

Untersuchung zur Rolle des La-verwandten Proteins LARP4B im mRNA-Metabolismus

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Maritta Küspert

aus Schwäbisch Hall

Würzburg 2014

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie am:

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

1. Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer
2. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Buchberger

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

1. Prüfer: Prof. Dr. Utz Fischer
2. Prüfer: Prof. Dr. Alexander Buchberger
3. Prüfer: Prof. Dr. Stefan Gaubatz

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Zusammenfassung

Eukaryotische *messenger*-RNAs (mRNAs) müssen diverse Prozessierungsreaktionen durchlaufen, bevor sie der Translationsmaschinerie als Template für die Proteinbiosynthese dienen können. Diese Reaktionen beginnen bereits kotranskriptionell und schließen das *Capping*, das Spleißen und die Polyadenylierung ein. Erst nach dem die Prozessierung abgeschlossen ist, kann die reife mRNA ins Zytoplasma transportiert und translatiert werden. mRNAs interagieren in jeder Phase ihres Metabolismus mit verschiedenen *trans*-agierenden Faktoren und bilden mRNA-Ribonukleoproteinkomplexe (mRNPs) aus. Dieser „mRNP-Code“ bestimmt das Schicksal jeder mRNA und reguliert dadurch die Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene.

Für das La-verwandte Protein LARP4B (*La-related protein 4B*) wurde kürzlich eine direkte Interaktion mit den Translationsfaktoren PABPC1 (*poly(A) binding protein, cytoplasmic 1*) und RACK1 (*receptor for activated C kinase*) gefunden. Diese Befunde sowie die Assoziation mit aktiv translatierenden Ribosomen lässt vermuten, dass LARP4B zum mRNP-Code beiträgt. Die Domänenstruktur des Proteins legt darüber hinaus nahe, dass LARP4B direkt mRNAs bindet.

Um einen Einblick in die Funktion von LARP4B und seiner *in vivo* RNA-Bindungspartner zu erhalten, wurde die mRNA-Assoziation transkriptomweit mit Hilfe von PAR-CLIP (*Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*)-Experimenten bestimmt. Diese Daten zeigen, dass LARP4B ein spezifisches Set an zellulären mRNAs über Sequenzbereiche in deren 3'-untranslatierten Regionen bindet. Die bioinformatische Auswertung der PAR-CLIP-Daten identifizierte ein LARP4B-Bindemotiv, welches durch *in vitro* Bindungsstudien validiert werden konnte. Darüber hinaus belegten pSILAC (*pulsed stable isotope labeling with amino acids in cell culture*)-Experimente und eine transkriptomweite Analyse der mRNA-Level, dass LARP4B die Expression der Ziel-mRNAs beeinflusst, indem es die Stabilität der gebundenen Transkripte erhöht. LARP4B konnte somit als positiver Faktor der eukaryotischen Genexpression identifiziert werden.

Summary

Eukaryotic messenger RNAs (mRNAs) undergo several processing reactions before they can serve as a template for protein biosynthesis. These processing reactions begin co-transcriptionally and include capping, splicing and polyadenylation. Once the processing is complete, the mature mRNA can be exported to the cytoplasm for translation. Throughout the various steps of the metabolism, the mRNAs interact with different sets of *trans*-acting factors to form mRNA ribonucleoprotein complexes (mRNPs). This “mRNP code” determines the fate of any mRNA and thereby regulates gene expression at the post-transcriptional level.

Recently, the La-related protein 4B (LARP4B) was shown to interact directly with two translation factors, the cytoplasmic poly(A) binding protein 1 (PABPC1) and the receptor for activated C kinase (RACK1). These findings as well as its association with actively translating ribosomes suggest that LARP4B contributes to the mRNP code. The domain architecture of LARP4B suggests that LARP4B might bind mRNA directly. To gain insight into the function of LARP4B and its *in vivo* RNA binding partners, the associated mRNAs were determined using the transcriptome-wide PAR-CLIP (Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation) technology. These data show that LARP4B binds to a specific set of cellular mRNAs at the 3'-untranslated regions (3'-UTR). The biocomputational analysis of the PAR-CLIP data identified the LARP4B binding motif which could be validated by *in vitro* binding studies. Furthermore, taken together, pSILAC (pulsed stable isotope labeling with amino acids in cell culture) data and a transcriptome-wide analysis of mRNA levels demonstrate that LARP4B influences target mRNA expression by stabilizing the bound transcript. In conclusion, LARP4B was identified as a positive regulator for eukaryotic gene expression.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Messenger-RNA: Bindeglied zwischen der genetischen Information und der Proteinwelt	1
1.2	Der Lebenszyklus einer mRNA	2
1.3	Der Aufbau des mRNP-Codes	4
1.4	Die Funktion der RBPs: Das Auslesen des mRNP-Codes	6
1.5	mRNPs als Ursache für Krankheiten	7
1.6	RNA-Bindedomänen vermitteln die Bindung von Proteinen an RNA	8
1.7	Proteinfamilien RNA-bindender Proteine	10
1.8	Die Familie der La-verwandten Proteine	12
1.8.1	Die humanen LARPs.....	14
1.1.1.1	Das genuine La-Protein.....	14
1.1.1.2	Regulation der RNAP2-Transkription durch LARP7	14
1.1.1.3	LARP6 reguliert die Expression von Typ I Collagen	15
1.1.1.4	LARP1, ein Faktor der TOP-mRNA Expression.....	15
1.1.1.5	Die mRNP-Komponenten LARP4 und LARP4B.....	16
1.9	Problemstellung und Konzeption	17
2	Ergebnisse	18
2.1	Bestimmung des LARP4B mRNA-Interaktoms mittels PAR-CLIP	18
2.2	Validierung der PAR-CLIP-Daten	22
2.3	LARP4B bindet bevorzugt 3'-untranslatierte Regionen	24
2.4	LARP4B interagiert mit AU-reichen Sequenzen	25
2.5	LARP4B stabilisiert die gebundenen Ziel-mRNAs	28
2.6	LARP4B stimuliert die Expression der Ziel-mRNAs	30
2.7	LARP4B, LARP4 und LARP1 interagieren mit einem überlappenden Set an mRNAs	32
2.8	LARP4B, LARP4 und LARP1 agieren partiell redundant	33
3	Diskussion	37
3.1	Identifizierung der <i>in vivo</i> Ziel-RNAs von LARP4B	38
3.2	LARP4B interagiert bevorzugt mit AU-reichen Sequenzen in der 3'-UTR ...39	
3.3	LARP4B stimuliert die Expression der Ziel-mRNAs durch Stabilisierung des gebundenen Transkripts	40

3.4	Der Beitrag von LARP4B zum mRNP-Code: eine Hypothese	42
3.5	LARP4B, LARP4 und LARP1: gleiche mRNA-Interaktoren, aber unterschiedliche Funktionen?	44
3.6	Ausblick	46
4	Material & Methoden	47
4.1	Materialien	47
4.1.1	Längenstandards	47
4.1.2	Allgemeine Puffer	47
4.1.3	Proteaseinhibitoren	48
4.1.4	Medien.....	48
4.1.4.1	Medien und Zusätze für die Bakterienkultur	48
4.1.4.2	Medien und Zusätze für die Gewebekultur	48
4.1.5	Antikörper	50
4.1.6	Plasmide	51
4.1.7	Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien.....	51
4.1.7.1	Bakterienstämme	51
4.1.7.2	Eukaryotische Zelllinien.....	52
4.1.8	DNA und RNA Oligonukleotide.....	52
4.1.8.1	DNA Oligonukleotide (Sigma-Aldrich).....	52
4.1.8.2	RNA Oligonukleotide.....	54
4.2	Methoden	55
4.2.1	Molekularbiologische Methoden	55
4.2.1.1	Polymerasekettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation	55
4.2.1.2	Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen.....	55
4.2.1.3	Dephosphorylierung von DNA-Enden	56
4.2.1.4	Ligation von DNA Fragmenten	56
4.2.1.5	Gerichtete <i>in vitro</i> Mutagenese	56
4.2.1.6	Transformation kompetenter Bakterienzellen	57
4.2.1.7	Kontrolle der Klonierung durch Kolonie-PCR	57
4.2.1.8	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren	57
4.2.1.9	Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen oder Reaktionsansätzen..	58
4.2.1.10	Isolierung von Plasmid-DNA	58
4.2.1.11	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	58
4.2.1.12	Kontrolle der Klonierung durch Sequenzierung	58
4.2.2	Biochemische Methoden	58
4.2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterienzellen.....	58
4.2.2.2	Expression und Aufreinigung von rekombinantem LARP4B.....	59

4.2.2.3	Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	60
4.2.2.4	Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	61
4.2.2.5	Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen	61
4.2.2.6	Regeneration von Glutathionsepharose.....	61
4.2.2.7	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford	62
4.2.2.8	5'-Endmarkierung von RNA-Oligonukleotiden.....	62
4.2.2.9	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	62
4.2.2.10	Reinigung von RNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen.....	63
4.2.2.11	Phenolextraktion von RNA aus Immunpräzipitationen und Zellextrakten	63
4.2.2.12	<i>Elektromobility Shift Assay</i> (EMSA)	64
4.2.2.13	Quantitative Echtzeit- PCR (qPCR).....	64
4.2.2.14	Expressionsanalyse verschiedener Proteine in Mausgeweben	65
4.2.2.15	Analyse des mRNA-Transkriptoms mittels Hochdurchsatzsequenzierung	65
4.2.2.16	Photoactivatable-Ribonucleoside-enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation (PAR-CLIP)	67
4.2.2.17	Polysomendichtegradientenzentrifugation.....	69
4.2.2.18	Dichtegradientenzentrifugation	69
4.2.2.19	mRNA-Polysomenverschiebung.....	70
4.2.2.20	Proteinmassenspektrometrie.....	71
4.2.3	Immunbiochemische Methoden	72
4.2.3.1	Spezifischer Proteinnachweis durch Western-Blot Analyse.....	72
4.2.3.2	Immunpräzipitation von HA-C8ORF33	73
4.2.3.3	Immunpräzipitation von endogenem C8ORF33 und GRWD1	73
4.2.3.4	RNA-Immunpräzipitation (IP) aus Zellextrakt mit anschließender RT-PCR (RIP-PCR).....	74
4.2.3.5	Immunfluoreszenzmikroskopie	76
4.2.4	Zellbiologische Methoden.....	77
4.2.4.1	Kultivierung adhärent wachsender eukaryotischer Zelllinien	77
4.2.4.2	Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zelllinien.....	77
4.2.4.3	Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen.....	77
4.2.4.4	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA.....	78
4.2.4.5	Transiente Transfektion von siRNA.....	78
4.2.4.6	Herstellung stabiler Flp-In T-REx 293-Zelllinien	78
4.2.4.7	pulsed stable isotope labeling with amino acids in cell culture (pSILAC).....	79
4.2.4.8	Luciferase-basierende Reporteranalysen.....	81
4.2.4.9	<i>In vivo</i> RNA-Markierung durch ³² P-Inkorporation	81

5 Literaturverzeichnis..... 83

6 Anhang..... 105

6.1	Tabelle der LARP4B-Zielgene	105
6.3	C8ORF33 ist ein negativer Regulator der eukaryotischen	
	Ribosomenbiogenese	130
6.3.1	Zusammenfassung	130
6.3.2	Summary	131
6.3.3	Einleitung.....	132
6.3.3.1	Die Synthese der Translationsmaschinerie bindet beträchtliche zelluläre Ressourcen.....	132
6.3.3.2	Die Ribosomenbiogenese	132
6.3.3.3	Zellwachstum und Ribosomenbiogenese	134
6.3.3.4	Ribosomenassoziierte Krankheiten: Ribosomopathien.....	135
6.3.3.5	Problemstellung	136
6.3.4	Ergebnisse	137
6.3.4.1	C8ORF33 inhibiert die Ribosomenbiogenese.....	137
6.3.4.2	C8ORF33 interagiert mit GRWD1, einem potentiellen Faktor der Ribosomenbiogenese	139
6.3.4.3	GRWD1 ist ein positiver Faktor der Ribosomenbiogenese.....	140
6.3.4.4	C8ORF33 sequestriert GRWD1 in einem inhibitorischen Komplex.....	142
6.3.5	Diskussion	144
6.3.5.1	C8ORF33 ist ein Ribosomenbiogenesefaktor	144
6.3.5.2	Die Ribosomenbiogenese: Katalytische Faktoren und Zusammenlagerungschaperone	145
6.3.5.3	Hinweise auf die Funktion von C8ORF33 durch die Analyse von GRWD1	146
6.3.5.4	Die Regulation der Ribosomenbiogenese.....	147
6.3.5.5	GRWD1 und die nukleoläre Stressantwort.....	149
6.3.5.6	Ausblick.....	149
7	Abbildungsverzeichnis.....	151
8	Abkürzungsverzeichnis.....	153
8.1.1	Nukleotidbasen	161
8.1.2	Aminosäuren.....	161
9	Publikationen	162
10	Erklärung.....	163
11	Danksagung	164

1 Einleitung

1.1 *Messenger*-RNA: Bindeglied zwischen der genetischen Information und der Proteinwelt

Wie exprimieren Lebewesen ihre genetische Information und wandeln sie in funktionelle Biomoleküle um? Diese Frage ist eines der zentralen Themen in den Biowissenschaften. Bei diesem Prozess kommt der *messenger*-RNA (mRNA) eine zentrale Bedeutung zu, da sie als Mittler zwischen der genetischen Information einerseits und dem funktionsfähigen Protein andererseits agiert. Von ihrer Transkription bis zum Abbau unterliegen mRNAs, speziell in Eukaryoten, einem komplexen und bislang nur teilweise verstandenen Metabolismus (Abbildung 1). Dieser erlaubt vielfältige Möglichkeiten der Regulation sowohl auf transkriptioneller als auch auf posttranskriptioneller Ebene.

Während ihres gesamten Lebenszyklus liegen mRNAs sehr wahrscheinlich niemals als freie Moleküle vor. Vielmehr bilden sie zusammen mit diversen *trans*-agierenden Faktoren Ribonukleoproteinkomplexe (mRNPs). Hierbei wird ein kombinatorisches Netzwerk auf der mRNA ausgebildet, das man auch als mRNP-Code bezeichnet. Die individuelle Ausprägung dieses Codes bestimmt das zelluläre Schicksal einer mRNA, sei es auf der Ebene der Stabilität, Lokalisation oder Translation. Die Zusammensetzung eines mRNPs ist hochdynamisch und wechselt in Abhängigkeit des funktionellen Stadiums, in dem sich eine betreffende mRNA befindet. Dem mRNP-Code kommt damit die entscheidende Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression zu. Im Zentrum dieser Arbeit steht die Analyse eines *trans*-agierenden Faktors der als Komponente des mRNP-Codes agiert.

1.2 Der Lebenszyklus einer mRNA

Alle kernkodierte mRNAs werden in Eukaryoten als Vorläufermoleküle, den sogenannten prä-mRNAs, durch die RNA Polymerase II (RNAP2) gebildet (Abbildung 1). In diesem Vorläuferzustand sind sie für die Translation nicht funktionell und müssen daher durch eine Reihe von Prozessierungsreaktionen zur reifen mRNA umgewandelt werden. Beim Großteil der mRNAs unterscheidet man hierbei primär drei Prozesse: Die Generierung des 5'-Endes durch das *Capping*, die Zusammenfügung von kodierenden Bereichen durch das Spleißen und die Polyadenylierung des 3'-Endes (Abbildung 1). Alle diese Reaktionen erfolgen bereits am naszierenden mRNA-Molekül, also kotranskriptionell, und gewährleisten somit die effiziente Bereitstellung von reifen mRNAs.

Die Cappingreaktion ist primär für den Schutz der mRNA vor Exonukleasen und für die Translationsinitiation wichtig (1-3). Beim *Capping* wird zunächst das Triphosphat des 5'-terminalen Nukleotids der mRNA zu einem Diphosphat umgewandelt (4). Die Addition eines Guanosinmonophosphats über eine 5'-5'-Triphosphatbrücke und die anschließende Methylierung des terminalen Guanosins in der N7-Position führt schließlich zur Ausbildung der Capstruktur, die als m7G-Cap bezeichnet wird (4, 5).

Da die große Mehrzahl der proteinkodierenden Gene höherer Lebewesen aus einer Abfolge von kodierenden Exons und nicht-kodierenden Introns besteht, muss durch einen weiteren Prozessierungsschritt, dem sogenannten prä-mRNA-Spleißen, der offene Leserahmen generiert werden. Dieser hochkomplexe Vorgang wird durch das makromolekulare Spleißosom katalysiert (6). In einem ersten nukleophilen Angriff greift die 2'-OH-Gruppe eines Adenosins der im Intron liegenden Verzweigungsstelle die 5'-Spleißstelle an wodurch eine intermediäre Struktur entsteht und das 5'-liegende Exon freigesetzt wird (6). Die dadurch entstandene 3'-OH-Gruppe dieses Exons greift daraufhin in einer weiteren Umesterung die 3'-Spleißstelle an (6). Dadurch werden die beiden Exons miteinander verbunden und das Intron freigesetzt.

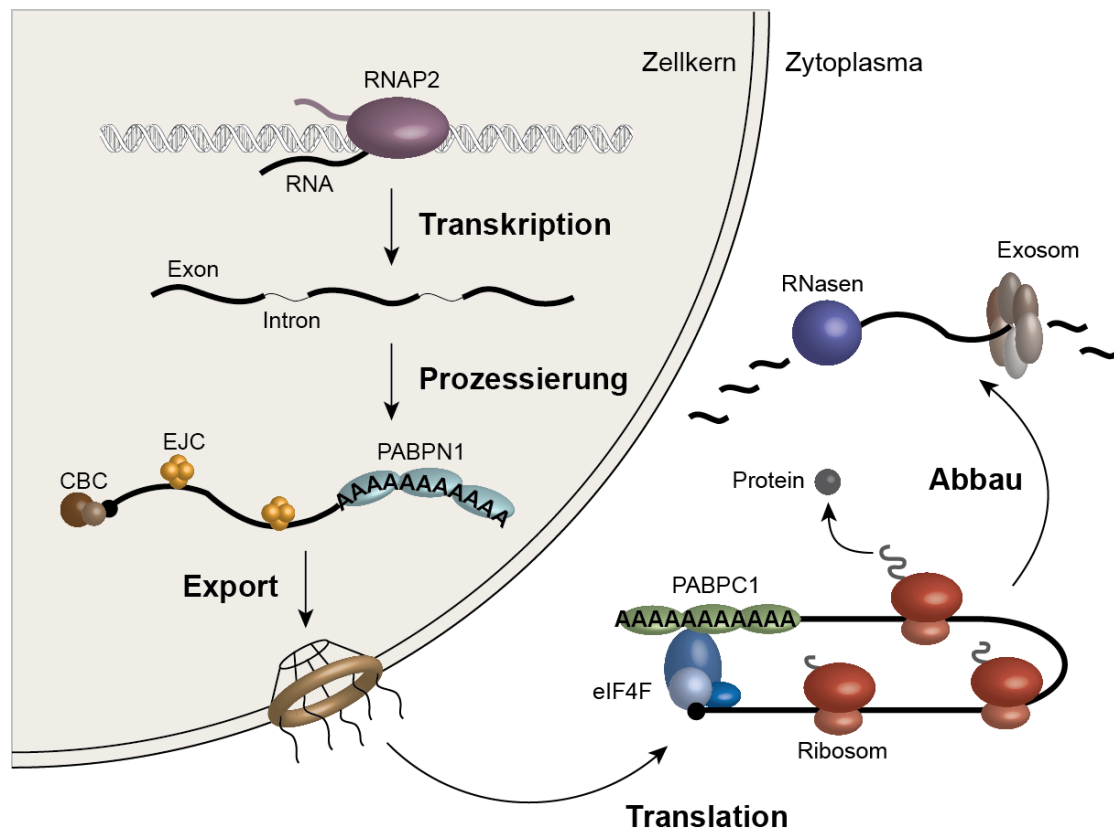


Abbildung 1: Der Lebenszyklus einer eukaryotischen mRNA.

Die Transkription der prä-mRNA erfolgt im Zellkern durch die RNA-Polymerase II (RNAP2). Nach der Prozessierung der mRNA im Kern erfolgt der Export ins Zytoplasma. mRNAs werden im Zytoplasma durch die Ribosomen in Proteine translatiert und durch RNasen zu definierten Zeitpunkten abgebaut. CBC: cap-binding complex, EJC: exon-junction complex

Schließlich wird das mature 3'-Ende der mRNA durch Polyadenylierung generiert. Diese Modifikation dient, ähnlich wie das Capping, der Stabilisierung der mRNA und der Stimulierung der Translation und wird durch die makromolekulare Polyadenylierungsmaschinerie ermöglicht (7, 8). Die Polyadenylierung erfolgt in einem zweistufigen Prozess, bei dem zunächst die mRNA nach dem Polyadenylierungssignal AAUAAA gespalten wird (9-11). An der entstehenden 3'-Hydroxygruppe addiert anschließend die Poly(A)-Polymerase einen Poly(A)-Schwanz von ca. 200-300 Nukleotiden an das 3'-Ende der mRNA (12, 13).

Erst wenn die oben beschriebenen Prozessierungsreaktionen vollständig abgelaufen sind, erfolgt der Export der reifen mRNA ins Zytoplasma und die Translation der kodierenden Sequenz an Ribosomen in Proteine (Abbildung 1).

mRNAs unterliegen einem ständigen Zyklus von Synthese und Degradierung. Letztere wird durch die Deadenylierung des 3'-Endes eingeleitet (14). Danach entfernt der Decappingkomplex das Cap und die mRNA wird durch zelluläre RNasen in 5'-3'-Richtung abgebaut (14, 15). Alternativ kann der Abbau in 3'-5'-Richtung durch das Exosom erfolgen (16, 17).

1.3 Der Aufbau des mRNP-Codes

Die Zusammenlagerung der mRNA in ein mRNP bietet eine Vielzahl kombinatorischer Möglichkeiten der mRNP-Zusammensetzung. Allein die Anzahl und Heterogenität der mRNA-Interaktoren ist immens: So wurden über 800 Proteine neueren Studien zufolge im Menschen als mRNA-bindende Faktoren identifiziert (18, 19). Neben den „klassischen“ Faktoren wie hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*), Helikasen, Translationsfaktoren und Nukleasen befinden sich darunter auch einige Stoffwechsellzyme, was zeigt, dass der Umfang an mRNA-bindenden Proteinen weitaus größer ist als bisher angenommen (18, 19). Darüber hinaus wechselwirken mRNPs mit weiteren Biomolekülen, wie zum Beispiel nicht-kodierenden RNAs oder Metaboliten. Betrachtet man außerdem die Diversität der verschiedenen mRNAs stellt sich die Frage, wie die Wechselwirkung einer mRNA mit einem spezifischen Set an RNA-bindenden Proteinen (RBPs) zustande kommt.

Ein Mechanismus, der maßgeblich den Aufbau des mRNP-Codes bestimmt, ist die sequenzspezifische Rekrutierung von RBPs durch *cis*-regulatorische Elemente der mRNA. Ein solches *cis*-Element kann dabei von verschiedenen RBPs gebunden werden, was zur Konkurrenz dieser RBPs um die Bindestelle führt. Dies ist beispielsweise bei AU-reichen Elementen (ARE) in 3'-untranslatierten Regionen (3'-UTRs) von mRNAs der Fall. Die Bindung dieser Elemente durch destabilisierende Faktoren, wie dem Protein AUF1 (*AU-rich element RNA binding factor 1*), führt zur Rekrutierung des Exosoms und somit zum Abbau der mRNA (20-22). Binden hingegen stabilisierende Faktoren, wie das HuR (*human antigen R*) Protein, wird die Bindestelle für destabilisierende Faktoren maskiert und es kommt zu einer Stabilisierung der gebundenen mRNA (23).

Neben der sequenzspezifischen Rekrutierung von RBPs können Faktoren auch kontextspezifisch über Protein-Protein-Wechselwirkungen an die mRNA rekrutiert werden. Ein Beispiel dafür bietet der EJC (*exon-junction complex*), der abhängig von

der Spleißreaktion an die mRNA bindet und Exon-Exon-Grenzen markiert (24). Über die Interaktion mit dem Spleißfaktor *CWC22* (*CWC22 spliceosome-associated protein*) wird der EJC an die mRNA rekrutiert, woraufhin eIF4AIII (*eukaryotic initiation factor 4A3*), eine Komponente des EJC, sequenzunabhängig ungefähr 20 Nukleotide 5' zur Exon-Exon-Grenze an die mRNA bindet (24-28).

Ein weiteres bekanntes Beispiel für die kontextspezifische Rekrutierung von Faktoren stellt die Kopplung von Transkription und mRNP-Zusammenlagerung dar. Bereits an der naszierenden mRNA etabliert sich ein primäres mRNP durch die Rekrutierung von RBPs durch die RNAP2. Die größte Untereinheit dieser Polymerase besitzt eine C-terminale Domäne (CTD), die aus Wiederholungen einer sieben Aminosäuren langen Sequenz besteht (29-31). Durch die differenzielle Phosphorylierung von Serin 2 und Serin 5 in dieser Sequenz wird die Transkription mit der Prozessierung koordiniert und die Rekrutierung von definierten RBPs ermöglicht, die dann sequenzspezifisch an die mRNA binden (32-38). So führt beispielsweise die spezifische Phosphorylierung von Serin 2 zur Rekrutierung der Polyadenylierungsmaschinerie und damit zur kotranskriptionellen Polyadenylierung des naszierenden Transkripts (38, 39).

Zusätzlich können weitere Faktoren durch Protein-Protein-Wechselwirkungen an das mRNP rekrutiert werden ohne eine direkte Interaktion mit der mRNA einzugehen. Auf diese Weise wird die Komplexität des mRNPs weiter erhöht.

1.4 Die Funktion der RBPs: Das Auslesen des mRNP-Codes

Die Einbindung der mRNA in ein mRNP hat funktionelle Konsequenzen für das gebundene Transkript. Die Funktion der mRNA-bindenden Faktoren ist dabei vielfältig, jedoch derzeit nur teilweise verstanden. Es ist aber wahrscheinlich, dass sie jede Ebene der Genexpression beeinflussen.

RBPs sind wesentlich an der Katalyse der einzelnen Schritte des mRNA-Metabolismus beteiligt. RBPs wirken als Komponenten des Spleißosoms oder der Polyadenylierungsmaschinerie an der nukleären Prozessierung der mRNA mit (6, 7, 40). Außerdem sind Translationsfaktoren entscheidend für eine effiziente Translation der mRNA durch das Ribosom (41). Auch der Abbau der mRNA wird durch RBPs wie Nukleasen und Decappingenzyme katalysiert (14, 15).

Über die Beteiligung an der Katalyse hinaus haben RBPs zusätzlich regulatorische Funktionen im mRNA-Metabolismus. Bereits im Zellkern regulieren RBPs die Prozessierung der mRNA indem sie Einfluss auf das alternative Spleißen oder die Wahl alternativer Polyadenylierungsstellen nehmen (40, 42, 43). Im Zytoplasma können RBPs die Translation und den Abbau der mRNA stimulieren oder reprimieren (44, 45). Durch die Regulation verschiedenster Schritte des mRNA-Metabolismus sorgen RBPs somit für die Feinabstimmung der Genexpression.

Als Adaptoren können RBPs weitere Faktoren an das mRNP rekrutieren, die das Schicksal der mRNA beeinflussen. Die Bindung von NXF1 (*nuclear RNA export factor 1*) an die mRNA sorgt durch die Wechselwirkung mit der Kernpore für einen effizienten Export der mRNA ins Zytoplasma (46-49). Auch die zytoplasmatische Lokalisation der mRNA wird durch RBPs mitbestimmt. So assoziiert die ASH1 (*absent, small, or homeotic discs 1*) mRNA durch die Bindung des RBPs She2p (*Swi5p-dependent HO expression*) mit Myosin und kann dadurch an ihren Bestimmungsort transportiert werden (50-52).

Darüber hinaus kann die Bindung verschiedener RBPs als „Qualitätskontrolle“ dienen. Die Interaktion der mRNA mit RBPs stellt sicher, dass die Reihenfolge der Metabolismusschritte gewahrt bleibt indem bevorzugt mRNAs weiter prozessiert werden, die einen vorangegangenen Schritt bereits durchlaufen haben. Dies ist der Fall bei der Interaktion von PABPN1 (*poly(A) binding protein, nuclear 1*) mit dem Poly(A)-Schwanz. Diese Bindung, die erst aufgrund der Polyadenylierung ermöglicht wird, fördert gleichzeitig den daraufhin stattfindenden Export der mRNA (53). Auch

die korrekte Prozessierung der mRNA kann mithilfe von RBPs, in diesem Fall des EJC, überprüft werden. Befindet sich, unter anderem aufgrund von fehlerhaftem Spleißen, ein EJC mehr als 50 Nukleotide 3' entfernt zum Stoppcodon wird die mRNA in einem *nonsense-mediated decay* (NMD) genannten Prozess translationsabhängig abgebaut (28, 54-56).

1.5 mRNPs als Ursache für Krankheiten

Die Integrität des mRNP-Codes ist von essentieller Bedeutung für die Homöostase einer Zelle. So ist es nicht überraschend, dass Veränderungen im Kontext von mRNPs Ursache von diversen Krankheiten, wie Krebs, Muskeldystrophien sowie sensorische und neurologische Störungen sind (57, 58).

Pathologische Störungen können dabei durch eine beeinträchtigte Funktion der mRNA-bindenden Faktoren verursacht werden. Dies kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. So können zum Beispiel Mutationen, veränderte posttranslationale Modifikationen oder die Sequestrierung durch Autoantikörper die Aktivität eines RBPs beeinflussen (59-62). Auch Veränderungen im Expressionslevel eines RBPs können Ursache von Krankheiten sein (63, 64).

Neben einer beeinträchtigten Funktion der RBPs können auch Veränderungen der mRNA zu pathologischen Störungen führen. Dies kann zum Beispiel durch Störungen bei der mRNA-Prozessierung hervorgerufen werden. Bei der spinalen Muskelatrophie (SMA) kommt es zu Defekten in der UsnRNP (*uridine rich small nuclear ribonucleoparticle*)-Biogenese, woraus ein verändertes mRNA-Spleißmuster und damit einhergehend eine Degeneration von Motoneuronen resultiert (65-67). Darüber hinaus können Mutationen in der mRNA-Sequenz Ursache von Krankheiten sein. Hierbei kommt es häufig zur Vervielfältigung von Trinukleotidwiederholungen in den mRNAs (68-73). Durch die sich daraus ergebenden neuen RNA-Bindesequenzen werden RBPs sequestriert und stehen nicht mehr für die Bindung an ihre eigentliche Zielsequenz zur Verfügung (73-75).

1.6 RNA-Bindedomänen vermitteln die Bindung von Proteinen an RNA

Die Bindung der RBPs an die mRNA erfolgt meist über eine oder mehrere RNA-Bindedomänen (RBD). Diese kontaktieren häufig nur wenige Nukleotide lange RNA-Sequenzen, weshalb die Wechselwirkung mit der RNA oftmals schwach ist. Aus diesem Grund sind RBPs häufig modular aufgebaut und enthalten mehrere RBDs (76, 77). Die Kombination mehrerer RNA-Bindedomänen verleiht den RBPs eine erhöhte Spezifität und Affinität zur mRNA-Zielsequenz (76, 77). Häufige RNA-Bindedomänen in mRNAs sind RRM (*RNA recognition motif*), DEAD-Boxen, KH (*hnRNPK homology*)-Domänen, Zinkfinger-Motive und RGG-Boxen (18, 19).

RRMs sind die am häufigsten vorkommende RNA-Bindedomänen und werden in einer Vielzahl verschiedener Proteine, wie zum Beispiel hnRNP A1 und PABPC1 (*poly(A) binding protein, cytoplasmic 1*), gefunden (18, 19, 78). Sie besitzen eine β - α - β - β - α - β Topologie und bilden ein viersträngiges, antiparalleles β -Faltblatt an dessen Rückseite sich zwei α -Helices befinden (Abbildung 2A) (79). Konservierte aromatische Aminosäuren der beiden mittleren Stränge sorgen durch Stapelwechselwirkungen mit den RNA-Basen und durch Interkalierung zwischen zwei Zuckern für die Interaktion mit der RNA (79, 80). Von dieser klassischen Art der Interaktion gibt es jedoch zahlreiche Abweichungen. So kann die RNA-Bindung über die N- oder C-terminale Erweiterung des RRM oder über Wechselwirkungen mit der Kante des β -Faltblattes erfolgen (79). Diese vielseitigen Bindungsmöglichkeiten tragen dazu bei, dass RRM ein breites Spektrum an Zielsequenzen mit einer Länge von zwei bis acht Nukleotiden binden können (80). Neben den klassischen RRM gibt es zudem RRM-ähnliche Domänen. Diese besitzen zwar die typische Topologie eines RRM, jedoch fehlen die konservierten Aminosäuren (81, 82).

DEAD-Box Helikasen sind ATP-abhängige RNA-Helikasen, deren Bindung an RNA durch die DEAD-Box vermittelt wird (83). Eine DEAD-Box besteht aus zwei RecA-ähnlichen Domänen, welche aus insgesamt zwölf konservierten Sequenzmotive bestehen (Abbildung 2B) (83). Eines dieser Sequenzmotive, Asp-Glu-Ala-Asp, gibt den DEAD-Boxen ihren Namen. Die Bindung der RNA erfolgt mit beide RecA-ähnlichen Domänen was eine geschlossene Konformation der DEAD-Box zur Folge

hat (83). Dazu kontaktieren sie das Rückgrat der RNA, wodurch die Bindung von DEAD-Boxen an die RNA sequenzunabhängig ist (84).

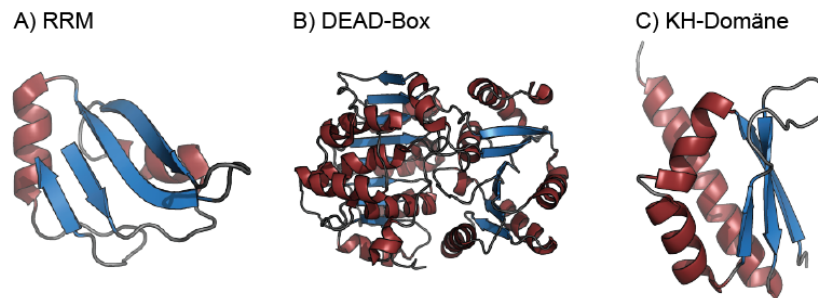


Abbildung 2: Schematische Darstellung von mRNA-Bindedomänen.

(A) Das RRM (*RNA recognition motif*) besteht aus einem viersträngigen, antiparallelen β -Faltblatt, an dessen Rückseite sich zwei α -Helices befinden. (PDB Eintrag 2VOD) (85). (B) Zwei RecA-ähnliche Domänen bilden zusammen eine DEAD-Box. Diese beiden Domänen vermitteln gemeinsam die Bindung an RNA (PDB Eintrag 2DB3) (86). (C) Typ I KH (*hnRNP K homology*)-Domänen zeichnen sich durch ein dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt mit drei vorgelagerten α -Helices aus. (PDB 1EC6) (87).

Die KH-Domäne ist eine etwa 70 Aminosäuren lange RNA-Bindedomäne, die man unter anderem im namensgebenden Protein hnRNP K oder auch in FMRP (*fragile X mental retardation protein*) findet (88-90). In Eukaryoten findet man typischerweise die Typ I KH-Domäne, die ein dreisträngiges, antiparalleles β -Faltblatt mit drei vorgelagerten α -Helices bildet (Abbildung 2C) (88, 91). KH-Domänen besitzen eine GXXG-Schleife, die mit Phosphatgruppen der RNA wechselwirkt (88, 91). Darüber hinaus findet man Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe Wechselwirkungen zwischen der KH-Domäne und den RNA-Basen (88).

Zinkfinger-Motive sind relativ kleine, um die 30 Aminosäuren lange Proteindomänen (92-94). Durch die Koordination eines Zinkions durch Cysteine oder Histidine wird ihre Domänenstruktur stabilisiert (94). Zinkfinger können DNA sowie einzel- oder doppelsträngige RNA binden (94, 95). Gemäß der an der Zinkionenkoordination beteiligten Aminosäuren und der von dem Zinkfinger angenommenen Struktur unterscheidet man verschiedene Klassen von Zinkfingern. Die am häufigsten in mRNA-bindenden Proteinen vorkommenden Zinkfinger sind die CCHC (Cys-Cys-His-Cys)- und CCCH (Cys-Cys-Cys-His)-Zinkfinger (18, 19). Die CCCH-Zinkfinger von ZFP36 (*ZFP36 ring finger protein*) binden beispielsweise durch

Wasserstoffbrückenbindungen und Stapelwechselwirkungen an AU-reiche mRNA-Sequenzen (96, 97).

Die Wechselwirkung von Proteinen mit RNA kann auch über Bindemotive in unstrukturierten Proteinbereichen erfolgen. Ein solches Beispiel sind die Arginin-Glycin-Glycin (RGG)-Boxen (19, 98, 99). RGG-Boxen bestehen aus RGG(X0-4)RGG(X0-4)RGG-oder RGG(X0-4)RGG-Sequenzen (100). Arginine in RGG-Boxen stellen klassische Substrate für eine asymmetrische Dimethylierung durch Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) dar (101-103). Da RGG-Boxen meist Teil unstrukturierter Proteinregionen sind, ist die Strukturbestimmung schwierig. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die C-terminale RGG-Box von Nucleolin aus sich wiederholenden β -Schleifen besteht (99). RGG-Boxen können sowohl Primär- als auch Sekundärstrukturen von Nukleinsäuren erkennen (100, 104, 105).

1.7 Proteinfamilien RNA-bindender Proteine

Aufgrund funktioneller Ähnlichkeiten, gemeinsamer Domänen oder Sequenzhomologien lassen sich die RBPs in Proteinfamilien einteilen. Proteine einer Familie spielen dabei oftmals im selben Schritt des mRNA-Metabolismus eine Rolle. Eine solche Proteinfamilie bilden die hnRNPs. hnRNPs sind sowohl strukturell als auch funktionell eine heterogene Klasse von RBPs. Trotz dieser Diversität besitzen hnRNPs aber einige gemeinsame Eigenschaften. Im Allgemeinen zeigen sie eine diffuse nukleäre Lokalisation, können jedoch zwischen Zellkern und Zytoplasma pendeln (106-112). Durch die Bindung an die naszierende prä-mRNA im Zellkern stellen sie ein Kennzeichen eines prä-mRNPs dar und verpacken die naszierende RNA (112-120). Darüber hinaus sind sie keine Komponenten anderer RNPs (119). Die Bindung an mRNAs vermitteln dabei RRM-ähnliche Domänen, KH-Domänen oder RGG-Boxen (89, 98, 106, 109, 111, 112, 121-124). Die einzelnen hnRNPs haben auch spezifische Funktionen, die alle Ebenen der posttranskriptionellen Genexpression betreffen (125). So beeinflussen sie häufig das Spleißen der mRNA, indem sie beispielsweise an exonische Spleiß*silencer* binden (126-146).

Die Familie der SR-Proteine zeichnet sich durch eine gemeinsame Proteindomäne, die RS-Domäne, aus (132, 147-155). Diese besteht aus Wiederholungen des Arginin-Serin-Dipeptids und vermittelt Protein-Protein-Interaktionen (156-159).

Neben der C-terminalen RS-Domäne besitzen SR-Proteine ein N-terminales RRM und oft zusätzlich eine RRM-ähnliche Domäne (149, 155). SR-Proteine sind Spleißaktivatoren, die an exonische Spleißenhancer binden (148, 149, 156, 160-167). SR-Proteine bleiben an der prozessierten mRNA gebunden und beeinflussen dadurch weitere Schritte des mRNA Metabolismus, wie zum Beispiel die Translation (168-172).

Eine weitere RBP-Proteinfamilie ist die Familie der Hu/ELAVL-Proteine. Sie umfasst im Menschen vier Proteine: das ubiquitäre HuR/ELAVL1 (*embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like*) sowie die neuronalen Proteine HuB/ELAVL2, HuC/ELAVL3 und HuD/ELAVL4 (173-175). ELAVL-Proteine besitzen eine gemeinsame Domänenstruktur, bestehend aus zwei RRM, einer Gelenkregion und eines weiteren RRM (175-177). Sie kompetieren mit anderen RBPs um die Bindung an AREs und beeinflussen auf diese Weise vor allem die Stabilität und Translation der mRNA (175, 177-190). ELAVL-Proteine pendeln zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern, wo sie zusätzlich das alternative Spleißen und die alternative Polyadenylierung regulieren (23, 183, 191-194).

1.8 Die Familie der La-verwandten Proteine

Durch die funktionelle Charakterisierung der einzelnen Familienmitglieder wurden in den letzten Jahren der weitreichende Einfluss einer weiteren Familie an RNA-bindenden Proteinen im mRNA-Metabolismus deutliche: nämlich die Familie der La-verwandten Proteine LARPs (*La-related proteins*). Proteine der LARP-Familie zeichnen sich durch eine gemeinsame RNA-Bindedomäne, dem La-Motiv, aus (Abbildung 3) Das La-Motiv ist ein konserviertes Motiv und wird mit Ausnahme einiger Protisten in allen Eukaryoten nicht aber in Prokaryoten gefunden (195). In den meisten Fällen wird das La-Motiv von einem RRM oder einer RRM-ähnlichen Domäne gefolgt, die zusammen das La-Modul bilden (195).

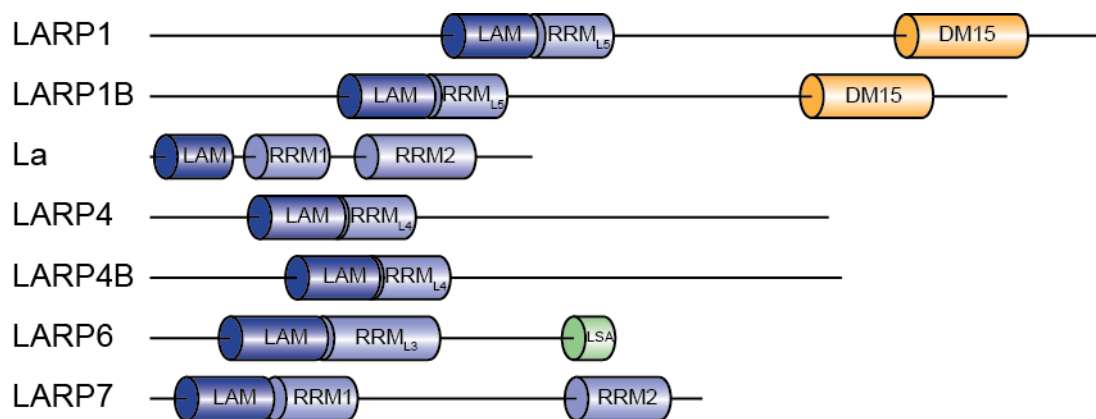


Abbildung 3: Domänenstruktur der humanen LARPs.

Die humanen LARPs besitzen in ihrem N-Terminus ein La-Motiv (LAM), dem ein RRM (*RNA recognition motif*) oder eine RRM-ähnlichen Domäne folgt. Gemeinsam bilden diese beiden Domänen das La-Modul. Zusätzlich findet man ein weiteres RRM im C-Terminus von La und LARP7. LARP1 und LARP1B verfügen außerdem über eine DM15-Domäne, während LARP6 ein LSA (*La motif and S1 associated*)-Motiv besitzt.

Strukturanalysen des humanen La-Proteins, des am besten untersuchten LARP-Proteins, zeigen, dass das La-Motiv eine geflügelte Helix-Schleife-Helix-Struktur annimmt, wie man sie in vielen Transkriptionsfaktoren findet (Abbildung 4) (85, 196-198). Das La-Motiv und das angrenzende RRM bilden dabei eine gemeinsame Bindungstasche für die Bindung an 3'-UUUOH, einer Zielsequenz von La (196-199). Dabei bedient sich das La-Modul eines atypischen Bindungsmodus. Statt mit der Erkennungshelix des La-Motivs, die bei vielen Transkriptionsfaktoren für die Bindung

an Nukleinsäuren sorgt, interagiert das La-Motiv mit der gegenüberliegenden Seite mit der RNA (85, 198, 200). Des Weiteren werden die bei vielen RRM konservierten aromatischen Aminosäuren der RNP1 (*RNA-binding region1*)- und RNP2 (*RNA-binding region2*)-Sequenzen nicht für die Bindung an 3'-UUUOH benötigt. Stattdessen erfolgt die Wechselwirkung über die Kante des β -Faltblatts des RRM (85, 198).

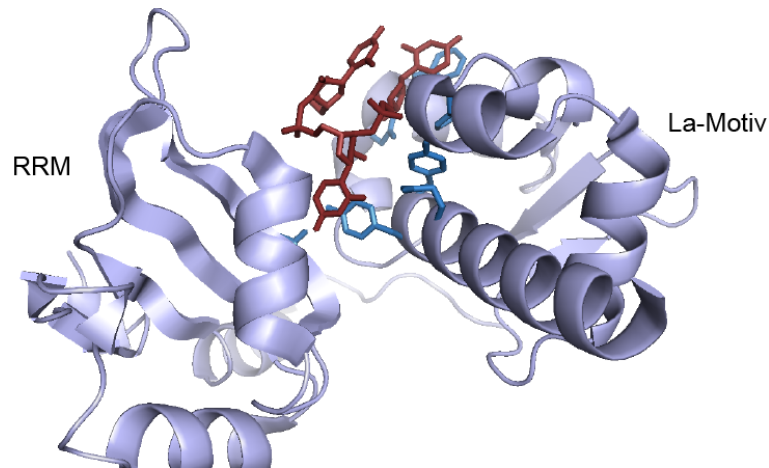


Abbildung 4: Kristallstruktur des La-Moduls des humanen La-Proteins.

Das RRM (*RNA recognition motif*) und das La-Motiv bilden eine gemeinsame Bindungstasche für die Interaktion mit 3'-UUUOH (rot). Die Wechselwirkung mit der RNA findet größtenteils über das La-Motiv statt. Zusätzlich findet man Interaktionen der RNA mit der Unterseite des β -Faltblatts (PDB Eintrag 1ZH5) (198).

Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten können die LARPs in fünf Unterfamilien eingeteilt werden: die Familie der genuinen La-Proteine und die LARP-Familien 1,4,6 und 7 (Abbildung 3) (195).

1.8.1 Die humanen LARPs

1.1.1.1 Das genuine La-Protein

Das am besten untersuchte LARP-Protein ist das genuine La-Protein. Das La-Protein höherer Eukaryoten besitzt neben dem N-terminalen La-Modul zusätzlich ein weiteres, C-terminales RRM sowie ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS) und ein nukleäres Retentionselement (NRE) (Abbildung 3) (195, 201, 202). Das La-Protein wurde zunächst als Autoantigen bei den rheumatischen Erkrankungen Sjögren-Syndrom und systemischer *Lupus erythematoses* identifiziert (203-205). La bindet an das 3'-UUUOH-Ende naszierender RNA Polymerase III (RNAP3)-Transkripte, wie beispielsweise der 7SL snRNA (*small nuclear RNA*), 7SK snRNA, Y-RNAs, 5S rRNA und prä-tRNAs (206-221). Dadurch beeinflusst La den Metabolismus dieser RNAs, indem es Einfluss auf die Stabilität, Faltung oder Prozessierung dieser RNAs sowie die Zusammenlagerung zu RNPs nimmt (222-236).

La ist überwiegend im Zellkern lokalisiert (199, 203, 237-239). Ein Teil befindet sich jedoch auch als Bestandteil von mRNPs im Zytoplasma (240-243). Hierbei spielt La vor allem bei der Translation viraler sowie zellulärer mRNAs, die eine IRES (*internal ribosome entry site*)-Struktur besitzen, eine Rolle. Durch Bindung an die IRES-Struktur wird ein stimulativer Effekt auf deren Translation ausgeübt (244-259). Auch die Expression von TOP (*5'-terminal oligopyrimidine tract*)-mRNAs wird durch die Bindung von La an die TOP-Sequenz beeinflusst (260-264). Neben einem translationellen Effekt kann die Bindung von La mRNAs auch vor Abbau schützen (265-267). Des Weiteren ist La an der Expressionsregulation durch microRNAs beteiligt, indem es unter anderem hilft die hydrolysierte mRNA vom RISC (*RNA-induced silencing complex*)-Komplex zu entfernen (268, 269).

1.1.1.2 Regulation der RNAP2-Transkription durch LARP7

Die größte Homologie zum genuinen La-Protein zeigt LARP7. Alle Aminosäuren, die für die Bindung von La an das 3'-UUUOH-Ende naszierender RNAP3-Transkripte benötigt werden, sowie das C-terminale RRM sind bei LARP7 konserviert (Abbildung 3) (195, 270). In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass LARP7 an das 3'-UUUOH-Ende der 7SK snRNA bindet und diese dadurch stabilisiert (271-274). Die 7SK snRNA ist Bestandteil eines nukleären RNPs, das den

positiven Transkriptionselongationsfaktor b (pTEFb), einen Regulator der RNAP2-Transkription, binden kann (275-279). Durch diese Bindung wird der pTEFb-Komplex und damit die Transkriptionselongation inhibiert (280-283). LARP7 stellt somit einen negativen Regulator der RNAP2 Transkriptionselongation dar (271, 273, 274).

1.1.1.3 LARP6 reguliert die Expression von Typ I Collagen

LARP6 spielt eine entscheidende Rolle in der Collagenexpression. Typ I Collagen besteht aus einer Tripelhelix aufgebaut aus zwei $\alpha 1(I)$ - und einem $\alpha 2(I)$ -Collagenpolypeptid. Um die korrekte Zusammenlagerung des Heterotrimers zu gewährleisten, muss die Expression der verschiedenen Polypeptide koordiniert werden. Dies wird durch LARP6 bewerkstelligt. LARP6 bindet dafür an die Haarnadel-Struktur, die sich in der 5'-UTR der $\alpha 1(I)$ - und $\alpha 2(I)$ -Collagen mRNA befindet und fungiert als Adapterprotein für die Rekrutierung weiterer Faktoren, die für die Collagenexpression von Bedeutung sind (284-286). Zu diesen gehören UNRIP (*UNR interacting protein*), Nicht-Muskel Myosin, Vimentinfilamente und die RNA-Helikase A (287-290). Auf diese Weise kann die Collagenexpression koordiniert und gesteigert werden.

1.1.1.4 LARP1, ein Faktor der TOP-mRNA Expression

Das zytoplasmatische LARP1 assoziiert mit Translationsinitiationsfaktoren, wie dem eukaryotischen Translationsinitiationsfaktor 4E (eIF4E) und aktiv translatierenden Ribosomen, und ist somit an der mRNA Translation beteiligt (291-293). Die Assoziation mit dem mRNP erfolgt dabei durch Bindung an PABPC1 und den Poly(A)-Schwanz der mRNA, was eine globale Stimulation der Proteinexpression zur Folge hat (291-293). Dies kann durch die Bindung von LARP1 an Raptor, einer Komponente des mTORC1-Komplexes (*mammalian target of rapamycin complex 1*), erklärt werden (292). mTORC1 phosphoryliert unter anderem die eIF4E-Bindeproteine und die S6 Kinase, was zu einer gesteigerten Translation führt (294-299). In Übereinstimmung damit führt eine siRNA-vermittelte Depletion von LARP1 zur Akkumulation von 80S Ribosomen (291). Zusätzlich wurde gezeigt, dass LARP1 bevorzugt mit TOP-mRNAs interagiert und deren Translation fördert (292, 293). So resultiert die Verminderung der LARP1-Expression in einer Verschiebung von TOP-

mRNAs von Polysomen hin zu Subpolysomen (292). Gleichzeitig werden TOP-mRNAs durch die Bindung von LARP1 stabilisiert (293).

1.1.1.5 Die mRNP-Komponenten LARP4 und LARP4B

LARP4 und LARP4B zeigen die größte Varianz zum La-Protein. In Übereinstimmung mit der großen Homologie zwischen LARP4 und LARP4B wurden für beide Proteine ähnliche biochemische und funktionelle Eigenschaften gefunden (270). So sind beide Proteine Bestandteil zytoplasmatischer mRNPs und assoziieren mit Translationsinitiationsfaktoren (300-302). Wie für Komponenten von Translationspräinitiationskomplexen typisch, translokalisieren sie in Stressgranula, zytoplasmatischen Aggregaten, in welchen unter Stressbedingungen mRNAs gelagert werden (301, 302). Durch Bindung von RACK1 (*receptor of activated protein kinase C1*), einer Komponente der 40S ribosomalen Untereinheit, sind sie in der Lage mit dem Ribosom zu interagieren (300-302). Dadurch kosedimentieren sie mit der 40S ribosomalen Untereinheit, 80S Ribosomen und Polysomen in einer Dichtegradientenzentrifugation (301, 302). Darüber hinaus binden LARP4 und LARP4B an PABPC1 (301, 302). Dies wird durch eine Variante des PABP-Interaktionsmotivs 2 (vPAM), die sich im N-Terminus der beiden Proteine befindet, vermittelt (301-303). Im Einklang damit üben beide Proteine einen stimulierenden Effekt auf die globale Proteinexpression aus wobei der genaue Wirkmechanismus jedoch noch offen ist (301, 302).

1.9 Problemstellung und Konzeption

Der mRNP-Code spielt die zentrale Rolle in der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression. Aufgebaut aus zahlreichen Proteinfaktoren und nicht-kodierenden RNAs bestimmt er durch das Zusammenspiel dieser Faktoren das Schicksal der gebundenen mRNA zu jedem Zeitpunkt ihres Metabolismus. Die Funktion der einzelnen Faktoren ist jedoch bislang nur unzureichend verstanden. Eine dieser mRNP-Code-Faktoren ist das La-verwandte Protein LARP4B. Durch die Interaktion mit PABPC1 und RACK1 sowie der Kosedimentation mit aktiv translatierenden Ribosomen wurde es unlängst als Bestandteil von mRNPs identifiziert (300, 301). Die Identität dieser mRNPs sowie der genaue Wirkmechanismus von LARP4B im Kontext dieser mRNPs ist jedoch bis heute unbekannt.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher zunächst das Set an mRNPs bestimmt werden, mit welchen LARP4B interagiert. Dazu sollte ein PAR-CLIP (*Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*)-Experiment die von LARP4B gebundenen RNAs identifizieren. PAR-CLIP bietet dabei den Vorteil einer kovalenten Quervernetzung des Proteins und der RNA wodurch eine stringente Reinigung des mRNPs ermöglicht wird. Aus der Quervernetzung resultierende T:C Konversionen erlauben darüberhinaus eine verbesserte bioinformatische Auswertung der Sequenzierdaten. Die Kenntnis der mRNA-Interaktoren sollte anschließend die funktionelle Analyse des Effekts von LARP4B auf die Expression dieser mRNPs ermöglichen. Zusätzlich sollte das LARP4B mRNA-Interaktom mit den von LARP4 und LARP1 gebundenen mRNAs verglichen werden, um Rückschlüsse über eine mögliche funktionelle Redundanz dieser Faktoren zuzulassen.

2 Ergebnisse

2.1 Bestimmung des LARP4B mRNA-Interaktoms mittels PAR-CLIP

Wie durch Strukturstudien für das genuine La-Protein gezeigt, stellt das La-Motiv gemeinsam mit dem angrenzenden RRM ein RNA-Bindemotiv dar (196-199). Auch LARP4B besitzt in seinem N-Terminus ein La-Modul, was LARP4B zu einem putativ RNA-bindenden Protein macht (195). Da jedoch einige der für die Bindung des La-Proteins an 3'-UUUOH benötigten Aminosäuren bei LARP4B nicht konserviert sind, stellt sich die Frage, ob LARP4B ebenfalls in der Lage ist RNA zu binden (270). Um diese Frage zu klären, wurde ein PAR-CLIP-Experiment durchgeführt. Dazu wurde eine stabile Flp-In T-REx 293 LARP4B-Zelllinie verwendet. Diese Zelllinie exprimiert

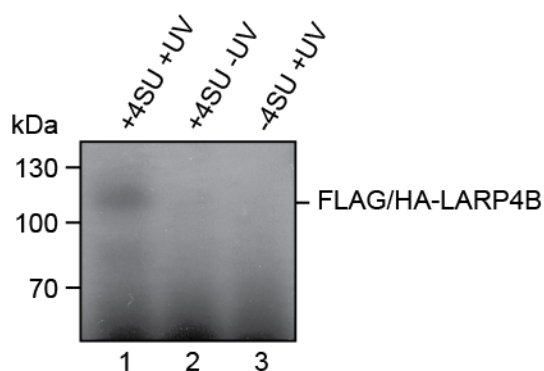


Abbildung 5: LARP4B bindet RNA *in vivo*.

Flp-In T-REx 293 LARP4B-Zellen wurden in Medium mit 4SU kultiviert, mit Tetracyclin induziert und UV-behandelt. Nach der Immunpräzipitation von FLAG/HA-LARP4B wurde kopräzipitierte RNA radioaktiv markiert, der Komplex über SDS-PAGE aufgetrennt und gebundene RNA durch Autoradiografie nachgewiesen (Spur 1). Zur Kontrolle wurde Medium ohne 4SU verwendet (Spur 2) oder die UV-Behandlung weggelassen (Spur 3).

nach der Induktion mit Tetracyclin LARP4B, welches am N-Terminus einen FLAG/HA-Tag besitzt. Diese Zelllinie wurde in 4SU-haltigem Medium kultiviert und die Expression von FLAG/HA-LARP4B mit Tetracyclin induziert. Nach der Behandlung mit UV-Licht von 365 nm Wellenlänge wurden die Zellen lysiert und FLAG/HA-LARP4B mithilfe eines α -FLAG-Antikörpers immunpräzipitiert. Kopräzipitierte RNA wurde partiell hydrolysiert und anschließend am 5'-Ende mittels T4 Polynukleotidkinase (T4 PNK) radioaktiv markiert. Der Ansatz wurde danach durch SDS-PAGE aufgetrennt und kopräzipitierte, direkt an das Protein gebundene RNA durch Autoradiografie sichtbar gemacht. Auf diese Weise konnte immunpräzipitiertes

FLAG/HA-LARP4B radioaktiv markiert werden (Abbildung 5 Spur 1). Die radioaktive Markierung ist dabei abhängig von der Inkorporation von 4SU sowie der UV-Behandlung (Abbildung 5 Spuren 2,3). Somit konnte gezeigt werden, dass LARP4B *in vivo* RNA direkt bindet.

Die von LARP4B gebundene RNA sollte nun darüber Aufschluss geben, mit welchen RNPs LARP4B assoziiert ist und sollte daher in einem PAR-CLIP-Experiment identifiziert werden. Die Identifizierung der gebundenen RNA sowie die bioinformatische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Yasuhiro Murakawa (AG Dr. Markus Landthaler, Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) und wurde aus zwei voneinander unabhängigen Experimenten abgeleitet. Der immunpräzipitierte Komplex aus FLAG/HA-LARP4B und der gebundenen RNA wurde hierzu aus dem SDS-PAGE-Gel eluiert und die RNA durch eine Proteinase K Behandlung isoliert. Anschließend wurde die RNA nach Adapterligation revers transkribiert, die erhaltene cDNA amplifiziert und im Hochdurchsatzverfahren sequenziert. Die erhaltenen Datensätze wurden mithilfe einer Annotationspipeline bioinformatisch ausgewertet (Tabelle 1). Den daraus resultierenden 5,9 beziehungsweise 1,8 Millionen verschiedenen Sequenzen wurden die genomischen Regionen zugeordnet (Tabelle 1).

Tabelle 1: Bioinformatische Auswertung der LARP4B PAR-CLIP-Sequenzierdaten.

	PAR-CLIP 1	PAR-CLIP 2
Sequenzen nach Adapterentfernung	17,8 M	11,8 M
verschiedene Sequenzen	5,9 M	1,8 M
Kartierung auf das humane Genom		
nicht kartierbare Sequenzen	4,7 M	1,2 M
nicht eindeutig kartierbare Sequenzen	0,5 M	0,3 M
behaltenen Sequenzen	0,8 M	0,3 M
konservative Kombination beider PAR-CLIP-Replikate		
Rohcluster	33123	
gefilterte Cluster	32992	
identifizierte Gene	7906	

Die 4SU-vermittelte Quervernetzung von RNA mit Proteinen führt an der Quervernetzungsstelle zu charakteristischen T:C Konversionen in den sequenzierten PCR-Produkte. Aufgrund dieser T:C Konversionen durften die Sequenzen bei der Kartierung *eine* Abweichung zum humanen Genom zeigen. Um die Genomstelle eindeutig zuordnen zu können, wurden für die weitere Auswertung nur Sequenzen verwendet, die eindeutig auf eine einzige Stelle des Genoms kartiert werden konnten. Dadurch wurden ca. 800000 beziehungsweise ca. 300000 Sequenzen beibehalten (Tabelle 1).

Um auszuschließen, dass es sich bei der sequenzierten RNA um unspezifischen Hintergrund handelt, wurden die behaltene Sequenzen mit dem humanen Genom abgeglichen (Abbildung 6).

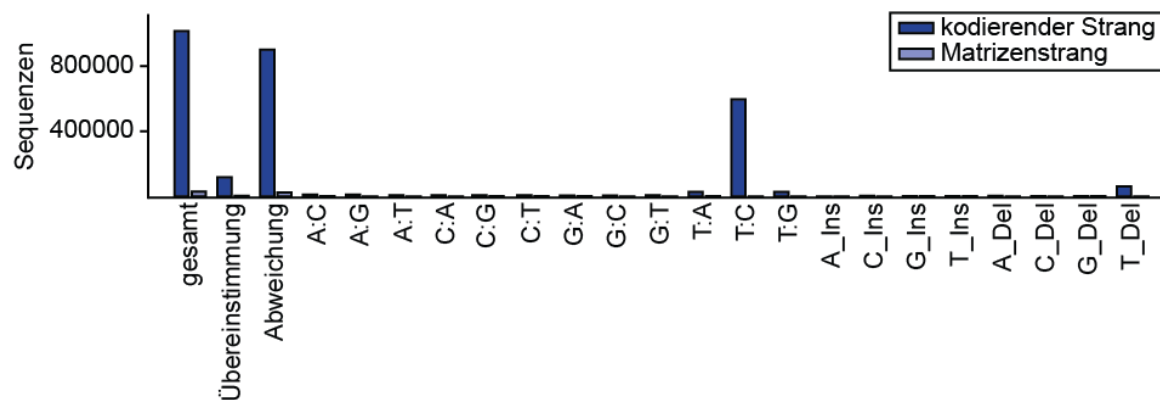


Abbildung 6: Abgleich der Sequenzen mit dem humanen Genom.

Den behaltene Sequenzen wurden die genomischen Regionen zugeordnet. Die Übereinstimmung oder die gefundenen Abweichungen dieser Sequenzen mit dem Genom ist dargestellt. Ins: Insertion, Del: Deletion

Dabei fiel auf, dass nur ein geringer Teil der Sequenzen eine perfekte Übereinstimmung mit dem Genom aufwies. Die überwiegende Mehrheit der Sequenzen zeigte jedoch T:C Konversionen. Dies beweist, dass die Quervernetzung von LARP4B mit der RNA effizient erfolgte und damit die erhaltenen Sequenzierdaten die von LARP4B spezifisch gebundenen RNAs wiedergeben.

Aus den erhaltenen Sequenzen wurden schließlich Rohcluster gebildet. Ein Cluster ist eine Zusammenfassung von Sequenzen, die dem Genom fortlaufend zugeordnet werden können. Dazu wurden die Daten beider PAR-CLIP-Replikate konservativ kombiniert, das heißt jedes der Replikate muss mindestens eine Sequenz sowie eine

T:C Konversion zu jedem *Cluster* beitragen. *Cluster*, die Sequenzen beinhalteten, die auf den Matrizenstrang kartiert wurden, wurden anschließend von der weiteren Auswertung ausgenommen, woraus 32992 gefilterte *Cluster* resultierten. Diese konnten 7906 mRNA-kodierenden Genen zugeordnet werden, welche gemeinsam

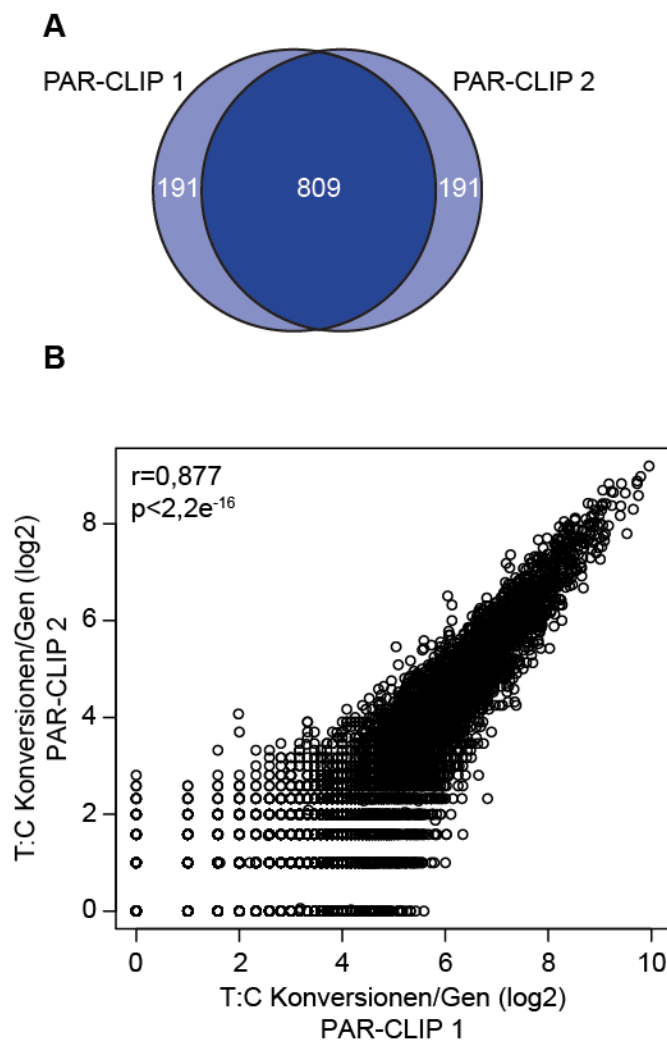


Abbildung 7: Reproduzierbarkeit des PAR-CLIP-Experiments.

(A) Der Vergleich der in beiden PAR-CLIP-Replikaten erhaltenen 1000 besten Zielgene zeigt eine hohe Übereinstimmung. (B) Die Anzahl der T:C Konversionen der identifizierten mRNAs korreliert signifikant zwischen den PAR-CLIP-Replikaten.

(Abbildung 7B). Die durchgeführten PAR-CLIP-Experimente zeigten somit eine spezifische Bindung von LARP4B an mRNAs und identifizierten ferner reproduzierbar das LARP4B mRNA-Interaktom.

das LARP4B mRNA-Interaktom bilden. LARP4B stellt somit einen mRNA-bindenden Faktor dar. Die Anzahl der gemessenen T:C Konversionen gilt hierbei als Maß für die Bindung von LARP4B an die mRNA. Die identifizierten LARP4B Zielgene wurden daher gemäß ihrer Anzahl an T:C Konversionen geordnet.

Um die Reproduzierbarkeit des PAR-CLIP-Experiments zu überprüfen, wurden die in beiden Replikaten identifizierten 1000 besten Zielgene miteinander verglichen (Abbildung 7A). Dabei zeigte sich eine Übereinstimmung von über 80 % zwischen den beiden Replikaten. Vergleicht man weiterhin die Anzahl der T:C Konversionen der identifizierten mRNAs in beiden Replikaten findet sich auch hier eine signifikante Korrelation zwischen beiden PAR-CLIP-Experimenten

2.2 Validierung der PAR-CLIP-Daten

Um Artefakte durch das PAR-CLIP-Experiment auszuschließen, sollte die Interaktion von LARP4B mit den identifizierten mRNA-Zielgenen nun experimentell bestätigt werden. Dazu wurde FLAG/HA-LARP4B aus Zellextrakt stabiler Flp-In T-REx 293 LARP4B-Zellen mit α -FLAG-Antikörpern immunpräzipitiert, kopräzipitierte RNA isoliert und mittels reverser Transkription mit anschließender PCR-Amplifikation analysiert (RIP-PCR).

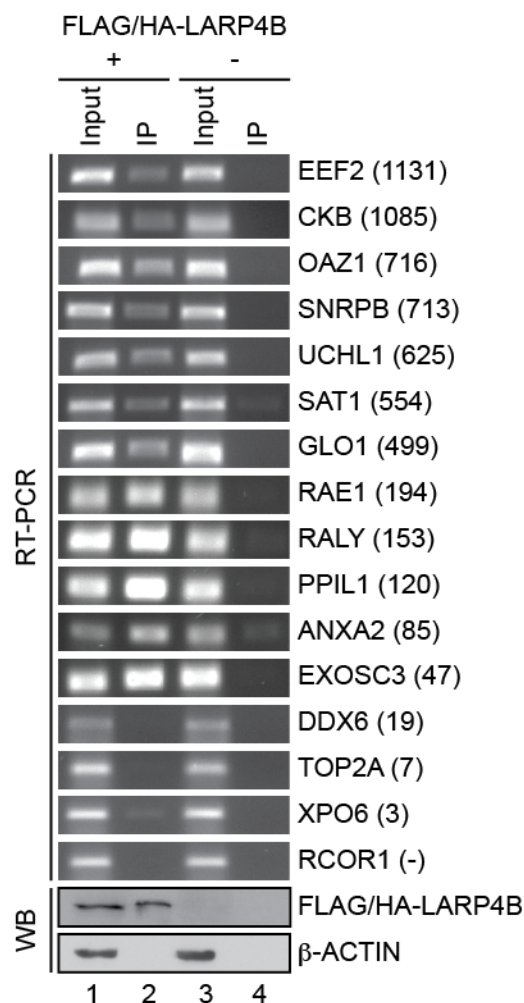


Abbildung 8: Validierung der PAR-CLIP-Daten durch RIP-PCR.

FLAG/HA-LARP4B wurde aus Zellextrakt stabiler Flp-In T-REx 293 LARP4B-Zellen immunpräzipitiert (Spur 2). Zellextrakt von Flp-In T-REx Zellen diente zur Kontrolle (Spur 4). Kopräzipitierte RNA wurde revers transkribiert, die cDNA der angegebenen Gene mittel PCR amplifiziert und in einem Agarosegel durch Ethidiumbromidfärbung in UV-Licht sichtbar gemacht. Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der identifizierten T:C Konversionen an. WB: Western-Blot

Zur Kontrolle der Spezifität wurde Zellextrakt von Flp-In T-REx Zellen verwendet, die kein LARP4B überexprimieren. Die Kopräzipitation von LARP4B mit Ziel-mRNAs, die eine hohe Anzahl an T:C Konversionen aufzeigten, konnte auf diese Weise bestätigt werden (Abbildung 8 Spur 2). Im Gegensatz dazu konnten mRNAs, die wenige T:C Konversionen aufwiesen oder nicht durch das PAR-CLIP-Experiment identifiziert wurden, nicht in der LARP4B Immunpräzipitation nachgewiesen werden (Abbildung 8 Spur 2).

Die durchgeführte Analyse bestätigt daher zum einen die aus dem PAR-CLIP-Experiment erhaltenen Ergebnisse und beweist darüber hinaus die Interaktion von LARP4B mit einem spezifischen Set an mRNAs.

Die Verwendung einer stabilen LARP4B-Zelllinie birgt die Gefahr von Überexpressionsartefakten. Dies sollte durch eine Immunpräzipitation von

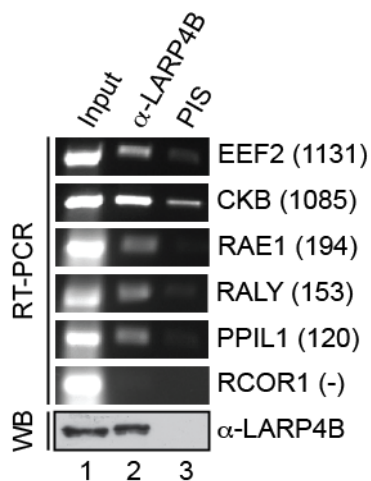


Abbildung 9 RIP-PCR des endogenen LARP4Bs.

Aus HEK293-Zellextrakt wurde LARP4B immunpräzipitiert (Spur 2) und kopräzitierte RNA durch RT-PCR analysiert. Zur Kontrolle der Spezifität wurde eine Immunpräzipitation mit Präimmenserum durchgeführt (Spur 3). Die Zahl in Klammern gibt die Anzahl der T:C Konversionen der mRNAs im PAR-CLIP-Experiment an. WB: Western-Blot

endogenem LARP4B aus HEK293-Zellextrakt ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle der Spezifität wurde eine Immunpräzipitation mit Präimmenserum durchgeführt. Eine RT-PCR identifizierte dabei kopräzitierte RNA (Abbildung 9). Auch hier konnte eine Interaktion von LARP4B mit mRNAs, die durch das PAR-CLIP-Experiment als Zielgene bereits vorlagen, nachgewiesen werden. Zur Kontrolle wurde die kopräzitierte RNA auf die Bindung zur RCOR1 mRNA untersucht. Diese war in keinem der vorangegangenen Experimente als LARP4B bindend identifiziert worden. Es ließ sich auch hier keine Assoziation von LARP4B mit der Kontroll-mRNA finden, was die Spezifität der Bindung von LARP4B an die Ziel-mRNAs bestätigt. Auch die RIP-PCR des endogenen LARP4B verifiziert somit die Ergebnisse der PAR-CLIP-Analyse und zeigt die Wechselwirkung von LARP4B mit spezifischen mRNAs.

2.3 LARP4B bindet bevorzugt 3'-untranslatierte Regionen

Die Lage der LARP4B Bindestellen auf der mRNA kann Aufschluss über einen möglichen Funktionsmechanismus von LARP4B liefern. Daher wurden die PAR-CLIP-Daten hinsichtlich der Position der LARP4B Bindestellen auf den mRNAs untersucht. Betrachtet man dabei die Verteilung der *Cluster* wird deutlich, dass LARP4B, in Übereinstimmung mit der zytoplasmatischen Lokalisation, hauptsächlich an exonische Bereiche bindet (Abbildung 10A). LARP4B zeigt dabei eine bevorzugte Interaktion mit 3'-untranslatierten Regionen (Abbildung 10A). Auch die kodierende Sequenz (*coding sequence*, CDS) wird von LARP4B gebunden (Abbildung 10A).

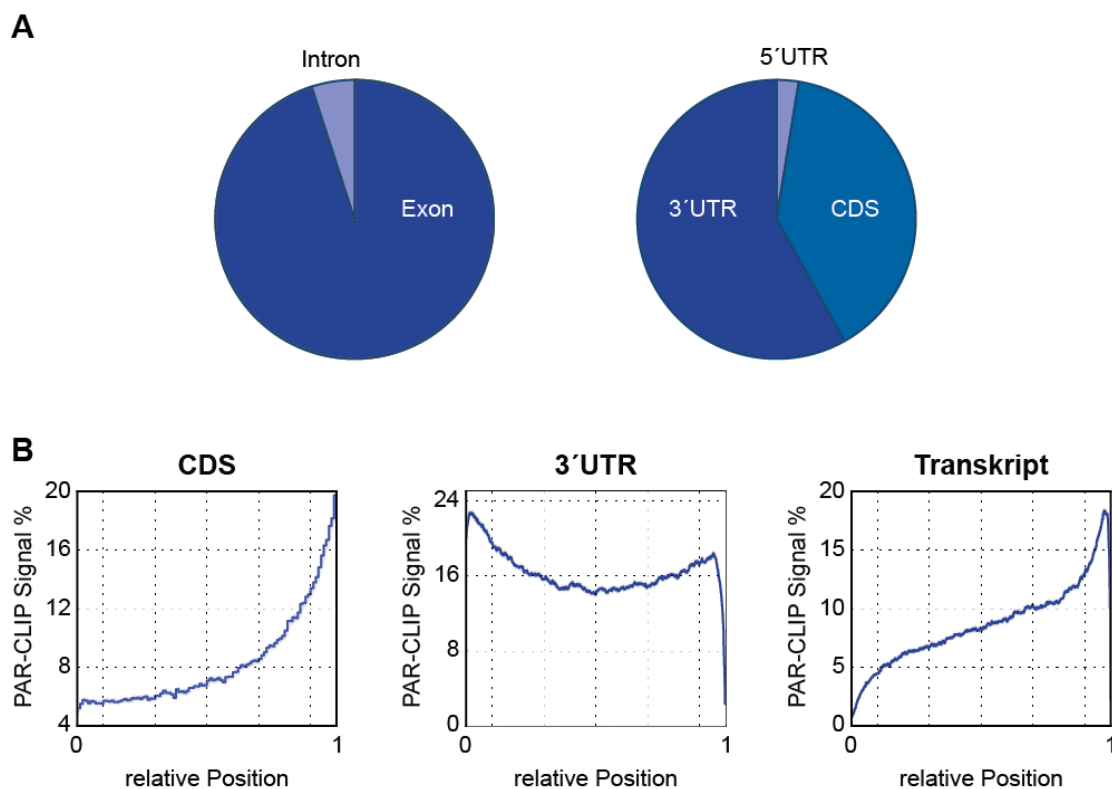


Abbildung 10: Verteilung der LARP4B-Bindecluster auf der mRNA.

(A) LARP4B interagiert überwiegend mit exonischen mRNA-Bereichen. Darüber hinaus besitzt es eine Präferenz für kodierende Sequenzen (CDS) und 3'-untranslatierte Regionen (3'-UTR). (B) Die Analyse der LARP4B Bindestellen innerhalb der kodierenden Sequenz zeigt eine starke Zunahme der LARP4B Bindung zum 3'-Ende der CDS. Dagegen sind die LARP4B-Bindestellen gleichmäßig über die 3'-UTR verteilt. LARP4B bindet daher bevorzugt am 3'-Ende der mRNA.

Eine genauere Analyse der LARP4B-Bindestellen innerhalb der kodierenden Sequenz zeigt jedoch eine starke Zunahme der LARP4B Wechselwirkungen zum 3'-Ende der kodierenden Sequenz hin, also in Richtung der 3'-UTR (Abbildung 10B). Im Gegensatz dazu sind die LARP4B-Bindestellen nahezu gleichmäßig über die 3'-UTR verteilt (Abbildung 10B). Dies resultiert in einer verstärkten Bindung von LARP4B in Richtung des 3'-Endes der mRNA (Abbildung 10B).

2.4 LARP4B interagiert mit AU-reichen Sequenzen

RNA-bindende Proteine erkennen häufig spezifische RNA-Sequenzen und können auf diese Weise sequenzabhängig mit der RNA wechselwirken. Andererseits kann die Bindung an RNA auch sequenzunabhängig durch eine kontextspezifische Rekrutierung erfolgen. Ein Beispiel dafür ist der EJC, der abhängig vom Spleißvorgang an die RNA rekrutiert wird und diese daraufhin sequenzunabhängig bindet (24). Die zuvor gezeigte direkte Bindung von LARP4B an mRNA wirft daher die Frage auf, ob LARP4B sequenzspezifisch oder sequenzunspezifisch mit der RNA interagiert. Eine RNA-Bindemotivsuche sollte darüber Aufschluss geben.

Für die Bindemotivsuche wurden die besten 1000 LARP4B-Binde*cluster* in der 3'-UTR verwendet. Die dabei identifizierten T:C Konversionen ermöglichten die Bestimmung der LARP4B-Quervernetzungsstellen innerhalb dieser *Cluster*. Die Bindemotivsuche erfolgte in Fenstern von 41 Nukleotiden um diese Quervernetzungsstellen, wobei die Häufigkeit aller 7mer-Sequenzen in diesen Fenstern erfasst wurde. In Tabelle 2 sind die 20 am häufigsten auftretenden 7mer-Sequenzen aufgeführt. Dabei handelt es sich überwiegend um AU-reiche Sequenzen. Die Bindemotivsuche ergab somit eine Präferenz von LARP4B für diese Sequenzen.

Tabelle 2: LARP4B Bindemotivsuche.

Sequenz	Abundanz
UAAUAAA	0.1058824
CAAUAAA	0.1058824
AAAUAAA	0.1029412
UUUUUUU	0.0970588
AAUAAAA	0.0941176
AAUAAAU	0.0882353
AAUAAAC	0.0852941
AAUAAAG	0.0823529
GGGCUGG	0.0764706
UUAAUAA	0.0705882
UUUUUAU	0.0676471
GGUGGGG	0.0647059
GGCUGGG	0.0647059
UUUUAAU	0.0588235
UUUUAAU	0.0588235
UUUAUUU	0.0588235
UUAUUUU	0.0588235
AUAAUA	0.0588235
UGGGGGA	0.0558824
UUUUUAA	0.0529412

Diese Präferenz sollte nun durch *in vitro* Bindungsstudien mit rekombinant exprimiertem LARP4B experimentell validiert werden. Hierfür wurde eine RNA-Sequenz aus der CKB mRNA, einer LARP4B Ziel-mRNA, verwendet. Diese Sequenz befindet sich in einem LARP4B-Bindecluster in der 3'-UTR dieser mRNA. Die radioaktiv markierte Sonde wurde mit steigenden Mengen an LARP4B inkubiert und über eine native RNA-Gelelektrophorese aufgetrennt. Wie durch Autoradiografie ersichtlich, interagiert LARP4B dabei mit der CKB RNA (Abbildung 11A). Die Quantifizierung dieser Interaktion ergab eine Dissoziationskonstante von etwa 200 nM (Abbildung 11B). Zur Kontrolle der Bindungsspezifität wurde eine RNA-Sequenz aus der 3'-UTR der TOP3B mRNA, die keine Ziel-mRNA darstellt, verwendet. Im Gegensatz zur CKB RNA wurde die TOP3B RNA kaum von LARP4B gebunden (Abbildung 11C).

Die CKB RNA besitzt eine AU-reiche Sequenz, die gemäß der LARP4B Bindemotivsuche bevorzugt von LARP4B gebunden wird. Daher sollte der Einfluss

dieser AU-reichen Region auf das LARP4B-Bindevverhalten untersucht werden. Hierzu wurde eine Deletionsmutante, der diese AU-reiche Region fehlt, für Bindungsstudien verwendet (CKB del). Es zeigte sich eindeutig, dass diese RNA nicht mehr von LARP4B gebunden werden kann, was die Notwendigkeit AU-reicher Regionen für die LARP4B Bindung beweist (Abbildung 11D).

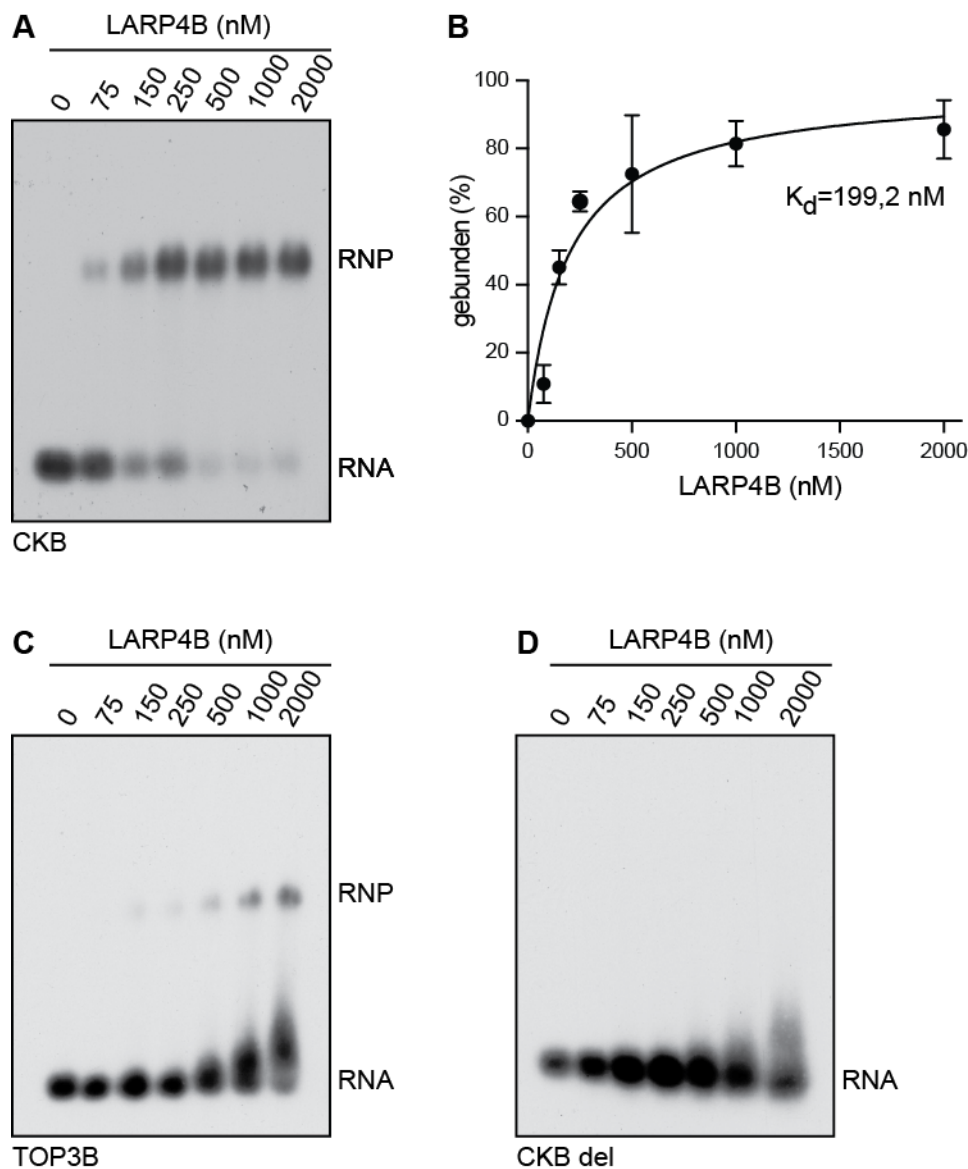


Abbildung 11: LARP4B *in vitro* Bindungsstudien.

(A) Autoradiografie einer nativen RNA-Gelelektrophorese mit radioaktiv markierter CKB RNA nach Inkubation mit steigenden Mengen rekombinantem LARP4B. (B) Bestimmung der Dissoziationskonstanten für die Bindung von LARP4B an die CKB RNA. (C) EMSA (*Elektromobility Shift Assay*) von LARP4B mit TOP3B RNA, einer Kontroll-RNA. (D) EMSA von LARP4B mit einer CKB Deletionsmutanten, der die AU-reiche Sequenz fehlt.

Es konnte somit gezeigt werden, dass LARP4B spezifisch mit RNA-Zielsequenzen wechselwirkt während es keine Interaktion mit der Kontroll-RNA eingeht. Die bioinformatisch ermittelte Präferenz für AU-reiche Sequenzen konnte zusätzlich experimentell bestätigt werden, was die Sequenzabhängigkeit der Bindung verifiziert.

2.5 LARP4B stabilisiert die gebundenen Ziel-mRNAs

Da LARP4B eine mRNP-Komponente darstellt, sollte im Folgenden der Einfluss von

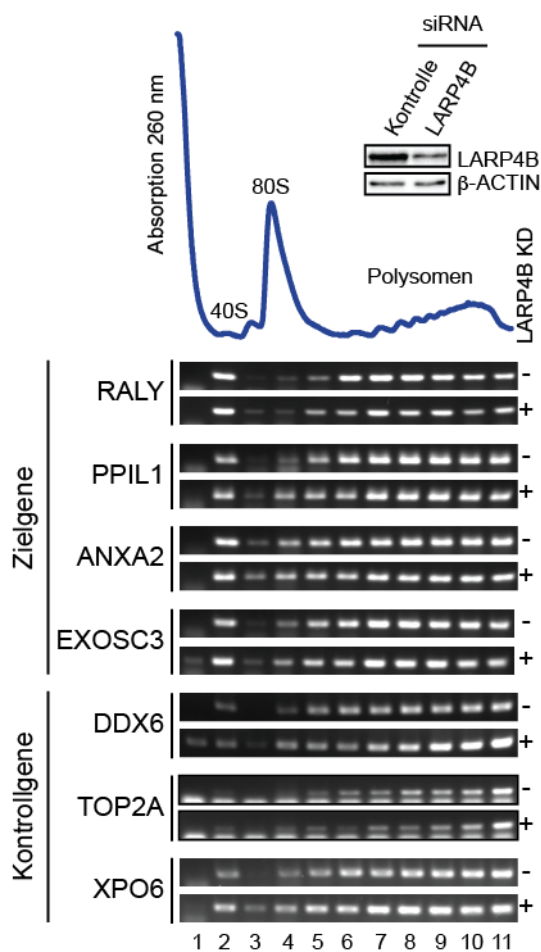


Abbildung 12: mRNA-Polysomenverschiebung.

Zellextrakt von LARP4B-*knockdown*- und Kontrollzellen wurde durch eine Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und RNA der einzelnen Fraktionen extrahiert und revers transkribiert. cDNA der angegebenen Gene wurde amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromid im UV-Licht visualisiert.

LARP4B auf die post-transkriptionelle Genexpression funktionell untersucht werden. Dabei erlaubte die Identifizierung des LARP4B mRNA-Interaktoms die Analyse des Effekts von LARP4B auf diese Ziel-mRNA-Expression. Die zytoplasmatische Lokalisation von LARP4B und die damit verbundene Inkorporation in späte mRNPs legt nahe, dass LARP4B entweder die Translation oder die Stabilität der gebundenen mRNAs beeinflusst (301).

Zunächst sollte daher der Einfluss von LARP4B auf die mRNA-Translation untersucht werden. Dazu wurde eine

Polysomendichtegradientenzentrifugation mit Zellextrakt von LARP4B-*knockdown*- und Kontrollzellen durchgeführt. RNA

der einzelnen Gradientenfraktionen wurde extrahiert, cDNA hergestellt und für die angegebenen Gene amplifiziert (Abbildung 12). Die Verminderung des LARP4B-Proteinlevels führte dabei zu keinem veränderten Sedimentationsverhalten der untersuchten mRNAs. Es konnte somit kein Effekt von LARP4B auf die Assoziation der mRNAs mit der Translationsmaschinerie nachgewiesen werden.

Dieser Befunde legt den Schluss nahe, dass LARP4B die Stabilität der Ziel-mRNAs beeinflusst. Zur Analyse der mRNA-Stabilität wurde daher mRNA aus LARP4B-*knockdown*- und Kontrollzellen isoliert und revers transkribiert. Nach der Adapterligation wurde die erhaltene cDNA im Hochdurchsatz sequenziert. Aus den erhaltenen Daten wurden die Änderungen der mRNA-Level unter LARP4B-

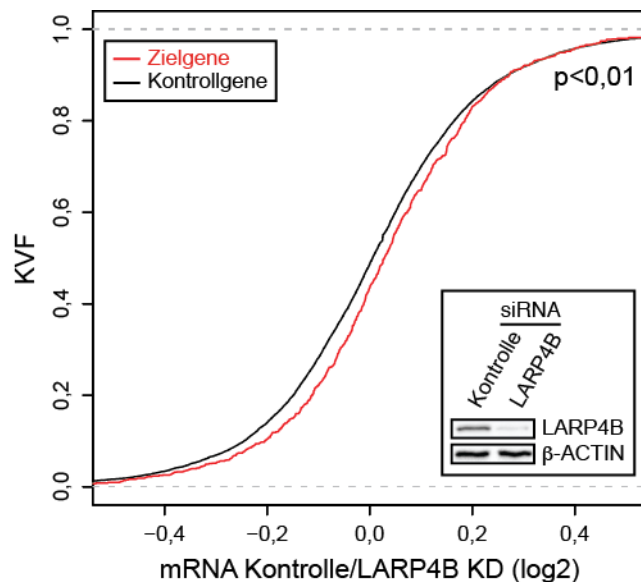


Abbildung 13: Effekt von LARP4B auf das mRNA-Level.

mRNA aus LARP4B-*knockdown*- und Kontrollzellen wurde revers transkribiert und an die erhaltenen cDNA Adapter ligiert. Nach einer Sequenzierung im Hochdurchsatzverfahren wurden die Änderungen der mRNA-Level zwischen den beiden Proben bestimmt. Der Vergleich zwischen den Änderungen der mRNA-Level der 1000 besten LARP4B-Zielgene und den Kontrollgenen zeigt eine signifikante Destabilisierung der Ziel-mRNAs unter LARP4B-*knockdown* Bedingungen. $p < 0,01$ (Wilcoxon-Rangsummentest). KVF: kumulative Verteilungsfunktion.

knockdown Bedingungen errechnet und anschließend die Änderungen der mRNA-Level der 1000 besten LARP4B-Zielgene mit denen der Kontrollgene in einer kumulativen Verteilungsfunktion (KVF) verglichen. Die LARP4B-Zielgene zeigten dabei eine signifikant stärkere Destabilisierung verglichen mit den Kontrollgenen im Falle eines LARP4B *knockdowns* (Abbildung 13). Die Bindung von LARP4B führt somit zur Stabilisierung der jeweils gebundenen mRNA. Um diesen stabilisierenden Effekt von LARP4B näher zu untersuchen, wurde die Änderung des mRNA-Level einzelner mRNAs in Folge eines LARP4B-*knockdowns* analysiert. Dazu wurde nach einer siRNA-vermittelten

Depletion von LARP4B RNA aus *knockdown*- und Kontrollzellen isoliert und revers transkribiert. Die Bestimmung der mRNA-Level erfolgte anschließend durch eine quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) (Abbildung 14). Die LARP4B-Zielgene RAE1, PPIL1 und EXOSC3 zeigten dabei ein um 40 bis 50 % reduziertes mRNA-Level im Falle des LARP4B-*knockdowns*. Im Gegensatz dazu änderte sich das mRNA-Level der Kontrollgene nur unwesentlich. Dies bestätigte erneut einen stabilisierenden Effekt von LARP4B auf die gebundenen mRNAs.

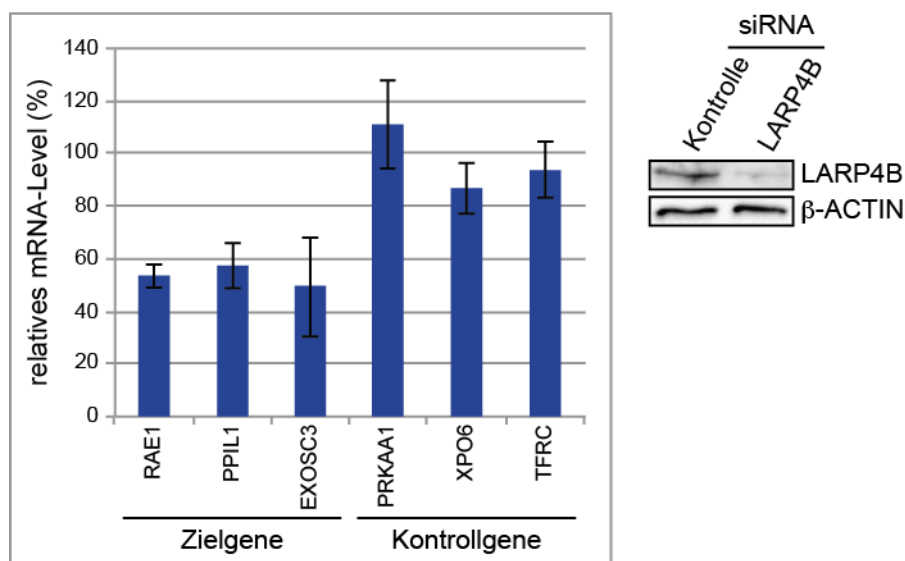


Abbildung 14: Stabilisierung der mRNA durch LARP4B.

LARP4B- und Kontroll-siRNA wurde in Zellen transfiziert aus welchen nach 48 h RNA isoliert wurde. Diese wurde revers transkribiert und zur Analyse der mRNA-Level eine qPCRs für die angegebenen Gene durchgeführt. Die Effizienz des *knockdowns* wurde durch eine Western-Blot Analyse überprüft.

2.6 LARP4B stimuliert die Expression der Ziel-mRNAs

Um zu überprüfen, ob sich die Stabilisierung der von LARP4B gebundenen mRNAs auch in einem veränderten Proteinlevel widerspiegelt, wurde ein pSILAC (*pulsed stable isotope labeling with amino acids in cell culture*)-Experiment durchgeführt. Dafür wurden Zellen in Medium kultiviert, dem aus leichten Isotopen bestehende Aminosäuren zugesetzt wurden. Nach der Transfektion der Kontroll- und LARP4B-siRNA wurden die neusynthetisierten Proteine der Kontrollzellen mit schweren Aminosäuren und die der LARP4B-*knockdown*-Zellen mit mittelschweren

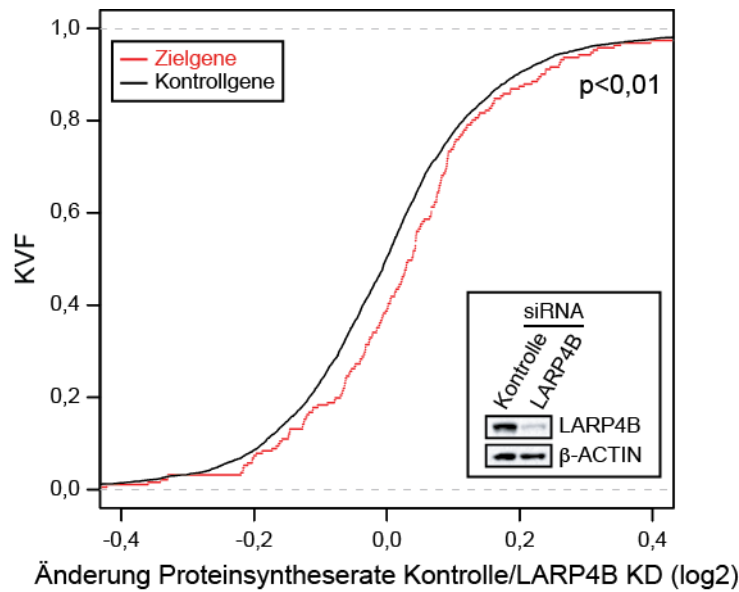


Abbildung 15: LARP4B stimuliert die Expression der Ziel-mRNAs.

Zur Untersuchung des Effekts auf die Proteinsyntheserate nach einem LARP4B-*knockdown* wurde ein pSILAC-Experiment durchgeführt und durch massenspektrometrische Analyse die Änderung der Proteinsyntheserate durch einen LARP4B-*knockdown* bestimmt. In einer kumulativen Verteilungsfunktion (KVF) wurden diese Änderungen der 500 besten LARP4B-Zielgene mit denen der Kontrollgene verglichen. $p < 0,01$ (Wilcoxon-Rangsummentest). KVF: kumulative Verteilungsfunktion, KD: *knockdown*

syntheserate der Zielgene verglichen mit den Kontrollgenen.

In Anbetracht der mRNA-stabilisierenden Wirkung von LARP4B ist der beschriebene Effekt auf die Proteinbiosynthese sehr wahrscheinlich primär auf die Regulation der mRNA-Level und nicht auf eine Regulation der Translationsmaschinerie zurückzuführen.

Aminosäuren markiert. Aus beiden Kulturen wurden Extrakte hergestellt und durch Massenspektrometrie analysiert. Durch das Mengenverhältnis der schweren zu den mittelschweren Proteinen wurde die Veränderung der Proteinsyntheserate durch den LARP4B-*knockdown* bestimmt. Anschließend wurden diese Änderungen der Proteinsyntheserate der 500 besten LARP4B-Zielgene mit den Kontrollgenen in einer kumulativen Verteilungsfunktion verglichen (Abbildung 15). Der LARP4B *knock down* führte hierbei zu einer signifikant verringerten Protein-

2.7 LARP4B, LARP4 und LARP1 interagieren mit einem überlappenden Set an mRNAs

Neben LARP4B stehen auch die LARP-Familienmitglieder La, LARP1, LARP4 und LARP6 im Zusammenhang mit dem mRNA-Metabolismus (285, 291-293, 302, 304). Besonders LARP1 und LARP4 zeigen ähnliche funktionelle und biochemische Eigenschaften wie LARP4B. So handelt es sich bei allen drei Proteinen um zytoplasmatische Faktoren, die mit PABPC1 interagieren und in einer Dichtegradientenzentrifugation mit aktiv translatierenden Ribosomen kosedimentieren (291, 300-302). Es stellt sich somit die Frage, ob diese drei Faktoren synergistische oder redundante Effekte auf einen gemeinsamen Satz an mRNPs ausüben. Um dies zu klären, sollte die von LARP4 und LARP1 gebundenen mRNAs identifiziert und mit den LARP4B mRNA-Bindungspartnern verglichen werden. Hierzu wurde FLAG/HA-LARP4 und FLAG/HA-LARP1 aus Zellextrakt stabiler Zelllinien immunpräzipitiert und kopräzipitierte RNA mittels RT-PCR analysiert (Abbildung 16). LARP4 interagierte dabei mit einer spezifischen Gruppe der untersuchten mRNAs. Bei diesen handelt es sich ausnahmslos um mRNAs, die auch als LARP4B Ziel-mRNAs identifiziert wurden (Abbildung 16 Spur 2 und 6). Transkripte, die keine Assoziation mit LARP4B aufwiesen, wurden hingegen auch nicht von LARP4 gebunden (Abbildung 16 Spur 2 und 6). Die einzige Ausnahme stellt die XPO6 mRNA dar, die von LARP4 schwach, jedoch nicht von LARP4B gebunden wird. Auch LARP1 bindet die von LARP4B kontaktierten mRNAs (Abbildung 16 Spur 2 und 10). Darüber hinaus bindet LARP1 jedoch noch weitere Transkripte, wie die DDX6 und XPO6 mRNA, und zeigt eine schwache Wechselwirkung mit TOP2A und RCOR1 (Abbildung 16 Spur 6). Die mRNP-Komponenten LARP4B, LARP4 und LARP1 binden also an ein überlappendes Set an mRNAs. LARP1 bindet darüber hinaus weitere mRNAs und scheint somit ein breiteres Spektrum an mRNA-Interaktoren zu besitzen. Dagegen werden mRNAs, die nicht mit LARP4B interagieren, größtenteils auch nicht von LARP4 gebunden.

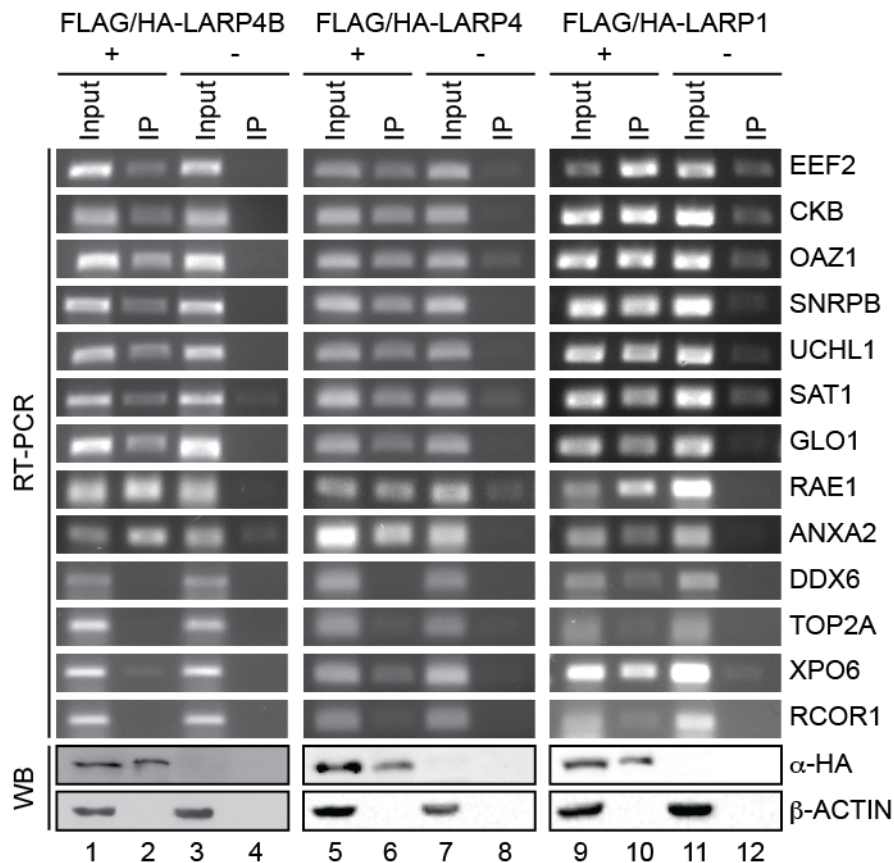


Abbildung 16: Vergleich der RIP-PCRs von LARP4B, LARP4 und LARP1.

FLAG/HA-LARP4B, -LARP4 und -LARP1 wurde aus Zellextrakt stabiler Zelllinien immunpräzipitiert (Spur 2, 6 und 10). Zur Kontrolle wurde Zellextrakt von Flp-In T-REx Zellen verwendet (Spur 4, 8 und 12). Kopräzipitierte RNA wurde isoliert und revers transkribiert. cDNA der angegebenen Gene wurde amplifiziert und in einem Agarosegel durch Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht. Die Spuren 1 bis 4 sind identische mit Abbildung 8. WB: Western-Blot

2.8 LARP4B, LARP4 und LARP1 agieren partiell redundant

Die bereits bekannten funktionellen Eigenschaften sowie das überlappende Set an gebundenen mRNAs legen eine mögliche funktionelle Redundanz beziehungsweise Kooperation der Proteine LARP4B, LARP4 und LARP1 nahe. Eine Voraussetzung dafür ist jedoch, dass diese Faktoren im selben Gewebe exprimiert werden. Zur Analyse des Expressionsmusters dieser Faktoren wurde Gesamt-RNA verschiedener Mausgewebe revers transkribiert und die cDNA von LARP4B, LARP4 und LARP1 amplifiziert (Abbildung 17). Die Expression aller drei Proteine konnte in allen analysierten Geweben nachgewiesen werden. Es handelt sich somit um ubiquitäre Faktoren.

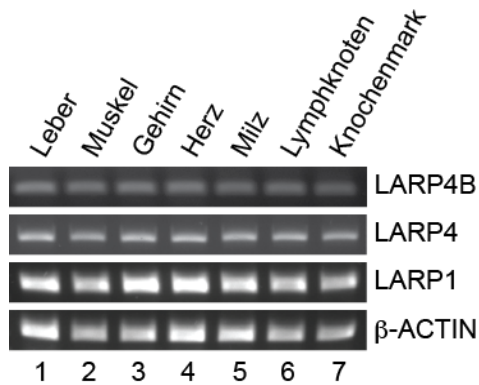


Abbildung 17: Expressionsanalyse von LARP4B, LARP4 und LARP1.

RNA aus verschiedenen Mausgeweben wurde revers transkribiert. LARP4B, LARP4 und LARP1 cDNA wurde amplifiziert, im Agarosegel aufgetrennt und durch Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht sichtbar gemacht.

Da LARP4B, LARP4 und LARP1 in allen untersuchten Geweben koexprimiert vorliegen, sollte als nächstes geklärt werden, ob der Verlust einer dieser Faktoren durch die jeweils anderen kompensiert werden kann. Dazu wurde durch einen *knockdown* das Expressionslevel jeweils eines dieser Proteine vermindert und anschließend das Expressionslevel der anderen Faktoren durch eine Western-Blot Analyse untersucht und quantifiziert (Abbildung 18). Sowohl der *knockdown* von LARP4B als auch von LARP4 führte zu einer signifikant erhöhten Expression der anderen untersuchten LARP-Proteine (Abbildung 18B). Im Falle des LARP1 *knockdowns* wurde ebenfalls eine signifikante Steigerung des LARP4B-Proteinlevels beobachtet (Abbildung 18B).

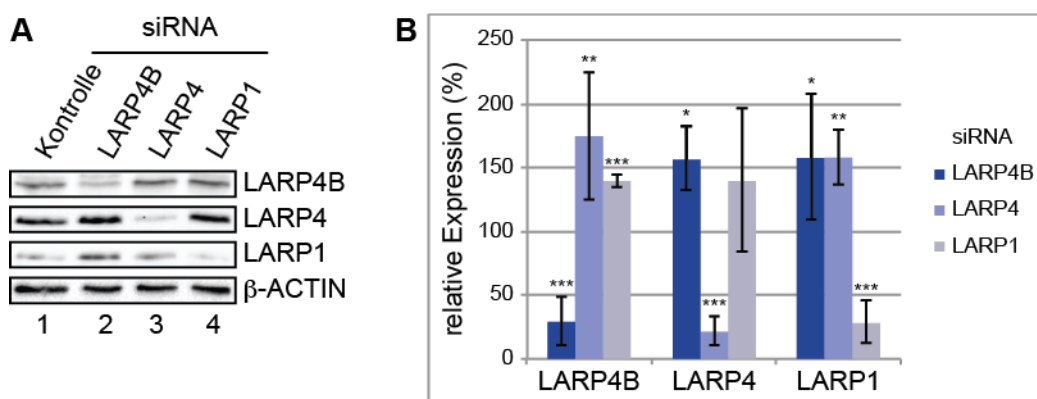


Abbildung 18: Regulation des Expressionslevels von LARP4B, LARP4 und LARP1.

(A) Nach dem *knockdown* von LARP4B, LARP4 oder LARP1 wurde das Expressionslevel dieser LARP-Verwandten Proteine durch einen Western-Blot analysiert. (B) Quantifizierung der Western-Blot Analyse. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ (Student's *t*-Test, gepaart, zweiseitig).

Demnach wird der Verlust jeweils eines der Proteine LARP4B, LARP4 oder LARP1 durch die beiden verbleibenden kompensiert. Dies legt einen funktionellen Zusammenhang dieser Proteine nahe und deutet auf überschneidende oder gar redundante zelluläre Funktionen hin. Daher sollte der Effekt des *knockdowns* der Proteine LARP4B, LARP4 und LARP1 sowie Kombinationen davon auf die Expression eines Luciferase-basierenden Reporters analysiert werden. Dazu wurde durch siRNA-Transfektion die Expression von LARP4B, LARP4 und LARP1 und Kombinationen dieser Proteine vermindert und ein Luciferase-kodierendes Reporterplasmid transient transfiziert. Die Luciferaseaktivität der daraus hergestellten Zellextrakte wurde luminometrisch bestimmt und die relative Luciferaseaktivität verglichen mit der Kontrolle berechnet (Abbildung 19). Der Einzel-*knockdown* von LARP4B, LARP4 und LARP1 führte dabei zu einer 42, 20 beziehungsweise 70 % verringerten Luciferaseaktivität. Durch Kombination des LARP4B- und LARP4-*knockdowns* konnte die Luciferaseaktivität auf 45 % gesenkt werden (55 % Inhibition). Die Kombination des LARP1-*knockdowns* mit einem LARP4B beziehungsweise LARP4-*knockdown* resultierte in verbleibenden 28 beziehungsweise 21 % Luciferaseaktivität (72 beziehungsweise 79 % Inhibition).

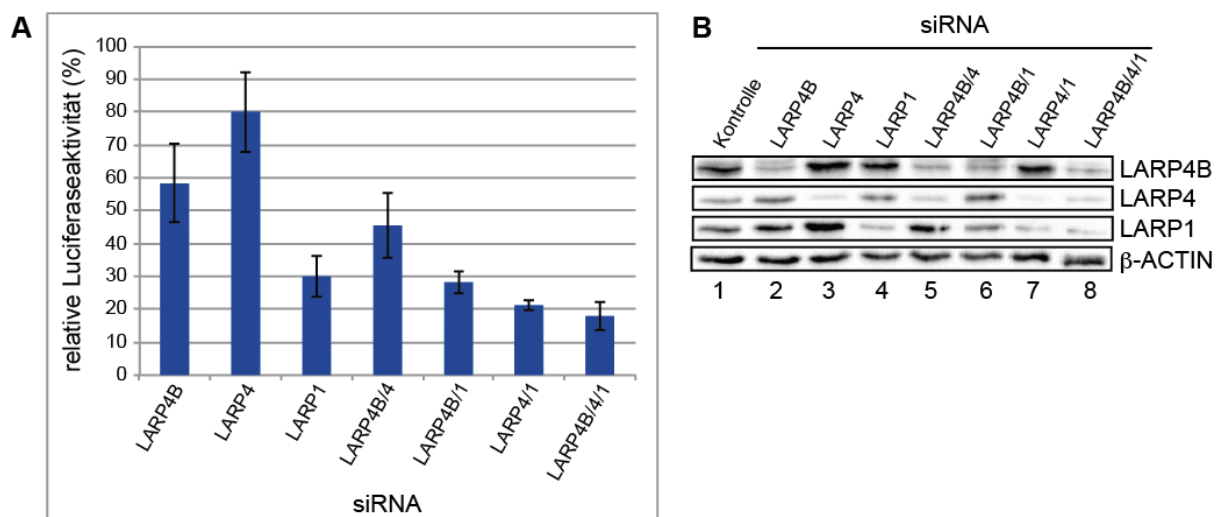


Abbildung 19: Luciferase-basierende Reportergenanalysen.

(A) siRNA gegen die angegebenen LARP-Proteine und eine Kontroll-siRNA wurde in Zellen transfiziert. Nach der Transfektion eines Luciferase-kodierenden Reporterplasmids wurde Zellextrakt hergestellt und die Luciferaseaktivität luminometrisch bestimmt. (B) Western-Blot Analyse zur Kontrolle der *knockdown*-Effizienz.

Den größten Effekt mit einer um über 82 % verminderten Luciferaseaktivität zeigte der gemeinsame *knockdown* aller drei untersuchten LARP-Proteine. Die gemessenen Effekte auf den Luciferase-Reporter sind daher im Fall von LARP4 und LARP1 beziehungsweise LARP4 und LARP4B additiv, während nur subadditive Effekte beim gleichzeitigen *knockdown* von LARP1 und LARP4B gemessen werden konnten.

3 Diskussion

Von ihrer Synthese bis zu ihrem Abbau unterlaufen mRNAs einen komplizierten und mehrstufigen Metabolismus. Dabei liegen sie stets von Proteinfaktoren, nicht-kodierenden RNAs und anderen Metaboliten gebunden als mRNPs vor. Diese Faktoren bestimmen maßgeblich das Schicksal der gebundenen RNA. Besonders in Hinblick auf die Vielzahl an pathologischen Störungen, die von einem veränderten mRNA-Metabolismus hervorgerufen werden, steht die Kenntnis aller mRNP-Faktoren sowie deren Wirkmechanismus im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses. Eine Proteinfamilie, die neueren Studien zufolge eine große Rolle im mRNA-Metabolismus spielt, ist die Familie der La-verwandten Proteine (LARPs). Die Proteine der LARP-Familie besitzen alle eine RNA-bindende Domäne, das La-Modul, was sie zu bona fide RNA-bindenden Faktoren macht (195). Für die Proteine La, LARP6, LARP1, LARP4 und LARP4B wurde bereits eine Beteiligung am mRNA-Metabolismus gezeigt (285, 291-293, 300-302, 304). Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand das LARP4B-Protein, für das in früheren Arbeiten eine Interaktion mit der Translationsmaschinerie, vermutlich über Bindung an die Faktoren PABPC1 und RACK1 gezeigt wurde (300, 301). In Übereinstimmung mit diesen Befunden assoziiert LARP4B mit aktiv translatierenden Ribosomen und übt einen stimulierenden Effekt auf die Proteinexpression aus (301).

Während die Interaktionen von LARP4B mit diversen Proteinfaktoren und der Translationsmaschinerie bereits gut etabliert ist, war über die Identität der gebundenen mRNAs und deren Regulation bislang noch sehr wenig bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurden daher experimentelle Strategien entwickelt und angewandt, welche die mRNA-Bindungspartner von LARP4B identifizieren sollten. Dadurch konnte ein RNA-Bindemotiv bestimmt und ein stabilisierender Effekt von LARP4B auf die gebundenen mRNAs nachgewiesen werden.

3.1 Identifizierung der *in vivo* Ziel-RNAs von LARP4B

Zur Identifizierung von *in vivo* gebundener RNA können verschiedene Varianten der CLIP-Technologie herangezogen werden (305). Sie alle beruhen auf der kovalenten Quervernetzung des zu untersuchenden Proteins mit der RNA. Diese kovalente Quervernetzung ermöglicht eine stringente und denaturierende Reinigung des RNPs. Zusätzlich gibt die Quervernetzung *in cellulo* die *in vivo* Bindungssituation wieder, wodurch *off-target*-Effekte, zum Beispiel in Folge der Zellyse, weitgehend vermieden werden können. CLIP bietet somit zahlreiche Vorzüge verglichen mit herkömmlichen RNA-Immünpräzipitationsmethoden, die auf eine kovalente Verknüpfung von RNA und Protein verzichten (305). Die kovalente Verknüpfung kann dabei einerseits über Uridinbasen durch fernes UV-Licht (245 nm Wellenlänge) erfolgen (HITS-CLIP (*High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation*)) und iCLIP (*individual-nucleotide resolution crosslinking and immunoprecipitation*)) (306, 307). Andererseits ermöglicht die Inkorporation von photoaktivierbaren Nukleotidanaloga wie 4SU oder 6SG in die RNA eine Quervernetzung durch UV-Licht von 356 nm Wellenlänge (PAR-CLIP) (308). Dabei muss jedoch gewährleistet sein, dass diese Nukleotidanaloga effizient von der Zelle aufgenommen und in ausreichender Menge in die RNA eingebaut werden. Zusätzlich ist zu beachten, dass sie in höherer Konzentration eine nukleoläre Stressantwort auslösen und daher zytotoxisch wirken (309). Ob dies mit einem veränderten mRNA-Transkriptom einhergeht ist bislang ungewiss (308, 310). Die Verwendung von photoaktivierbaren Nukleotidanaloga bietet jedoch auch einige Vorteile. So zeichnet sich eine 4SU-vermittelte Quervernetzung häufig durch eine gute Effizienz aus (305, 308). Einen zusätzlichen Vorteil stellen die in den Sequenzierdaten charakteristisch an der Quervernetzungsstelle auftretenden T:C Konversionen dar, mit deren Hilfe die bioinformatische Auswertung erleichtert und verbessert wird (308). So können zum Beispiel die erhaltenen Ziel-RNAs gemäß der Anzahl an identifizierten T:C Konversionen geordnet und die exakte Bindestelle des Proteins auf der RNA identifiziert werden. Außerdem erlauben diese Konversionen die Unterscheidung zwischen spezifisch gebundenen Transkripten und Hintergrund-RNA. Aufgrund dieser Vorzüge wurde zur Identifizierung der LARP4B RNA-Interaktoren ein PAR-CLIP-Experiment unter Verwendung von 4SU durchgeführt. Die anschließende bioinformatische Auswertung identifizierte, in Übereinstimmung

mit einer bereits gezeigten Beteiligung von LARP4B im mRNA-Metabolismus, die von LARP4B gebundenen RNA-Transkripte als mRNA. Das Spektrum der im PAR-CLIP-Experiment gefundenen mRNAs ist mit 7906 Transkripten als sehr breit anzusehen (Tabelle 1). LARP4B ist demnach am Metabolismus einer Vielzahl von mRNAs beteiligt was durch die Interaktion mit den allgemeinen Translationsfaktoren PABPC1 und RACK1 bekräftigt wird (300, 301). Die Validierung der PAR-CLIP-Daten durch RIP-PCR erlaubte jedoch eine Begrenzung auf circa 3000 LARP4B Ziel-mRNAs (Abbildung 8). Durch die kovalente Quervernetzung der RNA mit dem Protein können durch ein PAR-CLIP-Experiment auch kurzlebige RNA-Protein-Interaktionen identifiziert werden. Diese müssen jedoch nicht zwangsläufig die wirkliche Bindungssituation widerspiegeln, da nicht jede Interaktion in einer stabilen Bindung des Proteins an die RNA resultiert. Demgegenüber stellen die durch die RIP-PCR identifizierten Interaktionen hochaffine und daher stabile Interaktionen dar.

3.2 LARP4B interagiert bevorzugt mit AU-reichen Sequenzen in der 3'-UTR

Die Verteilung der LARP4B Bindestellen entlang der mRNA ergab, dass LARP4B bevorzugt mit 3'-UTRs wechselwirkt (Abbildung 10). Zusätzlich konnte eine Präferenz für AU-reiche Sequenzen ermittelt und experimentell bestätigt werden (Tabelle 2 und Abbildung 11). Die bevorzugte Bindung an 3'-UTRs steht im Einklang mit der Interaktion von LARP4B mit PABPC1, welches den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNA bindet (301). Durch diese Wechselwirkung könnte LARP4B an das mRNP rekrutiert werden woraufhin die Wechselwirkung, aufgrund der räumlichen Nähe, bevorzugt mit der 3'-UTR stattfinden würde. Andererseits könnte die Sequenzspezifität der LARP4B-Bindung jedoch auch eine direkte Kontaktierung der RNA erlauben. Bedingt durch eine erhöhte Affinität zu AU-reichen Sequenzen könnte LARP4B dabei diese Regionen in der 3'-UTR unabhängig von Proteininteraktionen binden. Während die für die Bindung benötigten *cis*-Elemente der mRNAs durch die vorliegende Arbeit gut analysiert sind, bleibt die Frage offen, welche Proteinregionen in LARP4B die RNA-Bindung vermitteln. Für das genuine La-Protein konnte gezeigt werden, dass das La-Modul, bestehend aus dem La-Motiv und der angrenzenden RRM, für die Bindung an 3'-UUUOH benötigt wird (196-199).

Da für LARP4B über das La-Modul hinaus keine weiteren Proteindomänen identifiziert wurden, legt das den Schluss nahe, dass auch im Falle von LARP4B das La-Modul für die Bindung an die RNA verantwortlich ist.

La	I	C	H	Q	I	E	Y	Y	F	G	D	F	N	L	P	R	D	K	F	L	K	E	Q	I	-	K	L	D	E	G	W	V	P	L	E	I	M	I	K	F	N	R	L	N	R	L	T	T	D
LARP7	I	A	K	Q	V	D	F	W	F	G	D	A	N	L	H	K	D	R	F	L	R	E	Q	I	E	K	S	R	D	G	Y	V	D	I	S	L	L	V	S	F	N	K	M	K	K	L	T	T	D
LARP6	L	V	D	Q	I	E	F	Y	F	S	D	E	N	L	E	K	D	A	F	L	L	K	H	V	R	R	N	K	L	G	Y	V	S	V	K	L	L	T	S	F	K	K	V	K	H	L	T	R	D
LARP1	I	K	R	Q	I	E	Y	Y	F	S	V	D	N	L	E	R	D	F	F	L	R	R	K	M	--	D	A	D	G	F	L	P	I	T	L	I	A	S	F	H	R	V	Q	A	L	T	T	D	
LARP1B	I	K	R	Q	I	E	Y	Y	F	S	V	E	N	L	E	R	D	F	F	L	R	G	K	M	--	D	E	Q	G	F	L	P	I	S	L	I	A	G	F	Q	R	V	Q	A	L	T	T	N	
LARP4	L	K	K	Q	L	E	F	C	F	S	R	E	N	L	S	K	D	L	Y	L	I	S	Q	M	--	D	S	D	Q	F	I	P	I	W	T	V	A	N	M	E	E	I	K	K	L	T	T	D	
LARP4B	L	K	K	T	L	E	F	C	L	S	R	E	N	L	A	S	D	M	Y	L	I	S	Q	M	--	D	S	D	Q	Y	V	P	I	T	T	V	A	N	L	D	H	I	K	K	L	S	T	D	

Abbildung 20: Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen La-Motive.

Die Aminosäuresequenzen der La-Motive der humanen LARP-Proteine sind dargestellt. Aminosäuren, die für die Bindung von La an 3'-UUUOH benötigt werden, sind hervorgehoben. Aminosäuren, die davon eine Homologie zum La-Protein zeigen, sind gelb dargestellt.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von La und LARP4B zeigt jedoch, dass die für die Bindung an 3'-UUUOH benötigten Aminosäuren bei LARP4B teilweise nicht konserviert sind (Abbildung 20) (270). Zusätzlich besitzt LARP4B lediglich eine RRM-ähnliche Domäne anstelle einer RRM (195). Weitere Bindungsstudien könnten daher klären, ob das La-Modul von LARP4B für die Bindung an RNA nötig und ausreichend ist.

3.3 LARP4B stimuliert die Expression der Ziel-mRNAs durch Stabilisierung des gebundenen Transkripts

Die Identifizierung der gebundenen mRNAs erlaubte die Analyse des Einflusses von LARP4B auf die Expression dieser mRNPs. Als zytoplasmatische mRNP-Komponente ist dabei denkbar, dass LARP4B entweder die Translation oder die Stabilität der gebundenen mRNAs beeinflusst (301). Da durch die reduzierte Expression von LARP4B durch *knockdown*-Experimente keine Veränderung in der Assoziation der untersuchten mRNAs mit der Translationsmaschinerie beobachtet werden konnte, war ein direkter Effekt von LARP4B auf die Translation der gebundenen mRNAs unwahrscheinlich (Abbildung 12). Dieser Befund legte andererseits nahe, dass LARP4B die mRNA Stabilität beeinflusst. Eine

transkriptomweite Analyse zeigte in der Tat eine signifikante Verringerung der mRNA-Menge der LARP4B-Zielgene verglichen mit der Kontrollgruppe im Falle eines LARP4B-*knockdowns* (Abbildung 13). Eine quantitative Echtzeit-PCR ausgewählter mRNAs bestätigte zusätzlich, dass eine siRNA-vermittelte reduzierte Expression von LARP4B zu einem um etwa 50 % reduzierten mRNA-Level der untersuchten Zielgene führt (Abbildung 14). Dabei ist anzunehmen, dass die Änderung der mRNA-Level durch einen stabilisierenden Effekt von LARP4B auf die gebundenen mRNAs verursacht wird, da die zytoplasmatische Lokalisation von LARP4B ein Effekt auf die mRNA Transkription unwahrscheinlich erscheinen lässt. Auch auf Proteinebene konnte gezeigt werden, dass LARP4B einen stimulierenden Effekt auf die Expression der Ziel-mRNAs ausübt (Abbildung 15). Angesichts der Änderung der mRNA-Level im Falle eines LARP4B-*knockdowns* ist dieser Effekt von LARP4B höchstwahrscheinlich auf die Stabilisierung der mRNA und weniger auf eine vermehrte Translation zurückzuführen (Abbildung 21).

Die Identifizierung von LARP4B als positiven Faktor der posttranskriptionellen Genexpression deckt sich mit den Erkenntnissen einer früheren Veröffentlichung (301). Durch Luciferase-basierende Reporterexperimente sowie metabolische Markierungsstudien wurde LARP4B als positiver Translationsregulator beschrieben. Hierbei konnte kein Effekt von LARP4B auf das mRNA-Level des Reporters beobachtet werden, weshalb ein translationeller Effekt von LARP4B auf die mRNA-Expression postuliert wurde (301). Es wurde jedoch nicht untersucht, ob die Reporter-mRNA direkt von LARP4B gebunden werden kann und somit eine LARP4B Ziel-mRNA darstellt. Durch indirekte Effekte auf die Reporterexpression könnte diese Diskrepanz möglicherweise erklärt werden.

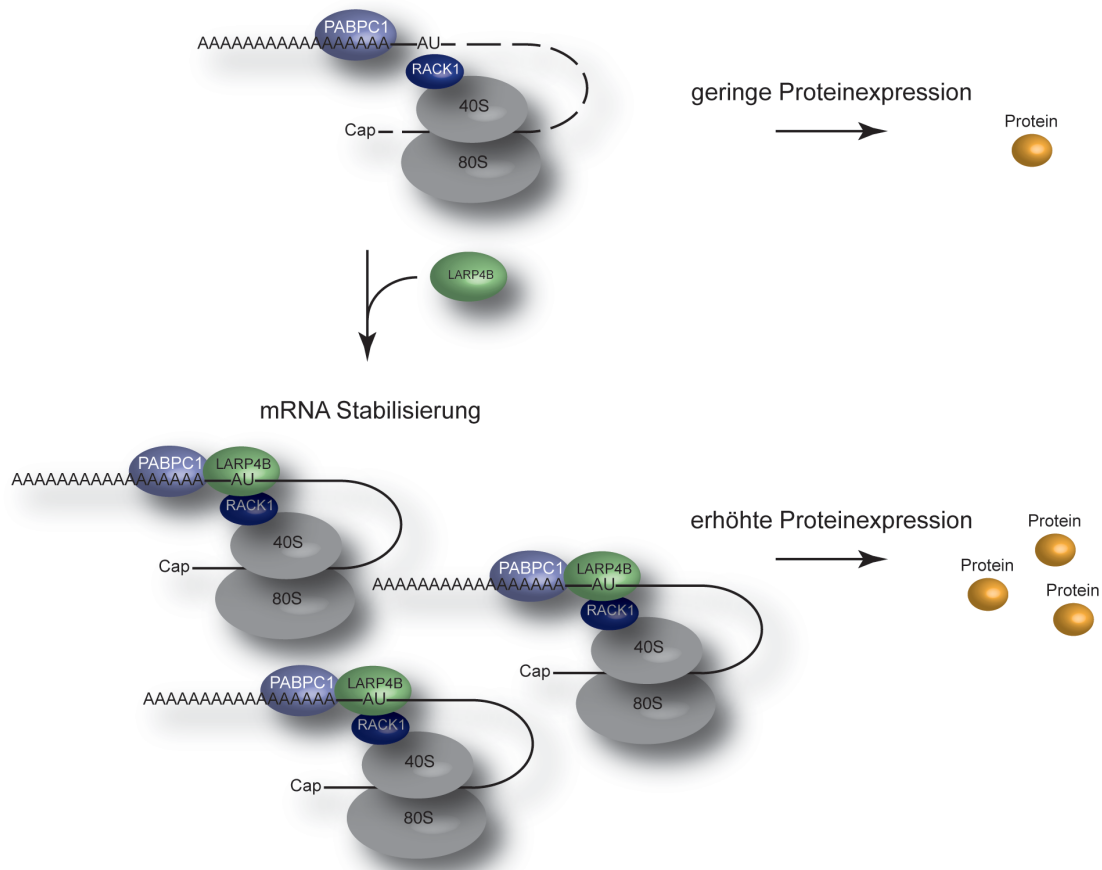


Abbildung 21: Regulation der posttranskriptionellen Genexpression durch LARP4B.

Die Bindung von LARP4B an AU-reiche Sequenzen in den 3'-UTRs von mRNAs führt zu einer erhöhten Stabilität und damit zu einem erhöhten mRNA-Level. Dies resultiert wiederum in einer vermehrten Proteinexpression.

3.4 Der Beitrag von LARP4B zum mRNP-Code: eine Hypothese

Die in dieser Arbeit gewonnenen Daten belegen einen stimulatorischen Effekt von LARP4B auf die Expression der gebundenen mRNAs, der durch die Stabilisierung des gebundenen Transkripts zustande kommt. Dieser stabilisierende Effekt könnte durch verschiedene Mechanismen zu erklären sein. Zum einen könnte die Bindung von LARP4B an die 3'-UTR der mRNA zu einer verstärkten Interaktion von LARP4B mit PABPC1 führen. Durch die Bindung an den Poly(A)-Schwanz der mRNA dient PABPC1 als Adaptor für zahlreiche Proteine, die sowohl die Translation als auch die Stabilität der mRNA beeinflussen (311). Darunter befinden sich unter anderem der eukaryotische Translationsinitiationsfaktor 4G (eIF4G), PAN3 (*PAN3 poly(A) specific*

ribonuclease subunit), PAIP1 (*poly(A) binding protein interacting protein 1*) und PAIP2 (*poly(A) binding protein interacting protein 2*) oder auch TNRC6A (*trinucleotide repeat containing 6A*) (312-316). Diese Faktoren können die mRNA-Expression sowohl stimulieren als auch reprimieren. Die Konkurrenz dieser Faktoren um die Bindung an PABPC1 beeinflusst dabei die Expressionseffizienz der mRNA. (312, 314, 317, 318). Über ähnliche Mechanismen könnte sich auch die Funktion von LARP4B erklären lassen. Besonders die Verdrängung destabilisierender Faktoren, wie zum Beispiel TNRC6A oder Deadenylierungsfaktoren wie den PAN2/PAN3-Komplex, könnte zur Stabilisierung der mRNA beitragen.

Die Interaktion von LARP4B mit AU-reichen Sequenzen in den 3'-UTRs der gebundenen mRNAs legt eine Beteiligung von LARP4B im Metabolismus AU-reicher Elemente (ARE)-beinhaltender mRNAs nahe. AREs sind 50 bis 150 Nukleotide lange Bereiche in den 3'-UTRs von mRNAs, die unter anderem für Transkriptionsfaktoren oder Cytokine kodieren (319, 320). Durch die Bindung verschiedener Faktoren, wie TTP (*tristetraprolin*), AUF1 oder HuR, beeinflussen ARE maßgeblich die Stabilität der mRNA (20, 22, 96, 175, 321). Die Mehrzahl der bindenden Faktoren wie TTP oder AUF1 führen dabei zu einer Destabilisierung des Transkripts da sie durch die Rekrutierung verschiedener Komponenten der Degradationsmaschinerie, wie des Exosoms, des Decappingkomplexes, Deadenylasen oder XRN1 (5'-3' Exoribonuklease 1), den Abbau ARE-beinhaltender mRNAs begünstigen (22, 96, 321). Im Gegensatz dazu kann die Stabilität der mRNA jedoch auch durch die Bindung von AREs erhöht werden. Der am besten charakterisierte stabilisierende Faktor ist dabei das HuR Protein (23, 183, 322, 323). HuR kompetiert mit destabilisierenden Faktoren um die Bindung an AREs und führt vermutlich durch deren Verdrängung zur Stabilisierung der mRNA. Das Gleichgewicht zwischen destabilisierenden und stabilisierenden Faktoren bestimmt somit die Stabilität von ARE-beinhaltenden mRNAs (23, 324-326). Durch die Bindung von LARP4B an AU-reiche Sequenzen innerhalb eines ARE könnten, ähnlich dem für HuR beschriebenen Mechanismus, destabilisierende Faktoren wie zum Beispiel AUF1 oder TTP von der mRNA verdrängt werden, wodurch die Degradationsmaschinerie nicht mehr an die mRNA rekrutiert werden kann und somit die mRNA stabilisiert wird. Schätzungen zufolge werden AREs, über die bekannten ARE-beinhaltenden mRNAs wie TNF (*tumor necrosis factor*) oder VEGFA (*vascular endothelial growth factor A*) hinaus, in mehreren tausend mRNAs gefunden, was zu

der großen Anzahl an identifizierten LARP4B Ziel-mRNAs passen könnte (327). Darüber hinaus ist denkbar, dass LARP4B auch AU-reiche Sequenzen, die nicht Teil eines AREs darstellen, bindet und so die Expression eines breiteren Spektrums an mRNAs beeinflusst. Ähnlich wurde für HuR einer neueren Studie zufolge eine funktionelle Bindung an mehr als 4800 Ziel-mRNAs beschrieben und daher eine Rolle, die über eine Beteiligung von HuR an ARE-vermitteltem mRNA-Abbau hinausgeht, diskutiert (328).

3.5 LARP4B, LARP4 und LARP1: gleiche mRNA-Interaktoren, aber unterschiedliche Funktionen?

Für die Proteine LARP4B, LARP4 und LARP1 wurden ähnliche biochemischen und funktionellen Eigenschaften gefunden. So handelt es sich bei diesen drei Faktoren um zytoplasmatische Proteine, die unter zellulären Stressbedingungen in Stressgranula translozieren. Außerdem interagieren sie mit PABPC1, kosedimentieren mit Polysomen und haben mRNA-stabilisierende Wirkung (291-293, 300-302). Diese drei La-verwandten Proteine könnten somit überlappende oder gar redundante Funktionen im mRNA-Metabolismus besitzen. Daher wurden die von diesen drei Faktoren gebundenen mRNAs durch eine RIP-PCR näher untersucht. Diese Analyse ergab, dass LARP4B, LARP4 und LARP1 ein gemeinsames Set an Ziel-mRNAs besitzen (Abbildung 16). Darüber hinaus sind auch die von LARP4B und LARP4 nicht gebundenen mRNAs weitgehend identisch. LARP1 unterscheidet sich diesbezüglich von den beiden LARP-Orthologen, da dieses Protein über das gemeinsame Set hinaus noch mit weiteren mRNAs interagiert. Dass auch LARP4 mit einem breiten Spektrum an mRNAs interagiert ist in Übereinstimmung mit einer Studie, deren zufolge 2000 mRNAs von LARP4 gebunden werden (302). Zwar wurden für LARP1 noch keine transkriptomweiten RNA-Bindungsstudien durchgeführt, doch ein publizierter globaler Effekt auf die Translation lässt auch hier auf ein breites Spektrum an mRNA-Bindungspartnern schließen (291, 292). Auch die Bindung von LARP1 an den Poly(A)-Schwanz von mRNAs deutet auf eine allgemeine Rolle im mRNP Metabolismus hin (293).

Mit der Bindung an das gleiche Set an mRNAs ist somit eine Voraussetzung für eine funktionelle Redundanz von LARP4B, LARP4 und LARP1 gegeben. Auch die

gefundene Koexpression dieser drei Faktoren in verschiedenen Mäusegeweben würde eine redundante Funktion ermöglichen (Abbildung 17).

Ein Luciferase-basierendes Reporterexperiment lässt jedoch kombinatorische beziehungsweise redundante Funktionen von LARP4B, LARP4 und LARP1 eher unwahrscheinlich erscheinen (Abbildung 19). Durch den gleichzeitigen *knockdown* zweier dieser Faktoren konnten lediglich moderat verstärkte Effekte gegenüber den Einzel-*knockdowns* beobachtet werden. Der *knockdown* aller drei Faktoren zeigte mit über 80 % reduzierter Luciferaseaktivität den größten Effekt, was jedoch auch hier nur eine minimale Steigerung verglichen mit den Doppel-*knockdowns* bedeutete. Eine funktionelle Redundanz von LARP4B, LARP4 und LARP1 ist daher fraglich. Nicht auszuschließen ist jedoch ein synergistischer Effekt dieser Faktoren, da zum Beispiel LARP4B und LARP1 als Bestandteile von denselben mRNPs identifiziert wurden (Dissertation K. Schäffler). Darüber hinaus sind auch spezifische Funktionen von LARP4B, LARP4 und LARP1 im mRNA-Metabolismus durchaus denkbar. Weitere funktionelle Studien sollten daher zur Klärung beitragen.

3.6 Ausblick

In dieser Arbeit wurde erstmals die direkte Bindung von LARP4B an RNA sowohl *in vivo* als auch *in vitro* gezeigt und die LARP4B Ziel-mRNAs identifiziert. Diese Bindung könnte durch das La-Modul, einer bekannten RNA-Bindungsdomäne, vermittelt werden (196-199). Jedoch sind einige Aminosäuren des La-Motivs, die für die Bindung des genuinen La-Proteins an 3'-UUUOH benötigt werden, bei LARP4B nicht konserviert (270). Zusätzlich besitzt LARP4B lediglich einer RRM-ähnlichen Domäne anstelle einer RRM (195). Diese Befunde lassen einen atypischen Bindungsmechanismus von LARP4B an RNA vermuten. Dabei ist denkbar, dass Proteinregionen über das La-Modul hinaus an der Interaktion von LARP4B mit RNA beteiligt sein könnten. Strukturanalysen könnten hierbei zur Klärung beitragen. Dafür wurden durch die Identifizierung der Ziel-mRNAs sowie der darin benötigten *cis*-Elemente wichtige Voraussetzungen geschaffen.

LARP4B stellt zweifelsfrei einen positiven Faktor der Genexpression dar. Der Proteinbedarf einer Zelle muss jedoch verschiedenen Wachstumsbedingungen angepasst werden. Um dies zu erreichen könnte auch die Regulation der LARP4B-Funktion von entscheidender Bedeutung sein und sollte daher näher untersucht werden. Dies kann zum Beispiel durch ein verändertes Expressionslevel oder veränderte posttranslationelle Modifikationen wie Phosphorylierungen erreicht werden. In Hinblick einer möglichen funktionellen Überschneidung der Proteine LARP4B, LARP4 und LARP1 sollte dabei auch die Regulation der Aktivität dieser Proteine ins Auge gefasst werden.

Die Vielzahl der identifizierten Ziel-mRNAs sowie ein funktioneller Effekt auf die Expression eines breiten Spektrums dieser mRNAs legt den Schluss nahe, dass LARP4B einen allgemeinen Faktor der posttranskriptionellen Genexpression darstellt. Es ist jedoch nicht gänzlich auszuschließen, dass die Breite des Effekts nicht zum Teil auf Sekundäreffekte zurückzuführen ist. Weitere funktionelle Studien sollten daher einen globalen Effekt von LARP4B auf die Genexpression weitergehend analysieren.

4 Material & Methoden

4.1 Materialien

Verwendete Chemikalien wurden von BD Biosciences, Merck, Serva, Sigma-Aldrich, Boehringer Ingelheim, Riedel-de Haen und Roth bezogen. Radiochemikalien stammen von Hartmann Analytic. Verbrauchsmaterialien wurden von Hartenstein, Macherey-Nagel, Eppendorf, Sarstedt, Satorius stedim, Dispomed und Greiner bezogen.

4.1.1 Längenstandards

GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

4.1.2 Allgemeine Puffer

10x PBS	2x RNA-Probenpuffer
1,4 M NaCl	8 M Harnstoff
27 mM KCl	10 mM EDTA
100 mM Na ₂ HPO ₄	0,04 % (w/v) Bromphenolblau
18 mM KH ₂ PO ₄	0,04 % (w/v) Xylencyanol
6x Proteinprobenpuffer	DNA-Probenpuffer
300 mM Tris-HCl, pH 6.8	50 % (v/v) Glycerin
12% (w/v) SDS	5 mM Tris HCl pH 8,0
30% (v/v) Glycerin	0,05 mM EDTA
600 mM DTT	0,04 % (w/v) Bromphenolblau
0.04% (w/v) Bromphenolblau	0,04 % (w/v) Xylencyanol

4.1.3 Proteaseinhibitoren

1 mg/ml Leupeptin/Pepstatin A
100 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
100 mM 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF)
1 mg/ml Aprotinin

4.1.4 Medien

4.1.4.1 Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

LB-Medium

1,0 % (w/v) Bacto™ Tryptone (BD Biosciences)
1.0 % (w/v) NaCl
0,5 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences)

TB-Medium

1,2 % (w/v) Bacto™ Tryptone (BD Biosciences)
2,4 % (w/v) Bacto™ Yeast Extract (BD Biosciences)
0,4 % (v/v) Glycerin
17 mM KH₂PO₄
72 mM K₂HPO₄

Zur Selektion wurde den Medien 100 µg/ml Ampicillin (Roth) bzw. 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol (Sigma-Aldrich) zugegeben.

Durch Zugabe von 2 % (w/v) Bacto™ Agar (BD Biosciences) wurden Festmedien hergestellt.

4.1.4.2 Medien und Zusätze für die Gewebekultur

Kulturmedium und –zusätze wurden, soweit nicht anders angegeben, von Life Technologies bezogen. Antibiotika stammen von InvivoGen, Serva Electrophoresis, Sigma-Aldrich und Life Technologies. Zellkulturutensilien wurden von der Firma Becton Dickinson, Sarstedt, Greiner und TPP bezogen.

Mediumzusammensetzung

Kulturmedien:

HEK293, U2OS:

DMEM

10 % (v/v) FBS

1 % (v/v) Pen Strep

100 µg/ml Zeocin

Flp-In T-REx 293:

DMEM

10 % (v/v) FBS

10 µg/ml Blastocidin

stabile Flp-In T-REx 293-Zelllinien:

DMEM

10 % (v/v) FBS

10 µg/ml Blastocidin

100 µg/ml Hygromycin B

5 µg/ml Puromycin

Flp-In T-REx HeLa C8ORF33:

DMEM

10 % (v/v) FBS

1 % (v/v) Pen/Strep

400 µg/ml Hygromycin B

pSILAC-Medium leicht:

DMEM ohne L-Arginine, L-Glutamine, L-Lysine und Natriumpyrovat

10 % (v/v) dialysiertes FBS

4 mM Glutamin (PAA)

1,74 mM L-Prolin (Sigma-Aldrich)

0,8 mM L-Lysin Monohydrochlorid (Sigma-Aldrich)

0,4 mM L-Arginin Monohydrochlorid (Sigma-Aldrich)

pSILAC-Medium mittelschwer:

DMEM ohne L-Arginine, L-Glutamine, L-Lysine und Natriumpyrovat

10 % (v/v) dialysiertes FBS

4 mM Glutamin (PAA)

1,74 mM L-Prolin (Sigma-Aldrich)

0,8 mM L-Lysin 2HCl (4,4,5,5,-D4 96-98%, Cambridge Isotope Laboratories)

0,4 mM L-Arginin HCl (U-13C6, Cambridge Isotope Laboratories)

pSILAC-Medium schwer:

DMEM ohne L-Arginine, L-Glutamine, L-Lysine und Natriumpyrovat

10 % (v/v) dialysiertes FBS

4 mM Glutamin (PAA)

1,74 mM L-Prolin (Sigma-Aldrich)

0,8 mM L-Lysin 2HCl (U-13C6 99%, 15N2 99%, Cambridge Isotope Laboratories)

0,4 mM L-Arginin HCl (U-13C6 99%, 15N4 99%, Cambridge Isotope Laboratories)

4.1.5 Antikörper

Name	WB	Herkunft
α -GRWD1	1:1000	Atlas (HPA042643)
α -LARP1	1:5000	Abcam (ab86359)
α -LARP4	1:5000	Bethyl Laboratories (A303-990A)
α -p21	1:500	BD Biosciences (610233)
α -p53	1:100	Santa Cruz Biotechnology (sc-6243)
HA.11-Antibody	1:1000	Hiss Diagnostics (MMS-101R)
Polyklonaler α -C8ORF33	1:100	Institut für Biochemie, Universität Würzburg
Polyklonaler α -LARP4B	1:1000	Institut für Biochemie, Universität Würzburg
β -Actin clone AC-74	1:1000	Sigma-Aldrich (A5316)
Alexa Fluor ^R 488 F(ab') ₂ fragment α -mouse IgG		Invitrogen (A11017)
Alexa Fluor ^R 594 F(ab') ₂ fragment α -rabbit IgG		Invitrogen (A11072)
α -Mouse gIgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate		Sigma-Aldrich (A4416)
α -Rabbit gIgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate		Sigma-Aldrich (A6154)

4.1.6 Plasmide

Name	Beschreibung	Herkunft
C8ORF33::FRT/TO/MCS		Diese Arbeit
C8ORF33::pHA		Institut für Biochemie, Universität Würzburg
LARP1::pFRT/TO/MCS		Diese Arbeit
LARP4::pFRT/TO/MCS		Diese Arbeit
LARP4B::pGEX-6P-1		(301)
pFRT/TO/MCS	N-Terminaler FLAG/HA- <i>Tag</i> in pcDNA5/FRT/TO	Institut für Biochemie, Universität Würzburg
pHA	HA- <i>Tag</i> in pcDNA3.1	Dissertation O. Plöttner
pHA-FF	<i>Firefly</i> Luciferase in pHA	A. Hirmer, Lehrstuhl für Bio- chemie, Universität Würzburg
pHA-FF Agel/Afel	Agel/Afel Schnittstellen in pHA-FF	Diese Arbeit
pOG44		Invitrogen (V6005)
SAT1::pHA-FF	SAT1 3'-UTR in pHA-FF Agel/Afel	Diese Arbeit

4.1.7 Bakterienstämme und eukaryotische Zelllinien

4.1.7.1 Bakterienstämme

E. coli DH5 α F Φ 80/*lacZ* Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17*(r $_k^-$, m $_k^+$) *phoA supE44* λ^- *thi-1 gyrA96 relA1* λ^- (Invitrogen)

E. coli BL21(DE3)pLysS F $^-$, *ompT*, *hsdS_B* (r $_{B^-}$, m $_{B^-}$), *dcm*, *gal*, λ (DE3), pLysS, CM f (Promega)

4.1.7.2 Eukaryotische Zelllinien

Flp-In™ T-REx™ 293	Invitrogen (R780-07)
Flp-In™ T-REx™ 293 C8ORF33	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ 293 LARP1	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ 293 LARP4	Diese Arbeit
Flp-In™ T-REx™ 293 LARP4B	(301)
Flp-In™ T-REx™ HeLa C8ORF33	Institut für Biochemie, Universität Würzburg
HEK293	DSMZ (ACC 305)
U2OS	AG Stefan Gaubatz, Universität Würzburg

4.1.8 DNA und RNA Oligonukleotide

4.1.8.1 DNA Oligonukleotide (Sigma-Aldrich)

Primer für die Klonierung

Name	Sequenz (5' -> 3')
C8ORF33 BamHI forw	AATAGGATCCATGGCGGCCCTGGGACATC
C8ORF33 XhoI rev	AGGACTCGAGCTAAAAGAAATTGAACCTAAACTC
Larp1 HindIII for	AGCAAAGCTTATGCTTTGGAGGGTGCTTTTG
Larp1 XhoI rev	ACGACTCGAGTCACTTTCCCAAAGTCTGTG
Larp4 HindIII for	AGCAAAGCTTATGTTGCTTTTCGTGGAGCAG
Larp4 XhoI rev	ACGACTCGAGTTACTTTGGTGATCTGGGTG
SAT1 3'-UTR Afel for	AATAAGCGCTGGAGTGCTGCTGTAGATG
SAT1 3'-UTR AgeI rev	AGTAACCGGTAACCTTGATAGCCAAGT

Primer für die gerichtete *in vitro* Mutagenese

Name	Sequenz (5' -> 3')
pHA-FF Afel <i>antisense</i>	CCTCTAGATGCATGCTAGCGCTACACGGCGATCTTTCCGCC
pHA-FF Afel <i>sense</i>	GGCGGAAAGATCGCCGTGTAGCGCTAGCATGCATCTAGAGG
pHA-FF AgeI <i>antisense</i>	TAGAGCCCACCGTTCCCCAGCATGCCTG
pHA-FF AgeI <i>sense</i>	CAGGCATGCTGGGGAACCGTGGGCTCTA

Primer für die Expressionsanalyse von LARPs

Name	Sequenz (5' -> 3')
------	--------------------

mmACTB for	ATGTGCAAAGCCGGCTTCG
mmACTB rev	AGCACAGGGTGCTCCTCAG
mmLARP1 for	GCCAGCTCTATGGATTGGAG
mmLARP1 rev	TGGCCAGTAGGTGTCGTAG
mmLARP4 for	GCAGTTCAGCAATTTCTACAGAAG
mmLARP4 rev	CTCTACAGGCGTTGTCTCAG
mmLARP4B	GGGTTTACATCTCCGACCTTC
mmLARP4B	TCTCTTCTCTTTTCTTCCGATAGC

Primer für die qPCR, RIP-PCR und mRNA Polysomenverschiebung

Name	Sequenz (5' -> 3')
ANXA2 for	ACAGCCATCAAGACCAAAGG
ANXA2 rev	TCAGTGCTGATGCAAGTTCC
CKB for	AGTTCATGTGGAACCCTCACC
CKB rev	ACCAGCTCCACCTCTGAGAAG
DDX6 for	ATGATCGCTTCAACCTGAAAAG
DDX6 rev	ATGTGTCACAGATCCAAACGAG
EEF2 for	CATCTACGGGGTTTTGAACAGG
EEF2 rev	TTCTTTCAGGCCCTTGCGCTTG
EXOSC3 for	CAGACCAAATGTGCAGGTTG
EXOSC3 rev	CAGACCATCCTGTCCAATGA
GLO1 for	CTCGAGGATTCGGTCATATTGG
GLO1 rev	AGGAGAATTCTCACAGCACTAC
GNB2L1 for	TACTGGCTGTGTGCTGCCACAG
GNB2L1 rev	CTAGCGTGTGCCAATGGTCAC
OAZ1 for	ACTGGCGAACAGTGCTGAGTG
OAZ1 rev	CCGGTCTCACAATCTCAAAGC
PPIL1 for	GGTCGAGGTGGTGCATCTAT
PPIL1 rev	GAAGTGGCTGCCATTGGTAT
PRKAA1 for	GGGTGAAGATCGGCCACTAC
PRKAA1 rev	CCTACCACATCAAGGCTCCG
RAE1 for	GCTGCTGGGAAGTTCAAGAC
RAE1 rev	ATCACACGATGCCGTAAACA
RALY for	CTACCGGGACGACTTCTACG

RALY rev	GCAAAGAGCTTGACAGGTACG
RCOR1 for	CAGTAACCAGAAGCCTGTGAAG
RCOR1 rev	GATAACACAGTAGTCCACACC
SAT1 for	GGCAAGTTATTGTATCTTGAGGAC
SAT1 rev	GAAGTTGATGGATGGTTCATTCC
SDHA for	GATTACTCCAAGCCCATCCA
SDHA rev	CACAGTCAGCCTCGTTCAAA
SNRBP for	GAGGGACTCCAATGGGCATG
SNRBP rev	CAGACAATCCCATGAGACTCC
TFRC for	TGGACAGCACAGACTTCACC
TFRC rev	ATCACGCCAGACTTTGCTGA
TOP2A for	CCACTGTCTTCAAGCCCTCC
TOP2A rev	CGGTAGTGGAGGTGGAAGAC
UCHL1 for	AATGTCTGGGTAGATGACAAGGTG
UCHL1 rev	CACAGAGCATTAGGCTGCCTTG
XPO6 for	GACGCTCCATCACAACTGGA
XPO6 rev	TGTCCGAAAGCCTGCATGAT

4.1.8.2 RNA Oligonukleotide

RNA Oligonukleotide für EMSA (Sigma-Aldrich)

Name	Sequenz (5' ->3')
CKB	GUAGAGACUCCGUCACGCUUGGUAGAGUUUUAUUUUUUUGA
CKB del	GUAGAGACUCCGUCACGCUUGGUAGAGGA
TOP3B	GACCCUGUCCUCCUCACCCAGGCUGCAGUGCCAUGCAGAC

siRNA	
Name	Herkunft
C8ORF33	siTools
GFP	GCAAGCUGACCCUGAAGUUC(dTdT) (Eurofins MWG Operon)
GRWD1	GE Healthcare (M-027146-02-0005)
LARP1	GAAUGGAGAUGAGGAUUGC(dTdT) (Eurofins MWG Operon)
LARP4	Thermo Fisher Scientific (L-016523-02-0005)
LARP4B	Thermo Fisher Scientific (MU-026388-02-0005)
Luciferase gl2	CGUACGCGGAAUACUUCGA(dTdT) (Eurofins MWG Operon)
NegK	siTools

4.2 Methoden

Verwendete Lösungen wurden steril filtriert oder autoklaviert, Kunststoffwaren wurden autoklaviert und Glasgeräte gebacken.

4.2.1 Molekularbiologische Methoden

4.2.1.1 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur DNA-Amplifikation

Zur Amplifikation von DNA wurde eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Dabei wurde entweder die Phusion (2x Phusion[®] Master Mix with HF Buffer, Thermo Fisher Scientific), Pfu (Institut für Biochemie, Universität Würzburg) oder Taq (*Thermo aquaticus*) DNA-Polymerase eingesetzt.

4.2.1.2 Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen

Die Hydrolyse von DNA durch Restriktionsendonukleasen (Thermo Fisher Scientific) erfolgte für 2 h bei 37 °C unter den vom Hersteller angegebenen Pufferbedingungen.

4.2.1.3 Dephosphorylierung von DNA-Enden

Um die Religation eines hydrolysierten Plasmids zu verhindern wurde die Plasmid-DNA durch die Zugabe von 1 µl FastAP (Thermo Fisher Scientific) zum Restriktionsansatz für 1 h bei 37 °C dephosphoryliert.

4.2.1.4 Ligation von DNA Fragmenten

Die Ligation von hydrolysiertes Plasmid-DNA und Insert erfolgte für 1 h bei RT in dem angegebenen Reaktionsansatz. Das Insert lag dabei in einem 10-fachen molaren Überschuss über dem Plasmid vor.

32,5 µl Insert/Plasmid-DNA
 1 µl T4 DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific)
 1 µl ATP (10 mM)
 4 µl 10x T4 DNA-Ligase Puffer
 2 µl PEG 6000 (24 % (w/v))

4.2.1.5 Gerichtete *in vitro* Mutagenese

Um in den Vektor pHA-FF eine A_gel und A_fel Restriktionsschnittstelle einzufügen wurde eine *in vitro* Mutagenese durchgeführt. Die Einführung dieser Schnittstellen erlaubt die Klonierung verschiedener 3'-UTRs in den Luciferase-Reporter.

Reaktionsansatz:	PCR-Programm:
125 ng pHA-FF	95 °C 30 s
2 µl Pfu DNA Polymerase	95 °C 30 s
(Institut für Biochemie, Universität Würzburg)	55 °C 1 min
25 pmol Mutageneseprimer <i>sense</i> bzw <i>antisense</i>	68 °C 12 min
5 µl 10x Puffer	68 °C 8 min
1 µl dNTPs (je 10 mM)	4 °C ∞
38 µl H ₂ O	10 Zyklen

Die Hälfte des Antisenseansatzes wurde zum Senseansatz gegeben und erneut eine PCR mit dem angegebenen Programm durchgeführt. Anschließend wurde 1 µl DpnI (Thermo Fisher Scientific) zugegeben und 1 h bei 37 °C inkubiert. 30 µl des Ansatzes wurden in *E.coli* DH5α transformiert und auf LB-Platten mit Ampicillin ausplattiert. Von Einzelkolonien wurde eine Übernachtskultur angeimpft und die Plasmid-DNA isoliert.

4.2.1.6 Transformation kompetenter Bakterienzellen

Hitzeschock-transformationskompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und das zu transformierende Plasmid zugeben. Nach 5 min Inkubation auf Eis erfolgte der Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Anschließend wurde 2 min auf Eis inkubiert, 700 µl LB-Medium zugegeben und für 45 min bei 37 °C geschüttelt. Die transformierten Bakterien wurden zur Selektion auf LB-Platten mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert.

4.2.1.7 Kontrolle der Klonierung durch Kolonie-PCR

Zur Kontrolle einer Klonierung wurde eine Kolonie-PCR durchgeführt. Dazu wurden von einer Selektionsplatte Einzelkolonien gepickt und in einen 20 µl PCR-Reaktionsansatz gegeben. Die amplifizierte DNA wurde auf einem Agarosegel aufgetrennt und im UV-Licht sichtbar gemacht.

4.2.1.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von Nukleinsäuren

Um DNA gelelektrophoretisch aufzutrennen, wurde ein 0,8 % bis 1,5 % Agarosegel verwendet, welches in 1x TBE (89 mM Tris HCl pH 8,0, 89 mM H₃BO₄, 4 mM EDTA, 1 µg/ml Ethidiumbromid) gegossen wurde. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE bei 150 V. Die Zugabe von Ethidiumbromid erlaubte die Visualisierung der DNA-Banden im UV-Licht.

4.2.1.9 Aufreinigung von Nukleinsäuren aus Agarosegelen oder Reaktionsansätzen

DNA wurde aus Agarosegelen oder direkt aus PCR- oder Restriktionsansätzen mithilfe des NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

4.2.1.10 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA aus *E.coli* DH5α wurde abhängig von der benötigten Menge an Plasmid-DNA 4 ml oder 250 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Plasmid QuickPure (Macherey-Nagel) oder dem NucleoBond® PC 500 Kits (Macherey-Nagel) gemäß den Herstellerangaben aufgereinigt.

4.2.1.11 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und DNA wurde durch Aufnahme einer Absorptionskurve am Spektralphotometer NanoVue™ (GE Healthcare) bestimmt.

4.2.1.12 Kontrolle der Klonierung durch Sequenzierung

Um den Erfolg der Klonierungen zu kontrollieren wurde eine DNA-Sequenzierung bei der Firma GATC (Konstanz) durchgeführt.

4.2.2 Biochemische Methoden

4.2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterienzellen

4 ml LB-Medium wurden mit kompetenten *E.coli* BL21(DE3)pLysS oder *E.coli* DH5α angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. 2x 250 ml LB-Medium wurden mit je 2 ml der Vorkultur angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienzellen

wurden abzentrifugiert (1500 g, 10 min, 4 °C), der Überstand verworfen, das Pellet in 100 ml kaltem TFBI (30 mM KOAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8) resuspendiert und erneut 10 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienzellen wurden abzentrifugiert (1500 g, 10 min, 4 °C), in 13 ml kaltem TFBII (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl, 15 % (v/v) Glycerin, pH 6,5) resuspendiert und zu je 100 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

4.2.2.2 Expression und Aufreinigung von rekombinantem LARP4B

LARP4B::pGEX-6P-1 wurde in *E.coli* BL21(DE3)pLysS transformiert und auf Selektionsplatten mit Ampicillin und Chloramphenicol über Nacht bei 37 °C selektioniert. Eine 100 ml Vorkultur (TB-Medium, 10 mM MgCl₂) wurde mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. 2 l Hauptkultur (TB-Medium, 10 mM MgCl₂) wurden mit einer OD₆₀₀ von 0,05 aus dieser Vorkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Expression von GST-LARP4B mit 1 mM IPTG (Roth) bei 15 °C für 5 h induziert. Die Bakterien wurden abzentrifugiert (15 min, 4000 g, 4 °C), der Überstand verworfen und das Bakterienpellet bei -20 °C gelagert. Alle folgenden Aufreinigungsschritte erfolgten bei 4 °C. Das Pellet wurde mit 40 ml GST-Lysepuffer (50 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton X 100, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) resuspendiert und durch Sonifizieren (3x1 min, Stufe 5, *output* 50 %, Sonifier[®] 250, Branson) lysiert. Das Lysat wurde durch Zentrifugation (25000 rpm, 4 °C, 40 min, Rotor 45Ti (Beckman Coulter)) geklärt und anschließend mit 7 ml in GST-Lysepuffer äquilibrierter Glutathionsepharose 4B (GE Healthcare) bei 4 °C für 90 min inkubiert. Die Sepharose wurde danach zuerst mit 10 SV GST-Lysepuffer, anschließend mit 10 SV Anionenaustauschchromatografiepuffer (100 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 6,7, 1 mM DTT) gewaschen. Um den GST-Tag zu entfernen wurde die Sepharose in 10 ml Anionenaustauschchromatografiepuffer über Nacht bei 4 °C mit 200 µl PreScission Protease (Institut für Biochemie, Universität Würzburg) inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und auf 5 ml einkonzentriert. Zur weiteren Aufreinigung des rekombinanten LARP4B wurde eine Anionenaustauschchromatografie durchgeführt (HighTrapQ HP, 1 ml, GE

Healthcare). Gebundene Proteine wurden durch einen Salzgradienten von 100 mM bis 1 M NaCl eluiert. Der Durchfluss enthielt das rekombinante LARP4B und wurde deshalb zur weiteren Aufreinigung auf 500 µl einkonzentriert. Durch eine anschließende Gelfiltrationschromatografie in Gelfiltrationspuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris pH 7,5, 1 mM DTT) wurde LARP4B über eine Superdex™ 200 10/300 GL-Säule (GE Healthcare) weiter gereinigt.

4.2.2.3 Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Durch eine denaturierende SDS-PAGE wurden Proteine ihrer Größe nach aufgetrennt. Dazu wurden die Proben mit Proteinprobenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C denaturiert. Anschließend wurden die Proben auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 75 mA für 75 min (Mini-Protean® Tetra Cell-System (Bio-Rad): 45 mM für 45 min) in 1x Lämmli-Puffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS) aufgetrennt.

Trenngel	10%	12%
4x SDS-Trenngelpuffer	5,25 ml	5,25 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Roth)	6,75 ml	8,85 ml
H ₂ O	8,25 ml	6,0 ml
APS (10 % (w/v))	100 µl	100 µl
TEMED	100 µl	100µl

Sammelgel	4%
4x SDS-Sammelgelpuffer	1,6 ml
Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Roth)	0,8 ml
H ₂ O	3,8 ml
APS (10 % (w/v))	50 µl
TEMED	10 µl

4x SDS-Trenngelpuffer: 1,5 M Tris HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS

4x SDS-Sammelgelpuffer: 0,5 M Tris HCl pH 8,8, 0,4 % (w/v) SDS

4.2.2.4 Coomassiefärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Ein SDS-Polyacrylamidgel wurde für 30 min bei RT in Coomassiefärbelösung (40 % (v/v) Methanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,2 % (w/v) SERVA Blue R) inkubiert. Anschließend wurde das Gel solange in 20 % (v/v) Essigsäure entfärbt bis die Proteinbanden sichtbar waren. Dazu wurde die Entfärbelösung mehrfach gewechselt.

4.2.2.5 Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen

Zur Detektion von Proteinen in PAA-Gelen durch Silberfärbung wurde das Gel zunächst 1 h in der Fixierlösung (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure, 0,5 ml/l Formaldehyd (37 %)) inkubiert, 3x für 20 min mit 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und danach 1 min mit Natriumthiosulfatlösung (0,2 g/l $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) behandelt. Nach 3x 20 s Waschen mit H_2O wurde das Gel für 20 min in der Silberimprägnierlösung (2 g/l AgNO_3 , 0,75 ml/l Formaldehyd (37 %)) inkubiert und erneut 2x 20 s mit Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Gel in der Entwicklerlösung (60 g/l Na_2CO_3 , 0,5 ml/l Formaldehyd (37 %)) solange inkubiert bis Proteinbanden sichtbar waren und dann die Färbung mit Stopplösung (50 % (v/v) Methanol, 12 % (v/v) Essigsäure) abgestoppt.

4.2.2.6 Regeneration von Glutathionsepharose

Verwendete Glutathionsepharose wurde mit 10 SV 20 mM Glutathion eluiert und anschließend mit 10 SV 0,5 M NaOH gewaschen. Danach wurde die Sepharose 2x für 1 h in 8,75 M Harnstoff mit 10 mM DTT inkubiert. Nach Waschen mit 10 SV H_2O und 10 SV 20 % Ethanol wurden die Glutathionsepharose in 20 % Ethanol gelagert.

4.2.2.7 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde die Methode nach Bradford angewandt (329). Dazu wurden 200 μl *Protein Assay Dye Reagent Konzentrate* (Bio-Rad), 798 μl H_2O und 2 μl Proteinprobe gemischt und 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm an einem Biophotometer[®] (Eppendorf) gemessen. Mittels einer BSA-Eichgeraden wurde daraufhin die Proteinkonzentration berechnet.

4.2.2.8 5'-Endmarkierung von RNA-Oligonukleotiden

Zur radioaktiven Markierung von RNA-Oligonukleotiden wurden diese am 5'-Ende mithilfe von γ -(³²P)-ATP phosphoryliert.

Reaktionsmix:

2 μl RNA-Oligonukleotid (10 μM)

0,9 μl H_2O

2,1 μl PEG 6000 (24% (w/v))

Der Reaktionsmix wurde 1 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurde 1 μl PNK-Puffer A, 1 μl T4-Polynukleotidkinase (10 U/ μl , Thermo Fisher Scientific) und 3 μl γ -(³²P)-ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$, 6000 mCi/mmol) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl RNA-Probenpuffer gestoppt. Die RNA-Oligonukleotide wurden auf einem 12,5 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend aus dem Gel eluiert.

4.2.2.9 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von RNA wurde ein 12,5 % denaturierendes Polyacrylamidgel verwendet auf welches die mit RNA-Probenpuffer versetzten Proben geladen wurden. Die Elektrophorese erfolgte in 1x TBE (89 mM Tris HCl pH 8,0, 89 mM H_3BO_4 , 4 mM EDTA) bei 30 W für 1 h.

12,5 % denaturierendes Polyacrylamidgel:
20 ml Rotiphorese[®] Sequenziergel Konzentrat (Roth)
16 ml Rotiphorese[®] Sequenziergel Verdünner (Roth)
4 ml Rotiphorese[®] Sequenziergel Puffer-Konzentrat (Roth)
400 µl APS (10 % (w/v))
40 µl TEMED

4.2.2.10 Reinigung von RNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen

Nachdem die radioaktivmarkierte RNA über eine denaturierende RNA-Gelelektrophorese aufgetrennt wurde, wurde die RNA durch Autoradiografie auf einem Röntgenfilm (CEA RP New Medical X-Ray screen Blue sensitive (Agfa HealthCare)) sichtbar gemacht und die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten. Die Elution aus dem Gel erfolgte in 300 µl einer 300 mM NaCl-Lösung über Nacht bei 4 °C. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 ml Ethanol bei -20 °C für 6 h gefällt, abzentrifugiert (16000 g, 4 °C, 30 min), der Überstand abgenommen und das Pellet getrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl H₂O aufgenommen.

4.2.2.11 Phenolextraktion von RNA aus Immunpräzipitationen und Zellextrakten

Um RNA aus Zellextrakten oder Immunpräzipitationen zu isolieren wurde 1 Vol Phenol (Roti[®]-Aqua-Phenol zur RNA Extraktion (Roth))/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) gegeben und 10 s gemixt. Nach Zentrifugation (5 min, 16000 g, RT) wurde die wässrige Phase abgenommen und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (25:1) versetzt und erneut gemixt. Nach der Zentrifugation (5 min, 16000 g, RT) wurde die wässrige Phase wieder abgenommen und die RNA durch Alkoholfällung präzipitiert. Dazu wurde 3 Volumen Isopropanol zugegeben und die RNA über Nacht bei -20 °C präzipitiert. Die RNA wurde abzentrifugiert (30 min, 16000 g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Das RNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur getrocknet und in H₂O aufgenommen.

4.2.2.12 Elektromobility Shift Assay (EMSA)

In einem 10 µl Ansatz wurden die angegebenen Proteinmengen in 1x EMSA-Puffer (50 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, 1 mM DTT, 10 % (v/v) Glycerin, 0,1 mg/ml BSA) mit 5 nM RNA 30 min bei 4 °C inkubiert. Ein 0,4 % Agarosegel (gegossen in 0,5x TBE (44,5 mM Tris HCl pH 8,0, 44,5 mM H₃BO₄, 2 mM EDTA)) wurde 30 min bei 3,3 V/cm und 4 °C in 0,5x TBE vorlaufen gelassen. 8 µl des Ansatzes wurden geladen und 3 h bei 3,3 V/cm aufgetrennt. Danach wurde das Gel auf einer AmershamTM Hybond-N⁺-Membran (GE Healthcare) getrocknet (Gel Dryer Model 583, Bio-Rad) und die Banden durch Autoradiografie auf einem Röntgenfilm (CEA RP New Medical X-Ray screen Blue sensitive (Agfa HealthCare)) sichtbar gemacht.

4.2.2.13 Quantitative Echtzeit- PCR (qPCR)

HEK293-Zellen in einem 6-well wurden mit LARP4B-siRNA transfiziert. Als Kontroll-siRNA wurde die Luciferase gl2-siRNA verwendet. Nach 48 h wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 200 µl Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) zugegeben. Zellextrakt wurde hergestellt und die Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode bestimmt. Die Kontrolle des *knockdowns* erfolgte nach Auftrennung von 40 µg Gesamtprotein durch SDS-PAGE mittels Western-Blot. Gesamt-RNA wurde durch Phenolextraktion isoliert und mit Isopropanol gefällt. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 20 µl H₂O aufgenommen und mithilfe des TURBO DNA-freeTM-Kits (Life Technologies) eine DNA-Hydrolyse durchgeführt. Die RNA-Konzentration wurde daraufhin am Spektralphotometer NanoVueTM (GE Healthcare) bestimmt und 5 µg Gesamt-RNA für die reverse Transkription mit dem SuperScriptIII[®] First-strand-Kit (Life Technologies) eingesetzt. Diese erfolgte gemäß den Herstellerangaben mithilfe von *random Hexamer*-Primern. Die qPCR wurde am Real-Time System CFX96 TouchTM (Bio-Rad) durchgeführt. Die SDHA-mRNA wurde als Referenz verwendet.

Reaktionsansatz:	PCR-Programm:
6 µl iTaq™ Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad)	95 °C 30 s
2 µl Primer-Mix (5'- und 3'-Primer je 1,5 µM)	95 °C 5 s
4 µl RT-Ansatz (1:10 Verdünnung)	60 °C 30 s
	40 Zyklen

4.2.2.14 Expressionsanalyse verschiedener Proteine in Mausgeweben

10 µg Gesamt-RNA aus den angegebenen Mausgeweben wurde mithilfe des SuperScriptIII® First-strand-Kits (Life Technologies) revers transkribiert wobei oligo(dT)₂₀-Primer eingesetzt wurden. Die erhaltene cDNA wurde daraufhin amplifiziert.

Reaktionsansatz:	PCR-Programm:
10 µl innuMix Green PCR MasterMix (Analytic Jena)	96 °C 3 min
0,25 µl 5'-Primer (100 µM)	94 °C 30 s
0,25 µl 3'-Primer (100 µM)	56 °C 30 s
9 µl H ₂ O	72 °C 30 s
0,5 µl cDNA	72 °C 5 min
4 °C ∞	35 Zyklen

Die PCR-Ansätze wurden mit 5 µl DNA-Probenpuffer versetzt und 20 µl davon in einem 1,5 % Agarosegel für 30 min bei 150 V aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden danach im UV-Licht sichtbar gemacht.

4.2.2.15 Analyse des mRNA-Transkriptoms mittels Hochdurchsatzsequenzierung

HEK293-Zellen in 6-wells wurden mit LARP4B-siRNA beziehungsweise Luciferase gl2-siRNA transfiziert. Nach 24 h wurden die Zellen auf eine 6 cm-Schale überführt und weiter kultiviert. 48 h nach der Transfektion wurde zur Kontrolle des *downs* je ein *well* der LARP4B-*knockdown*- und Kontrollzellen mit 1 ml 1x PBS gewaschen und mit Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) versetzt. Gesamtzellextrakt

wurde hergestellt und die Proteinkonzentration mittels Bradford-Analyse bestimmt. 40 µg Gesamtzellextrakt wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression der angegebenen Proteine durch einen Western-Blot analysiert. Gleichzeitig erfolgte die Präparation der Gesamt-RNA mithilfe des RNeasy[®] Mini-Kits (Qiagen) gemäß Herstellerangaben. Dazu wurden die Zellen direkt in der Kulturschale lysiert und mittels einer QIAshredder-Säule (Qiagen) homogenisiert. Zusätzlich wurde eine Hydrolyse von DNA-Kontaminationen mit DNase I auf der Säule durchgeführt. Die RNA wurde mit 30 µl H₂O von der Säule eluiert und die Konzentration am NanoVue[™] Spektralphotometer (GE Healthcare) bestimmt. Mithilfe des Experion RNA StdSense Analysis Kit (Bio-Rad) wurde die Qualität der RNA überprüft. Aus 4 µg Gesamt-RNA wurde mRNA mithilfe des NEBNext[®] Poly(A) *mRNA Magnetic Isolation Module* (New England BioLabs) isoliert. Die Kontrolle der RNA-Qualität, die Generierung der cDNA-Bibliothek, die Hochdurchsatzsequenzierung sowie die Bestimmung der Änderungen der mRNA-Levels wurden von Dr. Elmar Wolf (AG Prof. Dr. Martin Eilers, Lehrstuhl für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Würzburg) durchgeführt. Zur Kontrolle der mRNA-Qualität wurde das Experion RNA HighSens Analysis Kit (Bio-Rad) verwendet. Aus der erhaltenen mRNA wurde mithilfe des NEBNext mRNA Library Prep Master Mix Set for Illumina[®] (New England BioLabs) eine cDNA-Bibliothek hergestellt. Nach jeder enzymatischen Reaktion wurde dabei mit dem PCR-Aufreinigungskit (Qiagen) aufgereinigt. Zur Herstellung der cDNA-Bibliothek wurde eine mRNA Fragmentierung, cDNA-Synthese, Zweitstrangsynthese und eine Reparatur der cDNA-Enden durchgeführt. Außerdem wurde an die cDNA-Enden ein zusätzliches Desoxyadenosin angefügt. Nach der Adapterligation wurde die cDNA auf einem 2 % Agarosegel aufgetrennt und der Größenbereich von 200 Basenpaaren (+/- 25 Basenpaaren) ausgeschnitten. Die cDNA wurde aus dem Gel eluiert und mithilfe von NEBNext[®] Multiplex Oligos for Illumina[®] (Index Primer Set 1) amplifiziert (15 Zyklen). Die Quantifizierung und Kontrolle der Qualität der cDNA erfolgte mit dem Experion DNA 1K Analysis Kit (Bio-Rad). Die Proben wurden anschließend in einem äquimolaren Verhältnis gemischt. Die Sequenzierung wurde auf einem Genome Analyzer IIX (Illumina) mithilfe des TruSeq SR Cluster Kit v5-CS-GA (Illumina) und des TruSeq SBS Kit v5-GA (Illumina) durchgeführt. Die Mischung der cDNA-Bibliotheken wurde mit einer Konzentration von 9 pM auf eine Spur der *flowcell* geladen und sequenziert. Für die bioinformatische Analyse wurden die fastq-Dateien mit Casava extrahiert und die

reads den jeweiligen Konditionen anhand ihrer Index-Sequenzen zugeordnet (dekonvoliert). Anschließend wurde eine Kartierung auf das humane Genom (hg19) mit bowtie-0.12.8 und den bowtie-Standardoptionen vorgenommen. Dabei betrug das *Alignment* zwischen 87 und 90 %. Mit samtools wurden die Daten in eine binäre Datei umgewandelt. Die weitere Auswertung erfolgte mit R. Dabei wurden die Pakete Rsamtools, Genomicfeatures, edgeR, goseq, limma, biomaRt und lattice verwendet.

4.2.2.16 Photoactivatable-Ribonucleoside-enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation (PAR-CLIP)

Flp-In T-REx 293 LARP4B-Zellen wurden über Nacht in Medium mit 100 µM 4SU kultiviert und die Expression von FLAG/HA-LARP4B für 5 h durch Zugabe von 0,5 µg/ml Tetracyclin induziert. Die Durchführung des PAR-CLIP-Experiments erfolgt wie beschrieben (308). Die Zellen wurden dazu einmal mit 1x PBS gewaschen und die Quervernetzung mit UV-Licht von 365 nm Wellenlänge (0,15 J/cm², Bio-Link Crosslinker BLX 365 5x8 W (Peqlab)) durchgeführt. Daraufhin wurden die Zellen in 1x PBS von der Kulturschale gelöst, abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff gefroren. Die Lyse erfolgte in 3 Volumen 1x NP-40 Lysepuffer (50 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,5 % (v/v) NP-40, 0,5 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren). Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden Zelltrümmer bei 13000 g und 4 °C für 15 min abzentrifugiert und der Überstand durch einen 5 µm Spritzenfilter geklärt. Nach einer RNase T1 (Thermo Fisher Scientific)-Behandlung (7 min, 1 U/µl, 22 °C) wurde eine Immunpräzipitation von FLAG/HA-LARP4B mit 150 µl ANTI-FLAG[®] M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich) für 1 h bei 4 °C durchgeführt und 3x mit IP-Puffer (50 mM HEPES pH 7,5, 300 mM KCl, 2 mM EDTA, 0,05 % (v/v) NP-40, 0,5 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) gewaschen. Anschließend wurde erneut eine RNase T1-Behandlung durchgeführt (7 min, 100 U/µl, 22 °C) und 3x mit Hochsalzwaschpuffer (50 mM HEPES pH 7,5, 500 mM KCl, 0,05 % (v/v) NP-40, 0,5 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) gewaschen. Nach dem Äquilibrieren der Matrix in Dephosphorylierungspuffer (50 mM Tris HCl pH 7,9, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT) wurde eine *Calf Intestinal* alkalische Phosphatase (New England BioLabs)-Behandlung durchgeführt (40 min, 0,5 U/µl,

37 °C) und danach mit PNK-Puffer ohne DTT gewaschen. Die Matrix wurden in 1 Volumen PNK-Puffer aufgenommen, 1,5 µl γ -³²P-ATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl) und T4 PNK (10 U/µl, Thermo Fisher Scientific) zugegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Die Phosphorylierung wurde durch die Zugabe von ATP (100 µM) vervollständigt (5 min, 37 °C). Anschließend wurde die Matrix 5x mit PNK-Puffer gewaschen und der LARP4B-RNA-Komplex durch Denaturierung (2 min bei 90 °C) in 70 µl 1x SDS-PAGE Ladebuffer (10 % (v/v) Glycerin, 50 mM Tris HCl pH 6,8, 2 % (w/v) SDS, 100 mM DTT, 2 mM EDTA, 0,1 % (w/v) Bromphenolblau) von der Matrix gelöst. Die Proben wurden auf einem NuPAGE[®] Novex[®] 4-12 % Bis-Tris Proteingel (Life Technologies) aufgetrennt (200 V, 45-60 min) und auf eine Nitrozellulosemembran (0,22 µM, Merck Millipore) transferiert. Die Identifizierung der gebundenen RNAs sowie die bioinformatischen Analysen wurden von Yasuhiro Murakawa (Arbeitsgruppe Dr. Markus Landthaler, Max-Delbrück-Zentrum für Molekulare Medizin, Berlin) durchgeführt. Auf der zu erwartenden Höhe wurde der Protein-RNA-Komplex ausgeschnitten, LARP4B durch eine Proteinase K-Behandlung entfernt und die RNA durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert. Nach der Ligation der 3'- und 5'-Adapter wurde die RNA revers transkribiert. Die cDNA wurde PCR amplifiziert und auf einem HighSeq2000 (Illumina) mit einem 1x51 Zyklus sequenziert.

Die PAR-CLIP-Sequenzierdaten wurden mithilfe einer PAR-CLIP-Annotations*pipeline* analysiert (328). Die Kartierung erfolgte dabei auf das humane Genom (Version hg18). Kartierungsstatistik, Zielgenidentifizierung und *Clusterverteilung* wurden mit der *Annotationspipeline* generiert. Für jedes *Cluster* wurde die Position mit der höchsten Anzahl an T:C Konversionen bestimmt und als LARP4B-Quervernetzungsstelle definiert. Für die Bindemotivsuche wurden die 1000 besten *Cluster* der 3'-UTR verwendet. In 41 nt langen Fenstern um die Quervernetzungsstellen dieser *Cluster* wurde die Häufigkeit aller 7mere bestimmt. Um die Anreicherung jedes 7mers zu ermitteln wurde die Häufigkeit der 7mere in den LARP4B 3'-UTR-Bindestellen mit den Häufigkeiten in allen 3'-UTRs verglichen (330). Dabei wurde die längste 3'-UTR-Sequenz für jedes Gen verwendet. Die Ziel-mRNAs wurden nach der Anzahl der auf die mRNA-Expression normalisierten T:C Konversionen geordnet (331) und die 500 besten Zielgene mit dem pSILAC- bzw. die 1000 besten Zielgene mit der mRNA-Transkriptomanalysedaten verglichen.

4.2.2.17 Polysomendichtegradientenzentrifugation

Zellen in einer 10 cm Kulturschale wurde für 5 min mit 8 µg/ml Emetin behandelt und mit 1x PBS gewaschen. Mit 300 µl Gradientenlysepuffer (100 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,01 U/µl RNAsin[®], 0,5 % (v/v) NP-40, 0,1 mg/ml Cycloheximid, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) wurde Gesamtzellextrakt hergestellt und die Proteinkonzentration photometrisch nach Bradford bestimmt. Der Zellextrakt wurde daraufhin auf eine Proteinkonzentration von 15,5 µg/µl eingestellt. Mithilfe des Gradientenmischers Gradient Mate[™] (Biocomp) wurde in einem Zentrifugenröhrchen (14x89 mm, Beckmann Coulter) ein 5 %-45 % Saccharosegradient in 1x Gradientenpuffer (100 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂) hergestellt und auf 4 °C gekühlt. Von dem Saccharosegradienten wurden 235 µl abgenommen und 235 µl Zellextrakt geladen. Die Zentrifugation erfolgte bei 38000 rpm (Rotor SW40Ti (Beckman Coulter)) und 4 °C für 1 h. Die Gradienten wurden mithilfe des Gradientenernters Piston Gradient Fractionator[™] (Biocomp) ausgestattet mit dem Fraktionssammler *Fraction collector Model 2110* (Bio-Rad) mit einer Fraktionsgröße von 500 µl fraktioniert. Eine Absorptionskurve bei 260 nm Wellenlänge wurde mit dem Econo UV Monitor (Bio-Rad) aufgezeichnet.

4.2.2.18 Dichtegradientenzentrifugation

HEK293-Zellen in 10 cm Schalen wurden mit C8ORF33-siRNA und Luciferase gl2-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde Zellextrakt mit Gradientenlysepuffer (100 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂, 0,01 U/µl RNAsin[®], 1,0 % (v/v) NP-40, 0,1 mg/ml Cycloheximid, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) hergestellt (11,9 µg/µl Gesamtprotein). Außerdem wurden Flp-In T-REx 293 C8ORF33-Zellen in 10 cm Schalen für 5 h mit 1 µg/µl Tetracyclin induziert und ebenfalls Zellextrakt hergestellt (4,9 µg/µl Gesamtprotein).

Für die Dichtegradientenzentrifugation wurde mithilfe des Gradientenmischers Gradient Mate[™] in einem Zentrifugenröhrchen (11x60 mm, Beckmann Coulter) ein 10 %-30 % Glyceringradient in 1x Gradientenpuffer (100 mM KCl, 20 mM Tris HCl pH 7,5, 5 mM MgCl₂) hergestellt und auf 4 °C vorgekühlt. Zellextrakt wurde hergestellt, 200 µl des Glyceringradienten abgenommen und 200 µl Zellextrakt geladen. Die Zentrifugation erfolgte für 16 h bei 50000 rpm (Rotor SW60Ti

(Beckman Coulter)) und 4 °C. 200 µl Fraktionen wurden abgenommen und 20 µl der Fraktionen mit Proteinprobenpuffer versetzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte über SDS-PAGE und die Analyse der angegebenen Proteine über Western-Blot.

4.2.2.19 mRNA-Polysomenverschiebung

HEK293-Zellen in 10 cm Schalen wurden mit LARP4B-siRNA und zur Kontrolle mit Luciferase gl2-siRNA transfiziert. Nach 48 h wurde Zellextrakt hergestellt und eine Polysomendichtegradientenzentrifugation durchgeführt. Zur Kontrolle des *knockdowns* wurden 40 µg Gesamtprotein durch SDS-PAGE aufgetrennt und die angegebenen Proteine durch Western-Blot analysiert. Je 150 µl Lösung zweier Gradientenfraktionen wurden vereinigt und 300 µl H₂O zugegeben. Die RNA wurde phenolextrahiert, mit Isopropanol gefällt, abzentrifugiert und das Pellet getrocknet. Nach Resuspension in 10 µl H₂O wurde die RNA mithilfe des SuperScriptIII® First-strand-Kits (Life Technologies) gemäß den Herstellerangaben revers transkribiert wobei *random Hexamer*-Primer verwendet wurden. Danach wurde der Reaktionsansatz auf 95 µl mit H₂O aufgefüllt und die cDNA der angegebenen Gene durch PCR amplifiziert.

Reaktionsansatz:	PCR-Programm:
10 µl innuMix Green PCR Master Mix (Analytic Jena)	94 °C 5 min
0,25 µl 5'-Primer (100 µM)	94 °C 30 s
0,25 µl 3'-Primer (100 µM)	60 °C 30 s
4,5 µl H ₂ O	72 °C 30 s
5 µl cDNA	72 °C 7 min
	4 °C ∞
	30 Zyklen

Zu den PCR-Ansätzen wurden 5 µl DNA-Probenpuffer gegeben und 18 µl davon für 30 min bei 150 V auf einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Die amplifizierte cDNA wurden im UV-Licht sichtbar gemacht.

4.2.2.20 Proteinmassenspektrometrie

Durchgeführt vom Arbeitskreis von Prof. Dr. Andreas Schlosser (Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg).

Die durch Massenspektrometrie zu analysierenden Proteinkomplexe wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel anschließend Coomassie gefärbt. Die Gelspuren wurden in Banden geschnitten und in 30 % Acetonitril entfärbt. Dann wurden diese Gelstücke in 100 % Acetonitril geschrumpft und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Die Proteine wurden über Nacht mit 0,1 µg Trypsin pro Gelstück bei 37 °C in 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat (pH 8,0) verdaut und die erhaltenen Peptide mit 5 % Ameisensäure aus den Gelstücken eluiert. Die NanoLC-MS/MS-Analysen wurden auf einem LTQ-Orbitrap Velos Pro-Massenspektrometer, der mit einer EASY-Spray Ionenquelle ausgestattet und mit einem EASY-nLC 1000 UHPLC-System (alles Thermo Fisher Scientific) gekoppelt ist, durchgeführt. Die Peptide wurden auf die Vorsäule geladen (2 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) und über einen 30 min linearen Gradienten von 3 bis 30 % Acetonitril, 0,1 % Ameisensäure mit 200 nl/min auf der analytischen Säule aufgetrennt (EASY-Spray, 25 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße). MS-Spektren wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 30.000 bei 400 m/z aufgenommen. CID Fragmentationenspektren (MS/MS-Spektren) wurden in einer Ionenfalle mit einer Auflösung von 7.500 bei 400 m/z detektiert. Die max. 5 intensivsten Peptidvorläuferionen jedes MS-Spektrums wurden datenabhängig für die MS/MS-Analyse ausgewählt. Weitere Methodenparameter waren eine dynamische Ausschlussliste ohne Wiederholungen und einer Ausschlussdauer von 30 Sekunden sowie Ausschluss von einfach geladenen Ionen. Für die Peptidvorläuferselektion wurde ein Schwellenwert von 50.000 verwendet. Für die prädiktive automatische Verstärkungsregelung (AGC) wurden Zielwerte von 1e6 für MS-Spektren bzw. 5e4 für MS/MS-Spektren vorgegeben. Für die interne Kalibrierung („lock mass“) wurde die Masse des protonierten Decamethylcyclopentasiloxan (m/z 371.10124) verwendet.

Zur Prozessierung der Rohdaten und für die Generierung einer *peak*-Liste wurde Mascot Distiller 2.5 verwendet. Dabei wurden die Standardeinstellungen für den Orbitrap Velos-Massenspektrometer (*high/high*) verwendet. Die Datenbanksuche

erfolgte mit dem Mascot Server 2.4 mit den folgenden Parametern: 10 ppm, MS/MS-Massentoleranz: 0,02 Da, Enzym: Trypsin, wobei drei verpasste Schnittstellen erlaubt waren; feste Modifikationen: Carbamidomethyl (C); variable Modifikationen: N-terminale Acetylierung, Gln zu pyro-Glu-Umwandlung, Oxidation (M) und Phosphorylierung (STY). Für die Datenbanksuche wurde die humane UniProt Datenbank sowie eine Datenbank, die Kontaminationen enthält, verwendet.

4.2.3 Immunbiochemische Methoden

4.2.3.1 Spezifischer Proteinnachweis durch Western-Blot Analyse

Die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semi-Dry* Blot auf eine PVDF-Membran (0,45 µm, Merck Millipore) transferiert (332). Dafür wurde das Gel zwischen je 2 Lagen in Towbinblotlösung (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 3,5 mM SDS, 10 % (v/v) Methanol) getränktem Chromatografiepapier auf eine PVDF-Membran, die zuvor in Methanol rehybridisiert wurde, plaziert. Der Transfer erfolgte für 2 h bei 150 mA. Um den Transfer der Proteine zu überprüfen wurde die Membran Amidoschwarz gefärbt. Dazu wurde die Membran für 5 min bei RT in Amidoschwarzfärbelösung (0,2 % (w/v) Amidoschwarz 10B, 10 % (v/v) Methanol, 2 % (v/v) Essigsäure) inkubiert und anschließend in Amidoschwarzentfärbelösung (90 % (v/v) Methanol, 3 % (v/v) Essigsäure) solange entfärbt bis Proteinbanden sichtbar waren. Daraufhin wurde die Membran für 1 h in 5 % (w/v) Magermilchpulver in 1x PBS-T (1x PBS, 0,05 % (w/v) Tween 20) geblockt, mit 1x PBS-T gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 1x NET-Gelatinepuffer (150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 0,05 % (v/v) Triton X 100, 0,25 % (w/v) Gelatine, 0,02 % (w/v) Natriumazid) mit der entsprechenden Primärantikörperverdünnung inkubiert. Nach 3x Waschen für 5 min bei RT in 1x PBS-T wurde die Membran für 1 h bei RT in der Sekundärantikörperlösung inkubiert (1:5000 Peroxidase-gekoppelter Sekundärantikörper in 1x PBS-T) und erneut 3x 5 min bei RT mit 1x PBS-T gewaschen. Zur Detektion wurden 10 ml Blotlösung 1 (1,25 mM Luminol, 100 mM Tris HCl pH 8,5) mit 100 µl Blotlösung 2 (6,8 mM pCumarsäure in DMSO) und 8 µl H₂O₂ (30 %) gemischt und die Membran darin für 1 min inkubiert. Die Detektion der Chemolumineszenz erfolgte mithilfe des Molecular Imager[®] ChemiDoc[™] XRS+ (Bio-Rad).

4.2.3.2 Immunpräzipitation von HA-C8ORF33

Zur Immunpräzipitation von überexprimiertem HA-C8ORF33 wurden zwei 14,5 cm Schalen HEK293-Zellen mit dem Plasmid C8ORF33::pHA transfiziert. 50 µl ProteinG-Sepharose (GE Healthcare) wurde mit 20 µl anti-HA Antikörper beziehungsweise 20 µl Präimmenserum 90 min bei 4 °C auf einem Überkoprotator gekoppelt. 24 h nach der Transfektion wurde Zellextrakt mit IP-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) hergestellt und 90 min bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Anschließend wurde 6x mit IP-Puffer und 3x mit 1x PBS gewaschen und währenddessen das Reaktionsgefäß gewechselt. Zur Analyse der Immunpräzipitation wurden Proteine von 15 µl Sepharose durch Denaturierung in SDS-Proteinprobenpuffer gelöst, über SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Dabei identifizierte kopräzipitierte Proteine wurden massenspektrometrisch untersucht. Zur Analyse der Immunpräzipitation durch einen Western-Blot wurden denaturierte Protein von 10 µl Sepharose sowie 10 µl Zellextrakt über SDS-PAGE aufgetrennt und mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

4.2.3.3 Immunpräzipitation von endogenem C8ORF33 und GRWD1

Zur Immunpräzipitation von endogenem C8ORF33 wurde aufgereinigter α-C8ORF33-Antikörper sowie Präimmenserum kovalent an ProteinG-Sepharose (GE Healthcare) gekoppelt. Dazu wurde zunächst je 50 µl Sepharose mit IP-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) äquilibriert und in 1,5 ml IP-Puffer mit 160 µl α-C8ORF33-Antikörper beziehungsweise 20 µl Präimmenserum für 2 h bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Anschließend wurde die Sepharose zunächst mit IP-Puffer, dann 2x mit 10 SV 1x PBS/0,01% NP-40 gewaschen. Nach dem Äquilibrieren mit 3x 10 SV 0,2 M Natriumtetraborat (pH 9,0) bei Raumtemperatur erfolgte die kovalente Kopplung der Antikörper an die Sepharose mit 10 SV 20 mM DMP in 0,2 M Natriumtetraborat bei Raumtemperatur für 1 h. Danach wurde 2x mit 10 SV Ethanolamin gewaschen und über Nacht bei 4 °C auf dem Überkoprotator in Ethanolamin inkubiert. Schließlich wurde die Sephasore in IP-Puffer äquilibriert. Aus HEK293-Zellen wurde mit IP-Puffer Zellextrakt hergestellt und die

antikörpergekoppelte Sepharose mit 1,3 ml Zellextrakt (3 µg/µl Gesamtprotein) für 2 h bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Sepharose 5x mit IP-Puffer gewaschen. Für die anschließende Analyse wurden präzipitierte Proteine von 36 µl Sepharose durch Denaturierung in SDS-Proteinprobenpuffer gelöst, über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung detektiert. Zur Kontrolle durch Western-Blot wurde Proteine von 4 µl Sepharose gelöst, über SDS-PAGE aufgetrennt und mit den angegebenen Antikörpern analysiert.

Die Immunpräzipitation von endogenem GRWD1 erfolgt wie oben beschrieben. Dabei wurden 60 µl ProteinG-Sepharose (GE Healthcare) pro IP und 40 µl α-GRWD1-Antikörper beziehungsweise 0,8 µl Präimmenserum verwendet. Die Proteinkonzentration des Zellextrakt betrug 5 µg/µl. Von 30 µl Sepharose eluierte Proteine wurden massenspektrometrisch untersucht. Zur Analyse der kopräzipitierten Proteine durch SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung wurden eluierte Proteine von 26 µl Sepharose eingesetzt. Zusätzlich wurde die Immunpräzipitation durch eine Western-Blot Analyse untersucht.

4.2.3.4 RNA-Immunpräzipitation (IP) aus Zellextrakt mit anschließender RT-PCR (RIP-PCR)

IP aus Zellextrakt stabiler Flp-In T-REx 293-Zelllinien:

Zur Überexpression der *getaggt* Proteine wurden stabile Flp-In T-REx 293-LARP4B, -LARP4 und -LARP1 Zelllinien auf 3 14,5 cm Kulturschalen bei einer Konfluenz von 80 % mit 0,5 µg/ml Tetracyclin für 5 h induziert. Zur Kontrolle wurde die Flp-In™ T-REx™ 293-Zelllinie verwendet die analog behandelt wurde. Nach der Induktion wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe von IP-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde nach der Bradford-Methode bestimmt und der Zellextrakt auf eine Proteinkonzentration von 6 µg/µl eingestellt. Pro IP wurden 100 µl ANTI-FLAG® M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich) 3x mit je 1 ml IP-Puffer äquilibriert und mit 1,4 ml Zellextrakt für 90 min auf einem Überkoprotator bei 4 °C inkubiert. Die Matrix wurde 6x mit je 1 ml IP-Puffer gewaschen und infolgedessen in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Zur Kontrolle der IP wurde ein Western-Blot durchgeführt. Dazu wurden immunpräzipitierte Proteine von 10 µl Matrix durch Denaturierung in Proteinprobenpuffer gelöst und zusätzlich zu 10 µl Zellextrakt durch SDS-PAGE aufgetrennt. Anschließend wurden die zu analysierenden Proteine durch Western-Blot nachgewiesen. Die restlichen 90 µl der Matrix wurden mit 90 µl IP-Puffer versetzt und die kopräzipitierte RNA phenolextrahiert. Aus 90 µl Zellextrakt wurde ebenfalls durch Phenolextraktion Gesamt-RNA isoliert. Aus den wässrigen Phasen wurden die RNA mit Isopropanol gefällt. Das getrocknete RNA-Pellet wurde in 10 µl H₂O aufgenommen und mithilfe des SuperScriptIII[®] First-strand-Kits (Life Technologies) gemäß den Herstellerangaben eine reverse Transkription mit oligo(dT)₂₀-Primern durchgeführt. Der Reaktionsansatz wurde auf 120 µl mit H₂O aufgefüllt und zur Amplifikation der gewünschten cDNA eine PCR durchgeführt. Der PCR-Ansatz wurde danach mit 5 µl DNA-Probenpuffer versetzt. 20 µl davon wurden auf einem 1,5 % Agarosegel für 30 min bei 150 V aufgetrennt und DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht.

Reaktionsansatz:	PCR-Programm:	
10 µl innuMix Green PCR MasterMix (Analytic Jena)	94 °C	5 min
5 µl Primer-Mix (5'- und 3'-Primer je 1,5 µM)	94 °C	30 s
1 µl H ₂ O	60 °C	30 s
4 µl cDNA	72 °C	30 s
	72 °C	7 min
	4 °C	∞
	30 Zyklen	

IP von endogenem LARP4B aus HEK293-Zellextrakt:

Zur Immunpräzipitation von endogenem LARP4B aus HEK293-Zellextrakt wurden je 50 µl magnetischer Dynabeads ProteinG (Life Technologies) mit α-LARP4B-Antikörper und zur Kontrolle der Spezifität mit Präimmenserum gekoppelt. Aus HEK293-Zellen wurde mit IP-Puffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) Zellextrakt hergestellt und je 1,5 ml Zellextrakt (10 µg/µl Gesamtprotein) pro IP eingesetzt. Die Matrix wurde 3 h bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Anschließend wurde 6x mit IP-Puffer gewaschen. Zur Kontrolle der IP wurden immunpräzipitierte Proteine

von 5 µl Matrix durch Denaturierung in Proteinprobenpuffer gelöst und gemeinsam mit 10,5 µl Zellextrakt über SDS-PAGE aufgetrennt und LARP4B durch einen Western-Blot nachgewiesen. Von der restlichen Matrix wurde kopräzipitierte RNA isoliert. Zusätzlich wurde Gesamt-RNA aus 200 µl Zellextrakt extrahiert. Die reverse Transkription erfolgte mit dem SuperScriptIII[®] First-strand-Kit (Life Technologies) gemäß den Herstellerangaben mithilfe von oligo(dT)₂₀-Primern. Nach der Amplifikation der cDNA für die angegebenen Gene erfolgt die Visualisierung durch Ethidiumbromidfärbung im UV-Licht.

4.2.3.5 Immunfluoreszenzmikroskopie

Flp-In T-REx HeLa C8ORF33-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert und über Nacht die Expression von FLAG/HA-C8ORF33 mit 1 µg/µl Tetracyclin induziert. Nach dem Fixieren der Zellen für 30 min mit 3,7 % Formaldehyd wurde sie für 5 min mit 1x PBS gewaschen. Die Permeabilisierung erfolgte für 30 min mit 1 % BSA, 0,2 % Triton in 1x PBS woraufhin erneut gewaschen (5 min, 1x PBS) wurde. Anschließend wurde für 5 h in der Primärantikörperverdünnung (1:200) in 1 % BSA in 1x PBS inkubiert. Im Anschluss wurde 5 min mit 1x PBS gewaschen und mit der Sekundärantikörperverdünnung (1:500 in 1 % BSA in 1x PBS) 1 h inkubiert. Die Zellen wurden 5 min in 1x PBS und 5 min in Wasser gewaschen und in Vectashield Einbettmedium mit DAPI (Vector Laboratories) eingebettet. Zur Versiegelung wurden die Deckgläschen mit Nagellack auf dem Objektträger fixiert.

4.2.4 Zellbiologische Methoden

4.2.4.1 Kultivierung adhärent wachsender eukaryotischer Zelllinien

Adhärent wachsende Zelllinien wurden in dem entsprechenden Kulturmedium bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Alle 3 Tage wurde das Medium gewechselt. Beim Erreichen einer Konfluenz von 100 % wurden die Zellen passagiert. Dafür wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und mit 0,25 % Trypsin-EDTA (Life Technologies) von der Kulturschale abgelöst und in einer 1:5 bis 1:20 Verdünnung auf einer neuen Kulturschale ausgesät.

4.2.4.2 Auftauen und Einfrieren von eukaryotischen Zelllinien

Die eingefrorene Zellsuspension wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, mit Kulturmedium versetzt und die Zellen abzentrifugiert (5 min, 400 g, RT). Der Überstand wurde abgenommen, das Zellpellet mit Kulturmedium aufgenommen und die Zellen in Kulturschalen ausgesät.

Zum Einfrieren adhärent wachsender Zelllinien wurden diese mit 1x PBS gewaschen und mit 0,25 % Trypsin-EDTA (Life Technologies) von der Kulturschale abgelöst. Anschließend wurden sie in Kulturmedium aufgenommen und abzentrifugiert (5 min, 400 g, RT). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in Einfriermedium (70 % Kulturmedium, 20 % (v/v) FBS, 10 % DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Aliquots wurden auf -80 °C gekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

4.2.4.3 Herstellung von Gesamtzellextrakten aus Zellkulturen

Zur Gewinnung von Zellextrakt aus adhärent wachsenden Zellen wurden diese 1x mit 1x PBS gewaschen und mit dem entsprechenden Lysepuffer versetzt. Mithilfe eines Zellschabers wurden die Zellen vom Gefäßboden entfernt und in ein Reaktionsgefäß überführt. Nach Inkubation für 10 min auf Eis wurden Zelltrümmer durch Zentrifugation (10 min, 9300 g, 4 °C) entfernt und der Überstand abgenommen. Zur Lagerung wurde der Zellextrakt in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C aufbewahrt.

4.2.4.4 Transiente Transfektion von Plasmid-DNA

Für die Transfektion von Plasmid-DNA in eukaryotische Zelllinien wurde Nanofectin (GE Healthcare) verwendet. Die Durchführung erfolgte gemäß den Herstellerangaben.

4.2.4.5 Transiente Transfektion von siRNA

Für die Transfektion von siRNA wurden die Zellen in Transfektionsmedium (DMEM, 10 % (v/v) FBS) kultiviert. Die Transfektion erfolgte bei einer Konfluenz von 20 % mithilfe von Lipofectamine[®] RNAiMax Reagent (Life Technologies). Die Durchführung geschah gemäß Herstellerangaben. Die dabei eingesetzten Mengen für ein 6-well waren wie folgt: 75 pmol siRNA, 7,5 µl Lipofectamine RNAiMax, 125 µl Opti-MEM[®]I, 2,5 ml Transfektionsmedium. Für andere Formate wurden die entsprechenden Mengen verwendet.

4.2.4.6 Herstellung stabiler Flp-In T-REx 293-Zelllinien

Zur Generierung stabiler Flp-In T-REx 293-Zelllinien wurde das Flp-In[™] T-REx[™] Core Kit (Life Technologies) verwendet. Flp-In[™] T-REx[™]-293-Zellen in antibiotikafreiem Kulturmedium wurden bei einer Konfluenz von 40 % mit den Plasmiden pOG44 und dem jeweiligen pFRT/TO/MCS-Konstrukt in einem Verhältnis von 1:9 mit Nanofektin kotransfiziert. Nach 24 h wurden stabile Klone durch Kultivierung in Kulturmedium mit 10 µg/ml Blasticidin und 100 µg/ml Hygromycin selektioniert. Das Medium wurde alle 2 Tage gewechselt bis einzelne Klone erkennbar waren. Diese wurden vereinzelt und weiter kultiviert. Die induzierbare Expression der *getaggt*en Proteine wurde nach Induktion mit 0,5 µg/ml Tetracyclin durch einen Western-Blot überprüft. Zum Aufbewahren wurden Kryokulturen angelegt.

4.2.4.7 pulsed stable isotope labeling with amino acids in cell culture (pSILAC)

HEK293-Zellen in einem 6-well wurden mit LARP4B-siRNA beziehungsweise zur Kontrolle mit Luciferase gl2-siRNA transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden das Medium abgenommen, die Zellen 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen und in leichtem pSILAC-Medium kultiviert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen erneut 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen und die Kontrollzellen in schwerem pSILAC-Medium und die LARP4B-*knockdown*-Zellen in mittelschwerem pSILAC-Medium weiter kultiviert. Nach 24 h wurden die Zellen erneut 2x mit 1 ml 1x PBS gewaschen, 100 µl Lysepuffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris HCl pH 7,5, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % (v/v) NP-40, 1 mM DTT, 1:1000 Proteaseinhibitoren) zugegeben und Gesamtzellextrakte hergestellt. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford ermittelt. Zur Kontrolle des *knockdowns* wurden 40 µg Gesamtzellextrakt über SDS-PAGE aufgetrennt und die angegebenen Proteine mittels Western-Blot detektiert.

Die massenspektrometrische Analyse der Proben sowie die Bestimmung der Proteinratios wurde von Dr. Jens Vanselow (AG Prof. Dr. Andreas Schlosser, Rudolf-Virchow-Zentrum für Experimentelle Biomedizin, Universität Würzburg) durchgeführt. Durch Erhitzen der Lysate für 10 min bei 70 °C in NuPAGE LDS Probenpuffer (Life Technologies) mit 50 mM DTT wurden die Proteine reduziert. Zur Alkylierung wurden die Lysate für 20 min bei Raumtemperatur in 120 mM Iodacetamid inkubiert. Die Proben wurden auf ein NuPAGE® Novex® 4-12 % Bis-Tris Gradientengel (Life Technologies) geladen und aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel Coomassie gefärbt. Die Gelspuren wurden in 15 Banden geschnitten und zunächst mit 30 % Acetonitril entfärbt, mit 100 % Acetonitril geschrumpft und in einem Vakuumkonzentrator getrocknet. Der Verdau der Proteine erfolgte über Nacht bei 37 °C mit 0,1 µg Trypsin pro Gelstück in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat. Proteolytische Peptide wurden mit 5 % Ameisensäure aus den Gelstücken extrahiert.

NanoLC-MS/MS-Analysen wurden auf einem LTQ-Orbitrap Velos Pro Hybrid-Massenspektrometer, ausgestattet mit einer EASY-Spray Ionenquelle und gekoppelt mit einem EASY-nLC 1000 UHPLC-System (alles Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Peptide wurden auf die Vorsäule geladen (2 cm x 75 µm ID. PepMap C18, 3 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße) und über einen 120 min linearen Gradienten von 3 bis 30 % Acetonitril, 0.1 % Ameisensäure mit 400 nl/min auf der

analytischen Säule aufgetrennt (EASY-Spray, 25 cm x 75 µm ID, PepMap C18, 2 µm Partikelgröße, 100 Å Porengröße).

MS-Spektren wurden in der Orbitrap mit einer Auflösung von 30.000 bei 400 m/z aufgenommen; CID Fragmentationenspektren (MS/MS-Spektren) ausgewählter Peptidvorläuferionen wurden in der Ionenfalle detektiert. Die max. 15 intensivsten Peptidvorläuferionen jedes MS-Spektrums wurden datenabhängig für die MS/MS-Analyse ausgewählt. Weitere Methodenparameter waren dabei eine dynamische Ausschlussliste ohne Wiederholungen und einer Ausschlussdauer von 60 Sekunden sowie Ausschluss von einfach geladenen Ionen. Für die Peptidvorläuferselektion wurde ein Schwellenwert von 10.000 verwendet. Für die prädiktive automatische Verstärkungsregelung (AGC) wurden Zielwerte von 1e6 für MS-Spektren bzw. 1e4 für MS/MS-Spektren vorgegeben. Für die interne Kalibrierung („lock mass“) wurde die Masse des protonierten Decamethylcyclopentasiloxan (m/z 371.10124) verwendet.

Für die Identifizierung und Quantifizierung der Proteine wurden die MS-Rohdaten mit der Software MaxQuant, Version 1.5.0.25 analysiert (333). Dabei erfolgte die Datenbanksuche mit der in MaxQuant integrierten Suchmaschine Andromeda. Für die Datenbanksuche wurde die UniProt Referenzproteomdatenbank *homo sapiens* in Verbindung mit einer Datenbank verwendet, die typische Kontaminationen u.a. aus der Zellkultur enthält (334). Die Suche erfolgte dann in einer kombinierten „reverse concatenated“ Datenbank, die für jeden Eintrag auch die invertierte Sequenz enthielt und somit die Bestimmung der „false discovery rate“ (FDR) ermöglicht. Die Proteinidentifizierung wurde durch die FDR kontrolliert und auf <1 % für Protein- und Peptididentifizierung gesetzt. Zusätzlich zu den Standardeinstellungen von MaxQuant (u.a. min. 1 razor/unique Peptid für die Identifizierung, max. 2 verpasste Schnittstellen beim Verdau) wurde die Suche mit folgenden variablen Modifikationen durchgeführt: Protein N-terminale Acetylierung, Gln zu pyro-Glu-Umwandlung und Oxidation (an Met). Zur Quantifizierung pSILAC-markierter Proteine wurden der Mittelwert des log₂-transformierten Verhältnisses der Intensitäten der schwer („heavy“, H) und mittel („medium“, M) markierten Peptide für jedes Protein berechnet („log₂ H/M Verhältnis“). Proteine, für die weniger als zwei Peptidratioren vorhanden waren, wurden nicht weiter berücksichtigt. Die Proteinratios wurden für jedes Experiment normalisiert und hierfür in Intensitätsklassen mit mind. 300 Proteinen pro Klasse eingeteilt. Veränderungen in den Proteinratios wurden als signifikant

erachtet, wenn sie Ausreißer aus der Verteilung der Proteinratios dieses Experiments in ihrer Intensitätsklasse waren. Für die Identifizierung von Ausreißern (also den differentiell exprimierten Proteinen) wurde Boxplot-Statistik verwendet, potentielle Ausreißer ($>1.5x$ Interquartilsabstands, IQR) oder extreme Ausreißer ($>3x$ IQR) wurden allerdings nur dann als signifikant betrachtet, wenn die Varianz der individuellen Peptidratos des jeweiligen Proteins klein war, d.h. wenn im gekerbten Boxplot die Peptidratiokerbe nicht mit dem Mittelwert aller Peptidratiokerben einer Intensitätsklasse überlappte.

4.2.4.8 Luciferase-basierende Reporteranalysen

HEK293-Zellen in 12-well Kulturplatten wurden mit der angegebenen siRNA transfiziert. Als Kontrolle wurde GFP-siRNA verwendet. 48 h nach der Transfektion wurde das SAT1::pHA-FF-Reporterplasmid transfiziert. Nach 5 h wurden die Zellen mit 1x PBS gewaschen und 250 μ l passiver Lysepuffer (Promega) zugegeben. Die Lyse erfolgte durch Inkubation für 30 min bei RT. Die Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Nach dem Auftauen wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (10 min, 9300 g, 4 °C), der Überstand abgenommen und die Proteinkonzentration nach Bradford bestimmt. Zur Kontrolle des *knockdowns* wurden 40 μ g Gesamtprotein durch SDS-PAGE aufgetrennt und die angegebenen Proteine durch Western-Blot nachgewiesen. Zur Messung der Luciferaseaktivität wurden 20 μ l Zellextrakt (0,57 μ g/ μ l) in eine 96-well Platte überführt und die Luciferaseaktivität an einem TriStar LB 941 Luminometer (Berthold Technologies) bestimmt. Dazu wurde 50 μ l Beetle-Juice (PJK) zugegeben und die Aktivität für 10 s mit 2 s Pause gemessen.

4.2.4.9 *In vivo* RNA-Markierung durch 32 P-Inkorporation

Durchgeführt vom Institut von Prof. Dr. Nick Watkins (Universität Newcastle upon Tyne, GB). U2OS-Zellen wurden mit C8ORF33-, GRWD1- oder als Kontrolle mit HEXIM1-siRNA transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurde neusynthetisierte RNA radioaktiv markiert. Für Überexpressionsexperimente wurde die Expression von FLAG/HA-C8ORF33 in Flp-In T-REx 293 C8ORF33-Zellen mit Tetracyclin für 48 h induziert und ebenfalls neusynthetisierte RNA radioaktiv markiert. Dafür wurde das Medium entfernt und die Zellen für 1 h in phosphatfreiem DMEM +10 % FBS

kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für eine weitere Stunde in phosphatfreiem Medium kultiviert, dem ^{32}P -Orthophosphorsäure (15 $\mu\text{Ci/ml}$) zugesetzt wurde. Die Zellen wurden zweimal mit 1x PBS gewaschen und für 3 h in normalem Kulturmedium kultiviert. Durch eine Trypsinbehandlung wurden die Zellen von der Kulturschale abgelöst, abzentrifugiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. RNA wurde mithilfe von Trizol isoliert, in Wasser resuspendiert und über ein Glyoxal gel aufgetrennt. Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran geblottet und die RNA durch Ethidiumbromid im UV-Licht sichtbar gemacht. Neusynthetisierte RNA wurde durch Autoradiografie detektiert.

5 Literaturverzeichnis

1. G. W. Both, Y. Furuichi, S. Muthukrishnan, A. J. Shatkin, Ribosome binding to reovirus mRNA in protein synthesis requires 5' terminal 7-methylguanosine. *Cell* **6**, 185 (Oct, 1975).
2. C. L. Hsu, A. Stevens, Yeast cells lacking 5'→3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Molecular and cellular biology* **13**, 4826 (Aug, 1993).
3. T. L. Poole, A. Stevens, Comparison of features of the RNase activity of 5'-exonuclease-1 and 5'-exonuclease-2 of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic acids symposium series*, 79 (1995).
4. V. H. Cowling, Regulation of mRNA cap methylation. *The Biochemical journal* **425**, 295 (Jan 15, 2010).
5. C. Wei, B. Moss, 5'-Terminal capping of RNA by guanylyltransferase from HeLa cell nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 3758 (Sep, 1977).
6. C. L. Will, R. Luhrmann, Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **3**, (Jul, 2011).
7. N. J. Proudfoot, Ending the message: poly(A) signals then and now. *Genes & development* **25**, 1770 (Sep 1, 2011).
8. D. Munroe, A. Jacobson, mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Molecular and cellular biology* **10**, 3441 (Jul, 1990).
9. J. R. Nevins, J. E. Darnell, Jr., Steps in the processing of Ad2 mRNA: poly(A)+ nuclear sequences are conserved and poly(A) addition precedes splicing. *Cell* **15**, 1477 (Dec, 1978).
10. J. L. Manley, P. A. Sharp, M. L. Gefter, Rna synthesis in isolated nuclei processing of adenovirus serotype 2 late messenger rna precursors. *Journal of molecular biology* **159**, 581 (Aug 25, 1982).
11. N. J. Proudfoot, G. G. Brownlee, 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA. *Nature* **263**, 211 (Sep 16, 1976).
12. M. D. Sheets, M. Wickens, Two phases in the addition of a poly(A) tail. *Genes & development* **3**, 1401 (Sep, 1989).
13. Y. Takagaki, L. C. Ryner, J. L. Manley, Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. *Cell* **52**, 731 (Mar 11, 1988).
14. C. Y. Chen, A. B. Shyu, Mechanisms of deadenylation-dependent decay. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **2**, 167 (Mar-Apr, 2011).
15. M. Arribas-Layton, D. Wu, J. Lykke-Andersen, H. Song, Structural and functional control of the eukaryotic mRNA decapping machinery. *Biochimica et biophysica acta* **1829**, 580 (Jun-Jul, 2013).
16. D. Mukherjee *et al.*, The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *The EMBO journal* **21**, 165 (Jan 15, 2002).
17. J. S. Anderson, R. P. Parker, The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *The EMBO journal* **17**, 1497 (Mar 2, 1998).
18. A. G. Baltz *et al.*, The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Molecular cell* **46**, 674 (Jun 8, 2012).

19. A. Castello *et al.*, Insights into RNA biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. *Cell* **149**, 1393 (Jun 8, 2012).
20. W. Zhang *et al.*, Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Molecular and cellular biology* **13**, 7652 (Dec, 1993).
21. G. Brewer, An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Molecular and cellular biology* **11**, 2460 (May, 1991).
22. C. Y. Chen *et al.*, AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451 (Nov 16, 2001).
23. X. C. Fan, J. A. Steitz, Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *The EMBO journal* **17**, 3448 (Jun 15, 1998).
24. H. Le Hir, E. Izaurralde, L. E. Maquat, M. J. Moore, The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *The EMBO journal* **19**, 6860 (Dec 15, 2000).
25. L. Ballut *et al.*, The exon junction core complex is locked onto RNA by inhibition of eIF4AIII ATPase activity. *Nature structural & molecular biology* **12**, 861 (Oct, 2005).
26. A. L. Steckelberg, V. Boehm, A. M. Gromadzka, N. H. Gehring, CWC22 connects pre-mRNA splicing and exon junction complex assembly. *Cell reports* **2**, 454 (Sep 27, 2012).
27. I. Barbosa *et al.*, Human CWC22 escorts the helicase eIF4AIII to spliceosomes and promotes exon junction complex assembly. *Nature structural & molecular biology* **19**, 983 (Oct, 2012).
28. A. Alexandrov, D. Colognori, M. D. Shu, J. A. Steitz, Human spliceosomal protein CWC22 plays a role in coupling splicing to exon junction complex deposition and nonsense-mediated decay. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 21313 (Dec 26, 2012).
29. M. Wintzerith, J. Acker, S. Vicaire, M. Vigneron, C. Kedinger, Complete sequence of the human RNA polymerase II largest subunit. *Nucleic acids research* **20**, 910 (Feb 25, 1992).
30. L. A. Allison, M. Moyle, M. Shales, C. J. Ingles, Extensive homology among the largest subunits of eukaryotic and prokaryotic RNA polymerases. *Cell* **42**, 599 (Sep, 1985).
31. J. L. Corden, D. L. Cadena, J. M. Ahearn, Jr., M. E. Dahmus, A unique structure at the carboxyl terminus of the largest subunit of eukaryotic RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 7934 (Dec, 1985).
32. D. L. Cadena, M. E. Dahmus, Messenger RNA synthesis in mammalian cells is catalyzed by the phosphorylated form of RNA polymerase II. *The Journal of biological chemistry* **262**, 12468 (Sep 15, 1987).
33. M. E. Kang, M. E. Dahmus, RNA polymerases IIA and IIO have distinct roles during transcription from the TATA-less murine dihydrofolate reductase promoter. *The Journal of biological chemistry* **268**, 25033 (Nov 25, 1993).
34. Z. Yue *et al.*, Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 12898 (Nov 25, 1997).

35. S. McCracken *et al.*, 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & development* **11**, 3306 (Dec 15, 1997).
36. M. J. Mortillaro *et al.*, A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8253 (Aug 6, 1996).
37. A. Yuryev *et al.*, The C-terminal domain of the largest subunit of RNA polymerase II interacts with a novel set of serine/arginine-rich proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 6975 (Jul 9, 1996).
38. S. McCracken *et al.*, The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**, 357 (Jan 23, 1997).
39. S. H. Ahn, M. Kim, S. Buratowski, Phosphorylation of serine 2 within the RNA polymerase II C-terminal domain couples transcription and 3' end processing. *Molecular cell* **13**, 67 (Jan 16, 2004).
40. A. R. Kornblihtt *et al.*, Alternative splicing: a pivotal step between eukaryotic transcription and translation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **14**, 153 (Mar, 2013).
41. R. J. Jackson, C. U. Hellen, T. V. Pestova, The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews. Molecular cell biology* **11**, 113 (Feb, 2010).
42. R. Elkon, A. P. Ugalde, R. Agami, Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nature reviews. Genetics* **14**, 496 (Jul, 2013).
43. X. D. Fu, M. Ares, Jr., Context-dependent control of alternative splicing by RNA-binding proteins. *Nature reviews. Genetics* **15**, 689 (Oct, 2014).
44. D. R. Schoenberg, L. E. Maquat, Regulation of cytoplasmic mRNA decay. *Nature reviews. Genetics* **13**, 246 (Apr, 2012).
45. I. Abaza, F. Gebauer, Trading translation with RNA-binding proteins. *Rna* **14**, 404 (Mar, 2008).
46. I. C. Braun, E. Rohrbach, C. Schmitt, E. Izaurralde, TAP binds to the constitutive transport element (CTE) through a novel RNA-binding motif that is sufficient to promote CTE-dependent RNA export from the nucleus. *The EMBO journal* **18**, 1953 (Apr 1, 1999).
47. Y. Kang, B. R. Cullen, The human Tap protein is a nuclear mRNA export factor that contains novel RNA-binding and nucleocytoplasmic transport sequences. *Genes & development* **13**, 1126 (May 1, 1999).
48. A. Bachi *et al.*, The C-terminal domain of TAP interacts with the nuclear pore complex and promotes export of specific CTE-bearing RNA substrates. *Rna* **6**, 136 (Jan, 2000).
49. J. Katahira *et al.*, The Mex67p-mediated nuclear mRNA export pathway is conserved from yeast to human. *The EMBO journal* **18**, 2593 (May 4, 1999).
50. S. Munchow, C. Sauter, R. P. Jansen, Association of the class V myosin Myo4p with a localised messenger RNA in budding yeast depends on She proteins. *Journal of cell science* **112 (Pt 10)**, 1511 (May, 1999).
51. G. B. Gonsalvez *et al.*, RNA-protein interactions promote asymmetric sorting of the ASH1 mRNA ribonucleoprotein complex. *Rna* **9**, 1383 (Nov, 2003).
52. C. Kruse *et al.*, Ribonucleoprotein-dependent localization of the yeast class V myosin Myo4p. *The Journal of cell biology* **159**, 971 (Dec 23, 2002).

53. L. H. Apponi *et al.*, Loss of nuclear poly(A)-binding protein 1 causes defects in myogenesis and mRNA biogenesis. *Human molecular genetics* **19**, 1058 (Mar 15, 2010).
54. I. Kashima *et al.*, Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes & development* **20**, 355 (Feb 1, 2006).
55. Y. F. Chang, J. S. Imam, M. F. Wilkinson, The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annual review of biochemistry* **76**, 51 (2007).
56. L. E. Maquat, Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nature reviews. Molecular cell biology* **5**, 89 (Feb, 2004).
57. A. Castello, B. Fischer, M. W. Hentze, T. Preiss, RNA-binding proteins in Mendelian disease. *Trends in genetics : TIG* **29**, 318 (May, 2013).
58. K. E. Lukong, K. W. Chang, E. W. Khandjian, S. Richard, RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends in genetics : TIG* **24**, 416 (Aug, 2008).
59. J. Dalmau, H. M. Furneaux, R. J. Gralla, M. G. Kris, J. B. Posner, Detection of the anti-Hu antibody in the serum of patients with small cell lung cancer--a quantitative western blot analysis. *Annals of neurology* **27**, 544 (May, 1990).
60. R. B. Darnell, J. B. Posner, Paraneoplastic syndromes involving the nervous system. *The New England journal of medicine* **349**, 1543 (Oct 16, 2003).
61. K. De Boulle *et al.*, A point mutation in the FMR-1 gene associated with fragile X mental retardation. *Nature genetics* **3**, 31 (Jan, 1993).
62. N. M. Kuyumcu-Martinez, G. S. Wang, T. A. Cooper, Increased steady-state levels of CUGBP1 in myotonic dystrophy 1 are due to PKC-mediated hyperphosphorylation. *Molecular cell* **28**, 68 (Oct 12, 2007).
63. I. Oberle *et al.*, Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* **252**, 1097 (May 24, 1991).
64. M. Pieretti *et al.*, Absence of expression of the FMR-1 gene in fragile X syndrome. *Cell* **66**, 817 (Aug 23, 1991).
65. A. Bergin *et al.*, Identification and characterization of a mouse homologue of the spinal muscular atrophy-determining gene, survival motor neuron. *Gene* **204**, 47 (Dec 19, 1997).
66. Z. Zhang *et al.*, SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing. *Cell* **133**, 585 (May 16, 2008).
67. F. Lotti *et al.*, An SMN-dependent U12 splicing event essential for motor circuit function. *Cell* **151**, 440 (Oct 12, 2012).
68. J. Buxton *et al.*, Detection of an unstable fragment of DNA specific to individuals with myotonic dystrophy. *Nature* **355**, 547 (Feb 6, 1992).
69. C. T. Caskey, A. Pizzuti, Y. H. Fu, R. G. Fenwick, Jr., D. L. Nelson, Triplet repeat mutations in human disease. *Science* **256**, 784 (May 8, 1992).
70. Y. H. Fu *et al.*, An unstable triplet repeat in a gene related to myotonic muscular dystrophy. *Science* **255**, 1256 (Mar 6, 1992).
71. H. G. Harley *et al.*, Expansion of an unstable DNA region and phenotypic variation in myotonic dystrophy. *Nature* **355**, 545 (Feb 6, 1992).
72. M. Mahadevan *et al.*, Myotonic dystrophy mutation: an unstable CTG repeat in the 3' untranslated region of the gene. *Science* **255**, 1253 (Mar 6, 1992).
73. L. P. Ranum, T. A. Cooper, RNA-mediated neuromuscular disorders. *Annual review of neuroscience* **29**, 259 (2006).
74. H. Jiang, A. Mankodi, M. S. Swanson, R. T. Moxley, C. A. Thornton, Myotonic dystrophy type 1 is associated with nuclear foci of mutant RNA, sequestration of

- muscleblind proteins and deregulated alternative splicing in neurons. *Human molecular genetics* **13**, 3079 (Dec 15, 2004).
75. C. K. Iwahashi *et al.*, Protein composition of the intranuclear inclusions of FXTAS. *Brain : a journal of neurology* **129**, 256 (Jan, 2006).
76. M. L. Anko, K. M. Neugebauer, RNA-protein interactions in vivo: global gets specific. *Trends in biochemical sciences* **37**, 255 (Jul, 2012).
77. S. F. Mitchell, R. Parker, Principles and properties of eukaryotic mRNPs. *Molecular cell* **54**, 547 (May 22, 2014).
78. S. A. Adam, T. Nakagawa, M. S. Swanson, T. K. Woodruff, G. Dreyfuss, mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Molecular and cellular biology* **6**, 2932 (Aug, 1986).
79. Y. Muto, S. Yokoyama, Structural insight into RNA recognition motifs: versatile molecular Lego building blocks for biological systems. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **3**, 229 (Mar-Apr, 2012).
80. A. Clery, M. Blatter, F. H. Allain, RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Current opinion in structural biology* **18**, 290 (Jun, 2008).
81. E. Birney, S. Kumar, A. R. Krainer, Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic acids research* **21**, 5803 (Dec 25, 1993).
82. C. L. Kielkopf, N. A. Rodionova, M. R. Green, S. K. Burley, A novel peptide recognition mode revealed by the X-ray structure of a core U2AF35/U2AF65 heterodimer. *Cell* **106**, 595 (Sep 7, 2001).
83. A. A. Putnam, E. Jankowsky, DEAD-box helicases as integrators of RNA, nucleotide and protein binding. *Biochimica et biophysica acta* **1829**, 884 (Aug, 2013).
84. P. Linder, F. V. Fuller-Pace, Looking back on the birth of DEAD-box RNA helicases. *Biochimica et biophysica acta* **1829**, 750 (Aug, 2013).
85. O. Kotik-Kogan, E. R. Valentine, D. Sanfelice, M. R. Conte, S. Curry, Structural analysis reveals conformational plasticity in the recognition of RNA 3' ends by the human La protein. *Structure* **16**, 852 (Jun, 2008).
86. T. Sengoku, O. Nureki, A. Nakamura, S. Kobayashi, S. Yokoyama, Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein Drosophila Vasa. *Cell* **125**, 287 (Apr 21, 2006).
87. H. A. Lewis *et al.*, Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell* **100**, 323 (Feb 4, 2000).
88. R. Valverde, L. Edwards, L. Regan, Structure and function of KH domains. *The FEBS journal* **275**, 2712 (Jun, 2008).
89. H. Siomi, M. J. Matunis, W. M. Michael, G. Dreyfuss, The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic acids research* **21**, 1193 (Mar 11, 1993).
90. H. Siomi, M. C. Siomi, R. L. Nussbaum, G. Dreyfuss, The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* **74**, 291 (Jul 30, 1993).
91. N. V. Grishin, KH domain: one motif, two folds. *Nucleic acids research* **29**, 638 (Feb 1, 2001).
92. J. Miller, A. D. McLachlan, A. Klug, Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *The EMBO journal* **4**, 1609 (Jun, 1985).

93. R. S. Brown, C. Sander, P. Argos, The primary structure of transcription factor TFIIIA has 12 consecutive repeats. *FEBS letters* **186**, 271 (Jul 8, 1985).
94. J. H. Laity, B. M. Lee, P. E. Wright, Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Current opinion in structural biology* **11**, 39 (Feb, 2001).
95. T. M. Hall, Multiple modes of RNA recognition by zinc finger proteins. *Current opinion in structural biology* **15**, 367 (Jun, 2005).
96. E. Carballo, W. S. Lai, P. J. Blackshear, Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science* **281**, 1001 (Aug 14, 1998).
97. B. P. Hudson, M. A. Martinez-Yamout, H. J. Dyson, P. E. Wright, Recognition of the mRNA AU-rich element by the zinc finger domain of TIS11d. *Nature structural & molecular biology* **11**, 257 (Mar, 2004).
98. M. Kiledjian, G. Dreyfuss, Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *The EMBO journal* **11**, 2655 (Jul, 1992).
99. L. Ghisolfi, G. Joseph, F. Amalric, M. Erard, The glycine-rich domain of nucleolin has an unusual supersecondary structure responsible for its RNA-helix-destabilizing properties. *The Journal of biological chemistry* **267**, 2955 (Feb 15, 1992).
100. P. Thandapani, T. R. O'Connor, T. L. Bailey, S. Richard, Defining the RGG/RG motif. *Molecular cell* **50**, 613 (Jun 6, 2013).
101. M. A. Lischwe, R. G. Cook, Y. S. Ahn, L. C. Yeoman, H. Busch, Clustering of glycine and NG,NG-dimethylarginine in nucleolar protein C23. *Biochemistry* **24**, 6025 (Oct 22, 1985).
102. F. M. Boisvert, C. A. Chenard, S. Richard, Protein interfaces in signaling regulated by arginine methylation. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* **2005**, re2 (Feb 15, 2005).
103. M. C. Yu, The Role of Protein Arginine Methylation in mRNP Dynamics. *Molecular biology international* **2011**, 163827 (2011).
104. C. Schaeffer *et al.*, The fragile X mental retardation protein binds specifically to its mRNA via a purine quartet motif. *The EMBO journal* **20**, 4803 (Sep 3, 2001).
105. A. Ramos, D. Hollingworth, A. Pastore, G-quartet-dependent recognition between the FMRP RGG box and RNA. *Rna* **9**, 1198 (Oct, 2003).
106. S. Pinol-Roma, M. S. Swanson, J. G. Gall, G. Dreyfuss, A novel heterogeneous nuclear RNP protein with a unique distribution on nascent transcripts. *The Journal of cell biology* **109**, 2575 (Dec, 1989).
107. G. P. Leser, J. Escara-Wilke, T. E. Martin, Monoclonal antibodies to heterogeneous nuclear RNA-protein complexes. The core proteins comprise a conserved group of related polypeptides. *The Journal of biological chemistry* **259**, 1827 (Feb 10, 1984).
108. S. Pinol-Roma, G. Dreyfuss, Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **355**, 730 (Feb 20, 1992).
109. A. Ghetti, S. Pinol-Roma, W. M. Michael, C. Morandi, G. Dreyfuss, hnRNP I, the polypyrimidine tract-binding protein: distinct nuclear localization and association with hnRNAs. *Nucleic acids research* **20**, 3671 (Jul 25, 1992).
110. Y. D. Choi, G. Dreyfuss, Monoclonal antibody characterization of the C proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes in vertebrate cells. *The Journal of cell biology* **99**, 1997 (Dec, 1984).
111. M. J. Matunis, W. M. Michael, G. Dreyfuss, Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Molecular and cellular biology* **12**, 164 (Jan, 1992).
112. G. Dreyfuss, Y. D. Choi, S. A. Adam, Characterization of heterogeneous nuclear RNA-protein complexes in vivo with monoclonal antibodies. *Molecular and cellular biology* **4**, 1104 (Jun, 1984).

113. A. L. Beyer, M. E. Christensen, B. W. Walker, W. M. LeStourgeon, Identification and characterization of the packaging proteins of core 40S hnRNP particles. *Cell* **11**, 127 (May, 1977).
114. H. E. Wilk, H. Werr, D. Friedrich, H. H. Kiltz, K. P. Schafer, The core proteins of 35S hnRNP complexes. Characterization of nine different species. *European journal of biochemistry / FEBS* **146**, 71 (Jan 2, 1985).
115. J. Stevenin, H. Gallinaro-Matringe, R. Gattoni, M. Jacob, Complexity of the structure of particles containing heterogeneous nuclear RNA as demonstrated by ribonuclease treatment. *European journal of biochemistry / FEBS* **74**, 589 (Apr 15, 1977).
116. S. Pinol-Roma, Y. D. Choi, M. J. Matunis, G. Dreyfuss, Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes & development* **2**, 215 (Feb, 1988).
117. C. A. van Eekelen, T. Riemen, W. J. van Venrooij, Specificity in the interaction of hnRNA and mRNA with proteins as revealed by in vivo cross linking. *FEBS letters* **130**, 223 (Aug 3, 1981).
118. Y. D. Choi, G. Dreyfuss, Isolation of the heterogeneous nuclear RNA-ribonucleoprotein complex (hnRNP): a unique supramolecular assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **81**, 7471 (Dec, 1984).
119. G. Dreyfuss, M. J. Matunis, S. Pinol-Roma, C. G. Burd, hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annual review of biochemistry* **62**, 289 (1993).
120. M. Huang *et al.*, The C-protein tetramer binds 230 to 240 nucleotides of pre-mRNA and nucleates the assembly of 40S heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles. *Molecular and cellular biology* **14**, 518 (Jan, 1994).
121. M. S. Swanson, T. Y. Nakagawa, K. LeVan, G. Dreyfuss, Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. *Molecular and cellular biology* **7**, 1731 (May, 1987).
122. A. Kumar, K. R. Williams, W. Szer, Purification and domain structure of core hnRNP proteins A1 and A2 and their relationship to single-stranded DNA-binding proteins. *The Journal of biological chemistry* **261**, 11266 (Aug 25, 1986).
123. C. G. Burd, M. S. Swanson, M. Gorlach, G. Dreyfuss, Primary structures of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2, B1, and C2 proteins: a diversity of RNA binding proteins is generated by small peptide inserts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 9788 (Dec, 1989).
124. G. Biamonti *et al.*, Isolation of an active gene encoding human hnRNP protein A1. Evidence for alternative splicing. *Journal of molecular biology* **207**, 491 (Jun 5, 1989).
125. S. P. Han, Y. H. Tang, R. Smith, Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *The Biochemical journal* **430**, 379 (Sep 15, 2010).
126. Y. D. Choi, P. J. Grabowski, P. A. Sharp, G. Dreyfuss, Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins: role in RNA splicing. *Science* **231**, 1534 (Mar 28, 1986).
127. H. Sierakowska, W. Szer, P. J. Furdon, R. Kole, Antibodies to hnRNP core proteins inhibit in vitro splicing of human beta-globin pre-mRNA. *Nucleic acids research* **14**, 5241 (Jul 11, 1986).
128. A. Gil, P. A. Sharp, S. F. Jamison, M. A. Garcia-Blanco, Characterization of cDNAs encoding the polypyrimidine tract-binding protein. *Genes & development* **5**, 1224 (Jul, 1991).

129. M. P. Mullen, C. W. Smith, J. G. Patton, B. Nadal-Ginard, Alpha-tropomyosin mutually exclusive exon selection: competition between branchpoint/polypyrimidine tracts determines default exon choice. *Genes & development* **5**, 642 (Apr, 1991).
130. J. G. Patton, S. A. Mayer, P. Tempst, B. Nadal-Ginard, Characterization and molecular cloning of polypyrimidine tract-binding protein: a component of a complex necessary for pre-mRNA splicing. *Genes & development* **5**, 1237 (Jul, 1991).
131. A. Mayeda, A. R. Krainer, Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell* **68**, 365 (Jan 24, 1992).
132. H. Ge, J. L. Manley, A protein factor, ASF, controls cell-specific alternative splicing of SV40 early pre-mRNA in vitro. *Cell* **62**, 25 (Jul 13, 1990).
133. J. E. Harper, J. L. Manley, Multiple activities of the human splicing factor ASF. *Gene expression* **2**, 19 (1992).
134. J. Zhu, A. Mayeda, A. R. Krainer, Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Molecular cell* **8**, 1351 (Dec, 2001).
135. T. O. Tange, C. K. Damgaard, S. Guth, J. Valcarcel, J. Kjems, The hnRNP A1 protein regulates HIV-1 tat splicing via a novel intron silencer element. *The EMBO journal* **20**, 5748 (Oct 15, 2001).
136. A. E. House, K. W. Lynch, An exonic splicing silencer represses spliceosome assembly after ATP-dependent exon recognition. *Nature structural & molecular biology* **13**, 937 (Oct, 2006).
137. R. Martinez-Contreras *et al.*, Intronic binding sites for hnRNP A/B and hnRNP F/H proteins stimulate pre-mRNA splicing. *PLoS biology* **4**, e21 (Feb, 2006).
138. B. Chabot, M. Blanchette, I. Lapierre, H. La Branche, An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Molecular and cellular biology* **17**, 1776 (Apr, 1997).
139. S. Hutchison, C. LeBel, M. Blanchette, B. Chabot, Distinct sets of adjacent heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) A1/A2 binding sites control 5' splice site selection in the hnRNP A1 mRNA precursor. *The Journal of biological chemistry* **277**, 29745 (Aug 16, 2002).
140. S. Sharma, L. A. Kohlstaedt, A. Damianov, D. C. Rio, D. L. Black, Polypyrimidine tract binding protein controls the transition from exon definition to an intron defined spliceosome. *Nature structural & molecular biology* **15**, 183 (Feb, 2008).
141. A. J. Matlin, J. Southby, C. Gooding, C. W. Smith, Repression of alpha-actinin SM exon splicing by assisted binding of PTB to the polypyrimidine tract. *Rna* **13**, 1214 (Aug, 2007).
142. R. Lamichhane *et al.*, RNA looping by PTB: Evidence using FRET and NMR spectroscopy for a role in splicing repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 4105 (Mar 2, 2010).
143. Y. Xue *et al.*, Genome-wide analysis of PTB-RNA interactions reveals a strategy used by the general splicing repressor to modulate exon inclusion or skipping. *Molecular cell* **36**, 996 (Dec 25, 2009).
144. J. P. Venables *et al.*, RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2beta and affect splicing. *Human molecular genetics* **9**, 685 (Mar 22, 2000).
145. Y. Hofmann, B. Wirth, hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Human molecular genetics* **11**, 2037 (Aug 15, 2002).

146. M. T. Nasim, T. K. Chernova, H. M. Chowdhury, B. G. Yue, I. C. Eperon, HnRNP G and Tra2beta: opposite effects on splicing matched by antagonism in RNA binding. *Human molecular genetics* **12**, 1337 (Jun 1, 2003).
147. M. B. Roth, A. M. Zahler, J. A. Stolk, A conserved family of nuclear phosphoproteins localized to sites of polymerase II transcription. *The Journal of cell biology* **115**, 587 (Nov, 1991).
148. A. R. Krainer, G. C. Conway, D. Kozak, Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. *Genes & development* **4**, 1158 (Jul, 1990).
149. A. M. Zahler, W. S. Lane, J. A. Stolk, M. B. Roth, SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. *Genes & development* **6**, 837 (May, 1992).
150. L. Boucher, C. A. Ouzounis, A. J. Enright, B. J. Blencowe, A genome-wide survey of RS domain proteins. *Rna* **7**, 1693 (Dec, 2001).
151. H. Ge, P. Zuo, J. L. Manley, Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with Drosophila regulators. *Cell* **66**, 373 (Jul 26, 1991).
152. A. R. Krainer, A. Mayeda, D. Kozak, G. Binns, Functional expression of cloned human splicing factor SF2: homology to RNA-binding proteins, U1 70K, and Drosophila splicing regulators. *Cell* **66**, 383 (Jul 26, 1991).
153. R. A. Spritz *et al.*, The human U1-70K snRNP protein: cDNA cloning, chromosomal localization, expression, alternative splicing and RNA-binding. *Nucleic acids research* **15**, 10373 (Dec 23, 1987).
154. H. Theissen *et al.*, Cloning of the human cDNA for the U1 RNA-associated 70K protein. *The EMBO journal* **5**, 3209 (Dec 1, 1986).
155. J. L. Manley, A. R. Krainer, A rational nomenclature for serine/arginine-rich protein splicing factors (SR proteins). *Genes & development* **24**, 1073 (Jun 1, 2010).
156. J. Y. Wu, T. Maniatis, Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell* **75**, 1061 (Dec 17, 1993).
157. J. D. Kohtz *et al.*, Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature* **368**, 119 (Mar 10, 1994).
158. J. F. Caceres, T. Misteli, G. R. Sreaton, D. L. Spector, A. R. Krainer, Role of the modular domains of SR proteins in subnuclear localization and alternative splicing specificity. *The Journal of cell biology* **138**, 225 (Jul 28, 1997).
159. M. C. Lai, R. I. Lin, S. Y. Huang, C. W. Tsai, W. Y. Tarn, A human importin-beta family protein, transportin-SR2, interacts with the phosphorylated RS domain of SR proteins. *The Journal of biological chemistry* **275**, 7950 (Mar 17, 2000).
160. S. L. Chew, H. X. Liu, A. Mayeda, A. R. Krainer, Evidence for the function of an exonic splicing enhancer after the first catalytic step of pre-mRNA splicing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **96**, 10655 (Sep 14, 1999).
161. H. Shen, J. L. Kan, M. R. Green, Arginine-serine-rich domains bound at splicing enhancers contact the branchpoint to promote prespliceosome assembly. *Molecular cell* **13**, 367 (Feb 13, 2004).
162. H. Shen, M. R. Green, A pathway of sequential arginine-serine-rich domain-splicing signal interactions during mammalian spliceosome assembly. *Molecular cell* **16**, 363 (Nov 5, 2004).
163. Y. Cavaloc, C. F. Bourgeois, L. Kister, J. Stevenin, The splicing factors 9G8 and SRp20 transactivate splicing through different and specific enhancers. *Rna* **5**, 468 (Mar, 1999).

164. H. X. Liu, M. Zhang, A. R. Krainer, Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes & development* **12**, 1998 (Jul 1, 1998).
165. T. D. Schaal, T. Maniatis, Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Molecular and cellular biology* **19**, 1705 (Mar, 1999).
166. R. Tacke, Y. Chen, J. L. Manley, Sequence-specific RNA binding by an SR protein requires RS domain phosphorylation: creation of an SRp40-specific splicing enhancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 1148 (Feb 18, 1997).
167. E. C. Ibrahim, T. D. Schaal, K. J. Hertel, R. Reed, T. Maniatis, Serine/arginine-rich protein-dependent suppression of exon skipping by exonic splicing enhancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5002 (Apr 5, 2005).
168. Y. Huang, J. A. Steitz, Splicing factors SRp20 and 9G8 promote the nucleocytoplasmic export of mRNA. *Molecular cell* **7**, 899 (Apr, 2001).
169. J. R. Sanford, N. K. Gray, K. Beckmann, J. F. Caceres, A novel role for shuttling SR proteins in mRNA translation. *Genes & development* **18**, 755 (Apr 1, 2004).
170. K. M. Bedard, S. Daijogo, B. L. Semler, A nucleo-cytoplasmic SR protein functions in viral IRES-mediated translation initiation. *The EMBO journal* **26**, 459 (Jan 24, 2007).
171. J. E. Swartz, Y. C. Bor, Y. Misawa, D. Rekosh, M. L. Hammarskjold, The shuttling SR protein 9G8 plays a role in translation of unspliced mRNA containing a constitutive transport element. *The Journal of biological chemistry* **282**, 19844 (Jul 6, 2007).
172. G. Michlewski, J. R. Sanford, J. F. Caceres, The splicing factor SF2/ASF regulates translation initiation by enhancing phosphorylation of 4E-BP1. *Molecular cell* **30**, 179 (Apr 25, 2008).
173. J. Dalmau, H. M. Furneaux, C. Cordon-Cardo, J. B. Posner, The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *The American journal of pathology* **141**, 881 (Oct, 1992).
174. A. Szabo *et al.*, HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal. *Cell* **67**, 325 (Oct 18, 1991).
175. W. J. Ma, S. Cheng, C. Campbell, A. Wright, H. Furneaux, Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *The Journal of biological chemistry* **271**, 8144 (Apr 5, 1996).
176. H. J. Okano, R. B. Darnell, A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **17**, 3024 (May 1, 1997).
177. A. C. Beckel-Mitchener, A. Miera, R. Keller, N. I. Perrone-Bizzozero, Poly(A) tail length-dependent stabilization of GAP-43 mRNA by the RNA-binding protein HuD. *The Journal of biological chemistry* **277**, 27996 (Aug 2, 2002).
178. T. D. Levine, F. Gao, P. H. King, L. G. Andrews, J. D. Keene, Hel-N1: an autoimmune RNA-binding protein with specificity for 3' uridylylate-rich untranslated regions of growth factor mRNAs. *Molecular and cellular biology* **13**, 3494 (Jun, 1993).
179. S. Chung, L. Jiang, S. Cheng, H. Furneaux, Purification and properties of HuD, a neuronal RNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **271**, 11518 (May 10, 1996).

180. V. E. Myer, X. C. Fan, J. A. Steitz, Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *The EMBO journal* **16**, 2130 (Apr 15, 1997).
181. C. Y. Chen, N. Xu, A. B. Shyu, Highly selective actions of HuR in antagonizing AU-rich element-mediated mRNA destabilization. *Molecular and cellular biology* **22**, 7268 (Oct, 2002).
182. I. Lopez de Silanes, M. Zhan, A. Lal, X. Yang, M. Gorospe, Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 2987 (Mar 2, 2004).
183. S. S. Peng, C. Y. Chen, N. Xu, A. B. Shyu, RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *The EMBO journal* **17**, 3461 (Jun 15, 1998).
184. C. D. Mobarak *et al.*, The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression, and PKC-dependent neurite outgrowth in PC12 cells. *Molecular biology of the cell* **11**, 3191 (Sep, 2000).
185. R. G. Jain, L. G. Andrews, K. M. McGowan, P. H. Pekala, J. D. Keene, Ectopic expression of Hel-N1, an RNA-binding protein, increases glucose transporter (GLUT1) expression in 3T3-L1 adipocytes. *Molecular and cellular biology* **17**, 954 (Feb, 1997).
186. N. S. Levy, S. Chung, H. Furneaux, A. P. Levy, Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *The Journal of biological chemistry* **273**, 6417 (Mar 13, 1998).
187. U. Atasoy *et al.*, Regulation of eotaxin gene expression by TNF-alpha and IL-4 through mRNA stabilization: involvement of the RNA-binding protein HuR. *Journal of immunology* **171**, 4369 (Oct 15, 2003).
188. F. Bolognani *et al.*, In vivo post-transcriptional regulation of GAP-43 mRNA by overexpression of the RNA-binding protein HuD. *Journal of neurochemistry* **96**, 790 (Feb, 2006).
189. D. Antic, N. Lu, J. D. Keene, ELAV tumor antigen, Hel-N1, increases translation of neurofilament M mRNA and induces formation of neurites in human teratocarcinoma cells. *Genes & development* **13**, 449 (Feb 15, 1999).
190. M. Kullmann, U. Gopfert, B. Siewe, L. Hengst, ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes & development* **16**, 3087 (Dec 1, 2002).
191. H. Zhu, R. A. Hasman, V. A. Barron, G. Luo, H. Lou, A nuclear function of Hu proteins as neuron-specific alternative RNA processing regulators. *Molecular biology of the cell* **17**, 5105 (Dec, 2006).
192. H. Zhu, H. L. Zhou, R. A. Hasman, H. Lou, Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *The Journal of biological chemistry* **282**, 2203 (Jan 26, 2007).
193. H. Zhu, M. N. Hinman, R. A. Hasman, P. Mehta, H. Lou, Regulation of neuron-specific alternative splicing of neurofibromatosis type 1 pre-mRNA. *Molecular and cellular biology* **28**, 1240 (Feb, 2008).
194. D. Bellavia *et al.*, Notch3 and the Notch3-upregulated RNA-binding protein HuD regulate Ikaros alternative splicing. *The EMBO journal* **26**, 1670 (Mar 21, 2007).
195. C. Bousquet-Antonelli, J. M. Deragon, A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *Rna* **15**, 750 (May, 2009).
196. C. Alfano *et al.*, Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nature structural & molecular biology* **11**, 323 (Apr, 2004).

197. G. Dong, G. Chakshusmathi, S. L. Wolin, K. M. Reinisch, Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *The EMBO journal* **23**, 1000 (Mar 10, 2004).
198. M. Teplova *et al.*, Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Molecular cell* **21**, 75 (Jan 6, 2006).
199. S. Horke, K. Reumann, C. Schulze, F. Grosse, T. Heise, The La motif and the RNA recognition motifs of human La autoantigen contribute individually to RNA recognition and subcellular localization. *The Journal of biological chemistry* **279**, 50302 (Nov 26, 2004).
200. K. S. Gajiwala, S. K. Burley, Winged helix proteins. *Current opinion in structural biology* **10**, 110 (Feb, 2000).
201. A. Jacks *et al.*, Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure* **11**, 833 (Jul, 2003).
202. F. H. Simons, F. J. Broers, W. J. Van Venrooij, G. J. Pruijn, Characterization of cis-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen. *Experimental cell research* **224**, 224 (May 1, 1996).
203. M. Akizuki, R. Powers, H. R. Holman, A soluble acidic protein of the cell nucleus which reacts with serum from patients with systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *The Journal of clinical investigation* **59**, 264 (Feb, 1977).
204. M. A. Alspaugh, E. M. Tan, Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. *The Journal of clinical investigation* **55**, 1067 (May, 1975).
205. M. Mattioli, M. Reichlin, Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis and rheumatism* **17**, 421 (Jul-Aug, 1974).
206. J. Rinke, J. A. Steitz, Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. *Nucleic acids research* **13**, 2617 (Apr 11, 1985).
207. G. Boire, J. Craft, Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *The Journal of clinical investigation* **85**, 1182 (Apr, 1990).
208. G. J. Pruijn, R. L. Slobbe, W. J. van Venrooij, Analysis of protein--RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes. *Nucleic acids research* **19**, 5173 (Oct 11, 1991).
209. S. L. French *et al.*, Visual analysis of the yeast 5S rRNA gene transcriptome: regulation and role of La protein. *Molecular and cellular biology* **28**, 4576 (Jul, 2008).
210. J. Rinke, J. A. Steitz, Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* **29**, 149 (May, 1982).
211. M. R. Lerner, N. C. Andrews, G. Miller, J. A. Steitz, Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **78**, 805 (Feb, 1981).
212. M. R. Lerner, J. A. Boyle, J. A. Hardin, J. A. Steitz, Two novel classes of small ribonucleoproteins detected by antibodies associated with lupus erythematosus. *Science* **211**, 400 (Jan 23, 1981).
213. A. M. Francoeur, M. B. Mathews, Interaction between VA RNA and the lupus antigen La: formation of a ribonucleoprotein particle in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 6772 (Nov, 1982).

214. M. D. Rosa, E. Gottlieb, M. R. Lerner, J. A. Steitz, Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAIL. *Molecular and cellular biology* **1**, 785 (Sep, 1981).
215. J. C. Chambers, M. G. Kurilla, J. D. Keene, Association between the 7 S RNA and the lupus La protein varies among cell types. *The Journal of biological chemistry* **258**, 11438 (Oct 10, 1983).
216. C. Hashimoto, J. A. Steitz, Sequential association of nucleolar 7-2 RNA with two different autoantigens. *The Journal of biological chemistry* **258**, 1379 (Feb 10, 1983).
217. J. P. Hendrick, S. L. Wolin, J. Rinke, M. R. Lerner, J. A. Steitz, Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Molecular and cellular biology* **1**, 1138 (Dec, 1981).
218. M. B. Mathews, A. M. Francoeur, La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylate tail of a small RNA. *Molecular and cellular biology* **4**, 1134 (Jun, 1984).
219. R. Reddy, D. Henning, E. Tan, H. Busch, Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA). *The Journal of biological chemistry* **258**, 8352 (Jul 10, 1983).
220. J. E. Stefano, Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* **36**, 145 (Jan, 1984).
221. M. P. Terns, E. Lund, J. E. Dahlberg, 3'-end-dependent formation of U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in *Xenopus laevis* oocyte nuclei. *Molecular and cellular biology* **12**, 3032 (Jul, 1992).
222. C. J. Yoo, S. L. Wolin, The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* **89**, 393 (May 2, 1997).
223. G. Chakshusmathi, S. D. Kim, D. A. Rubinson, S. L. Wolin, A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. *The EMBO journal* **22**, 6562 (Dec 15, 2003).
224. L. A. Copela, G. Chakshusmathi, R. L. Sherrer, S. L. Wolin, The La protein functions redundantly with tRNA modification enzymes to ensure tRNA structural stability. *Rna* **12**, 644 (Apr, 2006).
225. B. K. Pannone, S. D. Kim, D. A. Noe, S. L. Wolin, Multiple functional interactions between components of the Lsm2-Lsm8 complex, U6 snRNA, and the yeast La protein. *Genetics* **158**, 187 (May, 2001).
226. B. K. Pannone, D. Xue, S. L. Wolin, A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. *The EMBO journal* **17**, 7442 (Dec 15, 1998).
227. J. Kufel *et al.*, Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. *Molecular and cellular biology* **20**, 5415 (Aug, 2000).
228. W. C. Boelens, I. Palacios, I. W. Mattaj, Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. *Rna* **1**, 273 (May, 1995).
229. C. Grimm, E. Lund, J. E. Dahlberg, In vivo selection of RNAs that localize in the nucleus. *The EMBO journal* **16**, 793 (Feb 17, 1997).
230. F. H. Simons, S. A. Rutjes, W. J. van Venrooij, G. J. Pruijn, The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA. *Rna* **2**, 264 (Mar, 1996).
231. J. Anderson *et al.*, The essential Gcd10p-Gcd14p nuclear complex is required for 1-methyladenosine modification and maturation of initiator methionyl-tRNA. *Genes & development* **12**, 3650 (Dec 1, 1998).

232. A. Belisova *et al.*, RNA chaperone activity of protein components of human Ro RNPs. *Rna* **11**, 1084 (Jul, 2005).
233. D. Xue, D. A. Rubinson, B. K. Pannone, C. J. Yoo, S. L. Wolin, U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *The EMBO journal* **19**, 1650 (Apr 3, 2000).
234. L. A. Copela, C. F. Fernandez, R. L. Sherrer, S. L. Wolin, Competition between the Rex1 exonuclease and the La protein affects both Trf4p-mediated RNA quality control and pre-tRNA maturation. *Rna* **14**, 1214 (Jun, 2008).
235. M. Nashimoto, C. Nashimoto, M. Tamura, R. L. Kaspar, K. Ochi, The inhibitory effect of the autoantigen La on in vitro 3' processing of mammalian precursor tRNAs. *Journal of molecular biology* **312**, 975 (Oct 5, 2001).
236. D. J. Van Horn, C. J. Yoo, D. Xue, H. Shi, S. L. Wolin, The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *Rna* **3**, 1434 (Dec, 1997).
237. W. J. Habets, J. H. den Brok, A. M. Boerbooms, L. B. van de Putte, W. J. van Venrooij, Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. *The EMBO journal* **2**, 1625 (1983).
238. J. M. Raats *et al.*, Human recombinant anti-La (SS-B) autoantibodies demonstrate the accumulation of phosphoserine-366-containing la isoforms in nucleoplasmic speckles. *European journal of cell biology* **82**, 131 (Mar, 2003).
239. F. H. Simons, G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, Analysis of the intracellular localization and assembly of Ro ribonucleoprotein particles by microinjection into *Xenopus laevis* oocytes. *The Journal of cell biology* **125**, 981 (Jun, 1994).
240. M. Bachmann, K. Pfeifer, H. C. Schroder, W. E. Muller, The La antigen shuttles between the nucleus and the cytoplasm in CV-1 cells. *Molecular and cellular biochemistry* **85**, 103 (Feb 21, 1989).
241. V. Fok, K. Friend, J. A. Steitz, Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *The Journal of cell biology* **173**, 319 (May 8, 2006).
242. R. V. Intine, S. A. Tenenbaum, A. L. Sakulich, J. D. Keene, R. J. Maraia, Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Molecular cell* **12**, 1301 (Nov, 2003).
243. R. Peek, G. J. Pruijn, A. J. van der Kemp, W. J. van Venrooij, Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *Journal of cell science* **106** (Pt 3), 929 (Nov, 1993).
244. Y. N. Chang, D. J. Kenan, J. D. Keene, A. Gatignol, K. T. Jeang, Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. *Journal of virology* **68**, 7008 (Nov, 1994).
245. K. Meerovitch, J. Pelletier, N. Sonenberg, A cellular protein that binds to the 5'-noncoding region of poliovirus RNA: implications for internal translation initiation. *Genes & development* **3**, 1026 (Jul, 1989).
246. Y. V. Svitkin *et al.*, Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus translation in vitro. *Journal of virology* **68**, 1544 (Mar, 1994).
247. P. Cheung *et al.*, Specific interactions of HeLa cell proteins with Coxsackievirus B3 RNA: La autoantigen binds differentially to multiple sites within the 5' untranslated region. *Virus research* **90**, 23 (Dec, 2002).
248. M. Holcik, R. G. Korneluk, Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Molecular and cellular biology* **20**, 4648 (Jul, 2000).

249. Y. K. Kim, S. H. Back, J. Rho, S. H. Lee, S. K. Jang, La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic acids research* **29**, 5009 (Dec 15, 2001).
250. Y. K. Kim, S. K. Jang, La protein is required for efficient translation driven by encephalomyocarditis virus internal ribosomal entry site. *The Journal of general virology* **80 (Pt 12)**, 3159 (Dec, 1999).
251. K. Meerovitch *et al.*, La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *Journal of virology* **67**, 3798 (Jul, 1993).
252. G. Sommer *et al.*, The RNA-binding protein La contributes to cell proliferation and CCND1 expression. *Oncogene* **30**, 434 (Jan 27, 2011).
253. Y. V. Svitkin, A. Pause, N. Sonenberg, La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *Journal of virology* **68**, 7001 (Nov, 1994).
254. J. Zhang, T. N. Dinh, K. Kappeler, G. Tsaprailis, Q. M. Chen, La autoantigen mediates oxidant induced de novo Nrf2 protein translation. *Molecular & cellular proteomics : MCP* **11**, M111 015032 (Jun, 2012).
255. N. Ali, G. J. Pruijn, D. J. Kenan, J. D. Keene, A. Siddiqui, Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *The Journal of biological chemistry* **275**, 27531 (Sep 8, 2000).
256. M. Costa-Mattioli, Y. Svitkin, N. Sonenberg, La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Molecular and cellular biology* **24**, 6861 (Aug, 2004).
257. R. Pudi, P. Srinivasan, S. Das, La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *The Journal of biological chemistry* **279**, 29879 (Jul 16, 2004).
258. R. Pudi, S. Abhiman, N. Srinivasan, S. Das, Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *The Journal of biological chemistry* **278**, 12231 (Apr 4, 2003).
259. R. Trotta *et al.*, BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer cell* **3**, 145 (Feb, 2003).
260. B. Cardinali, C. Carissimi, P. Gravina, P. Pierandrei-Amaldi, La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *The Journal of biological chemistry* **278**, 35145 (Sep 12, 2003).
261. L. Pellizzoni, B. Cardinali, N. Lin-Marq, D. Mercanti, P. Pierandrei-Amaldi, A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: implication of a protein factor in complex formation. *Journal of molecular biology* **259**, 904 (Jun 28, 1996).
262. J. Zhu, A. Hayakawa, T. Kakegawa, R. L. Kaspar, Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochimica et biophysica acta* **1521**, 19 (Oct 31, 2001).
263. C. Crosio, P. P. Boyl, F. Loreni, P. Pierandrei-Amaldi, F. Amaldi, La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic acids research* **28**, 2927 (Aug 1, 2000).
264. E. I. Schwartz, R. V. Intine, R. J. Maraia, CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine-366 and can modulate rpL37 5'-terminal oligopyrimidine mRNA metabolism. *Molecular and cellular biology* **24**, 9580 (Nov, 2004).
265. R. S. McLaren, N. Caruccio, J. Ross, Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Molecular and cellular biology* **17**, 3028 (Jun, 1997).

266. I. Ehlers *et al.*, Functional characterization of the interaction between human La and hepatitis B virus RNA. *The Journal of biological chemistry* **279**, 43437 (Oct 15, 2004).
267. K. Spangberg, L. Wiklund, S. Schwartz, Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. *The Journal of general virology* **82**, 113 (Jan, 2001).
268. C. Liang *et al.*, Sjogren syndrome antigen B (SSB)/La promotes global microRNA expression by binding microRNA precursors through stem-loop recognition. *The Journal of biological chemistry* **288**, 723 (Jan 4, 2013).
269. Y. Liu *et al.*, Autoantigen La promotes efficient RNAi, antiviral response, and transposon silencing by facilitating multiple-turnover RISC catalysis. *Molecular cell* **44**, 502 (Nov 4, 2011).
270. M. A. Bayfield, R. Yang, R. J. Maraia, Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochimica et biophysica acta* **1799**, 365 (May-Jun, 2010).
271. N. He *et al.*, A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Molecular cell* **29**, 588 (Mar 14, 2008).
272. C. Jeronimo *et al.*, Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Molecular cell* **27**, 262 (Jul 20, 2007).
273. B. J. Krueger *et al.*, LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic acids research* **36**, 2219 (Apr, 2008).
274. A. Markert *et al.*, The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO reports* **9**, 569 (Jun, 2008).
275. N. F. Marshall, D. H. Price, Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *The Journal of biological chemistry* **270**, 12335 (May 26, 1995).
276. D. Ivanov, Y. T. Kwak, J. Guo, R. B. Gaynor, Domains in the SPT5 protein that modulate its transcriptional regulatory properties. *Molecular and cellular biology* **20**, 2970 (May, 2000).
277. N. F. Marshall, D. H. Price, Control of formation of two distinct classes of RNA polymerase II elongation complexes. *Molecular and cellular biology* **12**, 2078 (May, 1992).
278. T. Wada, T. Takagi, Y. Yamaguchi, D. Watanabe, H. Handa, Evidence that P-TEFb alleviates the negative effect of DSIF on RNA polymerase II-dependent transcription in vitro. *The EMBO journal* **17**, 7395 (Dec 15, 1998).
279. Y. Yamaguchi *et al.*, NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell* **97**, 41 (Apr 2, 1999).
280. V. T. Nguyen, T. Kiss, A. A. Michels, O. Bensaude, 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* **414**, 322 (Nov 15, 2001).
281. Y. Xue, Z. Yang, R. Chen, Q. Zhou, A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic acids research* **38**, 360 (Jan, 2010).
282. Z. Yang, Q. Zhu, K. Luo, Q. Zhou, The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* **414**, 317 (Nov 15, 2001).

283. J. H. Yik *et al.*, Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Molecular cell* **12**, 971 (Oct, 2003).
284. B. Stefanovic, C. Hellerbrand, D. A. Brenner, Regulatory role of the conserved stem-loop structure at the 5' end of collagen alpha1(I) mRNA. *Molecular and cellular biology* **19**, 4334 (Jun, 1999).
285. L. Cai, D. Fritz, L. Stefanovic, B. Stefanovic, Binding of LARP6 to the conserved 5' stem-loop regulates translation of mRNAs encoding type I collagen. *Journal of molecular biology* **395**, 309 (Jan 15, 2010).
286. Y. Yamada, M. Mudryj, B. de Crombrughe, A uniquely conserved regulatory signal is found around the translation initiation site in three different collagen genes. *The Journal of biological chemistry* **258**, 14914 (Dec 25, 1983).
287. L. Cai, D. Fritz, L. Stefanovic, B. Stefanovic, Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen. *Journal of molecular biology* **401**, 564 (Aug 27, 2010).
288. Z. Manojlovic, B. Stefanovic, A novel role of RNA helicase A in regulation of translation of type I collagen mRNAs. *Rna* **18**, 321 (Feb, 2012).
289. M. Vukmirovic, Z. Manojlovic, B. Stefanovic, Serine-threonine kinase receptor-associated protein (STRAP) regulates translation of type I collagen mRNAs. *Molecular and cellular biology* **33**, 3893 (Oct, 2013).
290. A. A. Challa, B. Stefanovic, A novel role of vimentin filaments: binding and stabilization of collagen mRNAs. *Molecular and cellular biology* **31**, 3773 (Sep, 2011).
291. C. Burrows *et al.*, The RNA binding protein Larpl1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic acids research* **38**, 5542 (Sep, 2010).
292. J. Tcherkezian *et al.*, Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes & development* **28**, 357 (Feb 15, 2014).
293. K. Aoki *et al.*, LARP1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. *FEBS letters* **587**, 2173 (Jul 11, 2013).
294. L. Beretta, A. C. Gingras, Y. V. Svitkin, M. N. Hall, N. Sonenberg, Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *The EMBO journal* **15**, 658 (Feb 1, 1996).
295. G. J. Brunn *et al.*, Phosphorylation of the translational repressor PHAS-I by the mammalian target of rapamycin. *Science* **277**, 99 (Jul 4, 1997).
296. A. C. Gingras, S. G. Kennedy, M. A. O'Leary, N. Sonenberg, N. Hay, 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated and inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes & development* **12**, 502 (Feb 15, 1998).
297. M. K. Holz, B. A. Ballif, S. P. Gygi, J. Blenis, mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. *Cell* **123**, 569 (Nov 18, 2005).
298. B. Raught *et al.*, Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. *The EMBO journal* **23**, 1761 (Apr 21, 2004).
299. D. Shahbazian *et al.*, The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *The EMBO journal* **25**, 2781 (Jun 21, 2006).
300. F. Angenstein *et al.*, A receptor for activated C kinase is part of messenger ribonucleoprotein complexes associated with polyA-mRNAs in neurons. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 8827 (Oct 15, 2002).
301. K. Schaffler *et al.*, A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation. *Rna* **16**, 1488 (Aug, 2010).

302. R. Yang *et al.*, La-related protein 4 binds poly(A), interacts with the poly(A)-binding protein MLLE domain via a variant PAM2w motif, and can promote mRNA stability. *Molecular and cellular biology* **31**, 542 (Feb, 2011).
303. R. Merret *et al.*, The association of a La module with the PABP-interacting motif PAM2 is a recurrent evolutionary process that led to the neofunctionalization of La-related proteins. *Rna* **19**, 36 (Jan, 2013).
304. S. L. Wolin, T. Cedervall, The La protein. *Annual review of biochemistry* **71**, 375 (2002).
305. M. Ascano, M. Hafner, P. Cekan, S. Gerstberger, T. Tuschl, Identification of RNA-protein interaction networks using PAR-CLIP. *Wiley interdisciplinary reviews. RNA* **3**, 159 (Mar-Apr, 2012).
306. D. D. Licatalosi *et al.*, HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* **456**, 464 (Nov 27, 2008).
307. J. Konig *et al.*, iCLIP--transcriptome-wide mapping of protein-RNA interactions with individual nucleotide resolution. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (2011).
308. M. Hafner *et al.*, Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* **141**, 129 (Apr 2, 2010).
309. K. Burger *et al.*, 4-thiouridine inhibits rRNA synthesis and causes a nucleolar stress response. *RNA biology* **10**, 1623 (Oct, 2013).
310. L. Dolken *et al.*, High-resolution gene expression profiling for simultaneous kinetic parameter analysis of RNA synthesis and decay. *Rna* **14**, 1959 (Sep, 2008).
311. J. Xie, G. Kozlov, K. Gehring, The "tale" of poly(A) binding protein: The MLLE domain and PAM2-containing proteins. *Biochimica et biophysica acta* **1839**, 1062 (Aug 10, 2014).
312. L. Zekri, E. Huntzinger, S. Heimstadt, E. Izaurralde, The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release. *Molecular and cellular biology* **29**, 6220 (Dec, 2009).
313. A. W. Craig, A. Haghighat, A. T. Yu, N. Sonenberg, Interaction of polyadenylate-binding protein with the eIF4G homologue PAIP enhances translation. *Nature* **392**, 520 (Apr 2, 1998).
314. K. Khaleghpour *et al.*, Translational repression by a novel partner of human poly(A) binding protein, Paip2. *Molecular cell* **7**, 205 (Jan, 2001).
315. H. Imataka, A. Gradi, N. Sonenberg, A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *The EMBO journal* **17**, 7480 (Dec 15, 1998).
316. N. Siddiqui *et al.*, Poly(A) nuclease interacts with the C-terminal domain of polyadenylate-binding protein domain from poly(A)-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **282**, 25067 (Aug 24, 2007).
317. M. M. Karim *et al.*, A mechanism of translational repression by competition of Paip2 with eIF4G for poly(A) binding protein (PABP) binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9494 (Jun 20, 2006).
318. Y. Funakoshi *et al.*, Mechanism of mRNA deadenylation: evidence for a molecular interplay between translation termination factor eRF3 and mRNA deadenylases. *Genes & development* **21**, 3135 (Dec 1, 2007).
319. D. Caput *et al.*, Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **83**, 1670 (Mar, 1986).
320. C. Barreau, L. Paillard, H. B. Osborne, AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research* **33**, 7138 (2005).

321. J. Lykke-Andersen, E. Wagner, Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes & development* **19**, 351 (Feb 1, 2005).
322. W. Wang *et al.*, HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Molecular and cellular biology* **20**, 760 (Feb, 2000).
323. W. Wang, M. C. Caldwell, S. Lin, H. Furneaux, M. Gorospe, HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *The EMBO journal* **19**, 2340 (May 15, 2000).
324. A. Lal *et al.*, Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal* **23**, 3092 (Aug 4, 2004).
325. X. F. Ming, G. Stoecklin, M. Lu, R. Looser, C. Moroni, Parallel and independent regulation of interleukin-3 mRNA turnover by phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Molecular and cellular biology* **21**, 5778 (Sep, 2001).
326. I. Raineri, D. Wegmueller, B. Gross, U. Certa, C. Moroni, Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic acids research* **32**, 1279 (2004).
327. T. Bakheet, M. Frevel, B. R. Williams, W. Greer, K. S. Khabar, ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic acids research* **29**, 246 (Jan 1, 2001).
328. S. Lebedeva *et al.*, Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Molecular cell* **43**, 340 (Aug 5, 2011).
329. M. M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry* **72**, 248 (May 7, 1976).
330. G. Grillo *et al.*, UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs. *Nucleic acids research* **38**, D75 (Jan, 2010).
331. L. H. Gregersen *et al.*, MOV10 Is a 5' to 3' RNA helicase contributing to UPF1 mRNA target degradation by translocation along 3' UTRs. *Molecular cell* **54**, 573 (May 22, 2014).
332. H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology* **24**, 145 (1992).
333. J. Cox, M. Mann, MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature biotechnology* **26**, 1367 (Dec, 2008).
334. C. UniProt, Activities at the Universal Protein Resource (UniProt). *Nucleic acids research* **42**, D191 (Jan, 2014).
335. N. Hein, K. M. Hannan, A. J. George, E. Sanij, R. D. Hannan, The nucleolus: an emerging target for cancer therapy. *Trends in molecular medicine* **19**, 643 (Nov, 2013).
336. H. Khatter *et al.*, Purification, characterization and crystallization of the human 80S ribosome. *Nucleic acids research* **42**, e49 (Apr, 2014).
337. A. K. Henras *et al.*, The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **65**, 2334 (Aug, 2008).
338. F. M. Boisvert, S. van Koningsbruggen, J. Navascues, A. I. Lamond, The multifunctional nucleolus. *Nature reviews. Molecular cell biology* **8**, 574 (Jul, 2007).
339. T. Wild *et al.*, A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. *PLoS biology* **8**, e1000522 (2010).

340. I. Raska, K. Koberna, J. Malinsky, H. Fidlerova, M. Masata, The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* **96**, 579 (Oct, 2004).
341. S. T. Mullineux, D. L. Lafontaine, Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie* **94**, 1521 (Jul, 2012).
342. T. Kiss, Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* **109**, 145 (Apr 19, 2002).
343. S. M. Lastick, The assembly of ribosomes in HeLa cell nucleoli. *European journal of biochemistry / FEBS* **113**, 175 (Dec, 1980).
344. G. Dieci, G. Fiorino, M. Castelnuovo, M. Teichmann, A. Pagano, The expanding RNA polymerase III transcriptome. *Trends in genetics : TIG* **23**, 614 (Dec, 2007).
345. J. A. Steitz *et al.*, A 5S rRNA/L5 complex is a precursor to ribosome assembly in mammalian cells. *The Journal of cell biology* **106**, 545 (Mar, 1988).
346. J. Zhang *et al.*, Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes & development* **21**, 2580 (Oct 15, 2007).
347. E. Hurt *et al.*, A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *The Journal of cell biology* **144**, 389 (Feb 8, 1999).
348. T. I. Moy, P. A. Silver, Nuclear export of the small ribosomal subunit requires the ran-GTPase cycle and certain nucleoporins. *Genes & development* **13**, 2118 (Aug 15, 1999).
349. P. E. Gleizes *et al.*, Ultrastructural localization of rRNA shows defective nuclear export of preribosomes in mutants of the Nup82p complex. *The Journal of cell biology* **155**, 923 (Dec 10, 2001).
350. F. Thomas, U. Kutay, Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. *Journal of cell science* **116**, 2409 (Jun 15, 2003).
351. C. R. Trotta, E. Lund, L. Kahan, A. W. Johnson, J. E. Dahlberg, Coordinated nuclear export of 60S ribosomal subunits and NMD3 in vertebrates. *The EMBO journal* **22**, 2841 (Jun 2, 2003).
352. K. E. Sloan, M. T. Bohnsack, N. J. Watkins, The 5S RNP couples p53 homeostasis to ribosome biogenesis and nucleolar stress. *Cell reports* **5**, 237 (Oct 17, 2013).
353. S. Fumagalli, V. V. Ivanenkov, T. Teng, G. Thomas, Suprainduction of p53 by disruption of 40S and 60S ribosome biogenesis leads to the activation of a novel G2/M checkpoint. *Genes & development* **26**, 1028 (May 15, 2012).
354. X. X. Sun, Y. G. Wang, D. P. Xirodimas, M. S. Dai, Perturbation of 60 S ribosomal biogenesis results in ribosomal protein L5- and L11-dependent p53 activation. *The Journal of biological chemistry* **285**, 25812 (Aug 13, 2010).
355. Y. Zhang, H. Lu, Signaling to p53: ribosomal proteins find their way. *Cancer cell* **16**, 369 (Nov 6, 2009).
356. S. Boulon, B. J. Westman, S. Hutten, F. M. Boisvert, A. I. Lamond, The nucleolus under stress. *Molecular cell* **40**, 216 (Oct 22, 2010).
357. J. T. Lee, W. Gu, The multiple levels of regulation by p53 ubiquitination. *Cell death and differentiation* **17**, 86 (Jan, 2010).
358. T. Riley, E. Sontag, P. Chen, A. Levine, Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature reviews. Molecular cell biology* **9**, 402 (May, 2008).
359. Y. Haupt, R. Maya, A. Kazaz, M. Oren, Mdm2 promotes the rapid degradation of p53. *Nature* **387**, 296 (May 15, 1997).

360. R. Honda, H. Tanaka, H. Yasuda, Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS letters* **420**, 25 (Dec 22, 1997).
361. M. H. Kubbutat, S. N. Jones, K. H. Vousden, Regulation of p53 stability by Mdm2. *Nature* **387**, 299 (May 15, 1997).
362. G. Donati, S. Peddigari, C. A. Mercer, G. Thomas, 5S ribosomal RNA is an essential component of a nascent ribosomal precursor complex that regulates the Hdm2-p53 checkpoint. *Cell reports* **4**, 87 (Jul 11, 2013).
363. A. Narla, B. L. Ebert, Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood* **115**, 3196 (Apr 22, 2010).
364. K. Burger *et al.*, Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *The Journal of biological chemistry* **285**, 12416 (Apr 16, 2010).
365. K. Gratenstein *et al.*, The WD-repeat protein GRWD1: potential roles in myeloid differentiation and ribosome biogenesis. *Genomics* **85**, 762 (Jun, 2005).
366. C. Xu, J. Min, Structure and function of WD40 domain proteins. *Protein & cell* **2**, 202 (Mar, 2011).
367. T. L. Iouk, J. D. Aitchison, S. Maguire, R. W. Wozniak, Rrb1p, a yeast nuclear WD-repeat protein involved in the regulation of ribosome biosynthesis. *Molecular and cellular biology* **21**, 1260 (Feb, 2001).
368. S. Schaper *et al.*, A yeast homolog of chromatin assembly factor 1 is involved in early ribosome assembly. *Current biology : CB* **11**, 1885 (Nov 27, 2001).
369. A. Killian *et al.*, Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene* **23**, 8597 (Nov 11, 2004).
370. J. W. Harper, G. R. Adami, N. Wei, K. Keyomarsi, S. J. Elledge, The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* **75**, 805 (Nov 19, 1993).
371. Y. Xiong *et al.*, p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases. *Nature* **366**, 701 (Dec 16, 1993).
372. W. S. el-Deiry *et al.*, WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* **75**, 817 (Nov 19, 1993).
373. J. J. Gorski *et al.*, A novel TBP-associated factor of SL1 functions in RNA polymerase I transcription. *The EMBO journal* **26**, 1560 (Mar 21, 2007).
374. G. Miller *et al.*, hRRN3 is essential in the SL1-mediated recruitment of RNA Polymerase I to rRNA gene promoters. *The EMBO journal* **20**, 1373 (Mar 15, 2001).
375. M. Preti *et al.*, Gradual processing of the ITS1 from the nucleolus to the cytoplasm during synthesis of the human 18S rRNA. *Nucleic acids research* **41**, 4709 (Apr, 2013).
376. M. Wang, D. G. Pestov, 5'-end surveillance by Xrn2 acts as a shared mechanism for mammalian pre-rRNA maturation and decay. *Nucleic acids research* **39**, 1811 (Mar, 2011).
377. K. E. Sloan *et al.*, Both endonucleolytic and exonucleolytic cleavage mediate ITS1 removal during human ribosomal RNA processing. *The Journal of cell biology* **200**, 577 (Mar 4, 2013).
378. T. Kent, Y. R. Lapik, D. G. Pestov, The 5' external transcribed spacer in mouse ribosomal RNA contains two cleavage sites. *Rna* **15**, 14 (Jan, 2009).
379. D. L. Lafontaine, C. Bousquet-Antonelli, Y. Henry, M. Caizergues-Ferrer, D. Tollervy, The box H + ACA snoRNAs carry Cbf5p, the putative rRNA pseudouridine synthase. *Genes & development* **12**, 527 (Feb 15, 1998).
380. V. Albanese, S. Reissmann, J. Frydman, A ribosome-anchored chaperone network that facilitates eukaryotic ribosome biogenesis. *The Journal of cell biology* **189**, 69 (Apr 5, 2010).

381. J. A. Claypool *et al.*, Tor pathway regulates Rrn3p-dependent recruitment of yeast RNA polymerase I to the promoter but does not participate in alteration of the number of active genes. *Molecular biology of the cell* **15**, 946 (Feb, 2004).
382. C. Mayer, I. Grummt, Ribosome biogenesis and cell growth: mTOR coordinates transcription by all three classes of nuclear RNA polymerases. *Oncogene* **25**, 6384 (Oct 16, 2006).
383. C. Mayer, J. Zhao, X. Yuan, I. Grummt, mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes & development* **18**, 423 (Feb 15, 2004).
384. K. M. Hannan *et al.*, mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Molecular and cellular biology* **23**, 8862 (Dec, 2003).
385. G. A. Nader, T. J. McLoughlin, K. A. Esser, mTOR function in skeletal muscle hypertrophy: increased ribosomal RNA via cell cycle regulators. *American journal of physiology. Cell physiology* **289**, C1457 (Dec, 2005).
386. A. Murayama *et al.*, Epigenetic control of rDNA loci in response to intracellular energy status. *Cell* **133**, 627 (May 16, 2008).
387. A. Vaquero *et al.*, SIRT1 regulates the histone methyl-transferase SUV39H1 during heterochromatin formation. *Nature* **450**, 440 (Nov 15, 2007).
388. A. Vaquero *et al.*, Human SirT1 interacts with histone H1 and promotes formation of facultative heterochromatin. *Molecular cell* **16**, 93 (Oct 8, 2004).
389. L. Yang *et al.*, Regulation of SirT1-nucleomethylin binding by rRNA coordinates ribosome biogenesis with nutrient availability. *Molecular and cellular biology* **33**, 3835 (Oct, 2013).
390. S. Hayashida *et al.*, Fasting promotes the expression of SIRT1, an NAD⁺ -dependent protein deacetylase, via activation of PPARalpha in mice. *Molecular and cellular biochemistry* **339**, 285 (Jun, 2010).
391. S. Nemoto, M. M. Fergusson, T. Finkel, Nutrient availability regulates SIRT1 through a forkhead-dependent pathway. *Science* **306**, 2105 (Dec 17, 2004).
392. H. Y. Cohen *et al.*, Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science* **305**, 390 (Jul 16, 2004).
393. K. Itahana *et al.*, Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Molecular cell* **12**, 1151 (Nov, 2003).
394. M. Sugimoto, M. L. Kuo, M. F. Roussel, C. J. Sherr, Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Molecular cell* **11**, 415 (Feb, 2003).
395. A. J. Apicelli *et al.*, A non-tumor suppressor role for basal p19ARF in maintaining nucleolar structure and function. *Molecular and cellular biology* **28**, 1068 (Feb, 2008).
396. F. Lessard *et al.*, The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. *Molecular cell* **38**, 539 (May 28, 2010).
397. A. J. Saporita *et al.*, RNA helicase DDX5 is a p53-independent target of ARF that participates in ribosome biogenesis. *Cancer research* **71**, 6708 (Nov 1, 2011).
398. N. Huang, S. Negi, A. Szebeni, M. O. Olson, Protein NPM3 interacts with the multifunctional nucleolar protein B23/nucleophosmin and inhibits ribosome biogenesis. *The Journal of biological chemistry* **280**, 5496 (Feb 18, 2005).

6 Anhang

6.1 Tabelle der LARP4B-Zielgene

Pos.	Gen	T:C
1	EEF2	1131
2	CKB	1085
3	ENO1	1002
4	GNB2L1	818
5	OAZ1	716
6	SNRPB	713
7	UCHL1	625
8	ACTG1	579
9	HNRNPA2B1	560
10	SAT1	554
11	RPS4X	544
12	MIF	540
13	TUBA1B	519
14	NDUFS6	507
15	ARF1	505
16	STMN1	500
17	GLO1	499
18	SOD1	495
19	HNRNPA B	494
20	ALDOA	492
21	CCT3	489
22	RPS16	482
23	SF1	475
24	GLUL	473
	SHMT2	473
26	COX8A	453
27	TOMM6	449
28	MYL6	447
29	MCM7	440
30	GPI	435
31	EIF6	432
32	TMBIM6	431
33	TIMM13	428
34	C17orf7-AS1	425
35	ATP5B	424
36	CNBP	422
37	SF3B5	420
38	BIRC5	419
39	DCTPP1	418
40	MAZ	417
41	PPP4C	413
42	PDE3A	412
43	C1orf43	407
44	UQCRCQ	406
45	RPL8	403
	MRPS12	403
47	ATP6V0 C	402
48	RPS3	399
49	COX7A2	398
50	ANKRD3 OBL	394
51	PRDX1	386
	ACTN4	386
53	HNRNPU L1	385
54	PHB2	381
	TRIM28	381
	SRSF9	381
57	CDK4	380
58	NME1	378
59	LSM4	375
	RPL18	375
61	HSP90A A1	371
62	PFN1	366
63	FBL	363
	TMPO	363
65	HDFG	362
66	CFL1	361
67	CCT7	360
68	TMED9	359
69	RPS11	357

70	SNRPD3	356
71	PSMB2	350
72	CCT4	345
73	LARP4B	344
74	PKM2	343
	HNRNPF	343
	H1FX	343
77	STIP1	338
78	CALR	335
79	LDHB	333
80	ATP5G3	330
	PAIP2	330
	KDEL1	330
83	NONO	329
84	KHSRP	327
	RNF167	327
86	HMGB2	326
87	PSAP	325
88	C14orf2	324
	PSMD8	324
90	CANX	323
	UBB	323
92	RANGAP 1	322
	SQSTM1	322
94	CSTB	317
95	HN1	316
96	UBE2C	315
97	RBM3	314
98	WDR83O S	313
99	CIRBP	312
	HFM1	312
101	CD81	310
102	ATP6V0 B	308
103	PMAIP1	307
104	NDUFB1 1	305
105	C1QBP	302
	TAGLN2	302
107	BSG	300
108	RPL13	297
	ARF5	297
110	PPIF	296
111	COX6B1	294
112	ZNF428	292
113	PSMB1	291
	PRDX6	291
115	SLC1A5	289
116	DDT	287
117	PLK1	286
	CCT5	286
119	ATP5G2	284
120	CAPNS1	283
121	UBE2M	280
	MRPL4	280
123	SPINT2	279
	U2AF2	279
125	MRFAP1	278
126	H2AFX	275
127	RPL36	274
	DHCR24	274
129	ASF1B	273
130	CDK1	272
	FUS	272
132	B2M	271
133	POLR2E	270
	LRRC59	270
135	RPL23	269
136	BRK1	268
	FARSA	268
	HNRNPU	268
139	EIF4EBP 1	267
	MDH2	267
141	AP2S1	265

143	TUFM	265
	HINT1	263
	MARCKS L1	263
145	RBX1	262
	SRSF2	262
147	PEBP1	261
148	TMEM14 7	260
	PSENIEN	260
	RAN	260
	ZNFX1-AS1	260
152	NHP2L1	259
153	CDKN2A	258
154	RNASEK	256
155	TK1	255
156	ACTB	254
	POP7	254
	SMARCD 2	254
159	RPL11	253
	RPL27	253
	VIM	253
	XRCC5	253
163	BUB3	252
164	SGTA	251
	CCNB1	251
166	C17orf81	250
	PCBP1	250
168	RBM42	249
	PPP2CA	249
170	RPS21	248
	MRPS7	248
172	NOP10	247
173	RPLP2	246
	CALM3	246
175	UBE2E1	245
176	ATP6V1F	244
	SERBP1	244
	PPP1CA	244
179	SLC3A2	243
	NDUFA2	243
	UQCRCR	243
182	SNRPD2	242
	PPP2R1 A	242
	TIMM50	242
185	CUTA	241
	ID3	241
	EIF4A3	241
	GAPDH	241
	SLC25A3	241
190	COX7C	240
191	DEK	238
	H2AFZ	238
	MCM5	238
194	GMNN	237
	CSDE1	237
	SRM	237
	RNF187	237
	C19orf10	237
	MRPL14	237
200	SNHG1	236
	SIVA1	236
	EIF5A	236
	PSMD3	236
204	NDUFA1 1	235
	MLF2	235
	C19orf48	235
	C19orf43	235
	HIST1H4 C	235
	SSU72	235
210	AURKB	234
211	ZWINT	233

	H2AFY	233
	PARK7	233
	UOCR11	233
215	TMED2	232
216	HSP90A B1	231
217	PIN1	230
	POLR2I	230
	ATF4	230
	SSR2	230
	FAU	230
	SNHG8	230
223	PCNA	229
	RNASEH 2A	229
	GNB1	229
	TPI1	229
227	MED10	228
	TUBB4B	228
229	PSMB5	226
230	MRPS21	225
	RBBP7	225
	EIF4G2	225
233	APRT	224
234	SNRPA	223
235	PDXP	222
	MRPS23	222
237	TSC22D 3	221
	CYB5R3	221
	MRPS2	221
	HNRNPA 0	221
241	TBCB	220
	ATP5J2	220
243	EMD	219
244	ILF2	218
	PHGDH	218
246	ECHS1	217
	TPX2	217
	NGFRAP 1	217
249	WDR18	216
250	ZNF226	215
	DYNLRB 1	215
	HSBP1	215
	PPM1G	215
	NCL	215
	RPL32	215
256	HNRNPL	214
257	MRPL51	212
258	YWHAB	211
	C20orf43	211
260	AP2M1	210
	DAZAP1	210
262	UBA52	209
	SPCS1	209
	H3F3B	209
265	EIF3B	208
	YARS	208
267	DDOST	207
268	CDC25B	206
	ATPIF1	206
	S100A10	206
271	RPS24	205
	C7orf59	205
	EIF1	205
	PSMA7	205
	RHOA	205
	PRPF19	205
277	EWSR1	204
	SUPT5H	204
	RPL37A	204
	RAB11A	204
	ATP6AP 1	204

282	ODC1	203
283	COPZ1	202
	CCT2	202
	ERH	202
286	TMEM85	201
287	SNRPF	200
	PCBP2	200
	RBM14	200
290	MRPS34	199
	RPS5	199
	SF3A1	199
	COMMD4	199
294	RPL35	198
	MIEN1	198
	FKBP4	198
297	DBNDD2	197
	NDUFA9	197
	NKIRAS2	197
300	SCAMP3	196
	RPS19	196
	ZNF703	196
	CALM2	196
	TMCO1	196
305	FKBP8	195
	PDIA6	195
307	NDUFB10	194
	SRSF7	194
	RAE1	194
	PITHD1	194
312	APEX1	193
	SNRPC	193
	GABARAP	193
317	BUD31	193
	PGAM5	193
	SRSF1	192
318	TIMM17B	191
	NHP2	191
320	EDF1	190
	MRPS18A	190
	ERP29	190
324	NOLC1	190
	UNG	189
325	PSMB4	188
	TRA2B	188
	AHSA1	188
	SAP18	188
	C20orf24	188
330	RPL15	187
	UQCR10	187
	LGALS3BP	187
	ROMO1	187
334	RPS29	186
	CDT1	186
	EIF3I	186
	MCM2	186
338	KLHDC3	185
	PAK4	185
340	LUC7L2	184
	PCMT1	184
342	TMSB10	183
	SNHG15	183
	GABARAPL2	183
	RPS23	183
347	RRM1	183
	TSPAN3	182
	ENSA	182
351	RPS19BP1	182
	HBXIP	182
	SIGMAR1	181
354	TOMM22	181
	YWHAE	181
356	GPX4	180
	NDUFA7	180
358	TRAPPC1	179
	LAGE3	179
	APP	178
364	C11orf10	178
	EIF3G	178
	LSM7	178
	GHITM	178
	ANAPC16	178
364	CHCHD1	177
	PSME3	177

	PSMA2	177
	RPL36AL	177
	PNP	177
	CDC37	177
370	SYNCRIP	176
	SF3B4	176
372	PRDX2	175
	VPS25	175
	SURF4	175
	SRP14	175
	BAX	175
377	TMEM93	174
	SEP15	174
	GNB2	174
	PRELID1	174
381	IDH3B	173
	PAF1	173
	MRPL54	173
	MRPL38	173
385	PNKD	172
	NDUFB2	172
388	AKT1S1	172
	PFDN5	171
	OTUB1	171
	CCDC56	171
	DAD1	171
393	FAM168B	171
	ARL6IP4	170
	PRPS1	170
396	C12orf62	170
	SUPT4H1	169
399	EIF3D	169
	PPIB	169
	RPL28	168
	HAX1	168
	EBP	168
404	COPS6	168
	FAM100B	168
	PUF60	167
408	MRPL43	167
	TYMS	167
	SLC35A4	167
409	CDIPT	166
	PDRG1	165
412	XIST	165
	DMKN	165
	GNAS	164
	PSMA4	164
	ECH1	164
417	SNRPD1	164
	PTP4A1	164
	RCC1	163
423	CLTA	163
	MTHFD2	163
	FEN1	163
	RPS14	163
	PAICS	163
	U2AF1	162
	CERS2	162
	CCNG1	162
	ZMAT2	162
	MAGOH	162
430	SNRNP70	162
	POLR2F	162
	TOMM5	161
	SSR4	161
	CD63	161
437	MANBAL	161
	GLRX5	161
	MRPL28	161
	SSRP1	161
440	PRMT1	160
	FBXO7	160
	HN1L	160
446	FHL1	159
	ASNS	159
	ATP6V1E1	159
	ZIC2	159
	DDX24	159
451	PTBP1	159
	ARPC4	158
	PSMA1	158
	PFN2	158
	CHCHD2	158
453	NEDD8	158
	DDX56	157
	ITM2C	157
	HES4	156

	TRAPPC3	156
	RPL5	156
	PGRMC1	156
	ILF3	156
	PPP1CC	155
458	TSEN34	155
	SNHG13	155
	SSBP1	155
	POMP	155
	XRCC6	155
	SEC61A1	155
465	SAE1	154
	MAD2L2	154
	SRRT	154
	IMP3	154
	MYBL2	154
473	CCT8	154
	POLR2G	154
	DDX5	154
	DAZAP2	153
	UBE2I	153
	CEBPG	153
	MCM4	153
	CLPP	153
	RALY	153
	LAPTM4B	153
482	PRPF8	153
	YIF1B	153
	YDJC	152
487	CD59	152
	PRMT5	152
	PTGES3	152
	VCP	152
	CDCA3	151
489	HIGD2A	151
	HSPBP1	150
	RPS6	150
	MRPS26	150
494	VAMP8	150
	CNN3	150
	C6orf108	149
	BCL2L12	149
	PRDX4	149
	POLR2L	149
	EIF3K	149
500	SLC39A1	149
	PDCD6	148
	WARS	148
	SCAND1	148
507	CLTB	148
	PLEKHJ1	148
	MEA1	148
	PRCC	148
	CD164	147
	RPL35A	147
	MRPL24	147
	GADD45	147
	GIP1	147
	TXN2	147
514	JAGN1	147
	REEP4	147
	HSD17B10	146
	RPL38	146
	FAM127B	146
	RPLP1	146
	KIAA0101	146
	JTB	146
	SAR1A	146
	POLR1D	146
TKT	146	
526	LMAN2	146
	ATP6V0D1	146
	SNHG7	146
	EIF4A1	145
	LDHA	145
	POP4	145
	C5orf32	145
	RPA2	145
	TAF7	145
	AATF	145
533	CAPZB	144
	CCDC124	144
	CDK2	144
	AKR7A2	144
	SERF2	144
	HOXA9	144

539	PIGY	143
	PNPLA2	143
541	RNH1	142
	H2AFV	142
	ATP5D	142
	DPM3	142
	COX5B	142
	PRKCSH	142
	EZR	142
	ELOF1	142
	TXNL4A	142
	ARL6IP1	142
553	CD9	142
	ATP1A1	142
	HNRNPK	141
	RHOC	141
	USF2	141
	SNAPIN	141
	CYC1	141
	TRIP6	141
	STRAP	141
	SRPRB	141
561	EIF4G1	140
	NME2	140
	LMNB1	140
565	DHX15	140
	PEF1	139
	URM1	139
	STRA13	139
	GRAMD1A	139
	TMEM208	139
	SUMO3	139
	RAB7A	139
	MYL12A	139
	MARCKS	139
574	UBE2A	138
	SEPT2	138
	NACA	138
	PPP2R2A	138
	TTC1	138
582	GSK3A	138
	PERP	138
	COASY	138
	HNRNPD	137
	GPS1	137
585	LAMP1	137
	ZSCAN18	136
	TXNRD1	136
	PRDX3	136
	PSMB6	136
	STOML2	136
	C1orf122	136
	RPL29	136
	CENPV	136
	METTL1A	136
HSP90B1	136	
595	COPS7A	135
	AURKA	135
	CNPY2	135
	NGRN	135
	PSMB3	135
	LAMTOR1	135
	NPM3	135
	STUB1	135
	EID1	135
	PMF1	135
605	GEMIN7	134
	PSMG1	134
	UBA1	134
	ATP6V0E1	134
	MRPL41	134
	INO80E	134
	ARF3	134
613	NUCKS1	134
	TMEM205	133
	MYEOV2	133
	HNRNPM	133
	ITM2B	133
620	CDCA8	133
	PGD	133
	SFXN1	133
	ATP5G1	132
	BCAP31	132
	SNX3	132

	C16orf80	132
	KRT10	132
	SMC1A	132
626	GPX1	131
	FDFT1	131
	USP11	131
	FTH1	131
630	MTFP1	130
	SYF2	130
	MRPL23	130
	TMEM10	130
	1	
	SMG9	130
	ZNF207	130
636	SLC25A5	129
	NDUFA1	129
	3	
	NDUFS7	129
	RRAGA	129
	POLDIP2	129
	SUB1	129
642	MLX	128
	TRIAP1	128
	DNNTIP1	128
	HDAC2	128
	SF3B3	128
647	MRPS14	127
	XBP1	127
	SMARCB	127
	1	
	AP1M1	127
	POLR2C	127
	SRP9	127
	RPA1	127
	CYB5B	127
655	RANGRF	126
	HM13	126
	PSMD13	126
	TIMM23	126
	PSMB7	126
	PIM3	126
	UQCRC1	126
	APH1A	126
	HOXA10-	126
	HOXA9	
664	VKORC1	125
	AHCY	125
	TMEM55	125
	B	
	WBP2	125
	AIMP2	125
	RAB1B	125
	MFAP1	125
	LAPTM4	125
	A	
	GNG12	125
	NUDT1	125
674	CENPM	124
	FAM96B	124
	PLD3	124
	DCTN2	124
	TMEM97	124
	PSMD9	124
680	ARL2	123
	MRPL10	123
	RPUSD3	123
	ARPC2	123
	ERAL1	123
	C7orf11	123
	PTMS	123
	CDC123	123
	FAM127	123
	A	
	C19orf53	123
	ATP5SL	123
691	LSMD1	122
	PSMA5	122
	GOT1	122
	VAMP3	122
	C7orf55	122
696	MEPCE	121
	HMG3	121
	POP5	121
	HNRNPH	121
	3	
	BANF1	121
	HIST1H2	121
	BK	
	MRPL27	121
	EIF4E2	121
	MRPL12	121
	MTA2	121
	ZNF580	121
707	C11orf31	120

	DBI	120
	UBL5	120
	CSNK1E	120
	NUBP2	120
	EIF5	120
	DDX17	120
	TFDP1	120
	FIS1	120
	ZNHIT3	120
	PPIL1	120
	RPL13A	120
719	ATP5J	119
	SLC16A1	119
	CKS2	119
	NDUFA1	119
	2	
	BEX1	119
	VBP1	119
	C1orf35	119
	SF3B2	119
727	RRM2	118
	C20orf27	118
	TIMM17A	118
	KHDRBS	118
	1	
	TUBG1	118
	ELAVL1	118
733	DCXR	117
	TMEM10	117
	6C	
	CDKN1A	117
	CHTOP	117
	DDX39A	117
	GTF3C5	117
	NPM1	117
	ATOX1	117
	MBD3	117
	DDRK1	117
	FAM50A	117
	TUBA1C	117
	ABT1	117
	SFPO	117
	PSMD11	117
	TSPYL1	117
	POLR2A	117
	CLTC	117
751	EDC3	116
	MRPS35	116
	SNRNP2	116
	PLP2	116
	E2F1	116
	PA2G4	116
757	PRC1	115
	CST3	115
	VPS72	115
	ANP32B	115
	MRPS16	115
	RAB5C	115
	RPAIN	115
764	NAPA	114
	PPP2R4	114
	TRAPPC	114
	5	
	RBM10	114
	NDUFS5	114
	CCT6A	114
	UROD	114
	SARS	114
	RRP36	114
	ILVBL	114
	TP53	114
	SENP3-	114
	EIF4A1	
776	AES	113
	COPE	113
	GRB2	113
	NDUFB3	113
	RER1	113
	RAVER1	113
	C14orf16	113
	6	
	PTPLAD	113
	1	
784	ACLY	112
	GINS2	112
	TMEM59	112
	CDC20	112
	CAMLG	112
	RBM22	112
	ANP32E	112
791	NME1-	111
	NME2	
	ACOT7	111
	PRKAR1	111

	A	
	ITPA	111
	GORASP	111
	2	
	RPP30	111
	SRSF6	111
	RUVBL2	111
	MRPL2	111
	ARFIP2	111
801	MRPL42	110
	PHPT1	110
	LY6E	110
	C19orf63	110
	RAC3	110
	RNPS1	110
	NAA10	110
	TARS	110
	CALM1	110
	WDR77	110
	C17orf61	110
812	NUSAP1	109
	NDUF8	109
	ARPC5	109
	DCAF7	109
816	HNRPDL	108
	ZNHIT1	108
	TMEM9	108
	TALDO1	108
	MANF	108
	COPS4	108
	TXLNA	108
	EIF2S1	108
	LRRC47	108
	IRF2BP1	108
	SRRM2	108
827	MORF4L	107
	2	
	NAA20	107
	MYL12B	107
	MCRS1	107
	PXMP2	107
	VPS4A	107
	FLNA	107
834	SLC25A1	106
	CD151	106
	NDUFA8	106
	CHCHD1	106
	0	
	DEGS1	106
	UTP11L	106
	RPF1	106
	URGCP-	106
	MRPS24	
	MRPS24	106
843	CHMP1A	105
	CHCHD8	105
	MRT04	105
	MMADH	105
	C	
	EXOSC5	105
	SPRYD4	105
	THOP1	105
	FASN	105
851	TMEM22	104
	2	
	LOC3887	104
	96	
	LOC1005	104
	06930	
	COX4NB	104
	RPL30	104
	CBR1	104
	C15orf24	104
	HNRNPH	104
	1	
	ZNF787	104
	SCD	104
	LYRM4	104
862	NENF	103
	NDUFA1	103
	AP3M1	103
	ADPRHL	103
	2	
	JMJD6	103
	CGNI	103
	ATP6V1	103
	D	
	NARS	103
	GOT2	103
	USP22	103
	NT5C3L	103
873	NDUFAF	102
	3	
	C2orf28	102
	CD320	102

	RPS8	102
	RABAC1	102
	PES1	102
	MAF1	102
	RAC1	102
	SRSF3	102
	C7orf44	102
	RUVBL1	102
	CAPZA1	102
885	APTX	101
	KXD1	101
	UCK1	101
	RPS15	101
	SDF4	101
	LSM14A	101
	UBXN1	101
	EPB41L4	101
	A-	
	AS1	
	ICMT	101
	MRPL3	101
	HARS	101
	DDA1	101
	DL	101
	RBM8A	101
899	BID	100
	SEC61G	100
	PPP5C	100
	C16orf42	100
	HSPA9	100
	MCM3	100
	EIF2S2	100
906	NDUFC1	99
	TFG	99
	C21orf33	99
	SRSF5	99
	COX6A1	99
	C1orf144	99
	MRPL40	99
	SLIRP	99
	SELK	99
	WDR34	99
	HOXB9	99
	ZCCHC1	99
	2	
	SLC7A5	99
	KPNA6	99
	NDUFC2	99
921	MCL1	98
	DDX3X	98
	MAT2B	98
	DHCR7	98
	NDUFS8	98
	PDHA1	98
	PPDPF	98
	C19orf42	98
	CCDC86	98
	GDI1	98
	FOXC1	98
	REEP5	98
	ETF1	98
	LSM1	98
935	CALU	97
	SRA1	97
	PSMA3	97
	HIST1H3	97
	B	
	DYNLT1	97
	YKT6	97
	RPL27A	97
	MLLT11	97
	DCAF15	97
944	TXNDC1	96
	2	
	GPR172	96
	A	
	PSMC5	96
	PSMC4	96
	PPP2R5	96
	D	
	PEPD	96
	CTBP1	96
	CARHSP	96
	1	
	OBFC2B	96
	NDUFS2	96
	GRPEL1	96
	CDCA5	96
	GRN	96
	YRDC	96
	TIMP1	96
	GTF2F1	96
	UQCRRF	96
	1	

962	DNAJC7	96	
	EPN1	95	
	RAB34	95	
	SEC13	95	
	COP3	95	
	OAZ2	95	
	SSNA1	95	
	NME3	95	
	CDK2AP1	95	
	MIDN	95	
	DR1	95	
	MRP63	95	
SENP3	95		
974	EEF1E1	94	
	GIPC1	94	
	RUSC1	94	
	MRPS11	94	
	MRPL17	94	
	MRPL37	94	
	PFDN2	94	
	RAD23A	94	
	ERI3	94	
	C20orf4	94	
	ACTR1A	94	
	GOLPH3	94	
	DDX21	94	
	ATXN7L3B	94	
	PDIA3	94	
PLIN3	94		
990	WBP5	93	
	ADRM1	93	
	CSTF1	93	
	C19orf6	93	
	PSMF1	93	
	SERP1	93	
	HDGFRP2	93	
	PTOV1	93	
	TRAPPC4	93	
	GRWD1	93	
ARPP19	93		
1001	RNASEK-C	92	
	17ORF49		
	TBRG4	92	
	TSM	92	
	AK2	92	
	ARRB2	92	
	CDKN2C	92	
	KIAA1967	92	
	TMED3	92	
	AKR1B1	92	
	TWF2	92	
	GN5	92	
	SNX17	92	
	C22orf32	92	
	JPX	92	
	ECSIT	92	
	PIN4	92	
	1017	AKR1A1	91
ATP5I		91	
MPDU1		91	
TMED4		91	
NT5DC2		91	
TCP1		91	
ARPC5L		91	
POLR2K		91	
GRSF1		91	
POLR2J		91	
EIF3H		91	
YWHAG		91	
MAPK1IP1L		91	
NOC2L		91	
PUS1		91	
1032		PDCC4	90
		TPD52L2	90
	MANEAL	90	
	DNM2	90	
	GDI2	90	
	NSUN2	90	
	MED24	90	
	POLR3K	90	
	DPM2	90	
	PPP1R7	90	
	AIP	90	
	BASP1	90	
	HDAC1	90	
	PRPF31	90	
	ATP2A2	90	

1048	DYNLL1	90
	GAS5	89
	CTNNB1	89
	TROAP	89
	C12orf57	89
	ERGIC3	89
	SKP1	89
	PCBD1	89
	SNF8	89
	FLOT2	89
	FXR2	89
	ALKBH5	89
1061	DCUN1D5	89
	APLP2	89
	CTSD	88
	COMT	88
	DGUOK	88
	RHBDD2	88
	ZNF444	88
	NAT14	88
	TMEM179B	88
	ATP5O	88
1073	C17orf79	88
	COBRA1	88
	CLIC4	88
	PTP4A2	88
	FLAD1	87
	DIABLO	87
	G6PC3	87
	CECR5	87
	FAM189B	87
	PKMYT1	87
1087	TES	87
	RPN2	87
	EFTUD2	87
	MRPL34	87
	LCP1	87
	DDB1	87
	TXNDC17	87
	SF3B1	87
	MAGED1	86
	PPIE	86
1111	MDH1	86
	PPP6C	86
	MRPL55	86
	PDCC2	86
	GART	86
	ATP5C1	86
	C3orf37	86
	RFC3	86
	TIMM22	86
	TXN	86
1130	MTA1	86
	MRPL22	86
	MTCH1	86
	YWHAH	86
	HOXB2	86
	PSMD14	86
	MRPL15	86
	PHB	86
	VTA1	86
	GINS1	86
YWHAQ	86	
GUK1	86	
1111	RTN4	85
	ISOC2	85
	BRP44	85
	POLD2	85
	ANXA2	85
	CKAP2	85
	BTG3	85
	NDUFB7	85
	CDC25A	85
	NDUFB9	85
TMEM109	85	
1130	PIGS	85
	PFKP	85
	PREB	85
	C22orf28	85
	STC2	85
	SCAF1	85
	MRPS25	85
	GSTO1	85
	SOD2	84
	SIRT2	84
TCEB2	84	
TCEAL4	84	
DOLPP1	84	
RTN3	84	

1145	IMPDH2	84
	POLR2H	84
	AKIRIN2	84
	PTTG1	84
	C19orf54	84
	OXA1L	84
	C20orf111	84
	SNW1	84
	CDC5L	84
	SLMO2	83
	MINOS1	83
	RBM4	83
1165	MATR3	83
	GSPT1	83
	FAM195B	83
	BCKDHA	83
	CXXC1	83
	CENPW	83
	NME4	83
	TSR2	83
	MPI	83
	LSM3	83
1179	CCNA2	83
	LEPROT1	83
	MAP2K2	83
	TMEM123	83
	NIT1	83
	RBM14-RBM4	83
	TXNDC5	83
	HNRNPC	82
	DDX47	82
	UBE2D2	82
C19orf24	82	
MRPL48	82	
CUEDC2	82	
VAMP2	82	
RPL19	82	
ATP6V1G1	82	
RNF114	82	
CCNB2	82	
MCTS1	82	
SLC25A11	82	
1195	UBE2L3	82
	C16orf13	81
	FXD5	81
	RFC5	81
	MRPS33	81
	ACTL6A	81
	CTDN1P1	81
	TST	81
	HPRT1	81
	SEPHS2	81
BLMH	81	
AAMP	81	
SAR1B	81	
MRPS18C	81	
SF3A3	81	
ABCF2	81	
TMED10	81	
CLPTM1	80	
MLST8	80	
RPL31	80	
BTF3	80	
MRPL47	80	
ACIN1	80	
ZYX	80	
PHF5A	80	
PSMC2	80	
UBE2N	80	
PTTG1IP	80	
CSTF3	80	
1207	UXT	79
	ACP1	79
	TMUB1	79
	NDUFV3	79
	ANXA7	79
	COX4I1	79
	WDR1	79
	ATP6V0E2	79
	C10orf35	79
	APOA1BP	79
PBK	79	
ESD	79	
SEC11A	79	

1225	SYNGR2	79
	GTBP4	79
	UBE2B	79
	MCM6	79
	CPNE1	79
	AKT2	78
	GRINA	78
	NSUN5	78
	C4orf3	78
	HIST1H1C	78
	CD2BP2	78
	SDHAF1	78
LOC400043	78	
CNIH	78	
COX5A	78	
MPV17L2	78	
SH3BGR13	78	
YIPF3	78	
PSMC3	78	
SESN2	78	
MRPL9	78	
MAT2A	78	
SPCS3	78	
PABPC1	78	
FKBP1A	78	
1245	SKA2	77
	PLS3	77
	UBE2J2	77
	VPS29	77
	DKC1	77
	NGDN	77
	SEC61B	77
	SDF2L1	77
	CREG1	77
	TOR1AIP2	77
NDUFA6	77	
RHOG	77	
BRF2	77	
DDIT4	77	
EEF1A1	77	
ENO2	77	
KRT19	77	
C14orf119	77	
1263	BCAT2	76
	PIGT	76
	C1orf86	76
	ECI1	76
	POLE3	76
	GMDS	76
	GANAB	76
	HIST1H4B	76
	TMED1	76
	ASNA1	76
GET4	76	
MFN2	76	
UBC	76	
1276	MGST1	75
	C7orf50	75
	MRPL53	75
	C9orf23	75
	ANXA11	75
	SLC25A39	75
	ETFA	75
	BLVRB	75
	ACTR2	75
	DHX9	75
CTPS	75	
FARSB	75	
STT3A	75	
FAM136A	75	
UBE2Q1	75	
CNP	75	
METAP2	75	
SLC19A1	75	
EGLN2	75	
1295	HDLBP	74
	FOXM1	74
	SLC29A1	74
	RELA	74
	DCTN3	74
	PPP1R35	74
	BABAM1	74
	GCHFR	74
	CCDC16	74
		7

	SCAMP2	74
	PDLIM1	74
	PEA15	74
	YY1	74
	AK1	74
	SNX1	74
	SOX4	74
	GTF2H5	74
	SET	74
1313	PAFAH1 B3	73
	WBSCR2 2	73
	NOP56	73
	CHCHD5	73
	FDX1L	73
	NOSIP	73
	TSEN54	73
	MARS	73
	VAT1	73
	SLC2A1	73
	CENPB	73
1324	PSMG3	72
	SMARCD 1	72
	PSMD12	72
	ADAR	72
	SSBP4	72
	GATC	72
	NDUFS3	72
	C14orf1	72
	ATG4D	72
	CLN6	72
	BYSL	72
	NAP1L1	72
	IGBP1	72
	GTF2A2	72
	USP39	72
	BRX1	72
	FBXL15	72
	NPLOC4	72
	NUDT19	72
	DRG1	72
	DNAAJ1	72
	KIF20A	72
	C20orf11	72
	SAMD4B	72
	CCDC11 7	72
	KAT2A	72
	ERC1	72
	MTPN	72
	LUZP6	72
1353	USP1	71
	SARNP	71
	HCCS	71
	BCAT1	71
	SLCO5A 1	71
	CTSB	71
	DAP3	71
	WTAP	71
	TIMM8B	71
	BRI3	71
	NCOA4	71
	RPS12	71
	C16orf61	71
	ZNF593	71
	MRPL18	71
	BCAS2	71
	TIMM44	71
	ZNF358	71
	SAMM50	71
	SRP68	71
	RNF220	71
	TOMM20	71
	PARP1	71
	VMA21	71
1377	FDPS	70
	C16orf5	70
	PSMG2	70
	KDELR2	70
	POLDIP3	70
	ATN1	70
	CBX3	70
	SPAG7	70
	FAM32A	70
	DLGAP5	70
	ELOVL1	70
	CNPPD1	70
	PMVK	70
	ARPC1B	70
	TRIM11	70
	MED19	70

	SHKBP1	70
	TSN	70
	TADA3	70
	ITGAE	70
	PNPO	70
	RSL1D1	70
	CTNBL 1	70
	TOMM40	70
1401	SSSCA1	69
	VPS28	69
	RAB24	69
	NCDN	69
	DBN1	69
	HGS	69
	CDK2AP 2	69
	ICT1	69
	MTG1	69
	PYCR2	69
	SLBP	69
	BTBD2	69
	TUBB6	69
	ID2	69
	TSG101	69
	CEBPB	69
	MAP7D1	69
	SND1	69
	NDUFA4	69
	LMNB2	69
	DDX1	69
	CYCS	69
	HOXA10	69
1424	SLC37A4	68
	PRNP	68
	HNRNPR	68
	RPS27A	68
	AUP1	68
	UBL7	68
	SERPIN H1	68
	UBE2T	68
	UBR7	68
	C19orf70	68
	TMEM17 3	68
	PSMD2	68
	NCAPD2	68
	SCP2	68
1438	LOC1005 07246	67
	SORBS3	67
	RPL10	67
	PTPMT1	67
	SNRNP2 5	67
	DHX30	67
	KPNB1	67
	FAM98C	67
	NAA50	67
	ARPC3	67
	CHTF8	67
	ZNF146	67
	TEX264	66
1450	USMG5	66
	CSDA	66
	CCNDBP 1	66
	RPS9	66
	EBNA1B P2	66
	SFT2D1	66
	UBAP2L	66
	C3orf75	66
	YIF1A	66
	MZT1	66
	TEX261	66
	KIAA066 4	66
	TUBB2A	66
	SSB	66
	NOL12	66
1466	HRAS	65
	ITGB3BP	65
	SH3GL1	65
	CCND3	65
	RBM39	65
	WLS	65
	ATP5L	65
	RFC2	65
	HMG2	65
	NPC2	65
	GTF2E2	65
	MRPL16	65

	SLC35B2	65
	C1orf85	65
	RG9MTD 1	65
	TACO1	65
	ANXA5	65
	GLT25D1	65
	CIAO1	65
	CS	65
	LTV1	65
	KLHL15	65
	LSR	65
1489	ECHDC1	64
	MPST	64
	PDHB	64
	NFKBIB	64
	SLC4A2	64
	TMEM11	64
	NDUFA3	64
	WIBG	64
	GNAI2	64
	DDX49	64
	ARMC6	64
	ADK	64
	AMD1	64
	UBE2K	64
	GAR1	64
	C6orf115	64
	SHISA5	64
	NUDC	64
	C8orf33	64
	CISD1	64
	FTL	64
	CCNK	64
	MED29	64
	EEF1G	64
	DVL2	64
	CHCHD3	64
	PAFAH1 B2	64
	RPS10-NUDT3	64
	NUDT3	64
1518	UQCRB	63
	TRMT11 2	63
	PTRHD1	63
	C12orf73	63
	TMEM16 0	63
	WASF2	63
	SDR39U 1	63
	G3BP1	63
	RABEP1	63
	NUDT5	63
	TRA2A	63
	LRRC41	63
	MED4	63
	SON	63
	KIF2C	63
	EIF2S3	63
	C22orf13	63
	MRPL49	63
1536	YME1L1	62
	ALKBH6	62
	SEC23B	62
	RPLP0	62
	RPS20	62
	PPT1	62
	NLE1	62
	DPH2	62
	RPL37	62
	CNPY3	62
	CADM1	62
	TIAL1	62
	HIST1H1 E	62
	AP1S1	62
	TMEM19 9	62
	DYNLL2	62
	NOP2	62
	MRFAP1 L1	62
	CDC23	62
	IFRD2	62
	FAM53C	62
	YARS2	62
	C11orf83	62
	C12orf24	62
	HDDC2	62
	CTNNA1	62
	PGRMC2	62

	VAPA	62
	XRN2	62
	SRSF4	62
	NDFIP1	62
	TUBA1A	62
	JUN	62
	ARL3	62
	HCFC1	62
	MRPL52	62
	DPH1	62
1573	NDUFB5	61
	RBMX	61
	SCO2	61
	MED8	61
	RPL14	61
	SYPL1	61
	STRN4	61
	TAF15	61
	IMP4	61
	SEPW1	61
	DPY30	61
	POLR1C	61
	NXP4	61
	PIM2	61
	CNOT3	61
	CMAS	61
	MYH9	61
	CHAF1A	61
	TARBP2	61
	RNF7	61
	C15orf63	61
1594	IRF3	60
	DHPS	60
	DUT	60
	C12orf44	60
	BLOC1S 2	60
	PIGC	60
	TRMT2A	60
	FAM195 A	60
	CSK	60
	ZRANB2	60
	C6orf125	60
	ZNF330	60
	NDUFAF 4	60
	TPRN	60
	NUTF2	60
	ZFAND3	60
	VPS35	60
	PPP3R1	60
	SLC25A4	60
	LOC1005 06548	60
	PRPF6	60
	IRAK1	60
	UCK2	60
1617	PSRC1	59
	TNPO2	59
	BLCAP	59
	C8orf59	59
	LINC004 93	59
	EI24	59
	C21orf59	59
	DSTN	59
	M6PR	59
	CACYBP	59
	RAB35	59
	MKRN1	59
	UFC1	59
	CDKN2AI PNL	59
	UBQLN1	59
	COX7A2 L	59
	KIF23	59
	DUSP14	59
	NRSN2	59
	CLPTM1 L	59
	CCDC85 B	59
	EIF2B1	59
	UBL4A	59
	TIMMDC 1	59
	HSPB11	59
	BTBD6	59
	THAP11	59
	GDE1	59
	TRIB3	59
	SF3A2	59

1653	PNMA1	59
	ACBD6	59
	CDKN1B	59
	CTU1	59
	CPSF6	59
	CHD4	59
	ALG3	58
	CFL2	58
	OST4	58
	ID1	58
	SELS	58
	HINT2	58
	MORF4L1	58
	ANAPC5	58
	PGLS	58
	EXOSC2	58
	PFDN1	58
	HES1	58
	SDHB	58
	PMPCA	58
	CCDC51	58
	RPL39	58
	RAB21	58
	SERINC1	58
	DNAJC8	58
	TBCC	58
	ANKLE2	58
	FSTL1	58
	IFIT5	58
	C20orf29	58
	TMEM189	58
	SYNJ2B-P-COX16	58
	1679	GSTK1
PEMT		57
BAD		57
HERPUD1		57
SNHG6		57
MAGED2		57
PABPC4		57
JUP		57
LOC550643		57
ANAPC10		57
ZMYND19		57
HOXA5		57
HDAC3		57
DERL2		57
TRABD		57
HSPA8		57
EMG1		57
HNRNPA1		57
PSMD6		57
ZDHHC12		57
RPL22		57
CLEC11A		57
YTHDF1		57
C11orf58		57
TM9SF2		57
POLR2B		57
ZCRB1		57
1706	ZNF664	56
	GOLGA7	56
	IP6K2	56
	AGTRAP	56
	THYN1	56
	BEX4	56
	SLC35A2	56
	UNC119	56
	RNASEH2C	56
	C1GALT1C1	56
	PVRL2	56
	CSNK1A1	56
	C9orf123	56
	PPIA	56
	POLR3D	56
	TRAPPC2L	56
	C19orf25	56
	GNPDA1	56
	ARF4	56
	TFAM	56
	PIH1D1	56

1735	RPN1	56
	MSX2	56
	CARM1	56
	TOE1	56
	SUPT16H	56
	NMT1	56
	SMARCA5	56
	SMUG1	56
	PELO	55
	RPL23A	55
	ATF3	55
	HMGA1	55
	NFYC	55
	OS9	55
	UBXN6	55
	BOD1	55
	SARS2	55
	DOHH	55
	ATG9A	55
	AP2A1	55
	CIB1	55
	TOMM7	55
	PSMA6	55
	TSPAN31	55
	DTX3	55
	ORMDL2	55
	MRPL45	55
	ATP1B1	55
	PPCDC	55
	B3GNT1	55
	ZC3HC1	55
	SMARCE1	55
	TOMM70A	55
SNRNP200	55	
C15orf23	55	
CDK16	55	
VDAC1	55	
1764	C17orf49	54
	HOXC4	54
	PRKAG1	54
	SPG21	54
	LAMTOR2	54
	NUDT16L1	54
	NSFL1C	54
	METTL17	54
	RAD23B	54
	NSDHL	54
	PKN1	54
	TPT1	54
	HIST1H4H	54
	TRAPPC6A	54
	CDCA4	54
	RAD1	54
	DPYSL2	54
	AP3D1	54
	NOC4L	54
	RPS25	54
	C12orf10	54
	ZNF511	54
	HEBP2	54
	MRPS10	54
	DUS1L	54
	TH1L	54
	C7orf73	54
DUSP3	54	
DYNC1LI1	54	
HKR1	54	
SLC39A3	54	
COX15	54	
HSPA4	54	
WDR6	54	
C5orf51	54	
GNAI3	54	
1800	RPL17	53
	OTUD5	53
	KLC1	53
	BNIP1	53
	BEX2	53
	C4orf48	53
	ATPAF1	53
	LMNA	53
	RDH11	53
	EIF1B	53

1830	DHRS2	53
	CCDC43	53
	LSM5	53
	PDCD5	53
	C9orf142	53
	SHMT1	53
	CDC34	53
	DAP	53
	C9orf78	53
	PSMD7	53
	PPA1	53
	ZNF503	53
	C16orf53	53
	ENOPH1	53
	LRWD1	53
	ARL8B	53
	HMGA2	53
	PMPCB	53
	FASTKD5	53
	NUP62	53
	RPL17-C18ORF32	52
	OCIAD1	52
	HMOX2	52
	NDUFV1	52
	PI4KB	52
	AGPAT2	52
	SNX11	52
	MED27	52
	AAAS	52
	COCH	52
	TRIP13	52
	SHFM1	52
	BCL7C	52
DDAH1	52	
SRI	52	
HEBP1	52	
CMC1	52	
FUCA2	52	
DAPK3	52	
GTF2B	52	
MAGEF1	52	
AAGAB	52	
ZNF622	52	
PINK1	52	
PRPF38A	52	
CHERP	52	
PPP6R1	52	
STARD7	52	
PNN	52	
MKI67	52	
FLII	52	
DPP9	52	
EDC4	52	
PHLN1	52	
AP1B1	52	
1865	SCAMP4	51
	SLC35C2	51
	PSMC3IP	51
	C1orf31	51
	AIMP1	51
	CHMP2A	51
	ING3	51
	HMBS	51
	SIRT6	51
	FAM125A	51
	PPP1CB	51
	HIST1H2BJ	51
MRPS6	51	
SLC25A10	51	
RPS27L	51	
RPL4	51	
MOGS	51	
PPP2CB	51	
MGST3	51	
FAF1	51	
SNX2	51	
EIF4A2	51	
TSPYL2	51	
GLTSCR2	51	
APEH	51	
GATAD2B	51	
NAA38	51	
1892	HSPE1	50
	TGIF2-C20ORF	50

1926	24	
	TCEB1	50
	TMUB2	50
	U2AF1L4	50
	RAD51	50
	CENPA	50
	RSRC2	50
	CBY1	50
	NRGN	50
	CDK5RA P1	50
	DPCD	50
	HIRIP3	50
	TTC9C	50
	ADI1	50
	FKBP3	50
	MRPL50	50
	EID2	50
	MAPRE1	50
	RRP12	50
	NR2F6	50
	GGH	50
	SMNDC1	50
	TSC22D4	50
	DNAJB1	50
	C5orf22	50
	PELP1	50
	TRAP1	50
	DHX37	50
	LMO4	50
	SNRPE	50
	CSTF2T	50
	CENPF	50
	RBFOX2	50
1926	NIPAZ	49
	PQBP1	49
	SLC39A14	49
	IFI27L1	49
	REPIN1	49
	ATP5A1	49
	GLA	49
	PLEKHB2	49
	NCAPH2	49
	PRAF2	49
	MORN2	49
	SMC4	49
	CLNS1A	49
	TPRG1L	49
	RNPEP	49
	TARDBP	49
	NUCB1	49
	FUNDC1	49
	TERF2IP	49
	ARL2BP	49
	PHF23	49
	LRP3	49
	ALDH9A1	49
	GATAD2A	49
	PSMD4	49
	TNFRSF10D	49
	TCEB3	49
KIF5B	49	
TM9SF3	49	
RRP1B	49	
ATXN2L	49	
CBS	49	
HIF1A	49	
1959	KIAA1191	48
	ECI2	48
	CTSA	48
	ETFB	48
	VDAC3	48
	ATP6V0A1	48
	SCRN1	48
	LGMN	48
	GPATCH4	48
	ACOT8	48
	NTPCR	48
	CSNK1D	48
BAG2	48	
MED11	48	
RSL24D1	48	
CBX1	48	
PHF6	48	
DLX2	48	

1981	VPS37B	48	
	ATP5F1	48	
	ERF	48	
	HP1BP3	48	
	MDK	47	
	GADD45A	47	
	RNF40	47	
	RPL9	47	
	EXOSC3	47	
	MCAT	47	
	NCBP2	47	
	OAT	47	
	COMMD9	47	
	SRPR	47	
	C7orf30	47	
	CNIH4	47	
	NUP37	47	
	MIS18A	47	
	UBE2Z	47	
	SH3GLB1	47	
	AP2B1	47	
	TRAM1	47	
	ATP6AP2	47	
	NRBP1	47	
	KANSL2	47	
	ELOVL4	47	
	RCN2	47	
	SUPT6H	47	
	MYBBP1A	47	
	CSE1L	47	
	RRP7A	47	
	LOC647979	47	
	SSR1	47	
	EIF4EBP2	47	
	ORC4	47	
	BCL2L2-PABPN1	47	
	OVCA2	47	
	PABPN1	47	
	2015	SLMO2-ATP5E	46
		ING4	46
		PEG10	46
		RBBP4	46
		PSME1	46
CNN2		46	
MAPK1		46	
HAGH		46	
ARHGDI1A		46	
EIF3L		46	
SAT2		46	
PTMA		46	
QSOX1		46	
MRPL44		46	
ATP1B3		46	
LINC00116		46	
CLSTN1		46	
UTP14A		46	
MAP2K7		46	
C5orf15		46	
RRP1		46	
PDAP1		46	
CCDC94		46	
RGS16		46	
MTCH2		46	
MARCH5		46	
NCLN		46	
BAG3	46		
CORO1C	46		
NUB1	46		
SMAD4	46		
UBE2D3	46		
SYNGR1	46		
2048	HCFC1R1	45	
	GGCT	45	
	MAPK3	45	
	FIBP	45	
	PACSN2	45	
	KAT5	45	
	PARL	45	
	GPS2	45	
	PHF19	45	
	PRPS2	45	
	CTSL1	45	
CHMP5	45		

2087	SNHG11	45
	ADD1	45
	C17orf89	45
	TP53I13	45
	COQ4	45
	SEPN1	45
	GLE1	45
	G3BP2	45
	C5orf24	45
	IFI30	45
	YEATS4	45
	MZT2B	45
	SLC25A17	45
	DDX41	45
	NUDT15	45
	SAP30BP	45
	POLD1	45
	RARS	45
	PTRF	45
	XPO7	45
	HAUS5	45
	CBX5	45
	SREBF2	45
	IK	45
	SUMO1	45
	CELF1	45
	COX16	45
	MUTED-TXNDC5	44
	PDCD10	44
	FOXRED1	44
	YTHDF2	44
	TPD52	44
	MRPL33	44
ABHD14B	44	
MGAT1	44	
THAP7	44	
EXOSC4	44	
RGS10	44	
C22orf39	44	
COMMD6	44	
SEPHS1	44	
CIZ1	44	
FCGRT	44	
CDC42	44	
HMGNI1	44	
NXF1	44	
SEC11C	44	
ZNF581	44	
TMEM111	44	
USP14	44	
MRPL13	44	
TMEM223	44	
SERPINB6	44	
RANBP1	44	
GEMIN6	44	
NOB1	44	
NR1H2	44	
COPS7B	44	
HOXB7	44	
C11orf51	44	
DHRS11	44	
C16orf59	44	
DPF2	44	
NPDC1	44	
CCDC106	44	
SRPK1	44	
FAM89A	44	
MAD2L1	44	
WDR45L	44	
RNF126	44	
SLU7	44	
C16orf72	44	
PRPF3	44	
COPG	44	
2134	FTSJ1	43
	SDCCAG3	43
	ZMAT5	43
	PEX19	43
	ZNF576	43
	TMEM14C	43
	PEX11B	43
	C6orf106	43
	LBR	43

2169	ORC6	43
	JOSD2	43
	STX10	43
	MPV17	43
	STK24	43
	CETN2	43
	UBE2V2	43
	GABARA	43
	PL1	43
	CAP1	43
	STK25	43
	RNMTL1	43
	DDX54	43
	PRKAB1	43
	CMTM6	43
	NAP1L4	43
	CWC27	43
	DNAJA2	43
	FBR5	43
	UBE2R2	43
	CASC3	43
	H1FO	43
	DDX27	43
	PITPNA	43
	IRGQ	43
	ELOVL5	43
	ISYNA1	43
	ANAPC13	42
	YY1AP1	42
	KRTCAP2	42
	CHID1	42
TBP	42	
PFKM	42	
ALDH1A2	42	
CTCF	42	
DCTN4	42	
UGP2	42	
VPS26A	42	
PRR13	42	
NTHL1	42	
FTSJ2	42	
PTRH2	42	
WDR54	42	
DCTN6	42	
SERTAD1	42	
C19orf47	42	
GTF3A	42	
CCDC12	42	
DUSP1	42	
QPRT	42	
ACAT2	42	
CA2	42	
PITX1	42	
RRP9	42	
C2orf29	42	
SH3GLB2	42	
SMCR7L	42	
SPTSSA	42	
TTC5	42	
CRKL	42	
IPO5	42	
SLC7A1	42	
EIF4G3	42	
LRPAP1	42	
MBOAT7	42	
2207	CHURC1	41
	ZFP91	41
	CINP	41
	MICU1	41
	NDRG3	41
	BTF3L4	41
	UBE2H	41
	HSD17B4	41
	PRDX5	41
	MYL6B	41
	C20orf30	41
	ZNF771	41
	TCEAL8	41
	SLC35B1	41
	USP5	41
KARS	41	
CDC42SE1	41	
TTC19	41	
TSSC4	41	
COTL1	41	
COX6C	41	
AIG1	41	

2244	SAMD11	41
	CIRH1A	41
	TUBB2B	41
	CHMP4B	41
	TACC3	41
	FAM162A	41
	PTPN1	41
	CPE	41
	TOX4	41
	SMG5	41
	MRPS31	41
	XPO1	41
	FAM49B	41
	BTG1	41
	ANKRD52	41
	FAM122B	40
	NFIC	40
	ACYP1	40
	FAM96A	40
	STAU1	40
	CPSF4	40
	RRNAD1	40
ZFPL1	40	
ASAH1	40	
SAFB	40	
C1orf123	40	
DHX40	40	
TUSC2	40	
NDUFAF1	40	
TPRKB	40	
TAF10	40	
CBFB	40	
DLEU1	40	
C9orf16	40	
NDUFS4	40	
LOC93622	40	
PPIH	40	
KHK	40	
S100A11	40	
MRPL36	40	
TMEM66	40	
CIAPIN1	40	
DRG2	40	
CHIC2	40	
ARCN1	40	
DPAGT1	40	
SVIP	40	
RHEB	40	
TM2D1	40	
CUTC	40	
ASF1A	40	
GGNBP2	40	
DARS	40	
C6orf120	40	
FAM98A	40	
ADIPOR2	40	
CDC6	40	
HEXA	40	
NRAS	40	
SV2A	40	
ETV5	40	
DDX18	40	
TMEM167A	40	
TUG1	40	
NDUF6B	40	
ATAD3A	40	
RAB5B	40	
ATP5E	40	
UBE2V1	39	
TMEM216	39	
GSR	39	
TMEM141	39	
LARP6	39	
CLU	39	
SURF2	39	
HIST1H4D	39	
C20orf96	39	
HIST1H2AH	39	
CPSF7	39	
TRAFD1	39	
RBCK1	39	
SF3B14	39	
HMGCS1	39	
CHCHD6	39	

	TMEM16A	39
	PDZD11	39
	NDUFV2	39
	UBXN8	39
	SAC3D1	39
	MGEA5	39
	NOL7	39
	ZCCHC17	39
	ALAS1	39
	TMEM50A	39
	WHSC2	39
	IFT52	39
	ARAF	39
	TSPAN12	39
	PITPNB	39
	RAB10	39
	SSR3	39
	FUBP1	39
	NUP85	39
	LARP1	39
	ZFR	39
	SNHG3	39
	RAB4B-EGLN2	39
2336	TJAP1	38
	TSTD1	38
	DBNL	38
	INSIG1	38
	CXorf56	38
	GRK6	38
	C1orf198	38
	ORC3	38
	SUMF2	38
	NIPSNAP1	38
	MFSD10	38
	HIST1H4E	38
	CRK	38
	TMEM201	38
	SEC24C	38
	CBLL1	38
	DNAJB6	38
	CAPRIN1	38
	CYB5R1	38
	NDRG1	38
	RBMX2	38
	NAT9	38
	UCHL3	38
	BAG1	38
	RPRM	38
	GNG11	38
	AASDHPPT	38
	B3GALT6	38
	LYPLA2	38
	QPCT	38
	DCAF12	38
	C6orf62	38
	NBN	38
	MSH2	38
	TMEM48	38
	AKIP1	38
	SYS1	38
2373	PIGP	37
	RASSF1	37
	RFC4	37
	MAD2L1BP	37
	RPS13	37
	ETV4	37
	TRIM41	37
	UBE2E3	37
	B9D2	37
	MGAT4B	37
	PDCD2L	37
	SDHAF2	37
	TNFRSF12A	37
	SYAP1	37
	SCYL1	37
	MED28	37
	SNRNP40	37
	HOXD11	37
	POMGN1	37
	MAP4	37
	SFXN4	37

	SLC25A28	37
	IER3IP1	37
	RNF10	37
	GPXKOW	37
	FBRSL1	37
	LAMP2	37
	BRP44L	37
	SMARCC1	37
	CMBL	37
	SLC38A2	37
	BAIAP2L1	37
	NUP188	37
	STK40	37
	GCN1L1	37
	BCCIP	37
	DEDD	37
	PDLIM7	37
	CGGBP1	37
	GJA9-MYCBP	37
2413	ARL2-SNX15	36
	ATF7	36
	SMARCA4	36
	GTPBP3	36
	SDCBP	36
	LRR1	36
	TMEM219	36
	LUC7L	36
	CASP7	36
	DCTD	36
	NDUFB1	36
	PAPOLA	36
	ANAPC7	36
	DNAJA3	36
	GPR108	36
	SREBF1	36
	COQ7	36
	RBM17	36
	NFATC3	36
	EXOSC10	36
	FAM207A	36
	GLOD4	36
	ENDOG	36
	C2orf47	36
	RHBDD3	36
	MIIP	36
	FSD1	36
	EPB41	36
	LXN	36
	BTBD1	36
	SUCLG1	36
	LONP1	36
	ZNF346	36
	KRI1	36
	HINT3	36
	RAB31	36
	FTSJ3	36
	TIPRL	36
	GSG2	36
	EFCAB11	36
	MPZL1	36
	SMG7	36
	TMED7	36
2456	SYNJ2BP	35
	NT5C	35
	FLYWCH2	35
	TXNL4B	35
	ASB6	35
	LETMD1	35
	NUD2	35
	ZFAND6	35
	SNHG5	35
	MRPL21	35
	ADSL	35
	ZSWIM7	35
	BCKDK	35
	LDB1	35
	SDF2	35
	UNK	35
	LCMT1	35
	UBTF	35
	AKIRIN1	35
	STX4	35
	RPL39L	35

	POLE4	35
	PFKL	35
	MRPL46	35
	SPR	35
	RNF181	35
	TSSC1	35
	NDUFAF2	35
	CNOT8	35
	EIF2B2	35
	BECN1	35
	WDR61	35
	SUV39H1	35
	FAM82A2	35
	OGFR	35
	CTSZ	35
	WBP11	35
	QARS	35
	INA	35
	ERCC3	35
	RIOK2	35
	C11orf2	35
	MRPS27	35
	LEPREL4	35
	ZNF512	35
	EFNA5	35
	NUDCD3	35
	YTHDC1	35
	LASP1	35
	DNMT1	35
	BAZ2A	35
	CLDND1	35
	EPB41L2	35
2509	PCID2	34
	SLC39A9	34
	SLC6A15	34
	KLC2	34
	HAT1	34
	C18orf32	34
	STX5	34
	COPS8	34
	C19orf79	34
	SRP54	34
	MAP2K3	34
	APOPT1	34
	REXO2	34
	HMOX1	34
	ARV1	34
	COPS2	34
	MRPL30	34
	C1orf131	34
	EIF3M	34
	SAMD1	34
	GLRX3	34
	B3GAT3	34
	RAB1A	34
	PROCR	34
	MEAF6	34
	DARS2	34
	C12orf47	34
	TBL2	34
	HDHD2	34
	HMGNA4	34
	RHOT2	34
	DONSON	34
	FAF2	34
	IPO4	34
	CCNF	34
	SYMPK	34
	CCDC50	34
	ADH5	34
	PDCK	34
	CKAP5	34
	NKX2-5	34
	NAE1	34
	C1orf12	34
	CTSC	34
	MBNL1	34
2554	SERF2-C15ORF63	33
	SETDB1	33
	SMAP2	33
	B4GALT3	33
	DPF1	33
	MIR4709	33
	CDC45	33
	SKP2	33
	MNAT1	33

	SHC1	33
	GINS3	33
	TMEM70	33
	TMEM98	33
	HIST1H3H	33
	EPHX1	33
	SNX5	33
	WAC	33
	RCC2	33
	PMM1	33
	LSM10	33
	FAM100A	33
	C19orf52	33
	LUC7L3	33
	CCDC58	33
	GRHPR	33
	DYRK4	33
	R3HCC1	33
	TOMM34	33
	GOLM1	33
	TMEM115	33
	ANP32A	33
	CDX2	33
	TMEM30A	33
	PFND4	33
	PCGF2	33
	CISD3	33
	BLVRA	33
	KCTD10	33
	CEBPA	33
	ATF1	33
	FXC1	33
	TUBGCP2	33
	CHAF1B	33
	LOC147727	33
	PFAS	33
	FCF1	33
	SNAP29	33
	INTS5	33
	MAGOHB	33
	MMACHC	33
	TRIM65	33
	MORC2	33
	ZNF726	33
	PHKB	33
	METTL23	33
	BLOC1S1	33
2610	COX11	32
	SNUPN	32
	CITED2	32
	LAS1L	32
	TNFRSF10B	32
	CEP57	32
	VAPB	32
	C10orf2	32
	ASCC1	32
	MTMR14	32
	OCIAD2	32
	CORO1B	32
	ACADVL	32
	PSAT1	32
	TIMM8A	32
	CMPK1	32
	LOC100505876	32
	SDHC	32
	RAB2A	32
	PPP1R14B	32
	YIPF2	32
	DUSP12	32
	C20orf3	32
	R3HDM4	32
	ALKBH7	32
	COPS5	32
	UBE2E2	32
	ID4	32
	THOC7	32
	WDR74	32
	ZNF768	32
	SURF6	32
	HYOU1	32
	CPSF3L	32
	TELO2	32

	MUL1	32
	AP1G1	32
	MED31	32
	BET1	32
	ARL6IP5	32
	CCDC99	32
	CDK9	32
	ACTR6	32
	AKAP8L	32
	ASNSD1	32
	MOAP1	32
	PPP1R1 5A	32
	AKAP12	32
	ZC3H15	32
	SC5DL	32
	CSNK1G 2	32
	UBIAD1	32
	BRAT1	32
	NUDT21	32
	CCAR1	32
	NOP14	32
	MCMBP	32
	KCTD12	32
	PTPN23	32
	THRAP3	32
	RRP15	32
	VDAC2	32
	TPM1	32
	IMPDH1	32
2675	PDF	31
	PPP2R5 C	31
	ALKBH2	31
	EGFL7	31
	NIP7	31
	C11orf68	31
	ADIPOR 1	31
	DERL1	31
	TPM3	31
	GAMT	31
	TIPIN	31
	TRUB2	31
	TPGS2	31
	EBPL	31
	SCO1	31
	LOC1522 17	31
	TUSC3	31
	TRMU	31
	EAPP	31
	HTATSF 1	31
	EIF2B5	31
	KAT7	31
	ARL1	31
	PSPH	31
	ZNF282	31
	GARS	31
	LTA4H	31
	RNF11	31
	NOL11	31
	UTP3	31
	GNA11	31
	DNAJC9	31
	KCTD5	31
	NDUFA1 0	31
	PURA	31
	ILKAP	31
	RTF1	31
	MTHFD1	31
	GNS	31
	AGPAT5	31
	PWP2	31
	MARCH6	31
	TFE3	31
	PRRC2C	31
	GPN3	31
	TYW3	31
	SLC25A1 3	31
	SPRYD7	31
	FYTTD1	31
	UMPS	31
	HNRNPU L2	31
	COG8	31
	RPL13A P5	31
2727	AMZ2	30
	C18orf21	30

	CRNDE	30
	HIST1H2 BD	30
	BRE	30
	KAT8	30
	CHAC1	30
	WASF1	30
	ATF5	30
	CAV1	30
	RCE1	30
	CDK5	30
	INPP5K	30
	SCARB1	30
	CDKN3	30
	SPC24	30
	MST4	30
	CLP1	30
	NSF	30
	CYB561 D2	30
	LANCL1	30
	AGBL5	30
	RPL26	30
	CD276	30
	YIPF5	30
	EXOSC1	30
	REEP2	30
	WRAP73	30
	LHFP	30
	USP48	30
	RCHY1	30
	WSB2	30
	HAUS1	30
	PWP1	30
	FAM83D	30
	CAPZA2	30
	PDIA4	30
	ARHGEF 18	30
	COPB1	30
	GOLPH3 L	30
	PGP	30
	MRPS30	30
	DTNBP1	30
	PCNP	30
	CCDC12 7	30
	RAB14	30
	FUNDC2	30
	COX10	30
	RLTPR	30
	SORD	30
	PGM1	30
	CREM	30
2779	BMI1	29
	PMF1- BGLAP	29
	HIST1H3 D	29
	CYB5A	29
	STARD3	29
	THAP3	29
	ELAC2	29
	SMAD5	29
	ZNF529	29
	BCLAF1	29
	DCTN5	29
	MASTL	29
	SPNS1	29
	RAD51C	29
	COMTD1	29
	GMPR2	29
	RPL7A	29
	MON1A	29
	MFSD5	29
	FAM64A	29
	CCDC28 B	29
	ALDH2	29
	HIST1H2 AG	29
	STAG2	29
	SEH1L	29
	ACADM	29
	C3orf14	29
	XPNPEP 3	29
	ATXN10	29
	ASRGL1	29
	OSTC	29
	PAK1IP1	29
	PRMT6	29
	POLB	29

	FN3KRP	29
	HAUS2	29
	GADD45 B	29
	PEX14	29
	LOC1001 29361	29
	C17orf56	29
	RSAD1	29
	TCTA	29
	GM2A	29
	TLX3	29
	RAB11B	29
	RAB5A	29
	CSNK2A 2	29
	PDCD7	29
	CNDP2	29
	TTLL12	29
	ACBD3	29
	KIAA127 9	29
	HIATL1	29
	CCDC47	29
	ZNF227	29
	SLC20A1	29
	MLF1IP	29
	PPPDE1	29
	HMG3B	29
	TAB2	29
	EIF1AX	29
	KPNA4	29
	PVR	29
2842	PPAN	28
	PSMG4	28
	FAM54B	28
	PEX26	28
	S100A13	28
	TPD52L1	28
	MTHFD1 L	28
	ZFYVE21	28
	RPS15A	28
	PPA2	28
	ZNF414	28
	NOP16	28
	PIP5K1A	28
	FAHD1	28
	FPGS	28
	CTTN	28
	MKNK2	28
	TIMM10	28
	SRRD	28
	PEX10	28
	LYAR	28
	THAP1	28
	NUDCD2	28
	EED	28
	MZT2A	28
	SDSL	28
	IVD	28
	MED22	28
	NUBP1	28
	SEC22B	28
	CENPQ	28
	DCTN1	28
	HOXC9	28
	AEN	28
	TYSND1	28
	HMG20B	28
	DHR57B	28
	ANXA1	28
	RAB8A	28
	RASL10 B	28
	GPBP1	28
	EIF2B3	28
	AARS	28
	FBXO18	28
	CPSF3	28
	ATP6V1 B2	28
	HSPA14	28
	GNPNAT 1	28
	MAP1LC 3B	28
	CRNKL1	28
	BAP1	28
	C2orf68	28
	TNPO1	28
	GEMIN4	28
	LPCAT1	28
	WSB1	28

	SART1	28
	KIAA090 7	28
	PRRC2B	28
	MAP1B	28
	PDLM2	28
	SPTAN1	28
	LINC003 38	28
	TMX2- CTNND1	28
2906	GLRX2	27
	MRPL11	27
	LITAF	27
	THTPA	27
	TPRA1	27
	SNRNP2 7	27
	VTRNA1- 1	27
	CENPN	27
	TXNL1	27
	FHL3	27
	SNCA	27
	HLA- DQB1	27
	MTX2	27
	TMEM12 9	27
	RBM18	27
	HSPD1	27
	SIL1	27
	RNF34	27
	UBE2D1	27
	C3orf26	27
	SRSF11	27
	RNF41	27
	ORMDL1	27
	MRPS15	27
	TMEM14 A	27
	METTL5	27
	COQ5	27
	DNAJB1 1	27
	FBXW9	27
	NPAS1	27
	QTRT1	27
	TEFM	27
	TMBIM1	27
	DHRS3	27
	CRTC2	27
	H2AFJ	27
	OSBPL9	27
	TDP2	27
	C17orf63	27
	ISOC1	27
	CDO1	27
	FKBP5	27
	CCDC97	27
	VMP1	27
	COPA	27
	GNB1L	27
	BAK1	27
	TRIM8	27
	CALCOC O2	27
	CHP	27
	STK11	27
	SP1	27
	EIF4E	27
	SLC48A1	27
	KDM5C	27
	UBE2S	27
	GRIPAP1	27
	TMOD3	27
	SMG8	27
	GNL3L	27
	KRAS	27
	ZC3H18	27
	MSH6	27
	ARMC1	27
	ME1	27
	SUZ12	27
	NOL9	27
	AMBRA1	27
	FAM3A	27
	RASSF7	27
2976	SCNM1	26
	RBM12	26
	BZW2	26
	ILK	26
	UBAC2	26
	NASP	26

	IMMT	26
	DYRK1B	26
	KCTD15	26
	CANT1	26
	ZDHH16	26
	LOC284408	26
	GBAS	26
	TCOF1	26
	SNHG10	26
	WIPI2	26
	MED18	26
	HIST1H4A	26
	TCEAL3	26
	CCNC	26
	SKA1	26
	HIST1H2AC	26
	WDR62	26
	RAB6A	26
	HIST1H2AI	26
	MED15	26
	DLL3	26
	INTS12	26
	DRAP1	26
	ARFRP1	26
	MOB1A	26
	GTF3C2	26
	C15orf61	26
	PUM1	26
	DNAL4	26
	C9orf82	26
	SPC25	26
	C11orf48	26
	GTF2F2	26
	NSMCE2	26
	MSRB2	26
	DNAJC1	26
	CKAP4	26
	UBLCP1	26
	PYGO2	26
	MED25	26
	MMS19	26
	FUBP3	26
	PGAM1	26
	NUP43	26
	POGK	26
	LRRC42	26
	RIT1	26
	TP53INP2	26
	EMP2	26
	FECH	26
	LETM1	26
	NAA15	26
	METTL6	26
	PLEKHH3	26
	ARIH2	26
	ESPL1	26
	NCBP1	26
	MKLN1	26
	PIGL	26
	CREB5	26
	TOM1	26
	TMX2	26
3044	COMMD3-BMI1	25
	COMMD3	25
	SYS1-DBNDD2	25
	C8orf76	25
	MLF1	25
	BCL7B	25
	MAX	25
	TMEM126B	25
	NIF3L1	25
	MFSD12	25
	SLC6A8	25
	ABHD12	25
	CEP55	25
	SNAP23	25
	MT1X	25
	P4HTM	25
	PSPC1	25
	CCDC23	25
	DNAJB12	25
	NXN	25

	ESYT1	25
	CUL2	25
	ORA11	25
	LZIC	25
	CAMK1	25
	ZFAND2A	25
	TCF3	25
	PPIC	25
	PLRG1	25
	PTK7	25
	ORC5	25
	VHL	25
	TSTA3	25
	MED16	25
	RNF26	25
	IFT81	25
	CERS5	25
	DOLK	25
	TRAF2	25
	ELP4	25
	ZDHH9	25
	RALA	25
	DDX55	25
	CCDC90B	25
	RAP2C	25
	UBQLN2	25
	UNC119B	25
	GMFB	25
	RNF2	25
	UBFD1	25
	SDC2	25
	SDHA	25
	INTS10	25
	CBR4	25
	NFE2L1	25
	DGCR14	25
	FAM120AOS	25
	WDR26	25
	TMEM185B	25
	SLC25A20	25
	DNAJC5	25
	HIF1AN	25
	SDHD	25
	RPRD2	25
	TNRC6A	25
	KIAA0100	25
	CKM	25
	FKBP2	25
	CCNB1IP1	25
	TCEAL1	25
	SIGIRR	25
	WDR13	25
	RBM23	25
	TSPAN17	25
	MX11	25
	SUN2	25
	GEMIN8	25
	RAB4A	25
3122	BSCL2	24
	TOR2A	24
	NF2	24
	FKBP11	24
	DEF8	24
	C12orf32	24
	SPOP	24
	UBAP1	24
	TMEM126A	24
	VTRNA1-2	24
	YWHAZ	24
	KLC4	24
	NPTN	24
	PUSL1	24
	ENY2	24
	CLN3	24
	UFDF1	24
	LOC401397	24
	DHDDS	24
	RFXANK	24
	EFHD1	24
	STX8	24
	MVK	24
	FDXR	24
	ADPGK	24

	LAMTOR3	24
	DPYSL5	24
	C9orf89	24
	GGA3	24
	SLC5A6	24
	PXN	24
	C11orf1	24
	C8orf55	24
	NUP98	24
	MSMO1	24
	ARHGAP1	24
	LAP3	24
	ARGLU1	24
	DPH3	24
	EXOSC6	24
	PIAS4	24
	KDM1A	24
	UBAC1	24
	TOR1A	24
	VCL	24
	ZC3H3	24
	IRS4	24
	ACSL3	24
	ERGIC1	24
	TRMT61A	24
	LCLAT1	24
	ZNF574	24
	DIAPH1	24
	ARG2	24
	ACAA2	24
	ACTR3	24
	PRR14	24
	NSUN4	24
	IVNS1ABP	24
	KPNA3	24
	PPPDE2	24
	GGCX	24
	STMN3	24
	FOPNL	24
	C8orf38	24
	SRF	24
	BNIP3L	24
	TSR1	24
	MLEC	24
	FBXL3	24
	EPRS	24
	AGPAT6	24
	ZADH2	24
	EXOC4	24
	MDM2	24
	PLDN	24
	ST7L	24
	ACACA	24
	AGFG1	24
	BRD8	24
3202	RAB4B	23
	MIARAB4B	23
	RPL3	23
	GSTZ1	23
	NAA60	23
	NFE2L2	23
	FYN	23
	GYS1	23
	TMED5	23
	PANK2	23
	TAF6	23
	BRMS1	23
	SNAPC2	23
	DCAF11	23
	RNF145	23
	IFT46	23
	RAB9A	23
	THOC5	23
	ATP5H	23
	APBB1	23
	GMPPA	23
	TUFT1	23
	RLN2	23
	HIST1H2BC	23
	SERINC3	23
	PARP2	23
	CTXN1	23
	RAD51A P1	23
	RPL24	23
	GPT2	23
	RQCD1	23
	NR2C2A	23

	P	
	RMI2	23
	MFSD3	23
	KIF2A	23
	LSM6	23
	GSS	23
	BIN3	23
	HOXA7	23
	HOXB6	23
	BTBD3	23
	MPHOSP6	23
	YIPF4	23
	NKAP	23
	BARX2	23
	GPATCH3	23
	C9orf40	23
	AVP11	23
	HOXA11-AS1	23
	SUV420H2	23
	PLAC1	23
	PANK4	23
	SLC2A4RG	23
	VPS33A	23
	HOXD13	23
	POR	23
	LYRM2	23
	NUP107	23
	NEK2	23
	TWISTNB	23
	SELT	23
	KRT8	23
	LMAN1	23
	PAFAH1B1	23
	PRPF40A	23
	EIF5B	23
	PPRC1	23
	SRSF8	23
	ANKH	23
	MTPAP	23
	BCOR	23
	DNTTIP2	23
	CARDK	23
	ANAPC11	23
	C15orf44	23
	TAX1BP3	23
	CCNT1	23
3279	DBF4B	22
	PATZ1	22
	BOLA3	22
	C14orf80	22
	PRPSAP2	22
	HOTAIRM1	22
	ZNF32	22
	GTPBP8	22
	BCS1L	22
	CRCP	22
	GOSR2	22
	PSMD10	22
	LRRC61	22
	DFFA	22
	RPS2	22
	PRCP	22
	LARP7	22
	NCKIPSD	22
	RPIA	22
	ALG14	22
	CCS	22
	SKA3	22
	COMMD10	22
	TMEM69	22
	TXLNG	22
	NANS	22
	POLR3GL	22
	QRICH1	22
	WDR33	22
	Cxorf26	22
	SEPX1	22
	CHMP4A	22
	CREB3	22
	PRKACA	22

	BATF3	22
	SBDS	22
	MKRN2	22
	POLR3C	22
	RFK	22
	TBC1D1 0B	22
	ORMDL3	22
	PDDC1	22
	C6orf211	22
	LACTB2	22
	TGOLN2	22
	MGAT2	22
	BFAR	22
	PIGH	22
	C20orf72	22
	BPNT1	22
	GTPBP2	22
	TOR1AIP 1	22
	SLC25A4 4	22
	FAM101 B	22
	NACC1	22
	DIS3	22
	MKL1	22
	TM9SF1	22
	DDX20	22
	WDR82	22
	MSL1	22
	KRR1	22
	KBTBD6	22
	B4GALT 5	22
	CEP41	22
	EAF1	22
	RNFT1	22
	DDX52	22
	AXIN1	22
	CYP51A 1	22
	MED14	22
	C1orf21	22
	KIF1C	22
	TLN1	22
	TPR	22
	PTEN	22
	KBTBD4	22
	UBE2G2	22
	CDV3	22
	GBF1	22
	FGFR1	22
	ADAT3	22
3361	PIP4K2C	21
	CAMTA1	21
	RPL41	21
	RPL10A	21
	POMT1	21
	PPCS	21
	MT2A	21
	TAX1BP 1	21
	CCDC59	21
	PRKD2	21
	CASP2	21
	LOC1005 06469	21
	LYPD1	21
	ARL6IP6	21
	EXOC7	21
	GALK1	21
	TRAPPC 6B	21
	FAM89B	21
	MVD	21
	CLINT1	21
	IRF2BP2	21
	FAM104 A	21
	BET1L	21
	LMCD1	21
	NMU	21
	GSTA4	21
	DPM1	21
	APLP1	21
	RRP8	21
	LIN37	21
	CRIP1	21
	CDC42E P1	21
	PIGO	21
	CAV2	21
	ADNP	21
	ASCC2	21

	AP3S1	21
	PYGL	21
	DEDD2	21
	IER5	21
	ZNHIT2	21
	NUP155	21
	CENPK	21
	IER2	21
	EFHA1	21
	RNF25	21
	DLG1	21
	SLFN11	21
	ZBTB48	21
	IFNGR2	21
	FAM192 A	21
	C21orf2	21
	ARMC7	21
	PTDSS1	21
	PRUNE	21
	MBD6	21
	FOXJ3	21
	NAGK	21
	HEXB	21
	ZUFSP	21
	RNF219	21
	SPRY2	21
	ARF6	21
	MAVS	21
	HBS1L	21
	FAM8A1	21
	TMEM19 4A	21
	ZFAND5	21
	GNL2	21
	RFT1	21
	ZER1	21
	TIMELES S	21
	SPAG5	21
	CCDC6	21
	ZNF770	21
	RHOBTB 3	21
	ATP6V1 C1	21
	PARM1	21
	HNRNPA 3	21
	ISY1	21
	MIR17H G	21
	CORO7- PAM16	21
3444	PAM16	21
	MIR3620	20
	UQCC	20
	ATP6V1 H	20
	ZNF644	20
	ERCC1	20
	ZNF384	20
	IP6K1	20
	POLR3H	20
	ZMYM3	20
	FXR1	20
	PDK2	20
	RBM34	20
	C19orf60	20
	METTL1	20
	LOC1005 05761	20
	DUS3L	20
	C6orf226	20
	HAUS8	20
	IDH3G	20
	CARS	20
	VGLL4	20
	AP3M2	20
	SNX12	20
	DNLZ	20
	NECAP1	20
	EMP3	20
	PTS	20
	RABGGT B	20
	RPSA	20
	NAT10	20
	GNP2	20
	IGFBP2	20
	FAM98B	20
	CWC15	20
	IL10RB	20
	CRELD2	20
	JUND	20

	TSPAN9	20
	WDR73	20
	METTL9	20
	CNNM3	20
	GATA3	20
	KIFAP3	20
	UNC45A	20
	TMEM15 9	20
	SWSAP1	20
	NCSTN	20
	MED9	20
	ANAPC2	20
	UTP18	20
	RNF214	20
	TMEM12 7	20
	UBA2	20
	JOSD1	20
	FLYWCH 1	20
	FAM36A	20
	TOLLIP	20
	PEX6	20
	RPA3	20
	ZNF544	20
	TXNRD2	20
	SEN2	20
	FRA10A C1	20
	PTPRF	20
	KATNA1	20
	RBM26	20
	WIZ	20
	SRP72	20
	RNF8	20
	UFM1	20
	CCDC25	20
	C2orf18	20
	CNOT6	20
	STK11IP	20
	AKAP8	20
	KCTD20	20
	EIF3A	20
	ITPRIP	20
	ZDHHC2 0	20
	SMU1	20
	ATP6V1 A	20
	MLLT6	20
	NCKAP5 L	20
	CLDN15	20
	AMOTL1	20
	PRSS23	20
	SLC50A1	20
	TNIP1	20
	DNAH14	20
	CHCHD7	20
	ZNF410	20
	C10orf32	20
	KHDC1	20
3537	NDUFC2	19
	-	
	KCTD14	19
	SEC14L1	19
	GPR137	19
	EEF1B2	19
	FHL2	19
	DSN1	19
	POLD4	19
	AIFM1	19
	HK1	19
	PCSK1N	19
	HIST3H2 A	19
	C17orf90	19
	RIOK1	19
	PRPF4	19
	EIF2D	19
	CCNH	19
	ATP5EP 2	19
	FAM158 A	19
	WRAP53	19
	GSTP1	19
	ELK1	19
	N6AMT2	19
	MAPK8IP 2	19
	ETHE1	19
	BOLA1	19
	TRPC4A	19

	P	
	C16orf91	19
	G6PD	19
	TTK	19
	ARHGAP 11A	19
	C9orf37	19
	PRIM1	19
	NETO2	19
	YBEY	19
	NDFIP2	19
	CCDC11 5	19
	SLC9A3 R1	19
	PROSER 1	19
	APOC1	19
	MKI67IP	19
	ALKBH3	19
	SMYD5	19
	MRPS22	19
	RPS6KB 2	19
	HARS2	19
	POLG	19
	OGT	19
	ZNF579	19
	NQO2	19
	YIPF6	19
	FSCN1	19
	SLCO4A 1	19
	CENPT	19
	ATIC	19
	TCF25	19
	RAF1	19
	ACTR10	19
	ZMPSTE 24	19
	LOC7283 92	19
	TBCA	19
	PCOLCE 2	19
	KIAA009 0	19
	TM7SF3	19
	HSD17B 12	19
	NPEPPS	19
	PPIL4	19
	MED20	19
	PRRC1	19
	DNAJC1 1	19
	RPRD1B	19
	GPBP1L 1	19
	TMEM19	19
	UBE2J1	19
	USP7	19
	GALM	19
	RND2	19
	C5orf43	19
	ZNF687	19
	SCAMP1	19
	RINT1	19
	GRPEL2	19
	SLC31A1	19
	PKNOX1	19
	ZDHHC2	19
	NAT8L	19
	TNFAIP1	19
	LUZP1	19
	ZCCHC1 0	19
	GSTM3	19
	DNAJC1 8	19
	SALL2	19
	CDK5RA P3	19
	SRRM1	19
	SCAF8	19
	CDK6	19
	GGA2	19
	DNAJC3	19
	SHCBP1	19
	NCAPH	19
	DDX50	19
	LIN7C	19
	DDX6	19
	THUMPD 1	19

	CCND2	19
	SLC35F1	19
	MTHFD2 L	19
	WDR83	19
	MAPKAP K3	19
	ATG12	19
	LOC4042 66	19
	EIF1AD	19
	FAM122 A	19
3650	AP3S2	19
	URI1	18
	C7orf49	18
	ATP13A2	18
	C20orf7	18
	MGST2	18
	RWDD1	18
	RPL34	18
	TMEM13 8	18
	HMMR	18
	NARF	18
	SLC25A1 9	18
	CNOT2	18
	NADK	18
	BPGM	18
	PRR24	18
	SH3BGR	18
	HIST2H2 AC	18
	PSEN2	18
	TROVE2	18
	FAM204 A	18
	LEMD2	18
	THRA	18
	UPF3B	18
	C1orf52	18
	RPL6	18
	INPP1	18
	CD97	18
	SCRN2	18
	SURF1	18
	FOXRED 2	18
	C13orf27	18
	CAMTA2	18
	PPP1R1 4C	18
	GPA1	18
	NXT1	18
	AKT1	18
	CCDC13 0	18
	COMMD 8	18
	MAPK14	18
	SWI5	18
	TXNDC9	18
	NET1	18
	POLR2D	18
	ALDH16 A1	18
	ERGIC2	18
	ACP2	18
	TBCE	18
	EIF2AK1	18
	EFHD2	18
	COQ10B	18
	NDUFA5	18
	BSDC1	18
	CHST14	18
	FBXO28	18
	MELK	18
	GTSE1	18
	PROSC	18
	PREP	18
	DDX28	18
	SP2	18
	PHKG2	18
	DDX23	18
	SCAP	18
	DENR	18
	GATA6	18
	NPTX2	18
	HSPH1	18
	ZIC5	18
	RABGEF 1	18
	POGZ	18
	EPCAM	18

	CC2D1A	18
	C4orf46	18
	CCDC71 L	18
	APEX2	18
	MLLT1	18
	AMFR	18
	IFFO1	18
	PNISR	18
	AGFG2	18
	KCTD2	18
	SLC25A3 2	18
	RNF44	18
	GBA2	18
	CDK12	18
	ALG1	18
	GORASP 1	18
	F11R	18
	ZNF777	18
	AMBN	18
	ZNF776	18
	NR1D1	18
	ABCA3	18
	CASK	18
	RMND5A	18
	DDX31	18
	HEATR2	18
	CDS2	18
	FAM199 X	18
	GPR180	18
	TUBB	18
	KDM5B	18
	PID1	18
	IQSEC2	18
	TFDP2	18
3755	PGAP2	17
	MEN1	17
	LARP4	17
	MPG	17
	IFT27	17
	ASPSR 1	17
	DPH5	17
	HTATIP2	17
	DCAKD	17
	WRB	17
	SHARPI N	17
	C3orf78	17
	DHRS1	17
	ZFAND1	17
	CETN3	17
	NELF	17
	MIR10A	17
	RPUSD2	17
	MRI1	17
	IFRD1	17
	ENTPD6	17
	CHCHD4	17
	ALDH18 A1	17
	CHPF	17
	MKKS	17
	MSX1	17
	FANCL	17
	RILPL2	17
	CHMP2B	17
	CFDP1	17
	COX7B	17
	CDCA7	17
	COPB2	17
	PDE6D	17
	THAP5	17
	C12orf52	17
	MED7	17
	RTCD1	17
	TMEM9B	17
	C19orf51	17
	PRPF38 B	17
	RSU1	17
	SFXN2	17
	ISG20L2	17
	CERCAM	17
	JMJD8	17
	IST1	17
	TTC38	17
	PAWR	17
	TSPAN6	17
	REXO4	17
	SLC25A3	17

	6	
	RFC1	17
	XRCC1	17
	ANKRD4 0	17
	VPS45	17
	RANBP9	17
	COPG2	17
	ASB8	17
	FANCG	17
	TRAF7	17
	ISCA2	17
	GNAI1	17
	KATNB1	17
	CHD8	17
	MED30	17
	SAAL1	17
	CDR2	17
	SCRIB	17
	DCPS	17
	METTL3	17
	MTMR1	17
	PRKAR2 B	17
	CRBN	17
	MESDC2	17
	SCD5	17
	KLHL21	17
	ZNHIT6	17
	PRKRIP1	17
	DNAJB9	17
	DHX34	17
	PPM1F	17
	RAD21	17
	CBX2	17
	HJURP	17
	ESRRA	17
	SLC35F2	17
	FAM210 B	17
	LOC1006 30923	17
	NAGA	17
	HOXB3	17
	KIF4A	17
	CLASRP	17
	HMGB1	17
	RRAGD	17
	SHB	17
	DSG2	17
	RPAP2	17
	JAK1	17
	NUP210	17
	CAD	17
	RBM27	17
	C9orf9	17
	DNAJC1 9	17
	EEF1E1- MUTED	17
	WBP1	17
	INO80B- WBP1	17
3862	CTNND1	16
	SNORD5 8B	16
	RPL36A- HNRNPH 2	16
	DAG1	16
	SEPT9	16
	LAMA4	16
	ODF2	16
	ATL2	16
	SLC9A3 R2	16
	FAIM	16
	MAPK8	16
	YPEL3	16
	NT5C3	16
	PLA2G16	16
	MIER1	16
	AARSD1	16
	LOC1003 06951	16
	CHFR	16
	COMMD 7	16
	PHC2	16
	CPVL	16
	ALG8	16
	LIPA	16
	WDR45	16
	MRPS17	16
	EIF4H	16

	ADCK4	16
	UCKL1	16
	LYRM5	16
	HOXA3	16
	DNASE2	16
	MMAB	16
	TMEM60	16
	SAP30	16
	EXOSC8	16
	NSMCE1	16
	C16orf48	16
	RPL26L1	16
	FADD	16
	UBXN2A	16
	TTI2	16
	CCDC28 A	16
	ACN9	16
	COMMD 2	16
	CLCN3	16
	BRI3BP	16
	PODXL2	16
	FERMT2	16
	PGS1	16
	ANKRD5 4	16
	C11orf46	16
	CARS2	16
	SFT2D3	16
	CCDC22	16
	FAM177 A1	16
	LIMA1	16
	ZNF598	16
	TMEM20 9	16
	C12orf23	16
	STX12	16
	VASP	16
	NCOA5	16
	JKAMP	16
	ELP3	16
	PXMP4	16
	C5orf30	16
	SNRNP4 8	16
	FADS2	16
	CUL4A	16
	RABIF	16
	FAM171 A1	16
	FARS2	16
	ZNF212	16
	C10orf47	16
	C7orf42	16
	ACAT1	16
	SNX8	16
	FTSJD2	16
	TIMP3	16
	APOBEC 3F	16
	CAND1	16
	SGCB	16
	PHAX	16
	UBE2QL 1	16
	EPT1	16
	MID1	16
	YLPM1	16
	DSP	16
	SPEN	16
	DHX29	16
	SEC62	16
	ZNF184	16
	ANKRD1 7	16
	PVT1	16
	HSF2	16
	TMEM13 4	16
	PRMT2	16
	C15orf57	16
	PMP22	16
	SLC25A2 6	16
	MDFIC	16
	KIAA126 7	16
	NFIB	16
	CAMK2D	16
	ARNT	16
	FAM24B	16
	KTI12	16
3969	MYCBP	15

ZFYVE27	15
FMR1	15
FXN	15
ANO6	15
PRKRA	15
MOCS2	15
CRABP2	15
PPP1R8	15
TMEM99	15
ZNF385A	15
TMEM14B	15
MAPRE2	15
CRYZ	15
THOC6	15
HIST4H4	15
GPSM1	15
CDC25C	15
NUP93	15
MAEA	15
RACGAP1	15
MRPL35	15
ARHGEF1	15
IFT20	15
C17orf53	15
SCAF4	15
RNF14	15
CRADD	15
GTF3C6	15
DNM1L	15
GCDH	15
TPM4	15
IFITM1	15
C6orf130	15
SELENBP1	15
MGRN1	15
CASP3	15
DCK	15
PIGU	15
PICK1	15
NRF1	15
DUS2L	15
CRLS1	15
SLC25A14	15
PDCL3	15
C18orf56	15
TFPT	15
CHAMP1	15
COG2	15
DHRS7	15
PSMD1	15
C20orf177	15
CCDC34	15
CA8	15
INPP5J	15
SUGP1	15
SLC1A4	15
C19orf29	15
CCNE2	15
POLR3F	15
TEX10	15
FAM60A	15
C1orf135	15
C9orf114	15
TCF4	15
B4GALT4	15
CLK2	15
C12orf4	15
HUS1	15
LIG1	15
SFSWAP	15
PRPF39	15
ELF1	15
PIP4K2A	15
ACBD7	15
LZTFL1	15
SH3BP1	15
TUBGCP4	15
C15orf39	15
OCRL	15
SNAPC3	15
TXNDC15	15
HAUS7	15
HADHA	15
TIFA	15
LMBRD1	15

EIF3E	15
WASL	15
SLC12A9	15
TP53RK	15
ERLIN2	15
PRKAR2A	15
KIAA0494	15
ST13	15
GPATCH8	15
MTSS1L	15
SEPT11	15
RLIM	15
MAP1S	15
BCL10	15
DTL	15
RBBP6	15
NCAPG	15
CERS6	15
LDOC1L	15
IMPAD1	15
CDKAL1	15
HSPA5	15
PCGF5	15
STK17A	15
SLC38A10	15
ATF6	15
SRCAP	15
GLI3	15
NSL1	15
DYNC1H1	15
GLUD1	15
PER1	15
SEC22C	15
TSC22D1	15
QKI	15
STX16	15
IARS2	15
SNORD81	15
NDNL2	15
4094	
PTPRA	14
C6orf1	14
CDC47L	14
ACTN1	14
CDC7	14
TFCP2	14
MINPP1	14
DNAJC12	14
ZDHHC4	14
ALG5	14
TM2D3	14
GPC3	14
GCH1	14
C16orf57	14
HPCAL1	14
PSMB10	14
IFT43	14
CYBA	14
RBM38	14
MRPS28	14
GGA1	14
RARG	14
RAP1A	14
ARFGAP2	14
HNRNPH2	14
CMTM8	14
GAD1	14
TMEM120A	14
MRPS5	14
C20orf196	14
B4GALT7	14
C20orf20	14
NUPL2	14
FAM57A	14
ALG12	14
ZDHHC24	14
TPBG	14
COQ9	14
SELRC1	14
MAN2B1	14
MIS12	14
EXOC3	14

DNPEP	14
SPG20	14
XAB2	14
PLCG1	14
IDH1	14
CBX4	14
PAQR4	14
SNRPA1	14
VPS37C	14
UTP6	14
SNIP1	14
SMAP1	14
CCDC137	14
RNF20	14
AP1S2	14
RAB12	14
RIC8A	14
STARD3NL	14
CBX6	14
SOLE	14
HS6ST2	14
ZSWIM1	14
TBC1D15	14
FZD2	14
ALX1	14
FAHD2A	14
VAC14	14
E2F2	14
SMARCA1	14
BRD4	14
LEF1	14
RFX1	14
ABLIM1	14
C15orf17	14
FLJ22184	14
LENG8	14
RPRD1A	14
MSRB3	14
BICD2	14
KIAA1586	14
OGFOD1	14
ZNF530	14
DSCR3	14
SART3	14
LPHN1	14
ZNF749	14
LIN28B	14
OBSL1	14
GTF2E1	14
KIAA0182	14
SNAPC5	14
NUMA1	14
FBXO46	14
VPS11	14
ACO2	14
BBS1	14
KIAA1467	14
ZDHHC5	14
DVL3	14
LRRC58	14
FAM105B	14
SREK1IP1	14
PCIF1	14
FAM105A	14
WNK1	14
RBM15B	14
RGMB	14
SLC35B4	14
CARD10	14
EFNB2	14
UBQLN4	14
LOC100216545	14
ZNF585A	14
POLRMT	14
DNAJC16	14
SLC39A10	14
MAML1	14
ORAOV1	14
CEP89	14
DNAJC21	14

HMGXB4	14
SLC30A5	14
PICALM	14
CXADR	14
EPB49	14
RAP1B	14
ATP5J2-PTGD1	14
MIR93	14
MOB4	14
4225	
GLB1	13
MBD1	13
STRADA	13
NKRF	13
ARL5A	13
SCOC	13
C9orf116	13
ISCU	13
SMOX	13
ARPC1A	13
HIST1H2BF	13
HADH	13
C17orf58	13
COQ10A	13
MYADM	13
PPAP2A	13
TLX1	13
APOBEC3C	13
WDR5	13
PCTP	13
TCEA2	13
TRNAU1AP	13
EBAG9	13
CCDC109B	13
MRPL32	13
TM2D2	13
C19orf55	13
RBPJ	13
STXBP2	13
C12orf75	13
SS18	13
THG1L	13
VT11B	13
IGSF8	13
MINK1	13
AFMID	13
E2F4	13
RPS6KA4	13
CHPT1	13
TMEM18	13
CBR3	13
TJP2	13
SLC25A33	13
THUMPD3	13
HIST2H2BE	13
TMEM206	13
PLEKHO1	13
SLC39A6	13
BBIP1	13
C5orf39	13
KCTD17	13
MAPRE3	13
LOC100133311	13
FOXF2	13
ATG3	13
PPID	13
GGPS1	13
RPL22L1	13
PEX2	13
SAYSD1	13
MAP2K1	13
CYFIP1	13
ADM	13
FADS1	13
FAM173B	13
ARL5B	13
TMEM41A	13
WVVOX	13
FBXO21	13
FDX1	13
C9orf64	13
RREB1	13

	TSPYL4	13
	SMARCA2	13
	CALD1	13
	HPS1	13
	KIF11	13
	TRIP4	13
	KDM4A	13
	SLC25A15	13
	RECQL4	13
	EHD4	13
	ACOT2	13
	TRIM44	13
	TP53BP2	13
	TMEM191A	13
	ETS2	13
	DLAT	13
	SKI	13
	FOXJ2	13
	PLSCR1	13
	COX19	13
	WIPF2	13
	CKMT1A	13
	CLDN1	13
	BLOC1S3	13
	GPX8	13
	WAPAL	13
	LYRM7	13
	KCMF1	13
	HEXIM1	13
	PPM1E	13
	NOP58	13
	NAA25	13
	SNX18	13
	PCYOX1	13
	SIPA1L3	13
	SEC16A	13
	RNMT	13
	TMEM33	13
	HUWE1	13
	INPPL1	13
	VPS39	13
	NUS1	13
	UBE3B	13
	UBR4	13
	TNFRSF21	13
	GOLGA2	13
	EEF1D	13
	C7orf46	13
	COMMD5	13
	PRR7	13
	DMAP1	13
	YIPF1	13
	FIP1L1	13
	CSNK2A1	13
	PML	13
	ARHGEF2	13
	ASPH	13
	BAG5	13
	DCAF8	13
	RERE	13
	DCP2	13
	VEGFA	13
	NBL1	13
	C1orf151	13
	NBL1	13
	HEATR8-TTC4	13
4362	LMAN2L	12
	PTGES2	12
	CMTM3	12
	XRCC3	12
	CYBASC3	12
	SSBP3	12
	INO80C	12
	ACD	12
	POLL	12
	SELM	12
	ABI1	12
	RUFY1	12
	TMEM107	12
	MPP1	12
	PPP2R1B	12
	HIST1H2	12

	AB	
	ZNF302	12
	SMAD1	12
	TFIP11	12
	AIF1L	12
	ITPK1	12
	SEPP1	12
	MFGES8	12
	CALCOCO1	12
	TAF11	12
	CEPT1	12
	RHEBL1	12
	ERLEC1	12
	PIM1	12
	UNC50	12
	LOC440944	12
	CAMSAP3	12
	RPE	12
	SERPINB1	12
	CNOT7	12
	EVL	12
	FRG1	12
	AMH	12
	TIMM9	12
	TLE3	12
	RFNG	12
	BRF1	12
	IFNGR1	12
	KCTD13	12
	IDI1	12
	ZNF3	12
	GUSB	12
	TXNIP	12
	SMARCC2	12
	CENPO	12
	RALB	12
	BCL7A	12
	ASH2L	12
	MCOLN1	12
	FGFRL1	12
	PLBD2	12
	F12	12
	SLC25A23	12
	NUP54	12
	CUL1	12
	MTRR	12
	FLT4	12
	DYNLT3	12
	ZNF260	12
	GALNT1	12
	KDEL1	12
	C12orf29	12
	FAM175B	12
	CNO	12
	PISD	12
	CREBZF	12
	SGSM3	12
	ABCE1	12
	SUV420H1	12
	MPP2	12
	AFG3L2	12
	SLC25A38	12
	ZNF628	12
	GCLM	12
	MYH14	12
	PLEKHM2	12
	KIAA0930	12
	UHRF2	12
	STIM1	12
	UBE2O	12
	MSN	12
	WDR75	12
	DENND4B	12
	MMGT1	12
	UBAP2	12
	TRIT1	12
	POLA2	12
	CRTAP	12
	KIF1A	12
	GSK3B	12
	TCEANC2	12

	FAM126A	12
	AP2A2	12
	NAPG	12
	TOP1	12
	COL4A2	12
	MCM8	12
	MED13L	12
	KDSR	12
	GPR107	12
	ZFYVE20	12
	RB1	12
	HNRNPA1P10	12
	ETV3	12
	PURB	12
	STX6	12
	SETD1A	12
	WDR12	12
	ZC3HAV1	12
	KCNMA1	12
	VT11A	12
	PHIP	12
	ANKRD11	12
	RC3H2	12
	NPHP1	12
	VPS53	12
	CHEK1	12
	TAF1C	12
	NRP1	12
	BCAR1	12
	HOXC6	12
	MOB2	12
	MIR660	12
	LOC144438	12
4491	MIR20A	11
	P2RX5-TAX1BP3	11
	ANKHD1	11
	UBOX5	11
	SUV39H2	11
	BCAS4	11
	IF16	11
	HY1	11
	SLC41A3	11
	SRP19	11
	TRMT1	11
	RNF121	11
	ASB13	11
	LGALS3	11
	FZR1	11
	RANBP3	11
	ZFP36L1	11
	ORC1	11
	STAT3	11
	SLC6A9	11
	AKAP1	11
	AMMEC R1	11
	TACC1	11
	CAGE1	11
	MIF4GD	11
	ZSCAN2	11
	BBS10	11
	NUPR1	11
	LOC100129250	11
	HILPDA	11
	CNFN	11
	HMGCL	11
	APOO	11
	MBIP	11
	TECR	11
	ZMYM6NB	11
	SCML1	11
	CAST	11
	THUMP2	11
	RAMP1	11
	CKS1B	11
	HDCC3	11
	HIST2H3D	11
	SNHG12	11
	MNX1	11
	HTRA2	11
	FLJ46906	11
	SS18L2	11

	HOXC10	11
	ZBTB80S	11
	MSI2	11
	NSA2	11
	FAM120C	11
	PHF10	11
	NUF2	11
	CSRP2	11
	CGRRF1	11
	TOR3A	11
	RP9	11
	WDR25	11
	HOXD10	11
	CCNY	11
	HOXA4	11
	EXOSC7	11
	NKX2-4	11
	NPRL2	11
	DERA	11
	DEPDC1	11
	UPP1	11
	MBD4	11
	PNO1	11
	CROCCP2	11
	NUDT11	11
	SLC27A3	11
	RFWD2	11
	ALDH3A2	11
	MFF	11
	ZDHH1C8	11
	PPWD1	11
	CREB3L2	11
	UAP1	11
	PPME1	11
	ZCCHC3	11
	SIKE1	11
	MARVELD1	11
	CWF19L1	11
	RAB18	11
	PRSS16	11
	KHDRBS3	11
	RRS1	11
	GLTP	11
	GFER	11
	TARS2	11
	SIX5	11
	MECP2	11
	OLA1	11
	DROSHA	11
	BRAP	11
	ADRBK1	11
	MCU	11
	ZNF263	11
	CTNNAL1	11
	CDC27	11
	PPTC7	11
	CYB5D1	11
	SKP1P2	11
	AMMEC R1L	11
	MAK16	11
	PKN3	11
	LIMD2	11
	CPNE3	11
	CSTF2	11
	BMP7	11
	ST7	11
	MTAP	11
	NAGLU	11
	FTO	11
	CPOX	11
	CDR2L	11
	RFWD3	11
	METTL16	11
	BBX	11
	SLC35E1	11
	IARS	11
	CTR9	11
	CERK	11
	DOT1L	11
	H2AFY2	11
	RND1	11
	WDR24	11
	TMEM16	11

	8	
	PPM1D	11
	MED17	11
	DDX19A	11
	ZNF254	11
	C17orf51	11
	CUL3	11
	KIAA031 9L	11
	UBXN7	11
	RTKN2	11
	SETD5	11
	DCP1A	11
	GLG1	11
	SUCLG2	11
	FLJ2386 7	11
	PODXL	11
	LANCL2	11
	SSH2	11
	KLHL18	11
	EPC1	11
	SIK3	11
	LOC6433 39	11
	FANCC	11
	SEPT8	11
	CAMK2G	11
	ATG13	11
	LOC1006 16530	11
	MCFD2	11
	ASB3	11
4650	FAM213 B	10
	SNX15	10
	TSPAN4	10
	NFU1	10
	OXR1	10
	AZ12	10
	SGOL1	10
	PSIP1	10
	SGOL2	10
	PCDH7	10
	PHLDA2	10
	RPS28	10
	PPIL3	10
	MIR222	10
	RABGGT A	10
	QPCTL	10
	PDPN	10
	MAPK7	10
	HIST1H2 BO	10
	CASP8	10
	FBXO5	10
	TINF2	10
	LENG1	10
	AHCYL1	10
	C5orf44	10
	ARMCX2	10
	MARCH9	10
	OSTF1	10
	WARS2	10
	RHOV	10
	GLI4	10
	FBXW5	10
	BAIAP2	10
	RBM28	10
	PYCR1	10
	MYPOP	10
	UQCRC2	10
	C7orf23	10
	SH3GL2	10
	TRMT6	10
	POFUT1	10
	COQ6	10
	LRIF1	10
	SLC2A8	10
	KPTN	10
	NR2C1	10
	RFX5	10
	JUNB	10
	C1orf174	10
	CYR61	10
	TLCD1	10
	COA5	10
	ABHD8	10
	WDR41	10
	USP33	10
	ABHD10	10
	PIGW	10
	LOC4015	10

	88	
	C18orf8	10
	EEF1A2	10
	SGK196	10
	PSEN1	10
	LSM14B	10
	BNIP2	10
	BAMBI	10
	HIBADH	10
	CCDC53	10
	COQ3	10
	HADHB	10
	FAM206 A	10
	SEC22A	10
	SELO	10
	C3orf39	10
	PTER	10
	ANKRD4 6	10
	PPP1R1 6A	10
	B4GALT 1	10
	TSPAN3 3	10
	LRFN1	10
	ZNF404	10
	TRUB1	10
	MTMR2	10
	SLC25A3 0	10
	GPM6B	10
	CCDC90 A	10
	WDTC1	10
	HACL1	10
	TRAIP	10
	EPHA2	10
	TBC1D2 5	10
	NOC3L	10
	DCAF16	10
	CHD1L	10
	NEFL	10
	PANK3	10
	SMAD3	10
	SSFA2	10
	WDR3	10
	VPS36	10
	GPC4	10
	RAB3GA P1	10
	PPFIA3	10
	ANGEL1	10
	NCS1	10
	ZFP36L2	10
	KIAA173 7	10
	PEX3	10
	FAHD2B	10
	TRIM35	10
	OGDH	10
	SMS	10
	SYT11	10
	RCN1	10
	TGFB1	10
	ANKRD1 0	10
	GFM1	10
	SLC38A1	10
	PPP1R1 5B	10
	PNMA2	10
	WDFY1	10
	CEBPZ	10
	RPAP1	10
	ZNF678	10
	KDM3B	10
	PRKD3	10
	ZNF142	10
	UBXN4	10
	BCORL1	10
	PDCD11	10
	SLC41A1	10
	NUFIP2	10
	GNA13	10
	SBF1	10
	LLGL1	10
	ENAH	10
	NUP50	10
	ANGEL2	10
	TOP2B	10
	FAM208 A	10

	GAPVD1	10
	KATNAL 1	10
	ATG2A	10
	ZRANB3	10
	CNTNAP 2	10
	PKN2	10
	BMS1	10
	GXYLT1	10
	ALG10B	10
	PKIG	10
	TEAD4	10
	UBXN11	10
	SLC10A3	10
	CTDSP1	10
	TRAF3IP 2-AS1	10
	MRRF	10
	B4GALT 2	10
	MATK	10
	NEO1	10
	TSC2	10
	PHF8	10
	PBRM1	10
	KIAA091 3	10
	KAT6A	10
	EXT2	10
	TNRC6B	10
	TMEM18 9-	10
	UBE2V1	10
	MIR423	10
	TNFAIP8 L2- SCNM1	10
4818	B9D1	9
	LLGL2	9
	PDHX	9
	GFM2	9
	CYB5D2	9
	FASTK	9
	ARMC10	9
	FGF13	9
	GALE	9
	SMAD7	9
	TAZ	9
	MTERFD 2	9
	ZNF345	9
	PCCB	9
	GLRX	9
	UIMC1	9
	TBPL1	9
	C5orf45	9
	METTL1 3	9
	RAB7L1	9
	C1orf182	9
	MAPKAP 1	9
	RCCD1	9
	CAPN1	9
	SUMO2	9
	LOC1005 06233	9
	POC5	9
	PINX1	9
	SBDSP1	9
	RPS26	9
	AK3	9
	XPNPEP 1	9
	ARFIP1	9
	TFAP2A	9
	TCTN3	9
	NKIRAS1	9
	RMND5B	9
	NFS1	9
	COG4	9
	FAM71E 1	9
	ACOT9	9
	BCL2L1	9
	GDF15	9
	TMEM50 B	9
	RAB32	9
	ALDH4A 1	9
	OSGEP	9
	AZIN1	9
	ENDOV	9

	TFAP4	9
	DPP3	9
	USP19	9
	CHAC2	9
	HS1BP3	9
	NHEJ1	9
	SFN	9
	ITGB1BP 1	9
	CTNNB1 P1	9
	PLD6	9
	PTPN18	9
	CXorf69	9
	ACAD9	9
	TIPARP	9
	LRRFIP2	9
	RWDD2B	9
	AIFM2	9
	TNPO3	9
	YAF2	9
	HDHD3	9
	DHX36	9
	RAB38	9
	MESP1	9
	METTL2 A	9
	BCAS3	9
	ZNF784	9
	API5	9
	CHMP4C	9
	ARL16	9
	PLOD1	9
	ZBTB17	9
	MAP3K1 0	9
	TMEM21 8	9
	CRLF3	9
	FKRP	9
	CLPB	9
	GDAP1	9
	TRAF4	9
	MED21	9
	WWTR1	9
	LZTS2	9
	C14orf21	9
	SIAH1	9
	ATXN7L3	9
	SRXN1	9
	L3MBTL2	9
	RBM4B	9
	STEAP1	9
	HPS6	9
	INCENP	9
	HMGCR	9
	MSI1	9
	WBP4	9
	ZW10	9
	C9orf100	9
	ZIK1	9
	FIZ1	9
	ALYREF	9
	FAM193 B	9
	CUL4B	9
	Pi4K2A	9
	NUMBL	9
	GTPBP5	9
	MXD4	9
	SPTLC1	9
	NUP88	9
	CMIP	9
	ARMC5	9
	LIMK2	9
	CDK10	9
	RAP2A	9
	TM9SF4	9
	TP73- AS1	9
	CD2AP	9
	ABCD4	9
	C22orf25	9
	DAK	9
	SETD8	9
	ARFGAP 3	9
	TNFRSF 1A	9
	TPP1	9
	ZNF569	9
	WDR43	9
	TRIM68	9
	SMC2	9

	HDAC6	9
	GOSR1	9
	NFATC21P	9
	HSPA2	9
	GOLT1B	9
	UCHL5	9
	YTHDF3	9
	PPP1R13L	9
	UPF1	9
	CLSTN3	9
	SMC3	9
	STX7	9
	SPATS2L	9
	SPECC1	9
	RBBP9	9
	PARD3	9
	KPNA1	9
	TFB1M	9
	MED12	9
	MTX3	9
	ASB1	9
	UAP1L1	9
	ZNF512B	9
	BIRC2	9
	HLCS	9
	ATXN2	9
	PM20D2	9
	KIF3B	9
	KLHL9	9
	UTP14C	9
	SLK	9
	SEC23IP	9
	C9orf156	9
	DYNC1LI2	9
	MBD2	9
	NEK3	9
	DYRK2	9
	PIGM	9
	RPS6KA3	9
	PRKDC	9
	SULF2	9
	HEMK1	9
	EIF4B	9
	ZXDC	9
	ZYG11B	9
	PCNT	9
	TRMT5	9
	SPTBN1	9
	TFPI	9
	RIMKLB	9
	MACF1	9
	MTFMT	9
	POLE2	9
	PLAA	9
	LOC286467	9
	LRRC20	9
	TRIOBP	9
	P2RX5	9
	HIST1H2AD	9
	C8orf82	9
	MIR106B	9
	PPAN-P2RY11	9
5014	MTHFS	8
	TSNAX	8
	NR3C1	8
	ABHD11	8
	RTN2	8
	ZNF274	8
	PQLC2	8
	TSLP	8
	CAB39	8
	C11orf57	8
	LOC100499177	8
	SLC1A3	8
	ELAVL2	8
	EXO1	8
	ADD3	8
	NFX1	8
	SP3	8
	ACOX1	8
	KIFC3	8
	TBC1D7	8
	RNU11	8
	MIR21	8
	GMPPB	8

	VEGFB	8
	RNF146	8
	FKBP1B	8
	ZNF668	8
	CMTM7	8
	YPEL5	8
	PCK2	8
	NSMCE4A	8
	SLMO1	8
	C6orf126	8
	TMEM42	8
	EML2	8
	SLC39A8	8
	RCAN3	8
	HRK	8
	NUP62C	8
	HIST1H3F	8
	EIF3F	8
	TMCO6	8
	SH2B1	8
	EDARAD	8
	INTS9	8
	DTD1	8
	RBP1	8
	LPPR2	8
	C6orf162	8
	OAF	8
	NDUFS1	8
	HLA-DRB5	8
	SUFU	8
	DBB2	8
	GKAP1	8
	MAP3K7	8
	PHLDA3	8
	NUP35	8
	HECTD2	8
	C3orf52	8
	SMTN	8
	HOTAIR	8
	SNTA1	8
	DRAM2	8
	C7orf26	8
	YAE1D1	8
	ARRDC1	8
	STK16	8
	C1orf124	8
	CDC42E	8
	PRPSAP1	8
	ITFG2	8
	LYPD6B	8
	DEX1	8
	BEND7	8
	IQCD	8
	SIX1	8
	HEY1	8
	XKR8	8
	CHKA	8
	KLHL26	8
	CAMK2N1	8
	HOXB5	8
	PALLD	8
	TPST1	8
	PARP6	8
	RNF115	8
	C17orf85	8
	METTL7A	8
	C3orf33	8
	OGFOD2	8
	SYDE1	8
	PDCL	8
	ZNF391	8
	MAP3K11	8
	DHX38	8
	RNF122	8
	ATP13A1	8
	MTIF2	8
	LOC150381	8
	SBNO2	8
	LRRC57	8
	THAP10	8
	PPP1R9B	8
	UBE2W	8
	FBXW4	8

	AGGF1	8
	SREK1	8
	C1orf109	8
	NCAPG2	8
	GOLGA5	8
	NEK9	8
	EN2	8
	IQCB1	8
	IPO8	8
	ABHD4	8
	ADAMTS1	8
	LSM12	8
	BAHD1	8
	ABCF3	8
	NUDT12	8
	CXorf38	8
	NLK	8
	MIS18BP1	8
	RYBP	8
	SLIT2	8
	UBE2G1	8
	MB21D2	8
	LRRC14	8
	ZC3H7B	8
	ANKRD13A	8
	CEP57L1	8
	SEC23A	8
	ESYT2	8
	MUT	8
	HERC5	8
	RNF111	8
	KLF3	8
	FHOD1	8
	EXOC2	8
	BBS7	8
	BRD3	8
	ZNF16	8
	SPPL2A	8
	TBRG1	8
	MYO19	8
	STK4	8
	NT5C2	8
	MTA3	8
	NEK7	8
	C17orf39	8
	SNX4	8
	ECT2	8
	EXTL2	8
	MED13	8
	TMEM181	8
	MRPL19	8
	ZNF84	8
	TWF1	8
	TARBP1	8
	AIM1L	8
	RCL1	8
	C1orf213	8
	MAP3K2	8
	SIPA1L2	8
	ZDHHC3	8
	THSD1P1	8
	SIN3A	8
	SIN3B	8
	FNIP1	8
	ARID2	8
	TNKS	8
	TRAPPC10	8
	CLEC2L	8
	KAT6B	8
	RBM33	8
	SLC12A5	8
	STARD13	8
	MAPK9	8
	DIDO1	8
	SMPD4	8
	SEZ6L2	8
	TCF7L2	8
	SNORD25	8
	LEPROT	8
	NAT6	8
	CHMP1B	8
5201	APITD1	7
	TMED7-TICAM2	7
	C9orf5	7
	RNASE4	7

	DDIT3	7
	ZNF200	7
	PBX1	7
	UHMK1	7
	BCL11A	7
	GNP1	7
	TMEM80	7
	ATP5S	7
	PBX3	7
	IAH1	7
	LINC00339	7
	TATDN3	7
	C14orf142	7
	SPHK2	7
	SMPD1	7
	SLC35A1	7
	LOC100506649	7
	CLK3	7
	FBXO17	7
	RPP40	7
	ANXA6	7
	ZC4H2	7
	CRYBB2P1	7
	SCAMP5	7
	RNF22	7
	SPATA5L1	7
	GALT	7
	LOC100131089	7
	MAPKAPK2	7
	PEX16	7
	S100PBP	7
	ZNF259	7
	TIMM21	7
	RBM45	7
	TMEM39B	7
	ALKBH4	7
	DNAJB2	7
	NECAB3	7
	IDH2	7
	TRIM4	7
	UFSP2	7
	MRM1	7
	FEZ2	7
	ALG2	7
	DHRS13	7
	MRPS9	7
	METTL10	7
	ORAI3	7
	KRT18	7
	SCIN	7
	ACSS1	7
	CNPY4	7
	FAM113A	7
	CLN5	7
	GIT1	7
	PDLIM3	7
	SPA17	7
	SLC7A6OS	7
	CCDC9	7
	TMEM53	7
	C8orf42	7
	TWIST1	7
	P4HA1	7
	MARC1	7
	DENND1A	7
	DYRK3	7
	FAM117A	7
	ECE1	7
	FOXO4	7
	TMEM38B	7
	CREB3L4	7
	BTG2	7
	RELB	7
	SH3BP5L	7
	RPP14	7
	RNF130	7
	BTBD10	7
	CDKN2AIP	7

RSPRY1	7
ELF4	7
ZMYND1	7
1	
EARS2	7
PPP2R5	7
A	
TMEM87	7
A	
SYK	7
C14orf12	7
9	
H3F3C	7
CPT2	7
LOC9224	7
9	
OIP5	7
FOXP1	7
ERCC2	7
TUBG2	7
SPIN1	7
EXOG	7
C14orf16	7
9	
RBM48	7
PHF17	7
PLAGL2	7
GCC1	7
KBTBD2	7
NEDD1	7
GMEB2	7
STXBP3	7
TOP2A	7
MCEE	7
KIAA143	7
0	
PITPNC1	7
MXRA7	7
AP3B1	7
SOX12	7
SLC25A3	7
7	
TAOK2	7
TMEM64	7
CXorf40B	7
CDH2	7
PIGK	7
CCDC3	7
PLA2G15	7
FKBP14	7
HSPA13	7
SSX2IP	7
TBC1D1	7
3	
SUPT7L	7
C1orf96	7
C16orf70	7
WDR76	7
TAF8	7
METAP1	7
PIK3R2	7
NAF1	7
ENC1	7
USP10	7
VEZF1	7
ZNF367	7
TERF2	7
WNT5A	7
TCF7L1	7
ADNP2	7
RUFY3	7
STK35	7
IFT57	7
RHOQ	7
WDR70	7
KIN	7
RNF169	7
SEC63	7
MED1	7
AMN1	7
ULBP1	7
SOC57	7
PIP5K1C	7
TTC31	7
ZZZ3	7
APOL2	7
KLHDC1	7
0	
RAB3IP	7
KLHL8	7
GALNT7	7
PGPEP1	7
GIGYF2	7
PAK2	7

FBXW2	7
C6orf89	7
ADAM10	7
NCAPD3	7
SLC4A1	7
AP	
GAK	7
RNF38	7
UFL1	7
ZNF507	7
EDIL3	7
DCAF6	7
TRIM38	7
VASN	7
CNNM1	7
THOC2	7
SAV1	7
STXBP1	7
C7orf60	7
NPC1	7
PDSS2	7
BAG4	7
TLE6	7
TMTC3	7
CDKN2B	7
RDX	7
AKAP9	7
SNX27	7
ZNF527	7
CENPE	7
C17orf99	7
MLL	7
MTRF1	7
REEP3	7
ZNF638	7
REEP1	7
PTPRG	7
DYNC2LI	7
1	
FUZ	7
SLC25A2	7
2	
EPDR1	7
ACAA1	7
CTH	7
MFAP3	7
PPP3CA	7
STAMPB	7
MYO1B	7
USP16	7
ZNF557	7
WHSC1	7
PDIK1L	7
BCAP29	7
LCOR	7
C3orf17	7
HIPK1	7
MINA	7
LPP	7
RAD51D	7
URGCP	7
C15orf38	6
-	
AP3S2	
TTC4	6
HNRNPU	6
L2-	
BSCL2	
TP73	6
CUX1	6
SEC14L2	6
C9orf86	6
MIR4647	6
TSP0	6
E2F5	6
RABL5	6
PITX2	6
C1D	6
MIR34A	6
TGFB111	6
SETD4	6
HIST1H2	6
BG	
ZCCHC9	6
LYRM1	6
RAD9A	6
NOL3	6
SMAGP	6
HIST2H2	6
BF	
PKIB	6
NUDT14	6
FAM54A	6
ZNF524	6

5425

UXS1	6
FBXO44	6
CRELD1	6
MITD1	6
SFR1	6
C21orf11	6
9	
MAD1L1	6
PRR19	6
RTKN	6
RWDD3	6
RPL12	6
MTERFD	6
3	
ZNF239	6
WDR4	6
LLPH	6
NME6	6
VKORC1	6
L1	
SUCLA2	6
FLJ3130	6
6	
SLC35G	6
1	
CCDC10	6
1	
SNAP47	6
SLC44A2	6
FAM58A	6
SH3BP5	6
ECE2	6
SLC37A3	6
C1orf159	6
TTF1	6
DBNDD1	6
NLRX1	6
PTPN6	6
NCOA7	6
TRNP1	6
FLJ4366	6
3	
LMF2	6
TMEM21	6
4	
YBX1	6
COQ2	6
ULBP2	6
HSD11B	6
2	
PTPLA	6
GNG2	6
PDSS1	6
ZNF138	6
LYSMD1	6
TMEM38	6
A	
RCAN1	6
TSPAN7	6
ZBED5	6
RPRML	6
ZNF566	6
HEY2	6
C16orf58	6
USF1	6
LOC4399	6
49	
FNTA	6
PLEKHB	6
1	
MXD3	6
LRRC28	6
RAB13	6
GLYCTK	6
TRIM14	6
CADM4	6
DBP	6
LYPLAL1	6
GHDC	6
SCRN3	6
MAN1B1	6
C11orf84	6
HOXA11	6
AIDA	6
PPOX	6
LINC003	6
24	
PLEKHF	6
1	
LRRC26	6
C5orf34	6
CKAP2L	6
KCTD9	6
STOM	6
MON1B	6

LOC1005	6
05483	
GJB2	6
COG5	6
SLC35B3	6
PLOD2	6
C7orf43	6
ITGB1	6
UBTD2	6
RIMS4	6
CCNE1	6
RPAP3	6
ZMI22	6
PCBD2	6
PDCD6IP	6
SMAD9	6
ZBTB10	6
CD68	6
ZNF639	6
LRCH4	6
LIMS1	6
NRARP	6
TRMT11	6
TBC1D9	6
B	
RELT	6
C9orf69	6
EEFSEC	6
SLC15A4	6
C4orf27	6
ZSCAN2	6
1	
ACCN2	6
PRIM2	6
RPSAP5	6
8	
IKBIP	6
SKAP2	6
CKMT1B	6
KIAA182	6
6	
SMEK1	6
SGMS1	6
SIAH2	6
HIAT1	6
ARHGEF	6
3	
XPOT	6
FAM111	6
B	
EDA2R	6
CTDSP2	6
OSBP	6
PLCD3	6
STAR4D	6
SLC43A2	6
CHORD	6
C1	
HSF1	6
ADCK3	6
ZNF329	6
TMEM16	6
5	
DLG3	6
EIF2A	6
AP1S3	6
TBKBP1	6
FAM129	6
B	
FAM116	6
A	
HIRA	6
XXYL1	6
NUP205	6
PCBP1-	6
AS1	
ALG9	6
LPHN2	6
PNPLA8	6
AACS	6
MARCH7	6
CBX3P2	6
SMAD2	6
GPHN	6
DSC3	6
AQP3	6
NIPAL3	6
TBCD	6
MAP4K4	6
NFYB	6
TWSG1	6
FAM53B	6
KIAA035	6
5	
PIAS2	6

TULP3	6
PEX13	6
NR1D2	6
PGM2	6
MET	6
CPEB4	6
CEP104	6
ABHD13	6
SLC2A3	6
PRKAA1	6
CREBBP	6
CDAN1	6
ZNF100	6
WDR11	6
GAA	6
DPP8	6
GABPA	6
ITGA5	6
DYM	6
FBXW7	6
ANLN	6
KIF14	6
SPECC1L	6
JAG1	6
FOXP4	6
EPC2	6
EFCAB7	6
ZNF24	6
BBS5	6
SPPL3	6
ZCCHC7	6
C10orf26	6
PPP1R37	6
KBTBD11	6
WDR19	6
SENP5	6
STK38L	6
ARHGAP39	6
FBXO48	6
PDS5B	6
ARID1A	6
BAZ1B	6
EFHC1	6
ERO1L	6
ERI1	6
FASTKD2	6
NOTCH2	6
PCMTD2	6
TDP1	6
ATP1A3	6
TUBGCP3	6
NFIA	6
TRIM32	6
GOLGA3	6
NCOR2	6
VPRBP	6
NR2C2	6
IPO13	6
C9orf102	6
C12orf5	6
ZC3H4	6
GNB4	6
GJC1	6
TAOK1	6
PHACTR4	6
USP9X	6
C11orf71	6
HELZ	6
ZNF273	6
LOC96610	6
ZNF229	6
MCART6	6
KIF9	6
DNAJC24	6
SCLT1	6
GUSBP11	6
PLA2R1	6
PXDNL	6
MOSPD3	6
DERL3	6
FBXO22	6
PREPL	6
SUN1	6
SEC61A2	6

CORO7	6
ABHD14A	6
RPS10	6
RPL29P2	6
PLEKHA3	6
MIR25	6
MIR615	6
MIR4680	6
C17orf61	6
PLSCR3	6
SCLY	6
UBE2F-SCLY	6
5710 MIR19A	5
NEDD8-MDP1	5
MECOM	5
TMEM25	5
BDNF	5
C6orf203	5
SGCE	5
TTC8	5
GLT8D1	5
NECAP2	5
CLDN12	5
DDX11	5
PLS1	5
POC1A	5
MYO1C	5
HSDL2	5
AURKC	5
MID1IP1	5
POT1	5
ZNF160	5
FBXO9	5
PAN2	5
STRBP	5
PVRL3	5
LEPRE1	5
RNF138	5
PPM1A	5
KCTD1	5
PAX6	5
AUTS2	5
MTMR3	5
TP53BP1	5
VTRNA1-3	5
C8orf40	5
HIST1H2BL	5
MIR221	5
MIR10B	5
TOX2	5
IFI27L2	5
DALRD3	5
HES6	5
HSBP1L1	5
C7orf25	5
LINC00467	5
NUDT8	5
HIST1H3A	5
TMEM170A	5
CCM2	5
LOC100507588	5
USE1	5
SPSB3	5
ZBED3	5
NVL	5
C17orf108	5
LOC100506844	5
SYCE1L	5
IMMP1L	5
POMZP3	5
OCEL1	5
HOXC13	5
C1orf56	5
C16orf88	5
CLK1	5
C4orf49	5
OSR2	5
TBC1D10A	5
OMA1	5
RNASEH	5

1	
PNRC1	5
IRAK1BP1	5
FGFR10P2	5
GTF2H1	5
TRMT61B	5
NIT2	5
ATG4A	5
JMJD4	5
AVEN	5
TCTEX1D2	5
TAF6L	5
CLPX	5
TM7SF2	5
DNAJC2	5
DBR1	5
ZNF747	5
ACADS	5
ZNF673	5
WDR85	5
ING1	5
RAB3A	5
SPPL2B	5
NRN1	5
HDAC8	5
ACTA2	5
C12orf48	5
FKBP10	5
PPP1R12C	5
KLHDC2	5
C4orf32	5
TAF1B	5
FAM168A	5
OTUD1	5
MAPK12	5
NR2F2	5
TRIM21	5
FAM48A	5
RRP7B	5
FAM118B	5
FANCA	5
DEM1	5
SLC39A13	5
CTGF	5
IGFLR1	5
NAP1L2	5
ZNF473	5
RILPL1	5
PPP2R3C	5
GPRIN1	5
DVL1	5
C9orf125	5
N6AMT1	5
PLAT	5
TBC1D23	5
C1orf115	5
PTPRS	5
PIGQ	5
USP3	5
C4orf43	5
PPP1R2	5
RNASEH2B	5
RNASET2	5
C5orf25	5
NKAPP1	5
STX18	5
TICAM1	5
FOXD1	5
WRNIP1	5
GNPAT	5
PNRC2	5
ATRIP	5
TCERG1	5
STAM	5
CNOT10	5
TADA1	5
FBXO3	5
KIAA0020	5
FZD8	5
PAPSS1	5
RFTN1	5
SLC17A5	5

SGPP1	5
LRRC40	5
HSPA4L	5
LEMD3	5
LOC728554	5
CPSF1	5
HDAC5	5
DDX46	5
CSNK1G3	5
CABLES2	5
ICAM5	5
ETAA1	5
LOC100129794	5
NDST2	5
PRKAB2	5
KREMEN1	5
CHTF18	5
SMOC1	5
TCFL5	5
DUSP22	5
LINC00094	5
METTLL21A	5
BRSK1	5
GDF11	5
TSPAN10	5
C1QL1	5
CCND1	5
LGALS1	5
DLEU2	5
ERMPP1	5
KLF5	5
TBC1D20	5
NOL8	5
PTPN9	5
RAB8B	5
GATA4	5
NAMPT	5
MAU2	5
TIMP2	5
GCFC1	5
SENP1	5
RALGDS	5
ESF1	5
LIG3	5
MCM3AP	5
RIOK3	5
HMGXB3	5
CD3EAP	5
RAB3IL1	5
GPRIN1	5
DXH8	5
CHRNA5	5
THNSL1	5
SNAPC4	5
VRK3	5
CPSF2	5
MYEF2	5
MOSPD1	5
USPL1	5
WNT10B	5
ZBTB33	5
HMG20A	5
PARG	5
IPP	5
RNF139	5
FAM160B2	5
PRRG4	5
DKFZp761E198	5
BLM	5
FAM46A	5
ARL15	5
ANO8	5
NLGN2	5
FAM20B	5
SH2B3	5
STX3	5
ZDHHC7	5
NAA30	5
TRIP12	5
PDPK1	5
LOC341056	5
SUDS3	5
SETD2	5
BTRC	5

SOBP	5
ZNF76	5
IPO7	5
KIF3C	5
BRMS1L	5
TIAM1	5
HELLS	5
TMX1	5
ITFG3	5
ABCC10	5
PRR12	5
KANSL3	5
ZFPM1	5
TBL1XR1	5
FAM91A1	5
C10orf46	5
ZBTB24	5
PLA2G4A	5
RETSAT	5
OPA3	5
C11orf82	5
IFNAR1	5
CRTC3	5
C16orf62	5
TPCN1	5
RLF	5
EXOC5	5
SOLH	5
ZNF318	5
EXTL3	5
ABHD2	5
MAN1A1	5
SLTM	5
ASH1L	5
RNGTT	5
CLCC1	5
PLEKHA5	5
CNOT6L	5
CSNK1G1	5
DENND5B	5
UBR5	5
FAM160B1	5
EHMT1	5
RNF157	5
EP400	5
TLE4	5
ZNRF1	5
PPM1H	5
SKIL	5
ONECUT2	5
FLVCR1	5
E2F7	5
MLL2	5
XPR1	5
TRAK2	5
SLC22A5	5
SNX30	5
USP46	5
ZBTB38	5
PCF11	5
ZNF652	5
MFS2B	5
ARSK	5
MAP3K8	5
NBPF1	5
ODF2L	5
MAST1	5
ANKS6	5
EMR3	5
DISP1	5
PHF20	5
C4orf29	5
MMS22L	5
GLS	5
GNA12	5
YSK4	5
ALMS1	5
DOCK7	5
XKR6	5
TMEM132D	5
PTPN2	5
FAM122C	5
TRPT1	5
SLAIN1	5
FAS	5

ABL2	5
MBNL3	5
SNORD4B	5
TRAPPC2P1	5
RBMXL1	5
C19orf2	5
MIR641	5
CHMP3	5
MIR548N	5
REXO1	5
PTCD1	5
DFNB59	5
6039	
FKBP1A-SDCBP2	4
BGLAP	4
APITD1-CORT	4
DTNA	4
TCF7	4
RAI14	4
BACH1	4
NAA16	4
TAF12	4
DLST	4
VPREB3	4
HIST3H2BB	4
P4HA2	4
RIPPLY2	4
UBA3	4
CITED1	4
FBXL6	4
FITM2	4
RPS27	4
PRKCZ	4
PHYH	4
RRAS2	4
DLX4	4
LINC00263	4
RGP1	4
CROT	4
TMEM54	4
CIDECP	4
PSME2	4
TMEM100	4
USP21	4
BPHL	4
NTAN1	4
LOC100130776	4
HOXD9	4
CDC37L1	4
RPS7	4
NINJ1	4
PTPLB	4
ZFYVE1	4
CXCL16	4
FAM176B	4
TBL3	4
EID2B	4
TMSB15B	4
TRAM1L1	4
MED6	4
GPRC5C	4
RARA	4
C11orf96	4
C3orf23	4
C17orf48	4
MAP7D3	4
PP7080	4
HDAC10	4
SERP2	4
SLC29A2	4
RGS2	4
SOCS2	4
ARL17A	4
NRBF2	4
NR1H3	4
RAD54B	4
SLC38A7	4
LOC387647	4
PAK1	4
POLR1E	4
CA5BP1	4
NEIL2	4
MAP3K1	4

3	
RNF215	4
SLC26A6	4
ZNF326	4
CAPRIN2	4
ISL2	4
ACAP3	4
PRPF18	4
C11orf24	4
KIAA2013	4
APOE	4
KLF6	4
PPM1B	4
TUBE1	4
ZBTB26	4
LARGE	4
EFNB1	4
TEAD2	4
MORN4	4
KLHL17	4
FAM83G	4
HYLS1	4
LMBR1L	4
HSDL1	4
ACTR8	4
E4F1	4
REPS1	4
TAF5	4
CAPN2	4
PRKD1	4
C2orf43	4
LOC644936	4
NADKD1	4
RPS6KA1	4
FAM172A	4
ATPAF2	4
CREBL2	4
KCNK5	4
SCARA3	4
CCDC91	4
C1orf112	4
FGF11	4
ARL8A	4
FAM118A	4
GMPR	4
FBXL19	4
C5orf28	4
OSBPL2	4
C4orf52	4
CC2D2A	4
FAM69B	4
RGS19	4
DENND5A	4
C1orf216	4
RIBC2	4
NEURL4	4
TMBIM4	4
CDYL	4
PIAS3	4
TMEM39A	4
CD47	4
DHX33	4
TMEM187	4
DFFB	4
NARFL	4
RRBP1	4
EPS15L1	4
ZNF362	4
EP400NL	4
ZNF296	4
SERPINF1	4
SETD6	4
GPR153	4
ZFYVE19	4
ZBTB9	4
UROS	4
HOXB13	4
FAM134C	4
ZHX2	4
TMEM184C	4
BORA	4
ZNF746	4
SUPV3L1	4

SUGP2	4
HEYL	4
RDH10	4
MAP4K5	4
POU4F1	4
DMWD	4
AJUBA	4
TMEM57	4
FBXO38	4
PJA2	4
MYLIP	4
AZI1	4
KLHL20	4
ZNF503-AS2	4
RAB40B	4
ABCB6	4
ZRANB1	4
DIRAS1	4
SMYD4	4
DMRT3	4
JPH1	4
PATL1	4
RNF19A	4
LOC100130890	4
NOL10	4
MED23	4
DYRK1A	4
CDKL3	4
FAM114A2	4
SRD5A3	4
DUSP7	4
ZKSCAN5	4
SWAP70	4
CHMP7	4
ZNF775	4
PAPSS2	4
HDGFRP3	4
FADS3	4
NUP153	4
ZNF607	4
RUSC2	4
GNP7	4
PLCB3	4
NUDT4	4
GUF1	4
ZAK	4
NFIX	4
NAB1	4
KIAA0284	4
SCCPDH	4
RALBP1	4
LYPLA1	4
ZNF416	4
C2CD2L	4
LRRC8E	4
LOC339803	4
ANKRD13B	4
CEP85L	4
SLC20A2	4
APOL	4
USO1	4
FUT11	4
KDM2B	4
HABP4	4
ZNF77	4
FAM45A	4
ZFP30	4
SYVN1	4
CNTLN	4
TRIM13	4
OSTM1	4
RNF168	4
ZNF623	4
NDST1	4
FAM45B	4
KCNMB4	4
TTF2	4
TRIM16	4
SAMD10	4
THAP2	4
LEO1	4
IGF2BP1	4
MAL2	4
LDLRAP1	4
AMOTL2	4

REST	4
KIAA0146	4
QSOX2	4
FAM178A	4
MAFK	4
D4S234E	4
CAMSAP2	4
C18orf54	4
SLC9B2	4
ERP44	4
RAPGEF1	4
ITSN1	4
SDAD1	4
RHBDD1	4
ENTPD4	4
NOTCH3	4
KIF3A	4
ME2	4
FAR1	4
NRIP3	4
HCG11	4
CISD2	4
VCAN	4
ARHGEF10	4
GTPBP10	4
DCAF5	4
NAIF1	4
CHM	4
ASCC3	4
F2RL1	4
PRR11	4
CTTNBP2NL	4
PKP4	4
SLC35D1	4
FAM160A2	4
ZNF850	4
QSER1	4
NOM1	4
PAPD5	4
EGLN1	4
B7H6	4
COL4A1	4
MIOS	4
SNX25	4
STAT2	4
PITPNM1	4
C5orf41	4
TTC7B	4
CELF2	4
PRPF4B	4
PCNXL3	4
FARP2	4
FLCN	4
C17orf103	4
TYRO3	4
OXCT1	4
BCL2L13	4
YAP1	4
GATAD1	4
EP300	4
ZNF280C	4
PDXDC1	4
FBXO11	4
ETNK1	4
ZBTB40	4
RC3H1	4
IGF2BP3	4
AASDH	4
SH3BGR L2	4
C10orf76	4
DCUN1D4	4
MTHFR	4
N4BP1	4
ITPR3	4
PRKAA2	4
C18orf25	4
PDE7A	4
GFPT1	4
CTDSPL2	4
C1orf55	4
PCGF3	4
GK5	4
MYO6	4

ATP13A3	4
HAUS3	4
KLHL5	4
GOLGB1	4
NUP214	4
PHC3	4
OSBPL8	4
LPGAT1	4
ZFX	4
ITPKB	4
HK2	4
SENP6	4
YTHDC2	4
TMEM164	4
PTPRK	4
DBT	4
SPAG9	4
IPO9	4
AHR	4
KIAA1211	4
KIAA0947	4
FAM208B	4
GDAP2	4
SCAF11	4
POLH	4
AFF4	4
ZNF780B	4
RANBP2	4
ZNF724P	4
CYP2U1	4
SMG1	4
ZWILCH	4
ANKRD62P1-PARP4P3	4
SUZ12P	4
MEF2D	4
TOM1L1	4
NUPL1	4
INTS7	4
CDH3	4
IQGAP3	4
RASSF5	4
NUCB2	4
PDE6A	4
SENP7	4
GRAMD1C	4
LOC728558	4
PRKCE	4
BRAF	4
BAZ2B	4
TPK1	4
LOC647946	4
TNNT1	4
C12orf65	4
TMEM177	4
PRMT3	4
TMEM22	4
MND1	4
CCDC163P	4
CHST12	4
RNF6	4
PPIL2	4
ZNF193	4
NQO1	4
GPM6A	4
ZNF706	4
LIN54	4
LRRC8A	4
IMPA1	4
ARMCX3	4
MSL3	4
C1orf27	4
SMAD6	4
CHRA1	4
GNG4	4
SUOX	4
XIAP	4
CYFIP2	4
PLEKHA1	4
FBXW11	4
PDE10A	4
CCNT2	4
EIF2AK2	4

ANKRD28	4
MOCS1	4
ATG7	4
POP1	4
EFCAB5	4
KCNIP4	4
PARD3B	4
NFATC1	4
BANP	4
VPS16	4
MIR196B	4
TSNAX-DISC1	4
HSPE1-MOB4	4
SNORD49B	4
PRH1-PRR4	4
MIR3658	4
SPHAR	4
CCDC169	4
6459 MIR17	3
PLSCR3	3
RRFL	3
PCDHGA11	3
CLCN5	3
CCPG1	3
TTC23	3
SYNRG	3
CTAGE5	3
MTHFSD	3
BTN2A2	3
SNX21	3
MDP1	3
KRTAP19-1	3
RPP38	3
TATDN1	3
BBC3	3
HIST1H2BN	3
PHYHD1	3
PCGF1	3
HBQ1	3
TSEN15	3
TNIP2	3
LOC100506054	3
RRAS	3
HSD3B7	3
SERPINE2	3
CASP6	3
PLAUR	3
LOC100289361	3
GSTO2	3
CDK20	3
ZNF688	3
TGIF1	3
OSCP1	3
PJA1	3
HBA1	3
MTCP1NB	3
TTC26	3
LOC100506451	3
ULBP3	3
XRCC4	3
TBC1D17	3
C13orf15	3
C6orf72	3
DET1	3
RAB28	3
FBXO4	3
ADRA2C	3
LOC100303749	3
FHIT	3
PRMT7	3
CCDC24	3
NCK2	3
PHF1	3
ZNF383	3
CCDC107	3
HINFP	3
A1BG	3
RBBP8	3

TMEM128	3
SPAG4	3
FUCA1	3
IMPA2	3
ZNF446	3
TMEM116	3
SEPT6	3
NAPRT1	3
RPL7L1	3
HRASLS	3
TP5311	3
IFI35	3
EIF2B4	3
SQRDL	3
C12orf49	3
ZSCAN16	3
CRIP3	3
MGMT	3
SP110	3
PPP3CB	3
RPP25	3
SLC25A48	3
ALG13	3
DEAF1	3
ZNF408	3
UCP2	3
C4orf34	3
HAPLN3	3
ADCK2	3
SNAPC1	3
C16orf93	3
FAM63A	3
RRM2B	3
C16orf87	3
TMEM186	3
EGLN3	3
IKZF5	3
DDX42	3
PRORS1P	3
RASL11A	3
HOMER2	3
NDOR1	3
WEE1	3
RAD54L	3
AGPAT9	3
STAG3L4	3
VAV1	3
C5orf54	3
ELMOD3	3
DUS4L	3
BFSP1	3
RNF216P1	3
GCAT	3
TNFSF9	3
SCPEP1	3
HYAL2	3
GCA	3
PDX1	3
COIL	3
PNKP	3
ALDH6A1	3
SLC39A4	3
ZNF48	3
LOH12C R1	3
CCDC72	3
BNIP3	3
TOB1	3
GLIPR2	3
ALG6	3
MARK3	3
STARD10	3
RPSAP9	3
MAFB	3
RNF185	3
ZNF219	3
TRIM59	3
FGFR10P	3
GABRD	3
SCFD2	3
PANX1	3
ZNF584	3
LRRC45	3

ELOVL6	3
FJX1	3
KCNJ8	3
SPATS2	3
KIF18A	3
ESCO2	3
RHBDF1	3
NSUN5P2	3
NEK4	3
TRIM16L	3
BK250D10.8	3
DKK1	3
SLC27A5	3
CYHR1	3
C19orf12	3
LOC401010	3
RBM11	3
GPR137B	3
PPP1R3F	3
APBA3	3
GMPS	3
UBP1	3
FAM213A	3
PRKCD	3
CCZ1	3
HMG5	3
FBXO34	3
TMEM68	3
LRRC8D	3
TMEM198B	3
SCARB2	3
SPATA2L	3
SLC39A11	3
GBA	3
ZFP36	3
MBOAT2	3
MLL13	3
TSPAN15	3
SLC35E3	3
CSRNP2	3
RERG	3
ZEB1	3
WFS1	3
KAZALD1	3
DPY19L1	3
PIGA	3
GPR3	3
CRY1	3
FAM188A	3
LIMK1	3
ERLIN1	3
PTCD2	3
CXorf67	3
NIPA1	3
POC1B	3
ZNF277	3
LRRC4B	3
CNOT4	3
DNM1	3
SLC30A1	3
ZNF267	3
CDADC1	3
PTPDC1	3
GSN	3
DTWD1	3
ARHGAP17	3
ELL3	3
RHBDF2	3
MANSC1	3
PAPD4	3
NEBL	3
DUSP28	3
FARP1	3
BBS2	3
CCDC82	3
MTFR1	3
HDAC11	3
PEL1	3
ASUN	3
RAP1GDS1	3
OBFC2A	3

BRPF3	3
CHST7	3
C2orf69	3
GPD1L	3
DCAF13	3
ENDOD1	3
SLC4A11	3
ZNF542	3
PBXIP1	3
ZNF251	3
FBXL17	3
GTF3C4	3
POLR2M	3
RIC8B	3
MEIS2	3
HGSNAT	3
EIF3J	3
SRR	3
WDR67	3
LOC202781	3
SRFBP1	3
FLJ37453	3
POLD3	3
KDM2A	3
LTBP4	3
GLB1L	3
CYP2S1	3
KIAA0922	3
DOK4	3
SGSH	3
ZNF180	3
FAM108B1	3
KLHL13	3
RNF216	3
PIBF1	3
TPMT	3
NFYA	3
MOCS3	3
AMZ2P1	3
LCMT2	3
E2F8	3
DCDC2	3
PFKFB3	3
PLEKHG3	3
IPO11	3
ERBB2	3
FAM107B	3
LRFN4	3
KIAA1919	3
HPS4	3
KDM6B	3
FBXO42	3
ZNF398	3
EPM2AIP1	3
RBM25	3
F2R	3
SLC25A42	3
IBA57	3
WWC1	3
TNK2	3
MTF1	3
BUB1	3
SRC	3
NEDD4L	3
TOP3A	3
LDLR	3
ZNF230	3
ZC3H13	3
XPO6	3
C14orf102	3
TGFB2	3
KANK2	3
QTRTD1	3
CDK17	3
PAQR3	3
STAT5B	3
MN1	3
URB2	3
PKD1	3
POLR3B	3
SF1	3
PDLIM5	3
KANK1	3
PHACTR2	3

SLC30A6	3
LZTR1	3
MCM10	3
GOPC	3
SPATA2	3
KIAA1143	3
EML4	3
ZBTB5	3
ALDH7A1	3
C6orf228	3
RUNDC1	3
B3GALNT2	3
PRKCH	3
GIGYF1	3
PMEPA1	3
SRGAP2	3
SGSM2	3
JAG2	3
HOMER1	3
LAMB1	3
IL13RA1	3
SYNJ1	3
ITCH	3
ZNF480	3
FAM102B	3
CDK14	3
AARS2	3
PHLPP1	3
KAT2B	3
MARK4	3
ZNF585B	3
LOC100506686	3
ACVR2B	3
PELI2	3
CHD9	3
CELSR2	3
CHST3	3
EPHA7	3
ABI2	3
USP54	3
TGFBR1	3
IFFO2	3
EFR3B	3
ANKFY1	3
ABCA2	3
CDK13	3
TBC1D4	3
RAB11FIP2	3
PDS5A	3
INO80	3
ROBO2	3
DIEXF	3
CPD	3
BMPR2	3
PDPR	3
MID2	3
POLE	3
KCNJ14	3
ANKRA2	3
ARFGEF2	3
NIPBL	3
MLL4	3
ZNF155	3
TET3	3
CREB1	3
ZNF224	3
ZMAT3	3
PTAR1	3
NSD1	3
PIKFYVE	3
POU2F1	3
SACS	3
HOOK3	3
ZNF677	3
TMX4	3
ZNF573	3
NT5M	3
MORN1	3
CENPC1	3
BRWD1	3
FMO5	3
BMX	3
TMEM185A	3
DNAH12	3
PURG	3
AP3B2	3

HELO	3
FAM126B	3
INTS2	3
CCDC66	3
RGS3	3
LRP5	3
KCNAB2	3
HHIP	3
TAF4	3
GON4L	3
MOXD1	3
AAK1	3
MACROD1	3
ARAP2	3
SPATA6	3
RSF1	3
ABTB2	3
VWA3B	3
MYO1E	3
LOC100132891	3
KIAA1797	3
MIR548AN	3
SLC2A13	3
SBF2	3
CEP112	3
CTNNA3	3
PPAPDC1B	3
GABPB1	3
ZNF280D	3
LRRFIP1	3
ST20	3
C9orf30	3
ZHX1-C8ORF76	3
MIR32	3
MIR148B	3
TTC28-AS1	3
C15orf38	3
ZBED6	3
RPL36A	3
AHRR	3
TMPPE	3
BUB1B	3
MEF2BNB	3
SNORD68	3
ST20-MTHFS	3
GNG10	3
CERS1	3
MIR1909	3
HOXC5	2
C6orf147	2
NSRP1	2
LEPR	2
BLOC1S1-RDH5	2
ZC3H11A	2
MAP2K4	2
CRHR1	2
CFLAR	2
ELP2	2
ZNF331	2
TMEM136	2
DGKZ	2
MFS11	2
LINC00152	2
TESC	2
C11orf73	2
PLAC8	2
EDEM2	2
CNTFR	2
SESN1	2
TP53I3	2
HIGD1A	2
NR4A1	2
BOLA3-AS1	2
TDRD3	2
SMCR7	2
RABEPK	2
STOX1	2
PARN	2

6900

GNL3	2
NUDT9	2
ZNF583	2
ACSS2	2
PC	2
SLC35C1	2
ACBD5	2
PQLC1	2
SPINT1	2
TRAF5	2
DLGAP4	2
MARCH8	2
MTO1	2
ANKS3	2
ARMC8	2
SYT6	2
SLC11A2	2
FGFR4	2
CELF5	2
PHLDB1	2
RAB2B	2
LOC8169 1	2
RG9MTD 2	2
TRAPPC 2	2
DHX35	2
LIG4	2
OSBPL1 A	2
RBBP5	2
PARP8	2
RNF4	2
PHF20L1	2
TMEM18 4B	2
FGFR3	2
BZW1	2
AMPD2	2
ZNF641	2
ARAP1	2
EYA4	2
VDR	2
CLIP1	2
SFMBT1	2
ARHGEF 26	2
C21orf91	2
ABR	2
SYT1	2
FAM13B	2
SLC7A2	2
CASP8A P2	2
USP8	2
TLK1	2
ITGAV	2
BVES	2
KIF16B	2
ANK2	2
TMEM13 5	2
TMEM23 1	2
ANKRD1 2	2
MXD1	2
PLEKHM 1	2
TANK	2
MICAL3	2
PLCH1	2
NLGN4Y	2
ELMO1	2
CADPS	2
PTPRN2	2
MIR320A	2
PPP1R1 4A	2
MIR148A	2
RNU12	2
RPPH1	2
C14orf10 9	2
HIST2H2 AB	2
S100P	2
FAM104 B	2
KRTAP2 1-2	2
HMSD	2
HIST1H2 AM	2

LGALS1	2
OGG1	2
MLLT10	2
C6orf57	2
C16orf74	2
LOC1005 06713	2
FAM159 B	2
TAF1D	2
DNAJC4	2
LYSMD2	2
RPS10P 7	2
ADA	2
FBLL1	2
GALR2	2
ZNF821	2
TMSB15 A	2
CCDC77	2
PRADC1	2
KCTD6	2
XPA	2
FBXL12	2
NUDT7	2
RWDD2A	2
FRG1B	2
FOSL1	2
VAMP5	2
SFT2D2	2
WDR20	2
SMARCD 3	2
ASTN2	2
LDHC	2
MRPL42 P5	2
CPT1C	2
MRPL39	2
C1orf133	2
ZNF691	2
UBE2L6	2
ASL	2
LOC3752 95	2
KDEL3	2
LOC4402 88	2
SLC22A1 8	2
C2orf74	2
CDC16	2
MSRA	2
CALCB	2
C11orf75	2
EIF3IP1	2
CCDC15 9	2
TTC27	2
EFNA1	2
CFD	2
MNS1	2
ARID5A	2
MAGEH1	2
ACBD4	2
DMPK	2
NGLY1	2
TMEM23 4	2
INPP5F	2
RBPM52	2
GTF2A1	2
FAAH	2
BARD1	2
ABCD3	2
IGFBP6	2
SUGT1	2
FAM174 A	2
RELL2	2
NELL2	2
CASP9	2
RNF113 A	2
LOC7290 41	2
ASPHD1	2
CCDC11 1	2
VIPR1	2
C4orf33	2
LPAR2	2
ADPRHL 1	2

ANKZF1	2
A2LD1	2
PPP4R2	2
SNAP25	2
TRNT1	2
C11orf54	2
TESK1	2
GNAS- AS1	2
LOC4078 35	2
LINC004 78	2
AGXT2L 2	2
RND3	2
RRAGC	2
CLUAP1	2
ZDHHC6	2
MOK	2
UBAC2- AS1	2
ACYP2	2
FLJ4135 0	2
C12orf60	2
BCAM	2
SERGEF	2
SH2B2	2
MCPH1	2
UBTD1	2
TOP1MT	2
QDPR	2
LOC1005 06012	2
ETNK2	2
UBE2CB P	2
PACRGL	2
PIGX	2
METTL2 B	2
LOC1436 66	2
TBC1D1	2
LOC1005 05854	2
SULT4A1	2
MTX1	2
SPATA1 7	2
C1orf74	2
PARS2	2
PET112	2
MCF2L- AS1	2
MUS81	2
CACNB3	2
RNF13	2
FAM103 A1	2
ATAD1	2
ZNF205	2
EME1	2
PMM2	2
GPX3	2
MAPK13	2
PRPH	2
PLL	2
PUS3	2
CUEDC1	2
TP1P3	2
MKS1	2
FRS3	2
PCYT1A	2
MLH1	2
MIER2	2
SCNN1B	2
TMEM13 2A	2
SMPDL3 A	2
ATAD3B	2
LRTOMT	2
BTN2A1	2
ELK3	2
TNK1	2
VPS33B	2
LRRC1	2
NPRL3	2
ALDH1B 1	2
GTF2H3	2
AGAP6	2
PIGV	2

LYPD3	2
APBA2	2
MYD88	2
PRICKLE 3	2
ZNF232	2
PPAPDC 1A	2
TAB1	2
KLF16	2
RECQL	2
LIAS	2
ANXA3	2
NSUN5P 1	2
PTHLH	2
CDC40	2
ST6GAL NAC6	2
NUDT10	2
AP4M1	2
BHLHB9	2
ZNF567	2
WDYHV1	2
SIPA1	2
THAP8	2
P2RX4	2
IDAS	2
VRK1	2
PWWP2 B	2
SPRYD3	2
KLHDC8 B	2
TCF12	2
RASA1	2
MUDEN G	2
TCEA1	2
ZNF394	2
KIAA014 1	2
ACP6	2
LOC6439 88	2
CD55	2
CNTR0B	2
CAMK1D	2
C14orf79	2
IDH3A	2
GABRB3	2
SLC25A4 6	2
DLG1	2
LEPREL 2	2
C6orf225	2
CD46	2
SLC38A9	2
ZDHHC2 2	2
HOXC11	2
OSR1	2
UHRF1	2
DSCC1	2
MKNK1	2
LOC2843 85	2
TMCO3	2
FRAT2	2
ZNF675	2
HDAC7	2
CYP2J2	2
MRS2	2
DUSP9	2
ZNF526	2
THAP6	2
KIAA198 4	2
DLX1	2
MPHOSP H10	2
RING1	2
FOXP1	2
MFS1	2
LOC4010 22	2
HOXC8	2
ARHGEF 16	2
SIX2	2
USP28	2
HEATR6	2
ZBTB1	2
PTBP2	2

ZSCAN1 2	2
TMEM18 8	2
NIPSNA P3A	2
TTI1	2
RASL11 B	2
GEMIN5	2
AVL9	2
B3GNT2	2
ZNF429	2
RPUSD1	2
CCDC12 6	2
ZNF642	2
CARD6	2
ARRDC2	2
C6orf192	2
SCFD1	2
GNB5	2
ADO	2
MYNN	2
GLTPD1	2
RPL13A P17	2
HLX	2
CEP120	2
FAH	2
LIN52	2
STOML1	2
EMILIN3	2
C3orf80	2
EMX2	2
PALM	2
CAPN10	2
TOPORS	2
EIF2C2	2
UBA5	2
SLC35E4	2
ANKRD3 2	2
ANO10	2
SAP130	2
MDM1	2
EML3	2
AP1AR	2
SHISA3	2
C1QL4	2
SLC25A2 5	2
PGAP3	2
MIPEP	2
TSKU	2
DCLRE1 A	2
ANKMY2	2
GLMN	2
HOXB4	2
RTN1	2
DGCR8	2
IRX3	2
ZNF682	2
CENPP	2
ZNF140	2
FTSJD1	2
CCDC64	2
NUMB	2
RRN3	2
CHGB	2
SDC1	2
PIF1	2
ZNF582	2
ISM2	2
EIF2AK4	2
SNX10	2
ARFGAP 1	2
SNTB1	2
ALKBH8	2
SPIRE2	2
C17orf75	2
C10orf28	2
SLC27A4	2
MEX3D	2
BHLHE4 0	2
SLC35F5	2
TGFA	2
DDN	2
ASB7	2
DMRTA2	2
ERVMER 34-1	2

TMEM63 B	2
GTPBP1	2
CYTH1	2
TMC6	2
USP51	2
PTDSS2	2
TCF24	2
NHLRC3	2
DDX51	2
FAM193 A	2
ABCB9	2
MCOLN3	2
ANKRD1 3C	2
HEATR3	2
ZNF223	2
TCTN2	2
MNT	2
LOC4401 73	2
SHOC2	2
LOC7301 01	2
ATG5	2
BCDIN3 D	2
MICALL1	2
GALNT3	2
ZNF134	2
PLEKHF 2	2
ZBTB7B	2
ATPBD4	2
FAM210 A	2
ERCC6L	2
DGCR2	2
ZNF343	2
STK33	2
ACADSB	2
AGK	2
RUFY2	2
ATF7IP	2
SEMA6B	2
HECTD3	2
TEAD3	2
FEM1A	2
BMP6	2
UBXN2B	2
TRIB2	2
ZNF689	2
LRP10	2
LOC1003 79224	2
GCLC	2
SCYL2	2
RFXAP	2
BCAR3	2
GSPT2	2
FBXO33	2
ZSWIM3	2
GALNT1 3	2
FAN1	2
EFNB3	2
STK10	2
KHNYN	2
VPS4B	2
NUFIP1	2
GNPTAB	2
FAM40A	2
CEP68	2
C4orf42	2
TMEM65	2
KIAA089 5L	2
CASC4	2
STYX	2
JAZF1	2
C15orf29	2
FBXW8	2
RHOU	2
C17orf28	2
PRDM8	2
FAM40B	2
UNC5B	2
KCTD7	2
PEX12	2
ZKSCAN 1	2
HIP1R	2
FBLN1	2
XRCC2	2

KIT	2
CLCN7	2
IRF2BPL	2
TONSL	2
NPAT	2
C10orf88	2
MGC275 2	2
P2RY1	2
ABCB10	2
FAP	2
RAB15	2
LRIG2	2
PHF13	2
DDX10	2
STK36	2
S1PR2	2
GALNT1	2
ZSWIM4	2
GBE1	2
VAV3	2
HSH2D	2
CA13	2
AP1G2	2
ZNF45	2
RHPN2	2
GLB1L2	2
MTMR12	2
MCART1	2
CEP85	2
PDE4A	2
PRDM13	2
CD99L2	2
PRRT3	2
EFTUD1	2
PLEKHG 2	2
CCDC85 C	2
AGAP2	2
RAD18	2
DACT1	2
ZFYVE16	2
NKX3-1	2
RXRA	2
LRIG3	2
FMNL1	2
LSG1	2
KCNC3	2
ARMC4	2
MCM9	2
AASS	2
TRIM25	2
TSHZ1	2
C17orf96	2
ZNF420	2
POLR1B	2
ACSF3	2
KIAA160 9	2
RNF31	2
MTDH	2
GRB10	2
FAM200 B	2
OTUD6B	2
POLM	2
CDCA2	2
MEGF9	2
ALAD	2
ZNF587	2
DHX32	2
EYA3	2
LOC9078 4	2
ITGB5	2
ADAL	2
CDC42S E2	2
ABCC4	2
TGS1	2
TLE1	2
DNA2	2
ZNF549	2
PAFAH2	2
TOB2P1	2
TMX3	2
LGALS8	2
IFT122	2
CUL5	2
ZNF317	2
TTC37	2
SLC16A1 4	2

CDC42E P3	2
TSTD2	2
TNFAIP3	2
PPAT	2
TAF5L	2
GJA1	2
BCL2L11	2
DNAJC1 0	2
ASAP3	2
MRE11A	2
FANCD2	2
RBM12B	2
SNX22	2
IREB2	2
ZNF548	2
OXNAD1	2
LNPEP	2
ZNF281	2
MMP15	2
TRIM56	2
WWP2	2
ITPRIP2	2
TTYH3	2
OXSR1	2
NCKAP1	2
STRN3	2
CWC22	2
ZNF772	2
EPS8	2
ZNF271	2
TTC33	2
MEF2A	2
IPMK	2
TOB2	2
MPP5	2
LPCAT2	2
MBLAC2	2
ZNF234	2
TADA2B	2
PHF12	2
DZIP1	2
UBL3	2
ACO1	2
TXLNB	2
FGF9	2
ZNF192	2
NEAT1	2
GLCE	2
KTN1	2
PNPT1	2
INF2	2
RANBP1 0	2
C9orf91	2
C3orf58	2
FAM46C	2
SPAST	2
MANEA	2
SPIN4	2
DHX57	2
STAM2	2
SH3BP4	2
RCBTB1	2
UTP23	2
RIPK1	2
KIAA180 4	2
UACA	2
PARD6B	2
PLEKHA 7	2
LOC4013 21	2
WDR90	2
COL5A1	2
ZNF614	2
FNDC3A	2
LRP11	2
CLEC16 A	2
SPTLC2	2
RBMS1	2
FOKK2	2
RG55	2
BRPF1	2
SIK2	2
MYO9B	2
PLXNB2	2
PRKACB	2
SPICE1	2
LHFPL4	2
DENND3	2

SYT9	2
SETDB2	2
FAM188B	2
RAB11F1P5	2
SARM1	2
NR3C2	2
NCOR1	2
LRIG1	2
CTC1	2
WDHD1	2
JARID2	2
CNNM4	2
G2E3	2
FMNL2	2
EPHA3	2
LIFR	2
RAB3D	2
SLC9A5	2
NFRKB	2
ATG14	2
MYOM2	2
FAM171A2	2
EBF2	2
UGGT1	2
TATDN2	2
CMTM4	2
ZNF320	2
ORAI2	2
GCOM1	2
FAM120A	2
MAN1A2	2
APPBP2	2
DGKE	2
PARVA	2
FRS2	2
ATAD2	2
KIAA1429	2
CYP1B1	2
ZBED4	2
TMEM104	2
ELL2	2
BCL9	2
MIER3	2
ARIH1	2
RAPGEF2	2
MARK1	2
INMT-FAM188B	2
MAP3K1	2
IQCE	2
ZNF33A	2
MDM4	2
TNKS2	2
SSH1	2
CC2D1B	2
CIC	2
SGPL1	2
DPY19L4	2
SAMD8	2
WDR36	2
MYO1D	2
PTGFRN	2
AGPAT3	2
TMF1	2
MFHAS1	2
KLHDC5	2
SLC12A7	2
KIF26A	2
SH3BP2	2
IKBKAP	2
SAP30L	2
POLR3A	2
NACC2	2
ZDBF2	2
LRRC8C	2
ARHGEF12	2
IGFBP5	2
SETD7	2
HS2ST1	2
USP37	2
BTA1	2
ATP10D	2
EPB41L1	2
DNAL1	2
ZNF629	2

LAMC1	2
ZNF805	2
FBXL18	2
ENTPD7	2
RAB11F1P1	2
KIAA0195	2
SOAT1	2
SEMA6A	2
CTIF	2
OTUD7B	2
TBC1D30	2
C12orf35	2
YOD1	2
SHPRH	2
SOCS4	2
PTPRJ	2
NKTR	2
BTBD7	2
U2SURP	2
RAB22A	2
METTL8	2
IRS2	2
BEND4	2
PCM1	2
MYH10	2
CPED1	2
STX17	2
ASXL1	2
MCC	2
XPO4	2
MAF	2
TEX15	2
TMEM120B	2
LAMA1	2
FBN1	2
MYO10	2
XRN1	2
MAP1A	2
SMCR8	2
FOKK1	2
ZFP106	2
ARHGAP5	2
ZMYM2	2
FZD3	2
FAM59B	2
PTPN14	2
HTT	2
CNOT1	2
LOC729013	2
ZNF445	2
C19orf44	2
UBN2	2
FAT1	2
C14orf16	2
LRP1	2
ALS2	2
MPP3	2
LONRF2	2
CHD7	2
C10orf10	2
STRN	2
ZNF382	2
RECQL5	2
MCM3AP-AS1	2
VSIG10	2
ANKRD4	2
MMD	2
SLC25A4	2
FBXL14	2
GTF3C3	2
TIA1	2
POMT2	2
CEP76	2
KIAA1524	2
STK38	2
C3orf64	2
ZMYM1	2
MAEL	2
PRSS12	2
NCK1	2
RCBTB2	2
ZNF782	2
UEVLD	2

LOC645513	2
LOC389831	2
MYSM1	2
BRD7	2
THEM4	2
SMEK2	2
DNAJC27-AS1	2
NISCH	2
CRYZL1	2
RCOR3	2
NADSYN1	2
KIAA0226	2
LOC400927	2
PPIG	2
C2orf76	2
FBXO31	2
LOC646278	2
SNX6	2
P2RY14	2
NKAIN1	2
FBXO10	2
EHHADH	2
RPGRIPL1	2
PHTF1	2
COG3	2
ARID3A	2
ELF2	2
C11orf63	2
MTUS1	2
TBC1D22B	2
PIEZO1	2
MTBP	2
ARNTL2	2
SEL1L3	2
TMEM161B	2
KIAA1598	2
MYO5C	2
LOC728190	2
TRANK1	2
TNRC6C	2
SOS1	2
TRIM33	2
CMYA5	2
WNK2	2
DZIP3	2
RASAL2	2
METTL15	2
UBE3C	2
PPP2R2C	2
CAPN8	2
FCHO2	2
CBFA2T2	2
MANBA	2
ITGA8	2
CDK8	2
BRIP1	2
KAL1	2
FAM13A	2
CIT	2
SCAI	2
NT5DC1	2
AGTPBP1	2
C8orf44-SGK3	2
MAGI3	2
BTBD9	2
ZFH3	2
TMEM131	2
VPS13D	2
MYO3A	2
LOC100289178	2
PPP1R9A	2
PLXNA4	2
DOCK1	2
DNAH8	2
MCTP1	2

LOC642924	2
GLIS3	2
FNDC3B	2
RIT2	2
MIR548A3	2
LHFPL3	2
PTPRM	2
MIR1302-1	2
MACROD2	2
ERC2	2
EPHA6	2
SDK1	2
RBFOX1	2
GRID2	2
DPP10	2
RDM1	2
C11orf49	2
PRR5	2
TUBD1	2
C10orf58	2
MUTYH	2
ZNF568	2
ABCG1	2
HSD11B1L	2
STEAP2	2
ADARB1	2
FOXP2	2
PTBP3	2
SLC12A6	2
SYT14	2
PDE4D	2
DMD	2
TGIF2	2
OSBPL6	2
BCL2L2	2
FXYD6	2
MGC57346	2
RBAK	2
ARHGAP19	2
SNORD96A	2
SNORD29	2
MIR744	2
SNORA68	2
ANG	2
CSNK2A1P	2
LOC147804	2
TMEM110	2
RNU86	2
SNORD32A	2
MIR301A	2
SNHG4	2
ZFP91-CNTF	2
CD302	2
CPT1B	2
CHURC1-FNTB	2
ACY1	2
ARPC4-TTL3	2
C1orf93	2
MIR1181	2
MIRLET7A3	2
PET117	2
CSRP2BP	2
MIRLET7BHG	2
PCDHGC3	1
PRR4	1
FAM188B-2-CDRT4	1
RTEL1	1
DNAJC25-GNG10	1
GDF1	1
GPR75-ASB3	1
RNF103-	1

	CHMP3	
	LY75- CD302	1
	C10orf32 -AS3MT	1
	MIR1292	1
	MIR3652	1

	RPL21P2 8	1
	RPL21	1
	TMEM18 3B	1
	TMEM18 3A	1

	P2RY11	1
	KLHL23	1
	PHOSPH O2- KLHL23	1
	SLC5A3	1

6.3 C8ORF33 ist ein negativer Regulator der eukaryotischen Ribosomenbiogenese

6.3.1 Zusammenfassung

Die Ribosomenbiogenese stellt einen hochgradig komplexen und energieintensiven Prozess dar. Bei Eukaryoten wird dabei zunächst ein rRNA-Vorläufer transkribiert, welcher anschließend modifiziert und zu den 5,8S, 18S und 28S rRNA prozessiert wird. Bereits während dieser Prozessierung findet die Zusammenlagerung mit den ribosomalen Proteinen statt. Die Ribosomenbiogenese erstreckt sich dabei über mehrere zelluläre Kompartimente beziehungsweise Subkompartimente und benötigt eine Vielzahl an *trans*-agierenden Faktoren. Fehler in der Ribosomenbiogenese sind Ursache zahlreicher als Ribosomopathien bezeichneter Krankheiten. Die Kenntnis des genauen Ablaufs der Ribosomenbiogenese sowie insbesondere aller daran beteiligten *trans*-agierenden Faktoren stellen daher ein begründetes wissenschaftliches Interesse dar.

In der vorliegenden Arbeit konnte das bislang uncharakterisierte Protein C8ORF33 (*chromosome 8 open reading frame 33*) als Interaktor von GRWD1 (*glutamate-rich WD repeat containing 1*), einem putativ stimulatorischen Ribosomenbiogenesefaktor, identifiziert werden. Beide Proteine weisen eine vorwiegend nukleoläre Lokalisation auf und metabolische Markierungsexperimente bestätigten deren Beteiligung an der Ribosomenbiogenese. Interessanterweise übt C8ORF33 dabei jedoch, im Gegensatz zu der überwiegenden Mehrheit der bekannten Ribosomenbiogenesefaktoren, einen inhibitorischen Effekt aus. Immunpräzipitationsexperimente und Dichtegradientenzentrifugationsstudien deuteten darauf hin, dass dieser inhibitorische Effekt auf der Sequestrierung des stimulierenden Faktors GRWD1 in einen inhibitorischen Komplex beruht. Die hier gezeigten Befunde lassen somit auf einen bislang unbekanntem Regulationsmechanismus schließen, mit dem die Ribosomenbiogenese negativ reguliert und somit der zellulären Homöostase angepasst werden kann.

6.3.2 Summary

Ribosome biogenesis is a highly complex and energy consuming process. In eukaryotes, the newly transcribed rRNA precursors are modified and processed to yield the 5.8S, 18S and 28S rRNAs. The association of ribosomal proteins with the rRNAs begins as early as during rRNA maturation. Ribosome biogenesis spans over various cellular (sub-)compartments and requires a multitude of *trans*-acting factors. Furthermore, defects in ribosome biogenesis cause numerous diseases known as ribosomopathies. Therefore, the understanding and elucidating of the exact mechanism of ribosome biogenesis as well as the complete set of *trans*-acting factors is of reasonable scientific interest.

In this work the uncharacterized protein chromosome 8 open reading frame 33 (C8ORF33) could be identified as an interactor of the putative stimulatory ribosome biogenesis factor glutamate-rich WD repeat containing 1 (GRWD1). Both proteins localize predominantly to nucleoli and metabolic labeling assays could confirm their involvement in ribosome biogenesis. Interestingly, C8ORF33 is a negative regulator of ribosome biogenesis, contrary to the vast majority of the known ribosome biogenesis factors. Immunoprecipitation experiments and density gradient centrifugation studies indicate that this inhibitory effect is due to its sequestration of the stimulatory GRWD1 in an inhibitory complex. These data elucidate a novel negative regulatory mechanism during ribosome biogenesis, which might play crucial roles in maintaining cellular homeostasis.

6.3.3 Einleitung

6.3.3.1 Die Synthese der Translationsmaschinerie bindet beträchtliche zelluläre Ressourcen

Die lineare Erbinformation der DNA wird durch die Proteinbiosynthesemaschinerie in die dreidimensionale Welt der Proteine mit vielen katalytischen und strukturgebenden Eigenschaften übersetzt. Naturgemäß ist dieser Prozess sehr energieaufwändig, müssen doch die Aminosäuren vor ihrer Verknüpfung aktiviert und die einzelnen Schritte der Translation durch energieverbrauchende Enzyme ermöglicht werden. Interessanterweise ist dieser Energieaufwand aber vernachlässigbar im Vergleich zum Energieaufwand, der für die Synthese der Proteinsynthesemaschinerie selbst aufgewendet werden muss. So schätzt man, dass weit über 60 % der gesamten metabolischen Energie einer Zelle für den Aufbau und Erhalt der über 10 Millionen Ribosomen aufgewandt wird (335). Somit ist nicht nur die Translation sondern auch die Ribosomensynthese unerlässlich für das Wachstum und die Proliferation der Zelle.

6.3.3.2 Die Ribosomenbiogenese

Bestehend aus über 80 Proteinen, vier rRNAs und einer molekularen Masse von 4,2 MDa zählt das Ribosom zu den größten makromolekularen Komplexen einer menschlichen Zelle (336). Aufgrund dieser Komplexität ist es nicht verwunderlich, dass die Ribosomenbiogenese einen koordinierten und hochregulierten Prozess darstellt, der sich über mehrere zelluläre und subzelluläre Kompartimente erstreckt und an dem eine Vielzahl an *trans*-agierenden Faktoren beteiligt sind (337-339). Zunächst wird im Nukleolus ein 47S prä-rRNA-Vorläufer transkribiert, welcher die 5,8S, 18S und 28S rRNA enthält (Abbildung 22). Dieser Vorläufer wird im Laufe der Biogenese zu den reifen rRNAs prozessiert, modifiziert und mit ribosomalen Proteinen zusammengelagert. Dazu werden die im Zytoplasma translatierten ribosomalen Proteine sowie Prozessierungs- und Assemblierungsfaktoren in den Zellkern importiert. Ein Teil dieser Faktoren wandert anschließend in den Nukleolus, wo die Zusammenlagerung der prä-ribosomalen Partikel beginnt. Nach der weiteren

Reifung im Nukleoplasma und in der finalen Phase auch im Zytoplasma lagern sich die reifen 40S und 60S Untereinheiten zum katalytisch aktiven Ribosom zusammen.

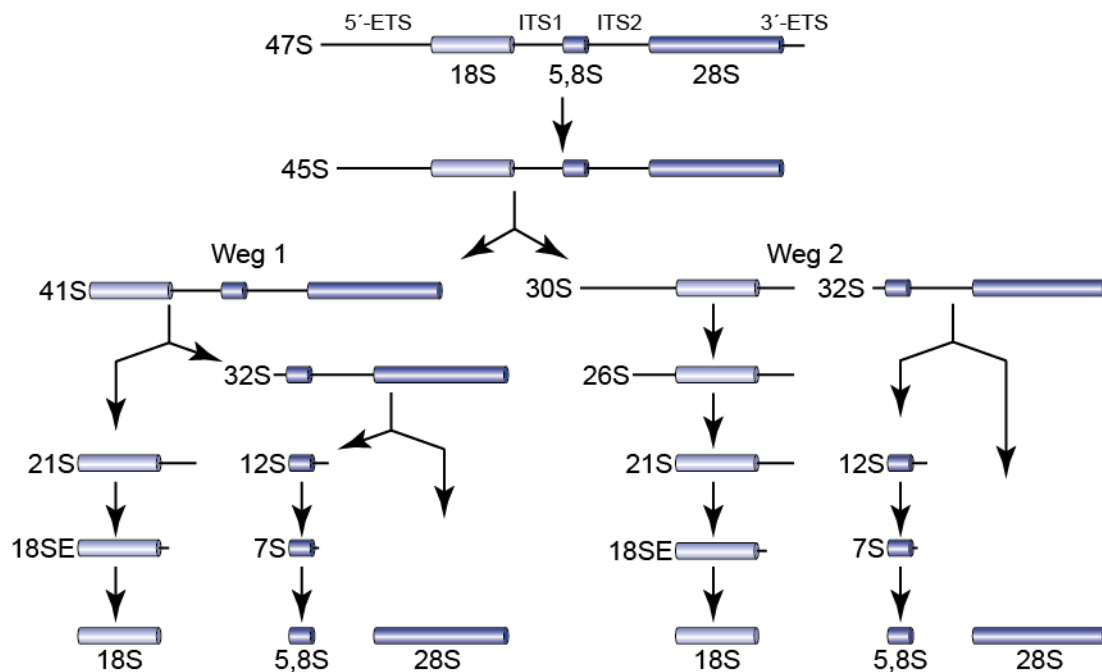


Abbildung 22: Prozessierung der rRNA.

rRNAs werden als 47S prä-rRNA von der RNA-Polymerase I (RNAP1) transkribiert. Die Prozessierung dieses Vorläufers kann über zwei verschiedene Prozessierungswege erfolgen. Dabei werden durch endo- und exonukleolytische Spaltungen die ETSs (*external transcribed spacer*) und ITSs (*internal transcribed spacer*) entfernt und so die 5,8S, 18S und 28S rRNAs generiert.

Die DNA-Segmente, die für den 47S prä-rRNA-Vorläufer kodieren, sind in sich tandemartig wiederholenden Einheiten an mehreren Stellen des Genoms kodiert (340). Diese werden als nukleolusorganisierende Regionen (NOR) bezeichnet, da sich transkriptionsabhängig der Nukleolus um diese Regionen formiert. Die 47S prä-rRNA wird von der RNA Polymerase I (RNAP1) transkribiert und setzt sich aus einem *external transcribed spacer* (ETS), der 18S rRNA, einem *internal transcribed spacer* (ITS), der 5,8S rRNA, einem weiteren ITS, der 28S rRNA und einem abschließenden ETS zusammen (340) (Abbildung 22).

Um aus dem 47S Vorläufer die 18S, 5,8S und 28S rRNAs zu erhalten, wird die prä-rRNA im Anschluss an die Transkription prozessiert und modifiziert. Endo- und Exonukleasen hydrolysieren dazu die prä-rRNA an definierten Stellen und entfernen

dadurch die ETSs und ITSs (Abbildung 22) (341). Neben der Prozessierung wird die rRNA auch massiv posttranskriptionell modifiziert. Diese Modifizierungen erfolgen durch snoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein complex*), wobei man zwei Klassen unterscheidet: Die C/D Box snoRNPs katalysieren die Methylierung der 2'-OH-Gruppen der Ribose während die H/ACA snoRNPs die Isomerisierung von Uracil zu Pseudouracil katalysieren (338, 342). Diese Modifikationen sind von Bedeutung für die spätere Struktur und Funktion des Ribosoms (337).

Die Zusammenlagerung der prä-rRNA mit ribosomalen Proteinen zum prä-ribosomalen Partikel beginnt bereits während der Prozessierung der rRNA im Nukleolus. Durch die Spaltung zwischen der 18S und der 5,8S rRNA wird dieser Partikel in die 40S und 60S prä-ribosomalen Partikel aufgetrennt, die getrennt voneinander weiter prozessiert und mit weiteren ribosomalen Proteinen zusammengelagert werden. Die Zusammenlagerung mit ribosomalen Proteinen erfolgt in einer festgelegten Reihenfolge. So unterscheidet man frühe ribosomale Proteine, die bereits vor der Spaltung der 40S und 60S prä-ribosomalen Partikel inkorporiert werden, von späten Faktoren, die erst danach eingebaut werden (343). Auch die 5S rRNA muss in den prä-ribosomalen Partikel integriert werden, da sie nicht mit den restlichen ribosomalen RNAs als 47S prä-rRNA transkribiert sondern getrennt von der RNA Polymerase III synthetisiert wird (344). Die 5S rRNA bildet dazu zunächst zusammen mit den ribosomalen Proteinen RPL5 und RPL11 den 5S RNP Subkomplex welcher im Nukleolus in den prä-ribosomalen Komplex eingebaut wird (345, 346). Nach der Reifung der prä-ribosomalen Partikel im Zellkern erfolgt der Export von prä-40S und prä-60S ins Zytoplasma wo die finale Reifung zu den funktionsfähigen 40S und 60S Untereinheiten erfolgt. Dieser Exportweg wird durch den Exportfaktor XPO1 (Exportin 1) und die GTPase Ran ermöglicht (347-351).

6.3.3.3 Zellwachstum und Ribosomenbiogenese

Die Ribosomenbiogenese ist eng mit dem Zellwachstum verknüpft (352). Nukleoläre Stressbedingungen wie Inhibierung der rRNA-Transkription oder -Prozessierung führen daher zu einer zellulären Stressantwort (353-356). Hierbei spielt das Tumorsuppressorgen p53 eine zentrale Rolle. p53 ist ein Transkriptionsfaktor, der die Transkription von Genen fördert, die zu Zellzyklusarrest, DNA-Reparatur und letzten Endes zu Apoptose führen (357, 358). Unter normalen

Wachstumsbedingungen wird p53 nur in sehr geringen Mengen exprimiert, da es durch Interaktion mit der E3 Ligase MDM2 (*mouse double minute 2 homolog*) ubiquitinyliert und daraufhin abgebaut wird (359-361). Wird infolge von nukleolärem Stress die Ribosomenbiogenese inhibiert, wird das 5S RNP nicht mehr effizient in den prä-ribosomalen Partikel inkorporiert und liegt somit frei vor (352, 362). Dies führt zur verstärkten Bindung von MDM2 an das 5S RNPs (352, 362). Infolgedessen interagiert MDM2 nicht mehr mit p53, welches dadurch nicht mehr abgebaut wird und deshalb in der Zelle akkumuliert.

6.3.3.4 Ribosomenassoziierte Krankheiten: Ribosomopathien

Fehler in der Biogenese oder der Funktion des Ribosoms sind Ursache von diversen Krankheiten, die unter dem Begriff Ribosomopathien zusammengefasst werden. Häufig äußern sich diese Krankheiten in Defekten der Erythropoese oder in Skelettschäden und umfassen unter anderem die Diamond-Blackfan-Anämie, das 5q-minus-Syndrom oder das Treacher-Collins-Syndrom (363). Auch bei der Behandlung von Krebserkrankungen rückt die Ribosomenbiogenese zunehmend in den Fokus. Aufgrund der starken Proliferation ist sie wachstumsentscheidend für eine Krebszelle. Der Eingriff in die Ribosomenbiogenese durch Chemotherapeutika bietet daher einen Ansatzpunkt für die Krebstherapie (364).

Ein umfassendes Verständnis der Ribosomenbiogenese sowie die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung aller daran beteiligter Faktoren ist aus diesem Grund von größtem wissenschaftlichen Interesses. Faktoren, die die Ribosomenbiogenese positiv beeinflussen, sind bereits zahlreich bekannt. Vor diesem Hintergrund stellt sich nun die prinzipielle Frage, ob Mechanismen existieren, durch welche die Ribosomenbiogenese negativ reguliert werden kann. Ein solches Szenario würde der Zelle die Möglichkeit eröffnen infolge von Stressbedingungen die Ribosomenbiogenese zu unterdrücken. Die Aufdeckung von derartigen Mechanismen und der daran beteiligten Faktoren könnte auch bei der Entwicklung von Krebstherapien von entscheidender Bedeutung sein.

6.3.3.5 Problemstellung

GRWD1 (*glutamate-rich WD-repeat 1*) ist ein eukaryotisches Protein, dessen strukturelles Hauptcharakteristikum vier sogenannte Tryptophan-Aspartat (WD40)-Wiederholungsmotive sind (365). Gemeinsam bilden die WD-Motive eine WD-Domäne, welche eine propellerartige Struktur besitzt und Protein-Protein-Interaktionen vermittelt (366). Das Hefehomolog von GRWD1, Rrb1p (*regulator of ribosome biogenesis*), wurde als Ribosomenbiogenesefaktor identifiziert und wird für die Biogenese der 60S Untereinheit benötigt (367-369). Auch für das humane Homolog gibt es erste Hinweise, die auf eine Beteiligung in der Ribosomenbiogenese hindeuten (339, 365). Initiale Experimente im Rahmen dieser Arbeit haben gezeigt, dass GRWD1 mit dem noch uncharakterisierten Protein C8ORF33 interagiert. Die Kenntnis aller Faktoren, die an der Ribosomenbiogenese beteiligt sind sowie deren Wirkmechanismus ist essentiell für ein umfassendes Verständnis der Ribosomenbiogenese. Aus diesem Grund sollte C8ORF33 funktionell und biochemisch charakterisiert und eine mögliche Rolle in der Ribosomenbiogenese untersucht werden. Dabei sollte besonders die funktionelle Konsequenz der Interaktion von C8ORF33 mit GRWD1 analysiert werden.

6.3.4 Ergebnisse

6.3.4.1 C8ORF33 inhibiert die Ribosomenbiogenese

Das Protein C8ORF33 wurde bislang noch keinem zellulären Prozess zugeordnet und sollte daher im Rahmen dieser Arbeit funktionell und biochemisch charakterisiert werden. Da die intrazelluläre Lokalisation eines Proteins häufig erste Anhaltspunkte über dessen zelluläre Funktion gibt, wurde eine indirekte Immunfluoreszenz zur Detektion von C8ORF33 in einer stabilen Flp-In T-REx HeLa C8ORF33-Zelllinie durchgeführt. Nach Induktion mit Tetracyclin exprimieren diese Zellen C8ORF33, welches am N-Terminus eine FLAG/HA-Tag besitzt. Nach der Induktion dieser Zelllinie erfolgte die Färbung von FLAG/HA-C8ORF33 mithilfe eines α -HA-Antikörpers. C8ORF33 lokalisierte dabei im Zellkern mit einer deutlichen Anreicherung in den Nukleoli (Abbildung 23A).

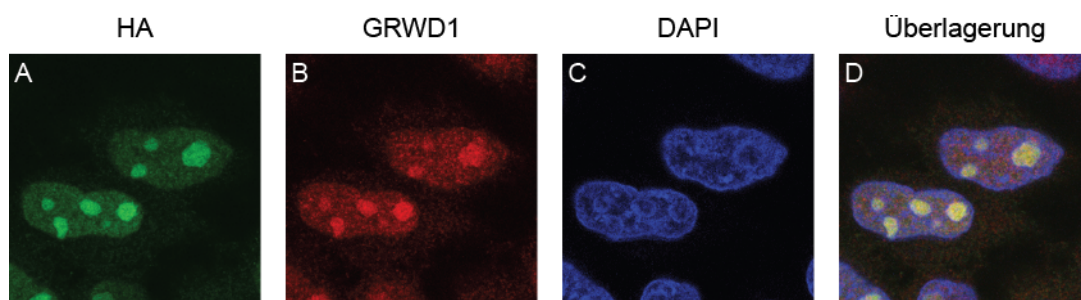


Abbildung 23: C8ORF33 und GRWD1 lokalisieren in Nukleoli.

Immunfluoreszenzmikroskopieaufnahmen nach Induktion einer stabilen FLAG/HA-C8ORF33 Zelllinie mit Tetracyclin (A) Färbung von FLAG/HA-C8ORF33 mit α -HA-Antikörpern (B) Detektion von GRWD1 mit α -GRWD1-Antikörpern (C) DAPI-Färbung zur Visualisierung der Zellkerne (D) Überlagerung von A-C.

Nukleoli sind hochspezialisierte subnukleäre Domänen, in welchen die Transkription ribosomaler RNA sowie die frühe Phase der Ribosomenbiogenese stattfindet. Die Lokalisation von C8ORF33 in Nukleoli ist daher indikativ für eine Beteiligung an einem dieser Prozesse. Um diese Möglichkeit experimentell zu testen, wurde ein metabolisches Markierungsexperiment in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Nick Watkins (Universität Newcastle upon Tyne, GB) durchgeführt. Zellen wurden hierfür mit Kontroll- und C8ORF33-siRNA transfiziert. Durch Kultivierung dieser Zellen in

Medium, welches ^{32}P -markiertes Phosphat enthielt, wurde die neusynthetisierte RNA radioaktiv markiert. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert, gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Die Detektion der

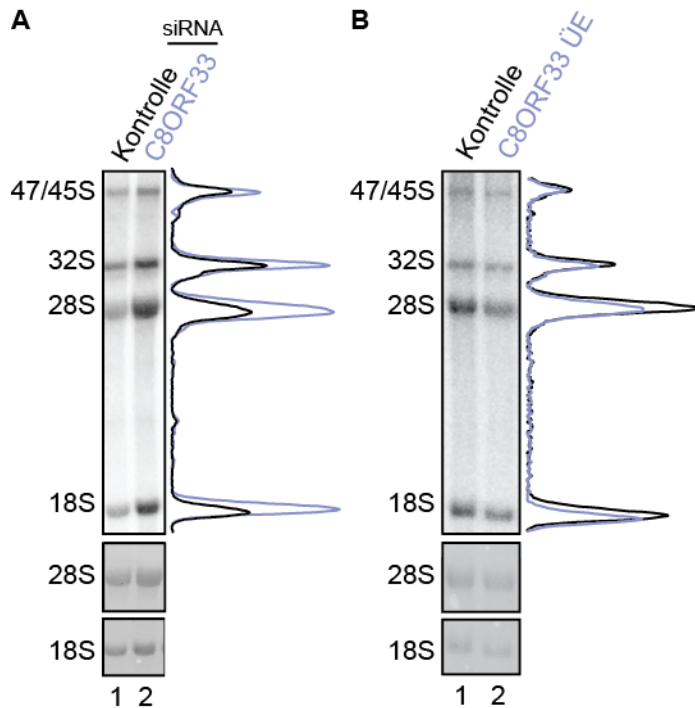


Abbildung 24: C8ORF33 ist ein Inhibitor der Ribosomenbiogenese.

(A) Kontroll- (Spur 1) und C8ORF33-siRNA (Spur 2) wurde in Zellen transfiziert. Neusynthetisierte RNA wurde durch Kultivierung der Zellen in Medium, das mit ^{32}P -Phosphat supplementiert wurde, radioaktiv markiert. Gesamt-RNA wurde isoliert, über ein Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran geblottet. Neusynthetisierte RNA wurde durch Autoradiografie detektiert. (B) Autoradiografie der neusynthetisierten RNA in C8ORF33-überexprimierenden (Spur 1) und nicht überexprimierenden (Spur 2) Zellen. Unten: Ehtidumbromidfärbung der 28S und 18S rRNA.

neusynthetisierten RNA erfolgte durch Autoradiografie. Die siRNA-vermittelte Reduzierung von C8ORF33 resultierte im Vergleich zur Kontrolle in einer vermehrten Synthese der 47S/45S- und 32S-rRNA-Vorstufen sowie der 28S und 18S rRNA (Abbildung 24A). Diese Daten lassen vermuten, dass C8ORF33 ein Faktor ist, der die Ribosomenbiogenese negativ beeinflusst. Um diese Hypothese zu untermauern, wurde ein Überexpressions-experiment durchgeführt. Die Überexpression von C8ORF33 hatte einen inhibitorischen Effekt auf die Synthese der 28S und 18S rRNA zur Folge (Abbildung 24B). C8ORF33 stellt somit einen Inhibitor der Ribosomenbiogenese dar. C8ORF33 inhibiert dabei die Biogenese beider ribosomaler Untereinheiten.

6.3.4.2 C8ORF33 interagiert mit GRWD1, einem potentiellen Faktor der Ribosomenbiogenese

Um einen Einblick in den Mechanismus der Inhibierung der Ribosomenbiogenese durch C8ORF33 zu erhalten, wurde nach möglichen Interaktoren von C8ORF33 mittels Immunpräzipitation gesucht. Zur Überexpression von HA-C8ORF33 wurden Zellen transient transfiziert. α -HA-Antikörper präzipitierten zusätzlich zu HA-C8ORF33 einen weiteren Faktor mit einem Molekulargewicht von ca. 60 kDa, der in einer parallel ausgeführten Kontrollimmunpräzipitation nicht zu detektieren war

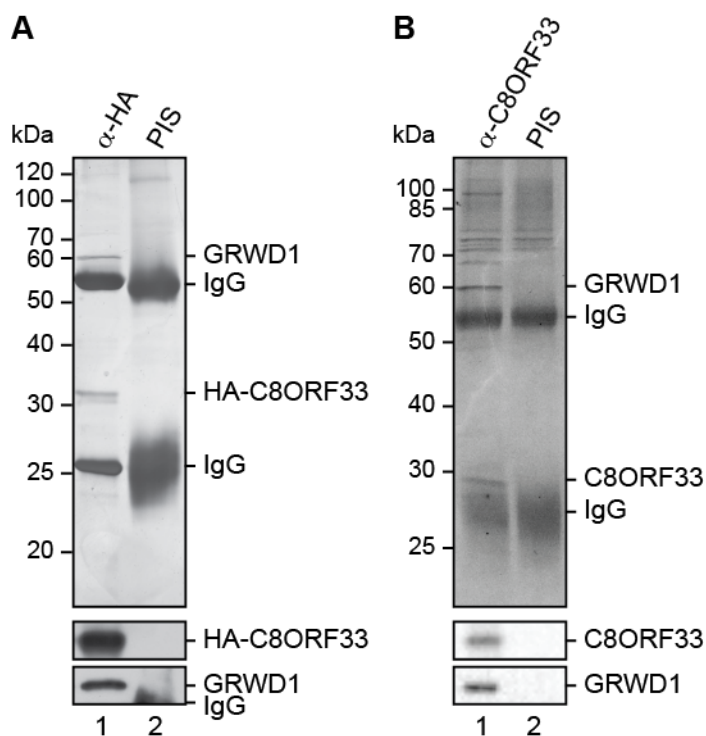


Abbildung 25: C8ORF33 interagiert mit GRWD1.

(A) Aus Zellextrakt von HA-C8ORF33-überexprimierenden Zellen wurde eine IP mit α -HA-Antikörpern durchgeführt (Spur 1). Zur Kontrolle der Spezifität erfolgte eine IP mit Präimmunserum (Spur 2). (B) IP aus HEK293-Zellextrakt mit α -C8ORF33-Antikörpern (Spur 1) und Präimmunserumkontrolle (Spur 2). Kopräzipitierte Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung (A oben) oder Coomassiefärbung (B oben) detektiert. Unten: Western-Blot Analyse der Immunpräzipitation.

(Abbildung 25A). Zur Identifizierung dieses Interaktors wurde die Immunpräzipitation massenspektrometrisch analysiert. Diese Analyse identifizierte GRWD1 als möglichen Bindungspartner von C8ORF33. Erste Daten deuten daraufhin, dass GRWD1 (*glutamate-rich WD repeat containing 1*) einen positiven Faktor der Ribosomenbiogenese darstellt (339, 365). Diese Vermutung wird durch die Homologie zum Hefeprotein Rrb1p, einem beschriebenen Ribosomenbiogenesefaktor, weiter gestützt (367-369). Eine Western-Blot Analyse der C8ORF33-Immunpräzipitation mit α -GRWD1-Antikörpern bestätigte die Koreinigung von GRWD1 mit C8ORF33 (Abbildung 25A). Eine

Immunpräzipitation von endogenem C8ORF33 mithilfe von α -C8ORF33-Antikörpern verifizierte die Assoziation von C8ORF33 mit GRWD1 (Abbildung 25B). Um zweifelsfrei nachzuweisen, dass C8ORF33 und GRWD1 Teil eines gemeinsamen Komplexes in zellulären Extrakten sind, wurde eine reziproke Immunpräzipitation mit α -GRWD1-Antikörpern durchgeführt (Abbildung 26). Diese bestätigte die Interaktion von C8ORF33 mit GRWD1. Die oben beschriebenen Interaktionsstudien belegten somit eine Assoziation von C8ORF33 mit dem möglichen Ribosomenbiogenesefaktor GRWD1.

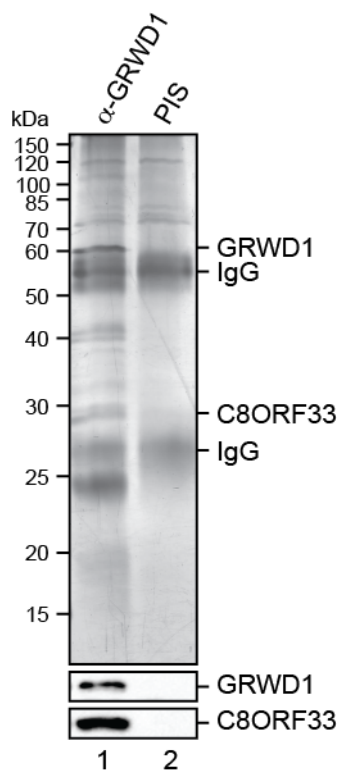


Abbildung 26: Verifizierung der Interaktion von C8ORF33 mit GRWD1.

Mit α -GRWD1-Antikörpern (Spur 1) und Präimmunserum (Spur 2) wurde eine Immunpräzipitation aus HEK293-Zellextrakt durchgeführt. Kopräzipitierte Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung detektiert (oben). Western-Blot Analyse der Immunpräzipitation zeigt die Interaktion von GRWD1 mit C8ORF33 (unten).

6.3.4.3 GRWD1 ist ein positiver Faktor der Ribosomenbiogenese

Während für Rrb1p, dem Hefehomolog von GRWD1, eine Rolle in der Ribosomenbiogenese durch genetische Studien eindeutig nachgewiesen werden konnte, gibt es für GRWD1 lediglich erste Hinweise, die auf eine Beteiligung an der Ribosomenbiogenese hinweisen (367-369). So wurde GRWD1 in einem Hochdurchsatzscreen als möglicher Ribosomenbiogenesefaktor identifiziert und eine Kosedimentation mit präribosomalen Partikeln in einer Dichtegradientenzentrifugation gefunden (339, 365). Daher sollte die Rolle von

GRWD1 im Kontext der Ribosomenbiogenese näher untersucht werden. Immunfluoreszenzstudien mit α -GRWD1-Antikörpern zeigten dabei eine Kolokalisation von GRWD1 mit dem Interaktionspartner C8ORF33 im Zellkern sowie in den Nukleoli, was eine Beteiligung von GRWD1 bei der Ribosomenbiogenese nahelegt (Abbildung 23B). Anhand eines metabolischen Markierungsexperiments sollte daher die mögliche Rolle von GRWD1 bei der Ribosomenbiogenese weiter analysiert werden. Die siRNA-vermittelte Depletion von GRWD1 führte dabei zu Defekten in der Biogenese der 60S ribosomalen Untereinheit verglichen mit den Kontrollzellen (persönliche Mitteilung Dr. Nick Watkins, Universität Newcastle upon Tyne, GB). GRWD1 wurde somit als positiver Faktor der Ribosomenbiogenese identifiziert.

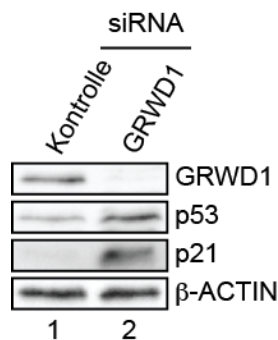


Abbildung 27: Die verminderte GRWD1-Expression resultiert in einer nukleolären Stressantwort.

Kontroll- (Spur 1) und GRWD1-siRNA (Spur 2) wurde in Zellen transfiziert und der daraus hergestellte Zellextrakt durch eine Western-Blot Analyse auf die Expression von p53 und p21 untersucht.

Die Ribosomenbiogenese stellt einen sehr komplexen Vorgang dar, dessen Störung häufig mit einer nukleolären Stressantwort einhergeht. Ein molekulares Kennzeichen dieser Antwort ist die Akkumulation des Tumorsuppressorgens p53. Hierdurch wird die Transkription von Genen, wie beispielsweise p21 gefördert, die Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren (358, 370-372). Da GRWD1 die Ribosomenbiogenese stimuliert, könnten Änderungen in der GRWD1-Expression ebenfalls zu einer nukleolären, p53-vermittelten Stressantwort führen. Um dies zu testen, wurde die Expression von GRWD1 durch siRNA-Transfektion vermindert. Zellextrakt von diesen Zellen wurde 72 Stunden nach der Transfektion mittels Western-Blot Analyse auf die Expression von p53 und p21 untersucht (Abbildung 27). Die verminderte Expression von GRWD1 resultierte in einer deutlich erhöhten Expression von p53 und p21 im Vergleich zu Kontrollzellen, die lediglich mit einer Kontroll-siRNA transfiziert wurden. Diese Daten belegen daher, dass die Inhibierung der

Ribosomenbiogenese durch eine verminderte GRWD1-Expression zu einer p53-vermittelten nukleolären Stressantwort führt.

6.3.4.4 C8ORF33 sequestriert GRWD1 in einem inhibitorischen Komplex

Das Vorliegen des stimulierenden Faktors GRWD1 in einem Komplex mit dem inhibitorischen C8ORF33 legt nahe, dass die Aktivität von GRWD1 durch die Bindung von C8ORF33 reguliert werden kann. Der GRWD1-C8ORF33-Komplex sollte daher durch eine Dichtegradientenzentrifugation weiter charakterisiert werden. Dazu wurden Zellen mit C8ORF33- und Kontroll-siRNA transfiziert und der Zellextrakt in einer Dichtegradientenzentrifugation über einen 10 %-30 % Glyceringradienten aufgetrennt. Das Sedimentationsverhalten von C8ORF33 und GRWD1 wurde durch Western-Blot der einzelnen Fraktionen untersucht. Hierbei zeigte sich eine Kosedimentation von C8ORF33 und GRWD1 in den Fraktionen 10 und 11 der Kontrollzellen (Abbildung 28A Reihen 1 und 3). Zusätzlich sedimentierte GRWD1 in den Fraktionen 7 bis 9, was auf einen weiteren, niedermolekularen GRWD1-Komplex hindeutet (Abbildung 28A Reihe 3). Verringert sich das C8ORF33-Expresionslevel durch eine siRNA-Transfektion, kommt es zu einer Verschiebung von GRWD1 in die Fraktionen 8 bis 10, also dem niedermolekularen Komplex (Abbildung 28A Reihen 3 und 4). C8ORF33 beeinflusst also das Sedimentationsverhalten von GRWD1. Deshalb wurde als nächstes der Effekt einer C8ORF33-Überexpression auf das Sedimentationsverhalten von GRWD1 untersucht. Dafür wurde in einer stabilen Zelllinie die Überexpression von FLAG/HA-C8ORF33 mit Tetracyclin induziert, während die Kontrollzellen uninduziert blieben. Zellextrakt dieser Zellen wurde erneut über eine Dichtegradientenzentrifugation aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. In den uninduzierten Zellen sedimentierte GRWD1 in dem niedermolekularen Komplex in den Fraktionen 7 bis 9 (Abbildung 28B Reihe 4). Die Überexpression von FLAG/HA-C8ORF33 führte zu einer Verschiebung von GRWD1 in den höhermolekularen Komplex in den Fraktionen 9 bis 11, was einer Kosedimentation mit C8ORF33 entspricht (Abbildung 28B Reihen 1 und 3).

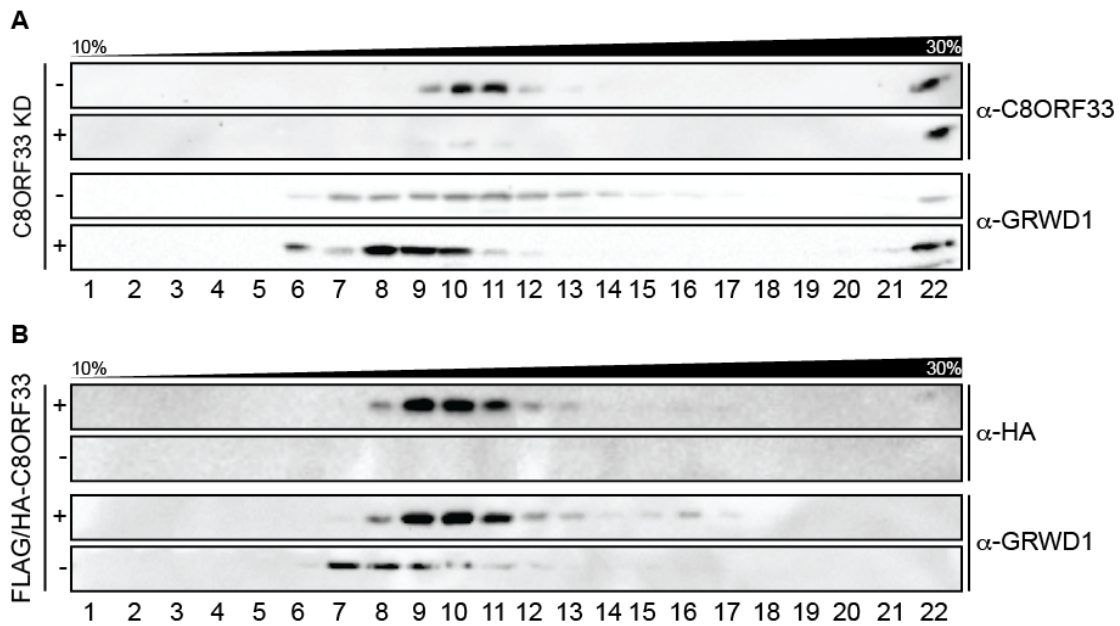


Abbildung 28: Sedimentationsverhalten von C8ORF33 und GRWD1.

(A) Zellen wurden mit siRNA gegen C8ORF33 (+) und Kontroll-siRNA (-) transfiziert und Zellextrakte hergestellt. Diese wurden durch eine Dichtegradientenzentrifugation über einen 10%-30% Glyceringradienten aufgetrennt und die Gradientenfraktionen mittels Western-Blot mit den angegebenen Antikörpern analysiert. (B) Dichtegradientenzentrifugation von Zellextrakt induzierter (+) und uninduzierter (-) stabiler FLAG/HA-C8ORF33-Zellen. KD: *knockdown*

GRWD1 liegt somit in zwei verschiedenen Komplexen vor: einem niedermolekularen sowie einem höhermolekularen, der C8ORF33 beinhaltet. Das Expressionslevel von C8ORF33 bestimmt dabei das Verhältnis der beiden GRWD1-beinhaltenen Komplexe. Die negative Wirkung von C8ORF33 auf die Ribosomenbiogenese beruht somit auf der Sequestrierung von GRWD1 in einem inhibitorischen Komplex.

6.3.5 Diskussion

6.3.5.1 C8ORF33 ist ein Ribosomenbiogenesefaktor

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das bis dahin uncharakterisierte Protein C8ORF33 funktionell analysiert. Bei diesem Protein handelt es sich um ein 25 kDa großes Protein, welches durch ein Gen auf dem humanen Chromosom 8 kodiert ist und keine bekannten Proteindomänen besitzt. Es war daher allein aufgrund der Primärsequenz kein biochemischer Prozess offensichtlich, in den C8ORF33 einzuordnen war. Die in dieser Arbeit durchgeführten zellbiologischen und biochemischen Daten haben klarmachen können, dass es sich bei diesem Faktor um eine Komponente der Ribosomenbiogenesemaschinerie handeln muss. Hierfür sprechen folgende Befunde:

1. Indirekte Immunfluoreszenzstudien zeigten eine eindeutige Lokalisation von C8ORF33 in Nukleoli, einer subnukleären Domäne, in der die initiale Phase der Ribosomenbiogenese stattfindet (Abbildung 23). Eine nukleoläre Lokalisation ist daher häufig indikativ für eine Beteiligung an der Ribosomenbiogenese.
2. Durch Immunpräzipitationen mit monospezifischen Antikörpern wurde das Protein GRWD1 als Interaktor von C8ORF33 gefunden (Abbildungen 25 und 26). Humanes GRWD1 wurde in einem Hochdurchsatzscreen als möglicher Ribosomenbiogenesefaktor identifiziert und für das Hefehomolog (Rrb1p) eine Rolle in der Ribosomenbiogenese eindeutig beschrieben (339, 365, 367-369).
3. Dichtegradientenzentrifugationen belegten, dass GRWD1 zwei definierte Komplexe in zellulären Komplexen ausbildet, von denen einer mit C8ORF33 kosedimentiert (Abbildung 28). Interessanterweise führt eine Überexpression von C8ORF33 zu einer vollständigen Sequestrierung von GRWD1.
4. Metabolische Markierungsexperimente konnten darüber hinaus zeigen, dass es sich bei diesem Protein um einen Faktor handelt, der die Ribosomenbiogenese beeinflusst (Abbildung 24). Diese Experimente machten auch deutlich, dass C8ORF33, im Gegensatz zu der Mehrzahl der bislang bekannten Ribosomenbiogenesefaktoren, inhibitorisch und nicht stimulatorisch wirkt.

Die oben zusammengefassten experimentellen Daten definieren somit C8ORF33 als einen Faktor, der sehr wahrscheinlich direkt in die Ribosomenbiogenese eingreift und diese verlangsamt.

6.3.5.2 Die Ribosomenbiogenese: Katalytische Faktoren und Zusammenlagerungschaperone

Die Ribosomenbiogenese steht aufgrund ihrer zentralen Bedeutung für die zelluläre Homöostase und des enormen Energieaufwands, der für diesen Prozess benötigt wird, unter der Kontrolle einer großen Anzahl von regulatorischen *trans*-agierenden Faktoren. Diese Faktoren beeinflussen die Biogenese auf unterschiedlichste Weise. Transkriptionsfaktoren wie RRN3 (*RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog (S.cerevisiae)*) oder TAF1D (*TATA box binding protein associated factor, RNA Polymerase I, D, 41 kDa*) rekrutieren die RNAP1 an den Promoter und werden für eine effiziente Transkription des rRNA-Vorläufers benötigt (373, 374). Prozessierungs- und Modifikationsfaktoren wie XRN2 (5'-3' Exoribonuklease 2) und EXOSC10 (*exosome component 10*) beziehungsweise die snoRNP-Komponente Dyskerin stellen dagegen sicher, dass die reifen rRNA-Moleküle für die Zusammenlagerung der ribosomalen Untereinheiten gebildet werden können (375-379). Neben den oben beschriebenen katalytischen Faktoren kennt man heute weitere Faktoren, die für die Zusammenlagerung des Ribosoms benötigt werden und daher Assemblierungsfaktoren beziehungsweise -chaperone im engeren Sinne darstellen. Hierzu gehören unter anderem Jjj1p (*J-protein (type III)*) und Zuo1p (Zuotin) (380).

Die oben beschriebenen Prozesse können alle durch posttranslationale Modifikationen hochreguliert werden, um die Ribosomenbiogenese mit dem zellulären Wachstum zu koordinieren. Ein übergeordneter Regulator ist zum Beispiel der mTORC1, der durch Phosphorylierung weiterer Regulatoren wie beispielsweise der S6 Kinase 1 RNAP1-Transkriptionsfaktoren aktiviert und so die Transkription des rRNA-Vorläufers steigert (381-385).

Der inhibitorische Effekt von C8ORF33 auf die Ribosomenbiogenese lässt vermuten, dass es sich in diesem Fall ebenfalls um einen regulatorischen Faktor handelt. Die Interaktion mit GRWD1 und das Verständnis über dessen Funktion lassen einen

neuen Wirkmechanismus möglich erscheinen, nämlich die Blockade eines stimulatorischen Faktors.

6.3.5.3 Hinweise auf die Funktion von C8ORF33 durch die Analyse von GRWD1

Einen wichtigen Befund bezüglich der Wirkungsweise von C8ORF33 in der Ribosomenbiogenese kam durch die biochemische Charakterisierung des humanen GRWD1. Dieses Protein weist ebenso wie C8ORF33 eine nukleoläre Lokalisation auf, was mit der gefundenen physischen Interaktion beider Proteine gut korreliert (Abbildung 23). Metabolische Markierungsexperimente beweisen darüber hinaus, dass GRWD1 eine stimulatorische Rolle auf die Biogenese der 60S-Untereinheit besitzt (Befunde erhalten in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Nick Watkins, Universität Newcastle upon Tyne, GB). Diese Entdeckungen stimmen mit den Daten über das Hefehomolog Rrb1p überein, welches die Biogenese der großen ribosomalen Untereinheit fördert (367). Aufgrund der Interaktion von Rrb1p mit dem ribosomalen Protein L3 (RPL3) wird angenommen, dass Rrb1p als Assemblierungschaperon und nicht als katalytischer Faktor wirkt (367, 368). Auch in einer Immunpräzipitation von GRWD1 konnte RPL3 massenspektrometrisch nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was einen ähnlichen Funktionsmechanismus für GRWD1 nahelegt.

C8ORF33 und GRWD1 bilden einen gemeinsamen Komplex, zeigen jedoch gegensätzliche Effekte auf die Ribosomenbiogenese. Die Daten sind somit konsistent mit einem Modell in dem die stimulatorische Aktivität von GRWD1 durch die Bindung an C8ORF33 blockiert beziehungsweise negativ reguliert wird. Somit wäre die inhibierende Wirkung von C8ORF33 auf die Ribosomenbiogenese eine Konsequenz der Inaktivierung des biogenesefördernden GRWD1-Proteins. Dieses Modell wird durch Dichtegradientenzentrifugationsstudien gestützt (Abbildung 28). Diese zeigten, dass GRWD1 in einem niedermolekularen und einem höhermolekularen Komplex sedimentiert, wobei C8ORF33 spezifisch nur mit dem höhermolekularen Komplex kosedimentiert. Die Überexpression von C8ORF33 sowie die siRNA-vermittelte Depletion belegten, dass das Expressionslevel von C8ORF33 das Sedimentationsverhalten von GRWD1 beeinflusst. So ist C8ORF33 in der Lage GRWD1 in den höhermolekularen Komplex zu sequestrieren. Der

inhibitorische Effekt von C8ORF33 beruht somit möglicherweise auf der Sequestrierung und damit der Inaktivierung von GRWD1 (Abbildung 29).

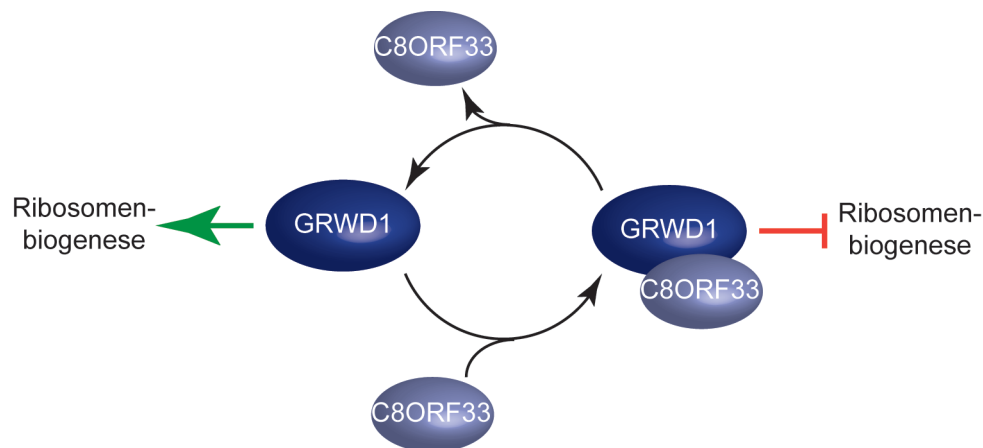


Abbildung 29: Modell zur Inhibition der Ribosomenbiogenese durch C8ORF33.

Die Bindung von C8ORF33 an GRWD1 führt zur Sequestrierung von GRWD1 in einen höhermolekularen Komplex. Dadurch kann GRWD1 die Ribosomenbiogenese wahrscheinlich nicht mehr stimulieren.

Dabei ist denkbar, dass die Interaktion von GRWD1 mit C8ORF33 weitere Interaktionen von GRWD1, die für die Stimulierung der Ribosomenbiogenese benötigt werden, ausschließt. Zum Beispiel könnte C8ORF33 mit RPL3 um die Bindung an GRWD1 kompetieren. Durch eine höhere Affinität oder ein höheres Expressionslevel verglichen mit den kompetierenden Faktoren könnte C8ORF33 GRWD1 so in einen inhibitorischen Komplex zwingen und die Ribosomenbiogenese negativ regulieren.

6.3.5.4 Die Regulation der Ribosomenbiogenese

Die Regulation der GRWD1-Aktivität durch C8ORF33 eröffnet der Zelle die Möglichkeit, die Ribosomenbiogenese zu unterdrücken und damit den zellulären Wachstumsbedingungen anzupassen. Während zahlreiche Faktoren bekannt sind, die die Ribosomenbiogenese fördern, gibt es nur wenige Beispiele für eine negative Regulation der Ribosomenbiogenese. Dabei handelt es sich vorwiegend um Mechanismen, die die Transkription des 47S prä-rRNA-Vorläufers inhibieren. Ein Beispiel dafür ist der eNOSC (*energy-dependent nucleolar silencing complex*)-

Komplex. Dieser wird durch RRP8 (*ribosomal RNA processing 8, methyltransferase, homolog (yeast)*) an die rDNA rekrutiert, was zu einer Deacetylierung und Methylierung des Histons H3 im Chromatin dieses Genlokus führt (386-388). Auf diese Weise kommt es zur Stilllegung der rDNA-Gene. Die Regulation der Ribosomenbiogenese durch den eNOSC-Komplex ist dabei abhängig vom Energiestatus der Zelle (386). Kommt es zu einer gesteigerten rRNA-Transkription, bindet RRP8 an die synthetisierte rRNA und kann dadurch den eNOSC-Komplex nicht mehr an die rDNA rekrutieren, wodurch die Transkription der rRNA nicht inhibiert werden kann (389). Unter Energiemangelbedingungen kommt es jedoch zu einer verstärkten Expression und Interaktion der Komplexkomponenten und somit zu einer Inhibierung der rRNA-Transkription (386, 390-392).

Ein weiterer Faktor, der die Ribosomenbiogenese negativ reguliert, ist das Tumorsuppressorprotein CDKN2A ARF (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A alternate open reading frame*). CDKN2A ARF inhibiert sowohl die Transkription als auch die Prozessierung der rRNA sowie den Export der Ribosomen (393-395). Dies geschieht durch vielfältige Mechanismen. So führt zum Beispiel die Bindung von CDKN2A ARF an Nucleophosmin, welches für die Ribosomenbiogenese benötigt wird, zu dessen Polyubiquitinylierung und damit zum Abbau (393). Außerdem inhibiert CDKN2A ARF die Sublokalisierung in den Nukleolus von TTF1 sowie DDX5 (DEAD-Box Helikase 5), welche die Transkription der rRNA fördern (396, 397). Zusätzlich zu CDKN2A ARF kann auch NPM3 (*nucleophosmin/nucleoplasm 3*) die Prozessierung der rRNA inhibieren (398). NPM3 interagiert dazu mit Nucleophosmin (398). Ähnlich wie für C8ORF33 wird auch hier ein Mechanismus diskutiert, der auf der Sequestrierung eines stimulatorischen Faktors, in diesem Fall Nucleophosmin, in einen inhibitorischen Komplex beruht (398). Die Inhibierung der Ribosomenbiogenese durch C8ORF33 zählt somit zu den wenigen Beispielen einer negativen Regulation auf posttranskriptioneller Ebene.

Die Ribosomenbiogenese stellt einen der energieaufwändigsten zellulären Prozesse dar. Es ist daher unerlässlich, dass sie den zellulären Wachstumsbedingungen angepasst werden kann. Durch die Unterdrückung der Ribosomenbiogenese stehen so unter Stressbedingungen die Energieressourcen einer Zelle anderen Prozessen zur Verfügung, die für das Überleben der Zelle entscheidend sind. Die Adjustierung der Ribosomenbiogenese an die Wachstumsbedingungen durch negative Regulierungsmechanismen ist daher unerlässlich für die Zelle.

6.3.5.5 GRWD1 und die nukleoläre Stressantwort

Die Komplexität eines Ribosoms verlangt eine hochkoordinierte Biogenese. Störungen der Ribosomenbiogenese resultieren daher in einer nukleolären Stressantwort (353-356). Dabei akkumuliert das Tumorsuppressorgen p53 in der Zelle und stimuliert dadurch die Transkription von Genen, die einen Zellzyklusarrest oder Apoptose induzieren (357, 358). Auch die Inhibierung der Ribosomenbiogenese aufgrund eines verringerten GRWD1-Expressionslevels führt zu einer erhöhten Expression von p53 sowie dessen Zielgen p21 und resultiert somit in einer nukleolären Stressantwort (Abbildung 27). Es ist daher denkbar, dass eine verminderte GRWD1-Expression Auswirkungen auf den Zellzyklus und damit die Zellproliferation hat oder gar zu Apoptose führen kann. Eine hinreichende Expression von GRWD1 ist somit unerlässlich um eine normale Proliferation der Zelle zu gewährleisten. Auch die Überexpression von C8ORF33 resultiert in Defekten in der Ribosomenbiogenese. Dies ist wahrscheinlich auf die Inaktivierung von GRWD1 zurückzuführen und könnte somit ebenfalls in einer p53-vermittelten nukleolären Stressantwort resultieren. Diese Möglichkeit bleibt durch Überexpressionsexperimente zu testen.

6.3.5.6 Ausblick

Mit der hier gezeigten Regulation der GRWD1-Aktivität durch C8ORF33 wurde ein neuer Mechanismus identifiziert, durch den die Ribosomenbiogenese negativ reguliert werden kann. Über die genaue Funktionsweise von GRWD1 in Bezug auf die Ribosomenbiogenese ist jedoch noch wenig bekannt. Basierend auf den Daten für das Hefehomolog Rrb1p könnte GRWD1 die Inkorporation von RPL3 in den präribosomalen Partikel fördern (367, 368). Die Identifizierung weiterer Bindungspartner von GRWD1 könnte zur Aufklärung der Rolle von GRWD1 in der Ribosomenbiogenese beitragen.

Während GRWD1 lediglich die Biogenese der 60S Untereinheit beeinflusst, betrifft der inhibitorische Effekt von C8ORF33 die Biogenese beider ribosomaler Untereinheiten (367). Damit könnte sich die Rolle von C8ORF33 in der Ribosomenbiogenese nicht nur auf die Regulation der GRWD1-Aktivität beschränken. Vielmehr ist denkbar, dass C8ORF33 darüber hinaus die Aktivität

zusätzlicher Faktoren reguliert. Die Identifizierung weiterer Bindungspartner von C8ORF33 sowie die Analyse des Effekts der C8ORF33-Interaktion auf die Aktivität dieser Faktoren könnte daher weitere Einblicke in die Regulation der Ribosomenbiogenese liefern.

Durch C8ORF33 kann die Aktivität von GRWD1 und somit die Ribosomenbiogenese negativ reguliert werden. Durch Änderungen der C8ORF33-Aktivität oder des Expressionslevels kann daher die Ribosomenbiogenese der zellulären Homöostase angepasst werden. Die Bedingungen, unter denen es zu einer vermehrten C8ORF33-vermittelten Unterdrückung der Ribosomenbiogenese kommt, sind jedoch noch völlig unklar und sollten daher analysiert werden. Aufgrund des verringerten Bedarfs an Ribosomen sind dabei vor allem Bedingungen, die mit einer verminderten Proliferation und damit einer verminderten Proteinsyntheserate einhergehen, näher zu untersuchen.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Der Lebenszyklus einer eukaryotischen mRNA	3
Abbildung 2:	Schematische Darstellung von mRNA-Bindedomänen	9
Abbildung 3:	Domänenstruktur der humanen LARPs	12
Abbildung 4:	Kristallstruktur des La-Moduls des humanen La-Proteins	13
Abbildung 5:	LARP4B bindet RNA <i>in vivo</i>	18
Abbildung 6:	Abgleich der Sequenzen mit dem humanen Genom	20
Abbildung 7:	Reproduzierbarkeit des PAR-CLIP-Experiments	21
Abbildung 8:	Validierung der PAR-CLIP-Daten durch RIP-PCR	22
Abbildung 9:	RIP-PCR des endogenen LARP4Bs	23
Abbildung 10:	Verteilung der LARP4B-Bindecluster auf der mRNA	24
Abbildung 101:	LARP4B <i>in vitro</i> Bindungsstudien	27
Abbildung 12:	mRNA-Polysomenverschiebung	28
Abbildung 13:	Effekt von LARP4B auf das mRNA-Level	29
Abbildung 14:	Stabilisierung der mRNA durch LARP4B	30
Abbildung 15:	LARP4B stimuliert die Expression der Ziel-mRNAs	31
Abbildung 16:	Vergleich der RIP-PCRs von LARP4B, LARP4 und LARP1	33
Abbildung 17:	Expressionsanalyse von LARP4B, LARP4 und LARP1	34
Abbildung 18:	Regulation des Expressionslevels von LARP4B, LARP4 und LARP1	34
Abbildung 19:	Luciferase-basierende Reporteranalysen	35
Abbildung 20:	Vergleich der Aminosäuresequenz der humanen La-Motive	40
Abbildung 21:	Regulation der posttranskriptionellen Genexpression durch LARP4B	42
Abbildung 22:	Prozessierung der rRNA	133
Abbildung 23:	C8ORF33 und GRWD1 lokalisieren in Nukleoli	137
Abbildung 24:	C8ORF33 ist ein Inhibitor der Ribosomenbiogenese	138
Abbildung 25:	C8ORF33 interagiert mit GRWD1	139
Abbildung 26:	Verifizierung der Interaktion von C8ORF33 mit GRWD1	140

Abbildung 27: Die verminderte GRWD1-Expression resultiert in einer nukleolären Stressantwort	141
Abbildung 28: Sedimentationsverhalten von C8ORF33 und GRWD1	143
Abbildung 29: Modell zur Inhibierung der Ribosomenbiogenese durch C8ORF33	147

8 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celcius
∞	unendlich
40S	kleine ribosomale Untereinheit
4SU	4-Thiouridin
60S	große ribosomale Untereinheit
6SG	6-Thioguanosin
80S	translationsaktives Ribosom bestehend aus 40S und 60S
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid
AG	Arbeitsgruppe
AgNO ₃	Silbernitrat
ANXA2	Annexin A2
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-reiches Element
ASH1	<i>absent, small, or homeotic discs 1</i>
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AUF1	<i>AU-rich element RNA binding factor 1</i>
AUF1	<i>AU-rich element RNA binding protein 1</i>
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin (engl.: <i>bovine serum albumin</i>)
bzw	beziehungsweise
C-terminal	Carboxy-Terminus
C8ORF33	Chromosom 8 offenes Leseraster 33
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
CBC	<i>cap-binding complex</i>
CDKN2A ARF	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 2A alternate open reading frame</i>
cDNA	komplementäre DNA (engl. <i>complementary DNA</i>)
CDS	kodierende Sequenz (engl.: <i>coding sequence</i>)

Ci	Curie
CKB	<i>creatine kinase, brain</i>
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CTD	C-terminale Domäne
CTP	Cytosin-5'-Trisphosphat
CWC22	<i>CWC22 spliceosome-associated protein</i>
d	desoxy
dd	Doppelt destilliert
DDX5	DEAD-Box Helikase 5
DDX6	DEAD-Box Helikase 6
Del	Deletion
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMP	Dimethylpimelimidat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEF2	eukaryotischer Translationselongationsfaktor 2
eIF4AIII	<i>eukaryotic initiation factor 4A3</i>
eIF4E	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4E
eIF4F	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4F
eIF4G	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor 4G
EJC	<i>exon-junction complex</i>
ELAVL	<i>embryonic lethal, abnormal vision, drosophila-like</i>
EMSA	<i>Electromobility Shift Assay</i>
engl.	englisch
eNOSC	<i>energy-dependent nucleolar silencing complex</i>
<i>et al.</i>	und andere (lat.: <i>et alterae</i>)
ETS	<i>external transcribed spacer</i>

EXOSC10	<i>exosome component 10</i>
EXOSC3	<i>exosome component 3</i>
FBS	<i>Fetal bovine serum</i>
FDR	<i>false discovery rate</i>
FF	<i>firefly</i>
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
for	<i>forward</i>
g	Gramm
GB	Großbritannien
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GLO1	Glyoxalase I
GNB2L1	<i>guanine nucleotide binding protein, beta polypeptide 2-like 1</i>
GRWD1	<i>glutamate-rich WD-repeat 1</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₃ BO ₄	Borsäure
HA	<i>hemagglutinin</i>
HCl	Salzsäure
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HITS-CLIP	<i>High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking immunoprecipitation</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HuR	<i>human antigen R</i>
iCLIP	<i>individual-nucleotide resolution crosslinking and immunoprecipitation</i>
IgG	Immunglobulin G
Ins	Insertion
IP	Immunpräzipitation
IPTG	1-Isopropyl-beta-D-1-thiogalactopyranosid
IQR	Interquartilsabstand
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>

ITS	<i>internal transcribed spacer</i>
Jjj1p	<i>J-protein (type III)</i>
K ₂ HPO ₄	Kaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
K _d	Dissoziationskonstante
KD	<i>knockdown</i>
kDa	Kilodalton
KH-Domäne	<i>hnRNPK homology</i> -Domäne
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
KOAc	Kaliumacetat
KVF	kumulative Verteilungsfunktion
l	Liter
LARP	<i>La-related protein</i>
LB	Luria Bertani
LSA-Motiv	<i>La motif and S1 associated</i> -Motiv
M	Million
M	molar
m7G	N7-Monomethylguanosen
mA	Milliampere
MDa	Megadalton
MDM2	<i>mouse double minute 2 homolog</i>
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
miRNA	mikroRNA
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	millimolar
mmol	Millimol
MnCl ₂	Manganchlorid
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -RNA
mRNP	messenger-Ribonukleoproteinpartikel
mTORC1	<i>mammalian target of rapamycin complex 1</i>
N-terminal	Ammino-Terminus

Na ₂ CO ₃	Natriumcarbonat
Na ₂ HPO ₄	Natriumhydrogenphosphat
Na ₂ S ₂ O ₃	Natriumthiosulfat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NET	NaCl/EDTA/Tris
ng	Nanogramm
nl	Nanoliter
NLS	nukleäres Lokalisationssignal
nM	nanomolar
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
NOR	nukleolusorganisierende Regionen
NP-40	Nonidet P-40
NPM3	<i>nucleophosmin/nucleoplasmin 3</i>
NRE	nukleäres Retentionselement
nt	Nukleotid
NXF1	<i>nuclear RNA export factor 1</i>
OAZ1	<i>ornithine decarboxylase antizyme 1</i>
OD	optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
P	Phosphor
PAA	Polyacrylamid
PABPC1	<i>poly(A) binding protein, cytoplasmic 1</i>
PABPN1	<i>poly(A) binding protein, nuclear 1</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAIP1	<i>poly(A) binding protein interacting protein 1</i>
PAIP2	<i>poly(A) binding protein interacting protein 2</i>
PAN3	<i>PAN3 poly(A) specific ribonuclease subunit</i>
PAR-CLIP	<i>Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PDB	Protein Data Bank
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIS	Präimmunserum
pmol	Pikomol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PPIL1	<i>peptidylprolyl isomerase (cyclophilin)-like 1</i>
PRKAA1	<i>protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit</i>
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferasen
pSILAC	<i>pulsed stable isotope labeling with amino acids in cell culture</i>
pTEFb	positiver Transkriptionselongationsfaktor b
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	quantitative Echtzeit-PCR
RACK1	<i>receptor of activated protein kinase C1</i>
RAE1	<i>ribonucleic acid export 1</i>
RALY	<i>RALY heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
RbCl	Rubidiumchlorid
RBD	RNA-Bindedomäne
RBP	RNA-bindendes Protein
RCOR1	<i>rest corepressor 1</i>
rev	<i>reverse</i>
RGG-Box	Arginin-Glycin-Glycin-Box
RIOK2	RIO Kinase 2
RIP-PCR	RNA-Immunpräzipitation mit RT-PCR
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: <i>ribonucleic acid</i>)
RNAi	RNA-Interferenz
RNAP1	RNA Polymerase I
RNAP2	RNA Polymerase II
RNAP3	RNA Polymerase III
RNase	Ribonuklease
RNP1	<i>RNA-binding region 1</i>
RNP2	<i>RNA-binding region 2</i>
RPL11	ribosomales Protein L11
RPL3	ribosomales Protein L3
RPL5	ribosomales Protein L5

rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: <i>revolutions per minute</i>)
Rrb1p	regulator of ribosome biogenesis
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RRN3	<i>RRN3 RNA polymerase I transcription factor homolog (S.cerevisiae)</i>
rRNA	ribosomale RNA
RRP8	<i>ribosomal RNA processing 8, methyltransferase, homolog (yeast)</i>
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunde
S	Svedberg
SAT1	<i>spermidine/spermine N1-acetyltransferase 1</i>
SDHA	<i>succinate dehydrogenase complex, subunit A, flavoprotein</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl.: <i>sodium dodecyl sulfate</i>)
She2p	<i>Swi5p-dependent HO expression</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMA	spinale Muskelatrophie
snoRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein complex</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
SNRPB	<i>small nuclear ribonucleoprotein B and B1</i>
SV	Säulenvolumen
T4 PNK	T4 Polynukleotidkinase
TAF1D	<i>TATA box binding protein associated factor, RNA Polymerase I, D, 41 kDa</i>
Taq	<i>Thermo aquaticus</i>
TB	<i>terrific broth</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylenethyldiamin
TFB	Transformationspuffer
TFRC	<i>transferrin receptor</i>
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TNRC6A	<i>trinucleotid repeat containing 6A</i>
TOP	<i>5'-terminal oligopyrimidine tract</i>

TOP2A	Topoisomerase (DNA) II alpha
TOP3B	<i>topoisomerase (DNA) III beta</i>
Tris	Tris(Hydroxymethy)-aminomethan
tRNA	Transfer-RNA
TTP	<i>tristetraprolin</i>
U	Einheit (engl.: <i>unit</i>)
UCHL1	<i>ubiquitin carboxy-terminal esterase L1</i>
ÜE	Überexpression
UNRIP	<i>UNR interacting protein</i>
UsnRNP	<i>uridine rich small nuclear ribonucleoparticle</i>
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UTR	untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
vPAM	Variante des PABP-Interaktionsmotivs 2
W	Watt
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
WB	Western-Blot
x	-mal
XPO	Exportin 1
XPO6	Exportin 6
XRN1	5'-3' Exoribonuklease 1
XRN2	5'-3' Exoribonuklease 2
z. B.	zum Beispiel
ZFP36	<i>ZFP36 ring finger protein</i>
Zuo1p	Zuotin
α	anti
β	beta
γ	gamma
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

8.1.1 Nukleotidbasen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

8.1.2 Aminosäuren

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

9 Publikationen

Küspert M, Murakawa Y, Schäffler K, Vanselow J, Wolf E, Juranek S, Schlosser A, Landthaler M & Fischer U (2014) LARP4B contacts a specific set of mRNAs and influences their expression. *Manuskript in Vorbereitung*.

Küspert M, Schor R, Amend M, Schlosser A, Watkins N & Fischer U (2014) C8ORF33 is a negative regulator of eukaryotic ribosome biogenesis. *Manuskript in Vorbereitung*.

Bommert KS, Effenberger M, Leich E, **Küspert M**, Murphy D, Langer C, Moll R, Janz S, Mottok A, Weissbach S, Rosenwald A, Bargou R & Bommert K (2013) The feed-forward loop between YB-1 and MYC is essential for multiple myeloma cell survival. *Leukemia*. **27(2)**: 441-450.

10 Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die Dissertation

**Untersuchung zur Rolle des La-verwandten Proteins LARP4B im mRNA-
Metabolismus**

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Grade keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, November 2014

.....

Maritta Küspert

11 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Utz Fischer für die Überlassung des Projekts und die Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit.

Prof. Dr. Alexander Buchberger danke ich für die Übernahme des Zweitgutachens und Prof. Dr. Stefan Gaubatz als Prüfer des Promotionskolloquiums.

Ich danke Yasuhiro Murakawa und Dr. Markus Landthaler für die Hilfe mit dem PAR-CLIP-Experiment sowie der bioinformatischen Auswertungen. Mein Dank geht an Dr. Jens Vanselow und Prof. Dr. Andeas Schlosser für die massenspektrometischen Analysen und Dr. Elmar Wolf für die Hochdurchsatzsequenzierungen.

Bei Stefan möchte ich mich ganz herzlich für die Unterstützung und Hilfe, das stets offene Ohr und den unermüdlichen Versuch mir die Bioinformatik näherzubringen bedanken.

Mein Dank geht an die Kollegen des Lehrstuhls für Biochemie für die gute Zusammenarbeit und den Beistand besonders auch während schwierigen Phasen der Arbeit. Vor allem bei meinen Mitdotoranden möchte ich mich für die gute Zeit die wir, auch über die Arbeit hinaus, gemeinsam durchlebt und durchlitten haben bedanken. Ich hoffe wir haben noch so manche lustige Feier vor uns.

Speziell möchte ich mich bei den aktuellen und ehemaligen Laborkollegen aus B132 bedanken. Micheal für zahlreiche Hilfestellungen und die immer offene Türe auch nach dem Auszug aus B132. Ganz lieben Dank geht auch an Schnitti, Flo und Katrin für die gemeinsame Zeit und Zusammenarbeit im Labor. Vielen Dank Raissa und Mario für eure Mitarbeit. Ihr habt mir wirklich sehr geholfen!

Mein herzlichster Dank geht an alle diejenigen, die mich während der ganzen Zeit meiner Promotion unterstützt, ermutigt, motiviert und so manches Mal aufgemuntert haben.

Einen ganz besonderen Dank gebührt meinen Eltern und meiner Schwester Amelie für die ununterbrochene Unterstützung.

