

ROBERT KOCH INSTITUT



HUMBOLDT-UNIVERSITÄT ZU BERLIN



**MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHE FAKULTÄT I  
INSTITUT FÜR BIOLOGIE**

**MASTERARBEIT  
ZUM ERWERB DES AKADEMISCHEN GRADES  
MASTER OF SCIENCE**

**Untersuchungen zur Rolle von Staufen1 im  
Replikationsmechanismus humaner Retroviren**

**Investigations of the role of Staufen1 in the  
replication mechanism of human retroviruses**

**vorgelegt von  
Alexander Rohde**

**angefertigt im Fachgebiet 18 - HIV und andere Retroviren  
am Robert Koch-Institut**

**Berlin, im September 2013**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
1.1 Retroviren.....	5
1.1.1 Exogene und endogene Retroviren.....	6
1.1.2 Humane Retroviren: HIV-1 und HERV-K(HML-2).....	7
1.1.2.1 Akzessorische Proteine Rev und Rec.....	8
1.2 Staufer.....	9
1.2.1 Virale Wechselwirkungen mit humanem Staufer.....	10
1.3 Cytoplasmatische RNA-Granula.....	11
1.3.1 Bedeutung von Staufer für Stressgranula und Prozessierungskörperchen (P-bodies).....	15
1.3.2 Wechselwirkung von Viren mit den Stressgranula und Prozessierungskörperchen.....	15
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	17
<b>2 Materialien und Methoden.....</b>	<b>18</b>
2.1 Materialien.....	18
2.1.1 Groß- und Spezialgeräte.....	18
2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Größenstandards und Ladepuffer.....	18
2.1.3 Puffer und Nährmedien.....	19
2.1.4 Kits und Enzyme.....	20
2.1.5 Konstrukte und Vektoren.....	20
2.1.6 Oligonukleotide.....	22
2.1.7 Antikörper.....	22
2.1.8 Bakterielle und eukaryotische Zelllinien.....	23
2.1.9 Software.....	23
2.2 Methoden.....	24
2.2.1 DNA-Analytik und mikrobiologische Methoden.....	24
2.2.1.1 Transformation elektrokompenter und chemisch kompetenter Zellen.....	24
2.2.1.2 Plasmidisolation.....	24
2.2.1.3 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese.....	25

2.2.1.4 DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung .....	25
2.2.1.5 Reinigung von Fragmenten aus Restriktionsverdauen und PCR-Ansätzen.....	25
2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	25
2.2.1.7 DNA-Sequenzierung .....	26
2.2.1.8 DNA-Restriktion.....	27
2.2.1.9 Ligation.....	27
2.2.1.10 Anlegen von Glycerinstocks.....	28
2.2.2 Methoden der Zellkultur .....	28
2.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen.....	28
2.2.2.2 Zellzahlbestimmung .....	28
2.2.2.3 Transfektion .....	29
2.2.2.4 Stressen von Zellen .....	30
2.2.3 Proteinanalytik .....	30
2.2.3.1 Zellyse und Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen.....	30
2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Analyse mittels Western Blot .....	30
2.2.3.3 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS).....	33
2.2.3.4 Fluoreszenzfärbungen .....	33
2.2.3.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM) .....	34
<b>3 Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
3.1 Etablierung eines Systems zur Induktion von cytoplasmatischen Staufen1-haltigen Stressgranula und ihre Abgrenzung von Prozessierungskörperchen (P-bodies).....	36
3.2 Untersuchungen zur Einwanderung von Rec und Rev in die Stressgranula.....	38
3.2.1 Nachweis der Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula unter natriumarsenitinduziertem Stress .....	38
3.2.2 Einfluss der Zugabe viraler DNA auf die Einwanderung von Rec und Rev in die Stressgranula .....	42
3.2.3 Untersuchung funktioneller Rev-Mutanten auf ihre Einwanderung in die Stressgranula .....	43
3.2.4 Untersuchungen zur Lokalisation von Rev in den Prozessierungskörperchen.....	51

3.2.5 Einfluss der Staufen1-Überexpression und des Staufen1-Knockdowns auf die Einwanderung von Rec und Rev in die Stressgranula.....	52
3.2.5.1 Nachweis des Knockdowns von ektopischem und endogenem Staufen1 mittels shRNAs und siRNAs.....	52
3.2.5.2 Einfluss des Knockdowns von endogenem Staufen1 sowie der Staufen1-Überexpression auf die Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula .....	56
3.3 Untersuchungen zur Einwanderung von Staufen1 in die Stressgranula .....	61
3.3.1 Analysen zur Einwanderung der Staufen1-Mutanten in die Stressgranula ....	61
3.3.2 Einfluss des Knockdowns von endogenem Staufen1 auf die Lokalisation der Staufen1-Mutanten .....	64
3.3.2.1 Nachweis der Resistenz von ektopischem Staufen1 gegenüber dem Knockdown von endogenem Staufen1 durch die siRNA 3084 .....	65
3.3.2.2 Lokalisation der Staufen1-Mutanten nach endogenem Staufen1-Knockdown.....	68
3.3.3 Herstellung und Charakterisierung weiterer Staufen1-Mutanten zur Identifizierung der verantwortlichen Domäne für die Einwanderung in die Stressgranula .....	70
<b>4 Diskussion .....</b>	<b>78</b>
4.1 Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula .....	78
4.1.1 Einfluss der Zugabe von viraler DNA und der Zugabe von ektopischem Staufen1 sowie des Staufen1-Knockdowns auf die Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula.....	78
4.2 Untersuchungen der Rev-Mutanten auf ihre Lokalisation in den Stressgranula.....	79
4.3 Untersuchungen zur Einwanderung von Rev in die Prozessierungskörperchen und physiologische Bedeutung der Interaktion von HIV-1 mit P-bodies .....	80
4.4 Identifizierung der für den Transport in die Stressgranula verantwortlichen Domäne von Staufen1 .....	82
4.5 Relevanz der Staufen1-Rev- und der Staufen1-Rec-Interaktion im viralen Replikationsmechanismus sowie der Wechselwirkungen von HIV-1 und HERV-K(HML-2) mit den Stressgranula .....	84
4.6 Schlussbemerkungen und Ausblick .....	86

<b>5 Zusammenfassung / Summary .....</b>	<b>88</b>
5.1 Zusammenfassung .....	88
5.2 Summary .....	89
<b>6 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>90</b>
<b>7 Anhang .....</b>	<b>I</b>
7.1 Primer-Sequenzen .....	I
7.2 shRNAs und siRNAs .....	II
7.3 Abkürzungsverzeichnis .....	II
7.4 Danksagung .....	V
7.5 Eigenständigkeitserklärung .....	VI

# 1 Einleitung

## 1.1 Retroviren

Die Familie der Retroviren nimmt auf Grund ihrer besonderen Charakteristika eine Sonderstellung innerhalb der Gruppe der Viren ein. Trotz der großen Diversität innerhalb der Retroviren vereint alle Mitglieder der Besitz einer reversen Transkriptase (der gleichzeitig namensgebend für diese Familie war; Reverse Transkriptase Onkoviren), also eines Enzymes, das die virale genomische RNA in DNA umschreiben kann. Die Entdeckung eines solchen Enzymes widerlegte damals das „Dogma der Molekularbiologie“, das einen unidirektionalen Informationsfluss von DNA zu RNA vorsah. Die biotechnologische Nutzung der reversen Transkriptase hat darüber hinaus bis heute eine große Bedeutung für die molekularbiologische Forschung und Entwicklung.

Retroviren werden häufig in komplexe und einfache Retroviren eingeteilt. Unabhängig von dieser Klassifizierung besitzen die diploiden Genome aller infektiösen Retroviren eine vergleichbare Grundstruktur mit den vier Komponenten *gag-pro-pol-env* (wobei in einigen Darstellungen *pro* und *pol* zu einem Komplex zusammengefasst wird). *Pol* codiert dabei für die reverse Transkriptase und eine Integrase, *pro* enthält die Information für eine virale Protease, *gag* (group-specific antigen) codiert für die Struktur- und Kapsidproteine und *env* (envelope) beinhaltet die Information für die viralen Hüllproteine. Komplexe Retroviren besitzen außerdem zusätzliche (sogenannte akzessorische) Gene, die weitere modulatorische Funktionen vermitteln können oder zelluläre Abläufe zu Gunsten des Virus manipulieren.

Nach der Infektion einer geeigneten Wirtszelle mit einem Retrovirus werden im ersten Schritt die zwei genomischen einzelsträngigen RNAs (ca. 7 bis 10 kb groß) über die im Virion enthaltene reverse Transkriptase in (schlussendlich doppelsträngige) DNA umgeschrieben. Der fehleranfällige Vorgang der Retrotranskription ist häufig mit Mutationen in der Nukleotidsequenz verbunden; dies stellt eine Ursache für die hohe Mutationskapazität von Retroviren dar (Menendez-Arias *et al.*, 2009). Anschließend erfolgt die für Retroviren obligatorische Integration in die Wirts-DNA durch die virale Integrase zum Provirus. Die flankierenden Bereiche des codierenden viralen Genoms, die LTRs (long terminal repeats), besitzen eine Promotoraktivität, die nun die Expression der viralen Proteine induziert. Einfach oder mehrfach gespleißte virale Transkripte dienen dabei zur Proteinsynthese, während genomische Vollängen-RNAs im späteren Verlauf über ein nur in ungespleißten Transkripten enthaltenes Verpackungssignal während der Assemblierung der Virionen in neue virale

Partikel verpackt werden können. Nach der Knospung dieser Partikel, auch als „budding“ bezeichnet, kommt es durch die Aktivität der viralen Protease zu einer Reifung und damit zur Entstehung eines neuen infektiösen Virions.

### **1.1.1 Exogene und endogene Retroviren**

Ihre besonderen Eigenschaften, insbesondere die Befähigung zur reversen Transkription und zur Integration in das jeweilige Wirtszellgenom, erlaubt die Entstehung sogenannter endogener Retroviren, also proviraler Sequenzen im Genom des Wirtes, die von Generation zu Generation weitervererbt werden. In seltenen Fällen gelingt es exogenen Retroviren Zellen der Keimbahn zu infizieren. Wenn diese Infektion und die damit verbundene Integration in das Genom der Zelle die Lebensfähigkeit nicht signifikant einschränkt und unter der Voraussetzung, dass eine derartig infizierte Keimzelle zu Nachkommen führt, kann sich ein exogenes Retrovirus als endogenes Provirus etablieren. Die Vermehrung kann fortan nicht nur horizontal über somatische Zellen, sondern auch vertikal über die Keimbahn erfolgen. Solche Integrationsereignisse sind auf Grund der Fülle an Voraussetzungen selten; über Zeiträume von Millionen von Jahren gesehen allerdings nicht ungewöhnlich.

Heute sind in sehr vielen Wirbeltieren solche retrovirale Genome beschrieben worden, die etwa 6 bis 14 % des Gesamtwirtsgenomes der untersuchten Wirbeltiere ausmachen können (Weiss und Stoye, 2013). Nach der Integration eines exogenen Retrovirus kommt es mit der Zeit zur Anhäufung von Mutationen, die in vielen Fällen die ursprüngliche Replikationskompetenz stark einschränkt oder ganz beseitigt. Eine Weitergabe des nun endogenisierten Retrovirus ist jetzt nur noch vertikal über die Nachkommenschaft des infizierten Wirtes möglich.

Auch im humanen Genom sind eine ganze Reihe von endogenen Retroviren gefunden worden. Etwa 8 % unseres Genomes besteht aus Sequenzen, die Charakteristika von retroviralen Genomen aufweisen; fast die Hälfte unseres Genomes besteht aus Retroelementen, also transposablen Elementen (Deininger und Batzer, 2002). Der Umfang an diesen Elementen veranschaulicht einerseits den Einfluss von Retroviren in der menschlichen Entwicklungsgeschichte, ist aber gleichzeitig auch darin begründet, dass sich viele dieser Retroelemente im Laufe der Evolution über Retrotransposition im Genom ausbreiten konnten. Durch Vergleich der Nukleotidsequenzen der 5'- und 3'-LTRs (die bei exogenen Retroviren identisch sein sollten) konnten über die Anzahl der Unterschiede die Integrationszeitpunkte

der retroviralen Sequenzen geschätzt werden. Diese Zeitpunkte liegen weit verteilt und reichen bis über 60 Millionen Jahre zurück (Tristem, 2000).

Von großem Interesse in der Forschung sind insbesondere die Folgen für den Menschen, die sich aus der Existenz von endogenen retroviralen Genomen ergibt (Kurth und Bannert, 2009). Bereits früh wurde für viele exogene Retroviren ein onkologisches Potential nachgewiesen; ein prominentes Beispiel dafür ist das Rous-Sarkom-Virus, das in infizierten Hühnern Tumore verursachen kann. Die Rolle von humanen endogenen Retroviren bei der Tumorentstehung ist daher Gegenstand vieler Forschungsvorhaben.

Endogene Retroviren könnten aber auch durchaus für den Wirt von Nutzen sein. Virale Hüllproteine, die in der Plazenta synthetisiert werden, scheinen dort beispielsweise eine wichtige physiologische Rolle einzunehmen und entscheidenden Anteil an den vielfältigen Interaktionen zwischen Embryo und Mutter beziehungsweise der Plazentaentwicklung zu haben (Black *et al.*, 2010). Dieses Beispiel veranschaulicht, dass die Bedeutung endogener humaner Retroviren für den Menschen vielschichtiger Natur ist und die Forschung weit davon entfernt ist, die komplexen Beziehungen zwischen Wirt und endogenisiertem Retrovirus ausreichend verstanden zu haben.

### **1.1.2 Humane Retroviren: HIV-1 und HERV-K(HML-2)**

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Retroviren, dem exogenen Retrovirus HIV-1 sowie dem endogenen Retrovirus HERV-K113 (human endogenous retrovirus K113), ein Vertreter der Gruppe HERV-K(HML-2), handelt es sich um komplexe Retroviren, die also akzessorische Proteine besitzen. Die beiden Viren weisen allerdings keine direkte Verwandtschaft auf, da sie unterschiedlichen Unterfamilien zugeordnet sind, nämlich den Lentiviren (HIV-1) beziehungsweise den Betaretroviren (HERV-K(HML-2)). HERV-K113 (bzw. HERV-K(HML-2)) ist ein relativ junges endogenes Retrovirus; auch wenn der genaue Integrationszeitpunkt noch nicht zweifelsfrei feststeht, kann man davon ausgehen, dass die Integration im Vergleich zu anderen endogenen Retroviren noch nicht sehr lange zurückliegt (Turner *et al.*, 2001; Beimforde *et al.*, 2008). Auf Grund dessen sind nur wenige Mutationen in der Genomsequenz zu erwarten; im Gegensatz zu anderen endogenen Retroviren sind die Leserahmen von *gag*, *pro*, *pol* und *env* noch offen, besitzen also keine durch Mutationen entstandene Stoppcodons. In Abbildung 1 ist das etwa 9 kb große Genom von HERV-K113 schematisch dargestellt.



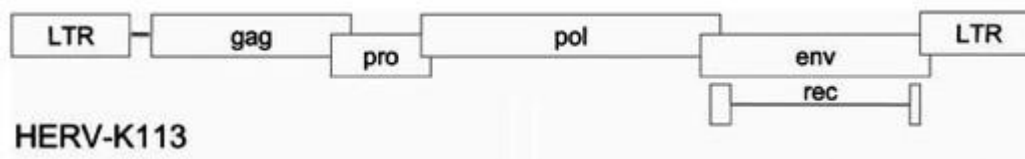


Abbildung 1: Schematischer Aufbau des endogenen Retrovirus HERV-K113 (nach George *et al.*, 2011)

Neben den üblichen Komponenten eines Retrovirus besitzt HERV-K113 bzw. die Gruppe HERV-K(HML-2) das Protein Rec (regulator of expression encoded by cORF), das funktionell dem Analogon in HIV, Rev (regulator of expression of virion proteins, siehe unten), und in HTLV, Rex, ähnelt (Hanke *et al.*, 2013). Trotz der anscheinend intakten Leseraster konnte die volle Replikationskompetenz von HERV-K113 oder eines anderen HERV-K(HML-2)-Elementes im Menschen bis heute nicht nachgewiesen werden (Beimforde *et al.*, 2008).

HIV-1 ist eines von vier exogenen, humanpathogenen Retroviren (neben HIV-2 sowie HTLV-1 und HTLV-2), die von Mensch zu Mensch übertragen werden können. Obwohl erst vor einigen Jahrzehnten entdeckt, hat es sich innerhalb von kürzester Zeit zu einer globalen Epidemie entwickelt. Es kodiert für sechs akzessorische Proteine (darunter Rev), die vielfältige Funktionen wahrnehmen und unter anderem dazu beitragen, der Detektion durch das Immunsystem des Menschen erfolgreich zu entgehen.

### 1.1.2.1 Rev und Rec

Einfache und komplexe Retroviren verfolgen unterschiedliche Strategien, um ungespleißte Vollängentranskripte aus dem Zellkern zu transportieren. Einfache Retroviren verwenden dazu spezielle konstitutive Exportelemente (CTEs), um von zellulären Proteinen ins Cytoplasma transportiert zu werden. Komplexe Retroviren wie HIV, HTLV und HERV-K(HML-2) verwenden dagegen virale akzessorische Proteine wie Rev (HIV), Rex (HTLV) oder Rec (HERV-K(HML-2)), die in Zusammenarbeit mit Proteinen der Wirtszelle (zum Beispiel Crm-1) diesen Vorgang vermitteln. Diese kleinen, gut 100 Aminosäuren großen Proteine (Rec: 105 Aminosäuren, Rev: 116 Aminosäuren) binden an bestimmte RNA-Sequenzen mit Haarnadelstrukturen (sogenannte Rev, Rex oder Rec responsive elements; RRE, RxRE und RcRE) auf den ungespleißten (bzw. unvollständig gespleißten) Vollängentranskripten und vermitteln dadurch den Export aus dem Zellkern. Außerdem sind

zumindest für Rev noch weitere Funktionen, zum Beispiel in der Verpackung der viralen genomischen RNA, beschrieben worden (Brandt *et al.*, 2007; Malim *et al.*, 1991).

Abbildung 2 zeigt schematisch den Aufbau des Rev-Proteins und kennzeichnet wichtige funktionelle Domänen:

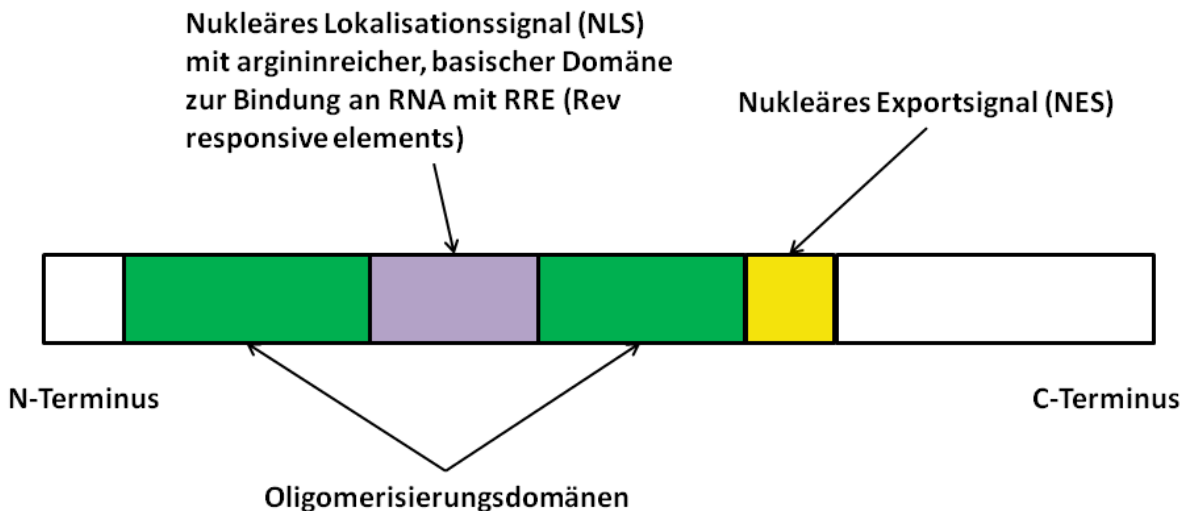


Abbildung 2: Schematischer Aufbau des Rev-Proteins von HIV-1

## 1.2 Staufen

Das Staufenprotein wurde erstmals in der Embryogenese von *Drosophila melanogaster* entdeckt und seine Rolle hinsichtlich der polarisierten Verteilung und des Transportes maternaler mRNAs charakterisiert (St Johnston *et al.*, 1991; Ferrandon *et al.*, 1994). Staufen ist ein modular aufgebautes Transportprotein für doppelsträngige RNA. Es besteht aus mehreren charakteristischen, konservierten Domänen, die doppelsträngige RNAs erkennen und binden können (dsRBD; dsRNA binding domain). In Säugetieren existieren im Gegensatz zu *Drosophila* zwei homologe Gene, *Staufen1* und *Staufen2*, die für mehrere Isoformen kodieren. Im Menschen sind zwei *Staufen1*-Isoformen mit einem Molekulargewicht von 55 kDa (entspricht 496 Aminosäuren) und einer schwächer exprimierten 63 kDa-Variante (mit 577 Aminosäuren) bekannt. Für *Staufen2* sind insgesamt vier verschiedene Spleißvarianten beschrieben worden. Während *Staufen2* primär in den Nervenzellen lokalisiert ist, wird *Staufen1* ubiquitär exprimiert. In Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung des *Staufen1*-Proteins gezeigt von der in dieser Arbeit verwendeten 55 kDa-Variante.



Abbildung 3: Schematische Darstellung des *Staufen1*-Proteins

TBD: Tubulin-Bindedomäne; RBD: dsRNA-Bindedomäne. Hinweis: Die Domäne RBD1 existiert nur für *Staufen2* und bei dem *Staufen*-homolog in *Drosophila melanogaster*.

Nur zwei der vier konservierten dsRNA-Bindedomäne, nämlich RBD3 und RBD4, zeigen eine tatsächliche Bindeaktivität für doppelsträngige RNA, wobei RBD3 eine deutlich stärkere Affinität zu RNA aufweist (Wickham *et al.*, 1999). Darüber hinaus kann Staufen1 auch über die Tubulin-Bindedomäne an Mikrotubuli binden, was für seine Funktion als Transportprotein wichtig ist. Mehrere Veröffentlichungen ergaben, dass Staufen1 in der Zelle Dimere sowie hetero- und homooligomere Strukturen bildet. Diese Selbstassoziation beziehungsweise die Interaktionen mit anderen Proteinen scheint vor allem von RBD2 und RBD5 sowie der Region zwischen TBD und RBD5 vermittelt zu werden (Gleghorn *et al.*, 2013; Martel *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2002). Nukleäre Lokalisierungssequenzen, in und zwischen RBD3 und RBD4 gelegen, erlauben dem Protein zwischen Zellkern und Cytoplasma zu pendeln, wobei der Großteil des Proteins im Cytoplasma lokalisiert ist und hier insbesondere mit dem rauen endoplasmatischen Retikulum oder ungebundenen Polysomen assoziiert ist (Martel *et al.*, 2006). Darüber hinaus wird Staufen1 (und ferner auch Staufen2) in mehrere cytoplasmatische RNA-Granula rekrutiert (siehe Abschnitt 1.3).

Staufen1 spielt in einer ganzen Reihe von zellulären Vorgängen eine Rolle. Es konnte gezeigt werden, dass im Falle der auch in dieser Arbeit verwendeten HEK 293T-Zellen etwa 7 % aller mRNAs zusammen mit Staufen1 Ribonukleoproteine ausbilden können und damit den Transport dieser Transkripte steuern (Furic *et al.*, 2008). Außerdem kann die Bindung von Staufen1 an diese mRNAs deren Translation erleichtern. Darüber hinaus ist Staufen1 aber auch an Abbauprozessen von mRNAs maßgeblich involviert; außerdem interagiert es mit Proteinen, die in einem alternativen Weg den Abbau von mRNAs mit einem irrtümlich entstandenen Stoppcodon (nonsense-mediated mRNA decay) vermitteln (Kim *et al.*, 2005).

### **1.2.1 Virale Wechselwirkungen mit humanem Staufen1**

Staufen1 ist für den Replikationsmechanismus mehrerer medizinisch hochrelevanter humanpathogener Viren wie HIV-1, Hepatitis C oder Influenza von Bedeutung. So interagiert beispielweise das Influenzavirusprotein NS1 (non-structural protein 1) mit der Region zwischen RBD3 und RBD4; eine Störung dieser Bindung verringert die Replikationseffizienz deutlich (Lee *et al.*, 2011). Möglicherweise manipuliert das Virus dadurch den durch Staufen1 vermittelten mRNA-Abbau zu seinen Gunsten. Im Falle von Hepatitis C verursacht ein Staufen1-Knockdown einen deutlichen Rückgang an sekretierten Virionen und intrazellulären viralen Genprodukten (Blackham *et al.*, 2013).

Im Falle von HIV-1 konnte gezeigt werden, dass Staufen1 zusammen mit dem viralen Protein Gag und genomischer HIV-1-RNA Ribonukleoproteinkomplexe ausbildet, die Kapsidbildung beeinflusst und die Verpackung von viraler RNA begünstigt (Milev *et al.*, 2011; Chatel-Chaix *et al.*, 2007; Abrahamyan *et al.*, 2010). Darüber hinaus wird Staufen1 auch direkt in die viralen Partikel inkorporiert (Mouland *et al.*, 2000).

Für die beiden retroviralen akzessorischen Proteine Rev (HIV-1) beziehungsweise Rec (HERV-K(HML-2)) wurden vor kurzem ebenfalls Wechselwirkungen mit Staufen1 nachgewiesen (Hanke *et al.*, 2013; für Rev noch in Vorbereitung). Die Interaktion von Staufen1 mit den viralen Proteinen könnte eine wichtige Rolle beim nukleozytoplasmatischen Export und Transport viraler genomischer RNA spielen. Während das Rev-Protein in diesen Untersuchungen mit der RBD3 Domäne von Staufen1 interagierte, so identifizierte man im Fall von Rec RBD4 als Interaktionsdomäne.

### **1.3 Cytoplasmatische RNA-Granula**

Nicht immer werden mRNAs direkt nach dem Transport vom Zellkern ins Cytoplasma der Translation zugeführt. In vielen Fällen kann man eine Akkumulation in sogenannten RNA-Granula beobachten. Die mRNAs in diesen RNA-Granula sind (zumindest vorübergehend) den zellulären Translationsvorgängen entzogen. Inzwischen wurde eine ganze Reihe von diesen cytoplasmatisch lokalisierten RNA-Granula beschrieben, die mit unterschiedlichen Funktionen assoziiert worden sind. Neben den Stressgranula, auf die im Folgenden näher eingegangen werden soll, kennt man vor allem die mit den Stressgranula funktionell verwandten Prozessierungskörperchen, auch „P-bodies“ genannt, sowie die bereits seit längerem bekannten Keimzellgranula („germ cell granules“) und neuronalen Granula (Thomas *et al.*, 2011). Neben mRNAs können sich in RNA-Granula auch eine ganze Reihe nicht kodierender RNAs befinden.

#### **Keimzellgranula**

Bereits der russische Biologe Metchnikoff beobachtete vor über hundert Jahren granulaartige, cytoplasmatische Strukturen in der Keimbahnentwicklung von Insekten. Diese Keimzellgranula wurden später intensiv bei Modellorganismen wie dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* oder der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* untersucht. Keimzellgranula spielen eine wichtige Rolle bei der embryonalen Zelldifferenzierung und

haben oftmals eine stark polarisierte Lokalisation in der Zelle, die die asymmetrische Weitergabe maternaler Transkripte bei der Zellteilung unterstützt (Gao und Arkov, 2012).

### **Neuronale Granula**

Bei der zweiten prominenten Gruppe von RNA-Granula, den neuronalen Granula, handelt es sich um Aggregate von mRNAs, ribosomalen Proteinen und Translationsinitiationsfaktoren. Diese Aggregate werden über Mikrotubuli entlang der Dendriten und Axone zu ihrem Bestimmungsort (z. B. der Synapse) transportiert, was eine insbesondere für lang gestreckte Zellen wie Neuronen vorteilhafte ortsspezifische Proteinbiosynthese ermöglicht. Bei einem externen Stimulus kommt es dann zur (partiellen) Freisetzung von mRNAs und Translationsfaktoren (Miki *et al.*, 2005). Sowohl Stau1 und Stau2 wurden in diesen neuronalen Granula gefunden; interessanterweise allerdings nicht in denselben Granula (Duchaine *et al.*, 2002). Dies legt nahe, dass neuronale Granula in weitere Subtypen unterteilt werden können.

### **Stressgranula und Prozessierungskörperchen (P-bodies)**

Die erst später entdeckten und beschriebenen Stressgranula und Prozessierungskörperchen werden häufig in einem Atemzug genannt, obwohl sie (trotz einiger Gemeinsamkeiten) durchaus klar unterscheidbare Charakteristika aufweisen.

Stressgranula wurden zunächst bei Tomatenpflanzen nach einem Hitzeschock beschrieben (Nover *et al.*, 1989), aber sind bereits kurze Zeit später auch in vielen Säugetiersystemen als Reaktion auf eine ganze Reihe von anderen Stressfaktoren wie Arsenit, UV-Licht und bestimmten Chemikalien beobachtet worden (Thomas *et al.*, 2011). Der Stressinduktor scheint dabei einen gewissen Einfluss auf die RNA- und Proteinzusammensetzung dieser Granula zu haben. Einige mRNAs, darunter interessanterweise solche deren Genprodukte in der Stressantwort involviert sind (z. B. Chaperone, HSP70 etc.), werden nicht in diese Granula rekrutiert und können weiterhin translatiert werden (Anderson und Kedersha, 2002).

Stressgranula beinhalten wie auch die neuronalen Granula ribosomale Bestandteile (mit Ausnahme der großen Untereinheit) und eine ganze Reihe von Initiationsfaktoren. Die Bildung von Stressgranula beginnt in der Regel mit der Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  durch eine (von mehreren verschiedenen) stressinduzierte Kinase. Die Blockade der Translation führt in der Folge schrittweise zu einer Akkumulation

von mehreren verschiedenen Proteinen, darunter viele mit einer unmittelbaren Funktion in der Translation oder inhärenten RNA-Bindeaktivität, wodurch die mRNAs in die Stressgranula rekrutiert werden. Das RNA-Bindeprotein TIA-1 (T-cell internal antigen-1) ist eines der Proteine, die diese Aggregation insbesondere bei arsenitinduziertem oxidativen Stress vermitteln können, und wird häufig als Markerprotein für Stressgranula verwendet (Gilks *et al.*, 2004). Auch in dieser Arbeit ist es für die Visualisierung in Fluoreszenzaufnahmen genutzt worden.

Die Bildung und Akkumulation von Stressgranula, die unter günstigen Wachstumsbedingungen im Gegensatz zu den anderen hier beschriebenen RNA-Granula nicht zu beobachten sind, erfolgt dabei hoch dynamisch und relativ schnell (innerhalb von 30 min). Stressgranula können in ihrer Größe erheblich variieren; Fusionen und Teilung dieser Granula sind dabei nicht selten. Nach Abklingen des Stressimpulses lösen sich die Strukturen wieder auf und die mRNAs können wieder in den Translationsprozess eintreten. Stressgranula sind somit transiente Strukturen; in ihnen befindliche mRNAs müssen nicht zwangsläufig Degradationsprozessen ausgesetzt sein, vielmehr können sie unter Stressbedingungen für einen gewissen Zeitraum gelagert werden.

Über die zellphysiologische Rolle von Stressgranula herrscht in der Literatur noch Uneinigkeit (Buchan und Parker, 2009). Lange Zeit dominierte die Vermutung, dass Stressgranula eine globale Translationsinhibition vermitteln und durch eine Art Selektionsprozess vorhandene mRNAs entweder geschützt und stabil gelagert werden oder an P-bodies (siehe unten) weitergereicht werden. Diese Funktion wird von einigen Wissenschaftlern aber zunehmend in Frage gestellt. Alternativ wird vorgeschlagen, dass die Konzentrierung bestimmter Proteine und mRNAs in den Stressgranula bestimmte enzymatische Reaktionen oder die Bildung spezifischer Ribonukleoproteinkomplexe fördert und bestimmte seltenere Translationsprozesse ermöglicht (zum Beispiel für mRNAs mit interner ribosomaler Eintrittsstelle (IRES) und einer damit verbundenen leichteren Translationsiniation unter Stressbedingungen im Vergleich zu mRNAs ohne IRES). Dazu passt, dass einige Untersuchungen gezeigt haben, dass bestimmte mRNAs (darunter solche, die für Proteine mit einer Rolle in der Stressantwort kodieren) unter Stressbedingungen deutlich besser translatiert werden.

Andere Theorien betonen dagegen die Wichtigkeit der Stressgranula in der Vermeidung der Apoptose, da eine ganze Reihe von Apoptosefaktoren in den Stressgranula gebunden werden können, die damit dem cytoplasmatischen Pool wirkungsvoll entzogen werden. Für alle genannten Hypothesen fehlen aber bisher umfassende experimentelle Belege, sodass die genaue Funktion (oder besser Funktionen) der Stressgranula bis auf weiteres strittig bleibt.

Anders verhält es sich mit den konstitutiv in jeder Zelle vorkommenden Prozessierungskörperchen, den „P-bodies“. Unter Stressbedingungen expandieren auch diese RNA-Granula hinsichtlich ihrer Größe, allerdings in geringerem Umfang als Stressgranula. Sie enthalten im Gegensatz zu den Stressgranula weder Initiationsfaktoren noch ribosomale Bestandteile, sondern beinhalten wichtige Bestandteile der RNA-Abbaumaschinerie beziehungsweise deren einleitenden Schritte. So sind zum Beispiel Decappingenzyme (wie DCP1 und DCP2) und Exonukleasen in den Prozessierungskörperchen zu finden (Kedersha *et al.*, 2006). Außerdem hat man in den Prozessierungskörperchen von Säugetieren mehrere Proteine des RNA-induzierten Silencingkomplexes (RISC) identifizieren können (Liu *et al.*, 2005); ein weiteres Indiz für die wichtige Rolle von Prozessierungskörperchen im mRNA-Metabolismus.

P-bodies und Stressgranula liegen häufig in direkter Nachbarschaft zueinander. Die deutlich kleineren P-bodies sind sehr viel mobiler als die Stressgranula, ändern ihre Form und Größe im Vergleich zu den Stressgranula aber kaum. Einige Proteine finden sich sowohl in P-bodies als auch in den Stressgranula. Obwohl ein tieferes Verständnis für die Natur der Wechselwirkungen zwischen diesen beiden RNA-Granula noch fehlt, liegt die Vermutung nahe, dass auch auf mRNA-Ebene ein Austausch von Ribonukleoproteinen stattfinden kann. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass unter bestimmten Umständen Stressgranula und P-bodies teilweise oder sogar ganz miteinander fusionieren können (Thomas *et al.*, 2009). Der ständige und rasche Austausch von Proteinkomponenten und bestimmter mRNAs mit dem Cytoplasma ist inzwischen gut dokumentiert (Mollet *et al.*, 2008; Buchan und Parker, 2009). Auf Grund der erstaunlich hohen Dynamik des Austausches von mRNAs mit dem Cytoplasma bezweifeln einige Wissenschaftler die Bedeutung der Stressgranula als stabilen Speicherort für mRNAs beziehungsweise die Bedeutung von P-bodies als Ort der mRNA-Degradation.

### **1.3.1 Bedeutung von Stau1 für Stressgranula und Prozessierungskörperchen (P-bodies)**

Als Proteine mit RNA-Bindeaktivität sind sowohl Stau1 wie auch Stau2 in den neuronalen RNA-Granula vertreten sowie in den Keimzellgranula. Stau1 und Stau2 wird darüber hinaus auch in die Stressgranula rekrutiert (Thomas *et al.*, 2005). Stau1 ist allerdings keine notwendige Komponente für die Entstehung von Stressgranula. Interessanterweise scheint die Überexpression von Stau1 die Bildung von Stressgranula zu inhibieren, während der Knockdown von Stau1 die Bildung von Stressgranula begünstigt (Thomas *et al.*, 2009). Stau1 wird daher eine wichtige Rolle bei der Auflösung der Stressgranula zugeschrieben beziehungsweise bei der Stabilisierung von Polysomen.

Über die Präsenz von Stau1 in den P-bodies existieren in der Literatur unterschiedliche Angaben, zumindest in der Fruchtfliege ist Stau1 in den P-bodies vorhanden (Barbee *et al.*, 2006), bei Säugetieren scheint Stau1 nicht oder nur in relativ geringem Umfang in den P-bodies lokalisiert zu sein (Thomas *et al.*, 2009).

### **1.3.2 Wechselwirkung von Viren mit den Stressgranula und Prozessierungskörperchen (P-bodies)**

Viele Viren scheinen auf vielfältige Weise mit den Stressgranula (und ferner auch den P-bodies) interagieren zu können (Montero, 2011). Diese Wechselwirkungen können dabei darauf abzielen, die Bildung von Stressgranula zu unterbinden (mutmaßlich häufigstes Szenario), die Existenz von Stressgranula zu tolerieren oder sogar deren Bildung zu induzieren, um Vorteile für den eigenen Replikationsmechanismus zu erzielen. Die große Varianz an Interaktionen kann nicht überraschen, wenn man sich vor Augen führt, dass der Transport viraler mRNAs oder sogar genomischer RNAs in den Stressgranula und P-bodies erheblichen Einfluss auf die effiziente Replikation von Viren haben kann.

Virale Infektionen lösen in vielen befallenen Zellen eine Stressantwort hervor. Eine Reihe von Kinasen werden nach einer Infektion aktiviert (z. B. die durch doppelsträngige RNA aktivierbare Proteinkinase K) und induzieren über die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  die bereits beschriebene Stressgranulabildung. Auch eine Interferonantwort kann die Bildung von Stressgranula stimulieren. Sowohl für RNA-Viren wie auch DNA-Viren sind eine Reihe von inhibitorischen Effekten beschrieben worden (White und Lloyd, 2012), so kontrolliert beispielsweise das Poliovirus oder Herpes Simplex Virus 1 die Bildung von Stressgranula auf



mehreren Ebenen und repliziert deutlich schlechter, wenn diese Manipulationsstrategien künstlich gestört werden. Einige Viren wie das Vacciniavirus (der Erreger der Kuhpocken) oder Coronaviren profitieren möglicherweise von der Bildung von Stressgranula, da dadurch bestimmte (virale) RNAs und Proteine aufkonzentriert werden können.

Die zwei humanen Retroviren HIV-1 und HTLV-1 manipulieren beide die Bildung von Stressgranula. HIV-1 beeinflusst zwar nicht den initialen Schritt der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung, scheint aber über eine Wechselwirkung des viralen Proteins Gag mit Stau1 und viraler genomischer RNA die Bildung von Stressgranula (sowie ferner der P-bodies) erheblich zu beeinträchtigen (Abrahamyan *et al.*, 2010). Für HTLV-1 wurde gezeigt, dass eine cytoplasmatische Lokalisation des viralen Proteins Tax die Bildung von Stressgranula unterdrückt, während eine Lokalisation von Tax im Zellkern die Bildung in moderatem Umfang zulässt (Legros *et al.*, 2011).

Schließlich ist ein weiterer Aspekt der Wechselwirkung mit Viren zu erwähnen: Stressgranula und P-bodies könnten in der antiviralen Abwehr involviert sein. Einige Proteine mit bekannter antiviraler Aktivität akkumulieren in beiden Granulaformen, unter ihnen auch das bekannte APOBEC3G (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G), das insbesondere mit der Replikation von Retroviren interferieren kann (Gallois-Montbrun *et al.*, 2007).

## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die Interaktionen zwischen den akzessorischen viralen Proteinen Rec des endogenen Retrovirus HERV-K(HML-2) und Rev des exogenen Retrovirus HIV-1 mit dem humanen Protein Staufen1 sind bereits in vorangegangenen Untersuchungen nachgewiesen worden. Diese Wechselwirkungen sind für den Transport von viralen Volllängengenomen aus dem Zellkern in das Cytoplasma von großer Bedeutung.

Über Staufen1 ist bekannt, dass es einen nicht essentiellen Bestandteil von cytoplasmatischen Stressgranula darstellt. Die Lokalisation von Rec in diesen Granula unter Stressbedingungen, nicht jedoch in den Prozessierungskörperchen, ist erst vor kurzem beschrieben worden (Hanke *et al.*, 2013). Auch für das Rev-Protein konnte in vorhergehenden Untersuchungen ebenfalls eine Einwanderung in die Stressgranula beobachtet werden.

In dieser Arbeit sollen die genauen Mechanismen und zellulären Bedingungen, die für die bisher noch kaum charakterisierte Einwanderung dieser beiden Proteine in die Stressgranula verantwortlich sind, näher untersucht werden und ein Vergleich zwischen den Eigenschaften von Rev und Rec in Bezug auf ihre Rekrutierung in diese Granula angestellt werden.

In diesem Zusammenhang ist erstens von Interesse, inwiefern die Präsenz von viralen genomischen RNAs für die Einwanderung in die Stressgranula erforderlich ist. Über eine Mutantensammlung des Rev-Proteins soll zweitens näher analysiert werden, welche funktionellen Bereiche im Falle von Rev für die Einwanderung in die Stressgranula erforderlich sind und ob Rev auch in den Prozessierungskörperchen zu finden ist. Drittens soll geprüft werden, ob eine mittels RNA-Interferenz verursachte Reduktion von endogenem Staufen1 beziehungsweise die Überexpression von Staufen1 einen Einfluss auf die Lokalisation der beiden viralen Proteine Rec und Rev in den Stressgranula hat. Viertens soll schließlich die Domäne des Staufen1-Proteins identifiziert werden, die die Lokalisation in den Stressgranula vermittelt.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Groß- und Spezialgeräte

In Tabelle 1 sind die Apparaturen zusammengestellt, die über die übliche Standardausrüstung eines biologischen Labors hinausgehen. Darüber hinaus verwendete Kleingeräte wie zum Beispiel Tischzentrifugen, Lichtmikroskope, Blottingapparaturen oder Gelelektrophoresevorrichtungen stammten von den Herstellern BioRad, Carl Zeiss, Bioview, Eppendorf, Heraeus, GFL, New Brunswick Scientific, IKA, Carl Roth, Hirschmann, Kendro oder Stratagene.

Apparatur/Großgerät	Hersteller
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 780	Carl Zeiss
Konfokales Laser-Scanning-Mikroskop LSM 510	Carl Zeiss
FACS Calibur	BD Biosciences
CO <sub>2</sub> Inkubator C200	Labotect
Odyssey Infrared Imager	LI-COR
NanoDrop Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop
Beckman Coulter-Counter Z2	Beckman Coulter

**Tabelle 1: Verwendete Großgeräte**

#### 2.1.2 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Größenstandards und Ladepuffer

Die verwendeten Standardchemikalien und Verbrauchsmaterialien wurden von Carl Roth, Peqlab, Serva, Invitrogen, BioRad, Techno Plastic Products, Braun, Fermentas, Sigma-Aldrich, Roche Diagnostics, Merck, TTP/Biochrom, Simport, Gibco und Nunc bezogen. Die zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen und Nukleinsäuren eingesetzten Ladepuffer und Größenstandards sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Größenstandard / Ladepuffer	Bezugsquelle
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas
DNA Loading Dye (5 x)	Qiagen
PAGERuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific

**Tabelle 2: Verwendete Größenstandards**

### 2.1.3 Puffer und Nährmedien

Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ist in Tabelle 3 aufgeführt.

Puffer/Nährmedium	Zusammensetzung
PBS	137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 2 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> in H <sub>2</sub> O dest. (pH 7,0)
TAE	40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA in H <sub>2</sub> O dest. (pH 7,2)
SOC-Medium	2 % (w/v) Bacto-Trypton, 0,5 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgS, 20 mM Glucose
LB-Medium	1 % (w/v) Bacto-Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl in H <sub>2</sub> O dest.
LB-Agar	2 % (w/v) Agar in LB-Medium
Kryomedium	50 % LB-Medium (v/v), 50 % Glycerin (v/v)
Lysispuffer	1 % (v/v) Triton X-100, 20 mM Tris (pH 7,7), 150 mM NaCl

#### Lösungen für SDS-PAGE / Western Blot

Laemmli-Puffer (4 x)	200 mM Tris-HCl (pH 8,3), 8 % (w/v) SDS, 0,02 % (w/v) Bromphenolblau, 40 % (v/v) Glycerin, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol
Laufpuffer	25 mM Tris (pH 8,3), 19,2 mM Glycin, 0,01 % (w/v) SDS
Transferpuffer	25 mM Tris (pH 8,3), 19,2 mM Glycin
Blockierpuffer „ohne“	5 % (w/v) Magermilchpulver in PBS
Blockierpuffer „mit“	5 % (w/v) Magermilchpulver, 0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS
Waschpuffer	0,1 % (v/v) Tween 20 in PBS

#### Lösungen für Fluoreszenzpräparate

Fixierpuffer	3 % (w/v) Formaldehyd in PBS
Permeabilisierungspuffer	1 % (v/v) Triton X-100 in PBS
Blockierpuffer	1 % (w/v) Magermilchpulver in PBS
Mowiol	24 g Glycerin, 9,6 g Mowiol 4-88, 24 ml H <sub>2</sub> O bidest., 48 ml Tris-HCl 0,2 M (pH 8,5)

## Lösungen für die Zellkultur

Trypsin/EDTA	0,25 % (w/v) Trypsin, 0,2 % (v/v) EDTA in H <sub>2</sub> O dest.
DMEM + + +	89,5 % (v/v) Dulbecco`s modified Eagles medium („high glucose“ oder „low glucose“), 10 % (v/v) fetales Kälberserum, 0,5 % (v/v) Penicillin/Streptomycin-Lösung (je 10 mg/ml), 2 mM Glutamin

**Tabelle 3: Verwendete Puffer und Nährlösungen und ihre Zusammensetzung**

### 2.1.4 Kits und Enzyme

Kit	Hersteller
QIA Prep Spin Miniprep Kit	Qiagen
Endo-free Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen
BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	ABI Terminator Chemie, Applied Biosystems
PolyFect Transfection Reagent	Qiagen
Effectene Transfection Reagent	Qiagen

**Tabelle 4: Verwendete Kits und ihre Bezugsquelle**

Enzym	Hersteller
HindIII	New England Biolabs
KpnI	New England Biolabs
NotI	New England Biolabs
SacI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific
<i>Pfu</i> Turbo DNA-Polymerase	Stratagene
Dream <i>Taq</i> Green DNA-Polymerase	Thermo Scientific

**Tabelle 5: Verwendete Enzyme und ihre Bezugsquelle**

### 2.1.5 Konstrukte und Vektoren

Name und Vektorgerüst	Bezugsquelle
pmCherry-N1-Staufen1	Dr. Kirsten Hanke
pCMVTag2B-Staufen1	Dr. Kirsten Hanke

pCMVTag2B-ΔN-Term./RBD2-Staufen1	Jula Wamara
pCMVTag2B-ΔRBD3-Staufen1	Jula Wamara
pCMVTag2B-ΔRBD4-Staufen1	Jula Wamara
pCMVTag2B-F135A-Staufen1	Jula Wamara
pCMVTag2B-ΔTBD/RBD5-Staufen1	Jula Wamara
pLVTHM-shRNA-C1	Jula Wamara
pLVTHM-shRNA-C3	Jula Wamara
pLVTHM-shRNA-A7	Jula Wamara
pLVTHM-shRNA-A2C4	Jula Wamara
pLVTHM-shRNA-B3	Jula Wamara
pcDNA3.1-wtRec-V5	Dr. Norbert Bannert
pEGFP-oricoRec	Dr. Kirsten Hanke
pcDNA3.1-Rev-V5	Dr. Norbert Bannert
pEYFP-N1-Rev	Dr. Kirsten Hanke
pEYFP-N1-Δ32-Rev	Katharina Fideke
pEYFP-N1-Δ48-Rev	Katharina Fideke
pEYFP-N1-Δ63-Rev	Katharina Fideke
pEYFP-N1-M5-Rev	Katharina Fideke
pEYFP-N1-M10-Rev	Katharina Fideke
pEYFP-N1-SLT-Rev	Katharina Fideke
pcDNA3.1-Δ32-Rev-V5	Katharina Fideke
pcDNA3.1-Δ48-Rev-V5	Katharina Fideke
pcDNA3.1-Δ63-Rev-V5	Katharina Fideke
pcDNA3.1-M5-Rev-V5	Katharina Fideke
pcDNA3.1-M10-Rev-V5	Katharina Fideke
pcDNA3.1-SLT-Rev-V5	Katharina Fideke
pEYFP-TIA-1	Dr. Nancy Kedersha <i>et al.</i>
pmRFP-DCP1a	Dr. Nancy Kedersha <i>et al.</i>
pSIvec1envLuc („SHIV“)	Dr. Norbert Bannert
pBSK-HERV-K113 („oriK113“)	Dr. Nadine Beimforde

---

**Tabelle 6: Verwendete Plasmide und ihre Bezugsquelle**

Die auf jedem dieser Plasmide kodierten und verwendeten Selektionsmarker sind in Tabelle 7 zusammengestellt worden.

Name	Selektionsmarker in <i>Escherichia coli</i>
pmCherry-N1	Kanamycin
pCMVTag2B	Kanamycin
pcDNA3.1	Ampicillin
pEGFP	Ampicillin
pEYFP	Ampicillin
pEYFP-N1	Ampicillin
pLVTHM	Ampicillin
pBSK	Ampicillin

**Tabelle 7: Verwendete Plasmide und ihre Selektionsmarker**

Die beiden Plasmide pBSK-HERV-K113 („oriK113“) sowie pSIVec1envLuc („SHIV“) dienten in diesen Versuchen als Äquivalent zu dem viralen Provirus, also den integrierten Genomen von HERV-K(HML-2) und HIV-1. Der lentivirale SHIV-Vektor besitzt Teile des humanen und des simianen (also „affenartigen“) Immundefizienzvirus, ist aber für sich genommen auf Grund des unvollständigen Genoms nicht replikationsfähig. Er wird häufig für die Pseudotypisierung und Herstellung lentiviraler Partikel unter Kotransfektion mit einem Rev-kodierenden Plasmid und einem viralen Hüllprotein verwendet. Das Produkt sind „single round“-Viren, die nur dazu fähig sind, einmalig in eine Zelle einzudringen und in das Wirtsgenom zu integrieren. Der Einbau eines Luziferasegens macht den SHIV-Vektor außerdem zu einem geeigneten Reporterkonstrukt.

### 2.1.6 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden als Lyophilisate von Invitrogen bezogen. Die Primer wurden zunächst mit der entsprechenden Menge an H<sub>2</sub>O auf eine Stammlösung von 100 µM gelöst und anschließend daraus Arbeitslösungen mit einer Konzentration von 10 µM hergestellt. siRNAs wurden in nukleasefreien Wasser gelöst, auf eine Endkonzentration von 20 µM gebracht und als Aliquots bei – 20 °C gelagert.

### 2.1.7 Antikörper

Antikörperbezeichnung bzw. Spezifikation	Spezies	Bezugsquelle
α-Flag	Kaninchen	Sigma-Aldrich
α-V5	Ziege	AbD Serotec

$\alpha$ -V5-Cy3	Maus	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -Aktin	Maus	Sigma-Aldrich
$\alpha$ -Staufen1	Ratte	Dr. Oliver Hohn, RKI
$\alpha$ -mCherry	Maus	Abcam
$\alpha$ -Ratte-Alexa 488	Ziege	Invitrogen
$\alpha$ -Kaninchen-Alexa 568	Ziege	Invitrogen
$\alpha$ -Ratte-Alexa 680	Ziege	Invitrogen
$\alpha$ -Maus-IR-Dye 800	Esel	LI-COR Biosciences

**Tabelle 8: Verwendete Antikörper und ihre Herkunftsspezies bzw. Bezugsquelle**

## 2.1.8 Bakterielle und eukaryotische Zelllinien

### Kompetente Bakterienzellen

Bezeichnung	Organismus	Bezugsquelle
One Shot Stbl3	<i>Escherichia coli</i>	Invitrogen
One Shot Top10	<i>Escherichia coli</i>	Invitrogen

### Eukaryotische Zellen

Bezeichnung	Organismus	Ursprungsgewebe
HEK 293T	<i>Homo sapiens</i>	Transformierte embryonale Nierenzellen

**Tabelle 9: Verwendete Zelllinien und ihre Bezugsquelle bzw. Ursprungsgewebe**

## 2.1.9 Software

Zur Analyse der Aufnahmen am konfokalen Lasermikroskop wurden die Gerätesoftware ZEN 2012 Blue Edition sowie die ältere Version ZEN 2009 Light Edition von der Firma Carl Zeiss verwendet. Die Signalquantifizierung der Western Blots erfolgte über ImageJ. Das Primerdesign und die Ermittlung geeigneter Annealingtemperaturen wurde mit Hilfe der im Internet frei verfügbaren Programme OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) und Oligo Calc (<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>) vorgenommen. Die Auswertung der FACS-Experimente erfolgte über die frei im Internet zugängliche Software „Flowing Software“, entwickelt von der Universität Turku, Finnland. Für statistische Auswertungen und die Darstellung der Daten in entsprechenden Diagrammen wurde das Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel verwendet.



## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 DNA-Analytik und mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Transformation elektrokompenter und chemisch kompetenter Zellen**

Das Einschleusen von Plasmiden in *Escherichia coli* (Top10 oder Stabl3) erfolgte über Elektroporation beziehungsweise Hitzeschocktransformation, wobei für gewöhnlich mit der Elektroporation höhere Transformationseffizienzen erreichbar sind.

Bei der Elektroporation wurden zu den auf Eis aufgetauten elektrokompenten Zellen etwa 1 bis 2 µl DNA gegeben (etwa 5 bis 100 ng), der Ansatz in eine vorgekühlte, saubere Elektroporationsküvette überführt und in den Elektroporator gestellt. Anschließend wurde ein Impuls mit einer Spannung von 2,5 kV, einem Leistungswiderstand von 200 Ohm und einer Kapazität von 25 µF ausgelöst, um die Aufnahme der DNA in die Zellen zu ermöglichen. Nach dem Impuls wurden umgehend 500 µl SOC-Medium auf die Zellen gegeben und der Ansatz vor dem Ausplattieren auf Selektivmedium für eine Stunde bei 37 °C im Schüttler inkubiert.

Für die chemische Transformation wurden auf die auf Eis aufgetauten chemisch kompetenten Zellen 1 bis 5 µl DNA (5 bis 200 ng) gegeben, vorsichtig gemischt und der Ansatz für eine halbe Stunde auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen für 45 s im Heizblock bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt und sofort danach nochmals für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 500 µl SOC-Medium hinzugegeben und der Ansatz wie bei der Elektroporation vor dem Ausplattieren eines geeigneten Volumens für eine Stunde bei 37 °C unter ständigem Schütteln inkubiert.

16 bis 24 Stunden nach der Transformation können Bakterienkolonien von den LB-Platten gepickt werden und weiteren Analysen unterzogen werden.

#### **2.2.1.2 Plasmidisolation**

Die Plasmidisolationen erfolgten über das QIAprep Spin MiniPrep Kit zur Gewinnung von kleineren DNA-Mengen oder für die Isolation von größeren Mengen von DNA mit dem Endo-free Plasmid Maxi Kit. Es wurde dabei nach den Angaben des Herstellers vorgegangen. Zur Anzucht der Bakterienkulturen wurden für eine Minipräparation 16 Stunden zuvor 4 ml Selektivmedium (LB mit Ampicillin oder Kanamycin) angeimpft beziehungsweise für eine Maxipräparation 24 Stunden zuvor 250 ml Selektivmedium.

### **2.2.1.3 Auftrennung von DNA mittels Agarosegelelektrophorese**

DNA-Fragmente lassen sich mittels eines elektrischen Feldes und einer geeigneten Wanderungsmatrix (zum Beispiel Agarose) elektrophoretisch auftrennen. Zur Herstellung von Agarosegelen wurde Agarose in TAE-Puffer in der Mikrowelle gelöst und in entsprechende Gelkammern gegossen. Für die Visualisierung unter UV-Licht wurden die Gele nach dem Aufkochen mit Ethidiumbromid oder alternativ mit dem weniger toxischen GelRed versetzt. Zur Kontrolle und Isolation von DNA aus Restriktionsverdauen, PCRs und Plasmidisolationen wurden 1 % (w/v) Agarosegele verwendet und die Proben für 60 bis 90 min bei einer Spannung von 80 bis 100 V aufgetrennt.

### **2.2.1.4 DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

Die Ermittlung der DNA-Konzentration erfolgte (neben der semiquantitativen Abschätzung über die Agarosegelelektrophorese) über die Messung der Absorption bei 260 nm am Nanodrop. Der Quotient der Absorption bei 260 nm und 280 nm lieferte außerdem eine Aussage über die Reinheit der DNA-Lösung. Gute Präparationen sollten einen Quotient zwischen 1,6 und 1,8 ergeben.

### **2.2.1.5 Reinigung von Fragmenten aus Restriktionsverdauen und PCR-Ansätzen**

Für viele Reaktionen ist es wichtig, DNA-Lösungen von unerwünschten und Folgereaktionen negativ beeinflussenden Substanzen wie Primern, Restriktionsenzymen oder bestimmten Pufferkomponenten zu befreien. Dazu wurde das QIAquick PCR Purification Kit von Qiagen verwendet und die Reinigung nach den Herstellerangaben durchgeführt.

### **2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Die Polymerase-Kettenreaktion, kurz PCR genannt, dient zur spezifischen und schnellen exponentiellen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten. Sie ist damit für den Nachweis bestimmter DNA-Sequenzen und der Klonierung im Allgemeinen von hoher Bedeutung.

Eingesetzte Primer können zum Einfügen von Restriktionsschnittstellen zu Klonierungszwecken einen 5' Überhang besitzen, der das Anfügen von zusätzlichen Nukleotiden erlaubt. Zu beachten ist hierbei, dass viele Restriktionsenzyme nicht direkt am Anfang eines DNA-Fragmentes schneiden können, sondern bis zu 6 zusätzliche Basenpaare am Anfang des DNA-Doppelstranges für eine effiziente Restriktion erforderlich sein können.

Ein typischer Ansatz einer PCR-Reaktion für Klonierzwecke und des zugehörigen Temperaturschemas ist im Folgenden dargestellt:

2,5 µl	<i>Pfu</i> -Polymerase Puffer (10-fach)
2 µl	dNTPs (jeweils 2 mM)
1 µl	Primer forward (10 µM)
1 µl	Primer reverse (10 µM)
0,2 µl	<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase
1 µl	Template (ca. 10 ng)
17 µl	H <sub>2</sub> O bidest.

96 °C	3 min (initiale Denaturierung)	} 35 Zyklen
96 °C	30 s (Denaturierung)	
T <sub>m</sub> – 5 °C	40 s (Primer-Annealing)	
72 °C	1 min (Elongation für Fragmente < 1 kbp)	
72 °C	5 min (finale Elongation)	

Neben Klonierzwecken kann die PCR in der sogenannten Kolonie-PCR dazu genutzt werden, nach der Transformation positive Kolonien auf den Selektionsplatten zu identifizieren. Hierzu werden Kolonien vorsichtig von der Platte gepickt und in 25 bis 50 µl Wasser überführt. Als Template für die PCR dient dann 1 µl dieser Bakterienlösung. Die restliche Bakterienlösung kann bei Bedarf später zum Animpfen von Plasmidpräparationen oder von Nährbodenplatten verwendet werden.

### 2.2.1.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von DNA ist häufig erforderlich, um im Klonierungsprozess (insbesondere der PCR) aufgetretene Sequenzfehler erkennen zu können. In dieser Arbeit wurden Sequenzierungen über die Sanger-Kettenabbruchmethode durchgeführt. Dazu kam das BigDye 3.1 Reagenz von Applied Biosystems zum Einsatz. Es enthält neben den konventionellen Desoxynukleotidtriphosphaten fluoreszenzmarkierte 2', 3'-Dideoxynukleotidtriphosphate, deren Inkorporation durch die im BigDye 3.1 Reagenz enthaltene DNA-Polymerase zum Kettenabbruch führt. Ein typischer Reaktionsansatz ist im Folgenden dargestellt:

1 µl	BigDye 3.1
1 µl	ABI-Puffer
1 µl	DNA (etwa 200 ng für Plasmidpräparationen)
0,5 µl	Sequenzprimer (10 µM)
6,5 µl	H <sub>2</sub> O bidest.

Das übliche Temperaturschema des Sequenzierungsansatzes lautet wie folgt:

96 °C	2 min	(initiale Denaturierung)	} 25 Zyklen
96 °C	10 s	(Denaturierung)	
50 °C	10 s	(Primer-Annealing)	
60 °C	4 min	(Elongation)	

Die in der Reaktion entstehenden Fragmente wurden vom hauseigenen Sequenzierlabor des Robert Koch-Institutes ausgelesen.

### 2.2.1.8 DNA-Restriktion

Typ II Restriktionsenzyme erkennen und schneiden hochspezifisch DNA an ihren jeweiligen Erkennungssequenzen. Dadurch erlauben sie das gezielte Schneiden von DNA-Fragmenten oder Plasmiden, das für Klonierungen erforderlich ist. Unter bestimmten Bedingungen können auch im selben Ansatz mehrere Enzyme gleichzeitig zum Einsatz kommen. Die in dieser Arbeit eingesetzten Restriktionsenzyme wurden nach Herstellerangaben (NEB) zusammen mit den empfohlenen Puffern eingesetzt. Jeder Verdau wurde für mindestens zwei Stunden bei 37 °C durchgeführt. Sofern erforderlich wurden die Enzyme durch Erhitzen auf 80 °C für 20 min inaktiviert.

### 2.2.1.9 Ligation

Als Gegenstück zur Restriktion findet die Ligation Anwendung beim Zusammenfügen von DNA. Für die Verknüpfung freier 3'-OH-Gruppen mit freien Phosphatgruppen benötigt die in dieser Arbeit eingesetzte T4-DNA-Ligase ATP als Kosubstrat. Für die verwendeten „sticky end“-Ligationansätze von einem geschnittenen Insert in ein Plasmid wurde ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 3 : 1 angestrebt. Etwa 50 – 100 ng DNA wurden pro Ansatz für eine Stunde bei Raumtemperatur ligiert. Anschließend konnte der Ansatz direkt in der Transformation eingesetzt werden.

### **2.2.1.10 Anlegen von Glycerinstocks**

Nährbodenplatten sind auf Grund ihrer begrenzten Haltbarkeit keine dauerhafte Option zur stabilen Lagerung von Bakterienstämmen. Eine bessere Alternative dazu bieten Glycerinstocks, die bei - 80 °C über viele Jahre gelagert werden können. Zum Anlegen einer Glycerinstammkultur wurde eine Übernachtskultur der transformierten Bakterien angesetzt, am Folgetag 1 ml dieser Bakterienlösung mit 1 ml Kryomedium (mit einem Glyceringehalt von 50 % (v/v)) versetzt und sofort bei - 80 °C eingefroren.

## **2.2.2 Methoden der Zellkultur**

### **2.2.2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen**

HEK 293T-Zellen wurden in „DMEM High Glucose“ oder „DMEM Low Glucose“ bei 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C und 98 % Luftfeuchtigkeit in 75 cm<sup>2</sup> – Kulturflaschen angezogen. Dem Nährmedium wurde fetales Kälberserum (10 %), eine Antibiotikamischung aus Penicillin und Streptomycin sowie Glutamin (2 mM) zugefügt. Alle zwei bis drei Tage beziehungsweise bei einer Konfluenz von größer als 90 % war ein Mediumswechsel und „Splitten“ (Passagieren) der Zellen erforderlich, um optimale Wachstumsbedingungen zu gewährleisten. Dazu wurde das Medium komplett abgenommen und die Zellen einmal vorsichtig mit 10 ml PBS gewaschen, um die den Trypsinverdau inhibierenden Mediumskomponenten zu entfernen. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen für 20 s mit 2,5 ml Trypsinlösung benetzt, das Trypsin wieder abgenommen und die Zellen für maximal 5 min im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die nun anverdauten Zellen mit 10 ml vorgewärmtem frischen Medium vom Boden der Kulturflasche abgespült und durch einiges Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Je nach Konfluenz wurden 1-2 ml der Zelllösung in der Flasche belassen, der Rest verworfen oder für weitere Versuche verwendet und auf die Zellen 24 ml frisches, vorgewärmtes Medium gegeben.

### **2.2.2.2 Zellzahlbestimmung**

Um reproduzierbare Ergebnisse zu gewährleisten und optimale Bedingungen für Transfektionen, zytometrische Untersuchungen oder die Anfertigung von Fluoreszenzpräparaten zu schaffen, ist eine Zellzahlbestimmungen erforderlich. 10 µl der während eines Mediumwechsels anfallenden Zelllösung wurden in 10 ml isotones Medium verdünnt und im Beckman Coulterzähler gezählt. Der Coulterzähler erfasst die Änderung des Wechselstromwiderstandes, der sogenannten Impedanz, wenn eine Zelle oder ein Partikel durch die enge Kapillare des Gerätes hindurchfließt. Die Größe der Änderung des

Wechselstroms erlaubt dabei Rückschlüsse auf die Größe des Partikels. Neben der ungefähren Zellzahl pro ml gibt eine Messung also auch Auskunft über die Größenverteilung der gemessenen Zellen beziehungsweise der Partikel. Dadurch kann gleichzeitig überprüft werden, ob die Zellen vollständig vereinzelt worden sind.

### **2.2.2.3 Transfektion**

Für die Transfektion, also zum Einbringen von DNA in eukaryotische Zellkulturen, können neben (zum Teil recht aufwändigen) physikalischen Methoden eine Reihe von chemischen Verfahren wie die Kalzium-Phosphat-Präzipitation, die Lipofektion (also mit Hilfe von Liposomen) oder auch die dendrimervermittelte DNA-Aufnahme eingesetzt werden. Die in dieser Arbeit verwendeten Transfektionsreagenzien (Polyfect und Effectene von Qiagen) beruhen auf der zuletzt genannten Methode. Die in diesen Reagenzien enthaltenen kationischen Dendrimere sind stark verzweigte polymerartige Strukturen, die auf Grund ihrer positiven Ladung DNA komplexieren und die Aufnahme in die Zelle erleichtern können.

siRNAs sowie shRNAs exprimierende Plasmide kamen in dieser Arbeit zum Einsatz, um endogenes wie exogenes Stau1 herunterzuregulieren. Die Transfektion mit diesen kurzen doppelsträngigen RNAs beziehungsweise die stabile Expression der shRNAs hat den Abbau der zugehörigen mRNAs durch den RNA-induced silencing complex (RISC) zur Folge. Die gegen endogenes Stau1 gerichtete siRNA 3084 sowie die Negativkontrolle siRNA-NS (non-silencing) wurden bereits in den Arbeiten von Chatel-Chaix, 2004, und Abrahamyan, 2010, verwendet. Cytotoxische Effekte durch die Transfektion mit siRNAs wurden in keinem der Experimente beobachtet.

Die Transfektion der Zellen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Alle Versuche, bei denen siRNAs eingesetzt worden sind, erfolgten mit Effectene; Versuche ohne siRNAs mit Polyfect. Bei Kotransfektionen von unterschiedlichen Plasmiden wurden äquimolare Verhältnisse angestrebt, wobei bei besonders schwach oder sehr stark exprimierten Proteinen das zugehörige Plasmid in höheren beziehungsweise niedrigeren Mengenverhältnissen transfiziert worden ist.

Die eingesetzten siRNA-Mengen wurden üblicherweise so gewählt, dass sie nach der Transfektion in einer Endkonzentration von ca. 20 bis 40 nM im Medium vorlagen. Für Transfektionen mit Polyfect in 6-Well-Platten wurden ca. 2 µg DNA eingesetzt; für

Transfektionen mit Effectene 0,3 bis 0,5 µg. Die vom Hersteller empfohlenen Mengen an Effectene (das primär für die Transfektion von DNA ausgelegt ist) und dem zugehörigen Enhancermix wurden bei DNA/siRNA-Kotransfektionen entsprechend der verwendeten Menge an siRNAs um den Faktor 1,5 bis 2 erhöht.

#### **2.2.2.4 Stressen von Zellen**

Über die Induktion von transienten Stressgranula in eukaryotischen Zellen existieren in der Literatur unterschiedlich Angaben bezüglich der Methodik. Verwendet werden thermische Hitzeschockverfahren, milde cytotoxische Reagenzien sowie Verfahren unter Verwendung von Arsenitverbindungen. Die reproduzierbarsten Ergebnisse erhält man dabei meistens mit einer (meist temporären) Zugabe von Arsenit in das Nährmedium. Soweit nicht anders angegeben wurden bei den beschriebenen Stressversuchen die HEK 293T-Zellen für eine Stunde einer subletalen Menge an Natriumarsenit ausgesetzt. Dazu wurde zunächst das Medium von den Zellen abgenommen und danach auf die Zellen ein etwa halb so großes Volumen an frischem Nährmedium gegeben, das Natriumarsenit in einer Endkonzentration von 0,5 mM enthielt. Die Zellen wurden eine Stunde lang in der arsenithaltigen Lösung bei den üblichen Bedingungen weiterkultiviert. Vor weiteren Analysen wurden die Zellen nach Abnehmen des arsenithaltigen Mediums einmal mit PBS gewaschen.

#### **2.2.3 Proteinanalytik**

##### **2.2.3.1 Zellyse und Proteinextraktion aus eukaryotischen Zellen**

Zur Gewinnung von möglichst hochkonzentrierten, eukaryotischen Zelllysaten wurden die Zellen in 10 cm – Schalen (oder 6-Well-Platten) kultiviert und transfiziert. Nach Erreichen einer hohen Zelldichte wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal vorsichtig mit PBS gewaschen und die Zellschalen auf Eis gelagert, um die Proteindegradation zu minimieren. Nach Aufgabe von 300 µl (bzw. 100 µl je Well) mit Proteaseinhibitor versetzten Lysispuffer wurden die Zellen mit einem Zellschaber von der Schale abgelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde für 5 bis 10 Minuten bei 4 °C rotiert und anschließend für 7 min bei 8000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, à 50 µl aliquotiert und bis zur Analyse bei – 20 °C gelagert.

##### **2.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Analyse mittels Western Blot**

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach Laemmli kann zur Auftrennung von Proteingemischen eingesetzt werden. Unter denaturierenden Bedingungen wird in einer

Gelmatrix die Wanderungsgeschwindigkeit primär durch die Masse des Proteins beziehungsweise genauer seiner Aminosäureanzahl bestimmt. In dem sogenannten Sammelgel werden die Proteine dafür zunächst in einer engen Lauffront aufkonzentriert, bevor die eigentliche Auftrennung im Trenngel erfolgen kann. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel bestimmt dabei die Trenneigenschaften des Geles. Generell sollten für kleine Proteine eher hohe Konzentrationen gewählt werden, während für größere Proteine geringere Konzentrationen die besseren Trennschärfen erzielen. Nach einem Transfer auf eine Membran können über die Zugabe von spezifischen Antikörpern die gewünschten Proteine detektiert werden.

In dieser Arbeit wurden 10-prozentige Polyacrylamidgele verwendet. Die folgenden Mengenangaben ergeben ausreichende Mengen für etwa 2 Minigele (1,5 mm Dicke).

	<b>Trenngel</b> (10 % Acrylamid)	<b>Sammelgel</b> (5 % Acrylamid)
H <sub>2</sub> O	8,2 ml	5,7 ml
30 % (w/v) Acrylamid	6,6 ml	1,7 ml
Tris-Puffer I (1,5 M, pH 8,8)	5 ml	
Tris-Puffer II (0,5 M, pH 6,8)		2,5 ml
10 % (w/v) SDS	100 µl	100 µl
10 % (w/v) APS	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

Die einzelnen Komponenten wurden in der oben genannten Reihenfolge zusammenpipettiert und gut gemischt. Die radikalisch vermittelte Polymerisation des Geles beginnt nach der Zugabe von APS und des Radikalkatalysators TEMED. Nach dem Gießen des Trenngels wurde dieses mit Ethanol überschichtet und nach der Polymerisation das Ethanol wieder entfernt. Anschließend wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen und ein Probenkamm mit 10 Taschen in das Sammelgel eingefügt. Für die Beladung der Gele wurden die Proben mit Laemmlipuffer versetzt und für 5 bis 10 min bei 95 °C aufgeköcht und anschließend bis zur Auftragung auf Eis gelagert. Für jede Tasche kann ein Probenvolumen



von bis zu 50 µl eingesetzt werden. Die ersten 15 min wurden die Proben bei einer Spannung von 100 Volt und danach für etwa eine Stunde bei 120 Volt aufgetrennt.

Nach dem Gellauf wurde das Sammelgel vorsichtig vom Trenngel abgetrennt und verworfen. Das Trenngel wurde für 30 min in Transferpuffer geschwenkt und im Semidry-Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Dazu wurde die in Transferpuffer benetzte auf Gelgröße zurechtgeschnittene Nitrozellulosemembran auf ein mit Transferpuffer durchtränktes Filterpapier gelegt, auf die Membran das Gel gelegt und zuoberst ein weiteres Filterpapier gelegt. Es ist dabei darauf zu achten, das Entstehen von Luftblasen zu vermeiden, da diese den Transfer behindern. Der ganze Ansatz wurde in einer Transferkammer von Biorad für 70 min bei 10 Volt geblottet. Als Transferkontrolle wurde das Gel anschließend in Coomassielösung geschwenkt, um den Erfolg des Transfers beurteilen zu können.

Zur Verringerung unspezifischer Antikörperbindungen wurde die Membran für eine Stunde in Blockierpuffer ohne Tween 20 geschwenkt. Anschließend wurde der primäre Antikörper in einer geeigneten Verdünnung (z. B. 1:5000) in Blockierpuffer mit Tween 20 auf die Membran gegeben und über Nacht bei 4 °C geschwenkt. Die Membran wurde am Folgetag für zweimal 5 min und einmal 10 min mit Waschpuffer von nicht oder unspezifisch gebundenem Antikörper befreit. Danach wurde der in Blockierpuffer mit Tween 20 verdünnte sekundäre Fluoreszenzantikörper auf die Membran gegeben und bei Raumtemperatur für eine Stunde geschwenkt. Anschließend wurde zweimal für 5 min und einmal für 10 min mit Waschpuffer gewaschen und die Membran zur vollständigen Entfernung von störendem Tween 20 einmal in PBS gewaschen.

Die Detektion der antikörpervermittelten Fluoreszenzsignale erfolgte am Odyssey Infrared Imager. Da das Gerät sowohl Signale bei 700 nm als auch bei 800 nm auslesen und voneinander trennen kann, ist es möglich zwei verschiedene Signale separat aufzunehmen (unter der Voraussetzung, dass die verwendeten primären Antikörper aus zwei unterschiedlichen Spezies stammen und die sekundären Antikörper Signale bei 700 nm beziehungsweise 800 nm aussenden).

Zur Ladekontrolle bei den Stufen1-Knockdown-Experimenten wurde ein aktinspezifischer Antikörper verwendet mit einem bei 800 nm fluoreszierenden Sekundärantikörper. Das nachzuweisende Protein wurde dementsprechend mit einem bei 700 nm fluoreszierenden

Sekundärantikörper nachgewiesen. Die meisten Proteinmarker sind ebenfalls bei 700 nm detektierbar.

### **2.2.3.3 Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung (FACS)**

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die schnelle Analyse (und gegebenenfalls Sortierung) großer Zellpopulationen hinsichtlich bestimmter Parameter wie Größe und Form sowie die Quantifizierung von (zuvor spezifisch markierten) Oberflächenproteinen und intrazellulären Molekülen. Die Detektion der einzelnen Eigenschaften erfolgt nach einer Vereinzelung der Zellen in einem schmalen Flüssigkeitsstrahl durch Laseranregung und der Aufnahme des daraus entstehenden Fluoreszenzsignales beziehungsweise des Ausmaßes an Streulicht. Durch die Verwendung verschiedener Laser können mehrere Fluoreszenzsignale pro Zelle ausgelesen werden und damit unterschiedliche Proteine oder Oberflächenmarker gleichzeitig gemessen werden.

Die in dieser Arbeit vorgenommenen Fluoreszenzanalysen quantifizierten Proteine, die bereits durch einen Fluoreszenztag (z. B. GFP oder mCherry) markiert worden sind. Eine antikörpervermittelte Markierung ist daher nicht erforderlich gewesen. Transfizierte Zellen wurden in 6-Well-Platten angezogen und vor der Analyse zunächst einmal mit PBS gewaschen, dann durch kurzen Anverdau mit Trypsin (siehe Punkt 2.2.2.1) vom Boden der Platte abgelöst und nach Vereinzelung in 0,5 bis 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend bis zur Vermessung im Durchflusszytometer auf Eis gelagert. Je nach Zelldichte wurden 100 bis 200 µl Zelllösung in 250 µl PBS verdünnt, kurz gevortext und sofort vermessen. Für jede Messung wurden 50 000 bis 100 000 Zellen verwendet; bei geringer Zelldichte mindestens jedoch 10 000. Untransfizierte Zellen beziehungsweise einfach transfizierte Zellen (nur GFP oder nur mCherry) wurden zur Bestimmung der Grenzwerte („Gates“) benutzt, um tatsächliche Fluoreszenzsignale von Hintergrundsignalen oder den Signalen anderer Fluoreszenztags unterscheiden zu können.

### **2.2.3.4 Fluoreszenzfärbungen**

Um Informationen über die intrazelluläre Verteilung und Strukturierung von bestimmten Proteinen zu erhalten, können durch spezifische Fluoreszenzmarkierungen diese Proteine visualisiert und mittels eines Fluoreszenzmikroskopes beobachtet werden. Werden für diese Färbungen Antikörper verwendet, so spricht man von Immunfluoreszenz.

Zur Anfertigung von Fluoreszenzpräparaten wurden auf zuvor gründlich gereinigten und desinfizierten Deckgläschen einen Tag vor der Transfektion ca. 250 000 Zellen (für eine Inkubationszeit von 16 bis 24 Stunden) oder ca. 120 000 Zellen (für eine Inkubationszeit von 40 bis 48 Stunden bei Versuchen mit siRNAs) in 6-Well-Platten ausgesät. Nach der Inkubationszeit (und einem eventuellen Stressen mit Natriumarsenit) wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 3 % Formaldehydlösung für 30 min bei 37 °C fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS für 5, 10 und 15 min wurden die Zellen für intrazelluläre Färbungen mit 0,5 % Triton X-100 für 15 min bei Raumtemperatur permeabilisiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS für 5, 10 und 15 min wurden die Präparate mit 1 % Milchpulverlösung blockiert. Anschließend wurden die Deckgläschen aus den 6-Well-Platten genommen, in eine Feuchtigkeitskammer gelegt und mit dem primären Antikörper (1:200 bis 1:400 verdünnt in 250 µl 1 % Milchpulverlösung) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Deckgläschen zurück in die 6-Well-Platten gelegt, dreimal für 5, 10 und 15 min mit PBS gewaschen und in gleicher Weise mit dem fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörper lichtgeschützt inkubiert (1:250 bis 1:500 verdünnt in 250 µl 1 % Milchpulverlösung). Nach Waschen für 5, 10 und 15 min mit PBS wurden die Zellkerne mit 1:30000 verdünntem Hoechst-Reagenz (oder mit DAPI) für 10 bis 15 min bei Raumtemperatur lichtgeschützt angefärbt. Nach dreimaligem Waschen für 5, 10 und 15 min mit PBS und einmaligem Waschen mit H<sub>2</sub>O für 5 min wurden die Präparate mit den Zellen nach unten in 50 µl Mowiol auf einem Objektträger eingedeckt und über Nacht abgedunkelt im Kühlschrank ausgehärtet. Zum Schutz vor Austrocknung und zur stabilen Lagerung können die Präparate mit Nagellack versiegelt werden.

#### **2.2.3.5 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (cLSM)**

Konfokale Laser-Scanning-Mikroskope wie das in dieser Arbeit verwendete LSM 780 sowie das LSM 510 von der Firma Carl Zeiss erlauben im Vergleich zu herkömmlichen Fluoreszenzmikroskopen Aufnahmen mit weitaus schwächeren Hintergrundsignalen, da die Proben nur in einem sehr kleinen Bereich Stück für Stück mit einem Laser angeregt und durch eine Lochblende nur Signale aus einer Ebene im Detektor aufgenommen werden. Dadurch kann das Präparat Punkt für Punkt gerastert werden und unerwünschte Hintergrundsignale minimiert beziehungsweise herausgefiltert werden. Die Verwendung von mehreren Lasern erlaubt die simultane Aufnahme mehrerer Fluoreszenzsignale in unterschiedlichen Kanälen.

Alle Aufnahmen in dieser Arbeit wurden mit dem 63x - Ölobjektiv angefertigt. Die Bildausschnitte haben (sofern nicht anders angegeben und durch einen gesondert eingetragenen Maßstab verdeutlicht) einen Umfang von 134,69  $\mu\text{m}$  x 134,69  $\mu\text{m}$ . Für sogenannte „Tile Scans“ (mit einer besseren Übersichtsfunktion) wurden 3 x 3 benachbarte Bildausschnitte vom Mikroskop aufgenommen, die Bildübergänge mit Zen 2009 prozessiert und zu einem Ausschnitt zusammengefügt (mit den Maßen 404,59  $\mu\text{m}$  x 404,59  $\mu\text{m}$ ).

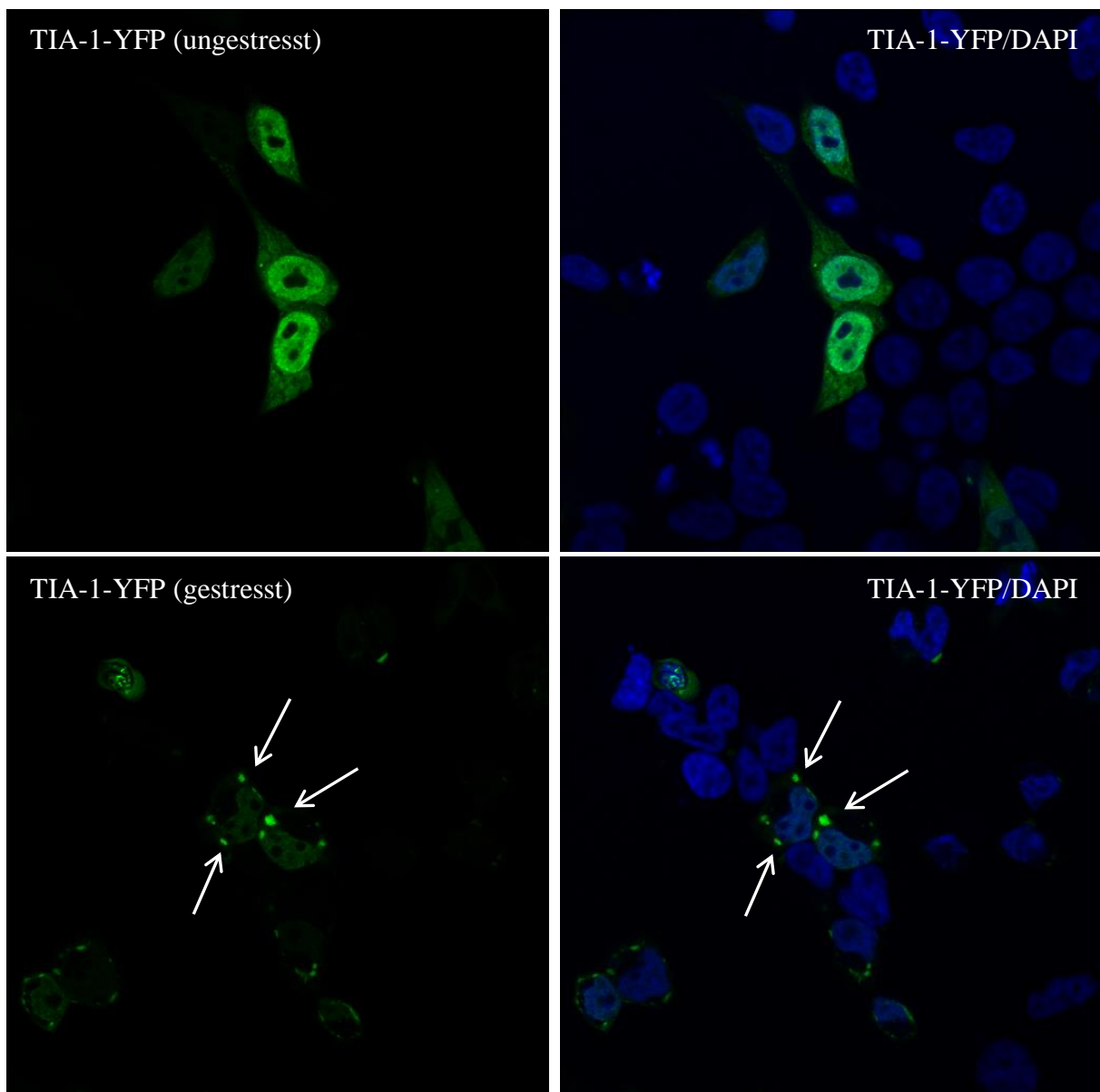
Die Stärke der einzelnen Laser wurde für jede Aufnahme neu angepasst und so gewählt, dass die interessierenden Bereiche knapp unter der Schwelle zur Lichtsättigung liegen. Dadurch gewährleistet man optimale Aufnahmebedingungen ohne störende Überbelichtungseffekte im betreffenden Bereich. Um Hintergrundsignale von anderen Fluoreszenzfarbstoffen so gering wie möglich zu halten, wurden die einzelnen Detektorbandbreiten so eng gewählt, dass falsche Signale aus anderen Quellen nur in sehr geringem Maße zu erwarten sind. Gleichzeitig wurden die Fluorophore nach Möglichkeit so ausgewählt, dass Absorptions- und Emissionsspektren keine signifikanten Überlappungen aufwiesen.

Die in dieser Arbeit gezeigten mikroskopischen Bilder wurden keiner weiteren Bearbeitung unterzogen, die auf Ausschnittsverkleinerung (mit Ausnahme der Bildausschnittsvergrößerung zur Verdeutlichung der Granulafinstruktur), Kontrast- oder Intensitätsverstärkung beziehungsweise anderweitig signalverändernder Bildbearbeitung abzielt. Quantifizierungen von Signalstärken wurden mittels ZEN 2012 Blue Edition in den entsprechend umrandeten Bereichen vorgenommen. Bildexport, Kanaltrennung etc. erfolgten mittels ZEN 2009 Light Edition. Darüber hinaus gehende Bildbeschriftungen und Markierungen mit Pfeilen wurden in Microsoft Word vorgenommen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Etablierung eines Systems zur Induktion von cytoplasmatischen Staufen1-haltigen Stressgranula und ihre Abgrenzung von Prozessierungskörperchen (P-bodies)

Zur Induktion der Stressgranula wurden zunächst verschiedene Bedingungen ausgetestet, um ein möglichst hohes Maß an Reproduzierbarkeit zu erreichen. TIA-1-YFP ist als ein abundant exprimiertes Markerprotein für die Visualisierung von Stressgranula geeignet, da es unter Stressbedingungen in großen Mengen und zu einem hohen Prozentsatz in den Stressgranula aggregiert. Abbildung 4 zeigt diesen Vorgang und vergleicht die Verteilung von TIA-1-YFP im ungestressten und gestressten Zustand:

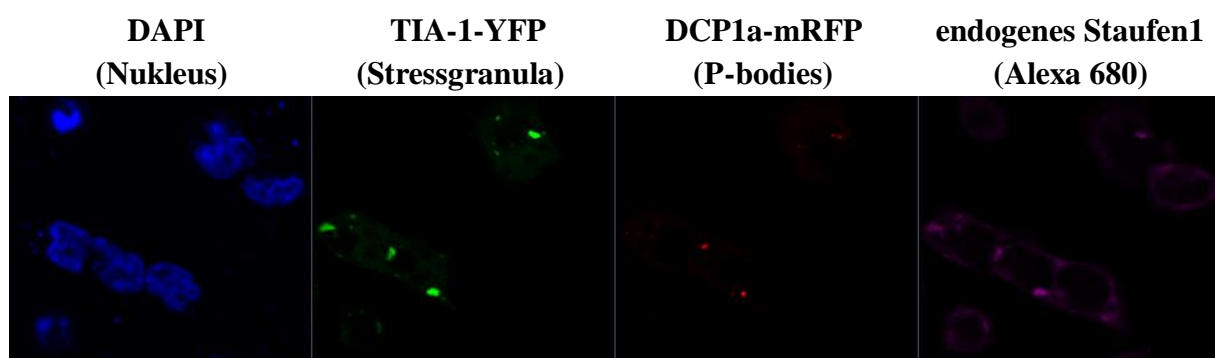


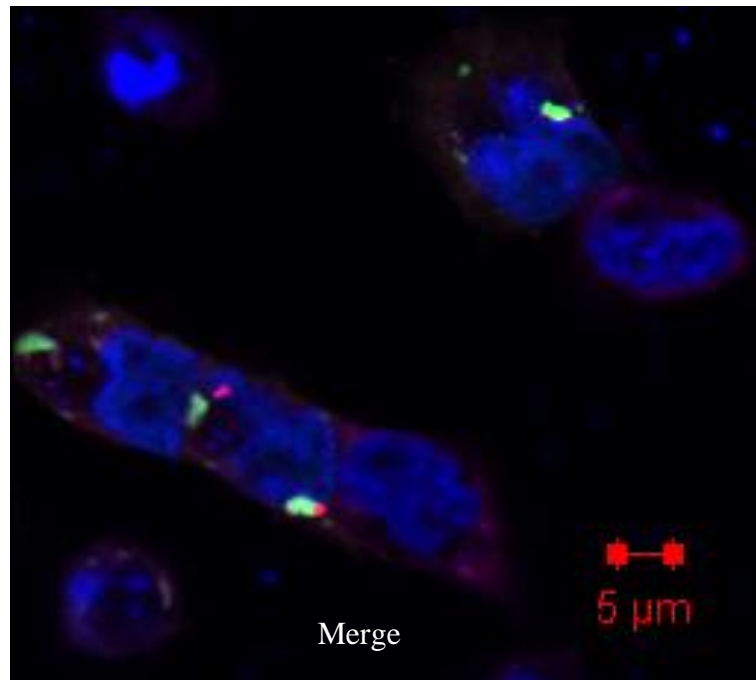
**Abbildung 4: TIA-1-YFP akkumuliert in den Stressgranula nach Natriumarsenitbehandlung**

HEK 293T-Zellen wurden mit dem Stressmarker TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag mit (unten) und ohne (oben) einstündigem Natriumarsenitstress (0,5 mM) untersucht.

Im ungestressten Zustand findet man TIA-1-YFP sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern, wobei hier mit den Nukleoli gewisse Bereiche ausgespart werden (Gilks *et al.*, 2004). Arsenitzugabe (0,5 mM für eine Stunde) induziert die Akkumulation von TIA-1-YFP in cytoplasmatischen Granula. Die Zahl, Form und Größe der Granula konnte dabei von Zelle zu Zelle variieren; außerdem bildeten nicht alle Zellen diese Granula aus. Höhere Arsenitkonzentrationen (z. B. 1 mM) bzw. längere Inkubationszeiten in arsenithaltigem Medium (2 Stunden) erhöhten den Anteil der Zellen mit Stressgranula und den Umfang der Rekrutierung von TIA-1 in diese Stressgranula, gleichzeitig erhöhte dies allerdings auch den Anteil der Zellen, die einen apoptotischen Zustand erreichten. Bei vielen Zellen führt die Arsenitzugabe zu einem Verlust der gewohnten Morphologie und viele Organellen, einschließlich des Zellkernes, zeigten häufig eine deformierte Struktur. Geringere Arsenitkonzentrationen unter 0,5 mM zeigten weniger zytotoxische Effekte; die Anzahl und der Erfolg der Stressgranulainduktion zeigten aber ein nicht unerhebliches Ausmaß an Variation. Daher wurde in allen weiteren Versuchen, das Stressen der Zellen mit 0,5 mM Natriumarsenit und für eine Stunde durchgeführt. Interessanterweise fanden sich bei einem geringen Prozentsatz an Zellen auch unter ungestressten Bedingungen Stressgranula, deren Zahl und Ausmaß insgesamt aber deutlich kleiner blieben als unter Natriumarsenitzugabe.

Um für Folgeversuche sicherzustellen, dass TIA-1 spezifisch für Stressgranula ist und nicht Prozessierungskörperchen visualisiert, wurden vergleichend die P-bodies über die Lokalisation des Decappingenzym DCP1a markiert, das nicht in den Stressgranula zu finden ist (Gallois-Montbrun *et al.*, 2007; Thomas *et al.*, 2009). Staufen1 lokalisiert bevorzugt in den Stressgranula und nur zu geringen Teilen in P-bodies. Abbildung 5 zeigt, dass Staufen1 und TIA-1 in denselben Granula vorhanden sind, P-bodies (also DCP1a-Akkumulationen) dagegen eigene kleine Granula bilden, die zwar durchaus in der unmittelbaren Nachbarschaft gelegen sind, aber ansonsten distinkte Granula bilden:





**Abbildung 5: Der Stressgranulamarker TIA-1-YFP und Staufen1 akkumulieren in den gleichen Granula, während der P-body-Marker DCP1a-mRFP separate Granula bildet.**

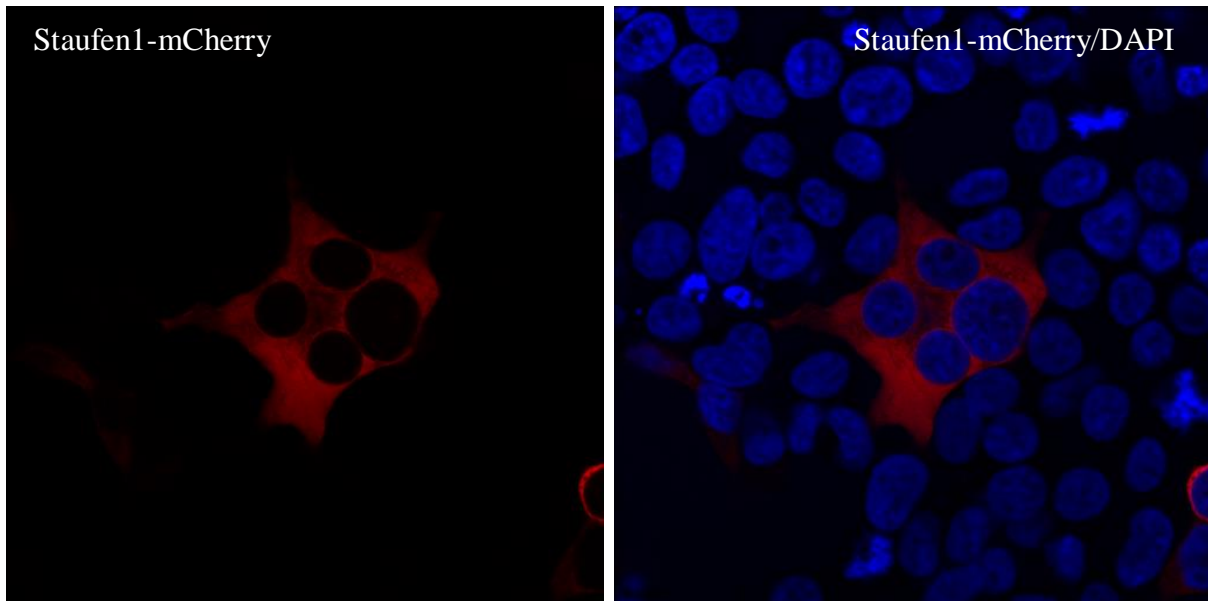
HEK 293T-Zellen wurden mit dem Stressmarker TIA-1-YFP und DCP1a-mRFP transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde mit Natriumarsenit gestresst.

Interessanterweise wirkte die Überexpression von DCP1a oft cytotoxisch oder stark wachstumshemmend auf die Zellen, während ähnliche Effekte im Falle von TIA-1 nicht zu beobachten waren. Da DCP1a im Abbauprozess von mRNAs involviert ist, könnte die Überexpression dieses Enzymes einen negativen Einfluss auf den RNA-Metabolismus der Zellen gehabt haben und die deutlich verringerte Wachstumsgeschwindigkeit erklären.

### **3.2 Untersuchungen zur Einwanderung von Rec und Rev in die Stressgranula**

#### **3.2.1 Nachweis der Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula unter natriumarsenitinduziertem Stress**

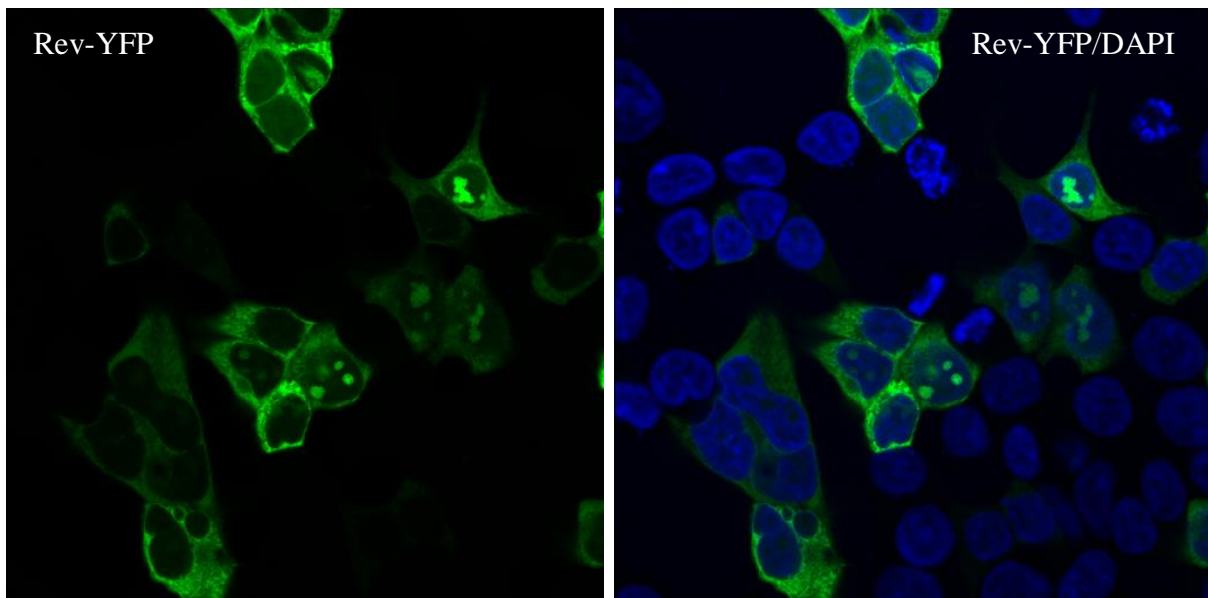
Zunächst wurde das intrazelluläre Verteilungsmusters von Staufen1, Rec und Rev im ungestressten Zustand beobachtet, um es im zweiten Schritt mit der Verteilung unter Stressbedingungen vergleichen zu können. Dazu wurden die HEK 293T-Zellen mit markierten Proteinvarianten transfiziert. Staufen1, Rec und Rev müssen zwar auf Grund ihrer Funktion als Transportproteine für den Kernexport von RNA grundsätzlich sowohl im Zellkern als auch im Cytoplasma vorhanden sein, ihre anteilmäßige Verteilung in diesen beiden Kompartimenten unterscheidet sich aber dennoch deutlich. Staufen1 ist fast ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert, wie in Abbildung 6 ersichtlich ist.



**Abbildung 6: Staufen1 ist fast ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Staufen1-mCherry transfiziert und am Folgetag ohne Natriumarsenitstress fixiert.

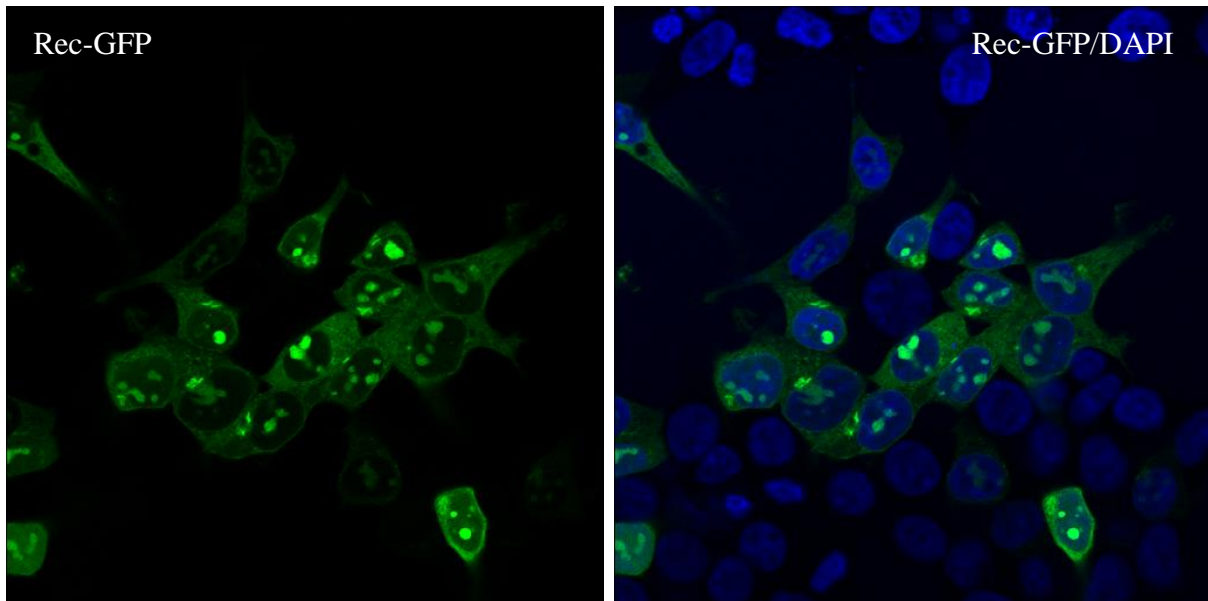
Rec und Rev sind im Gegensatz zu Staufen1 auch sehr stark im Zellkern zu finden, wo sie sich vor allem in den Nukleoli ansammeln (siehe Abbildung 7 und 8; Hanke *et al.*, 2013). Rev ist in beiden Kompartimenten etwa gleich stark vertreten; hier zeigt sich interessanterweise ein heterogenes Bild, da einige Zellen deutliche Rev-Ansammlungen in den Nukleoli aufweisen, bei anderen dagegen im Cytoplasma der größte Anteil an Rev vorliegt.



**Abbildung 7: Rev ist sowohl im Cytoplasma wie im Zellkern lokalisiert; die Verteilung kann jedoch von Zelle zu Zelle variieren.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Rev-YFP transfiziert und am Folgetag ohne Natriumarsenitstress fixiert.



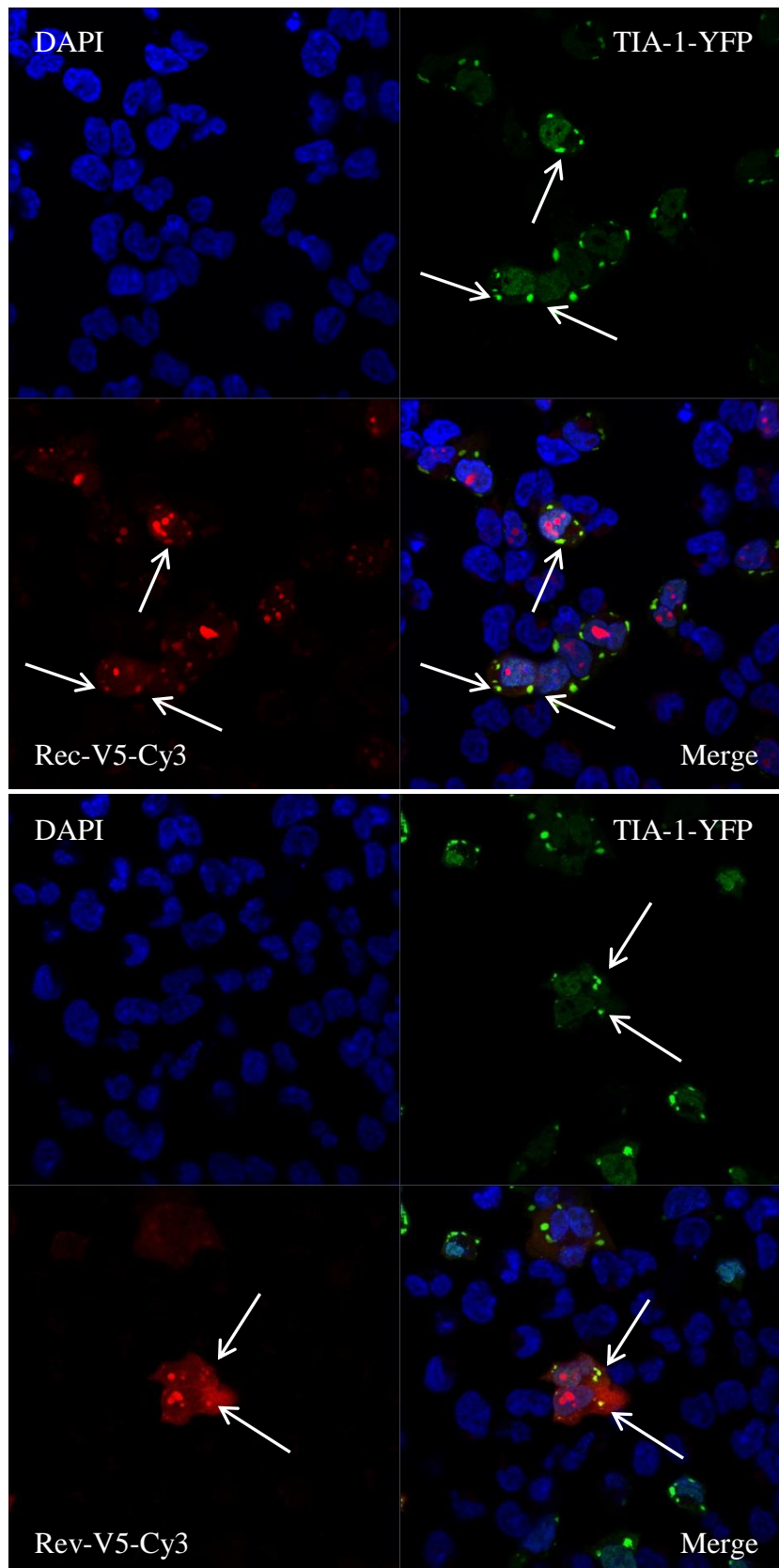


**Abbildung 8: Rec ist sowohl im Cytoplasma wie im Zellkern lokalisiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Rec-GFP transfiziert und am Folgetag ohne Natriumarsenitstress fixiert.

Nach dem Stressen der Zellen (siehe Abbildung 9) und bei der Koftransfektion mit viraler DNA, die Rev beziehungsweise Rec responsive elements enthalten (Rec und Rev kann somit an die korrespondierenden mRNAs binden) kann man alle drei Proteine in den Stressgranula wiederfinden. Rev und Stau1 sind dabei bei deutlich mehr Zellen in den Stressgranula zu beobachten; im Falle von Rec fällt dieser Effekt dagegen schwächer aus als im Vergleich zu Stau1 und Rev. Da Rec eine stärkere Lokalisation im Zellkern hat als Rev, ist es plausibel, dass die Lokalisation in den cytoplasmatischen Stressgranula weniger stark ist als bei Rev.

Interessanterweise konnte die Rekrutierung von Rec in die Stressgranula jedoch dadurch verstärkt werden, dass mit Stau1 koftransfiziert worden ist; die Menge an Stau1 in der Zelle also nun deutlich gesteigert worden ist. Unter solchen Bedingungen werden Rec und Rev in ähnlichen Mengen in die Stressgranula transportiert, wie aus Abbildung 9 ersichtlich wird. Ein substantieller Anteil von Rec und Rev verbleibt aber auch nach Natriumarsenitzugabe häufig im Cytoplasma oder im Zellkern. Diese Beobachtung konnte zuvor auch schon für den intrazellulären Stau1-Pool gemacht werden, da unter Stressbedingungen keineswegs alle Proteine in die Stressgranula transportiert werden. Vor dem Hintergrund der hohen Dynamik der Stressgranula und dem ständigen Austausch mit dem Cytoplasma kann dies nicht verwundern.



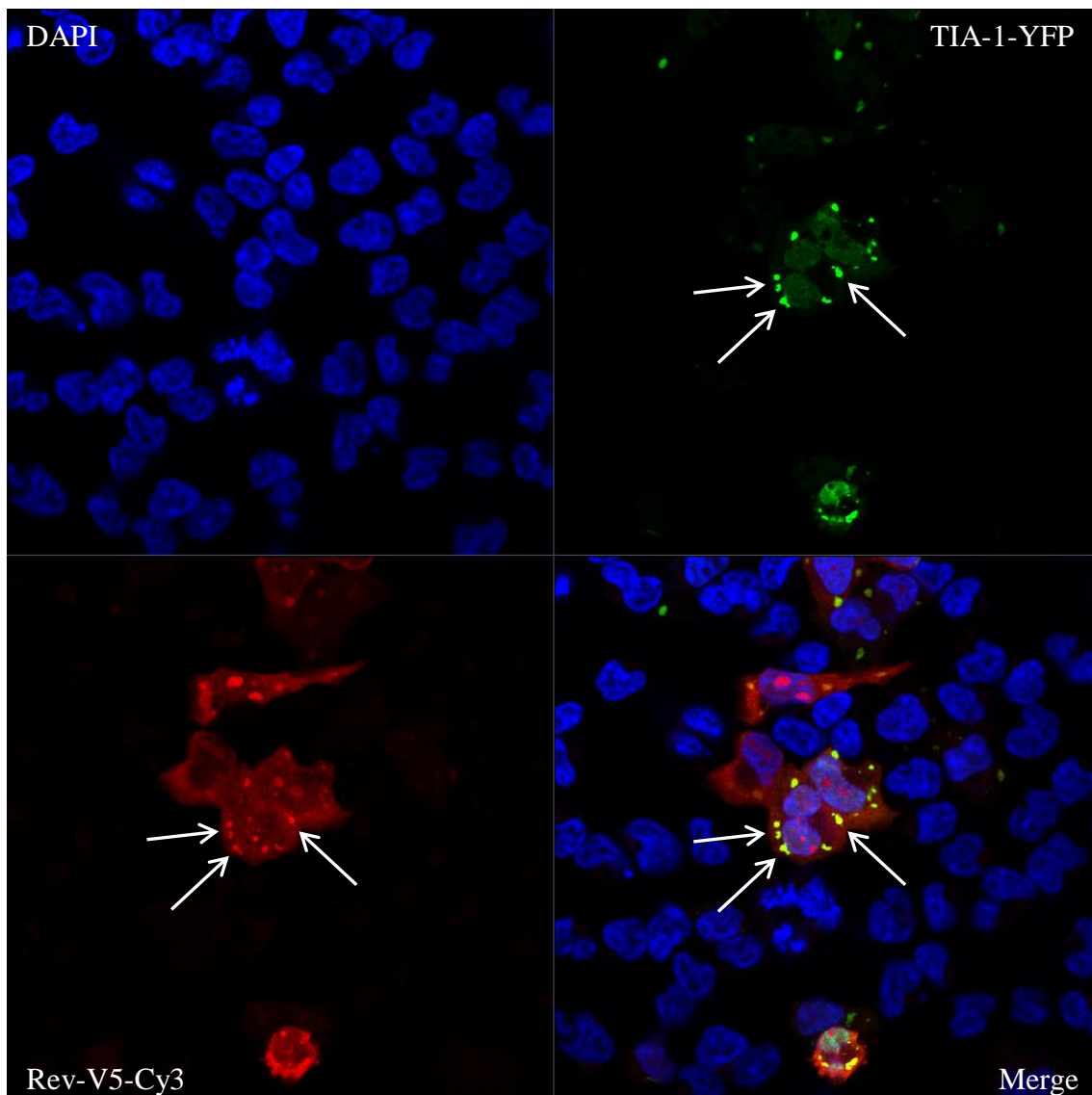
**Abbildung 9: Rec und Rev wandern unter Stress in die Stressgranula ein.**

Oben: HEK 293T-Zellen wurden mit Rec-V5, HERV-K113-DNA, Staufen1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

Unten: HEK 293T-Zellen wurden mit Rev-V5, SHIV-DNA, Staufen1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

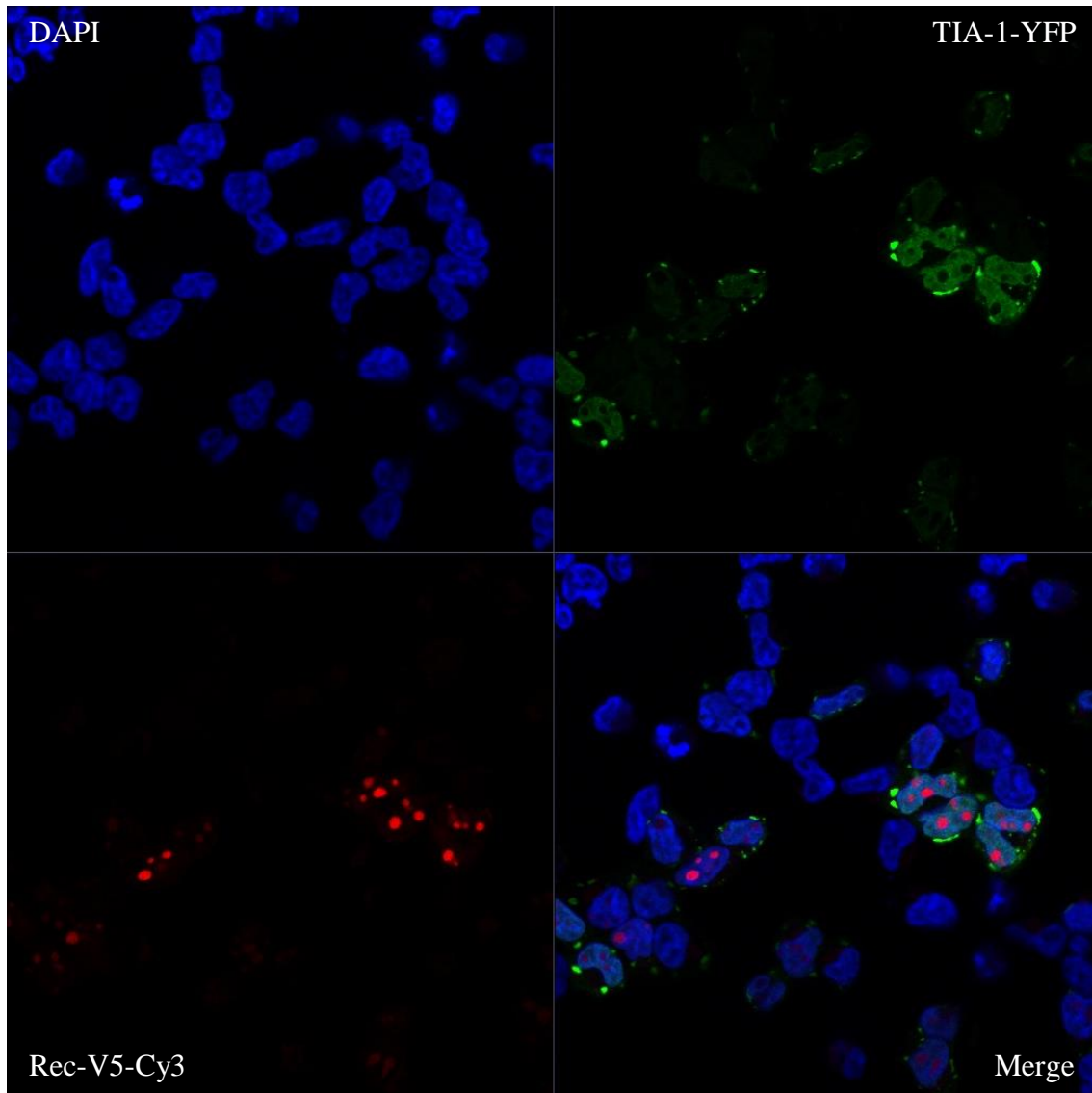
### 3.2.2 Einfluss der Zugabe viraler DNA auf die Einwanderung von Rec und Rev in die Stressgranula

Rec und Rev wurden bereits in vorangehenden Untersuchungen bei Kotransfektionen mit viraler DNA in den Stressgranula gefunden (Hanke *et al.*, 2013; Daten im Falle von Rev noch nicht publiziert). Über die tatsächliche Notwendigkeit von viraler DNA für die Lokalisation in den Stressgranula wurden bisher aber keine Untersuchungen angestellt. Die Versuche wurden daher nun in Abwesenheit viraler DNA wiederholt. Im Falle von Rev (genau wie für Staufen1) zeigte sich kein Einfluss auf die Lokalisation in den Stressgranula (Abbildung 10). Rec dagegen war (bei vergleichbarer Proteinexpression) kaum noch im Cytoplasma zu finden und damit nur noch sehr schwach in den Stressgranula zu finden (Abbildung 11). In den wenigen Fällen, in denen Rec noch im Cytoplasma vertreten ist, konnte aber noch eine moderate Kolo­kalisierung beobachtet werden.



**Abbildung 10: Rev wandert auch ohne virale DNA in die Stressgranula ein.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Rev-V5, Staufen1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

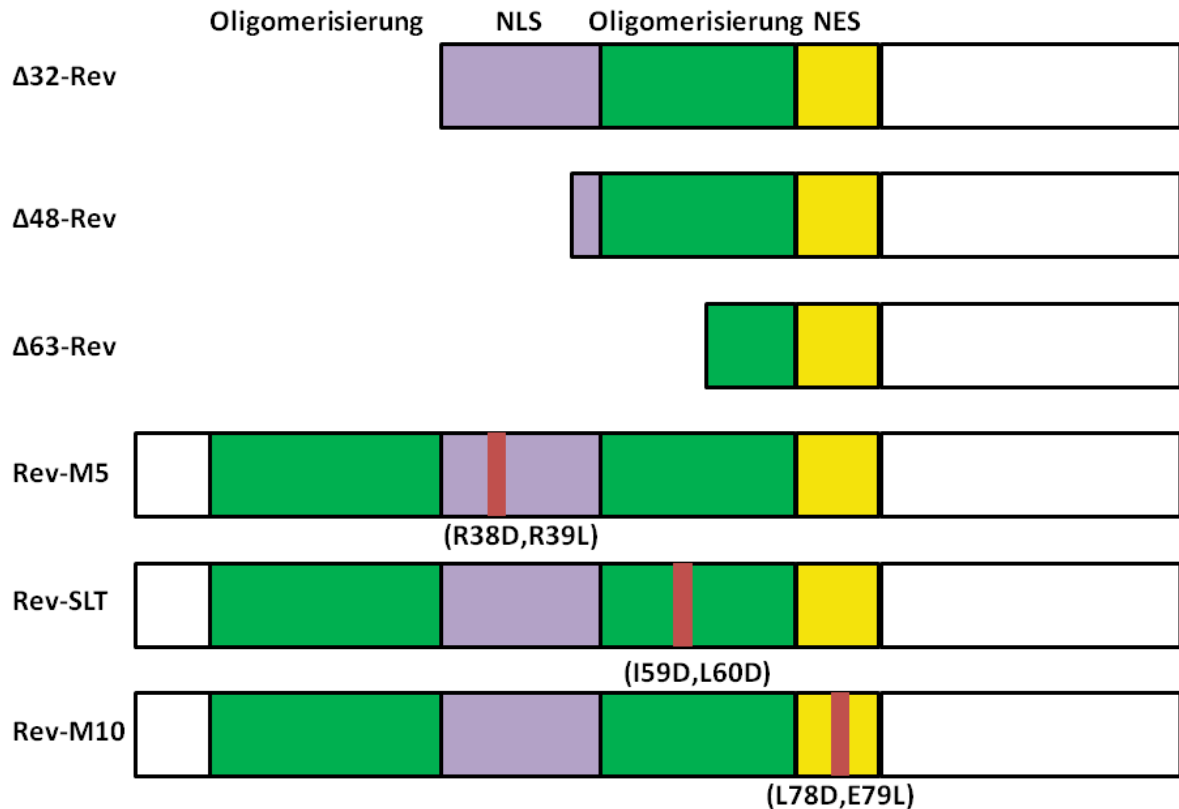


**Abbildung 11: Rec wandert ohne virale DNA nur in geringen Mengen in die Stressgranula ein.**  
 HEK 293T-Zellen wurden mit Rec-V5, Stau1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

Während also im Falle von Rev virale DNA in diesen Versuchen keinen Einfluss zeigte, so konnte man im Falle von HERV-K(HML-2) durchaus einen förderlichen Effekt feststellen, der sich aus dem Vorhandensein der Rec responsive elements ergeben könnte.

### 3.2.3 Untersuchung funktioneller Rev-Mutanten auf ihre Einwanderung in die Stressgranula

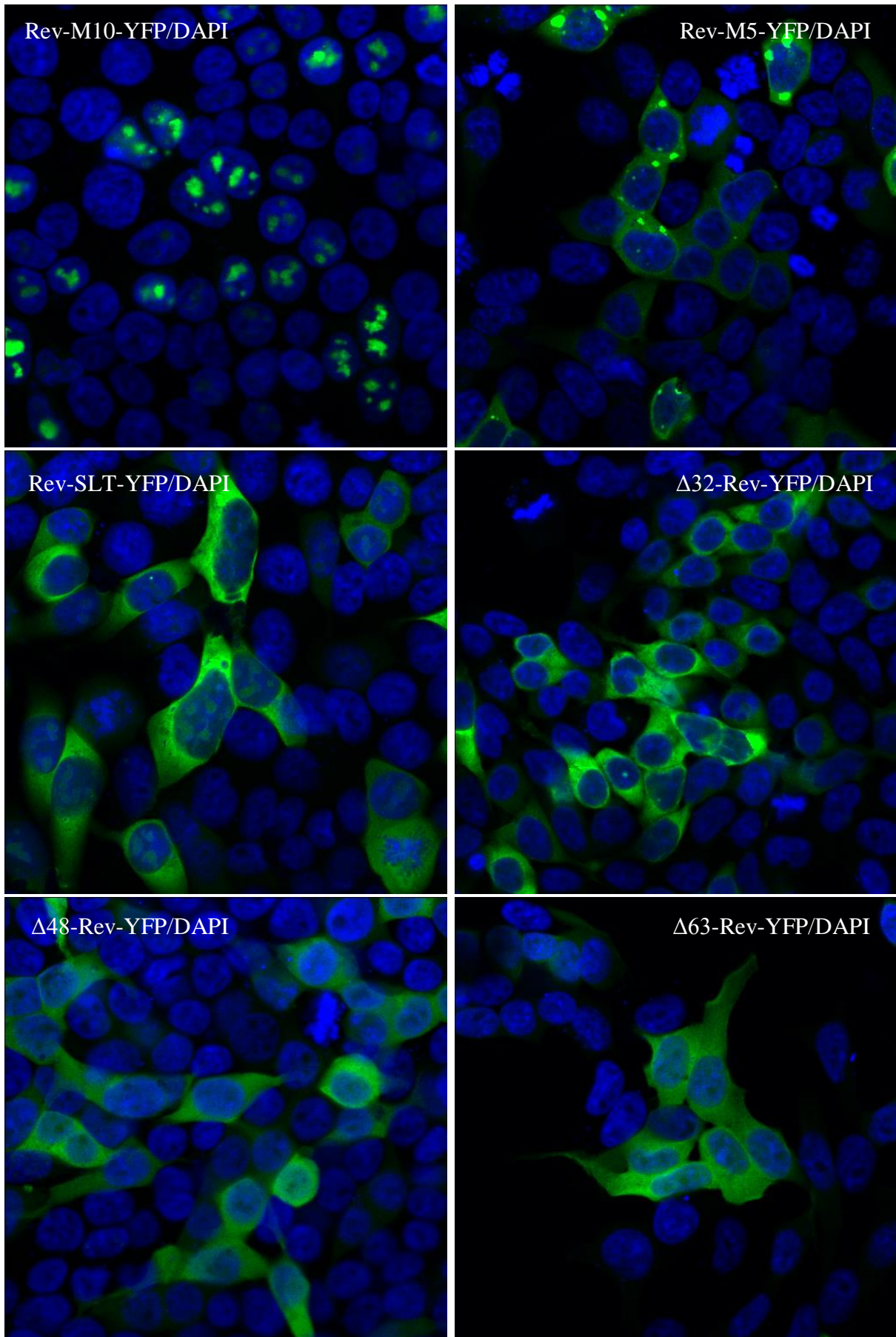
Für das Rev-Protein stand eine Mutantenauswahl zur Verfügung, die genutzt werden sollte, um die für die Einwanderung in die Stressgranula wichtige(n) Domäne(n) zu identifizieren. Abbildung 12 zeigt schematisch den strukturellen Aufbau des Rev-Proteins und kennzeichnet die mutierten Bereiche der sechs Mutanten.



**Abbildung 12: Schematischer Überblick der Rev-Mutanten und der eingefügten Deletionen/Mutationen**  
M5: mutiertes Kernlokalisierungssignal (NLS) und gestörte Bindung an mRNAs mit Rev responsive elements;  
SLT: mutierte Proteinloopstruktur mit stark eingeschränkter Befähigung zur Bildung von Dimeren bzw. Oligomeren; M10: mutiertes Kernexportsignal (NES). Die Zahlen und Buchstaben in Klammern unter den Mutanten geben die Position der veränderten Codons an (roter Balken) sowie die ursprünglichen Aminosäuren im Wildtypprotein (links) bzw. die mutierten Aminosäuren (rechts) im konventionellen Einbuchstabencode. Eine genaue Beschreibung der einzelnen funktionellen Bereiche findet sich auch im Abschnitt 1.1.2.1, Abbildung 2.

Zunächst wurden die ungestressten YFP-markierten Mutanten auf ihre Lokalisation untersucht (siehe Abbildung 13). Rev-M10 mit dem mutierten Exportsignal ist nur noch im Zellkern zu finden (im Bereich der Nukleoli), während Rev-M5 mit dem mutierten nukleären Lokalisationssignal nur im Cytoplasma zu finden ist und dort vielfach in großen Aggregaten akkumuliert.  $\Delta 32$ -,  $\Delta 48$ - und  $\Delta 63$ -Rev sind sowohl im Cytoplasma wie auch (in geringen Teilen) im Kern vorhanden; allerdings ohne in signifikanten Mengen in den Nukleoli zu akkumulieren. Die Mutante Rev-SLT mit der Mutation in der Rev-Dimerisierungsdomäne ähnelt in seiner Verteilung am ehesten dem Wildtypprotein; zeigt aber eine deutlich schwächere Akkumulation in den Nukleoli.

Die Lokalisation der Mutanten im ungestressten Zustand ist in Abbildung 13 vergleichend gegenübergestellt worden.

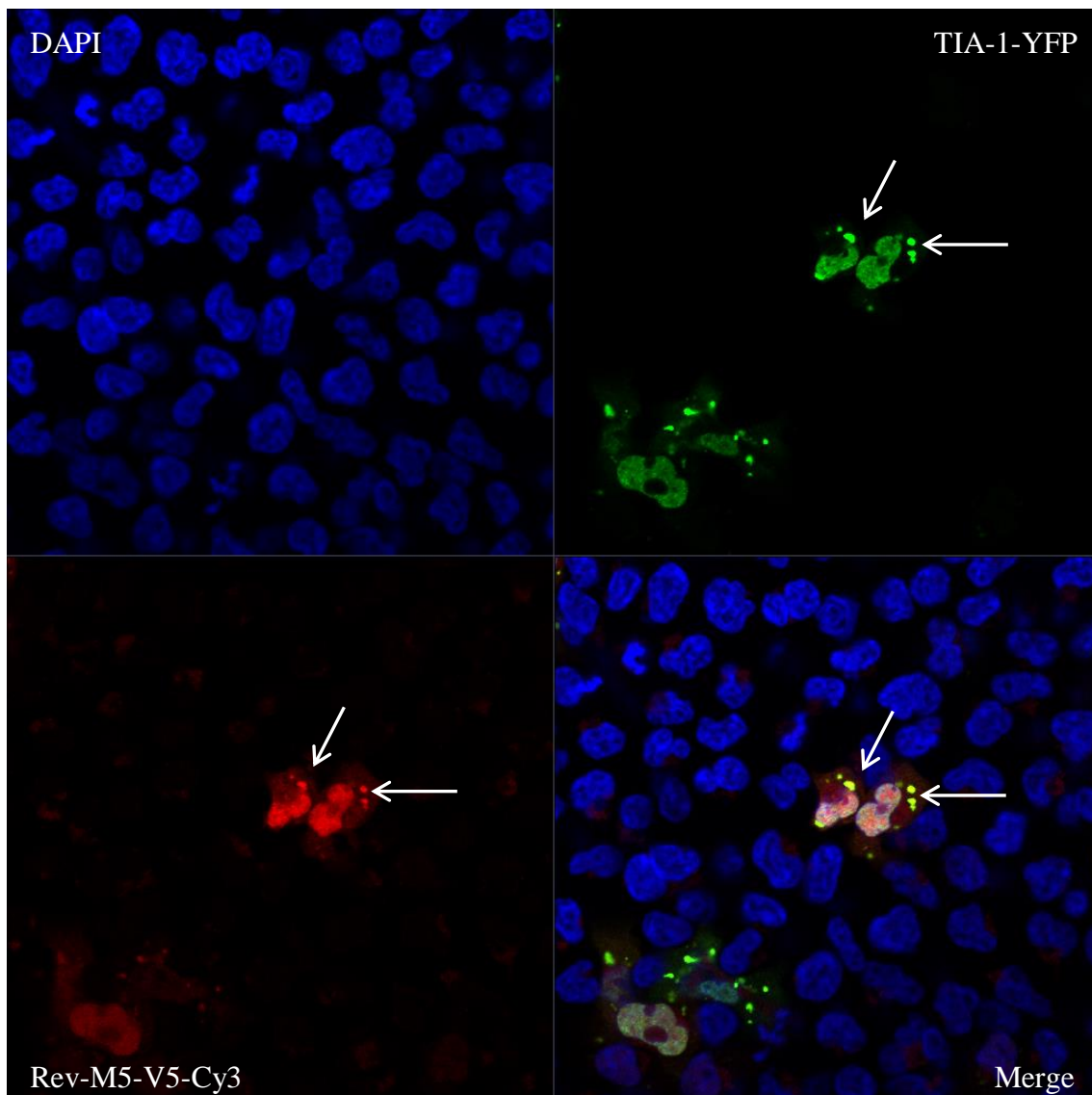


**Abbildung 13: Ungestresste Lokalisation der Rev-Mutanten**

HEK 293T-Zellen wurden mit der angegebenen Rev-Mutante transfiziert und am Folgetag fixiert.

Da Rev ein sehr kleines Protein ist und der deutlich größere YFP-Tag die Eigenschaften des Proteins hinsichtlich der Rekrutierung in die Stressgranula beeinflussen könnte, wurden für die Stressversuche auf V5-getaggte Proteinvarianten von  $\Delta 32$ -Rev, Rev-M5, Rev-M10 und Rev-SLT zurückgegriffen.

Die Mutanten  $\Delta 32$ -Rev, Rev-SLT sowie Rev-M5 waren alle in großen Mengen in den Stressgranula vorhanden. Interessanterweise war Rev-M5 jetzt trotz deletiertem nukleären Lokalisationssignals auch im Kern zu finden, wie in Abbildung 14 dargestellt.



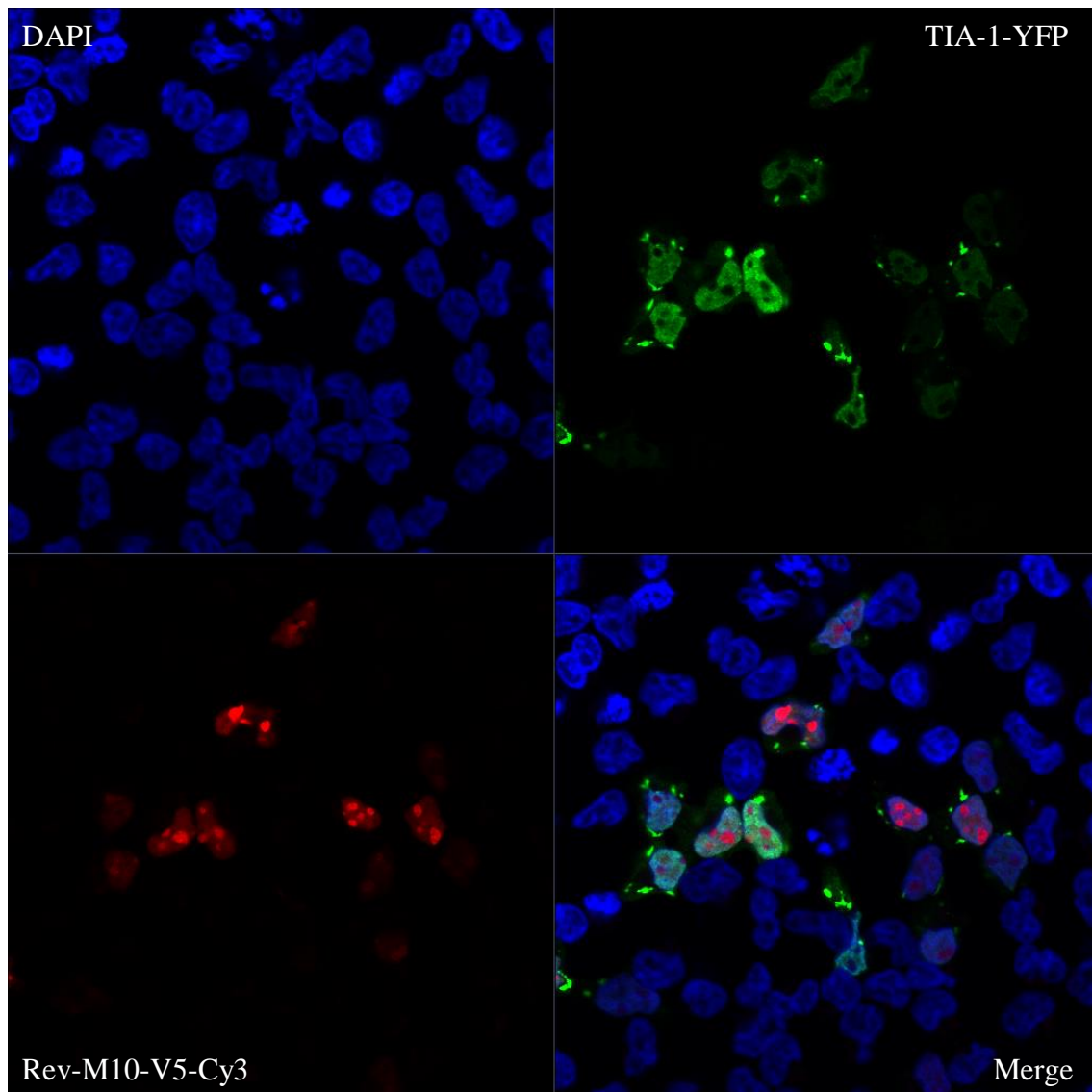
**Abbildung 14: Rev-M5 wird trotz der mutierten Staufen1-Interaktionsdomäne in großen Mengen in die Stressgranula rekrutiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Rev-M5-V5, SHIV-DNA, Staufen1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

Die unter ungestressten Bedingungen beobachteten Rev-M5-Anhäufungen im Cytoplasma kolokalisierten jetzt nahezu vollständig mit dem Stressmarker TIA-1. Die Lokalisation von

Rev-M5 in den Stressgranula ist besonders bemerkenswert, da für diese Mutante in einer Vorarbeit am Institut gezeigt worden ist, dass sie nicht mehr mit Stau1 interagieren kann. Die Rekrutierung von Rev in die Stressgranula müsste hier also unabhängig von Stau1 erfolgt sein. Außerdem ist für diese Mutante gezeigt worden, dass sie deutlich weniger als 10 Prozent der RNA/RRE-Bindeaktivität des Wildtypproteins besitzt (Hoffmann *et al.*, 2012). Die Rekrutierung in die Stressgranula könnte möglicherweise also weitgehend unabhängig von der Bindung an mRNAs erfolgen.

Rev-M10 (mit dem deletierten Exportsignal und der starken Lokalisation im Zellkern) wird, wie Abbildung 15 verdeutlicht, nicht in die Stressgranula transportiert; die intrazelluläre Verteilung änderte sich unter Natriumarsenitstress kaum.

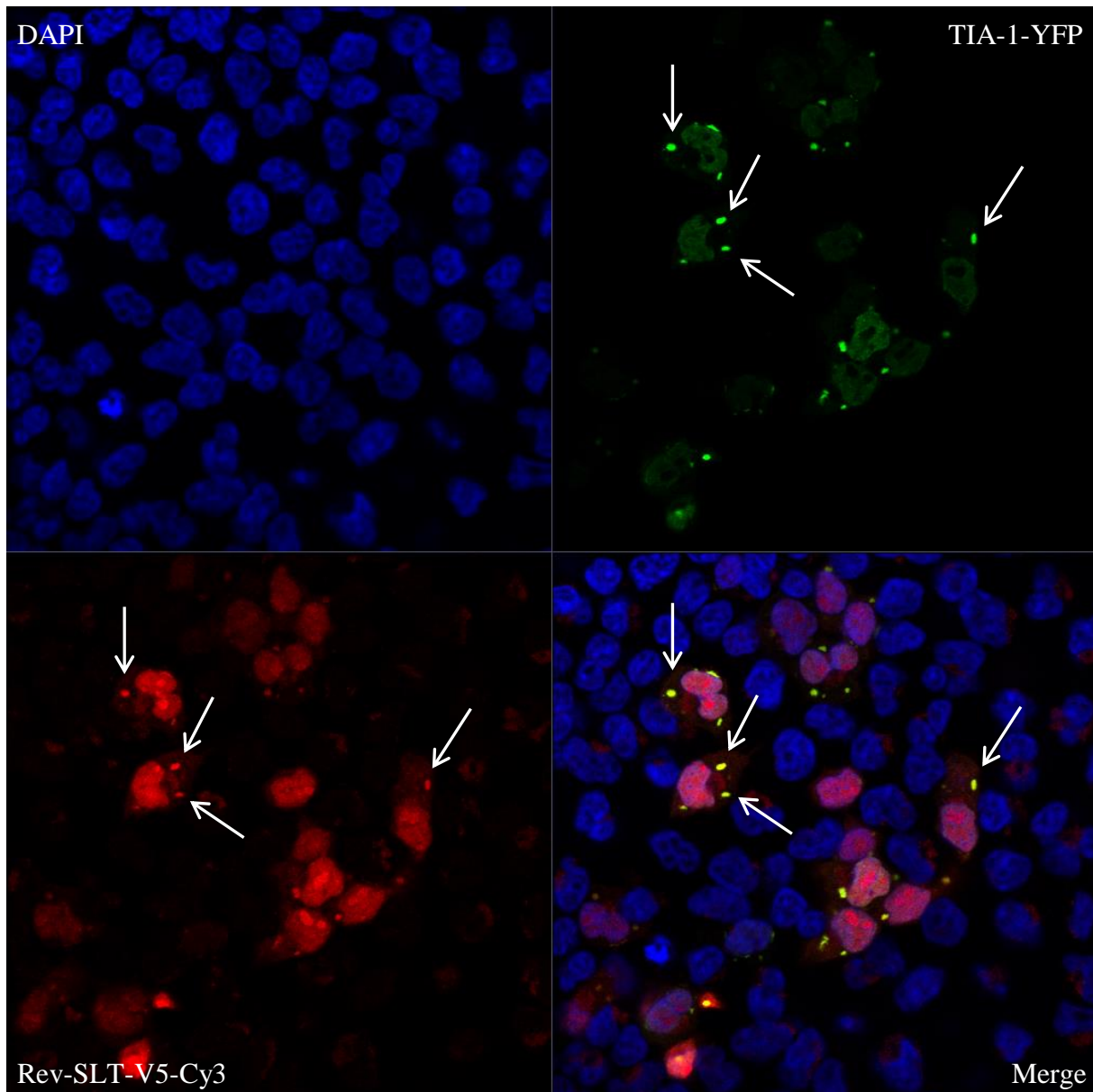


**Abbildung 15: Rev-M10 verbleibt unter Stressbedingungen vollständig im Zellkern und ist nicht in den Stressgranula zu finden.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Rev-M10-V5, SHIV-DNA, Stau1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.



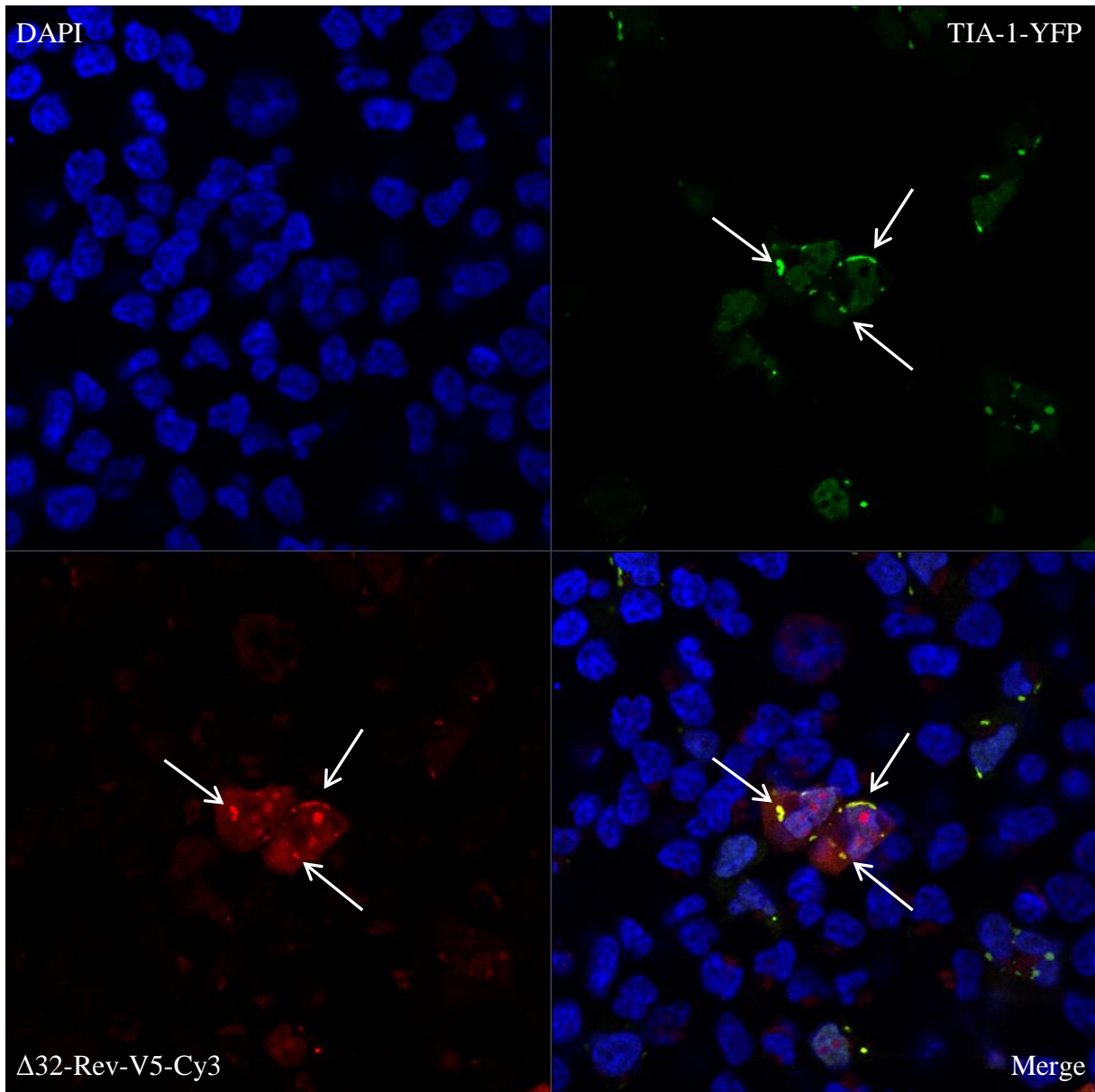
Die beiden Oligomerisierungsmutanten Rev-SLT sowie  $\Delta 32$ -Rev waren beide deutlich in den Stressgranula zu finden (Abbildung 16 und 17). Weder die Oligomerisierung von Rev noch die N-terminale Region scheinen für die Rekrutierung in die Stressgranula essentiell zu sein.



**Abbildung 16: Die Oligomerisierungsmutante Rev-SLT wird in großen Mengen in die Stressgranula rekrutiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Rev-SLT-V5, SHIV-DNA, Staufen1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

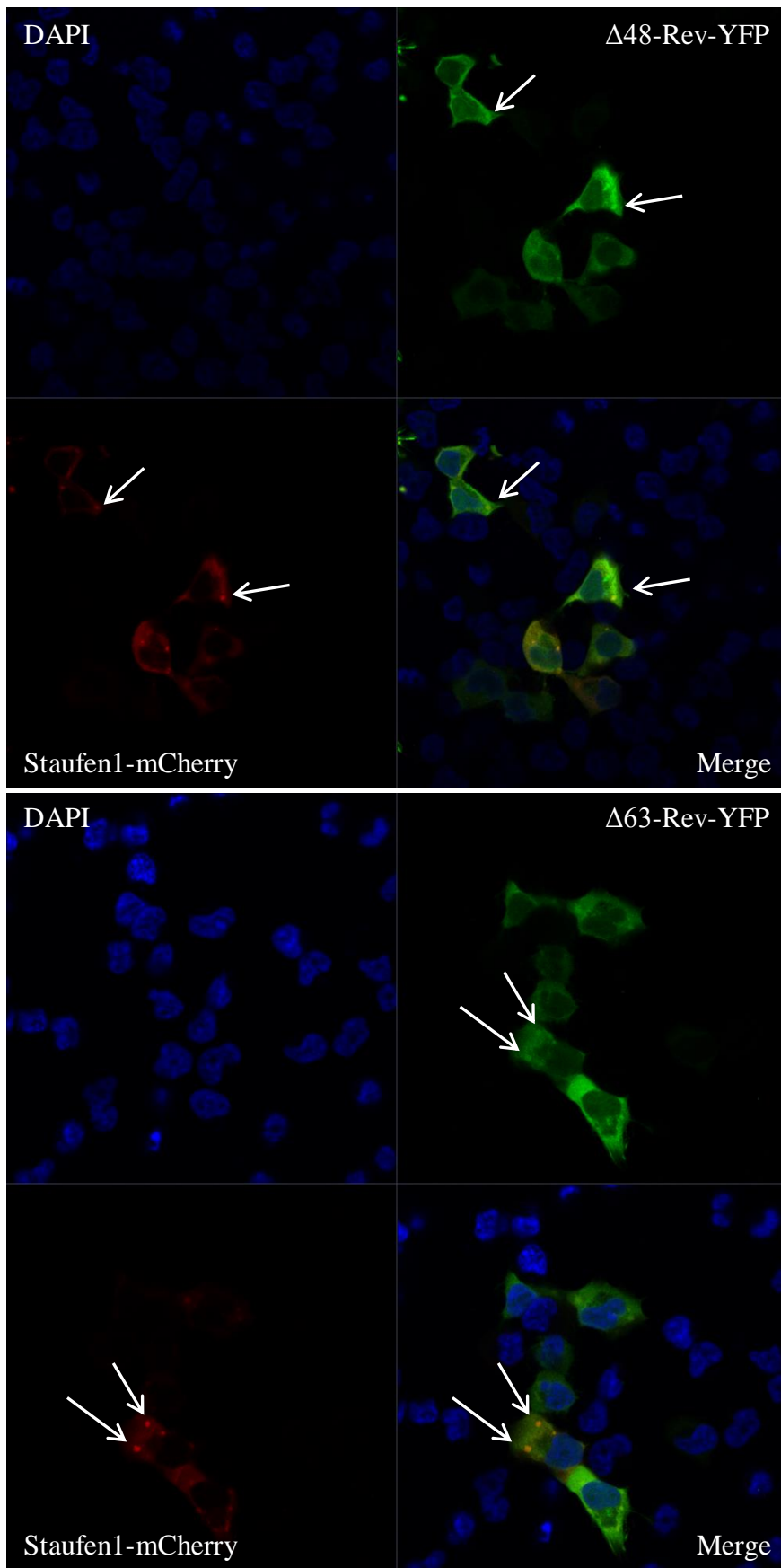
Interessanterweise akkumulierte die  $\Delta 32$ -Rev-V5-Mutante (siehe Abbildung 17) in diesen Versuchen auch in den Nukleoli, was nicht für ungestresstes  $\Delta 32$ -Rev-YFP beobachtbar ist. Dies könnte in Zusammenhang stehen mit dem Stressen der Zellen, aber auch mit der Präsenz von viraler DNA oder sich aus dem Wegfall des deutlich größeren YFP-Fluoreszenztags (im Austausch mit dem kleineren V5-Tag) ergeben.



**Abbildung 17:  $\Delta 32$ -Rev wird in großen Mengen in die Stressgranula rekrutiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit  $\Delta 32$ -Rev-V5, SHIV-DNA, Stau1-Flag und TIA-1-YFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

Die V5-getaggten Mutanten  $\Delta 48$  und  $\Delta 63$  mit einer Größe von deutlich unter 100 Aminosäuren konnten unter Stressbedingungen nur in sehr geringen Mengen in den Zellen beobachtet werden; vermutlich verhinderte ihre geringe Größe eine effiziente Translation oder führten zu einem schnellen proteolytischen Abbau. Daher wurden für diese Rev-Mutanten die YFP-getaggten Varianten gewählt und Stau1-mCherry zur Visualisierung der Stressgranula herangezogen. Die YFP-getaggten Mutanten  $\Delta 48$ -Rev und  $\Delta 63$ -Rev zeigten ebenfalls eine schwache Lokalisation in den Stressgranula. Im Falle von  $\Delta 48$ -Rev ist diese bei den meisten Zellen geringfügig stärker ausgeprägt als im Falle von  $\Delta 63$ -Rev.



**Abbildung 18:  $\Delta 48$ -Rev wandert in begrenztem Umfang in die Stressgranula ein;  $\Delta 63$ -Rev wandert nur noch sehr schwach in die Stressgranula ein.**

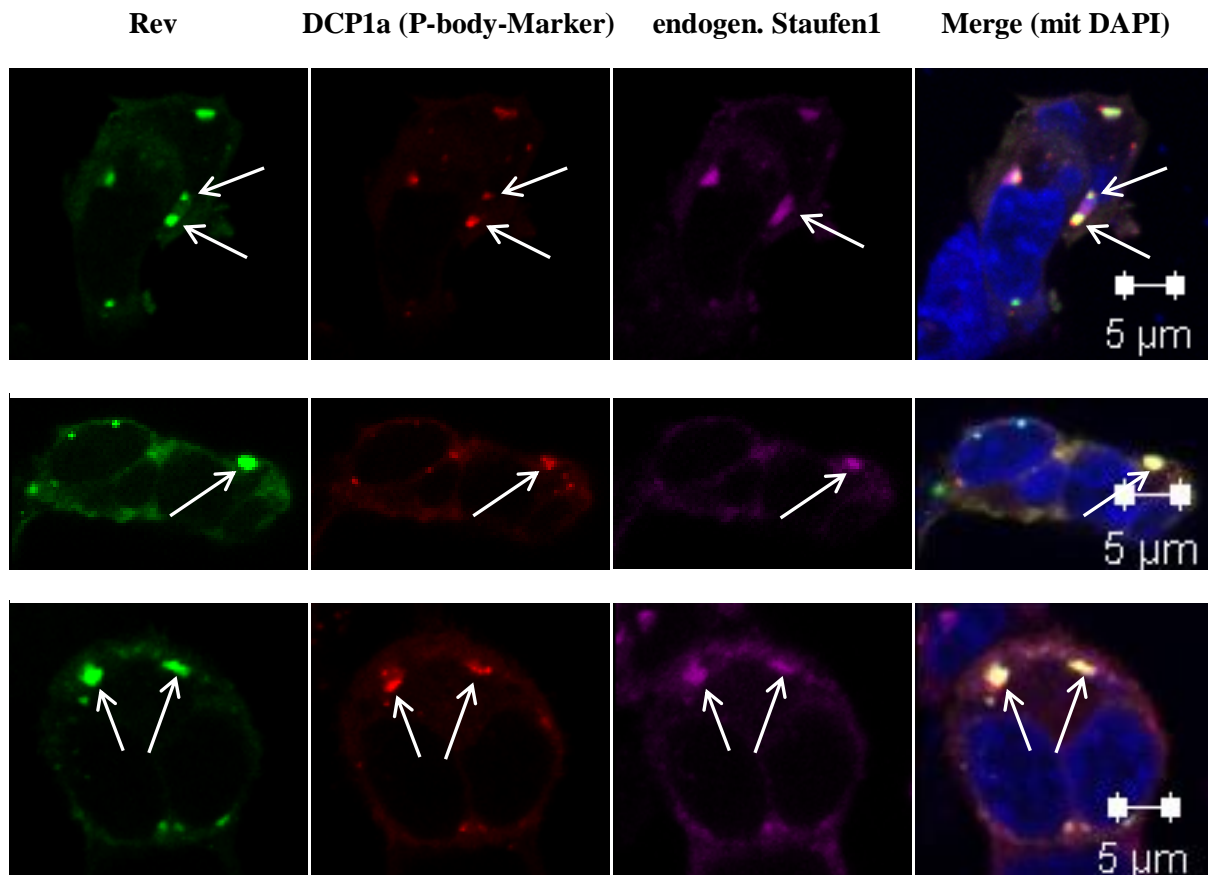
HEK 293T-Zellen wurden mit  $\Delta 48$ -Rev-YFP (oben) bzw.  $\Delta 63$ -Rev-YFP (unten), SHIV-DNA, Staufen1-Flag und Staufen1-mCherry transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert.

Für Mutante  $\Delta 63$ -Rev konnte nur in einigen wenigen Zellen eine Akkumulation in den Stressgranula gefunden werden. Auf Grund der sehr kleinen Fragmentgröße von  $\Delta 48$ -Rev und  $\Delta 63$ -Rev und des im Vergleich dazu recht großen Fluoreszenztags bleibt allerdings fraglich, ob dies tatsächlich bedeutet, dass der verantwortliche Bereich für die Einwanderung in die Stressgranula zwischen Aminosäure 32 und 48 (also dem Bereich für die nukleäre Lokalisation und der Bindung an Rev responsive elements) oder zwischen Aminosäure 48 und 63 liegt. Rev-Mutanten mit Deletionen im C-terminalen Bereich könnten darüber Aufschluss geben.

### **3.2.4 Untersuchungen zur Lokalisation von Rev in den Prozessierungskörperchen**

Erst kürzlich wurde beschrieben, dass Rec zwar in natriumarsenitinduzierte Stressgranula einwandern kann, nicht aber in den Prozessierungskörperchen zu finden ist (Hanke *et al.*, 2013). Vor diesem Hintergrund stellt sich die Frage, ob auch Rev lediglich in die Stressgranula einwandert, nicht aber in die P-bodies mit den hier enthaltenen Komponenten zum Abbau von RNAs. Zur Aufklärung dieser Fragestellung wurden zur Herstellung von Immunfluoreszenzpräparaten HEK 293T-Zellen mit Rev-YFP sowie dem P-body-Marker DCP1a-mRFP kotransfiziert, gestresst und zusätzlich endogenes Staufen1 angefärbt. Die Mehrheit der beobachteten Granula mit Staufen1- und Rev-Akkumulationen bildeten distinkte Einheiten von den oftmals benachbarten P-bodies, wie es im Falle von Rec auch beobachtet worden ist. Etwa 10 bis 20 % der Zellen zeigten aber Granula mit einer deutlichen Kolo-kalisation von Rev und endogenem Staufen1 mit dem P-body-Marker DCP1a, wie in der Abbildung 19 an Hand an Hand dreier vergrößerter Bildausschnitte exemplarisch gezeigt ist.

Interessanterweise besitzen diese vergleichsweise großen Granula (zumindest größer als die meisten anderen P-bodies) anscheinend auch eine gewisse Feinstrukturierung, da die Rev-, Staufen1- und DCP1a-Akkumulationen zwar deutlich miteinander überlappen, keinesfalls aber immer deckungsgleich sind. Für die hier beobachtete Einwanderung von Rev in die Prozessierungskörperchen war die Zugabe von viraler DNA wie schon bei den Untersuchungen zur Einwanderung in die Stressgranula nicht erforderlich. Es spricht also einiges dafür, dass Rev unabhängig von mRNAs in die Prozessierungskörperchen rekrutiert werden kann.



**Abbildung 19: Rev (und Stau1) sind zum Teil auch in den Prozessierungskörperchen zu finden.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Rev-YFP und DCP1a-mRFP transfiziert und am Folgetag nach einstündigem Natriumarsenitstress fixiert. Die drei Abbildungsreihen zeigen vergrößerte Bildausschnitte von drei separaten Aufnahmen, um die Granulastrukturierung besser zu verdeutlichen.

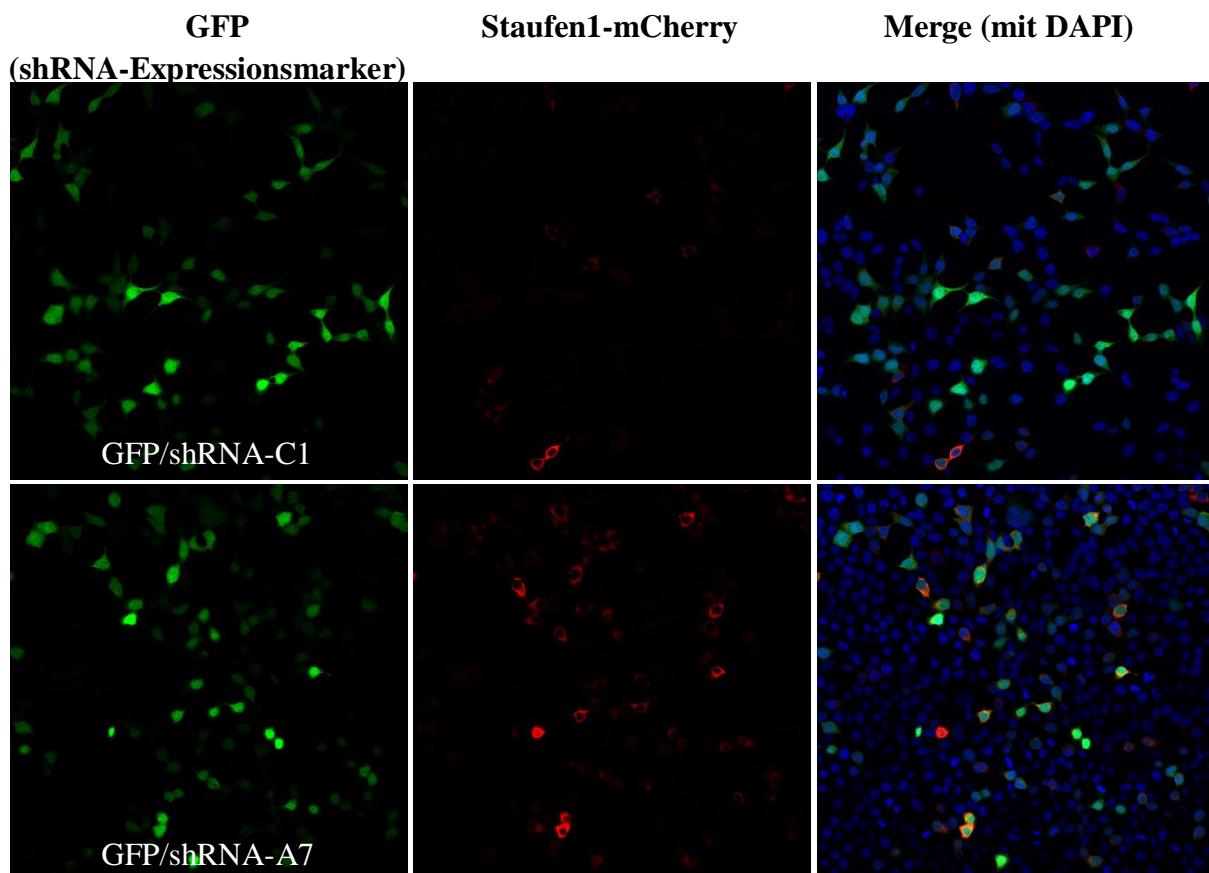
### 3.2.5 Einfluss der Stau1-Überexpression und des Stau1-Knockdowns auf die Einwanderung von Rec und Rev in die Stressgranula

Die bisherigen Untersuchungen warfen die Frage auf, welche Rolle Stau1 für den Transport von Rev und Rec in die Stressgranula spielt. Zur Klärung dieser Frage sollte die Stau1 in den HEK 293T-Zellen mit shRNAs und siRNAs herunterreguliert werden und die Ergebnisse mit der Überexpression von Stau1 verglichen werden.

#### 3.2.5.1 Nachweis des Knockdowns von ektoischem und endogenem Stau1 mittels shRNAs und siRNAs

shRNAs (short hairpin RNAs) können von Plasmiden kodiert werden und stabil in den Zellen exprimiert werden. Sie stellen damit eine beliebte Alternative zu dem teureren und weniger beständigen Einsatz von siRNAs dar. Trotz des prinzipiell sehr ähnlichen Wirkprinzips ist aber auch die Effizienz des Knockdowns oftmals geringer als bei siRNAs. Das lentivirale Plasmid pLVTHM ist für die Expression von shRNAs designt worden. Es kodiert gleichzeitig

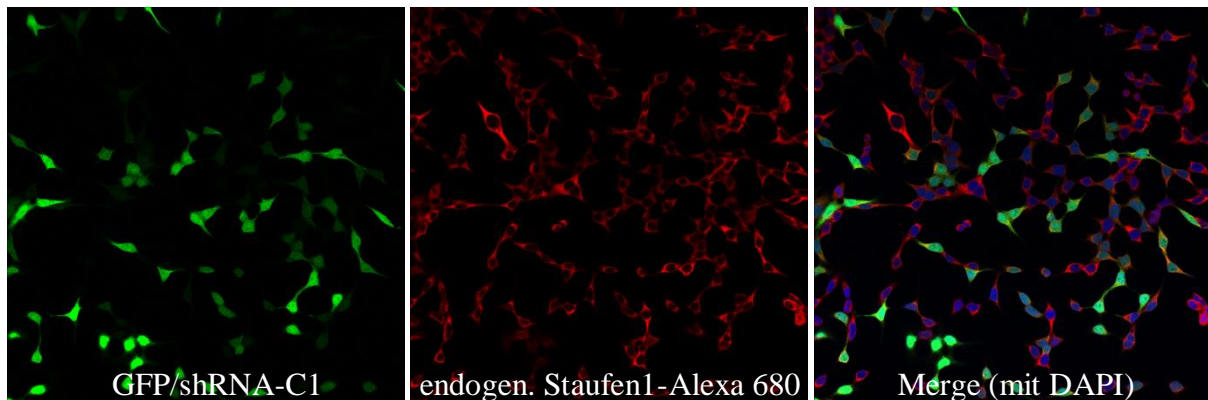
für GFP, das als Transfektionsmarker dient. Für den Staufen1-Knockdown standen insgesamt fünf shRNA-Konstrukte zur Verfügung (C1, C3, A2C4, A7 und B3), die an unterschiedlichen Bereichen des Staufen1-Transkriptes angreifen können. Zunächst wurde versucht ektoptisches Staufen1-mCherry herunterzuregulieren. Bei einem erfolgreichen Staufen1-Knockdown sollten die transfizierten Zellen also ein grünes GFP-Signal als Indikator für die Expression der shRNAs, aber kein rotes mCherry-Signal mehr aussenden. Da ein Gemisch der fünf Varianten sehr heterogene Ergebnisse lieferte, wurden alle fünf Varianten einzeln getestet und mit dem leeren pLVTHM-Plasmid verglichen. C3 und A2C4 zeigten nur eine mäßige Reduktion der Expression von Staufen1-mCherry, A7 und B3 fast keinen messbaren Effekt und lediglich C1 erwies sich als ausreichend wirksam (Abbildung 20). Während für ausreichende Staufen1-mCherry-Signale im Falle des Knockdowns mit shRNA-C1 die Laserstärke zur Anregung von mCherry auf 80 % des maximal möglichen eingestellt werden musste, reichten beim Knockdown mit dem nur schwach wirksamen shRNA-A7 11 % zur Generierung einer starken Fluoreszenz aus.



**Abbildung 20 (3 x 3 Tile Scans):** Die shRNA-C1 zeigt gegen ektoptisches Staufen1 (Staufen1-mCherry) die beste Aktivität (oben), andere shRNAs wie shRNA-A7 bewirken dagegen teilweise nur eine geringe Reduktion der Expression von Staufen1-mCherry (unten).

HEK 293T-Zellen wurden mit Staufen1-mCherry und dem angegebenen pLVTHM-shRNA-Vektor transfiziert und am Folgetag fixiert.

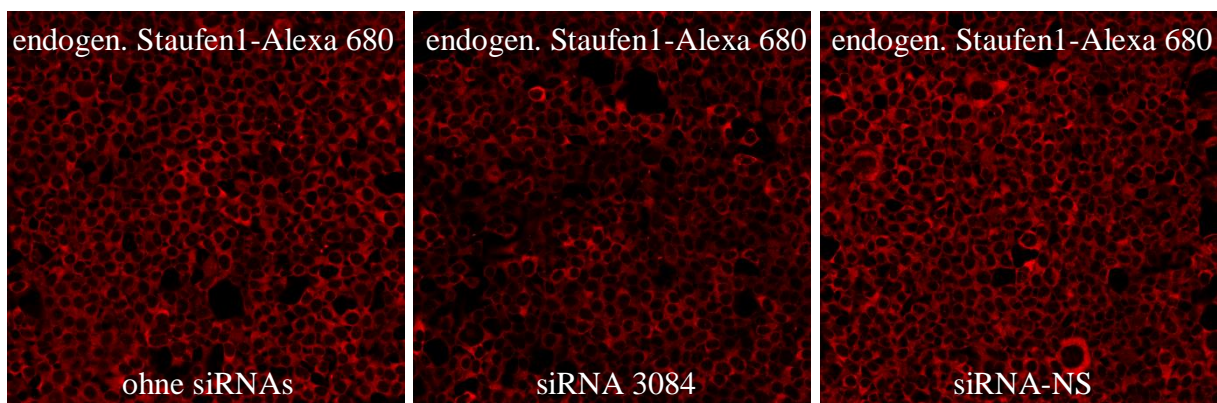
Anschließend wurde versucht mit dem am stärksten wirksamen Konstrukt, shRNA-C1, auch endogenes Staufen1 herunterzuregulieren, der beobachtete Effekt war aber deutlich geringer (siehe Abbildung 21).



**Abbildung 21: Die shRNA-C1 wirkt nur schwach gegen endogenes Staufen1.**

HEK 293T-Zellen wurden mit dem Plasmid pLVTHM-shRNA-C1 transfiziert und am Folgetag fixiert.

Daher wurde der endogene Staufen1-Knockdown nun mit der siRNA 3084 versucht, die bereits in anderen Studien mit Erfolg gegen die 55 kDa- sowie 63 kDa-Variante von Staufen1 eingesetzt werden konnte (Chatel-Chaix *et al.*, 2004; Abrahamyan *et al.*, 2010). Zum Ausschluss von unspezifischen Effekten, die sich aus dem Einsatz von siRNAs ergeben können, wurde als Negativkontrolle eine siRNA verwendet, die nicht gegen Staufen1 gerichtet ist (siRNA-NS). Die siRNA 3084 zeigte in Immunfluoreszenzaufnahmen nach 24 Stunden eine deutliche Reduktion im Vergleich zur siRNA-NS und zu untransfizierten Zellen (siehe Abbildung 22).



**Abbildung 22: siRNA 3084 reguliert das endogene Staufen1 herunter; unspezifische Effekte durch siRNAs treten nicht auf.**

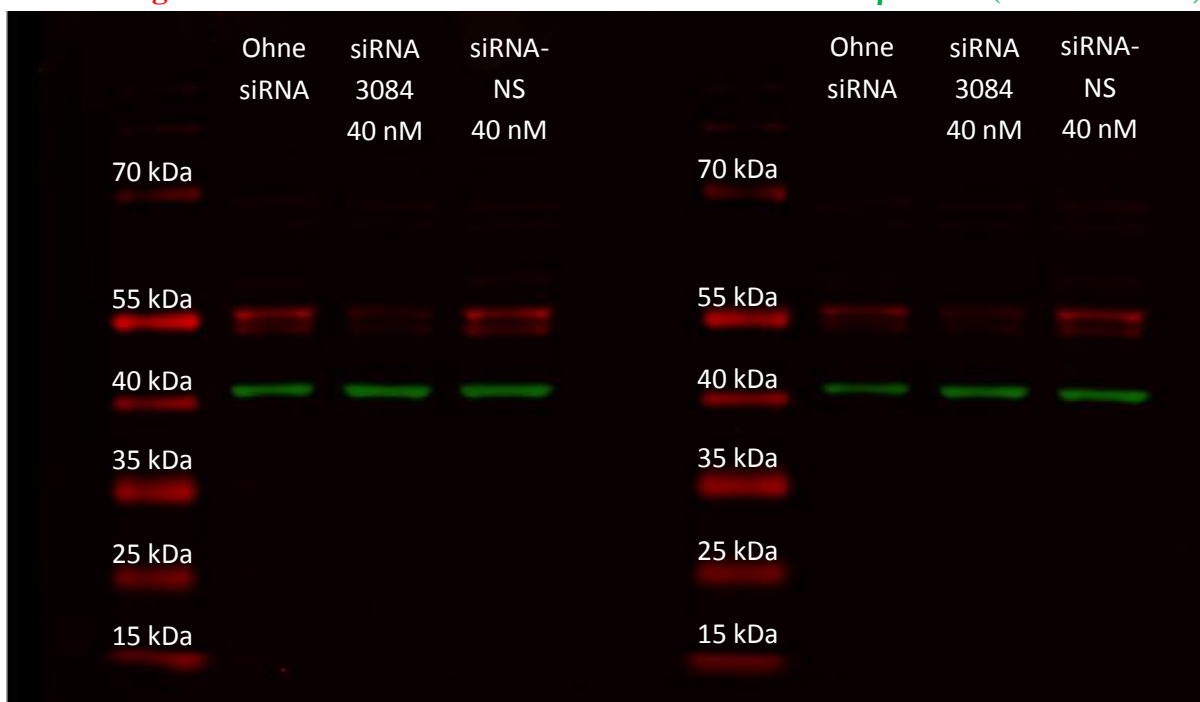
HEK 293T-Zellen wurden mit der Staufen1-spezifischen siRNA 3084 transfiziert (Mitte), mit der nicht spezifischen siRNA-NS (rechts) oder ganz ohne siRNAs transfiziert (links). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und endogenes Staufen1 angefärbt.

Immunfluoreszenzaufnahmen sind allerdings nur begrenzt für quantitative Analysen geeignet; Western Blots erlauben dagegen verlässlichere Aussagen über den Rückgang der

Proteinexpression. Daher wurde nun, nach einer weiteren Optimierung der Transfektion mit Effectene und der erforderlichen Effectenemenge, in zwei Ansätzen HEK 293T-Zellen entweder mit der siRNA 3084 oder siRNA-NS transfiziert sowie in einem dritten Ansatz Zellen ohne die Zugabe von siRNAs über 40 Stunden angezogen. Mit den aus diesen Ansätzen gewonnenen Zelllysaten wurde im Western Blot die Proteinexpression von endogenem Staufen1 überprüft. Als Ladekontrolle und für die Normalisierung beziehungsweise Quantifizierung der Ansätze über ImageJ wurde gleichzeitig  $\beta$ -Aktin nachgewiesen. Die Ansätze wurden in vier Replika in verschiedenen Konzentrationen auf die Acrylamidgele aufgetragen. Abbildung 23 zeigt beispielhaft zwei der vier Replika:

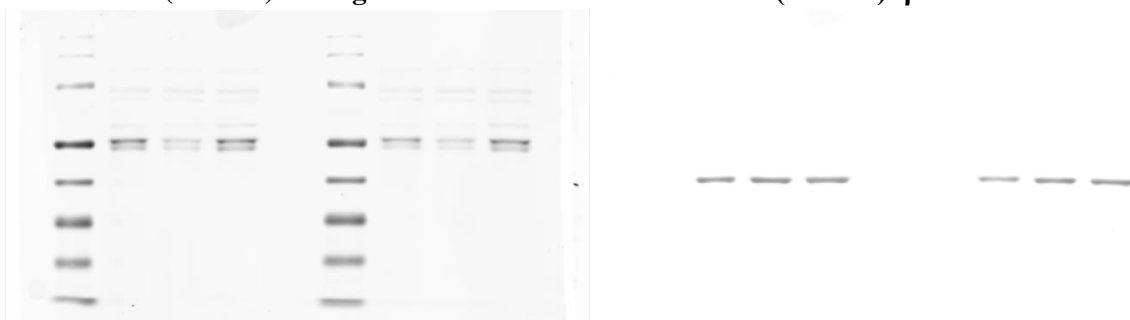
**Rot: endogenes Staufen1**

**Grün:  $\beta$ -Aktin (Ladekontrolle)**



**Roter Kanal (700 nm): endogenes Staufen1**

**Grüner Kanal (800 nm):  $\beta$ -Aktin**

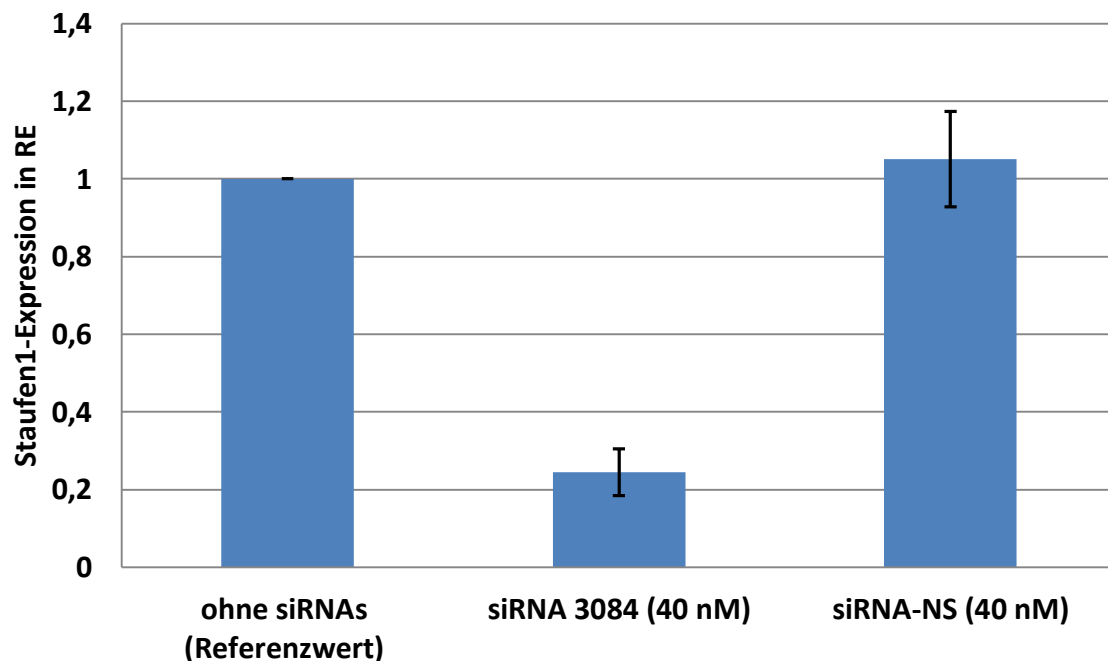


**Abbildung 23: Nachweis der Effektivität von siRNA 3084 im Western Blot**

HEK 293T-Zellen wurden in drei Ansätzen wie angegeben transfiziert, 40 Stunden später geerntet und die Lysate in verschiedenen Replika im Western Blot analysiert und dabei sowohl endogenes Staufen1 wie auch  $\beta$ -Aktin detektiert. Die obere Abbildung zeigt den Scan des Blotes mit zwei Replikaaufragungen im Odyssey Infrared Imager mit der Überlagerung beider Kanäle; in den beiden unteren Abbildungen sind die beiden Kanäle getrennt in Schwarzweiß dargestellt. Hinweis: Die Doppelbanden bei 55 kDa resultieren vermutlich aus posttranslationalen Modifikationen von Staufen1, die zu verschiedenen Proteinmassen führen.



Die einzelnen Staufen1-Banden wurden auf die zugehörigen Aktinbanden normalisiert und in Bezug gesetzt auf die Staufen1-Banden der untransfizierten Zellen. Die Ergebnisse der vier Replika wurden gemittelt und der Standardfehler des Mittelwertes berechnet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 dargestellt:



**Abbildung 24: Die siRNA 3084 reduziert die Menge an endogenem Staufen1 um etwa 75 Prozent; unspezifische siRNAs zeigen keine Wirkung.**

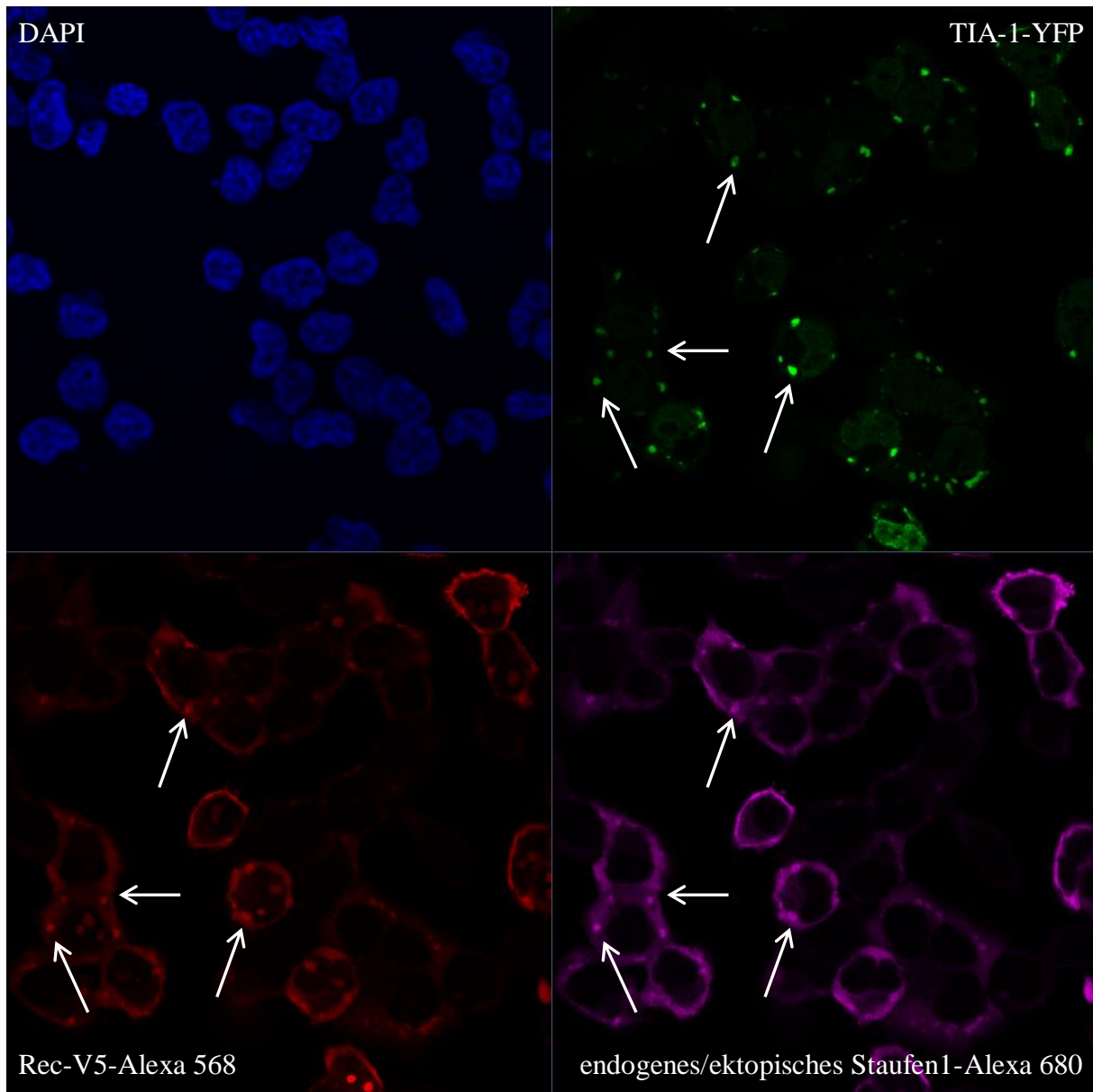
Die im Western Blot ermittelten Expressionswerte von Staufen1 wurden auf den Zustand ohne Zugabe von siRNAs normiert (auf den Wert 1 festgesetzt), alle Angaben auf der y-Achse sind dementsprechend als relative Einheiten (RE) zu bewerten.

Die Western Blot-Analyse zeigt, dass mittels siRNA 3084 etwa 75 % der endogenen Staufen1-Menge herunterreguliert werden konnte, siRNA-bedingte Artefakte sind dabei nicht zu beobachten, da die nicht Staufen1-spezifische siRNA-NS keine signifikante Veränderung der Staufen1-Expression zur Folge hatte. Die gemessene Reduktion der endogenen Staufen1-Menge um ca. 75 % liegt im Bereich des Erwarteten, da Publikationen, in denen die gleichen siRNAs zum Einsatz kamen, von einer Reduktion der endogenen Staufen1-Menge um etwa 80 % berichteten (Chatel-Chaix *et al.*, 2004).

### **3.2.5.2 Einfluss des Knockdowns von endogenem Staufen1 sowie der Staufen1-Überexpression auf die Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula**

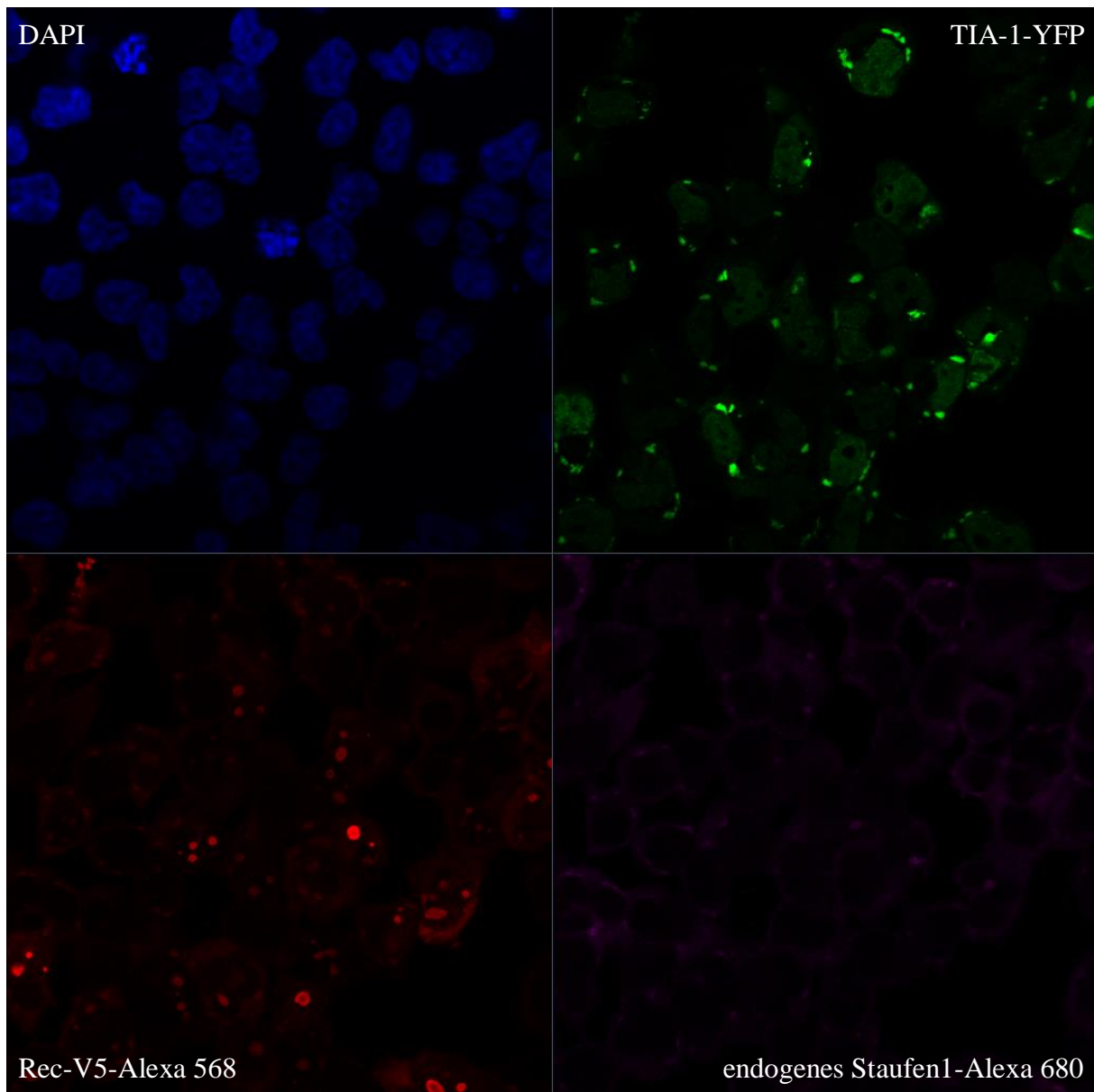
Nach dem Beweis der Wirksamkeit des Staufen1-Knockdowns wurde die Rec- und Rev-Einwanderung in die Stressgranula nach einer Transfektion mit siRNA 3084 untersucht und mit dem Effekt einer Staufen1-Überexpression verglichen.

In Abbildung 25 ist die Lokalisation von Rec bei Überexpression von Stau1 dargestellt. Es fällt auf, dass bei der Überexpression von Stau1 deutlich mehr Rec im Cytoplasma vorhanden ist als beim Knockdown von Stau1.



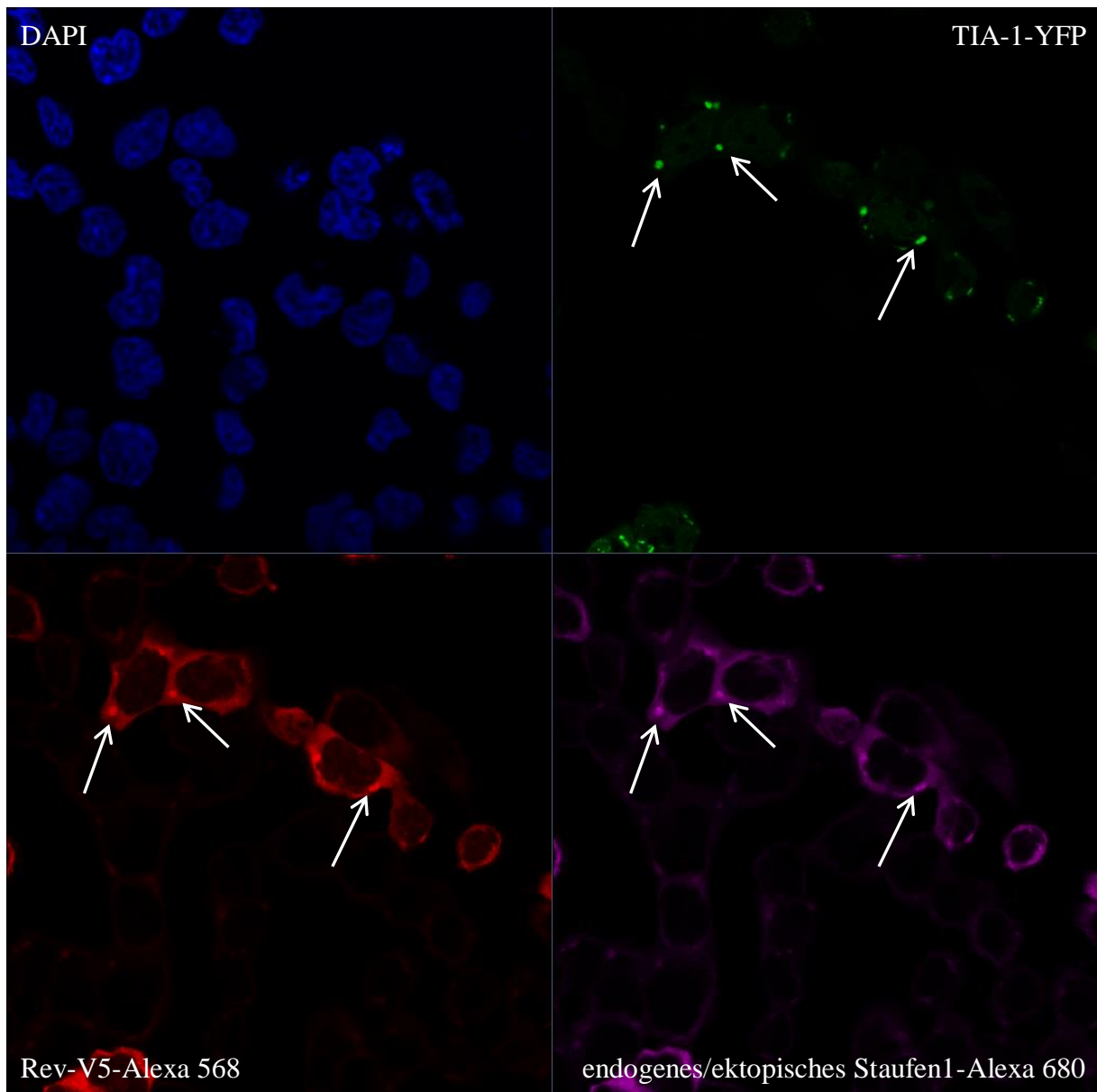
**Abbildung 25: Überexpression von Stau1 begünstigt die Einwanderung von Rec in die Stressgranula.** HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP, Rec-V5, HERV-K113-DNA und Stau1-Flag transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

Nach dem Stau1-Knockdown ist eine Einwanderung von Rec in die Stressgranula in gewissem Maße noch beobachtbar, aber in einem signifikant geringeren Ausmaß als im Falle der Stau1-Überexpression. Die Mehrheit der Zellen zeigt unter diesen Bedingungen keine Einwanderung mehr von Rec in die Stressgranula (siehe Abbildung 26).



**Abbildung 26: Der Knockdown von Stau1 behindert die Einwanderung von Rec in die Stressgranula.** HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP, Rec-V5, HERV-K113-DNA und mit der siRNA 3084 transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

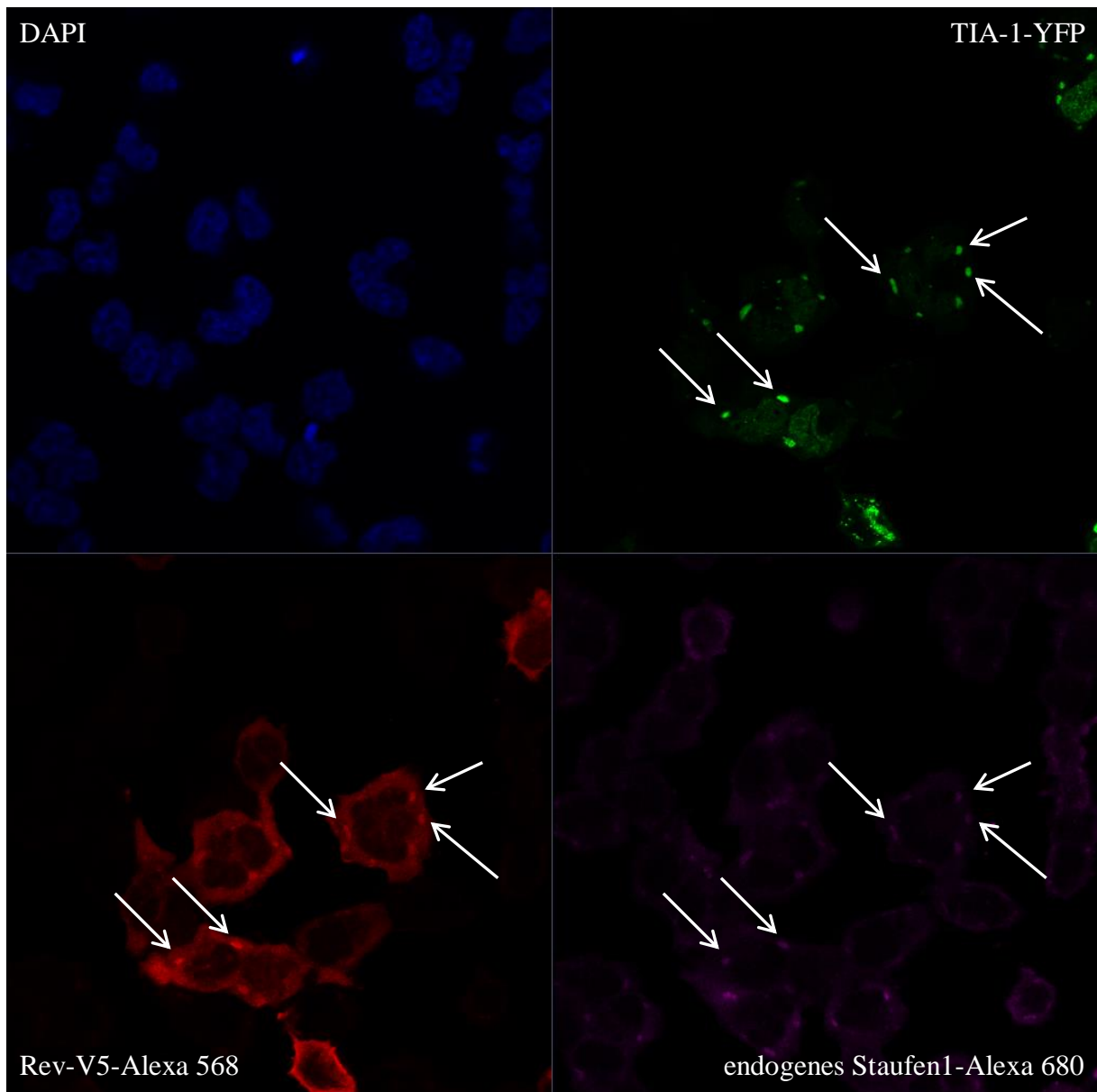
Das Rev-Protein scheint dagegen relativ unabhängig von Stau1 in die Stressgranula zu gelangen. Die Stau1-Überexpression führte weder zu einer stärkeren Lokalisation im Cytoplasma noch zu einer verstärkten Einwanderung in die Stressgranula; ein Stau1-Knockdown scheint (wenn überhaupt) einen eher positiven Effekt für die Einwanderung von Rev zu haben. In beiden Fällen ist die große Mehrheit des viralen Proteins im Cytoplasma zu finden. Abbildung 27 zeigt die Lokalisation von Rev unter Stressbedingungen und nach Stau1-Überexpression.



**Abbildung 27: Die Überexpression von Stau1 beeinflusst nicht die Rekrutierung von Rev in die Stressgranula.**

HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP, Rev-V5 und Stau1-Flag transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

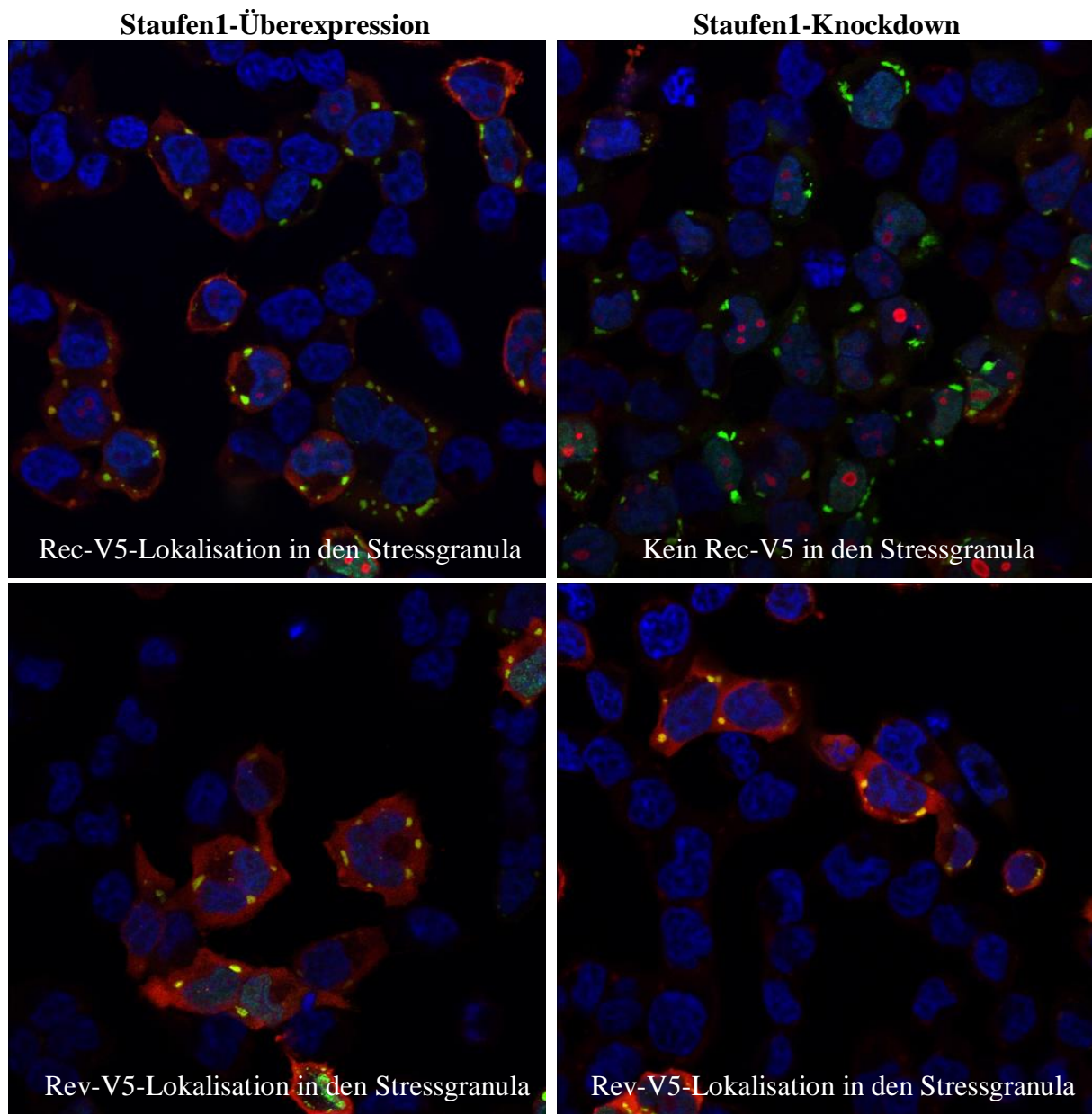
Abbildung 28 zeigt die Lokalisation von Rev unter Stressbedingungen und nach dem Knockdown von endogenem Stau1.



**Abbildung 28: Der Knockdown von Stau1 beeinflusst nicht die Einwanderung von Rev in die Stressgranula.**

HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP, Rev-V5 und mit der siRNA 3084 transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

In Abbildung 29 werden die überlagerten Bilder („Merge“ der Kanäle mit Ausnahme des Stau1-Kanales) der obigen vier Abbildungen von Rec und Rev nach Stau1-Knockdown beziehungsweise nach der Überexpression vergleichend gegenübergestellt. Anhand der gelb dargestellten Kollokalisationsbereiche wird noch einmal gut veranschaulicht, dass nur Rec, aber nicht Rev vom intrazellulären Stau1-Level hinsichtlich des Transportes in die Stressgranula beeinflusst wird. Gleichzeitig wird ebenfalls deutlich, dass Rec auch unter Stress in den Nukleoli zu finden ist, während Rev deutlich mehr im Cytoplasma vertreten ist.



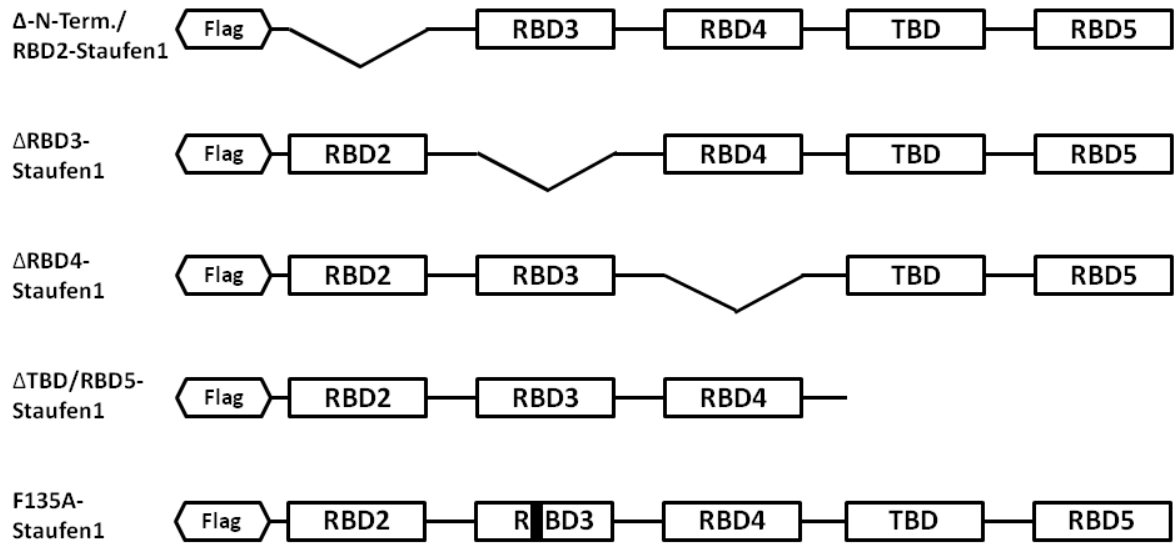
**Abbildung 29: Rec, aber nicht Rev, wird von der Überexpression von Staufen1 bzw. dem Knockdown von endogenem Staufen1 hinsichtlich seiner Einwanderung in die Stressgranula beeinflusst.**

Die vorangehenden vier Abbildungen 25 - 28 werden hier als Überlagerung des DAPI-, Rec/Rev- sowie des TIA-1-Kanals dargestellt. Gelbe Bereiche verdeutlichen Orte der Kolo-kalisation von TIA-1 mit Rec bzw. Rev. Zur besseren Interpretation der Bilder wurde auf die Darstellung des Staufen1-Signales verzichtet.

### 3.3 Untersuchungen zur Einwanderung von Staufen1 in die Stressgranula

#### 3.3.1 Analysen zur Einwanderung der Staufen1-Mutanten in die Stressgranula

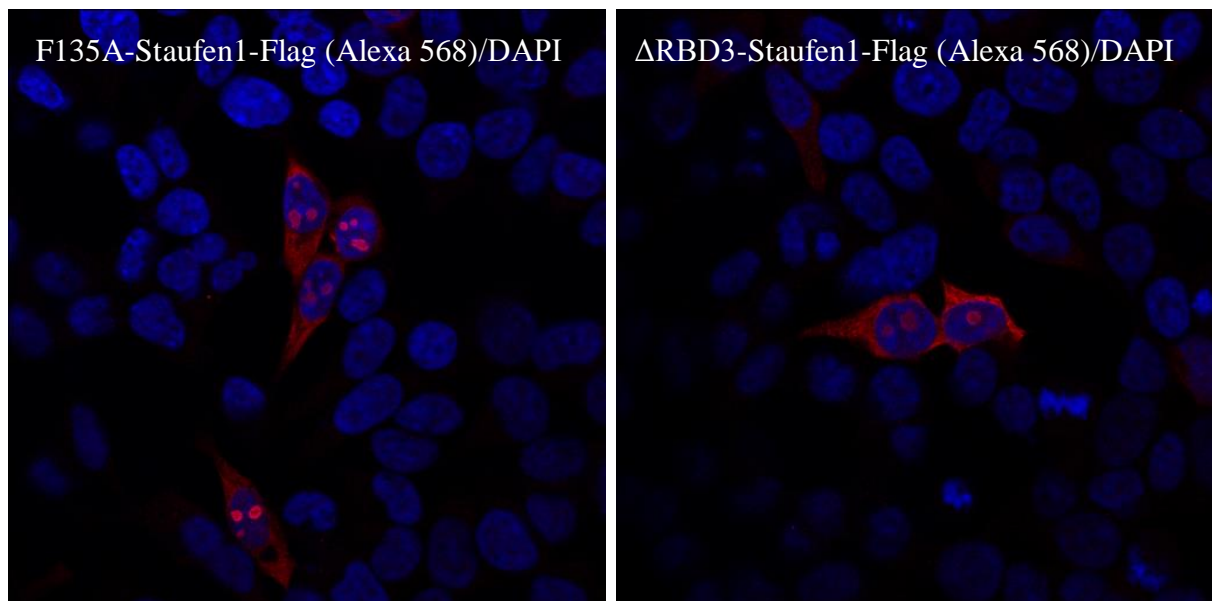
Zur Identifizierung der Staufen1-Domäne, die für die Rekrutierung in die Stressgranula verantwortlich ist, wurde auf eine bereits bestehende Mutantensammlung zurückgegriffen. In vier der fünf Mutanten wurden ein bis zwei funktionelle Domänen deletiert; die fünfte Mutante, F135A-Staufen1, besitzt eine Punktmutation in der Domäne RBD3, die die RNA-Bindeaktivität dieser Domäne zerstört (Chatel-Chaix *et al.*, 2004). Die einzelnen Veränderungen und Deletionen sind in Abbildung 30 aufgeführt:



**Abbildung 30: Schematische Darstellung der Staufen1-Mutanten**

TBD: Tubulin-Bindedomäne; RBD: RNA-Bindedomäne.

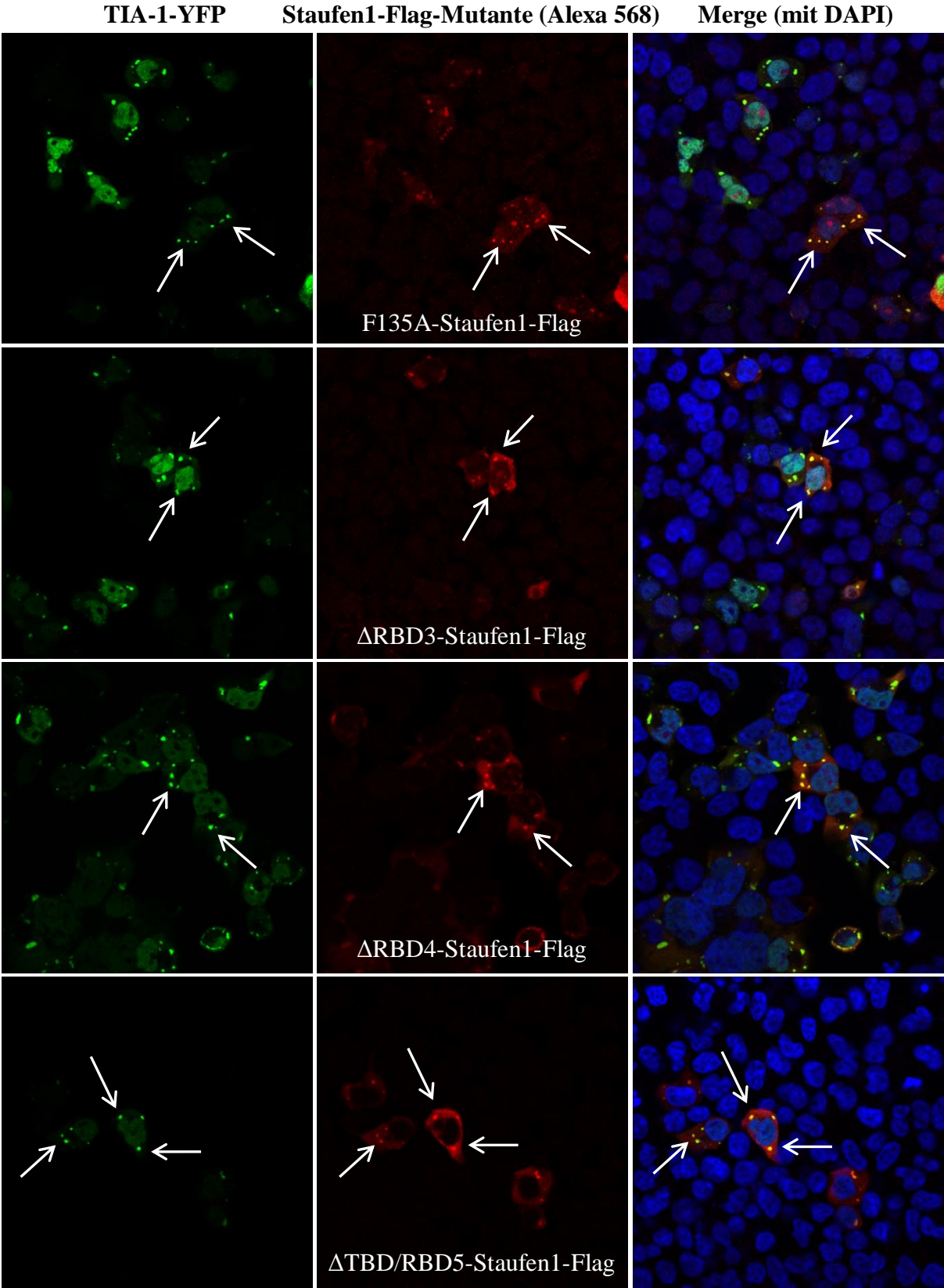
Die beiden RBD3-Staufen1-Mutanten, bei denen die RNA-Bindedomäne RBD3 komplett deletiert beziehungsweise eine Aminosäure mutiert worden ist (F135A), zeigten im Gegensatz zum Wildtypprotein auch eine deutliche Lokalisierung in distinkten Bereichen im Zellkern, vermutlich den Nukleoli (siehe Abbildung 31). Alle anderen Mutanten zeigten eine zum Wildtypprotein ähnliche Verteilung.



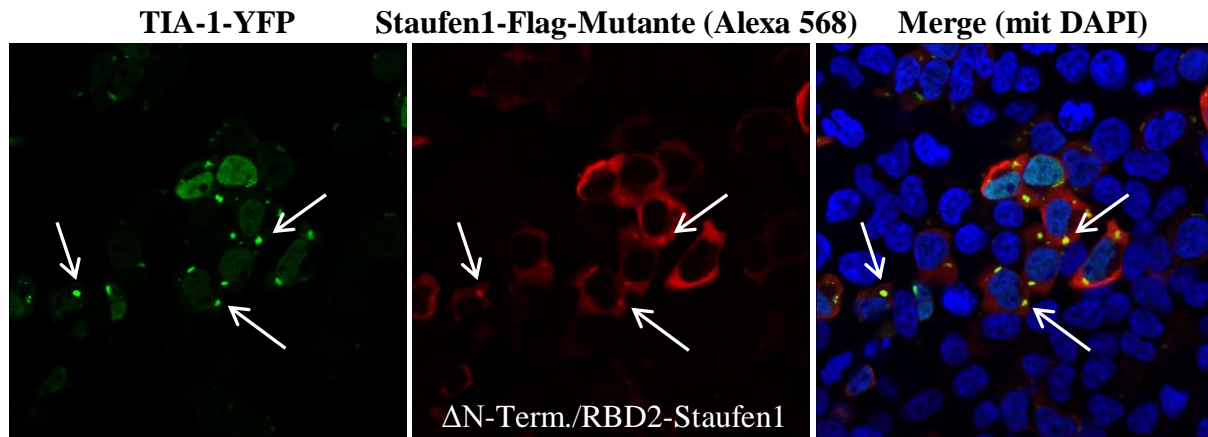
**Abbildung 31: Die Staufen1-Mutanten F135A- und  $\Delta$ RBD3-Staufen1 mit stark eingeschränkter RNA-Bindekapazität akkumulieren auch innerhalb des Zellkerns.**

HEK 293T-Zellen wurden mit F135A- und  $\Delta$ RBD3-Staufen1-Flag transfiziert und am Folgetag ohne Stress fixiert.

Abbildung 32 zeigt die Ergebnisse der Lokalisation der Staufen1-Mutanten nach Natriumarsenitstress:







**Abbildung 32:** Bis auf die Mutante  $\Delta$ N-Terminus/RBD2-Staufen1 mit eingeschränkter Rekrutierung in die Stressgranula werden alle Staufen1-Mutanten unter Stressbedingungen in großen Mengen in die Stressgranula transportiert.

HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP und der jeweils genannten Staufen1-Mutante transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

Unter Stressbedingungen kolokalisierten die (Deletions-)Mutanten  $\Delta$ RBD3-, F135A-,  $\Delta$ RBD4-Staufen1 ohne signifikante Einschränkung in den Stressgranula, im Falle von  $\Delta$ TBD/RBD5-Staufen1 erkannte man eine leichte Beeinträchtigung, die sich durch einen gestörten Transport des Proteins durch die verlorene Fähigkeit zur Bindung an Tubulin ergeben könnte.

Im Falle der  $\Delta$ N-Terminus-Mutante zeigte sich eine deutliche Reduktion in der (trotz allem immer noch erkennbaren) Einwanderung in die Stressgranula. Dies diente als erster Hinweis auf die Bedeutung der N-terminalen Region mit der enthaltenen RBD2-Domäne, die im Gegensatz zu den Domänen RBD3 und RBD4 keine Bindungsaffinität für dsRNA aufweist.

### 3.3.2 Einfluss des Knockdowns von endogenem Staufen1 auf die Lokalisation der Staufen1-Mutanten

Die Ergebnisse aus 3.3.1 legten nahe, dass insbesondere der N-Terminus beziehungsweise die darin enthaltene RBD2-Domäne eine wichtige Rolle für die Lokalisation in den Stressgranula spielt. Gleichwohl war auch die entsprechende Deletionsmutante  $\Delta$ N-Terminus/RBD2-Staufen1 noch in der Lage in die Stressgranula einzuwandern. Für Staufen1 ist bekannt, dass es dimerisieren oder gar oligomerisieren kann (Martel *et al.*, 2010). Dies wirft die Frage auf, ob endogenes Staufen1 als Dimer oder Oligomer mit mutierten Staufen1-Proteinen den Transport in die Granula ermöglicht und dadurch Effekte der jeweiligen Deletion kaschiert.

Auf Grund dieser Überlegungen wurde die Lokalisation der Mutanten nochmals untersucht, diesmal jedoch nach dem Knockdown von endogenem Staufen1.

### 3.3.2.1 Nachweis der Resistenz von ektoischem Staufen1 gegenüber dem Knockdown von endogenem Staufen1 durch die siRNA 3084

Die siRNA 3084 greift an einer nicht kodierenden Stelle im endogenen Transkript an, die auf den plasmidkodierten Transkripten des getaggenen, ektoischen Staufen1-mCherry beziehungsweise der mit einem Flag-Tag versehenen Staufen1-Deletionsmutanten nicht vorhanden ist. Die shRNA-C1 ist im Gegensatz zur siRNA 3084 gegen eine kodierende Region des Transkriptes gerichtet. Dadurch sollten die mutierten Gensequenzen resistent gegenüber des Silencingeffektes der siRNA 3084 sein, nicht aber in Hinblick auf die Expression der shRNA-C1. Die verschiedenen Angriffspunkte der fünf shRNAs (C1, C3, A2C4, A7 und B3) beziehungsweise der siRNA 3084 bezüglich der mengenmäßig bedeutsamsten endogenen Staufen1-Spleißvariante T5, bestehend aus insgesamt 14 Exons, sind in Abbildung 33 dargestellt:

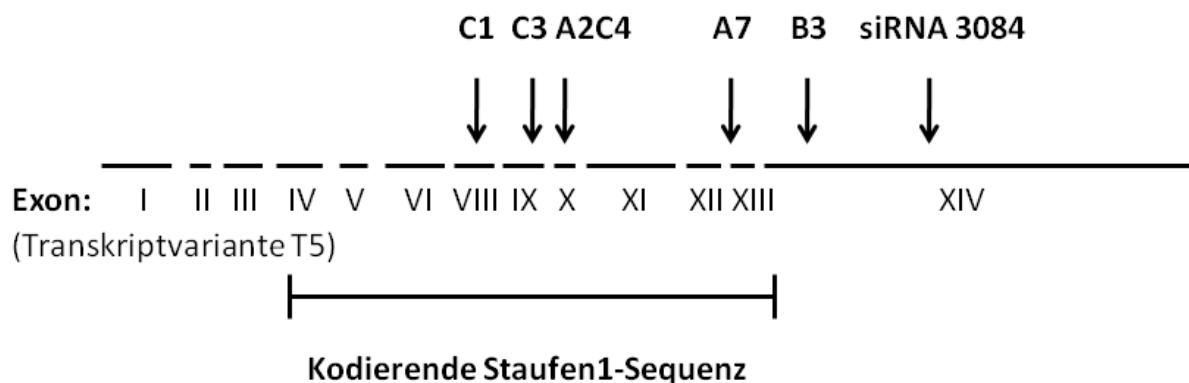
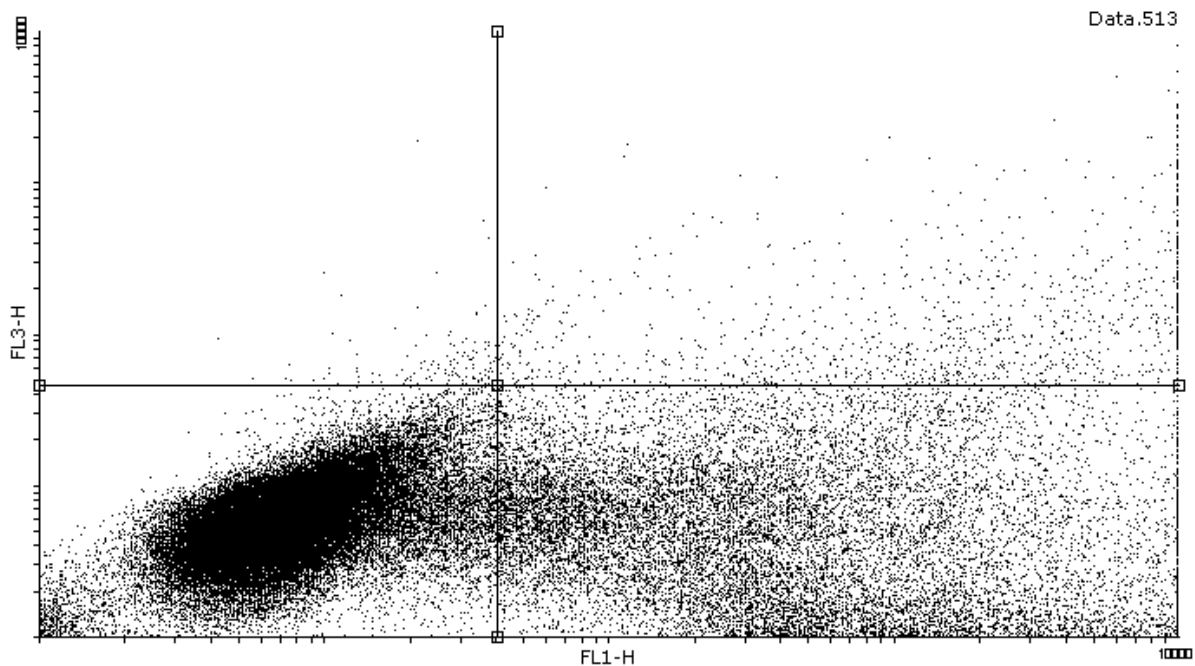


Abbildung 33: Angriffspunkte der plasmidkodierten shRNAs beziehungsweise der siRNA 3084

Die Resistenz gegenüber der siRNA, nicht aber gegen die shRNAs wurde durch die Analyse im FACS deutlich (sowie in Immunfluoreszenzaufnahmen), bei dem zwar mit der shRNA-C1 ein Knockdown von ektoischem Staufen1-mCherry um ca. 75 % möglich war, nicht jedoch mittels der siRNAs. Abbildung 34 zeigt beispielhaft das Ergebnis der FACS-Analyse einer Staufen1-mCherry- und GFP-exprimierenden Zellpopulation (ohne siRNAs oder shRNAs) als Dotplot.

Die Signalgrenzwerte (Gates) des Dotplots wurden nach dem Abgleich mit einer untransfizierten Zellpopulation gelegt. Es fällt auf, dass das Staufen1-mCherry-Signal (im Kanal FL3-H) deutlich schwächer ausfällt (nur etwa 1,24 % der Zellen zeigen ein

signifikantes mCherry-Signal) als das von GFP (im Kanal FL1-H) generierte Signal (23,66 % mit signifikantem GFP-Signal). Diese Beobachtung stimmt mit den Ergebnissen in der Immunfluoreszenz überein, in denen die Staufen1-mCherry-Expression im Vergleich zu anderen Proteinen immer recht schwach ausfiel.



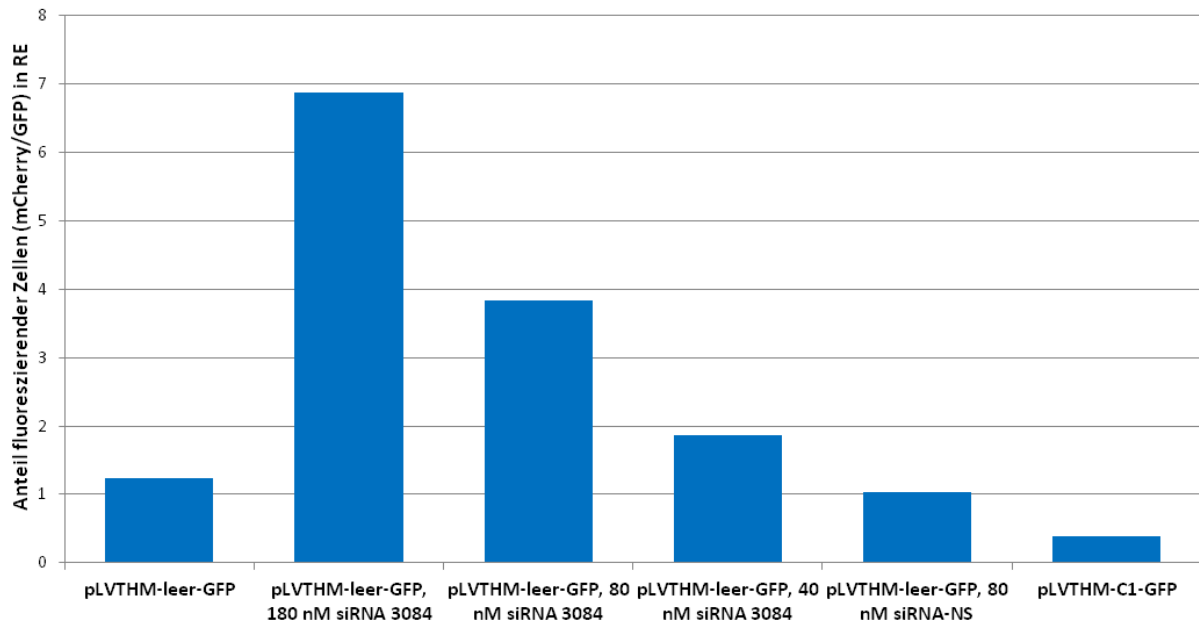
	Events	% of Vis	X Mean	Y Mean	X GeoMean	Y GeoMean	X Median	Y Median
All events	100.000	100,00	551,35	9,12	20,99	4,82	8,51	5,42
Left Bottom	76.213	76,21	8,42	6,47	6,89	5,43	7,04	5,78
Right Bottom	22.548	22,55	2.241,87	5,21	734,29	2,70	716,92	1,83
Left Top	127	0,13	26,50	92,71	24,22	69,78	28,13	59,89
Right Top	1.112	1,11	3.543,54	260,44	1.463,10	133,27	1.910,95	100,00

**Abbildung 34: Repräsentative Darstellung einer FACS-Analyse: Staufen1-mCherry wird schwächer exprimiert als GFP.**

HEK 293T-Zellen wurden mit Staufen1-mCherry und einem GFP-kodierenden Vektor transfiziert. 100 000 Zellen wurden am Folgetag im FACS analysiert. Die x-Achse quantifiziert dabei die Stärke des grünen GFP-Signales im Kanal FL1-H; die y-Achse quantifiziert die Stärke des roten Staufen1-mCherry-Signales im Kanal FL3-H. Die Schwellwerte für die vier Quartile entstanden auf der Grundlage des Vergleiches mit untransfizierten Zellen.

Jeder FACS-Ansatz wurde mit der exakt gleichen Menge an Staufen1-mCherry transfiziert. GFP wurde (entweder kodiert vom leeren, mit der siRNA kotransfizierten pLVTHM-Vektor oder direkt durch das Plasmid pLVTHM-C1) zur Normalisierung der Staufen1-mCherry-Expression verwendet. Wie in Abbildung 35 dargestellt, kann die shRNA-C1 die Expression um fast 80 Prozent herabregulieren, nicht jedoch die siRNA 3084 oder die Kontroll siRNA-NS.

### mCherry/GFP Koexpression normalisiert auf die GFP-Expression

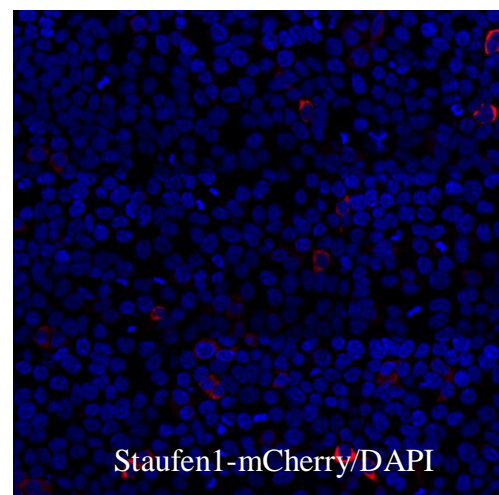
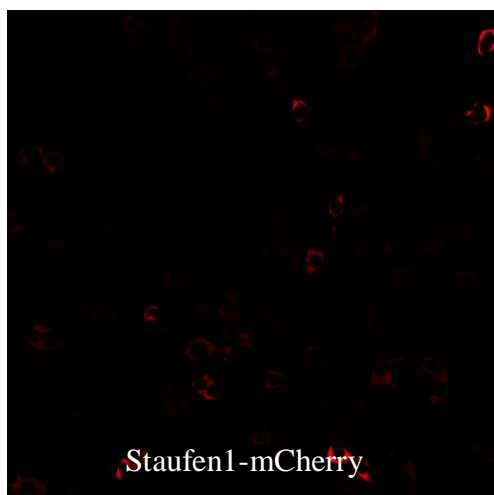


**Abbildung 35: Auswertung der FACS-Ansätze zum Nachweis der Resistenz von ektoischem Stauften1 gegenüber der siRNA 3084, nicht jedoch gegenüber der shRNA-C1**

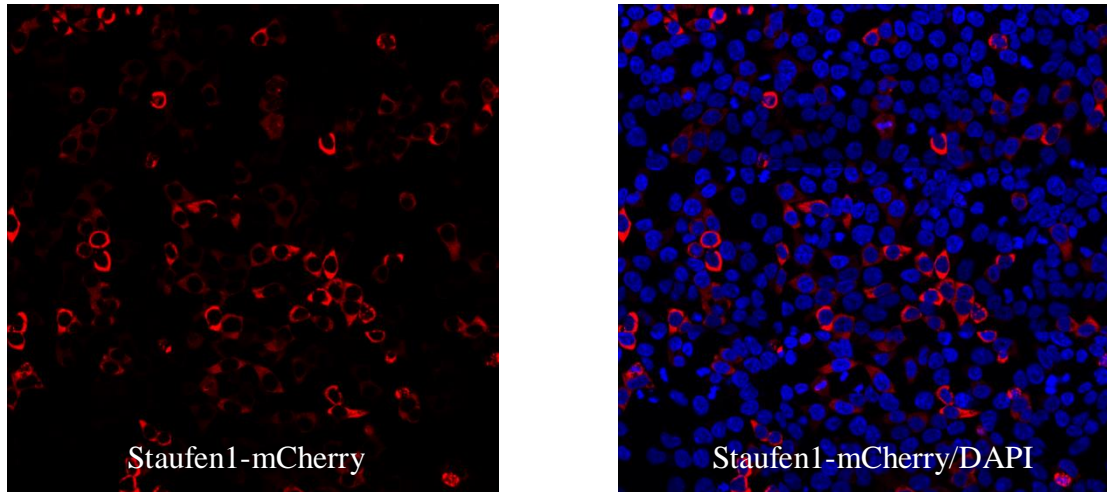
Die Ansätze wurden wie angegeben transfiziert und am Folgetag im FACS vermessen. Die Stauften1-mCherry-Expression wurde auf die GFP-Expression (Marker für die Transfektionseffizienz) normalisiert. Die einzelnen Werte wurden wie folgt berechnet (und hier in relativen Einheiten (RE) angegeben): Anzahl (mCherry/GFP-koexprimierende Zellen) / Anzahl (alle GFP-exprimierende Zellen) x 100

Die FACS-Analysen zeigten überraschenderweise ebenfalls, dass der Einsatz der gegen endogenes Stauften1 gerichteten siRNA 3084 die Expression der ektoischen Variante sogar noch deutlich zu steigern vermag. Dieser unerwartete Effekt verstärkte sich mit steigenden Konzentrationen der siRNA 3084 sogar noch (nicht aber bei Zugabe der nicht zielgerichteten Kontroll-siRNA-NS). Dieses Phänomen konnte auch mit dem Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet werden, wie in Abbildung 36 zu erkennen ist.

Ohne siRNAs:



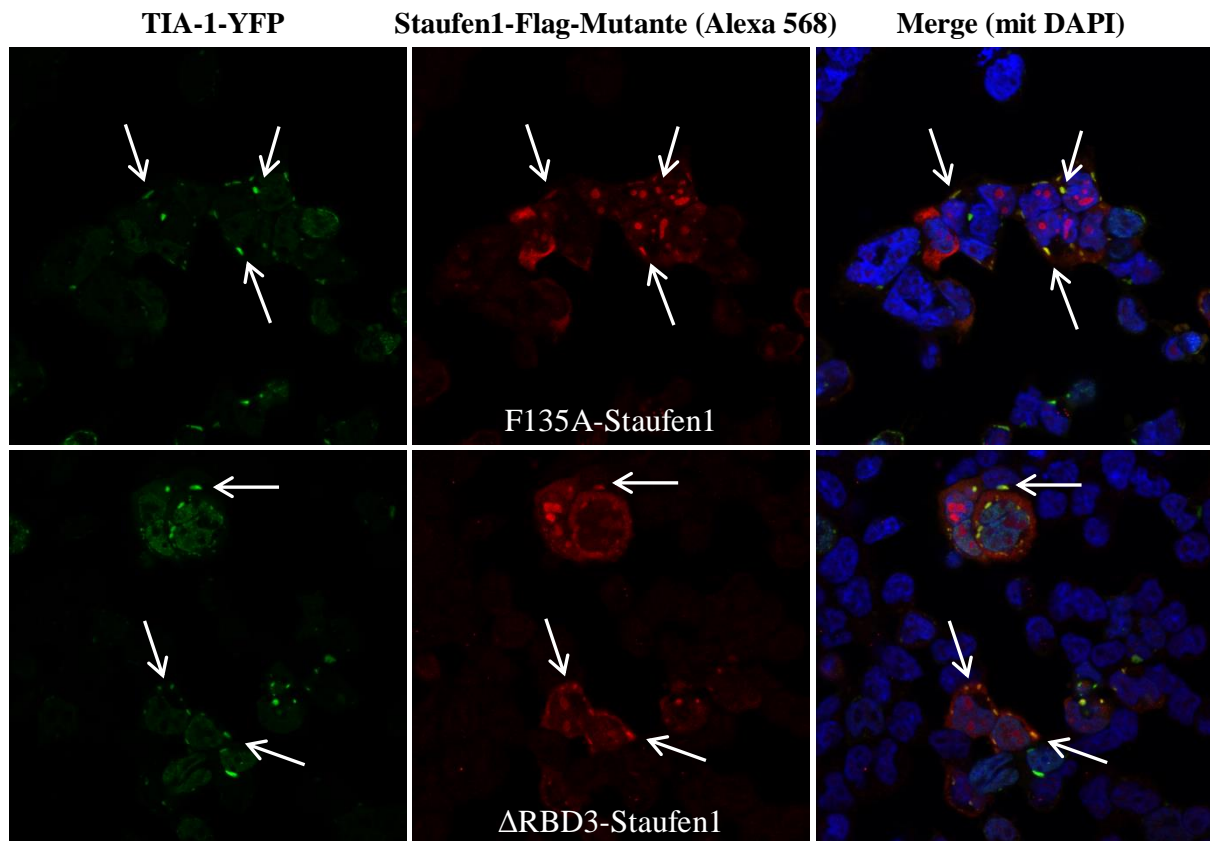
Mit 180 nM siRNA 3084:

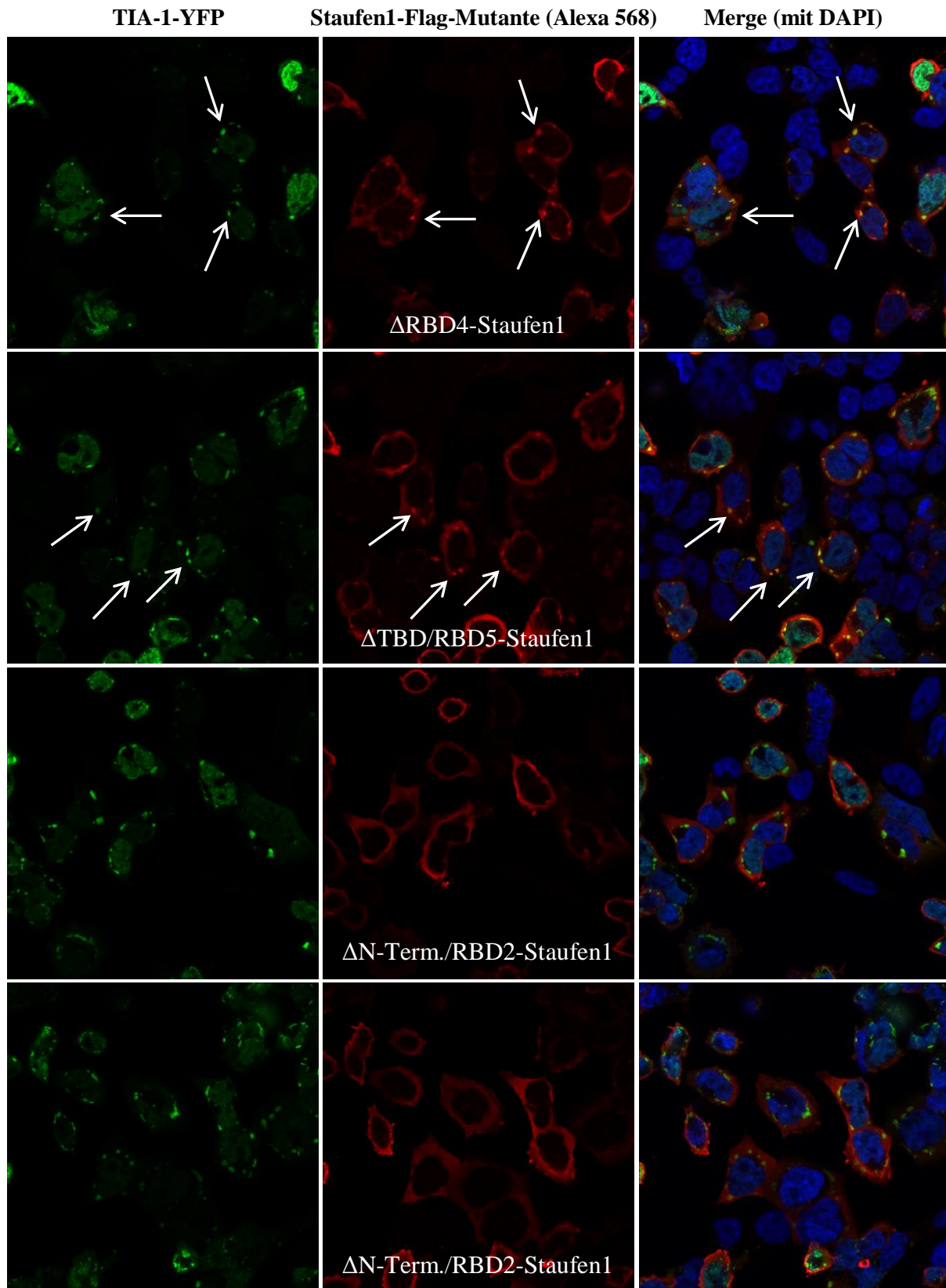


**Abbildung 36 (3 x 3 Tile Scans):** Ektopisches Staufen1 wird nicht durch die siRNA 3084 herunterreguliert; stattdessen scheint diese siRNA einen förderlichen Effekt auf die Expression zu haben. HEK 293T-Zellen wurden mit Staufen1-mCherry transfiziert; gegebenfalls zusammen mit der genannten Menge an siRNA 3084. Am Folgetag wurden die Zellen fixiert.

### 3.3.2.2 Lokalisation der Staufen1-Mutanten nach endogenem Staufen1-Knockdown

Von den fünf Staufen1-Mutanten erschienen nach der Kotransfektion der Mutanten mit der siRNA 3084 (und dem damit verbundenen endogenen Staufen1-Knockdown ohne Inhibition der Expression der Staufen1-Mutanten, siehe 3.3.2.1) bis auf Staufen1-F135A alle Mutanten zumindest partiell in ihrer Einwanderung in die Stressgranula gestört (siehe Abbildung 37).





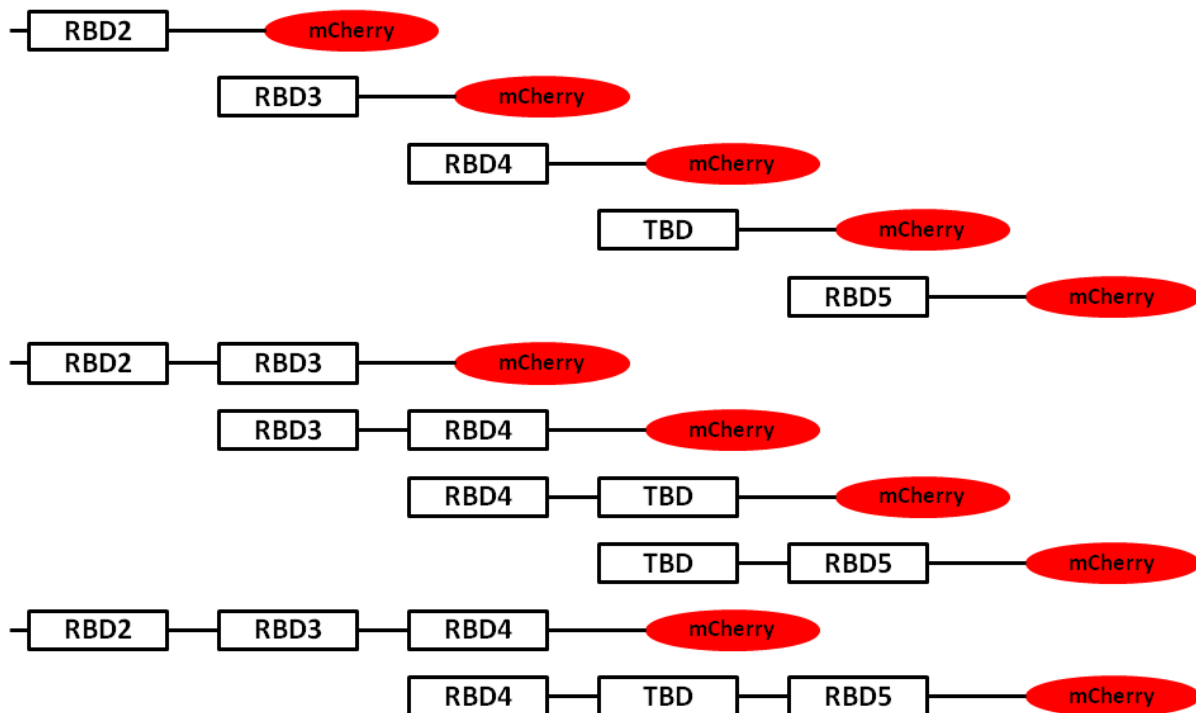
**Abbildung 37: Der Knockdown von endogenem Staufen1 behindert alle Mutanten in ihrer Einwanderung in die Stressgranula, aber nur  $\Delta$ N-Terminus/RBD2 wird vollständig in seiner Rekrutierung in die Stressgranula gestört (siehe die unteren beiden Abbildungsreihen).**

HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP, der siRNA 3084 und der jeweils genannten Staufen1-Mutante transfiziert und zwei Tage später vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

Für die N-terminale Deletionsmutante mit der fehlenden RBD2-Domäne war sogar gar keine Einwanderung in die Stressgranula mehr zu beobachten (Abbildung 37 unten). Dies stützt die Vermutung, dass diese Mutante nur auf Grund der konstitutiven Staufen1-Expression (und der sich daraus ergebenden Möglichkeit zur Dimerisierung mit dem Wildtypprotein) in die Stressgranula gelangen konnte. Die Deletion aller anderen Domänen scheint die Einwanderung in die Stressgranula nicht maßgeblich zu behindern. Interessanterweise scheint die Fähigkeit RNA binden zu können, keine essentielle Voraussetzung für die Rekrutierung in die Stressgranula zu sein. Gleichwohl zeigt sich in diesen Untersuchungen, dass nur das intakte Protein in großen Mengen in die Stressgranula transportiert werden kann; jede Domäne also zumindest einen gewissen Anteil daran hat.

### 3.3.3 Herstellung und Charakterisierung weiterer Staufen1-Mutanten zur Identifizierung der verantwortlichen Domäne für die Einwanderung in die Stressgranula

Zur Untermauerung der Hypothese, dass der N-Terminus beziehungsweise die Domäne RBD2 die Einwanderung in die Stressgranula vermittelt, wurden eine Reihe neuer Mutanten von Staufen1 angefertigt, die zwischen einer und drei der insgesamt fünf funktionellen Domänen des Proteins enthalten. Abbildung 38 zeigt schematisch die generierten Mutanten, die in das pmCherry-N1-Plasmid kloniert worden sind.

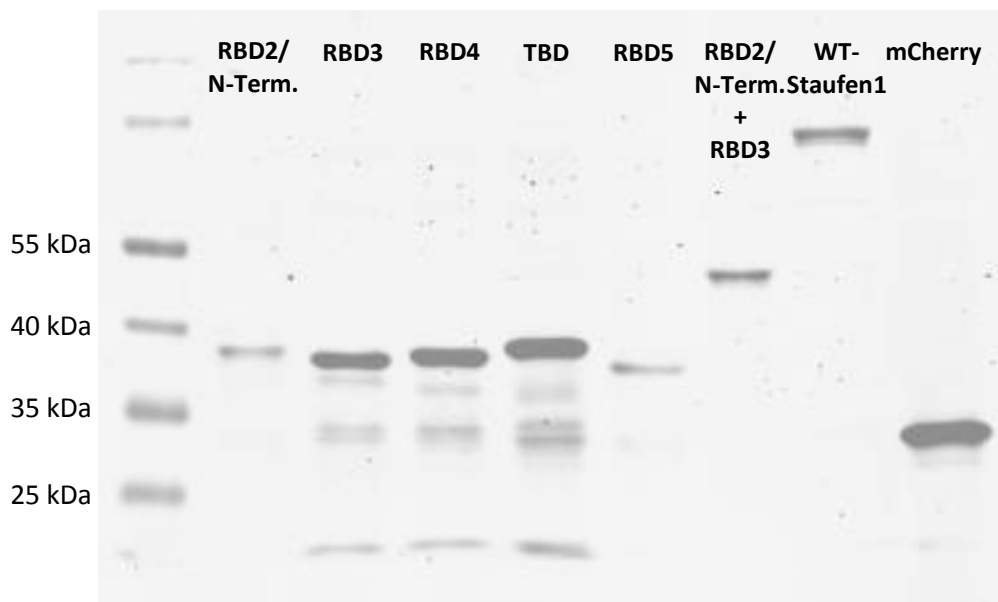


**Abbildung 38: Übersicht über die neu generierten Staufen1-Fragmente**

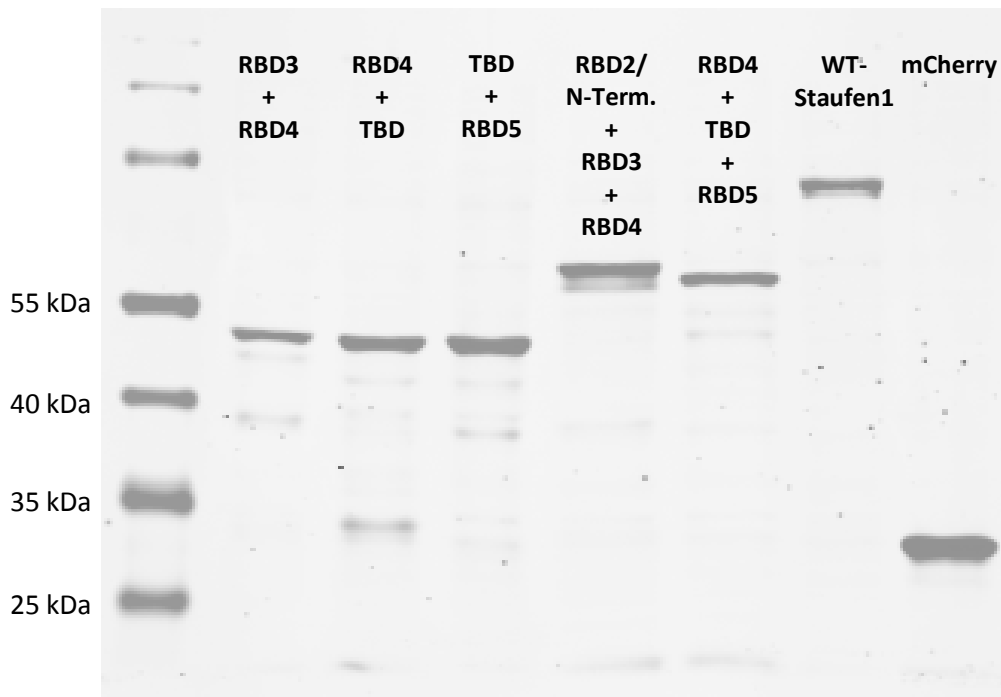
Die genauen Aminosäurepositionen des Beginns und des Endes der hier gezeigten Staufen1-Fragmente sind den entsprechend bezeichneten Klonierungsprimern im Anhang dieser Arbeit zu entnehmen (Abschnitt 7.2).

Sofern erforderlich wurde den jeweiligen Konstrukten ein Startcodon am Anfang der Sequenz hinzugefügt. Die generierten Konstrukte wurden zur Kontrolle der Klonierung einer Kolonie-PCR und einem geeigneten Restriktionsverdau unterzogen (unter Nutzung der für die Klonierung verwendeten Schnittstellen für die Enzyme HindIII und XhoI) und anschließend sequenziert. Drei Mutanten trugen eine stille Mutation in einem Codon der RBD5-Domäne (also ohne Veränderung der Aminosäure; Codongebrauch des neuen Codons fast identisch), die aber bereits in dem Ausgangstemplate vorhanden war und von der keine Verfälschung der nachfolgenden Experimente zu erwarten ist.

Zur Überprüfung der Expression wurden HEK 293T-Zellen mit den hergestellten Konstrukten transfiziert, die Lysate aus diesen Ansätzen gewonnen und im Western Blot mit Hilfe eines gegen mCherry gerichteten Antikörpers detektiert. Abbildung 39 zeigt die Ergebnisse dieses Versuches anhand zweier Western Blots: Alle generierten Mutanten werden exprimiert, wenn auch in unterschiedlichen Mengen. Bei einigen Konstrukten, die nur aus einer Domäne von Staufen1 bestehen, wird zu einem geringen Anteil auch das mCherry-Protein ohne Staufen1-Fusionspartner detektiert. Der Großteil von mCherry ist aber in allen Konstrukten mit dem Staufen1-Fragment verbunden; daher sind in der Immunfluoreszenz keine signifikanten falschpositiven Signale von abgespaltenen mCherry-Molekülen zu erwarten.





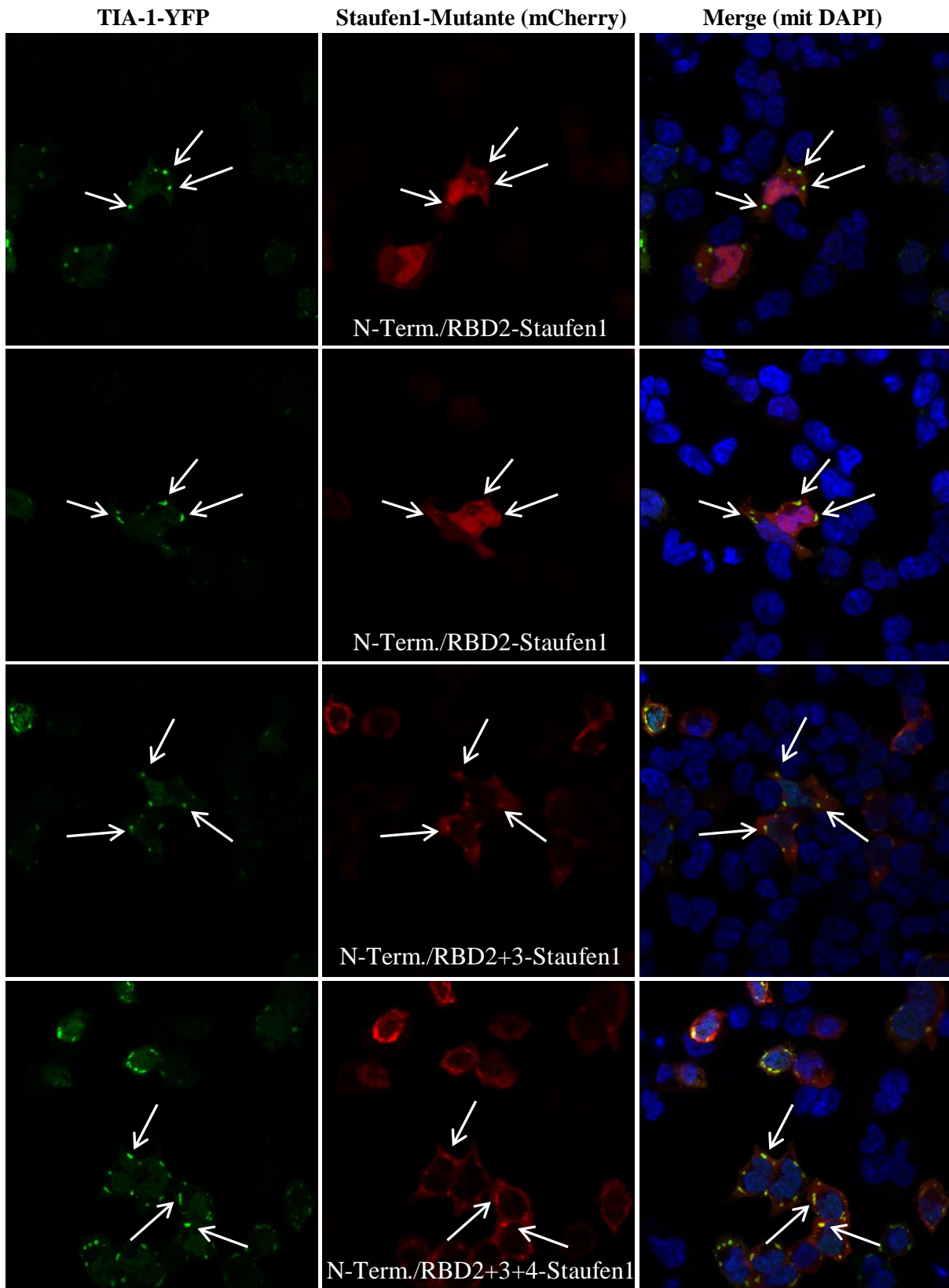


**Abbildung 39: Alle generierten mCherry-markierten Staufen1-Fragmentkonstrukte werden vollständig exprimiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit dem jeweiligen Konstrukt transfiziert, nach einem Tag aus diesen Ansätzen die Lysate geerntet und im Western Blot mit dem  $\alpha$ -mCherry-Antikörper nachgewiesen.

Die elf neuen Mutanten wurden nun auf ihre Lokalisation in den Stressgranula hin überprüft. Die Mutante N-Terminus/RBD2-Staufen1 wird, den Erwartungen entsprechend, in die Stressgranula rekrutiert, wie aus Abbildung 40 ersichtlich wird. Auch die Mutanten N-Terminus/RBD2,RBD3-Staufen1 sowie N-Terminus/RBD2,RBD3,RBD4-Staufen1 lokalisierten in den Stressgranula, zeigten aber ansonsten durchaus andere Verteilungsmuster in der Zelle.

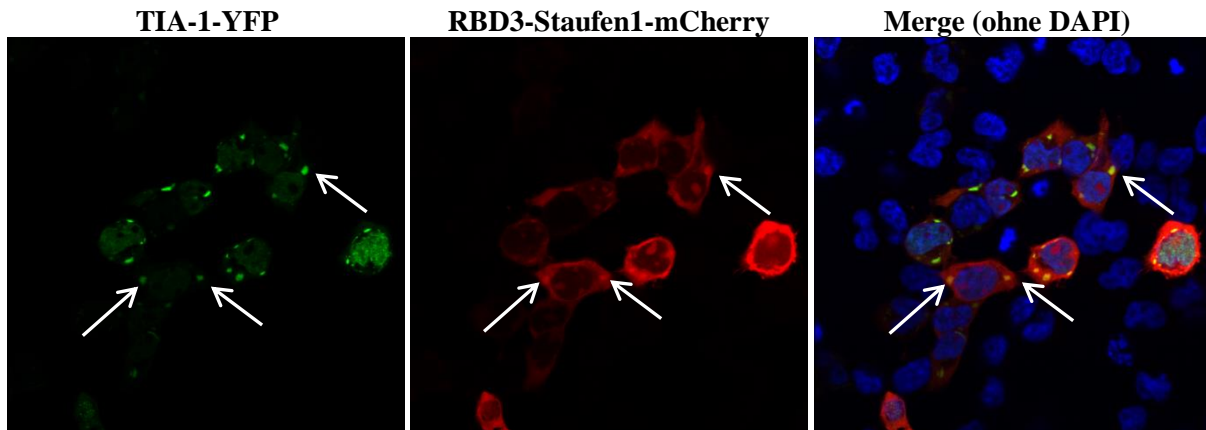
Alle diese drei Mutanten besitzen den N-Terminus bzw. die Domäne RBD2. Die Mutante N-Terminus/RBD2,RBD3,RBD4-Staufen1 wurde von diesen drei Konstrukten am stärksten exprimiert (in Übereinstimmung mit der Expressionsanalyse im Western Blot) und zeigte bei vielen Zellen einen deutlich inhibierenden Effekt auf die Ausbildung von Stressgranula, der zwar in der Literatur bereits beschrieben worden ist (siehe Thomas *et al.*, 2009), aber bisher bei keinem anderen Stressversuch in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. In den verbleibenden Zellen, die noch Stressgranula bildeten, wurde dieses Staufen1-Fragment aber in deutlichem Umfange in die Stressgranula rekrutiert.



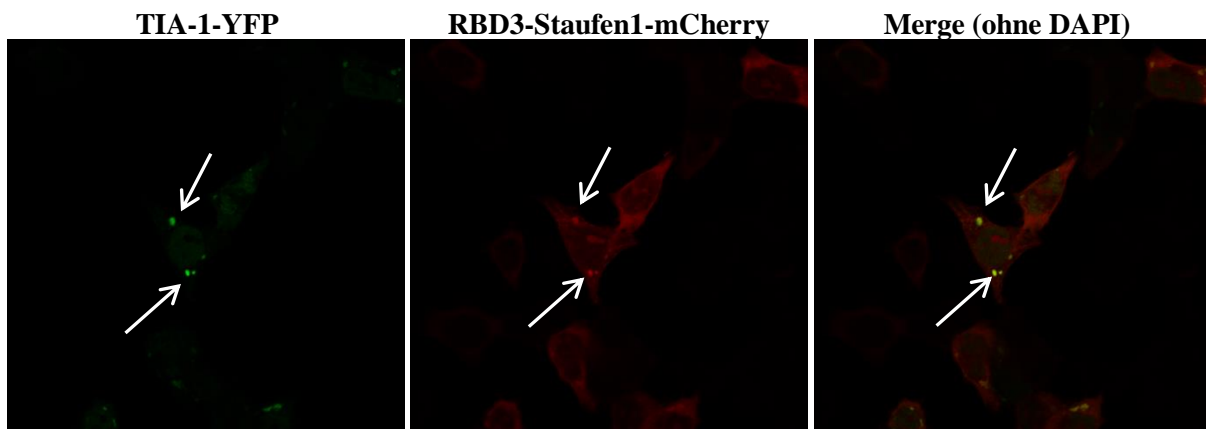
**Abbildung 40: Die N-terminale Staufen1-Region mit der Domäne RBD2 vermittelt den Transport in die Stressgranula.**

HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP und dem jeweils genannten mCherry-markierten Staufen1-Fragment transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

Interessanterweise konnte man auch für die Mutante RBD3-Staufen1 eine Einwanderung in die Stressgranula beobachten, die beim Knockdown von endogenem Staufen1 sogar noch leicht verstärkt wurde (siehe Abbildung 41). Dieser Befund ist etwas überraschend, da die  $\Delta$ RBD3-Staufen1-Mutante keine Einschränkung bezüglich der Rekrutierung in die Stressgranula aufwies (siehe Abschnitt 3.3.1 und 3.3.2.2).



**Nach dem Knockdown von endogenem Staufen1:**

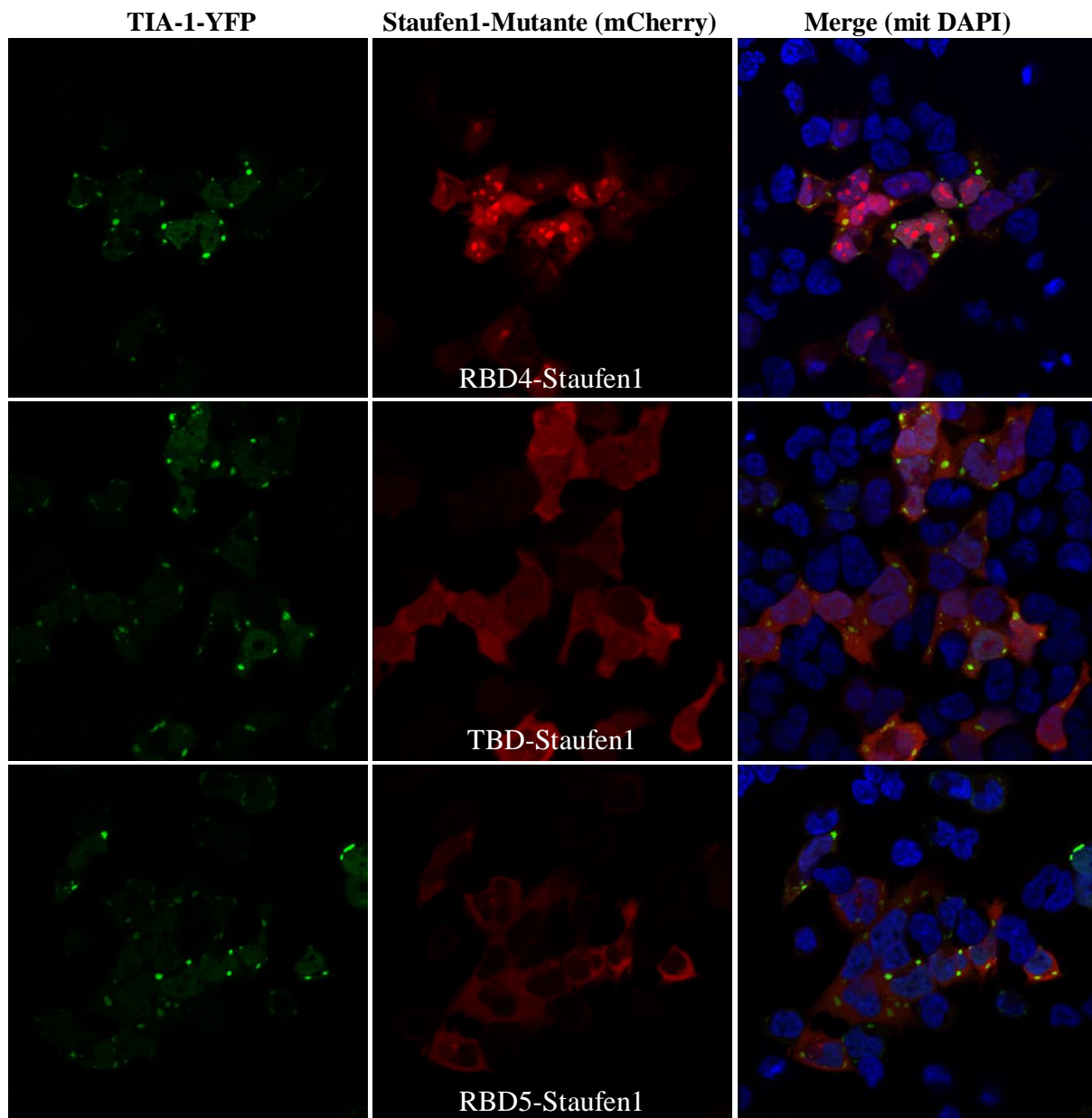


**Abbildung 41: Die Domäne RBD3 ist ebenfalls am Transport in die Stressgranula beteiligt; das RBD3-Fragment wird nach endogenem Staufen1-Knockdown stärker in die Stressgranula transportiert.**

Obere Reihe: HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP und dem mCherry-markierten RBD3-Staufen1-Fragment transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst. Untere Reihe: HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP, dem mCherry-markierten RBD3-Staufen1-Fragment transfiziert sowie mit der siRNA 3084 und zwei Tage später vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

Alle anderen sieben Mutanten zeigten entweder nur eine recht schwache (z. B. RBD4,TBD,RBD5-Staufen1 und TBD,RBD5-Staufen1) oder gar keine Einwanderung in die Stressgranula. Nach dem Knockdown von endogenem Staufen1 konnten diese schwachen Akkumulationen in den Stressgranula nicht mehr gefunden werden. Die Einwanderung in die Stressgranula könnte sich in diesen Fällen durch Dimerisierungseffekte mit endogenem Staufen1 ergeben, da der C-Terminus von Staufen1 maßgeblich an solchen Interaktionen beteiligt ist (siehe Abschnitt 1.2 bzw. Gleghorn *et al.*, 2013; Luo *et al.*, 2002).

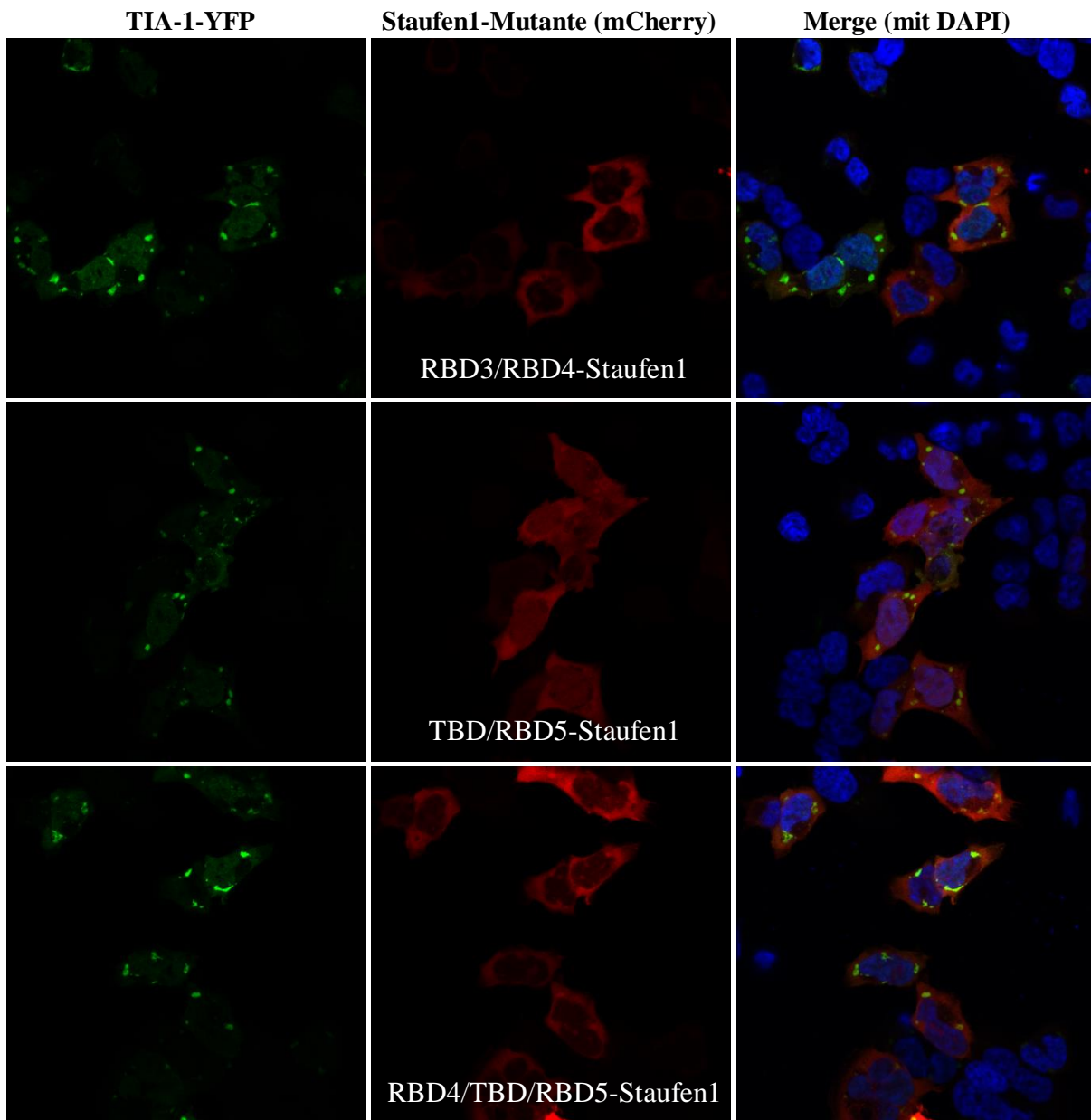
Keine der anderen drei Staufen1-Domänen war als Einzeldomäne in den Stressgranula zu finden (bzw. nur in sehr geringen Mengen), wie Abbildung 42 verdeutlicht:



**Abbildung 42: Die Domänen RBD4, TBD und RBD5 sind nicht am Transport in die Stressgranula beteiligt und sind (wenn überhaupt) nur in sehr geringen Mengen in den Stressgranula lokalisiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP und dem jeweils genannten mCherry-markierten Staufen1-Fragment transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

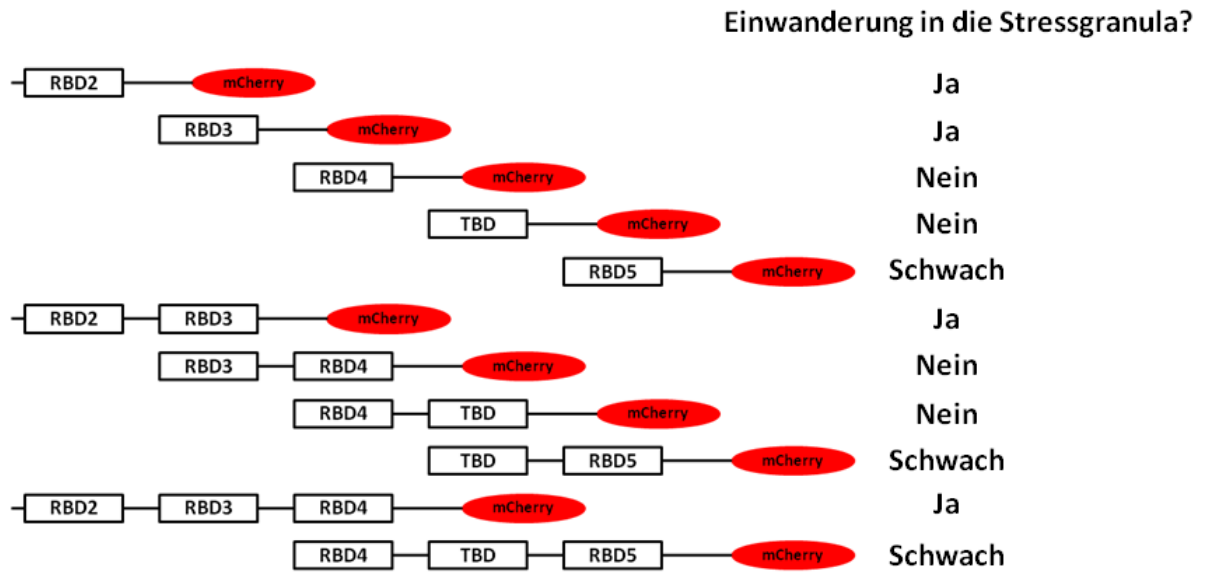
Unter den Mutanten, die ebenfalls nicht in die Stressgranula gelangen, war auch die Mutante RBD3,RBD4-Staufen1 (siehe Abbildung 43). Trotz der RBD3-Domäne wurde diese Mutante nicht in den Stressgranula gefunden. Dies weist darauf hin, dass die RBD3-Domäne alleine nicht in der Lage ist, das Vollängenprotein in die Stressgranula zu befördern, möglicherweise auch deswegen, weil sich die einzelnen Domäne gegenseitig in ihrer Aktivität funktionell beeinflussen können oder zumindest sterisch behindern.



**Abbildung 43: Fusionskonstrukte aus den Domänen RBD4, TBD und RBD5 werden ebenfalls nicht oder nur in sehr geringen Mengen in die Stressgranula transportiert.**

HEK 293T-Zellen wurden mit TIA-1-YFP und dem jeweils genannten mCherry-markierten Staufen1-Fragment transfiziert und am Folgetag vor der Fixierung für eine Stunde gestresst.

Abbildung 44 fasst die Ergebnisse der Lokalisationsstudien noch einmal zusammen. Während der N-Terminus mit der Domäne RBD2 also eine wichtige Rolle für den Transport in die Stressgranula zu spielen scheint, ist die Rolle von RBD3 weniger eindeutig.



**Abbildung 44:** Der N-Terminus bzw. die Domäne RBD2 von Staufen1 ist maßgeblich an der Rekrutierung in die Stressgranula beteiligt und wird dabei möglicherweise von der Domäne RBD3 unterstützt. Schwache Lokalisationen einiger Konstrukte in den Stressgranula waren nach dem Knockdown von endogenem Staufen1 nicht mehr zu beobachten.

## **4 Diskussion**

### **4.1 Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula**

Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten deutlich, dass die viralen Proteine Rec und Rev unter Stressbedingungen in die Stressgranula rekrutiert werden. Trotzdem ergaben die einzelnen Versuche eine Reihe von wichtigen Unterschieden hinsichtlich des Einflusses der Zugabe von viraler DNA, der Überexpression von Staufen1 beziehungsweise eines Staufen1-Knockdowns.

Es fiel bei vielen Fluoreszenzaufnahmen auf, dass der Umfang der Rekrutierung in die Stressgranula im Falle des HIV-1-Proteins Rev deutlich größer zu sein scheint als im Vergleich mit dem Protein Rec. Gerade bei Zellen mit niedrigem Rec-Expressionslevel befand sich ein Großteil des Proteins im Zellkern und nur ein viel geringerer Anteil im Cytoplasma; im Falle von Rev sind dagegen sowohl mit wie ohne Stressbedingungen große Mengen im Cytoplasma zu finden. Dies könnte einen wichtigen Grund darstellen, warum die Rev-Lokalisation in den Stressgranula stärker ausfiel.

#### **4.1.1 Einfluss der Zugabe von viraler DNA und der Zugabe von ektopischem Staufen1 sowie des Staufen1-Knockdowns auf die Lokalisation von Rec und Rev in den Stressgranula**

Rev wanderte in diesen Untersuchungen nahezu unabhängig von viralen Genomen beziehungsweise dem Vorhandensein von Rev responsive elements in die Stressgranula ein. Dies könnte ein Indiz für einen mRNA-unabhängigen Vorgang darstellen. Da aber Rev möglicherweise auch an zelluläre mRNAs binden könnte, lässt sich auch ein Transport durch die Bindung an zelluläre mRNAs nicht völlig ausschließen.

Rec dagegen schien in der Anwesenheit von HERV-K(HML-2)-RNA deutlich besser in die Stressgranula transportiert zu werden als ohne diese. Gleichwohl sah man auch ohne virale DNA bei einigen Zellen noch eine schwache Lokalisation in den Stressgranula. Im Gegensatz zu Rev scheint der Rec-Transport in die Stressgranula durchaus von den viralen Volllängentranskripten beziehungsweise den darauf vorhandenen Rec-Bindestellen vermittelt zu werden.

Bei Staufen1-Überexpression war der Anteil an Rec in den Stressgranula merklich erhöht, ein Knockdown von endogenem Staufen1 verringerte die Lokalisation in den Stressgranula

dagegen deutlich. Ein deutlicher Einfluss des Staufen1-Knockdowns beziehungsweise einer Staufen1-Überexpression war dagegen auf Rev nicht erkennbar.

Diese unterschiedlichen Befunde bezüglich der Abhängigkeit von der Zugabe an viraler DNA beziehungsweise bezüglich der intrazellulär vorhandenen Menge an Staufen1 legen die Vermutung nahe, dass Rec und Rev durch unterschiedliche Prozesse in die Stressgranula gelangen. Für Rev sind neben Staufen1 eine ganze Reihe von anderen Proteinen beschrieben worden, die mit Rev Interaktionen ausbilden können. Zu diesen Interaktionspartnern gehört unter anderem auch der Translationsfaktor eIF5A (Suhasini *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2011). Interessanterweise ist eIF5A (neben vielen anderen zellulären Prozessen) auch maßgeblich in der Formierung von (natriumarsenitinduzierten) Stressgranula involviert (Li *et al.*, 2010). Ein eIF5A-Knockdown behindert die Bildung von Stressgranula (und hat nur geringen Einfluss auf P-bodies). Es ist daher gut denkbar, dass Rev nicht (oder nicht nur) über Staufen1 in die Stressgranula gelangt, sondern durch die Interaktion mit anderen Proteinen wie eIF5A.

Der Einfluss von Staufen1 auf die Einwanderung von Rev in die Stressgranula kann allerdings nicht vollkommen ausgeschlossen werden, da der Knockdown von Staufen1 auf 25 % der Ausgangsmenge an endogenem Protein möglicherweise noch ausreicht für Rev, um in die Stressgranula transportiert zu werden. Wenn bereits die Staufen1-Mengen nach Zugabe von siRNA 3084 ausreichend sind oder die Transportkinetik von Rev schon gesättigt ist, ist es verständlich, dass die Staufen1-Überexpression keinen weiteren förderlichen Effekt hat.

Für Rec dagegen scheint ein Komplex aus dem viralen Volllängengenom, Staufen1 und Rec für die Einwanderung in die Stressgranula verantwortlich zu sein. Auch hier kann man aber eine Beteiligung weiterer Interaktionspartner nicht ausschließen. Besonders vor dem Hintergrund, dass die Staufen1-Expression wichtig für den Export von Rec (weniger aber für den von Rev) aus dem Zellkern ist, bleibt vorstellbar, dass Staufen1 in erster Linie für den Transportschritt aus dem Zellkern wichtig ist, die eigentliche Einwanderung in die Stressgranula im Cytoplasma aber unabhängig von der Staufen1-Bindung (oder der viralen Volllängentranskripte) abläuft.

#### **4.2 Untersuchungen der Rev-Mutanten auf ihre Lokalisation in den Stressgranula**

Die Analysen der Rev-Mutanten hinsichtlich ihres Transportes in die Stressgranula lieferten weitere Hinweise darauf, dass Rev nicht durch eine Interaktion mit Staufen1 in die



Stressgranula transportiert wird. Vorarbeiten am Institut hatten über FACS-Analysen und Co-Immunpräzipitationen die Region um die nukleäre Lokalisationssequenz als die mit Stauf1 interagierende Region identifiziert. Die Mutante Rev-M5 (mutierte NLS und keine Bindung an die Rev responsive elements) hatte in diesen Analysen keine Interaktion mehr mit Stauf1 gezeigt, die Mutante Rev-M10 (mutierte NES) war dagegen durchaus noch in der Lage mit Stauf1 zu interagieren (wenn auch eingeschränkter als WT-Rev). Interessanterweise (und in Übereinstimmung mit den Stauf1-Knockdown-Versuchen) war die mit Stauf1 nicht interagierende Mutante Rev-M5 in den angefertigten Immunfluoreszenzpräparaten in großem Umfange in den Stressgranula zu finden, während dies für die in ihrer Interaktion mit Stauf1 nur mäßig beeinträchtigte Mutante Rev-M10 nicht gilt. Die Analyse der Rev-Mutanten bestätigte also die vorhergehenden Versuche des Stauf1-Knockdowns und den Befund, dass die Präsenz viraler Genome für die Einwanderung von Rev in die Stressgranula nicht erforderlich ist.

Die tatsächlich verantwortliche Domäne für die Lokalisation in den Stressgranula konnte nicht eindeutig bestimmt werden. Durch die Rev-Mutantenanalyse ist aber anzunehmen, dass sie im C-terminalen Bereich oder der nukleären Lokalisationssequenz zu finden ist. Der N-terminale Bereich, der essentiell für die Oligomerisierung des Proteins an viraler RNA ist, zeigte sich in diesen Versuchen als nicht notwendig für die Stressgranulalokalisierung. Die Oligomerisierung von Rev ist in der Literatur gut beschrieben, ihre biologische Relevanz ist aber strittig, da sie für die Funktionalität von Rev nicht immer erforderlich zu sein scheint (Furnes *et al.*, 2005). Dies könnte erklären, weshalb die Oligomerisierungsmutanten keine Beeinträchtigung in ihrer Einwanderung in die Stressgranula zeigten.

Da Rev mit vielen anderen Proteinen interagiert, von denen vermutlich bisher nur einige beschrieben worden sind (Sahasini *et al.*, 2009), kann man aber auch nicht ausschließen, dass mehr als ein Interaktionspartner Rev in die Stressgranula transportiert und dadurch möglicherweise auch mehr als eine Domäne von Rev die Rekrutierung in die Stressgranula vermittelt.

#### **4.3 Untersuchungen zur Einwanderung von Rev in die Prozessierungskörperchen und physiologische Bedeutung der Interaktion von HIV-1 mit P-bodies**

Die Einwanderung von Rev in die Prozessierungskörperchen erfolgt in einem geringeren Ausmaße und Häufigkeit als die Rekrutierung in die Stressgranula. Es bleibt zu klären, ob

Rev direkt vom Cytoplasma in die P-bodies gelangt oder Fusionsereignisse von P-bodies mit den Stressgranula dafür verantwortlich sind. Die differenzierte Strukturierung der Granula mit den überlappenden und distinkten Akkumulationen von Stau1, DCP1a und Rev könnte auf nicht vollständige Fusionsereignisse benachbarter Granula hindeuten, bei denen die Identität (und Proteinzusammensetzung) von Stressgranula und P-bodies zumindest partiell erhalten bleibt.

Die Expression von ektoischem DCP1a greift sehr viel stärker in den Metabolismus ein als der Stressmarker TIA-1. Nach der Transfektion mit diesem Decappingfaktor, dessen enzymatische Aktivität mRNAs für den Abbau vorbereitet, wurde eine deutliche Reduktion des Zellwachstums sowie ein abnorm hoher Anteil an toten oder apoptotischen Zellen beobachtet. Angesichts der Wirkungsweise des verwendeten Markerproteins ist diese Beobachtung durchaus einleuchtend. Auf Grund der cytotoxischen Wirkung der DCP1a-Expression muss die biologische Relevanz dieses artifiziellen Systems zur Visualisierung von DCP1a kritisch hinterfragt werden. In der Tat existieren in der Literatur Hinweise darauf, dass die DCP1a-Überexpression gewisse Abweichungen in der P-body-Physiologie verursacht. Trotz dieser Einschränkungen ist angesichts der in vielen Fällen doch recht deutlichen Lokalisation anzunehmen, dass Rev auch unter nicht derart invasiven Einflüssen in die P-bodies einwandert.

Die Wechselwirkungen zwischen P-bodies (und ihren einzelnen Komponenten) mit HIV-1 sind Gegenstand einer ganzen Reihe von Untersuchungen. Verschiedene Komponenten von P-bodies (teils mit antiviraler Aktivität) können in die entstehenden Viruspartikel verpackt werden. Eine Veränderung in der intrazellulären Konzentration dieser P-body-Komponenten, zum Beispiel von Mov-10, das zusammen mit dem möglicherweise antiviral wirkenden APOBEC3G Komplexe bilden kann und in die Virionen verpackt wird, zeigte teils deutliche Effekte auf die Infektiosität der Virionen (Furtak *et al.*, 2010; Burdick *et al.*, 2010). Es ist allerdings umstritten, ob die Proteine für die Inkorporation in die Virionen tatsächlich aus den P-bodies stammen müssen (Izumi *et al.*, 2013).

Über das Vorhandensein von viraler mRNA in den P-bodies wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen gegensätzliche Ergebnisse publiziert. Den Ergebnissen von Abrahamyan *et al.* aus dem Jahre 2010 zufolge sind keine viralen RNAs in den P-bodies zu finden, sondern nur in davon distinkten Granula; diesem Befund widersprechen allerdings die Ergebnisse von

Nathans *et al.*, 2009, sowie von Chable-Bessia *et al.*, 2009. Die genaue Rolle von P-bodies und ihrer Komponenten im Replikationszyklus des Virus ist daher noch lange nicht vollständig geklärt.

#### **4.4 Identifizierung der für den Transport in die Stressgranula verantwortlichen Domäne von Staufen1**

Die bisher in der Literatur vorhandene Veröffentlichung (Thomas *et al.*, 2009) zur Identifikation der Domäne, die die Einwanderung in die Stressgranula vermittelt, beschränkte sich auf die etwas unbefriedigende Aussage, dass ein Staufen1-Fragment bestehend aus N-Terminus/RBD2, RBD3 und RBD4 noch in den Stressgranula zu finden sei; nicht aber ein C-terminales Fragment mit den Domänen TBD und RBD5. Die anfänglichen Bemühungen in dieser Arbeit zur Identifizierung der verantwortlichen Staufen1-Domäne wurden dadurch erschwert, dass Staufen1 Dimere oder sogar oligomere Strukturen ausbildet. Diese Strukturen scheinen auch unter Stressbedingungen Bestand zu haben. Dadurch waren alle Staufen1-Varianten der zunächst verwendeten Mutantensammlung mit ein oder zwei deletierten Domänen in den Stressgranula zu finden. Die eingefügten Defekte konnten durch die Bindung an voll funktionsfähiges Wildtyp-Staufen1 überdeckt werden. Erst durch die drastische Reduktion des endogenen Staufen1 um etwa 75 % zeigte sich, dass der N-Terminus mit der Domäne RBD2 (ohne dsRNA-bindender Aktivität) für die Einwanderung in die Stressgranula notwendig ist. Auch für die anderen Mutanten war eine gewisse Einschränkung zu beobachten, aber nur die Mutante  $\Delta$ N-Terminus/RBD2-Staufen1 war überhaupt nicht mehr in den Stressgranula zu finden.

Die zur Bestätigung dieses Ergebnisses hergestellten weiteren Mutanten erhärteten diesen Befund: Alle Mutanten mit enthaltenem N-Terminus beziehungsweise RBD2 waren in den Stressgranula zu finden. Mutanten ohne N-Terminus/RBD2 (aber den Regionen TBD oder RBD5) waren nur sehr schwach in den Stressgranula zu finden. Die Tatsache, dass der Knockdown von endogenem Staufen1 die Lokalisation dieser Proteinfragmente in den Stressgranula nahezu beseitigt, weist darauf hin, dass über die Dimerisierung mit dem Wildtypprotein der Transport in die Stressgranula vermittelt worden ist. Tatsächlich ist in der Literatur beschrieben, dass die Dimerisierung von Staufen1 maßgeblich durch die Domänen RBD5, der Region zwischen TBD und RBD5 und in geringem Maße auch von RBD2 vermittelt wird (Martel *et al.*, 2010; Gleghorn *et al.*, 2013). Im Falle des N-Terminus/RBD2-Fragmentes sind solche Dimerisierungseffekte für die Stressgranulaeinwanderung nicht

ausschlaggebend gewesen, da der Knockdown von endogenem Staufen1 keinen Einfluss auf die Einwanderung hatte.

Überraschend ist, dass auch RBD3 alleine in die Stressgranula einwandert und dass der Effekt nach einem endogenen Staufen1-Knockdown sogar noch zunimmt. RBD3 ist die Domäne mit der stärksten dsRNA-Bindeaktivität (Wickham *et al.*, 1999); es ist denkbar, dass es durch die Bindung an mRNAs in die Stressgranula gelangt. Bei einem Knockdown von endogenem Staufen1 werden die mit der RBD3-Einzeldomäne um mRNA konkurrierenden Vollängenproteine (mit mutmaßlich höherer Affinität zu dsRNA als RBD3 alleine) herunterreguliert: Dadurch könnte mehr von der RBD3-Einzeldomäne an die mRNAs gebunden werden, was die unter diesen Umständen verstärkte Einwanderung in die Stressgranula erklären würde. Interessant wäre in diesem Zusammenhang gewesen eine mutierte Variante der RBD3-Einzeldomäne zu untersuchen, die nicht mehr an RNAs binden kann, beispielsweise die bereits erwähnte Mutante F135A-RBD3. Für ein solches F135A-RBD3-mCherry-Konstrukt wäre keine Rekrutierung mehr in die Stressgranula zu erwarten.

RBD3 alleine scheint im Vollängen-Staufen1 allerdings nicht vollständig in der Lage, das Protein in die Stressgranula zu dirigieren, denn die Mutante mit dem deletierten N-Terminus/RBD2 ( $\Delta$ N-Term./RBD2-Staufen1) war beim Knockdown von endogenem Staufen1 nicht mehr in den Stressgranula zu finden. Dazu passt, dass auch das RBD3,RBD4-Fragment nicht in den Stressgranula zu finden ist. Der in und zwischen RBD3 und RBD4 liegende Bereich von Staufen1 enthält verschiedene Lokalisierungssignale, die wichtig für das nukleocytoplasmatische Pendeln sind (Martel *et al.*, 2006) und mit dem Transport in die Stressgranula interferieren könnten. Für RBD3 ist in der Literatur beschrieben worden, dass die benachbarten Domäne RBD2 und RBD4 einen deutlichen (und sogar gegenläufigen) Einfluss auf die Funktionalität von RBD3 haben. Auch sterische Effekte bei der Faltung des RBD3,RBD4-Fragmentes könnten die Stressgranulaeinwanderung unterbunden haben. Schließlich spricht auch die Beobachtung, dass die RBD3-Deletionsmutante (also Vollängenstaufen1 ohne RBD3) keine Einschränkung hinsichtlich der Rekrutierung in die Stressgranula aufweist, dafür, dass RBD3 zwar an der Einwanderung in die Stressgranula beteiligt ist, aber nicht derartig essentiell wie die Region um den N-Terminus bzw. RBD2 ist.

Es wurde für Staufen1 gezeigt, dass die Überexpression die Bildung von Stressgranula inhibieren kann. Dieser Effekt, der für die hier vorgenommenen Untersuchungen mitunter

problematisch gewesen sein könnte, trat nur in sehr begrenztem Maße auf. Die eher schlechte Expression von ektopischen Staufen1 im Vergleich zu anderen ektopisch exprimierten Proteinen wie TIA-1 oder Rev könnte eine Ursache dafür sein. Außerdem ist bekannt, dass die TIA-1-Überexpression dem inhibierenden Effekt von Staufen1 teilweise kompensieren kann (Thomas *et al.*, 2009). Interessanterweise war der inhibierende Effekt auf die Formation von Stressgranula besonders stark bei den Fluoreszenzpräparaten für die Staufen1-Mutante N-Terminus/RBD2,RBD3,RBD4 ausgeprägt, die sehr stark über einen Zeitraum von zwei Tagen exprimiert worden ist. Für diese Mutante wurde auch in der Literatur bereits eine inhibierende Wirkung auf die Stressgranulabildung beschrieben (Thomas *et al.*, 2009).

#### **4.5 Relevanz der Staufen1-Rev- und der Staufen1-Rec-Interaktion im viralen Replikationsmechanismus sowie der Wechselwirkungen von HIV-1 und HERV-K(HML-2) mit den Stressgranula**

Staufen1 spielt sowohl in dem Replikationsmechanismus von HIV-1 als auch in dem von HERV-K(HML-2) eine wichtige Rolle. Auch für HTLV ist bereits eine Interaktion mit Staufen1 nachgewiesen worden. Es ist vorstellbar, dass diese Gemeinsamkeit hinsichtlich der Staufen1-Interaktion von diesen drei ansonsten recht unterschiedlichen Retroviren bereits bei einem gemeinsamen Vorfahr zu finden ist; gerade auch vor dem Hintergrund, dass Staufen1 Entsprechungen in vielen anderen, mitunter stammesgeschichtlich weit entfernten Tiergruppen besitzt (zum Beispiel in Insekten).

Es wäre allerdings voreilig daraus zu schließen, dass Staufen1 für beide Retroviren vergleichbare Funktionen einnimmt, denn selbst unter Annahme einer evolutionär sehr alten Wechselwirkung zwischen Staufen1 und den Retroviren kann sich die Natur der Interaktion seitdem stark verändert haben. Die Untersuchungen in dieser Arbeit zeigten tatsächlich eine Reihe von Unterschieden hinsichtlich des Verhältnisses von Staufen1 zu Rev und Rec auf, die sich an bereits vorher bestehende Erkenntnisse anknüpft: Vorarbeiten am Institut ergaben, dass sich bereits in ihrer Bindestelle an Staufen1 Unterschiede zwischen Rec (Interaktion mit RBD4) und Rev (Interaktion mit RBD3) ergeben. Ebenfalls zeigten diese Versuche bei der Überexpression von Staufen1 einen gesteigerten Export viraler Transkripte aus dem Zellkern im Falle von HERV-K(HML-2) beziehungsweise einen verringerten Export im Falle von HIV-1.

In Bezug auf die Stressgranula und die Prozessierungskörperchen setzen sich diese Unterschiede fort: Die Staufen1-Überexpression sowie der Staufen1-Knockdown hat einen Einfluss auf den Rec-Transport in die Stressgranula, nicht aber auf Rev. Rev-Mutanten, die nicht mehr an Staufen1 binden können, gelangen trotzdem in die Stressgranula. Während Rec nicht in die P-bodies transportiert wird, konnte man Rev durchaus (wenn auch nur in begrenzten Mengen) in den Prozessierungskörperchen finden.

Diese Befunde deuten darauf hin, dass Staufen1 bezüglich Rev und Rec zwar vermutlich komplementäre Aufgaben beim RNA-Transport wahrnimmt, aber die genauen Mechanismen dieser Interaktionen durchaus voneinander verschieden sind.

Im Falle von HIV-1 ist bekannt, dass es über das virale Protein Gag an Staufen1 bindet und in infizierten Zellen die Bildung von Stressgranula inhibiert sowie die Anzahl der Prozessierungskörperchen verringert (Abrahamyan *et al.*, 2010). Die Beobachtung, dass der N-Terminus von Staufen1 die Einwanderung in die Stressgranula vermittelt, ist besonders vor dem Hintergrund bemerkenswert, dass eben jene Region auch für die notwendige Multimerisierung des HIV-Proteins Gag als maßgeblich identifiziert worden ist; auch wenn es anscheinend nicht die Interaktion mit Gag selber vermittelt, für die wiederum RBD3 notwendig ist (Chatel-Chaix *et al.*, 2008). Die funktionelle Assoziation (und mögliche Manipulation) der für die Einwanderung in die Stressgranula verantwortlichen Staufen1-Domänen RBD2 und RBD3 mit dem viralen Gag-Protein könnte ein wichtiger Hinweis darauf sein, wie es dem HI-Virus gelingt, die Stressgranulabildung zu seinen Gunsten zu manipulieren.

Es ist gut möglich, dass eine solche Inhibition der Stressgranulabildung und Beschränkung der P-bodies nicht nur ein zufälliges Nebenprodukt einer Infektion ist (die durch die Aktivierung von antiviralen Kinasen häufig gerade eher Induktoren statt Inhibitoren von Stressgranula darstellen), sondern einen Vorteil für die Replikation des Virus verspricht. Vor dem Hintergrund, dass Rev in großen Mengen in die Stressgranula und in geringerem Ausmaße auch in die P-bodies rekrutiert werden kann und damit potentiell auch virale Vollängentranskripte in beide Granulatypen gelangen könnten, ist es gut vorstellbar, dass das Virus geeignete Strategien entwickelt hat, um dem entgegen zu wirken. Die Manipulation der Bildung dieser Granula ist daher nur folgerichtig. Die Komplexität der noch längst nicht ausreichend charakterisierten Interaktionen zwischen den Proteinen der P-bodies und

Stressgranula und dem HI-Virus implizieren aber möglicherweise auch, dass P-bodies und Stressgranula während der Infektion replikationsfördernde Effekte haben könnten, wie sie für andere Viren bereits beschrieben worden sind (vgl. Abschnitt 1.3.2).

Das Rec-Protein von HERV-K(HML-2) wird dagegen schlechter als Rev in die Stressgranula transportiert und ist in den Prozessierungskörperchen nicht zu finden (Hanke *et al.*, 2013). Über die Interaktion von HERV-K(HML-2) mit den Stressgranula oder Prozessierungskörperchen existieren bisher keine weiterführenden Untersuchungen. Es lässt sich allerdings mutmaßen, dass derartig weitreichende Inhibitionsmechanismen und Interaktionsebenen wie im Falle von HIV-1 weniger dringlich für dieses Virus sind, da die Rekrutierung von Proteinen wie Rec in die Stressgranula schwächer ausfällt und in die P-bodies überhaupt nicht beobachtet worden ist.

#### **4.6 Schlussbemerkungen und Ausblick**

Die einzelnen Domänen von Stau1 beeinflussen sich gegenseitig in ihrer Funktionalität und agieren keinesfalls als unabhängige Einheiten. Die Rolle von Stau1 in unterschiedlichen zellulären Prozessen wie dem RNA-Transport, dem Abbau von RNA oder dem Einfluss auf die Translation macht es zusammen mit seiner funktionellen Modularität und der ubiquitären Expression zu einem geeigneten Ziel für retrovirale Proteine wie Rec, Rev oder Gag, aber auch von verschiedenen anderen Viren. Zumindest im Falle von HIV-1 ergeben sich Interaktionen auf mehreren Ebenen, die auch für HERV-K(HML-2) denkbar erscheinen und deren weitere Erforschung lohnenswert ist.

Auch die vielfältigen Wechselwirkungen und die Manipulation der Stressgranula (und Prozessierungskörperchen) durch Retroviren wie HIV-1, HERV-K(HML-2) oder HTLV sollten in Zukunft nicht aus dem Fokus des wissenschaftlichen Interesses verschwinden, bieten sie doch schließlich einerseits wertvolle Einblicke in die zellulären Reaktionen auf virale Infektionen und geben andererseits Aufschluss auf die entsprechenden viralen Kontermechanismen.

Für weitergehende Untersuchungen der Interaktion zwischen Retroviren und den Stressgranula und zur weiteren Validierung der bisherigen Ergebnisse wäre es langfristig erstrebenswert, Forschungen an tatsächlich infizierten Zellen durchzuführen, die die *in vivo* Situation besser abbilden können als durch die (zweifelloos methodisch einfachere)

Überexpression von entsprechend markierten viralen Proteinen, Stressmarkern und humanen Proteinen. Dies setzt (neben einem höheren methodischen Aufwand) auch die Generierung und Verwendung von Antikörpern gegen diese unmarkierten Proteine voraus.

Es wäre für Folgeversuche besonders interessant zu untersuchen, ob sich in den Stressgranula (oder auch in den P-bodies) virale genomische oder gespleißte Transkripte von HERV-K(HML-2) ansammeln, da dies ein weiteres wichtiges Indiz für die Relevanz der Stressgranula im viralen Replikationsmechanismus darstellen würde. Über die möglichen Folgen der Rekrutierung von retroviralen RNAs in diese Granula (und der damit einhergehenden Kolokalisation mit antiviralen Proteinen) lässt sich bisher nur mutmaßen. Auch wenn im Falle von HIV-1 bereits einige Untersuchungen in dieser Richtung erfolgt sind, ist die Informationslage auch für das HI-Virus noch eher begrenzt.



## **5 Zusammenfassung**

### **5.1 Zusammenfassung**

In dieser Arbeit sollte die Rolle des humanen Staufen1-Proteins hinsichtlich seiner Interaktion mit dem akzessorischen Protein Rec der endogenen humanen Retroviren der Familie HERV-K(HML-2) sowie dem funktionell verwandten Protein Rev des exogenen Retrovirus HIV-1 näher charakterisiert werden. Diese drei Proteine wirken maßgeblich am Kernexport ungespleißter sowie unvollständig gespleißter viraler RNAs mit. Die Kriterien, die zur Einwanderung dieser Proteine in die Stressgranula führen, sowie die beteiligten Proteinregionen sollten genauer beleuchtet werden.

In diesen Untersuchungen zeigte sich, dass virale genomische RNAs nur im Falle des Rec-Proteins einen förderlichen Effekt auf die Lokalisation in den Stressgranula hatten. Der Knockdown von endogenem Staufen1 hatte ebenfalls nur einen negativen Effekt auf die Einwanderung von Rec. Analog dazu zeigte sich bei der Überexpression von Staufen1 eine verbesserte Einwanderung von Rec in die Stressgranula. Weder virale genomische RNAs noch die Expressionsstärke von Staufen1 beeinflussten dagegen die Einwanderung von Rev in die Stressgranula. Deletionsmutanten von Rev, die zur Interaktion mit Staufen1, zur Oligomerisierung oder zur Bindung an die Ziel-RNAs nicht mehr fähig waren, fanden sich trotzdem in den Stressgranula. Insgesamt war die Rekrutierung von Rev in die Stressgranula stärker als der Transport von Rec in diese Granula. Im Gegensatz zu Rec konnte Rev auch in den Prozessierungskörperchen beobachtet werden. Die Anzahl an Unterschieden legt nahe, dass Rec und Rev durch unterschiedliche Vorgänge in die Stressgranula gelangen. Trotz einiger Gemeinsamkeiten ist es denkbar, dass Staufen1 auch im Replikationsmechanismus dieser Retroviren recht unterschiedliche Funktionen wahrnimmt. Das Protein Staufen1 wird ebenfalls in großen Mengen in die Stressgranula rekrutiert. Die N-terminale Domäne mit der nicht mehr funktionsfähigen, aber konservierten dsRNA-bindenden Proteindomäne RBD2 ist für diese Einwanderung maßgeblich verantwortlich. Die Domäne RBD3 mit der stärksten Bindeaktivität an dsRNAs trägt in einem schwächeren Ausmaß ebenfalls zur Einwanderung in die Stressgranula bei.

Stressgranula treten im Zuge von viralen Infektionen häufig auf und können von vielen Viren manipuliert werden. HIV-1 scheint dazu die inhibierende Wirkung von Staufen1 zu nutzen. Die genaue Rolle der Stressgranula und des in diesen enthaltenen Proteins Staufen1 während der Replikation von HIV-1, HERV-K(HML-2) und anderen Viren bleibt eine bislang nur teilweise beantwortete Frage mit möglicherweise therapeutischer Relevanz in der Zukunft.

## 5.2 Summary

The role of the human protein Staufen1 regarding its interaction with the accessory protein Rec of the endogenous retroviruses of the HERV-K(HML-2) family and the functionally related protein Rev of the exogenous retrovirus HIV-1 was further characterized in this work. These three proteins are decisively involved in the nuclear export of unspliced and incompletely spliced viral RNAs. The criteria that lead to the recruitment of these proteins in the stress granules as well as the involved protein domains should be examined more closely.

The experiments presented in this work illustrated that viral genomic RNAs enhance only the localization of Rec in the stress granules. The knockdown of endogenous Staufen1 had only a negative effect on the transport of Rec into the stress granules. Correspondingly, the Staufen1-overexpression resulted in an increased transport of Rec into the stress granules. In contrast to these findings, neither viral genomic RNAs nor the expression level of Staufen1 had an influence on the recruitment of Rev into the stress granules. Deletion mutants of Rev which were incapable to interact with Staufen1, to oligomerize or to bind to the target RNAs were still found in the stress granules. All in all, the recruitment of Rev into the stress granules was stronger than the transport of Rec in these granules. In contrast to Rec, Rev could also be observed in the processing bodies. The number of differences between Rec and Rev suggests that these proteins are recruited into the stress granules by different processes. Despite several similarities, it is conceivable that Staufen1 may serve different functions in the replication mechanism of these retroviruses as well. The protein Staufen1 is also recruited into the stress granules in large amounts. The N-terminal domain with the nonfunctional, but conserved dsRNA-binding domain RBD2 is crucial for this migration into the stress granules. The domain RBD3 with the strongest affinity for dsRNAs is also participating to a minor degree in the recruitment of Staufen1 into the stress granules.

Stress granules occur frequently during viral infections and can be manipulated by various viruses. In case of HIV-1, this manipulation is mediated by taking advantage of the inhibitory capacities of Staufen1. The precise role of the stress granules and the therein included Staufen1 during the replication of HIV-1, HERV-K(HML-2) and other viruses remains to be an incompletely answered question with potential therapeutic relevance for the future.

## 6 Literaturverzeichnis

Abrahamyan, L. G., Chatel-Chaix, L., Ajamian, L., Milev, M. P., Monette, A., Clément, J. F., Song, R., Lehmann, M., DesGroseillers, L., Laughrea, M., Boccaccio, G., Mouland, A. J. (2010). Novel Staufen1 ribonucleoproteins prevent formation of stress granules but favour encapsidation of HIV-1 genomic RNA. *J Cell Sci* 123(3):369-83.

Anderson, P., Kedersha, N. (2002). Stressful initiations. *J Cell Sci* 115 (Teil 16):3227-34.

Barbee, S. A. , Estes, P. S., Cziko, A. M., Hillebrand, J., Luedeman, R. A., Coller, J. M., Johnson, N., Howlett, I. C., Geng, C., Ueda, R., Brand, A. H., Newbury, S. F., Wilhelm, J. E., Levine, R. B., Nakamura, A., Parker, R., Ramaswami, M. (2006). Staufen- and FMRP-containing neuronal RNPs are structurally and functionally related to somatic P bodies. *Neuron* 52(6):997-1009.

Beimforde, N., Hanke, K., Ammar, I., Kurth, R., Bannert, N. (2008). Molecular cloning and functional characterization of the human endogenous retrovirus K113. *Virology* 371(1):216-25.

Black, S. G., Arnaud, F., Palmarini, M., Spencer, T. E. (2010). Endogenous retroviruses in trophoblast differentiation and placental development. *Am J Reprod Immunol* 64(4):255-64.

Blackham, S. L., McGarvey, M. J. (2013). A host cell RNA binding protein, Staufen1, has a role in hepatitis C virus replication before virus assembly. *J Gen Virol*.

Brandt, S., Blissenbach, M., Grewe, B., Konietzny, R., Grunwald, T., Uberla, K. (2007). Rev proteins of human and simian immunodeficiency virus enhance RNA encapsidation. *PLoS Pathog* 3(4):e54.

Buchan, J., R., Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Mol Cell* 36(6):932-41.

Burdick, R., Smith, J. L., Chaipan, C., Friew, Y., Chen, J., Venkatachari, N. J., Delviks-Frankenberry, K. A., Hu, W. S., Pathak, V. K. (2010). P body-associated protein Mov10 inhibits HIV-1 replication at multiple stages. *J Virol* 84(19):10241-53.

Chable-Bessia, C., Meziane, O., Latreille, D., Triboulet, R., Zamborlini, A., Wagschal, A., Jacquet, J. M., Reynes, J., Levy, Y., Saib, A., Bennasser, Y., Benkirane, M. (2009). Suppression of HIV-1 replication by microRNA effectors. *Retrovirology* 6:26.

Chatel-Chaix, L., Abrahamyan, L., Fréchina, C., Mouland, A. J., DesGroseillers, L. (2007). The host protein Staufen1 participates in human immunodeficiency virus type 1 assembly in live cells by influencing pr55Gag multimerization. *J Virol* 81(12):6216-30.

Chatel-Chaix, L., Clément, J. F., Martel, C., Bériault, V., Gatignol, A., DesGroseillers, L., Mouland, A. J. (2004). Identification of Staufen in the human immunodeficiency virus type 1 Gag ribonucleoprotein complex and a role in generating infectious viral particles. *Mol Cell Biol* 24(7):2637-48.

Chatel-Chaix, L., Boulay, K., Mouland, A. J., Desgroseillers, L. (2008). The host protein Staufen1 interacts with the Pr55Gag zinc fingers and regulates HIV-1 assembly via its N-terminus. *Retrovirology* 5:41.

Deininger, P. L., Batzer, M. A. (2002). Mammalian retroelements. *Genome Res* 12(10):1455-65.

Duchaîne, T., F., Hemraj, I., Furic, L., Deitinghoff, A., Kiebler, M. A., DesGroseillers, L. (2002). Staufen2 isoforms localize to the somatodendritic domain of neurons and interact with different organelles. *J Cell Sci* 115 (Teil 16):3285-95.

Ferrandon, D., Elphick, L., Nüsslein-Volhard, C., St Johnston, D (1994). Staufen protein associates with the 3'UTR of bicoid mRNA to form particles that move in a microtubule-dependent manner. *Cell* 79(7):1221-32.

Furic, L., Maher-Laporte, M., DesGroseillers, L. (2008). A genome-wide approach identifies distinct but overlapping subsets of cellular mRNAs associated with Staufen1- and Staufen2-containing ribonucleoprotein complexes. *RNA* 14(2):324-35.

Furnes, C., Arnesen, T., Askjaer, P., Kjems, J., Szilvay, A. M. (2005). HIV-1 Rev oligomerization is not obligatory in the presence of an extra basic domain. *Retrovirology* 2:39.

- Furtak, V., Mulky, A., Rawlings, S. A., Kozhaya, L., Lee, K., Kewalramani, V. N., Unutmaz, D. (2010). Perturbation of the P-body component Mov10 inhibits HIV-1 infectivity. *PLoS One* 5(2):e9081.
- Gallois-Montbrun, S., Kramer, B., Swanson, C. M., Byers, H., Lynham, S., Ward, M., Malim M. H. (2007). Antiviral protein APOBEC3G localizes to ribonucleoprotein complexes found in P bodies and stress granules. *J Virol* 81(5):2165-78.
- Gao, M., Arkov, A. L. (2013). Next generation organelles: Structure and role of germ granules in the germline. *Mol Reprod Dev* 80(8): 610-23.
- George, M., Schwecke, T., Beimforde, N., Hohn, O., Chudak, C., Zimmermann, A., Kurth, R., Naumann, D., Bannert, N. (2011). Identification of the protease cleavage sites in a reconstituted Gag polyprotein of an HERV-K(HML-2) element. *Retrovirology* 8:30.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L. M., Anderson, P. (2004). Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* (12):5383-98.
- Gleghorn, M., L., Gong, C., Kielkopf, C. L., Maquat, L. E. (2013). Staufen1 dimerizes through a conserved motif and a degenerate dsRNA-binding domain to promote mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol* 20(4):515-24.
- Hanke, K., Chudak, C., Kurth, R., Bannert, N. (2013). The Rec protein of HERV-K(HML-2) upregulates androgen receptor activity by binding to the human small glutamine-rich tetratricopeptide repeat protein (hSGT). *Int J Cancer* 132(3):556-67.
- Hanke, K., Hohn, O., Liedgens, L., Fidgeke, K., Wamara, J., Kurth, R., Bannert, N. (2013). Staufen-1 Interacts with the HERV-K(HML-2) Rec and Gag Proteins and Increases Virion Production. *J Virol*.
- Hoffmann, D., Schwarck, D., Banning, C., Brenner, M., Mariyanna, L., Krepstakies, M., Schindler, M., Millar, D. P., Hauber, J. (2012). Formation of trans-activation competent HIV-1 Rev:RRE complexes requires the recruitment of multiple protein activation domains. *PLoS One* 7(6):e38305.

- Izumi, T., Burdick, R., Shigemi, M., Plisov, S., Hu, W. S., Pathak, V. K. (2013). Mov10 and APOBEC3G Localization to Processing Bodies is not Required for Virion Incorporation and Antiviral Activity. *J Virol*.
- Kim, Y.K., Furic, L., Desgroseillers, L., Maquat, L. E. (2005). Mammalian Staufen1 recruits Upf1 to specific mRNA 3'UTRs so as to elicit mRNA decay. *Cell* 120(2):195-208.
- Kurth, R., Bannert, N. (2010). Beneficial and detrimental effects of human endogenous retroviruses. *Int J Cancer* 126(2):306-14.
- Lee, J. H., Oh, J. Y., Pascua, P. N., Kim, E. G., Choi, Y. K., Kim, H. K. (2011). Impairment of the Staufen1-NS1 interaction reduces influenza viral replication. *Biochem Biophys Res Commun* 414(1):153-8.
- Legros, S., Boxus, M., Gatot, J. S., Van Lint, C., Kruys, V., Kettmann, R., Twizere, J. C., Dequiedt, F. (2011). The HTLV-1 Tax protein inhibits formation of stress granules by interacting with histone deacetylase 6. *Oncogene* 30(38):4050-62.
- Li, C. H., Ohn, T., Ivanov, P., Tisdale, S., Anderson, P. (2010). eIF5A promotes translation elongation, polysome disassembly and stress granule assembly. *PLoS One* 5(4):e9942.
- Liu, J., Henao-Mejia, J., Liu, H., Zhao, Y., He, J. J. (2011). Translational regulation of HIV-1 replication by HIV-1 Rev cellular cofactors Sam68, eIF5A, hRIP, and DDX3. *J Neuroimmune Pharmacol* 6(2):308-21.
- Luo, M., Duchaine, T. F., DesGroseillers, L. (2002). Molecular mapping of the determinants involved in human Staufen-ribosome association. *Biochem J* 365 (Teil 3):817-24.
- Malim, M. H., Cullen, B. R. (1991). HIV-1 structural gene expression requires the binding of multiple Rev monomers to the viral RRE: implications for HIV-1 latency. *Cell* 65(2):241-8.
- Martel, C., Dugré-Brisson, S., Boulay, K., Breton, B., Lapointe, G., Armando, S., Trépanier, V., Duchaine, T., Bouvier, M., Desgroseillers, L. (2010). Multimerization of Staufen1 in live cells. *RNA* 16(3):585-97.

- Martel, C., Macchi, P., Furic, L., Kiebler, M. A., Desgroseillers, L. (2006). Staufen1 is imported into the nucleolus via a bipartite nuclear localization signal and several modulatory determinants. *Biochem J* 393 (Teil 1):245-54.
- Menéndez-Arias, L. (2009). Mutation rates and intrinsic fidelity of retroviral reverse transcriptases. *Viruses* 1(3):1137-65.
- Miki, T., Takano, K., Yoneda, Y. (2005). The role of mammalian Staufen on mRNA traffic: a view from its nucleocytoplasmic shuttling function. *Cell Struct Funct* 30(2): 51-6.
- Milev, M. P., Brown, C. M., Mouland, A. J. (2010). Live cell visualization of the interactions between HIV-1 Gag and the cellular RNA-binding protein Staufen1. *Retrovirology* 7:41.
- Mollet, S., Cougot, N., Wilczynska, A., Dautry, F., Kress, M., Bertrand, E., Weil, D. (2008). Translationally repressed mRNA transiently cycles through stress granules during stress. *Mol Biol Cell* (10):4469-79.
- Montero, H., Trujillo-Alonso, V. (2011). Stress granules in the viral replication cycle. *Viruses* 3(11):2328-38.
- Mouland, A. J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGroseillers, L., Cohen, E. A. (2000). The double-stranded RNA-binding protein Staufen is incorporated in human immunodeficiency virus type 1: evidence for a role in genomic RNA encapsidation. *J Virol* 74(12):5441-51.
- Nathans, R., Chu, C. Y., Serquina, A. K., Lu, C. C., Cao, H., Rana, T. M. (2009). Cellular microRNA and P bodies modulate host-HIV-1 interactions. *Mol Cell* 34(6):696-709.
- St Johnston, D., Beuchle, D., Nüsslein-Volhard, C. (1991). Staufen, a gene required to localize maternal RNAs in the *Drosophila* egg. *Cell* 66(1):51-63.
- Suhasini, M., Reddy, T. R. (2009). Cellular proteins and HIV-1 Rev function. *Curr HIV Res* 7(1):91-100.
- Tang, S.J., Meulemans, D., Vazquez, L., Colaco, N., Schuman, E. (2001). A role for a rat homolog of staufen in the transport of RNA to neuronal dendrites. *Neuron* 8;32(3):463-75.

Thomas, M. G., Loschi, M., Desbats, M. A., Boccaccio, G. L. (2011). RNA granules: the good, the bad and the ugly. *Cell Signal* 23(2): 324-34.

Thomas, M. G., Martinez Tosar, L. J., Loschi, M., Pasquini, J. M., Correale, J., Kindler, S., Boccaccio, G. L. (2005). Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell* (1):405-20.

Thomas, M., G., Martinez Tosar, L. J., Desbats, M., A., Leishman, C. C., Boccaccio, G. L. (2009). Mammalian Staufen 1 is recruited to stress granules and impairs their assembly. *J Cell Sci* 122 (Teil 4):563-73.

Tristem, M. (2000). Identification and characterization of novel human endogenous retrovirus families by phylogenetic screening of the human genome mapping project database. *J Virol* 74(8):3715-30.

Turner, G., Barbulescu, M., Su, M., Jensen-Seaman, M. I., Kidd, K. K., Lenz, J. (2001). Insertional polymorphisms of full-length endogenous retroviruses in humans. *Curr Biol* 11(19):1531-5.

Weiss, R. A., Stoye, J. P. (2013). Our viral inheritance. *Science* 340(6134):820-1.

White, J. P., Lloyd, R. E. (2012). Regulation of stress granules in virus systems. *Trends Microbiol* 20(4):175-83.

Wickham, L., Duchaine, T., Luo, M., Nabi, I. R., DesGroseillers, L. (1999). Mammalian staufen is a double-stranded-RNA- and tubulin-binding protein which localizes to the rough endoplasmic reticulum. *Mol Cell Biol* 19(3):2220-30.



## 7 Anhang

### 7.1 Primer-Sequenzen

In der nachfolgenden Auflistung der verwendeten Primer sind etwaige Restriktionsstellen (HindIII: AAGCTT; XhoI: CTCGAG), die zu Klonierungszwecken verwendet worden sind, kursiv und fett dargestellt. Die Zahlen in den Primernamen geben dabei Auskunft darüber, welche Aminosäurebereiche das jeweilige Primerpaar abdecken kann.

Primername	Sequenz (von 5` nach 3`)
Stau-N-Term- RBD2-1-89_for	GGATCG <b><i>CTCGAG</i></b> ATGAAACTTGGAAAAAAACCAATGTAT
Stau-N-Term- RBD2-1-89_rev	GCAACCA <b><i>AGCTT</i></b> CTCCAGCCTCTCTGGCAG
Stau-RBD3- 102-172_for	GGATCG <b><i>CTCGAG</i></b> ATGAAATCTGAAATAAGTCAAGTGTTTGAG
Stau-RBD3- 102-172_rev	CAGTGCA <b><i>AGCTT</i></b> CGGTA ACTTCTTCAGCTCCTCA
Stau-RBD4- 205-275_for	GACTCG <b><i>CTCGAG</i></b> ATGAATCCGATTAGCCGACTGG
Stau-RBD4- 205-275_rev	GCTACGA <b><i>AGCTT</i></b> GACTTTGAAACCAAGGATCTCC
Stau-TBD- 282-372_for	GCTACG <b><i>CTCGAG</i></b> ATGAAACCCGCACTCAAGTCAGA
Stau-TBD- 282-372_rev	GATCAGA <b><i>AGCTT</i></b> GGCAGTTACCGTGGCCTT
Stau-RBD5- 410-476_for	AGTGAA <b><i>CTCGAG</i></b> ATGGAGCAACTGGACTATCTTTCCAG
Stau-RBD5- 410-476_rev	GCTACCA <b><i>AGCTT</i></b> GTCCA ACTCAGACAGCAACTTTAA
Stau-Ganz- 1-496_for	GTAACG <b><i>CTCGAG</i></b> ATGAAACTTGGAAAAAAACCAATG
Stau-Ganz- 1-496_rev	GCACTGA <b><i>AGCTT</i></b> GCACCTCCCACACACAGAC
pCDNA3_Seq- For	GTGTACGGTGGGAGGTCT

Tabelle 10: Verwendete Primer mit Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme (fett und kursiv)

## 7.2 shRNAs und siRNAs

Sequenzname	Sequenz (von 5` nach 3`)
shRNA-C1	GGAGGTGAATGGAAGAGAATCTTCAAGAGAGATTCTCTCCATT CACCTCC
shRNA-C3	GCCTGCAGTTGAACGAGTAAATTCAAGAGATTTACTCGTTCAAC TGCAGGC
shRNA-C2A4	GCCACAGACAAGCCCAGAATATTCAAGAGATATTCTGGGCTTGT CTGTGGC
shRNA-A7	GCTGCGCTGAACATCTTAAAGTTCAAGAGACTTTAAGATGTTCA GCGCAGC
shRNA-B3	GCAGGGAAGACAACAGAAACATTCAAGAGATGTTTCTGTTGTCT TCCCTGC
siRNA 3084	AAATAGCACAGTTTGGAAACT
siRNA-63kDa	TGAATGGGTCTACCTGCATTT
siRNA-NS	AATTCTCCGAACGTGTCACGT

**Tabelle 11: Verwendete siRNAs und shRNAs für den Staufen1-Knockdown**

## 7.3 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A. bidest.	Aqua bidestillata
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	base pair(s)
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
C-Terminus	Carboxy-Terminus
ca.	circa
DAPI	4',6-Diamidin-2'-phenylindol
DCP1a	decapping protein 1a
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium

DNA	desoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dsRNA	double-stranded RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOH	Ethanol
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanin
g	Gramm
Gag	gruppenspezifisches Antigen
GFP	green fluorescent protein
h	Stunde(n)
HERV	humanes endogenes Retrovirus
HIV	humanes Immundefizienz-Virus
HTLV	humanes T-lymphotropes Virus
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	lysogeny broth
LTRs	long terminal repeats
N-Terminus	Amino-Terminus
M	molar
ml	Milliliter
min	Minute
mM	millimolar
mRNA	messenger RNA
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NS	non-silencing
ORF	Open Reading Frame
ori	original
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
PCR	polymerase chain reaction

<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
RBD	RNA-Bindedomäne
Rec	regulator of expression encoded by cORF
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
Rev	regulator of expression of virion proteins
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHIV	simian-human immunodeficiency virus
shRNA	short hairpin RNA
siRNA	small interfering RNA
TIA-1	T-cell internal antigen-1
T	Thymin
<i>Taq</i>	<i>Thermophilus aquaticus</i>
Tris	Trihydroxymethylaminomethan
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBD	Tubulin-Bindedomäne
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethan-1,2-diamin
U	Units
üN	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
vgl.	vergleiche
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtsanteil
z. B.	zum Beispiel
z. T.	zum Teil
μF	Mikrofarad
μl	Mikroliter
μM	mikromolar

## **7.4 Danksagung**

Ich möchte Dr. Norbert Bannert herzlich danken für die Unterstützung und Betreuung meiner Arbeit, für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und natürlich für die Möglichkeit, meine Masterarbeit in seinem Fachbereich anfertigen zu dürfen. Weiterhin möchte ich auch Professor Dr. Christian Schmitz-Linneweber danken für seine freundliche Bereitschaft, diese Arbeit als interner Gutachter an der Humboldt-Universität zu bewerten.

Jula Wamara und Katharina Fiddeke möchte ich dafür danken, dass sie mir die von ihnen generierten Plasmidkonstrukte (siehe Abschnitt 2.1.5, Tabelle 6) für meine Untersuchungen zur Verfügung gestellt haben. Gleichmaßen möchte ich Dr. Kirsten Hanke für ihre umfangreichen Vorarbeiten in Bezug auf Staufen1 und dem Rec-Protein danken, die den Ausgangspunkt meiner Untersuchungen bildeten.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Kazimierz Madela vom ZBS4 für seine ausführliche Einweisung und die wertvollen Tipps im Umgang mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop, die maßgeblich am Gelingen dieser Arbeit Anteil haben.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle auch herzlich allen anderen Mitgliedern des Fachgebietes 18 danken, die mich durch Rat und Tat sowie durch die angenehme Arbeitsatmosphäre bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Zu guter Letzt möchte ich mich bei meiner Familie bedanken für die breite Unterstützung während meines gesamten Studiums, die mir vieles in den letzten fünf Jahren sehr erleichtert hat.

## **7.5 Eigenständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Masterarbeit erstmalig einreiche, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Berlin, den 27. September 2013