

**Untersuchungen zur Funktion der DEAD-Box-RNA-Helikase DDX3 in der  
cap- und IRES-abhängigen Translation**

**Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Naturwissenschaftlichen Fakultät I  
Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von  
René Geißler  
geboren am 30. Dezember 1980 in Parchim

Gutachter

1. Prof. Dr. S.-E. Behrens
2. Prof. Dr. E. Wahle
3. Prof. Dr. M. Gromeier

Halle (Saale), 10. Juli 2012



**INHALTSVERZEICHNIS**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

**TABELLEN & ABBILDUNGEN**

<b>I</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>I.1</b>	<b>Molekularer Mechanismus der eukaryotischen Translation</b>	<b>1</b>
<b>I.2</b>	<b>Alternative Wege der Translationsinitiation</b>	<b>5</b>
<b>I.3</b>	<b>Das HCV-Replikonsystem - Charakterisierung der Funktion von zellulären Faktoren im Lebenszyklus von HCV</b>	<b>8</b>
<b>I.4</b>	<b>DDX3, ein Mitglied der Familie der DEAD-Box-RNA-Helikasen</b>	<b>12</b>
<b>I.5</b>	<b>Zielstellung der Arbeit</b>	<b>15</b>
<b>II</b>	<b>MATERIALIEN UND METHODEN</b>	<b>16</b>
<b>II.1</b>	<b>Materialien</b>	<b>16</b>
II.1.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterial	16
II.1.2	Kulturmedien und Antibiotika zur Anzucht von Bakterien und humanen Zelllinien	16
II.1.3	Bakterienstämme und deren Kultivierung	17
II.1.4	Humane Zelllinien und deren Kultivierung	17
II.1.5	Nucleotide	18
II.1.6	Oligonucleotide und siRNAs	18
II.1.7	Plasmide	19
II.1.8	Antikörper	23
<b>II.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>23</b>
II.2.1	Molekularbiologische Methoden	23
II.2.1.1	Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien	23
II.2.1.2	cDNA-Erststrangsynthese	24
II.2.1.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	24
II.2.1.4	Ortsgerichtete Mutagenese	25
II.2.1.5	Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)	25
II.2.1.6	Reinigung von DNA-Fragmenten	27
II.2.1.7	Spezifische Restriktionshydrolyse von DNA	28
II.2.1.8	Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen	28
II.2.1.9	Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen	28
II.2.1.10	Ligation von DNA-Fragmenten	29
II.2.1.11	Herstellung und Transformation chemisch kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	29
II.2.1.12	Präparation von Plasmid-DNA	29
II.2.1.13	DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse	30
II.2.1.14	<i>In vitro</i> -Transkription	30
II.2.1.15	Aminoacylierung der tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	31

II.2.1.16	Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren	32
II.2.1.16.1	Agarose-Gelelektrophorese	32
II.2.1.16.2	Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
II.2.1.17	Transfektion von RNA und DNA in humane Zelllinien	32
II.2.1.17.1	Kationische Polymer-vermittelte Transfektion von siRNAs und Plasmid-DNA	32
II.2.1.17.2	Elektroporation von Luciferase-Reporter- und HCV-Replikon-RNAs	33
II.2.1.18	Autoradiographie	34
II.2.2	Proteinbiochemische Methoden	34
II.2.2.1	Herstellung von cytoplasmatischen Huh7-Extrakten	34
II.2.2.2	Herstellung von Translations-kompetenten cytoplasmatischen Huh7-S10-Extrakten	34
II.2.2.3	Translationsreaktion und Translations-Initiationsreaktion <i>in vitro</i>	35
II.2.2.4	Auftrennung und Analyse von Translationskomplexen	36
II.2.2.5	Primer-Extensions-Inhibitions-Analyse ( <i>toe printing</i> )	37
II.2.2.6	<i>In vitro</i> -Assemblierung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen	38
II.2.2.7	Immunpräzipitation - Affinitätsreinigung	39
II.2.2.8	Proteinreinigung	40
II.2.2.8.1	Reinigung von ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten	40
II.2.2.8.2	Native Reinigung von eIF3 aus cytoplasmatischem HeLa-Extrakt	41
II.2.2.8.3	Native Reinigung von eIF2 aus cytoplasmatischem HeLa-Extrakt	42
II.2.2.8.4	Rekombinante Herstellung und Reinigung von DDX3 aus <i>E. coli</i>	42
II.2.2.8.5	Rekombinante Herstellung und Reinigung von eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF4G <sup>737-1116</sup> , eIF5, eIF5B <sup>587-1220</sup> und der <i>E. coli</i> -Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> -Synthetase aus <i>E. coli</i>	43
II.2.2.9	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	44
II.2.2.9.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	44
II.2.2.9.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Gill & von Hippel	44
II.2.2.10	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	44
II.2.2.11	Nachweis von Proteinen	45
II.2.2.11.1	Coomassie-Färbung	45
II.2.2.11.2	Western-Blot	45
II.2.2.11.3	Nachweis der Translationseffizienz von Reporter-RNAs	46
<b>II.3</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>46</b>
<b>III</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>47</b>
<b>III.1</b>	<b>DDX3 fördert die IRES- und cap-abhängige Translation</b>	<b>47</b>
III.1.1	siRNA-vermittelte Depletion von DDX3 im Cytoplasma reprimiert die HCV- und EMCV-IRES-abhängige Translation eines bi-cistronischen HCV-Replikons	47
III.1.2	Depletion von DDX3 vermindert die Translation und Replikation eines mono-cistronischen HCV-Replikons	49
III.1.3	DDX3 unterstützt generell die Translation	52
<b>III.2</b>	<b>DDX3 interagiert mit Translations-Initiationskomplexen</b>	<b>56</b>
III.2.1	DDX3 ist kein Bestandteil von Polysomen	56

III.2.2	DDX3 co-sedimentiert anteilig mit der ribosomalen 40S-Untereinheit	58
III.2.3	DDX3 interagiert mit Translations-Initiationsfaktoren und der ribosomalen 40S-Untereinheit	59
III.2.4	DDX3 interagiert direkt mit eIF3 und der ribosomalen 40S-Untereinheit	62
<b>III.3</b>	<b>DDX3 assoziiert an neu assemblierte 80S-Ribosomen</b>	<b>64</b>
III.3.1	DDX3 co-sedimentiert mit neu assemblierten 80S-Ribosomen während der Translationsinitiation an mRNA	65
III.3.2	DDX3 interagiert mit ca. 50% aller neu assemblierten 80S-Ribosomen	67
III.3.3	DDX3 co-sedimentiert mit neu assemblierten 80S-Ribosomen auch bei einer Translationsinitiation an einer IRES	69
III.3.4	DDX3 interagiert RNA-unabhängig mit neu assemblierten 80S-Ribosomen	72
<b>III.4</b>	<b>DDX3 fördert die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen <i>in vitro</i></b>	<b>74</b>
III.4.1	Depletion von DDX3 reduziert die cap- und IRES-abhängige Translation in Huh7-S10-Extrakten	74
III.4.2	DDX3 hat keine Funktion bei der Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes	75
III.4.3	Depletion von DDX3 hemmt die Ausbildung des 80S-Initiationskomplexes	79
<b>III.5</b>	<b>DDX3 fördert die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen in einer <i>in vitro</i>-rekonstituierten Translations-Initiationsreaktion mit gereinigten Komponenten</b>	<b>81</b>
III.5.1	Herstellung von Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup>	82
III.5.2	Herstellung und Reinigung der ribosomalen Untereinheiten, der Translations-Initiationsfaktoren und von DDX3	83
III.5.3	Rekombinant gereinigtes DDX3 fördert die Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes in einem <i>in vitro</i> -rekonstituierten Translationssystem	85
<b>III.6</b>	<b>Untersuchungen zur Rolle einzelner Proteindomänen von DDX3 während der Translation</b>	<b>89</b>
III.6.1	DDX3 fördert die Translation unabhängig von dessen ATPase- und Helikaseaktivität	89
III.6.2	DDX3 fördert die Translation ausschließlich mit vollständigem N-Terminus	91
<b>IV</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>96</b>
<b>V</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG/SUMMARY</b>	<b>112</b>
<b>VI</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>115</b>
<b>VII</b>	<b>ANHANG</b>	<b>127</b>
VII.1	Oligonucleotide	127
VII.2	siRNAs	130
<b>PUBLIKATIONSLISTE</b>		<b>131</b>
<b>DANKSAGUNG</b>		<b>133</b>
<b>LEBENS LAUF</b>		<b>134</b>

**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

**135**

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

Chemikalien (z.B. NaCl), Enzymbezeichnungen (z.B. *XbaI*), Maßeinheiten (z.B. min, µg, °C), der Aminosäurecode (z.B. Q, E, D), die Nucleobasen (A, C, G, T), Länder (z.B. USA) bzw. Bundesstaaten (z.B. CA, NY) sowie Puffer und Medien, die im Text näher erläutert werden, sind nicht im Abkürzungsverzeichnis aufgeführt. Für ein besseres Verständnis werden aus dem Englischen und Lateinischen übernommene Begriffe in der vorliegenden Arbeit kursiv dargestellt. Komplexe zusammengesetzte Begriffe werden zur besseren Lesbarkeit durch einen Bindestrich getrennt.

**Abkürzungen**

A	Aminoacyl-	<i>E. coli</i>	lat. <i>Escherichia coli</i>
Abb.	Abbildung	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ad</i>	lat. „zu“	eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
AG	Arbeitsgruppe	EMCV	Encephalomyocarditis Virus
APS	Ammoniumperoxodisulfat	engl.	Englisch
ATP	Adenosintriphosphat	ER	endoplasmatisches Retikulum
bp	Basenpaare	eRF	engl. <i>eukaryotic release factor</i>
BSA	bovines Serumalbumin	<i>et al.</i>	lat. „und andere“ ( <i>et alii</i> )
bzw.	beziehungsweise	F	Familie
C	HCV-Core-Protein	Fc	engl. <i>fragment crystallizable</i>
ca.	circa	FCS	fetales Kälberserum
5'cap	m <sup>7</sup> GpppG am 5'Ende von RNA	Flag-	Protein mit N-terminalem Flag- <i>tag</i>
CD	engl. <i>cluster of differentiation</i>	Flag- <i>tag</i>	Aminosäuresequenz DYKDDDDK
cDNA	engl. <i>complementary DNA</i>	FPLC	engl. <i>fast protein liquid chromatography</i>
CMV	Cytomegalovirus		
CRM	engl. <i>chromosome maintenance region</i>	G418	Geneticin
C <sub>t</sub>	engl. <i>cycle threshold</i>	GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
CTP	Cytidintriphosphat	GMP-PNP	Guanosin-5'-(β,γ-imido)-triphosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat	GTP	Guanosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat	H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	doppelt destilliertes, deionisiertes Wasser
DDT	Dithiothreitol		
DDX	DEAD-Box-RNA-Helikase	HBV	Hepatitis B Virus
DEAE	Diethylaminoethyl-	HCV	Hepatitis C Virus
Ded1	DDX3-homologes Protein aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	HDV	Hepatitis Delta Virus
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat	Hek	engl. <i>human embryonic kidney</i>
DHX	DEAH-Box-RNA-Helikase	HeLa	Henrietta Lacks (Helen Lane)
DMEM	engl. <i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>	His-	Protein mit N-terminalem His- <i>tag</i>
DNA	Desoxyribonucleinsäure	His- <i>tag</i>	Aminosäuresequenz HHHHHH
DNase	Desoxyribonuclease	HIV	engl. <i>human immunodeficiency virus</i>
dNTPs	Desoxyribonucleosidtriphosphate	hnRNP	engl. <i>heterogeneous nuclear RNP</i>
ds	doppelsträngig	HRP	engl. <i>horseradish peroxidase</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat	HSP	engl. <i>heat shock protein</i>
E	engl. <i>envelope</i>	Huh	engl. <i>human hepatocellular carcinoma</i>
		IBs	engl. <i>inclusion bodies</i>

IFN	Interferon	RT	Raumtemperatur
IGF2BP	engl. <i>insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein</i>	RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
IgG	Immunglobulin G	RWTH	Rheinisch-Westfälische Technische Hochschule Aachen
IP	Immunpräzipitation	SDS	Natriumdodecylsulfat
IPB	Immunpräzipitationspuffer	SF	Superfamilie
IRES	engl. <i>internal ribosome entry site</i>	s.g.	so genannt
JFH	engl. <i>Japanese fulminant hepatitis</i>	SGR	engl. <i>subgenomic replicon</i>
lat.	Lateinisch	siRNA	engl. <i>short interfering RNA</i>
LB	Luria-Bertani	sORF	engl. <i>short ORF</i>
Luc	Luciferase	ss	einzelsträngig
Met	Methionin	SUMO	engl. <i>small ubiquitin-like modifier</i>
MN	Micrococcus-Nuclease	Tab.	Tabelle
MOPS	3-(N-morpholino)-1-propansulfonsäure	TAP	engl. <i>tip-associated protein</i>
mRNA	engl. <i>messenger RNA</i>	TC	engl. <i>ternary complex</i>
Mut	Mutante	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
NEAA	engl. <i>non-essential amino acids</i>	T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
Neo	Neomycin-Phosphotransferase II	tRNA	engl. <i>transfer RNA</i>
NFAR	engl. <i>nuclear factors associated with dsRNA</i>	u.a.	unter anderem
NIID	National Institute of Infectious Diseases	ubi	Ubiquitin
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure	UTR	untranslatierte Region
NP-40	Nonidet P-40	UV	ultraviolett
Nr.	Nummer	Vasa	DEAD-Box-RNA-Helikase aus <i>Drosophila melanogaster</i>
NS	Nichtstrukturprotein	v/v	Volumen pro Volumen
nt	Nucleotid	vgl.	vergleiche
OD <sub>260</sub>	optische Dichte bei 260 nm	w	Masse
OD <sub>280</sub>	optische Dichte bei 280 nm	WNV	West Nil Virus
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei 600 nm	WT	Wildtyp
ORF	engl. <i>open reading frame</i>	w/v	Masse pro Volumen
P	Peptidyl-	z.B.	zum Beispiel
PAA	Polyacrylamid	∞	unendlich
PABPC	poly(A)-Bindepotein C		
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese		
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		
PES	Polyethersulfon		
PIC	Präinitiationskomplex		
PV	Poliovirus		
PVDF	Polyvinylidendifluorid		
Rev	engl. <i>regulator of virion expression</i>		
RHA	RNA-Helikase A		
RNA	Ribonucleinsäure		
RNase	Ribonuclease		
RNP	Ribonucleoprotein		
rpL	engl. <i>ribosomal protein L (large subunit)</i>		
rpS	engl. <i>ribosomal protein S (small subunit)</i>		
RRL	engl. <i>rabbit reticulocyte lysate</i>		

## TABELLEN &amp; ABBILDUNGEN

Tabelle	Seite
<b>Tab. II-1:</b> Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien	16
<b>Tab. II-2:</b> Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika	17
<b>Tab. II-3:</b> Bezeichnung und Genotyp der verwendeten <i>E. coli</i> -Stämme	17
<b>Tab. II-4:</b> Bezeichnung der verwendeten Nucleosidtriphosphate	18
<b>Tab. II-5:</b> Bezeichnung, Antibiotikaresistenz und Herkunft der verwendeten Plasmide	19
<b>Tab. II-6:</b> Antikörper für Western-Blot und Immunpräzipitationen	23
<b>Tab. II-7:</b> PCR-Reaktionsansatz	25
<b>Tab. II-8:</b> PCR-Programm	25
<b>Tab. II-9:</b> Reaktionsbedingungen der qRT-PCR	26
<b>Tab. II-10:</b> Konzentrationen der dNTPs und ddNTPs in den A-, C-, G- und T-Terminationsstamm- lösungen für die <i>Taq</i> -Polymerase	38
<b>Tab. VII-1:</b> Sequenz und Schmelztemperatur der verwendeten Oligonucleotide	127
<b>Tab. VII-2:</b> Sequenzen der verwendeten siRNAs	130
Abbildung	Seite
<b>Abb. I-1:</b> Molekularer Mechanismus der eukaryotischen Translation.	4
<b>Abb. I-2:</b> Translationsinitiation an der HCV-IRES.	7
<b>Abb. I-3:</b> Translationsinitiation an der EMCV-IRES.	8
<b>Abb. I-4:</b> Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.	10
<b>Abb. I-5:</b> Strukturelle Organisation der HCV-Replikons.	11
<b>Abb. I-6:</b> Sequenzmotive von DEAD-Box-Proteinen und deren Interaktion mit ATP und RNA.	13
<b>Abb. I-7:</b> Postulierte Funktionen von DDX3 in der Genexpression.	14
<b>Abb. III-1:</b> Bi-cistronisches HCV-Replikon.	48
<b>Abb. III-2:</b> Depletion von DDX3 im Cytoplasma inhibiert die IRES-abhängige Translation eines bi- cistronischen HCV-Replikons.	49
<b>Abb. III-3:</b> Mono-cistronisches HCV-Replikon.	50
<b>Abb. III-4:</b> Depletion von DDX3 inhibiert die Translation und Replikation eines mono-cistronischen HCV-Replikons.	51
<b>Abb. III-5:</b> Transfektionskontrolle des mono-cistronischen HCV-Replikons in DDX3-depletierte Zellen.	51
<b>Abb. III-6:</b> Depletion von DDX3 inhibiert die Translation von HCV- und EMCV-Reporter-RNAs.	53
<b>Abb. III-7:</b> Depletion von DDX3 inhibiert die 5'cap-abhängige Translation.	55
<b>Abb. III-8:</b> DDX3 co-sedimentiert mit 80S-Ribosomen.	57
<b>Abb. III-9:</b> DDX3 co-sedimentiert mit der ribosomalen 40S-Untereinheit.	59
<b>Abb. III-10:</b> DDX3 interagiert mit der Translationsmaschinerie.	61
<b>Abb. III-11:</b> DDX3 co-präzipitiert mit mRNAs und der HCV-RNA.	62
<b>Abb. III-12:</b> DDX3 interagiert direkt mit eIF3 und der 40S-Untereinheit des 43S-PIC.	64
<b>Abb. III-13:</b> DDX3 interagiert spezifisch mit neu assemblierten 80S-Ribosomen.	66

---

<b>Abb. III-14:</b> Bestimmung der Stoffmenge von DDX3, die mit den neu assemblierten 80S-Ribosomen assoziiert ist.	<b>68</b>
<b>Abb. III-15:</b> DDX3 interagiert mit neu assemblierten 80S-Ribosomen an der HCV-RNA.	<b>70</b>
<b>Abb. III-16:</b> Die Translations-defiziente HCV-RNA assembliert keine Initiationskomplexe.	<b>72</b>
<b>Abb. III-17:</b> DDX3 interagiert RNA-unabhängig mit neu assemblierten 80S-Ribosomen.	<b>73</b>
<b>Abb. III-18:</b> Die cap- und HCV-IRES-abhängige Translation ist in DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakten reduziert.	<b>75</b>
<b>Abb. III-19:</b> Primer-Extensions-Inhibitions-Analyse ( <i>toe printing</i> ).	<b>76</b>
<b>Abb. III-20:</b> <i>Toe printing</i> -Analyse von 48S-Initiationskomplexen an einer mRNA und HCV-RNA in einem DDX3-depletierten Extrakt.	<b>78</b>
<b>Abb. III-21:</b> DDX3-Depletion hemmt die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen an der mRNA.	<b>80</b>
<b>Abb. III-22:</b> DDX3-Depletion hemmt die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen an der HCV-RNA.	<b>81</b>
<b>Abb. III-23:</b> Herstellung von tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> <i>in vitro</i> .	<b>83</b>
<b>Abb. III-24:</b> Native Reinigung der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten sowie von eIF2 und eIF3.	<b>84</b>
<b>Abb. III-25:</b> Reinigung von rekombinanten eIFs und von Flag-DDX3.	<b>85</b>
<b>Abb. III-26:</b> Test des gereinigten Flag-DDX3 auf die Präsenz kontaminierender Translations-Initiationskomponenten bzw. auf die Bildung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen.	<b>86</b>
<b>Abb. III-27:</b> Test auf Funktionalität der ribosomalen Untereinheiten.	<b>87</b>
<b>Abb. III-28:</b> Gereinigtes DDX3 stimuliert die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen <i>in vitro</i> .	<b>88</b>
<b>Abb. III-29:</b> DDX3 stimuliert die Translation, auch mit nicht funktionellen ATPase- und Helikase-Domänen.	<b>90</b>
<b>Abb. III-30:</b> Der N-Terminus von DDX3 ist essentiell für die Stimulierung der Translation.	<b>92</b>
<b>Abb. III-31:</b> Einfluss des N-Terminus von DDX3 auf die Stimulierung der Translation.	<b>94</b>
<b>Abb. IV-1:</b> Modell der Funktion von DDX3 in der Translationsinitiation.	<b>106</b>
<b>Abb. IV-2:</b> Post-transkriptionale Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionspartner von humanen DEAD-Box-RNA-Helikasen (DDX).	<b>109</b>

## I Einleitung

### I.1 Molekularer Mechanismus der eukaryotischen Translation

Die Genexpression reguliert alle biologischen Vorgänge einer Zelle. Dabei wird die auf einem Gen codierte Information in ein definiertes Expressionsprodukt umgesetzt. Zunächst entsteht durch die Transkription eines Gens eine prä-RNA, die anschließend noch im Zellkern prozessiert wird. Dazu werden die Introns durch Spleißen entfernt und bei Protein-codierenden RNAs (mRNAs - *messenger RNA*) eine 5'cap-Struktur durch Übertragen eines GMP-Nucleotids in Form einer 5',5'-Triphosphatbindung an das 5'Ende synthetisiert, welches im Anschluss methyliert wird (m<sup>7</sup>GpppN-cap). Am 3'Ende der RNA generiert dann die Poly(A)-Polymerase einen poly(A)-Bereich (Shatkin, 1976; Wahle & Rügsegger, 1999). Die prozessierte mRNA ist somit aus drei Teilbereichen aufgebaut. Am 5'Ende befindet sich eine untranslatierte Region (5'UTR), deren RNA-Struktur vollständig unstrukturiert bis komplex strukturiert variieren kann. Der 5'UTR folgt die Protein-codierende Sequenz (ORF - *open reading frame*) und eine 3'UTR, die ebenfalls eine unstrukturierte bis komplex strukturierte Organisation besitzen kann. Nach Transport der mRNA vom Zellkern in das Cytoplasma wird die Translation durch die Initiationsfaktoren (eIFs) und die ribosomalen Untereinheiten initiiert.

Der Translationsprozess umfasst vier Schritte: (1) die Initiation, (2) die Elongation, (3) die Termination und (4) das Ribosomen-Recycling (Jackson *et al.*, 2010). Jeder Schritt zeichnet sich dabei durch ein komplexes Zusammenspiel von Translationsfaktoren aus, die zur Ausbildung von Initiationskomplexen und translationsfähigen Ribosomen bis zur Wiederverwertung von Ribosomen am Ende einer Translationsreaktion beitragen. Den wichtigsten Schritt in diesem Translationsprozess nimmt die Initiationsreaktion ein, in deren Verlauf die ribosomalen Untereinheiten an das AUG-Startcodon der mRNA rekrutiert werden und die im Folgenden detailliert aufgezeigt wird.

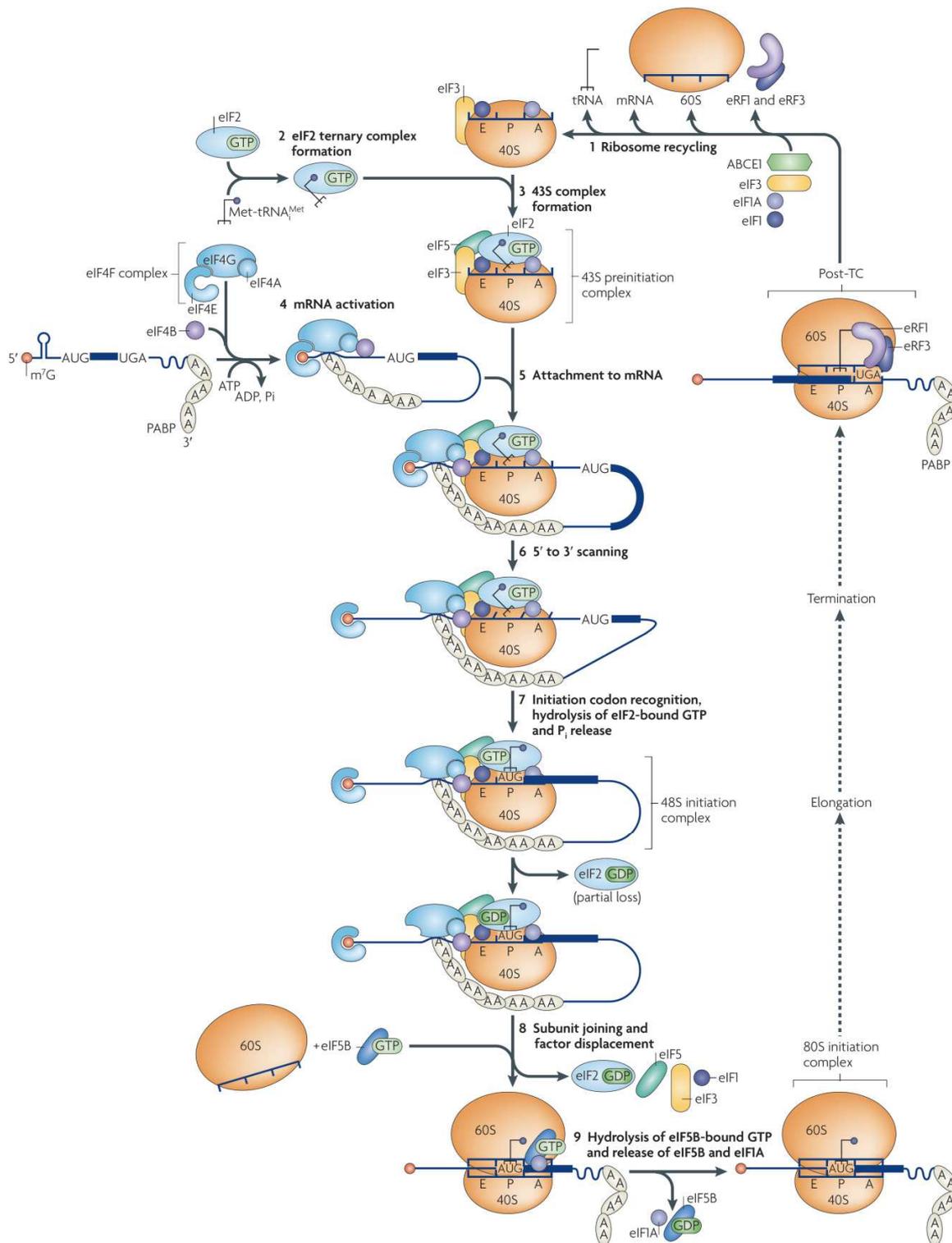
Die Voraussetzung für den Beginn der Initiationsphase der Translation ist die Bereitstellung von ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten. Dies wird erreicht durch die Dissoziation der 80S-Ribosomen, zum einen aus dem großen Pool von s.g. „freien“, d.h. nicht an mRNA-assoziierte 80S-Ribosomen (Cooper *et al.*, 1976; Otto & Puglisi, 2004) und zum anderen aus 80S-Ribosomen, die eine Translationsreaktion beendet haben (Abb. I-1 Schritt 1, Ribosomen-Recycling). Das Ribosomen-Recycling erfolgt durch die Translations-Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und eIF3. Diese Faktoren dissoziieren die RNA-gebundenen 80S-Ribosomen in die 60S-Untereinheiten und in die mRNA- bzw. tRNA-gebundenen 40S-Untereinheiten. eIF1 fördert anschließend die Freisetzung der assoziierten tRNA von der 40S-Untereinheit. Eine Reassoziierung wird durch die gebundenen Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und eIF3 an der 40S-Untereinheit verhindert (Pisarev *et al.*, 2007a; Jackson *et al.*, 2010). Ceci und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine Reassoziierung der ribosomalen Untereinheiten zudem durch die Bindung von eIF6 an die 60S-Untereinheit unterbunden wird (Ceci *et al.*, 2003).

Der erste Schritt in der Initiationsreaktion ist die Ausbildung des 43S-Präinitiationskomplexes (PIC). Der PIC besteht aus dem eIF2-Ternär-Komplex (eIF2-TC), der ein GTP und die mit Methionin beladene Initiator-tRNA enthält (eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>), den Translations-Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF3 und eIF5 sowie der ribosomalen 40S-Untereinheit (Abb. I-1 Schritte 2 und 3; Peterson *et al.*, 1979a; Olsen *et al.*, 2003). Während der Translationsinitiation wird der 43S-PIC an das 5' Ende der mRNA rekrutiert. Dieser Prozess wird durch den eIF4F-Komplex vermittelt, der sich aus der DEAD-Box-RNA-Helikase eIF4A, dem *scaffold*-Protein eIF4G und dem cap-Bindeprotein eIF4E zusammensetzt. eIF4E bindet dabei die 5' cap-Struktur. eIF4G, das im eIF4F-Komplex mit eIF4A und eIF4E interagiert, assoziiert sowohl mit eIF3 im 43S-PIC als auch mit dem poly(A)-Bindeprotein PABPC, das an den poly(A)-Bereich der mRNA bindet. Über diesen Vorgang wird die mRNA zirkularisiert und der weitere Ablauf der Translationsinitiation stimuliert (Tarun & Sachs, 1996; Imataka *et al.*, 1998; Gingras *et al.*, 1999; Kahvejian *et al.*, 2005). Die Bindung des eIF4F-Komplexes an die mRNA hat zur Folge, dass die Sekundärstruktur der 5' cap-proximalen Region partiell entwunden wird. Diese Entwindung wird durch eIF4A unter kooperativer Mitwirkung von eIF4B katalysiert. Rogers und Mitarbeiter konnten nachweisen, dass der Initiationsfaktor eIF4B in diesem Prozess die Helikaseaktivität von eIF4A stimuliert (Rogers *et al.*, 2001). Die anschließende Entwindung der Sekundärstrukturen in der Nähe des 5' caps ermöglicht die Assoziation des 43S-PIC über die 40S-Untereinheit an die mRNA (Abb. I-1 Schritte 4 und 5). Nach der Rekrutierung des 43S-PIC *scannt* die 40S-Untereinheit mit den assoziierten Translations-Initiationsfaktoren die mRNA in 5'-3'-Richtung vom 5' cap bis zum AUG-Startcodon, an dem sich dann eine Basenpaarung mit dem Anticodon der Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> ausbilden kann (Abb. I-1 Schritt 6; Cigan *et al.*, 1988). eIF4A unterstützt dabei die Entwindung von RNA-Sekundärstrukturen im *scanning*-Prozess, der somit ATP-abhängig ist. Der Verbrauch von ATP ist proportional zum Grad der Strukturierung der 5'UTR (Jackson, 1991; Svitkin *et al.*, 2001b). Es gibt Hinweise darauf, dass dieses *scanning* zusätzlich durch die Initiationsfaktoren eIF1 und eIF1A unterstützt wird, die die 40S-Untereinheit in einer *scanning*-kompetenten Konformation halten (Passmore *et al.*, 2007). Nach Erkennung des Initiationscodons erfolgt die eIF5-vermittelte GTP-Hydrolyse von eIF2 (Peterson *et al.*, 1979b; Paulin *et al.*, 2001). Dieses führt zur Verringerung der Affinität von eIF2 zur Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> und somit zur Ausbildung des s.g. 48S-Initiationskomplexes (Abb. I-1 Schritt 7). Um zwischen falschen Basen-paarungen des Anticodons der Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> in der 5'UTR zu diskriminieren, ist das AUG-Startcodon meist Teil einer Konsensussequenz GCC(A/G)CCAUGG (Kozak-Konsensus-sequenz; Kozak, 1986). eIF1 nimmt dabei eine Schlüsselrolle ein, denn es ermöglicht dem 43S-PIC vermutlich das AUG-Startcodon von nicht-AUG-Codons zu unterscheiden (Pestova *et al.*, 1998a; Pestova & Kolupaeva, 2002; Pisarev *et al.*, 2006).

Der letzte Schritt der Translations-Initiationsreaktion ist die Assemblierung eines funktionellen 80S-Ribosoms (80S-Initiationskomplex), das auch als 60S-*subunit joining*

bezeichnet wird. In diesem Schritt katalysiert eIF5B, welches eine Ribosomen-abhängige GTPase ist, die Anlagerung der 60S-Untereinheit an den 48S-Initiationskomplex (Pestova *et al.*, 2000). Weiterhin werden die Initiationsfaktoren eIF1, eIF2-GDP, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G und eIF5 simultan aus dem 48S-Initiationskomplex freigesetzt (Abb. I-1 Schritte 8 und 9). eIF5B hat die Funktion, eIF2 partiell von der 40S-Untereinheit freizusetzen. Die Hydrolyse von eIF5B-gebundenem GTP wird hierbei durch die 60S-Untereinheit induziert, ist aber nicht essentiell für das 60S-*subunit joining* (Jackson *et al.*, 2010). Vielmehr gewährleistet die Hydrolyse die eigene Freisetzung von eIF5B und eIF1A aus dem assemblierten 80S-Ribosom, durch das dieses Elongations-kompetent wird (Pestova *et al.*, 2000). Dieser Prozess wird zusätzlich durch eine Interaktion von eIF1A mit eIF5B beschleunigt (Olsen *et al.*, 2003; Acker *et al.*, 2006; Acker *et al.*, 2009).

Die zum folgenden mRNA-Codon komplementäre Aminoacyl-tRNA kann nun mit der Aminoacylbindestelle (A-Bindestelle) des 80S-Ribosoms assoziieren und die erste Peptidbindung der Elongationsreaktion ausbilden. Während der Elongationsphase der Translation wird die genetische Information der mRNA in eine Proteinsequenz translatiert. Die Termination der Translation wird durch das Stoppen der Elongationsreaktion an den mRNA-Stopcodons (UAA, UAG, UGA) initiiert, da für diese Codons keine komplementäre Aminoacyl-tRNA existiert. Durch die Terminationsfaktoren eRF1 und eRF3 (*eukaryotic release factors*) wird die Polypeptidkette von der Polypeptidyl-tRNA freigesetzt (Kisselev *et al.*, 2003). Anschließend erfolgt die Dissoziation des 80S-Ribosoms von der mRNA (Abb. I-1 Schritt 1).



**Abb. I-1: Molekularer Mechanismus der eukaryotischen Translation.** Der Translationsprozess an einer mRNA wird in vier Schritte unterteilt: Initiation, Elongation, Termination und Ribosomen-Recycling. Die Initiationsreaktion wird zusätzlich in acht Phasen (2-9) unterschieden: (2) Bildung des Ternär-Komplexes (TC) eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, (3) Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes (PIC), (4) mRNA-Aktivierung durch Bindung des eIF4F-Komplexes an die 5'cap-Struktur der mRNA, (5) Bindung des 43S-PIC an den eIF4F-Komplex und der mRNA, (6) *Scanning* des 43S-PIC entlang der 5'UTR in 5'-3'-Richtung, (7) Erkennung des AUG-Startcodons und Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes, (8) 60S-subunit joining zum 80S-Initiationskomplex, katalysiert durch eIF5B, (9) Freisetzung von eIF1A und eIF5B zur Assemblierung eines Elongationskompetenten 80S-Ribosoms. Der Initiationsreaktion schließt sich die Elongation und die Termination an, die vom (1) Ribosomen-Recycling gefolgt wird, das zur Dissoziation der 80S-Ribosomen in die ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten führt. Abbildung aus Jackson *et al.* (2010).

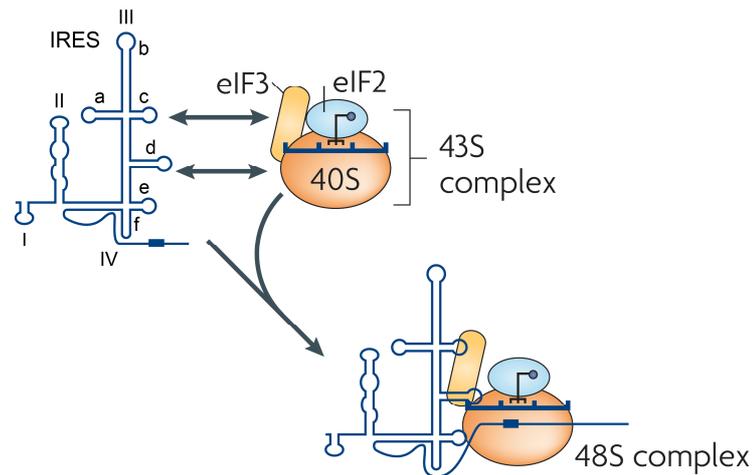
## I.2 Alternative Wege der Translationsinitiation

Bei einer Vielzahl von Viren, insbesondere (+)-Strang-RNA-Viren, hat sich ein alternativer Mechanismus der Translationsinitiation über eine interne Ribosomenbindestelle (IRES) in der 5'UTR entwickelt. Ursprünglich entdeckt wurde dieser Mechanismus an der viralen RNA des Poliovirus (PV) und des Encephalomyocarditis Virus (EMCV; Jang *et al.*, 1988; Pelletier & Sonenberg, 1988). Aufbauend auf diesen Arbeiten wurden zahlreiche weitere IRES-Elemente bei (+)-Strang-RNA-Viren, wie den Picornaviren und Hepaciviren (z.B. HCV - Hepatitis C Virus), aber auch bei mRNAs, die von DNA-Viren codiert werden, wie dem Herpes-Virus sowie zellulären mRNAs identifiziert (Baird *et al.*, 2006). Die IRES ist ein spezifisch gefaltetes Sekundär- bzw. Tertiärstrukturelement der RNA, an das der 43S-PIC zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes direkt binden kann. Somit erfolgt die Initiation der Translation 5'cap-unabhängig und auch unabhängig von den meisten Initiationsfaktoren. Der weitere Verlauf der Translation, der die Assemblierung eines 80S-Ribosoms, die Elongations- und die Terminationsreaktion beinhaltet, erfolgt dagegen analog zu 5'cap-mRNAs (Jackson *et al.*, 2010).

Im Falle der HCV-IRES liegt einer der einfachsten Initiationsmechanismen der Translation vor, der sich durch ein Minimum an essentiellen Initiationsfaktoren zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes auszeichnet und im Folgenden vorgestellt wird. Die Initiation erfolgt nach einem 5'cap-unabhängigen Mechanismus, da das 5'Ende der 5'UTR des HCV-RNA-Genoms keine cap-Struktur besitzt und auch ohne die Beteiligung der Faktoren eIF4B und eIF4F (Abb. I-2; Pestova *et al.*, 1998b; Jackson *et al.*, 2010). Die 5'UTR wird in vier Domänen unterteilt (I-IV). Das IRES-Element wird dabei von den Domänen II-IV und zusätzlich von ca. 40 Nucleotiden der codierenden Sequenz des Core-Proteins gebildet (Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992; Wang *et al.*, 1993; Reynolds *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1999). Die ersten 40 Nucleotide der 5'UTR (Domäne I) sind für die IRES-abhängige Translation nicht essentiell (Pestova *et al.*, 1998b), werden aber für eine fördernde (Fukushi *et al.*, 1994; Luo *et al.*, 2003) bzw. reprimierende (Rijnbrand *et al.*, 1995; Grassmann *et al.*, 2005) Wirkung auf die IRES kontrovers diskutiert. Die Domänen IIIc, IIIId, IIIe und IIIf bilden den Kern der HCV-IRES (Abb. I-2) und vermitteln die direkte Bindung der 40S-Untereinheit des 43S-PIC an die HCV-RNA. Diese Interaktion führt zur Konformationsänderung in der 40S-Untereinheit, so dass das AUG-Startcodon in der Domäne IV direkt in der Peptidylbindestelle (P-Bindestelle) der 40S-Untereinheit ohne die Notwendigkeit eines *scanning*-Prozesses positioniert wird (Honda *et al.*, 1996; Pestova *et al.*, 1998b; Kieft *et al.*, 2001). Die Bindung der 40S-Untereinheit an die IRES und die Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes wird zusätzlich durch die direkte Interaktion von eIF3 mit den Domänen IIIa, IIIb und IIIc der HCV-IRES unterstützt (Pestova *et al.*, 1998b; Kieft *et al.*, 2001). Nach der Rekrutierung des eIF2-TC durch eIF3 erfolgt, wie auch bei der Initiation an der 5'cap-mRNA, die eIF5-katalysierte Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP und das 60S-*subunit joining* zur Ausbildung des 80S-Ribosoms. Dieses wird wiederum durch eIF5B vermittelt

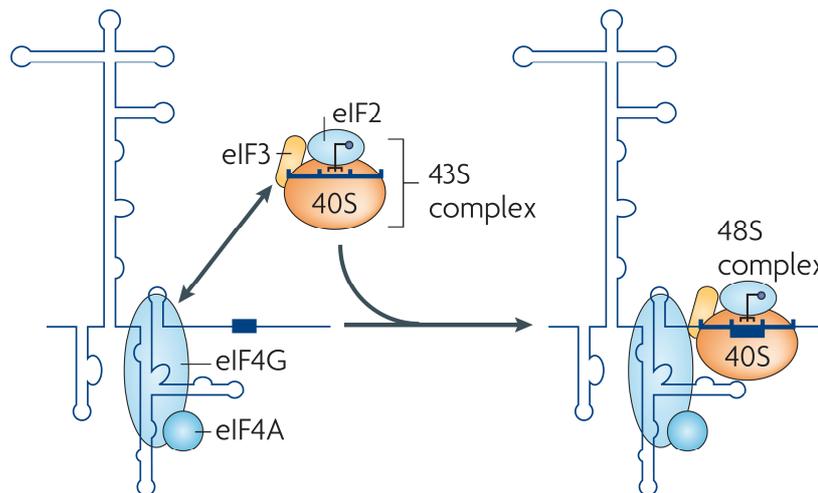
(Pestova *et al.*, 2000). Interessanterweise wurde alternativ zu diesem Mechanismus auch eine eIF2-unabhängige Initiation beschrieben (Terenin *et al.*, 2008). So konnte gezeigt werden, dass zur Assemblierung eines 80S-Ribosoms lediglich die Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, eIF3 und eIF5B sowie die ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten benötigt werden. In diesem Prozess übernimmt wahrscheinlich eIF5B die Stabilisierung und die Bindung der Initiator-tRNA an die 40S-Untereinheit. Über diesen Mechanismus kann die HCV-IRES auch bei zellulären Stressbedingungen, in denen die eIF2-vermittelte Initiation durch Phosphorylierung der eIF2 $\alpha$ -Untereinheit blockiert ist, die Translation initiieren.

Wie bereits oben aufgezeigt, enthalten die meisten mRNAs eine 5'cap-Struktur und einen poly(A)-Bereich am 3'Ende, so dass durch Bindung des eIF4F-Komplexes und PAPBC eine 5'-3'-Interaktion ermöglicht wird, die die Translation stimuliert. Die HCV-RNA besitzt jedoch keinen poly(A)-Bereich am 3'Ende, sondern eine 3'UTR, die sich durch drei Strukturelemente auszeichnet (Kolykhalov *et al.*, 1996): (1) eine nichtkonservierte variable Region, (2) ein einzelsträngiger poly(U/C)-Bereich (Tanaka *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1996) und (3) eine hochkonservierte Sequenz von 98 Nucleotiden (3'X-Region), die drei *stem-loops* ausbildet (Tanaka *et al.*, 1995). Es gibt Hinweise darauf, dass im Falle von HCV eine Zirkularisierung der viralen RNA durch zelluläre Proteine, die s.g. NFAR-Proteine (*nuclear factors associated with dsRNA*) NF90, NF45 und RHA (RNA-Helikase A) begünstigt wird, die an die 5'- und 3'UTR der HCV-RNA binden (Isken *et al.*, 2007). Darüber hinaus wurden RNA-RNA-Interaktionen des *stem-loop* SL3 des 3'Endes des viralen ORFs mit der IRES nachgewiesen (Romero-Lopez & Berzal-Herranz, 2009). Der potentielle Einfluss der HCV-3'UTR auf die IRES-vermittelte Translation wird dagegen kontrovers diskutiert. Untersuchungen zeigten eine fördernde Wirkung der 3'UTR (Ito *et al.*, 1998; McCaffrey *et al.*, 2002), keinen Einfluss (Fang & Moyer, 2000; Kong & Sarnow, 2002; Imbert *et al.*, 2003) bzw. einen inhibitorischen Effekt (Murakami *et al.*, 2001) auf die IRES-initiierte Translation. Verschiedene Faktoren, z.B. Proteine oder RNAs, die diese Effekte vermitteln, konnten bisher nur mit dem Protein IGF2BP1 (*insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1*) identifiziert werden. Durch die Bindung an die HCV-3'UTR verstärkt IGF2BP1 möglicherweise die HCV-IRES-vermittelte Translation (Weinlich *et al.*, 2009).



**Abb. I-2: Translationsinitiation an der HCV-IRES.** Schematische Darstellung der HCV-5'UTR, bestehend aus der Domäne I und dem IRES-Element (Domäne II, IIIa-f, IV). Die HCV-IRES bindet direkt den 43S-PIC ohne einen *scanning*-Prozess an das AUG-Startcodon. Dies wird durch die Interaktion von eIF3 mit den Domänen IIIa, IIIb und IIIc und der 40S-Untereinheit mit den Domänen IIIc, IIId, IIIe und IIIf der IRES ermöglicht und führt zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes. Die Abbildung wurde nach Jackson *et al.* (2010) modifiziert.

Die Translationsinitiation an der IRES des Encephalomyocarditis Virus findet ebenfalls ohne die meisten der in der 5' cap-abhängigen Translation involvierten Initiationsfaktoren statt. Die Initiation erfolgt wie an der HCV-IRES, ebenfalls unabhängig vom cap-Bindeprotein eIF4E, da das virale RNA-Genom auch keine 5' cap-Struktur enthält (Pestova *et al.*, 1996a; Pestova *et al.*, 1996b). Der Initiationsprozess beginnt mit der Bindung eines eIF4G-eIF4A-Komplexes an eine *stem-loop*-Struktur in unmittelbarer Nähe des AUG-Startcodons, was durch eIF4G vermittelt wird (Abb. I-3; Kolupaeva *et al.*, 1998; Niepmann, 2009). Die RNA-Bindung von eIF4G wird dabei durch eIF4A stimuliert (Lomakin *et al.*, 2000). Nach der Bindung von eIF4G und der Ausbildung der Interaktion zu eIF3 wird der 43S-PIC an das AUG-Startcodon wiederum ohne einen *scanning*-Prozess zur Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes rekrutiert (Abb. I-3; Kaminsky *et al.*, 1990). Die anschließende Assemblierung eines 80S-Ribosoms erfolgt nach dem gleichen Mechanismus wie in der 5' cap-abhängigen Translationsinitiation (Jackson *et al.*, 2010). Stimuliert wird die EMCV-IRES-vermittelte Translationsinitiation zusätzlich durch einen poly(A)-Bereich am 3'Ende des viralen Genoms (Abb. I-3; Bergamini *et al.*, 2000; Michel *et al.*, 2000; Svitkin *et al.*, 2001a).



**Abb. I-3: Translationsinitiation an der EMCV-IRES.** Die IRES-Domäne *downstream* der zentralen Domäne bindet den eIF4G-eIF4A-Komplex. Diese Faktoren rekrutieren über die eIF4G-eIF3-Interaktion die 40S-Untereinheit des 43S-PIC ohne einen *scanning*-Prozess an das AUG-Startcodon der IRES und führen zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes. Die Abbildung wurde nach Jackson *et al.* (2010) modifiziert.

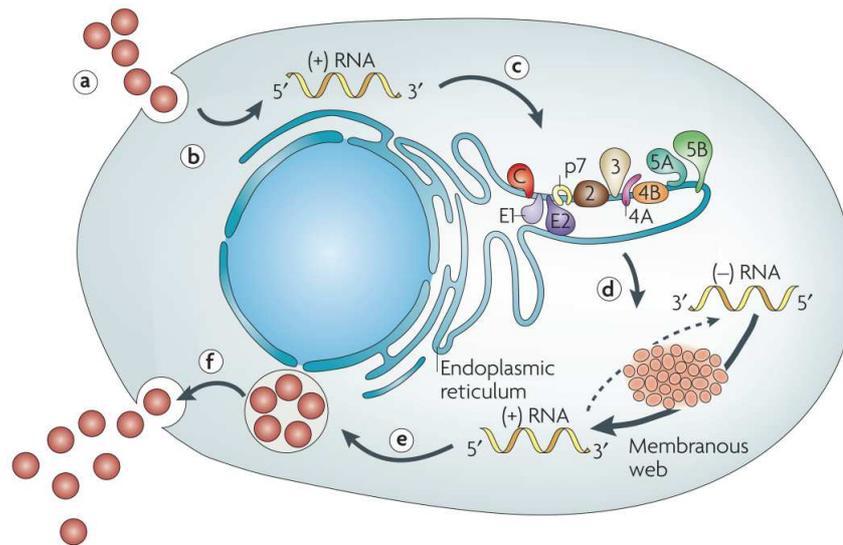
Die Entdeckung dieser alternativen Mechanismen der Translationsinitiation an IRES-Strukturen viraler RNAs ermöglichte es, gezielt die Funktion von zellulären Faktoren im Translationsprozess zu charakterisieren, wie es bei der Untersuchung am 5'cap-abhängigen Initiationsprozess nur schwer möglich gewesen wäre. Förderlich war dabei, dass diese vereinfachten Initiationsmechanismen nur wenige Translations-Initiationsfaktoren benötigen. Weiterhin ließ sich bei Verwendung dieser IRES-Elemente auch die Translation und Replikation im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus untersuchen, der im Folgenden vorgestellt wird. Dies beinhaltete auch die Charakterisierung von Faktoren, wie Proteine und RNAs, die essentiell für diese Prozesse sind.

### I.3 Das HCV-Replikonsystem - Charakterisierung der Funktion von zellulären Faktoren im Lebenszyklus von HCV

Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Zellkultursystems war es lange Zeit schwer möglich, den Lebenszyklus des Hepatitis C Virus zu untersuchen. HCV besitzt ausschließlich den Menschen als natürlichen Wirt und vermehrt sich in der Leber. Nach einer Infektion manifestiert sich das HCV sehr langsam. Eine Erkrankung beginnt mit Grippe-ähnlichen Symptomen, wie Fieber oder Müdigkeit und führt langfristig zu Leberzirrhosen, Leberkrebs und schließlich zum Leberversagen (Colvin & Mitchell, 2010). Die infektiösen HCV-Partikel bestehen aus einer Lipidmembran, in die zwei Glykoproteine (E1 und E2) eingelagert sind (Selby *et al.*, 1993). Diese Lipidmembran umhüllt ein Nucleocapsid, das aus dem HCV-Core-Protein gebildet wird und das virale Genom des HCV enthält (Penin *et al.*, 2004). Zum Lebenszyklus des HCV ist bisher Folgendes bekannt. Der erste Schritt des HCV-Infektionszyklus ist die Bindung des Virus an verschiedene Rezeptoren der Zelle (Abb. I-4; Lindenbach, 2007). Danach erfolgt dessen Aufnahme in die Zelle, vermutlich über eine

Clathrin-vermittelte Endozytose (Blanchard *et al.*, 2006). Die anschließende Freisetzung des HCV-Genoms ins Cytoplasma wird durch eine pH-Absenkung im Endosom und der damit verbundenen Verschmelzung der Virushülle mit der Endosomenmembran ermöglicht (Hsu *et al.*, 2003; Tscherne *et al.*, 2006). Das virale Genom ist eine einzelsträngige (ss) (+)-Strang-RNA mit einer Länge von ca. 9,6 kb und enthält, wie bereits aufgezeigt, keine 5'cap-Struktur und keinen poly(A)-Bereich, sondern komplex strukturierte 5'- und 3'UTRs, die den offenen Leserahmen flankieren. Aufgrund der positiven Orientierung wird die ins Cytoplasma freigesetzte HCV-RNA unmittelbar über die IRES-vermittelte Translation in ein Polyprotein mit ca. 3000 Aminosäuren translatiert (vgl. Abschnitt I.2 für den Mechanismus der HCV-IRES-abhängigen Translation). Die Proteinsynthese erfolgt am rauen endoplasmatischen Retikulum (ER; Lindenbach, 2007). Dadurch wird das Polyprotein in der ER-Membran über Transmembranhelices verankert und co- bzw. post-translational in die reifen viralen Strukturproteine C, E1, E2, das Membranprotein p7 und die Nichtstrukturproteine (NS) NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A sowie NS5B gespalten (Abb. I-4). Die Strukturproteine und das Protein p7 werden durch die ER-Signalpeptidase prozessiert (Hijikata *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994; Hüsey *et al.*, 1996), dagegen werden die NS-Proteine durch die viralen Proteasen NS2/3 und NS3/4A gespalten (Grakoui *et al.*, 1993; Hijikata *et al.*, 1993; Tomei *et al.*, 1993).

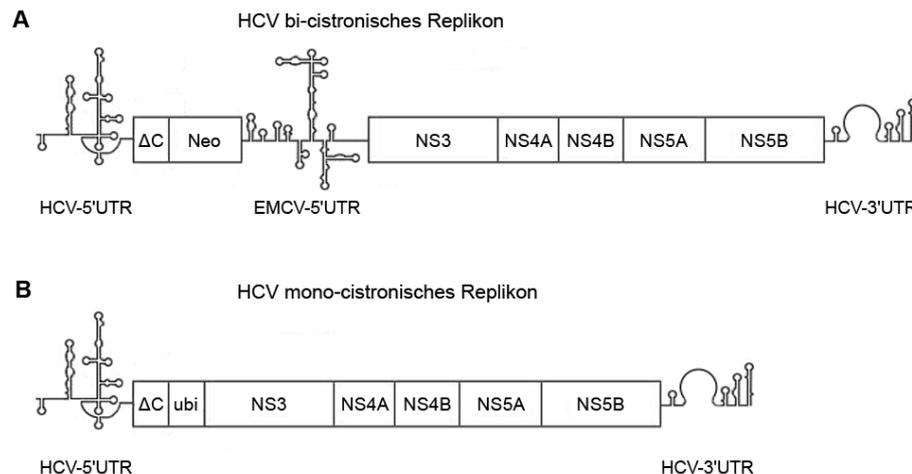
Wie bei allen (+)-Strang-RNA-Viren wird das Genom für die Replikation in einen Membran- gebundenen Replikationskomplex rekrutiert (Abb. I-4; Lindenbach, 2007). Dabei assoziieren die NS-Proteine und die HCV-RNA mit der perinucleären Matrix und bilden ein s.g. membranöses Netzwerk (*membranous web*) aus (Gosert *et al.*, 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass dieses Netzwerk durch NS4B induziert wird (Egger *et al.*, 2002). Eine Schlüsselrolle in diesem Replikationsprozess besitzt die RNA-abhängige RNA-Polymerase NS5B (Behrens *et al.*, 1996), welche die Replikation am 3'Ende der 3'UTR vermutlich *de novo* initiieren kann (Luo *et al.*, 2000; Oh *et al.*, 2000; Zhong *et al.*, 2000). Die Vervielfältigung der viralen RNA erfolgt über ein (-)-Strang-RNA-Intermediat, das für multiple Runden der (+)-Strang-RNA-Synthese verwendet wird. Sowohl die (-)-Strang-RNA als auch die (+)-Strang-RNA werden von der NS5B-Polymerase mit Unterstützung der NS-Proteine NS2-NS5A synthetisiert. Die neu synthetisierte (+)-Strang-RNA wird dann für zusätzliche Synthesen des (-)-Strangs und für weitere Runden in der Translation verwendet (Bartenschlager *et al.*, 2004). Des Weiteren wird die neu generierte (+)-Strang-RNA in neue Viruspartikel verpackt, die in den letzten Schritten des Lebenszyklus von HCV zu infektiösen Viruspartikeln heranreifen und aus der Zelle freigesetzt werden (Abb. I-4).



**Abb. I-4: Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.** Schematische Darstellung des Lebenszyklus des HCV: a) Virusbindung und Aufnahme in die Zelle, b) Freisetzung der (+)-Strang-RNA in das Cytoplasma, c) IRES-vermittelte Translation und Prozessierung des Polyproteins, d) Replikation der HCV-RNA über ein (-)-Strang-RNA-Intermediat, e) Verpackung des viralen Genoms und Virusassemblierung, f) Virusreifung und Freisetzung aus der Zelle. Abbildung aus Moradpour *et al.* (2007).

Untersuchungen des Translations- und RNA-Replikationsprozesses von HCV waren vor allem durch die Entwicklung eines RNA-Replikonsystems möglich, das analog zu anderen (+)-Strang-RNA-Viren erstmals aus einem HCV-1b-Isolat entwickelt wurde (Lohmann *et al.*, 1999). Replikons sind RNA-Moleküle, die für Proteine codieren, die eine vollständige Replikation der RNA ermöglichen. Der Prototyp der subgenomischen HCV-Replikons war eine s.g. „bi-cistronische“ RNA. Für die Generierung dieser RNA wurden die codierenden Regionen der Strukturproteine, des Proteins p7 und von NS2 des HCV-Genoms durch die codierende Region für den Selektionsmarker Neomycin-Phosphotransferase II (Neo) ersetzt, der eine Neomycin-/Geneticinresistenz (G418) vermittelt. Durch diese Antibiotikaresistenz konnten nach Transfektion der RNA in geeignete Zellen, Replikon-haltige Zellen generiert und selektiert werden. Hierbei erwies sich die Huh7-Zelllinie (*human hepatocellular carcinoma*) als optimal (Lohmann *et al.*, 1999). In den bi-cistronischen Replikons erfolgt die Translation der Neo-RNA über die HCV-IRES, während die Synthese der viralen NS-Proteine NS3, NS4A, NS4B, NS5A und NS5B durch die Initiation der Translation an einer zweiten, heterologen IRES des Encephalomyocarditis Virus erfolgt (Abb. I-5 A). Die ersten entwickelten Replikons zeigten nur eine geringe Replikationseffizienz. Wie sich dann aber zeigte, konnte diese durch s.g. adaptive Mutationen, die während des Selektionsprozesses in der viralen RNA in den Huh7-Zellen akkumulierten, deutlich gesteigert werden (Blight *et al.*, 2000; Krieger *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001; Bukh *et al.*, 2002; Lohmann *et al.*, 2003). Aus einem japanischen Patienten, der unter einer fulminanten Hepatitis C litt, konnte dann im Jahr 2003 eine HCV-RNA isoliert werden, deren Replikons auch ohne adaptive Mutationen effizient in Huh7-Zellen replizierten (Kato *et al.*, 2003b). Das Besondere bei diesem Klon war, dass mit der Transfektion des vollständigen RNA-Genoms sogar infektiöse Viruspartikel

generiert werden konnten (Wakita *et al.*, 2005). So beruhen alle derzeit verwendeten Zellsystems, die das vollständige HCV-Genom verwenden, zu großen Teilen auf diesem Isolat (JFH1 - *Japanese fulminant hepatitis 1*). Mit dem JFH1-Klon war es auch erstmals möglich mono-cistronische HCV-Replikons herzustellen, die einen effizienten Vermehrungszyklus in Zellkultur zeigten. Hier wird die Translation und Replikation ausschließlich über die 5'- und 3'UTR des HCV vermittelt (Abb. I-5 B). Somit stellt dieses System bis heute das leistungsfähigste Werkzeug dar, um den Translations- und Replikationsprozess des Hepatitis C Virus im Zellsystem nachzustellen und zu charakterisieren.



**Abb. I-5: Strukturelle Organisation der HCV-Replikons.** (A, B) Schematische Darstellung des Aufbaus subgenomischer HCV-Replikons. Die untranslatierten Bereiche (UTRs) sind als Linien gekennzeichnet und repräsentieren die vorgeschlagene Sekundärstruktur, die viralen und nichtviralen (Neo, ubi) genetischen Einheiten sind eingerahmt. (A) Bi-cistronisches RNA-Replikon. Die Expression des Neo-Selektionsmarkers ermöglicht die Generierung von G418-resistenten Replikon-enthaltenden Huh7-Zellen. (B) Mono-cistronisches HCV-Replikon.  $\Delta C$ : Core-Protein-codierendes Element des HCV, das die effiziente HCV-IRES-vermittelte Translation unterstützt (Lohmann *et al.*, 1999). ubi: Ubiquitin-codierende Sequenz, die die authentische Prozessierung des N-Terminus von NS3 durch die Ubiquitin-Carboxyl-Hydrolase ermöglicht.

Die Identifizierung von Wirtsfaktoren, die von Seiten der Zelle bereitgestellt werden und für den Lebenszyklus des HCV, insbesondere dem Translations- und Replikationsprozess, fördernd bzw. essentiell sind, erlangte in den letzten Jahren eine immer größer werdende Bedeutung. Durch den Einsatz der siRNA-Technologie in der Zellkultur (Elbashir *et al.*, 2001) in Kombination mit dem HCV-Replikonsystem konnten gezielt Faktoren identifiziert werden, die eine potenzielle Funktion im HCV-Lebenszyklus besitzen. Mit der Massenspektrometrie zur Detektion von Proteinen konnte zudem eine Vielzahl an zellulären Proteinen identifiziert werden, die mit der RNA bzw. Proteinen des HCV interagieren (Lu *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2006; Tingting *et al.*, 2006; Isken *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2007; Weinlich *et al.*, 2009). Zwei Arbeiten konnten auf diese Weise auch das Enzym DDX3 als 5'- und 3'UTR- bzw. nur als 3'UTR-assoziiertes Protein der HCV-RNA nachweisen (Harris *et al.*, 2006; Weinlich *et al.*, 2009). Ob DDX3 direkt oder indirekt mit den UTRs interagiert, ist bisher nicht bekannt. Dieses Protein zählt zur Familie der DEAD-Box-RNA-Helikasen (DDX). Über *knock down*-Experimente mit siRNAs wurde bisher für DDX3 eine potentielle,

aber nicht näher charakterisierte Funktion im Replikationsprozess der HCV-RNA nachgewiesen (Ariumi *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2007). Ebenso gab es Hinweise, dass DDX3 in der 5'cap-abhängigen Translation von mRNAs involviert ist (Lai *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Der Mechanismus, wie DDX3 diese Prozesse beeinflusst, blieb jedoch unbekannt.

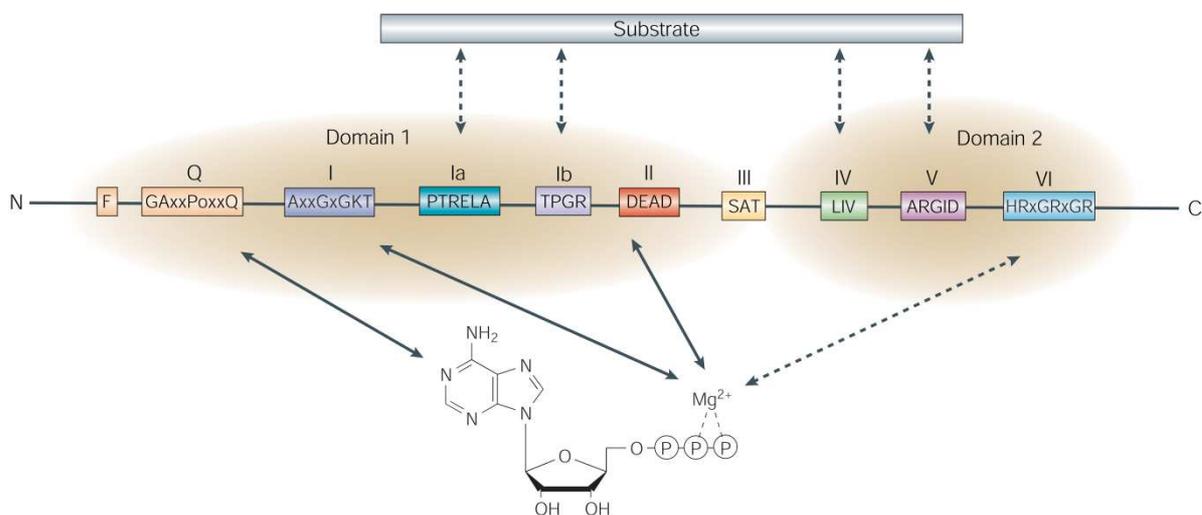
#### I.4 DDX3, ein Mitglied der Familie der DEAD-Box-RNA-Helikasen

DEAD-Box-RNA-Helikasen katalysieren die Entwindung von doppelsträngiger (ds) RNA aus der Änderung der freien Enthalpie, die bei der Bindung und Hydrolyse von ATP freigesetzt wird. Sie werden durch zahlreiche prokaryotische und eukaryotische Gene sowie durch eine Vielzahl von RNA- und DNA-Viren codiert (Kadare & Haenni, 1997; Shiratori *et al.*, 1999; Silverman *et al.*, 2003; Kwong *et al.*, 2005). Eine essentielle Funktion wird den RNA-Helikasen in den meisten RNA-abhängigen zellulären Prozessen zugeschrieben, wie z.B. der Transkription, dem prä-mRNA-*editing* und dem Spleißen, dem Kern-Cytoplasma-Transport, der Translation, dem RNA-Abbau, aber auch in der Biogenese von Ribosomen und bei der Virusvermehrung. Innerhalb dieser Prozesse scheint die Aktivität der RNA-Helikasen hochspezifisch zu sein, denn sowohl kleine Sekundärstrukturelemente der RNA als auch lange dsRNA-Moleküle werden in ihrer Struktur modifiziert bzw. entwunden (Tanner & Linder, 2001; Rocak & Linder, 2004; Cordin *et al.*, 2006). In den letzten Jahren wurde den RNA-Helikasen auch eine potentielle Funktion als RNA-*chaperone* bzw. als RNPsasen zugesprochen (Fuller-Pace, 2006). In diesem Zusammenhang gibt es Indikationen, dass die Helikasen die lokale Entwindung der RNA zur Ausbildung von optimalen RNA-Strukturen und auch die Assoziationen bzw. Dissoziationen von RNA-Protein-Komplexen fördern.

Die Klassifikation dieser Enzyme erfolgt nach charakteristischen Sequenzmotiven in der Primärstruktur in drei Superfamilien (SF1, SF2 und SF3) sowie zwei weiteren Familien (F4 und F5; Gorbalenya & Koonin, 1993). Nach dieser Klassifikation gehört die DEAD-Box-RNA-Helikase DDX3 zur SF2-Superfamilie, die erstmals 1989 beschrieben wurde (Linder *et al.*, 1989). Wie alle DEAD-Box-RNA-Helikasen besteht auch DDX3 aus einer zentralen Kernregion, die jedes der neun konservierten Sequenzmotive enthält. Diese Region umfasst ca. 350-400 Aminosäuren und enthält zwei RecA-ähnliche globuläre Domänen (Abb. I-6), die über einen *linker* kovalent miteinander verbunden sind (Tanner & Linder, 2001; Caruthers & McKay, 2002). Zudem besitzt DDX3 zusätzliche N- und C-terminale Sequenzbereiche, die die Kernregion flankieren. Es wird vermutet, dass die flankierenden N- und C-terminalen Bereiche Interaktionen mit RNA-Substraten, Co-Faktoren oder anderen Proteinen in Proteinkomplexen eingehen können (Abb. I-6; Cordin *et al.*, 2006; Fuller-Pace, 2006).

Ein Sequenzvergleich von DEAD-Box-RNA-Helikasen aus unterschiedlichen Spezies führte zur Entdeckung der neun konservierten Sequenzmotive (Abb. I-6; Tanner, 2003; Tanner *et al.*, 2003). Die N-terminale Domäne 1 enthält die Motive Q, I, Ia, Ib, II und III. Das Q-Motiv

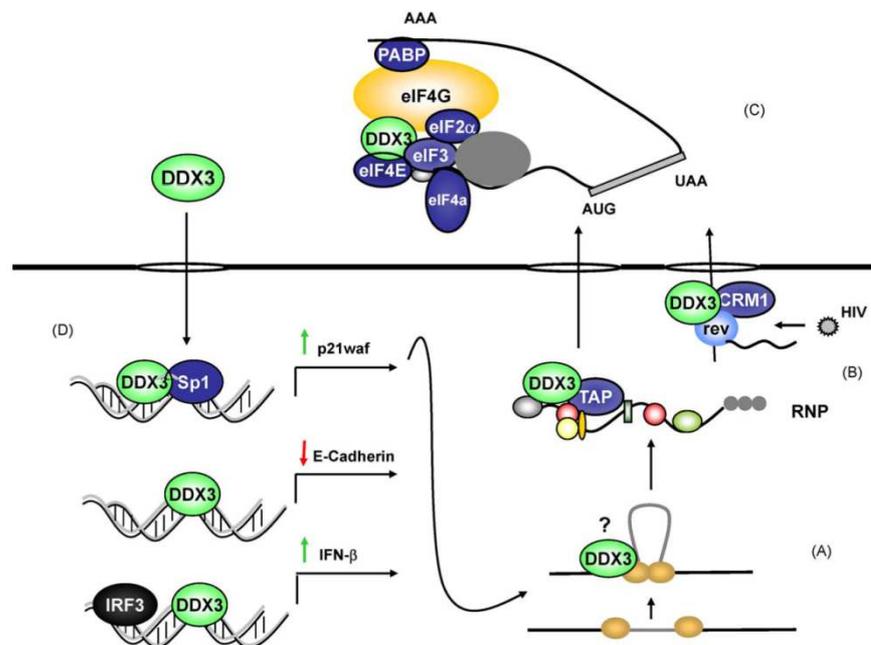
ist spezifisch für die Familie der DEAD-Box-RNA-Helikasen und ist an der Bindung von ATP beteiligt. Tanner *et al.* (2003) vermuteten, dass dieses Motiv als Sensor für ein gebundenes Nucleotid fungiert und dadurch die ATPase- und Helikaseaktivität dieser Enzyme reguliert. Die Motive I und II sind ATP-Bindemotive (Walker *et al.*, 1982), während die Motive Ia und Ib wahrscheinlich an der RNA-Bindung beteiligt sind (Korolev *et al.*, 1998; Lin & Kim, 1999; Caruthers *et al.*, 2000). Das Motiv III koordiniert die ATP-Hydrolyse mit einer Konformationsänderung im Protein, welche für die Helikaseaktivität notwendig ist (Pause & Sonenberg, 1992; Schwer & Meszaros, 2000). In der C-terminalen Domäne 2 sind die Motive IV, V und VI lokalisiert. Die Motive IV und V sind ebenfalls an der RNA-Bindung beteiligt (Korolev *et al.*, 1998; Lin & Kim, 1999; Caruthers *et al.*, 2000), während das Motiv VI wahrscheinlich das Motiv III unterstützt (Caruthers *et al.*, 2000).



**Abb. I-6: Sequenzmotive von DEAD-Box-Proteinen und deren Interaktion mit ATP und RNA.** Schematische Darstellung der Struktur, der Konsensussequenz der neun konservierten Helikasemotive und deren Interaktion mit ATP und dem RNA-Substrat von DEAD-Box-RNA-Helikasen (DDX). DDX-Proteine besitzen zwei kovalent verbundene RecA-ähnliche Domänen (Domain 1 und 2), die die Kernregion der Helikase bilden. Flankiert werden diese Bereiche von N- und C-terminalen Regionen unterschiedlicher Länge. Die Domäne 1 enthält die Motive zur ATP-Bindung (Q, I, II), das Motiv III zur Koordination der ATP-Hydrolyse und die RNA-Bindemotive Ia und Ib. Die C-terminale Domäne 2 enthält die RNA-Bindemotive IV und V und das Motiv VI zur Koordination der ATPase- und Helikaseaktivität. x: beliebige Aminosäure. Abbildung aus Rocak & Linder (2004).

*DDX3* wurde als eines von fünf Genen identifiziert, zu denen es Homologe im nicht-rekombinierbaren Bereich des Y-Chromosoms gibt (Lahn & Page, 1997). Es ist über Spezies hinweg konserviert und wird ubiquitär in zahlreichen Geweben exprimiert (Kim *et al.*, 2001). *DDX3* konnte mit allen Prozessen der Genexpression funktional in Verbindung gebracht werden (Abb. I-7). Anhand von Chromatin-Immunpräzipitationen konnte gezeigt werden, dass *DDX3* mit dem E-Cadherin- und Interferon (IFN)- $\beta$ -Promoter interagiert. Diese Assoziation führt zur Stimulierung des IFN- $\beta$ -Promoters bzw. Inhibierung des E-Cadherin-Promoters (Botlagunta *et al.*, 2008; Schröder *et al.*, 2008; Soulat *et al.*, 2008). Des Weiteren konnte auch eine Assoziation von *DDX3* an das Spleißosom nachgewiesen werden (Zhou *et al.*, 2002). Eine potenzielle Funktion der *DDX3*-Helikase im mRNA-Export aus dem Zellkern

wurde ebenfalls postuliert. So interagiert DDX3 mit den Exportrezeptoren TAP (*tip-associated protein*), dem Haupttransporter für mRNA und CRM1 (*chromosome maintenance region 1*, Abb. I-7). Die C-terminal flankierende Region von DDX3 vermittelt dabei die RNA-unabhängige Interaktion mit dem TAP-Protein (Yedavalli *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2008). Kontrovers wird dagegen die Funktion von DDX3 in der Translation diskutiert. Durch Immunpräzipitationen konnte eine Assoziation von DDX3 mit den Translations-Initiationsfaktoren eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4E und dem poly(A)-Bindepotein PABPC identifiziert werden (Lai *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Shih *et al.* (2008) postulierten, dass DDX3 direkt mit eIF4E interagiert und diese Interaktion zu einer Inhibierung der cap-abhängigen Translation führt. Dagegen gingen Lai *et al.* (2008) davon aus, dass DDX3 die Translation von mRNAs mit komplex strukturierten 5'UTRs fördert (Abb. I-7). Daten, die mit dem Hefe-homologen Enzym von DDX3, dem Protein Ded1 erzielt wurden, deuten darauf hin, dass Ded1 ebenso an der Translationsinitiation durch eine direkte Interaktion mit eIF4G bzw. an der Umstrukturierung von mRNP-Komplexen beteiligt ist (Chuang *et al.*, 1997; Hilliker *et al.*, 2011). Bisher war es jedoch nicht möglich einen direkten Interaktionspartner von DDX3 in der Translation zu identifizieren. Auch der Mechanismus, wie DDX3 diese Prozesse in der Translation fördert, konnte bisher nicht aufgeklärt werden.



**Abb. I-7: Postulierte Funktionen von DDX3 in der Genexpression.** (A) Aufgrund der Helikaseaktivität wird vermutet, dass DDX3 in der strukturellen Änderung von RNA-Substraten und Ribonucleoprotein-Komplexen involviert ist. (B) Beteiligung von DDX3 wahrscheinlich im mRNA-Export durch Interaktion mit dem mRNA-Exportprotein TAP und dem Rezeptor für den Proteinexport CRM1. (C) Beteiligung von DDX3 im Translationsprozess durch Interaktion mit den Translations-Initiationsfaktoren eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4E und PABPC. (D) Regulation der Transkription durch Reduktion der Expression des E-Cadherin-Gens und Stimulierung des p21waf- und IFN- $\beta$ -Promoters. Abbildung aus Schröder (2010).

DDX3 hat auch in der Untersuchung von viralen Lebenszyklen zunehmend an Bedeutung gewonnen, da es die Vermehrung des HBV (Hepatitis B Virus), Poxvirus, HIV (*human immunodeficiency virus*) und HCV beeinflusst. Wang *et al.* (2009) zeigten, dass DDX3 mit

der HBV-Polymerase interagiert und dadurch die reverse Transkription des viralen Genoms inhibiert wird. Die Genexpression von *IFN- $\beta$*  wird durch die Assoziation des N-terminal flankierenden Bereichs von DDX3 mit dem Protein K7 des Poxvirus inhibiert, da DDX3 nicht mehr zu einer Aktivierung des *IFN- $\beta$* -Promoters beitragen kann (Schröder *et al.*, 2008). Eine fördernde Funktion wird DDX3 im Lebenszyklus des HIV zugeschrieben. Es gibt Hinweise darauf, dass DDX3 mit dem HIV-Rev-Protein und dem Proteintransporter CRM1 interagiert, was zum bevorzugten Transport von ungespleißten HIV-mRNAs aus dem Zellkern und letztendlich zu einer gesteigerten Replikation führt (Yedavalli *et al.*, 2004). Die meisten Arbeiten zu DDX3 wurden im Zusammenhang mit dem Hepatitis C Virus publiziert. So wurde gezeigt, dass das Core-Protein des HCV mit dem C-Terminus von DDX3 interagiert. Es wurde postuliert, dass durch diese Assoziation die Verpackung der viralen RNA beeinflusst wird (Mamiya & Worman, 1999; Owsianka & Patel, 1999; You *et al.*, 1999). Ariumi *et al.* (2007) und Randall *et al.* (2007) beobachteten, dass eine siRNA-vermittelte DDX3-Depletion im Cytoplasma von Huh7-Zellen die Replikation des HCV reduziert. Die Ursache dieser Reduktion wurde jedoch nicht weiter untersucht.

## **I.5 Zielstellung der Arbeit**

Die DEAD-Box-RNA-Helikase DDX3 wurde als potentieller Wirtsfaktor des Hepatitis C Virus beschrieben (Harris *et al.*, 2006; Ariumi *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2007; Weinlich *et al.*, 2009). Diese Arbeiten basierten im Wesentlichen auf zwei Ergebnissen: der Interaktion von DDX3 mit den HCV-UTRs und der Inhibierung der Replikation von HCV-Replikons bzw. des vollständigen HCV-RNA-Genoms nach einer siRNA-vermittelten Depletion von DDX3 in der Zelle. Weiterführende Untersuchungen zur Funktion von DDX3 im HCV-Replikationsprozess wurden nicht durchgeführt.

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse sollte im Rahmen der vorliegenden Dissertation deshalb ursprünglich die Funktion von DDX3 im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus charakterisiert werden. Aus ersten Untersuchungen ging hervor, dass DDX3 die IRES-abhängige Translation der HCV-RNA positiv beeinflusst. Im Folgenden konnte dann festgestellt werden, dass DDX3 auch die 5'cap-abhängige Translation von mRNAs fördert.

Die Arbeit wurde dementsprechend auf folgende drei Aspekte erweitert:

- (1) Es sollte als Hauptaufgabe festgestellt werden, in welchem Schritt der Translation DDX3 involviert ist.
- (2) Es sollten Interaktionspartner von DDX3 im Translationsprozess identifiziert werden.
- (3) Es sollte untersucht werden, welche Proteindomänen von DDX3 für die fördernde Funktion im Translationsprozess notwendig sind.

## II Materialien und Methoden

### II.1 Materialien

#### II.1.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Alle verwendeten Chemikalien und Verbrauchsmaterialien, soweit nicht anders angegeben, wurden von den Firmen AppliChem GmbH (Darmstadt, Deutschland), Carl Roth GmbH + Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) bezogen. Lösungen und Puffer wurden nach Standardprotokollen (Sambrook & Russell, 2001) mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> hergestellt und bei Bedarf sterilisiert (20 min; 121°C; 1,2 bar). Im Falle der Verwendung spezieller Reagenzien, Enzyme und Puffer (außer Inkubationspuffer für Enzyme, die von Firmen mitgeliefert wurden) werden an den jeweiligen Textstellen entsprechende Hinweise gegeben.

#### II.1.2 Kulturmedien und Antibiotika zur Anzucht von Bakterien und humanen Zelllinien

Die Herstellung der Kulturmedien (Tab. II-1) für *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte nach Sambrook & Russel (2001) in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Das Luria-Bertani-Medium (LB) wurde für 20 min bei 121°C und 1,2 bar sterilisiert. Zur Selektion auf Resistenz-vermittelnde Plasmide wurde dem Kulturmedium nach Abkühlung auf 50°C das entsprechende steril filtrierte Antibiotikum (vgl. Tab. II-2) zugegeben (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter; PVDF; steril; 0,22 µm; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland). Zur Kultivierung der verwendeten humanen Zelllinien (vgl. II.1.4) wurde das *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM, 500 ml) nach Abnahme von 56 ml mit 50 ml FCS (fetales Kälberserum), 5 ml Penicillin (10000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml), 0,5 ml Biotin (10 µg/ml) und 0,5 ml Hypoxanthin (25 µg/ml) versetzt (Tab. II-1).

**Tab. II-1: Zusammensetzung der verwendeten Kulturmedien**

Kulturmedium	Bestandteil	Endkonzentration	Firma
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Bacto <sup>TM</sup> Trypton	10 g/l	BD Biosciences
	Bacto <sup>TM</sup> Yeast Extract	5 g/l	BD Biosciences
	NaCl	10 g/l	Carl-Roth
LB-Agarplatten	LB-Medium		
	Bacto <sup>TM</sup> Agar	14 g/l	BD Biosciences
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	[+] D-Glucose	4,5 g/l	Invitrogen
	[+] NEAA		
	[-] L-Glutamin		
	[-] Pyruvat		
	[+] FCS	10%	PAN Biotech
	[+] Biotin	0,1 µg/ml	Sigma-Aldrich
	[+] Hypoxanthin	0,25 µg/ml	Sigma-Aldrich
	[+] Penicillin	100 U/ml	Invitrogen
[+] Streptomycin	100 µg/ml	Invitrogen	

Die Antibiotika wurden als Stammlösungen (Tab. II-2), soweit nicht anders angegeben, in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> hergestellt, steril filtriert (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter; PVDF; steril; 0,22 µm; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland) und bei -20°C aufbewahrt.

**Tab. II-2: Konzentrationsangaben der verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Stammlösung	Endkonzentration	Firma
Ampicillin	100 mg/ml*	100 µg/ml <sup>a</sup>	Carl Roth
Kanamycin	50 mg/ml	50 µg/ml <sup>a</sup>	Carl Roth
Tetracyclin	1 mg/ml	1 µg/ml <sup>b</sup>	Sigma-Aldrich
Blasticidin	7,5 mg/ml	5 µg/ml <sup>b</sup>	Invitrogen
Penicillin	10000 U/ml**	100 U/ml <sup>b</sup>	Invitrogen
Streptomycin	10 mg/ml**	100 µg/ml <sup>b</sup>	Invitrogen
Geneticin (G418)	20 mg/ml	800 µg/ml <sup>b</sup>	Invitrogen

\* in Ethanol, \*\* von Invitrogen bezogen, <sup>a</sup> LB-Medium, <sup>b</sup> DMEM

### II.1.3 Bakterienstämme und deren Kultivierung

In der Arbeit wurden Bakterienstämme der Spezies *E. coli* verwendet. Diese sind in Tab. II-3 aufgelistet.

**Tab. II-3: Bezeichnung und Genotyp der verwendeten *E. coli*-Stämme**

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
TOP10	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(Str <sup>R</sup> ) endA1 λ <sup>-</sup>
BL21(DE3)	F <sup>-</sup> ompT gal dcm lon hsdS <sub>B</sub> (r <sub>B</sub> <sup>-</sup> m <sub>B</sub> <sup>-</sup> ) λ(DE3(lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5))

Die Kultivierung der *E. coli*-Stämme erfolgte auf LB-Agarplatten (94 x 16 mm, Corning, Amsterdam, Niederlande) oder als Suspensionsschüttelkultur in LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum (vgl. II.1.2) über Nacht bei 37°C. Der *E. coli*-Stamm TOP10 (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) wurde für allgemeine Klonierungsarbeiten und für präparative Plasmidproduktionen verwendet. Die heterologe Genexpression erfolgte im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (Novagen, Darmstadt, Deutschland). Für eine spätere Verwendung wurden 850 µl einer *E. coli*-Suspensionsschüttelkultur mit 15% (v/v) Glycerin versetzt, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### II.1.4 Humane Zelllinien und deren Kultivierung

In dieser Arbeit wurden die Zelllinien Huh7 (*human hepatocellular carcinoma*, Prof. Dr. R. Bartenschlager, Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland), Huh7/SGR-JFH1 und Hek293T-REx<sup>TM</sup> (*human embryonic kidney*, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Die Huh7-Zelllinie wurde aus Gewebe eines Lebertumors eines 57-jährigen Japaners generiert (Nakabayashi *et al.*, 1982) und für Untersuchungen mit HCV-Replikons verwendet. Huh7/SGR-JFH1 ist eine Huh7-Zelllinie, die persistent mit einem bi-cistronischen HCV-Replikon des Genotyps 2a transfiziert wurde. Die Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zelllinie ist eine

embryonale Nierenzelllinie, die durch Transfektion der DNA-Sequenz des E1A-Proteins des Adenovirus (Subtyp 5) generiert wurde und das SV40 *large T-Antigen* exprimiert. Zusätzlich enthält die Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zelllinie ein Tetracyclin-vermitteltes Expressionssystem (pcDNA<sup>TM</sup>6/TR).

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in 100 mm x 25 mm Kulturschalen (Corning, Amsterdam, Niederlande) mit je 10 ml DMEM (vgl. II.1.2) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>-Inkubator CB-150, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland). Beim routinemäßigen Passagieren wurden die adhären wachsenden Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 90% mit 5 ml PBS (1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 2,6 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) gewaschen und anschließend durch Inkubation mit 400 µl Trypsin (0,25% Trypsin; 1 mM EDTA; Invitrogen GmbH; Karlsruhe; Deutschland) für 2 min vom Boden der Kulturschale abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in 10 ml DMEM wurden 1/10 Huh7- bzw. 1/5 Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen in neue Kulturschalen zur weiteren Kultivierung ausgesät. Zur Selektion der Huh7/SGR-JFH1-Zellen wurde das DMEM mit 800 µg/ml Geneticin (G418) versetzt. Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen, die den pcDNA<sup>TM</sup>6/TR-Vektor enthielten, wurden durch Zugabe von Blastocidin zum DMEM selektioniert (vgl. II.1.2).

### II.1.5 Nucleotide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Nucleotide sind in Tab. II-4 aufgeführt.

**Tab. II-4: Bezeichnung der verwendeten Nucleosidtriphosphate**

Nucleosidtriphosphat	Firma
Desoxyribonucleosidtriphosphate (dNTPs)	Roche Diagnostics
Didesoxyribonucleosidtriphosphate (ddNTPs)	Jena Bioscience
Ribonucleosidtriphosphate (NTPs)	Roche Diagnostics
[ $\alpha$ - <sup>32</sup> P]-CTP	Hartmann Analytic
[ $\gamma$ - <sup>32</sup> P]-ATP	Hartmann Analytic
Guanosin-5'-( $\beta,\gamma$ -imido)-triphosphat (GMP-PNP)	Sigma-Aldrich Chemie
m <sup>7</sup> GpppG (cap-analog)	Jena Bioscience

### II.1.6 Oligonucleotide und siRNAs

Die Synthese der Oligonucleotide für Sequenzierreaktionen (vgl. II.2.1.13), PCR-Amplifikationen (vgl. II.2.1.3) und *toe prints* (vgl. II.2.2.5) erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland). Für die Bestimmung der Schmelztemperatur wurde ein Programm der Firma IIT Biotech (Bielefeld, Deutschland, <http://www.iit-biotech.de/iit-cgi/oligo-tm.pl>) verwendet. Der Verwendungszweck und die Sequenzen der einzelnen Oligonucleotide sowie deren Schmelztemperatur sind im Anhang in Tab. VII-1 aufgeführt. Die Schmelztemperatur wurde so gewählt, dass jede PCR-Reaktion (vgl. II.2.1.3) bei einer *annealing*-Temperatur der Oligonucleotide von 60°C erfolgreich durchgeführt werden konnte.

Das Design der siRNAs wurde von der Firma Dharmacon Inc. (Chicago, IL, USA) durchgeführt. Die Herstellung erfolgte durch die Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland).

## II.1.7 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tab. II-5 aufgeführt.

**Tab. II-5: Bezeichnung, Antibiotikaresistenz und Herkunft der verwendeten Plasmide**

Plasmid	Antibiotikaresistenz	Herkunft
pSGR-JFH1	Ampicillin	Prof. T. Wakita, NIID, Tokyo
pSGR-JFH1/mono	Ampicillin	R. Geißler
pWNV-5'cap-Luc-3'UTR	Ampicillin	AG Prof. Behrens, MLU Halle-Wittenberg
p5'cap-Luc-poly(A)	Ampicillin	Dr. A. Ostareck-Lederer, RWTH Aachen
p5'cap-Luc-	Ampicillin	Dr. A. Ostareck-Lederer, RWTH Aachen
pHCV-5'UTR-Luc-3'UTR	Ampicillin	R. Geißler
pEMCV-5'UTR-Luc-	Ampicillin	AG Prof. Behrens, MLU Halle-Wittenberg
p5'cap-sORF-poly(A)	Ampicillin	AG Prof. Wahle, MLU Halle-Wittenberg
pHCV-5'UTR-sORF-3'UTR	Ampicillin	R. Geißler
pHCV-5'UTR $\Delta$ SLIII-sORF-3'UTR	Ampicillin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 5/TO-Flag-DDX3	Ampicillin/Hygromycin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 5/TO-DDX3	Ampicillin/Hygromycin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 5/TO-Flag-eIF1	Ampicillin/Hygromycin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 5/TO-Flag-eIF5	Ampicillin/Hygromycin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 5/TO-Flag-eIF5B	Ampicillin/Hygromycin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>WT</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>Mut</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>1-412</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>1-583</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>29-661</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>47-661</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>73-661</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>100-661</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pcDNA <sup>TM</sup> 3.1-Flag-DDX3 <sub>129-661</sub>	Ampicillin/Zeocin	R. Geißler
pET-DDX3	Kanamycin	R. Geißler
pET-eIF1	Kanamycin	R. Geißler
pET-eIF1A	Kanamycin	R. Geißler
pET-eIF4A	Kanamycin	R. Geißler
pET-eIF4B	Kanamycin	R. Geißler
pET-eIF4G <sub>737-1116</sub>	Kanamycin	R. Geißler
pET-eIF5	Kanamycin	R. Geißler
pET-eIF5B <sub>587-1220</sub>	Kanamycin	R. Geißler
pET-Met-tRNA <sub>i</sub> <sup>Met</sup> -Synthetase	Kanamycin	R. Geißler

Die Oligonucleotide, die zur Generierung nachfolgender Plasmide verwendet wurden, sind in Tab. VII-1 aufgelistet.

**pSGR-JFH1:** Dieser Vektor (Prof. T. Wakita, National Institute of Infectious Diseases, Tokyo, Japan) enthält die cDNA-Sequenz, die für ein bi-cistronisches HCV-Replikon codiert (GenBank: AB114136). Die cDNA wurde aus einem viralen Isolat des HCV-Genotyps 2a (JFH1) generiert (Kato *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2003a; Kato *et al.*, 2005). Am 5'Ende der cDNA befindet sich die Sequenz eines T7-Promoters für die *in vitro*-Transkription (vgl. II.2.1.14). Die cDNA besteht aus den codierenden Regionen für die HCV-5'UTR, das  $\Delta$ Core-Fragment, die Neomycin-Phosphotransferase II, die EMCV-5'UTR, die HCV-Region NS3-NS5B und die HCV-3'UTR (siehe Abb. I-5). Linearisiert wurde dieses Plasmid mit dem Restriktionsenzym *XbaI* (vgl. II.2.1.7).

**pSGR-JFH1/mono:** Dieser Vektor codiert für ein mono-cistronisches HCV-Replikon (T7-Promoter, HCV-5'UTR,  $\Delta$ Core, ubi, HCV-Region NS3-NS5B, HCV-3'UTR) und wurde aus dem Plasmid pSGR-JFH1 generiert. Die Herstellung erfolgte durch PCR-Amplifikation (vgl. II.2.1.3) von pSGR-JFH1 mit spezifischen Oligonucleotiden, so dass der codierende Bereich der Neomycin-Phosphotransferase II bis einschließlich der EMCV-5'UTR deletiert wurde. Dieses PCR-Fragment wurde *blunt end* mit einer Ubiquitin-cDNA ligiert (vgl. II.2.1.10), die durch PCR generiert wurde (vgl. II.2.1.3).

Sowohl im Falle von pSGR-JFH1 als auch im Falle von pSGR-JFH1/mono wurde an das 3'Ende der cDNA (3'Ende der HCV-3'UTR-codierenden Region) die codierende Sequenz eines Ribozyms des Hepatitis Delta Virus (HDV) eingefügt. Durch die autokatalytische Abspaltung des HDV-Ribozyms nach der *in vitro*-Transkription (vgl. II.2.1.14) entsteht das authentische 3'Ende der HCV-3'UTR. Dazu wurde ein Bereich von der codierenden Sequenz von NS5B und der HCV-3'UTR durch PCR mit spezifischen Oligonucleotiden amplifiziert (vgl. II.2.1.3), die die Sequenz des HDV-Ribozyms enthielten. Dieses PCR-Fragment wurde zwischen die *EcoRV*- und *XbaI*-Restriktionsschnittstellen von pSGR-JFH1 und pSGR-JFH1/mono ligiert (vgl. II.2.1.10). Die Linearisierung erfolgte mit dem Restriktionsenzym *XbaI* (vgl. II.2.1.7).

**pWNV-5'cap-Luc-3'UTR:** Das Plasmid wurde von S. Friedrich (AG Prof. Behrens MLU Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland) generiert und enthält die cDNA eines Replikons des West Nil Virus (WNV) mit einem zusätzlich eingefügten ORF eines Luciferase-Reportergens (T7-Promoter, WNV-5'UTR, C'-Luc-E', NS1-NS5, WNV-3'UTR). Dieses Plasmid wurde aus einem Vorläuferplasmid generiert, das von Prof. P.Y. Shi (Novartis Institute for Tropical Diseases, Singapore) zur Verfügung gestellt wurde (Shi *et al.*, 2002). Die Ligation der cDNA der *renilla*-Luciferase (vgl. II.2.1.10) erfolgte in die *AflII*-Restriktionsschnittstelle zwischen die codierenden Bereiche des Capsidproteins (C') und des Hüllproteins (E'). Linearisiert wurde dieses Plasmid mit dem Restriktionsenzym *ApaI* (vgl. II.2.1.7).

**p5'cap-Luc-poly(A), p5'cap-Luc-:** Diese Plasmide wurden von Dr. A. Ostareck-Lederer (RWTH Aachen, Aachen, Deutschland) zur Verfügung gestellt und sind in der Publikation von Iizuka *et al.* (1994) beschrieben. Das Plasmid p5'cap-Luc-poly(A) codiert für die *firefly*-Luciferase und einen poly(A)-Bereich aus 98 nt. Der Vektor enthält einen T3-Promoter für

die *in vitro*-Transkription (vgl. II.2.1.14), so dass eine Luciferase-codierende mRNA generiert werden kann, die ein 5'cap und einen poly(A)-Bereich am 3'Ende besitzt. p5'cap-Luc- besitzt die gleiche Organisation wie p5'cap-Luc-poly(A), mit der Ausnahme, dass der poly(A)-Bereich deletiert ist. Für die *in vitro*-Transkription wurden diese Plasmide mit dem Restriktionsenzym *NotI* linearisiert (vgl. II.2.1.7).

**pHCV-5'UTR-Luc-3'UTR:** Das Plasmid enthält einen T7-Promoter und eine cDNA, von der aus eine RNA generiert werden kann, die aus der Region HCV-5'UTR/ $\Delta$ Core am 5'Ende, dem ORF der *firefly*-Luciferase und der HCV-3'UTR am 3'Ende besteht. Die Generierung des Plasmids erfolgte aus pSGR-JFH1 mit Hilfe der PCR (vgl. II.2.1.3), wodurch die codierende Region der Neomycin-Phosphotransferase II bis zum NS5B deletiert wurde. Das Fragment pSGR-JFH1 wurde mit der cDNA der *firefly*-Luciferase, die mit PCR amplifiziert wurde (vgl. II.2.1.3), *blunt end* ligiert (vgl. II.2.1.10). Durch das Restriktionsenzym *XbaI* wurde dieses Plasmid linearisiert (vgl. II.2.1.7).

**pEMCV-5'UTR-Luc-:** Dieses Plasmid wurde von Dr. O. Isken (in der AG von Prof. Behrens, jetzt Universität zu Lübeck, Lübeck, Deutschland) hergestellt, in dem die cDNA der *firefly*-Luciferase zwischen die *NcoI*- und *NotI*-Restriktionsschnittstellen von pCITE (Novagen, Darmstadt, Deutschland) ligiert wurde (vgl. II.2.1.10). Der Vektor enthält einen T7-Promoter und codiert für die EMCV-5'UTR. Die Linearisierung des Plasmids erfolgte durch das Restriktionsenzym *NotI* (vgl. II.2.1.7). Durch *in vitro*-Transkription wird eine Luciferase-codierende mRNA generiert (vgl. II.2.1.14), die am 5'Ende eine EMCV-5'UTR besitzt. Der für EMCV charakteristische poly(A)-Bereich wird durch diesen Vektor nicht codiert.

**p5'cap-sORF-poly(A):** Das Plasmid wurde von Dr. C. Harnisch (AG Prof. Wahle, MLU Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland) bereitgestellt und ist in der Publikation von Naarmann *et al.* (2008) beschrieben. Der Vektor diente zur *in vitro*-Transkription einer mRNA mit einem 5'cap (vgl. II.2.1.14), einem kurzen ORF (sORF, 111 nt) und einem poly(A)-Bereich aus 34 nt, die für Translations-Initiationsexperimente eingesetzt wurde (vgl. II.2.2.3). Linearisiert wurde dieses Plasmid mit dem Restriktionsenzym *NotI* (vgl. II.2.1.7). Die *in vitro*-Transkription erfolgte mit der T7-RNA-Polymerase (vgl. II.2.1.14).

**pHCV-5'UTR-sORF-3'UTR:** Dieses Plasmid codiert für eine RNA mit der HCV-5'UTR, einem kurzen Bereich des HCV-Core-Proteins ( $\Delta$ C, 83 nt) und der HCV-3'UTR. Die Herstellung erfolgte ausgehend von pSGR-JFH1 mit der PCR (vgl. II.2.1.3), in der die codierende Region der Neomycin-Phosphotransferase II bis zum NS5B deletiert wurde. Eine anschließende *blunt end*-Ligation (vgl. II.2.1.10) dieses PCR-Fragments generierte das Plasmid pHCV-5'UTR-sORF-3'UTR. Der Vektor wurde mit dem Restriktionsenzym *XbaI* linearisiert (vgl. II.2.1.7) und mit der T7-RNA-Polymerase transkribiert (vgl. II.2.1.14). Die daraus hergestellte RNA wurde, analog der vom Plasmid p5'cap-sORF-poly(A) transkribierten RNA, für Translations-Initiationsexperimente eingesetzt (vgl. II.2.2.3).

**pHCV-5'UTRSLIII-sORF-3'UTR:** In diesem Plasmid wurde die Sequenz des *stem-loop* SLIII in der HCV-5'UTR durch PCR (vgl. II.2.1.3) und *blunt end*-Ligation (vgl. II.2.1.10) von pHCV-5'UTR-sORF-3'UTR deletiert. Das generierte RNA-Konstrukt wurde als Kontrolle für Translations-Initiationsexperimente eingesetzt (vgl. II.2.2.3), da die verkürzte HCV-IRES (Deletion der Domäne III) die Translation nicht initiieren kann.

**pcDNA<sup>TM</sup>5/TO:** Dieser Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) ermöglicht die heterologe Genexpression in humanen Zelllinien mit Hilfe des Cytomegalovirus-Promoters (CMV). Die Kombination mit der Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zelllinie (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland, vgl. II.1.4) erlaubt die Tetracyclin-vermittelte Genexpression. Der Tetracyclin-Repressor (TetR) wird vom Vektor pcDNA<sup>TM</sup>6/TR exprimiert, der die Tetracyclin-Operatorsequenz (TetO<sub>2</sub>) im CMV-Promoter des pcDNA<sup>TM</sup>5/TO bindet und die Genexpression unterdrückt. Durch Zugabe von Tetracyclin wird der TetR von der TetO<sub>2</sub>-Sequenz verdrängt und die Genexpression ermöglicht. Der Vektor **pcDNA<sup>TM</sup>5/TO-Flag-DDX3** enthält die cDNA zur Herstellung von DDX3 mit einem Flag-*tag*. Die *Flag-DDX3X*-Sequenz wurde durch RT-PCR amplifiziert (vgl. II.2.1.2 und II.2.1.3) und zwischen die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XhoI* von pcDNA<sup>TM</sup>5/TO ligiert (vgl. II.2.1.10). **pcDNA<sup>TM</sup>5/TO-DDX3** wurde wie oben beschrieben, ohne einen N-terminalen Flag-*tag* generiert.

**pcDNA<sup>TM</sup>3.1/Zeo:** Dieser Vektor (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) ermöglicht ebenfalls die konstitutive Genexpression in humanen Zelllinien. Durch Ligation der cDNA *Flag-DDX3X* zwischen die *BamHI*- und *XhoI*-Restriktionsschnittstellen wurde der Vektor **pcDNA<sup>TM</sup>3.1-Flag-DDX3** generiert (vgl. II.2.1.10). Die DDX3-Variante *Flag-DDX3<sub>Mut</sub>* (Y200A, Q207A, K230A, D347A, E348A) wurde mit diesem Vektor nach Abschnitt II.2.1.4 hergestellt. Die Generierung von Deletionsvarianten (vgl. Tab. II-5) erfolgte mit Hilfe der PCR (vgl. II.2.1.3) ausgehend von diesem Vektor.

**pET:** Dieser Vektor wurde für die heterologe Genexpression im *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet (vgl. II.1.3). Das Plasmid codiert für einen N-terminalen 6x Histidin-*tag*. Die Generierung der in Tab. II-5 aufgeführten pET-Konstrukte erfolgte durch *blunt end*-Ligation der entsprechenden cDNAs in das pET-Plasmid (vgl. II.2.1.10). Dieses Plasmid wurde durch eine PCR vom Plasmid pET-SUMO (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) generiert (vgl. II.2.1.3), so dass die codierende Region für das SUMO-Protein deletiert wurde. Demzufolge wurde dieser Vektor nur als pET bezeichnet.

Folgende DNA-Konstrukte wurden mit den oben aufgeführten Plasmiden durch eine PCR generiert (vgl. II.2.1.3, Oligonucleotide siehe Tab. VII-1). Das Konstrukt HCV-5'UTR-Luc wurde vom Plasmid pHCV-5'UTR-Luc-3'UTR und das Konstrukt EMCV-5'UTR-Luc-poly(A) vom Vektor pEMCV-5'UTR-Luc- hergestellt.

## II.1.8 Antikörper

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Antikörper und Antiseren sind in Tab. II-6 aufgelistet. Das anti-DDX3-Antiserum wurde von Prof. A. Patel (MRC - University of Glasgow Centre for Virus Research, University of Glasgow, Großbritannien) und der IGF2BP1/2-Antikörper von Prof. S. Hüttelmaier (Institut für Molekulare Medizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Das NS5A-Antiserum wurde von der Firma Eurogentec Deutschland GmbH (Köln, Deutschland) produziert, ausgehend von rekombinant gereinigtem NS5A-Protein des HCV-Genotyps 2a (Paul Knick, AG Prof. Behrens, Mikrobielle Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle, Deutschland).

**Tab. II-6: Antikörper für Western-Blot und Immunpräzipitationen**

Antikörper	Charakteristika	Firma/Herkunft	Bestell-Nr.
Anti-DDX3	polyklonal, Kaninchen	Prof. A. Patel	
Anti-NS5A/HCV-Genotyp 2a	polyklonal, Kaninchen	Eurogentec	
Anti-Neomycin-Phosphotransferase II	polyklonal, Kaninchen	Abcam	ab 60018
Anti-Vinculin	monoklonal, Maus	Sigma-Aldrich	V9131
Anti-Flag®	monoklonal, Maus	Stratagene	200472-21
Anti-6xHis	HRP-konjugiert	Novagen	71841
Anti-IGF2BP1/2	monoklonal, Maus	Prof. S. Hüttelmaier	
Anti-eIF2 $\alpha$	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-11386
Anti-eIF3c	polyklonal, Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	sc-28858
Anti-eIF5	monoklonal, Maus	Santa Cruz Biotechnology	sc-28309
Anti-eIF6	monoklonal, Maus	BD Biosciences	611120
Anti-rpS3	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology	2579
Anti-rpS6	polyklonal, Kaninchen	Cell Signaling Technology	2317
Anti-rpL26	polyklonal, Kaninchen	Bethyl Laboratories	A300-686A
Anti-Kaninchen	polyklonal, Esel	GE Healthcare	NA934V
Anti-Maus	polyklonal, Schaf	GE Healthcare	NXA931

## II.2 Methoden

### II.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### II.2.1.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus humanen Zelllinien

Gesamt-RNA aus Huh7- und Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen (vgl. II.1.4) für quantitative Real-Time-PCR-Untersuchungen (vgl. II.2.1.5) oder zur Gewinnung von cDNAs (vgl. II.2.1.2) erfolgte mit der Trizol-Methode. Zellen einer 100 mm x 25 mm Kulturschale mit einer Konfluenz zwischen 70-80% wurden 1x mit 5 ml PBS gewaschen und trypsiniert, in 5 ml DMEM aufgenommen (vgl. II.1.4) und für 5 min bei 1500 rpm (Mikro 200, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, in 1 ml Trizol [0,1 M CH<sub>3</sub>COONa pH 5,0; 0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 5%

(v/v) Glycerin; 38% (v/v) Phenol (wassergesättigt, stabilisiert, AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)] denaturiert und für 3 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurde die Trizol-Lösung mit 200 µl Chloroform versetzt, geschüttelt und nach einer Inkubation für 5 min anschließend bei 4°C zentrifugiert [15 min, 13000 rpm (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland)]. Die RNA aus der wässrigen Phase wurde durch Zugabe von 50% (v/v) Isopropanol gefällt (10 min, RT). Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm und 4°C wurde die präzipitierte RNA mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gelöst.

### II.2.1.2 cDNA-Erststrangsynthese

Die cDNA-Erststrangsynthese wurde mit einer modifizierten Reversen Transkriptase des Moloney murinen Leukämievirus durchgeführt. Für die reverse Transkription wurden 0,5 µg Gesamt-RNA (vgl. II.2.1.1) mit 10 pmol oligo(dT)<sub>19</sub>- und wenn erforderlich mit 10 pmol eines genspezifischen *reverse*-Primers (vgl. Tab. VII-1) in einem Volumen von 12 µl versetzt und für 5 min bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen des Ansatzes auf Eis wurden 4 µl 5x M-MuLV-Puffer, 2 µl 10 mM dNTPs, 1 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>, 0,5 µl RiboLock<sup>TM</sup> RNase Inhibitor (40 U/µl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und 0,5 µl Reverse Transkriptase (200 U/µl, RevertAid<sup>TM</sup> H Minus Reverse Transcriptase, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) zugegeben und für 60 min bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reversen Transkriptase erfolgte für 10 min bei 70°C. Jeder Reaktionsschritt wurde in einem MasterCycler<sup>®</sup> Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Vor Verwendung der cDNA zur Amplifikation der in dieser Arbeit verwendeten Gene oder als *template* in der quantitativen Real-Time-PCR (vgl. II.2.1.5) wurde der cDNA-Ansatz auf 10 ng RNA-Äquivalent/µl mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> verdünnt.

### II.2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist ein Verfahren für die gezielte Amplifikation von DNA-Fragmenten mit einer hitzebeständigen DNA-Polymerase (Mullis & Faloona, 1987). Dabei wird eine DNA-Matrize (*template*) mittels zweier spezifischer Oligonucleotide (Primer) in einer zyklischen Abfolge bestehend aus Denaturierung des *templates*, Hybridisierung (*annealing*) der Primer an das *template* und DNA-Synthese (Elongation) exponentiell vervielfältigt.

In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation von cDNAs (vgl. II.2.1.2), zur Generierung von DNA-Fragmenten für die Konstruktion von Plasmiden und zur Herstellung von *template*-DNA für die *in vitro*-Transkription (vgl. II.2.1.14) eingesetzt.

Zur Amplifikation von DNA-Fragmenten wurde die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase (Finnzymes Oy, Vantaa, Finnland) eingesetzt, für die eine Elongationsgeschwindigkeit von 1 kb/30 s angenommen wurde. Die Inkubation des PCR-Ansatzes

erfolgte in einem MasterCycler<sup>®</sup> Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) in einem 50 µl-PCR-Ansatz (Tab. II-7).

**Tab. II-7: PCR-Reaktionsansatz**

Bestandteil	50 µl-Reaktionsansatz	Endkonzentration
1 H <sub>2</sub> O	<i>ad</i> auf 50 µl	
2 <i>forward</i> -Primer	2 µl	0,4 µM
3 <i>reverse</i> -Primer	2 µl	0,4 µM
4 dNTPs	1 µl	200 µM
5 5x Phusion <sup>®</sup> HF-Puffer	10 µl	1x
6 <i>template</i> -DNA	10 ng RNA-Äquivalent bzw. 100 ng Plasmid	
7 Phusion <sup>®</sup> DNA-Polymerase	0,25 µl	0,01 U/µl

Jede PCR-Reaktion wurde nach folgendem PCR-Programm durchgeführt (Tab. II-8):

**Tab. II-8: PCR-Programm**

Prozess	Temperatur	Dauer
1 Initiale Denaturierung	98°C	30 s
2 Denaturierung	98°C	10 s
3 <i>annealing</i>	60°C	30 s
4 Elongation	72°C	30 s/kb
5 25-35 Zyklen der Schritte 2-4		
6 Kühlung	10°C	∞

#### II.2.1.4 Ortsgerichtete Mutagenese

Die ortsgerechte Mutagenese ist eine Technik, um gezielt Mutationen in dsDNA-Moleküle einzuführen. In dieser Arbeit wurde die Methode zur Herstellung von DDX3-Varianten verwendet.

Ausgehend von zwei Oligonucleotiden (*forward* und *reverse*), von denen ein Oligonucleotid die gewünschte Mutation trägt, wurde in einer PCR-Reaktion (vgl. II.2.1.3) das vollständige und mutierte DNA-Fragment generiert. Dieses PCR-Fragment wurde anschließend gereinigt (vgl. II.2.1.6), an den 5'-Hydroxylgruppen phosphoryliert (vgl. II.2.1.9) und zur Hydrolyse des *template*-Vektors mit dem Restriktionsenzym *DpnI* (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt (vgl. II.2.1.7). Nach einer erneuten Reinigung (vgl. II.2.1.6) und der Selbstligation (vgl. II.2.1.10) wurde das Plasmid in *E. coli*-Top10-Zellen transformiert (vgl. II.2.1.11).

Die Analyse der generierten Mutation erfolgte durch Präparation der Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.12) mit einer anschließenden DNA-Sequenzierung (vgl. II.2.1.13).

#### II.2.1.5 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCR beruht auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR, die zusätzlich eine Quantifizierung der amplifizierten DNA ermöglicht. Diese Quantifizierung erfolgt mit Hilfe

eines Fluoreszenzfarbstoffs, der mit der doppelsträngigen DNA interkaliert, am Ende eines PCR-Zyklus und kann absolut anhand einer Kalibrierungskurve oder relativ, bezogen auf die Transkriptmenge eines nicht regulierten Referenz-Gens, durchgeführt werden. Die Zunahme der Fluoreszenzintensität korreliert dabei mit der Zunahme der neu synthetisierten DNA. Die Grundlage für die Quantifizierung bildet der  $C_t$ -Wert (*cycle threshold*), der denjenigen PCR-Zyklus anzeigt, an dem die Fluoreszenz signifikant über die Hintergrundfluoreszenz ansteigt. Er liegt am Anfang der exponentiellen Phase der qRT-PCR, in der noch optimale Bedingungen zur Amplifikation eines DNA-Fragments vorliegen.

Die Größe der im Rahmen dieser Arbeit amplifizierten PCR-Produkte betrug zwischen 70-130 bp. Die Durchführung der qRT-PCR erfolgte mit dem QuantiTect<sup>®</sup> SYBR<sup>®</sup> Green PCR Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland), das zur Quantifizierung den Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I enthält, in einem Light Cycler 1.5 Instrument (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Dazu wurden in einem 10 µl-Reaktionsansatz 10 ng RNA-Äquivalent aus der cDNA-Erststrangsynthese (vgl. II.2.1.2) mit 50 pmol *forward*- und *reverse*-Primern (vgl. Tab. VII-1) sowie 5 µl des SYBR<sup>®</sup> Green PCR-Mixes versetzt. Die Amplifikation erfolgte mit dem in Tab. II-9 aufgeführten PCR-Programm. Für die Heiz- und Kühlleistung nach jedem PCR-Schritt wurde die maximale Geschwindigkeit von 20°C/s verwendet. Die spezifische Amplifikation der entsprechenden cDNA wurde mit einem Reaktionsansatz der cDNA-Erststrangsynthese durchgeführt (vgl. II.2.1.2), der nicht mit der Reversen Transkriptase versetzt wurde.

Nach Ablauf der qRT-PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse des synthetisierten PCR-Produkts um zu kontrollieren, ob genau ein spezifisches DNA-Fragment amplifiziert wurde. Dabei wird die Temperatur kontinuierlich von 60°C auf 95°C erhöht und während des gesamten Prozesses die Fluoreszenzintensität gemessen. Wird die Schmelztemperatur des PCR-Fragments erreicht, dissoziiert die dsDNA in die DNA-Einzelstränge und der Fluoreszenzfarbstoff (SYBR<sup>®</sup> Green I) wird freigesetzt. Die Fluoreszenzintensität nimmt durch die Freisetzung des Farbstoffs ab. Eine spezifische Amplifikation wird durch genau einen Peak in der Schmelzkurve repräsentiert.

**Tab. II-9: Reaktionsbedingungen der qRT-PCR**

Prozess	Temperatur	Dauer
1 Aktivierung der <i>Taq</i> -DNA-Polymerase	95°C	15 min
2 Denaturierung	95°C	25 s
3 <i>annealing</i>	60°C	25 s
4 Elongation	72°C	25 s
5 40 Zyklen der Schritte 2-4		
6 Schmelzkurvenanalyse		

In dieser Arbeit wurden die Transkriptmengen relativ mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode quantifiziert (Livak & Schmittgen, 2001). Als interne Kontrolle (Referenz-Gen) wurde das Transkript des Gens *GAPDH* verwendet, da dieses bei einem *knock down* von DDX3 bzw. einer

Überexpression von *DDX3* und der anschließenden Transfektion der HCV-Replikons und Luciferasekonstrukte nicht beeinflusst wurde. Die Berechnung der relativen Transkriptmengen entsprechender Gene von der zu untersuchenden Probe bezogen auf die Kontrolle ist im Folgenden dargestellt:

$$\Delta C_{t(K)} = C_{t(ZG)} - C_{t(RG)} \quad (1)$$

$$\Delta C_{t(P)} = C_{t(ZG)} - C_{t(RG)} \quad (2)$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(P)} - \Delta C_{t(K)} \quad (3)$$

$C_t$	<i>cycle threshold</i>
$\Delta C_t$	Differenz der $C_t$ -Werte aus Zielgen [ $C_{t(ZG)}$ ] und Referenzgen [ $C_{t(RG)}$ ]
$\Delta\Delta C_t$	Differenz der $\Delta C_t$ -Werte der zu untersuchenden Probe und der Kontrolle
K	Kontrolle
P	zu untersuchende Probe
RG	Referenzgen
ZG	Zielgen

Zunächst wird der  $\Delta C_t$ -Wert aus der Differenz der  $C_t$ -Werte des Transkripts des Zielgens und des Referenzgens ermittelt (vgl. Gleichung 1 und 2). Der  $\Delta C_t$ -Wert der Kontrolle wird danach von dem  $\Delta C_t$ -Wert der zu untersuchenden Probe [ $\Delta C_{t(P)}$ ] abgezogen und ergibt die relative Transkriptmenge ( $\Delta\Delta C_t$ -Wert) des Zielgens bezogen auf das Zielgen in der Kontrolle (vgl. Gleichung 3).

Die n-fache Expression (A) eines Gens in der zu untersuchenden Probe bezogen auf die Kontrolle wird aus der PCR-Effizienz und dem  $\Delta\Delta C_t$ -Wert ermittelt (vgl. Gleichung 4).

$$A = E^{-\Delta\Delta C_t} \quad (4)$$

A	n-fache Expression eines Gens
E	PCR-Effizienz
$\Delta\Delta C_t$	Differenz der $\Delta C_t$ -Werte der Kontrolle und der zu untersuchenden Probe

Die PCR-Effizienz (E) entspricht dabei der Verdopplungsrate der DNA-Fragmente in einem PCR-Zyklus. Unter optimalen PCR-Bedingungen verdoppelt sich die DNA-Menge in jedem PCR-Zyklus. Die Berechnung der PCR-Effizienz erfolgte mit dem Programm LinRegPCR (Ramakers *et al.*, 2003) bzw. einer Kalibriergeraden der Transkripte. Die Effizienzen der PCR-Reaktionen lagen zwischen 1,9 und 2,0.

### II.2.1.6 Reinigung von DNA-Fragmenten

Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Restriktionsansätzen (vgl. II.2.1.7) oder PCR-Reaktionen (vgl. II.2.1.3) wurde durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.16.1) mit anschließender Gelextraktion mit dem GeneJet<sup>TM</sup> Gel Extraction Kit (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Im Falle der spezifischen Hydrolyse von PCR-Produkten und der Linearisierung von Plasmiden erfolgte

die Reinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und einer Ethanolpräzipitation nach Standardprotokollen (Sambrook & Russell, 2001) oder direkt mit dem GeneJet™ Gel Extraction Kit.

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte in einem Photometer (BioPhotometer, Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) oder durch Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.16.1) unter Verwendung eines definierten Größenstandards (GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland).

### **II.2.1.7 Spezifische Restriktionshydrolyse von DNA**

Die Restriktionsenzyme und entsprechenden Puffer für die Inkubation zur Hydrolyse von dsDNA (Plasmide, PCR-Fragmente) wurden von den Firmen Fermentas GmbH (St. Leon-Rot, Deutschland) und New England Biolabs GmbH (Frankfurt/Main, Deutschland) bezogen. In dieser Arbeit wurden Restriktionsendonucleasen des Typs II zur Herstellung von Plasmiden und PCR-Fragmenten für die Ligation, zur Identifizierung von Plasmiden, die die gewünschte cDNA enthielten und zur Linearisierung von Plasmiden für die *in vitro*-Transkription (vgl. II.2.1.14) verwendet.

Die Reaktionsbedingungen für die endonucleolytische Spaltung von dsDNA wurden nach Angaben des Herstellers für das jeweilige Enzym durchgeführt. Für qualitative Analysen generierter Plasmide wurde 1 µg Plasmid in einem 10 µl-Restriktionsansatz für 1 h inkubiert. Für präparative Mengen an Plasmiden (vgl. II.2.1.12) zur Klonierung (vgl. II.2.1.10) und *in vitro*-Transkription (vgl. II.2.1.14) wurden 20-100 µg Plasmid in einem 70 µl-Restriktionsansatz über Nacht inkubiert. Die Analyse der Restriktionsspaltung erfolgte mittels Agarose-Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.16.1).

### **II.2.1.8 Dephosphorylierung von 5'-Phosphatgruppen**

Die 5'-Phosphatgruppen, die bei der Hydrolyse von dsDNA entstehen (vgl. II.2.1.7), wurden durch Inkubation mit dem Enzym alkalische Phosphatase (1 U/µl, FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) entfernt. Dies verhindert die Selbstligation von Plasmid-DNA, die nur mit einer oder unvollständig mit zwei Restriktionsendonucleasen spezifisch hydrolysiert wurde. Die Dephosphorylierung wurde nach Angaben des Herstellers in einem 40 µl-Reaktionsansatz durchgeführt.

### **II.2.1.9 Phosphorylierung von 5'-Hydroxylgruppen**

Die Phosphorylierung der 5'-Hydroxylgruppen von PCR-Fragmenten zur *blunt end*-Ligation (vgl. II.2.1.10) erfolgte durch das Enzym T4-Polynucleotid-Kinase (10 U/µl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Zur Phosphorylierung der Oligonucleotide für das *toe printing* (vgl. Tab. VII-1) wurden 1 µM Primer und 4 µl [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]-ATP (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland) in einem 20 µl-Reaktionsansatz für 30 min bei 37°C inkubiert.

### II.2.1.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten wurde mit der T4-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) durchgeführt. Für *sticky*- und *blunt end*-Ligationen wurden 100 ng Vektor mit einem 5:1-Verhältnis (*insert*:Vektor) von der zu ligierenden DNA in einem 20  $\mu$ l-Ansatz mit 5 U T4-DNA-Ligase für 2 h bei RT inkubiert. Zur Selbstligation von Vektor-DNA wurde 50 ng Plasmid-DNA eingesetzt.

### II.2.1.11 Herstellung und Transformation chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter *E. coli*-Zellen wurden 50 ml LB-Medium (vgl. II.1.2) mit 500  $\mu$ l Bakterienkultur beimpft und bei 200 rpm (Universalschüttler SM 30 A, Hechingen, Deutschland) bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37°C inkubiert. Durch eine Zentrifugation [10 min, 5000 rpm (Rotina 38 R, Winkelrotor 6-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), 4°C] wurden die Zellen pelletiert und anschließend in 10 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (10 min, 5000 rpm, 4°C) wurden die *E. coli*-Zellen in 2 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> aufgenommen und mit 2 ml 50 % (v/v) Glycerin versetzt, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Für die Transformation wurde ein Aliquot (50  $\mu$ l) dieser *E. coli*-Zellen auf Eis aufgetaut und mit der zu transformierenden DNA [2  $\mu$ l-Ligationsansatz (vgl. II.2.1.10) oder 50 ng Vektor] für 20 min auf Eis inkubiert. Die anschließende Transformation erfolgte durch einen Hitzeschock für 45 s bei 42°C. Nach einer Inkubation von 5 min auf Eis wurde der Transformationsansatz mit 500  $\mu$ l LB-Medium (vgl. II.1.2) versetzt und für 45 min bei 200 rpm (Universalschüttler SM 30 A, Hechingen, Deutschland) und 37°C inkubiert. Danach wurden 100  $\mu$ l von der Bakterienkultur auf LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert (vgl. II.1.3). Die Identifizierung von Vektoren mit dem gewünschten *insert* erfolgte durch spezifische Restriktionshydrolyse (vgl. II.2.1.7) der isolierten Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.12).

### II.2.1.12 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte aus 1,5 ml einer Suspensionskultur (vgl. II.1.3) des jeweiligen Bakterienklons. Nach Zentrifugation der *E. coli*-Zellen [1 min, 13000 rpm (Mikro 200, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), RT] wurden diese in 150  $\mu$ l P1-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 8,0; 10 mM EDTA; 100  $\mu$ g/ml RNase A (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland)] resuspendiert. Die alkalische Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 150  $\mu$ l P2-Puffer [200 mM NaOH, 1% (v/v) SDS]. Das Lysat wurde anschließend mit 150  $\mu$ l P3-Puffer (3 M CH<sub>3</sub>COOK/HCl pH 5,2) neutralisiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und 4°C wurden 400  $\mu$ l des Überstands mit 1 ml 100% Ethanol versetzt. Nach einer Inkubation für 5 min auf Eis erfolgte die Präzipitation der Plasmide durch

eine erneute Zentrifugation für 10 min bei 13000 rpm und 4°C. Anschließend wurde das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 50 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 8,0; 1 mM EDTA) gelöst.

Die Isolierung größerer Mengen an Plasmid-DNA wurde wie vorhergehend beschrieben durchgeführt. Dazu wurden 50 ml einer Suspensionskultur eingesetzt und das Bakterienpellet mit jeweils 3 ml P1-, P2- und P3-Puffer aufgeschlossen. Die Fällung der Plasmide erfolgte mit 0,7 Volumenteilen Isopropanol. Die präparierte Plasmid-DNA wurde in 1 ml TE-Puffer aufgenommen.

### II.2.1.13 DNA-Sequenzierung und Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung der Nucleotidsequenzen erfolgte mit dem Programm Clone Manager Professional Suite (Scientific & Educational Software, Cary, NC, USA).

### II.2.1.14 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde zur Herstellung von RNA und [<sup>32</sup>P]-markierter RNA für *in vivo*- bzw. *in vitro*-Translations-, *in vitro*-Translations-Initiations- und HCV-Replikon-Experimente verwendet. Alle RNA-Konstrukte wurden durch eine *run-off in vitro*-Transkription generiert. Die Termination der Transkription erfolgte somit durch Abfallen der RNA-Polymerase von der *template*-DNA.

In einem 40 µl-Ansatz wurden 3 µg linearisiertes Plasmid (vgl. II.2.1.7) bzw. 1 µg DNA aus einer PCR-Reaktion (vgl. II.2.1.3) mit 1x Transkriptionspuffer (Stratagene, Waldbronn, Deutschland), 1 mM NTPs, 10 mM DTT, 20 U RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und 50 U T3- bzw. T7-RNA-Polymerase (Stratagene, Waldbronn, Deutschland) für 3 h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der *in vitro*-Transkriptionsansatz zur Hydrolyse der *template*-DNA mit 10 U DNase I (DNase I recombinant, RNase free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) versetzt und für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Die Reinigung der synthetisierten RNA erfolgte durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanolpräzipitation (vgl. II.2.1.6).

Die RNAs SGR-JFH1, SGR-JFH1/mono, 5'cap-Luc-poly(A), 5'cap-Luc- und HCV-5'UTR-Luc-3'UTR wurden ausgehend von linearisierter Plasmid-DNA (vgl. II.1.7 für entsprechende Restriktionsenzyme) hergestellt, während die tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> sowie die RNAs HCV-5'UTR-Luc-, EMCV-Luc-poly(A), 5'cap-sORF-poly(A), HCV-5'UTR-sORF-3'UTR und HCV-5'UTRΔSLIII-sORF-3'UTR von einem PCR-Fragment synthetisiert wurden (Oligonucleotide für die PCR siehe Tab. VII-1).

Die Herstellung von 5'cap-RNA-Konstrukten [5'cap-Luc-poly(A), 5'cap-Luc-, 5'cap-sORF-poly(A), WNV-5'cap-Luc-3'UTR] erfolgte analog der oben aufgeführten *in vitro*-Transkription. Das Verhältnis von m<sup>7</sup>GpppG (cap-analog, 1 mM, vgl. II.1.5) zu GTP im *in*

*in vitro*-Transkriptionsansatz betrug 2:1 für die Konstrukte 5'cap-Luc-poly(A), 5'cap-Luc- und WNV-5'cap-Luc-3'UTR bzw. 5:1 für das Konstrukt 5'cap-sORF-poly(A).

[<sup>32</sup>P]-markierte RNAs [5'cap-sORF-poly(A), HCV-5'UTR-sORF-3'UTR, HCV-5'UTRΔSLIII-sORF-3'UTR] wurden durch Zugabe von 333 nM [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-CTP (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland) in den Transkriptionsansatz und durch Verringerung der CTP-Konzentration auf 0,3  $\mu$ M hergestellt.

*In vitro*-transkribierte RNAs der DNA-Konstrukte [5'cap-sORF-poly(A), HCV-5'UTR-sORF-3'UTR, HCV-5'UTRΔSLIII-sORF-3'UTR] wurden im Anschluss durch eine Gelelektrophorese (vgl. II.2.1.16.2) und Extraktion aus einem denaturierenden (7 M Harnstoff) Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel, 4%) gereinigt. Zur Identifizierung der RNA im PAA-Gel wurden die Gele auf eine Fluoreszenzfarbstoff-beschichtete Kieselgelplatte (DC Karten Kieselgel 60F 254 0,2 mm, Honeywell Riedel de Haen, Seelze, Deutschland) gelegt und mit einer UV-Lampe (ENF-280C, Spectroline, Westbury, NY, USA) bei 254 nm angeregt. Die RNAs absorbieren das UV-Licht und projizieren einen „Schatten“ auf die Kieselgelplatte (*UV shadowing*), da der darunter liegende Fluoreszenzfarbstoff nicht angeregt werden kann. Die RNA-Bande wurde aus dem Gel ausgeschnitten und mit TNES-Puffer [10 mM Tris/HCl pH 7,5; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA; 0,1% (v/v) SDS] über Nacht unter Schütteln bei RT aus dem Gelstück eluiert. Anschließend wurden die extrahierten RNAs durch Phenol-Chloroform-Extraktion gereinigt und mit Ethanol präzipitiert (vgl. II.2.1.6). Die gefällte RNA wurde in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen und mit Hilfe des Nucleospin RNA II Kits (MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution der RNA erfolgte mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>. Die Reinigung dieser RNAs erfolgte unter denaturierenden Bedingungen. Daher wurden die RNAs nach der Elution für 5 min bei 95°C denaturiert und durch langsames Abkühlen auf RT renaturiert, um die Ausbildung der nativen Sekundär- und Tertiärstruktur zu gewährleisten.

### II.2.1.15 Aminoacylierung der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>

Die *in vitro*-transkribierte tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> (vgl. II.2.1.14) wurde vor Verwendung in der *in vitro*-Assemblierung von Translations-Initiationskomplexen (vgl. II.2.2.6) durch die *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase (vgl. II.2.2.8.5) mit Methionin beladen.

In einem 100  $\mu$ l-Ansatz wurden 30  $\mu$ g *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase (vgl. II.2.2.8.5) mit 20  $\mu$ g tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, 40 mM Tris/HCl pH 7,4, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM ATP, 1 mM GTP, 100 U RiboLock™ RNase Inhibitor (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) und 5 mM Methionin (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 45 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> mit Phenol-Chloroform extrahiert und durch Zugabe von Ethanol gefällt (vgl. II.2.1.6). Das RNA-Pellet wurde in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

Die Kontrolle der Aminoacylierung durch die *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase (vgl. II.2.2.8.5) erfolgte mit 4  $\mu$ l [<sup>35</sup>S]-Methionin (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig, Deutschland) und 1  $\mu$ g tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> für 30 min bei 37°C.

## II.2.1.16 Elektrophoretische Auftrennung von Nucleinsäuren

### II.2.1.16.1 Agarose-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA (vgl. II.2.1.12), mit Restriktionsenzymen spezifisch hydrolysierte DNA (vgl. II.2.1.7) und PCR-Fragmente (vgl. II.2.1.3) wurden in 1-2% Agarosegelen [125 ng/ml Ethidiumbromid, 0,5x TAE-Puffer (20 mM Tris pH 8,5; 10 mM CH<sub>3</sub>COOH; 0,5 mM EDTA)] in 0,5x TAE-Puffer bei einer Spannung von 120 V aufgetrennt. Vor der Trennung wurde die DNA mit 10x DNA-Probenpuffer [100 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 40% (v/v) Glycerin; 0,05% (v/v) Bromphenolblau; 0,05% (v/v) Xylencyanol] versetzt und nach der Gelelektrophorese mit dem Geldokumentationssystem (Kodak EDAS 290, Stuttgart, Deutschland) unter UV-Anregung (UV-Transilluminator, UXT-30M-8E, 312 nm, Biostep GmbH, Jansdorf, Deutschland) analysiert.

Die Analyse und Trennung von RNA erfolgte in 1,2% Agarose-Formaldehyd-Gelen [1x MOPS-Puffer (20 mM MOPS/NaOH pH 7,0; 5 mM CH<sub>3</sub>COONa; 1 mM EDTA), 2% (v/v) Formaldehyd] bei 120 V in 1x MOPS-Puffer. Zuvor wurde die RNA mit 5x RNA-Probenpuffer [5x MOPS; 4 mM EDTA; 30% (v/v) Formamid; 20% (v/v) Glycerin; 2,5% (v/v) Formaldehyd; 0,05% (v/v) Bromphenolblau; 100 µg/ml Ethidiumbromid] versetzt.

### II.2.1.16.2 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen wurde in dieser Arbeit zur Analyse bzw. Reinigung und anschließender Gelextraktion von [<sup>32</sup>P]-markierter RNA [5'cap-sORF-poly(A), HCV-5'UTR-sORF-3'UTR, HCV-5'UTRΔSLIII-sORF-3'UTR] und zur Analyse von [<sup>32</sup>P]-markierten cDNAs verwendet, die in der *toe print*-Reaktion generiert wurden (vgl. II.2.2.5).

Die Auftrennung erfolgte in 5-10% PAA-Gelen [19:1 Acrylamid:Bisacrylamid (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 1x TBE (89 mM Tris pH 8,3; 89 mM Borsäure; 20 mM EDTA)], die mit 7 M Harnstoff versetzt wurden bei 35 mA in 0,5x TBE-Puffer. Dazu wurden die Nucleinsäuren mit Formamid-Probenpuffer [95% (v/v) Formamid (deionisiert, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) 10 mM EDTA/NaOH pH 8,0; 0,05% (v/v) Bromphenolblau; 0,05% (v/v) Xylenxyanol] versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert.

Die Reinigung der RNA und die Auftrennung der cDNAs erfolgte durch 20 cm lange denaturierende (7 M Harnstoff) PAA-Gele (5-10%). Die markierten Nucleinsäuren wurden durch Autoradiographie analysiert (vgl. II.2.1.18).

## II.2.1.17 Transfektion von RNA und DNA in humane Zelllinien

### II.2.1.17.1 Kationische Polymer-vermittelte Transfektion von siRNAs und Plasmid-DNA

Für die Transfektion von siRNAs in Huh7- und Huh7/SGR-JFH1-Zellen (vgl. II.1.4) wurde Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Das

Prinzip beruht auf der Ausbildung eines Komplexes aus kationischen Lipiden mit den Phosphatgruppen des RNA-Rückgrates, der die Aufnahme der RNA in die Zelle vermittelt.

Die Huh7-Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von ca. 70% besaßen (vgl. II.1.4). Für eine 100 mm x 25 mm Kulturschale mit 10 ml DMEM wurden 1200 pmol siRNAs und 30 µl Lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMAX in je 1 ml DMEM (vgl. II.1.2, ohne die Zusätze FCS, Penicillin/Streptomycin, Biotin und Hypoxanthin) für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden diese Ansätze vereinigt, für weitere 20 min bei RT inkubiert und tropfenweise auf die Huh7-Zellen gegeben. 72 h nach Transfektion erfolgte die Ernte der Huh7/SGR-JFH1-Zellen und die Analyse der viralen RNA- bzw. Proteinmenge. Die mit siRNAs transfizierten Huh7-Zellen wurden entweder mit den Luciferase-Reporterkonstrukten oder dem mono-cistronischen HCV-Replikon retransfiziert (vgl. II.2.1.17.2).

Die Transfektion von Plasmid-DNA in Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen (vgl. II.1.4) erfolgte mit dem Turbofect<sup>TM</sup> Transfection Reagent (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland). Eine Kulturschale (100 mm x 25 mm) wurde mit 20 µg DNA transfiziert, die mit 20 µl Transfektionsreagenz in 1 ml DMEM (vgl. II.1.2, ohne die Zusätze FCS, Penicillin/Streptomycin, Biotin und Hypoxanthin) für 20 min bei RT inkubiert wurde. Die Konfluenz der Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen betrug ca. 50%. 24 h nach Transfektion wurden die Luciferase-Reporter-RNAs in diese Zellen transfiziert (vgl. II.2.1.17.2). Für die Affinitätsreinigung von Flag-DDX3 (vgl. II.2.2.7) wurden die Zellen 36 h nach Transfektion mit der Plasmid-DNA geerntet.

#### **II.2.1.17.2 Elektroporation von Luciferase-Reporter- und HCV-Replikon-RNAs**

Für *in vivo*-Translations- und HCV-Replikon-Experimente wurden die *in vitro*-transkribierten Luciferase-Reporter-RNAs (vgl. II.2.1.14) und das mono-cistronische HCV-Replikon in Huh7- bzw. Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen (vgl. II.1.4) durch Elektroporation transfiziert. Das Prinzip beruht auf der Generierung eines elektrischen Feldes, wodurch die Zellmembran permeabilisiert und die Aufnahme von Nucleinsäuren ermöglicht wird.

Die Huh7- und Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 70-80% elektroporiert. Dazu wurden die Zellen von der 100 mm x 25 mm Kulturschale trypsiniert, in 10 ml DMEM aufgenommen, 2x mit je 10 ml PBS gewaschen und in 400 µl PBS resuspendiert (vgl. II.1.4). Anschließend erfolgte die Transfektion von 4 pmol Luciferase-Reporter-RNA bzw. 200 ng (80 fmol) mono-cistronische HCV-Replikon-RNA durch Elektroporation. Die elektroporierten Zellen wurden danach auf 100 mm x 25 mm Kulturschalen bzw. auf 6-well-Platten ausgesät. Die Spaltbreite der Elektroporationsküvette (Gene Pulser<sup>®</sup> Cuvette, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) betrug für Huh7-Zellen 0,4 cm und für Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen 0,2 cm. Die Transfektionsbedingungen für Huh7-Zellen waren 200 V, 950 µF und 1 Puls bzw. für Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen 180 V, 950 µF und 1 Puls. Alle Elektroporationen wurden mit dem Gene Pulser<sup>®</sup> II Gerät (Bio-Rad

Laboratories GmbH, München, Deutschland) durchgeführt. 1 h nach Elektroporation der Luciferase-RNAs in Huh7-Zellen, die 72 h zuvor mit siRNAs transfiziert wurden (vgl. II.2.1.17.1), erfolgte die Zellernte und Analyse der Luciferaseaktivität (vgl. II.2.2.11.3). Die Analyse der Replikations- bzw. Translationseffizienz des mono-cistronischen HCV-Replikons erfolgte 48 h nach der Elektroporation des Replikons in die siRNA-transfizierten Huh7-Zellen (vgl. II.2.1.17.1).

### **II.2.1.18 Autoradiographie**

Die Autoradiographie wurde zum Sichtbarmachen von radioaktiv markierten Nucleinsäuren verwendet.

Dazu wurden denaturierende (7 M Harnstoff) PAA-Gele (vgl. II.2.1.16.2) für 15 min bei RT in 5% (v/v) Essigsäure fixiert, anschließend getrocknet (Unigeldryer 3545D, UniEquip Laborgerätebau- und Vertriebs GmbH, Planegg, Deutschland) und auf einen Kodak Storage Phosphor Screen S 230 (GE Healthcare, München, Deutschland) gelegt. Nach der Exposition des Screens wurde dieser mit einem Phosphoimager (Storm 860, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) eingelesen. Die Autoradiogramme wurden mit dem Programm ImageQuant 5.0 Build 050 (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA) quantitativ ausgewertet.

## **II.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **II.2.2.1 Herstellung von cytoplasmatischen Huh7-Extrakten**

Zur Analyse spezifischer Proteine im Cytoplasma von Huh7-Zellen wurde ein cytoplasmatischer Zellextrakt hergestellt.

Die Huh7-Zellen einer Kulturschale (100 mm x 25 mm, Konfluenz 70-80%) wurden durch Trypsin-Inkubation gelöst (vgl. II.1.4) und in DMEM (vgl. II.1.2) aufgenommen. Nach einem Waschschrift mit PBS (vgl. II.1.4) und einer Zentrifugation von 5 min bei 2000 rpm (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und 4°C erfolgte die Lyse der Zellen mit 50-200 µl Lyse-Puffer [50 mM Tris/HCl pH 8,0; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5% (v/v) NP-40] für 5 min auf Eis. Anschließend wurden die Zellkerne und unlösliche Bestandteile für 10 min bei 13000 rpm (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und 4°C präzipitiert. Bei dem verbliebenen Überstand handelte es sich um den cytoplasmatischen Extrakt.

### **II.2.2.2 Herstellung von Translations-kompetenten cytoplasmatischen Huh7-S10-Extrakten**

Die Herstellung von Translations-kompetenten cytoplasmatischen Huh7-Zellextrakten (Huh7-S10-Extrakt) erfolgte nach Barton & Flanagan (1993) und wurde für Translations-, Translations-Initiations- (vgl. II.2.2.3) und *toe printing*-Experimente (vgl. II.2.2.5) verwendet.

Dazu wurden Huh7-Zellen mit einer Konfluenz von ca. 80% von 80 (150 mm x 25 mm) Kulturschalen (entspricht ca.  $1,5 \times 10^8$  Zellen) trypsiniert (vgl. II.1.4), in DMEM aufgenommen (vgl. II.1.2) und 3x mit eiskaltem isotonischen Puffer (35 mM HEPES/KOH pH 7,6; 146 mM KCl; 11 mM Glucose) gewaschen. Durch eine Zentrifugation für 5 min bei 2000 rpm (Rotina 38 R, Winkelrotor 6-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und 4°C wurden die Zellen nach jedem Waschschrift pelletiert. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 Volumenteil hypotonischem Puffer [20 mM HEPES/KOH pH 7,6; 10 mM KCl; 1,5 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ; 1 mM DTT; Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland)] aufgenommen und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Zellyse erfolgte in einem 15 ml Dounce Homogenisator (Blaessig Glass Specialties Inc., Rochester, NY, USA) auf Eis durch 30x gleichmäßiges Stoßen und Ziehen des Pistills. Der cytoplasmatische Extrakt wurde danach sofort mit 0,1 Volumenteil 10x S10-Puffer [0,2 M HEPES/KOH pH 7,6; 1,2 M  $\text{CH}_3\text{COOK}$ ; 40 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ ; 50 mM DTT] versetzt und für 10 min bei 10000 rpm (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut für 10 min bei 10000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurde der verbliebene Überstand (Huh7-S10-Extrakt) aliquotiert, in flüssigem  $\text{N}_2$  schockgefroren und bei -80°C für weitere Experimente gelagert.

Für Translations-Initiationsreaktionen (vgl. II.2.2.3), die ausschließlich auf exogen zugegebener RNA erfolgen sollten, wurde die endogene mRNA im S10-Extrakt durch Zugabe von 0,08 Units/ $\mu\text{l}$  Micrococcus-Nuclease (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und 1 mM  $\text{CaCl}_2$  für 15 min bei 25°C hydrolysiert. Die Inaktivierung der Micrococcus-Nuclease erfolgte durch Zugabe von 2 mM EGTA/NaOH pH 7,6 (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland).

Der für die Polysomenanalyse (vgl. II.2.2.4) verwendete Huh7-S10-Extrakt wurde wie oben aufgezeigt, mit folgenden Änderungen hergestellt. Nach der Zellernte erfolgte die Inkubation der Huh7-Zellen in PBS (vgl. II.1.4) mit 2 mM Cycloheximid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) für 15 min bei RT. Für die Zellyse mit dem Dounce Homogenisator wurde der hypotonische Puffer mit 2 mM Cycloheximid versetzt.

### II.2.2.3 Translationsreaktion und Translations-Initiationsreaktion *in vitro*

Die Durchführung der *in vitro*-Translation orientierte sich an Barton & Flanagan (1993). In einem 10  $\mu\text{l}$ -Reaktionsansatz wurden 60 fmol *in vitro*-transkribierte Luciferase-Reporter-RNA (vgl. II.2.1.14) mit 40% Huh7-S10-Extrakt (vgl. II.2.2.2, 9  $\mu\text{g}$  Protein/ $\mu\text{l}$ ), 16 mM HEPES/KOH pH 7,6, 1 mM ATP, 0,2 mM GTP, 120 mM  $\text{CH}_3\text{COOK}$ , 2,75 mM  $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ , 1 mM Aminosäure-Mix (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland), 20 mM Kreatinphosphat (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), 40  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  Kreatinkinase (Roche) und 0,08 mg/ml tRNA (Roche) für 30 min bei 37°C inkubiert. Die

Translationsreaktion wurde im Anschluss auf Eis gestoppt und die Translationseffizienz der entsprechenden Luciferase-RNAs bestimmt (vgl. II.2.2.11.3).

Translations-Initiationsreaktionen wurden mit den *in vitro*-transkribierten [<sup>32</sup>P]-markierten RNAs 5'cap-sORF-poly(A), HCV-5'UTR-sORF-3'UTR und HCV-5'UTR $\Delta$ SLIII-sORF-3'UTR durchgeführt (vgl. II.2.1.14). Die Anreicherung von 48S- und 80S-Translations-Initiationskomplexen erfolgte durch Zugabe von spezifischen Translationsinhibitoren zur oben aufgeführten *in vitro*-Translationsreaktion. 48S-Initiationskomplexe wurden durch Ersetzen des GTPs mit 1,5 mM GMP-PNP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) angereichert. Dieses nicht hydrolysierbare GTP-Analogon inhibiert das 60S-*subunit joining*, in dem es die Freisetzung von Translations-Initiationsfaktoren aus dem 48S-Initiationskomplex unterbindet. Die Blockierung der Translationselongation durch Hemmung der Peptidyltransferaseaktivität der 60S-Untereinheit erfolgte durch Zugabe von 2 mM Cycloheximid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland). In einer Translations-Initiationsreaktion akkumulieren dadurch 80S-Initiationskomplexe.

Alle Translations-Initiationsreaktionen wurden anschließend in einem linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt (vgl. II.2.2.4). Für Western-Blot-Analysen (vgl. II.2.2.11.2) wurden 20 nM [<sup>32</sup>P]-markierte 5'cap-sORF-poly(A)-RNA bzw. 60 nM [<sup>32</sup>P]-markierte HCV-5'UTR-sORF-3'UTR- und HCV5'UTR $\Delta$ SLIII-sORF-3'UTR-RNAs in einem 125  $\mu$ l-Reaktionsansatz eingesetzt. Der Vergleich von S10-Extrakten von Huh7-Zellen, die 72 h zuvor mit den siRNAs siGFP und siDDX3-2 transfiziert wurden (vgl. II.2.1.17.1), erfolgte in einem 40  $\mu$ l-Reaktionsansatz mit je 10 nM [<sup>32</sup>P]-markierter 5'cap-sORF-poly(A)- und HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA durch anschließende Čerenkov-Zählung (vgl. II.2.2.4). Die Reaktionszeit der Translations-Initiationsreaktion betrug je nach Experiment zwischen 20 s und 15 min und wurde bei 37°C inkubiert sowie durch Überführung des Reaktionsgefäßes auf Eis gestoppt.

#### II.2.2.4 Auftrennung und Analyse von Translationskomplexen

Die Auftrennung von Translationskomplexen erfolgte in einem linearen Saccharose-Gradienten. Die Gradienten wurden mit einem Gradientenmischer (Gradient Master, BioComp Instruments Inc., Fredericton, Kanada) nach dem *tilted tube rotation*-Prinzip (Coombs & Watts, 1985) und nach Angaben des Herstellers generiert. Dabei wurden zwei verschieden konzentrierte Saccharose-Lösungen (Endpunktkonzentrationen des Saccharose-Gradienten) in einem Zentrifugenröhrchen [Ultra-Clear<sup>TM</sup> Centrifuge Tubes (14 x 95 mm), Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland] in einem spezifischen Winkel für eine ausgewiesene Zeit nach Angaben des Herstellers rotiert. Alle Gradienten wurden vor dem Beladen mit den entsprechenden Proben auf 4°C gekühlt.

Translations-Initiationskomplexe (vgl. II.2.2.3) wurden in einem 5-25% (w/v) linearen Saccharose-Gradienten (20 mM HEPES/KOH pH 7,6; 150 mM CH<sub>3</sub>COOK; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT) durch Zentrifugation für 2 h bei 38000 rpm (L8-M Ultrazentrifuge, SW40Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 4°C aufgetrennt. Die

Fraktionierung der Gradienten erfolgte von der höchsten zur geringsten Saccharose-Konzentration zu je 600 µl Fraktionen durch Anstechen des Bodens des Zentrifugenröhrchens. Zur Identifizierung der Initiationskomplexe wurde anschließend die OD<sub>260</sub> (JASCO® V-550 UV/VIS Spectrophotometer, Groß-Umstadt, Deutschland + HELLMMA® Präzisions-Küvetten Quarzglas Suprasil, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) bzw. die Radioaktivität mittels Čerenkov-Zählung (Pony Vial, 6 mL, Anti-Static, Perkin Elmer®, Rodgau, Deutschland + Lumasafe™ Plus, Lumac LSC BV., Groningen, Niederlande) in einem Szintillationszähler (Tri-Carb® 2100TR, Packard BioScience Company, Meriden, CT, USA) bestimmt. Die Čerenkov-Strahlung beruht auf der Emission elektromagnetischer Strahlung beim Durchtritt geladener Teilchen (z.B. freiwerdende Elektronen aus dem Zerfall des <sup>32</sup>P-Atomkerns) durch ein dielektrisches Medium. Die geladenen Teilchen polarisieren die Moleküle des Mediums, die durch die Rückkehr in den Grundzustand die s.g. Čerenkov-Strahlung emittieren. Für die Proteinanalyse wurden 400 µl jeder Fraktion mit 10% Trichloressigsäure (TCA, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefällt (Sambrook & Russell, 2001), die Proteine mit SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. II.2.2.10) und mittels eines Western-Blots identifiziert (vgl. II.2.2.11.2).

Zur Auftrennung der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten wurden 400 µg Huh7-S10-Extrakt mit 25 mM EDTA/NaOH pH 7,6 versetzt und für 4 h bei 38000 rpm (L8-M Ultrazentrifuge, SW40Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 4°C durch oben aufgeführten Gradienten (versetzt mit 25 mM EDTA/NaOH pH 7,6) zentrifugiert.

Die Polysomenanalyse wurde nach Weidensdorfer *et al.* (2009) durchgeführt. Dazu wurden 400 µg Cycloheximid-behandelter Huh7-S10-Extrakt (vgl. II.2.2.2) auf einen 15-45% (w/v) linearen Saccharose-Gradienten geladen und für 2 h bei 30000 rpm (L8-M Ultrazentrifuge, SW40Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 4°C zentrifugiert. Die Saccharose-Gradienten wurden mit 0,4 mM Cycloheximid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland) versetzt.

Die Auftrennung von *in vitro*-assemblierten Initiationskomplexen (vgl. II.2.2.6), die mit gereinigten Translationsfaktoren assembliert wurden, erfolgte nach Pisarev *et al.* (2007b) in einem 5-25% (w/v) linearen Saccharose-Gradienten (20 mM Tris/HCl pH 8,0; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 100 mM CH<sub>3</sub>COOK; 1 mM DTT) durch Zentrifugation (2 h, 38000 rpm, 4°C) mit einem SW40Ti-Rotor (L8-M Ultrazentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland).

### II.2.2.5 Primer-Extensions-Inhibitions-Analyse (*toe printing*)

Das *toe printing* ist eine Methode, um die Position von ribosomalen 48S- und 80S-Komplexen auf zu translatierenden RNAs zu bestimmen und wurde nach Ostareck *et al.* (2001) durchgeführt.

In einem 10 µl-Ansatz wurde eine Translations-Initiationsreaktion angesetzt (vgl. II.2.2.3) und zur Inhibierung der Assemblierung eines 80S-Ribosoms das GTP gegen 1,5 mM GMP-PNP (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) ersetzt und für 5 min bei 30°C

inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 pmol [<sup>32</sup>P]-Oligonucleotid (Oligonucleotide für das *toe printing* sind in Tab. VII-1 aufgelistet) und eine Inkubation für 3 min bei 0°C. Danach wurde dieser Ansatz 20-fach mit 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM CH<sub>3</sub>COOK, 0,5 mM dNTPs, 0,5 mM Cycloheximid (AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland), 1 mM DTT und 50 U AMV-RT (20 U/μl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) verdünnt und für 15 min bei 30°C inkubiert. Die cDNAs wurden mit Phenol-Chloroform extrahiert und durch Zugabe von Ethanol gefällt (vgl. II.2.1.6).

Die Größe der cDNA-Produkte wurde anhand einer Didesoxyribonucleotid-Sequenzierleiter (Sanger *et al.*, 1977) nach Slatko *et al.* (1999) bestimmt. Die Herstellung des Größenstandards erfolgte mit den gleichen Oligonucleotiden, die für das *toe printing* verwendet und mit den entsprechenden DNA-Fragmenten, von dem die RNAs mittels *in vitro*-Transkription generiert wurden (vgl. II.2.1.14). In einem 15 μl-Sequenzieransatz wurden 3 μl der jeweiligen Terminationsstammlösung für die *Taq*-Polymerase (Tab. II-10) mit 20 pmol [<sup>32</sup>P]-Oligonucleotid, 200 ng DNA, 1,5 μl 10x DreamTaq<sup>TM</sup>-Puffer und 0,625 U DreamTaq<sup>TM</sup> (5 U/μl, Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) versetzt und im MasterCycler<sup>®</sup> Thermocycler (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit folgendem PCR-Programm inkubiert:

- (1) 95°C 30 s
- (2) 57°C 30 s
- (3) 72°C 30 s

Schritte (1)-(3) 25 Zyklen

**Tab. II-10: Konzentrationen der dNTPs und ddNTPs in den A-, C-, G- und T-Terminationsstammlösungen für die *Taq*-Polymerase**

Nucleotid	A (μM)	C (μM)	G (μM)	T (μM)
dATP	8	80	80	80
dCTP	80	8	80	80
dGTP	80	80	8	80
dTTP	80	80	80	8
ddATP	120	-	-	-
ddCTP	-	55	-	-
ddGTP	-	-	16	-
ddTTP	-	-	-	100

Die cDNAs und die Sequenzierreaktionen wurden in Formamid-Puffer (vgl. II.2.1.16.2) aufgenommen, für 3 min bei 95°C erhitzt und in einem denaturierenden (7 M Harnstoff) PAA-Gel aufgetrennt (vgl. II.2.1.16.2) [10% PAA für das 5'cap-ORF-poly(A)- und 6% PAA für das HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-Konstrukt].

### II.2.2.6 *In vitro*-Assemblierung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen

Die *in vitro*-Assemblierung der 48S- und 80S-Translations-Initiationskomplexe erfolgte nach Pisarev *et al.* (2007b).

Zur Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes an der [<sup>32</sup>P]-markierten RNA 5'cap-sORF-poly(A) wurden 5 pmol dieser RNA mit 5 pmol Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, 3 pmol eIF1, 3 pmol eIF1A, 4 pmol eIF2, 4 pmol eIF3, 7 pmol eIF4A, 7 pmol eIF4B, 12 pmol eIF4G<sub>737-1116</sub>, 3 pmol eIF5, 3 pmol Flag-DDX3 und 3 pmol der 40S-Untereinheit (vgl. II.2.1.15, 0, II.2.2.8.1, II.2.2.8.2, II.2.2.8.3, II.2.2.8.5 und II.2.2.9.2) in einem 40 µl-Ansatz mit 20 mM Tris/HCl pH 8,0, 100 mM CH<sub>3</sub>COOK, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 1 mM ATP und 0,2 mM GTP versetzt und für 10 min bei 37°C inkubiert. Für die Assemblierung der 80S-Initiationskomplexe wurden die generierten 48S-Initiationskomplexe zusätzlich mit 5 pmol eIF5B<sub>587-1220</sub> und 3 pmol der 60S-Untereinheit versetzt und für 2 min bei 37°C inkubiert. Die 48S- und 80S-Initiationskomplexe an der [<sup>32</sup>P]-markierten RNA HCV-5'UTR-sORF-3'UTR wurden in derselben Weise wie für die RNA 5'cap-sORF-poly(A) assembliert, jedoch ohne Zugabe der Proteine eIF1, eIF1A, eIF2, eIF4A, eIF4B, eIF4G<sub>737-1116</sub> und eIF5. Anschließend erfolgte die Auftrennung der Initiationskomplexe in einem 5-25% (w/v) linearen Saccharose-Gradienten (vgl. II.2.2.4) durch Zentrifugation mit einem SW40Ti-Rotor (L8-M Ultrazentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) für 2 h bei 38000 rpm und 4°C.

### II.2.2.7 Immunpräzipitation - Affinitätsreinigung

Die Immunpräzipitation bzw. Affinitätsreinigung wurde zur Anreicherung von spezifischen Proteinen und deren Interaktionspartnern (Proteine, RNA) verwendet. Das Prinzip beruht auf der Kopplung eines für ein Protein spezifischen Immunglobulins an eine Matrix (Protein A-, Protein G-Sepharose). Das Protein A aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* und Protein G aus *Streptococcus*-Arten binden den Fc-Teil der IgG-Moleküle. Die Antikörpergekoppelte Matrix wird mit dem Proteingemisch versetzt, aus der das zu untersuchende Protein angereichert werden soll. Durch die spezifische Antigen-Antikörper-Bindung ist es möglich, aus einem Proteingemisch das gewünschte Protein zu reinigen bzw. anzureichern und potentielle Interaktionspartner nachzuweisen.

Zur Präzipitation von DDX3 aus Huh7-S10-Extrakten (vgl. II.2.2.2) von naiven Huh7- und von Huh7-Zellen, die das mono-cistronischen HCV-Replikon transient enthielten (vgl. II.2.1.17.2), wurden 5 µl DDX3-Kaninchen-Antiserum bzw. Kaninchen-Präimmunserum mit 30 µl (1 + 1-Suspension) Protein A-Sepharose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) in IPB-Puffer [20 mM HEPES/KOH pH 7,6; 150 mM KCl; 0,5% (v/v) NP-40; 1 mM DTT] für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Protein A-Sepharose-beads 3x mit je 500 µl IPB-Puffer gewaschen und mit 150 µg Huh7-S10-Extrakt versetzt und für 4 h bei 8°C inkubiert. Nach wiederholtem Waschen (3x) mit IPB-Puffer erfolgte die Aufnahme der Protein A-Sepharose-beads zum Auftrennen der Proteine im SDS-Gel in SDS-Probenpuffer (vgl. II.2.2.10).

Für die Analyse co-präzipitierter RNAs wurden die beads nach der Immunpräzipitation mit 40 µg Proteinase K (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) in 400 µl Puffer [20 mM Tris/HCl pH 7,6; 300 mM NaCl; 1% (v/v) SDS] versetzt und für 1 h bei 37°C inkubiert.

Anschließend wurden die RNAs mit Phenol-Chloroform extrahiert, durch Zugabe von Ethanol gefällt und pelletiert (vgl. II.2.1.6) sowie in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

Flag-DDX3 wurde rekombinant durch Transfektion des Expressionsplasmids (vgl. II.1.7 und II.2.1.17.1) in Hek293T-REx<sup>TM</sup>-Zellen (vgl. II.1.4) hergestellt und mit dem ANTI-FLAG M2 Affinity Gel Kit (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die Elution von Flag-DDX3 von den Flag-gekoppelten *beads* erfolgte mit 0,65 µg/µl Flag-Peptid. Die Konzentrationsbestimmung des gereinigten Flag-DDX3 erfolgte mittels eines semi-quantitativen Western-Blots (vgl. II.2.2.11.2), anhand eines Standards mit rekombinant gereinigtem DDX3 aus *E. coli* (vgl. II.2.2.8.4).

### II.2.2.8 Proteinreinigung

Die Reinigung von Proteinen, die mit Chromatographie-Säulen durchgeführt wurde, erfolgte mit einer FPLC (ÄKTApurifier 100, GE Healthcare, München, Deutschland).

#### II.2.2.8.1 Reinigung von ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten

Die ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten wurden aus Kaninchen-Retikulozytenlysat (Green Hectares, Oregon, WI, USA) nach Pisarev *et al.* (2007b) gereinigt.

100 ml Kaninchen-Retikulozytenlysat wurden bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und die Ribosomen bzw. Polysomen anschließend für 8 h bei 42000 rpm (L8-M Ultrazentrifuge, SW45Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in Puffer A (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM KCl; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT) durch Rühren für 30 min bei 0°C resuspendiert und auf eine optische Dichte (OD<sub>260</sub>) von 100-150 (JASCO<sup>®</sup> V-550 UV/VIS Spectrophotometer, Groß-Umstadt, Deutschland + HELLMMA<sup>®</sup> Präzisions-Küvetten Quarzglas Suprasil, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) mit Puffer A eingestellt. Unlösliche Rückstände wurden im Anschluss durch eine Zentrifugation pelletiert [10 min, 13000 rpm (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland), 4°C]. Zur Trennung der ribosomalen Untereinheiten wurde die Polysomensuspension danach mit 1 mM Puromycin für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend, zur Dissoziation von Initiationsfaktoren, tropfenweise mit 4 M KCl bis auf eine Endkonzentration von 0,5 M KCl unter Rühren versetzt. 1 ml-Aliquots wurden unverzüglich auf einen 10-30% (w/v) linearen Saccharose-Gradienten (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,5 M KCl; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT) geladen (vgl. II.2.2.4) und für 16 h bei 23500 rpm und 4°C zentrifugiert (L8-M Ultrazentrifuge, SW40Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Nach der Fraktionierung wurden die 40S- und 60S-Peak-Fractionen durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert und vereinigt. Die ribosomalen Untereinheiten wurden anschließend in Puffer B (20 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 2 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,25 M Saccharose; 1 mM DTT) mit einem Vivaspin 20 Konzentrador (Spin-X<sup>R</sup> UF 20, 100000 MWCO PES, Corning, Amsterdam, Niederlande) umgepuffert und auf eine OD<sub>260</sub> von 25-50 der 40S-Untereinheit

bzw. 60-120 der 60S-Untereinheit konzentriert. Für die molare Konzentration der ribosomalen Untereinheiten wurde angenommen, dass eine OD<sub>260</sub> von 1 einer molaren Menge von 65 pmol an 40S-Untereinheiten bzw. 29 pmol an 60S-Untereinheiten entspricht (Raychaudhuri & Maitra, 1986). Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

#### II.2.2.8.2 Native Reinigung von eIF3 aus cytoplasmatischem HeLa-Extrakt

Der cytoplasmatische HeLa-Extrakt wurde von Prof. R. Lührmann (Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie, Göttingen, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Dieser Extrakt wurde nach dem gleichen Prinzip hergestellt wie der Translations-kompetente cytoplasmatische Huh7-S10-Extrakt (vgl. II.2.2.2), mit der Ausnahme, dass kein 10x S10-Puffer zugegeben wurde. Die Reinigung von eIF3 orientierte sich an Damoc *et al.* (2007).

300 ml HeLa-Extrakt wurden in einem 37°C Wasserbad schnellstmöglich aufgetaut und mit 10% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA/NaOH pH 7,6, 1 mM EGTA/NaOH pH 7,6, 1 mM PMSF und 2 ml Protease Inhibitor Cocktail (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München, Deutschland) versetzt. Nach einer Zentrifugation für 20 min bei 20000 rpm und 4°C in einem SW45Ti-Rotor (L8-M Ultrazentrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) wurde der Überstand abgenommen, mit 450 mM KCl versetzt und erneut für 5 h bei 40000 rpm (L8-M Ultrazentrifuge, SW45Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 4°C zentrifugiert. Die mittleren 2/3 des Überstands wurden abgenommen und unter Rühren bei 0°C mit 40% (w/v) (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> versetzt. Nach einstündigem Rühren bei 0°C wurde das Präzipitat pelletiert (10 min, 20000 rpm, 4°C, L8-M Ultrazentrifuge, SW45Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland), anschließend in 50 ml Puffer C [20 mM HEPES/KOH pH 7,5; 50 mM KCl; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1 mM DTT] resuspendiert und über Nacht gegen 2 l Puffer C bei 4°C dialysiert. Die Proteinlösung wurde filtriert (Rotilabo<sup>®</sup>-Spritzenfilter; PVDF; steril; 0,22 µm; Carl Roth GmbH + Co. KG; Karlsruhe; Deutschland) und auf eine 6 ml Resource Q-Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gegeben, die mit Puffer C äquilibriert war. Die Säule wurde mit 2 Säulenvolumina an Puffer C gewaschen und die anschließende Elution erfolgte mit einem 100 ml-Gradienten von 50-600 mM KCl in Puffer C. Fraktionen mit eIF3 wurden durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert und vereinigt, gegen 1 l Puffer C für 4 h dialysiert und auf eine mit Puffer C äquilibrierte Mono S-Säule (HR 10/10, GE Healthcare, München, Deutschland) geladen. Die Proteine wurden mit einem 100 ml 50-400 mM KCl-Gradienten in Puffer C von der Mono S-Säule eluiert. Fraktionen die eIF3 enthielten, wurden durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert, vereinigt und mit Vivaspin 20 (Spin-X<sup>R</sup> UF 20, 50000 MWCO PES, Corning, Amsterdam, Niederlande) auf 1,5 ml konzentriert. Anschließend wurde eIF3 auf eine Gelfiltrationssäule (Superose 6, 10/300 GL, GE Healthcare, München, Deutschland) gegeben, die mit Puffer C und 100 mM KCl äquilibriert war. eIF3-haltige Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl.

II.2.2.11.1) identifiziert und vereinigt, bis auf 1 mg/ml konzentriert, in flüssigen N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### II.2.2.8.3 Native Reinigung von eIF2 aus cytoplasmatischem HeLa-Extrakt

Der Translations-Initiationsfaktor eIF2 wurde ausgehend vom 40%-Überstand der Ammoniumsulfat-Präzipitation des HeLa-Extrakts der eIF3-Reinigung aus Abschnitt II.2.2.8.2 nach Pisarev *et al.* (2007b) gereinigt.

Der Überstand wurde durch Zugabe von weiterem (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> unter Rühren bei 0°C auf eine Konzentration von 50% (w/v) eingestellt. Nach einer Inkubation von 30 min unter Rühren bei 0°C erfolgte eine Zentrifugation (10 min, 20000 rpm, 4°C, L8-M Ultrazentrifuge, SW45Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und die Aufnahme des Pellets in Puffer D [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM DTT]. Über Nacht wurde die Proteinlösung gegen Puffer D + 100 mM KCl dialysiert und auf eine 15 ml DEAE-Säule gegeben, die mit Puffer D + 100 mM KCl äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit Puffer D + 250 mM KCl in einer Stufe. Anschließend wurde das Eluat mit Puffer D auf 100 mM KCl verdünnt und auf eine mit Puffer D + 100 mM KCl äquilibrierte 15 ml-Phosphocellulose-Säule (P11, Whatman®) geladen. Die Säule wurde mit Puffer D + 400 mM KCl gewaschen und die Elution der Proteine erfolgte mit Puffer D + 800 mM KCl. Das Eluat wurde mit Puffer D auf 50 mM KCl verdünnt und auf eine 1 ml Resource Q-Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gegeben, die in Puffer D + 50 mM KCl äquilibriert war. Die Elution erfolgte in einem 50-500 mM KCl-Gradienten in Puffer D. Fraktionen mit eIF2 wurden durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert und vereinigt, anschließend in Puffer D + 100 mM KCl transferiert und konzentriert (Vivaspin 20, Spin-X<sup>R</sup> UF 20, 50000 MWCO PES, Corning, Amsterdam, Niederlande), schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### II.2.2.8.4 Rekombinante Herstellung und Reinigung von DDX3 aus *E. coli*

Die rekombinante Herstellung von DDX3 erfolgte durch Transformation (vgl. II.2.1.11) des Expressionsplasmids (vgl. II.1.7) in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) (vgl. II.1.3).

Dazu wurden je 3x 650 ml Kulturmedium (vgl. II.1.2) mit 8 ml einer Übernachtskultur beimpft und bis zum Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,8 bei 200 rpm (Universalschüttler SM 30 A, Hechingen, Deutschland) und 37°C inkubiert. Die Induktion der Genexpression erfolgte mit 1 mM IPTG (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) bei 37°C für 3 h. Anschließend wurden die Zellen für 10 min bei 6000 rpm (Sorvall RC-6<sup>TM</sup> Plus Superspeed-Zentrifuge, SLC-3000-Rotor, Bad Nauheim, Deutschland) und 4°C pelletiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall (2x 3 min; Cycle 0,5; Amplitude 70; Ultraschallprozessor UP200S; Hielscher Ultrasonics GmbH; Teltow; Deutschland). Das Expressionsprodukt bildete *inclusion bodies* (IBs), die nach Rudolph *et al.* (1997) präpariert wurden. Die IBs wurden in Puffer E [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 10% (v/v) Glycerin; 8 M Harnstoff;

100 mM NaCl; 20 mM Imidazol] denaturiert und auf eine 5 ml Ni-NTA-Säule (HisTrap™ FF crude, GE Healthcare, München, Deutschland) gegeben, die mit Puffer E äquilibriert war. Die Elution erfolgte mit Puffer E + 300 mM Imidazol in einer Stufe. Die Elutionsfraktion wurde 1:10 mit Puffer F [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 50 mM NaCl; 10% (v/v) Glycerin; 8 M Harnstoff; 1 mM DTT] verdünnt, auf eine 6 ml Resource Q-Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) geladen und mit einem 0,05-1 M NaCl-Gradienten in Puffer F eluiert. Das Eluat mit DDX3 wurde gegen Puffer F + 2 M NaCl dialysiert und anschließend mit Puffer G [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 2 M NaCl; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM DTT] durch Dialyse renaturiert. Die Konzentrierung erfolgte durch eine Ni-NTA-Säule (siehe oben) in Puffer G + 300 mM Imidazol. Zur Entfernung des Imidazols wurde die DDX3-haltige Elutionsfraktion abschließend auf eine Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 75, GE Healthcare, München, Deutschland) gegeben, die mit 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5 M NaCl, 1 mM DTT und 10% (v/v) Glycerin äquilibriert war. Die Peak-Fractionen von DDX3 wurden durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert, vereinigt, schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### **II.2.2.8.5 Rekombinante Herstellung und Reinigung von eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF4G<sub>737-1116</sub>, eIF5, eIF5B<sub>587-1220</sub> und der *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase aus *E. coli***

Die rekombinante Herstellung und Reinigung von eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF4G<sub>737-1116</sub>, eIF5, eIF5B<sub>587-1220</sub> und der *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase orientierte sich an Pisarev *et al.* (2007b).

Die Anzucht, Induktion, Zellernte und der Zellaufschluss der *E. coli*-Bakterien mit den entsprechenden cDNAs der oben aufgeführten Proteine erfolgte wie in Abschnitt II.2.2.8.4 beschrieben. Alle *E. coli*-Bakterien wurden in Puffer H [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,8 M KCl; 20 mM Imidazol; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM PMSF; Protease Inhibitor (Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, EDTA-free, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)] durch Ultraschall aufgeschlossen und für 30 min bei 40000 rpm (L8-M Ultrazentrifuge, SW45Ti-Rotor, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland) und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine 5 ml Ni-NTA-Säule (HisTrap™ FF crude, GE Healthcare, München, Deutschland) gegeben, die mit Puffer H äquilibriert war. Nach Beladung wurde die Säule mit Puffer I [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 20 mM Imidazol; 10% (v/v) Glycerin] gewaschen und die Proteine mit einem 25 ml 20-500 mM Imidazol-Gradienten in Puffer I eluiert. Im Anschluss wurden die Peak-Fractionen der Proteine durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert und 1:5 mit Puffer J [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 0,1 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin; 1 mM DTT] verdünnt. Fraktionen mit eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF5 und der *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase wurden danach auf eine mit Puffer J + 50 mM KCl äquilibrierte 6 ml Resource Q-Säule (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) geladen und mit 25 ml eines 0,05-1 M KCl-Gradienten in Puffer J eluiert. Fraktionen mit eIF1, eIF4G<sub>737-1116</sub> und eIF5B<sub>587-1220</sub>

wurden auf eine 5 ml Heparin-Säule (HiTrap<sup>TM</sup> Heparin HP, GE Healthcare, München, Deutschland) geladen, die ebenfalls mit Puffer J + 50 mM KCl äquilibriert war. Die Elution erfolgte wiederum mit 25 ml eines 0,05-1 M KCl-Gradienten in Puffer J. Peak-Fractionen aller eIFs und der *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase wurden durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert und jeweils vereinigt. Anschließend wurden diese mit einer Gelfiltrationssäule (HiLoad 16/60 Superdex 75, GE Healthcare, München, Deutschland) umgepuffert, die mit Puffer K [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM KCl; 1 mM DTT; 0,1 mM EDTA; 10% (v/v) Glycerin] äquilibriert war. Die Peak-Fractionen wurden wiederum durch SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) und Coomassie-Färbung (vgl. II.2.2.11.1) identifiziert, vereinigt, aliquotiert und bei -80°C aufbewahrt.

Die Konzentrationsbestimmung aller rekombinant gereinigten Proteine sowie von eIF2 und eIF3 erfolgte durch eine Messung der Absorption bei 280 nm (vgl. II.2.2.9.2).

## **II.2.2.9 Konzentrationsbestimmung von Proteinen**

### **II.2.2.9.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteingemischen erfolgte mit der Methode nach Bradford (1976) mit dem Bio-Rad Protein Assay Kit (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Das Prinzip beruht auf einer Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffs Coomassie-Brillant-Blau R-250 von 465 nm auf 595 nm nach Bindung an vorrangig basische und aromatische Aminosäureseitenketten (Compton & Jones, 1985). Die Proteinkonzentration wurde mittels einer für bekannte BSA-Konzentrationen (New England Biolabs GmbH, Frankfurt/Main, Deutschland) aufgestellten Kalibriergeraden ermittelt.

### **II.2.2.9.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Gill & von Hippel**

Nach Gill & von Hippel wird die Konzentration eines Proteins mit bekannter Aminosäuresequenz anhand der Absorption bei 280 nm bestimmt (Gill & von Hippel, 1989). Der entsprechende Extinktionskoeffizient  $\epsilon$  setzt sich aus der Anzahl im Molekül vorhandenen Tryptophane, Tyrosine, Phenylalanine und Cystine zusammen. Die Absorption der rekombinant gereinigten Proteine wurde mit einem Spektrometer der Firma JASCO<sup>®</sup> (JASCO<sup>®</sup> V-550 UV/VIS Spectrophotometer, Groß-Umstadt, Deutschland) und einer Küvette aus Quarzglas (HELLMA<sup>®</sup> Präzisions-Küvetten Quarzglas Suprasil, Hellma GmbH & Co. KG, Müllheim, Deutschland) gemessen und die Konzentration mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes ermittelt.

### **II.2.2.10 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichts erfolgte in der diskontinuierlichen SDS-PAGE (Laemmli, 1970), die anschließend durch Coomassie-Färbung des SDS-

PAA-Gels oder mittels eines Western-Blots und Chemilumineszenz detektiert wurden (vgl. II.2.2.11.2).

Für die Probenvorbereitung wurden die entsprechenden Proteine mit SDS-Probenpuffer [10 mM Tris/HCl pH 6,8; 20% (v/v) Glycerin; 6% (v/v) SDS; 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol; 0,01% (v/v) Bromphenolblau] versetzt und für 5 min bei 95°C inkubiert. Die Trennung erfolgte je nach Größe der Proteine, in einem 10% bzw. 12% SDS-PAA-Gel [375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,4% (v/v) SDS; 10% bzw. 12% PAA (Rotiphorese Gel 30 37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland); 0,15% (v/v) TEMED; 0,04% (v/v) APS] bei konstanter Stromstärke (30 mA). Eine Vortrennung und Konzentrierung der Proteine wurde durch ein 4% Sammelgel [62,5 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,2% (v/v) SDS; 0,2% (v/v) TEMED; 4% (Rotiphorese Gel 30 37,5:1 Acrylamid/Bisacrylamid, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland); 0,1% (v/v) APS] erreicht. Die Identifizierung des Molekulargewichts der rekombinanten Proteine erfolgte mit dem Molekulargewichtsmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland).

## **II.2.2.11 Nachweis von Proteinen**

### **II.2.2.11.1 Coomassie-Färbung**

Zur Detektion der Proteine nach der SDS-PAGE (vgl. II.2.2.10) wurde das SDS-PAA-Gel für 2 min mit Coomassie-Lösung [50% (v/v) Methanol, 10% (v/v) Essigsäure, 4 mg/ml Coomassie-Brillant-Blau R-250] in der Mikrowelle durch Erhitzen gefärbt. Die Entfernung des unspezifisch gebundenen Farbstoffs erfolgte durch wiederholtes Aufkochen des SDS-PAA-Gels in der Mikrowelle mit 7% (v/v) Essigsäure für 2 min.

### **II.2.2.11.2 Western-Blot**

Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte durch eine Antikörper-Bindung. Dafür wurden die Proteine durch eine SDS-PAGE aufgetrennt (vgl. II.2.2.10) und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (Western-Blot).

Das Whatman® Filterpapier (Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) und die Nitrocellulosemembran (Protran® Nitrocellulose Transfer Membran, Whatman GmbH, Dassel, Deutschland) wurden mit 1x Transferpuffer [48 mM Tris/HCl; 39 mM Glycin; 13 mM SDS; 20% (v/v) Methanol] versetzt und im Anschluss mit dem SDS-Gel auf eine Apparatur (Semi Dry Blotter Unit, Biostep GmbH, Jansdorf, Deutschland) gelegt. Der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf die Nitrocellulosemembran erfolgte für 2 h bei 6 V und RT. Zum Blockieren freier Bindestellen wurde die Membran nach dem Transfer in TN-Tween [20 mM Tris/HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,05% (v/v) Tween 20] mit 5% (w/v) Milchpulver (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) für 2 h unter Schütteln bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit dem primären Antikörper (vgl. Tab. II-6) nach Angaben des Herstellers für 2 h bei RT inkubiert. Alle primären Antikörper wurden mit einer

Verdünnung von 1:2000 eingesetzt. Die Ausnahme bildete das anti-NS5A-Antiserum, das mit einer Verdünnung von 1:10000 verwendet wurde. Nach 3x Waschen der Membran mit TN-Tween für je 5 min bei RT erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden sekundären Detektionsantikörper (vgl. Tab. II-6) mit einer Verdünnung von 1:7500 für 2 h bei RT in TN-Tween. Die sekundären Antikörper sind mit dem Enzym *horseradish peroxidase* (HRP) gekoppelt. Zur indirekten Detektion der Proteine wurde die Membran nach wiederholtem Waschen (3x) mit den Substraten des Pierce ECL Western-Blotting Kit (ThermoScientific, Dreieich, Deutschland) für 5 min bei RT inkubiert. Die Identifizierung der Proteine erfolgte anschließend durch Chemilumineszenz und durch Auflegen eines Films (CL-XPosure™-Film, ThermoScientific, Dreieich, Deutschland) in der Dunkelkammer.

Die quantitative Auswertung der Signale erfolgte mit dem Programm ImageQuant 5.0 Build 050 (Molecular Dynamics Inc., Sunnyvale, CA, USA).

### II.2.2.11.3 Nachweis der Translationseffizienz von Reporter-RNAs

Die Messung der Translationseffizienzen von *in vitro*-transkribierten *firefly*- und *renilla*-Luciferase-Reporterkonstrukten (vgl. II.2.1.14) erfolgte mit dem Luciferase Assay System (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) in einem Luminometer (Sirius, Titertek-Berthold, Pforzheim, Deutschland) nach Angaben des Herstellers.

Zur Bestimmung der Luciferaseaktivität von elektroporierten Huh7- bzw. Hek293T-REx™-Zellen (vgl. II.1.4 und II.2.1.17.2) wurden diese geerntet, anschließend gezählt (Bright-Line Hemacytometer, Hausser Scientific, Horsham, PA, USA), 1x mit PBS (4°C) gewaschen (vgl. II.1.4) und in 50 µl Lyse-Puffer aufgenommen. Nach einer Inkubationszeit von 2 min bei RT erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 13000 rpm (Mikro 200R, Winkelrotor 24-fach, Andreas Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen, Deutschland) und 4°C. Der Überstand wurde abgenommen und für die Bestimmung der Luciferaseaktivität verwendet, die dann auf die Zellzahl innerhalb eines Experiments normiert wurde.

## II.3 Statistische Auswertung

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders aufgezeigt, 3x (n = 3) unabhängig voneinander durchgeführt (biologische Replikate), Daten die in Balkendiagrammen dargestellt sind repräsentieren Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichungen (SD). Aufgrund größerer inter-experimenteller Variabilität wurde die Datennormierung so durchgeführt, dass die Werte der Kontrolle und der zu untersuchenden Probe auf den Wert der Kontrolle bezogen wurden. Durch dieses Verfahren konnte jedoch keine statistische Auswertung erfolgen, da die Kontrollwerte (100% oder 1) keine Varianz zeigten. Daten, die auf diese Weise generiert wurden, sind ausschließlich mit der Standardabweichung dargestellt. Daten, die eine statistische Auswertung erlaubten, wurden mit Student's *t*-Test auf Signifikanzen geprüft.

### III Ergebnisse

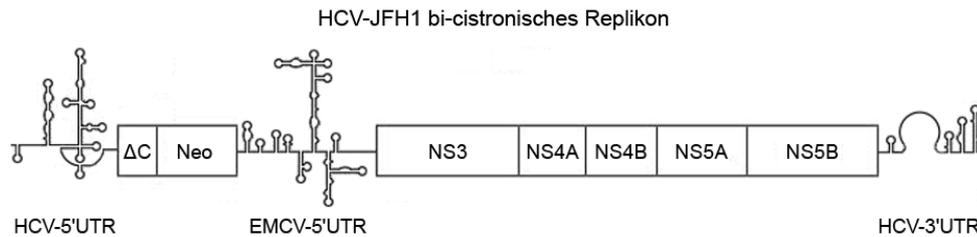
#### III.1 DDX3 fördert die IRES- und cap-abhängige Translation

RNA-Protein-Interaktionsstudien zeigten, dass DDX3 in unbekannter Weise mit der 5'- und 3'UTR des HCV-Genoms interagiert (Harris *et al.*, 2006; Weinlich *et al.*, 2009). Durch eine siRNA-vermittelte DDX3-Depletion in Huh7-Zellen wurde weiterhin indiziert, dass DDX3 die HCV-Replikation unterstützt (Ariumi *et al.*, 2007; Randall *et al.*, 2007). Aus diesen Arbeiten ging jedoch nicht hervor, ob DDX3 direkt im Replikationsprozess der HCV-RNA oder einem anderen Schritt im Lebenszyklus dieses humanpathogenen Virus involviert ist. Daher war das erste Ziel dieser Arbeit die Zuordnung von DDX3 zu einer Funktion im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.

##### III.1.1 siRNA-vermittelte Depletion von DDX3 im Cytoplasma reprimiert die HCV- und EMCV-IRES-abhängige Translation eines bi-cistronischen HCV-Replikons

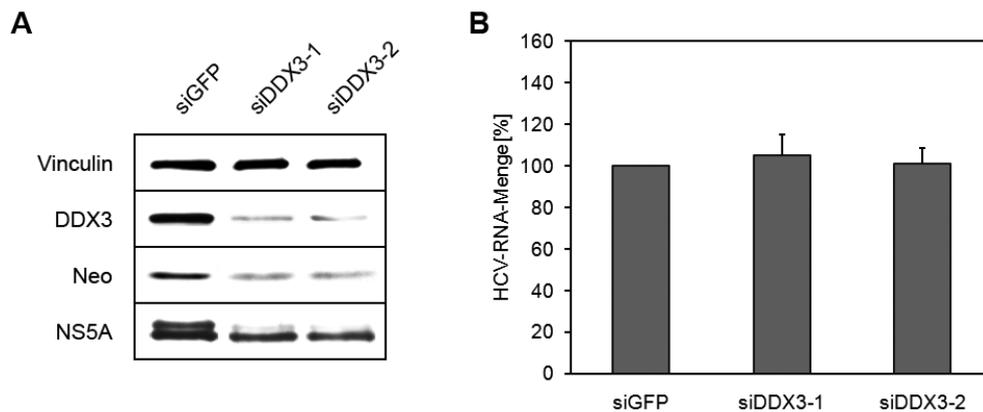
Eine potentielle Funktion von DDX3 im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus wurde mit dem HCV-Replikonsystem untersucht. Es wurde in einem ersten Ansatz eine Huh7-Zelllinie generiert, die ein subgenomisches bi-cistronisches HCV-Replikon des Genotyps 2a (JFH1) persistent enthielt (hier bezeichnet als Huh7/SGR-JFH1). Die *in vitro*-transkribierte bi-cistronische Replikon-RNA wurde dazu durch Elektroporation in die Huh7-Zelllinie transfiziert. Die anschließende Selektion von Huh7-Zellen, die das HCV-Replikon enthielten, erfolgte durch die Zugabe des Antibiotikums G418 (Geneticin) zum Kulturmedium. In Vorversuchen wurde die geringste Konzentration des Antibiotikums ermittelt, die zum Absterben der Huh7-Zellen führte. Nach Transfektion des Replikons in Huh7-Zellen und der Zugabe des Antibiotikums starben die Huh7-Zellen ohne funktionelles Replikon nach 2-4 Tagen, da diese keine Neomycin-Phosphotransferase II zur Inaktivierung des Antibiotikums G418 bildeten. Nach der Selektion der Replikon-haltigen Zellen wurden alle erhaltenen Klone der Kulturschale vereinigt und die Huh7/SGR-JFH1-Zellen für die anschließenden Untersuchungen verwendet.

Das in dieser Arbeit verwendete subgenomische bi-cistronische HCV-Replikon besteht aus der HCV-5'UTR, die über die HCV-IRES die Translation der Neomycin-Phosphotransferase II-RNA fördert. Nachfolgend enthält es die EMCV-5'UTR, die mit der Translationsinitiation an der EMCV-IRES eine effiziente Synthese der HCV-Nichtstrukturproteine NS3-NS5B ermöglicht. Diese sind für die Replikation der subgenomischen RNA essentiell (Lohmann *et al.*, 1999). Am 3'Ende befindet sich die authentische HCV-3'UTR (Abb. III-1).



**Abb. III-1: Bi-cistronisches HCV-Replikon.** Schematische Darstellung des bi-cistronischen HCV-JFH1-Replikons (vgl. Abb. I-5).

Um eine potenzielle Funktion von DDX3 in der HCV-IRES-abhängigen Translation und dem Replikationsprozess dieses Replikons zu untersuchen, wurde die Zelllinie Huh7/SGR-JFH1 mit zwei unabhängigen siRNAs (siDDX3-1 und -2) transfiziert, die zum Abbau der DDX3-codierenden mRNA und somit zur Reduktion der Menge von DDX3 führen. Als Kontrolle wurde eine siRNA (siGFP) verwendet, die keine komplementäre Zielsequenz für mRNAs in Huh7-Zellen besitzt. Der *knock down* von DDX3 wurde 72 h nach Transfektion der siRNAs mittels eines Western-Blots mit einem anti-DDX3-Antiserum analysiert. Es konnte eine deutliche Reduktion der Menge an cytoplasmatischem DDX3 auf 15-25% der ursprünglichen Menge an endogenem DDX3 im Vergleich zur Kontrolle erzielt werden (Abb. III-2 A). Wichtig für den weiteren Verlauf der Arbeit war die Beobachtung, dass die Reduktion der Menge an DDX3 durch diese beiden siRNAs keinen Einfluss auf die Viabilität der Huh7-Zellen hatte. Die Transfektion einer weiteren siRNA (siDDX3-3) gegen das DDX3-Transkript resultierte zwar in einer stärkeren Reduktion der DDX3-Menge, führte aber zu einer deutlich verringerten Wachstumsgeschwindigkeit dieser Zellen im Vergleich zur siGFP-Kontrolle (Daten nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde die siRNA siDDX3-3 nicht weiter verwendet. Die Quantifizierung der HCV-RNA-Menge zeigte, dass die Depletion von DDX3 keinen Einfluss auf die Replikation des persistent in den Zellen enthaltenden bi-cistronischen HCV-Replikons hatte. Dieses wurde an den unveränderten Quantitäten der HCV-RNA in den DDX3-depletierten Huh7/SGR-JFH1-Zellen im Vergleich zur siGFP-Kontrolle deutlich (Abb. III-2 B). Interessanterweise konnte aber im Gegensatz zur unveränderten Replikation bei Depletion von DDX3 eine Verringerung der Translation sowohl über die HCV-IRES als auch über die EMCV-IRES festgestellt werden. Gezeigt wurde diese Reduktion der Translation durch das verringerte Signal im Western-Blot für die Neomycin-Phosphotransferase II (Translation vermittelt durch die HCV-IRES) und für die NS-Proteine des HCV (repräsentiert durch NS5A, Translation vermittelt durch die EMCV-IRES) in beiden DDX3-depletierten Huh7-Zelllinien (ca. 37 % bzw. 46 % im Vergleich zur Kontrolle, Abb. III-2 A).



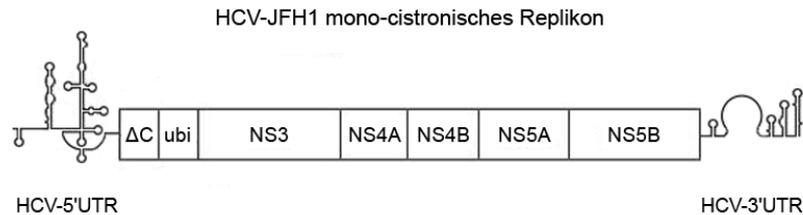
**Abb. III-2: Depletion von DDX3 im Cytoplasma inhibiert die IRES-abhängige Translation eines bi-cistronischen HCV-Replikons.** (A) Repräsentativer Western-Blot, der die Reduktion von DDX3, der Neomycin-Phosphotransferase II (Neo) und des Nichtstrukturproteins NS5A im cytoplasmatischen Extrakt der entsprechenden siRNA-transfizierten Huh7-Zellen zeigt. Die Vinculin-Menge diente als Ladekontrolle. NS5A wird in Huh7-Zellen phosphoryliert und hyperphosphoryliert (Doppelbande im Western-Blot). Durch die Depletion von DDX3 ist die Quantität beider Proteinformen vermindert. (B) Quantifizierung der Replikation des bi-cistronischen HCV-Replikons mittels qRT-PCR in stabil transfizierten Huh7-Zellen, die 72 h zuvor mit zwei unabhängigen siRNAs (siDDX3-1, siDDX3-2) und der Kontroll-siRNA (siGFP) transfiziert wurden (jeweils vier Experimente).

Diese Daten zeigten einen negativen Einfluss der DDX3-Depletion auf die HCV- und EMCV-IRES-abhängige Translation. Dagegen war die HCV-Replikation nicht betroffen. Letzteres Ergebnis war zunächst überraschend, weil die Synthese der viralen Proteine eine wesentliche Voraussetzung für die virale Replikation ist. Persistent transfizierte Replikons akkumulieren aber bekanntermaßen einen Überschuss an NS-Proteinen in den Zellen (Quinkert *et al.*, 2005). Die Tatsache, dass die HCV-RNA-Replikation unverändert blieb, wurde dementsprechend und auch im Hinblick auf die nachfolgend beschriebenen Ergebnisse so interpretiert, dass die Menge an viralen Proteinen in der Zelle trotz verminderter Translation über die EMCV-IRES dennoch ausreichend für eine unverminderte HCV-Replikation war. Einen wichtigen Aspekt stellte die Menge von Vinculin dar, die von der DDX3-Depletion nicht beeinflusst war. Vinculin wird generell als Ladekontrolle für Western-Blots und auch als Standard bei Experimenten mit variierender Translation verwendet. Der Grund liegt in der sehr hohen Proteinstabilität von Vinculin (Halbwertszeit  $\geq 20$  h; Lee & Otto, 1996).

### III.1.2 Depletion von DDX3 vermindert die Translation und Replikation eines mono-cistronischen HCV-Replikons

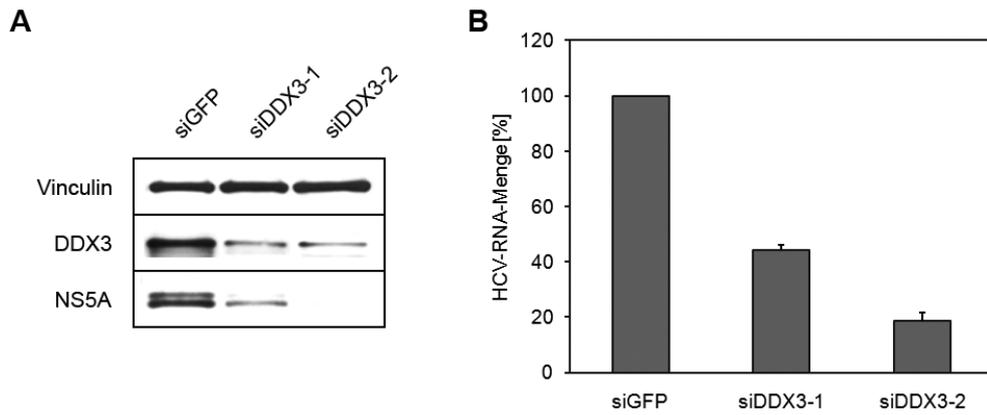
Ariumi *et al.* (2007) und Randall *et al.* (2007) hatten bereits gezeigt, dass in DDX3-depletierten Huh7-Zellen die Replikation eines vollständigen HCV-Genoms sehr stark reduziert war, während ähnlich zur oben dargestellten Situation, der Effekt auf die Replikation eines persistent transfizierten bi-cistronischen HCV-Replikons deutlich weniger ausgeprägt war. In Analogie zu einem Infektionsexperiment mit einer komplett genomischen HCV-RNA wurde daher in einem zweiten Ansatz ein mono-cistronisches HCV-Replikon transient in DDX3-depletierte Huh7-Zellen transfiziert und der Effekt des *knock down* auf die Translation und Replikation untersucht.

Das mono-cistronische HCV-Replikon ähnelt der genomischen HCV-RNA mit der Ausnahme, dass die codierenden Bereiche für die Strukturproteine sowie das Protein p7 und NS2 deletiert sind. Für die exakte Prozessierung des N-Terminus des viralen Proteins NS3 wurde die Ubiquitin-codierende Sequenz (ubi) vor das 5' Ende der genetischen Einheit von NS3 kloniert. Die Prozessierung erfolgte somit durch zelluläre Ubiquitin-Carboxyl-Hydrolasen. Die Translation und Replikation wird in diesem Replikon ausschließlich über die HCV-5'- und -3'UTR vermittelt (Abb. III-3).



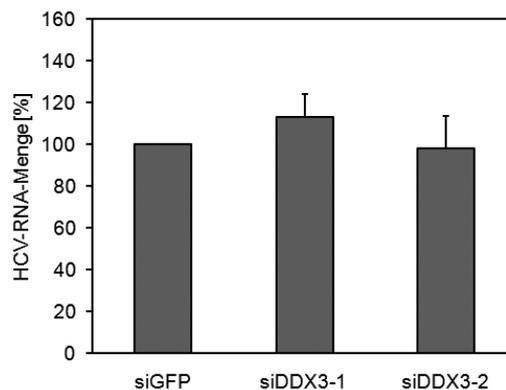
**Abb. III-3: Mono-cistronisches HCV-Replikon.** Schematische Darstellung des mono-cistronischen HCV-JFH1-Replikons (vgl. Abb. I-5).

72 h nach Transfektion der DDX3-siRNAs in die Huh7-Zellen wurde die *in vitro*-transkribierte mono-cistronische HCV-RNA in die DDX3-depletierten Zellen transfiziert. 48 h nach der Transfektion des Replikons wurden dann die Mengen an HCV-NS5A mittels eines Western-Blot und die Mengen der HCV-RNA mittels qRT-PCR bestimmt. Der Western-Blot in Abb. III-4 A zeigt analog zu den Ergebnissen mit dem bi-cistronischen HCV-Replikon der persistent transfizierten Huh7-Zelllinie (vgl. Abb. III-2 A), ebenfalls eine Reduktion der NS5A-Menge. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der bi-cistronischen Replikon-Zelllinie (vgl. Abschnitt III.1.1) wurde jedoch eine starke Reduktion der HCV-Replikation auf 44% bzw. 19% im Vergleich zur siGFP-Kontrolle beobachtet (Abb. III-4 B). Diese Daten mit dem transient transfizierten HCV-Replikonsystem zeigten, dass die Reduktion der Menge der viralen Nichtstrukturproteine in den DDX3-depletierten Zellen (repräsentiert durch NS5A) auch mit einer verringerten Replikation der viralen RNA einhergingen.



**Abb. III-4: Depletion von DDX3 inhibiert die Translation und Replikation eines mono-cistronischen HCV-Replikons.** (A) Repräsentativer Western-Blot von Vinculin, DDX3 und NS5A im cytoplasmatischen Extrakt von Huh7-Zellen, die mit den entsprechenden siRNAs (siGFP, siDDX3-1, siDDX3-2) und 72 h später mit dem mono-cistronischen HCV-Replikon transfiziert wurden. 48 h nach Transfektion des Replikons erfolgte die Western-Blot-Analyse der gekennzeichneten Proteine. (B) Replikation des mono-cistronischen HCV-Replikons in Huh7-Zellen, die mit den gekennzeichneten siRNAs transfiziert wurden. Die Quantifizierung der viralen HCV-RNA erfolgte 48 h nach Transfektion des Replikons mittels qRT-PCR von vier unabhängigen Experimenten.

Um das Experiment dahingehend abzusichern, dass vergleichbare RNA-Quantitäten des mono-cistronischen HCV-Replikons in die siGFP-Kontrollzellen und DDX3-depletierten Huh7-Zellen transfiziert wurden, erfolgte die Bestimmung der relativen Menge der HCV-RNA direkt nach der Transfektion des Replikons. Dazu wurden die Huh7-Zellen sofort nach der Transfektion geerntet und die RNA-Menge des HCV-Replikons mittels qRT-PCR analysiert. Dieses Kontrollexperiment zeigte, dass in die siRNA-behandelten Huh7-Zellen (siGFP, siDDX3-1, siDDX3-2) jeweils die gleichen RNA-Mengen des mono-cistronischen Replikons transfiziert wurden (Abb. III-5). Die Reduktion der HCV-RNA-Menge resultiert somit nicht aus einer geringeren Transfektionsrate des HCV-Replikons in die DDX3-depletierten Huh7-Zellen.



**Abb. III-5: Transfektionskontrolle des mono-cistronischen HCV-Replikons in DDX3-depletierte Zellen.** Die Huh7-Zellen wurden mit den entsprechenden siRNAs (siGFP, siDDX3-1, siDDX3-2) transfiziert und nach 72 h mit dem mono-cistronischen HCV-Replikon re-transfiziert. Die Huh7-Zellen wurden direkt nach der Elektroporation geerntet und die Menge an transfizierter HCV-RNA mittels qRT-PCR von jeweils vier Experimenten bestimmt.

Die in diesem Experiment erhaltenen Daten bestätigten die zuvor von Ariumi *et al.* (2007) und Randall *et al.* (2007) publizierten Ergebnisse. Zudem zeigten die Daten deutliche Unterschiede in den Auswirkungen der DDX3-Depletion auf die Replikation eines transient und eines persistent transfizierten HCV-RNA-Replikons (vgl. Abb. III-2). Das könnte wie bereits in Abschnitt III.1.1 aufgeführt damit zu begründen sein, dass zu dem Zeitpunkt der siRNA-vermittelten Depletion von DDX3 in der Zelllinie Huh7-SGR-JFH1 bereits ein Überschuss an NS-Proteinen vorlag. Auch wenn dieser Überschuss im Verlauf der DDX3-Depletion auf 40% reduziert wurde, ist zu vermuten, dass der verbleibende Anteil an NS-Proteinen ausreichte, um die Replikation der viralen RNA auf einem konstanten Niveau zu halten. Im Falle der Transfektion des mono-cistronischen HCV-Replikons lagen in den DDX3-depletierten Zellen jedoch noch keine NS-Proteine vor, da diese erst durch die IRES-vermittelte Translation gebildet werden mussten. Eine Reduktion der Translation hatte in diesem Falle einen deutlich gravierenden negativen Effekt auf die virale Replikation. In der Summe indizieren diese Daten eine wichtige Rolle von DDX3 in der HCV-IRES-vermittelten, aber auch in der EMCV-IRES-vermittelten Translation.

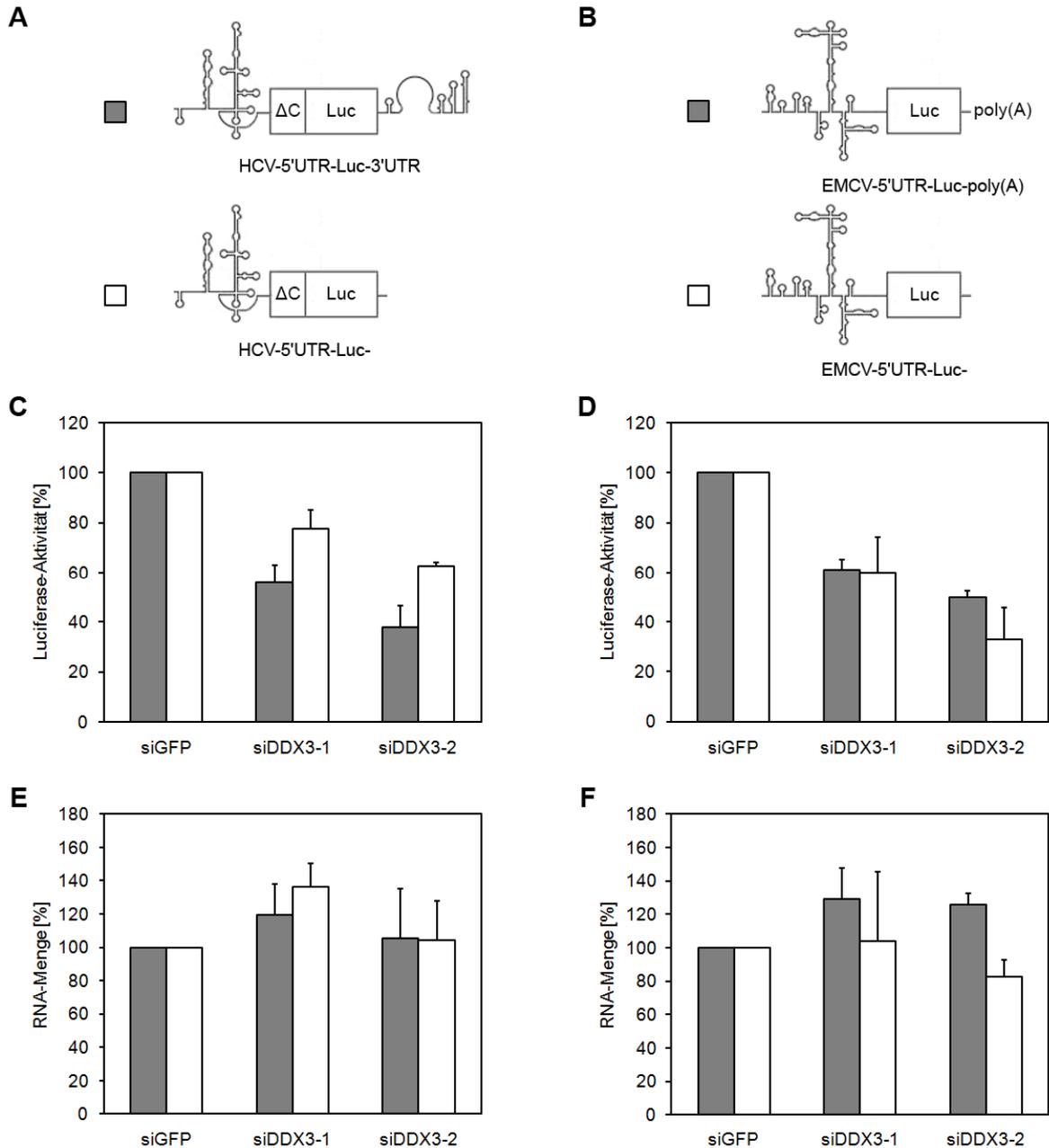
### III.1.3 DDX3 unterstützt generell die Translation

Die in Abschnitt III.1.1 dargestellten Ergebnisse indizierten, dass DDX3 die HCV- und EMCV-IRES-abhängige Translation fördert. Um dieses weiter zu spezifizieren, wurden Luciferase-Reporterkonstrukte generiert, die die HCV-5'UTR bzw. die EMCV-5'UTR enthielten. Um zudem eine potenzielle Funktion von DDX3 in der RNA-Zirkularisierung während der Translationsinitiation zu untersuchen, wurden analoge Konstrukte generiert, die die HCV-3'UTR bzw. einen poly(A)-Bereich enthielten (Abb. III-6 A und B).

Die Luciferase-Reporter-RNAs wurden in DDX3-depletierte Huh7-Zellen elektroporiert, die 72 h zuvor mit den siRNAs siGFP bzw. siDDX3-1/2 transfiziert wurden. 1 h nach der Transfektion erfolgte die Bestimmung der Luciferaseaktivität im Zelllysats. Das Ergebnis dieser Experimente zeigte, dass die Translationseffizienz der HCV- und EMCV-Luciferase-Reporterkonstrukte in den DDX3-depletierten Zellen im Vergleich zur siGFP-Kontrolle (100%) auf 30-60% reduziert war (Abb. III-6 C und D). Eine Ausnahme bildete das HCV-Konstrukt ohne 3'UTR. Die Translation dieser RNA war generell sehr gering im Vergleich zu den anderen verwendeten Luciferase-RNAs. Im Zellextrakt der Huh7-Zellen, die mit der siRNA siDDX3-1 transfiziert wurden, konnte eine Reduktion der Translation auf ca. 80% bestimmt werden (Abb. III-6 C).

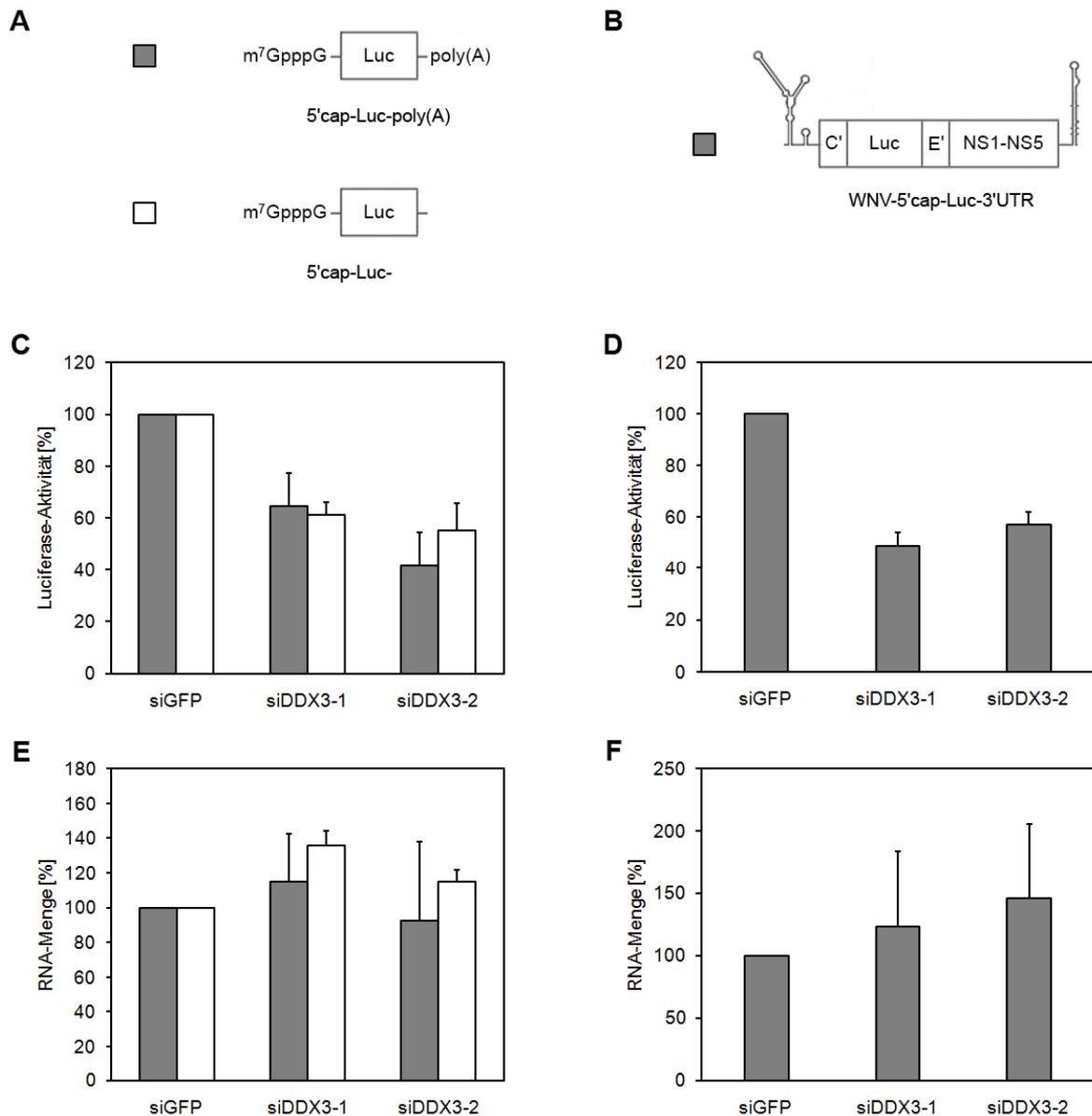
Um nachzuweisen, dass die Reduktion der Translation der HCV- und EMCV-Luciferase-Reporter-RNAs nicht auf eine verringerte RNA-Menge der Reporterkonstrukte zurückzuführen war, wurde die Quantität der Luciferase-Reporterkonstrukte in den GFP- und DDX3-siRNA-behandelten Zellen bestimmt. Dazu wurde parallel zur Messung der Luciferaseaktivität die Gesamt-RNA präpariert und die relative Menge an Luciferase-RNA mittels qRT-PCR 1 h nach Transfektion der Reporterkonstrukte ermittelt. Aus Abb. III-6 E und F geht

hervor, dass bezogen auf die siGFP-Kontrolle vergleichbare RNA-Mengen an Reporter-konstrukten in den DDX3-depletierten Zellen vorlagen.



**Abb. III-6: Depletion von DDX3 inhibiert die Translation von HCV- und EMCV-Reporter-RNAs.** (A, B) Schematische Darstellung der (A) HCV- und (B) EMCV-Luciferasekonstrukte. Die UTRs sind als Linien gezeichnet und zeigen die vorgeschlagene RNA-Sekundärstruktur sowie den codierenden Bereich der Luciferase als Kasten.  $\Delta C$ : codierender Sequenzbereich des HCV-Core-Proteins, der die effiziente Translation an der HCV-IRES ermöglicht. (C, D) Luciferaseaktivitätstest. Die (C) HCV- und (D) EMCV-Luciferase-RNAs wurden in die Huh7-Zellen 72 h nach Transfektion der entsprechenden siRNAs (siGFP, siDDX3-1, siDDX3-2) transfiziert. 1 h nach Transfektion wurde die Luciferaseaktivität in den Huh7-Zellextrakten bestimmt und im Kontrolleextrakt (siGFP) auf 100% festgelegt. (E, F) RNA-Menge der (E) HCV- und (F) EMCV-Luciferasekonstrukte in den Kontrollzellen (siGFP, 100%) und in DDX3-depletierten Huh7-Zellen (siDDX3-1, siDDX3-2). Die Gesamt-RNA wurde 1 h nach Transfektion der Luciferase-Reporter-RNAs aus Huh7-Zellen isoliert und die Menge an Reporter-RNA mittels qRT-PCR bestimmt. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Nachdem deutlich geworden war, dass eine Verminderung der intrazellulären Menge an DDX3 auch in diesen Luciferase-Reporterexperimenten zu einer verringerten HCV- und EMCV-IRES-vermittelten Translation führt, war es wichtig zu überprüfen, ob sich ein ähnlicher Effekt auch bei mRNAs feststellen ließ, bei denen die Translationsinitiation über ein 5'cap und einem *scanning*-Prozess erfolgte. Zu diesem Zweck wurden 5'cap-mRNA-Luciferasekonstrukte untersucht. Diese wurden mit und ohne einen poly(A)-Bereich am 3'Ende hergestellt [5'cap-Luc-poly(A)-, 5'cap-Luc-Konstrukt] und enthielten eine unstrukturierte 5'UTR. Daher wurde zur Untersuchung, ob es Unterschiede zwischen mRNAs mit strukturierten bzw. nicht strukturierten 5'UTRs gibt, zusätzlich ein Luciferase-Reporterkonstrukt des West Nil Virus (WNV-5'UTR-Luc-3'UTR) verwendet. Die WNV-RNA enthält ebenfalls eine 5'cap-Struktur, zudem aber auch eine komplex strukturierte 5'UTR (Abb. III-7 A und B). Die Ergebnisse des Luciferaseaktivitätstests zeigten, dass die Translation aller 5'cap-Luciferase-Reporterkonstrukte in den DDX3-depletierten Huh7-Zellen auf 40-60% im Vergleich zur siGFP-Kontrolle (100%) reduziert war (Abb. III-7 C und D). Durch Bestimmung der Mengen der Reporter-RNAs wurde abgesichert, dass in den siDDX3- und siGFP-behandelten Huh7-Zellen die gleichen RNA-Mengen enthalten waren. Aus Abb. III-7 E und F geht hervor, dass die Reduktion der Translation somit nicht auf eine veränderte RNA-Menge in den DDX3-depletierten Huh7-Zellen zurückzuführen war.



**Abb. III-7: Depletion von DDX3 inhibiert die 5'cap-abhängige Translation.** (A, B) Schematische Darstellung der (A) 5'cap-mRNA- und (B) 5'cap-WNV-Luciferasekonstrukte. Die UTRs sind als Linien gezeichnet und repräsentieren die vorgeschlagene RNA-Sekundärstruktur, der codierende Bereich der Luciferase als Kasten. C': Fragment des codierenden Bereichs des WNV-Capsidproteins. E': Fragment des codierenden Bereichs des WNV-Hüllproteins. Die WNV-3'UTR wird nur durch einen *stem-loop* am 3'Ende repräsentiert. (C, D) Luciferaseaktivitätstest. Die Bestimmung der Translationseffizienz der (C) 5'cap-mRNA- und (D) WNV-Luciferase-RNAs wurde wie in Abb. III-6 beschrieben durchgeführt. (E, F) RNA-Menge der (E) 5'cap- und (F) WNV-Luciferase-Reporterkonstrukte in den Kontrollzellen (siGFP, 100%) und in DDX3-depletierten Huh7-Zellen. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Da die DDX3-Depletion keinen Einfluss auf die Zellviabilität und die RNA-Menge der Luciferasekonstrukte hatte, konnte anhand dieser Ergebnisse geschlossen werden, dass DDX3 eine generell fördernde Funktion in der Translation besitzt. Zum einen unterstützt DDX3 die HCV- und EMCV-IRES-abhängige Translation, die keinen *scanning*-Prozess in der Translation zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes auf dem AUG-Startcodon aufweisen (Kaminski *et al.*, 1990; Honda *et al.*, 1996). Zum anderen waren keine Unterschiede bei Verwendung einer strukturierten bzw. nicht strukturierten 5'cap-UTR

nachweisbar. Entsprechend kann eine Funktion von DDX3 im 5'cap-abhängigen *scanning*-Prozess ausgeschlossen werden. Ein weiteres Ergebnis dieser Experimente war, dass die Funktion von DDX3 in der Translation unabhängig von der Präsenz eines poly(A)-Bereichs (im Falle der 5'cap- und EMCV-IRES-abhängigen Translation) bzw. auch unabhängig von der Präsenz einer authentischen HCV-3'UTR (im Falle der HCV-IRES-abhängigen Translation) war. Wie in Abb. III-6 und Abb. III-7 zu sehen, konnte mit allen entsprechenden Reporter-RNAs eine Reduktion der Translation bei einer DDX3-Depletion festgestellt werden. Daher kann auch eine Funktion von DDX3 im RNA-Zirkularisierungsprozess ausgeschlossen werden. DDX3 ist somit auch kein Faktor, der die Translation über das 3'Ende einer RNA stimuliert.

Bisher gab es keine Anhaltspunkte wie DDX3 den Translationsprozess fördert. Dies sollte im Folgenden untersucht werden.

### **III.2 DDX3 interagiert mit Translations-Initiationskomplexen**

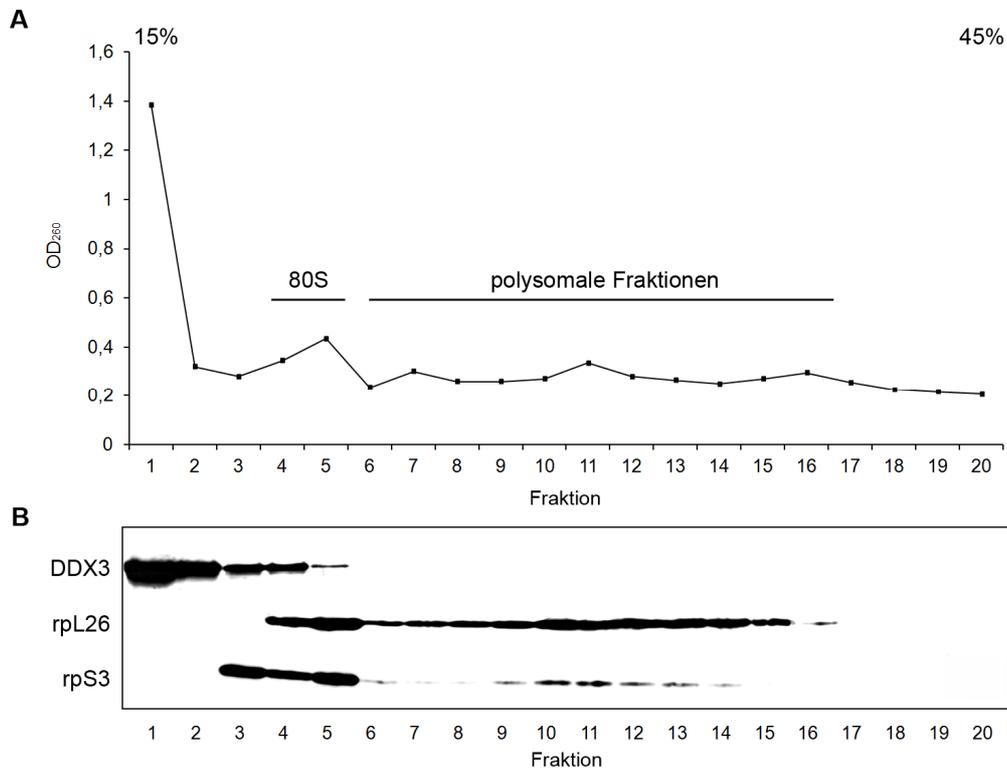
Die oben aufgeführten Experimente der DDX3-Depletion zeigten jeweils eine Reduktion der Translation sowohl von 5'cap- als auch von IRES-haltigen Reporter-RNAs (vgl. Abschnitt III.1.3). Um zu untersuchen, ob es sich dabei um einen direkten Effekt von DDX3 auf die Translation handelt, wurde zunächst analysiert, ob DDX3 mit der Translationsmaschinerie interagiert. In mehreren Arbeiten wurde bereits eine Co-Präzipitation von eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4E und PABPC mit DDX3 beobachtet (Lai *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008).

#### **III.2.1 DDX3 ist kein Bestandteil von Polysomen**

Um zu untersuchen, ob DDX3 mit Komplexen der Translationsinitiation oder der Translationselongation interagiert, wurde zuerst eine Polysomen-Gradientenzentrifugation von Huh7-Zellextrakten durchgeführt.

Dazu wurde ein cytoplasmatischer Huh7-S10-Extrakt in Anwesenheit des Translations-Elongationsinhibitors Cycloheximid präpariert. Cycloheximid inhibiert die Peptidyltransferaseaktivität der 60S-Untereinheit und blockiert somit die weitere Elongation und Proteinsynthese des 80S-Ribosoms. Die 80S-Ribosomen dissoziieren dabei nicht durch die Zugabe von Cycloheximid von der RNA ab, sondern verweilen auf dieser, so dass in dem so behandelten S10-Extrakt „freie“, RNA-ungebundene 80S-Ribosomen, einzelne 80S-Ribosomen auf einer RNA (Monosomen) und mehr als ein Ribosom auf einer RNA (Polysomen) vorzufinden sind. Die 80S-Ribosomen und Polysomen wurden in einem 15-45% linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt und durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm der ribosomalen RNA bzw. mittels eines Western-Blots mit Antikörpern gegen die ribosomalen Proteine rpS3 (40S-Untereinheit) und rpL26 (60S-Untereinheit) identifiziert. Das Absorptionsprofil bei 260 nm in Abb. III-8 A und der Western-Blot in Abb. III-8 B

lokalisierten die 80S-Ribosomen in den Fraktionen 4 und 5, während die Polysomen in die Fraktionen 6-16 sedimentierten. Der Western-Blot zum Nachweis von DDX3 zeigte kein Protein in den Polysomenfraktionen. Der größte Teil von DDX3 sedimentierte in die gering konzentrierten Saccharose-Fraktionen 1 und 2. Ein kleiner Anteil von DDX3 ließ sich jedoch auch in den Fraktionen 4 und 5 nachweisen, in denen die 80S-Ribosomen sedimentierten (Abb. III-8 B).

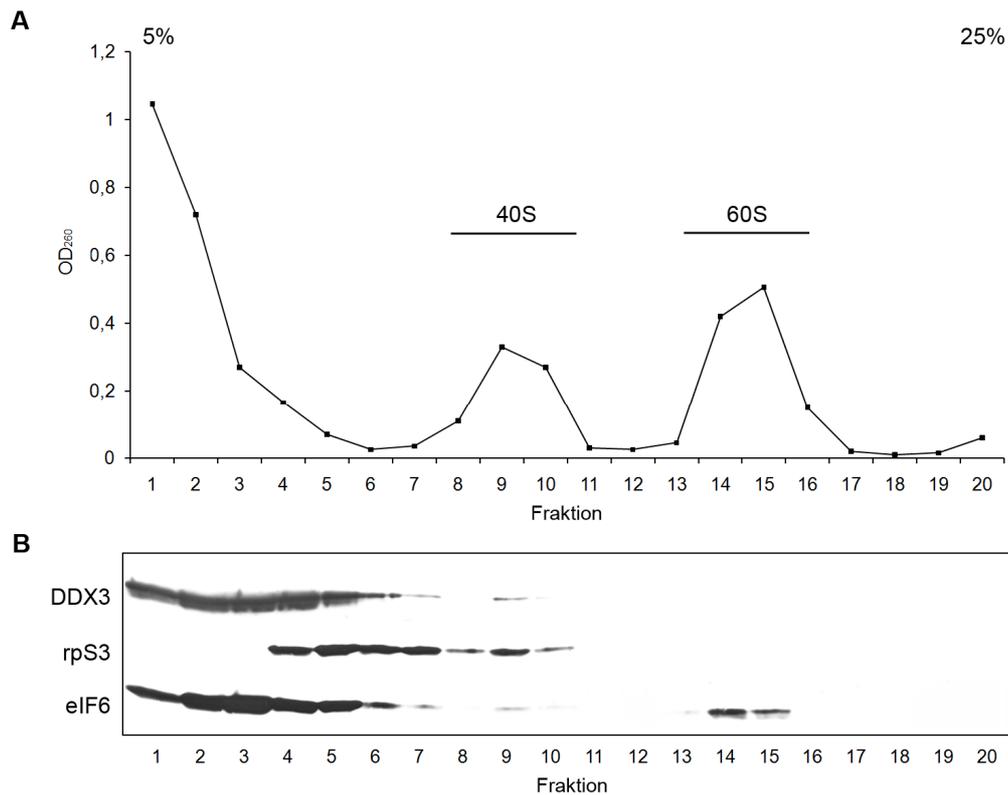


**Abb. III-8: DDX3 co-sedimentiert mit 80S-Ribosomen.** Huh7-S10-Extrakt wurde in Anwesenheit von 2 mM Cycloheximid präpariert und in einem 15-45% linearen Saccharose-Gradienten in Anwesenheit von 0,4 mM Cycloheximid aufgetrennt. (A) Auftragung der Absorption bei 260 nm jeder Fraktion des Gradienten. Die monosomalen 80S- und die polysomalen Fraktionen sind gekennzeichnet. (B) Identifizierung der fraktionierten Proteine DDX3, rpL26 und rpS3 mittels eines Western-Blots mit spezifischen Antikörpern.

Aus diesen Daten ging hervor, dass DDX3 nicht mit den Polysomen assoziiert war, d.h. es interagiert nicht mit 80S-Ribosomen, die aktiv eine RNA translatierten. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass DDX3 nicht im Elongations- und wahrscheinlich auch nicht im Terminationsprozess einer Translationsreaktion involviert ist. Die Sedimentation bei niedrigen Sedimentationswerten und die geringfügige Co-Sedimentation mit 80S-Ribosomen deuten eher darauf hin, dass DDX3 eine funktionelle Komponente in der Translationsinitiation sein könnte. Da in einem präparierten cytoplasmatischen S10-Extrakt auch „freie“, RNA-ungebundene 80S-Ribosomen enthalten sind (Cooper *et al.*, 1976; Otto & Puglisi, 2004), wäre auch eine Funktion im Ribosomen-Recyclingprozess denkbar.

### III.2.2 DDX3 co-sedimentiert anteilig mit der ribosomalen 40S-Untereinheit

Die Polysomenanalyse von DDX3 aus Abschnitt III.2.1 indizierte eine potentielle Assoziation mit monosomalen 80S-Ribosomen. Um zu untersuchen, ob DDX3 mit einer der beiden Untereinheiten des 80S-Ribosoms interagiert, wurden diese in die ribosomalen Untereinheiten getrennt und auf eine Co-Sedimentation mit DDX3 analysiert. Die Interaktion der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten ist  $Mg^{2+}$ -abhängig (Chao, 1957). Eine Dissoziation der 80S-Ribosomen in deren Untereinheiten kann folglich mittels eines Komplexbildners für zweiwertige Kationen, wie z.B. EDTA, erreicht werden. Der cytoplasmatische Huh7-S10-Extrakt wurde entsprechend mit EDTA versetzt und die ribosomalen Untereinheiten in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die Lokalisation der 40S- und 60S-Untereinheiten erfolgte durch die Messung der Menge an ribosomaler RNA (Abb. III-9 A) und mittels eines Western-Blots der einzelnen Gradientenfraktionen auf die Präsenz von DDX3, rpS3 (Komponente der 40S-Untereinheit) und eIF6 (Abb. III-9 B). eIF6 ist ein Proteinfaktor, der u.a. mit der 60S-Untereinheit assoziiert und die Assemblierung der 80S-Ribosomen unterbindet (Ceci *et al.*, 2003). Die Messung der Absorption bei 260 nm ergab drei RNA-Peaks in den Fraktionen 1/2, 9/10 und 14/15 (Abb. III-9 A). Die große RNA-Menge in den Fraktionen 1 und 2 mit der geringsten Saccharose-Konzentration indizierte freie RNAs oder mRNP-Komplexe. Das mittels eines Western-Blots identifizierte Sedimentationsprofil des rpS3-Proteins zeigte (Abb. III-9 B), dass die ribosomalen 40S-Untereinheiten in die Fraktionen 9 und 10 sedimentierten. In die Fraktionen 14 und 15 hingegen sedimentierten die ribosomalen 60S-Untereinheiten (repräsentiert durch den größeren Anteil an eIF6). Große Mengen an DDX3 und eIF6 sedimentierten in die gering konzentrierten Saccharose-Fraktionen 1-6. Interessanterweise co-sedimentierte ein gewisser Teil von DDX3 mit der 40S-Untereinheit in die Fraktionen 9 und 10, während eine Co-Sedimentation des Proteins mit der 60S-Untereinheit nicht nachgewiesen werden konnte (Abb. III-9 B).



**Abb. III-9: DDX3 co-sedimentiert mit der ribosomalen 40S-Untereinheit.** Der Huh7-S10-Extrakt wurde mit 25 mM EDTA versetzt und in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten fraktioniert. (A) OD<sub>260</sub>-Messung der ribosomalen RNA-Menge, die gegen die Gradientenfraktionen aufgetragen wurde. Die Sedimentation der ribosomalen Untereinheiten in die entsprechenden Fraktionen ist durch 40S und 60S gekennzeichnet. (B) Nachweis von DDX3, rpS3 und eIF6 mittels eines Western-Blots. Es ist anzumerken, dass es in Huh7-S10-Extrakten, die mit EDTA versetzt wurden, zu einer teilweisen Degradation der 40S-Untereinheiten kam (Fraktionen 4-7, Vergleich mit nicht-EDTA-behandelten Extrakten in Abb. III-13).

Diese Daten bestätigten die erzielten Ergebnisse aus der Polysomenanalyse von DDX3 und deuten auf eine Interaktion von DDX3 mit der ribosomalen 40S-Untereinheit hin.

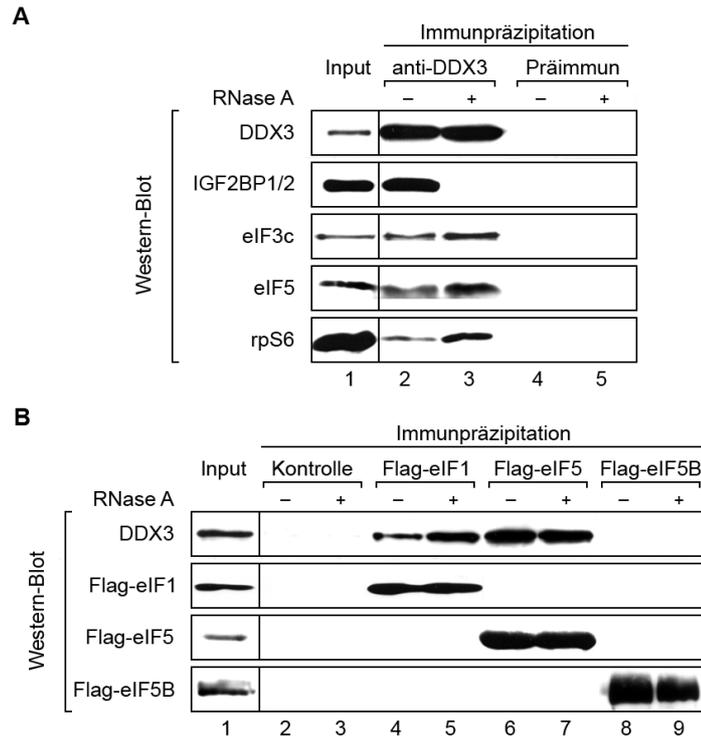
### III.2.3 DDX3 interagiert mit Translations-Initiationsfaktoren und der ribosomalen 40S-Untereinheit

Um die Beobachtungen aus Abschnitt III.2.1 und III.2.2 weiter zu spezifizieren, wurden Immunpräzipitationen (IPs) mit einem anti-DDX3-Antiserum aus Translations-kompetenten Huh7-S10-Extrakten durchgeführt. Das Präzipitat wurde durch eine SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und auf durch DDX3 co-präzipitierte Translations-faktoren analysiert.

So konnte zunächst eine spezifische Co-Präzipitation des Faktors eIF3 mit DDX3 nachgewiesen werden (Abb. III-10 A, Spur 2), was frühere Daten von Lee *et al.* (2008) bestätigte. Darüber hinaus co-präzipitierte eIF5 und das ribosomale Protein rpS6, ebenfalls eine Komponente der ribosomalen 40S-Untereinheit, mit DDX3 (Abb. III-10 A, Spur 2). Auffallend war, dass die Co-Präzipitation von eIF3, eIF5 und rpS6 mit DDX3 unabhängig davon zu beobachten war, ob die IPs in Ab- oder Anwesenheit von RNase A durchgeführt

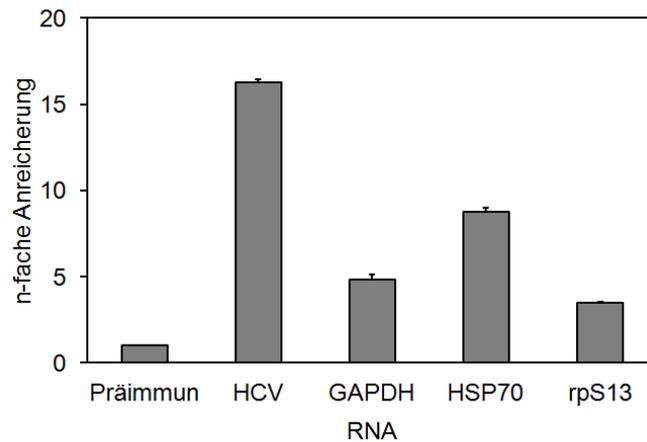
wurden (Abb. III-10 A, Spur 3). Dieses deutete auf eine RNA-unabhängige Interaktion von DDX3 mit diesen Faktoren hin. Im Gegensatz dazu konnte zwar eine Co-Präzipitation der Proteine IGF2BP1/2 mit DDX3 beobachtet werden, allerdings war diese Co-Präzipitation in Anwesenheit von RNase A nicht mehr festzustellen (Abb. III-10 A, Spuren 2 und 3). Das Protein IGF2BP1 wurde als 5'- und 3'UTR-bindendes Protein des HCV in Weinlich *et al.* (2009) beschrieben und interagiert RNA-abhängig in unbekannter Weise mit dem Translations-Initiationsfaktor eIF3 und dem Protein rpS3 der ribosomalen 40S-Untereinheit. Keiner der genannten mit DDX3 co-präzipitierten Faktoren wurde mit der Kontroll-IP angereichert, in der ein Präimmunsereum verwendet wurde (Abb. III-10 A, Spuren 4 und 5).

Wie in der Einleitung aufgezeigt, sind die Faktoren eIF3, eIF5 sowie rpS6 im 43S-PIC und 48S-Initiationskomplex assembliert (siehe Abb. I-1). Um die potenzielle Interaktion von DDX3 mit diesen Komplexen weiter zu untersuchen, wurde eine reverse IP durchgeführt. Dazu wurden Expressionsplasmide, die für Varianten von eIF1, eIF5 und eIF5B mit einem Flag-*tag* codierten, in Hek293-Zellen transient transfiziert und die hergestellten Proteine anschließend mit einem anti-Flag-Antikörper aus dem Zellextrakt präzipitiert. eIF1 ist ebenfalls eine Komponente des 43S-PIC, während der Initiationsfaktor eIF5B die Assemblierung des 80S-Ribosoms, ausgehend vom 48S-Initiationskomplex katalysiert (Pestova *et al.*, 2000). Der Western-Blot in Abb. III-10 B (Spuren 4, 5, 6 und 7) zeigt eine spezifische Co-Präzipitation von DDX3 mit eIF1 und eIF5 (Abb. III-10 B, Spuren 2 und 3). Als Kontrolle wurden Extrakte von Hek293-Zellen eingesetzt, die mit einem Kontrollplasmid transfiziert wurden, das kein *insert* enthält. Da die entsprechenden Co-Präzipitationen von DDX3 mit eIF1 und eIF5 wiederum in Anwesenheit von RNase A beobachtet werden konnten (Abb. III-10 B, Spuren 5 und 7), deutete dieses Ergebnis auf direkte oder indirekte Protein-Protein-Interaktionen von DDX3 mit den entsprechenden Translations-Initiationsfaktoren hin. Eine Co-Präzipitation von DDX3 mit eIF5B konnte nicht nachgewiesen werden (Abb. III-10 B, Spuren 8 und 9).



**Abb. III-10: DDX3 interagiert mit der Translationsmaschinerie.** (A) Immunpräzipitation von endogenem DDX3 aus einem Huh7-S10-Extrakt mit einem anti-DDX3-Antiserum in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von RNase A (Spuren 2 und 3). Kontroll-IPs wurden mit einem Präimmunserum (Spuren 4 und 5) durchgeführt. Die gekennzeichneten Proteine im Input (Spur 1) und den präzipitierten Proben wurden durch SDS-PAGE mittels eines anschließenden Western-Blots durch spezifische Antikörper identifiziert. (B) Hek293-Zellen wurden zur Herstellung von Flag-eIF1, Flag-eIF5 und Flag-eIF5B mit den entsprechenden Expressionsplasmiden transient transfiziert. 36 h nach Transfektion wurden die Immunpräzipitationen aus Gesamt-Zellextrakt mit einem anti-Flag-Antikörper in Ab- (-) und Anwesenheit (+) von RNase A durchgeführt. Co-präzipitiertes DDX3 wurde durch ein spezifisches anti-DDX3-Antiserum detektiert (Spuren 2-9), während Flag-eIF1, Flag-eIF5 und Flag-eIF5B mit einem anti-Flag-Antikörper identifiziert wurden. Kontroll-IPs mit dem anti-Flag-Antikörper aus dem Extrakt von Hek293-Zellen, die mit einem Plasmid ohne *insert* transient transfiziert wurden, dienen als Negativkontrolle (Spuren 2 und 3). Die Input-Spur repräsentiert eine Menge von 10% des eingesetzten Huh7-S10-Extrakts, der für die IP-Experimente verwendet wurde.

Abschließend wurde untersucht, ob unter diesen Bedingungen auch mRNAs und die HCV-RNA mit DDX3 co-präzipitierten. Für dieses Experiment wurde ein cytoplasmatischer S10-Extrakt von Huh7-Zellen verwendet, die 48 h zuvor mit einem mono-cistronischen HCV-Replikon (vgl. Abb. III-3) transient transfiziert wurden. Die IPs wurden mit dem Antiserum gegen DDX3 durchgeführt und das Präzipitat auf die Präsenz verschiedener mRNAs und der mono-cistronischen HCV-Replikon-RNA analysiert. Vor der Extraktion der RNAs wurde das DDX3-Präzipitat mit einer definierte Menge an 5'cap-Luc-poly(A)-RNA versetzt, die als Extraktionskontrolle diente und auf die die relativen Transkriptmengen normiert wurden. Mittels qRT-PCR konnte festgestellt werden, dass im Vergleich zur Kontrolle, die mit dem Präimmunserum durchgeführt wurde, die HCV-RNA um das 16-fache im DDX3-Präzipitat angereichert vorlag (Abb. III-11). Außerdem wurden die GAPDH- und HSP70-mRNAs (enthalten jeweils komplex strukturierte 5'UTRs) sowie die rpS13-mRNA (enthält eine unstrukturierte 5'UTR) um das 5-, 9- bzw. 3,5-fache im Vergleich zur Kontrolle verstärkt co-präzipitiert (Abb. III-11).



**Abb. III-11: DDX3 co-präzipitiert mit mRNAs und der HCV-RNA.** Immunpräzipitation von endogenem DDX3 mit einem anti-DDX3-Antiserum aus einem S10-Extrakt von Huh7-Zellen, die 48 h zuvor mit dem mono-cistronischen HCV-Replikon transient transfiziert wurden. Co-Präzipitierte RNAs wurden präpariert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Transkriptmengen der RNAs (HCV, GAPDH, HSP70, rpS13) wurden auf eine definierte Menge an Luciferase-RNA normiert, die vor der Extraktion der präzipitierten RNAs dem Präzipitat zugegeben wurde (Extraktionskontrolle). Das Balkendiagramm zeigt die Unterschiede der gemessenen RNA-Menge der entsprechenden RNAs im Vergleich zu einer Kontroll-IP, die mit dem Präimmunserum durchgeführt wurde (n-fache Anreicherung).

Zusammenfassend unterstützen diese Ergebnisse die These, dass DDX3 mit dem 43S-PIC über Protein-Protein-Interaktionen assoziiert. Die Co-Präzipitation von mRNAs und der HCV-RNA deuten zudem auch auf eine Interaktion von DDX3 mit dem 48S-Initiationskomplex hin.

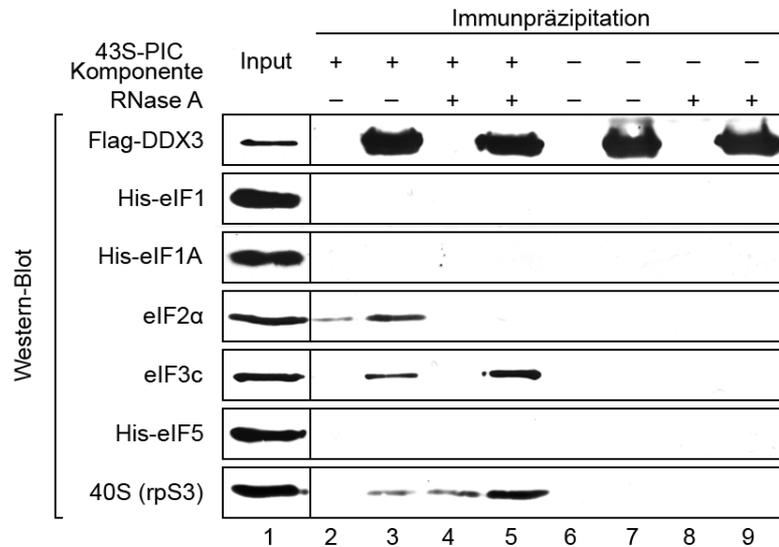
#### III.2.4 DDX3 interagiert direkt mit eIF3 und der ribosomalen 40S-Untereinheit

Die Analyse der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten aus Abschnitt III.2.2 indizierte eine Co-Sedimentation eines gewissen Anteils von DDX3 mit der 40S-Untereinheit. Die IP-Experimente zeigten zudem eine RNA-unabhängige Interaktion des Proteins mit der 40S-Untereinheit sowie RNA-unabhängige Assoziationen mit eIF1, eIF3 und eIF5 (vgl. Abb. III-10). Aus diesen Beobachtungen ging jedoch nicht hervor, ob DDX3 mit diesen Faktoren direkt oder indirekt interagiert.

Die Initiation der Translation an der HCV-IRES zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes benötigt ausschließlich den 43S-PIC (Pestova *et al.*, 1998b). Initiationsfaktoren wie der eIF4F-Komplex und eIF4B, die bei der 5'cap-abhängigen Translationsinitiation gebraucht werden, sind dagegen nicht essentiell (vgl. Abschnitte I.1 und I.2). Die Ergebnisse der Luciferase-Reporterexperimente zeigten, dass die HCV-IRES-abhängige Translation in DDX3-depletierten Huh7-Zellen reduziert war (vgl. III.1.3) und ließen deshalb vermuten, dass eine funktionelle Interaktion von DDX3 mit Komponenten des 43S-PIC erfolgte. Der 43S-PIC setzt sich aus den Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF5 und der ribosomalen 40S-Untereinheit zusammen. Mit den nachfolgend beschriebenen IP-Experimenten sollten der oder die direkten Interaktionspartner des 43S-PIC von DDX3 identifiziert werden.

Für diese Experimente wurden aus cytoplasmatischem HeLa-Extrakt und Kaninchen-Retikulozytenlysat die Translations-Initiationsfaktoren eIF2 und eIF3 bzw. die ribosomale 40S-Untereinheit gereinigt. Die Herstellungen von eIF1, eIF1A und eIF5 erfolgten rekombinant als His-tag-Fusionsproteine (siehe Abschnitt III.5.2 für die Qualität der gereinigten Faktoren). Um eine direkte Interaktion von DDX3 mit diesen Faktoren nachzuweisen, wurde in Hek293-Zellen DDX3 mit Flag-tag durch Transfektion des Expressionsplasmids hergestellt und mit einem anti-Flag-Antikörper durch Affinitätschromatographie gereinigt. Diese Reinigung erfolgte in Anwesenheit von 1% Triton-X-100 zur vollständigen Dissoziation von putativen DDX3-Proteinkomplexen. Nach der IP von Flag-DDX3 wurden die gereinigten Initiationsfaktoren des 43S-PIC einzeln mit den Flag-DDX3-haltigen *beads* versetzt und auf eine Co-Präzipitation mit DDX3 analysiert. Rekombinant gereinigtes DDX3 aus *E. coli* wurde in diesem Experiment nicht verwendet, da es unter den Pufferbedingungen mit den Translationskomponenten aggregierte.

Aus Abb. III-12 geht hervor, dass die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und eIF5 nicht mit dem gereinigten Flag-DDX3 co-präzipitierten. Interessanterweise konnte dagegen eine Co-Präzipitation von eIF3 mit Flag-DDX3 nachgewiesen werden. Diese wurde sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von RNase A beobachtet. Das demonstrierte, dass diese Interaktion RNA-unabhängig war (Abb. III-12, Spuren 3 und 5). Die Kontroll-IP, in der ein DDX3 ohne Flag-tag in Hek293-Zellen produziert wurde, was somit nicht mit den Flag-*beads* präzipitiert werden konnte, zeigte keine Assoziation mit dem exogen zugegebenen eIF3 (Abb. III-12, Spuren 2 und 4). Um zu zeigen, dass das gereinigte Flag-DDX3 nicht mit dem endogenen eIF3-Proteinkomplex kontaminiert war, wurden zusätzliche Kontroll-IPs durchgeführt (Abb. III-12, Spuren 6-9). Dazu wurde Flag-DDX3 durch Affinitätschromatographie gereinigt, jedoch nicht mit den Translationskomponenten versetzt. Diese Kontrollen verdeutlichten, dass Flag-DDX3 nach der Affinitätsreinigung nicht mit dem endogenen eIF3-Proteinkomplex assoziiert war (Abb. III-12, Spuren 7 und 9). Im Gegensatz zu der eindeutigen Interaktion von DDX3 mit eIF3 konnte mit dem Initiationsfaktor eIF2 nur eine RNA-abhängige Co-Präzipitation mit Flag-DDX3 nachgewiesen werden (Abb. III-12, Spuren 2). Auch die Kontroll-IP zeigte eine Co-Präzipitation von eIF2 mit den *beads* (Abb. III-12, Spuren 3). Allerdings konnte durch Zugabe von RNase A die Co-Präzipitation von eIF2 mit den Flag-DDX3- und den Kontroll-*beads* nicht mehr detektiert werden (Abb. III-12, Spuren 4 und 5). Das verdeutlichte, dass eIF2 in einer RNA-abhängigen Weise mit den *beads* interagiert und kein direkter Interaktionspartner von DDX3 war. Die IP mit der 40S-Untereinheit zeigte dagegen, ähnlich wie mit eIF3, eine spezifische Interaktion mit Flag-DDX3 (Abb. III-12, Spuren 2 und 3). Die Anwesenheit von RNase A führte zu einer stärkeren unspezifischen Bindung von rpS3 der 40S-Untereinheit an die *beads*. Im Präzipitationsexperiment mit Flag-DDX3 konnte die 40S-Untereinheit aber um das 4-fache im Vergleich zur Kontrolle angereichert werden (Abb. III-12, Spuren 4 und 5).



**Abb. III-12: DDX3 interagiert direkt mit eIF3 und der 40S-Untereinheit des 43S-PIC.** Western-Blot-Analyse des Inputs (Spur 1) und der gekennzeichneten co-präzipitierten Translationskomponenten (Spuren 2-9). Hek293-Zellen wurden transient mit dem Flag-DDX3-codierenden Plasmid transfiziert und das Protein anschließend mit einem anti-Flag-Antikörper durch Affinitätschromatographie gereinigt (Spuren 3, 5, 7 und 9). Kontroll-IPs wurden mit Hek293-Zellen durchgeführt, in denen ein DDX3 ohne Flag-tag hergestellt wurde (Spuren 2, 4, 6 und 8). Die gekennzeichneten Translationskomponenten wurden einzeln mit dem gereinigten Flag-DDX3 in Ab- (-) (Spuren 2, 3, 6 und 7) und in Anwesenheit (+) (Spuren 4, 5, 8 und 9) von RNase A versetzt und ein Präzipitationsexperiment durchgeführt. Die co-präzipitierten Translationsfaktoren wurden mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen. Die Anwesenheit von RNase A führte zur unspezifischen Assoziation der 40S-Untereinheit an die *beads*. Das Western-Blot-Signal für das immunpräzipitierte Flag-DDX3 repräsentiert eines von sechs IP-Experimenten, das für die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF5 und der 40S-Untereinheit durchgeführt wurde. Die Input-Spur repräsentiert eine Menge von 10% der Translationsfaktoren, die für die IP-Experimente eingesetzt wurden.

Die Ergebnisse zeigten, dass DDX3 offenbar direkt mit den Komponenten des 43S-PIC interagiert. Als direkte Interaktionspartner in diesem Komplex konnten eIF3 und die ribosomale 40S-Untereinheit identifiziert werden.

### III.3 DDX3 assoziiert an neu assemblierte 80S-Ribosomen

Der erste Schritt der Translationsinitiation ist die Bildung des 48S-Initiationskomplexes. Dieser beginnt an mRNAs mit der Bindung des eIF4F-Komplexes an die 5'cap-Struktur. Nach Assoziation des 43S-PIC erfolgt ein *scanning*-Prozess dieses Komplexes zum AUG-Startcodon wodurch sich der 48S-Initiationskomplex ausbildet (Abb. I-1; Jackson *et al.*, 2010). An der HCV-RNA bindet der 43S-PIC direkt und ohne *scanning* das AUG-Startcodon und führt zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes (Pestova *et al.*, 1998b). Nach Dissoziation der Initiationsfaktoren katalysiert eIF5B den zweiten Schritt der Translationsinitiation, die Assemblierung des 80S-Ribosoms durch Anlagerung der 60S- an die 40S-Untereinheit (Pestova *et al.*, 2000).

Aus den vorhergehenden Experimenten (vgl. III.2.1) konnte eine Funktion von DDX3 in der Translationsinitiation postuliert werden. Daher sollte als Nächstes untersucht werden, ob

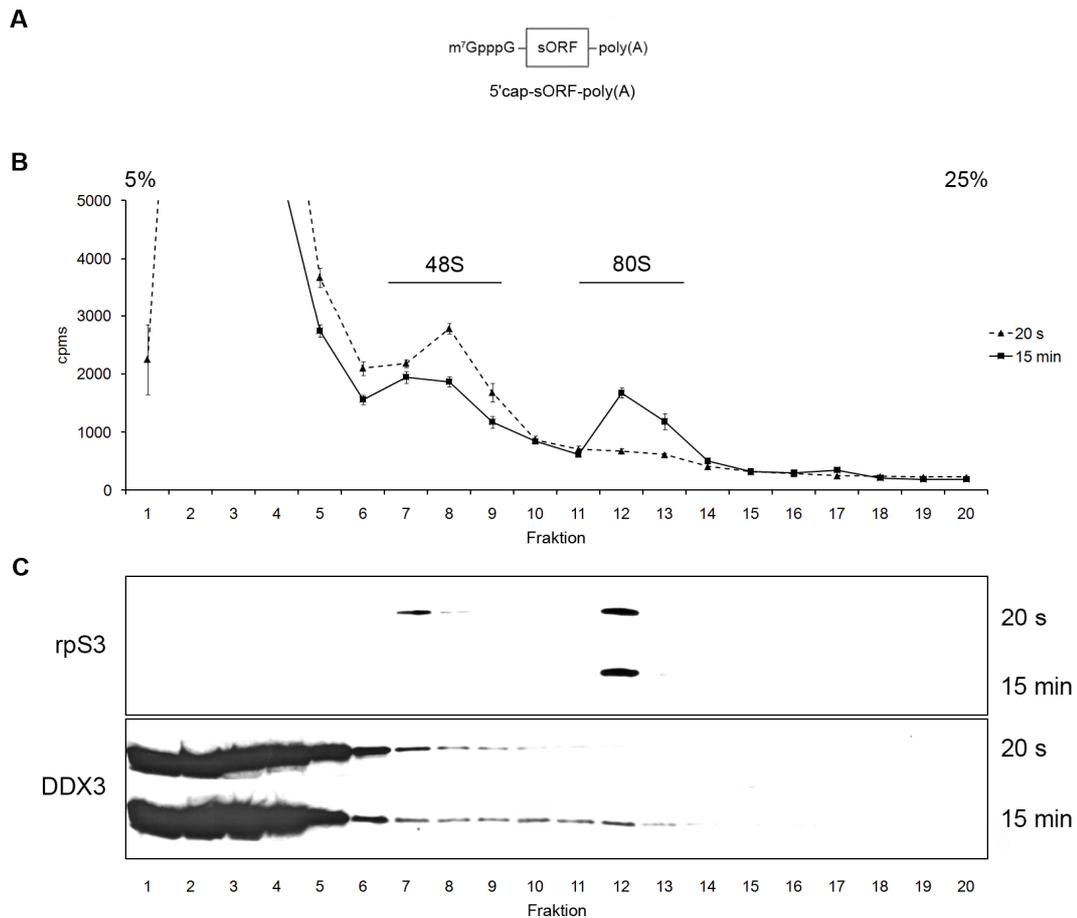
DDX3 während einer Translationsinitiation mit den 48S- und/oder mit den 80S-Initiationskomplexen assoziiert ist.

### III.3.1 DDX3 co-sedimentiert mit neu assemblierten 80S-Ribosomen während der Translationsinitiation an mRNA

Für die folgenden Untersuchungen wurden mit einem Huh7-S10-Extrakt Translations-Initiationsreaktionen durchgeführt. Dazu wurde der Huh7-S10-Extrakt mit Cycloheximid versetzt, um die Elongationsreaktion zu inhibieren. Dazu ist anzumerken, dass Cycloheximid nicht die Ausbildung der 48S- und 80S-Initiationskomplexe stört. Zur Analyse der Initiationskomplexe wurde dem Extrakt eine analytische Menge (20 nM) einer [<sup>32</sup>P]-markierten mRNA [5'cap-sORF-poly(A)] zugesetzt, die ein 5'GpppG-cap besitzt und aus einem kurzen *open reading frame* (sORF) sowie einem poly(A)-Bereich besteht (Abb. III-13 A). Die Initiationsreaktion wurde dann an zwei Zeitpunkten auf Eis gestoppt. Für die Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes wurde eine Reaktionszeit von 20 s, für die Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes eine Reaktionszeit von 15 min festgelegt. Die Auftrennung der Initiationskomplexe erfolgte in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten. Nach Fraktionierung wurde die Menge an Radioaktivität der 5'cap-sORF-poly(A)-RNA in den einzelnen Fraktionen bestimmt und die Sedimentation der Initiationskomplexe und von DDX3 mittels eines Western-Blots verfolgt.

Nach einer Reaktionszeit von 20 s war die markierte 5'cap-sORF-poly(A)-RNA sowohl in mRNP-Komplexen in den Fraktionen 2-5 als auch im 48S-Initiationskomplex in den Fraktionen 7-9 nachweisbar (Abb. III-13 B). Die Lokalisation des 48S-Initiationskomplexes wurde mittels eines Western-Blots von rpS3 in den Fraktionen 7 und 8 bestätigt (Abb. III-13 C). Interessanterweise wurde in der Initiationsreaktion nach 20 s die eingesetzte radioaktive RNA nicht in den Fraktionen 12 und 13 nachgewiesen (Abb. III-13 B). Die Fraktionen 12 und 13 enthielten aber eindeutig 80S-Ribosomen, was durch das rpS3-Signal angezeigt wurde (Abb. III-13 C). Der Nachweis von DDX3 in den Gradientenfraktionen zeigte, dass eine bestimmte Menge an DDX3 mit den neu assemblierten 48S-Initiationskomplexen co-sedimentierte, nicht aber mit den bereits vorhandenen 80S-Ribosomen (Abb. III-13 C).

Dieses Ergebnis änderte sich, wenn die Zeit der Translations-Initiationsreaktion auf 15 min verlängert wurde. Die exogen zugegebene 5'cap-sORF-poly(A)-RNA co-sedimentierte mit neu assemblierten 80S-Initiationskomplexen in die Fraktionen 12 und 13, was durch die Präsenz von Radioaktivität (Abb. III-13 B) und rpS3, vor allem in Fraktion 12, deutlich wurde (Abb. III-13 C). Interessanterweise zeigte der Western-Blot mit dem anti-DDX3-Antikörper, dass nun auch eine bestimmte Menge an DDX3 mit den neu assemblierten 80S-Initiationskomplexen co-sedimentierte (Abb. III-13 C).



**Abb. III-13: DDX3 interagiert spezifisch mit neu assemblierten 80S-Ribosomen.** (A) Aufbau der [<sup>32</sup>P]-markierten 5'cap-mRNA, die in diesem Versuch eingesetzt wurde. (B) Die Translations-Initiationsreaktionen wurden mit den Huh7-S10-Extrakten über die angegebenen Zeitintervalle in Anwesenheit von 2 mM Cycloheximid durchgeführt. Die Auftrennung der Translations-Initiationskomplexe erfolgte in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten und die Lokalisation durch Zugabe der markierten 5'cap-sORF-poly(A)-RNA. Die gemessene Radioaktivität wurde gegen die Gradientenfractionen aufgetragen, die 48S- und 80S-Initiationskomplexe sind gekennzeichnet. Gestrichelte Linie und Dreiecke: Sedimentation der exogen zugegebenen mRNA zum Zeitpunkt 20 s. Durchgezogene Linie und Quadrate: Sedimentation der mRNA zum Zeitpunkt 15 min. (C) Die Sedimentation von DDX3 und rpS3 im Gradienten wurde mittels eines Western-Blots zu den entsprechenden Zeitpunkten analysiert.

Diese Experimente zeigten, dass zu Beginn der Reaktion (20 s) in die Fraktion 12 bereits 80S-Ribosomen sedimentierten, zu diesem Zeitpunkt mit der exogen zugegebenen RNA aber erst die Bildung des 48S-Initiationskomplexes erfolgte (Abb. III-13 B). Cooper *et al.* (1976) berichteten, dass die Gesamtmenge an 80S-Ribosomen einer Zelle zu 70% aus „freien“, nicht mRNA-assoziierten Ribosomen besteht. In der Translations-Initiationsreaktion werden die „freien“ 80S-Ribosomen nach Cooper *et al.* (1976) nicht in die ribosomalen Untereinheiten dissoziiert und für eine Translationsinitiation verwendet. Deshalb kann postuliert werden, dass in die Fraktion 12 der nur kurz andauernden Translations-Initiationsreaktion (20 s) „freie“, also nicht neu assemblierte 80S-Ribosomen sedimentieren. Da DDX3 zu diesem Zeitpunkt nicht in die Fraktionen der 80S-Ribosomen sedimentierte, kann weiterhin geschlussfolgert werden, dass es nicht mit den „freien“ 80S-Ribosomen assoziiert ist (Abb. III-13 C). Dagegen war zum späteren Zeitpunkt der Translationsinitiation (15 min) ein

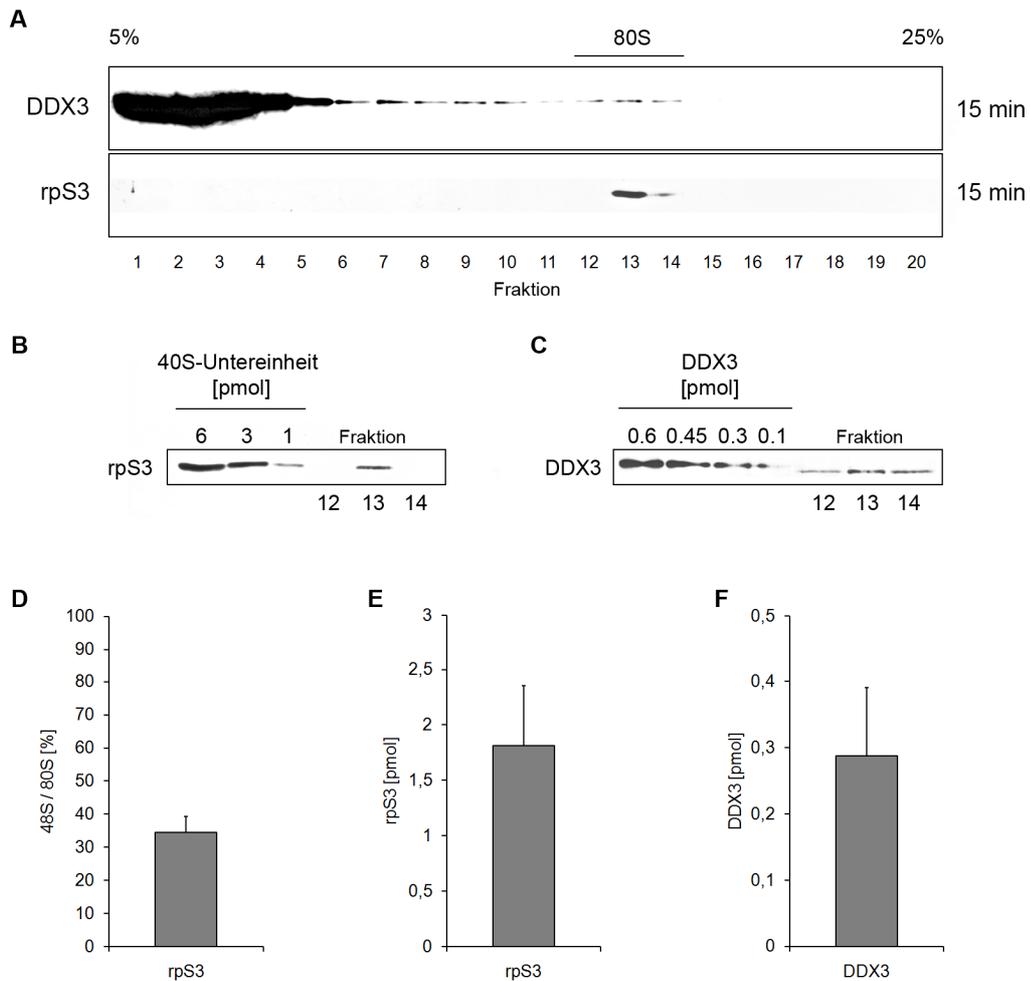
bestimmter Anteil von DDX3 in den Fraktionen der 80S-Ribosomen zu finden. Entsprechend deutete dieser Befund darauf hin, dass DDX3 entweder in der Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes oder für die Assemblierung eines funktionellen 80S-Ribosoms wichtig ist. Da DDX3 nicht mit den „freien“ 80S-Ribosomen co-sedimentierte, die zu allen Zeitpunkten während der Initiationsreaktionen nachweisbar waren, wurde zudem indiziert, dass DDX3 nicht am Ribosomen-Recyclingprozess beteiligt ist. Da keine eIFs mit den Elongations-kompetenten 80S-Ribosomen assoziiert sind (Jackson *et al.*, 2010), bestätigen diese Untersuchungen auch die IP-Experimente, die eine direkte Interaktion von DDX3 mit der 40S-Untereinheit anzeigen. Dieses lässt vermuten, dass ein bestimmter Anteil von DDX3 während der gesamten Initiationsphase an den ribosomalen 40S-Untereinheiten assoziiert bleibt (siehe Diskussion).

### **III.3.2 DDX3 interagiert mit ca. 50% aller neu assemblierten 80S-Ribosomen**

Aus den Ergebnissen von Abschnitt III.3.1 ging hervor, dass DDX3 während der Translations-Initiationsreaktion offenbar spezifisch an neu assemblierte 80S-Ribosomen assoziiert. Im Vergleich mit der Gesamtproteinmenge von DDX3 im Cytoplasma co-sedimentierte jedoch nur ein geringer Anteil von DDX3 mit den 48S- und 80S-Initiationskomplexen, während der größte Teil des Proteins in den gering konzentrierten Saccharose-Fractionen verblieb (vgl. Abb. III-13). Daher war es nun wichtig, die Menge an DDX3 zu bestimmen, die während einer Initiationsreaktion an die neu assemblierten 80S-Ribosomen assoziiert. Für die Berechnung der Proteinmenge wurde die Translations-Initiationsreaktion aus Abschnitt III.3.1 wiederholt, nur dass keine [<sup>32</sup>P]-markierte 5'cap-sORF-poly(A)-mRNA exogen zugegeben wurde. Während der Translationsinitiation sollte DDX3 somit an neu assemblierte 80S-Ribosomen mit gebundener endogener mRNA assoziieren.

Aus dieser Reaktion wurde zunächst der Anteil neu assemblierter 80S-Ribosomen bestimmt. Dies war essentiell, da die „freien“ 80S-Ribosomen im Huh7-S10-Extrakt für eine neue Initiationsreaktion nicht in die ribosomalen Untereinheiten dissoziiert werden (vgl. Abb. III-13, Cooper *et al.*, 1976). Dazu wurde in einer Initiationsreaktion nach 20 s die Menge an rpS3 (korrelierend mit der Anzahl an 40S-Untereinheiten) in den neu assemblierten 48S-Initiationskomplexen sowie die Menge an rpS3 in den schon vorhandenen „freien“ 80S-Ribosomen bestimmt. Aus dem Verhältnis der Menge an 40S-Untereinheiten im 48S-Initiationskomplex sowie der Summe aller 40S-Untereinheiten im 48S-Initiationskomplex und den „freien“ 80S-Ribosomen wurde ersichtlich, dass zu diesem frühen Zeitpunkt der Translationsinitiation ca. 35% aller 40S-Untereinheiten im 48S-Initiationskomplex vorzufinden waren (Abb. III-14 D). Diese 35% an 40S-Untereinheiten waren demzufolge in der Lage, neue 80S-Initiationskomplexe zu bilden. Anschließend wurde in der Initiationsreaktion nach 15 min die Gesamtmenge an 80S-Ribosomen bestimmt (Abb. III-14 A, Fraktion 13). Dazu wurde als Standard eine bekannte Menge an 40S-Untereinheiten eingesetzt, die aus einem Kaninchen-Retikulozytenlysat gereinigt wurden (vgl. III.5.2). Die Quantifizierung der

Menge an 80S-Ribosomen erfolgte dann mittels eines gemeinsamen Western-Blots (Abb. III-14 B) und einer für den Standard ermittelten Kalibriergeraden. So wurde gezeigt, dass ca. 1,8 pmol 80S-Ribosomen in die Fraktion 13 sedimentierten (Abb. III-14 E). Parallel dazu wurde die DDX3-Menge in dieser Fraktion mittels eines Western-Blots quantifiziert (Abb. III-14 C). Als Standard für DDX3 wurde rekombinant gereinigtes Protein aus *E. coli* verwendet. Anhand des Western-Blots konnte eine DDX3-Menge von ca. 0,29 pmol in der Fraktion 13 bestimmt werden (Abb. III-14 F).



**Abb. III-14: Bestimmung der Stoffmenge von DDX3, die mit den neu assemblierten 80S-Ribosomen assoziiert ist.** (A) Repräsentativer Western-Blot der Gradientenfaktionen einer Translations-Initiationsreaktion auf Gesamt-mRNA eines Huh7-S10-Extrakts nach 15 min. (B, C) Die Stoffmenge von (B) rpS3 und (C) DDX3 in der Fraktion 13 wurde mittels eines Western-Blots quantifiziert. Dazu wurden im Vergleich die Signale aus Western-Blots einer bekannten Stoffmenge an 40S-Untereinheiten und rekombinant gereinigtem DDX3 bestimmt. Dazu ist anzumerken, dass das rekombinante DDX3 einen zusätzlichen His-tag enthält und dementsprechend ein höheres Molekulargewicht als das endogene DDX3 im Huh7-S10-Extrakt aufweist. (D, E, F) Bestimmung des (D) Prozentsatzes an neu assemblierten 80S-Ribosomen, (E) der Stoffmenge an 80S-Ribosomen zum Zeitpunkt 15 min und (F) der Stoffmenge an DDX3 in den Fraktionen der 80S-Ribosomen. (D) Die Translations-Initiationsreaktion wurde für 20 s durchgeführt und die Stoffmenge an rpS3 (40S-Untereinheiten) in den Peak-Faktionen des 48S- und 80S-Initiationskomplexes bestimmt (siehe Abb. III-13 C für einen repräsentativen Gradienten). Dargestellt ist die Stoffmenge an 40S-Untereinheiten im 48S-Initiationskomplex, die in der Lage ist, zu neuen 80S-Ribosomen zu assemblieren, in Relation zur Summe der 40S-Untereinheiten im 48S- und 80S-Initiationskomplex. (E) Stoffmenge an 40S-Untereinheiten, die zum Zeitpunkt 15 min in die Fraktion 13 (Abb. III-14 A) sedimentierte (entspricht der Gesamtmenge an 40S-Untereinheiten im Huh7-S10-Extrakt, da kein rpS3-Signal an der Position des 48S-Initiationskomplexes detektiert wird). (F) Stoffmenge an DDX3, die mit den neu assemblierten 80S-Ribosomen nach einer Reaktionszeit von 15 min in Fraktion 13 assoziiert war.

Aus diesen Ergebnissen ist folgendes festzustellen: ca. 35% der Gesamtmenge an 80S-Ribosomen konnten als neu assemblierte 80S-Ribosomen ermittelt werden. Dies entspricht etwa dem Wert, der bereits mehrfach publiziert wurde. Für die Gesamtmenge an 80S-Ribosomen wurde ein Wert von 1,8 pmol ermittelt, demzufolge entsprechen ca. 0,6 pmol neu assemblierten 80S-Ribosomen. In Fraktion 13 waren nach einer Reaktionszeit von 15 min 0,29 pmol an DDX3 detektierbar. Somit waren ca. 50% der neu assemblierten 80S-Ribosomen mit DDX3 assoziiert. Bei dieser Berechnung wurde vorausgesetzt, dass nur ein DDX3-Molekül an ein 80S-Ribosom binden kann.

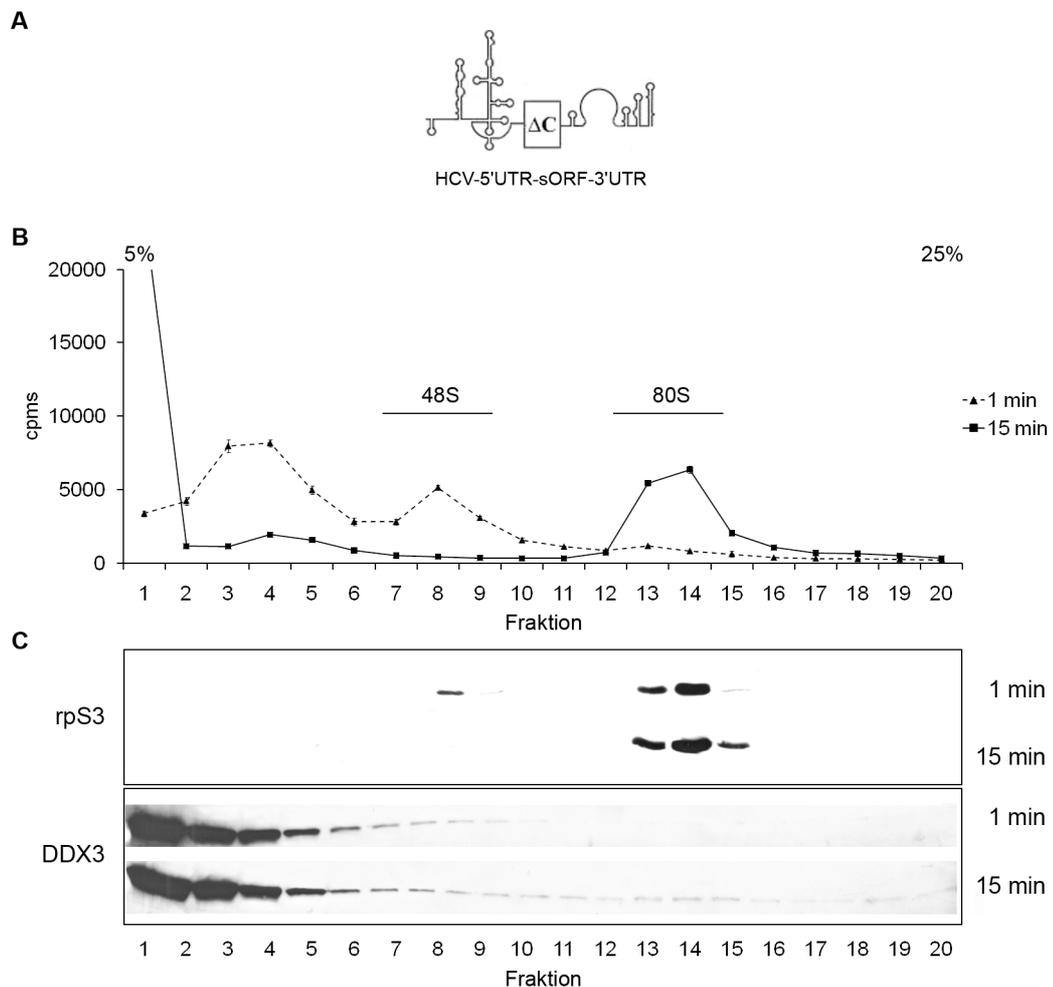
### III.3.3 DDX3 co-sedimentiert mit neu assemblierten 80S-Ribosomen auch bei einer Translationsinitiation an einer IRES

Als Nächstes sollte überprüft werden, ob ein ähnliches Verhalten von DDX3 auch mit Ribosomen zu beobachten ist, die a) ausschließlich auf einer exogenen RNA und b) auf einer IRES-haltigen RNA neu assemblierten. Dazu wurden Initiationsexperimente mit *in vitro*-transkribierter HCV-RNA durchgeführt. Der Huh7-S10-Extrakt wurde vor der Initiationsreaktion mit Micrococcus-Nuclease behandelt, so dass alle endogenen mRNAs durch Hydrolyse entfernt wurden.

Anschließend wurden die Initiationsexperimente mit analogen Mengen an Huh7-S10-Extrakt durchgeführt, wie in Abschnitt III.3.1 und III.3.2 beschrieben, jedoch mit einer größeren Stoffmenge (60 pmol) an [<sup>32</sup>P]-markierter HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA. Diese RNA bestand aus der HCV-5'UTR, der Core-Protein-codierenden Region für eine effiziente Translation und der HCV-3'UTR. Die Initiationsreaktion wurde in Anwesenheit von Cycloheximid für 1 min bzw. 15 min durchgeführt und auf Eis gestoppt. Für die HCV-RNA war eine Reaktionszeit von 1 min für die Assemblierung der 48S-Initiationskomplexe notwendig, da festgestellt wurde, dass diese Reaktion langsamer verlief als die Assemblierung dieser Komplexe an der 5'cap-sORF-poly(A)-mRNA (Daten nicht gezeigt). Als Negativkontrolle wurde ein Translations-defizientes RNA-Konstrukt verwendet, bei dem der *stem-loop* SLIII der IRES in der HCV-5'UTR deletiert war (Abb. III-15 A). Dieser *stem-loop* enthält die Bindestellen des Initiationsfaktors eIF3 und der 40S-Untereinheit (Pestova *et al.*, 1998b). Nach Deletion des *stem-loop* kann die RNA HCV-5'UTR $\Delta$ SLIII-sORF-3'UTR die Translation nicht mehr initiieren.

Bei der Translations-Initiationsreaktion, die nach 1 min gestoppt wurde, sedimentierte die radioaktiv markierte HCV-RNA in die Fraktionen 3/4 und 8 (Abb. III-15 C). Wie bereits aus den vorangegangenen Experimenten deutlich geworden war, sedimentierten in die Fraktionen 3 und 4 die mRNP-Komplexe und in die Fraktion 8 die neu assemblierten 48S-Initiationskomplexe. Dies wurde wiederum über die Detektion von rpS3 bestätigt (Abb. III-15 C). Wie zuvor bei der Initiationsreaktion auf mRNAs co-sedimentierte DDX3 zu diesem frühen Zeitpunkt mit den 48S-Initiationskomplexen. Auffallend war, dass nach einer Reaktionszeit von 1 min noch keine HCV-RNA in den Fraktionen der 80S-Initiationskomplexe enthalten

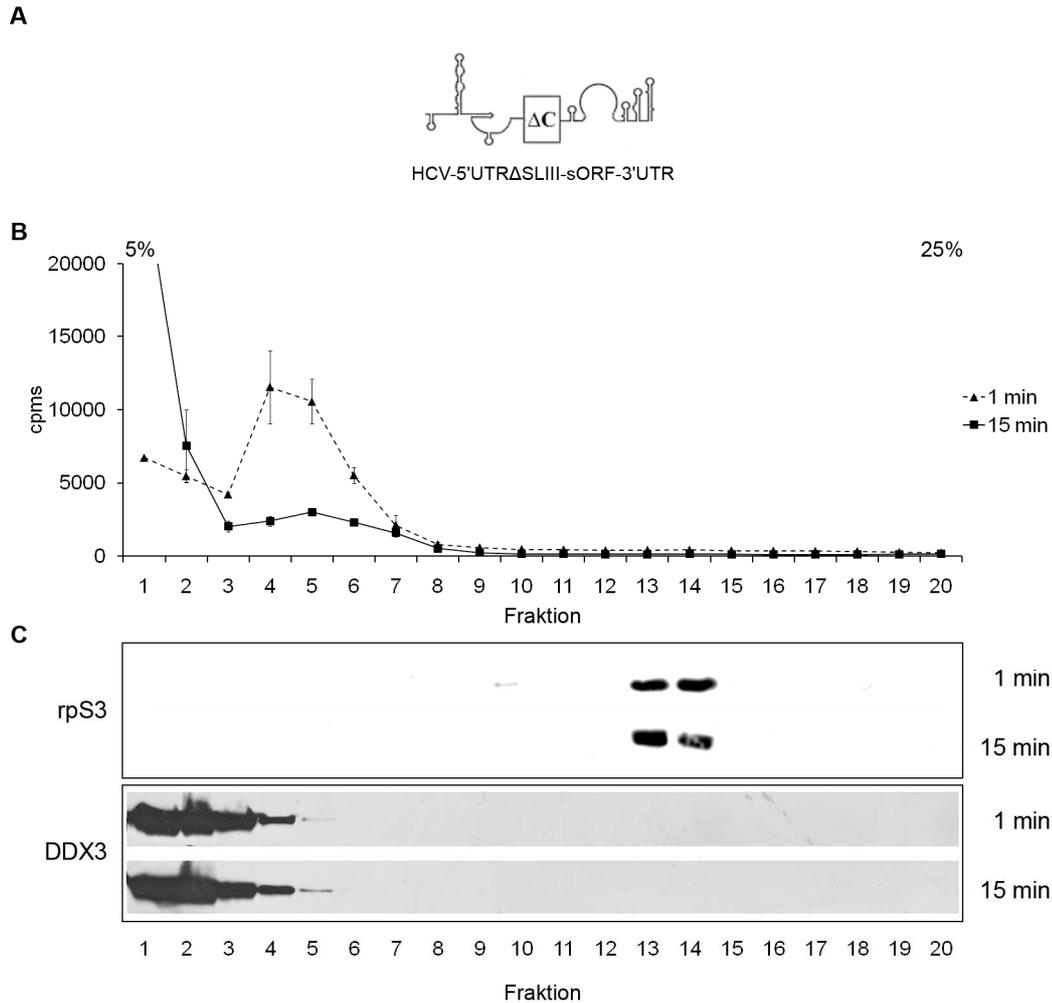
war, trotzdem aber 80S-Ribosomen nachgewiesen werden konnten (Abb. III-15 C, Fraktionen 13-15). Dieses bestätigte die Existenz von „freien“, RNA-ungebundenen 80S-Ribosomen im Extrakt umso mehr, da hier ausschließlich mit der exogenen RNA die Translations-Initiationsreaktion durchgeführt wurde. Nach einer Reaktionszeit von 15 min konnte die HCV-RNA in den Fraktionen der 80S-Initiationskomplexe (13-15) detektiert werden (Abb. III-15 C). Zu diesem Zeitpunkt ließ sich kein 48S-Initiationskomplex mehr nachweisen, da die gesamte Menge an rpS3 in den Fraktionen der 80S-Initiationskomplexe vorzufinden war. Mittels eines Western-Blots konnte zudem ein gewisser Anteil an DDX3 in den Fraktionen der neu assemblierten 80S-Ribosomen nachgewiesen werden (Abb. III-15 C, Fraktionen 13-15).



**Abb. III-15: DDX3 interagiert mit neu assemblierten 80S-Ribosomen an der HCV-RNA.** (A) Schematische Darstellung der RNA HCV-5'UTR-sORF-3'UTR. Die UTRs sind als Linien gezeichnet und repräsentieren die vorgeschlagene Sekundärstruktur. ΔC: codierender Sequenzbereich des HCV-Core-Proteins, der die effiziente Translation an der HCV-IRES fördert. (B) Die Translations-Initiationsreaktion an der HCV-RNA wurde in Anwesenheit von 2 mM Cycloheximid mit einem Huh7-S10-Extrakt durchgeführt, in dem zuvor durch Behandlung mit Micrococcus-Nuclease die endogene mRNA entfernt wurde. Nach einer Reaktionszeit von 1 min bzw. 15 min wurden die Translations-Initiationskomplexe in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt und die Radioaktivität gegen die Gradientenfraktionen aufgetragen. Die Positionen der neu assemblierten Initiationskomplexe sind als 48S und 80S gekennzeichnet. (C) Western-Blot-Analyse der entsprechenden Gradientenfraktionen, die mit spezifischen Antikörpern gegen DDX3 und rpS3 getestet wurden.

Analog zu den zuvor erhaltenen Daten mit der mRNA zeigten diese Ergebnisse, dass ein bestimmter Anteil von DDX3 auch während der Translationsinitiation an die 48S- und 80S-Initiationskomplexe assoziiert war.

Die Experimente mit der Translations-defizienten RNA HCV-5'UTR $\Delta$ SLIII-sORF-3'UTR wiesen dagegen ein völlig anderes Bild auf (Abb. III-16 A). Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden die isolierten Proteine der Gradientenfractionen der Initiationsreaktion mit den RNAs HCV-5'UTR-sORF-3'UTR bzw. HCV-5'UTR $\Delta$ SLIII-sORF-3'UTR simultan gebロットet, die Nitrocellulosemembran gleichzeitig mit den entsprechenden Antikörpern versetzt und zusammen durch Chemilumineszenz entwickelt. Nach einer Reaktionszeit von 1 min wurde die Radioaktivität der defizienten HCV-RNA vorwiegend in den Fraktionen 4 und 5 detektiert, in die die mRNP-Komplexe sedimentierten. In den Fraktionen 8 und 9, die dem 48S-Initiationskomplex entsprachen, konnte die RNA dagegen nicht nachgewiesen werden (Abb. III-16 B). Bestätigt wurde dieser Befund durch ein deutlich vermindertes Signal für rpS6 im Western-Blot der Fraktion 9, im Vergleich zur Wildtyp (WT)-HCV-RNA. DDX3 war im Falle der mutierten HCV-RNA nicht in den Fraktionen des 48S-Initiationskomplexes detektierbar (Abb. III-16 C). Nach einer Reaktionszeit von 15 min wurde die mutierte HCV-RNA ausschließlich in den gering konzentrierten Fraktionen des Gradienten nachgewiesen. Ein Signal in den Fraktionen der 80S-Ribosomen konnte zu keinem Zeitpunkt detektiert werden (Abb. III-16 B). Auch DDX3 war zu keinem Zeitpunkt in den Fraktionen der 80S-Ribosomen nachweisbar (Abb. III-16 C).



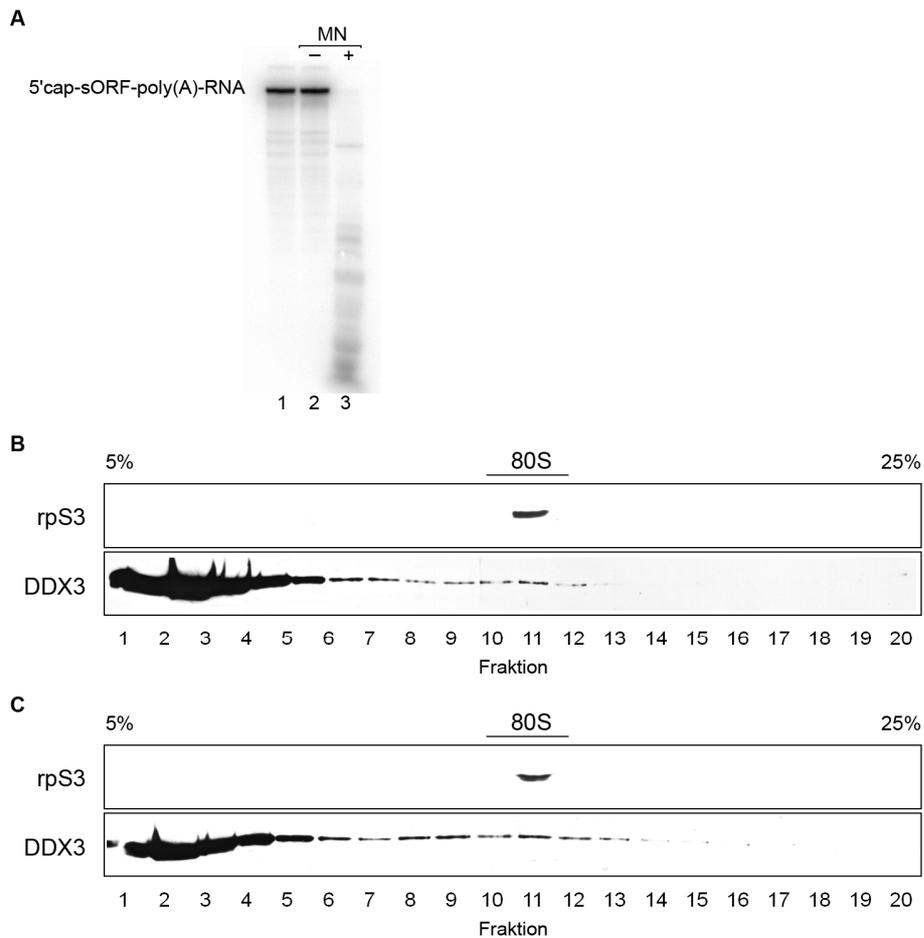
**Abb. III-16: Die Translations-defiziente HCV-RNA assembliert keine Initiationskomplexe.** Kontrollelexperiment zum Versuch in Abb. III-15. (A) Strukturelle Organisation der RNA HCV-5'UTRΔSLIII-sORF-3'UTR mit der Deletion des *stem-loop* SLIII in der HCV-5'UTR (vgl. Abb. III-15). Dieser RNA fehlte somit ein funktionelles HCV-IRES-Element (Grassmann *et al.*, 2005). (B) Die Translations-Initiationsexperimente wurden in der gleichen Weise, wie in Abb. III-15 durchgeführt. (C) Identifizierung von DDX3 und rpS3 mittels eines Western-Blots.

Die Translations-Initiationsexperimente mit der 5'cap-sORF-poly(A)-mRNA (vgl. Abb. III-13) sowie mit nicht mutierter und mutierter HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA ergaben somit ein übereinstimmendes Bild, das auf eine wichtige Funktion von DDX3 in der 5'cap- und HCV-IRES-abhängigen Translationsinitiation schließen ließ.

### III.3.4 DDX3 interagiert RNA-unabhängig mit neu assemblierten 80S-Ribosomen

Im folgenden Experiment sollte untersucht werden, ob DDX3 mit neu assemblierten 80S-Ribosomen spezifisch interagiert. So war z.B. vorstellbar, dass das Protein lediglich an Ribosomen-assoziierte mRNAs bindet und deshalb in die Fraktionen des 80S-Ribosoms co-sedimentierte. Um letzteres auszuschließen wurde eine Translations-Initiationsreaktion wie in Abschnitt III.3.1 in Anwesenheit von Cycloheximid gestartet und nach 15 min auf Eis gestoppt. Vor der Auftrennung der Initiationskomplexe in einem 5-25% linearen Saccharose-

Gradienten wurde der Reaktionsansatz mit Micrococcus-Nuclease versetzt, um RNAs zu entfernen, darunter auch mRNAs, die in neu assemblierten 80S-Ribosomen enthalten waren. Der Testverlauf in Abb. III-17 A belegte, dass die Micrococcus-Nuclease in den Pufferbedingungen der Translations-Initiationsreaktion funktionell war. Abb. III-17 B und C zeigen, dass das Sedimentationsverhalten von DDX3 auch nach einer Behandlung mit Micrococcus-Nuclease unverändert blieb, d.h. das Protein war nach wie vor in den neu assemblierten 80S-Initiationskomplexen nachzuweisen. Damit wurde deutlich, dass DDX3 sowohl mit der 40S-Untereinheit als auch mit neu assemblierten 80S-Ribosomen RNA-unabhängig interagiert.



**Abb. III-17: DDX3 interagiert RNA-unabhängig mit neu assemblierten 80S-Ribosomen.** (A) Test auf Aktivität der Micrococcus-Nuclease (MN) in der Translations-Initiationsreaktion. [<sup>32</sup>P]-markierte 5'cap-sORF-poly(A)-RNA (Spur 1) wurde in Ab- (-) und Anwesenheit (+) der MN unter identischen Pufferbedingungen einer Translationsreaktion für 15 min bei 25°C inkubiert (Spuren 2 und 3). (B, C) Die Translations-Initiationsreaktion wurde mit einem Cycloheximid-behandelten Huh7-S10-Extrakt für 15 min bei 37°C durchgeführt und die Translations-Initiationskomplexe in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Vor der Auftrennung wurde die (C) Translationsreaktion für 15 min bei 25°C mit MN behandelt, nachdem sich 80S-Initiationskomplexe ausbilden konnten. Die Position der 80S-Initiationskomplexe ist gekennzeichnet. Die Gradientenfraktionen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen DDX3 und rpS3 (40S-Untereinheit) mittels eines Western-Blots analysiert.

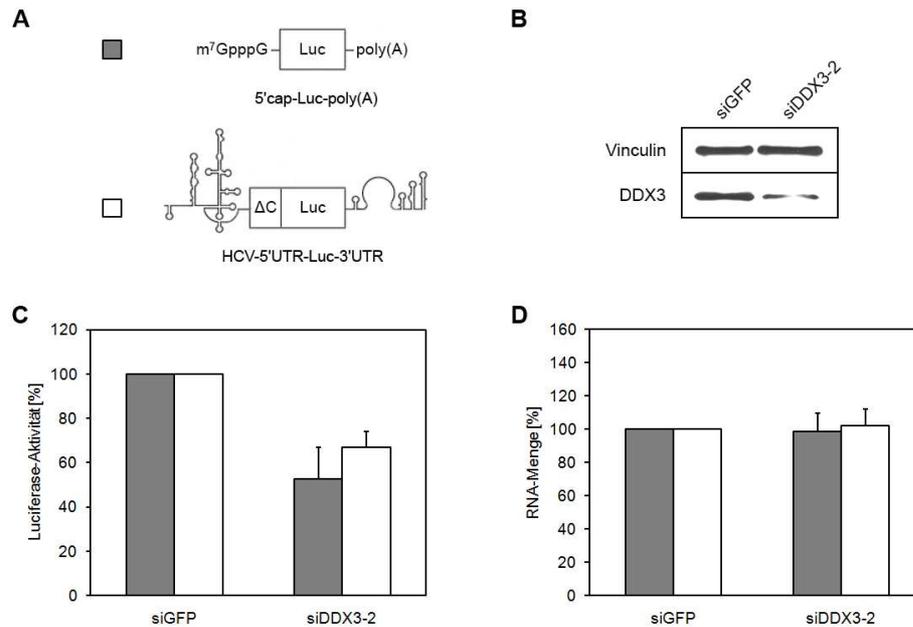
Dieses Experiment war wiederum in Einklang mit den Ergebnissen der IP-Experimente (vgl. Abschnitt III.2.3 und III.2.4) und bestätigte somit die Vorstellung, dass DDX3 auch im neu assemblierten 80S-Ribosom mit der 40S-Untereinheit assoziiert blieb.

### III.4 DDX3 fördert die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen *in vitro*

Die vorangegangenen Experimente (vgl. Abschnitt III.3.4) indizierten eine RNA-unabhängige Interaktion von DDX3 mit neu assemblierten 48S- und 80S-Initiationskomplexen in einer Translations-Initiationsreaktion. Ebenfalls wurde deutlich, dass DDX3 mit „freien“, RNA-ungebundenen 80S-Ribosomen nicht assoziierte. Dies ließ vermuten, dass das Protein an der Ausbildung des 48S- und/oder des 80S-Initiationskomplexes während der Translationsinitiation beteiligt ist.

#### III.4.1 Depletion von DDX3 reduziert die cap- und IRES-abhängige Translation in Huh7-S10-Extrakten

Um diesen Aspekt weiter zu untersuchen, wurden Translations-kompetente Huh7-S10-Extrakte hergestellt. Die Zellen, die dabei als Ausgangsmaterial verwendet wurden, waren einerseits mit der siRNA siGFP und andererseits mit der siRNA siDDX3-2 in Huh7-Zellen transfiziert worden. Die Quantifizierung der Depletion von DDX3 erfolgte mittels eines Western-Blots. Dieser zeigte eine Reduktion der DDX3-Menge auf ca. 25% im DDX3-depletierten Extrakt im Vergleich zum siGFP-Extrakt (Abb. III-18 B). Mit diesen Extrakten wurde eine *in vitro*-Translation mit den Reporter-RNAs 5'cap-Luc-poly(A) und HCV-5'UTR-Luc-3'UTR durchgeführt (Abb. III-18 A) um zu analysieren, ob der DDX3-depletierte Extrakt, ähnlich wie dies zuvor bereits mit DDX3-depletierten Huh7-Zellen festgestellt wurde (vgl. Abb. III-6 und Abb. III-7), eine Reduktion der Translation zeigte. Interessanterweise konnte auch unter diesen *in vitro*-Bedingungen eine deutliche Verminderung der Translation der Reporterkonstrukte im depletierten DDX3-Extrakt auf ca. 50% in der cap-abhängigen bzw. auf ca. 65% in der HCV-IRES-abhängigen Translation im Vergleich zum siGFP-Extrakt (100%) festgestellt werden (Abb. III-18 C). Parallel zur Bestimmung der Luciferase-Reporteraktivität wurde nach Abstoppen der Translationsreaktion die Gesamt-RNA des siGFP-Kontrollextrakts und des DDX3-depletierten Extrakts isoliert und die Mengen der RNAs 5'cap-Luc-poly(A) und HCV-5'UTR-Luc-3'UTR mittels qRT-PCR quantifiziert. Abb. III-18 D zeigt, dass vergleichbare Mengen der Reporterkonstrukte im DDX3-depletierten Extrakt und im Kontrollextrakt vorlagen. Die festgestellte Reduktion der Translation war somit nicht auf eine variierende RNA-Menge zurückzuführen. Das Experiment demonstrierte, dass mit dem DDX3-depletierten S10-Extrakt ein System etabliert werden konnte, mit dem sich detailliertere Untersuchungen zur Funktion von DDX3 während des Translations-Initiationsprozesses *in vitro* durchführen ließen.

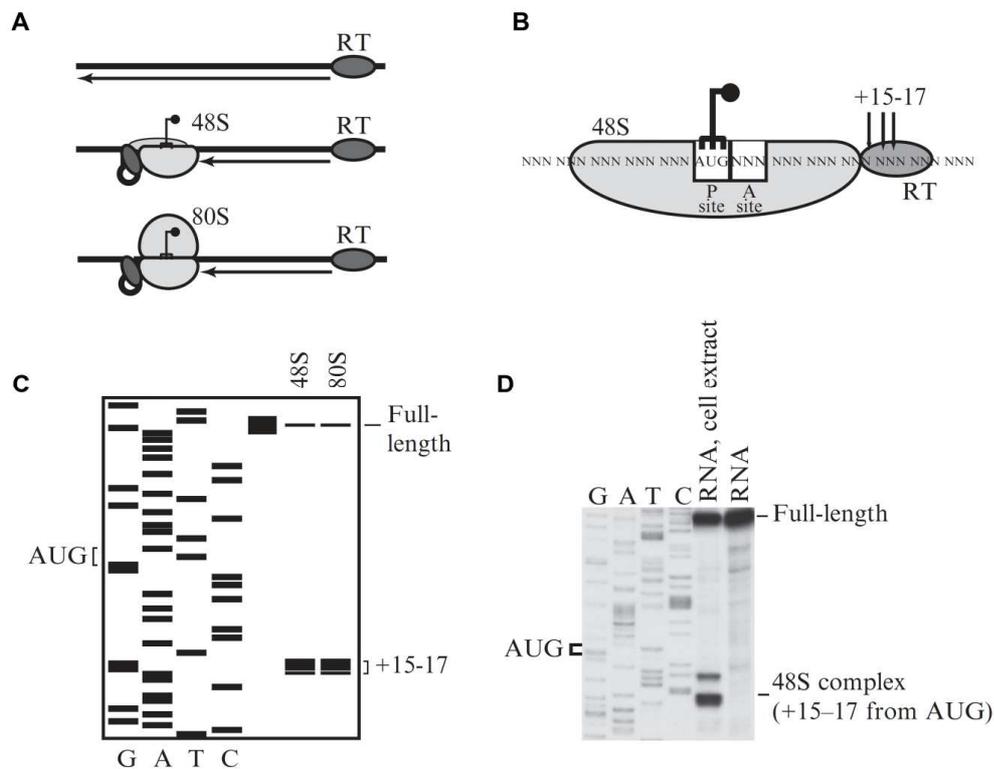


**Abb. III-18: Die cap- und HCV-IRES-abhängige Translation ist in DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakten reduziert.** (A) Schematische Darstellung der getesteten Luciferase-Reporter-RNAs (vgl. Abb. III-6 und Abb. III-7). (B) Western-Blot-Analyse von Vinculin und DDX3 in S10-Extrakten von Huh7-Zellen, die mit der siRNA siDDX3-2 und der Kontroll-siRNA siGFP 72 h vor der Präparation der Extrakte transfiziert wurden. (C) *In vitro*-Translation der entsprechenden Reporter-RNAs in den Huh7-S10-Extrakten. Die Luciferaseaktivität wurde nach einer Reaktionszeit von 30 min bestimmt. (D) RNA-Menge der Luciferase-Reporterkonstrukte im S10-Extrakt von siGFP- und siDDX3-2-behandelten Huh7-Zellen. Die RNAs wurden nach 30 min aus der Translationsreaktion präpariert und die relativen RNA-Mengen mittels qRT-PCR bestimmt.

### III.4.2 DDX3 hat keine Funktion bei der Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes

Um zunächst zu untersuchen, ob DDX3 eine Funktion in der Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes besitzt, wurde eine Primer-Extensions-Inhibitions-Analyse (*toe printing*) durchgeführt. Das *toe printing* ist eine Methode, mit der die Positionen von ribosomalen 48S- und 80S-Komplexen auf zu translatierenden RNAs bestimmt werden können. Dazu wird ein [<sup>32</sup>P]-markiertes Oligonucleotid, das komplementär zu der untersuchten mRNA ist, an diese hybridisiert und durch eine Reverse Transkriptase bis zum 5'Ende transkribiert (Abb. III-19 A). Sind 48S- bzw. 80S-Komplexe stabil an die mRNA gebunden, wird die reverse Transkription an der Bindungsstelle gestoppt, wodurch verkürzte cDNAs entstehen (Abb. III-19 A). Ribosomale Komplexe, die an der RNA gebunden sind, lassen somit an der mRNA einen charakteristischen *toe print* entstehen, der +15-17 nt *downstream* des ersten Nucleotids des Translations-Initiationscodons AUG liegt, das in der P-Bindestelle der 40S-Untereinheit gebunden ist (Abb. III-19 B). Die Verschiebung kommt dadurch zustande, dass die 40S-Untereinheit aufgrund der Größe einen bestimmten Bereich an der mRNA abdeckt. 48S- und 80S-Komplexe zeigen die gleichen *toe prints*, da die Position der 40S-Untereinheit an der RNA in einem vollständig assemblierten 80S-Ribosom nicht verändert wird (Abb. III-19 A und C; Pisarev *et al.*, 2007b). Die Position dieser Komplexe kann mittels einer Sequenzierreaktion bestimmt werden. Diese wird mit dem gleichen Oligonucleotid an dem DNA-

*template* durchgeführt, von dem aus ursprünglich die RNAs für die *toe print*-Analysen generiert wurden (Abb. III-19 C und D).

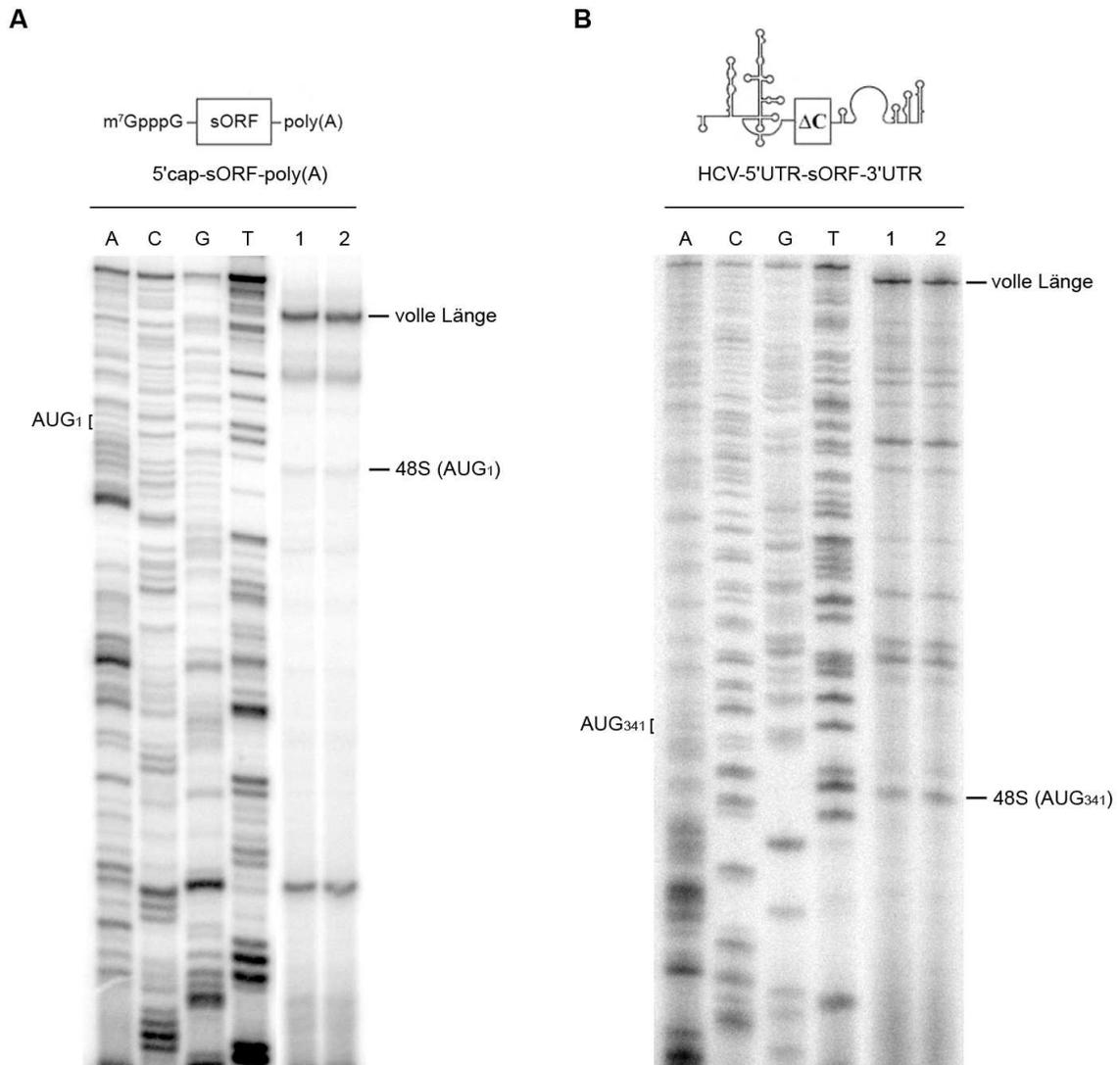


**Abb. III-19: Primer-Extensions-Inhibitions-Analyse (*toe printing*).** (A) An die *template*-RNA wird ein Oligonucleotid hybridisiert, das als Primer für die Reverse Transkriptase (RT) dient. Die durch die RT transkribierte cDNA wird radioaktiv markiert, entweder durch Verwendung eines 5'-[<sup>32</sup>P]-markierten Oligonucleotids oder durch den Einbau von [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-markierten Nucleotiden durch die RT. An einer RNA, die keine Initiationskomplexe gebunden hat, wird eine cDNA mit der vollständigen Länge gebildet (Full-length), während 48S- oder 80S-Komplexe zu einem vorzeitigen Abbruch der reversen Transkription aufgrund der Bindung der 40S-Untereinheit an die RNA führen. (B) In beiden Fällen wird die Synthese dieser cDNAs +15-17 nt *downstream* vom ersten Nucleotid (+1) gestoppt, das in der P-Bindestelle der 40S-Untereinheit gebunden ist. (C) Die generierten radioaktiv markierten cDNAs werden in einem denaturierenden Harnstoff-PAA-Gel aufgetrennt. Mittels einer Didesoxyribonucleotid-Sequenzierung, die an dem DNA-*template* mit dem gleichen Oligonucleotid durchgeführt wird, von dem aus ursprünglich die RNAs für die *toe print*-Analysen generiert wurden, kann die Position der gebundenen Komplexe bestimmt werden. (D) Beispiel eines *toe print* an einer mRNA. Die Position des *toe print*, der +15-17 nt vom ersten Nucleotid in der P-Bindestelle der 40S-Untereinheit liegt und die vollständige cDNA-Länge sind gekennzeichnet. Die Spuren G, A, T und C zeigen die Sequenzierleiter. Die Abbildung wurde nach Pisarev *et al.* (2007b) modifiziert.

Die Assemblierung der 48S-Initiationskomplexe erfolgte mit dem Kontrolleextrakt (siGFP) und dem DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakt aus Abschnitt III.4.1. Mit diesen Extrakten wurden Translations-Initiationsreaktionen an den RNAs 5'cap-sORF-poly(A) und HCV-5'UTR-sORF-3'UTR in Anwesenheit von GMP-PNP durchgeführt. Dieses nicht hydrolysierbare GTP-Analogon wird durch den Initiationsfaktor eIF2 gebunden. Die Blockierung der Hydrolyse von GMP-PNP durch eIF2 verhindert die Reduktion der Affinität von eIF2 zu der Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> und somit das Freisetzen der Initiationsfaktoren von der 40S-Untereinheit (Kapp & Lorsch, 2004). Dadurch wird die Assemblierung des 80S-Ribosoms unterbunden, da die 60S-Untereinheit nicht mit der 40S-Untereinheit assoziieren kann. Folglich akkumulieren in dieser Translations-Initiationsreaktion die 48S-Initiationskomplexe. Die in der anschlie-

ßenden reversen Transkription generierten cDNAs wurden zur Analyse in einem Harnstoff-PAA-Gel mit einer Didesoxyribonucleotid-Sequenzierreaktion aufgetrennt.

Die Initiation der Translation an der 5'cap-sORF-poly(A)-RNA im siGFP-Extrakt ergab neben der vollständig transkribierten RNA einen charakteristischen *toe print* mit einem Abstand von +15-16 nt *downstream* vom ersten Nucleotid des AUG-Startcodons (Abb. III-20 A, Spur 1). Der Vergleich mit dem DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakt zeigte einen *toe print* mit der gleichen Intensität, ebenfalls +15-16 nt *downstream* vom AUG-Startcodon entfernt (Abb. III-20 A, Spur 2). Das gleiche Ergebnis wurde mit der Translations-Initiationsreaktion an der HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA erhalten. Der Vergleich der *toe prints*, die +15-16 nt vom AUG<sub>341</sub>-Startcodon entfernt waren, zeigte keinen Unterschied in der Intensität im siGFP-Extrakt im Vergleich zum DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakt (Abb. III-20 B, Spuren 1 und 2). Es wurden außerdem weitere *toe prints upstream* des AUG<sub>341</sub>-Startcodons erhalten, die eine Nebenreaktion der Initiationsreaktion darstellten. Diese wurden ebenfalls von Pestova *et al.* (1998) beschrieben und nicht in der Abb. III-20 B gekennzeichnet.



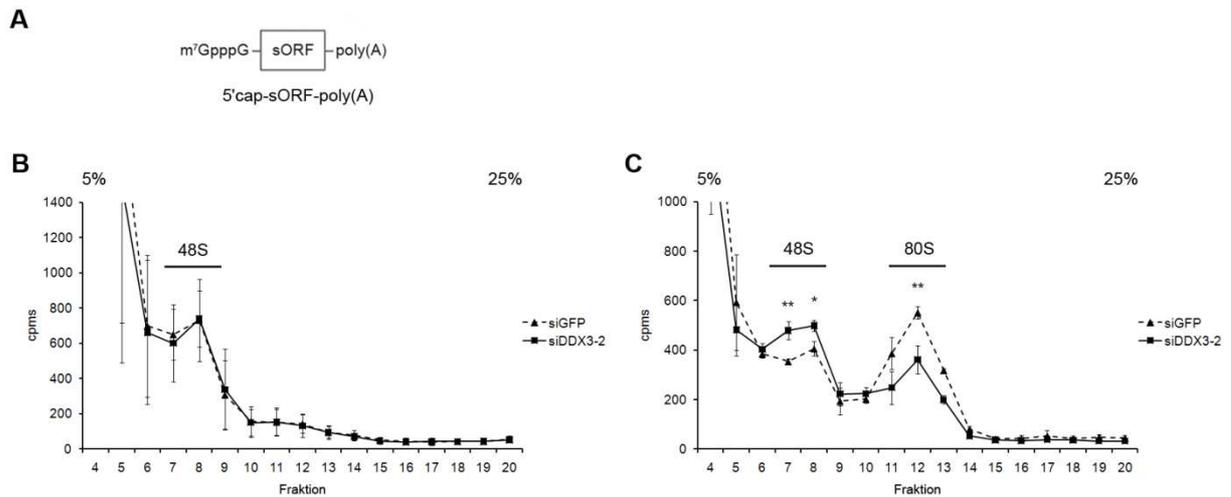
**Abb. III-20: Toe printing-Analyse von 48S-Initiationskomplexen an einer mRNA und HCV-RNA in einem DDX3-depletierten Extrakt.** (A, B) (oberer Abbildungsteil) Schematische Darstellung der verwendeten mRNA- und HCV-RNA-Konstrukte (vgl. Abb. III-13 und Abb. III-15). (unterer Abbildungsteil) Die 48S-Initiationskomplexe wurden in einer Translations-Initiationsreaktion in Anwesenheit von GMP-PNP an der (A) 5'cap-sORF-poly(A)- und (B) HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA in den entsprechenden Huh7-S10-Extrakten assembliert (Spur 1: Kontrollextrakt; Spur 2: DDX3-depletierter Extrakt). Die Auftrennung der cDNAs, die aus der mRNA und HCV-RNA generiert wurden, erfolgte in einem (A) 10% bzw. (B) 6% Harnstoff-PAA-Gel mit einer Didesoxyribonucleotid-Sequenzierleiter (Didesoxyribonucleotid von A, C, G, T). Die Sequenzierleiter wurde von DNA-templates generiert, von denen aus die RNAs für die toe print-Analysen generiert wurden. Die toe prints der 48S-Initiationskomplexe (mRNA: AUG<sub>1</sub>; HCV-RNA: AUG<sub>341</sub>) und die vollständige Länge der entsprechenden cDNAs (volle Länge) sind gekennzeichnet.

Diese Ergebnisse machten deutlich, dass die in den DDX3-depletierten Extrakten beobachtete verminderte Translation nicht auf eine verringerte Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes zurückzuführen war. Eine Funktion von DDX3 in diesem ersten Schritt der Translationsinitiation konnte daher ausgeschlossen werden.

### III.4.3 Depletion von DDX3 hemmt die Ausbildung des 80S-Initiationskomplexes

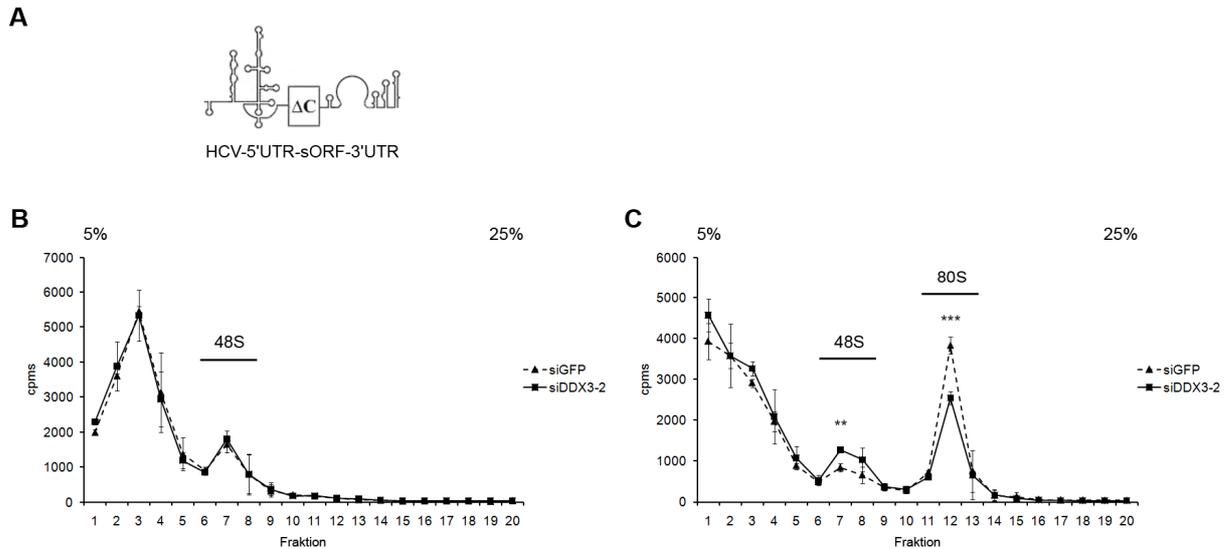
Aus den Ergebnissen von Abschnitt III.4.2 ging hervor, dass DDX3 keine Funktion in der Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes an einer mRNA bzw. HCV-RNA besaß. Es stellte sich die Frage, ob DDX3 den zweiten Schritt der Translationsinitiation, die Assemblierung des 80S-Ribosoms ausgehend vom 48S-Initiationskomplex beeinflusst. Aus den bereits aufgeführten Gründen eignete sich eine *toe print*-Reaktion zur Analyse des zweiten Schrittes der Translationsinitiation nicht, da 80S-Initiationskomplexe an der RNA den gleichen +15-16 nt *toe print* wie die 48S-Initiationskomplexe ausbilden. Deshalb wurden, wie bereits in Abschnitt III.3 aufgezeigt, mit den siGFP und den DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakten Translations-Initiationsreaktionen in Anwesenheit des Elongationsinhibitors Cycloheximid an den [<sup>32</sup>P]-markierten RNAs 5'cap-sORF-poly(A) und HCV-5'UTR-sORF-3'UTR durchgeführt. Anschließend wurden die assemblierten Initiationskomplexe in einem linearen 5-25% Saccharose-Gradienten aufgetrennt und die Radioaktivität in den 48S- und 80S-Initiationskomplexen analysiert. Es wurden wiederum zwei Zeitintervalle für die Initiationsreaktion gewählt, um die Assemblierung dieser Komplexe zu untersuchen.

Die 5'cap-sORF-poly(A)-RNA wurde zunächst für eine Reaktionszeit von 20 s mit den siGFP und DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakten versetzt. Abb. III-21 B zeigt, dass in dieser Zeit die 48S-Initiationskomplexe an der mRNA ausgebildet wurden (nachweisbare Radioaktivität in Fraktion 8). Wie aus den *toe print*-Experimenten zu erwarten war, ließen sich zu diesem Zeitpunkt keine Unterschiede zwischen dem DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakt und dem siGFP-Extrakt des Kontrollansatzes feststellen. Dies bestätigte, dass DDX3 nicht in die Bildung des 48S-Initiationskomplexes involviert ist. Anschließend wurde die Translations-Initiationsreaktion für 10 min durchgeführt und es konnte, ähnlich wie in den Huh7-S10-Extrakten aus Abschnitt III.3.1, die Assemblierung der 80S-Initiationskomplexe an der 5'cap-sORF-poly(A)-RNA nachgewiesen werden (Abb. III-21 C, Fraktionen 11-13). Interessanterweise wurden deutliche Unterschiede zwischen dem DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakt und dem Extrakt des Kontrollansatzes beobachtet. So war die Ausbildung des 80S-Initiationskomplexes in den DDX3-depletierten Extrakten signifikant verlangsamt. Dies zeigte sich darin, dass in den Fraktionen 11-13 der Anteil an markierter mRNA nur 60% der Menge im Vergleich zur jeweiligen Kontrollreaktion betrug (Abb. III-21 C). Dieser Befund korrelierte mit einer deutlich erhöhten mRNA-Menge, die in den 48S-Initiationskomplexen des DDX3-depletierten Extrakts verblieb (Abb. III-21 C, Fraktionen 7 und 8).



**Abb. III-21: DDX3-Depletion hemmt die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen an der mRNA.** Translations-Initiationsexperimente mit dem DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakt und dem Extrakt des Kontrollansatzes. (A) Schematische Darstellung der mRNA 5'cap-sORF-poly(A), die für die Translations-Initiationsexperimente verwendet wurde. (B) Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes an 10 nM [<sup>32</sup>P]-markierter mRNA nach einer Reaktionszeit von 10 min. (C) Bildung des 80S-Initiationskomplexes an der 5'cap-mRNA nach einer Reaktionszeit von 20 s. Zur besseren Auflösung sind die Messungen der Radioaktivität aus den Gradientenfraktionen 1-3 nicht abgebildet. Gestrichelte Linie, Dreiecke: Daten des Kontrollextrakts (Huh7-Zellen transfiziert mit siGFP). Durchgezogene Linie, Quadrate: Daten des DDX3-depletierten Extrakts (Huh7-Zellen transfiziert mit siDDX3-2); (\*)  $P \leq 0,05$ ; (\*\*)  $P \leq 0,01$ ;  $n=6$ .

Durch analoge Experimente mit der HCV-RNA sollte im zweiten Teil dieser Studien analysiert werden, ob sich ähnlich wie mit der 5'cap-mRNA, ebenfalls ein Einfluss von DDX3 auf den zweiten Schritt der Translationsinitiation feststellen ließ. Dazu wurden die oben aufgeführten Translations-Initiationsreaktionen an der [<sup>32</sup>P]-markierten HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA durchgeführt. Das erhaltene Sedimentationsprofil der radioaktiv markierten HCV-RNA veranschaulichte, dass nach einer Reaktionszeit von 1 min die 48S-Initiationskomplexe an der HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA ausgebildet wurden (Abb. III-22 B, Fraktion 7). Ein Unterschied in der Assemblierung dieser Komplexes konnte im DDX3-depletierten Extrakt und dem Extrakt des Kontrollansatzes, wie bereits bei der 5'cap-mRNA beschrieben, nicht festgestellt werden. Nach einer Reaktionszeit von 10 min zeigte sich wiederum in Analogie zur 5'cap-sORF-poly(A)-RNA, dass die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen an der HCV-RNA in den DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakten im Vergleich zum Extrakt des Kontrollansatzes um ca. 40% reduziert war (Abb. III-22 C, Fraktion 12). Bestätigt wurde diese verlangsamte Assemblierung der 80S-Initiationskomplexe im DDX3-depletierten Extrakt durch die gleichzeitige Akkumulation der HCV-RNA in den Fraktionen des 48S-Initiationskomplexes (Erhöhung der detektierbaren Menge im Vergleich zur Kontrolle um den Faktor 1,5; Abb. III-22 B, Fraktionen 7 und 8).



**Abb. III-22: DDX3-Depletion hemmt die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen an der HCV-RNA.** Translations-Initiationsexperimente mit dem DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakt und dem Extrakt des Kontrollansatzes. (A) Schematische Darstellung der RNA HCV-5'UTR-sORF-3'UTR, die für die Translations-Initiationsexperimente eingesetzt wurde (vgl. Abb. III-15). (B) Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes an 10 nM [<sup>32</sup>P]-markierter HCV-RNA nach einer Reaktionszeit von 1 min. (C) Bildung des 80S-Initiationskomplexes an der HCV-RNA nach einer Reaktionszeit von 10 min. Gestrichelte Linie, Dreiecke: Daten des Kontrolleextrakts (Huh7-Zellen transfiziert mit siGFP). Durchgezogene Linie, Quadrate: Daten des DDX3-depletierten Extrakts (Huh7-Zellen transfiziert mit siDDX3-2); (\*\*\*)  $P \leq 0,001$ ; (\*\*)  $P \leq 0,01$ ;  $n=6$ .

Diese Ergebnisse unterstützen die These, dass DDX3 den zweiten Schritt der Translationsinitiation, die Assemblierung von funktionellen 80S-Initiationskomplexen fördert.

### III.5 DDX3 fördert die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen in einer *in vitro*-rekonstituierten Translations-Initiationsreaktion mit gereinigten Komponenten

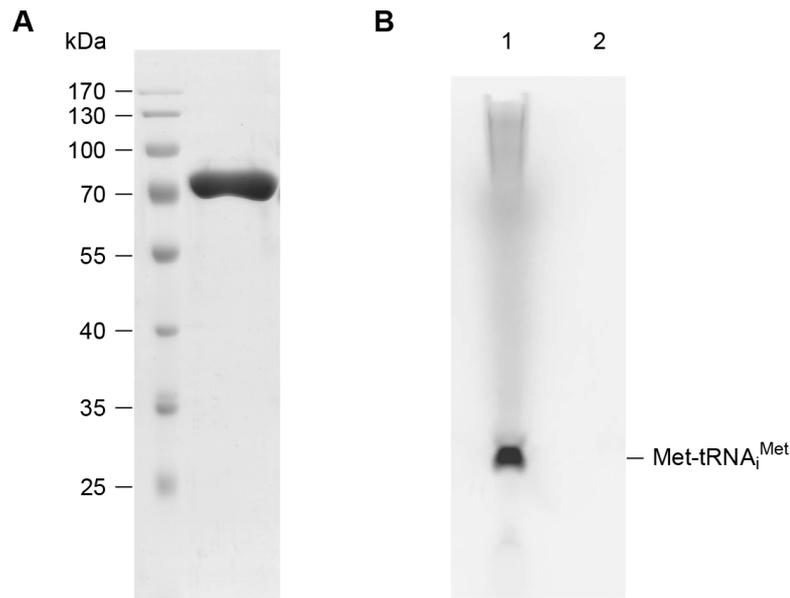
Die bisher dargestellten Daten zeigen, dass die Verminderung des zur Verfügung stehenden DDX3 sowohl *in vivo* als auch *in vitro* negative Effekte auf die Translation hatte. In den *in vitro*-Experimenten wurde zudem deutlich, dass DDX3 dabei keinen Einfluss auf die Bildung des 48S-Initiationskomplexes, aber auf die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen hatte (vgl. Abb. III-6, Abb. III-7, Abb. III-18, Abb. III-20, Abb. III-21 und Abb. III-22). Zusätzlich konnte eine RNA-unabhängige Interaktion mit dem Faktor eIF3 und der ribosomalen 40S-Untereinheit festgestellt werden (vgl. Abb. III-12). Um die Rolle von DDX3 bei der Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen in einem weiteren, unabhängigen Experiment zu prüfen, sollten 48S- bzw. 80S-Initiationskomplexe in Ab- und Anwesenheit von DDX3 *in vitro* rekonstituiert und eventuelle Unterschiede untersucht werden. Dazu wurden nativ gereinigte bzw. rekombinant hergestellte und gereinigte eukaryotische Translations-Initiationsfaktoren, die ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten, gereinigtes DDX3 und eine synthetisch unmodifizierte Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> eingesetzt.

### III.5.1 Herstellung von Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>

Die eukaryotische Translationsinitiation wird durch eine aminoacylierte tRNA, die Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> initiiert. Diese ist 76 nt lang und enthält acht Nucleotide, die zusätzliche Modifikationen an den Nucleobasen besitzen (native Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>). Nach der spezifischen Bindung an eIF2 bildet sich ein stabiler Ternär-Komplex mit GTP aus (Levin *et al.*, 1973).

Die Isolierung der nativen Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> aus zellulärer Gesamt-RNA ist ein sehr kosten-aufwendiger Prozess. Auch die Beladung der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> mit Methionin in einem Gesamt-RNA-Extrakt mit einer zellulären *E. coli*-Fraktion, die angereicherte Aminoacyl-tRNA-Synthetasen enthält, ist sehr ineffektiv und liefert nur geringe Ausbeuten für eine Assemblierungsreaktion *in vitro*. Aus den genannten Gründen wurde eine *in vitro*-transkribierte tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> (nicht modifizierte tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>) und eine gereinigte *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase für die Aminoacylierung der tRNA verwendet. Diese Synthetase katalysiert spezifisch die Beladung der Initiator-, aber nicht der Elongator-tRNA<sup>Met</sup> (Stanley, 1974; Drabkin & RajBhandary, 1985). In gleicher Weise wie die native Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, kann auch die nicht modifizierte Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> jeden Schritt der Translationsinitiation katalysieren (Pestova & Hellen, 2001).

Die *E. coli*-Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase wurde durch Transformation des Expressionsplasmids in *E. coli* hergestellt und anschließend gereinigt (Abb. III-23 A). Die Nucleotidsequenz der Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase wurde dabei aus dem *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit einer PCR amplifiziert. Als *template*-DNA für die *in vitro*-Transkription der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> wurde ein PCR-Produkt verwendet. Der Aktivitätsnachweis der erfolgreichen Beladung der tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> mit Methionin wurde durch Verwendung von [<sup>35</sup>S]-Methionin analysiert. Anschließend erfolgte die Auftrennung der [<sup>35</sup>S]-Methionin-markierten Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> in einem Harnstoff-PAA-Gel. Abb. III-23 B (Spur 1) zeigt, dass das native tRNA-Transkript durch die Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>-Synthetase erfolgreich mit Methionin beladen wurde. Eine mutierte tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, die eine Deletion der Cytidin-Nucleotide an Position 31 und 32 im *stem-loop* des Anticodons besaß, wurde wie beschrieben, nicht mit Methionin beladen (Abb. III-23 B, Spur 2; Pestova & Hellen, 2001).

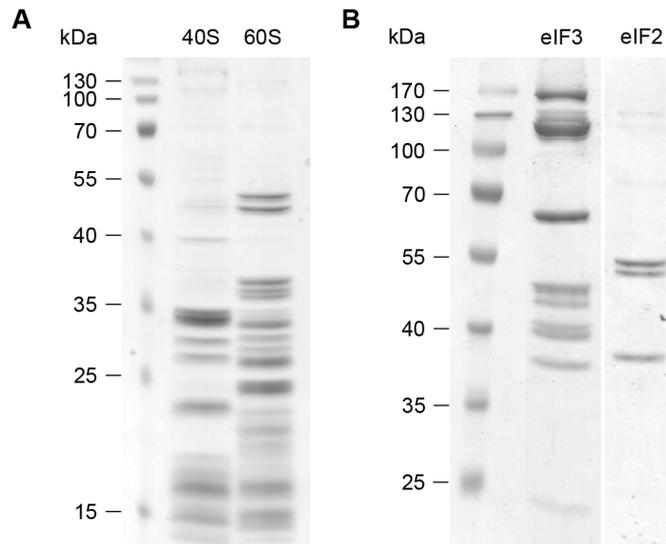


**Abb. III-23: Herstellung von  $tRNA_i^{Met}$  *in vitro*.** (A) Die  $Met-tRNA_i^{Met}$ -Synthetase wurde durch Transformation des Expressionsplasmids in *E. coli* hergestellt und anschließend gereinigt. Die Identifizierung erfolgte durch Coomassie-Färbung im PAA-Gel (10%). (B) Beladung der  $tRNA_i^{Met}$  mit Methionin durch die  $Met-tRNA_i^{Met}$ -Synthetase *in vitro*. Die nicht modifizierte  $tRNA_i^{Met}$  (Spur 1) und die mutierte  $tRNA_i^{Met}\Delta CC$  (Spur 2) wurden mit [ $^{35}S$ ]-Methionin sowie der  $Met-tRNA_i^{Met}$ -Synthetase versetzt und anschließend in einem Harnstoff-PAA-Gel (10%) aufgetrennt. Die mutierte  $tRNA_i^{Met}\Delta CC$ , die nicht mit Methionin beladen werden kann, wurde als Kontrolle der Substratspezifität verwendet.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die *in vitro*-Aminoacylierung der  $tRNA_i^{Met}$  spezifisch durch die gereinigte *E. coli*- $Met-tRNA_i^{Met}$ -Synthetase erfolgen konnte. Des Weiteren wurde impliziert, dass die *in vitro*-transkribierte  $tRNA_i^{Met}$  die richtige Tertiärstruktur besaß und somit für *in vitro*-Assemblierungsversuche von Translations-Initiationskomplexen einsetzbar war.

### III.5.2 Herstellung und Reinigung der ribosomalen Untereinheiten, der Translations-Initiationsfaktoren und von DDX3

Für die *in vitro*-Assemblierung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen wurden die ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten sowie die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G, eIF5 und eIF5B benötigt. Die 40S- und 60S-Untereinheiten wurden aus Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL) gereinigt (Abb. III-24 A). Die Initiationsfaktoren eIF2 und eIF3 sind Proteinkomplexe aus 3 bzw. 13 Untereinheiten und wurden ebenfalls nativ, in diesem Falle aus cytoplasmatischem Extrakt von HeLa-Zellen präpariert (Abb. III-24 B).

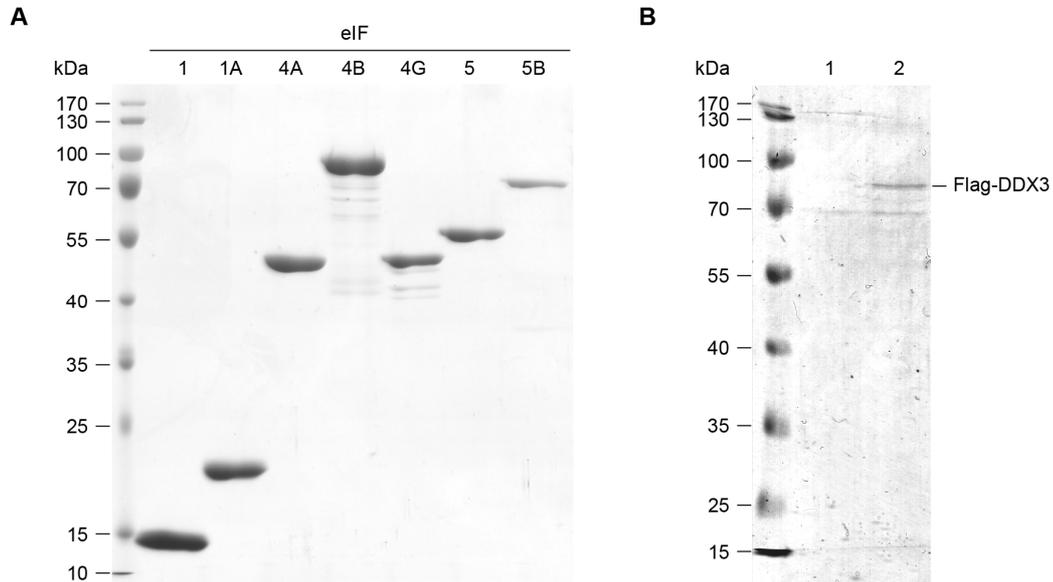


**Abb. III-24: Native Reinigung der ribosomalen 40S- und 60S-Untereinheiten sowie von eIF2 und eIF3.** (A) Reinigung der ribosomalen Untereinheiten aus Kaninchen-Retikulozytenlysat. Die Proteine der gereinigten 40S- und 60S-Untereinheiten wurden in einem PAA-Gel (12%) aufgetrennt und durch Coomassie angefärbt. (B) Native Reinigung der Proteinkomplexe eIF2 (3 Untereinheiten) und eIF3 (13 Untereinheiten) aus cytoplasmatischem HeLa-Extrakt. Die Proteine wurden in einem PAA-Gel (10%) aufgetrennt und durch Coomassie angefärbt.

Pisarev *et al.* (2007b) zeigten, dass für die *in vitro*-Assemblierung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen rekombinant hergestellte und nachfolgend gereinigte Initiationsfaktoren verwendet werden können. Daher wurden die cDNAs, die für eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF4G, eIF5 und eIF5B codierten, von Gesamt-RNA aus Huh7-Zellen generiert. Die Proteine wurden durch Transformation der Expressionsplasmide in *E. coli* hergestellt und anschließend gereinigt (Abb. III-25 A). Aufgrund der geringen Produktion des vollständigen eIF5B-Faktors (139 kDa) in *E. coli* erfolgte nur die Reinigung des C-terminalen Bereichs (Aminosäuren 587-1220) dieses Proteins (Abb. III-25 A). Dieser enthält die GTP-Bindedomäne und ist in der *in vitro*-Assemblierung eines 80S-Ribosoms funktionell (Lee *et al.*, 1999; Lee *et al.*, 2002). Für den *scaffold*-Faktor eIF4G (175 kDa) wurde das gleiche Problem beschrieben. Deshalb erfolgte für diesen lediglich die Reinigung der mittleren Domäne, die die Aminosäuren 737-1116 umfasst (Abb. III-25 A) und die eIF3- und eIF4A-Faktoren kooperativ binden kann (Lamphear *et al.*, 1995; Korneeva *et al.*, 2000). Diese eIF4G-Domäne ist ebenfalls in der *in vitro*-Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes funktionell (Pisarev *et al.*, 2007b).

In initialen Ansätzen wurde DDX3 rekombinant als SUMO-Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt. Das Protein konnte zwar löslich produziert werden, wurde aber partiell durch Proteasen abgebaut. In einem alternativen Ansatz, in dem das DDX3 ohne SUMO-Fusion in *E. coli* hergestellt wurde, konnte DDX3 aus *inclusion bodies* mit dem richtigen Molekulargewicht gereinigt werden. Beide DDX3-Varianten aggregierten jedoch mit den Initiationsfaktoren und ribosomalen Untereinheiten unter den Pufferbedingungen für die *in vitro*-Assemblierung der 48S- und 80S-Initiationskomplexe. Aus diesen Gründen wurde DDX3 schließlich als N-terminales Flag-*tag*-Fusionsprotein aus Hek293-Zellen durch eine Immun-

affinitätschromatographie mit einem anti-Flag-Antikörper gereinigt (Abb. III-25 B). Als Kontrolle in der anschließenden *in vitro*-Assemblierungsreaktion wurde eine affinitätschromatographische Reinigung aus Hek293-Zellen verwendet, in denen DDX3 ohne Flag-tag vorlag.



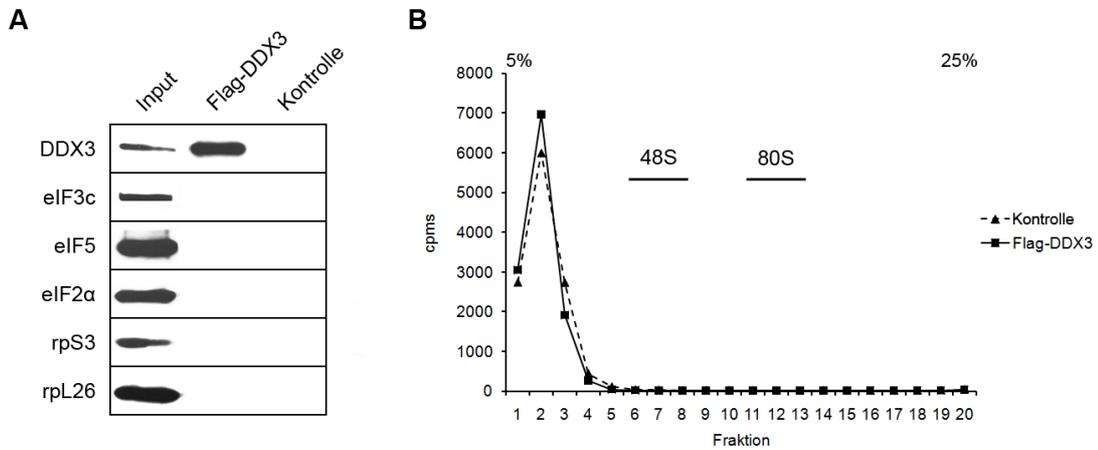
**Abb. III-25: Reinigung von rekombinanten eIFs und von Flag-DDX3.** (A) Die rekombinanten Proteine eIF1, eIF1A, eIF4A, eIF4B, eIF4G<sub>737-1116</sub>, eIF5 und eIF5B<sub>587-1220</sub> wurden in *E. coli* hergestellt und anschließend präpariert. (B) Flag-DDX3 wurde durch Transfektion des Expressionsplasmids in Hek293-Zellen produziert und mit einem anti-Flag-Antikörper durch eine Affinitätschromatographie gereinigt (Spur 2). Als Negativkontrolle für die Immunaffinitätsreinigung wurde ein Extrakt von Hek293-Zellen verwendet, die mit einem codierenden Vektor für ein DDX3 ohne Flag-tag transfiziert wurden (Spur 1). Die Proteine wurden in einem PAA-Gel (10%) aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt.

### III.5.3 Rekombinant gereinigtes DDX3 fördert die Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes in einem *in vitro*-rekonstituierten Translationssystem

In diesem finalen Experiment wurde der Einfluss des gereinigten DDX3 auf die Assemblierung der 48S- und 80S-Initiationskomplexe mit einem *in vitro*-rekonstituierbaren Translationssystem mit den aus Abschnitt III.5.1 und III.5.2 hergestellten Komponenten untersucht.

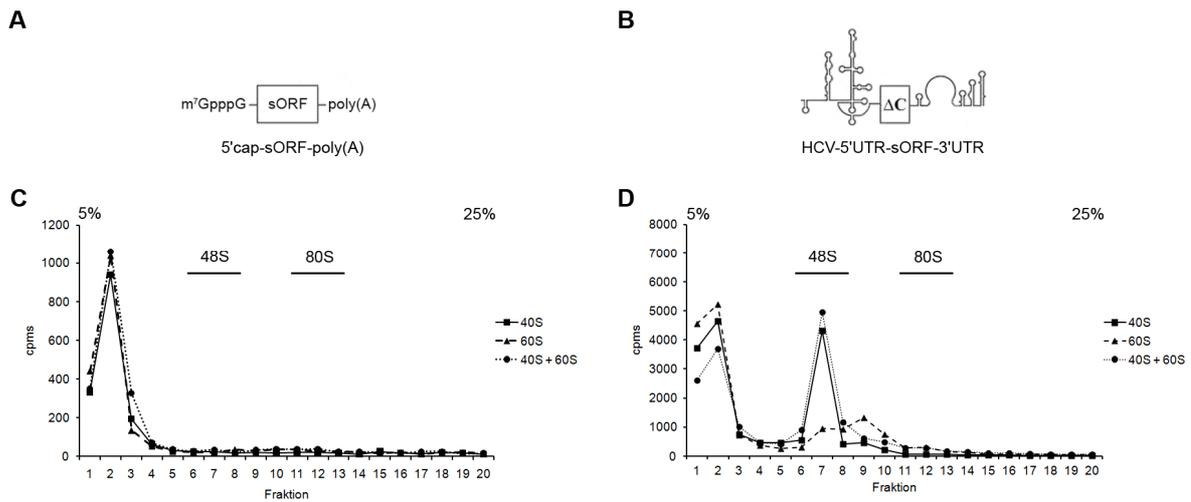
Zuvor war aber noch festzustellen, ob das Flag-DDX3 frei von Initiationsfaktoren und ribosomalen Untereinheiten war, da sonst die Ergebnisse einer *in vitro*-Assemblierung verfälscht würden. Der Western-Blot in Abb. III-26 A bestätigte, dass Flag-DDX3 und ebenso die entsprechende Kontrolle nicht mit Initiationsfaktoren kontaminiert waren, d.h. es konnten weder eIF2 $\alpha$ , eIF3c, eIF5 noch ribosomale Proteine der 40S- und 60S-Untereinheiten in diesen Präparationen nachgewiesen werden. In Übereinstimmung damit konnte auch in einem Translations-Initiationsexperiment, das ausschließlich mit Flag-DDX3 und der [<sup>32</sup>P]-markierten RNA HCV-5'UTR-sORF-3'UTR durchgeführt wurde, weder die Existenz von 48S- noch 80S-Initiationskomplexen festgestellt werden. In Analogie zur Kontrollreaktion sedimentierte die für die Translations-Initiationsexperimente eingesetzte HCV-RNA

ausschließlich in die ersten drei Fraktionen des Saccharose-Gradienten (Abb. III-26 B). Die HCV-RNA wurde deshalb verwendet, weil die HCV-IRES die 40S-Untereinheit direkt zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes bindet (vgl. Abb. III-27; Pestova *et al.*, 1998).



**Abb. III-26: Test des gereinigten Flag-DDX3 auf die Präsenz kontaminierender Translations-Initiationskomponenten bzw. auf die Bildung von 48S- und 80S-Initiationskomplexen.** (A) Western-Blot-Analyse des gereinigten Flag-DDX3 und der Kontrolle mit DDX3 ohne Flag-tag. Dazu wurden der Ausgangsextrakt (Input) und die Präparationen an gereinigtem DDX3 und der Kontrolle parallel mittels eines Western-Blots mit Antikörpern gegen die jeweils gekennzeichneten Translationskomponenten getestet. (B) Translations-Initiationsreaktion mit der [<sup>32</sup>P]-markierten RNA HCV-5'UTR-sORF-3'UTR und dem gereinigten Flag-DDX3 sowie der Kontrolle (n=1). Die Initiationsreaktion wurde wie in Abschnitt III.3.1 beschrieben durchgeführt und der Ansatz anschließend in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt.

In weiteren Vorversuchen wurde getestet, ob die gereinigten ribosomalen Untereinheiten funktionell waren bzw. ob diese die eingesetzten [<sup>32</sup>P]-markierten RNAs 5'cap-sORF-poly(A) und HCV-5'UTR-sORF-3'UTR unspezifisch binden oder möglicherweise auch ohne Initiationsfaktoren 80S-Ribosomen ausbilden konnten. Abb. III-27 C zeigt, dass eine Translations-Initiationsreaktion mit der 40S-Untereinheit und der 5'cap-sORF-poly(A)-RNA nicht zur Ausbildung eines 48S-Initiationskomplexes führten. Das gleiche Ergebnis wurde für die 60S-Untereinheit und für die Kombination aus 40S- und 60S-Untereinheiten erhalten. Im Gegensatz dazu wurde mit der HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA bei Einsatz der 40S-Untereinheit ein 48S-Initiationskomplex ausgebildet (detektierbare Radioaktivität in der Fraktion 7 des Gradienten, Abb. III-27 D). Im Vergleich zur 40S-Untereinheit konnte nur eine deutlich verminderte Assoziation der 60S-Untereinheit an die HCV-RNA festgestellt werden (Abb. III-27 D, Fraktion 9). Dieses Ergebnis stimmte wiederum mit dem bereits beschriebenen Aspekt überein, dass die 40S-Untereinheit direkt zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes an die HCV-IRES binden kann. Der Reaktionsansatz der HCV-RNA mit der 40S- und 60S-Untereinheit führte wieder zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes, aber nicht zur Assemblierung eines 80S-Ribosoms. Dies wurde deutlich, da die HCV-RNA nur in den Fraktionen detektierbar war, in die auch die 48S-Initiationskomplexe nach alleinigem Einsatz der 40S-Untereinheit nachgewiesen wurden (Abb. III-27 D).



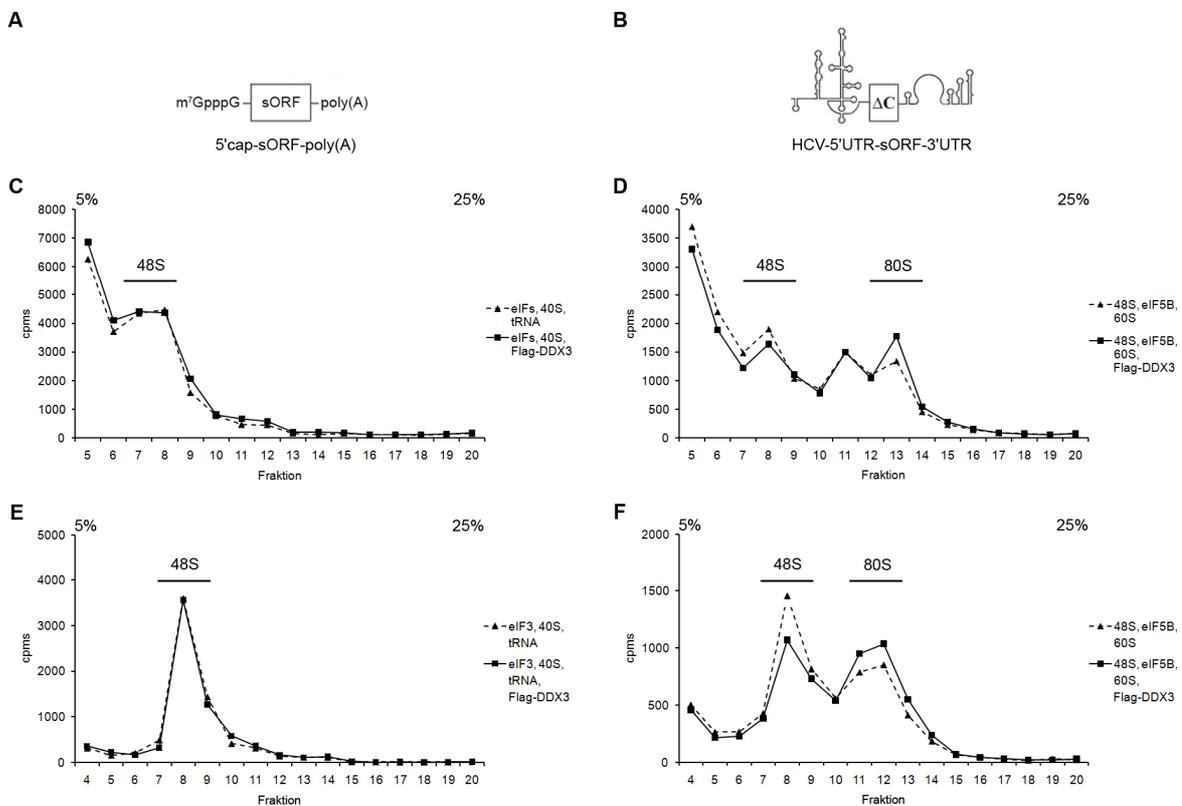
**Abb. III-27: Test auf Funktionalität der ribosomalen Untereinheiten.** (A, B) Schematische Darstellung der mRNA- und HCV-RNA-Konstrukte, die in diesem Experiment verwendet wurden (vgl. Abb. III-13 und Abb. III-15). (C, D) Translations-Initiationsreaktionen an der (C) 5'cap-sORF-poly(A)- und an der (D) HCV-5'UTR-sORF-3'UTR-RNA mit den 40S-, 60S- und der Kombination aus 40S- + 60S-Untereinheiten, die nachfolgend in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt wurden (n=1). Durchgezogene Linie, Quadrate: Daten mit der 40S-Untereinheit. Gestrichelte Linie, Dreiecke: Daten mit der 60S-Untereinheit. Gepunktete Linie, Kreise: Daten mit der Kombination aus 40S- und 60S-Untereinheiten.

Die Ergebnisse lieferten somit wichtige Indizien dafür, dass die präparierten 40S- und 60S-Untereinheiten aus dem Kaninchen-Retikulozytenlysat funktionell waren. Das heißt, eine unspezifische Bindung der 40S-Untereinheit an die 5'cap-mRNA bzw. der 60S-Untereinheit an die HCV-RNA und 5'cap-mRNA konnte dabei nicht festgestellt werden. Dagegen wurde wie zu erwarten, die Bindung der 40S-Untereinheit an die HCV-IRES nachgewiesen.

Um im nächsten Schritt zu untersuchen, ob DDX3 die Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes an einer mRNA fördert, wurde die [<sup>32</sup>P]-markierte RNA 5'cap-sORF-poly(A) unter Translations-Initiationsbedingungen mit der Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup> und den Faktoren eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G<sub>737-1116</sub>, eIF5 sowie der 40S-Untereinheit versetzt. Dieses Experiment wurde in Anwesenheit von DDX3 und der Kontrolle durchgeführt. Die *in vitro*-assemblierten 48S-Initiationskomplexe wurden anschließend in einem linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Es zeigte sich, dass DDX3 im Vergleich zum Kontrollansatz die Bildung des 48S-Initiationskomplexes an der mRNA nicht beeinflusste (Abb. III-28 C, Fraktionen 7 und 8).

Terenin *et al.* (2008) berichteten, dass an der HCV-IRES auch eine eIF2-unabhängige Initiation zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes ablaufen kann. Deshalb wurde die Translationsinitiation im folgenden Experiment an der [<sup>32</sup>P]-markierten RNA HCV-5'UTR-sORF-3'UTR ausschließlich mit der Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, eIF3 und der 40S-Untereinheit durchgeführt. Diese Anordnung wurde auch deshalb verwendet, weil zuvor eine direkte Protein-Protein-Interaktion von DDX3 mit eIF3 und der 40S-Untereinheit gezeigt wurde (vgl. Abb. III-12). Aus Abb. III-28 E (Fraktionen 8 und 9) wird deutlich, dass auch in dieser IRES-abhängigen Initiationsreaktion, die bis zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes verlief, keine Stimulierung durch DDX3 im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden konnte. Um

im nächsten Schritt die Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes zu erreichen, wurden die assemblierten 48S-Initiationskomplexe an der mRNA bzw. an der HCV-RNA mit dem Initiationsfaktor eIF5B<sub>587-1220</sub> und der 60S-Untereinheit versetzt. Es zeigte sich, dass in Anwesenheit von DDX3 die Assemblierung von 80S-Ribosomen sowohl an der 5'cap-mRNA als auch an der HCV-RNA im Vergleich zur Kontrolle deutlich stimuliert wurde. Das wurde durch erhöhte Mengen an detektierbarer RNA in den Fraktionen des 80S-Ribosoms gezeigt (Abb. III-28 D, Fraktion 13; F, Fraktionen 11 und 12). Die Erhöhung der RNA-Menge in den Fraktionen der 80S-Ribosomen korrelierte wiederum mit einer verringerten RNA-Menge in den Fraktionen der 48S-Initiationskomplexe. Eine schnellere *in vitro*-Assemblierung der 80S-Ribosomen in Anwesenheit von DDX3 konnte in ca. 60% aller Assemblierungsexperimente beobachtet werden. In den Kontrollreaktionen wurde in keinem Fall eine verbesserte Assemblierung des 80S-Ribosoms festgestellt.



**Abb. III-28: Gereinigtes DDX3 stimuliert die Assemblierung von 80S-Initiationskomplexen *in vitro*.** (A, B) Schematische Darstellung der RNAs 5'cap-sORF-poly(A) und HCV-5'UTR-sORF-3'UTR, die für diese Experimente verwendet wurden (vgl. Abb. III-13 und Abb. III-15). (C) *In vitro*-Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes an der mRNA in Anwesenheit von Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, der 40S-Untereinheit und den Initiationsfaktoren (eIFs) eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4B, eIF4G<sub>737-1116</sub> sowie eIF5. (D) *In vitro*-Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes, ausgehend von den 48S-Initiationskomplexen aus (C) in Anwesenheit der 60S-Untereinheit und eIF5B<sub>587-1220</sub>. (E) *In vitro*-Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes an der HCV-RNA in Anwesenheit von Met-tRNA<sub>i</sub><sup>Met</sup>, eIF3 und der 40S-Untereinheit (siehe Terenin *et al.*, 2008). (F) *In vitro*-Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes, ausgehend von den 48S-Initiationskomplexen an der HCV-RNA aus (E) in Anwesenheit der 60S-Untereinheit und eIF5B<sub>587-1220</sub>. Alle Translations-Initiationskomplexe wurden in einem 5-25% linearen Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die Radioaktivität wurde gegen die Gradientenfraktionen aufgetragen. Die Diagramme zeigen ein repräsentatives Experiment. Zur besseren Auflösung sind die Messungen aus den Fraktionen mit geringer Saccharose-Konzentration nicht gezeigt.

Diese Daten bestätigten die zuvor erhaltenen Ergebnisse aus den Translations-Initiationsversuchen mit DDX3-depletierten Huh7-S10-Extrakten (vgl. Abb. III-21 und Abb. III-22). Es wurde deutlich, dass DDX3 den zweiten Schritt der Translationsinitiation, die Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes fördert. Die Bildung des 48S-Initiationskomplexes wird dagegen durch DDX3 nicht beeinflusst.

### **III.6 Untersuchungen zur Rolle einzelner Proteindomänen von DDX3 während der Translation**

Die nachfolgenden Experimente sollten klären, ob für den fördernden Effekt von DDX3 in der Translation eine enzymatische Aktivität bzw. bestimmte Domänen dieses Proteins essentiell waren.

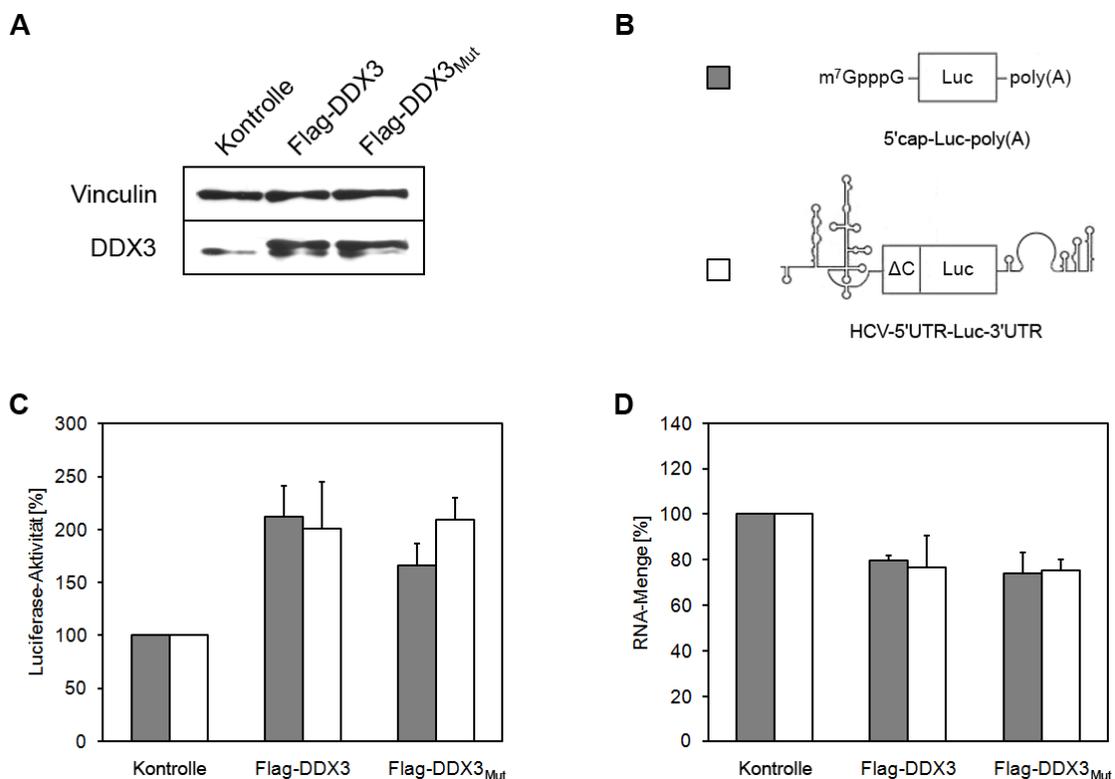
#### **III.6.1 DDX3 fördert die Translation unabhängig von dessen ATPase- und Helikaseaktivität**

Aufgrund von widersprüchlichen Aussagen in der Literatur zur Rolle der ATPase- und Helikaseaktivität von DDX3 in der Translation sollte untersucht werden, ob diese Enzymaktivitäten eine Rolle bei der hier festgestellten Translations-unterstützenden Wirkung des Proteins besitzen.

Dazu wurde zunächst eine DDX3-Variante hergestellt, die fünf Aminosäuresubstitutionen aufwies. So wurde die Bindung und Hydrolyse von ATP durch Substitutionen im Q-Motiv unterbunden (Y200A; Q207A; Cordin *et al.*, 2004). Zudem wurden anhand von Literaturdaten Substitutionen im Walker A-Motiv (Motiv 1: K230A) sowie im Walker B-Motiv (Motiv 2: D347A, E348A) eingeführt, die die ATPase- und Helikaseaktivität inhibieren sollten (Cordin *et al.*, 2006).

Im folgenden Experiment wurden natives DDX3 und mutiertes Protein über entsprechende Expressionsplasmide in Hek293-Zellen hergestellt. Zur Unterscheidung von endogenem DDX3 wurden die cDNAs mit einer codierenden Sequenz für einen N-terminalen Flag-tag fusioniert. Der Western-Blot in Abb. III-29 A belegt, dass die DDX3-Menge (sowohl beim WT als auch bei der Variante) im Vergleich zum endogenen DDX3 um ca. den Faktor 4 erhöht werden konnte. Um den Effekt dieser Überexpression zu untersuchen, wurden die Zellen nachfolgend mit den Luciferase-Reporterkonstrukten 5'cap-Luc-poly(A) und HCV-5'UTR-Luc-3'UTR transient transfiziert (Abb. III-29 B). Als Kontrolle wurden Hek293-Zellen verwendet, die mit einem Vektor ohne *insert* transfiziert wurden. Wie zuvor der *knock down* von DDX3 (vgl. III.1.1), hatte auch die Überexpression von *DDX3* und des mutierten Gens keine Auswirkungen auf die Zellviabilität. Die Messung der Luciferaseaktivität ergab, dass durch die Überexpression von *Flag-DDX3* die cap- und IRES-abhängige Translation um das ca. 2-fache im Vergleich zur Kontrolle gesteigert wurde (Abb. III-29 C). Interessanterweise wurde ein analoges Ergebnis mit der Variante Flag-DDX3<sub>Mut</sub> (Y200A, Q207A, K230A,

D347A, E348A) erhalten. Die Translation der 5'cap-Luc-poly(A)-RNA war um das 1,7-fache und der HCV-5'UTR-Luc-3'UTR-RNA um das 2,1-fache erhöht (Abb. III-29 C). Um auszuschließen, dass diese Unterschiede in der Translation nicht durch Unterschiede in den RNA-Mengen der Luciferase-Reporterkonstrukte hervorgerufen wurden, erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA zu dem Zeitpunkt, an dem auch die Luciferaseaktivität gemessen wurde. Dabei wurde festgestellt, dass die Mengen aller RNAs in den *DDX3*-überexprimierenden Hek293-Zellen auf ca. 75% im Vergleich zur Kontrolle reduziert waren (Abb. III-29 D). Da jedoch die Mengen der Luciferase-Reporter-RNAs in den Flag-*DDX3*-produzierenden Zellen nicht die der Kontrolle überstiegen, konnte diese Veränderung der RNA-Menge als Ursache für die gesteigerte Translation der 5'cap-mRNA bzw. der HCV-RNA ausgeschlossen werden.

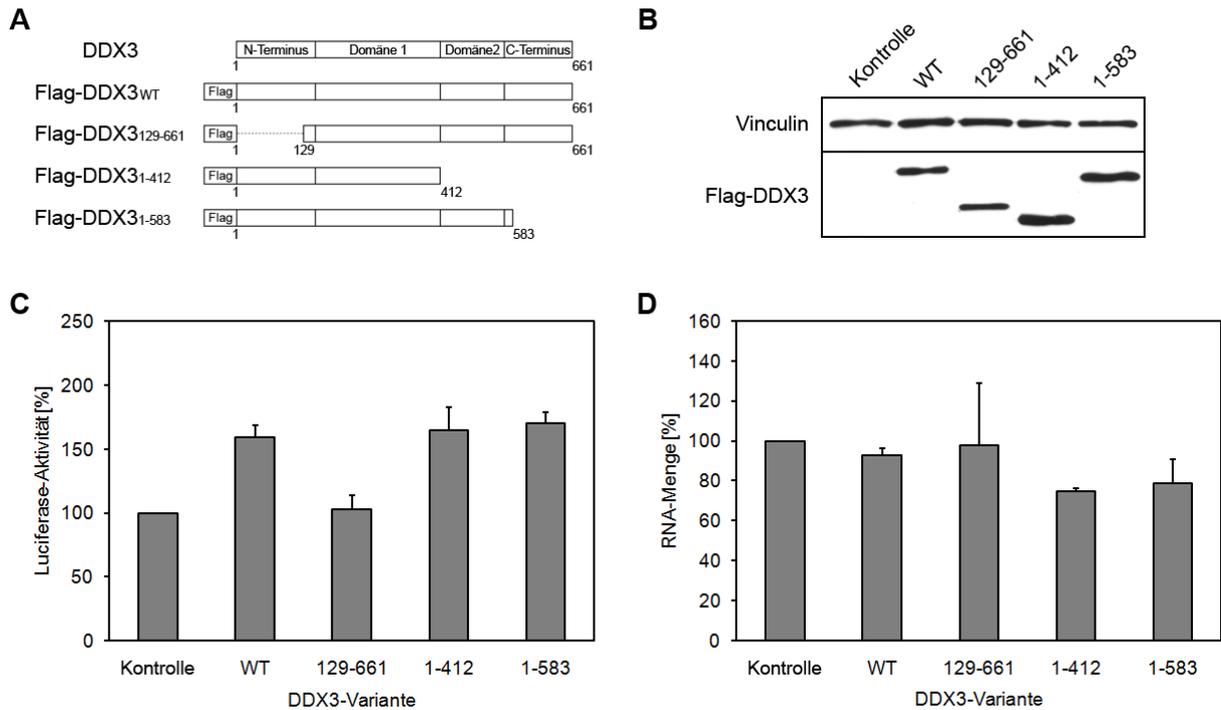


**Abb. III-29: DDX3 stimuliert die Translation, auch mit nicht funktionellen ATPase- und Helikase-Domänen.** (A) Western-Blot-Analyse des cytoplasmatischen Extrakts von Hek293-Zellen. Diese wurden zuvor mit Expressionsplasmiden transient transfiziert, die für Flag-*DDX3* und Flag-*DDX3*<sub>Mut</sub> codierten. Das endogene und durch Überexpression produzierte *DDX3* wurde mit einem anti-*DDX3*-Antiserum nachgewiesen. Hek293-Zellen, die mit einem Vektor ohne *insert* transfiziert wurden, dienten als Kontrolle. Flag-*DDX3*<sub>Mut</sub> wurde durch Generierung von Punktmutationen der *Flag-DDX3*-cDNA hergestellt. Diese Mutationen führten zur Inaktivierung der enzymatischen ATPase- und Helikaseaktivität (Q-Motiv: Y200A, Q207A; Motiv I: K230A; Motiv II: D347A, E348A; siehe Cordin *et al.*, 2006). (B) Schematische Darstellung der Luciferase-Reporter-RNAs, die in diesem Experiment verwendet wurden (vgl. Abb. III-6 und Abb. III-7). (C) Luciferaseaktivität im Zellextrakt von Hek293-Zellen, die mit den für Flag-*DDX3* und Flag-*DDX3*<sub>Mut</sub> codierenden Expressionsplasmiden 24 h zuvor transfiziert wurden. Die Luciferaseaktivität wurde 1 h nach Elektroporation der entsprechenden Reporter-RNAs bestimmt. (D) Vergleich der RNA-Mengen der Luciferase-Reporterkonstrukte in Hek293-Kontrollzellen und in den Hek293-Zellen, die Flag-*DDX3* bzw. Flag-*DDX3*<sub>Mut</sub> produzierten. Die Bestimmung der relativen Transkriptmengen erfolgte mittels qRT-PCR. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigten zum einen, dass entgegengesetzt zu den Daten der DDX3-Depletion eine Überexpression von *DDX3* die Translation stimuliert. Zum anderen wurde deutlich, dass die Funktion von DDX3 in der Translation unabhängig von der ATPase- und Helikaseaktivität des Proteins ist.

### III.6.2 DDX3 fördert die Translation ausschließlich mit vollständigem N-Terminus

In der Literatur zu DEAD-Box-RNA-Helikasen wurde postuliert, dass die N- und C-terminalen Bereiche dieser Proteine die Kontakte zwischen anderen Proteinen in Proteinkomplexen vermitteln (Cordin *et al.*, 2006; Fuller-Pace, 2006). Um dies an DDX3 und dessen Funktion in der Translation zu untersuchen, wurden DDX3-Varianten mit einem deletierten N- und C-Terminus hergestellt. Zusätzlich wurde eine Variante generiert, in der der C-Terminus und die Domäne 2 von DDX3 deletiert wurden (Abb. III-30 A). Alle Varianten wurden wiederum mit einem Flag-tag hergestellt. Der Western-Blot in Abb. III-30 B zeigt, dass jede der DDX3-Varianten in Hek293-Zellen generiert wurde. Entsprechend wurde anschließend in Zellen, die diese DDX3-Varianten enthielten, die Translation der nachfolgend transient transfizierten Reporter-RNA 5'cap-Luc-poly(A) gemessen. Die HCV-RNA wurde in diesen Translationsexperimenten nicht eingesetzt, weil alle bisherigen Daten mit der 5'cap-mRNA und der HCV-RNA identisch waren (vgl. Abb. III-6, Abb. III-7, Abb. III-20, Abb. III-21, Abb. III-22 und Abb. III-28). Wie in den oben aufgezeigten Ergebnissen, so konnte auch im Vergleich zur Kontrolle (Vektor ohne *insert*) eine um ca. 1,6-fach erhöhte Luciferaseaktivität mit Extrakten von Zellen gemessen werden, die den WT von Flag-DDX3 enthielten (Abb. III-30 C). Interessanterweise konnte diese Stimulierung nicht mit der N-terminalen DDX3-Deletionsvariante (Flag-DDX3<sub>129-661</sub>) gemessen werden. Dagegen zeigten die Experimente mit den Varianten Flag-DDX3<sub>1-412</sub> und Flag-DDX3<sub>1-582</sub> analog zum WT von Flag-DDX3, eine erhöhte Luciferaseaktivität im Vergleich zur Kontrolle (Abb. III-30 C). qRT-PCR-Messungen in Abb. III-30 D sicherten ab, dass die Unterschiede in der Translation der Luciferase-mRNAs nicht durch Unterschiede in den RNA-Mengen hervorgerufen wurden.

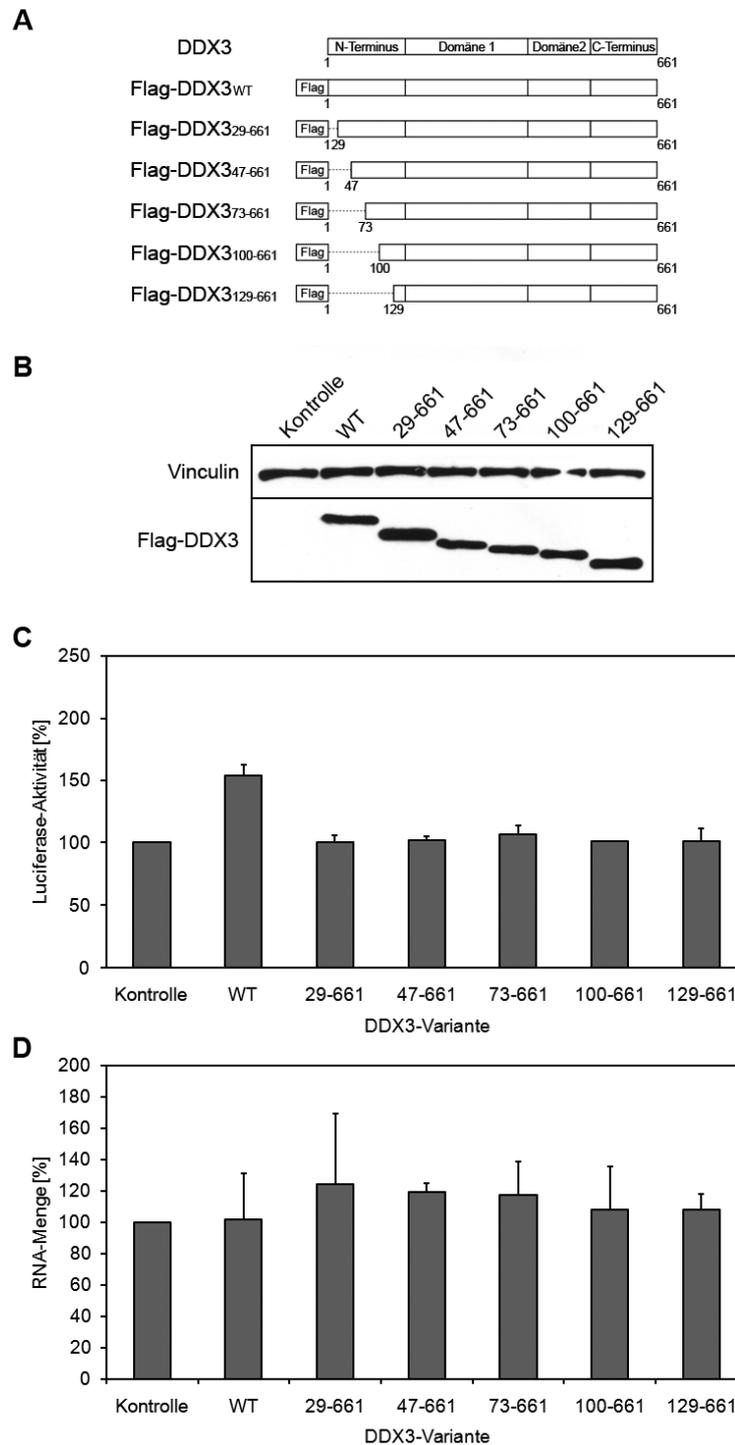


**Abb. III-30: Der N-Terminus von DDX3 ist essentiell für die Stimulierung der Translation.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten Flag-DDX3-Varianten. Die Nummerierungen repräsentieren die Positionen der Aminosäuren im Protein. (B) Western-Blot-Analyse der Flag-DDX3-Varianten. Expressionsplasmide, die für die gekennzeichneten Flag-DDX3-Varianten codierten, wurden transient in Hek293-Zellen transfiziert und im Hek293-Zelllysate mit einem anti-Flag-Antikörper nachgewiesen. Als Kontrolle wurden Hek293-Zellen verwendet, die mit einem Vektor ohne *insert* transfiziert wurden. (C) Luciferaseaktivität des 5'cap-Luc-poly(A)-Konstrukts im Zelllysate von Hek293-Zellen, die mit den codierenden Vektoren für die gekennzeichneten Flag-DDX3-Varianten transient transfiziert wurden. 24 h nach Transfektion erfolgte die Elektroporation der Luciferase-mRNAs in die Hek293-Zellen, die Flag-DDX3 produzierten. Die Luciferaseaktivität wurde 1 h nach Transfektion der 5'cap-Luc-poly(A)-RNA im Hek293-Zelllysate bestimmt und im Kontrolleextrakt auf 100% festgelegt. (D) Bestimmung der Menge an 5'cap-Luc-poly(A)-RNA mittels qRT-PCR in den Kontrollzellen (100%) und den Hek293-Zellen, die Flag-DDX3 produzierten. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Diese Daten deuteten auf eine wichtige Rolle des N-Terminus von DDX3 bei der unterstützenden Funktion des Proteins in der Translation hin. Des Weiteren bestätigten diese Ergebnisse, dass für diese Funktion keine enzymatische Aktivität von DDX3 notwendig ist, da in der Variante Flag-DDX3<sub>1-412</sub> die Domäne 2 deletiert war. Diese enthält drei von neun Motiven der DEAD-Box-RNA-Helikasen (Motiv IV, V, VI), die essentiell für die enzymatische ATPase- und Helikaseaktivität sind (Cordin *et al.*, 2006). Dennoch wurde mit dieser Variante eine ebenso deutliche Steigerung der Translation erhalten, wie mit dem WT.

Der N-Terminus von DDX3 enthält speziessübergreifend zahlreiche konservierte Sequenzmotive und ein potentielles eIF4E-Bindemotiv im Bereich der Aminosäuren 38-43 (Shih *et al.*, 2008). Um einen Einfluss dieser Sequenzbereiche auf die Translation zu untersuchen, wurde ausgehend von der Variante Flag-DDX3<sub>129-661</sub> mit verkürztem N-Terminus, die keine Stimulierung der Translation zeigte (vgl. Abb. III-30), der N-Terminus schrittweise verlängert (Abb. III-31 A). In analogen Experimenten wie oben beschrieben, wurde zunächst die erfolgreiche Expression dieser Varianten in Hek293-Zellen nachgewiesen und nachfolgend wiederum deren Einfluss auf die Translation der 5'cap-Reporter-mRNA untersucht (Abb.

III-31 B). Die Luciferaseaktivitäten in den entsprechenden Extrakten zeigten, dass die Varianten Flag-DDX3<sub>47-661</sub>, Flag-DDX3<sub>73-661</sub>, Flag-DDX3<sub>100-661</sub> und Flag-DDX3<sub>129-661</sub> die Translation des Luciferasekonstrukts im Vergleich zur Kontrolle (Vektor ohne *insert*) nicht stimulierten (Abb. III-31 C). Die Variante Flag-DDX3<sub>29-661</sub> mit dem potentiellen eIF4E-Bindemotiv zeigte ebenfalls keine Stimulierung der Translation im Vergleich zum WT (Abb. III-31 C).



**Abb. III-31: Einfluss des N-Terminus von DDX3 auf die Stimulierung der Translation.** (A) Schematische Darstellung der Flag-DDX3-Varianten mit unterschiedlicher Länge des N-Terminus. Die Nummerierungen repräsentieren die Positionen der Aminosäuren im Protein. (B) Western-Blot-Analyse der Flag-DDX3-Varianten mit einem anti-Flag-Antikörper im Extrakt von Hek293-Zellen, die durch transiente Transfektion der entsprechenden Expressionsplasmide hergestellt wurden. (C) Luciferaseaktivität des Reporter-RNA-Konstrukts 5'cap-Luc-poly(A) im Zellextrakt der Hek293-Zellen, die Flag-DDX3 produzierten. Die Elektroporation der Luciferase-mRNAs und Messung der Aktivitäten der Reporterkonstrukte erfolgte wie in Abb. III-30 beschrieben. (D) Bestimmung der Menge an 5'cap-Luc-poly(A)-RNA mittels qRT-PCR in den Kontrollzellen (100%) und den Hek293-Zellen, die Flag-DDX3 produzierten. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen von vier unabhängigen Experimenten.

Diese Ergebnisse zeigten, dass die Stimulierung der Translation durch DDX3 ausschließlich bei Vorhandensein eines vollständigen N-Terminus des Proteins möglich ist.

## IV Diskussion

Für die DEAD-Box-RNA-Helikase DDX3 gibt es verschiedene Erkenntnisse, nach denen das Protein an allen Schritten der zellulären Genexpression beteiligt ist. Es reguliert die Transkription von bestimmten Promotoren (Botlagunta *et al.*, 2008; Schröder *et al.*, 2008; Soulat *et al.*, 2008), wird zwischen dem Kern und Cytoplasma transportiert und fördert den Kernexport von spezifischen RNAs (Sekiguchi *et al.*, 2004; Yedavalli *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2008). Experimentelle Daten, die mit dem Hefe-homologen Enzym von DDX3, dem Protein Ded1 erhalten wurden, indizierten eine potentielle Funktion in der Translationsinitiation (Chuang *et al.*, 1997). Zudem ließen diese Daten vermuten, dass Ded1 Sekundärstrukturen in der 5'UTR von mRNAs modifiziert bzw. an der Umstrukturierung von mRNP-Translationskomplexen beteiligt ist (Berthelot *et al.*, 2004; Marsden *et al.*, 2006; Hilliker *et al.*, 2011). Vor dem Hintergrund, dass DDX3 mit zahlreichen Translations-Initiationsfaktoren (eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4E) und dem poly(A)-Bindeprotein PABPC interagiert, wurde bislang postuliert, dass es eine ähnliche Funktion wie Ded1 in der Translation besitzt (Lai *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Wie bereits in der Einleitung ausgeführt, gab es bisher nur Hinweise aus Studien einer siRNA-vermittelten Depletion von DDX3 auf eine wichtige Funktion dieses Proteins in der Translation und im HCV-Lebenszyklus.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation konnte erstmals ermittelt werden, wie DDX3 im Translationsprozess und im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus involviert ist. Die Ergebnisse werden unter folgenden Gesichtspunkten diskutiert:

- die Bedeutung von DDX3 im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus,
- die Bedeutung von DDX3 in der cap- und IRES-abhängigen Translation,
- die Funktion einzelner Domänen von DDX3 im Translationsprozess.

### ***Die Bedeutung von DDX3 im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus.***

RNA-Viren wie das HCV, kooptieren und modulieren die zelluläre Maschinerie, um sich effizient vermehren zu können, aber auch um Abwehrmechanismen zu inhibieren, die ihre Ausbreitung verhindern (Vidalain & Tangy, 2010; Nagy & Pogany, 2011). Um insbesondere eine effiziente Translation und Replikation des HCV-Genoms zu gewährleisten, kommt es zu vielfältigen funktionellen Wechselwirkungen der viralen Proteine und der HCV-RNA mit zahlreichen Proteinen der Zelle, den s.g. Wirtsfaktoren. Genom-übergreifende Ansätze basierend auf RNAi, führten zur Identifizierung von hunderten potentiellen Genen, die die Vermehrung des HCV beeinflussen (Randall *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009; Tai *et al.*, 2009). Ein weiteres leistungsfähiges System, welches zur Identifizierung von potentiellen Wirtsfaktoren im viralen Lebenszyklus führte, waren Kombinationen aus RNA-Affinitätsreinigungen und nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen, in denen Proteine isoliert und identifiziert

wurden, die mit dem HCV-Genom interagieren (Harris *et al.*, 2006; Tingting *et al.*, 2006; Isken *et al.*, 2007; Weinlich *et al.*, 2009). Der Ausgangspunkt dieser Arbeit basierte auf der Verwendung dieser letztgenannten Technik. Dabei wurde DDX3 als ein Protein identifiziert, das an die 5'- und 3'UTR des HCV-Genoms bindet (Weinlich *et al.*, 2009). Neben DDX3 konnten auch weitere Proteine identifiziert werden, denen eine Funktion in der Translation bzw. Replikation von HCV zugeschrieben wird. Dazu zählen z.B. IGF2BP1 (Weinlich *et al.*, 2009) und die NFAR-Proteine NF90, NF45 und RHA (Isken *et al.*, 2007). Außerdem konnten mit DDX1 und DDX5 zwei weitere DEAD-Box-RNA-Helikasen identifiziert werden, die mit dem viralen HCV-Genom interagieren (Harris *et al.*, 2006; Tingting *et al.*, 2006). Die Funktion von DDX1 im HCV-Lebenszyklus wurde bisher nicht untersucht, dieses Protein ist aber in der Lage, die 5'UTR des (-)-Strangs sowie die 3'UTR des (+)-Strangs des HCV-Genoms zu binden (Tingting *et al.*, 2006). Die RNA-Helikase DDX5 bindet die HCV-3'UTR und interagiert zusätzlich mit der NS5B-Polymerase von HCV (Goh *et al.*, 2004; Harris *et al.*, 2006). Durch diese Assoziation wird DDX5 vermutlich in die RNA-Replikationskomplexe rekrutiert. Es gibt Hinweise darauf, dass DDX5 dort die (-)-Strang-RNA-Synthese des HCV fördert. Darüber hinaus wurde postuliert, dass DDX5 RNA-Sekundärstrukturen entwinden könnte oder weitere Proteine an das virale Genom rekrutiert, die diesen ersten Replikationsschritt unterstützen (Goh *et al.*, 2004).

Aufgrund der Assoziation von DDX3 an die HCV-UTRs wurde die vorliegende Studie mit der Untersuchung des Einflusses dieses Proteins auf die Translation und Replikation von mono- und bi-cistronischen HCV-Replikons durchgeführt. Das dabei verwendete persistent transfizierte bi-cistronische Replikon wurde deshalb gewählt, weil dieses System die Möglichkeit bietet, den Translationsprozess separat vom viralen RNA-Replikationsprozess zu analysieren. Das Besondere an diesem System ist, dass ein ca. 1000-facher molarer Überschuss an viralen Proteinen im Vergleich zur (+)-Strang-RNA in der Zelle vorliegt (Quinkert *et al.*, 2005). Wird die Translation über die EMCV-IRES inhibiert, so befinden sich immer noch genügend virale Proteine in der Zelle, die für einen längeren Zeitraum ein konstantes Niveau an viraler RNA aufrecht erhalten können. Dieses Phänomen wurde im Zuge der Experimente zur DDX3-Depletion deutlich. So führte die Verringerung von DDX3 im Cytoplasma zu einer deutlichen Reduktion der HCV- und EMCV-IRES-abhängigen Translation. Dagegen blieb die Replikation des bi-cistronischen Replikons unbeeinflusst (vgl. Abb. III-2). Diese Ergebnisse stehen somit im Gegensatz zu den Daten von Ariumi *et al.* (2007). In ihren Arbeiten führte ein *knock down* von DDX3 zur Reduktion der Menge an HCV-RNA eines persistent transfizierten bi-cistronischen Replikons auf ca. 50%. Dazu ist aber festzustellen, dass Ariumi und Mitarbeiter für ihre Untersuchungen ein Replikon des HCV-Genotyps 1b verwendeten, das eine deutlich schlechtere Replikationseffizienz in der Zelle hat als das in dieser Dissertation verwendete HCV-2a-Replikon (vgl. Abb. III-1; Bartenschlager & Sparacio, 2007). Es ist deshalb anzunehmen, dass Ariumi *et al.* (2007) mit Zellen arbeiteten, in denen eine deutlich geringere Konzentration an viralen Proteinen vorlag. Eine

Verringerung der Proteinmenge infolge einer verringerten Translation musste demzufolge auch einen stärkeren Effekt auf die Replikation haben. Die Translation des bi-cistronischen HCV-Replikons bei einer DDX3-Depletion wurde von den Autoren nicht untersucht, so dass in deren Arbeit zu einer potentiellen Funktion von DDX3 in der IRES-abhängigen Translation keine Aussage getroffen werden kann.

Mit der transienten Transfektion eines mono-cistronischen HCV-Replikons wurde dagegen eine Virusinfektion nachgestellt. Es zeigte sich, analog zu den Infektionsexperimenten von Ariumi und Mitarbeitern, dass die DDX3-Depletion nicht nur die Proteinsynthese über die HCV-IRES reduzierte, sondern auch die Replikation des HCV-Replikons deutlich verminderte (vgl. Abb. III-4). Die Reduktion in der Replikation wurde so interpretiert, dass nach einer transienten Transfektion der viralen RNA die Nichtstrukturproteine *de novo* synthetisiert werden müssen und dadurch nur eine geringe Menge dieser für die Replikation der viralen RNA in der Zelle zur Verfügung steht. Deshalb wirkte sich in den transienten Transfektions- bzw. Infektionsexperimenten die Depletion von DDX3 nicht nur auf die Translation, sondern auch auf die Replikation der HCV-RNA aus.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse sprachen somit eindeutig für eine Funktion von DDX3 im Translationsprozess des Hepatitis C Virus. Außerdem wurde deutlich, dass die Funktion dieses Proteins in der Translation nicht HCV-spezifisch ist, da auch die IRES-abhängige Translation der EMCV-5'UTR bei einem *knock down* von DDX3 reduziert wurde (vgl. Abb. III-6). Da diese Ergebnisse mit einem HCV-Replikonsystem erzielt wurden, muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass DDX3 durchaus noch weitere Funktionen im Lebenszyklus des Virus haben könnte. Dazu zählen die Prozesse der Virusaufnahme in die Zelle, die Freisetzung des RNA-Genoms ins Cytoplasma, die Virusassemblierung und der Austritt des Virus aus der Zelle.

### ***Die Bedeutung von DDX3 in der cap- und IRES-abhängigen Translation.***

Derzeitige Modelle der Translationsinitiation für eukaryotische mRNAs gehen davon aus, dass die Nucleinsäure während dieses Prozesses eine zirkuläre Konformation annimmt (*closed loop*-Modell). Dabei werden durch RNA-Protein- bzw. Protein-Protein-Interaktionen die 5'- und 3'Enden der mRNA in räumliche Nähe gebracht, was zur Stimulierung der Translation führt (Jacobson & Peltz, 1996). Der molekulare Mechanismus, wie die Zirkularisierung der mRNA die Translation fördert, konnte bisher jedoch nicht definiert werden. Seit längerem wird aber vermutet, dass die mRNA-Stabilität durch die Ausbildung eines mRNP-Komplexes erhöht wird, wobei die 5'- und 3'Enden vor dem Abbau von Nucleasen geschützt sind. Somit ist die verstärkte Translation vermutlich ein sekundärer Effekt dieses Phänomens. Weiterhin wird diese Interaktion nur bei vollständigen mRNAs ausgebildet und könnte somit der Qualitätskontrolle dienen (Edgil & Harris, 2006; Komarova *et al.*, 2006). Eine alternative These wurde von A. Sachs aufgestellt. Er postulierte, dass die

Zirkularisierung das effiziente Recycling der Ribosomen fördert. Nach Erreichen des Stopcodons an der mRNA am 3'Ende würden die Ribosomen am 5'Ende sofort wieder für eine Reinitiation an der gleichen mRNA bereitstehen (Sachs & Varani, 2000). Da aber zahlreiche 3'UTRs eine Länge von mehreren 1000 nt besitzen und Histon-mRNAs gar keinen poly(A)-Bereich enthalten (Marzluff, 1992; Jackson *et al.*, 2010), hat sich inzwischen eine einfachere Vorstellung durchgesetzt, wie das 3'Ende einer mRNA die Translation stimuliert. R. Jackson und Mitarbeiter postulierten, dass die Verankerung von eIF4F zum poly(A)-Bereich über das PABPC-Protein den eIF4F-Komplex in der Nähe der mRNA hält, wenn der Kontakt zum 5'Ende der mRNA unterbrochen wird. In diesem Fall würde laut der Autoren eIF4F in Abwesenheit von PABPC verloren gehen und müsste *de novo* aus dem eIF4F-Pool rekrutiert werden (Jackson *et al.*, 2010). Wie in der Einleitung aufgezeigt, können zahlreiche Viren diese *end to end*-Kommunikation der UTRs ebenfalls ausbilden. EMC-Viren gehen diese Interaktion mit dem PABPC-Protein durch Bindung des poly(A)-Bereichs und des eIF4A-eIF4G-Komplexes ein, der eine *stem-loop*-Struktur in der Nähe des AUG-Startcodons der 5'UTR bindet (Jackson *et al.*, 2010). Das HCV bildet diese Zirkularisierung durch Bindung der NFAR-Proteine an die UTRs aus (Isken *et al.*, 2007). Außerdem besitzt das HCV-Genom einen *stem-loop* (5BSL3.2), der ca. 60 nt vom Stopcodon der 3'UTR in der codierenden Sequenz von NS5B lokalisiert ist, der eine RNA-RNA-Interaktion mit der 3'X-Region der 3'UTR bzw. der IRES-Domäne III<sub>d</sub> der 5'UTR eingehen kann (Friebe *et al.*, 2005; You & Rice, 2008; Romero-Lopez & Berzal-Herranz, 2009). Die virale Proteinsynthese und das Umschalten von der Translation zur Replikation könnten durch diese Interaktionen moduliert werden.

Da aus den Replikonexperimenten nicht ersichtlich war, ob eventuell auch codierende Sequenzen der HCV-NS-Proteine bei der Stimulierung der Translation durch DDX3 eine Rolle spielten, wurden zur weiteren Spezifizierung des Translationseffekts mono-cistronische Reporterkonstrukte mit der HCV- und EMCV-IRES generiert (vgl. Abb. III-6). Im Falle des HCV-Konstrukts wurde durch die Deletion der NS3-NS5B-codierenden Region auch die Interaktionsstelle des *stem-loop* 5BSL3.2 mit der 5'- und 3'UTR entfernt. Sowohl beim HCV-IRES-Konstrukt als auch beim EMCV-IRES-Konstrukt wurde ein authentisches 3'Ende verwendet. Bei der EMCV-IRES war dieses ein poly(A)-Bereich. Das war für die Experimente essentiell, da die HCV-3'UTR auch die EMCV-IRES- und cap-abhängige Translation stimulieren kann (Bung *et al.*, 2010), was Translationsergebnisse möglicherweise verfälschen würde. Zudem konnten Harris *et al.* (2006) DDX3 als HCV-3'UTR-assoziiertes Protein identifizieren. Inwieweit diese Interaktion direkt oder indirekt durch andere Faktoren vermittelt wird, ist unbekannt. Durch das Entfernen des poly(A)-Bereichs und der HCV-3'UTR wurde deshalb zusätzlich der Einfluss von DDX3 auf die Zirkularisierung und potentielle Stimulierung der Translation über das 3'Ende untersucht. Wie in Abb. III-6 gezeigt, wiesen alle Luciferasekonstrukte in den DDX3-depletierten Zellen eine verringerte Translation auf und bestätigten damit die zuvor gemessenen Effekte in den HCV-

Replikonexperimenten (vgl. Abb. III-2 und Abb. III-4). Da trotz deletiertem 3'Ende die Translation reduziert war, kann DDX3 als Faktor ausgeschlossen werden, der die Translation über die Interaktion mit dem 3'Ende fördert. DDX3 ist somit nicht an der RNA-Zirkularisierung über die 5'- und 3'Enden der RNAs involviert. Darüber hinaus konnte auch eine Rolle von DDX3 bei der Interaktion zwischen dem *stem-loop* 5BSL3.2 und der 5'- sowie der 3'UTR ausgeschlossen werden.

Die Verwendung von mRNA-Reporterkonstrukten mit unterschiedlicher Strukturierung der 5'UTR zeigten eine Reduktion der Translation in DDX3-depletierten Zellen (vgl. Abb. III-7). Somit wurde deutlich, dass DDX3 eine generell fördernde Funktion in der cap- und IRES-abhängigen Translation besitzt. Diese Daten stimmen mit den Beobachtungen von Lee *et al.* (2008) überein. Am Beispiel eines Reporterkonstrukts der  $\beta$ -Globin-mRNA indizierten die Autoren, dass DDX3 die cap-abhängige Translation fördert. Aus der Publikation von Lee *et al.* (2008) ging aber nicht hervor, ob DDX3 direkt die Translation oder einen anderen Schritt in der Genexpression beeinflusst. Die Transkription und die mRNA-Prozessierung konnten die Autoren ausschließen. Aufgrund der verwendeten technischen Konstellation der Experimente von Lee und Mitarbeitern konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die gemessenen Effekte auf eine Förderung des Transports des Reporterkonstrukts aus dem Zellkern durch DDX3 zurückzuführen waren. Die Untersuchungen von Lai *et al.* (2008) stimmen ebenfalls mit der in dieser Dissertation entdeckten fördernden Funktion von DDX3 in der Translation überein. Diese Autoren konnten zeigen, dass eine DDX3-Depletion die Aktivität eines mRNA-Luciferasekonstrukts reduziert. Nachteilig war allerdings, dass Expressionsplasmide, die für die Luciferase-RNAs codierten, in DDX3-depletierte Huh7-Zellen transfiziert wurden. Bei dieser Konstellation ist wiederum anzumerken, dass die direkte Bestimmung des Translationseffekts von DDX3 nicht erfolgen konnte, da DDX3 auch in der Transkription und dem RNA-Export aus dem Kern in das Cytoplasma involviert ist (Schröder, 2010). Eine große Diskrepanz der in dieser Dissertation erhaltenen Daten gab es zur Veröffentlichung von Shih *et al.* (2008). Diese Autoren beobachteten, dass die cap-abhängige Translation durch eine Depletion von DDX3 stimuliert wurde, während die HCV-IRES-vermittelte Translation unbeeinflusst blieb. In ihren Arbeiten verwendeten die Autoren ein bi-cistronisches Luciferasekonstrukt. Dieses bestand aus einer 5'cap-UTR, dem ORF der *renilla*-Luciferase, der HCV-IRES, dem ORF der *firefly*-Luciferase sowie einer poly(A)-Sequenz am 3'Ende. Da auch der poly(A)-Bereich die HCV-IRES-vermittelte Translation stimulieren kann (Bradrick *et al.*, 2006; Bung *et al.*, 2010), „konkurrieren“ hier somit zwei 5'UTR-Translationsstartpunkte mit einem poly(A)-Bereich. Hervorzuheben ist, dass die Luciferaseaktivitäten ausschließlich auf ein co-transfiziertes Reporterkonstrukt normiert wurden, das infolge der Depletion von DDX3 ebenfalls in der Translation negativ beeinflusst sein müsste.

Um auszuschließen, dass eine Depletion von DDX3 die mRNA-Menge beeinflusst, wurden in dieser Dissertation die RNA-Mengen der Luciferase-Reporterkonstrukte bestimmt, die aber

nicht beeinflusst waren (vgl. Abb. III-6 und Abb. III-7). Daher konnte ausgeschlossen werden, dass der Translationseffekt von DDX3 durch unterschiedliche RNA-Mengen in den DDX3-depletierten Zellen hervorgerufen wurde. Die Arbeitsgruppe um M. Niepmann berichtete zudem, dass in einem bi-cistronischen Reporterkonstrukt picornavirale IRES-Elemente auch die Translation *upstream* gelegener Gene durch Übertragung von Translationsfaktoren stimulieren können (Jünemann *et al.*, 2007). Dadurch sind die Ergebnisse eines bi-cistronischen Translationssystems, wie es Shih *et al.* (2008) verwendeten, schwer zu interpretieren. Aus diesem Grund wurden in dieser Dissertation mono-cistronische Luciferase-Reporter-RNAs eingesetzt. Dies garantierte, dass dieser Effekt nicht eintreten konnte (vgl. Abb. III-6 und Abb. III-7). Zusammengefasst ist festzustellen, dass die Mehrzahl der veröffentlichten Daten, die die Rolle von DDX3 in der Translation beschreiben, mit den in dieser Dissertation erzielten Ergebnissen übereinstimmen. Hervorzuheben ist, dass erstmals der direkte Einfluss von DDX3 in der Translation *in vivo* untersucht wurde, da Reporter-RNAs in DDX3-depletierte Zellen transfiziert wurden. Damit konnten die anderen Schritte der Genexpression ausgeschlossen werden, die von DDX3 beeinflusst sein könnten, was bei den anderen Publikationen nicht der Fall war.

Im Folgenden war es eine wichtige Aufgabe, den Schritt in der cap- und IRES-abhängigen Translation zu identifizieren, welcher durch DDX3 gefördert wird. Daten des Polysomen-experiments zeigten, dass DDX3 nicht mit aktiv translatierenden Ribosomen (Polysomen) co-sedimentierte (vgl. Abb. III-8). Somit kann eine Funktion in der Elongation und der Termination ausgeschlossen werden. DDX3 co-sedimentierte aber mit den ribosomalen Untereinheiten und einzelnen 80S-Ribosomen, was auf eine Funktion in der Translationsinitiation oder des Ribosomen-Recyclingprozesses hindeutete. Da DDX3 aber ebenfalls nicht mit „freien“, RNA-ungebundenen 80S-Ribosomen assoziiert war (vgl. Abb. III-13, Abb. III-15 und Abb. III-16), die ca. 70% der Menge aller Ribosomen in einer Zelle ausmachen (Cooper *et al.*, 1976; Otto & Puglisi, 2004; Bradrick *et al.*, 2006), kann eine Funktion auch im Recyclingprozess ausgeschlossen werden. Vielmehr deuteten die erhaltenen Daten an, dass DDX3 trotz unterschiedlicher Initiationsmechanismen der cap-, HCV- und EMCV-IRES-vermittelten Translation eine Funktion im Initiationsprozess besitzt, was bisher ausschließlich postuliert wurde (Lai *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008).

Die erhaltenen *in vivo*- und *in vitro*-Daten zeigten eine explizite Funktion von DDX3 in der Translationsinitiation. Es konnte zwar eine Beteiligung im *scanning*-Prozess und der Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes ausgeschlossen werden (vgl. Abb. III-21, Abb. III-22 und Abb. III-28), dagegen wurde aber deutlich gezeigt, dass DDX3 die Assemblierung des 80S-Initiationskomplexes, ausgehend vom 48S-Initiationskomplex fördert.

Dass DDX3 keine Funktion im *scanning*-Prozess besitzt, wurde als Erstes indirekt mit der Verwendung von HCV-IRES- und EMCV-IRES-haltigen Reporterkonstrukten gezeigt, bei denen die Luciferaseaktivitäten in DDX3-depletierten Zellen reduziert waren (vgl. Abb. III-6). Diese IRES-Elemente benötigen wie bereits aufgezeigt, kein *scanning* zur Ausbildung

des 48S-Initiationskomplexes (Kaminski *et al.*, 1990; Honda *et al.*, 1996). Zudem konnte die Funktion von DDX3 in dieser Initiationsphase ausgeschlossen werden, da mRNA-Reporterkonstrukte mit einer unstrukturierten bzw. komplex strukturierten 5'UTR verwendet wurden. Die Initiation der Translation an diesen RNAs beginnt mit einem *scanning*-Prozess, um den 48S-Initiationskomplex auszubilden. Da aber die Luciferaseaktivität des Konstrukts mit der unstrukturierten 5'UTR ebenfalls reduziert war, an dem keine Sekundärstrukturen entwunden werden müssen (vgl. Abb. III-7), konnte indirekt wiederum ausgeschlossen werden, dass DDX3 diesen Schritt fördert. Dieses Ergebnis steht aber im Widerspruch zu den Ergebnissen von Lai *et al.* (2008). Die Autoren verwendeten für ihre Untersuchungen mRNA-Luciferase-Reporterkonstrukte mit drei unterschiedlich strukturierten 5'UTRs. So wurde ein *stem-loop* von 38 nt, die 5'UTR des *human transforming growth factor  $\beta$*  mit zwei kurzen *stem-loops* und eine komplex strukturierte 5'UTR der Ornithin-Decarboxylase aus der Ratte verwendet. Mit jedem Luciferasekonstrukt wurde in DDX3-depletierten Zellen eine Reduktion erzielt. Da aber die deutlichste Reduktion mit der am stärksten strukturierten 5'UTR erhalten wurde, schlussfolgerten die Autoren, dass DDX3 eine Funktion im *scanning*-Prozess besitzen könnte, ohne dies weiter zu spezifizieren (Lai *et al.*, 2008).

Mit der Untersuchung der Translationsinitiation in DDX3-depletierten Extrakten an der mRNA und an der HCV-RNA konnte dann direkt gezeigt werden, dass die Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes durch DDX3 nicht gefördert wird (vgl. Abb. III-20, Abb. III-21 und Abb. III-22). Somit besitzt es eine andere Funktion in der Translation als die bisher charakterisierten Helikasen DHX29 (DEAH-Box-RNA-Helikase 29), eIF4A, RHA und das DDX3-homologe Protein Ded1. Die Gruppe um T. Pestova zeigte, dass DHX29 die effiziente NTPase-abhängige Assemblierung des 48S-Initiationskomplexes an mRNAs katalysiert, die eine komplex strukturierte 5'UTR besitzen. In Abwesenheit von DHX29 generierten die 48S-Initiationskomplexe einen *toe print*, der +8-9 nt vom AUG-Startcodon entfernt war. Durch Zugabe der RNA-Helikase wurde der *toe print* zur typischen Position von +15-17 nt verschoben (Pisareva *et al.*, 2008). Die Autoren vermuteten daher, dass DHX29 den *scanning*-Prozess indirekt unterstützt. DHX29 assistiert zwar das *scanning*, wahrscheinlich aber nicht durch Entwindung von Sekundärstrukturen der RNA, sondern durch eine konformationelle Änderung der 48S-Initiationskomplexe infolge seiner Bindung an die 40S-Untereinheit. Dadurch scheint die Positionierung der mRNAs im RNA-Zugangskanal der 40S-Untereinheit in positiver Weise beeinflusst zu sein (Pisareva *et al.*, 2008). Die in dieser Dissertation erhaltenen Daten der *toe print*-Experimente mit dem DDX3-depletierten Extrakt zeigten dagegen, dass weder Unterschiede in der Intensität der +15-17 nt *toe prints* von cap- und HCV-IRES-RNAs, noch Änderungen in den Positionen der *toe prints* auftraten. Daraus kann eindeutig geschlussfolgert werden, dass DDX3 keine Funktion im *scanning*-Prozess und in der Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes besitzt (vgl. Abb. III-20, Abb. III-21 und Abb. III-22). Für eIF4A konnten Pisareva *et al.* (2008) in gleicher Weise zeigen, dass dieses Protein an strukturierten 5'UTRs die Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes fördert. Die RNA-

Helikase RHA stimuliert ebenfalls die Translation von mRNAs mit komplex strukturierten 5'UTRs (Hartman *et al.*, 2006). Es ist aber erneut anzumerken, dass ein direkter Effekt von RHA auf die Translation nicht untersucht werden konnte, da die siRNA-Experimente mit Expressionsplasmiden, die für die mRNAs codierten, durchgeführt wurden. Auch für Ded1 wurde eine Funktion im *scanning*-Prozess postuliert (Chuang *et al.*, 1997; de la Cruz *et al.*, 1997; Iost *et al.*, 1999). Die Autoren schlussfolgerten diesen Aspekt daraus, dass mehrere kältesensitive *ded1*-Mutanten bei einem Temperaturübergang auf 15°C ein Dissoziieren der Ribosomen von den Polysomen zeigten, was laut Chuang *et al.* (1997) auf eine Funktion in der Initiation hindeutete. Eine definierte Funktion von Ded1 in der Translationsinitiation konnte jedoch inzwischen ausgeschlossen werden. So zeigten A. Hilliker und Mitarbeiter, dass Ded1 zum einen als Repressor der Translation wirkt, indem es die Akkumulation eines mRNA-eIF4F-Komplexes in *stress granules* (SGs) fördert (Hilliker *et al.*, 2011). Zum anderen führt die ATPase-Aktivität von Ded1 aber anschließend wieder zur Auflösung dieser SGs, welche zuvor für die Translation blockiert waren. Eine direkte Beteiligung in der Translation, wie z.B. dem *scanning*-Prozess, wird damit aber ausgeschlossen.

Die Translations-Initiationsexperimente mit einem DDX3-depletierten Extrakt zeigten dagegen deutlich, dass dieses Protein die Assemblierung des 80S-Ribosoms ausgehend vom 48S-Initiationskomplex fördert (vgl. Abb. III-21 und Abb. III-22). Diese Funktion von DDX3 im Prozess des 60S-*subunit joining* wurde durch *in vitro*-Rekonstitutionsexperimente von 80S-Ribosomen bekräftigt (vgl. Abb. III-28). Erstmals wurde durch die Arbeitsgruppe um A. Jacobson durch Untersuchungen am poly(A)-Bereich von mRNAs gezeigt, dass die Initiation der Translation auf der Stufe des 60S-*subunit joining* reguliert werden kann. Der poly(A)-Bereich stimuliert die Assemblierung des 80S-Ribosoms und hat keinen Einfluss auf die Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes (Munroe & Jacobson, 1990). Mit dem poly(A)-Bindeprotein PABPC konnte auch ein Faktor identifiziert werden, der diesen Prozess fördert (Searfoss *et al.*, 2001; Kahvejian *et al.*, 2005). Mit dem Protein Vasa aus *Drosophila melanogaster* wurde auch eine DEAD-Box-RNA-Helikase mit dem Prozess des 60S-*subunit joining* in Verbindung gebracht (Carrera *et al.*, 2000; Johnstone & Lasko, 2004). Die Autoren wiesen eine Interaktion von Vasa mit dem Faktor eIF5B nach und postulierten, dass die Helikase die Assemblierung des 80S-Ribosoms fördert. Liu *et al.* (2009) gingen zudem davon aus, dass Vasa U-reiche Sequenzelemente in der 3'UTR von bestimmten mRNAs (z.B. mei-P26) bindet. Dadurch rekrutiert Vasa möglicherweise den Faktor eIF5B zur 40S-Untereinheit, so dass dieser nachfolgend das *joining* der 60S-Untereinheit mit der 40S-Untereinheit katalysieren kann. Die Autoren konnten aber nicht zeigen, ob dieser Schritt tatsächlich durch Vasa beeinflusst wird und warum eIF5B zu diesen mRNAs nicht effizient rekrutiert werden kann. Das 60S-*subunit joining* wird unter bestimmten Bedingungen auch inhibiert. So interferiert der Proteinkomplex hnRNP K/E1 durch Bindung an eine spezifische Sequenz der 15-Lipoxygenase-mRNA mit der Assemblierung des 80S-Ribosoms auf dieser RNA (Ostareck *et al.*, 2001).

An diesem Punkt stellte sich die Frage, mit welchen Faktoren der Translationsinitiation interagiert DDX3, um die Assemblierung des 80S-Ribosoms zu fördern? Als potentielle Interaktionspartner von DDX3 im Translationsprozess wurden bisher eIF2, eIF3, eIF4A, eIF4E und PABPC identifiziert (Schröder, 2010). Diese fünf Faktoren wurden aber alle mit einer Immunpräzipitation von DDX3 aus einem Zellextrakt co-präzipitiert (Lai *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Mit dieser Methode konnten somit auch eIF1 und eIF5 als potentielle Interaktionspartner von DDX3 identifiziert werden (vgl. Abb. III-10). Da aber aus solchen IP-Experimenten nicht deutlich wurde, ob DDX3 direkt mit diesen Faktoren interagiert, wurden für die Interaktionsstudien gereinigte Faktoren des 43S-PIC verwendet. In diesem Zusammenhang konnte hier erstmals eine direkte Interaktion von DDX3 mit eIF3 und der ribosomalen 40S-Untereinheit nachgewiesen werden (vgl. Abb. III-12). Obwohl die Initiation der Translation ein dynamischer Prozess ist, in dem wechselnde transiente Protein-Interaktionen stattfinden, war es schwer vorstellbar, dass DDX3 mit allen in diesen IPs detektierten Faktoren während der Translation in direkter Wechselwirkung steht. Es gibt dennoch eine Erklärung dazu. Wie in der Einleitung aufgezeigt, assoziieren alle Initiationsfaktoren, die an der Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes beteiligt sind, über direkte Protein-Protein-Interaktionen miteinander. So bindet z.B. eIF3 im 43S-PIC an die 40S-Untereinheit sowie an eIF1 und eIF5 (Tolan *et al.*, 1983; Bandyopadhyay & Maitra, 1999; Fletcher *et al.*, 1999). Auch eine Interaktion von eIF3 mit dem Faktor eIF4B konnte gezeigt werden (Methot *et al.*, 1996). eIF5 interagiert außerdem noch mit eIF1A und der  $\beta$ -Untereinheit von eIF2 (Unbehaun *et al.*, 2004; Maag *et al.*, 2006). Wird einer dieser Faktoren aus einem Zellextrakt präzipitiert, so müsste eine Co-Präzipitation aller anderen Initiationsfaktoren nachzuweisen sein, was die meisten der bisher veröffentlichten Daten auch wiedergeben (Lai *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Einzig kontrovers sind dabei die Daten von Shih *et al.* (2008). Die Autoren wiesen eine direkte Interaktion mit dem cap-Bindeprotein eIF4E nach, die durch den N-Terminus von DDX3 vermittelt wird. Dieser enthält ein Motiv für die eIF4E-Bindung. Diese Assoziation führt vermutlich zur Inhibierung der cap-abhängigen Translation, da eIF4G an die gleiche Bindestelle von eIF4E bindet wie DDX3 und somit die weitere Initiation der Translation an mRNAs blockiert ist. Warum aber der C-Terminus von DDX3 nahezu mit der gleichen Affinität von eIF4E gebunden wird, wurde nicht diskutiert (Shih *et al.*, 2008). Da diese Interaktionsstudien mit rekombinantem DDX3 aus *E. coli* durchgeführt wurden, muss in Betracht gezogen werden, dass die Ergebnisse unspezifische Interaktionen von DDX3 mit eIF4E darstellen könnten, da diese auch in dieser Dissertation beobachtet wurden (vgl. Abschnitt III.5.2). Außerdem konnten A. Hilliker und Mitarbeiter eine Interaktion von Ded1 und eIF4E nicht nachweisen, obwohl Ded1 das gleiche Sequenzmotiv zur eIF4E-Bindung besitzt wie DDX3.

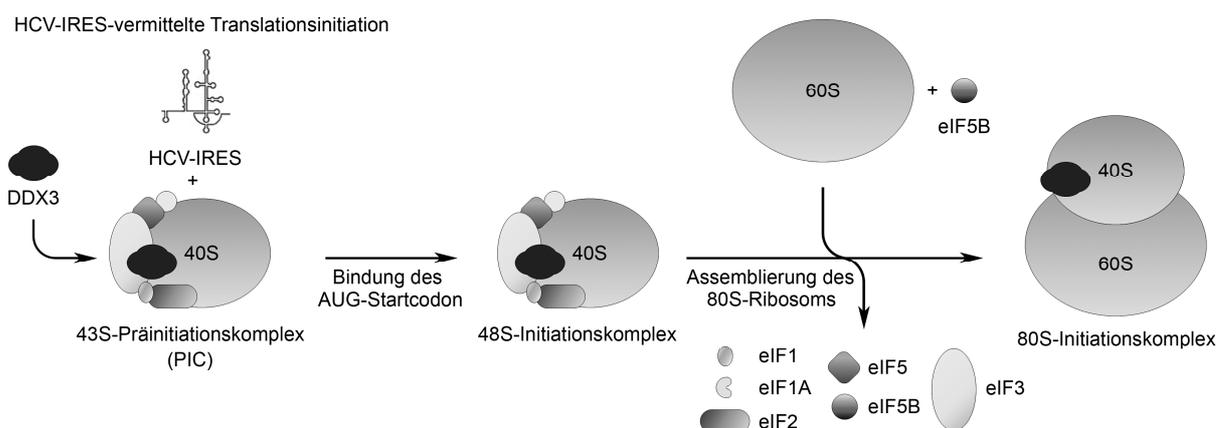
Die Interaktion von DDX3 mit der 40S-Untereinheit, die zudem im 48S- und 80S-Initiationskomplex festgestellt wurde, ist insofern interessant, da der 80S-Initiationskomplex keine Initiationsfaktoren enthält (Jackson *et al.*, 2010). Da DDX3 RNA-unabhängig mit den

neu assemblierten 80S-Ribosomen co-sedimentierte, nicht aber mit der 60S-Untereinheit, ist anzunehmen, dass dieses Protein wahrscheinlich über die Bindung an die 40S-Untereinheit mit dem 80S-Ribosom interagiert (vgl. Abb. III-8, Abb. III-9, Abb. III-12 und Abb. III-17). Diese Annahme wird durch die experimentellen Befunde gestützt, die zeigten, dass DDX3 während der gesamten Initiationsphase RNA-unabhängig mit der 40S-Untereinheit interagiert (vgl. Abb. III-17).

Der Anteil an DDX3, für den eine Assoziation an *de novo* assemblierte 48S- und 80S-Initiationskomplexe festgestellt wurde, war relativ gering im Vergleich zur Gesamtmenge des Proteins im Cytoplasma (vgl. Abb. III-13 und Abb. III-15). Das verwundert aufgrund des multifunktionalen Charakters von DDX3 nicht, denn wie bereits dargestellt, ist das Protein nicht nur in die Translation involviert, sondern hat auch Funktionen in der transkriptionalen und post-transkriptionalen Regulation der Genexpression, der Regulation des Zellzyklus und in der angeborenen Immunantwort (Schröder, 2010). Im Zuge der semi-quantitativen Bestimmung der DDX3-Menge in den Fraktionen der 80S-Ribosomen wurde jedoch deutlich, dass DDX3 dennoch zu einem erheblichen Anteil, zu ca. 45% in den neu gebildeten 80S-Ribosomen assoziiert war (vgl. Abb. III-14). Wird berücksichtigt, dass durch Scherkräfte während der Zentrifugation ein erheblicher Anteil an DDX3 von den ribosomalen Komplexen dissoziiert, so kann postuliert werden, dass ein Großteil der assemblierten 48S- und 80S-Initiationskomplexe DDX3 gebunden hat und diese Assoziation offenbar die Assemblierung des 80S-Ribosoms unterstützt. Im gleichen Kontext dazu ist anzumerken, dass bei der Untersuchung der Helikase DHX29 die 40S-Untereinheiten dieses Protein vollständig gebunden haben, die DHX29-enthaltenden 40S-Komplexe aber nur 10% der Menge an 40S-Gesamtkomplexen repräsentierten (Pisareva *et al.*, 2008).

Terenin *et al.* (2008) entdeckten einen einfacheren Initiationsmechanismus der Translation an der HCV-IRES. Bis auf die ribosomalen Untereinheiten werden zur Assemblierung eines 80S-Ribosoms nur die Initiationsfaktoren eIF3 und eIF5B gebraucht. Wie in dieser Dissertation festgestellt werden konnte, wird durch DDX3 die Assemblierung des 80S-Ribosoms in diesem Initiationsmechanismus ausgehend vom 48S-Initiationskomplex beschleunigt (vgl. Abb. III-28). Daher ist davon auszugehen, dass ein oder mehrere dieser vier Translationsfaktoren eine Interaktion mit DDX3 eingehen, damit das Protein in diesem Prozess aktiv sein kann. Eine Interaktion mit der 60S-Untereinheit und eIF5B konnte ausgeschlossen werden (vgl. Abb. III-8 und Abb. III-10). In Anlehnung an die bereits oben diskutierten Interaktionsstudien kann davon ausgegangen werden, dass DDX3 wiederum über seine Interaktion mit eIF3 und der 40S-Untereinheit in die Translationsinitiation involviert ist. In Auswertung dieser Daten ist vorstellbar, dass DDX3 als Teil des 43S-PIC in den 48S-Initiationskomplexe auf zu translatierenden RNAs assembliert wird und dass DDX3-assoziierte 48S-Initiationskomplexe die 80S-Initiationskomplexe schneller ausbilden können. Damit die 60S-Untereinheit mit dem 48S-Initiationskomplex interagieren kann, müssen die Initiationsfaktoren von der 40S-Untereinheit dissoziieren, so dass eIF5B das 60S-*subunit*

*joining* katalysieren kann (Pestova *et al.*, 2000). Da DDX3 weder mit der 60S-Untereinheit noch mit eIF5B interagiert (vgl. Abb. III-8 und Abb. III-10), scheint ein Einfluss während der Translation auf diese Faktoren eher ausgeschlossen. Es ist daher wahrscheinlicher, dass DDX3 wiederum über die Assoziation mit eIF3 und der 40S-Untereinheit die Konformation des 48S-Initiationskomplexes beeinflusst. So zeigte in diesem Zusammenhang die Arbeitsgruppe um C. Hellen, dass der Initiationsfaktor eIF3 in der HCV-IRES-abhängigen Translation keine Funktion in der Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes besitzt, jedoch essentiell für die Assemblierung der 80S-Ribosomen ist (Pestova *et al.*, 1998b). T. Pestova und Mitarbeiter postulierten zum einen, dass eIF3 die Konformation des 48S-Initiationskomplexes modifiziert, so dass dieser nach Dissoziation des Faktors eIF3 von der 40S-Untereinheit, die 60S-Untereinheit binden kann. Zum anderen wird vermutet, dass eIF3 in unmittelbarer Weise in das 60S-*subunit joining* involviert ist. In der cap-abhängigen Initiationsreaktion ist die Funktion von eIF3 u.a. das *scanning* zu unterstützen (Jackson *et al.*, 2010). Scheinbar induziert auch hier die Bindung von eIF3 an die 40S-Untereinheit, in dieser eine Änderung der Konformation, die essentiell für den *scanning*-Prozess ist. Die Interaktion von DDX3 mit eIF3 und der 40S-Untereinheit im 48S-Initiationskomplex könnte also zur Modifikation der Konformation dieses Komplexes führen. Ein Szenario ist, dass eIF3 in Anwesenheit von DDX3 schneller aus dem 48S-Initiationskomplex freigesetzt und somit eine beschleunigte Assemblierung des 80S-Ribosoms ermöglicht wird (Abb. IV-1). Da alle Interaktionen von DDX3 mit der Translationsmaschinerie unabhängig von RNA ausgebildet werden (vgl. III.2.4 und III.3.4), kann die Option, dass dieses Protein nur über die Helikaseaktivität RNA-Strukturen in den Initiationskomplexen modifiziert, ausgeschlossen werden. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass eine DDX3-Variante ohne ATPase- und Helikaseaktivität dennoch die Translation förderte (vgl. Abb. III-29, siehe nachfolgenden Punkt der Diskussion).



**Abb. IV-1: Modell der Funktion von DDX3 in der Translationsinitiation.** Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen vermuten, dass DDX3 über direkte Protein-Protein-Interaktionen an den 43S-PIC assoziiert ist. Dieser Komplex bindet mRNAs (beispielhaft gezeigt für die HCV-RNA) und generiert den 48S-Initiationskomplex. DDX3 induziert dann Konformationsänderungen im 48S-Initiationskomplex, die die Freisetzung der Initiationsfaktoren und das 60S-*subunit joining* begünstigen. DDX3 bleibt am 80S-Initiationskomplex gebunden, dissoziiert aber vor dem Elongationsprozess. Die gebundene HCV-RNA ist zur besseren Veranschaulichung der am Prozess beteiligten Proteine, im 48S- und 80S-Initiationskomplex nicht dargestellt.

***Die Funktion von DDX3 in der Translation ist unabhängig von der enzymatischen ATPase- und Helikaseaktivität, aber abhängig vom N-Terminus.***

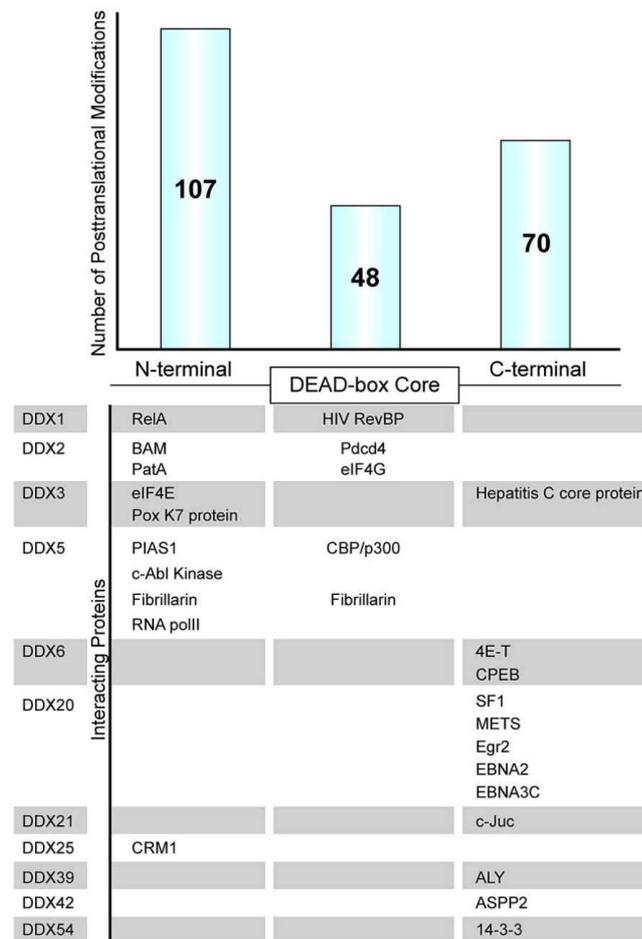
Die ATPase- und RNA-Helikasefunktion wurden bisher für mehr als 60 DEAD-Box-Proteine *in vitro* bestimmt (Jankowsky & Fairman, 2007; Rajkowitsch *et al.*, 2007). Biochemische Arbeiten zeigten weiterhin, dass DEAD-Box-RNA-Helikasen Aktivitäten besitzen, die über die Entwindung von RNA-Duplexen hinaus gehen. Darunter fallen Funktionen, in denen diese Proteine als Anker für Proteinkomplexe fungieren (Bono *et al.*, 2006), die Umstrukturierung von RNP-Komplexen bewerkstelligen (Xu *et al.*, 2004) und Aktivitäten, die durch Co-Faktor-Proteine hervorgerufen werden (Marintchev *et al.*, 2009; Montpetit *et al.*, 2011). Deshalb kann nicht zwingend davon ausgegangen werden, dass ein DEAD-Box-Protein auch tatsächlich als RNA-Helikase funktionell ist (Pyle, 2011).

Die in dieser Dissertation angefertigten Untersuchungen zur ATPase- und Helikaseaktivität von DDX3 in der Translation spiegeln diesen Aspekt wider. Durch Mutationen im Motiv Q, Motiv I und Motiv II von DDX3 wurde die enzymatische Aktivität unterbunden. Dennoch förderte eine Proteinvariante mit diesen Mutationen die Translation an der 5'cap-mRNA und an der HCV-RNA (vgl. Abb. III-29). Dieses Ergebnis steht aber im Gegensatz zu den Arbeiten von Lai *et al.* (2008). Die Autoren zeigten, dass die Helikaseaktivität von DDX3 für die Translation von mRNAs mit einer strukturierten 5'UTR notwendig war und postulierten daraus eine Beteiligung im ATP-abhängigen *scanning*-Prozess. Wie bereits aufgezeigt, konnte bei HCV-IRES- und EMCV-IRES-haltigen Reporterkonstrukten, die keinen *scanning*-Prozess zur Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes benötigen sowie bei mRNA-Luciferasekonstrukten mit entweder komplett unstrukturierten bzw. komplex strukturierten 5'UTRs, eine gleichbleibende Beteiligung von DDX3 am Translationsprozess nachgewiesen werden (vgl. Abb. III-6 und Abb. III-7). Die Gruppe um K.T. Jeang wies eine Helikaseaktivität von DDX3 *in vitro* nach und postulierte, dass diese essentiell für die HIV-Replikation ist (Yedavalli *et al.*, 2004). Die Autoren vermuteten, dass DDX3 dabei den Transport von partiell bzw. ungespleißten HIV-mRNAs über den CRM1-Transportweg aus dem Zellkern fördert. Ob die Helikaseaktivität für den Export von mRNAs notwendig ist, wurde jedoch nicht untersucht. Sollte die Helikaseaktivität von DDX3 tatsächlich für den Export von mRNAs gebraucht werden, so würde dies auch die Ergebnisse von Lai *et al.* (2008) erklären. Da von diesen Autoren keine Luciferase-mRNAs in HeLa-Zellen transfiziert wurden, sondern Plasmide, die für diese mRNAs codierten, ließe sich die verringerte Translation in den Experimenten mit DDX3-Varianten, die keine Helikaseaktivität besitzen, durch einen Transportdefekt erklären.

Wie bei DDX3 beobachtet (vgl. Abb. III-29), gibt es weitere Helikasen, deren Funktionen unabhängig von der ATPase- und Helikaseaktivität und auch unabhängig von ATP sind. Die RNA-Helikase Mss116 aus Hefe-Mitochondrien fördert das Spleißen des Gruppe II-Introns aI5 $\gamma$  unabhängig von der Helikaseaktivität und katalysiert sogar das Spleißen des Gruppe I-Introns LSU- $\Delta$ ORF aus *Neurospora crassa* in Abwesenheit von ATP (Halls *et al.*, 2007).

DDX5 und DDX17 können die Assoziation von zwei komplementären RNAs beschleunigen (Jalal *et al.*, 2007). Aus *E. coli* konnten DEAD-Box-RNA-Helikasen (DeaD, RhlB, RhlE und SrmB) identifiziert werden, die einen RNA-Duplex ohne eine enzymatische Helikaseaktivität (keine ATP-Hydrolyse) entwinden können und sogar eine RNA-*chaperone*-Aktivität besitzen (Zhao & Jain, 2011).

Während die Kernregionen (Domäne 1 und 2) der RNA-Helikasen weitestgehend in der Struktur homolog sind, unterscheiden sich die N- und C-terminalen Sequenzbereiche in der Familie der DEAD-Box-RNA-Helikasen sehr stark (Ranji & Boris-Lawrie, 2010). Diese Bereiche gehen zusätzliche Interaktionen mit dem RNA-Substrat und Proteinpartnern ein (Cordin *et al.*, 2006; Fuller-Pace, 2006). Zudem wurde postuliert, dass durch diese Interaktionen auch die Helikaseaktivitäten der DEAD-Box-Proteine reguliert bzw. noch unbekannt Funktionen vermittelt werden (Linder, 2006). Obwohl die Strukturen der N- und C-terminalen Bereiche von den meisten RNA-Helikasen weitgehend unbekannt sind, gibt es immer häufiger Hinweise darauf, dass diese Regionen regulatorische Hotspots für post-transkriptionale Modifikationen und Bindestellen für Interaktionspartner sind. Wahrscheinlich hat auch die Art der Modifikation einen Einfluss auf den Interaktionspartner, da für einige RNA-Helikasen (DDX3, DDX5 und DDX20) mehrere Interaktionspartner des N- und C-Terminus identifiziert wurden (Abb. IV-2; Gustafson & Wessel, 2010). Für DDX3 konnten in den N- und C-terminalen Bereichen bis zu 23 post-transkriptionale Modifikationen, wie Phosphorylierungen und Acetylierungen nachgewiesen werden (Molina *et al.*, 2007; Gustafson & Wessel, 2010). So wurde gezeigt, dass der N-Terminus von DDX3 eine Interaktion mit dem Initiationsfaktor eIF4E und dem Protein K7 des Poxvirus eingeht, während der C-Terminus mit dem HCV-Core-Protein interagiert (Owsianka & Patel, 1999; Schröder *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2008). Darüber hinaus gibt es Daten, die indizieren, dass der N-Terminus von DDX3 essentiell für die Aktivierung des IFN- $\beta$ -Promoters ist.



**Abb. IV-2: Post-transkriptionale Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionspartner von humanen DEAD-Box-RNA-Helikasen (DDX).** (Oberer Abbildungsteil) Schematische Darstellung der Domänenstruktur von DDX-Proteinen mit der zentralen Kerndomäne (DEAD-box Core) und den N- und C-terminalen Bereichen. Darüber sind die Anzahl der bekannten post-transkriptionalen Modifikationen der dargestellten DDX-Proteine aufgeführt. (Unterer Abbildungsteil) Bekannte DDX-Interaktionspartner mit der Bindestelle im Protein (N-terminal, DEAD-box Core und C-terminal). Abbildung aus Gustafson & Wessel (2010).

Der Einfluss der N- und C-terminalen Bereiche von DDX3 auf die Translation wurde mit der Generierung von DDX3-Deletionsvarianten untersucht. In diesen Experimenten wurde gezeigt, dass ein vollständiger N-Terminus von DDX3 für die Funktion in der Translation essentiell ist (vgl. Abb. III-31). Dagegen hatte der C-Terminus von DDX3 keine Relevanz für die Aktivität des Proteins im Translationsprozess (vgl. Abb. III-30). Wird von der oben ausgeführten These ausgegangen, dass DDX3 an Konformationsänderungen im 48S-Initiationskomplex beteiligt ist, so kann weiter angenommen werden, dass diese Aktivität durch Interaktionen des N-Terminus von DDX3 mit Komponenten von eIF3 und der 40S-Untereinheit zustande kommt.

Dass DDX3 die Translation unabhängig von der enzymatischen Aktivität unterstützt, passt auch in das Modell, nach dem DEAD-Box-RNA-Helikasen RNA-Protein- bzw. Protein-Protein-Kontakte modifizieren können (Pyle, 2008; Gustafson & Wessel, 2010). Für DDX3 wurde dieses Szenario postuliert (Schröder *et al.*, 2008), allerdings beruhten diese Annahmen vor allem auf Daten, die mit dem Hefe-homologen Ded1 erhalten wurden. Für Ded1 konnte

kürzlich gezeigt werden, dass der C-Terminus des Proteins mit eIF4G interagiert und diese Interaktion essentiell für die Rekrutierung von Ded1-mRNA-eIF4G-Komplexen in *stress granules* ist (Hilliker *et al.*, 2011). Die Funktion von Ded1 führt somit indirekt zur Beeinflussung der Translation. Bis heute wurde angenommen, dass DDX3 ähnliche Funktionen hat wie Ded1. Diese Annahme basierte aber lediglich auf dem Vergleich der Primärstrukturen, die zu 54% identisch sind (Ranji & Boris-Lawrie, 2010), wobei diese Übereinstimmung größtenteils auf die Kernregion der beiden Helikasen mit den neun konservierten Sequenzmotiven beschränkt ist. Die N- und C-terminalen Bereiche der beiden Proteine weisen jedoch eine völlig unterschiedliche Aminosäurezusammensetzung auf. In dieser Dissertation konnte erstmals gezeigt werden, dass der N-Terminus von DDX3 für die fördernde Funktion in der Translation essentiell ist (vgl. Abb. III-31), während bei Ded1 offenbar der C-Terminus die indirekte Funktion im Translationsprozess vermittelt (Hilliker *et al.*, 2011). Diese präsentierten Ergebnisse schließen somit gleiche Funktionen von DDX3 und Ded1 in der Translation aus.

### ***Fazit und Ausblick***

Diese Dissertation befasst sich mit Untersuchungen zur Funktion von DDX3 im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus und in der cap- und HCV-IRES-abhängigen Translation. Aus zuvor veröffentlichten Daten ließ sich bisher nur eine mögliche Beteiligung, jedoch keine definierte Aktivität von DDX3 in diesen Prozessen ableiten.

Zunächst konnte gezeigt werden, dass DDX3 die HCV-IRES-vermittelte Translation stimuliert. Weiterführende Untersuchungen belegten eine generell fördernde Funktion des Proteins im zellulären Translationsprozess. Dabei wurde deutlich, dass es spezifisch die Assemblierung des 80S-Ribosoms (*60S-subunit joining*) beschleunigt. Dagegen wird die Ausbildung des 48S-Initiationskomplexes durch DDX3 nicht beeinflusst. Die ATPase- und Helikaseaktivität von DDX3 ist für die Förderung des Translationsprozesses nicht essentiell, jedoch ist der N-Terminus des Proteins für die Vermittlung des Translationseffekts notwendig. DDX3 interagiert dabei direkt mit dem Translations-Initiationsfaktor eIF3 und der ribosomalen 40S-Untereinheit. Neben der RNA-Helikase eIF4A und DHX29 konnte mit DDX3 somit eine weitere Helikase charakterisiert werden, die einen definierten Prozess in der Translationsinitiation unterstützt.

Der molekulare Mechanismus, wie DDX3 die Assemblierung des 80S-Ribosoms fördert, ist bisher noch völlig unbekannt. Um diese Frage zu beantworten, besteht eine der Hauptaufgaben darin, die direkten Interaktionspartner im eIF3-Proteinkomplex (13 Untereinheiten) und der ribosomalen 40S-Untereinheit (33 Proteine) sowie die exakten Bindestellen zu ermitteln. Geeignete Methoden dazu sind Peptid-Microarrays, IP-Experimente mit einzelnen gereinigten Faktoren oder *cross-linking*-Experimente mit angeschlossener Proteolyse und Massenspektrometrie. Die Relevanz ermittelter Bindemotive

in diesen Faktoren auf die Translationsinitiation bzw. die Assemblierung des 80S-Ribosoms ließe sich dann über Mutagenese mit den in dieser Arbeit etablierten Verfahren überprüfen. Ein weiteres faszinierendes Thema ist die postulierte Konformationsänderung des 48S-Initiationskomplexes unter dem Einfluss von DDX3, die nach dem hier dargestellten Modell das *60S-subunit joining* beschleunigt. So ist z.B. folgendes Szenario vorstellbar. Die Interaktion von DDX3 mit eIF3 könnte zur Änderung in der Positionierung einzelner Sekundärstrukturelemente ( $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter) in eIF3 führen, welche bei Bindung von DDX3 eine andere Konformation annehmen. Die Strukturänderungen in eIF3 könnten dann die Affinität von eIF3 zur 40S-Untereinheit vermindern, wodurch eIF3 schneller aus dem 48S-Initiationskomplex freigesetzt wird. Um dieses Modell zu überprüfen bedarf es umfangreicher Studien. Eine sehr herausfordernde Strategie wäre, Kristallstrukturen des Komplexes aus eIF3 und der 40S-Untereinheit in An- und Abwesenheit von DDX3 zu ermitteln und zu vergleichen.

## V Zusammenfassung/Summary

In dieser Dissertation wurde die Funktion der DEAD-Box-RNA-Helikase DDX3 im Lebenszyklus des Hepatitis C Virus (HCV) und in der cap- und HCV-IRES-abhängigen Translation untersucht. Folgende Ergebnisse wurden erzielt:

- Im Lebenszyklus von HCV fördert DDX3 die IRES-vermittelte Translation. Über eine differenzielle Analyse mit mono- und bi-cistronischen HCV-Replikons konnte ein Einfluss auf die virale RNA-Replikation ausgeschlossen werden.
- DDX3 besitzt eine generell fördernde Funktion im Translationsprozess. Experimente mit Reporter-RNAs zeigten, dass sowohl die IRES-vermittelte als auch die cap-abhängige Translation in DDX3-depletierten Huh7-Zellen reduziert war. Dabei spielte es keine Rolle, ob die verwendeten mRNAs unstrukturierte bzw. strukturierte 5'cap-UTRs enthielten. Die Translations-fördernde Wirkung von DDX3 war unabhängig von der Anwesenheit einer poly(A)-Sequenz am 3'Ende von mRNAs bzw. von der eines authentischen 3'Endes viraler RNAs. Diese Daten schlossen eine Rolle von DDX3 sowohl bei der Zirkularisierung der translatierten RNA als auch im *scanning*-Prozess aus.
- Gradientenzentrifugations-Experimente ließen eine Funktion von DDX3 im Initiationsprozess der Translation vermuten. Dagegen konnte eine Beteiligung des Proteins am Elongationsprozess und am Ribosomen-Recycling ausgeschlossen werden.
- In Translations-Initiationsexperimenten konnte nachgewiesen werden, dass DDX3 mit 48S-Initiationskomplexen und neu assemblierten 80S-Ribosomen in einer RNA-unabhängigen Weise interagiert. Im Gegensatz dazu konnte keine Interaktion mit „freien“, RNA-ungebundenen 80S-Ribosomen detektiert werden.
- Der Nachweis einer direkten Interaktion mit der Translationsmaschinerie wurde durch Immunpräzipitationen mit gereinigten Faktoren des 43S-PIC geführt. Als direkte Interaktionspartner von DDX3 konnten eIF3 und die ribosomale 40S-Untereinheit identifiziert werden.
- Die exakte Funktion von DDX3 in der Translationsinitiation wurde mit DDX3-depletierten Translations-kompetenten Huh7-Extrakten ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass DDX3 die Assemblierung des 80S-Ribosoms an der 5'cap-mRNA und an IRES-haltiger RNA fördert. Die Bildung des 48S-Initiationskomplexes wird dagegen von DDX3 nicht beeinflusst.
- Experimente, in denen die 48S- und 80S-Initiationskomplexe mit gereinigten Komponenten *in vitro* rekonstituiert wurden, bestätigten den fördernden Effekt von DDX3 auf die Assemblierung des 80S-Ribosoms.
- Die erstmals beobachtete Funktion von DDX3 während der Translation war unabhängig von der ATPase- und Helikaseaktivität des Proteins. Über eine Mutagenesestudie konnte

gezeigt werden, dass der N-Terminus des Proteins eine essentielle Determinante dieser Funktion ist.

## Summary

This study investigated the function of the DEAD-box RNA helicase DDX3 in the life cycle of the hepatitis C virus (HCV) and in the cap- and HCV IRES-dependent translation. The following results were obtained:

- Using a comparative approach with mono- and bi-cistronic HCV RNA replicons, it was shown that DDX3 supports IRES-mediated translation but does not affect HCV RNA replication.
- DDX3 promotes overall translation. Experiments with reporter RNAs in Huh7 cells revealed that a depletion of DDX3 results in reduced IRES-dependent as well as cap-dependent translation. This was found irrespective of whether mRNAs contained structured or unstructured 5'cap-UTRs. Moreover, the observed impact of DDX3 on translation was shown to be independent of the presence of a poly(A) tail at the 3'end of mRNA and EMCV RNA, respectively. In the case of the HCV RNA, DDX3 supported IRES-mediated translation also in the absence of an authentic 3'UTR. These data excluded a function of DDX3 in the scanning process and during RNA circularization.
- Gradient centrifugation experiments indicated a function of DDX3 in the translation initiation process. A functional role of the protein in the translation elongation and ribosome recycling process was excluded.
- Translation initiation experiments demonstrated an RNA-independent association of DDX3 with 48S initiation complexes and newly assembled 80S ribosomes. In contrast, DDX3 did not associate with free RNA-unbound 80S ribosomes.
- Immunoprecipitation experiments with purified components of the 43S PIC revealed eIF3 and the ribosomal 40S subunit as direct interaction partners of DDX3.
- To elucidate the precise function of DDX3 in the translation initiation process, translation-competent DDX3-depleted extracts were used. It has been demonstrated that DDX3 supports the assembly of 80S initiation complexes on a 5'cap mRNA and on an IRES-containing RNA, respectively. In contrast, the assembly of 48S initiation complexes was unaffected by DDX3.
- The supportive role of DDX3 in the assembly of 80S initiation complexes, which was shown for the first time, was further confirmed by *in vitro* reconstitution experiments of 48S and 80S initiation complexes with purified components of the translation initiation process.
- Mutagenesis studies with DDX3 revealed that this function of DDX3 was not related to its ATPase and helicase activity but dependent on the presence of the N-terminus of this protein.

## VI Literatur

- Acker M.G., Shin B.S., Dever T.E. & Lorsch J.R.** (2006) Interaction between eukaryotic initiation factors 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem* **281**: 8469-8475
- Acker M.G., Shin B.S., Nanda J.S., Saini A.K., Dever T.E. & Lorsch J.R.** (2009) Kinetic analysis of late steps of eukaryotic translation initiation. *J Mol Biol* **385**: 491-506
- Ariumi Y., Kuroki M., Abe K., Dansako H., Ikeda M., Wakita T. & Kato N.** (2007) DDX3 DEAD-box RNA helicase is required for hepatitis C virus RNA replication. *J Virol* **81**: 13922-13926
- Baird S.D., Turcotte M., Korneluk R.G. & Holcik M.** (2006) Searching for IRES. *RNA* **12**: 1755-1785
- Bandyopadhyay A. & Maitra U.** (1999) Cloning and characterization of the p42 subunit of mammalian translation initiation factor 3 (eIF3): demonstration that eIF3 interacts with eIF5 in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **27**: 1331-1337
- Bartenschlager R., Frese M. & Pietschmann T.** (2004) Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* **63**: 71-180
- Bartenschlager R. & Sparacio S.** (2007) Hepatitis C virus molecular clones and their replication capacity in vivo and in cell culture. *Virus Res* **127**: 195-207
- Barton D.J. & Flanagan J.B.** (1993) Coupled translation and replication of poliovirus RNA in vitro: synthesis of functional 3D polymerase and infectious virus. *J Virol* **67**: 822-831
- Behrens S.E., Tomei L. & De Francesco R.** (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Embo J* **15**: 12-22
- Bergamini G., Preiss T. & Hentze M.W.** (2000) Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA* **6**: 1781-1790
- Berthelot K., Muldoon M., Rajkowitsch L., Hughes J. & McCarthy J.E.G.** (2004) Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Mol Microbiol* **51**: 987-1001
- Blanchard E., Belouzard S., Goueslain L., Wakita T., Dubuisson J., Wychowski C. & Rouille Y.** (2006) Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* **80**: 6964-6972
- Blight K.J., Kolykhalov A.A. & Rice C.M.** (2000) Efficient initiation of HCV RNA replication in cell culture. *Science* **290**: 1972-1974
- Bono F., Ebert J., Lorentzen E. & Conti E.** (2006) The crystal structure of the exon junction complex reveals how it maintains a stable grip on mRNA. *Cell* **126**: 713-725
- Botlagunta M., Vesuna F., Mironchik Y., Raman A., Lisok A., Winnard P., Mukadam S., Van Diest P., Chen J.H., Farabaugh P., Patel A.H. & Raman V.** (2008) Oncogenic role of DDX3 in breast cancer biogenesis. *Oncogene* **27**: 3912-3922
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Bradrick S.S., Walters R.W. & Gromeier M.** (2006) The hepatitis C virus 3'-untranslated region or a poly(A) tract promote efficient translation subsequent to the initiation phase. *Nucleic Acids Res* **34**: 1293-1303
- Bukh J., Pietschmann T., Lohmann V., Krieger N., Faulk K., Engle R.E., Govindarajan S., Shapiro M., St Claire M. & Bartenschlager R.** (2002) Mutations that permit efficient replication of hepatitis C virus RNA in Huh-7 cells prevent productive replication in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 14416-14421

- Bung C., Bochkaeva Z., Terenin I., Zinovkin R., Shatsky I.N. & Niepmann M.** (2010) Influence of the hepatitis C virus 3'-untranslated region on IRES-dependent and cap-dependent translation initiation. *FEBS Lett* **584**: 837-842
- Carrera P., Johnstone O., Nakamura A., Casanova J., Jackle H. & Lasko P.** (2000) VASA mediates translation through interaction with a Drosophila yIF2 homolog. *Mol Cell* **5**: 181-187
- Caruthers J.M., Johnson E.R. & McKay D.B.** (2000) Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**: 13080-13085
- Caruthers J.M. & McKay D.B.** (2002) Helicase structure and mechanism. *Curr Opin Struct Biol* **12**: 123-133
- Ceci M., Gaviraghi C., Gorrini C., Sala L.A., Offenhauser N., Marchisio P.C. & Biffo S.** (2003) Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* **426**: 579-584
- Chao F.C.** (1957) Dissociation of macromolecular ribonucleoprotein of yeast. *Arch Biochem Biophys* **70**: 426-431
- Chuang R.Y., Weaver P.L., Liu Z. & Chang T.H.** (1997) Requirement of the DEAD-Box protein ded1p for messenger RNA translation. *Science* **275**: 1468-1471
- Cigan A.M., Feng L. & Donahue T.F.** (1988) tRNA<sup>i</sup>(met) functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science* **242**: 93-97
- Colvin H.M. & Mitchell A.E.** (2010) Hepatitis and Liver Cancer: A National Strategy for Prevention and Control of Hepatitis B and C. National Academies Press, Washington, DC, USA.
- Compton S.J. & Jones C.G.** (1985) Mechanism of dye response and interference in the Bradford protein assay. *Anal Biochem* **151**: 369-374
- Coombs D.H. & Watts N.R.** (1985) Generating sucrose gradients in three minutes by tilted tube rotation. *Anal Biochem* **148**: 254-259
- Cooper H.L., Berger S.L. & Braverman R.** (1976) Free ribosomes in physiologically nondividing cells. Human peripheral lymphocytes. *J Biol Chem* **251**: 4891-4900
- Cordin O., Banroques J., Tanner N.K. & Linder P.** (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene* **367**: 17-37
- Damoc E., Fraser C.S., Zhou M., Videler H., Mayeur G.L., Hershey J.W.B., Doudna J.A., Robinson C.V. & Leary J.A.** (2007) Structural characterization of the human eukaryotic initiation factor 3 protein complex by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* **6**: 1135-1146
- de la Cruz J., Iost I., Kressler D. & Linder P.** (1997) The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 5201-5206
- Drabkin H.J. & RajBhandary U.L.** (1985) Attempted expression of a human initiator tRNA gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **260**: 5596-5602
- Edgil D. & Harris E.** (2006) End-to-end communication in the modulation of translation by mammalian RNA viruses. *Virus Res* **119**: 43-51
- Egger D., Wolk B., Gosert R., Bianchi L., Blum H.E., Moradpour D. & Bienz K.** (2002) Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* **76**: 5974-5984
- Elbashir S.M., Harborth J., Lendeckel W., Yalcin A., Weber K. & Tuschl T.** (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494-498
- Fang J.W. & Moyer R.W.** (2000) The effects of the conserved extreme 3' end sequence of hepatitis C virus (HCV) RNA on the in vitro stabilization and translation of the HCV RNA genome. *J Hepatol* **33**: 632-639

- Fletcher C.M., Pestova T.V., Hellen C.U. & Wagner G.** (1999) Structure and interactions of the translation initiation factor eIF1. *Embo J* **18**: 2631-2637
- Friebe P., Boudet J., Simorre J.P. & Bartenschlager R.** (2005) Kissing-loop interaction in the 3' end of the hepatitis C virus genome essential for RNA replication. *J Virol* **79**: 380-392
- Fukushi S., Katayama K., Kurihara C., Ishiyama N., Hoshino F.B., Ando T. & Oya A.** (1994) Complete 5' noncoding region is necessary for the efficient internal initiation of hepatitis C virus RNA. *Biochem Biophys Res Commun* **199**: 425-432
- Fuller-Pace F.V.** (2006) DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res* **34**: 4206-4215
- Gill S.C. & von Hippel P.H.** (1989) Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal Biochem* **182**: 319-326
- Gingras A.C., Raught B. & Sonenberg N.** (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu Rev Biochem* **68**: 913-963
- Goh P.Y., Tan Y.J., Lim S.P., Tan Y.H., Lim S.G., Fuller-Pace F. & Hong W.** (2004) Cellular RNA helicase p68 relocalization and interaction with the hepatitis C virus (HCV) NS5B protein and the potential role of p68 in HCV RNA replication. *J Virol* **78**: 5288-5298
- Gorbalenya A.E. & Koonin E.V.** (1993) Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Curr Opin Struct Biol* **3**: 419-429
- Gosert R., Egger D., Lohmann V., Bartenschlager R., Blum H.E., Bienz K. & Moradpour D.** (2003) Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *J Virol* **77**: 5487-5492
- Grakoui A., McCourt D.W., Wychowski C., Feinstone S.M. & Rice C.M.** (1993) Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase: determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* **67**: 2832-2843
- Grassmann C.W., Yu H., Isken O. & Behrens S.E.** (2005) Hepatitis C virus and the related bovine viral diarrhea virus considerably differ in the functional organization of the 5' non-translated region: implications for the viral life cycle. *Virology* **333**: 349-366
- Gustafson E.A. & Wessel G.M.** (2010) DEAD-box helicases: posttranslational regulation and function. *Biochem Biophys Res Commun* **395**: 1-6
- Halls C., Mohr S., Del Campo M., Yang Q., Jankowsky E. & Lambowitz A.M.** (2007) Involvement of DEAD-box proteins in group I and group II intron splicing. Biochemical characterization of Mss116p, ATP hydrolysis-dependent and -independent mechanisms, and general RNA chaperone activity. *J Mol Biol* **365**: 835-855
- Harris D., Zhang Z., Chaubey B. & Pandey V.N.** (2006) Identification of cellular factors associated with the 3'-nontranslated region of the hepatitis C virus genome. *Mol Cell Proteomics* **5**: 1006-1018
- Hartman T.R., Qian S., Bolinger C., Fernandez S., Schoenberg D.R. & Boris-Lawrie K.** (2006) RNA helicase A is necessary for translation of selected messenger RNAs. *Nat Struct Mol Biol* **13**: 509-516
- Hijkata M., Kato N., Ootsuyama Y., Nakagawa M. & Shimotohno K.** (1991) Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 5547-5551
- Hijkata M., Mizushima H., Akagi T., Mori S., Kakiuchi N., Kato N., Tanaka T., Kimura K. & Shimotohno K.** (1993) Two distinct proteinase activities required for the processing of a putative nonstructural precursor protein of hepatitis C virus. *J Virol* **67**: 4665-4675

- Hilliker A., Gao Z., Jankowsky E. & Parker R.** (2011) The DEAD-Box Protein Ded1 Modulates Translation by the Formation and Resolution of an eIF4F-mRNA Complex. *Mol Cell* **43**: 962-972
- Honda M., Brown E.A. & Lemon S.M.** (1996) Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA* **2**: 955-968
- Honda M., Beard M.R., Ping L.H. & Lemon S.M.** (1999) A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J Virol* **73**: 1165-1174
- Hsu M., Zhang J., Flint M., Logvinoff C., Cheng-Mayer C., Rice C.M. & McKeating J.A.** (2003) Hepatitis C virus glycoproteins mediate pH-dependent cell entry of pseudotyped retroviral particles. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**: 7271-7276
- Hüssy P., Langen H., Mous J. & Jacobsen H.** (1996) Hepatitis C virus core protein: carboxy-terminal boundaries of two processed species suggest cleavage by a signal peptide peptidase. *Virology* **224**: 93-104
- Iizuka N., Najita L., Franzusoff A. & Sarnow P.** (1994) Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **14**: 7322-7330
- 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
- Imbert I., Dimitrova M., Kien F., Kieny M.P. & Schuster C.** (2003) Hepatitis C virus IRES efficiency is unaffected by the genomic RNA 3'NTR even in the presence of viral structural or non-structural proteins. *J Gen Virol* **84**: 1549-1557
- Iost I., Dreyfus M. & Linder P.** (1999) Ded1p, a DEAD-box protein required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, is an RNA helicase. *J Biol Chem* **274**: 17677-17683
- Isken O., Baroth M., Grassmann C.W., Weinlich S., Ostareck D.H., Ostareck-Lederer A. & Behrens S.E.** (2007) Nuclear factors are involved in hepatitis C virus RNA replication. *RNA* **13**: 1675-1692
- Ito T., Tahara S.M. & Lai M.M.** (1998) The 3'-untranslated region of hepatitis C virus RNA enhances translation from an internal ribosomal entry site. *J Virol* **72**: 8789-8796
- Jackson R.J.** (1991) The ATP requirement for initiation of eukaryotic translation varies according to the mRNA species. *Eur J Biochem* **200**: 285-294
- Jackson R.J., Hellen C.U. & Pestova T.V.** (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**: 113-127
- Jacobson A. & Peltz S.W.** (1996) Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **65**: 693-739
- Jalal C., Uhlmann-Schiffler H. & Stahl H.** (2007) Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Res* **35**: 3590-3601
- Jang S.K., Krausslich H.G., Nicklin M.J., Duke G.M., Palmenberg A.C. & Wimmer E.** (1988) A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during *in vitro* translation. *J Virol* **62**: 2636-2643
- Jankowsky E. & Fairman M.E.** (2007) RNA helicases--one fold for many functions. *Curr Opin Struct Biol* **17**: 316-324
- Johnstone O. & Lasko P.** (2004) Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. *Development* **131**: 4167-4178
- Jünemann C., Song Y., Bassili G., Goergen D., Henke J. & Niepmann M.** (2007) Picornavirus internal ribosome entry site elements can stimulate translation of upstream genes. *J Biol Chem* **282**: 132-141

- Kadare G. & Haenni A.L.** (1997) Virus-encoded RNA helicases. *J Virol* **71**: 2583-2590
- Kahvejian A., Svitkin Y.V., Sukarieh R., M'Boutchou M.N. & Sonenberg N.** (2005) Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* **19**: 104-113
- 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
- Kapp L.D. & Lorsch J.R.** (2004) GTP-dependent recognition of the methionine moiety on initiator tRNA by translation factor eIF2. *J Mol Biol* **335**: 923-936
- Kato N., Sugiyama K., Namba K., Dansako H., Nakamura T., Takami M., Naka K., Nozaki A. & Shimotohno K.** (2003a) Establishment of a hepatitis C virus subgenomic replicon derived from human hepatocytes infected in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* **306**: 756-766
- Kato T., Furusaka A., Miyamoto M., Date T., Yasui K., Hiramoto J., Nagayama K., Tanaka T. & Wakita T.** (2001) Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J Med Virol* **64**: 334-339
- Kato T., Date T., Miyamoto M., Furusaka A., Tokushige K., Mizokami M. & Wakita T.** (2003b) Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology* **125**: 1808-1817
- Kato T., Date T., Miyamoto M., Sugiyama M., Tanaka Y., Orito E., Ohno T., Sugihara K., Hasegawa I., Fujiwara K., Ito K., Ozasa A., Mizokami M. & Wakita T.** (2005) Detection of anti-hepatitis C virus effects of interferon and ribavirin by a sensitive replicon system. *J Clin Microbiol* **43**: 5679-5684
- Kieft J.S., Zhou K., Jubin R. & Doudna J.A.** (2001) Mechanism of ribosome recruitment by hepatitis C IRES RNA. *RNA* **7**: 194-206
- Kim Y.S., Lee S.G., Park S.H. & Song K.** (2001) Gene structure of the human DDX3 and chromosome mapping of its related sequences. *Mol Cells* **12**: 209-214
- Kisselev L., Ehrenberg M. & Frolova L.** (2003) Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *Embo J* **22**: 175-182
- 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
- Kolykhalov A.A., Feinstone S.M. & Rice C.M.** (1996) Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* **70**: 3363-3371
- Komarova A.V., Brocard M. & Kean K.M.** (2006) The case for mRNA 5' and 3' end cross talk during translation in a eukaryotic cell. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **81**: 331-367
- Kong L.K. & Sarnow P.** (2002) Cytoplasmic expression of mRNAs containing the internal ribosome entry site and 3' noncoding region of hepatitis C virus: effects of the 3' leader on mRNA translation and mRNA stability. *J Virol* **76**: 12457-12462
- Korneeva N.L., Lamphear B.J., Hennigan F.L. & Rhoads R.E.** (2000) Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J Biol Chem* **275**: 41369-41376
- Korolev S., Yao N., Lohman T.M., Weber P.C. & Waksman G.** (1998) Comparisons between the structures of HCV and Rep helicases reveal structural similarities between SF1 and SF2 super-families of helicases. *Protein Sci* **7**: 605-610
- Kozak M.** (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**: 283-292

- Krieger N., Lohmann V. & Bartenschlager R.** (2001) Enhancement of hepatitis C virus RNA replication by cell culture-adaptive mutations. *J Virol* **75**: 4614-4624
- Kwong A.D., Rao B.G. & Jeang K.T.** (2005) Viral and cellular RNA helicases as antiviral targets. *Nat Rev Drug Discov* **4**: 845-853
- Laemmli U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685
- Lahn B.T. & Page D.C.** (1997) Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* **278**: 675-680
- Lai M.-C., Lee Y.-H.W. & Tarn W.-Y.** (2008) The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Mol Biol Cell* **19**: 3847-3858
- 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
- Lee C.S., Dias A.P., Jedrychowski M., Patel A.H., Hsu J.L. & Reed R.** (2008) Human DDX3 functions in translation and interacts with the translation initiation factor eIF3. *Nucleic Acids Res* **36**: 4708-4718
- Lee J.H., Choi S.K., Roll-Mecak A., Burley S.K. & Dever T.E.** (1999) Universal conservation in translation initiation revealed by human and archaeal homologs of bacterial translation initiation factor IF2. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 4342-4347
- Lee J.H., Pestova T.V., Shin B.S., Cao C., Choi S.K. & Dever T.E.** (2002) Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 16689-16694
- Lee S.W. & Otto J.J.** (1996) Differences in turnover rates of vinculin and talin caused by viral transformation and cell density. *Exp Cell Res* **227**: 352-359
- Levin D.H., Kyner D. & Acs G.** (1973) Protein initiation in eukaryotes: formation and function of a ternary complex composed of a partially purified ribosomal factor, methionyl transfer RNA, and guanosine triphosphate. *Proc Natl Acad Sci USA* **70**: 41-45
- Li Q., Brass A.L., Ng A., Hu Z., Xavier R.J., Liang T.J. & Elledge S.J.** (2009) A genome-wide genetic screen for host factors required for hepatitis C virus propagation. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 16410-16415
- Lin C., Lindenbach B.D., Pragai B.M., McCourt D.W. & Rice C.M.** (1994) Processing in the hepatitis C virus E2-NS2 region: identification of p7 and two distinct E2-specific products with different C termini. *J Virol* **68**: 5063-5073
- Lin C. & Kim J.L.** (1999) Structure-based mutagenesis study of hepatitis C virus NS3 helicase. *J Virol* **73**: 8798-8807
- Lindenbach B.D.** (2007) Flaviviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology, 5th Edition*: 1101-1152
- Linder P., Lasko P.F., Ashburner M., Leroy P., Nielsen P.J., Nishi K., Schnier J. & Slonimski P.P.** (1989) Birth of the D-E-A-D box. *Nature* **337**: 121-122
- Linder P.** (2006) Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res* **34**: 4168-4180
- Livak K.J. & Schmittgen T.D.** (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402-408
- Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L. & Bartenschlager R.** (1999) Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* **285**: 110-113

- Lohmann V., Korner F., Dobierzewska A. & Bartenschlager R.** (2001) Mutations in hepatitis C virus RNAs conferring cell culture adaptation. *J Virol* **75**: 1437-1449
- Lohmann V., Hoffmann S., Herian U., Penin F. & Bartenschlager R.** (2003) Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J Virol* **77**: 3007-3019
- Lomakin I.B., Hellen C.U. & Pestova T.V.** (2000) Physical association of eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) with eIF4A strongly enhances binding of eIF4G to the internal ribosomal entry site of encephalomyocarditis virus and is required for internal initiation of translation. *Mol Cell Biol* **20**: 6019-6029
- Lu H., Li W., Noble W.S., Payan D. & Anderson D.C.** (2004) Riboproteomics of the hepatitis C virus internal ribosomal entry site. *J Proteome Res* **3**: 949-957
- Luo G., Hamatake R.K., Mathis D.M., Racela J., Rigat K.L., Lemm J. & Colonno R.J.** (2000) De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol* **74**: 851-863
- Luo G., Xin S. & Cai Z.** (2003) Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **77**: 3312-3318
- Maag D., Algire M.A. & Lorsch J.R.** (2006) Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *J Mol Biol* **356**: 724-737
- Mamiya N. & Worman H.J.** (1999) Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J Biol Chem* **274**: 15751-15756
- Marintchev A., Edmonds K.A., Marintcheva B., Hendrickson E., Oberer M., Suzuki C., Herdy B., Sonenberg N. & Wagner G.** (2009) Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* **136**: 447-460
- Marsden S., Nardelli M., Linder P. & McCarthy J.E.G.** (2006) Unwinding single RNA molecules using helicases involved in eukaryotic translation initiation. *J Mol Biol* **361**: 327-335
- Marzluff W.F.** (1992) Histone 3' ends: essential and regulatory functions. *Gene Expr* **2**: 93-97
- McCaffrey A.P., Ohashi K., Meuse L., Shen S., Lancaster A.M., Lukavsky P.J., Sarnow P. & Kay M.A.** (2002) Determinants of hepatitis C translational initiation in vitro, in cultured cells and mice. *Mol Ther* **5**: 676-684
- Methot N., Song M.S. & Sonenberg N.** (1996) 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
- Michel Y.M., Poncet D., Piron M., Kean K.M. & Borman A.M.** (2000) Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts. Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J Biol Chem* **275**: 32268-32276
- Mizushima H., Hijikata M., Tanji Y., Kimura K. & Shimotohno K.** (1994) Analysis of N-terminal processing of hepatitis C virus nonstructural protein 2. *J Virol* **68**: 2731-2734
- Molina H., Horn D.M., Tang N., Mathivanan S. & Pandey A.** (2007) Global proteomic profiling of phosphopeptides using electron transfer dissociation tandem mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 2199-2204
- Montpetit B., Thomsen N.D., Helmke K.J., Seeliger M.A., Berger J.M. & Weis K.** (2011) A conserved mechanism of DEAD-box ATPase activation by nucleoporins and InsP6 in mRNA export. *Nature* **472**: 238-242
- Mullis K.B. & Faloona F.A.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**: 335-350

- Munroe D. & Jacobson A.** (1990) mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* **10**: 3441-3455
- Murakami K., Abe M., Kageyama T., Kamoshita N. & Nomoto A.** (2001) Down-regulation of translation driven by hepatitis C virus internal ribosomal entry site by the 3' untranslated region of RNA. *Arch Virol* **146**: 729-741
- Naarmann I.S., Harnisch C., Flach N., Kremmer E., Kuhn H., Ostareck D.H. & Ostareck-Lederer A.** (2008) mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem* **283**: 18461-18472
- Nagy P.D. & Pogany J.** (2011) The dependence of viral RNA replication on co-opted host factors. *Nat Rev Microbiol* **10**: 137-149
- Nakabayashi H., Taketa K., Miyano K., Yamane T. & Sato J.** (1982) Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res* **42**: 3858-3863
- Niepmann M.** (2009) Internal translation initiation of picornaviruses and hepatitis C virus. *Biochim Biophys Acta* **1789**: 529-541
- Oh J.W., Sheu G.T. & Lai M.M.** (2000) Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *J Biol Chem* **275**: 17710-17717
- Olsen D.S., Savner E.M., Mathew A., Zhang F., Krishnamoorthy T., Phan L. & Hinnebusch A.G.** (2003) Domains of eIF1A that mediate binding to eIF2, eIF3 and eIF5B and promote ternary complex recruitment in vivo. *Embo J* **22**: 193-204
- Ostareck D.H., Ostareck-Lederer A., Shatsky I.N. & Hentze M.W.** (2001) Lipoxigenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* **104**: 281-290
- Otto G.A. & Puglisi J.D.** (2004) The pathway of HCV IRES-mediated translation initiation. *Cell* **119**: 369-380
- Owsianka A.M. & Patel A.H.** (1999) Hepatitis C virus core protein interacts with a human DEAD box protein DDX3. *Virology* **257**: 330-340
- Passmore L.A., Schmeing T.M., Maag D., Applefield D.J., Acker M.G., Algire M.A., Lorsch J.R. & Ramakrishnan V.** (2007) The eukaryotic translation initiation factors eIF1 and eIF1A induce an open conformation of the 40S ribosome. *Mol Cell* **26**: 41-50
- Paulin F.E., Campbell L.E., O'Brien K., Loughlin J. & Proud C.G.** (2001) Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein. *Curr Biol* **11**: 55-59
- Pause A. & Sonenberg N.** (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *Embo J* **11**: 2643-2654
- Pelletier J. & Sonenberg N.** (1988) Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* **334**: 320-325
- Penin F., Dubuisson J., Rey F.A., Moradpour D. & Pawlotsky J.M.** (2004) Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* **39**: 5-19
- 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.** (1998a) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**: 854-859

- Pestova T.V., Shatsky I.N., Fletcher S.P., Jackson R.J. & Hellen C.U.** (1998b) A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNAs. *Genes Dev* **12**: 67-83
- 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
- Pestova T.V. & Hellen C.U.** (2001) Preparation and activity of synthetic unmodified mammalian tRNA<sup>i</sup>(Met) in initiation of translation in vitro. *RNA* **7**: 1496-1505
- Pestova T.V. & Kolupaeva V.G.** (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* **16**: 2906-2922
- Peterson D.T., Merrick W.C. & Safer B.** (1979a) Binding and release of radiolabeled eukaryotic initiation factors 2 and 3 during 80 S initiation complex formation. *J Biol Chem* **254**: 2509-2516
- Peterson D.T., Safer B. & Merrick W.C.** (1979b) Role of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of 80 S initiation complexes. *J Biol Chem* **254**: 7730-7735
- Pisarev A.V., Kolupaeva V.G., Pisareva V.P., Merrick W.C., Hellen C.U. & Pestova T.V.** (2006) Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. *Genes Dev* **20**: 624-636
- Pisarev A.V., Hellen C.U. & Pestova T.V.** (2007a) Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell* **131**: 286-299
- Pisarev A.V., Unbehauen A., Hellen C.U.T. & Pestova T.V.** (2007b) Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. *Methods Enzymol* **430**: 147-177
- Pisareva V.P., Pisarev A.V., Komar A.A., Hellen C.U.T. & Pestova T.V.** (2008) Translation initiation on mammalian mRNAs with structured 5'UTRs requires DExH-box protein DHX29. *Cell* **135**: 1237-1250
- Pyle A.M.** (2008) Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. *Annu Rev Biophys* **37**: 317-336
- Pyle A.M.** (2011) RNA helicases and remodeling proteins. *Curr Opin Chem Biol* **15**: 636-642
- Quinkert D., Bartenschlager R. & Lohmann V.** (2005) Quantitative analysis of the hepatitis C virus replication complex. *J Virol* **79**: 13594-13605
- Rajkowitsch L., Chen D., Stampfl S., Semrad K., Waldsich C., Mayer O., Jantsch M.F., Konrat R., Blasi U. & Schroeder R.** (2007) RNA chaperones, RNA annealers and RNA helicases. *RNA Biol* **4**: 118-130
- Ramakers C., Ruijter J.M., Deprez R.H. & Moorman A.F.** (2003) Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci Lett* **339**: 62-66
- Randall G., Panis M., Cooper J.D., Tellinghuisen T.L., Sukhodolets K.E., Pfeffer S., Landthaler M., Landgraf P., Kan S., Lindenbach B.D., Chien M., Weir D.B., Russo J.J., Ju J., Brownstein M.J., Sheridan R., Sander C., Zavolan M., Tuschl T. & Rice C.M.** (2007) Cellular cofactors affecting hepatitis C virus infection and replication. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 12884-12889
- Ranji A. & Boris-Lawrie K.** (2010) RNA helicases: emerging roles in viral replication and the host innate response. *RNA Biol* **7**: 775-787
- Raychaudhuri P. & Maitra U.** (1986) Identification of ribosome-bound eukaryotic initiation factor 2.GDP binary complex as an intermediate in polypeptide chain initiation reaction. *J Biol Chem* **261**: 7723-7728
- Reynolds J.E., Kaminski A., Kettinen H.J., Grace K., Clarke B.E., Carroll A.R., Rowlands D.J. & Jackson R.J.** (1995) Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *Embo J* **14**: 6010-6020

- Rijnbrand R., Bredenbeek P., van der Straaten T., Whetter L., Inchauspe G., Lemon S. & Spaan W.** (1995) Almost the entire 5' non-translated region of hepatitis C virus is required for cap-independent translation. *FEBS Lett* **365**: 115-119
- Rocak S. & Linder P.** (2004) DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**: 232-241
- Rogers G.W., Jr., Richter N.J., Lima W.F. & Merrick W.C.** (2001) Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *J Biol Chem* **276**: 30914-30922
- Romero-Lopez C. & Berzal-Herranz A.** (2009) A long-range RNA-RNA interaction between the 5' and 3' ends of the HCV genome. *RNA* **15**: 1740-1752
- Rudolph R., Boehm G. & Jaenike R.** (1997) Folding Proteins. In Protein Function: A Practical Approach, Creighton TE *Oxford: Oxford University Press*: 57-99
- Sachs A.B. & Varani G.** (2000) Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol* **7**: 356-361
- Sambrook J. & Russell D.W.** (2001) Molecular cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY, USA.
- Sanger F., Nicklen S. & Coulson A.R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
- Schröder M., Baran M. & Bowie A.G.** (2008) Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. *Embo J* **27**: 2147-2157
- Schröder M.** (2010) Human DEAD-box protein 3 has multiple functions in gene regulation and cell cycle control and is a prime target for viral manipulation. *Biochem Pharmacol* **79**: 297-306
- Schwer B. & Meszaros T.** (2000) RNA helicase dynamics in pre-mRNA splicing. *Embo J* **19**: 6582-6591
- Searfoss A., Dever T.E. & Wickner R.** (2001) Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol* **21**: 4900-4908
- Sekiguchi T., Iida H., Fukumura J. & Nishimoto T.** (2004) Human DDX3Y, the Y-encoded isoform of RNA helicase DDX3, rescues a hamster temperature-sensitive ET24 mutant cell line with a DDX3X mutation. *Exp Cell Res* **300**: 213-222
- Selby M.J., Choo Q.L., Berger K., Kuo G., Glazer E., Eckart M., Lee C., Chien D., Kuo C. & Houghton M.** (1993) Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* **74**: 1103-1113
- Shatkin A.J.** (1976) Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* **9**: 645-653
- Shi P.Y., Tilgner M. & Lo M.K.** (2002) Construction and characterization of subgenomic replicons of New York strain of West Nile virus. *Virology* **296**: 219-233
- Shih J.W., Tsai T.Y., Chao C.H. & Wu Lee Y.H.** (2008) Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein. *Oncogene* **27**: 700-714
- Shiratori A., Shibata T., Arisawa M., Hanaoka F., Murakami Y. & Eki T.** (1999) Systematic identification, classification, and characterization of the open reading frames which encode novel helicase-related proteins in *Saccharomyces cerevisiae* by gene disruption and Northern analysis. *Yeast* **15**: 219-253
- Silverman E., Edwalds-Gilbert G. & Lin R.J.** (2003) DExD/H-box proteins and their partners: helping RNA helicases unwind. *Gene* **312**: 1-16

- Slatko B.E., M. A.L., Tabor S. & Ju J.** (1999) DNA Sequencing by the Dideoxy Method. *Current Protocols in Molecular Biology*:
- Soulat D., Burckstummer T., Westermayer S., Goncalves A., Bauch A., Stefanovic A., Hantschel O., Bennett K.L., Decker T. & Superti-Furga G.** (2008) The DEAD-box helicase DDX3X is a critical component of the TANK-binding kinase 1-dependent innate immune response. *Embo J* **27**: 2135-2146
- Stanley W.M., Jr.** (1974) Specific aminoacylation of the methionine-specific tRNA's of eukaryotes. *Methods Enzymol* **29**: 530-547
- Svitkin Y.V., Imataka H., Khaleghpour K., Kahvejian A., Liebig H.D. & Sonenberg N.** (2001a) Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA* **7**: 1743-1752
- Svitkin Y.V., Pause A., Haghghat A., Pyronnet S., Witherell G., Belsham G.J. & Sonenberg N.** (2001b) The requirement for eukaryotic initiation factor 4A (eIF4A) in translation is in direct proportion to the degree of mRNA 5' secondary structure. *RNA* **7**: 382-394
- Tai A.W., Benita Y., Peng L.F., Kim S.S., Sakamoto N., Xavier R.J. & Chung R.T.** (2009) A functional genomic screen identifies cellular cofactors of hepatitis C virus replication. *Cell Host Microbe* **5**: 298-307
- Tanaka T., Kato N., Cho M.J. & Shimotohno K.** (1995) A novel sequence found at the 3' terminus of hepatitis C virus genome. *Biochem Biophys Res Commun* **215**: 744-749
- Tanner N.K. & Linder P.** (2001) DExD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol Cell* **8**: 251-262
- Tanner N.K.** (2003) The newly identified Q motif of DEAD box helicases is involved in adenine recognition. *Cell Cycle* **2**: 18-19
- Tanner N.K., Cordin O., Banroques J., Doere M. & Linder P.** (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell* **11**: 127-138
- Tarun S.Z., Jr. & Sachs A.B.** (1996) Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *Embo J* **15**: 7168-7177
- Terenin I.M., Dmitriev S.E., Andreev D.E. & Shatsky I.N.** (2008) Eukaryotic translation initiation machinery can operate in a bacterial-like mode without eIF2. *Nat Struct Mol Biol* **15**: 836-841
- Tingting P., Caiyun F., Zhigang Y., Pengyuan Y. & Zhenghong Y.** (2006) Subproteomic analysis of the cellular proteins associated with the 3' untranslated region of the hepatitis C virus genome in human liver cells. *Biochem Biophys Res Commun* **347**: 683-691
- Tolan D.R., Hershey J.W. & Traut R.T.** (1983) Crosslinking of eukaryotic initiation factor eIF3 to the 40S ribosomal subunit from rabbit reticulocytes. *Biochimie* **65**: 427-436
- Tomei L., Failla C., Santolini E., De Francesco R. & La Monica N.** (1993) NS3 is a serine protease required for processing of hepatitis C virus polyprotein. *J Virol* **67**: 4017-4026
- Tscherne D.M., Jones C.T., Evans M.J., Lindenbach B.D., McKeating J.A. & Rice C.M.** (2006) Time- and temperature-dependent activation of hepatitis C virus for low-pH-triggered entry. *J Virol* **80**: 1734-1741
- Tsukiyama-Kohara K., Iizuka N., Kohara M. & Nomoto A.** (1992) Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J Virol* **66**: 1476-1483
- Unbehaun A., Borukhov S.I., Hellen C.U. & Pestova T.V.** (2004) Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev* **18**: 3078-3093
- Vidalain P.O. & Tangy F.** (2010) Virus-host protein interactions in RNA viruses. *Microbes Infect* **12**: 1134-1143

- Wahle E. & Rügsegger U.** (1999) 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **23**: 277-295
- Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R. & Liang T.J.** (2005) Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med* **11**: 791-796
- Walker J.E., Saraste M., Runswick M.J. & Gay N.J.** (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J* **1**: 945-951
- Wang C., Sarnow P. & Siddiqui A.** (1993) Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism. *J Virol* **67**: 3338-3344
- Weidensdorfer D., Stohr N., Baude A., Lederer M., Kohn M., Schierhorn A., Buchmeier S., Wahle E. & Hüttelmaier S.** (2009) Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA* **15**: 104-115
- Weinlich S., Hüttelmaier S., Schierhorn A., Behrens S.-E., Ostareck-Lederer A. & Ostareck D.H.** (2009) IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA* **15**: 1528-1542
- Xu Y.Z., Newnham C.M., Kameoka S., Huang T., Konarska M.M. & Query C.C.** (2004) Prp5 bridges U1 and U2 snRNPs and enables stable U2 snRNP association with intron RNA. *Embo J* **23**: 376-385
- Yamada N., Tanihara K., Takada A., Yorihuzi T., Tsutsumi M., Shimomura H., Tsuji T. & Date T.** (1996) Genetic organization and diversity of the 3' noncoding region of the hepatitis C virus genome. *Virology* **223**: 255-261
- Yedavalli V.S., Neuveut C., Chi Y.H., Kleiman L. & Jeang K.T.** (2004) Requirement of DDX3 DEAD box RNA helicase for HIV-1 Rev-RRE export function. *Cell* **119**: 381-392
- You L.R., Chen C.M., Yeh T.S., Tsai T.Y., Mai R.T., Lin C.H. & Lee Y.H.** (1999) Hepatitis C virus core protein interacts with cellular putative RNA helicase. *J Virol* **73**: 2841-2853
- You S. & Rice C.M.** (2008) 3' RNA elements in hepatitis C virus replication: kissing partners and long poly(U). *J Virol* **82**: 184-195
- Zhao X. & Jain C.** (2011) DEAD-box proteins from *Escherichia coli* exhibit multiple ATP-independent activities. *J Bacteriol* **193**: 2236-2241
- Zhong W., Uss A.S., Ferrari E., Lau J.Y. & Hong Z.** (2000) De novo initiation of RNA synthesis by hepatitis C virus nonstructural protein 5B polymerase. *J Virol* **74**: 2017-2022
- Zhou Z., Licklider L.J., Gygi S.P. & Reed R.** (2002) Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature* **419**: 182-185

## VII Anhang

### VII.1 Oligonucleotide

Die verwendeten Oligonucleotide zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für die Generierung von Expressionsplasmiden, qRT-PCR-Untersuchungen, *in vitro*-Transkriptionen und das *toe printing* sind in Tab. VII-1 aufgelistet.

**Tab. VII-1: Sequenz und Schmelztemperatur der verwendeten Oligonucleotide.** Die Schmelztemperatur der Oligonucleotide bezieht sich auf die komplementären Bereiche zum DNA-*template* und beinhaltet nicht die Sequenzen von Restriktionsenzymen am 5'Ende, des T7-Promoters und des Flag-*tag*, sofern diese nicht in den DNA-*templates* vorhanden sind. fw: *forward*, rv: *reverse*, T<sub>m</sub>: Schmelztemperatur (IIT-Biotech).

Name und Verwendung	Sequenz 5'-3'	T <sub>m</sub> in °C
<b>Konstruktion der Expressionsplasmide</b>		
DDX3fw	AGTCATGTGGCAGTGGAAAATGC	61,0
DDX3rvORF	TTCTCGAGTCAGTTACCCACCAGTCAACC	60,9
DDX3fwFlag	CGGGGTACCGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGC CCGGGCGGATAGTCATGTGGCAGTGGAAAATGC	61,0
DDX3rvMut1	ACGAGTAAGCTCAATGTTTCCCATG	60,1
DDX3fwMut1	GCTACTCGCCCAACTCCAGTGGCAAAGCATGCTATTCC	72,3
DDX3rvMut2	TCCAGACCCTGTTTGGGCAC	65,4
DDX3fwMut2	GCAACTGCAGCATTCTGTGGCC	64,2
DDX3rvMut3	TAACACCAAGTATTTGCAAAAGTCTAATCC	57,7
DDX3fwMut3	GCTGCAGCTGATCGGATGTTGGATATGG	66,2
pcDNA3fw	TGACTCGAGCATGCATCTAGAGGG	60,9
DDX3rv1236nt	AGAGGTAGAGCCAACCTTCTCTAC	61,2
DDX3rv1749nt	GCTACCCTTGTAGTGGTGTTCATAAGC	61,9
DDX3fw388	AAATCAGATGAAGATGATTGGTCAAACCACTC	61,6
DDX3fw301	CGGAGTGATTACGATGGCATTGG	61,7
DDX3fw220	TCTCGTAGTGATTCAAGAGGGAAGTC	61,6
DDX3fw142	GCTACTAAAGGTTTCTACGATAAAGACAGTTCAG	60,3
DDX3fw88	GGAAGTACAGCCAGCAAAGGG	62,5
pcDNA3rv	GAATTCCTTGTGTCGTCCTTGTAGTC	62,7
eIF1fw	ATGTCCGCTATCCAGAACCTCC	62,9
eIF1rv	CCCAAGCTTAAAACCCATGAACCTTCAGCTGATCG	62,3
eIF1Afw	ATGCCCAAGAATAAAGGTAAAGGAGG	60,4
eIF1Arv	CCCAAGCTTAGATGTCATCAATATCTTCATCATCATCTCCAATGTC	61,0
eIF4Afw	ATGTCTGCGAGCCAGGATTCCCG	67,9
eIF4Arv	CCCAAGCTTCAGATGAGGTCAGCAACATTGAGG	62,5
eIF4Bfw	ATGGCGCCTCAGCAAAAAGAAGAATAAGAAGG	66,2
eIF4Brv	CCCAAGCTTCTATTCGGCATAATCTTCTCCCTCATTTTCATC	61,5
eIF4Gfw737-1116	AGCAGCAAGCGGACGGCGGCTG	72,2
eIF4Grv737-1116	CCCAAGCTTAAGCTGGGCGAGCAGCTTCTGATGC	68,6
eIF5fw	ATGTCTGTCAATGTCAACCGCAGC	65,5
eIF5rv	CCCAAGCTTAAATGGCATCAATATCGATGTCGTCATCC	60,9

Name und Verwendung	Sequenz 5'-3'	T <sub>m</sub> in °C
eIF5Bfw587-1220	ATGAGCTCAGATTCTGAATATGACTCTGATG	60,0
eIF5Brv587-1220	CCCAAGCTTAGATGATTTCAAATACTTTCTTCAGCTCCAC	59,0
eIF1fwFlag	CCCAAGCTTGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGC CCGGGCGGATTCCGCTATCCAGAACCTCC	62,9
eIF5fwFlag	CCCAAGCTTGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGC CCGGGCGGATTCTGTCAATGTCAACCGCAGC	61,0
eIF5BfwFlag	CTAGCTTAAGCCACCATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGGC CCGGGCGGATGGGAAGAAACAGAAAAACAAGAGCG	60,2
Meti-tRNASynfw	ATGCCTACTATGACTCAAGTTCGCG	60,9
Meti-tRNASynrv	TTATTTACCTGATGACCCGGTTTAGC	62,2
<b>Generierung des HDV-Ribozyms in pSGR-JFH1 und pSGR-JFH1/mono</b>		
JFH1rvRibo1	GTAGCCCAGGTCCGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGAC CCACATGATCTGCAGAGAGACCAG	59,7
JFH1rvRibo2	GCTCTAGACTTCTCCCTTAGCCTACCGAAGTAGCCCAGGTCGGAC CGCGAGGAG	74,4
JFH1fwRibo	GCCGATATCTCTTCAATTGGGCGGTG	65,5
<b>Konstruktion von pSGR-JFH1/mono</b>		
JFH1CoreSL1rv	GTTTAAACCGCCGCCCGCCGGGAACCTAACGTCTTCTGGGCGACG GTTGGTGTTTC	79,4
JFH1NS3fw	GCTCCCATCACTGCTTATGCC	61,7
Ubiquitinfw	ATGCAGATCTTCGTGAAAACCCCTTACCGGCAAGACCATCACCCCTT GAGGTGGAGCCCAGTGACACCATCGAAAATGTG	62,4
Ubiquitinrv1	GATGAGCCTCTGCTGGTCCGGGGGAATGCCTTCCTTATCCTGGAT CTTGGCCTTCACATTTTCGATGGTGTCACTGGG	62,4
Ubiquitinrv2	CCTTCTGGATGTTGTAGTCAGAAAGAGTACGGCCGTCTCCAGCT GCTTGCCTGCAAAGATGAGCCTCTGCTGGTCCGG	65,0
Ubiquitinrv3	ACCACCTCTCAGACGCAGGACCAGGTGCAGGGTCGACTCCTTCTG GATGTTGTAGTCAGAAAGAG	60,6
<b>Konstruktion von pHCV-5'UTR-Luc-3'UTR und pHCV-5'UTR-sORF-3'UTR</b>		
JFH1SLStopfw	CTCCCCGCTCGGTAGAGC	65,4
JFH1CoreSL1rv	GTTTAAACCGCCGCCCGCCGGGAACCTAACGTCTTCTGGGCGACG GTTGGTGTTTC	79,4
<b>Konstruktion von pHCV-5'UTRASLIII-sORF-3'UTR</b>		
JFH1ΔSLIIIfw	CCCCGGGAGGTCTCGTAGAC	68,4
JFH1ΔSLIIIrv	CTCCCCGGGAGGGGGGGGCTGG	85,1
<b>qRT-PCR</b>		
Reverse Transkription (RT)		
JFH1rvRT	CGCTCTAAGCCTGACGGTG	61,8
EMCVLucrvRT	CGATATCCATATGGGTGGTGGC	61,7
Luciferaserv	CACGGCGATCTTTCCGCC	66,3
Oligo(dt)19	TTTTTTTTTTTTTTTTTT	38,9
qPCR		
GAPDHfw	AGCCTCAAGATCATCAGCAATGC	60,1
GAPDHrv	ATGGCATGGACTGTGGTCATG	61,3
JFH1-1-fw	TCGACGTTGTTACAAGGTCTCC	60,6



## VII.2 siRNAs

Die in dieser Arbeit verwendeten siRNAs sind in Tab. VII-2 aufgeführt.

**Tab. VII-2: Sequenzen der verwendeten siRNAs**

Name	Sequenz 5'-3'
siGFP	GGCUACGUCCAGGAGCGCACCdTdT
siDDX3-1	UGAGCUUACUCGUUAUACUdTdT
siDDX3-2*	UGGAAGGUAUGGGCGCCGCdTdT

\* verwendet aus Randall *et al.* (2007)

## PUBLIKATIONSLISTE

Teile der vorliegenden Doktorarbeit bzw. verwendete Methoden sind in folgende Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge eingegangen.

VERÖFFENTLICHUNGEN IN FACHZEITSCHRIFTEN

**Geißler R., Golbik RP. & Behrens SE.** (2012) The DEAD-box helicase DDX3 supports the assembly of functional 80S ribosomes. *Nucleic Acids Res: in press*

**Geißler R., Scholze H., Hahn S., Streubel J., Bonas U., Behrens SE. & Boch J.** (2011) Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *PLoS ONE* **6**: e19509

**Reich S., Golbik RP., Geißler R., Lilie H. & Behrens SE.** (2010) Mechanisms of activity and inhibition of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* **285**: 13685-93

**Ziegler J., Facchini PJ., Geißler R., Schmidt J., Ammer C., Kramell R., Voigtländer S., Gesell A., Pienkny S. & Brandt W.** (2009) Evolution of morphine biosynthesis in opium poppy. *Phytochemistry* **70**: 1696-707

**Ziegler J., Brandt W., Geißler R. & Facchini PJ.** (2009) Removal of substrate inhibition and increase in maximal velocity in the short chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase involved in morphine biosynthesis. *J Biol Chem* **284**: 26758-67

**Geißler R., Brandt W. & Ziegler J.** (2007) Molecular modeling and site-directed mutagenesis reveal the benzyloisoquinoline binding site of the short-chain dehydrogenase/reductase salutaridine reductase. *Plant Physiol* **143**: 1493-503

TAGUNGSBEITRÄGE - VORTRÄGE

**Geißler R.**: The function of DDX3 in the cap- and IRES-dependent translation initiation process. DFG Forschergruppe 855 "Cytoplasmic regulation of gene expression", 15.-16.03.2011, Tübingen, Deutschland.

TAGUNGSBEITRÄGE - POSTER

**Geißler R., Patel A. & Behrens SE.:** DDX3 is an auxiliary factor of hepatitis C virus IRES-mediated translation. "18<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses", 08.-12.09.2011, Seattle, WA, USA.

**Winkler E., Aurich H., Geißler R., Mensch A., Stöhr N., Friedrich S., Hüttelmaier S. & Behrens SE.:** Hepatitis C virus replication induces expression of vascular endothelial growth factor and accelerates vascularisation of human hepatoma. "18<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses", 08.-12.09.2011, Seattle, WA, USA.

**Friedrich S., Geißler R. & Behrens SE.:** Cellular RNA-binding proteins are involved in West Nile virus RNA replication. “The complex life of mRNA: From synthesis to decay”, 18.-20.03.2010, Heidelberg, Deutschland.

**Friedrich S., Geißler R. & Behrens SE.:** Cellular RNA-binding proteins are involved in West Nile virus RNA replication. “16<sup>th</sup> International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses”, 03.-07.10.2009, Nizza, Frankreich.

**DANKSAGUNG**

Ich möchte mich bei allen Personen bedanken, die mich während der Anfertigung meiner Doktorarbeit unterstützt haben und somit zum Gelingen beitrugen.

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Sven-Erik Behrens für das Ermöglichen dieser Dissertation in seiner Abteilung. Sein unermüdliches Interesse an meiner Arbeit, seine stete Diskussionsbereitschaft und die kompetente Betreuung waren ausschlaggebend für die Entstehung dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, in der ich die vorliegende Arbeit angefertigt habe, für die angenehme Arbeitsatmosphäre und gute Zusammenarbeit. Mein spezieller Dank gilt an Christine Hamann für die exzellenten Arbeitsbedingungen in der Zellkultur und PD Dr. Ralph Golbik für seine stetige Diskussionsbereitschaft, die vielen Anregungen zu dieser Arbeit sowie das Korrekturlesen.

Herrn PD Dr. Thomas Vogt vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie in Halle möchte ich vielmals für das Korrekturlesen dieser Arbeit danken.

Herrn Dr. Arvind H. Patel von der Universität von Glasgow und Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier von der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die Bereitstellung des anti-DDX3-Antiserums und des IGF2BP1/2-Antikörpers.

Bei Prof. Dr. Takaji Wakita vom National Institute of Infectious Diseases in Tokyo, Dr. Antje Ostareck-Lederer von der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule in Aachen, Dr. Christiane Harnisch und Susann Friedrich möchte ich mich für diverse zur Verfügung gestellte Plasmide bedanken.

Herrn Prof. Dr. Reinhard Lührmann vom Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen danke ich für die Bereitstellung des cytoplasmatischen HeLa-Extrakts.

Mein größtes Dankeschön gilt meiner Familie, meinen Eltern, meiner Schwester Ramona, Doreen und besonders Dany. Ihnen danke ich für die Liebe, die ständige Unterstützung in allen Lebenslagen und für das unentwegte Korrekturlesen.

- D A N K E -

**LEBENS LAUF****Angaben zur Person**

Name René Geißler  
 Wohnort Sternstr. 6  
 06108 Halle (Saale)  
 Geburtstag 30.12.1980  
 Geburtsort Parchim  
 Staatsangehörigkeit Deutsch  
 Familienstand ledig

**Schulbildung**

1987 bis 1993 Grundschule 3, Guben  
 1993 bis 2000 Pestalozzi Gymnasium, Guben  
 Abschluss: Abitur

**Grundwehrdienst**

2000 bis 2001

**Studium**

2001 bis 2006 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
 Diplomarbeit am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Abteilung Naturstoff-Biotechnologie, Arbeitsgruppe Papaver-Genexpressionsanalyse, Halle (Saale) mit dem Thema: „Untersuchungen zur Katalyse und Substratbindung der Salutaridin-Reduktase aus *Papaver bracteatum* L.“  
 Abschluss: Diplom-Biochemiker (Note 1,0)

**Berufstätigkeit**

01.11.2006-14.10.2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie (IPB), Abteilung Sekundärstoffwechsel, Arbeitsgruppe Proteinbiochemie und Metabolite Profiling, Halle (Saale)  
 Seit 15.10.2007 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Abteilung Mikrobielle Biotechnologie

Halle (Saale), den



-----  
 René Geißler

**EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und nur unter Zuhilfenahme der im Quellen- und Literaturverzeichnis aufgeführten Werke angefertigt habe. Textstellen, die aus diesen Werken inhaltlich oder wörtlich übernommen wurden, sind als solche gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die Dissertation ausschließlich der Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegt wurde und ich mich erstmals für die Erlangung des Doktorgrades bewerbe.

Halle (Saale), den



-----  
René Geißler