



Identifizierung und Untersuchung TOP-mRNA - bindender Faktoren

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

vorgelegt von
Florian Amelingmeier
aus Würzburg, Deutschland

Heidelberg, 2022

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. Utz Fischer

Gutachter: Prof. Dr. Susanne Kramer

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Diese Doktorarbeit wurde angefertigt

in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Utz Fischer
am Lehrstuhl für Biochemie

der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Meinem Opa

“If you wish to make an apple pie from scratch, you must first invent the universe.”
— Carl Sagan

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	VIII
Summary	IX
1. Einleitung	1
1.1. Die Realisierung des genetischen Codes in Eukaryonten: Ein Überblick	1
1.1.1. Cap-abhängige Initiation der Translation.....	2
1.1.2. Regulation der eukaryotischen Translation	4
1.2. mTOR und Signaltransduktionswege	5
1.3. Translationsmechanismen der TOP-RNAs	8
1.4. Regulation der TOP-RNAs	10
1.4.1. <i>trans</i> -agierende Faktoren.....	10
1.4.1.1. TIAR / TIA-1.....	11
1.4.1.1.1. Struktur und Bindungseigenschaften von TIAR	12
1.4.1.1.2. Die Familie der La-Proteine	15
1.4.1.2.1. Larp1	17
1.4.1.2.2. Larp7	19
1.5. Zielsetzung	21
2. Ergebnisse	22
2.1. Studien zum Bindungsverhalten von TIAR an das TOP – RNA Motiv	22
2.1.1. Affinitätschromatographie identifiziert TIAR als spezifischen TOP-Bindefaktor	22
2.1.2. Die <i>in vitro</i> Translation eines TOP – Luziferase – Reporters wird durch TIAR inhibiert	24
2.1.3. Klonierung und Expression der TIAR Konstrukte.....	26
2.1.3.1. Bioinformatische Untersuchungen zur TIAR – Domänenstruktur	26
2.1.3.2. Expression und Aufreinigung der TIAR – Fragmente	28
2.1.4. Die Konstrukte hsT1-3, hsT2-3 und chTIAR1-3 binden an das TOP – Motiv.....	31
2.1.4.1. Konstrukt hsT1-3 bindet spezifisch an das TOP-Motiv von rps16 RNA	32

2.1.4.2. Konstrukt hsT1-3 bevorzugt das TOP-Motiv von rpL32 gegenüber dem von rps16	33
2.1.4.3. Die erste Base am 5'-Ende ist für die Bindung nicht essentiell	34
2.1.4.4. hsT2-3 bindet mit erhöhter Stabilität an längere Konstrukte	36
2.1.4.5. Konstrukt ctT1-3 bindet L32TOP	37
2.1.4.6. ctT1-3 bevorzugt längere Konstrukte	38
2.1.4.7. drT1-3 bindet an L32TOP	39
2.2. Identifizierung des Proteins 14-3-3ε mittels Affinitäts – und Anionen – Austauschchromatographie	41
2.3. Erörterung einer potentiellen Rolle von Larp1 bei der TOP response	45
2.3.1. Larp1 bindet spezifisch TOP-RNAs in gestarvten HEK 293-Zellen	45
2.3.2. Larp1 bindet spezifisch an das TOP-Motiv immobilisierter L32-5'UTR unter gestarvten Bedingungen	46
2.4. Untersuchungen zur Bindung von Larp7 und 7SK	48
2.4.1. Expression des Larp7 – Moduls	48
2.4.2. Bindungsstudien zum L7M mit diversen RNA – Oligomeren	49
2.4.2.1. Larp7 benötigt tRNA zur Bindung an eine U16-RNA.....	49
2.4.2.2. Das Larp7-Modul bindet an Stem Loop 4 der 7SK-RNA (7SK-SI4)	51
2.4.2.3. Heparin und Arginin erhöhen die Spezifität der RNA-Protein-Bindung	53
3. Diskussion	56
3.1. TIAR als TOP – interagierender Faktor	56
3.1.1. TIAR bindet <i>in vitro</i> direkt an das TOP-Motiv.....	56
3.1.2. Vergleich der ermittelten Bindungskonstanten mit Literaturwerten	57
3.1.3. RRM2 und 3 sind ausreichend für die RNA – Bindung	58
3.1.4. Der Einfluss der RNA – Oligomer – Länge auf die Bindungsaffinität zu TIAR deutet auf deren Kontrollfunktion hin.....	59
3.2. 14-3-3ε als TOP – interagierender Faktor	60
3.3. Larp 1 als TOP – interagierender Faktor	61
3.3.1. Ausblick: Larp1 und die TOP response	62

3.4. Ausblick: Erörterung des Einflusses putativ TOP – bindender Faktoren auf die Regulation der TOP – RNAs	63
3.5. Bindungsstudien zu Larp 7	65
3.5.1. Einfluss von Gesamt – tRNA auf die Bindung zwischen L7M und 7SK	66
3.5.2. Zugabe von Arginin beeinflusst das Bindungsverhalten von L7M und 7SK-SI4.....	67
4. Material und Methoden	71
4.1 Material	71
4.1.1 Längenstandards	71
4.1.1.1.DNA – Längenstandards	71
4.1.1.2. RNA – Längenstandards.....	71
4.1.1.3. Protein – Längenstandards.....	71
4.1.2. Puffer, Lösungen	72
4.1.2.1. Allgemeine Puffer	72
4.1.2.2. Puffer und Lösungen zur DNA – Analyse	72
4.1.2.3. Puffer und Lösungen zur RNA – Analyse	72
4.1.2.4. Puffer und Lösungen zur Protein – Analyse.....	73
4.1.2.5. Puffer und Lösungen zur Aufreinigung von Proteinen	75
4.1.2.6. Puffer und Lösungen für die Affinitätschromatographie.....	77
4.1.2.7. Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation	79
4.1.3. Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialen	79
4.1.3.1. Kits.....	79
4.1.3.2. Materialien und Medien für die prokaryotische Zellkultur	80
4.1.3.3. Materialien und Medien für die eukaryotische Zellkultur	80
4.1.4. Plasmide.....	81
4.1.5. Oligonukleotide	82
4.1.5.1. RNA- Oligonukleotide	82
4.1.5.2. DNA – Oligonukleotide	83
4.1.6. Antikörper	84

4.2. Methoden	86
4.2.1. Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren	86
4.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	86
4.2.1.2. PCR zur Amplifikation von DANN	86
4.2.1.3. DNA – Hydrolyse durch Restriktions – Endonukleasen	87
4.2.1.4. Dephosphorylierung linearisierter DNA – Plasmide	87
4.2.1.5. Ligation von DNA – Fragmenten.....	87
4.2.1.6. Transformation kompetenter Bakterienkulturen.....	88
4.2.1.7. Isolierung von Plasmid – DNA aus <i>E.coli</i> – Bakterien.....	88
4.2.1.8. RT – PCR zur DNA - Synthese mittels RNA – Templates	88
4.2.1.9. Agarose – Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA – Fragmenten	89
4.2.1.10. Aufreinigung von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen.....	89
4.2.1.11. Denaturierende RNA – Gelelektrophorese.....	89
4.2.1.12. Native RNA – Gelelektrophorese.....	89
4.2.1.13. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren	90
4.2.1.14. Phenolfällung von RNA.....	90
4.2.1.15. <i>In vitro</i> – Transkription	90
4.2.1.16. <i>In vitro</i> – Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter RNA.....	90
4.2.1.17. Radioaktive Markierung von RNA – Oligonukleotiden	91
4.2.2. Methoden zur Protein – Analyse.....	92
4.2.2.1. Denaturierende SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese SDS PAGE.....	92
4.2.2.2. Western Blot – Analyse	92
4.2.2.3. Coomassiefärbung von Proteinen nach SDS PAGE.....	92
4.2.2.4. Silberfärbung von Proteinen nach SDS PAGE	93
4.2.2.5. Flag – Immunpräzipitation von Flag – HA - Larp1 und interagierender RNA.....	93
4.2.2.6. Proteinpräzipitation aus der Phenolphase mit Aceton	94
4.2.2.7. Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA – Präzipitation).....	94
4.2.2.8. <i>In vitro</i> – Translation.....	94
4.2.2.9. Expression und Aufreinigung der TIAR – Konstrukte.....	94

4.2.2.10. Expression und Aufreinigung des Larp7 – Moduls (L7M)	96
4.2.3. Methoden zur Detektion von RNA – Protein – Interaktionen.....	97
4.2.3.1. <i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA)	97
4.2.3.2. UV - Crosslink – Assay	97
4.2.3.3. Biotin – Affinitätschromatographie	98
4.2.3.4. Tobramycin - Affinitätschromatographie	98
4.2.4. Methoden zur eukaryotischen Zellkultur	99
4.2.4.1. Wachstum und Passagieren eukaryotischer Zellen	99
4.2.4.2. Herstellung von Zellextrakten	99
5. Abkürzungsverzeichnis	101
5.1. Abkürzungsverzeichnis der Aminosäuren.....	107
5.2. Abkürzungsverzeichnis der Nukleotide	107
6. Abbildungsverzeichnis	108
7. Tabellenverzeichnis.....	110
8. Literaturverzeichnis	111
9. Danksagung	135
10. Erklärung	137

Zusammenfassung

Im Zellkern eukaryotischer Zellen werden Gene in mRNAs transkribiert, welche umfangreich prozessiert und aus dem Zellkern exportiert werden. Im Zytoplasma erfolgt die Translation der mRNAs in Proteine, ein Prozess, welcher viel Energie benötigt und daher mittels vielfältiger Mechanismen streng reguliert wird. Ein Beispiel hierfür stellt die Klasse der TOP-mRNAs dar, eine RNA-Spezies, welche hauptsächlich Transkripte von Genen umfasst, die selbst in die Translation involviert sind. Die prominentesten Vertreter dieser Klasse sind die Proteine der kleinen und großen ribosomalen Untereinheiten. TOP-mRNAs zeichnen sich durch ein gemeinsames Sequenz-Motiv am Anfang Ihrer 5'-UTR aus, welches aus einem Pyrimidinstrang besteht und unmittelbar nach dem Cap mit einem Cytosin beginnt. Dieses allen TOP-RNAs gemeinsame Motiv ermöglicht die zeitgleiche Translationskontrolle dieser RNA-Klasse. So kann die Translation der TOP-mRNAs unter Stressbedingungen wie z.B. Nährstoffmangel koordiniert inhibiert werden, wodurch Energie eingespart wird.

Bereits lange wird nach einem Regulator gesucht, der an dieses TOP-Motiv bindet und die koordinierte Regulation ermöglicht. Man kann sich hier einen Inhibitor oder auch einen Aktivator vorstellen. Verschiedene Proteine wurden bereits in Erwägung gezogen. In dieser Arbeit wurde das Protein TIAR mittels Massenspektrometrie als TOP-interagierender Faktor identifiziert und dessen Bindungseigenschaften mit dem TOP-Motiv durch Shift Assays untersucht. Hierbei konnten Minimalkonstrukte verschiedener Organismen sowie RNA-TOP – Sequenzen identifiziert werden, welche sich für Strukturanalysen eignen würden. Als weiterer TOP-interagierender Faktor wurde über verschiedene sequenzielle Reinigungsschritte das Protein 14-3-3ε identifiziert.

Weiterhin wurden die TOP-Motiv-bindenden Proteine LARP1 und LARP7 auf Ihre Bindungseigenschaften mit Ihren Zielsequenzen untersucht. Während gezeigt werden konnte, dass LARP1 einen inhibierenden Einfluss auf TOP-RNAs hat, wurde in weiteren Shift-Assays die Bindungseigenschaften von LARP7 mit 7SK untersucht, wobei ebenfalls ein minimales LARP7–Konstrukt sowie 7SK-Konstrukte für Strukturanalysen identifiziert werden konnten. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass verschiedene Substanzen wie tRNA und Arginin einen starken Einfluss auf die LARP7-7SK – Interaktion ausüben, welcher in weiteren Studien berücksichtigt werden sollte.

Summary

In the nucleus of eucaryotic cells, genes are transcribed into mRNA which are heavily processed and exported into the cytoplasm. There they are translated into proteins, a process requiring large amounts of energy so this process is strongly regulated. One example is the class of TOP RNAs consisting mainly of transcripts encoding for proteins involved in translation. Some well-known examples include the proteins of the large and small ribosomal subunits. TOP RNAs share a common motif at the start of their 5' UTR comprising a sequence entirely made of Pyrimidines immediately following the cap. This motif common to all TOP RNAs enables translational control of this class of RNAs in a timely coordinated manner. In this way, during conditions of stress like nutrient starvation, translation of TOP RNAs can be inhibited to save energy.

The search for a regulator which binds to the TOP motif and enables coordinated regulation started long ago. In principle the regulator could activate or inhibit translation. Different proteins have been considered to be the regulator so far.

In this thesis the protein TIAR was identified as TOP interacting factor using mass spectrometry. Its binding properties regarding the TOP motif have been evaluated using EMSA. RNA and proteins of different organisms were evaluated to identify minimal binding partner constructs for further structural analysis. Using different sequential purification approaches, the 14-3-3 ϵ protein was also identified as TOP binding factor.

Furthermore, the TOP binding proteins LARP1 and LARP7 and their target RNA sequences have been evaluated in regard to their binding properties. It could be shown that LARP1 has an inhibiting effect on translation of TOP RNAs. Using EMSA, minimal binding constructs of LARP7 and 7SK could be established which can be considered for further structural analysis. Also, it could be shown that certain substances like tRNA and Arginine influence the interaction of LARP7 and 7SK, an observation which should be considered in further experiments.

1. Einleitung

1.1. Die Realisierung des genetischen Codes in Eukaryonten: Ein Überblick

Während des Lebenszyklus eines Organismus laufen auf zellulärer Ebene eine Vielzahl komplexer Prozesse ab, um die Information seiner in der DNA kodierten Gene während der Genexpression in funktionale Produkte, nämlich RNAs oder Proteine, umzuwandeln (1). Ein Gen bezeichnet hierbei einen Abschnitt auf der DNA, der in eine RNA übersetzt wird (Transkription). Handelt es sich hierbei um eine Boten-RNA (messenger RNA, mRNA), so erfolgt bei Eukaryonten die Transkription durch die RNA-Polymerase II (2-5). mRNAs werden als Vorläufer-Moleküle (prä-mRNAs) gebildet und co- bzw. post-transkriptionell modifiziert und prozessiert. Hierbei werden z.B. Introns, d. h. Genabschnitte ohne funktionalen Code, durch Spleißen entfernt (6-11). Dies geschieht mit Hilfe des Splicesomes, welches wiederum durch Chaperone koordiniert und assembliert wird (12). Am 5'-Ende der mRNA wird eine *Cap*-Struktur, bestehend aus einem 7-Methylguanosin über eine 5'-5' – Phosphat-Diesterbindung angefügt, die die Ribonukleinsäure vor Abbau schützt und weitere Funktionen in späteren Phasen der Genexpression übernimmt (13-17). Das 3'-Ende der RNA wird poly-adenyliert und die reife mRNA wird schließlich in Form eines Ribonukleoproteinkomplexes (RNP) aus dem Zellkern transportiert (18-21), um im Zytoplasma der Zelle durch Ribosomen translatiert zu werden. Dieser Prozess, namentlich die Translation, wird durch eine Vielzahl von Mechanismen reguliert und ist Gegenstand dieser Arbeit.

Die eukaryotische Translation lässt sich in drei Teile gliedern: Initiation, Elongation und Termination. Während der Initiation wird die kleine (40S) und die große (60S) ribosomale Untereinheit des Ribosoms an das 5'-Ende der mRNA rekrutiert (22). Verschiedene Proteine, von denen einige in dieser Arbeit näher untersucht werden, greifen in diesen Schritt regulatorisch ein. Die Rekrutierung erfolgt in den meisten Fällen über das *Cap*, an das über einen Proteinkomplex die 40S-Untereinheit sowie ein RNP rekrutiert wird, der eine Initiator-tRNA transportiert (23-29). Diese tRNA ist mit einem Methionin beladen. Nach Bindung an die 40S-Untereinheit läuft der so entstandene Komplex an der 5'-UTR der RNA entlang (*scanning*), bis das Startcodon identifiziert ist (30, 31). Dort wird die 60S Untereinheit rekrutiert und das Ribosom beginnt mit der Translation. Alternativ zur *Cap*-Struktur kann die Translation über Strukturelemente wie IRES (*internal ribosome entry site*) erfolgen (32). Dies ist z.B. bei einigen Viren, aber auch bei diversen zellulären mRNAs von Bedeutung (33, 34).

Während der Elongationsphase bewegt sich das Ribosom in 3'-Richtung an der RNA entlang und verlängert die Peptidkette um die jeweils zum RNA-Codon passende Aminosäure. Diese wird in einem ternären Komplex an eine tRNA gebunden zusammen mit GTP und dem Elongationsfaktor eEF1A zunächst in die freie A-Seite des Ribosoms eingebunden (35, 36). Im Peptidyl-Transferase-Zentrum wird zwischen der gelieferten und einer bereits an der P-Seite vorhandenen Aminosäure eine Peptidbindung geknüpft und die Bindung mit der tRNA gelöst. Die nun freie tRNA rutscht weiter an die E-Seite, um das Ribosom zu verlassen, während die gelieferte tRNA mit der nun an die Peptidkette geknüpften Aminosäure an die P-Seite aufrückt. Diese Translokation wird durch den Elongationsfaktor eEF2 unterstützt (35, 37).

Wird ein Stop-Codon erreicht, erfolgt die Termination der Translation, welche im Wesentlichen aus der Peptidyl-tRNA-Hydrolyse und dem Ribosomen-Recycling besteht. Die Decodierung des Stop-Codons erfolgt über eRF1 (38). Hierbei wird der Effekt des „molekularen Mimikri“ genutzt, da eRF1 in seiner Struktur einer tRNA ähnelt (39). Der *release* Faktor bindet die GTPase eRF3 und aktiviert diese (40), was zur Stimulierung der Hydrolyse führt. eRF3 interagiert außerdem mit PABPC1 (*poly-A binding protein cytoplasmic 1*, im Folgenden PABP) (41), welches an den Poly-A-Schwanz der mRNA bindet und für den Brückenschluss mit dem Initiationskomplex verantwortlich ist (42). Dadurch wird das Ribosomenrecycling erleichtert, durch welches diese nach der Termination wieder an das 5'-Ende der mRNA geführt werden (43).

1.1.1. Cap-abhängige Initiation der Translation

Die Mechanismen der eukaryotischen Initiation der Translation, die im Folgenden aufgeführt werden, wurden von Pestova et al. in einem ausführlichen Review zusammengefasst (44 und Referenzen dort). Zur Initiation der Translation muss zu Beginn das Startcodon ATG identifiziert werden. Hierbei spielt das *Cap* der mRNA sowie deren 5'UTR eine wichtige Rolle (45). Es bildet sich zunächst ein 43S-Präinitiationskomplex (*Preinitiation Complex*, PIC), der aus einer ribosomalen 40S-Untereinheit sowie dem ternären Komplex (bestehend aus GTP-gebundenem eIF2 α sowie einer Methionyl-tRNA) zusammensetzt (46, 47). Die Bildung des PIC erfolgt mit Hilfe weiterer Initiationsfaktoren, nämlich eIF1, eIF5 und eIF3 (48-50).

Im nächsten Schritt wird der PIC an das 5'-Ende der mRNA rekrutiert. Dies erfolgt mit Hilfe des *Caps*, an das der eIF4F-Komplex bindet (51, 52). Dieser besteht aus den Faktoren eIF4E, der direkt an das *Cap* bindet, eIF4A, einer RNA-Helikase, und eIF4G, das als Gerüstprotein dient.

Der Kontakt wird über diesen Komplex sowie eIF3 und weiteren Faktoren (eIF4B, eIF4H, PABP) hergestellt. Durch die Bindung an PABP und damit an den PolyA-Schwanz der mRNA erfolgt die Bildung der *closed loop* - Struktur, wodurch die mRNA für die Initiation der Translation aktiviert wird (42). eIF4G ist hierbei maßgeblich an der Koordination und RNA-Bindung dieser Faktoren beteiligt. Im weiteren Verlauf beginnt der PIC die 5'UTR zu „scannen“, d. h. er bewegt sich an der 5'UTR entlang, bis das Startcodon gefunden ist (53). An diesem Prozess ist maßgeblich die Helikase eIF4A beteiligt, die die Entwindung etwaiger Sekundärstrukturen in der RNA bewerkstelligt, die beim *scanning*-Prozess hinderlich sein können (54-56). Im Rahmen der Translationsinitiation kann somit über Sekundärstrukturen in der 5'UTR die Proteinsynthese gehemmt werden; auch in anderen Phasen der Translation können derartige Mechanismen regulierend in die Proteinsynthese eingreifen. Außerdem können verschiedene Faktoren an die 5'UTR binden und die Translation ebenfalls unterbinden bzw. verlangsamen oder aber beschleunigen sowie initiieren.

Wurde das Startcodon vom 43S PIC identifiziert, interagiert es mit dem Anticodon der Initiator-tRNA durch Basenpaarung und der Scanning-Prozess ist beendet (57). Der GTPase-aktivierende Factor (GAP, GTPase activating factor) eIF5 bewirkt die Hydrolyse des eIF2 gebundenen GTPs und überführt es so in seine GDP-Form (58, 59). Nachdem andere Faktoren ebenfalls den PIC verlassen, wird über den Faktor eIF5B eine Bindung der 60S-Untereinheit an PIC bewerkstelligt, so dass ein translationskompetenter 80S-Initiations-Komplex entsteht (*Initiation Complex, IC*) (60, 61). Nach dessen Ausbildung kann die Elongationsphase der Translation beginnen.

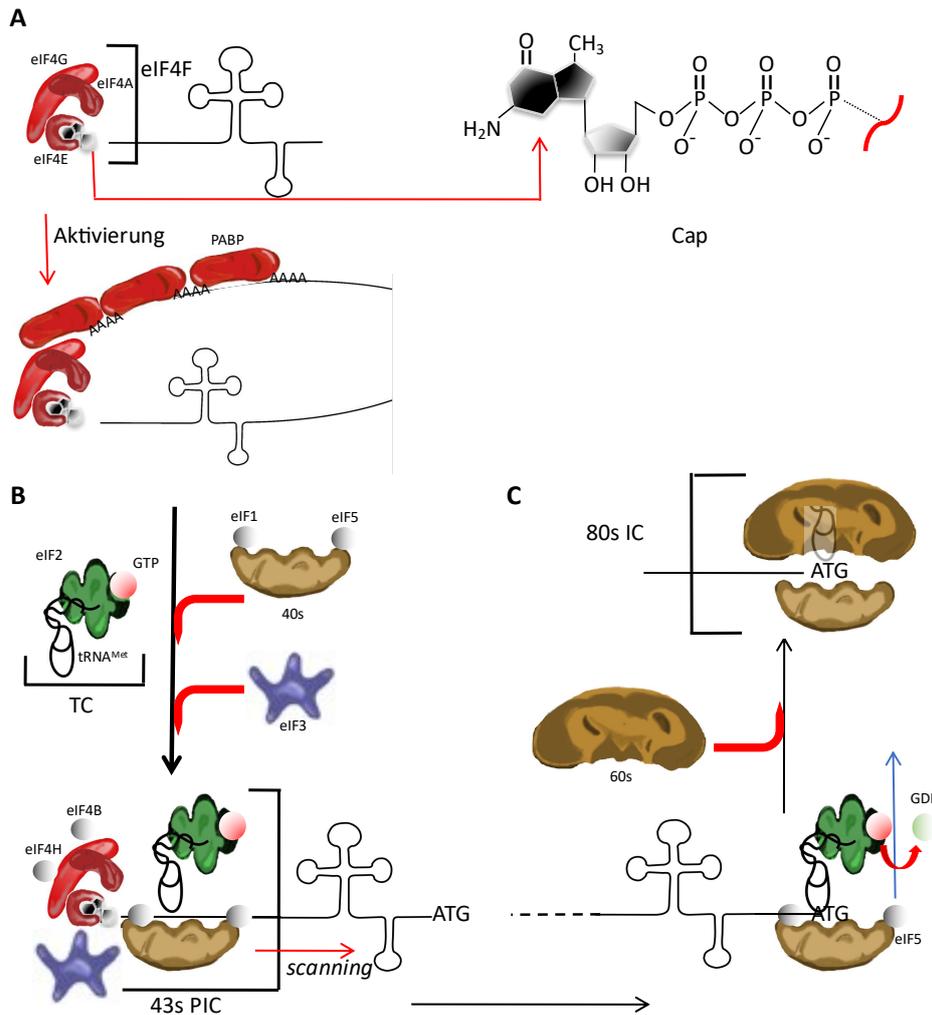


Abbildung 1: Initiation der Cap-abhängigen Translation. A) eIF4F-Komplex, bestehend aus eIF4E, eIF4G und eIF4A, gebunden an das Cap sowie dessen chemische Struktur. Durch Bindung an PABP erfolgt die Ausbildung einer „closed loop“-Struktur und somit die Aktivierung für die Translationsinitiation. B) Ausbildung des 43s PIC durch Hinzuziehen des TC, 40s und eIF3. Im Anschluss an die Formation erfolgt der *scanning*-Prozess. C) Nach Erreichen des Start-Codons erfolgt die Rekrutierung von 60s und damit die Ausbildung des 80s IC.

1.1.2. Regulation der eukaryotischen Translation

Da eine Zelle einen maßgeblichen Anteil ihres Energiehaushaltes für die Proteinsynthese aufwendet, ist es erforderlich, diese umfangreich unter Einbeziehung einer großen Anzahl an äußeren Faktoren und mit Hilfe zahlreicher Signalkaskaden zu regulieren. So geben z.B. Präsenz und Quantität einer Vielzahl von Nährstoffen entscheidende Signale für Zellzyklus, Wachstum und Proliferation (62-64). Äußere Faktoren wie Nährstoffe oder Wachstumsfaktoren werden über Rezeptoren erkannt, welche durch deren Bindung aktiviert werden und die zu übermittelnden Informationen über Signalkaskaden in geeignete zelluläre Reaktionen, z.B. die Expression spezifischer Gene, übertragen.

1.2. mTOR und Signaltransduktionswege

Die Kinase mTOR (*mammalian / mechanistic Target Of Rapamycin*) spielt in vielen Bereichen der Genexpression eine zentrale Rolle (65-67). In Bezug auf die Translation laufen an dem Enzym eine Vielzahl intra- und extrazellulärer Signale zusammen, die von der Kinase im Rahmen der globalen und spezifische Translationskontrolle umgesetzt werden. Die Zielproteine werden über mTOR durch Phosphorylierung an spezifischen Aminosäuresequenzen aktiviert bzw. inhibiert und beeinflussen dadurch wiederum durch Interaktion mit ihren Zielkomponenten regulatorisch verschiedene Schritte der Translation. Weiterhin wird mTOR selbst durch Phosphorylierung mittels anderer Kinasen aktiviert bzw. inhibiert. Auch in anderen Bereichen des Zellzyklus, wie z.B. der Transkription, übt mTOR auf diese Art Kontrollfunktionen aus (68).

Das Protein wurde zuerst in *Saccharomyces cerevisiae* entdeckt, wo es durch zwei Gene (TOR1 / TOR2) codiert wird (69, 70). In höheren Eukaryonten sowie in Säugetieren (71-73) existieren Homologe.

mTOR gehört zur Familie der PI3K – Kinasen. *In vivo* liegt mTOR in Form mindestens zweier Komplexe – mTORC1 und mTORC2 – vor, die sich vor allem in den Proteinen Raptor (mTORC1-spezifisch) und RICTOR (mTORC2-spezifisch) unterscheiden (74-76). Raptor ist abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus wichtig für die Aktivierung bzw. Inhibierung des Komplexes. Nur mTORC1 ist sensitiv gegenüber dem Immunsuppressivum Rapamycin, das inhibierend auf den Proteinkomplex wirkt (77-80). Dieses makrozyklische Lacton bindet einen intrazellulären Rezeptor namens FKBP12 (*FK506-binding protein 12kDa*), welcher wiederum unter bestimmten Umständen an mTOR bindet und inhibierend wirkt (81-84, 73).

Durch eine Kinase-Domäne in seiner C-terminalen Hälfte, welche der der Kinase PI3K ähnelt, ist mTOR zudem zur Autophosphorylierung fähig (85). Als rekombinantes Protein kann es zwei seiner Zielfaktoren, S6K und 4EBP1, *in vitro* phosphorylieren (86-88).

Der Komplex mTORC1 verarbeitet eine Reihe äußerer Signale wie Wachstumsfaktoren, Mitogene, Cytokine und Nährstoffe wie Aminosäuren (89-103). Auch intrazelluläre Faktoren wie der Energiestatus wirken auf die Kinase ein (104), die als Reaktion im Rahmen sogenannter Signalkaskaden wiederum diverse Phosphorylierungsreaktionen an Zielproteinen ausführt. Hierbei spielen eine Vielzahl von Rezeptorproteinen eine Rolle. Wachstumsfaktoren wie z.B. Insulin finden sich je nach Ernährungszustand in unterschiedlichen Konzentrationen im Blut.

Insulin wird an der Zelloberfläche von einer Rezeptor-Tyrosin-Kinase erkannt, woraufhin IRS1 (*Insulin Receptor Substrate 1*) an den Rezeptor rekrutiert und PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase) aktiviert wird (105, 106). Die darauffolgende Rekrutierung an die Plasmamembran sowie Aktivierung der Kinase Akt führt zur Phosphorylierung von TSC2, ein GAP (*GTPase activating protein*), das zusammen mit TSC1 den *tuberous sklerosis complex* TSC bildet (107). Dieser fungiert als GAP gegenüber Rheb. Im aktiven Zustand des TSC wird mTORC1 durch TSC2 inhibiert, da Rheb sich in seinem GDP-bindenden Zustand befindet (108). Durch Phosphorylierung von TSC2 durch besagte Signalkaskaden erfolgt eine Inhibierung des TSC und somit eine Aktivierung von mTORC1. Auch die 14-3-3 Proteine spielen eine wichtige Rolle bei der mTOR – Signalkaskade. Diese Proteinfamilie umfasst in Säugetieren sieben Isoformen ($\alpha - \eta$), welche in verschiedenen Zelltypen und Geweben unterschiedlich stark exprimiert werden (283) und an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt sind (284). In Bezug auf den mTOR – Signalweg konnte gezeigt werden, dass 14-3-3 β an TSC2 bindet und einen ternären Komplex mit TSC1 und TSC2 bildet, wodurch der Komplex in seiner Funktion inhibiert wird (285). Ist der Energiestatus (ATP-Level) der Zelle niedrig, wird durch AMPK neben TSC auch Raptor phosphoryliert, wodurch 14-3-3 mit Raptor interagiert und mTORC1 inhibiert, was zum Zellzyklusarrest führt (286). Als zentrale Schnittstelle ist die Kinase somit über die beschriebenen Mechanismen für die Integration diverser intra – und extrazellulärer Signale in die Regulation der Proteinsynthese verantwortlich.

Andere Modulatoren nutzen abweichende Signalwege, die bei TSC2 konvergieren und so mTORC1 regeln. Sauerstoff- und Glukoselevel wirken sich auf die AMP/ATP-Ratio aus, die Auskunft über den Energiestatus der Zelle gibt (109-112). Eine erhöhte Konzentration von AMP gegenüber ATP zeigt ein niedriges Energielevel an. Durch dieses Verhältnis wird die Kinase AMPK moduliert, die direkt TSC2 phosphorylieren kann. Die Aktivierung von mTORC1 durch Aminosäuren erfolgt am Lysosom (113-116). Hier interagiert der Komplex mit einem Rheb-Pool über den Gerüstekomplex Ragulator, der vier Rag-Proteine (RagA-RagD) rekrutiert (113). Deren GTP/GDP-Ratio wird über den Aminosäuregehalt der Lysosomen reguliert. Ist der Rag-Komplex durch ein ausreichend hohes Aminosäurelevel aktiv, erfolgt eine Rekrutierung von mTORC1 über Raptor an die lysosomale Membran, sowie die Aktivierung über den Rheb-Pool (117). Eine Übersicht über die beschriebenen Signalwege ist in Abbildung 2 gezeigt.

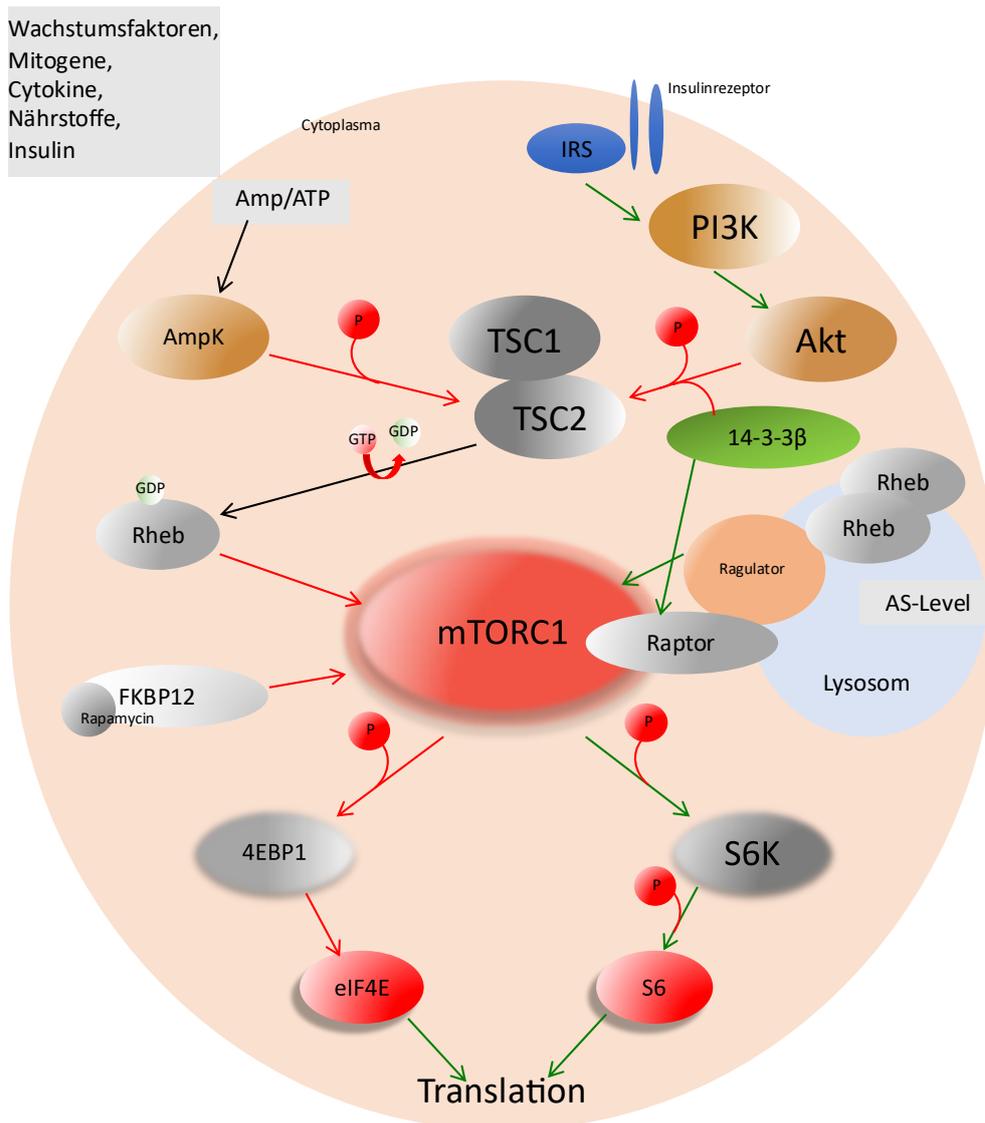


Abbildung 2: mTOR-abhängige Signaltransduktionswege. Extra- und intrazelluläre Signalegeber sind hell unterlegt. Der Pfad über PI3K und Akt ist beispielhaft anhand des Insulinrezeptors wiedergegeben. Die AMP/ATP – Ratio dient als induzierendes Beispiel für den AmpK-vermittelten Zweig. Die Transduktionen sind im Text beschrieben. Nicht dargestellt sind andere Effekte der mTOR-Induzierung wie z. B. Transkription.

mTORC1 ist vor allem für seine Rolle in der Translationsregulation bekannt, weshalb diesbezügliche Effektoren und Substrate Teil vieler Studien sind. Am besten untersucht ist das eIF4E-bindende Protein 4E-BP1 sowie die Kinasen S6k1 und S6k2 (118-121). 4E-BP1 bindet im phosphorylierten Zustand an eIF4E und konkurriert dabei durch überlappende Bindungsstellen um die Bindung mit eIF4G (122, 123). Die genannten Faktoren sind Teil des in Punkt 1.1.1. beschriebenen *Cap*-bindenden Komplexes eIF4F, der sich somit durch die Interaktion mit 4E-BP1 nicht zusammenlagern kann und in seiner Funktion inhibiert wird. 4E-BP1 enthält mehrere Phosphorylierungsseiten für mTOR und ist somit direktes Substrat (88).

Zwei Homologe des Proteins, 4E-BP2 und 4E-BP3 sind hinsichtlich der Translationsregulation weniger gut untersucht.

Die Kinasen S6K1 und S6K2 werden ebenfalls von mTOR phosphoryliert (118, 121) und haben mehrere Substrate, von denen in Bezug auf die Translationsregulation ein wichtiges das ribosomale Protein rps6 ist, eine Komponente der kleinen ribosomalen Untereinheit (124, 126). Es gibt Hinweise, dass die Phosphorylierung von rps6 zu einer Aktivierung der Translation führt, wobei die im Folgenden näher beschriebenen TOP-mRNAs eine zentrale Rolle spielen könnten (126).

1.3. Translationsmechanismen der TOP-RNAs

Die Synthese und Aufrechterhaltung der Translationsmaschinerie einer eukaryotischen Zelle verbraucht einen signifikanten Anteil der zur Verfügung stehenden Energie und unterliegt daher einer strengen Regulation (127). Eine große Zahl an Komponenten müssen im korrekten Verhältnis und zum richtigen Zeitpunkt synthetisiert werden bzw. in der Zelle vorliegen, um den reibungslosen Ablauf der Proteinsynthese zu gewährleisten. Je nach Bedarf kann somit die Produktion der für die Translation verantwortlichen Komponenten gesteigert oder gehemmt werden. Diese Regulation erfolgt auf Translationsebene als Antwort auf oben genannte intra- und extrazelluläre Einflüsse (127). Mangelt es z.B. an Energie oder anderen Faktoren, die für ein problemloses Wachstum oder für die Proliferation nötig sind, führt das zu einer hochkoordinierten zeitgleichen Hemmung des Syntheseapparates, um Energie einzusparen, die in solchen Situationen zur Überlebenssicherung der Zelle benötigt wird.

Eine Regulation des Proteinsyntheseapparates wurde zuerst an den mRNAs ribosomaler Proteine (*ribosomal protein RNAs*, rpRNAs) festgestellt, welche in Fibroblasten unter Stressbedingungen sowie abhängig vom Zellzyklus koordiniert in Polysomen oder Monosomen verschoben werden, wodurch ihre Translation verhindert wird (129). Das für die Regulation verantwortliche Element konnte in der 5'UTR der betroffenen mRNAs lokalisiert werden (130-140). Es handelt sich um ein RNA-Sequenzmotiv, das als „terminaler Oligopyrimidin-Trakt“ (*terminal oligopyrimidine tract*, TOP-Trakt bzw. TOP-Motiv) bezeichnet wird, nachdem es zunächst TLRE (*translational regulatory element*) genannt wurde (141). Ersetzte man bei mRNAs ribosomaler Proteine deren 5'UTRs durch die von β -Aktin bzw. fügte man das TOP-Motiv einer GAPDH-mRNA an, so verloren bzw. erwarben die resultierenden mRNAs die Fähigkeit zur Translationsregulation (141). Im Rahmen der Charakterisierung des

TOP-Motivs wurden zusätzlich zu den rpRNAs weitere Transkripte gefunden, die das Element besitzen (142). Bezeichnenderweise codieren die meisten der gefundenen TOP-mRNAs Faktoren, die selbst Komponenten der Translationsmaschinerie sind, wie z.B. eEF1A und PABP (143) oder auch eIF3e, eIF3F und eIF3H (144), RACK1 (145) und AUF1 (146). Auch nicht codierende Transkripte, die neben einem TOP-Motiv auch snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) in ihren Introns beherbergen, wurden entdeckt (147, 148).

Das Element ist in verschiedenen Vertebratengruppen sowie in Pflanzen konserviert, interessanterweise wurde es jedoch nicht in *Saccharomyces* gefunden (149, 157). Die Aktivität der TOP-RNAs wurde u. a. in *wheat germ extract* sowie in Eiern aus *Xenopus laevis* nachgewiesen und untersucht (149-156). Auch in Lysat aus *rabbit*-Retikulozyten funktioniert die TOP-response (156).

Die Klasse der TOP-mRNAs zeichnet sich durch mehrere gemeinsame Merkmale aus, von denen sich das wichtigste und namensgebende direkt an der *Cap*-Struktur befindet (127). In der Regel ist das erste codierte Nukleotid einer mRNA ein G oder A (128); TOP-mRNAs beginnen mit einem C, gefolgt von einem 4-14 Nukleotiden umfassenden Oligopyrimidin-Strang. Dieser ist, zusammen mit dem ersten C, notwendig und hinreichend für die Regulierung (140-143, 158). Wird diese Sequenz durch Purine unterbrochen oder das erste C durch eine andere Base ersetzt, ist die spezifische Translationskontrolle nicht mehr möglich (142). Auf die Pyrimidin-Sequenz folgt ein GC-reicher Strang, der ebenfalls wichtig für die Regulation zu sein scheint (142). Generell sind die 5'UTRs dieser mRNA-Klasse mit ca. 20-30 Basen eher kurz. Abbildung 3 zeigt schematisch den Aufbau der 5'UTR einer TOP-mRNA.



Abbildung 3: Elemente der 5'UTR einer TOP-RNA am Beispiel der rps16-mRNA. Als erste Base hinter dem *Cap* ist das C hervorgehoben. Der Pyrimidin-Trakt ist rot dargestellt. In der Regel folgt noch die hier schwarz dargestellte GC-reiche Region.

1.4. Regulation der TOP-RNAs

Aufgrund der Abundanz des TOP-Motivs als integraler Bestandteil der mRNAs des komplexen Translationsapparates wurden dessen Funktion sowie Interaktionspartner untersucht. Der Zusammenhang zwischen mTOR, S6K1/2 bzw. rpS6-Phosphorylierung und der spezifischen Inhibierung der TOP-mRNAs wurde durch Experimente mit Rapamycin aufgedeckt (159, 160). Rapamycin zeigte in lymphoiden Zellen eine selektive Inhibierung der Translation von TOP-RNAs. Diese Regulierung korrelierte mit dem Phosphorylierungsstatus von rpS6. Es wurde außerdem gezeigt, dass hierfür der intakte TOP-Trakt sowie die Kinase S6K/1 vonnöten sind, deren inaktive Form die Inhibierung verhinderte. Somit lag zunächst die Vermutung nahe, dass die Translation der TOP-RNAs vom Phosphorylierungsstatus von rpS6 abhängt, welcher über mTOR und S6K gesteuert wird. Diese wurde jedoch in weiteren Publikationen angezweifelt (161-163).

1.4.1. *trans*-agierende Faktoren

Nachdem das Element, das für die TOP-Antwort verantwortlich ist, gefunden war, stellte sich die Frage, wie die Regulierung mechanistisch erfolgt. Die Suche nach einem *trans*-agierenden Faktor, der an den Pyrimidin-Trakt bindet und regulierend wirkt, lieferte seitdem eine Reihe verschiedener potentieller Kandidaten.

Zu Beginn wurde als Regulator vor allem eIF4E diskutiert, da es ein phosphorylierbarer Faktor ist, dessen Expression mit der Translationseffizienz der TOP-RNAs korreliert (164-167). Dieser Initiationsfaktor wurde jedoch zunächst wieder verworfen (167). Es stellte sich heraus, dass die TOP-Antwort in Zellen, die eIF4E überexprimieren, genauso erfolgt wie in Kontrollzellen – die TOP-RNAs wurden trotz Überexpression gehemmt. Außerdem wirkten in einem *in vitro*-Translationssystem *Cap*-Analoga sowohl auf mRNAs mit als auch ohne TOP-Element kompetitiv. Erst sehr viel später konnte gezeigt werden, dass eIF4E zusammen mit 4E-BP1 und mTOR tatsächlich eine signifikante Rolle bei der Regulation der TOP-RNA-Translation spielen (168). Schon vorher wurden an der 5'UTR von mRNAs ribosomaler Proteine aus *Xenopus*-Eiern vier *trans*-agierende Proteine entdeckt, von denen zwei in der Pyrimidinregion binden (169). Diese wurden jedoch lediglich nach ihrer Größe charakterisiert; ob sie eine Rolle bei der Translationsregulation spielen, blieb zunächst unklar.

Die Frage, ob tatsächlich ein spezifischer Regulator existiert, wurde von Loreni und Amaldi geklärt (170). Hierfür wurden *Xenopus*-Zellen entweder mit einem Hitzeschock oder mit

Pactamycin behandelt, ein Antibiotikum, das inhibierend auf die Bindung zwischen dem Initiations-Komplex und der Initiator-tRNA wirkt und so die eukaryotische Translationsinitiation hemmt (171). Durch einen Hitzeschock wird diese ebenfalls gehemmt, und zwar durch Inaktivierung von eIF4E und eIF2 (172). Es zeigte sich, dass durch derartige Hemmung der Initiation TOP-RNAs nicht selektiv gehemmt werden, so dass auf einen spezifischen Regulator geschlossen wurde. Unklar war, ob es sich dabei um einen Translationsaktivator oder -repressor handelte.

Ein vielversprechender Kandidat als *trans*-agierender Faktor schien zunächst das La Protein, dessen *Xenopus*-Homolog im Komplex mit zwei weiteren Faktoren, CNBP und Ro60 Autoantigen, *in vitro* an das TOP-Motiv bindet (173-175). Zellkulturexperimente ließen zunächst eine translationsaktivierende Rolle von La vermuten, wodurch das Modell entstand, La wäre der Gegenspieler zu dem putativ inhibierenden CNBP (176). Dies wurde außerdem durch Experimente gestärkt, die zeigten, dass La in aktiv translatierenden Ribosomen mit TOP-RNAs assoziiert ist. (177). Andere Studien zeigten allerdings eine inhibierende Wirkung in *in vitro*-Translationssystemen (178). Im Lauf der Zeit wurden weitere Faktoren entdeckt, die im Zusammenhang mit der TOP-Regulierung (*TOP response*) stehen könnten, darunter neben weiteren Proteinen wie AUF1 (146) auch die miRNA 10a (179), deren Rolle jedoch nach wie vor unklar ist. Die Proteine TIA-1/TIAR, Larp1 und Larp7 sind vielversprechende Kandidaten, die im Folgenden näher erörtert werden.

1.4.1.1. TIAR / TIA-1

Das zytotoxische granula-assoziierte RNA-Bindeprotein TIA-1 wurde zuerst als 15kDa-Isoform in den Granula cytolytischer T-Lymphozyten entdeckt (180). Es stellte sich als diejenige Komponente heraus, die in zu lysierenden Zellen, also z.B. Virus-infizierten oder Krebszellen, für die DNA-Fragmentierung und somit den programmierten Zelltod (Apoptose) verantwortlich ist. Neben der 15kDa-Isoform wurde ein Protein von 40kDa und kurz darauf das Homolog TIAR gefunden. (180, 181). Die Faktoren gehören einer Klasse RNA-bindender Proteine an, die eine variierende Anzahl sogenannter RNA-bindender Domänen (*RNA recognition motif*, RRM) und carboxyterminal eine glutaminreiche Domäne besitzen, die z.B. für Protein-Interaktionen notwendig ist. TIA-1 und TIAR besitzen drei RRM (RRM1-3) und ihre C-terminale Domäne hat eine prionenähnliche Struktur (Abb. 4). Kawakami *et al.* charakterisierten ihre Struktur und Funktionsweise (181).

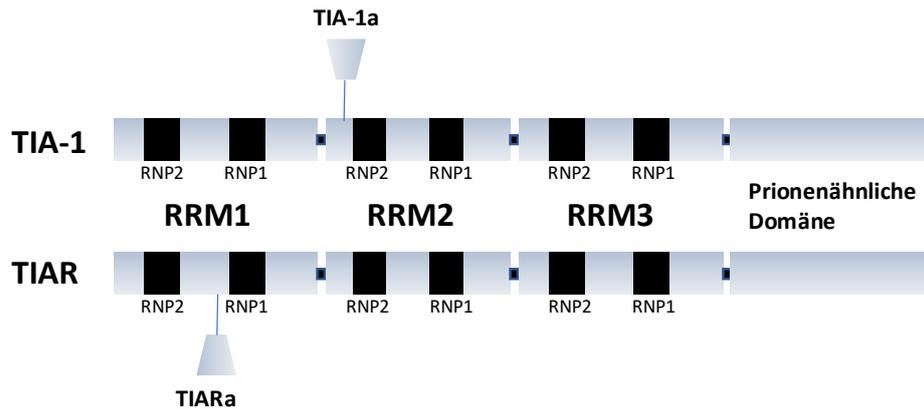


Abbildung 4: Schematische Darstellung der humanen Homologe TIA-1 und TIAR. Auf die Domänen RRM1 – RRM3 folgt am C-Terminus eine prionenähnliche Domäne. Durch Einfügen der gezeigten zusätzlichen Peptide TIA-1a und TIARa ergibt sich jeweils eine Isoform (modifiziert nach Anderson P. et al. 2002. Cell Stress Chaperones Apr;7(2):213-21 (182)).

Bevor eine wichtige Funktion der Proteine beim Spleißen evident wurde (183), stellte sich zunächst heraus, dass TIA-1 und TIAR eine zentrale Rolle im Zusammenhang mit der zellulären Stressantwort spielen (184). Hierbei bilden sie in Kombination mit anderen Proteinen sogenannte *stress granules* aus, die mRNAs sequestrieren und so deren Translation verhindern. Auf diese Weise wird gewährleistet, dass der Zelle genug Energie für Überlebensstrategien zur Verfügung gestellt wird. Später konnte gezeigt werden, dass TOP-RNAs eine der Hauptklassen an mRNAs sind, die durch TIAR inhibiert werden, wenn Zellen einem Aminosäuremangel ausgesetzt werden (185).

1.4.1.1.1. Struktur und Bindungseigenschaften von TIAR

Die Bindungseigenschaften der TIA-Proteine wurden in Hinblick auf Einzel-RRMs sowie verschiedene Kombinationen der RNA-bindenden Module in verschiedenen Arbeiten untersucht. Über ihre RRM-s können sowohl DNA als auch RNA gebunden werden (190) und es sind mittlerweile einige Zielsequenzen bekannt, die die vielfältigen Funktionen der Proteine bei der Transkription, dem Spleißen und der Translation widerspiegeln. Im Folgenden soll das bisher bekannte Bindungsverhalten der Module in Bezug auf verschiedene Nukleinsäuresequenzen erörtert werden.

Zur Identifizierung von Zielsequenzen wurden zu Beginn Selektions- und Amplifizierungsexperimente durchgeführt. Hierfür wurden die Proteine mit einem Pool von RNAs unbestimmter Sequenzen inkubiert. So wurde herausgefunden, dass Nukleinsäuren mit kurzen Uridylat-Sequenzen prominente Interaktoren der TIA-Proteine sind (186). Weiterhin

zeigten die Autoren, dass für diese Interaktion RRM2 notwendig und hinreichend ist. RRM1 und RRM3 alleine binden keine RNA, verstärken jedoch in Verbindung mit RRM2 deren Affinität. So konnte in „*filter binding assays*“ für eine TIAR-Trunkation, die alle drei RRMs umspannte, eine Dissoziationskonstante (K_D) von 20nM gegenüber einer K_D von 50nM der isolierten RRM2 festgelegt werden. Eine starke und spezifische Bindung der RRM2 konnte später durch Kuwasako *et al.* bestätigt werden, die in „*chemical shift perturbation experiments*“ die Affinität der isolierten Domäne an A-, C-, G- und U-RNA-Pentamere untersuchten und für die spezifische Uridin (U)-Pentamer-Bindung eine K_D von 30 μ M feststellten (187).

Auch das Bindungsverhalten der drei Domänen in Kombination wurde eingängig untersucht. Mittels isothermaler Titrations-Kalorimetrie (*isothermal titrtion calorimetry*, ITC) konnte die K_D eines entsprechenden Konstruktes für die Bindung an eine *splice site*-Sequenz der *fas* Rezeptor prä-mRNA, die eine natürliche Zielsequenz von TIAR ist, bestimmt werden (0,8 μ M) (188). Die Autoren konnten auch zeigen, dass es für die Bindung an ein U₂₀-RNA zwei verschiedene Bindungsstellen gab, deren Affinitäten sich beträchtlich voneinander unterschieden. Die K_D für die Bindung mit hoher Affinität lag bei 0,5nM gegenüber einer K_D von 240nM der zweiten Bindungsstelle. Die Bindungsstelle mit hoher Affinität wird zuerst besetzt und erst im Anschluss die Sequenz mit niedriger Affinität was überrascht, da ein U₂₀-Polymer keine unterschiedlichen Bindungsstellen aufweist. Laut Hypothese der Autoren ist dies dadurch zu erklären, dass TIAR zuerst einen längeren Strang an Uridinen besetzt und dann nur noch ein kleinerer Teil der Sequenz frei ist, der mit schwächerer Affinität gebunden wird. Dies erkläre auch die schwächere Bindung an die *fas*-Zielsequenz als an das U₂₀-Polymer. Interessanterweise konnten die Autoren zeigen, dass für die Bindung mit hoher Affinität RRM1 mitverantwortlich ist. Mutiert man diese Domäne oder verwendet ein Konstrukt, das nur die zentrale und die C-terminale Domäne umfasst, so bindet TIAR mit gleichbleibender niedrigerer Affinität an den U-Strang. Diese Erhöhung der Affinität gilt allerdings nur für U-Stränge; auf die Bindung an die *fas*-Site hatte RRM1 keinen Einfluss.

Auch andere natürliche Zielsequenzen wurden für die TIA-Proteine gefunden. Das West Nile Virus, ein Positivstrang-RNA-Virus und Vertreter der Flaviviren, enthält in der 3'UTR des Negativstrang-RNA-Genoms (welches zur Replikation gebildet wird) eine *Stem loop*-Struktur, an die TIAR und – wenngleich mit geringerer Affinität – TIA-1 binden. Auch hier wird bei beiden

Homologen lediglich RRM2 zur Bindung benötigt, wobei die K_D für TIAR RRM2 niedriger als für TIA-1 RRM2 ist (15nM gegenüber 112nM) (189).

Die Autoren nutzen eine Kombination aus verschiedenen Techniken (SIA, *Scaffold-Independent Analysis*, NMR und STD-NMR, *Saturation Transfer Difference NMR spectroscopy*), um aus verschiedenen 5mer-RNA-Oligos diejenigen mit der höchsten Affinität zu TIA-1-RRM3 herauszufinden und anschließend die K_D s zu bestimmen. Ein RNA-5mer mit der Sequenz ACUCC ergab die höchste Affinität mit einer K_D von 50 μ M. Ein OligoU-5mer wurde mit einer K_D von 140 μ M schlechter gebunden. Im Kontext mit TIA-RRM2 zeigte sich, dass RRM3 die Affinität signifikant erhöhte. Ein TIA-RRM2/3-Konstrukt bindet mit 18fach erhöhter Affinität an die RNA-Sequenz ACUCC und mit sechsfach höherer Affinität an den OligoU-Strang. Die Studie zeigte interessanterweise, dass auch ausschlaggebend für die Affinität war, welche Pyrimidine sich an welcher Stelle befanden. So wurde z. B. an dritter Stelle ein Uridin gegenüber einem Cytidin favorisiert. Auch die erste Base spielte eine Rolle, hier wurde ein „A“ gegenüber einem „G“ bevorzugt. So zeigt die Studie, dass TIA-1/RRM3 C-reiche RNA-Sequenzen favorisiert und die Affinität der RRM2 gegenüber diesen beträchtlich erhöht.

Bei weiteren Untersuchungen bezüglich der Bindung von RRM1 und RRM2 an U-reiche RNA bzw. T-reiche DNA wurde festgestellt, dass Reste auf der C-terminalen Seite von RRM2 eine signifikante Rolle bei der Bindung an ein U-17mer spielen (190). Hierfür wurden zwei die RRM2 umspannende Konstrukte verwendet, von denen eines C-terminal sechs Aminosäuren mehr umfasste als das andere. Die K_D s der Konstrukte betragen für die längere Version ca. 200nM und für die verkürzte RRM2 ca. 5 μ M, was eine signifikante Erhöhung durch die C-terminale Extension nahelegt. Auch die kurze RRM2 in Verbindung mit RRM1 zeigte mit einer K_D von ca. 1 μ M eine ca. fünffache Erhöhung der Affinität gegenüber der kurzen RRM2 alleine.

Interessante Einblicke in Konformationsänderungen diverser TIA-1-Module in Ab- und Anwesenheit von RNA ergab eine Studie von Sattler et al. (191). Hier wurden NMR, ITC und SAXS kombiniert, um Strukturen in Lösung zu evaluieren und das Bindungsverhalten an verschiedene RNAs herauszufinden. Es zeigte sich, dass die drei RRM-s ohne RNA unabhängig voneinander bewegbar sind und dass RRM2 und RRM3 bei Bindung an eine ihrer Zielsequenzen (hier *fas*-RNA) bzw. an ein OligoU-mer in einen starren und komprimierten Zustand übergehen. RRM1 spielt auch hier bei der RNA-Bindung eine untergeordnete Rolle. Auch in dieser Studie wurden Bindungsexperimente durchgeführt. Für die Bindung von RRM3

an ein U9-mer wurde durch NMR-Titrationsexperimente eine K_D von 30-5 μ M erhalten. Die Autoren erklärten die erhöhte Affinität dieser RRM im Vergleich zu vorigen Studien mit der Präsenz einer in ihren Konstrukten vorhandenen N-terminalen Helix, die zuvor missachtet wurde. Für die Bindung von RRM2 an das gleiche RNA-Konstrukt wurde eine K_D von ca. 35 μ M erhalten. Um K_D s für die Bindung an eine natürliche Zielsequenz zu erhalten, wurde ein RNA-16mer gewählt, das die Spleißseite der *fas*-prä-mRNA umspannt. Diese Sequenz umspannt einen 10 Nukleotide umfassenden Pyrimidin-Strang. Zu diesem Konstrukt wurde ein TIA-1-RRM2-3 - Modul titriert und zwei K_D s erhalten, nämlich 0,35nM und 27 μ M, was auf zwei Bindungsstellen schließen lässt. Titrations desselben Moduls zu einer U9-RNA ergab eine K_D von 7nM, so dass die bevorzugte Bindungsstelle an der *fas*-RNA eine ca. 10fach höhere Affinität gegenüber dem U9-Strang zeigte. Die Autoren schlossen dadurch entweder auf eine spezifische Zielsequenz in der *fas*-RNA, welche die Affinität erhöht oder auf unspezifische Aviditäts-Effekte. Um dies zu testen, wurde die *fas*-RNA auf den 10 Nukleotide umfassenden Pyrimidin-Strang begrenzt. Titration von TIA-1-RRM2-3 zu diesem RNA-Konstrukt ergab eine K_D von 17nM, die eher mit der von U9 vergleichbar ist, so dass Aviditätseffekte, basierend auf den unterschiedlichen Längen der Konstrukte, wahrscheinlicher für die Autoren schienen.

1.4.1.2. Die Familie der La-Proteine

Die Familie der La-Proteine spielt in vielen Bereichen des RNA-Metabolismus wichtige Rollen. Sowohl tRNA-Reifung als auch Transkription und Translation werden vom La-Protein bzw. seinen Abkömmlingen, den La-verwandten Proteinen (La-related Proteins, Larps) auf unterschiedliche Art reguliert (207). Das ursprüngliche La-Protein wurde als Autoimmunantigen im Zusammenhang mit den Krankheitsbildern des rheumatischen Formenkreises (z.B. Lupus erythematoses) entdeckt und daher als Lupus Autoantigen bezeichnet (192, 193). Zunächst wurde herausgefunden, dass es mit uridinreichen 3'-RNA-Sequenzen von PolIII-Transkripten assoziiert (194), woraufhin seine Funktion im tRNA-Metabolismus offengelegt wurde. Auch an der TOP-RNA-Translation scheint es beteiligt zu sein, indem es an den TOP-Trakt bindet (195). Verschiedene widersprüchliche Studien konnten jedoch nicht klären, ob es sich um einen Stimulator oder um einen Inhibitor der TOP-Response handelt (196-198) und unter welchen Bedingungen es seine regulierende Funktion ausübt. Eine weitere wichtige Rolle in der Translationsregulation spielt das Protein Larp4B, das einen stimulierenden Effekt aufweist (199). Die Proteine Larp1 und Larp7 erfüllen wichtige

Funktionen in der TOP-Response und der Transkription und werden im Folgenden näher erörtert.

Die La-Proteinfamilie wird durch ihre Struktur definiert und weist am N-Terminus eine La-Domäne (La-Motiv, LaM) auf, auf die eine RRM- bzw. RRM-ähnliche Domäne folgt (RRM1) (200). Am C-terminus befindet sich zumeist eine weitere RNA-Bindedomäne (RRM2) (204). Das La-Motiv bildet zusammen mit der RRM1 das La-Modul (N-terminale Domäne, NTD). Dessen Kristallstruktur, im Komplex mit einem neun Nukleotide umfassenden RNA-Oligomer mit 3'UUU-OH-Endung, wurde erfolgreich von Teplova *et al.* mit einer Auflösung von 1,85Å entschlüsselt (205) und ist in Abbildung 5 zu sehen. Interessanterweise bildeten in den Kristallen jeweils zwei NTDs mit je zwei RNA-Oligomeren einen Komplex, in dem die RNA-Stränge mit je fünf Nukleotiden eine Bindung eingehen. Die 3'-Enden blieben frei und tragen maßgeblich zur Ausbildung der RNA-Protein-Komplexe bei. Das LaM umfasst 85 Aminosäuren (AS 6-91) und RRM1 81 Reste (AS 107-188). Während das La-Motiv eine *winged helix*-Faltung ausbildet (200-202), in die drei weitere Helices inseriert sind, zeigt RRM1 eine Faltung mit für RNA-Bindedomänen typischer Topologie ($\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$) (203). Bezüglich seiner Bindungseigenschaften zeigt das LaM bei RNA-Kontakten ein untypisches Verhalten, da diese über die inserierten Helices geknüpft werden und nicht über die in die DNA-Erkennung involvierte Helix und Schleife (205). Auch RRM1 nutzt nicht, wie üblich, mehrere Reste der β -sheet-Oberfläche, sondern bindet lediglich mit dem Rest I140 an U8 des 3'-RNA-Terminus, dessen in der Fuge zwischen La-Domäne und RRM1 gelegenen drei Reste (U7, U8, U9) eine sonderliche Struktur einnehmen (205): U7 und U9 befinden sich in unmittelbarer Nähe zueinander, während U8 nach außen „gedrückt“ wird.

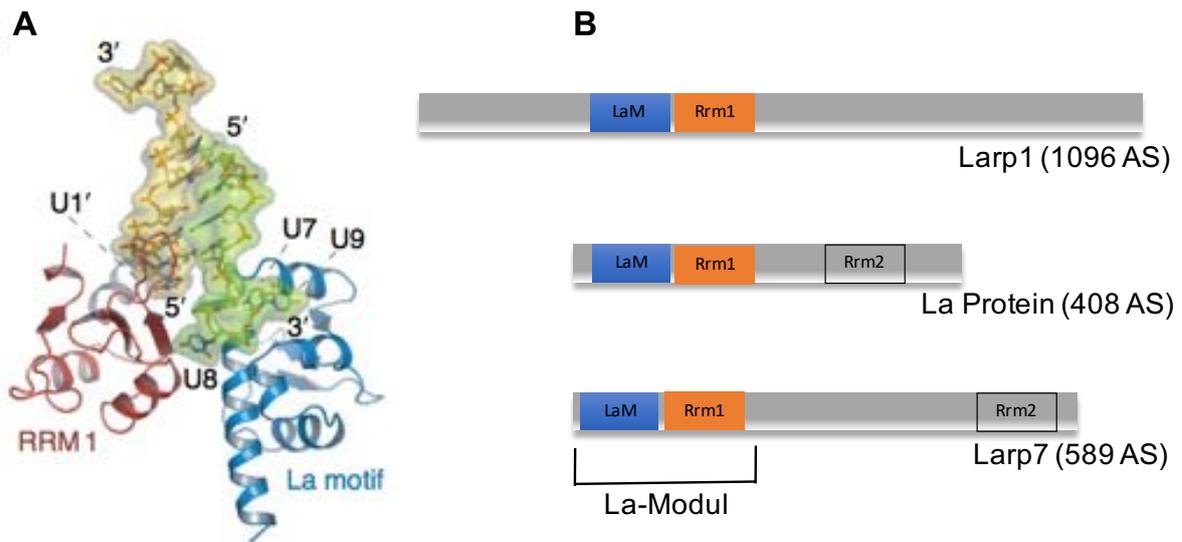


Abbildung 5: Strukturelle Aspekte von La, Larp1 und Larp7. A. Röntgenkristallstruktur des La-Moduls, gebunden an ein Nonamer, das in drei Uridinen (U7, U8, U9) und einer 3'OH-Gruppe endet. Dargestellt ist das LaM (*La motif*) sowie die RRM1 (Wiedergabe nach Curry S et al. 2006. Trends Biochem Sci. Jun;31(6):303-5 (206), mit Genehmigung von Elsevier). B. Darstellung der Proteine La, Larp1 und Larp7 mit Angabe ihrer Längen. Das La-Modul und die relevanten Domänen sind hervorgehoben.

Evolutionär betrachtet wird die Familie der La- sowie La- verwandten Proteine (*La related proteins*, Larps) durch das Vorhandensein der NTD definiert, wodurch sich verschiedene Subfamilien aus La-Homologen ergeben (207, 208). Während die NTD insgesamt hochkonserviert ist, kann man die benachbarte RRM in der RRM-Familie zugehörige (RRM1) und in RRM - ähnliche Domänen unterteilen. Der C-Terminus ist weitaus divergenter und eine (offensichtliche) RRM2 ist nicht immer vorhanden (208).

1.4.1.2.1. Larp1

Larp1 wurde zuerst in *Drosophila* beschrieben, wo es während der Entwicklung durch die Hox-Gene reguliert wird (209). Das Protein ist bis hin zu Wirbeltieren hochkonserviert und besitzt ein Ortholog in der Maus, das allerdings nicht mit Hox-Genen in Zusammenhang zu stehen scheint. Hier findet man es vor allem in neuronalen Strukturen und Organen während deren Entwicklung. Eine genauere Untersuchung zeigte, dass *Drosophila*-Larp1 (*dLarp1*) mit *dPABP* interagiert und somit eine Rolle während der Translation zu spielen scheint, wobei *dLarp*-Mutanten besonders relevante Einschränkungen im Verlauf der männlichen Meiose und der synzytialen Embryonalentwicklung zeigen (210). In *C. elegans* co-lokalisiert Larp1 mit *P-bodies* und bindet RNA (211). Die Rolle des Proteins in der Translation wurde weiterhin untermauert,

als gezeigt wurde, dass es neben PABP auch Interaktionen mit eIF4E sowie der ribosomalen Untereinheit 60S und auch 80S eingeht; außerdem führt ein *knock down* zur Verminderung der globalen Proteinsynthese (212).

Mit TOP-RNAs wurde Larp1 zum ersten Mal vom Team um Tohru Natsume in Verbindung gebracht, das durch proteomische Analyse, Immunpräzipitation und Massenspektrometrie zeigen konnte, dass Larp1 am 3'Ende von mRNAs, und zwar vorrangig von TOP-RNAs, bindet (213). Außerdem wurden diese RNAs durch Larp1 stabilisiert, was durch einen Larp1-*knock down* in HEK293-Zellen gezeigt wurde. In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass LARP1 mit mTOR sowie dem Cap von TOP-RNAs interagiert und deren Translation reguliert (214). Durch Saccharosegradienten-Zentrifugation wurde außerdem auch hier eine Poly- und Subpolysomenassoziation gefunden, wobei mTOR-Inhibierung eine Verschiebung von Larp1 in die Subpolysomen bewirkte. Die Interaktion mit PABP wurde bestätigt, ist jedoch nicht mTOR-abhängig. Außerdem wurde eine Interaktion mit Raptor gezeigt. Anhand von Larp1-depletierten Zellen wurde demonstriert, dass der Faktor für die Ribosomenassemblierung und somit aktive Translation notwendig ist, und zwar, obwohl die mTOR-Funktion nicht beeinträchtigt ist, was auf eine Funktion *downstream* von mTOR hindeutet. Depletion von Larp1 führte außerdem zu einer verminderten Ansammlung von TOP-RNAs in Polysomen, und TOP-RNAs assoziierten in Immunpräzipitationsexperimenten mit exo- und endogenem Larp1 im Vergleich zu Kontroll-RNAs verstärkt mit dem Protein, woraus geschlossen wurde, dass Larp1 spezifisch an TOP-RNAs bindet, über mTOR reguliert wird und für die aktive Translation der RNAs notwendig ist. Unklar ist allerdings, ob durch das Protein eine Stimulation oder eine Repression erfolgt und ob die Bindung spezifisch am TOP-Motiv stattfindet.

Eine direkte Interaktion mit dem Cap konnte schließlich durch Lahr et al. gezeigt werden (215). Die Autoren konnten anhand von Kristallstrukturen mit rps16 TOP-RNA zeigen, dass Larp1 über die c-terminale DM15 – Domäne direkt an das Cap der TOP-mRNAs bindet, wobei eIF4E bzw. der eIF4F-Komplex verdrängt wird. Letzteres wurde durch Competition assays zwischen eIF4E und der isolierten DM15-Domäne gezeigt. Interessanterweise stellte sich heraus, dass bei RNAs ohne TOP-Motiv das Gegenteil der Fall ist: Hier ist die Affinität von eIF4E zum Cap wesentlich höher als die der DM15-Domäne.

1.4.1.2.2. Larp7

Auch Larp7 wurde als Interaktor mit dem TOP-Motiv von Markert et al. beschrieben (216). Die Autoren fanden jedoch heraus, dass dieses Protein integraler Bestandteil eines an der Transkriptionsregulation beteiligten RNPs ist. Die kleine nichtkodierende RNA 7SK (*small noncoding RNA*, snRNA) bildet einen Komplex mit den Faktoren Hexim 1/2, wodurch sie einen inhibierenden Effekt auf pTEFb ausübt, ein positiver Transkriptions-Elongationsfaktor (217-224). Der Komplex wird durch die Bindung von Larp7 an das 3'-Ende der RNA stabilisiert (216). Die regulatorische Funktion basiert auf der Kinaseaktivität des Faktors pTEFB, der sich aus der Cyklin-abhängigen Kinase CDK9 sowie einer der beiden Isoformen Cyklin T1 bzw. Cyklin T2 zusammensetzt (225, 226). Am 5'-Ende von 7SK befindet sich ein Monomethyl-Cap, das durch MepCe angefügt wird (227, 228). Auch hnRNP K (229) sowie SR-Proteine (230) interagieren dynamisch mit dem Komplex.

Während pTEFB und andere Komponenten des Komplexes diesen temporär verlassen, ist Larp7 konstitutiv mit ihm verbunden (231). Die Sekundärstruktur von 7SK beinhaltet vier *stem loop*-Strukturen, wobei der am 3'-Ende befindliche (SI4) mit Larp7 assoziiert ist (Abb.6B) (216, 232). Abbildung 6A zeigt die Sekundärstruktur von 7SK. Auch in die HI-virale Transkription ist der Komplex verwickelt: Das TAR-Element, das die Kontrolle der viralen Transkription gewährleistet (233-235), ähnelt in seiner Struktur SI4 von 7SK, so dass der pTEFB-Komplex auch hier regulatorische Funktionen ausübt (236).

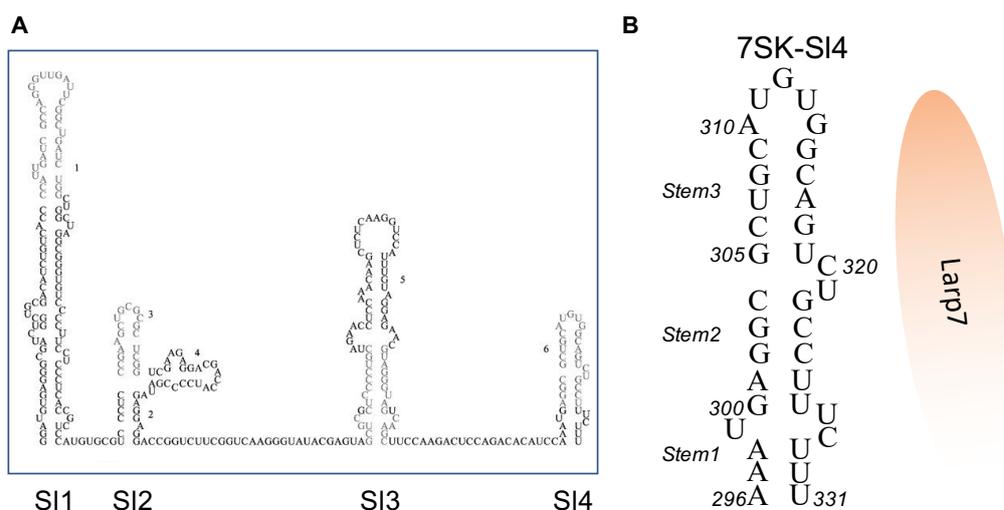


Abbildung 6: Sekundärstruktur der snRNA 7SK. A. Darstellung der Gesamtstruktur mit Fokus auf den vier *stem loops* SI1-SI4 (Wiedergabe nach Marz M. et al. 2009. Mol Biol Evol. Dec;26(12):2821-30 (249), mit Genehmigung von Oxford University Press). B. Sekundärstruktur des 7SK-SI4 (Modifiziert nach Durney M.A. et al. 2010. J Mol Biol. Dec 10;404(4):555-67 (236)) als putative Bindungsstelle von Larp7.

In zwei aktuellen Publikationen wurde außerdem eine Rolle von Larp7 bei der Modifikation der U6-snRNA (*small nuclear RNA*) etabliert (270, 271). Diese RNA ist innerhalb des U6 snRNPs neben den snRNPs U1, U2, U4 und U5 zentraler Bestandteil des Splicesosoms und am Spleißprozess der prä-mRNAs beteiligt (272, 273).

Die U6 snRNA wird während ihres Reifeprozesses stark modifiziert. Zwei dieser Modifikationen umfassen Pseudouridylierung und 2'-O - Methylierung im Nukleolus durch snoRNPs (small nucleolar RNPs) (274-276). Letztere Modifikation erfolgt durch das Enzym Fibrillarin, welches im Verbund mit Gerüstproteinen und einer *guide* RNA das Box C/D snoRNP bildet (277).

In Zusammenarbeit mit Gunther Meister und Mofang Liu konnte die Arbeitsgruppe um Utz Fischer zeigen, dass Larp7 eine zentrale Rolle bei der Ribose-2'-O - Methylierung der U6 snRNA spielt (270). Indem Larp7 mit U6 snRNA interagiert und so als Bindeglied den physischen Kontakt zu einem Subset von Box C/D snoRNPs herstellt, wird ein korrekt ablaufender Spleißprozess gewährleistet. In Larp7-depletierten Zellen wurden Methylierungsdefekte beobachtet, und bezeichnenderweise wurden auch Defekte in der 2'-O - Methylierung der U6 snRNA bei Geschwistern mit dem Alazami-Syndrom gefunden, welche eine Mutation des Larp7-Gens trugen. Die Krankheit wurde 2012 durch Alazami entdeckt, welcher als Ursache eine *Loss of function*-Mutation in Larp7 ausmachte (278). Das Syndrom geht u.a. mit Zwergwuchs und eingeschränkten intellektuellen Fähigkeiten einher.

Weiterhin konnten die Autoren in Zusammenarbeit mit Jian-Hua Yang zeigen, dass Larp7 auch in Mäusen während der Spermatogenese entscheidend für den Spleißprozess ist (271). Larp7 erleichtert die 2'-O - Methylierung der U6-snRNA, indem es das BOX C/D snoRNP mit dieser „belädt“ bzw. als Brückenfaktor den Kontakt herstellt. Auch hier verursacht eine Larp7-Depletion in der männlichen Keimbahn Defekte in der Methylierung und sowohl das Spleißen der prä-mRNAs als auch die Spermatogenese werden in ihrer Funktion eingeschränkt. Durch ektopische Expression von Larp7 (jedoch nicht einer mutierten Larp7-Variante) wurden diese Defekte behoben. Die Autoren konnten somit aufzeigen, dass Larp7 neben den bereits bekannten Funktionen eine zentrale Rolle während des Spleißvorgangs spielt und konnten einen kausalen Zusammenhang zwischen ihren Ergebnissen und den Ursachen des Alazami - Syndroms herstellen.

1.5. Zielsetzung

Die TOP-vermittelte Translationskontrolle ist nach wie vor, trotz zahlreicher entschlüsselter involvierter Faktoren, in vielerlei Hinsicht ungeklärt. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung weiterer TOP-bindender Faktoren sowie die biochemische Untersuchung in Hinblick auf deren Bindungsverhalten an das TOP-Motiv. Neben dem Protein 14-3-3 wurde mit TIAR ein weiterer TOP-bindender Faktor identifiziert und dessen spezifische Bindung an das TOP-Motiv sowie die minimal benötigten Proteinstrukturen erörtert. Für Larp1 wurde die Spezifität, Regulationsmodus sowie die Bedingungen zur Bindung an TOP-RNAs evaluiert, die bis dato noch nicht bekannt waren. So konnte gezeigt werden, dass die Bindung an das TOP-Motiv spezifisch unter Nahrungsmangel-Bedingungen erfolgt.

Zur Entschlüsselung der Struktur des Larp7-Moduls wurden außerdem zuvor benötigte Bindungsstudien mit der Zielsequenz SI4 der 7SK-RNA durchgeführt, wodurch ein zur Komplexbildung befähigtes Minimalkonstrukt für das Modul sowie für 7SK-SI4 identifiziert wurde.

2. Ergebnisse

2.1. Studien zum Bindungsverhalten von TIAR an das TOP-RNA Motiv

2.1.1. Affinitätschromatographie identifiziert TIAR als spezifischen TOP-Bindefaktor

TIA-1 sowie dessen Homolog TIAR wurden von Damgaard et al. (185) mit der *TOP response* in Verbindung gebracht. Die Autoren konnten zeigen, dass die Proteine für die Inhibierung der TOP-Translation unter Aminosäure-Mangel verantwortlich sind. Darüber hinaus wurde von der gleichen Gruppe gezeigt, dass unter diesen Bedingungen TOP-RNAs in *Stress granules* fixiert werden. Die für die Regulierung verantwortliche Region in *cis* begrenzten die Autoren auf die 5'UTR der TOP-RNAs. Der Nachweis einer Bindung direkt an das TOP-Motiv erfolgte jedoch nicht.

Um diese Bindung experimentell direkt nachzuweisen sowie die biochemischen Voraussetzungen einer Bindung von TIAR an das TOP-Motiv zu definieren, wurden zunächst mittels einer Affinitätschromatographie Proteine aus einem HEK293-Lysat identifiziert, die mit der rpL32-RNA-5'UTR interagieren. Hierfür wurden die am 3'-Ende mit Biotin versehenen RNAs an eine Streptavidinmatrix gekoppelt und mit Zellysate inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten erfolgte die Elution durch eine 6M Urea-Lösung. Als spezifischer RNA "Bait" wurde die rpL32-5'UTR mit intakter TOP-Sequenz verwendet, in einem parallel durchgeführten Kontrollversuch wurde ein RNA-Oligomer mit abgewandelter Sequenz gewählt. Über diese Strategie sollten sich somit Proteine identifizieren lassen, die selektiv an das TOP – Motiv binden. Nach Auftrennung durch ein SDS-Gel und anschließender Identifizierung der eluierten Proteine durch die Massenspektrometrie wurde TIAR als ein spezifisch an die TOP-RNA bindender Faktor identifiziert (Abb. 7A). Weitere identifizierte Proteine, die spezifisch mit dem TOP-Motiv interagieren und durch ihre Funktion im RNA-Metabolismus bzw. ihre Rolle in der Translation potentiell interessant erscheinen, sind in Tabelle 1 aufgezeigt.

Name	Masse (kDa)	Accession Number
DEAD box polypeptide 1 (DDX1)	75,4	gi 119621300
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein K (Hnrnp K)	47,5	gi 55958544
Y box binding protein-1 (YBX1)	35,4	gi 340419
Heterogenous nuclear ribonucleoprotein A0 (Hnrnp A0)	30,8	gi 5803036
splicing factor, arginine/serine – rich 1 (SF2/ASF)	25,6	gi 62088696

Tabelle 1: Weitere identifizierte Proteine, die spezifisch mit dem TOP-Motiv interagieren. Angegeben ist der Name, die Masse sowie die *Accession Number*.

Aufgrund der bereits bekannten Datenlage wurde im Folgenden das Augenmerk auf die TIA-Proteine gelegt. Zunächst wurde die spezifische Bindung dieses Faktors durch ein unabhängiges Western-Blot Experiment bestätigt. Hierzu wurde die Reinigung wiederholt und die Elutionsfraktionen im Western Blot mit Antikörpern gegen TIA-1 und TIAR evaluiert. Um zu untersuchen, ob sich ein Unterschied im Bindungsverhalten unter verschiedenen Bedingungen ergibt, wurden die Versuche einmal mit proliferierenden Zellen (*not starved, ns*) und parallel mit Zellen, die über einen Zeitraum von 6 Stunden unter Serummangel (*starved, st*) inkubiert wurden, durchgeführt (Abb. 7B). An die Tobramycin-Kontrollsäule band kein TIAR-Protein und konnte somit auch nicht im Western-Blot detektiert werden (Abb. 2.1B, Tobra – Elu Top / Mut). Über die Säulenmatrix, die das TOP-Motiv enthielt, ließ sich hingegen effektiv TIAR aus dem Zellextrakt isolieren, nicht jedoch durch die Kontroll-Säule mit mutierter RNA (Abb. 7B, Strepta-Elu Top / Mut). Ein Unterschied im Bindungsverhalten der TIAR-Proteine aus gestarvtem (*st*) gegenüber nicht-gestarvtem (*st*) Extrakt war bei diesem Experiment nicht feststellbar.

Die beschriebenen Experimente liefern Hinweise, dass TIAR in Zellextrakten eine spezifische Affinität zu TOP-RNA-Sequenzen zeigt. Diese scheint sich in gestarvten bzw. nicht gestarvten Extrakten nicht zu unterscheiden. Zusammen mit der vorhandenen Literatur (185, 237) erhärtet sich somit die Möglichkeit einer potentiellen Rolle der TIA-Proteine bei der TOP –

Response, wobei weitere Experimente nötig sind, um zu zeigen, ob die Interaktion in Verbindung mit bestimmten Bedingungen in der Zellumgebung (z.B. Nahrungsmangel) steht. Im Folgenden soll außerdem evaluiert werden, ob es sich bei TIAR um einen Translations – inhibierenden Faktor handelt.

2.1.2. Die *in vitro* Translation eines TOP – Luziferase – Reporters wird durch TIAR inhibiert

In den vorangegangenen Experimenten wurde eine spezifische Interaktion zwischen einer TOP – RNA und TIAR aus HEK293-Zell-extrakten mittels Chromatographie gezeigt. TIAR ließ sich aus den Zelllysaten spezifisch über eine mit dem TOP-Motiv versehene Biotin-RNA präzipitieren, nicht jedoch über eine Biotin-RNA ohne TOP-Motiv. In Bezug darauf, ob diese Interaktion in gestarvten bzw. nicht gestarvten Zellen stattfindet, konnte keine Aussage gemacht werden. Im ersten Fall würde die Interaktion auf eine inhibierende Rolle hindeuten, da die Translation der TOP-RNAs wie in der Einleitung beschrieben unterbunden wird. Sollte die Interaktion in aktiv proliferierenden Zellen stattfinden, so handelt es sich vermutlich eher um einen Faktor, der die Translation aktiviert.

Zur Evaluierung dieser Fragestellung wurden die im Folgenden beschriebenen *in vitro* – Translations-Assays in Retikulozyten-Lysaten aus Kaninchen durchgeführt. Das Lysat enthält alle aktiven Komponenten, die zur Translation nötig sind. Nach Zugabe der zu translatierenden RNA sowie ³⁵S-Methionin erfolgt die Translation des RNA-Reporters wtTOP-Renilla – Luciferase durch Inkubation bei 30°C (60min). Dieses Reporter-Plasmid enthält 5' des Luziferase-Gens die 5'UTR von rps16. Als Kontrolle wurde das Plasmid mutTOP-Renilla – Luciferase verwendet, dessen TOP-Motiv mit einem G startet. Vor der Translation wurden die Plasmide über eine BamH1-Schnittstelle hinter dem Poly-A – Schwanz mit BamH1 linearisiert. Das translatierte Protein Luziferase kann im Anschluss durch das eingebaute radioaktiv markierte Methionin mittels SDS-PAGE auf einem Röntgenfilm detektiert werden. Die Translationsansätze wurden mit steigenden Mengen an rekombinantem TIAR-Protein inkubiert und translatiert. TIAR zeigt hier einen eindeutigen spezifisch inhibierenden Effekt auf die Translation des TOP-Luziferase-Reporters. In Abbildung 7C ist deutlich erkennbar, wie das Translationsprodukt des TOP-RNA-Reporters (Wildtyp, Wt) im Gegensatz zur Translation der mutierten Version (Mutante, Mut) mit steigenden Mengen an titriertem TIAR-Protein abnimmt.

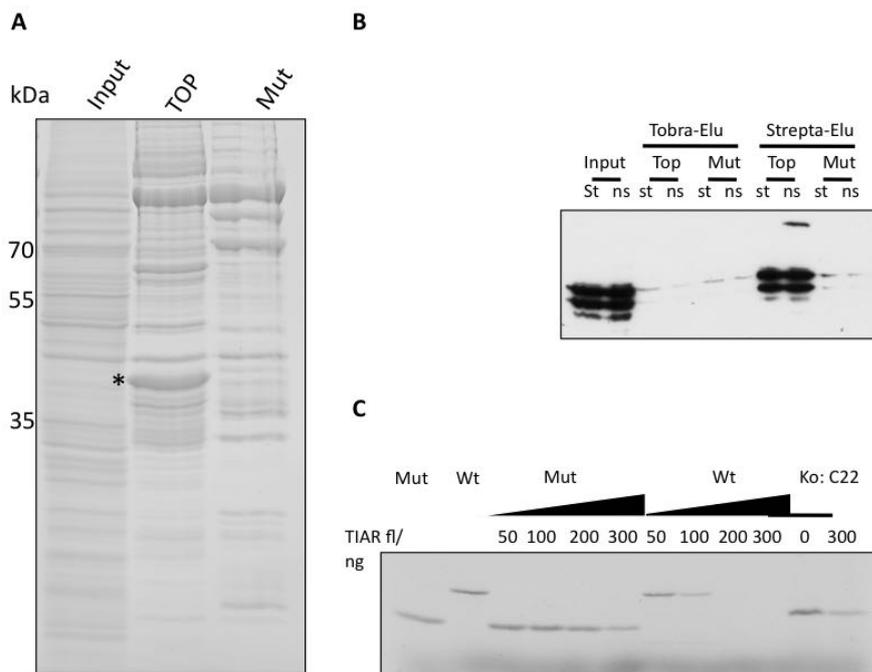


Abbildung 7: Nachweis spezifischer Bindung von TIAR an die TOP-UTRs von L32 bzw. S16-RNA. A) Identifizierung von TIAR als TOP-Interaktor mittels Biotin-Affinitätschromatographie. Die mit * markierte Bande bindet spezifisch an die rpl32-TOP-RNA und wurde durch Massenspektrometrie als TIAR identifiziert. B) Western Blot der in A) gezeigten Elutionen sowie einer Tobramycin-Affinitätschromatographie. C) *In vitro*-Translation eines TOP- und eines mutierten TOP-Reporterkonstruktes und Titration von rekombinantem TIAR. Wt = Wildtyp, Mut = Mutante, Tobra-Elu = Tobramycin-Elution, Strepta – Elu = Streptomycin-Elution, Ko = Kontrolle, C22 = C17ORF22 – RNA

Somit konnte mit diesem Experiment die zuvor gezeigte spezifische Interaktion im statischen Umfeld der Säulenchromatographie mit einer aktiven Rolle während der Translation verknüpft werden. Hier hat TIAR eine inhibierende Funktion.

Die dreidimensionale Struktur eines RNPs zwischen TIAR und dem TOP-Motiv kann weitere Einblicke in die physiologische Rolle von TIAR geben. Hierzu sind Kristallisationsexperimente Voraussetzung, für die die Länge der Interaktionspartner möglichst gekürzt und auf die minimal notwendigen RNA-Sequenzen bzw. Protein-Bindungsdomänen begrenzt werden, um eine stabile Bindung zu gewährleisten. Hierfür ist zunächst die Expression und Aufreinigung verschiedener Minimal-Fragmente von TIAR nötig, welche die einzelnen RRM-Domänen sowie Kombinationen dieser umfassen. Deren Design, Expression und Aufreinigung wird im Folgenden beschrieben.

2.1.3. Klonierung und Expression der TIAR Konstrukte

Nachdem TIAR als potentieller TOP-RNA-regulierender Kandidat etabliert war und gezeigt werden konnte, dass TIAR *in vitro* spezifisch mit der TOP-5'UTR einer Reporter-RNA interagiert und deren Translation inhibiert, sollten nun weitere Details dieser Interaktion evaluiert werden. Wie in der Einleitung beschrieben, ist die RNA-Bindung von TIAR abhängig von drei RNA-bindenden Domänen (RRM1-3) (188, 238). Verschiedene Parameter können das Bindungsverhalten beeinflussen, z.B. ob dieses auf einer oder mehreren RRM's beruht oder auch ob die Länge des TOP-Signals eine Rolle spielt. Eine detailliertere Beschreibung des Bindungsverhaltens durch die Rekapitulation der Interaktion mittels rekombinanter Proteinfragmente kann Aufschlüsse über den physiologischen Mechanismus der TOP – Regulation durch TIAR geben. Daher wurden für weitere Bindungsexperimente durch bioinformatische Evaluierung der Domänenstruktur, Klonierung und Expression verschiedene rekombinante TIAR-Proteinfragmente erstellt, welche für weitere Interaktionsstudien genutzt wurden.

2.1.3.1. Bioinformatische Untersuchungen zur TIAR - Domänenstruktur

Als ersten Schritt und im Hinblick auf mögliche spätere Kristallisationsversuche wurde zunächst das TIAR Protein bioinformatisch untersucht und die Domänenstruktur bestimmt.

TIA-1 und TIAR beinhaltet drei RRM's (RRM1-3) gefolgt von einer C-terminalen prionenähnlichen Domäne (*prion-related domain*, PRD). Die Affinitäten der RRM's zu verschiedenen RNA-Spezies wurden in der Einleitung detailliert beschrieben. *RNA – recognition motifs* (RRM) sind unter RNA-bindenden Proteinen hochkonserviert und bilden eine ca. 90 Aminosäuren umfassenden Domäne, die wiederum zwei konservierte Bindemotive beinhaltet. Diese RNP-Konsensus-Motive (RNPs), RNP1 und RNP2, sind notwendig und hinreichend zur Bindung verschiedener RNA-Targetsequenzen (203) und umfassen hauptsächlich aromatische, positiv geladene Reste. In ihrer dreidimensionalen Struktur bilden RRM's eine kanonische $\beta 1\alpha 1\beta 2\beta 3\alpha 2\beta 4$ -Topologie, welche eine antiparallele β -Faltblattstruktur, die gegen zwei α -Helices gerichtet ist, umfasst. Der zentrale Bereich des β -Faltblattes ($\beta 1$ und $\beta 3$) beinhaltet RNP1 und 2. Die RRM's der TIA-Proteinfamilie weisen eine Identität von 90% auf (238).

In den folgenden Versuchen wurden die isolierten Domänen bzw. Kombinationen hiervon rekombinant hergestellt. Zuvor wurden die RRM's der TIAR-Proteine bioinformatisch durch das *Simple Modular Architecture Research Tool* (SMART, 239 - 241) detektiert. Mit Hilfe des Programms PSIPRED (242, 243) wurden die Sekundärstrukturen evaluiert, um sicherzustellen, dass während des Designs der Genfragmente alle wichtigen Strukturen mit eingeschlossen sind. Abbildung 8 stellt schematisch die für diese Arbeit klonierten TIAR-Fragmente dar. Weiterhin angegeben sind die Positionen der RRM's innerhalb der Proteine (Position der ersten und letzten Aminosäure) sowie die Gesamtlänge der TIAR-Proteine. Die dargestellten Informationen lieferte der SMART-Algorithmus.

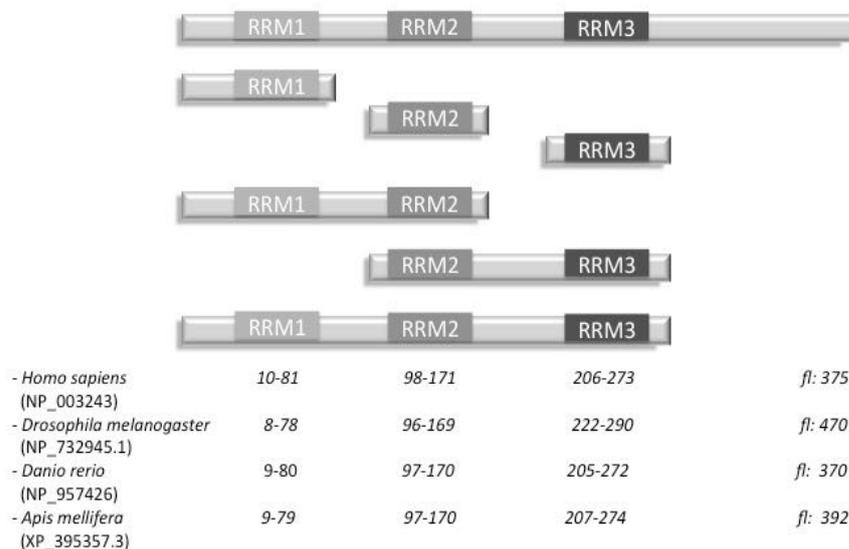


Abbildung 8: Schematische Darstellung der klonierten TIAR-Fragmente der Organismen *Homo sapiens*, *Drosophila melanogaster*, *Danio rerio* und *Apis mellifera*. Die Fragmente umfassen jeweils die einzelnen RRM's sowie die gezeigten Kombinationen RRM1-2, RRM2-3 und RRM1-3. Darunter angegeben sind die Positionen der ersten und letzten Aminosäure der RRM's innerhalb des jeweiligen Proteins sowie die Gesamtlänge der TIAR-Proteine der jeweiligen Organismen in Aminosäuren, außerdem die NCBI reference sequence. fl, full length.

Das TIAR-Gen wurde aus cDNA-Bibliotheken folgender Organismen mittels PCR kloniert: *Homo sapiens*, *Danio rerio*, *Drosophila melanogaster*, *Apis mellifera*. Die Proteinfragmente, deren Expression im Folgenden beschrieben wird, dienen nachfolgenden Versuchen zum RNA-Protein-Bindungsverhalten sowie der Kristallisation. Außerdem wurde TIAR aus dem Organismus *Chaetomium thermophilus* in die Folgeexperimente miteinbezogen, dessen Proteine sich durch ihre Thermostabilität für die Kristallisation besonders bewährt haben (244). Hier wurde das Protein von Dr. Clemens Grimm und Dr. Jann Patrick – Pelz

bereitgestellt. Das Fragment umfasst die AS 1-384 und damit die als putative RRM1-3 ermittelten Domänen. Das TIAR-Fragment aus *homo sapiens*, das die RRM1-3 umfasst, wurde von Dr. Michael Grimm bereitgestellt; die Expression weiterer Proteinfragmente wird im Folgenden beschrieben.

2.1.3.2. Expression und Aufreinigung der TIAR - Fragmente

Für die Klonierung wurden die Regionen RRM1 – RRM3 der jeweiligen Proteine in Subklonierungen in den Vektor pGEX, C-terminal der Glutathion-S-Transferase, eingebracht. Die C-terminale TIAR - Region lässt keine zuverlässige Strukturvorhersage zu und ist außerdem in Protein-Protein-Interaktionen involviert (245, 246), weshalb sie ignoriert wurde. Weitere Subklone umfassen RRM1 und RRM2 bzw. RRM2 und RRM3.

Die Expression erfolgte in *E. coli* BL21 *pLys* oder *E. coli* BL21 *Rosetta* mit anschließender Aufreinigung über GST-Affinitätschromatographie und Gelfiltration. Die Kulturen wurden bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD von ca. 0,8 inkubiert und dann mit IPTG induziert. Der Erfolg der Induktion wurde durch ein Coomassiegel überprüft. Abb. 9 zeigt die erfolgreiche Expression nach Induktion der TIAR-Fragmente von *Drosophila melanogaster* (dTIAr, dT), *Danio rerio* (drTIAR, drT) und *Apis mellifera* (amTIAR, amT).

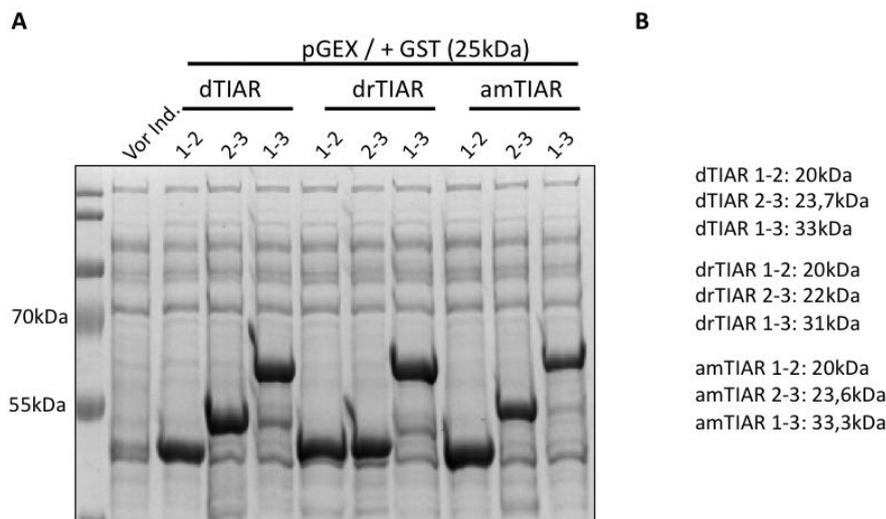


Abbildung 9: Nachweis erfolgreicher Induktion diverser TIAR-Fragmente. A) Coomassiegel bakterieller Lysate vor bzw. nach Induktion. B) Größenangaben der entsprechenden TIAR-Fragmente ohne GST in kDa. 1-2: RRM1 – RRM2, 2-3: RRM2-RRM3, 1-3: RRM1-RRM3. dTIAr = *Drosophila melanogaster* TIAR, drTIAR = *Danio rerio* TIAR, amTIAR = *Apis mellifera* TIAR. Ind.: Induktion.

Im Anschluss erfolgte der Zellaufschluss durch Resuspension in Lysepuffer sowie Sonication. Um die exprimierten TIAR-Fragmente aus dem Lysat aufzureinigen, wurde dieses mit Glutathion-4B-Sepharose (GE Healthcare, München) inkubiert, wodurch die GST-Fusionsproteine an der Sepharose-Matrix immobilisiert wurden. Mit Hilfe der *Prescission* – Protease wurden die Fragmente im Anschluss von den GST-Fusionsproteinen getrennt und der von der Matrix separierte Überstand durch Gelfiltrationschromatographie in enger Kooperation mit Dr. Clemens Grimm und Dr. Jann-Patrick Pelz weiter aufgereinigt. Dies diente dem Pufferaustausch sowie der weiteren Abtrennung von Protein- und Ribonukleinsäuren bzw. GST-Fragmenten. Die Gelfiltrationschromatographie bewirkt eine Auftrennung verschiedener Proteine nach deren Größe und wird durch Chromatogramme dargestellt, welche den Verlauf der Proteinkonzentration über das Elutionsvolumen darstellen. Die fraktionierten Elutionen wurden mit Hilfe eines Coomassiegels auf ihren Proteingehalt sowie die Größe der darin enthaltenen Proteine überprüft. Bei genügender Reinheit wurden diese gepoolt und aufkonzentriert. Die Ausbeute der Proteinfragmente, die nach diesem Schema aufgereinigt wurden, betrug zwischen 1mg und 5mg. In Abbildung 10 sind die Chromatogramme der Konstrukte hsT1-2 sowie hsT2-3 zu sehen, Abbildung 11 zeigt die Gelfiltrationsprofile der *Drosophila melanogaster*-, *Danio rerio*- und *Apis mellifera*-Konstrukte.

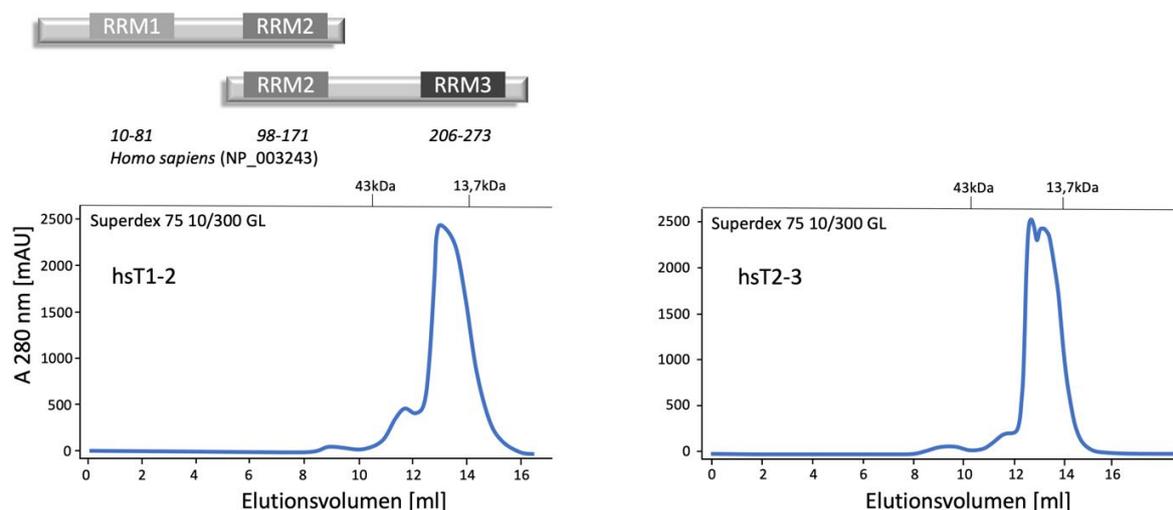


Abbildung 10: Elutionsprofile der TIAR-Konstrukte hsT1-2 und hsT2-3.

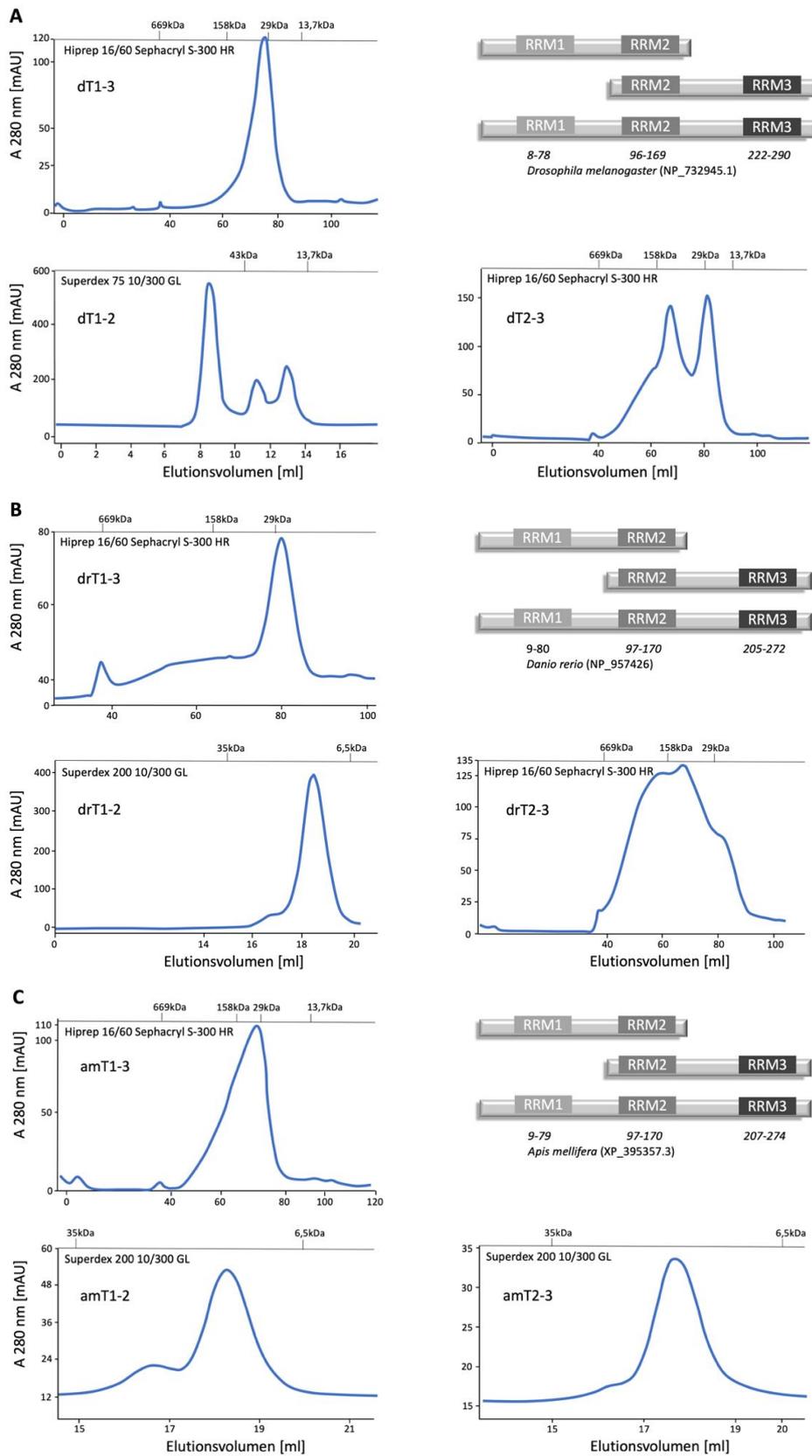


Abbildung 11: Elutionsprofile der verbleibenden TIAR-Konstrukte. A) dT1-2, dT2-3, dT1-3 B) drT1-2, drT2-3, drT1-3 C) amT1-2, amT2-3, amT1-3. dT = *Drosophila melanogaster*-TIAR, drT = *Danio rerio*-TIAR, amT = *Apis mellifera*-TIAR

Das hier beschriebene Aufreinigungsschema führte zu hoch aufgereinigten TIAR-Fragmenten, welche im Anschluss für Experimente zum Bindungsverhalten mit verschiedenen RNAs genutzt werden konnten. Diese Experimente dienen zur Erörterung der Frage, welche TIAR-RRMs zur Bindung an das TOP-Motiv nötig sind und mit welcher Affinität und Spezifität die Bindung erfolgt. Im Folgenden sind die Versuche zum Bindungsverhalten im Detail beschrieben.

2.1.4. Die Konstrukte hsT1-3, hsT2-3 und chT1-3 binden an das TOP – Motiv

Um zu erörtern, welche TIAR-Fragmente spezifisch an das TOP-Motiv binden und welche Spezifität sowie Affinität sie aufweisen, wurden EMSAs (*Electromobility shift Assays*) durchgeführt. Letztendlich kann hierdurch ermittelt werden, welche RRM's TIAR benötigt, um eine spezifische Bindung zu gewährleisten. Basierend auf derartigen Studien können die entsprechenden Protein- und RNA-Fragmente in Co-Kristallisationsexperimenten zur Erörterung der Struktur verwendet werden.

Die RNA-Oligonukleotide wurden hierfür am 5'-Ende mit PKA unter Verwendung von ATP, dessen γ -Phosphatgruppe durch das Isotop ^{32}P radioaktiv markiert wurde, kinasiert, um durch die radioaktive Markierung ein Signal auf einem *medical X-ray – Screen* detektieren zu können. Das unterschiedliche Laufverhalten von RNA-Protein-Komplexen im Vergleich zu ungebundener RNA durch ein natives Polyacrylamidgel (6%) ermöglicht nach Autoradiografie den Nachweis von RNA-Protein-Bindungen.

Die ersten Bindungsversuche blieben zunächst erfolglos oder waren nur mit sehr hohen Mengen Protein (im mg-Bereich) möglich. Eine Bindung erfolgte erst nach Vorinkubation der Ansätze mit BSA, wodurch potentielle unspezifische Bindungsstellen an den Reaktionsgefäßen abgesättigt wurden. Somit wurde dies generell in die Bindungsstudien mit einbezogen. Untersucht wurden zunächst die jeweiligen die RRM's 1-3 (T1-3) umfassenden Fragmente. In einem anfänglichen *Screen* wurde eine generelle Bindung untersucht und die Konzentrationen so gewählt, dass das Verhältnis Protein zu RNA entweder 1:1, 10:1 oder 100:1 betrug. Eine eindeutige und erfolgreiche Bindung fand statt zwischen L32 Top-RNA und hsT1-3 bzw. ctT1-3, so dass zunächst diese Konstrukte weiter examiniert wurden (Abb. 12).

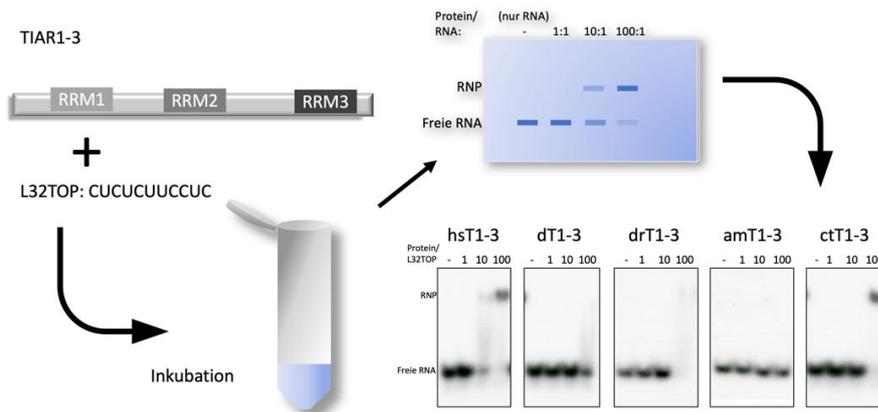


Abbildung 12: EMSA der jeweiligen die RRM1-RRM3 umspannenden TIAR-Konstrukte. Angegeben ist jeweils die Ratio Protein / RNA (1, 10, 100). L32 TOP = Pyrimidin-Trakt der L32TOP-RNA.

2.1.4.1. Konstrukt hsT1-3 bindet spezifisch an das TOP-Motiv von rps16 RNA

Nachdem hsT1-3 erfolgreich eine L32Top-Oligo-RNA gebunden hatte, wurde im Folgenden die Spezifität dieser Interaktion zum TOP-Motiv untersucht. Um diese zu demonstrieren, wurde die 5'UTR der rps16 RNA (S16) gewählt, deren Top-Motiv für den Kontrollversuch mutiert wurde (S16TOPmut). In Abbildung 13 ist zu sehen, dass das Bindungsverhalten gegenüber beiden Oligo-RNAs zunächst ähnlich ist (Abb. 13A). Titrierte man jedoch Heparin zu den RNA-Protein-Komplexen, konnte die Bindung im Kontrollversuch bereits ab einer Heparinmenge von 0,4µg unterbunden werden. Somit konnte gezeigt werden, dass die Bindung an die native S16 TOP-RNA wesentlich stabiler ist als an das S16TOPmut-Konstrukt (Abb. 13B), wodurch die Spezifität der Bindung zwischen dem S16-TOP-Motiv und hsT1-3 somit nachgewiesen wurde.

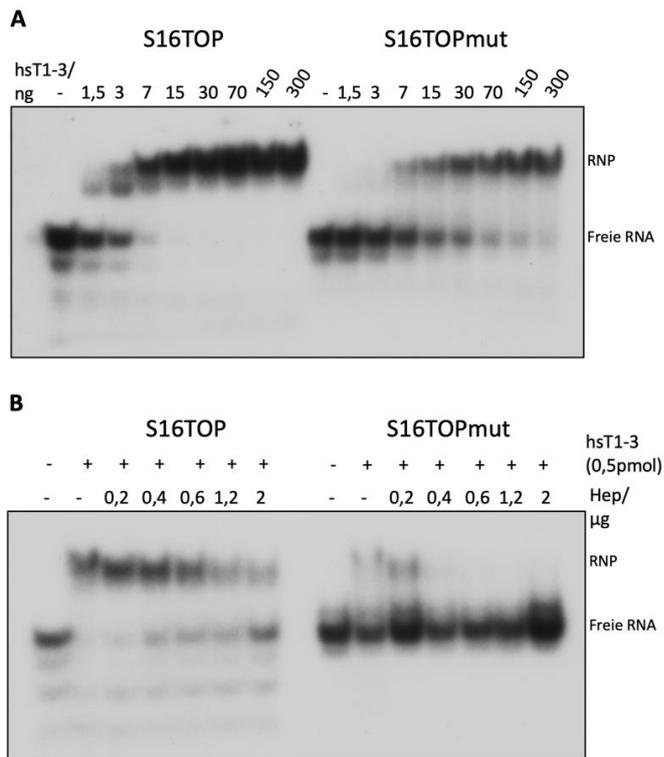


Abbildung 13: EMSA mit hsT1-3 und S16TOP- bzw. S16TOPmut-RNA. A) Titration rekombinanten hsT1-3 – Proteins zu S16TOP- bzw. S16TOPmut-RNA. B) Titration von Heparin zu gleichbleibenden Mengen rekombinanten hsT1-3 – Proteins und entsprechender RNA. Sequenzen der verwendeten RNAs: S16TOP: CCUUUUC; S16TOPmut: GAGUGACC. Hep = Heparin, S16TOPmut = S16-Mutante mit mutiertem TOP-Trakt.

2.1.4.2. Konstrukt hsT1-3 bevorzugt das TOP-Motiv von rpL32 gegenüber dem von rps16

Nach Etablierung einer spezifischen Bindung wurde diese genauer untersucht, wobei zunächst erörtert wurde, ob TOP-Motive unterschiedlicher Längen das Bindungsverhalten beeinflussen. Hierfür wurde S16TOP und L32TOP zum Vergleich herangezogen. Es zeigte sich, dass eine vollständige Bindung des längeren L32TOP (elf Basen gegenüber acht Basen bei S16TOP) bereits bei kleineren Mengen Protein erfolgte (Abb. 14).

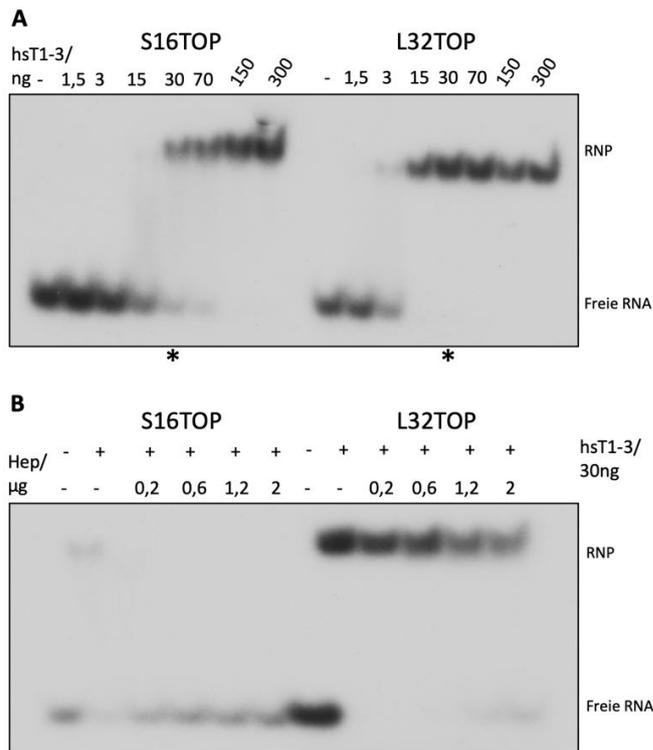


Abbildung 14: EMSA mit hsT1-3 und S16TOP- bzw. L32TOP-RNA. A) Titration rekombinanten hsT1-3 – Proteins zu S16TOP- bzw. L32TOP-RNA. Die mit * markierten Spuren kennzeichnen die Menge an Protein, die für den in B dargestellten Versuch gewählt wurden. B) Titration von Heparin zu gleichbleibenden Mengen rekombinanten hsT1-3 – Proteins und entsprechender RNA. Sequenzen der verwendeten RNAs: S16TOP: CCUUUUC; L32TOP: CUCUCUUCUC. Hep = Heparin.

Außerdem war auch hier die Bindung nach Heparin-Titration an L32TOP stabiler als an S16TOP (Abb. 14B). Somit bevorzugt hsTIAR1-3 ein längeres TOP-Motiv gegenüber einem Kürzeren.

2.1.4.3. Die erste Base am 5'-Ende ist für die Bindung nicht essentiell

Zur detaillierteren Untersuchung der Bindung sollte nun erörtert werden, ob die erste Base des TOP-Motivs eine Rolle spielt. Schon früh konnte gezeigt werden, dass die *TOP-response* außer Kraft gesetzt wird, wenn man das Cytosin direkt nach dem *Cap* durch ein Purin ersetzt (142). Die erste Base der 5'UTR scheint somit essentiell für die *TOP-response* zu sein. Um zu erörtern, ob diese Base in die TIAR-Bindung involviert ist, wurde die Affinität zu L32TOP mit der an ein mutiertes Konstrukt verglichen, bei dem nur die erste Base durch ein G ersetzt ist (L32TOPmut). Das Ergebnis ist in Abb. 15 zu sehen. Die Mutation hat keinen wesentlichen Einfluss auf das Bindeverhalten von hsT1-3.

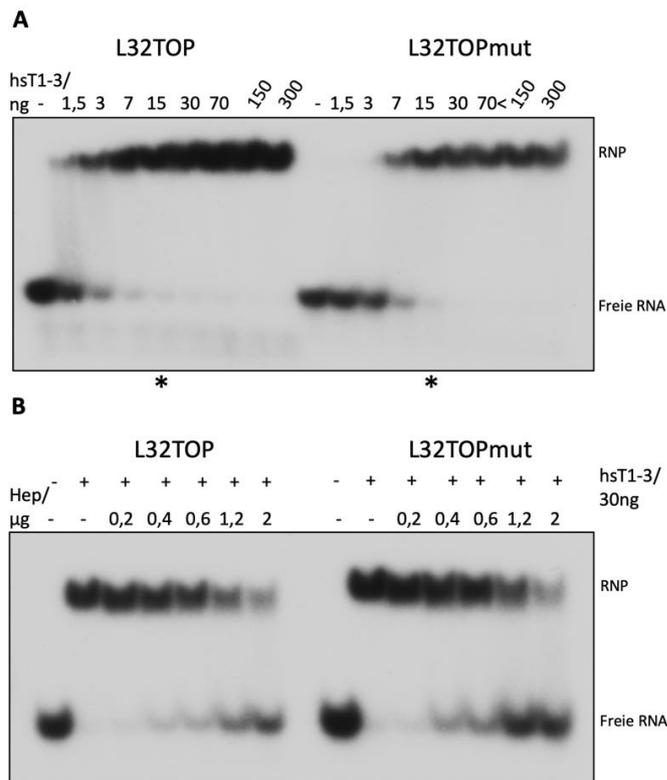


Abbildung 15: EMSA mit hsT1-3 und L32TOP- bzw. L32TOPmut-RNA. A) Titration rekombinanten hsT1-3 – Proteins zu L32TOP- bzw. L32TOPmut-RNA. Die mit * markierten Spuren kennzeichnen die Menge an Protein, die für den in B dargestellten Versuch gewählt wurden. B) Titration von Heparin zu gleichbleibenden Mengen rekombinanten hsT1-3 – Proteins und entsprechender RNA. Sequenzen der verwendeten RNAs: L32TOP: CUCUCUCCUC; L32TOPmut: GUCUCUCCUC. Hep = Heparin.

Somit wurde im nächsten Schritt die Dissoziationskonstante K_D zwischen hsT1-3 und L32TOP bestimmt. Hierfür wurden hsT1-3 in steigenden Konzentrationen zu L32TOP titriert, angefangen bei einer Ratio von 1:1 (Protein:RNA) bis zu einem Verhältnis von 10:1. Die K_D betrug $0,2\mu\text{M}$ (Abb. 16).

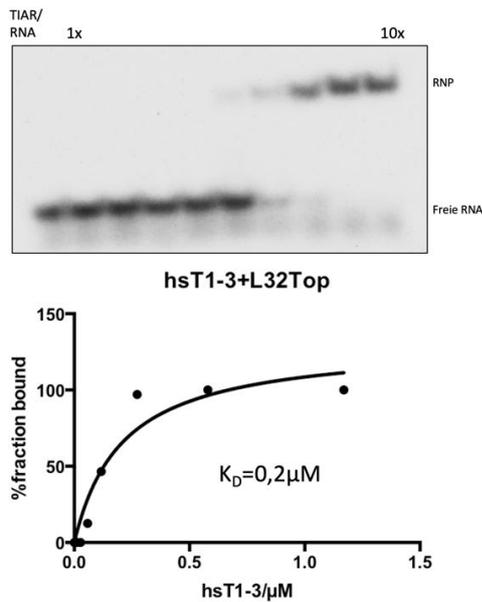


Abbildung 16: Bestimmung der K_D von hsT1-3 und L32TOP durch EMSA (erstellt mit GraphPad Prism Version 8.1.1 für macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com)

Für das Fragment hsT1-3 konnte somit eine spezifische Bindung an das L32TOP – Motiv gezeigt und eine Bindungskonstante etabliert werden. Die Bindung ist stabiler, wenn das gewählte RNA-TOP-Konstrukt länger ist, wobei die erste Base die Bindung nicht beeinflusst. Im Folgenden sollte untersucht werden, welche RRM's des TIAR-Fragments für die Bindung eine Rolle spielen und welche RRM's für weitere Bindungsversuche entbehrlich sind.

2.1.4.4. hsT2-3 bindet mit erhöhter Stabilität an längere Konstrukte.

Hierfür wurden zunächst die TIAR-Fragmente hsT1-2 und hsT2-3 sowie basierend auf den vorangegangenen Experimenten L32TOP gewählt. Im Gegensatz zum Konstrukt hsT1-2 (nicht gezeigt) band auch hsT2-3 an L32TOP (Abb. 17). Um auch hier eine Abhängigkeit von der Länge des TOP-Motivs zu untersuchen, wurden RNA-Oligos verschiedener Länge (8mer / S16TOP, 11mer / L32TOP, 15mer / eEF1BTOP) mit hsT2-3 inkubiert und mit Heparin titriert (Abb. 17B). Auch hier war die Affinität zum kürzesten RNA-Oligo am schwächsten. Die Affinität zwischen 11-mer und 15-mer unterschied sich nicht wesentlich, somit kann für Kristallisationsstudien hier das 11mer eingesetzt werden. Die ermittelte K_D liegt mit $0,14\mu\text{M}$ unter der von hsT1-3 ($0,2\mu\text{M}$) (Abb. 17A).

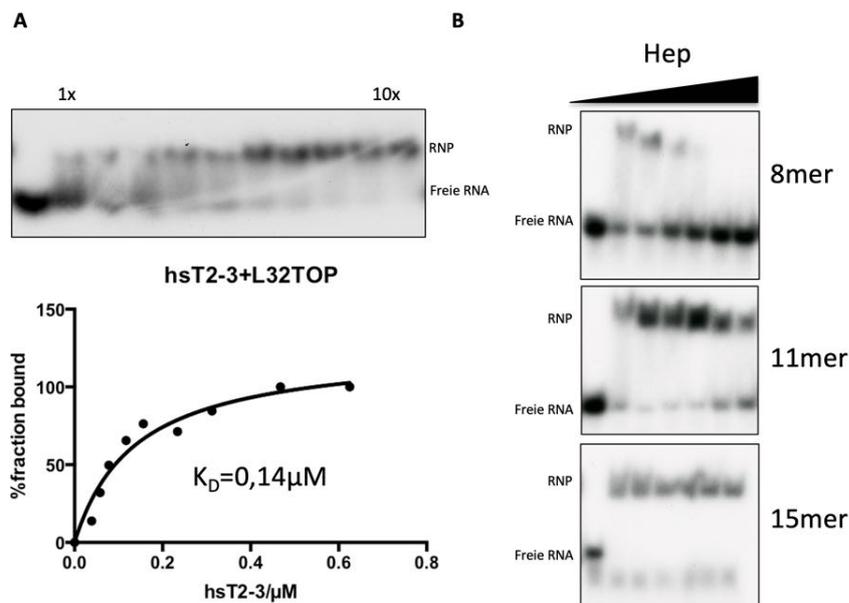


Abbildung 17: Ermittlung der K_D und Heparin-Sensitivität gegenüber RNAs verschiedener Längen von hT2-3. A) EMSA zur Ermittlung der K_D von hT2-3 und L32TOP (erstellt mit GraphPad Prism Version 8.1.1 für macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com). B) Titration von Heparin zu gleichbleibenden Mengen RNA verschiedener Länge und hT2-3. 8mer = S16TOP (CCUUUUC), 11mer = L32TOP(CUCUCUCCUC), 15mer = eEF1BTOP (CUUUUCCUCUCUUC), Hep = Heparin.

Somit konnte gezeigt werden, dass für die Bindung von hTIAR an ein TOP-Motiv RRM1 keine Rolle spielt und für weitere Versuche ignoriert werden kann. Weiterhin darf das RNA-Oligomer nicht zu kurz sein, eine Länge von acht Basen beeinflusst die Bindungsstabilität negativ, wohingegen mit einem Oligomer, das elf Basen umfasst, eine stabile Bindung etabliert werden kann. Eine weitere Verlängerung des Oligomers ist nicht nötig.

2.1.4.5. Konstrukt ctT1-3 bindet L32TOP

Wie bereits beschrieben, eignen sich die Proteine des Organismus *Chaetomium thermophilum* zur Kristallisation (244). Nachdem für hTIAR in den vorangegangenen Versuchen die Spezifität der Bindung etabliert und die Bindungskonstante erörtert worden war, wurde daher nun ctT1-3 für weitere Bindungsstudien herangezogen. Um eine spezifische Bindung des Fragments ctT1-3 an L32TOP zu demonstrieren, erfolgte die Titration einerseits zu dem nativen L32TOP-Motiv, außerdem zu einer mutierten Version (L32TOPmutAC), bei der Pyrimidine durch Purine ausgetauscht wurden, und zu der dem TOP-Motiv folgenden GC - Region. Es erfolgte lediglich eine Bindung an das unveränderte TOP-Motiv, diese ist somit spezifisch (Abb. 18).

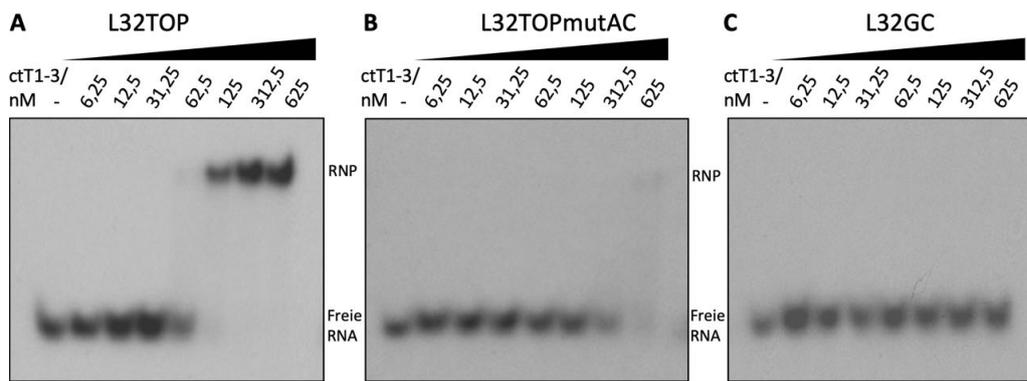


Abbildung 18: EMSA zur Ermittlung der Spezifität der Bindung zwischen ctT1-3 und L32TOP. A) Titration von ctT1-3 zu L32TOP. B) Titration von ctT1-3 zu L32TOPmutAC. C) Titration von ct1-3 zu L32GC. Sequenzen der verwendeten RNAs: L32TOP: CUCUCUUCUC; L32TOPmutAC: CACUCUACCUC; L32GC: GCGGCGCUGCC.

2.1.4.6. ctT1-3 bevorzugt längere Konstrukte

Auch hier sollte weiterhin erörtert werden, ob die Länge der RNA-Oligomere für die Bindung eine Rolle spielt. Die Titration von ctT1-3 zu RNA-Oligomeren verschiedener Länge (S16TOP/8mer, eEF1BTOP/11mer, L32TOP/15mer) zeigte, dass dies der Fall ist - die K_D wurde mit steigender Basenzahl vermindert (Abb. 19). Die bisher gezeigten untersuchten TIAR-Konstrukte bevorzugen also generell längere TOP-Motive. Bei ctT1-3 war dieses Verhalten besonders auffällig: Das 8mer wurde überhaupt nicht gebunden. Somit ließen sich lediglich K_D s für das 11mer und das 15mer bestimmen, die bei 37nM (11mer) und bei 9nM (15mer) liegen (Abb 20).

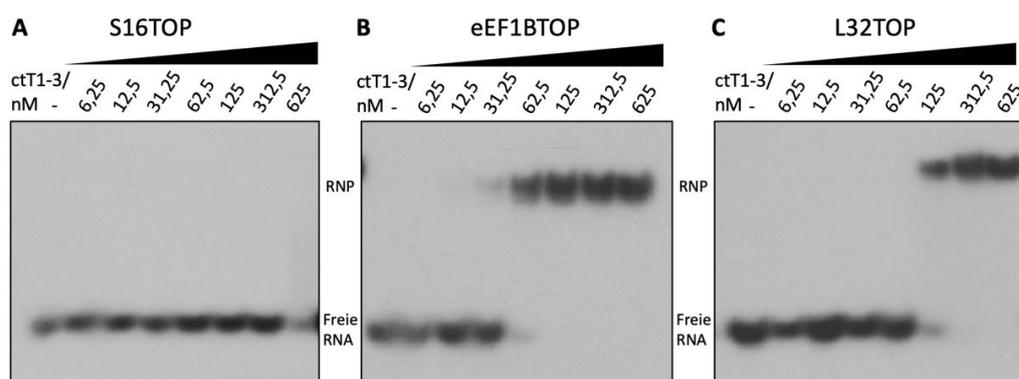


Abbildung 19: EMSA zur Ermittlung des Einflusses der Oligomer-Länge auf die Bindung zwischen ctT1-3 und RNA. A) Titration von ctT1-3 zu S16TOP (8mer). B) Titration von ctT1-3 zu eEF1BTOP (15mer). C) Titration von ctT1-3 zu L32TOP (11mer).

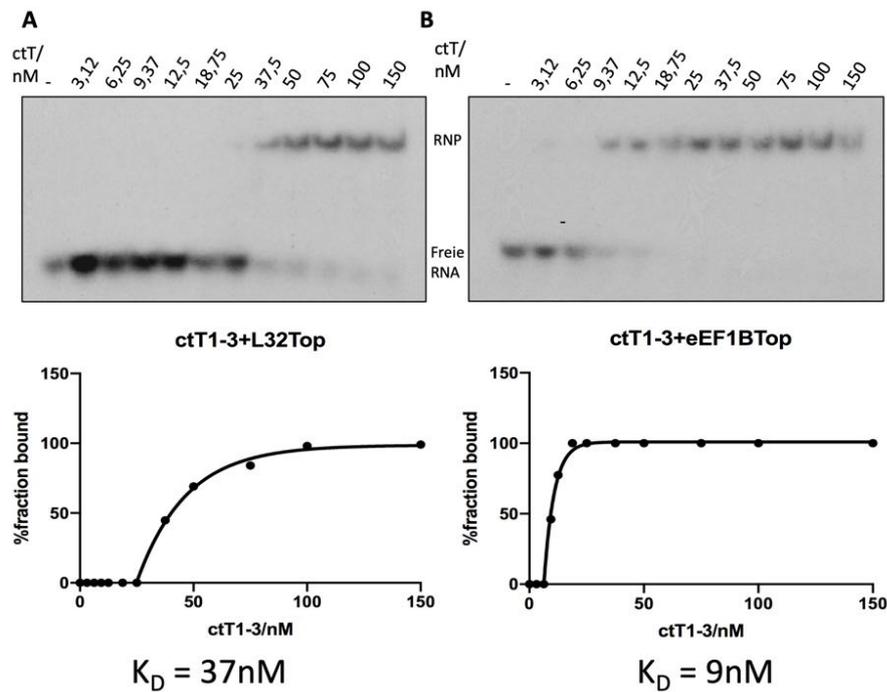


Abbildung 20: Ermittlung der K_D zwischen ctT1-3 und A) L32TOP bzw. B) eEF1BTop. Erstellt mit GraphPad Prism Version 8.1.1 für macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com

2.1.4.7. drT1-3 bindet an L32TOP

Auch drT1-3 wurde untersucht, wenn es auch im anfänglichen Screen keinen deutlichen Shift zeigte (Abb. 12). Dennoch war das Signal der ungebundenen RNA nicht mehr sichtbar, was auf sehr unspezifische Bindungen von Komplexen hindeuten könnte, die sich im Gel „verlaufen“. Daher wurde es erneut für weitere Experimente in Betracht gezogen. Es konnte mit einer K_D von $0,46\mu\text{M}$ zu L32TOP titriert werden (Abb. 21).

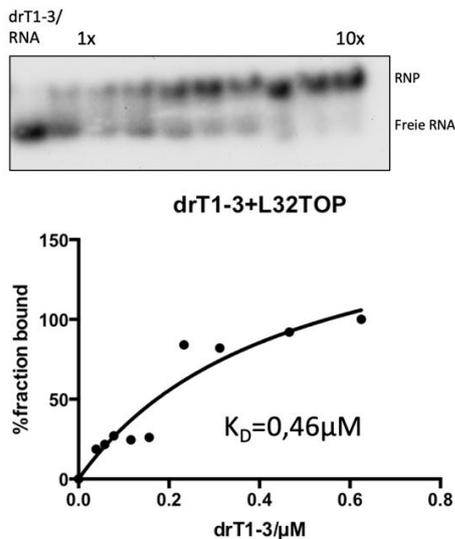


Abbildung 21: Ermittlung der K_D zwischen drT1-3 und L32TOP durch EMSA (erstellt mit GraphPad Prism Version 8.1.1 für macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com).

Im Gegensatz zu den *Homo sapiens* und *Chaetomium thermophilum*-Fragmenten ist die K_D des *Danio rerio*-Fragments deutlich höher. Somit sind die zuvor analysierten TIAR-Fragmente dem *Danio rerio*-TIAR-Protein für etwaige Kristallisationsversuche vorzuziehen. Die in den vorangegangenen Experimenten ermittelten Dissoziationskonstanten sind in Tabelle 2 zusammengefasst.

TIAR -Konstrukt	RNA – Oligomer	K_D
hsT1-3	L32TOP	0,2μM
hsT2-3	L32TOP	0,14μM
ctT1-3	L32TOP (11mer)	37nM
ctT1-3	eEF1BTOP (15mer)	9nM
drT1-3	L32TOP	0,46μM

Tabelle 2: TIAR-Konstrukte, RNA-Oligomere und ermittelte K_D s.

Die beschriebenen Versuche zeigen, dass sich hsT2-3 gut für etwaige Co-kristallisationsversuche mit L32TOP eignet. RRM1 kann ignoriert werden und die Stabilität der Bindung steigt mit der Länge des TOP-Motivs. Das Fragment ctT1-3 zeigt bezüglich der Bindung zu L32TOP eine wesentlich niedrigere K_D und sollte daher ebenfalls für weiterführende Strukturstudien in Betracht gezogen werden. Die Bindung von drT1-3 konnte ebenfalls gezeigt werden, diese scheint jedoch nicht so stabil wie die der vorher beschriebenen TIAR-Fragmente.

2.2. Identifizierung des Proteins 14-3-3ε mittels Affinitäts – und Anionen – Austauschchromatographie

Mit Hilfe der in 2.1.1 beschriebenen Tobramycin-Affinitätschromatographie konnte TIAR spezifisch als TOP – Interaktionsfaktor identifiziert werden. Um die Spezifität der Aufreinigung weiter zu erhöhen, wurde ein weiterer Reinigungsschritt eingeführt. Durch Auftrennen der Elution der Tobramycin-Chromatographie mittels Anionen-Austauschchromatographie konnte der unspezifische Hintergrund der Tobramycin-Elution weiter verringert und das Protein 14-3-3ε als TOP-Interaktor identifiziert werden.

Für diesen Versuch wurde zunächst eine wie in 2.1.1 beschriebene Tobramycin – Chromatographie durchgeführt. Die S16– und Kontrolltranskripte wurden vor der Immobilisierung an der Tobramycin-Matrix mit Hilfe des *Scriptcap™ m₇G Capping System* Kits (Biozym Scientific) am 5'-Ende mit einem Cap versehen. Die Elution erfolgte mit Hilfe einer 2mM Lösung gecappten Cytidins (Cap-Analog m⁷GpppC, Dr. Darzynkiewicz, Polen). 1ml der so erhaltenen Elution wurde weiter durch eine Anionenaustauschchromatographie aufgetrennt. Hierfür wurde die Elution auf eine MonoQ-Säule (GE Healthcare) geladen und die Proteine durch einen Gradienten (100mM NaCl – 1M NaCl in HEPES-Puffer pH7,5) über ein Volumen von 45ml eluiert. Der Durchlauf wurde in 500µl-Fraktionen aufgefangen. Das Profil ist in Abbildung 22A zu sehen. Um zu zeigen, dass eine Probe TOP – interagierende Faktoren enthält, wurden in Crosslink-Assays durch UV-Strahlung Quervernetzungen zwischen einem RNA-Oligonukleotid, welches die S16-UTR samt TOP-Motiv umfasst, sowie potentiell in der Elution enthaltenen bindenden Proteinen gebildet (Abb. 22B). Hierfür wurde je 20µl der untersuchten Fraktionen mit der S16-RNA 15min bei 37°C inkubiert. Die RNA – Oligonukleotide wurden zuvor mit Hilfe des *ScriptCap™ m₇G Capping Systems* (Biozym Scientific) am 5'-Ende mit einem radioaktiv markierten Cap ([α-³²P]-GTP) versehen. Nach der Inkubation erfolgte die UV-Bestrahlung in einem CL-1000 UV Crosslinker (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge) bei 254nm in einem Abstand von 10cm für 20min auf Eis. Durch die radioaktive Markierung der RNA konnten die Crosslinks im Anschluss durch durch SDS – PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

In einem ersten Screen wurden die GC-Elution sowie die Fraktionen 39-56 untersucht (nicht gezeigt). Eine Interaktion in Form eines „Schmiers“ war in Fraktion 50 erkennbar; dieser diente zum Anlass, die umliegenden Fraktionen erneut mittels Crosslink-Assays zu untersuchen.

Abbildung 22B zeigt Crosslinks in den Fraktionen 50, 51 und 52. Diese wurden somit mittels eines Competition-Assays untersucht (Abb. 22C). Hierfür wurden die Fraktionen vor UV – Bestrahlung mit S16-RNA sowie jeweils ohne und mit Zugabe von 2mM m⁷GpppC-Cap – Analog inkubiert. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Bindung und damit Quervernetzung direkt am Cap erfolgte, da durch Zugabe von Cap-Analog kein Crosslink mehr erkennbar war.

Im Anschluss wurden die Proteine der Fraktionen 48-54 mittels TCA präzipitiert und auf ein Silbergel aufgetragen. Fraktion 50 zeigte um den gesuchten Bereich von 27kDa bzw. im Bereich von 20 – 30kDa prominente Banden (Abb. 22D). Somit wurde dieser Bereich ausgeschnitten und die Proteine durch Massenspektrometrie untersucht. In Tabelle 3 sind neben 14-3-3ε die identifizierten Proteine vollständig aufgelistet.

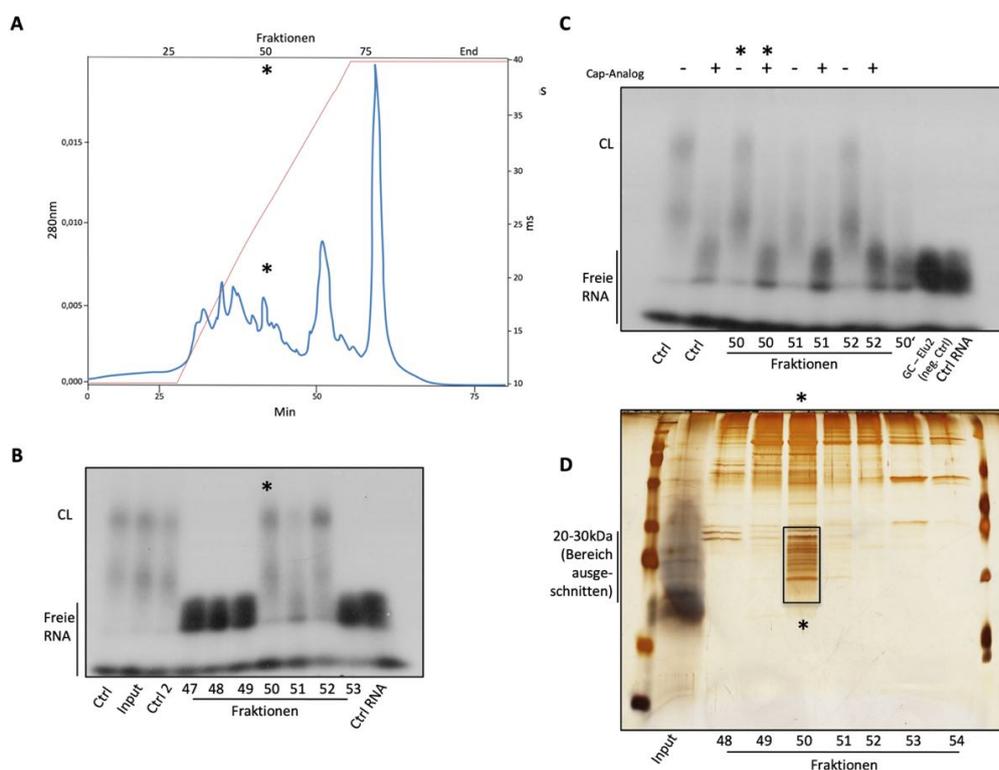


Abbildung 22: Aufreinigung und Identifizierung von 14-3-3ε als TOP – interagierendem Protein. A) Anionenaustauschchromatographie. Elutionsprofil der MonoQ – Säule. Die mit „*“ gekennzeichnete Fraktion beinhaltet einen durch Crosslink mit dem TOP-Motiv vernetzbaren Faktor (s. B) B) Screen mittels Crosslink – Assay der Fraktionen 47-53. Die Fraktionen 50-53 enthalten einen mit dem TOP-Motiv vernetzbaren Faktor. C) Competition Assay. Der Crosslink aus den Fraktionen 50, 51 und 52 wird durch Zugabe von Cap-Analog GpppC deletiert. D) Silberfärbung des SDS Gels nach Präzipitation der Fraktionen mit TCA. Der markierte Bereich (20 – 30kDa) wurde ausgeschnitten und einer massenspektrometrischen Analyse unterzogen. ms: Millisiemens, Ctrl: Kontrolle, CL: Crosslink

A

	Name (Gene_Symbol)	Masse	Gene Name (GN)	Score
1.	Proteasome subunit beta type-5 (PSB5_HUMAN)	28633	PSMB5	222
2.	Keratin, type II cytoskeletal 1 (K2C1_HUMAN)	66170	KRT1	204
3.	Prostaglandin E synthase 3(TEBP_HUMAN)	18971	PTGES3	158
4.	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermall (K22E_HUMAN)	65678	KRT2	155
5.	Proteasome subunit alpha type-2 (PSA2_HUMAN)	25996	PSMA2	132
6.	Proteasome subunit alpha type-6 (PSA6_HUMAN)	27838	PSMA6	132
7.	Keratin, type I cytoskeletal 9 (K1C9_HUMAN)	62255	KRT9	119
8.	Proteasome subunit beta type-6 (PSB6_HUMAN)	25570	PSMB6	114
9.	Keratin, type I cytoskeletal 10(K1C10_HUMAN)	59020	KRT10	95
10.	Proteasome subunit beta type-7 (PSB7_HUMAN)	30288	PSMB7	59
11.	Proteasome subunit beta type-4 (PSB4_HUMAN)	29243	PSMB4	57
12.	Proteasome subunit alpha type-7 (PSA7_HUMAN)	28041	PSMA7	54
13.	Proteasome subunit alpha type-5 (PSA5_HUMAN)	26565	PSMA5	51
14.	Copine-7(CPNE7_HUMAN)	71390	CPNE7	48
15.	14-3-3 protein epsilon (1433E_HUMAN)	29326	YWHAE	44
16.	Microtubule-associated protein RP/EB family member 1 (MARE1_HUMAN)	30151	MAPRE1	42
17.	Protein fem-1 homolog B (FEM1B_HUMAN)	71189	FEM1B	41
18.	Proteasome subunit alpha type-1 (PSA1_HUMAN)	29822	PSMA1	34

B

	Name (<i>Gene_Symbol</i>)	Masse	Accession Number (<i>IPI</i>)	Score
1.	Proteasome subunit beta type-5 (PSMB5)	28633	IPI00479306	294
2.	Keratin, type II cytoskeletal 1 (KRT1)	66170	IPI00220327	261
3.	Prostaglandin E synthase 3 (PTGES3)	18971	IPI00015029	202
4.	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (KRT2)	66111	IPI00021304	190
5.	Keratin, type I cytoskeletal 9 (KRT9)	62255	IPI00019359	179
6.	Proteasome subunit beta type-6 (PSMB6)	25570	IPI00000811	152
7.	Proteasome subunit alpha type-6 (PSMA6)	27838	IPI00029623	136
8.	Keratin, type I cytoskeletal 10 (KRT10)	59020	IPI00009865	135
9.	Proteasome subunit alpha type-2 (PSMA2)	25996	IPI00219622	96
10.	Proteasome subunit beta type-4 (PSMB4)	29243	IPI00555956	83
11.	Isoform 1 of Proteasome subunit alpha type-7 (PSMA7)	28041	IPI00024175	69
12.	Proteasome subunit beta type-7 (PSMB7)	30288	IPI00003217	65
13.	Proteasome subunit alpha type-5 (PSMA5)	326565	IPI00291922	57
14.	Collagen alpha-1(I) chain (COL1A1)	139853	IPI00297646	48
15.	14-3-3 protein epsilon (YWHAE)	29326	IPI00000816	47
16.	Isoform Short of Proteasome subunit alpha type-1 (PSMA1)	29822	IPI00016832	34

Tabelle 3: Durch Massenspektrometrie identifizierte Proteine, welche sich nach der Aufreinigung in der TCA – gefällten Fraktion befanden. Der untersuchte Bereich umfasst die Banden von 20 – 30kDa. Die durch Massenspektrometrie erhaltenen Daten wurden für Suchen in den Datenbanken *ipi_human Database* und *SwissProt* verwendet. A) Ergebnisse der Suche in der *SwissProt – Database* (SwissProt 20100615). B) Ergebnisse der Suche in der *ipi_human Database* (IPI_human HUMAN_v370)

2.3. Erörterung einer potentiellen Rolle von Larp1 bei der *TOP response*

In den vorangegangenen Experimenten wurde das Bindungsverhalten verschiedener TIAR – Fragmente zum TOP-Motiv untersucht und die Spezifität nachgewiesen, außerdem wurde 14-3-3 ϵ als TOP – interagierender Faktor identifiziert. Ein weiteres Protein, dessen Interaktion mit TOP-RNAs durch Aoki et al. (213) gezeigt wurde, ist Larp1. Das Mitglied der La-Proteinfamilie bindet an den polyA-Schwanz von mRNAs, wodurch es vorwiegend TOP-mRNAs stabilisiert. In diesem Zusammenhang wurde auch eine mögliche Rolle des Proteins in der Translationsregulation diskutiert (213 - 215), woraufhin Larp1 in diese Arbeit mit einbezogen wurde.

Die Affinität La-verwandter Proteine zu U-reichen RNA-Sequenzen wurde bereits mehrfach demonstriert (194, 216, 247, 248). So konnten z.B. Markert et al. mit Hilfe einer Tobramycin-Affinitäts-Chromatographie unter mehreren TOP-bindenden Faktoren Larp7 detektieren (216), welches ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit ist. Zunächst wurde hier untersucht, ob Larp1 an die 5'UTR einer TOP-RNA binden würde, ob die Bindung direkt am TOP-Motiv erfolgt und unter welchen Bedingungen sie stattfindet. Hierfür wurden zum einen eine stabile Larp1-FlpIN-Trex-Zelllinie induziert und ohne bzw. mit Serum inkubiert (*starved*, *st* bzw. *not starved*, *ns*). Daraufhin wurde mittels einer *Flag*-Immunopräzipitation (*Flag*-IP) Larp1 immobilisiert und per RT-PCR geprüft, ob spezifisch eine TOP-mRNA an Larp1 bindet. Zum anderen wurde in einem weiteren Versuch die biotinylierte rpl32-5'UTR sowie als Kontrolle eine Version mit mutiertem TOP-Motiv an einer Streptavidin-Matrix immobilisiert. Nach Inkubation mit Extrakten aus durch Serummangel inhibierten bzw. proliferierenden HEK293-Zellen wurde mittels eines Western Blots geprüft, ob Larp1 an einer Spezies dieser mRNAs gebunden hatte. Diese Versuche werden im Folgenden beschrieben.

2.3.1. Larp1 bindet spezifisch TOP-RNAs in gestarvten HEK 293-Zellen

Um zu überprüfen, ob Larp1 spezifisch an TOP-RNAs bindet und welche Bedingungen hierfür nötig sind, wurde im ersten Versuch eine stabile Larp1-FlpINTrex Zelllinie benutzt, welche von Dr. Maritta Küspert etabliert und zur Verfügung gestellt wurde (289). Bei einer Konfluenz von ca. 40% erfolgte die Induktion mit 0,5 μ g/ml Tetracyclin und nach 24h der Serumentzug (*st*). Eine auf gleiche Weise behandelte Kultur wurde nach 24h erneut mit FCS-haltigem Medium behandelt (*ns*). Zur Negativkontrolle erfolgte die Durchführung des Experiments zeitgleich mit

FlpIn-Trex-Zellen ohne Flag-Larp1. Nach einer sechsstündigen Inkubation ohne bzw. mit FCS wurden die Zellen lysiert und die Extrakte über Nacht bei 4°C mit *Flag*-beads inkubiert. Phenolisierung der Beads führte zu einer mit RNA angereicherten wässrigen Phase. Zur Prüfung, ob darin eine TOP-RNA, nämlich rpL23-mRNA enthalten ist, wurde mit Hilfe spezifischer Primer eine RT-PCR mit anschließender PCR durchgeführt. Als Negativ-Kontrolle diente der Nachweis von GAPDH-mRNA. Der Erfolg der Flag-IP wurde außerdem durch einen Western Blot geprüft.

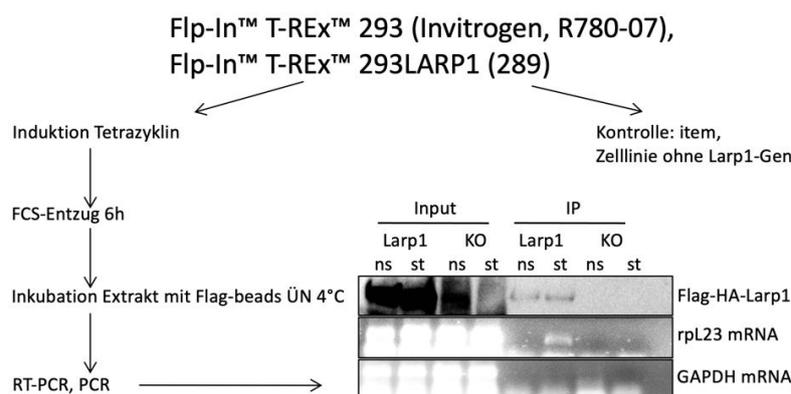


Abbildung 23: Immunpräzipitation und Identifikation der TOP-mRNA rpL23 als Interaktor des induzierten Flag – HA-Larp1. Gezeigt ist das Schema des Experiments sowie das Ergebnis des Versuchs mittels einer RT-PCR. Zur Kontrolle, ob Flag – HA-Larp1 erfolgreich exprimiert und aus dem Extrakt isoliert wurde, diente ein Western Blot. Die stabile Larp1-FlpInTrex Zelllinie wurde von Dr. Maritta Küspert etabliert und zur Verfügung gestellt (289).

Das Experiment ist in Abbildung 23 dargestellt. Während die GAPDH-mRNA lediglich in den Inputs enthalten ist, konnte die rpL23 mRNA spezifisch mit Larp1 aus gestarvten Zellen präzipitiert werden.

2.3.2 Larp1 bindet spezifisch an das TOP-Motiv immobilisierter L32-5'UTR unter gestarvten Bedingungen

Da in obigem Versuch bereits eine Spezifität bezüglich TOP-RNAs unter gestarvten Bedingungen demonstriert wurde, sollte nun untersucht werden, ob die Bindung an das TOP-Motiv erfolgt und ob sich hierbei die Spezifität für *Starving*-Bedingungen bewahrheitet. Dazu wurde die 5'UTR der L32 TOP-RNA, welche am 3'-Ende biotinyliert war (L32TOP), an einer Streptavidin-Matrix immobilisiert und diese mit HEK293-Extrakten inkubiert. Um Spezifität zum TOP-Motiv zu demonstrieren, wurde der Versuch parallel mit einer 5'UTR von L32 durchgeführt, deren TOP-Motiv mutiert war (L32mut). Zusätzlich wurde der Versuch mit der

5'UTR der S16 TOP-RNA (S16TOP) sowie als Kontrolle einer mutierten Version (S16mut) durchgeführt.

Die Extrakte wurden zuvor bei einer Konfluenz von ca. 80% sechs Stunden lang gestarvt bzw. in einem parallel durchgeführten Kontrollversuch weiter mit FCS-haltigem Medium behandelt. Außerdem wurde ein Teil des Versuches als Negativkontrolle mit einer Matrix ohne RNA durchgeführt.

Die Inkubation des Extraktes mit der Matrix erfolgte über Nacht bei 4°C. Der Erfolg des Experiments wurde durch einen Western Blot auf Larp1 überprüft. Als Kontrolle wurde der Blot außerdem mit einem TIAR-Antikörper inkubiert, da TIAR, wie bereits in dieser Arbeit gezeigt, spezifisch an das TOP-MOTIV bindet und somit eine solide Positiv-Kontrolle darstellt.

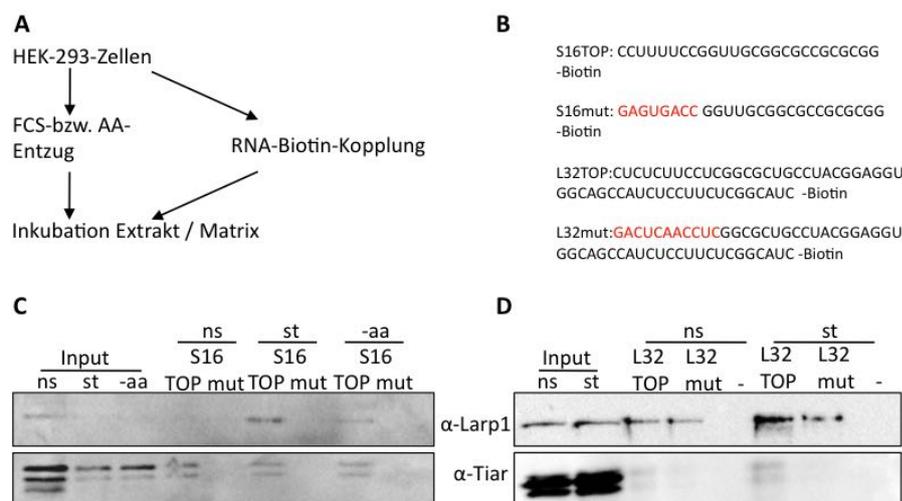


Abbildung 24: Biotin – Affinitäts-Chromatographie mit immobilisierten RNA-TOP-Elementen S16, S16mut, L32TOP und L32mut. A) Versuchsschema. HEK-293-Zellen wurden in An- bzw. Abwesenheit von Aminosäuren (AA) oder FCS herangezogen und anschließend lysiert. Der Extrakt wurde mit einer Matrix immobilisierter RNA – TOP-Motive inkubiert. B) Sequenzen der verwendeten RNA-Oligonukleotide. C) Western Blot mit Larp1 des Experiments mit S16 TOP-RNA bzw. der mutierten Form. Larp1 interagiert spezifisch mit den nicht – mutierten TOP-Motiven von S16 in gestarvten und Aminosäure-depletierten Zellen. Als Positiv-Kontrolle diente Tiar. D) Western Blot mit Larp1 des Experiments mit dem L32 – TOP-Motiv. Unter gestarvten Bedingungen erfolgt eine Anreicherung von Larp1 am TOP-Motiv.

Abbildung 24 zeigt das Ergebnis des Versuchs. Dieser ist zunächst schematisch dargestellt (Abb. 24A). Abbildung 24C zeigt, dass Larp1 spezifisch in gestarvten und Aminosäure –

depletierten Extrakten an die S16 – TOP-Matrix bindet. Auch an der L32 – Matrix wird Larp1 unter gestarvten Bedingungen angereichert (Abb. 24D).

Die vorangegangenen Versuche zeigen somit, dass Larp1 spezifisch mit TOP-RNAs interagiert, wobei das Protein in durch Serum– bzw. Aminosäureentzug inhibierten Zellen direkt das TOP-Motiv bindet. Dies lässt eine inhibierende Funktion von Larp1 bezüglich der Translation von TOP-RNAs vermuten.

2.4. Untersuchungen zur Bindung von Larp7 und 7SK

Aus der Familie der La-Proteine wurde neben Larp1 auch Larp7 als TOP-interagierender Faktor identifiziert (216), weshalb Larp7 in diese Arbeit ebenfalls mit einbezogen wurde. In weiteren Untersuchungen wurde schließlich 7SK als RNA-Interaktionspartner etabliert (216). Im Hinblick auf eine mögliche Kristallisation dieses RNA-Protein – Komplexes zur Evaluierung der Struktur sind auch hier vorangehende RNA-Protein – Bindungsstudien nötig, um die minimale Länge der Interaktionspartner zu erörtern und die Spezifität und Affinität der Bindung zu untersuchen. Diese Versuche sollen im Folgenden näher erläutert werden.

2.4.1 Expression des Larp7 - Moduls

Wie in der Einleitung beschrieben, umfasst das Larp7-Modul (L7M) das La-Motiv, gefolgt von einer RRM. Ein derartiges Larp7-Fragment, welches nur das L7M umfasst, wurde für diese Arbeit von Vanessa Schlag zur Verfügung gestellt. Das Proteinfragment umfasst die Aminosäuren 1-196 und wurde mit Hilfe von Psipred (242, 243) bioinformatisch auf Vollständigkeit des La-Motivs und der anschließenden RRM überprüft. Das Konstrukt befindet sich im Vektor pETM-11, somit erfolgte die Aufreinigung erfolgte über den N-terminalen 6 x His-Tag mit anschließender Gelfiltration. Hierfür wurde der DNA-Klon zunächst in BL21 DE3 pRARE Rosetta-Kulturen transformiert und in 2L TB-Medium bis zu einer OD von 1 bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach Induktion erfolgte die weitere Inkubation bei 22°C ÜN. Die Lyse erfolgte mittels Zugabe von Nuclease sowie durch Sonication. Nach Zentrifugation der Zelltrümmer wurde der Überstand mit Nickel-NTA-Agarose für zwei Stunden bei 4°C inkubiert. Im Anschluss erfolgten mehrere Waschschrte mit Hoch– und Niedrigsalzpuffern (500mM NaCl und 250mM NaCl). Das an den Beads immobilisierte Protein wurde mit Hilfe der TEV – Protease vom His-Tag und den Beads separiert. Die Elutionen wurden nach Aufkonzentration auf eine Superdex 75 26/60 (GE Healthcare) gegeben, um mit Hilfe der Gelfiltration den Puffer

auszutauschen und das aufgereinigte L7M von Verunreinigungen durch Größenseparation abzutrennen. Die Ausbeute betrug 0,5 - 1mg.

Auf diesem Weg konnten auch von L7M hoch aufgereinigte Proteinprodukte erhalten werden, die im Folgenden für Bindungsstudien im Hinblick auf verschiedene Oligo-U – und 7SK-RNA – Spezies herangezogen wurden.

2.4.2. Bindungsstudien zum L7M mit diversen RNA - Oligomeren

Da die Interaktion des La-Moduls mit U-reichen RNA-Sequenzen bekannt ist (207), wurden für die folgenden Bindungsstudien zunächst OligoU-RNAs gewählt; als Bindungsassay diente das EMSA. Das verwendete OligoU war ein 16mer (OligoU16).

2.4.2.1. Larp7 benötigt tRNA zur Bindung an eine U16-RNA

Zur Etablierung einer Bindung wurden zunächst verschiedene Puffer- und Temperaturbedingungen evaluiert, jedoch ohne Erfolg. Daraufhin wurden in einem Screen verschiedene Additiva eingesetzt, und zwar PBS, Heparin und tRNA (Abb. 25). In Gegenwart von tRNA kam es zu einer reproduzierbaren Bindung, die interessanterweise wieder aufgelöst wurde, wenn alle drei Additiva zusammen in den Ansatz gegeben wurden. Dies ist auf das Heparin zurückzuführen, wie in Punkt 2.4.2.3. gezeigt werden wird.

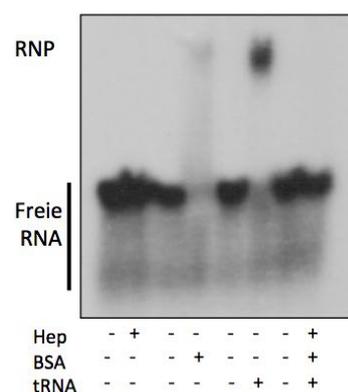


Abbildung 25: EMSA mit OligoU16 sowie Heparin (2µg), BSA (1µg) und tRNA (0,5µg). Eine stabile Bindung erfolgte unter Zugabe der tRNA.

Um zu prüfen, ob ein kürzeres OligoU ebenfalls zur Bindung führt, wurde der Versuch mit weiteren OligoU-Konstrukten (OligoU4, OligoU6, OligoU8) durchgeführt. Es zeigte sich jedoch,

dass ein OligoU8-mer nicht mehr bindet (Abb. 26). Weitere Experimente erfolgten daher zunächst mit dem OligoU16-mer.

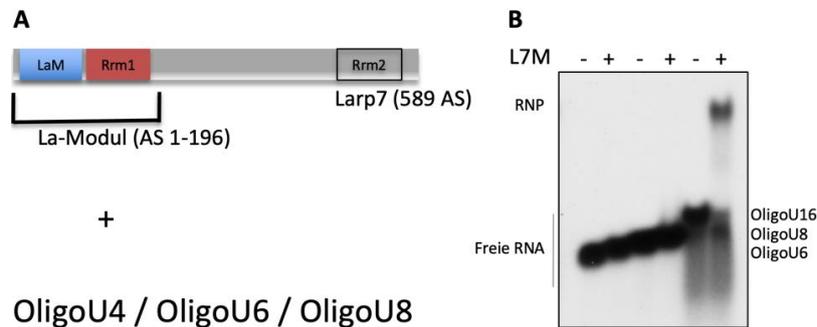


Abbildung 26: EMSA mit dem Larp7-Modul L7M und OligoU-RNA verschiedener Länge. A) Schematischer Aufbau von Larp7. L7M umfasst die Aminosäuren 1 – 196 und damit das La-Motiv sowie RRM1. B) EMSA. Eine Bindung erfolgte erst mit einem OligoU16-mer.

Mit diesem OligoU16-mer wurde in einem Titrationsexperiment zunächst untersucht, in welchem Verhältnis das L7M zur tRNA vorliegen muss (Abb. 27A). Dazu wurde L7M zu gleichbleibenden Mengen an tRNA und OligoU titriert. Eine vollständige Bindung erfolgte bei äquimolarer Ratio. Der umgekehrte Versuch, d. h. die Titration von tRNA zu gleichbleibenden Mengen an L7M, führte zu einem ähnlichen Ergebnis; hier erfolgte die vollständige Bindung bereits bei der Hälfte an eingesetzter tRNA (Abb. 27B). Eine mögliche Bindung zwischen tRNA und OligoU wird weiter unten diskutiert, in den hier gezeigten Versuchen dienten Proben, die lediglich tRNA und OligoU enthielten, als erste Negativkontrolle.

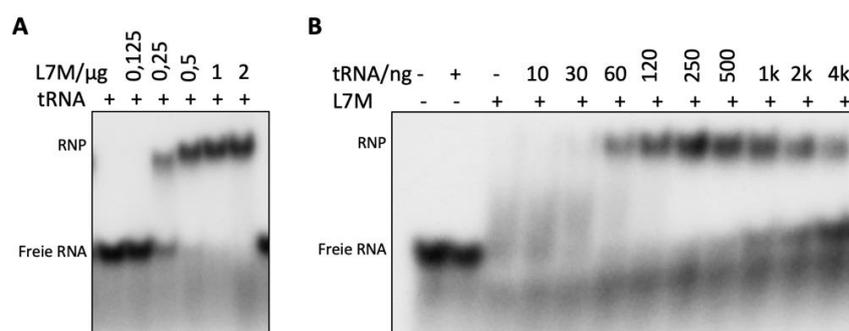


Abbildung 27: EMSA zur Untersuchung der benötigten Menge an tRNA. A) L7M wurde zu gleichbleibenden Mengen OligoU16 und tRNA (0,5µg) titriert. Bei 0,5µg L7M bildete sich das vollständige RNP. Äquimolare Mengen liegen in etwa bei jeweils 0,5µg tRNA bzw. L7M vor (0,5µg tRNA = 18pmol, 0,5µg L7M = 23pmol). B) tRNA wurde zu gleichbleibenden Mengen L7M (0,5µg) und OligoU16 titriert. Ein vollständiges, definiertes RNP bildete sich hier bei 0,25µg tRNA.

Um die Spezifität der Bindung zwischen OligoU16 und L7M zu zeigen, wurde in Konkurrenzexperimenten nun unmarkiertes OligoU16 zu äquimolaren Mengen an L7M und tRNA sowie zu radioaktiv markierter OligoU16-RNA titriert. Der Shift wurde bei äquimolaren Mengen an unmarkiertem OligoU16 gestört und konnte bei höheren Mengen vollständig unterbunden werden (Abb. 28A).

Theoretisch könnte der Shift auch eine Bindung zwischen tRNA und OligoU16 widerspiegeln. Um dies auszuschließen, wurde Protease zugesetzt. Da dies die Bindung zerstörte, handelt es sich bei dem Shift um eine RNA-Protein-Bindung (Abb. 28B).

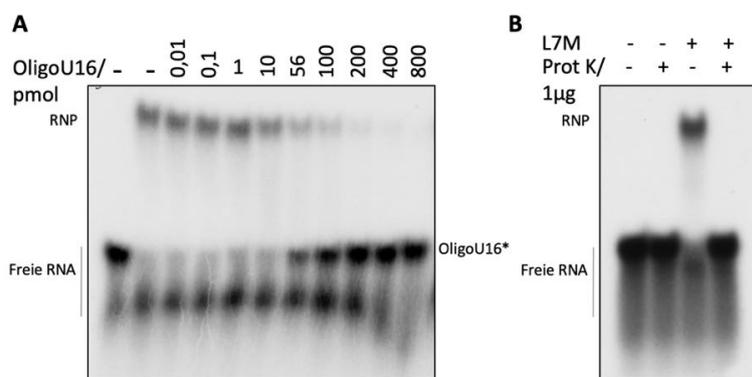


Abbildung 28: EMSAs zur Charakterisierung des L7M – U16-tRNA – mRNPs. A) Konkurrenz des radioaktiv markierten OligoU16-mers (OligoU16*) durch Titration von nicht-markierter OligoU16-RNA. OligoU16* wurde in gleichbleibenden Mengen von 90pmol eingesetzt, eine Konkurrenz ist ab einer Menge von 56pmol nicht-markierter OligoU16-RNA erkennbar. B) Überprüfung der Proteinkomponente des RNPs. OligoU16* und tRNA wurden in An- bzw. Abwesenheit von L7M sowie Proteinase K inkubiert. In Anwesenheit des Enzyms wird das RNP zerstört, was auf einen RNA-Protein – Komplex hindeutet. Prot K: Proteinase K; OligoU16: nicht-radioaktiv markierte OligoU16-RNA; OligoU16*: radioaktiv markiertes OligoU16-mer.

Somit konnte zunächst gezeigt werden, dass L7M mit Hilfe von tRNA an OligoU16 bindet. Die Länge der OligoU-RNA spielt bei der Bindung eine Rolle und es handelt sich um eine spezifische RNA-Protein – Bindung zwischen L7M und OligoU16, was durch Protease-Behandlung sowie Titration unmarkierter OligoU16-RNA gezeigt wurde.

2.4.2.2. Das Larp7-Modul bindet an *Stem Loop 4 (7SK-SI4)* der 7SK-RNA

Nachdem eine erfolgreiche Bindung an einen OligoU-RNA - Strang etabliert war, sollte dieses Ergebnis nun auf die natürliche RNA-Zielsequenz übertragen werden. Laut Markert et al. (216) erfolgt die Bindung von Larp7 an 7SK-SI4, daher wurde in folgenden Experimenten diese Stamm – Schleife - Struktur verwendet (Abb. 29A). Die Bindungsstudien wurden mit und ohne

tRNA durchgeführt. Es zeigte sich, dass Zugabe von tRNA die Spezifität des Shifts erhöht (Abb. 29B). Ohne tRNA erfolgten unspezifische zusätzliche Bindungen in Form eines zusätzlichen Shifts sowie eines „Schmiere“; durch Zusatz von tRNA konnten diese unspezifischen Bindungen zu einem spezifischeren Shift modifiziert werden. (Abb. 29B).

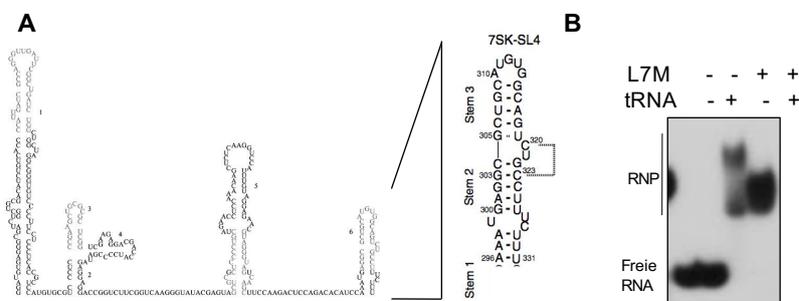


Abbildung 29: EMSA zur Charakterisierung von 7SK-SI4 als Zielsequenz von L7M. A) Schematische Darstellung der 7SK – RNA sowie 7SK-SI4 unter Berücksichtigung der Sekundärstruktur (Wiedergabe nach Durney M.A. et al. 2010. J Mol Biol. Dec 10;404(4):555-67 (236), mit Genehmigung von Elsevier und Marz M. et al. 2009. Mol Biol Evol. Dec;26(12):2821-30 (249), mit Genehmigung von Oxford University Press). B) EMSA mit L7M und radioaktiv markierter 7SK-SI4 – RNA in An- oder Abwesenheit von tRNA.

Weitere Titrationsexperimente zeigten, dass eine Bindung ohne tRNA prinzipiell stattfand, jedoch bei Zugabe von L7M über die äquimolare Menge hinaus in den bereits beobachteten unspezifischen Doppelshifts endete (Abb. 30). Durch Zugabe von tRNA (Abb. 30C), nicht jedoch BSA (Abb. 30B) konnte die Spezifität der Shifts maximiert werden, was sich in einem einzigen klaren Signal zeigte. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurde tRNA zu gleichbleibenden Mengen an L7M titriert (Abb. 30D). Dies führte ebenfalls zur Erhöhung der Spezifität des Shifts.

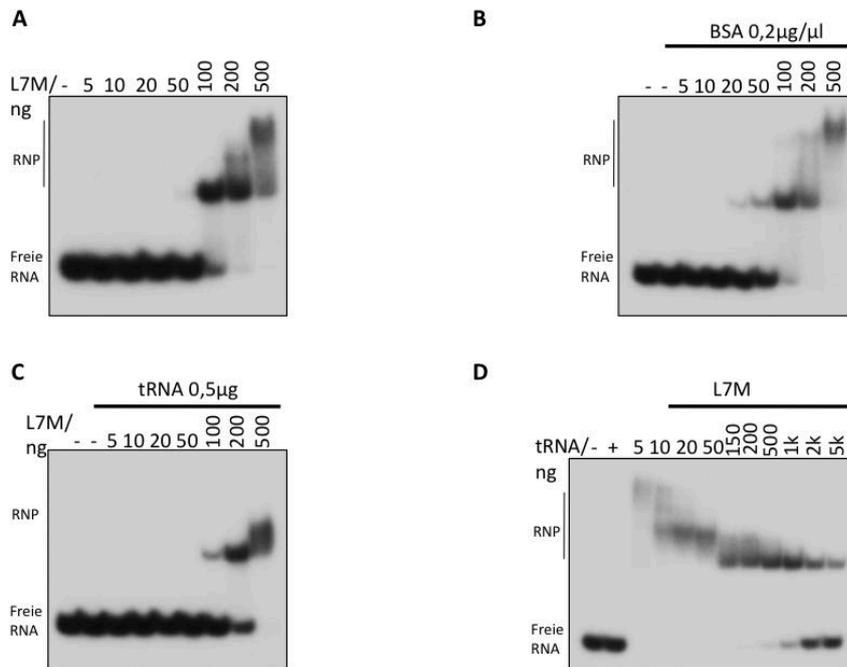


Abbildung 30: EMSAs zur Charakterisierung des Einflusses von tRNA auf die Ausbildung des L7M – 7SK-SI4 – mRNPs. A) Ausbildung des mRNPs durch Titration von L7M in Abwesenheit von tRNA. B) Ausbildung des mRNPs bei Titration von L7M in Anwesenheit von BSA. C) Ausbildung des mRNPs bei Titration von L7M in Anwesenheit von tRNA. D) Auswirkungen steigender Mengen von tRNA auf die Bildung des L7M – 7SK-SI4 – mRNPs.

Es wurde somit zunächst gezeigt, dass L7M in äquimolaren Mengen an 7SK-SI4 bindet, wobei unspezifische Bindungen, die bei einer höheren Protein/RNA-Ratio erfolgen, durch tRNA minimiert werden können. Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob weitere Additiva ebenfalls einen Einfluss auf den Shift haben bzw. ob unspezifische Bindungen weiter minimiert werden können. Wie im Folgenden gezeigt wird, haben auch Arginin und Heparin einen Einfluss auf das Bindeverhalten des RNPs.

2.4.2.3. Heparin und Arginin erhöhen die Spezifität der RNA-Protein-Bindung

Um die Spezifität der Bindung weiterhin zu steigern, was für etwaige Kristallisations-Experimente relevant ist, wurde im nächsten Schritt der Einfluss von Heparin und Arginin auf die Bindung untersucht. Durch Heparin konnte eine Erhöhung der Spezifität der Bindung zwischen 7SK-SI4 und L7M erreicht werden, mit steigenden Konzentrationen wurde jedoch die Stabilität des RNP beeinträchtigt (Abb. 31A). Arginin als weiteres Additivum wurde gewählt, da 7SK-SI4 in seiner Struktur dem Tar-Element HI-viraler RNA ähnelt, das maßgeblich an der Kontrolle der viralen Transkription beteiligt ist (233 - 236). Beide RNAs verfügen über eine Arginin-Bindetasche und TAR ändert nach Bindung der Aminosäure seine Struktur. Um

zu überprüfen, ob die Bindung von Arginin einen Einfluss auf das Verhalten der RNP-Bildung zwischen 7SK-SI4 und L7M hat, wurde ein Titrationsexperiment durchgeführt und die Aminosäure in steigenden Konzentrationen zugegeben, wobei L7M stets im Überschuss zu 7SK-SI4 vorlag (Abb. 31B). Interessanterweise konnten hierdurch drei verschiedene Shifts etabliert werden. Bei höheren Konzentrationen von Arginin wurden alle Bindungen, ähnlich wie bei Heparin, zerstört.

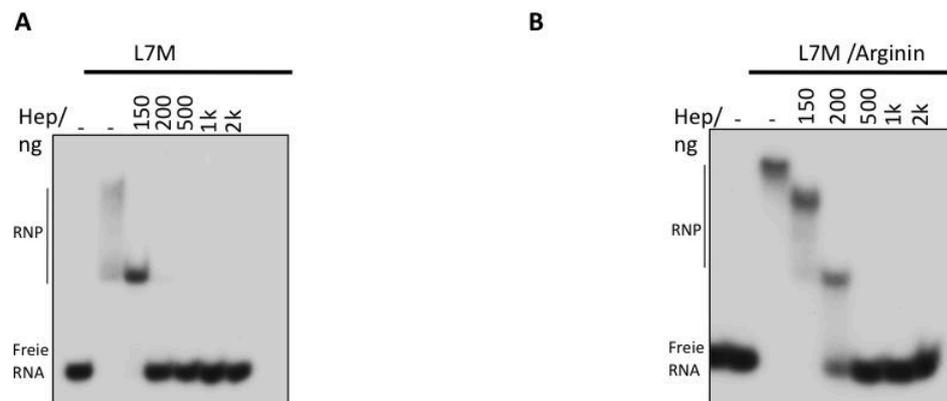


Abbildung 31: Erörterung des Einflusses von Heparin bzw. Arginin auf das L7M – 7SK-SI4 – RNP durch EMSA. A) Titration von Heparin zum RNP führt zunächst zu einer gut definierten Bindung, destabilisiert diese jedoch in steigenden Konzentrationen. B) Titration von Arginin zum RNP führt zur Ausbildung von drei RNPs verschiedener Größen. In höheren Konzentrationen werden diese ebenfalls zerstört.

Schließlich wurden zur Bestimmung einer K_D und zur Evaluierung einer minimalen zur Bindung erforderlichen Stamm-Schleife – Struktur Titrationsexperimente durchgeführt, bei denen L7M einmal zum erwähnten 7SK-SI4 (Abb. 32A) und zum anderen zu einer weiter verkürzten Version 7SK-SI4/2 in steigenden Konzentrationen gegeben wurde (Abb. 32B). Die Minimalversion des 7SK-SI4 - Konstruktes umfasst lediglich eine Auswölbung und eine Schleife. Die Ergebnisse zeigen, dass L7M auch dieses Konstrukt bindet, jedoch mit einer ca. dreifach höheren K_D .

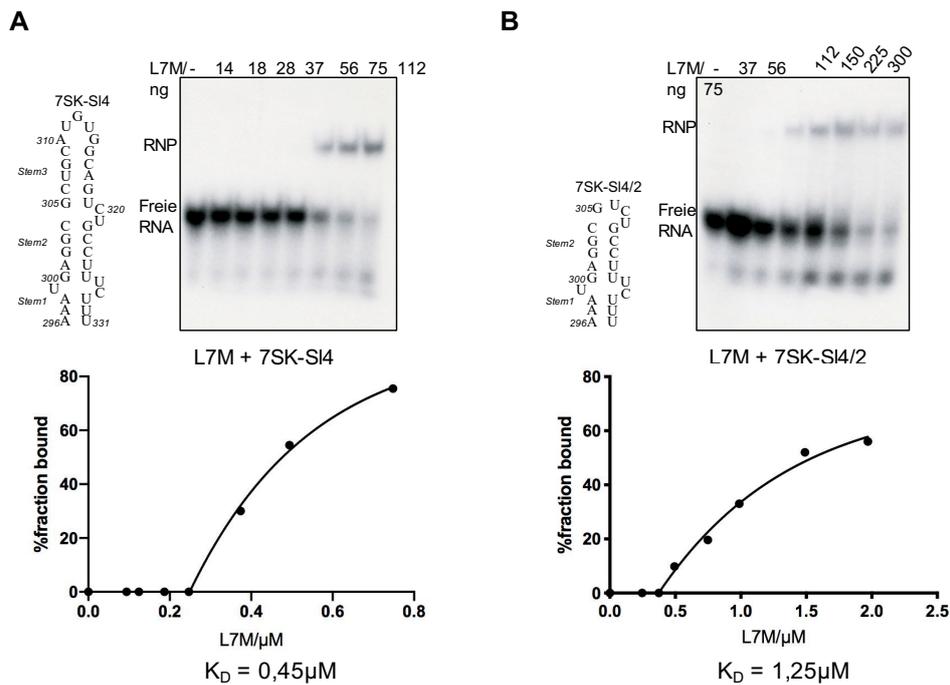


Abbildung 32: EMSA zur Bestimmung der K_D von 7SK-SI4 sowie eines Minimalkonstruktes 7SK-SI4/2 mit L7M. A) Sekundärstruktur von 7SK-SI4 (236), EMSA zur Bestimmung der K_D von 7SK-SI4 und L7M sowie Titrationskurve und berechnete K_D . B) Schematische Darstellung von 7SK-SI4/2, EMSA zur Bestimmung K_D von 7SK-SI4/2 und L7M sowie Titrationskurve und berechnete K_D . Sekundärstrukturen in A) und B) modifiziert nach Durney M.A. et al. 2010. J Mol Biol. Dec 10;404(4):555-67 (236). Software zur Erstellung der Titrationskurven: GraphPad Prism Version 8.1.1 für macOS, GraphPad Software, San Diego, California USA, www.graphpad.com

Die Bestimmung der K_D zeigt somit, dass ein längeres Konstrukt eine höhere Affinität zu L7M aufweist und für Kristallisationsstudien in Betracht gezogen werden sollte.

In diesem Abschnitt wurde die Bindung des L7M zunächst mit OligoU16 und dann mit Minimal-Konstrukten der 7SK-RNA untersucht und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass tRNA, Heparin und Arginin einen signifikanten Einfluss auf die Spezifität der Bindung haben. Weiterhin spielt auch hier die Länge der RNA eine Rolle. Die natürliche Ziel-RNA 7SK-SI4 kann minimiert werden, jedoch auf Kosten der Bindungsaffinität. Die Versuche können somit als Grundlage für weitere Bindungsstudien sowie Kristallisationsexperimente dienen.

3. Diskussion

3.1. TIAR als TOP – interagierender Faktor

Nachdem sich zeigte, dass für die Coregulation der Translation einer Gruppe von Proteinen, die selbst Teil des Translationsapparates sind, das TOP-Motiv unmittelbar nach dem Cap der mRNA verantwortlich ist, fand und findet nach wie vor eine intensive Suche nach den Faktoren statt, die an diese Sequenz binden und somit maßgeblich an der Regulation beteiligt sind. In dieser Arbeit wurde TIAR als TOP-interagierender Faktor identifiziert und zusammen mit Larp1 näher auf seine Rolle in der *TOP response* untersucht. Im Folgenden sollen zunächst die Ergebnisse dieser Experimente diskutiert werden.

3.1.1. TIAR bindet *in vitro* direkt an das TOP-Motiv

Damgaard et al. evaluierten TIAR als putativ TOP bindenden Faktor und zeigten, dass das Protein durch Interaktion mit der 5'UTR an der *TOP response* beteiligt ist (185). Sie konnten diese Eigenschaft jedoch nicht direkt mit dem TOP-Motiv, sondern nur mit der gesamten 5'UTR in Zusammenhang bringen. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass TIAR aus humanen Zellextrakten direkt an die pyrimidinreiche Sequenz der 5'UTR verschiedener ribosomaler mRNAs bindet. Dieses zunächst durch Affinitätschromatografie gefundene Ergebnis wurde durch *in vitro*-Translationsexperimente bestätigt. Somit konnte in dieser Arbeit eine etwaige Beteiligung durch TIAR an der *TOP response* zunächst weiter durch Involvierung des TOP-Elements auf RNA-Ebene definiert werden. Dies wird dadurch gezeigt, dass Mutationen im Bereich des TOP-Motivs, nicht jedoch in der nachfolgenden RNA-Sequenz der 5'UTR die Bindung verhindern.

Bereits vorher wurde in zahlreichen Arbeiten gefunden, dass TIA-1/TIAR an diverse U-reiche Sequenzen binden, z. B. während des Splicing-Prozesses (183, 185 - 191, 250). Auch *in vitro* wurden verschiedene RNA-Oligomere in Bezug auf ihre Bindungsaffinitäten untersucht. Das hier in der Arbeit zunächst untersuchte Bindungsverhalten steht nicht im Widerspruch zu Literaturwerten. Tabelle 4 stellt Literaturwerte bereits erörterter K_{DS} den in dieser Arbeit gefundenen gegenüber, Tabelle 5 fasst die in dieser Arbeit erörterten K_{DS} zusammen.

3.1.2. Vergleich der ermittelten Bindungskonstanten mit Literaturwerten

In Bezug auf die humanen TIAR-Konstrukte lassen sich Vergleiche zu Literaturwerten ziehen. Wie in der Einleitung im Detail beschrieben, wurden das Bindungsverhalten verschiedener TIAR-Konstrukte sowohl bezüglich ihrer Bindung an natürliche Zielsequenzen als auch bezüglich anderer RNA-Oligos untersucht (185 - 191, 250). Tabelle 4 stellt relevante Werte aus der Literatur denen in dieser Arbeit gefundenen gegenüber. Sowohl Konstrukt hsT1-3 mit einer K_D von $0,2\mu\text{M}$ (L32TOP) als auch Konstrukt hsT2-3 (K_D $0,14\mu\text{M}$, L32TOP) liegen in Bereichen, die den Literaturwerten nicht widersprechen. Betrachtet man die natürlichen Zielsequenzen wie die fas – prä-mRNA *splice site* (188), so scheint TIAR besser an das TOP – Motiv zu binden. Ein Vergleich mit TIAR-Konstrukten anderer Spezies erscheint nicht sinnvoll, da z.B. insgesamt die K_D s bei ctTIAR-Konstrukten wesentlich niedriger liegen. Die wichtige Schlussfolgerung aus diesem Ergebnis ist, dass für etwaige Kristallisationsversuche zunächst Konstrukte von ctTIAR in Betracht zu ziehen sind. Auch kann man durch Vergleich der Konstanten erkennen, dass die K_D bei zunehmender Länge des RNA-Oligos abnimmt (37nM / 11mer vs. 9nM / 15mer). Dies ist ebenfalls relevant für Kristallisationsversuche. Somit zeigen die Ergebnisse erstens, dass das TIAR-Protein aus *C. thermophilum* wesentlich besser an das TOP-Motiv bindet als das korrespondierende Konstrukt des humanen TIAR-Proteins (37nM vs. $0,2\mu\text{M}$) und zweitens, dass man genau abwägen muss zwischen minimaler Länge des RNA – Oligos zum Zwecke der Verbesserung der Kristallisationsbedingungen und abnehmender Bindungsaffinität mit kürzer werdenden Oligomeren.

TIAR - Konstrukt	RNA - Oligo	KD	Ref.
hsT1-3	L32TOP	0,2μM	diese Arbeit
	Fas – prä – mRNA splice site	0,8 μ M	188
	U20	a) 0,5nM; b) 0,24 μ M	188
hsT2-3	L32TOP	0,14μM	diese Arbeit
TIA-1 RRM2-3	U-rich 17mer	0,104 μ M	250
	(ACUCC)x4	0,418 μ M	250
	(GCUCC)x4	0,958 μ M	250
	c-rich natural	3,5 μ M	250

Tabelle 4: Gegenüberstellung der KDs von hsT1-3 und hsT2-3 mit diversen Literaturkonstanten.

TIAR -Konstrukt	RNA – Oligomer	K _D
hsT1-3	L32TOP	0,2 μ M
hsT2-3	L32TOP	0,14 μ M
ctT1-3	L32TOP (11mer)	37nM
ctT1-3	eEF1BTOP (15mer)	9nM
drT1-3	L32TOP	0,46 μ M

Tabelle 5: Zusammenfassung der erörterten KDs der in dieser Arbeit verwendeten TIAR-Konstrukte sowie der entsprechend eingesetzten RNA-Oligomere.

3.1.3. RRM2 und 3 sind ausreichend für die RNA –Bindung

In den Experimenten konnte keine Verbesserung der Bindung durch Addition der RRM1 zu den TIAR-Konstrukten festgestellt werden. Es scheint zumindest bei den humanen Konstrukten im Gegenteil sogar eine geringfügige Zunahme der K_D zu geben, wenn man hsT1-3 mit hsT2-3 vergleicht (0,2 μ M bzw. 0,14 μ M). RRM1 kann somit für etwaige Kristallisationsversuche weggelassen werden.

3.1.4. Der Einfluss der RNA – Oligomer – Länge auf die Bindungsaffinität zu TIAR deutet auf deren Kontrollfunktion hin

In der vorliegenden Arbeit wird klar gezeigt, dass die Länge der RNA-Oligomere einen Einfluss auf die Bindungsaffinität zwischen den TIAR-Konstrukten und den U-reichen RNA– Sequenzen hat: Je kürzer das RNA-Oligomer, desto schwächer wird die Bindung. Nicht nur die Bindungskonstante steigt, die Bindung wird auch schwächer, was durch Versuche mit Heparin gezeigt werden konnte. Dieses Bindungsverhalten deutet klar darauf hin, dass die Länge des TOP-Motivs eine wichtige Funktion im Bereich der Translationsregulation ausübt. Wenn kürzere TOP-Motive schlechter gebunden werden und somit womöglich schwächer inhibiert werden als andere TOP-mRNA – Spezies mit längeren TOP-Motiven, könnte das bedeuten, dass sie z.B. auch während einer Stresssituation aktiver sind, oder auch, dass sie eher wieder aktiviert werden als andere TOP-RNAs. Auf diese Weise kann die globale TOP-mRNA – Translationskontrolle maßgeblich verfeinert werden: Verschiedene TOP-RNAs werden vielleicht zeitlich verzögert inhibiert bzw. aktiviert, was der Zelle eine sensitivere Reaktion auf Umweltbedingungen ermöglicht. Eine schematische Darstellung dieser Hypothese ist in Abbildung 33 dargestellt. Weiter unten wird in Abbildung 34 die Inhibition der TOP-RNAs durch TIAR nach Aktivierung durch mTOR dargestellt (Abb. 34A).

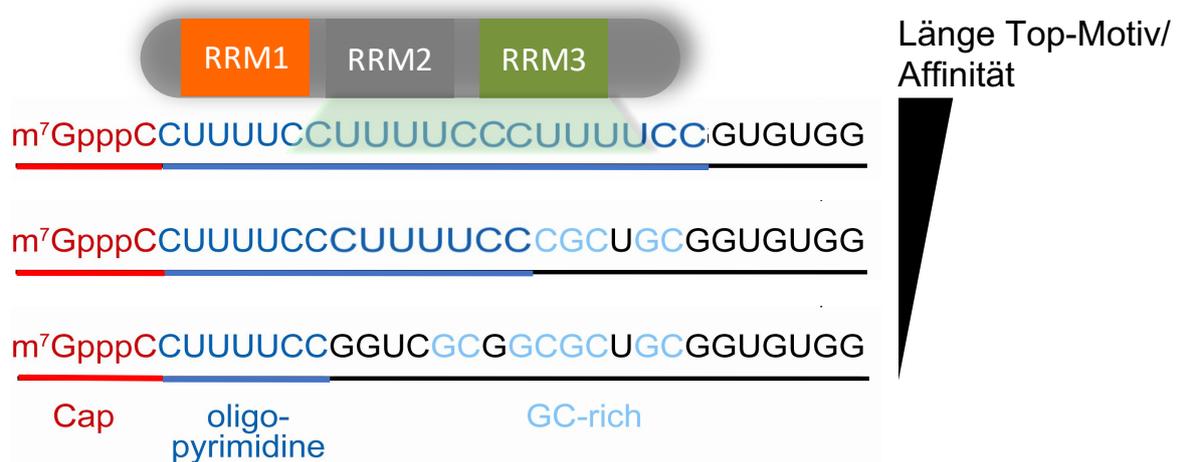


Abbildung 33: Schematische Darstellung der Bindung von TIAR an TOP RNAs verschiedener Länge. In die Bindung sind die Domänen RRM2 und RRM3 involviert. Die Affinität der Bindung steigt, je länger die TOP-Motive der 5'UTRs sind.

Bisher konnte keine klare Zuordnung von TOP-Motiven verschiedener Länge zu bestimmten Funktionsbereichen oder Ähnlichem hergestellt werden. Interessant ist in diesem

Zusammenhang jedoch, dass Shibui-Nihei et al. zeigen konnten, dass die Länge der TOP-Motive einer TOP-RNA bereits auf Transkriptionsebene reguliert werden kann: Pyrimidinreiche DNA-Sequenzen führen an der Transkriptionsstartseite zu einem „Rutschen“ der Polymerase, was zu Transkripten unterschiedlicher Länge der 5'-UTR führt (251). Somit könnte bereits auf Transkriptionsebene reguliert werden, welches regulatorische Verhalten die TOP-RNA durch die Länge ihres TOP-Motivs an den Tag legt. Hier sei auch darauf hingewiesen, dass durch diesen Mechanismus die in den Datenbanken notierten TOP-Sequenzen womöglich nicht die realen Sequenzen zu jedem Zeitpunkt eines Zellzyklus widerspiegeln.

3.2. 14-3-3ε als TOP – interagierender Faktor

In Versuch 2.2. wurde 14-3-3ε durch Tobramycin-Affinitätschromatographie mit anschließender Anionenaustausch-Chromatographie als mit dem TOP-Cap interagierender Faktor identifiziert. Das Protein erscheint sehr weit unten bzw. mit einem niedrigen Score in der Trefferliste; hierbei ist zu bedenken, dass keine einzelne Bande ausgeschnitten wurde, sondern ein Bereich von 20 – 30kDa, da die Banden zwar sauber getrennt und klar erkennbar waren, jedoch sehr dicht beieinander lagen.

Der Faktor erscheint unter den gefundenen Proteinen hinsichtlich der in der Einleitung beschriebenen Involvierung von 14-3-3ε in die mTOR-Signalkaskade interessant. Wie dort bereits beschrieben, interagiert 14-3-3ε nach Phosphorylierung durch AMPK mit Raptor und inhibiert mTOR (286), was zum Zellzyklusarrest führt. Während 14-3-3ε somit nach bisherigen Kenntnissen *upstream* in der mTOR-Signalkaskade anzusiedeln war, würden die hier gezeigten Ergebnisse eher darauf hindeuten, dass 14-3-3ε (zusätzlich) ein Target von mTOR bzw. *downstream* der Kaskade eine oder mehrere Funktionen ausübt. In diesem Zusammenhang ist interessant zu erwähnen, dass 14-3-3ε in einer Publikation von Meek et al. bereits 2004 im Rahmen einer Proteomanalyse unter vielen weiteren Proteinen als Interaktor von Larp1 (damals als KIAA0731 aufgeführt) identifiziert wurde (287). Sollte sich diese Interaktion im Rahmen weiterer Experimente bestätigen, könnte dies auf eine Funktion von 14-3-3ε in der Regulation der *TOP response* hindeuten.

Weiterhin konnte in einer aktuellen Publikation gezeigt werden, dass in Zelllinien des multiplen Myeloms 14-3-3ε aktivierend auf die Translationsinitiation sowie die Proteinsynthese wirkt, da 14-3-3ε sowohl den TSC1/TSC2 - Komplex bindet und inhibiert als

auch direkt an mTORC1 bindet, wodurch mTORC1 phosphoryliert wird (288). Depletion von 14-3-3 ϵ führte in der zitierten Arbeit zu einer Reduktion der Proteinsynthese von 50%, wohingegen 14-3-3 ϵ – Überexpression eine signifikante Steigerung der Proteinsynthese bewirkte. Eine zusätzliche Funktion von 14-3-3 ϵ in der Translationsregulation der TOP-RNAs wäre kongruent mit diesen Ergebnissen und würde den massiven Einfluss von 14-3-3 ϵ auf die Proteinsynthese untermauern. Es soll nicht unerwähnt bleiben, dass neben 14-3-3 ϵ eine Reihe von Untereinheiten des Proteasoms identifiziert wurden (Tabelle 3), so dass die Untersuchung eines Zusammenhanges sicherlich auch hier interessant wäre.

3.3. Larp 1 als TOP – interagierender Faktor

Larp1 wurde in dieser Arbeit näher untersucht, nachdem das Protein von Roux et al. als TOP–interagierender Faktor identifiziert worden war (214). Bereits vorher erschien eine Publikation, in der gezeigt wurde, dass der Faktor vorrangig mit TOP-RNAs interagiert, allerdings über deren polyA-Schwanz (213). Auch erschien während der Fertigstellung dieser Arbeit eine Publikation, die zeigt, dass LARP1 direkt mit dem Cap der TOP-RNAs interagiert (215).

Nach wie vor unbekannt waren zunächst die Auswirkungen von Larp1 auf die *TOP response*, so dass diese näher evaluiert wurden. Hier konnte unter Abschnitt 2.2. gezeigt werden, dass Larp1 unter gestärkten Bedingungen in HEK 293-Zellen an das TOP-Motiv bindet. Dies führt zu der Vermutung, dass es sich um einen inhibierenden Faktor handelt. Die Frage, ob Faktoren, die die *TOP response* beeinflussen, inhibierend oder aktivierend wirken, wird schon lange diskutiert (s. Einleitung). In einem hypothetischen Modell würde Larp1 unter Stressbedingungen wie Nahrungsmangel (und vermutlich weiteren noch zu erörternden) durch mTOR direkt oder indirekt aktiviert werden, so dass daraufhin die Bindung an das TOP–Motiv erfolgt. Dies könnte im einfachen Fall zu einer Inhibierung der Translationsinitiation führen, indem z.B. die Bindung aktivierender Faktoren verhindert wird bzw. diese durch Larp1 verdrängt werden. Ein Schema der TOP-Inhibition durch LARP1 und mTOR ist in Abbildung 34B dargestellt. Ein weiteres Szenario wäre, dass durch die Bindung die Lokation der betreffenden RNAs beeinflusst wird. Wie schon bei TIAR beschrieben (s. Einleitung), wurden TOP-RNAs unter Stressbedingungen in *Stress granules* gefunden (185, 237). Diese räumliche Konzentration könnte dem Translationsapparat den Zugang zu den mRNAs verwehren.

Gezeigt werden konnte bisher sowohl die Assoziation mit dem 5'-Ende (215, 252, 291, 292) als auch mit dem 3'-Ende der TOP-RNAs (213, 291), was darauf hinweisen könnte, dass Larp1 an der Zirkularisierung der TOP-RNAs beteiligt ist. Bezüglich des oben beschriebenen hypothetischen Modells konnte außerdem Larp1 bereits als Zielprotein für mTOR identifiziert werden: Larp1 bindet an Raptor und wird durch mTOR direkt phosphoryliert (214,252,291). Wie kristallographisch gezeigt wurde, bindet Larp1 über DM15 an das Cap sowie das darauf folgende Cytidin der TOP-RNAs und verhindert bei Inhibierung von mTOR die Assoziation der RNAs mit eIF4e (215).

Einem weiteren Modell zufolge muss berücksichtigt werden, dass die Translationskontrolle der TOP-RNAs unabhängig von Raptor verläuft (293-295). Hier würde Larp1 unter Nahrungsmangel in unphosphorylierter Form an TOP-RNAs binden und deren Translation inhibieren, ohne, dass mTOR-abhängige Signale involviert wären (292). Nach Phosphorylierung durch mTOR dissoziiert Larp1 vom 5'-Ende und assoziiert als Translations – Aktivator mit dem 3'-Ende (291). Auch dies stünde in Einklang mit den Ergebnissen dieser Arbeit, die zeigen, dass Larp1 unter *starved conditions* sowie unter Aminosäuremangel an das 5'-Ende einer TOP-RNA bindet (Abb. 24), nicht jedoch unter *ns (not starved)* - Bedingungen.

Larp1 ist auch an der Polyadenylierung und somit Erhöhung der Stabilität von TOP-RNAs beteiligt, während mTOR inhibiert ist (296). Umgekehrt führt die Depletion von Larp1 zu verminderter TOP-RNA – Stabilität sowie einer verminderten Anzahl an ribosomalen Proteinen (213, 214, 252, 291, 296). Weitere Experimente werden interessante Einsichten in das komplizierte Zusammenspiel zwischen Larp1 und verschiedenen weiteren Faktoren hinsichtlich der TOP-RNA – Translationskontrolle liefern.

3.3.1. Ausblick: Larp1 und die TOP response

Wie auch bezüglich weiterer putativ TOP-bindender Faktoren scheint die Rolle von Larp1 in der Regulation der TOP-RNA – Translation komplex. Diese Arbeit liefert Hinweise, dass Larp1 unter bestimmten inhibierenden Bedingungen wie Serum- und Aminosäuremangel spezifisch an das TOP-Motiv bindet. Weitere Experimente zur Evaluierung der Rolle von Larp1 sind nötig, um den Mechanismus der Regulation durch Larp1 zu klären. In gestarvten Zellen kann über FISH und Fluoreszenzmikroskopie eine potentielle Co-Lokation der mRNAs und Larp1 erörtert werden. Weitere *in vitro*-Translationsassays können die Hinweise auf eine Funktion als Inhibitor verstärken. Ein wichtiger Versuch ist der *knock down* von Larp1: Sollte das Protein

spezifisch die TOP-Translation inhibieren, so sollte in *Larp1 - knock down*-Zellen die Translation auch unter Stressbedingungen weiterhin stattfinden.

Auch ist zu evaluieren, ob *Larp1* unter spezifischen Stressbedingungen aktiviert wird oder eine generelle Rolle in der *TOP response* spielt. Auch hier können Experimente in Zellkultur Hinweise geben. *Knock down*-Zellen können so z.B. unter Aminosäuremangel oder Entzug von Wachstumsfaktoren herangezogen werden. Interessant wären hier auch Versuche unter weiteren Bedingungen wie Hitze- oder Kälteschock.

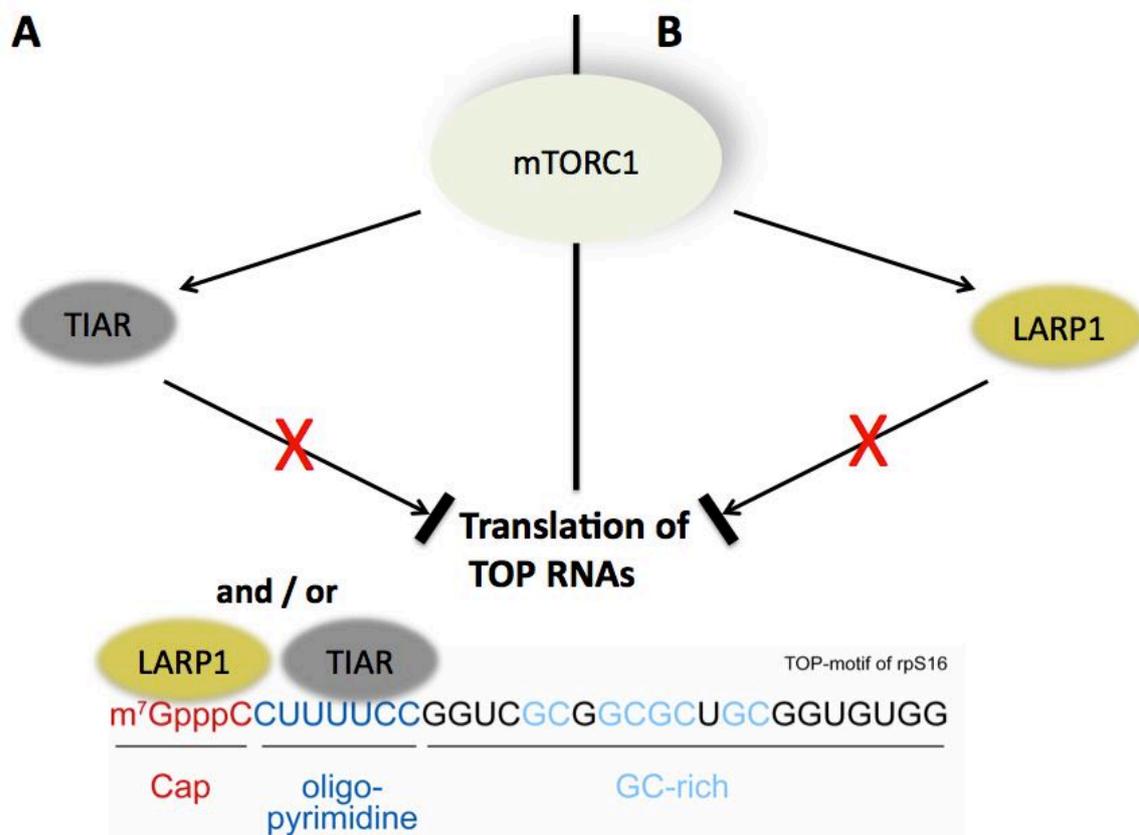


Abbildung 34: Darstellung der TOP – Translations-Inhibition durch TIAR und LARP1 in Abhängigkeit von mTOR. A) TIAR bindet und inhibiert TOP RNAs, nachdem mTOR inaktiviert wird. B) LARP1 bindet unter dem Einfluss von mTOR an das Cap der TOP RNAs und inhibiert deren Translation.

3.4. Ausblick: Erörterung des Einflusses putativ TOP – bindender Faktoren auf die Regulation der TOP – RNAs

In dieser Arbeit wurde die Bindung von TIAR und *Larp1* an TOP-Sequenzen untersucht. Von TIAR konnte gezeigt werden, dass der Faktor *in vitro* eine Rolle in der Regulation der TOP –

RNAs spielt, wobei er vermutlich als Inhibitor wirkt (185, 237). Während dieser Arbeit erschien außerdem eine Publikation, die zeigt, dass Larp1 seine inhibierende Rolle als Ziel von mTOR ausübt (252). Dies ist schematisch in Abb. 34B dargestellt. Die Ergebnisse dieser Arbeit wie in Abbildung 34 gezeigt werfen die interessante Frage auf, ob hinsichtlich der TOP-RNA – Regulation Interaktionen zwischen Larp1 und TIAR bestehen und falls ja, unter welchen Bedingungen diese stattfinden.

Wie in der Einleitung beschrieben, wurden auch andere Faktoren untersucht, die ebenfalls an TOP-Motive binden und inhibierende oder auch aktivierende Funktionen in der TOP – Response haben. Somit scheint offensichtlich, dass entweder die Suche nach dem „echten“ TOP-Faktor noch nicht abgeschlossen ist oder aber, dass mehrere Faktoren in die Regulation eingebunden sind. Möglich und auch durch Literatur gestützt wäre zum Beispiel, dass je nach Umgebungsbedingungen verschiedene Faktoren aktiviert werden. Weiterhin könnten verschiedene Zelltypen unterschiedliche Regulationsmodi aufweisen. Die Konsequenz hieraus ist, dass man gezielt Faktoren unter verschiedenen Bedingungen sucht, die an das TOP-Motiv binden und einen Einfluss auf die *TOP response* haben. Auf der anderen Seite kann man verschiedene Zelltypen den gleichen Bedingungen aussetzen und hier die Bindungsfaktoren evaluieren.

Auch die Funktion des Caps bleibt nach wie vor interessant. Wie bereits erwähnt, wurde LARP1 an anderer Stelle als Cap-bindender Faktor der TOP RNAs identifiziert (215). Bereits früh in der TOP-RNA – Forschung konnte gezeigt werden, dass die Regulation nur funktioniert, wenn sich unmittelbar nach dem Cap ein Cytosin und kein Guanin, Adenin oder Uracil befindet (140-143, 158). Dies deutet darauf hin, dass regulierende Faktoren das Cap bzw. unmittelbar benachbarte Regionen in die Bindung mit einbeziehen. Auch vorstellbar ist, dass ein alternativer Cap-Komplex an TOP-RNAs bindet. In anderen Fällen konnte eine solche Situation bereits demonstriert werden: so konnte z.B. gezeigt werden, dass für bestimmte RNAs, die unter hypoxischen Bedingungen translatiert werden, ein alternativer Cap-bindender Komplex existiert (253).

Hat man bei Faktoren wie TIAR oder Larp1 eine Bindung an das Cap bzw. das TOP-Motiv sowie eine mögliche Rolle in der *TOP response* demonstriert, bleibt zu klären, ob diese nur unter bestimmten Bedingungen oder generell zum Einsatz kommen.

Cap-Bindeproteine können über Affinitätschromatographie an entsprechenden 5-UTRs angereichert und über Cap-Analoga eluiert werden. Allerdings ergeben sich hier technische Probleme: So ist die Transkriptions- und Cappingeffizienz bei Transkripten, die mit Cytosin starten, weit geringer als bei mit Guanosin bzw. Adenosin startenden RNAs. Hier ist es daher nötig, weit größere Transkript- bzw. Extraktmengen einzusetzen, um eine relevante Konzentration zu erreichen. Auch die Aufreinigungsstrategie muss sorgfältig evaluiert werden, um Verunreinigungen durch unspezifische Proteine zu minimieren.

Ein weiteres Problem ergibt sich dadurch, dass man im Prinzip Cap und TOP-Motiv zusammen berücksichtigen muss. Beide haben ihre Relevanz in vielen Experimenten demonstriert. Ein Faktor, der an beide Elemente parallel bindet, könnte durch Elution nur mit Cap-Analoga oder TOP-Element nicht aufreinigbar sein. Hier müssen andere Strategien gewählt werden, z. B. Elution der gesamten mit TOP-Motiv bestückter Säule parallel zu einer Kontrollsäule mit mutierten TOP-Motiven oder auch ungecappter RNA.

3.5. Bindungsstudien zu Larp 7

Larp7 bindet an das 3'-Ende der 7sk und bildet so die Voraussetzungen für die Rekrutierung weiterer Bindungspartner wie pTEfB (217). Die Larp7-7SK – Bindung stabilisiert außerdem das 7SK-snRNP (216). In *in vivo assembly*-Experimenten wurden RNA-Determinanten evaluiert, die für die Bindung essentiell sind (254). Bei diesen Experimenten konnte zunächst gezeigt werden, dass alle RNA-Elemente, die für die Bindung von Larp7 an 7SK benötigt werden, durch SL4 sowie das 3'-OligoU-Ende gegeben sind. Entfernt man den basalen, den mittleren Stamm oder auch die terminale Stamm-Schleife, so erfolgte keine Bindung mehr an Larp7. Auch Mutationen in den Stammstrukturen unterbanden die Interaktion, allerdings konnte diese wieder hergestellt werden, wenn die zu den Mutationen komplementären Basen auf der jeweiligen Gegenseite des Doppelstranges eingeführt wurden, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Helix-Struktur und nicht die Sequenz maßgeblich für die Bindung sind. Die Sequenz der terminalen Schleife erwies sich jedoch als wichtig für die Bindung. Auch die Deletion der internen Ausstülpung verhinderte die Bindung, nicht jedoch die Mutation selbiger. Auch hier erwies sich somit die Präsenz der Ausstülpung als wichtig, nicht die genaue Sequenz.

Wenn somit die Struktur des hairpins sowie Sequenz-Elemente der terminalen Schleife wichtig für die Larp7-Bindung sind, stellt sich die Frage, warum in dieser Arbeit sogar mit einem

verkürzten hairpin ohne terminalen *stem loop* eine (wenngleich ineffektivere) Bindung etabliert werden konnte. Hier gibt eine weitere Arbeit Aufschluss, in der die Struktur des La-Moduls von Larp7 in Verbindung mit dem 7SK-SI4 aufgeschlüsselt wurde (255). Die Autoren co-kristallisierten das La-Modul mit dem 3'-Ende der 7SK, das SI4 umfasst. Die gewählte RNA umfasste die Basen 300-332, jedoch war der Hauptteil der RNA degradiert und die Kristall-Struktur offenbarte die Bindung des L7M an die letzten fünf Monomere des RNA-3'-Terminus. Zusätzlich konnten die Autoren durch Bindungsassays, Footprinting und SAXS zeigen, dass die Spezifität der Larp7-7SK – Bindung von RRM2 am c-Terminus von Larp7 ausgeht, welche an die terminale Schleife von SI4 bindet. Wie weiter oben erörtert, spielt hier die Integrität der Sequenz eine wichtige Rolle. Somit bindet das L7M das 3'-Ende des SI4 von 7SK, welches bei allen in dieser Arbeit verwendeten RNA-Oligomeren vorhanden ist und den 3'-OH-OligoU – Trakt umfasst. Die Spezifität zu 7SK wird über RRM2 gewährleistet, die in dieser Arbeit nicht untersucht wurde.

3.5.1. Einfluss von Gesamt – tRNA auf die Bindung zwischen L7M und 7SK

In dieser Arbeit wurde zunächst gezeigt, dass eine Bindung zwischen einem OligoU16-RNA – Strang und dem Larp7-Modul nur möglich ist, wenn tRNA beigefügt wird. Hier wird eine spezifische Bindung bei äquimolarer Ratio von tRNA und Larp7 etabliert. Während im Allgemeinen bei EMSAS die Zugabe von endogener Gesamt-tRNA dazu dient, unspezifische RNA-Protein – Bindungen zu minimieren und somit die Spezifität zu erhöhen, ist bei der Verwendung von La-Modulen durch die Affinität zu 3'-UUU-OH – Enden von Pol III-Transkripten bzw. auch durch teilweise etablierte Funktionen im tRNA-Metabolismus eine potentiell funktional relevante Bindung denkbar. Die hier gezeigten Experimente weisen eindeutig auf eine solche Situation hin, da im Zusammenhang mit OligoU-RNAs eine Bindung überhaupt erst durch Zugabe von tRNA zustande kam. Die Bindung involviert, gezeigt durch Protease-Behandlung, auch das L7M und ist nicht nur eine RNA-Interaktion.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind somit ein weiterer Hinweis auf die enorme Komplexität der La-Protein – Bindungsmodalitäten. So weisen das La-Protein sowie LARPs verschiedene, 3-UUU-OH - unabhängige und abhängige Bindungsmodi auf, wobei verschiedene RNA-bindende Oberflächen des La-Moduls sowie der proximalen RRM-Domäne eine Rolle spielen (207, 256). Dies ist auf verschiedene Funktionen in der tRNA-Reifung zurückzuführen: Während die C-terminale 3-UUU-OH – Bindung durch L7M zum Schutz der prä-tRNA vor

Nukleasen dient, funktionieren La-Proteine durch RRM-vermittelte Kontakte außerdem als RNA-Chaperone.

Die La-Module des La-Proteins und Larp7 zeigen hochkonservierte Reste, was erklärt, dass diese – vor allem separiert vom Rest der jeweiligen Proteine – die gleichen Zielsequenzen erkennen. Auch wurde bereits diskutiert, dass das La-Protein eine Subpopulation von 7SK-RNAs erkennt, bevor diese von Larp7 gebunden werden (257). Bezeichnenderweise greift das isolierte L7M von Larp7, gemessen durch *tRNA mediated suppression* - Assays, in die tRNA-Reifung ein, nicht jedoch das *full length* Larp7-Protein (256). Dies deutet darauf hin, dass C-terminale Elemente wie die RRM2 bei der Wahl der richtigen Zielsequenz eine Rolle spielen. So könnten C-terminale Domänen die Bindung an tRNA durch Larp7 verhindern und Spezifität zu 7SK-RNAs ermöglichen.

Somit können die Ergebnisse dieser Arbeit folgendermaßen erklärt werden: L7M bindet, allerdings fast ausschließlich mit Hilfe von (unbestimmten bzw. unbekannt) Elementen endogener tRNA, an OligoU-Stränge. Diese Elemente können tRNA-Sekundärstrukturen, Basen-Modifikationen (es handelt sich um endogene, aufgereinigte tRNA) oder auch Sequenzelemente sein. Für weitere Experimente, auch und gerade in Hinblick auf eine Co-Kristallisation, sollten diese Elemente näher bestimmt werden und in Betracht gezogen werden, ob man L7M nicht zunächst mit Hilfe von tRNA-Minimalkonstrukten kokristallisiert, da das separierte L7M, wie auch bereits weiter oben diskutiert, zu diesen vermutlich eine höhere Affinität aufweist. In Verbindung mit 7SK wäre eine Co-Kristallisation mit L7M, Larp7-RRM2 und 7SK-SI4 interessant.

3.5.2. Zugabe von Arginin beeinflusst das Bindungsverhalten von L7M und 7SK-SI4

Das retrovirale TAR-Element ähnelt in seiner Struktur 7SK-SI4 (236) und befindet sich am 5'-Ende naszierender HIV-Transkripte. Das HI-virale Genom wird ebenfalls durch die RNA-Polymerase II transkribiert, wobei diese zu Beginn der Elongationsphase durch negative Elongationsfaktoren DSIF und NELF inhibiert wird (258). Durch Phosphorylierung dieser sowie der C-terminalen Domäne CTD der Polymerase durch pTEFb könnte die Elongationsphase fortschreiten, pTEFb ist jedoch im Komplex mit 7SK und Hexim inaktiv. Diese Blockade der Elongationsphase wird durch das HI-virale Tat-Protein gelöst, welches HEXIM und 7SK von pTEFb separiert und durch Bindung an das TAR-Element am 5'-Ende des viralen Transkriptoms

pTEFb in die Nähe der inhibierten Polymerase bringt, welche somit durch pTEFb phosphoryliert werden und die Elongationsphase fortsetzen kann (259).

HEXIM1 bindet an den 5'-gelegenen *stem loop* von 7SK und diese Interaktion ist Voraussetzung für die Rekrutierung von pTEFb, wobei die C-terminale Domäne von HEXIM1 über Kontakte zur N-terminalen Domänen von CycT die Kinaseaktivität von pTEFb inhibiert (261-264). Eine weitere Voraussetzung für diese Inhibierung ist die Interaktion von pTEFb mit 7SK-SI4 (264). Wie auch das TAR-Element weist 7SK-SI4 eine *bulge*-Region auf, die als Arginin-Bindetasche fungiert (236). Proteine wie HEXIM1 und Tat weisen Arginin-reiche Motive auf (*arginine – rich motif*, ARM), die in die Bindung an die jeweiligen RNA-Elemente involviert sind (260, 263). Es ist bekannt, dass Tat über sein ARM direkt mit 7SK interagiert, um durch Verdrängung von HEXIM pTEFb vom 7SK-RNP abzusondern und an das TAR Element zu binden (263, 265). Weiterhin ähnelt das Tat Protein HEXIM1, und diese Ähnlichkeit sowie die Ähnlichkeit von 7SK-SI4 mit TAR lässt vermuten, dass 7SK-SI4 sowohl mit Tat als auch mit HEXIM und pTEFb über die Arginin-Bindetasche interagieren kann. Der genaue Mechanismus ist jedoch nicht bekannt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in EMSAs die Zugabe von Arginin einen Einfluss auf das Verhalten der RNP-Bildung zwischen 7SK-SI4 und L7M hat. Die Rationale, das Bindungsverhalten unter Zugabe von Arginin zu studieren, beruht auf einer Publikation von Durney und D'Souza (236), in welcher die NMR-Struktur von 7SK-SI4 sowohl ohne als auch mit gebundenem Argininamid gelöst wird. Hierdurch kann ein Vergleich beider Strukturen sowie mit der Struktur des homologen HI-viralen TAR-Elements gezogen werden.

Für das TAR-Element ist bekannt, dass die endständige Schleife sowohl Zyklin T1 als auch Tat bindet, während die Bindetasche („*bulge region*“) als flexible Region mit Tat durch dessen ARM interagiert (266-269). Während die Bindung zwischen Tat und TAR mit einer Konformationsänderung durch einen *induced fit*-Mechanismus einhergeht, konnten Durney und D'Souza durch NMR-Titrationsexperimente zeigen, dass die homologe *bulge region* in 7SK-SI4 eine vorgeformte Bindetasche für Arginin darstellt und durch die Bindung von Argininamid keine Strukturänderung induziert wird (236). In beiden Fällen sind Basen-Triplets in die Bindung involviert, anders als bei der Tat-TAR – Interaktion erfolgt jedoch zwischen dem Triplet in 7SK-SI4 und Arginin keine Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen (die Autoren bezeichnen es als „Pseudo – Basentriplett“).

Dadurch übersteigt die Affinität des 7SK-SI4 – Bindemotivs zu Arginin diejenige des TAR-Elementes um drei Größenordnungen. Abbildung 35 zeigt einen Vergleich der Sekundärstrukturen beider Elemente, die in die Bindung involvierten Elemente sind hervorgehoben.

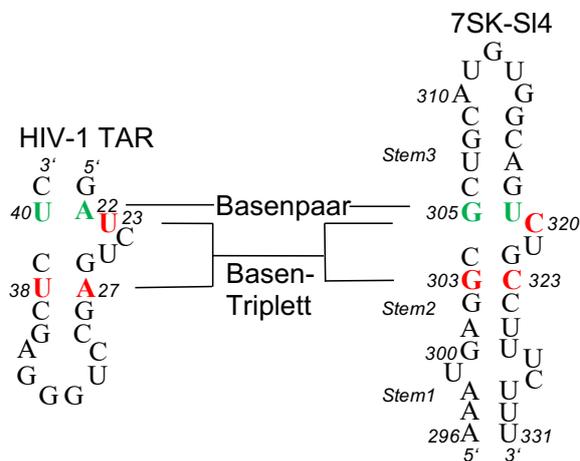


Abbildung 35: Vergleich der Sekundärstrukturen des HI-viralen TAR-Elements und des *stem loop* 4 der 7SK-RNA (7SK-SI4). Die rot und grün markierten Reste kennzeichnen die in die Argininbindung involvierten Strukturelemente (modifiziert nach Durney M.A. et al. 2010. J Mol Biol. Dec 10;404(4):555-67 (236)).

Das Experiment in Abbildung 31 dieser Arbeit zeigt, dass durch Titration von Arginin zu 7SK-SI4 und L7M das Laufverhalten des RNPs verändert wird. Es können mit steigender Konzentration von Arginin zwei unterschiedliche Shifts beobachtet werden. Da die Shifts nach Zugabe von Arginin im Vergleich zum RNP ohne Arginin weiter in das Gel einlaufen, deutet dieses Verhalten nicht auf eine Vergrößerung des Komplexes durch zusätzliche Bindung von Arginin hin. Eine andere Erklärung unterschiedlichen Laufverhaltens wäre eine Konformationsänderung im RNP, was nicht im Einklang mit den Ergebnissen aus oben beschriebener Publikation stehen würde (236). Die Autoren bezogen jedoch in Ihrer Arbeit nicht die Bindung von L7M mit ein. Somit könnten die Ergebnisse dieser Arbeit auf eine Strukturänderung hinweisen, wenn L7M zusammen mit Arginin in die Bindung an 7SK-SI4 involviert ist.

Die Experimente können Hinweise für Versuche zur Aufklärung der Struktur von RNPs geben, in welche 7SK-SI4 involviert ist. Es erscheint sinnvoll, die Zugabe von Arginin z.B. für etwaige Kristallisationsversuche zu erwägen, um ein realistisches Abbild der Struktur von 7SK-RNPs zu erhalten. Die Zugabe eines einzelnen Arginins anstatt eines ganzen Moduls oder einer Domäne eines potentiellen Bindungspartners wie HEXIM oder Tat, welches ein ARM enthält, könnte in Hinsicht auf eine Vereinfachung der Komplexbildung zur Kristallisation hilfreich sein.

4. Material und Methoden

4.1. Material

Soweit nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von folgenden Firmen bezogen: BD Biosciences (Heidelberg), Merck KgaA (Darmstadt), SERVA Electrophoresis GmbH (Heidelberg), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) sowie der Carl Roth GmbH + Co. Kg (Karlsruhe). Radiochemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von PerkinElmer LAS (Germany) GmbH bezogen. Enzyme (Restriktionsenzyme, Phosphatasen, DNA – Polymerasen) wurden von folgenden Firmen bezogen: Thermo Fisher Scientific (USA), MBI Fermentas (St. Leon Rot, jetzt Thermo Fisher Scientific), New England Biolabs (Frankfurt), Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen).

DNA – und RNA – Oligonukleotide wurden von Biomers.net GmbH (Ulm) bzw. Sigma-Aldrich Chemie GmbH synthetisiert.

4.1.1. Längenstandards

4.1.1.1. DNA - Längenstandards

GeneRuler™ 100bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™	Thermo Fisher Scientific

4.1.1.2. RNA – Längenstandards

RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder	Fermentas

4.1.1.3. Protein - Längenstandards

Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific
PageRuler™ Unstained Protein Ladder	Thermo Fisher Scientific

4.1.2. Puffer, Lösungen

4.1.2.1. Allgemeine Puffer

10x PBS:

1,4M NaCl
27mM KCl
100mM Na₂HPO₄
18mM KH₂PO₄

10x TBE:

890mM Tris
890mM H₃BO₄
20mM Na₂EDTA
pH 8,3

4.1.2.2. Puffer und Lösungen zur DNA – Analyse

DNA-Probenpuffer:

50% (v/v) Glycerin
5mM Tris HCl pH8,0
0,05mM EDTA
0,04% (w/v) Bromphenolblau
0,04% (w/v) Xylencyanol

4.1.2.3. Puffer und Lösungen zur RNA – Analyse

2x RNA – Probenpuffer (denaturierend):

8M Harnstoff
10mM EDTA
0,04% (w/v) Bromphenolblau
0,04% (w/v) Xylencyanol

RNA – Elutionspuffer:

5M NH₄OAc
4,5ml ddH₂O
5µl 0,1M EDTA
5µl MgCl₂
10µl 20 % SDS

2x EMSA - Puffer (nativ):

20mM Tris-HCl (pH 7,5)
5nM MgCl₂
200mM KCl
30% (v/v) Glycerin
1% Triton-X 100
10,1mg/ml BSA

4.1.2.4. Puffer und Lösungen zur Protein – Analyse

6x SDS – Probenpuffer:

300mM Tris-HCl, pH 6.8
12% (w/v) SDS
30% (v/v) Glycerin
600mM DTT
0.04% (w/v) Bromphenolblau

Trenngel (12%):

5,25ml 4x SDS – Trenngelpuffer
8,85ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Roth)
6ml H₂O
100µl APS (10 % (w/v))
100µl TEMED

Sammelgel (4%):

1,6ml 4x SDS - Sammelgelpuffer
0,8ml Rotiphorese® Gel 30 (37,5:1, Roth)
3,8ml H₂O
50µl APS (10 % (w/v))
10µl TEMED

4x SDS-Trenngelpuffer :

1,5M Tris HCl pH8,8,
0,4 % (w/v) SDS

4x SDS-Sammelgelpuffer:

0,5M Tris HCl pH8,8,
0,4 % (w/v) SDS

10x Lämmli - Puffer:

440mM Tris
2M Glycerin
1,5% (w/v) SDS
pH 8,3

Towbin – Lösung:

25mM Tris
3,5mM SDS
19,2mM Glycin
3,5mM SDS
bei Gebrauch:
10% (v/v) Methanol

Blotlösung:

1,25mM Luminol

100mM Tris HCl

pH8,5

bei Gebrauch zugeben:

6,8mM Cumarsäure in DMSO (dil. 1:100)

4.1.2.5. Puffer und Lösungen zur Aufreinigung von Proteinen

GST – Lysepuffer:

50mM Tris HCl pH7,5,

100mM NaCl,

0,05% NP-40,

bei Gebrauch zugeben:

1mM DTT

1:1000 Proteaseinhibitoren

GST – Hochsalz – Waschpuffer:

50mM Tris HCl pH7,5,

300 - 700mM NaCl,

0,05%NP-40,

1mM DTT

GST – Niedrigsalz – Waschpuffer:

50mM Tris HCl pH7,5,

150mM NaCl,

0,05%NP-40,

1mM DTT

GST - Gelfiltrationspuffer:

50mM Tris Hcl pH 7,5

150mM NaCl

5mM DTT

0,05% NP40

1mM EDTA

His - Lysepuffer:

20mM HEPES

250mM NaCl

10mM Imidazol

150µl β – Mercaptoethanol

His - Elutionspuffer:

20mM HEPES

200mM NaCl

250mM Imidazol

150µl β – Mercaptoethanol

His - Hochsalz - Waschpuffer:

20mM HEPES

500mM NaCl

20mM Imidazol

150µl β – Mercaptoethanol

His – Niedrigsalz – Waschpuffer:

20mM HEPES

250mM NaCl

20mM Imidazol

150µl β – Mercaptoethanol

His - Dialysepuffer:

20mM HEPES

200mM NaCl

150µl β – Mercaptoethanol

His - Gelfiltrationspuffer:

20mM HEPES

150mM NaCl

5mM DTT

His - Gelfiltrationspuffer:

20mM HEPES

150mM NaCl

5mM DTT

0,05% NP40

1mM EDTA

4.1.2.6. Puffer und Lösungen für die Affinitätschromatographie

Biotin – Streptavidin – Affinitätschromatographie

Hochsalz (HS) – Waschpuffer:

20mM HEPES pH 8.0

300mM KCl

10mM MgCl₂

0,01% NP-40

1mM DTT

Niedrigsalz (NS) – Puffer:

20mM HEPES pH 8.0
100mM KCl
10mM MgCl₂
0,01% NP-40
1mM DTT

Tobramycin – Affinitätschromatographie

Rando (RN) – Puffer:

20mM Tris – Acetate pH7,4
140mM NaCl
5mM KCl
1mM CaCl₂
1mM MgCl₂

Puffer C:

0,2M NaHCO₃
0,5M NaCl
pH8,3

Puffer B:

0,5M Ethanolamin
0,5M NaCl
pH 8,3

Puffer W1:

0,1M NaOAc
0,5M NaCl
pH4,0

Puffer W2

0,1M Tris – HCl
0,5M NaCl
pH 8,5

4.1.2.7. Puffer und Lösungen für die Immunpräzipitation

Anti – Flag - Immunpräzipitation

IP – Puffer:

50mM HEPES pH7,5
2mM EDTA
300mM KCl
0,05% (v/v) NP-40
bei Gebrauch zugeben:
0,5mM DTT
Proteaseinhibitoren (1:1000)

4.1.3. Kits, Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Streptavidin – Sepharose	GE Healthcare, München
NHS-activated Sepharose® 4 Fast Flow	Amersham Biosciences
Tobramycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glutathion – 4B Sepharose	GE Healthcare, München
Ni-NTA Agarose	QIAGEN, Hilden

4.1.3.1. Kits

Scriptcap™ m ⁷ G Capping System	Biozym Scientific
2x Phusion® Master Mix with HF Buffer	Thermo Fisher Scientific
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel™
NucleoBond® PC 500	Macherey-Nagel™
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel™
SuperScript™ III Reverse Transcriptase	Thermofisher Scientific
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel™
RiboMAX™ Large Scale RNA Production Kit	Promega
Rabbit Reticulocyte Lysate, Untreated	Promega

Medium für eukaryotische Zellkulturen (HEK293):

10% (v/v) DMEM

bei Gebrauch:

10 % (v/v) FBS

1% (v/v) Pen Strep

zur Induktion:

0,5µg/ml Tetrazyklin

Lysepuffer:

150mM NaCl

50mM Tris HCl (pH7,5)

2,5mM MgCl₂

0,5% (v/v) NP-40

bei Gebrauch:

1mM DTT

Zugabe von Proteaseinhibitoren (dil. 1:1000):

1 mg/ml Leupeptin/Pepstatin A

100mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)

100mM 4-(2-Aminoethyl)benzensulfonylfluorid (AEBSF)

1 mg/ml Aprotinin

4.1.4. Plasmide

wtTOP – Renilla – Luciferase

Promega, Dr. Aurelie Rakotondrafara

mutTOP – Renilla Luciferase

Promega, Dr. Aurelie Rakotondrafara

Die TOP – Renilla Luziferase – Plasmide wurden von Dr. Aurelie Rakotondrafara kloniert und zur Verfügung gestellt. Hierfür wurde über HindIII die 5'UTR von rps16 hinter einen T7 – Promoter kloniert. 3' der 5'UTR folgt das Gen für die Renilla – Luziferase, welches von der 5' UTR durch einen 20nt β – Globin – Spacer separiert wird. 3' des Luziferase - Gens folgt nach

75nt der Poly – A – Schwanz, an welchem sich am 3' – Ende eine BamH1 – Schnittstelle befindet. Über diese wurde zur Verwendung in *in vitro* – Translations – Assays das Plasmid mit BamH1 linearisiert.

4.1.5. Oligonukleotide

4.1.5.1. RNA- Oligonukleotide

Für die Biotin – Streptavidin – Affinitätschromatographie verwendete, am 3'-Ende mit Biotin (Btn) versehene RNA – Oligonukleotide (Biomers.net GmbH):

TIAR – Affinitätschromatographie:

rpl32 – TOP – RNA: CUCUCUUCCUCGGCGCUGCCUAC – Btn

rpl32 – Mut – RNA: GUAGGCAGCGCCGAGGAAGAGAG – Btn

LARP1 – Affinitätschromatographie:

S16TOP: CCUUUUCGGUUGCGGCGCCGCGCGG – Btn

S16mut: GAGUGACC GGUUGCGGCGCCGCGCGG – Biotin

L32TOP: CUCUCUUCCUCGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUC -Btn

L32mut: GACUCAACCUCGGCGCUGCCUACGGAGGUGGCAGCCAUCUCCUUCUCGGCAUC –Btn

Für EMSA verwendete RNA – Oligonukleotide:

L32TOP: CUCUCUUCCUC

L32TOPmut: GUCUCUUCCUC

L32GC: GCGGCGCUGCC

S16TOP: CCUUUUC

S16TOPmut: GAGUGACC

eEF1BTOP: CUUUUUCUCUCUUC

7SK – RNA (>gi|221219022):

GGAUGUGAGGGCGAUCUGGCUGCGACAUCUGUCACCCCAUUGAUCGCCAGGGUUGAUUCGGC
UGAUCUGGCUGGCUAGGCGGGUGUCCCUUCCUCCUACCCGCUCCAUGUGCGUCCUCCCGAA
GCUGCGCGCUCGGUCGAAGAGGACGACCAUCCCCGAUAGAGGAGGACCGGUCUUCGGUCAAGG
GUAUACGAGUAGCUGCGCUCCCUUGCUAGAACCUCCAAACAAGCUCUCAAGGUCCAUUUGUAG
GAGAACGUAGGGUAGUCAAGCUUCCAAGACUCCAGACACAUCCAAAUGAGGCGCUGCAUGUGG
CAGUCUGCCUUUCUUUU

7SK-SI4:

AAAUGAGGCGCUGCAUGUGGCAGUCUGCCUUUCUUUU

7SK-SI4/2:

AAAUGAGGCGUCUGCCUUUCUUU

4.1.5.2. DNA – Oligonukleotide

Für die Tobramycin - Affinitätschromatographie verwendete Oligonukleotide (DNA – Templates zur Transkription in RNA):

rpS16- TOP – RNA: TAA TAC GAC TCA CTA TAC TTT TCC GGT CGC GGC GCT GCG GCT TAG
TAT AGC GAG GTT TAG CTA CAC TCG TGC TGA GCC

rpS16 – Mut – RNA: TAA TAC GAC TCA CTA TAA GTG ACC GGT CGC GGC GCT GCG GCT TAG
TAT AGC GAG GTT TAG CTA CAC TCG TGC TGA GCC

Primer zur Klonierung der in dieser Arbeit erstellten Konstrukte

Tiar – Konstrukte:

hsTIAR Rrm1-2:

fw: TIAR RRM1 BamH1 fw CGCGGATCCATGATGGAAGACGACGG

rev: TIAR RRM12-Xho1rev CCGCTCGAGTGACTGGTTACTACAT

hsTIAR Rrm 2-3:

fw: TIAR RRM2 BamH1 fw CGCGGATCCGATACTTCCAATCACTTCCA

rev: TIAR RRM3 Xho1 rev: CCGCTCGAGAGGAGATTCTTTACCCCA

dTIAR 1-3:

fw: dTIAR fl BamH1 fw: CGCGGATCCATGGACGAGTCGCAACCGAA

Rev: dTIAR RRM3 Stop Xho1 rev: CCGCTCGAGTTAGTTATTGGCCGAGTTATCGCCTCC

dTIAR 1-2:

fw: dTIAR fl BamH1 fw: (s.o.)

rev: dTIAR RRM2 Stop Xho1 rev: CCGCTCGAGTTAAGGCTCGCGTGGTGGTGGCA

dTIAR 2-3:

fw: dTIAR RRM2 BamH1 fw.: CGGGATCCCCGAAGACAGACATCAGTTCGCA

rev: dTIAR RRM3 Stop Xho1 rev: (s.o.)

drTIAR 1-3:

fw: drTIAR fl BamH1 fw: CGCGGATCCATGGAAGACGAGAGCCACCCAAA

rev: drTIAR RRM3 Stop Xho1 rev: CCGCTCGAGTTACGGCTGGACATTTTTGGCCAT

drTIAR 1-2:

fw: drTIAR fl BamH1 fw: (s.o.)

rev: drTIAR RRM2 Stop Xho1 rev: CCGCTCGAGTTATTGCACACTCTTTGGAGCGGGT

drTIAR 2-3:

fw: drTIAR RRM2 BamH1 fw: CGGGATCCAAGAAAGATACATCAAATCATTTTCATGTT

rev: drTIAR RRM3 Stop Xho1 rev: (s.o.)

amTIAR 1-3:

fw: amTIAR fl BamH1 fw: CGCGGATCCATGAGCGAAGAAAGTAATCCGCGAA

rev: amTIAR RRM3 Stop Xho1 rev: CCGCTCGAGTTAATACTGTCCAGCTCCAGCTGT

am TIAR 1-2:

fw: amTIAR fl BamH1 fw: (s.o.)

rev: amTIAR RRM2 Stop Xho1 rev: CCGCTCGAGTTATGGCCTTTCAGATCGAGGT

amTIAR 2-3:

fw: amTIAR RRM2 BamH1 fw: CGGGATCCCCGAAGTTGGATACGAGTAATCACCA

rev: amTIAR RRM3 Stop Xho1 rev: (s.o.)

Primer zur Klonierung des T7- 7SK – Oligonukleotids:

T7-7SK fw: TAATACGACTCACTATAGGATGTGAGGGCGATCTGGCT

7SK rev: GCTACTCGTATACCCTTG

DNA – Oligonukleotid zur Transkription von 7SK-SI4:

T7 – 7SK stem loop:

TAATACGACTCACTATAGGAAATGAGGCGCTGCATGTGGCAGTCTGCCTTTCTTTT

4.1.6. Antikörper

α – TIAR: Rabbit polyclonal to TIAL1

Abcam

α - TIA-1: Mouse monoclonal to TIA1	Abcam
α -LARP1: Rabbit polyclonal to LARP1	Abcam
α -Rabbit gIgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate	Sigma-Aldrich
α -Mouse gIgG (whole molecule) Peroxidase Conjugate	Sigma-Aldrich

4.2. Methoden

4.2.1. Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

4.2.1.1. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde fotometrisch bestimmt. Hierbei wird die Extinktion des Lichts mit einer Wellenlänge von 260nm durch Nukleinsäuren gemessen, welches durch eine Küvette geleitet wird, die die zu untersuchende DNA bzw. RNA enthält. Im Anschluss wird die OD (optical density) ausgegeben, die in die Konzentration der Nukleinsäure umgerechnet werden kann (OD 1 entspricht hierbei einer Konzentration von 50µg/ml). Durch die Berücksichtigung des OD – Quotienten, der bei einer Messung von 260nm und 280nm ($OD_{260/280}$) erfolgt, kann parallel der Reinheitsgrad der Probe ermittelt werden.

4.2.1.2. PCR zur Amplifikation von DNA

Die Polymerase – Kettenreaktion dient zur Amplifikation von DNA – Fragmenten. Zu einer Template – DNA werden Primer, dNTPs sowie eine DNA - Polymerase (Taq (Thermo aquaticus), Pfu (Institut für Biochemie, Universität Würzburg) oder Phusion (2x Phusion®Master Mix with HF Buffer, Thermo Fisher Scientific) in folgendem Reaktionsansatz (50µl) gegeben:

25ng Template - DNA

1µl dNTPs (ad 10 µM)

1µl Primer fw. (ad 100 µM)

1µl Primer rev. (ad 100 µM)

5µl 10x Polymerase Puffer

0,5µl DNA-Polymerase

ad 50µl ddH₂O

Die Amplifikation erfolgt in einem Thermocycler, wobei 20 – 30 Zyklen durchgeführt werden. Ein Zyklus durchläuft folgende Phasen: Denaturierung 95°C, Primer – Annealing 50 – 70°C (je nach Eigenschaften des Primers; die Temperatur wurde 5°C unterhalb der spezifischen Schmelztemperatur T_M des Primers gewählt), Elongationsphase 72°C. Im Anschluss wurden die so erhaltenen Amplicons mit Hilfe eines Kits (NucleoSpin®Extract II) aufgereinigt.

4.2.1.3. DNA – Hydrolyse durch Restriktions - Endonukleasen

Im Rahmen des Primer – Designs wurden an die 5' – bzw. 3' – Enden der DNA – Inserts Schnittstellen für Restriktionsenzyme gesetzt, die es erlaubten, das Insert mittels Ligation (s. dort) in die Multiple cloning sites (MCS) der jeweiligen Plasmide zu setzen. Hierfür wurden die DNA – Fragmente sowie die DNA – Plasmide jeweils mit den entsprechenden Restriktionsenzymen hydrolysiert. Die zirkulären DNA – Plasmide wurden hierdurch linearisiert und erhielten am 5' – bzw. 3' – Ende die zu den DNA – Inserts entsprechenden Restriktionsschnittstellen. Ein Ansatz für einen Restriktionsverdau erfolgte je nach der Aktivität der Restriktionsenzyme und unter Zugabe der spezifischen Reaktionspuffer nach Herstellerangaben. Die Reaktion wurde für 2h bei 37°C inkubiert.

4.2.1.4. Dephosphorylierung linearisierter DNA – Plasmide

Zur Vermeidung von Plasmid – Religationen nach dem Restriktionsverdau wurden linearisierte DNA – Plasmide mit Hilfe der *Shrimp alkaline Phosphatase* SAP (New England Biolabs) dephosphoryliert. Hierfür wurden zu dem Restriktionsansatz 2µl SAP sowie SAP – Puffer (ad 1x dil.) hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 1h bei 37°C wurde die Reaktion durch Erhitzen auf 65°C für 15min beendet. Die Aufreinigung der linearisierten und dephosphorylierten Plasmid – DNA erfolgte durch das NucleoSpin®Extract II – Kit.

4.2.1.5. Ligation von DNA - Fragmenten

Um die zu klonierenden DNA – Fragmente nach dem Restriktionsverdau in das gewünschte Plasmid zu klonieren, wurde das Enzym T4 – Ligase verwendet. Hierbei ist zu beachten, dass das Insert im Überschuss zum Plasmid vorliegt. Für einen 10µl – Ansatz wurden somit verwendet:

1µl T4-Ligase,

1µl 10x Puffer,

1µl Vektor

7µl Insert.

Der Ansatz wurde ÜN bei RT inkubiert.

4.2.1.6. Transformation kompetenter Bakterienkulturen

Die Transformation dient der Vervielfältigung von DNA – Plasmiden mit Hilfe kompetenter *E.coli* – Bakterien. In verschiedenen Schritten wird das DNA – Plasmid (z.B. nach einer wie oben beschriebenen Ligation) in die Bakterienkultur eingebracht und diese im Anschluss zum Wachstum angeregt. Nach erfolgreichem Wachstum wird die Plasmid – DNA aus den Zellen isoliert und aufgereinigt. Die Transformation wurde nach Zugabe des DNA – Plasmids zu den Zellen wie folgt durchgeführt: Nach einer Inkubationszeit von 5min auf Eis erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 90sek. Nach anschließender erneuter Inkubation auf Eis für 2min wurden die Kulturen 1h bei 37°C auf einem Schüttler fixiert. Im Anschluss wurden die Kulturen auf LB – Agarplatten ausgestrichen, die das entsprechende Antibiotikum enthielten. Diese Platten wurden ÜN bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die erfolgreiche Transformation zeigte sich durch punktuell bakterienwachstum auf den Platten. Zur Überprüfung, ob die so entstandenen Kolonien das gesuchte Plasmid enthielten, wurden diese mit Hilfe einer sterilen Pipettenspitze von den Platten in je 3ml LB – Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum überführt. Nach einer erneuten Inkubation ÜN bei 37°C unter permanentem Schütteln wurde die DNA zur weiteren Untersuchung aus den Flüssigkulturen wie im Folgenden beschrieben isoliert.

4.2.1.7. Isolierung von Plasmid – DNA aus *E.coli* - Bakterien

Zur Isolierung der gewünschten DNA aus *E.coli* – Kulturen standen das NucleoBond®PC 500 oder das NucleoSpin®Plasmid QuickPure – Kit (jeweils von Macherey-Nagel) zur Verfügung. Die Isolation wurde nach Hersteller – Protokoll durchgeführt.

4.2.1.8. RT – PCR zur DNA - Synthese mittels RNA – Templates

Die RT – PCR dient der Herstellung von cDNA aus RNA und wurde mit Hilfe des Enzyms reverse Transkriptase (Superscript™, Thermofisher) durchgeführt. Hierfür wurden aus einer vorher präzipitierten und in 20 – 25µl H₂O aufgenommenen RNA 5µl entnommen und mit 1µl 10mM dNTPs, 1µl des spezifischen 3' – rev – Primers sowie 5µl H₂O versetzt. Dieser Ansatz wurde 5' bei 70°C inkubiert und auf Eis überführt. Nach weiterer Zugabe von 4µl TS – Puffer, 2µl 0,1M DTT sowie 1µl H₂O wurde der Ansatz 2' bei 42°C inkubiert. Es erfolgte die Zugabe des Enzyms reverse Transkriptase sowie eine weitere Inkubation für 50' bei 42°C. Im Anschluss wurde die

Reaktion durch Inkubation bei 70°C für 15' gestoppt und 3-4µl des cDNA – Ansatzes einer PCR unterzogen.

4.2.1.9. Agarose – Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA – Fragmenten

Zur Auftrennung von DNA – Fragmenten wurden Agarose – Gele verwendet, welche durch Zugabe von 1,5% Agarose zu 1x TBE – Puffer hergestellt wurden. Zusätzlich wurde Ethidiumbromid (1µg/ml) hinzugegeben, um die DNA im Anschluss an die Elektrophorese unter UV – Licht sichtbar zu machen. Die mit DNA beladenen Gele wurden unter Anlegen einer Spannung von 150 Volt in 1x TBE – Puffer inkubiert, wodurch die DNA – Fragmente der Größe nach aufgetrennt wurden.

4.2.1.10. Aufreinigung von DNA – Fragmenten aus Agarosegelen

Im Anschluss an eine DNA – Agarose – Gelelektrophorese wurden die gesuchten DNA – Fragmente unter UV – Licht aus dem Gel herausgeschnitten und mit Hilfe des NucleoSpin® Gel / PCR Clean-up Kits (Macherey-Nagel) nach Protokoll des Herstellers aufgereinigt. Je nach Folgeexperiment wurde die DNA im Anschluss in der gewünschten Konzentration in ddH₂O gelöst.

4.2.1.11. Denaturierende RNA – Gelelektrophorese

Zur Aufreinigung von RNA – Fragmenten wurde die denaturierende Gelelektrophorese genutzt. Hierbei wird die RNA – Probe mit denaturierendem RNA - Probepuffer versetzt, für 3min bei 95°C erhitzt und auf ein Polyacrylamid – Gel mit 8M Harnstoff geladen. Die Auftrennung im Gel erfolgt unter Spannung (150V) bei RT.

4.2.1.12. Native RNA – Gelelektrophorese

Im Zuge der nativen Gelelektrophorese sollen Strukturveränderungen der RNA vermieden werden. Sie dient u.a. der Untersuchung von Protein - RNA - Interaktionen im Rahmen des EMSA (s. 4.2.3.1.). Hierfür wurden die Proben in nativem RNA – Ladepuffer aufgenommen und das Polyacrylamidgel (6%) mit 4% Glycerin versetzt. Die Auftrennung über das Gel erfolgt bei 4°C in 0,3x TBE - Puffer. Zum Einlaufen der Proben in das Gel wurde eine Spannung von 100V angelegt, diese wurde im Anschluss auf 150 – 200V erhöht. Insofern die RNA radioaktiv markiert war, wurde das Gel nach dem Lauf über Nacht bei -80°C unter Lichtausschluss auf einem Medical X-ray Screen inkubiert und die radioaktive Markierung auf dem Film detektiert.

4.2.1.13. Ethanolpräzipitation von Nukleinsäuren

Um Nukleinsäuren aus wässriger Phase zu präzipitieren, wurde diese mit 3 Vol 96%igem Ethanol sowie 0,1 Vol 5M NH₄OAc (pH 5.2) versetzt. Nach Inkubation ÜN (mindestens 30min.) bei -20°C wurde das Präzipitat abzentrifugiert (4°C, 10min, 17000g) und das Pellet mit einem Volumen 70% EtOH gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (17000g, 4°C, 10min) wurde das Pellet im Vakuum getrocknet und in ddH₂O aufgenommen.

4.2.1.14. Phenolfällung von RNA

Zur Aufreinigung von RNA aus Extrakten oder Eluaten wurde die Probe mit gleichem Volumen ddH₂O sowie 2 Vol Phenol (ROTI®Aqua-Phenol, Carl Roth) versetzt und 15min auf einem Schüttler inkubiert. Mittels Zentrifugation erfolgte die Phasentrennung (13000rpm, 10min). Im Anschluss wurde die wässrige Phase in ein neues Gefäß überführt und die RNA mittels Ethanolpräzipitation (s.o.) aufgereinigt.

4.2.1.15. *In vitro* – Transkription

Die *in-vitro* – Transkription erfolgte mit Hilfe des RiboMAX™ Large Scale RNA Production Kits (Promega) nach Angaben des Herstellers. Als DNA – Template dienten DNA – Nukleotide mit den zu transkribierenden DNA – Sequenzen, welchen ein T7 – Primer vorausgeschaltet war. Im Anschluss wurde die DNA durch Zugabe einer im Kit enthaltenen DNase verdaut und die RNA mit Phenol extrahiert und durch Ethanol präzipitiert.

4.2.1.16. *In vitro* – Transkription zur Herstellung radioaktiv markierter RNA

Zur Herstellung radioaktiv markierter RNA erfolgte die Transkription mittels der T7 – Polymerase in Anwesenheit von radioaktiv markiertem [α -³²P] - UTP nach folgendem Ansatz:

20µl 5x Transkriptionspuffer

500ng DNA – Template

3µl ATP (100mM)

3µl GTP (100mM)

3µl CTP (100mM)

1µl [α -³²P]-UTP (10 µCi/µl)

3µl 0,1M DTT

1,8µl T7 – Polymerase

1,5µl RNAsin

ad 100µl ddH₂O

der Ansatz wurde für mindestens 4h bei 37°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von denaturierendem RNA – Probenpuffer und die Aufreinigung über ein denaturierendes Harnstoff – Gel.

4.2.1.17. Radioaktive Markierung von RNA – Oligonukleotiden

Zur Detektion von RNA, die für ein EMSA benutzt wurde, wurde diese an ihrem 5' – Ende radioaktiv markiert. Hierbei wurde das Enzym Polynukleotid – Kinase (PNK) verwendet, welches die RNA mittels einer radioaktiven γ – Phosphatgruppe aus ATP ([γ -³²P] – ATP) am 5' – Ende phosphoryliert. Zu diesem Zwecke wurden 10pmol der RNA mit 30µCi [γ -³²P] – ATP und T4 – PNK inkubiert. In 10µl – Ansätzen wurde außerdem 1µl 10x – PNK – Puffer A und ddH₂O hinzugeben. Die Inkubation erfolgte für 1h bei 37°C. Im Anschluss wurde die Probe in denaturierendem RNA – Ladepuffer aufgenommen und auf ein denaturierendes RNA – Polyacrylamidgel aufgetragen. Nachdem die Probe bei RT in 1xTBE – Puffer ausreichend mit Hilfe einer Spannung von 150V in das Gel eingelaufen war, wurde das Gel mit einem Medical X-ray Screen unter Lichtausschluss für 30sek bis 1min inkubiert. Mit Hilfe der über den Screen detektierten Bande wurde das Gelstück, welches die RNA enthielt, ausgeschnitten und bei -80°C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Elution der RNA aus dem gefrorenen Gel durch Zugabe von 300µl 300mM NaCl und Inkubation ÜN bei RT unter kontinuierlichem Schütteln. Die in Lösung befindliche RNA wurde zur Präzipitation mit 1ml Ethanol versetzt und mind. 30min bei -20°C inkubiert. Im Anschluss wurde die präzipitierte RNA bei 4°C für 30min abzentrifugiert (16000g), der flüssige Überstand verworfen und das Pellet in 20µl ddH₂O gelöst.

4.2.2. Methoden zur Protein – Analyse

4.2.2.1. Denaturierende SDS – Polyacrylamid – Gelelektrophorese SDS PAGE

Die SDS PAGE dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Hierfür wird die Probe mit SDS versetzt und für 5min bei 95°C erhitzt. Dadurch werden die Proteine denaturiert und mit negativen Ladungen versehen. Im Anschluss wird die Probe auf ein Polyacrylamid – Gel geladen und durch dieses auf Grund einer angelegten Spannung Richtung Kathode bewegt, wobei kleine Proteine schneller das Gel durchwandern als größere Moleküle. Die Auftrennung erfolgt in 1x Lämmli – Puffer, in welchem sich das Gel befindet. Dieses besteht aus einem Sammel – sowie einem Trenngel (10% - 15% Acrylamid).

4.2.2.2. Western Blot - Analyse

Das durch Towbin und Gültiken etablierte Western Blot – Verfahren dient der Detektion von Proteinen mit Antikörpern in einer Probe, deren Proteine zuvor mittels SDS – PAGE aufgetrennt wurden (279, 280). Die Proteine des SDS – Gels werden hierbei auf eine Membran geblottet, welche im Anschluss mit spezifischen Antikörpern inkubiert wird. So können spezifische Proteine an Hand des Antikörpers und Ihrer Größe nachgewiesen werden. Hierfür wird ein SDS – Gel auf einer PVDF – Membran (Merck Millipore) in Towbin – Lösung fixiert für 2h unter Stromfluss (150mA) inkubiert. Im Anschluss wird die Membran für 1h in 1x PBS– Puffer mit 0,05% (w/v) Tween20 (1x PBS-T) und 5% Magermilchpulver inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blocken. Nach Waschen der Membran mit 1x PBS – T (3x 10min) erfolgte die Inkubation mit dem proteinspezifischen Antikörper (Primärantikörper, 1:1000 in PBS-T, 4°C) in PBS-T, wobei die Verdünnung spezifisch auf den jeweiligen Antikörper abgestimmt wurde. Nach erneutem Waschen der Membran in PBS – T (3x 10min) erfolgte die Inkubation mit dem Peroxidase – gekoppeltem Sekundärantikörper für eine Std. (dil 1:5000 in PBS – T). Zur Umsetzung der Chemolumineszenz wurde die Membran 30sek in 10ml Blotlösung inkubiert und die Reaktion durch den Molecular Imager®ChemiDocTMXRS+ (Biorad) sichtbar gemacht.

4.2.2.3. Coomassiefärbung von Proteinen nach SDS PAGE

Mit Hilfe der Coomassiefärbung können Proteine auf einem SDS – Gel sichtbar gemacht werden, indem sie als blau gefärbte Banden hervortreten. Hierfür wird ein proteinhaltiges SDS – Gel für 30min bei RT in Coomassie – Färbelösung inkubiert, welche sich aus 40% Methanol, 10% Essigsäure und einer Spatelspitze des Farbstoffs SERVA Blue R („Coomassieblau“)

zusammensetzt. Im Anschluss erfolgt die Entfärbung durch Inkubation in 20% Essigsäure. Die Essigsäure wurde wiederholt gewechselt, bis der Blauton aus dem Gel hinreichend entfernt war, so dass die blauen Proteinbanden zum Vorschein kamen.

4.2.2.4. Silberfärbung von Proteinen nach SDS PAGE

Die Silberfärbung proteinhaltiger Gele nach SDS – PAGE ist eine Methode zur Detektion von Proteinen in einer Probe, welche der Coomassiefärbung in Ihrer Sensitivität überlegen ist. Somit können auch geringe Mengen an Protein im Anschluss massenspektroskopisch analysiert werden. Hierfür wurde das Polyacrylamid – Gel nach SDS – PAGE für mindestens 1h in Fixierlösung inkubiert, um die Proteine im Gel zu fixieren. Nach drei Waschschritten mit 50% EtOH (jeweils 20min) wurde das Gel für 1min mit 0,02 % Natriumthiosulfat behandelt, welches im Anschluss durch drei Waschschrritte (je 20sek) mit ddH₂O entfernt wurde. Nach Inkubation des Gels für 20min in Silbernitratlösung erfolgten erneut zwei Waschschrritte (je 20sek) und im Anschluss das Sichtbarmachen der Banden mittels Natriumcarbonat. War die Farbtintensität groß genug, so dass die Banden gut erkennbar waren, wurde das Gel kurz mit ddH₂O gewaschen und die weitere Einfärbung durch Inkubation in Stopplösung unterbunden. Im Anschluss konnten Proteinhaltige Banden ausgeschnitten und mittels Massenspektrometrie untersucht werden.

4.2.2.5. Flag – Immunpräzipitation von Flag – HA - Larp1 und interagierender RNA

Für ein mit einem Flag – Tag versehenes Larp1 - Konstrukt wurden von Dr. Maritta Küsspert stabile Flp-Trex - Zelllinien etabliert und für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Das durch diese Zellen überexprimierte Larp1 konnte durch das Flag - Tag mit Hilfe von *Magnetic anti – Flag beads* (Sigma Aldrich) aufgereinigt und dessen RNA – Interaktionspartner untersucht werden. Hierfür wurden die Zellen 5-6 Std. nach Induktion mit 0,5µg/ml Tetrazyklin (Serva, Heidelberg) lysiert und mit 150µl ANTI-FLAG®M2 Magnetic Beads ÜN bei 4°C inkubiert. Die Beads wurden im Anschluss dreimal mit IP – Puffer gewaschen. Zur Fällung der RNA sowie Trennung von den Proteinen wurden die Beads mit je 100µl H₂O und Phenol versehen und auf dem Schüttler für 30min (RT) inkubiert. Im Anschluss wurde durch Zentrifugation (10', 20000g) die Suspensionen in beads, eine wässrige und eine Phenolphase getrennt. Die wässrige und die Phenolphase wurden in separate Eppendorfgefäße überführt und die RNA aus der wässrigen bzw. die Proteine aus der Phenolphase präzipitiert. Die Proteine wurden im Anschluss mit Hilfe einer SDS – PAGE mit anschließendem Western Blot mittels eines α – Flag

– Antikörpers untersucht. Die präzipitierte RNA wurde in 20µl H₂O gelöst und die gesuchte RNA - Spezies im Anschluss mittels RT – PCR in DNA umgeschrieben. Diese konnte über ein Agarosegel evaluiert werden.

4.2.2.6. Proteinpräzipitation aus der Phenolphase mit Aceton

Zur Präzipitation von Proteinen aus der Phenolphase wurde Aceton genutzt. Hierfür wurde die Phenolphase mit 6 Volumina eisgekühltem Aceton versetzt und für 30' bei -80°C inkubiert. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 17000rpm (30', 4°C) pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet bei RT getrocknet. Die Proteine wurden im Anschluss entweder zunächst für 20min in 10µl H₂O gelöst oder sofort in 6x SDS - Probenpuffer aufgenommen und für eine SDS – PAGE verwendet.

4.2.2.7. Proteinpräzipitation mit Trichloressigsäure (TCA – Präzipitation)

Eine weitere Methode, um Proteine aus einer Lösung zu fällen, nutzt denaturierende 100%ige Trichloressigsäure (TCA). Hierfür wurde die Probe nach Zugabe von 0,1 Vol. 100% TCA mindestens 30min auf Eis inkubiert. Im Anschluss wurde die Probe 15min bei 15000 rpm (4°C) zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das proteinhaltige Pellet mit 900µl ethanol – und acetonhaltiger TCA – Waschlösung gewaschen und die Probe erneut abzentrifugiert (15000rpm, 30min, 4°C). Das Pellet wurde durch Zentrifugation im Vakuum getrocknet, mit 20µl SDS – Probenpuffer versetzt und 1h auf einem Schüttler resuspendiert. Im Anschluss konnte der Proteingehalt der Probe mittels SDS – PAGE und Silberfärbung evaluiert werden.

4.2.2.8. *In vitro* – Translation

Die *in vitro* – Translation wurde in *rabbit* Retikulozytenlysat (Promega) durchgeführt. Hierfür wurde 1µl einer zu translatierenden RNA (1µg/µl) in 10µl des Retikulozytenlysates gegeben und der Ansatz mit 1µl ³⁵S – markiertem Methionin versetzt. Um zu untersuchen, ob die in dieser Arbeit untersuchten TIAR – Konstrukte die Translation beeinflussen, wurden diese nach Expression zum Ansatz titriert und die Volumina durch Zugabe von H₂O angeglichen. Die Ansätze wurden für 60' bei 30°C inkubiert und je 5µl einer SDS – PAGE unterzogen. Das SDS – Gel wurde im Anschluss getrocknet und auf einem Röntgenfilm exponiert (ÜN, -80°C).

4.2.2.9. Expression und Aufreinigung der TIAR – Konstrukte

Die Tiar – Konstrukte wurden in den pGEX – 6P1 – Vektor kloniert und somit als Fusionsprotein mit der Glutathion-S – Transferase (GST, N – terminal) exprimiert. Hierfür wurden die Plasmide zunächst in kompetente *E.coli* BL21 pLys transformiert. Im Anschluss wurde die Kultur mit 1ml LB – Medium versehen und auf Agaroseplatten ausgestrichen. Die Platten wurden ÜN bei 37°C inkubiert. Waren sichtbare Kolonien gewachsen, wurden diese in 2L TB – Medium mit 10mM MgCl₂ überführt und unter Schütteln (180rpm) bei 37°C inkubiert. Die Induktion der mit 1mM IPTG (Roth) erfolgte bei Erreichen einer OD von 0,6 – 0,8. Im Anschluss wurden die Zellen erneut bei 20°C unter Schütteln inkubiert, bis eine OD von max. 1,5 erreicht war. Die Kultur wurde abzentrifugiert (4°C, 4000g, 20min) und die Pellets in GST – Lysepuffer bei 4°C resuspendiert (6ml/g GST - Lysepuffer). Im Anschluss erfolgte die weitere Zelllyse mittels Sonication auf Eis, wobei die Suspension 3x1min mit einem Output von 40 - 60% durch den Sonifier®250 (Branson) sonifiziert wurde. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation (30min, 25000g, 4°C) vom Lysat abgetrennt.

Der Erfolg der weiteren Schritte wurden jeweils durch abgenommene Proben (10µl) kontrolliert, deren Proteingehalt durch SDS – PAGE mit anschließender Coomassiefärbung sichtbar gemacht wurde.

Zur weiteren Aufreinigung wurde das Lysat bei 4°C ÜN rotierend mit Glutathion – Sepharose (GE Healthcare) inkubiert. Nach Immobilisierung der Fusionsproteine an der Sepharose – Matrix wurde diese in Säulen überführt und abwechselnd in Aufschlusspuffer je dreimal mit niedrigem NaCl – Gehalt (150mM NaCl) und hohem Salzgehalt (300 – 700mM NaCl) gewaschen. Im letzten Durchgang wurde ein Salzgehalt von 150mM NaCl eingestellt.

Die auf diese Weise gereinigte Sepharose sowie die immobilisierten Fusionsproteine wurden im nächsten Schritt über Nacht bei 4°C mit *Prescission* – Protease (120µl / 6ml Lysat) unter Rotation inkubiert. Durch Überführung des Lysats und der Beads in Säulen konnte das Eluat (Durchfluss) von der Matrix mit daran immobilisierter GST abgetrennt werden. Das Eluat wurde durch Zentrifugation aufkonzentriert (4°C, 5min, 4500g, MWCO 5000) und durch Gelfiltrationschromatographie weiter aufgereinigt. Hierfür wurde ein Äkta Prime HPLC Purifier – System (GE Healthcare) sowie verschiedene Säulen (Superdex™75 10/300, Superdex 200 10/300 GL, Hiprep 16/60 Sephacryl S-300 HR, GE Healthcare) verwendet, welche mit GST – Gelfiltrationspuffer (50mM Tris Hcl pH 7,5, 150mM NaCl, 5mM DTT, 0,05% NP40, 1mM EDTA)

äquibriert wurden. Das aufkonzentrierte Protein wurde auf die Säule geladen und die Elutionen in 2ml – Fraktionen aufgefangen. Mittels eines während der Chromatographie erstellten Absorptions – Diagrammes (280nm) konnten die Protein – enthaltenden Fraktionen bestimmt und durch Coomassie – Gel verifiziert werden. Im Anschluss wurden die Fraktionen zur weiteren Bearbeitung bzw. zur Aufbewahrung auf Lösungen zwischen 12g/L – 32g/L aufkonzentriert.

4.2.2.10. Expression und Aufreinigung des Larp7 – Moduls (L7M)

Das Larp7 – Konstrukt L7M befindet sich in dem Vektor pETM – 11 und wurde von Vanessa Schlag zur Verfügung gestellt. Es ist N – terminal mit einem His – Tag fusioniert und wurde somit über Ni – NTA – Agarose (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt. Das Plasmid wurde zunächst in kompetente *E. coli* BL21 DE3 pRARE Rosetta transformiert. Nach Inkubation ÜN wurde eine Vorkultur in 100ml TB – Medium angesetzt, welche nach Schütteln bei 37°C (180rpm) und einer OD von 1 in eine 2L – Kultur überführt wurde. Die weitere Inkubation nach Induktion mit IPTG erfolgte ÜN bei 22°C. Im Anschluss wurden die Pellets abzentrifugiert (4°C, 4000g, 20min) und bei 4°C in 4ml/g Pellet His - Lysepuffer mit Zugabe einer Spatelspitze Protease geschwenkt. Nach Sonication (3x1min, mit einem Output von 40 - 60%, durch den Sonifier®250 (Branson)) auf Eis wurden Zelltrümmer abzentrifugiert (20000g, 30min, 4°C) und der Überstand (50ml) auf 2ml Ni-NTA Agarose gegeben, welche zuvor mit His - Lysepuffer durch Zentrifugation (3x 1min 1500g) äquibriert wurde. Die Beads und das Lysat wurden 2h unter Drehen bei 4°C inkubiert und im Anschluss auf Säulen gegeben. Der Durchlauf wurde aufgefangen, um die Bindung des Proteins zu prüfen. Die Beads wurden 5x mit 5Vol (je 10ml) His - Hochsalz - Waschpuffer (500mM NaCl) und 1x mit 10ml His - Niedersalz - Waschpuffer (250mM NaCl) gewaschen. Im Anschluss wurden die Beads mit 10ml Ni - Elutionspuffer inkubiert und der Durchlauf in 1ml – Fraktionen aufgefangen. Die Fraktionen, welche nach Bradford – Test eluiertes Protein enthielten, wurden gepoolt und nach Zugabe von 100µl TEV – Protease ÜN bei 16°C gegen 3L Dialysepuffer dialysiert. Um den His – Tag aus dem Eluat zu entfernen, wurde dieses erneut auf wie zuvor beschrieben äquibrierte Ni-NTA Agarose gegeben und unter Rotation 2h bei 4°C inkubiert. Das Eluat wurde aufkonzentriert (4°C, 5min, 4500g, MWCO 6000) und über eine Gelfiltrationschromatographie mittels eines Äkta Prime HPLC Purifier – Systems (GE Healthcare) und einer Superdex™75 26/60 - Säule (GE Healthcare) aufgereinigt. Die Säule wurde zuvor mit His – Gelfiltrationspuffer (20mM HEPES, 150mM NaCl,

5mM DTT, 0,05% NP40, 1mM EDTA) äquilibriert und die Elutionen in 2ml – Fraktionen aufgefangen. Auch hier wurde Proteingehalt der Fraktionen anhand des Absorptionsprofils (280nm) durch SDS – PAGE und anschließende Coomassiefärbung kontrolliert. Die Eluate wurden gepoolt und zur Aufbewahrung und weiteren Verwendung auf 10g/L aufkonzentriert.

4.2.3. Methoden zur Detektion von RNA – Protein - Interaktionen

4.2.3.1. Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Der EMSA dient der Untersuchung von RNA – Protein – Interaktionen in nativer Umgebung. Hierbei werden radioaktiv markierte RNA – Oligonukleotide mit putativ bindenden Proteinen bzw. Proteinfragmenten inkubiert und im Anschluss auf ein natives Polyacrylamid – Gel aufgetragen. Als Kontrolle dient eine Probe, welche nur radioaktiv markierte RNA enthält.

Die Inkubation erfolgte in 8µl – Ansätzen in EMSA – Puffer (10mM Tris-HCl (pH 7,5), 2,5nM MgCl₂, 100mM KCl, 15% (v/v) Glycerin, 0,5% Triton-X 100, 0,1mg/ml BSA), welche bei RT für 30min inkubiert wurden. Parallel wurde das Polyacrylamid – Gel unter einer Spannung von 100V in 0,3x TBE – Puffer äquilibriert (mind. 30min, 4°C). Die Proben wurden mit nativem RNA – Probenpuffer versetzt, auf das Gel aufgetragen und liefen unter einer Spannung von 100V in das Gel ein. Nachdem die Proben eingelaufen waren, wurde die Spannung auf 200V erhöht. Die Versuche wurden unter einer Temperatur von 4°C durchgeführt. Bei Bildung eines RNA – Protein – Komplexes ändert sich das Laufverhalten relativ zur reinen Kontroll – RNA, so dass im Anschluss Interaktionen durch unterschiedliche Größen der radioaktiven Banden autoradiographisch detektiert werden konnten.

4.2.3.2. UV - Crosslink – Assay

Der UV Crosslink – Assay ist neben dem EMSA eine weitere Methode zur Detektion von RNA – Protein – Interaktionen. Hierbei werden Proteine mit einem *target* RNA – Oligonukleotid inkubiert, welches radioaktiv markiert ist. Die Proben werden durch UV – Bestrahlung quervernetzt, durch SDS – PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. Hierfür wurde je 20µl der untersuchten Fraktionen mit einem S16 – RNA 15min bei 37°C inkubiert. Die RNA – Oligonukleotide wurden zuvor mit Hilfe des ScriptCap™ m⁷G Capping Systems (Epicenter, Madison, USA) am 5' – Ende mit einem radioaktiv markierten Cap ([α-³²P]-GTP) versehen. Nach der Inkubation erfolgte die UV – Bestrahlung in einem CL-1000 UV Crosslinker (Ultra-Violet Products Ltd., Cambridge) bei 254nm in einem Abstand von 10cm für

20min auf Eis. Durch die radioaktive Markierung der RNA konnten die Crosslinks im Anschluss durch durch SDS – PAGE und Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

4.2.3.3. Biotin – Affinitätschromatographie

Die Biotin – Affinitätschromatographie basiert auf der Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin. Die so etablierte Matrix wurde mit Zellextrakt inkubiert, so dass Moleküle, die spezifisch mit der RNA – Sequenz interagieren, an der Matrix präzipitiert und im Anschluss untersucht werden können. Die an die Matrix gebundenen RNA – Moleküle spezifischer Sequenz waren am 3' - Ende mit Biotin versehen. Um die Interaktion zwischen biotiniertes RNA und Streptavidin – Beads zu etablieren, wurden zunächst 20µl Streptavidin – Matrix zweimal mit je 300µl HS – Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden 6µg der Biotin – RNA ÜN mit den Streptavidin – Beads bei 4°C auf einem Overwheel – Rotor inkubiert. Die so behandelte Matrix wurde je 3mal mit HS – Puffer und 4mal mit NS – Puffer gewaschen (je 300µl). Im Anschluss wurden 150µl Zell – Extrakt zur Matrix gegeben und es erfolgte die Inkubation für 30' bei RT auf dem Overwheel – Rotor.

Die Matrix wurde erneut je dreimal mit NS – Puffer und dreimal mit HS – Puffer gewaschen. Zur Elution der an der RNA präzipitierten Zielproteine wurde in zwei Schritten je 15µl 6M Urea – Puffer je 10' bei RT unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Elutionen wurden gepoolt und für weitere Schritte einer SDS – PAGE unterzogen.

4.2.3.4. Tobramycin - Affinitätschromatographie

Diese Art der Affinitätschromatographie beruht auf einer spezifischen Interaktion zwischen Tobramycin und einer RNA – Sekundärstruktur, welche durch Rando und Hartmuth et al. (281, 282) etabliert wurde. Diese Sekundärstruktur wurde durch Klonierung an das 5' – Ende von TOP - RNAs mit spezifischer Sequenz kloniert. Werden diese an eine Tobramycin – Matrix gekoppelt, können mit der RNA interagierende Proteine aus einem Extrakt präzipitiert und anschließend evaluiert werden.

Zur Durchführung des Experiments wurde zunächst Tobramycin (Sigma – Aldrich) an eine N-Hydroxysuccinimid – Matrix (NHS – Matrix, Amersham Sciences) gekoppelt. Hierfür wurde 500µl der NHS – beads je sechsmal mit 1ml 1mM HCl und im Anschluss sechsmal mit je 1ml Puffer C gewaschen. Die Matrix wurde mit 10mM Tobramycin in Puffer C ÜN bei RT auf dem

Overwheel – Rotor inkubiert. Auf diese Weise erfolgte die Kopplung des Tobramycins an die Matrix. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, erfolgte die Inkubation mit Puffer B für 1h bei RT. Im Anschluss wurde die so behandelte Matrix je dreimal mit Puffer W2 und Puffer W1 gewaschen. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Im letzten Schritt wurde zur Äquilibration die Matrix viermal mit Rando – Puffer (RN – Puffer (281, 282)) gewaschen.

Zur Kopplung der RNA wurde getrocknetes Transkript in 100µl RN – Puffer gelöst und zur Matrix gegeben. Nach Inkubation (RT, Overwheel – Rotor, 45') wurde der Durchlauf zur Kontrolle aufgefangen und es erfolgte die Inkubation der Matrix mit Zellextrakt für 20min bei RT. Der Zellextrakt wurde hierfür mit RN – Puffer im Verhältnis 3:1 verdünnt, um Präzipitationen zu vermeiden. Die Matrix wurde hiernach 4x mit je 500µl RN – Puffer, dann 4x mit je 500µl Puffer R1, 4x mit je 500µl Puffer R2 und 1x mit 500µl RN - Puffer gewaschen, wobei die Fraktionen sowie der Extrakt - Durchlauf zur Kontrolle aufgefangen wurden. Im Anschluss erfolgte die Elution der mit der RNA – Sequenz interagierenden Proteine durch 6M UREA. Die so erhaltenen Elutionen konnten im Anschluss mittels SDS – PAGE weiteren Experimenten unterzogen werden.

4.2.4. Methoden zur eukaryotischen Zellkultur

4.2.4.1. Wachstum und Passagieren eukaryotischer Zellen

In dieser Arbeit wurden HeLa S3 – Zellen sowie HEK 293 – Zellen verwendet. Diese wurden in DMEM mit 10% FCS herangezogen. Bei einer Zelldichte / Konfluenz von 70-80% wurden die Zellen passagiert. Hierbei wurde das Medium abgenommen, die Zellen dreimal mit 1xPBS gewaschen und anschließend für eine Minute mit 1ml Trypsin inkubiert, um die Zellen vom Schalenboden abzutrennen. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 9ml DMEM gestoppt. Von den so behandelten Zellen wurden 10% in neue Behältnisse überführt und die Kultur mit frischem DMEM und FCS aufgefüllt.

4.2.4.2. Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Zellextrakten wurde das Medium von den Zellen abgenommen, die Kultur dreimal mit 1x PBS gewaschen und mit 1ml Trypsin vom Untergrund der Schalen abgelöst. Die Reaktion wurde mit DMEM gestoppt. Durch Zentrifugation (1min 700rpm, 4°C) wurden die Zellen pelletiert und anschließend in adäquaten Mengen Lysepuffer (150mM NaCl, 50mM Tris HCl (pH7,5), 2,5mM MgCl₂, 0,5% (v/v) NP-40, 1mM DTT) aufgenommen. Die Lyse erfolgte auf

Eis sowie mechanisch durch mehrmaliges Auf – und Abziehen des Lysats mittels einer Spritze. In einem weiteren Zentrifugationsschritt (20000g, 30min, 4°C) wurden Zelltrümmer vom Extrakt abgetrennt. Das so erhaltene Lysat wurde entweder im Experiment verwendet oder in flüssigen Stickstoff zur Schockfrostung überführt und bei -80°C aufbewahrt. Alternativ wurden Zellpellets nach der Trypsinbehandlung und dreimaligem Waschen mit PBS in flüssigen Stickstoff überführt und vor der Zellyse bei -80°C aufbewahrt.

5. Abkürzungsverzeichnis

'	Minute
''	Sekunde
%	Prozent
4EBP	<i>4E – binding protein</i>
40S	kleine ribosomale Untereinheit
60S	große ribosomale Untereinheit
7SK	7SK - snRNA
7SK-SI4	<i>Stem loop 4</i> der 7SK - snRNA
80S	Ribosom (40S + 60S, aktiv in der Translation)
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	mikro
μM	mikromolar
A	Adenosin
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
<i>am</i>	<i>Apis mellifera</i>
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
Arg	Arginin
ARM	<i>Arginine-Rich Motif</i>
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase
AUF1	<i>AU-binding factor 1</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Btn	Biotin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin

ca.	circa
CDK	<i>cyclin – dependent kinase</i>
cDNA	<i>complement DNA</i>
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
CL	<i>Cross Link</i>
cm	Zentimeter
CNBP	<i>cellular nucleic-acid-binding protein</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
<i>ct</i>	<i>Chaetomium thermophilum</i>
C - terminal	Carboxyterminal
CTD	C-terminale Domäne
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat
d	desoxy
d.h.	das heißt
<i>d</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
Da	Dalton
ddH ₂ O	<i>double destillated H₂O</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxy - Nukleosidtriphosphat
<i>dr</i>	<i>Danio rerio</i>
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin - Tetraacetat
eEF	eukaryotischer Elongationsfaktor
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
Elu	Elution
EMSA	<i>Electromobility shift Assay</i>
engl.	Englisch
eRF	eukaryotischer Recyclingfaktor

et al.	et alii (und andere)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FKBP12	<i>FK506-binding protein 12kDa</i>
<i>fl</i>	<i>full length</i>
g	Gramm
G	Guanosin
GAP	<i>GTPase activating factor</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
Hep	Heparin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
HEXIM	<i>HEXamethylene-bis-acetamide-Inducible protein in vascular smooth Muscle cells</i>
HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
<i>hs</i>	<i>Homo sapiens</i>
IC	<i>Initiation Complex</i>
IgG	Immunglobulin Klasse G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IRES	<i>Internal ribosome entry site</i>
IRS1	<i>Insulin Receptor Substrate 1</i>
ITC	<i>isothermal titration calorimetry</i>
k	kilo
K _D	Dissoziationskonstante
kg	Kilogramm
L	Liter
L7M	La – Modul von Larp7
La	Lupus Autoantigen

Larp	<i>La – related protein</i>
LaM	La - Motiv
m	milli
M	molar
MeCPE	<i>Methylphosphate Capping Enzyme</i>
m ₇ G	N ₇ -Monomethylguanosin
min	Minute
miRNA	<i>micro RNA</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mRNP	<i>messenger Ribonucleoprotein particle</i>
ms	milli Siemens
mTOR	<i>mechanistic / mammalian target of rapamycin</i>
<i>mut</i>	mutiert
n	nano
nM	nanomolar
NMR	<i>Nuclear magnetic resonance</i>
ns	<i>not starved</i>
N - terminal	Aminoterminal
NTD	N-terminale Domäne
Oligo	Oligonukleotid
ORF	<i>Open reading frame</i>
p	piko
P	Phosphat
PABPC1	Poly (A) - bindendes Protein cytoplasmatisch 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
pH	Protonenkonzentration (negativer dekadischer Logarithmus)
PI3K	Phosphoinositid 3 - Kinase
PIC	<i>Preinitiation Complex</i>
pmol	pikomol

PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
PolII	RNA – Polymerase II
PolIII	RNA – Polymerase III
pTEFb	<i>positive transcription elongation factor b</i>
RACK1	<i>Receptor for activated C Kinase 1</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	<i>revolutions per minute</i>
rpL	<i>ribosomal subunit protein , large</i>
rpS	<i>ribosomal subunit protein , small</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RT	Reverse Transkription
S6K	S6 - Kinase
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SAXS	<i>Small angle X-ray scattering</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SI	<i>stem loop</i>
SMART	<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear RNP</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snoRNP	<i>small nucleolar RNP</i>
st	<i>starved</i>
T	Tiar
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TIA	<i>T-cell intracellular antigen</i>
TIAR	<i>T-cell intracellular antigen related</i>

TLRE	<i>translational regulatory element</i>
Tobra	Tobramycin
TOP	<i>Terminal Oligopyrimidine</i>
TOR	<i>Target of rapamycin</i>
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
tRNA	<i>transfer RNA</i>
TSC	<i>Tuberous sclerosis complex</i>
U	Uracil
u.a.	unter anderem
UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UTR	<i>Untranslated region</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume per volume</i> (Volumenanteil)
Vol.	Volumen / Volumina
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i> (Gewichtsanteil)
YBX-1	<i>Y box binding protein-1</i>
z. B.	zum Beispiel

5.1. Abkürzungsverzeichnis der 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

5.2. Abkürzungsverzeichnis der Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

6. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Initiation der Cap-abhängigen Translation.	4
Abb. 2:	mTOR-abhängige Signaltransduktionswege.	7
Abb. 3:	Elemente der 5'UTR einer TOP-RNA am Beispiel der rps16-mRNA.	9
Abb. 4:	Schematische Darstellung der Humanen Homologe TIA-1 und TIAR	12
Abb. 5:	Strukturelle Aspekte von La, Larp1 und Larp7.	17
Abb. 6:	Sekundärstruktur der snRNA 7SK.	19
Abb. 7:	Nachweis spezifischer Bindung von TIAR an die TOP-UTRs von L32 bzw. S16-RNA.	25
Abb. 8:	Schematische Darstellung der klonierten TIAR-Fragmente der Organismen <i>Homo sapiens</i> , <i>Drosophila melanogaster</i> , <i>Danio rerio</i> und <i>Apis mellifera</i>	27
Abb. 9:	Nachweis erfolgreicher Induktion diverser TIAR-Fragmente.	28
Abb. 10:	Elutionsprofile der TIAR-Konstrukte hsT1-2 und hsT2-3.	29
Abb. 11:	Elutionsprofile der verbleibenden TIAR-Konstrukte.	30
Abb. 12:	EMSA der jeweiligen die RRM1-RRM3 umspannenden TIAR-Konstrukte.	32
Abb. 13:	EMSA mit hsT1-3 und S16TOP- bzw. S16TOPmut-RNA.	33
Abb. 14:	EMSA mit hsT1-3 und S16TOP- bzw. L32TOP-RNA.	34
Abb. 15:	EMSA mit hsT1-3 und L32TO – bzw. L32TOPmut-RNA.	35
Abb. 16:	Bestimmung der K_D von hsT1-3 und L32TOP durch EMSA	36
Abb. 17:	Ermittlung der K_D und Heparin-Sensitivität gegenüber RNAs verschiedener Längen von hsT2-3.	37
Abb. 18:	EMSA zur Ermittlung der Spezifität der Bindung zwischen ctT1-3 und L32TOP. ...	38
Abb. 19:	EMSA zur Ermittlung des Einflusses der Oligomer-Länge auf die Bindung zwischen ctT1-3 und RNA.	38
Abb. 20:	Ermittlung der K_D zwischen ctT1-3 und A) L32TOP bzw. B) eEF1BTOP.	39
Abb. 21:	Ermittlung der K_D zwischen drT1-3 und L32TOP durch EMSA	40
Abb. 22:	Aufreinigung und Identifizierung von 14-3-3 ϵ als TOP-interagierendem Protein	42
Abb. 23:	Immunpräzipitation und Identifikation der TOP-mRNA rpL23 als Interaktor des induzierten Flag-HA-Larp1.	46

Abb. 24:	Biotin-Affinitäts – Chromatographie mit immobilisierten RNA-TOP – Elementen S16, S16mut, L32TOP und L32mut.	47
Abb. 25:	EMSA mit OligoU16 sowie Heparin (2µg), BSA (1µg) und tRNA (0,5µg).	49
Abb. 26:	EMSA mit dem Larp7-Modul L7M und OligoU-RNA verschiedener Länge.	50
Abb. 27:	EMSA zur Untersuchung der benötigten Menge an tRNA.	50
Abb. 28:	EMSAs zur Charakterisierung des L7M-U16-tRNA – mRNPs.	51
Abb. 29:	EMSA zur Charakterisierung von 7SK-SI4 als Zielsequenz von L7M.	52
Abb. 30:	EMSAs zur Charakterisierung des Einflusses von tRNA auf die Ausbildung des L7M – 7SK-SI4 – mRNPs.	53
Abb. 31:	Erörterung des Einflusses von Heparin bzw. Arginin auf das L7M – 7SK-SI4 – RNP durch EMSA.	54
Abb. 32:	EMSA zur Bestimmung der K_D von 7SK-SI4 sowie eines Minimalkonstruktes 7SK- SI4/2 mit L7M.	55
Abb. 33:	Schematische Darstellung der Bindung von TIAR an TOP-RNAs verschiedener Länge.	59
Abb. 34:	Darstellung der TOP-Translations-Inhibition durch TIAR und LARP1 in Abhängigkeit von mTOR.	63
Abb. 35:	Vergleich der Sekundärstrukturen des HI- viralen TAR-Elements und des stem loop 4 der 7SK-RNA (7SK-SI4).	69

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Weitere identifizierte Proteine, die spezifisch mit dem TOP-Motiv interagieren. 23

Tabelle 2: TIAR-Konstrukte, RNA-Oligomere und ermittelte K_D s. 40

Tabelle 3: Durch Massenspektrometrie identifizierte Proteine, welche sich nach der
Aufreinigung von 14-3-3 ϵ in der TCA-gefällten Fraktion befanden. 44

Tabelle 4: Gegenüberstellung der K_D s von hsT1-3 und hsT2-3 mit diversen
Literaturkonstanten. 58

Tabelle 5: Zusammenfassung der erörterten K_D s der in dieser Arbeit verwendeten TIAR –
Konstrukte sowie der entsprechend eingesetzten RNA-Oligomere. 58

8. Literaturverzeichnis

1. Crick F. H. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol.* 1958;12:138-63.
2. Furth J.J., Hurwitz J., Anders M. The role of deoxyribonucleic acid in ribonucleic acid synthesis. I. The purification and properties of ribonucleic acid polymerase. *J Biol Chem.* 1962 Aug;237:2611-9.
3. Weiss S.B. Enzymatic incorporation of ribonucleoside triphosphates into the interpolynucleotide linkages of ribonucleic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1960 Aug;46(8):1020-30.
4. Cramer P., Bushnell D.A., Fu J., Gnatt A.L., Maier-Davis B., Thompson N.E., Burgess R.R., Edwards A.M., David P.R., Kornberg R.D. Architecture of RNA polymerase II and implications for the transcription mechanism. *Science.* 2000 Apr 28;288(5466):640-9.
5. Borukhov S., Nudler E. 2008. RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol.* 2008 Mar;16(3):126-34.
6. Mulder C., Arrand J.R., Delius H., Keller W., Pettersson U., Roberts R.J., Sharp P.A. Cleavage maps of DNA from adenovirus types 2 and 5 by restriction endonucleases EcoRI and HpaI. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 1975;39 Pt 1:397-400.
7. Chow L.T., Roberts J.M., Lewis J.B., Broker T.R. A map of cytoplasmic RNA transcripts from lytic adenovirus type 2, determined by electron microscopy of RNA:DNA hybrids. *Cell.* 1977 Aug;11(4):819-36.
8. Chow L.T., Gelinas R.E., Broker T.R., Roberts R.J. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell.* 1977 Sep;12(1):1-8.
9. Chow L.T., Broker T.R. The spliced structures of adenovirus 2 fiber message and the other late mRNAs. *Cell.* 1978 Oct;15(2):497-510.
10. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Aug;74(8):3171-5.
11. Han J., Xiong J., Wang D., Fu X.D. 2011. Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends Cell Biol.* 2011 Jun;21(6):336-43.
12. Chari A., Golas M.M., Klingenhager M., Neuenkirchen N., Sander B., Englbrecht C., Sickmann A., Stark H., Fischer U. 2008. An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs. *Cell.* 2008 Oct 31;135(3):497-509.
13. Shatkin A.J. Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell.* 1976 Dec;9(4 PT 2):645-53.
14. Hamm J., Mattaj I.W. Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell.* 1990 Oct 5;63(1):109-18.

15. Shuman S. Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;66:1-40.
16. Moteki S., Price D. Functional coupling of capping and transcription of mRNA. *Mol Cell.* 2002 Sep;10(3):599-609.
17. Ramanathan A., Robb G.B., Chan S.H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res.* 2016 Sep 19;44(16):7511-26.
18. Takagaki Y., Ryner L.C., Manley J.L. Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. *Cell.* 1988 Mar 11;52(5):731-42.
19. Dargemont C., Kühn L.C. Export of mRNA from microinjected nuclei of *Xenopus laevis* oocytes. *J Cell Biol.* 1992 Jul;118(1):1-9.
20. Köhler A., Hurt E. Exporting RNA from the nucleus to the cytoplasm. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007 Oct;8(10):761-73.
21. Stewart M. Polyadenylation and nuclear export of mRNAs. *J Biol Chem.* 2019 Mar 1;294(9):2977-2987.
22. Hinnebusch A.G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:779-812.
23. Hickey E.D., Weber L.A., Baglioni C. Inhibition of initiation of protein synthesis by 7-methylguanosine-5'-monophosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1976 Jan;73(1):19-23.
24. Rao M.S., Hirsch F., Wu B.C., Spohn W.H., Busch H. Comparative studies on the '5'-cap' and in vitro translational activity of cytoplasmic and nuclear poly A(+) RNA1. *Mol Cell Biochem.* 1977 Mar 21;15(1):3-13.
25. Kaempfer R., Rosen H., Israeli R. Translational control: recognition of the methylated 5' end and an internal sequence in eukaryotic mRNA by the initiation factor that binds methionyl-tRNA^{fMet}. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Feb;75(2):650-4.
26. Sonenberg N., Morgan M.A., Merrick W.C., Shatkin A.J. A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1978 Oct;75(10):4843-7.
27. Caskey C.T., Tompkins R., Scolnick E., Caryk T., Nirenberg M. Sequential translation of trinucleotide codons for the initiation and termination of protein synthesis. *Science.* 1968 Oct 4;162(3849):135-8.
28. Richter D., Lipmann F., Tarragó A., Allende J.E. Interaction of eukaryote initiator methionyl-tRNA with the eukaryote equivalent of bacterial elongation factor T and guanosine triphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Aug;68(8):1805-9.

29. Levin D.H., Kyner D., Acs G. Protein initiation in eukaryotes: formation and function of a ternary complex composed of a partially purified ribosomal factor, methionyl transfer RNA, and guanosine triphosphate. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1973 Jan;70(1):41-5.
30. Kozak M. Evaluation of the "scanning model" for initiation of protein synthesis in eucaryotes. *Cell.* 1980 Nov;22(1 Pt 1):7-8.
31. Merrick W.C., Pavitt G.D. Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Dec 3;10(12).
32. López-Lastra M., Rivas A., Barría M.I. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol Res.* 2005;38(2-3):121-46.
33. Jackson R.J. The current status of vertebrate cellular mRNA IRESs. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2013 Feb 1;5(2).
34. Roberts L., Wieden H.J. Viruses, IRESs, and a universal translation initiation mechanism. *Biotechnol Genet Eng Rev.* 2018 Apr;34(1):60-75.
35. Proud C.G. Peptide-chain elongation in eukaryotes. *Mol Biol Rep.* 1994 May;19(3):161-70.
36. Sasikumar A.N., Perez W.B., Kinzy T.G. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012 Jul-Aug;3(4):543-55.
37. Browne G.J., Proud C.G. Regulation of peptide-chain elongation in mammalian cells. *Eur J Biochem.* 2002 Nov;269(22):5360-8.
38. Frolova L., Le Goff X., Rasmussen H.H., Cheperegin S., Dugeon G., Kress M., Arman I., Haenni A.L., Celis J.E., Philippe M., et al. A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor. *Nature.* 1994 Dec 15;372(6507):701-3.
39. Song H., Mugnier P., Das A.K., Webb H.M., Evans D.R., Tuite M.F., Hemmings B.A., Barford D. The crystal structure of human eukaryotic release factor eRF1--mechanism of stop codon recognition and peptidyl-tRNA hydrolysis. *Cell.* 2000 Feb 4;100(3):311-21.
40. Frolova L., Le Goff X., Zhouravleva G., Davydova E., Philippe M., Kisselev L. Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase. *RNA.* 1996 Apr;2(4):334-41.
41. Kozlov G., Gehring K. Molecular basis of eRF3 recognition by the MLE domain of poly(A)-binding protein. *PLoS One.* 2010 Apr 14;5(4):e10169.
42. Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., Sachs A.B. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell.* 1998 Jul;2(1):135-40.

43. Hellen C.U.T. Translation Termination and Ribosome Recycling in Eukaryotes. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2018 Oct 1;10(10).
44. Pestova T.V., Kolupaeva V.G., Lomakin I.B., Pilipenko E.V., Shatsky I.N., Agol V.I., Hellen C.U. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Jun 19;98(13):7029-36.
45. Shirokikh N.E., Preiss T. Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2018 Jul;9(4):e1473.
46. Jackson R.J., Hellen C.U., Pestova T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010 Feb; 11(2):113-27.
47. Sonenberg N., Hinnebusch A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* 2009 Feb 20; 136(4):731-45.
48. Asano K., Shalev A., Phan L., Nielsen K., Clayton J., Valásek L., Donahue T.F., Hinnebusch A.G. Multiple roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. *EMBO J.* 2001 May 1; 20(9):2326-37.
49. He H., von der Haar T., Singh C.R., Li M., Li B., Hinnebusch A.G., McCarthy J.E., Asano K. The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection. *Mol Cell Biol.* 2003 Aug; 23(15):5431-45.
50. Korneeva N.L., Lamphear B.J., Hennigan F.L., Rhoads R.E. Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. *J Biol Chem.* 2000 Dec 29; 275(52):41369-76.
51. Grifo J.A., Tahara S.M., Morgan M.A., Shatkin A.J., Merrick W.C. New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J Biol Chem.* 1983 May 10;258(9):5804-10.
52. Merrick W.C. eIF4F: a retrospective. *J Biol Chem.* 2015 Oct 2;290(40):24091-9.
53. Kozak M. Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *J Biol Chem.* 1991 Oct 25; 266(30):19867-70.
54. Parsyan A., Svitkin Y., Shahbazian D., Gkogkas C., Lasko P., Merrick W.C., Sonenberg N. mRNA helicases: the tacticians of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Apr;12(4):235-45.
55. Rogers G.W. Jr., Komar A.A., Merrick W.C. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2002;72:307-31.

56. Pestova T.V., Kolupaeva V.G. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 2002 Nov 15; 16(22):2906-22.
57. Hinnebusch A.G. Structural Insights into the Mechanism of Scanning and Start Codon Recognition in Eukaryotic Translation Initiation. *Trends Biochem Sci.* 2017 Aug;42(8):589- 611.
58. Das S., Maitra, U. Functional significance and mechanism of eIF5-promoted GTP hydrolysis in eukaryotic translation initiation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 2001;70:207-31.
59. Unbehauen A., Borukhov S.I., Hellen C.U., Pestova T.V. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev.* 2004 Dec 15;18(24):3078-93.
60. Roll-Mecak A., Shin B.S., Dever T.E., Burley S.K. Engaging the ribosome: Universal IFs of translation. *Trends Biochem Sci.* 2001 Dec;26(12):705-9.
61. Shin B.S., Maag D., Roll-Mecak A., Arefin M.S., Burley S.K., Lorsch J.R., Dever T.E. Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity. *Cell.* 2002 Dec 27;111(7):1015-25.
62. Huang S., Ingber D.E. The structural and mechanical complexity of cell-growth control. *Nat Cell Biol.* 1999 Sep;1(5):E131-8.
63. Dobashi Y., Watanabe Y., Miwa C., Suzuki S., Koyama S. Mammalian target of rapamycin: a central node of complex signaling cascades. *Int J Clin Exp Pathol.* 2011 Jun 20;4(5):476-95.
64. Liu G.Y., Sabatini D.M. mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2020 Apr;21(4):183-203.
65. Saxton R.A., Sabatini D.M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell.* 2017 Apr 6;169(2):361-371.
66. Fingar D.C., Blenis J. Target of rapamycin (TOR): an integrator of nutrient and growth factor signals and coordinator of cell growth and cell cycle progression. *Oncogene.* 2004 Apr 19;23(18):3151-71.
67. Hay N., Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 2004 Aug 15;18(16):1926-45.
68. Giguère V. Canonical signaling and nuclear activity of mTOR—a teamwork effort to regulate metabolism and cell growth. *FEBS J.* 2018 May;285(9):1572-1588.

69. Kunz J., Henriquez R., Schneider U., Deuter-Reinhard M., Movva N.R., Hall M.N. Target of rapamycin in yeast, TOR2, is an essential phosphatidylinositol kinase homolog required for G1 progression. *Cell*. 1993 May 7;73(3):585-96.
70. Helliwell S.B., Wagner P., Kunz J., Deuter-Reinhard M., Henriquez R., Hall M.N. TOR1 and TOR2 are structurally and functionally similar but not identical phosphatidylinositol kinase homologues in yeast. *Mol Biol Cell*. 1994 Jan;5(1):105-18.
71. Brown E.J., Albers M.W., Shin T.B., Ichikawa K., Keith C.T., Lane W.S., Schreiber S.L. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994 Jun 30;369(6483):756-8.
72. Chiu M.I., Katz H., Berlin V. RAPT1, a mammalian homolog of yeast Tor, interacts with the FKBP12/rapamycin complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Dec 20;91(26):12574-8.
73. Sabatini D.M., Erdjument-Bromage H., Lui M., Tempst P., Snyder S.H. RAFT1: a mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell*. 1994 Jul 15;78(1):35-43.
74. Kim D.H., Sarbassov D.D., Ali S.M., King J.E., Latek R.R., Erdjument-Bromage H., et al. mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*. 2002;110:163–175.
75. Hara K., Maruki Y., Long X., Yoshino K., Oshiro N., Hidayat S., et al. Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell*. 2002;110:177–189.
76. Sarbassov D.D., Ali S.M., Kim D.H., Guertin D.A., Latek R.R., Erdjument-Bromage H, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol*. 2004;14:1296–1302.
77. Eng C.P., Sehgal S.N., Vézina C. Activity of rapamycin (AY-22,989) against transplanted tumors. *J Antibiot (Tokyo)*. 1984 Oct; 37(10):1231-7.
78. Martel R.R., Klicius J., Galet S. Inhibition of the immune response by rapamycin, a new antifungal antibiotic. *Can J Physiol Pharmacol*. 1977 Feb; 55(1):48-51.
79. Vézina C., Kudelski A., Sehgal S.N. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*. 1975 Oct; 28(10):721-6.
80. Lamming D.W. Inhibition of the Mechanistic Target of Rapamycin (mTOR)-Rapamycin and Beyond. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2016 May 2;6(5).
81. Chung J., Kuo C.J., Crabtree G.R., Blenis J. Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell*. 1992 Jun 26; 69(7):1227-36.

82. Brown E.J., Albers M.W., Shin T.B., Ichikawa K., Keith C.T., Lane W.S., Schreiber S.L. A mammalian protein targeted by G1-arresting rapamycin-receptor complex. *Nature*. 1994 Jun 30; 369(6483):756-8.
83. Sabers C.J., Martin M.M., Brunn G.J., Williams J.M., Dumont F.J., Wiederrecht G., Abraham R.T. Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *J Biol Chem*. 1995 Jan 13; 270(2):815-22.
84. Choi J., Chen J., Schreiber S.L., Clardy J. Structure of the FKBP12-rapamycin complex interacting with the binding domain of human FRAP. *Science*. 1996 Jul 12; 273(5272):239-42.
85. Nishiuma T., Hara K., Tsujishita Y., Kaneko K., Shii K., Yonezawa K. Characterization of the phosphoproteins and protein kinase activity in mTOR immunoprecipitates. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998 Nov 18;252(2):440-4.
86. Brown E.J., Beal P.A., Keith C.T., Chen J., Shin T.B., Schreiber S.L. Control of p70 s6 kinase by kinase activity of FRAP in vivo. *Nature*. 1995 Oct 5;377(6548):441-6.
87. Hara K., Yonezawa K., Kozlowski M.T., Sugimoto T., Andrabi K., Weng Q.P., Kasuga M., Nishimoto I., Avruch J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem*. 1997 Oct 17;272(42):26457-63.
88. Burnett P.E., Barrow R.K., Cohen N.A., Snyder S.H., Sabatini D.M. RAFT1 phosphorylation of the translational regulators p70 S6 kinase and 4E-BP1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Feb 17;95(4):1432-7.
89. Viel S., Besson L., Marotel M., Walzer T., Marçais A. Regulation of mTOR, Metabolic Fitness, and Effector Functions by Cytokines in Natural Killer Cells. *Cancers (Basel)*. 2017 Sep 28;9(10).
90. Ren W., Yin J., Duan J., Liu G., Tan B., Yang G., Wu G., Bazer F.W., Peng Y., Yin Y. mTORC1 signaling and IL-17 expression: Defining pathways and possible therapeutic targets. *Eur J Immunol*. 2016 Feb;46(2):291-9.
91. Ali A.K., Nandagopal N., Lee S.H. IL-15-PI3K-AKT-mTOR: A Critical Pathway in the Life Journey of Natural Killer Cells. *Front Immunol*. 2015 Jul 20;6:355.
92. Kroczyńska B., Mehrotra S., Arslan A.D., Kaur S., Platanias L.C. Regulation of interferon-dependent mRNA translation of target genes. *J Interferon Cytokine Res*. 2014 Apr;34(4):289-96.
93. Schmeisser H., Bekisz J., Zoon K.C. New function of type I IFN: induction of autophagy. *J Interferon Cytokine Res*. 2014 Feb;34(2):71-8.
94. Pernice H.F., Schieweck R., Kiebler M.A., Popper B. mTOR and MAPK: from localized translation control to epilepsy. *BMC Neurosci*. 2016 Nov 17;17(1):73.

95. Beugnet A., Tee A.R., Taylor P.M., Proud C.G. Regulation of targets of mTOR (mammalian target of rapamycin) signalling by intracellular amino acid availability. *Biochemical Journal*. 2003;372(2):555–566.
96. Dreyer H.C., Drummond M.J., Pennings B., et al. Leucine-enriched essential amino acid and carbohydrate ingestion following resistance exercise enhances mTOR signaling and protein synthesis in human muscle. *American Journal of Physiology*. 2008;294(2):E392–E400.
97. Long X., Ortiz-Vega S., Lin Y., Avruch J. Rheb binding to mammalian target of rapamycin (mTOR) is regulated by amino acid sufficiency. *The Journal of Biological Chemistry*. 2005;280(25):23433–23436.
98. Peyrollier K., Hajduch E., Blair A.S., Hyde R., Hundal H.S. L-leucine availability regulates phosphatidylinositol 3-kinase, p70 s6 kinase and glycogen synthase kinase-3 activity in L6 muscle cells: evidence for the involvement of the mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway in the L-leucine-induced up-regulation of System A amino acid transport. *Biochemical Journal*. 2000;350(2):361–368.
99. Sato T., Nakashima A., Guo L., Coffman K., Tamanoi F. Single amino-acid changes that confer constitutive activation of mTOR are discovered in human cancer. *Oncogene*. 2010;29(18):2746–2752.
100. Tremblay F., Marette A. Amino acid and insulin signaling via the mTOR/p70 S6 kinase pathway. A negative feedback mechanism leading to insulin resistance in skeletal muscle cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 2001;276(41):38052–38060.
101. Zhang Y.J., Tian X.Q., Sun D.F., Zhao S.L., Xiong H., Fang J.Y. Combined inhibition of MEK and mTOR signaling inhibits initiation and progression of colorectal cancer. *Cancer Investigation*. 2009;27(3):273–285.
102. Nicklin P., Bergman P., Zhang B., et al. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR and autophagy. *Cell*. 2009;136(3):521–534.
103. Loewith R., Hall M.N. Target of rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics*. 2011 Dec; 189(4):1177-201.
104. Sofer A., Lei K., Johannessen C.M., Ellisen L.W. Regulation of mTOR and cell growth in response to energy stress by REDD1. *Mol Cell Biol*. 2005 Jul; 25(14):5834-45.
105. Shepherd P.R. Mechanisms regulating phosphoinositide 3-kinase signalling in insulin-sensitive tissues. *Acta Physiol Scand*. 2005 Jan;183(1):3-12.
106. Shepherd P.R., Withers D.J., Siddle K. Phosphoinositide 3-kinase: the key switch mechanism in insulin signalling. *Biochem J*. 1998 Aug 1;333 (Pt 3):471-90.

107. Vanhaesebroeck B., Stephens L., Hawkins P. PI3K signalling: the path to discovery and understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2012 Feb 23; 13(3):195-203.
108. Huang J., Manning B.D. The TSC1-TSC2 complex: a molecular switchboard controlling cell growth. *Biochem J.* 2008 Jun 1;412(2):179-90.
109. Gowans G.J., Hawley S.A., Ross F.A., Hardie D.G. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab.* 2013 Oct 1; 18(4):556-66.
110. Xiao B., Heath R., Saiu P., Leiper F.C., Leone P., Jing C., Walker P.A., Haire L., Eccleston J.F., Davis C.T., et al. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature.* 2007;449:496–500.
111. Hardie D.G. AMPK--sensing energy while talking to other signaling pathways. *Cell Metab.* 2014 Dec 2;20(6):939-52.
112. Hardie D.G. Sensing of energy and nutrients by AMP-activated protein kinase. *Am J Clin Nutr.* 2011 Apr;93(4):891S-6.
113. Sancak Y., Bar-Peled L., Zoncu R., Markhard A.L., Nada S., Sabatini D.M. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell.* 2010 Apr 16;141(2):290-303.
114. Sancak Y., Peterson T.R., Shaul Y.D., Lindquist R.A., Thoreen C.C., Bar-Peled L., Sabatini D.M. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science.* 2008 Jun 13; 320(5882):1496-501.
115. Bar-Peled L., Schweitzer L.D., Zoncu R., Sabatini D.M. Ragulator is a GEF for the rag GTPases that signal amino acid levels to mTORC1. *Cell.* 2012 Sep 14; 150(6):1196-208.
116. Zoncu R., Bar-Peled L., Efeyan A., Wang S., Sancak Y., Sabatini D.M. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H(+)-ATPase. *Science.* 2011 Nov 4; 334(6056):678-83.
117. Rocco M., Bos J.L., Zwartkruis F.J. Regulation of the small GTPase Rheb by amino acids. *Oncogene.* 2006 Feb 2;25(5):657-64.
118. Brown E.J., Beal P.A., Keith C.T., Chen J., Shin T.B., Schreiber S.L. Control of p70 S6 kinase by kinase activity of FRAP *in vivo*. *Nature.* 1995 Oct 5;377(6548):441-6.
119. Hara K., Yonezawa K., Kozlowski M.T., Sugimoto T., Andrabi K., Weng Q.P., Kasuga M., Nishimoto I., Avruch J. Regulation of eIF-4E BP1 phosphorylation by mTOR. *J Biol Chem.* 1997 Oct 17;272(42):26457-63.
120. Shima H., Pende M., Chen Y., Fumagalli S., Thomas G., Kozma S.C. Disruption of the p70(s6k)/p85(s6k) gene reveals a small mouse phenotype and a new functional S6 kinase. *EMBO J.* 1998 Nov 16;17(22):6649-59.

121. Lee-Fruman K.K., Kuo C.J., Lippincott J., Terada N., Blenis J. Characterization of S6K2, a novel kinase homologous to S6K1. *Oncogene*. 1999 Sep 9;18(36):5108-14.
122. Haghighat A., Mader S., Pause A., Sonenberg N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J*. 1995 Nov 15;14(22):5701-9.
123. Marcotrigiano J., Gingras A. C., Sonenberg, N., and Burley, S. K. Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell*. 1999 Jun;3(6):707-16.
124. Gressner A.M., Wool I.G. The phosphorylation of liver ribosomal proteins *in vivo*. Evidence that only a single small subunit (S6) is phosphorylated. *J Biol Chem*. 1974 Nov 10;249(21):6917-25.
125. Fumagalli S., Thomas G. S6 phosphorylation and signal transduction. In: Sonenberg N., Hershey J.W.B., Mathews M.B., editors. *Translational control of gene expression*. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2000. pp. 695–717
126. Ruvinsky I., Meyuhas O. Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*. 2006 Jun;31(6):342-8.
127. Meyuhas O. Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur J Biochem*. 2000 Nov;267(21):6321-30.
128. Bucher P. Weight matrix descriptions of four eukaryotic RNA polymerase II promoter elements derived from 502 unrelated promoter sequences. *J Mol Biol*. 1990 Apr 20;212(4):563-78.
129. Geyer P.K., Meyuhas O., Perry R.P., Johnson L.F. Regulation of Ribosomal Protein mRNA Content and Translation in Growth-Stimulated Mouse Fibroblasts. *Mol Cell Biol*. 1982 Jun;2(6):685-93.
130. Mariottini P., Bagni C., Annesi F., Amaldi F. Isolation and nucleotide sequences of cDNAs for *Xenopus laevis* ribosomal protein S8: similarities in the 5' and 3' untranslated regions of mRNAs for various r-proteins. *Gene*. 1988 Jul 15;67(1):69-74.
131. Mariottini P., Amaldi F. The 5' untranslated region of mRNA for ribosomal protein S19 is involved in its translational regulation during *Xenopus* development. *Mol Cell Biol*. 1990 Feb;10(2):816-22.
132. Dudov K.P., Perry R.P. The gene family encoding the mouse ribosomal protein L32 contains a uniquely expressed intron-containing gene and an unmutated processed gene. *Cell*. 1984 Jun;37(2):457-68.
133. Wiedemann L.M., Perry R.P. Characterization of the expressed gene and several processed pseudogenes for the mouse ribosomal protein L30 gene family. *Mol Cell Biol*. 1984 Nov;4(11):2518-28.

134. Wagner M., Perry R.P. Characterization of the multigene family encoding the mouse S16 ribosomal protein: strategy for distinguishing an expressed gene from its processed pseudogene counterparts by an analysis of total genomic DNA. *Mol Cell Biol.* 1985 Dec;5(12):3560-76.
135. Meyuhas O., Klein A. The mouse ribosomal protein L7 gene. Its primary structure and functional analysis of the promoter region. *J Biol Chem.* 1990 Jul 15;265(20):11465-73.
136. Huxley C., Fried M. The mouse rpl7a gene is typical of other ribosomal protein genes in its 5' region but differs in being located in a tight cluster of CpG-rich islands. *Nucleic Acids Res.* 1990 Sep 25;18(18):5353-7.
137. Kuzumaki T., Tanaka T., Ishikawa K., Ogata K. Rat ribosomal protein L35a multigene family: molecular structure and characterization of three L35a-related pseudogenes. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Jul 14;909(2):99-106.
138. Rhoads D.D., Dixit A., Roufa D.J. Primary structure of human ribosomal protein S14 and the gene that encodes it. *Mol Cell Biol.* 1986 Aug;6(8):2774-83.
139. Chen I.T., Roufa D.J. The transcriptionally active human ribosomal protein S17 gene. *Gene.* 1988 Oct 15;70(1):107-16.
140. Biberman Y., Meyuhas O. Substitution of just five nucleotides at and around the transcription start site of rat beta-actin promoter is sufficient to render the resulting transcript a subject for translational control. *FEBS Lett.* 1997 Apr 1;405(3):333-6.
141. Levy S., Avni D., Hariharan N., Perry R.P., Meyuhas O. Oligopyrimidine tract at the 5' end of mammalian ribosomal protein mRNAs is required for their translational control. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Apr 15;88(8):3319-23.
142. Avni D., Shama S., Loreni F., Meyuhas O. Vertebrate mRNAs with a 5'-Terminal Pyrimidine Tract Are Candidates For Translational Repression In Quiescent Cells: Characterization Of the Translational cis-Regulatory Element. *Mol Cell Biol.* 1994 Jun;14(6):3822-33.
143. Hornstein E., Git A., Braunstein I., Avni D., Meyuhas O. The expression of poly(A)-binding protein gene is translationally regulated in a growth-dependent fashion through a 5'-terminal oligopyrimidine tract motif. *J Biol Chem.* 1999 Jan 15;274(3):1708-14.
144. Iadevaia V., Caldarola S., Tino E., Amaldi F., Loreni F. All translation elongation factors and the e, f, and h subunits of translation initiation factor 3 are encoded by 5'-terminal oligopyrimidine (TOP) mRNAs. *RNA.* 2008 Sep;14(9):1730-6.
145. Loreni F., Iadevaia V., Tino E., Caldarola S., Amaldi F. RACK1 mRNA translation is regulated via a rapamycin-sensitive pathway and coordinated with ribosomal protein synthesis. *FEBS Lett.* 2005 Oct 24;579(25):5517-20. Epub 2005 Sep 27

146. Kakegawa T., Ohuchi N., Hayakawa A., Hirata S., Matsuda M., Kogure K., Kobayashi H., Inoue A., Kaspar R. L. Identification of AUF1 as a rapamycin-responsive binding protein to the 5'-terminal oligopyrimidine element of mRNAs. *Arch Biochem Biophys.* 2007 Sep 1;465(1):274-81.
147. Pelczar P., Filipowicz W. The host gene for intronic U17 small nucleolar RNAs in mammals has no protein-coding potential and is a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family. *Mol Cell Biol.* 1998 Aug;18(8):4509-18.
148. Smith C.M., Steitz J.A. Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes. *Mol Cell Biol.* 1998 Dec;18(12):6897-909.
149. Shama S., Meyuhas O. The translational cis-regulatory element of mammalian ribosomal protein mRNAs is recognized by the plant translational apparatus. *Eur J Biochem.* 1996 Mar 1;236(2):383-8.
150. Pierandrei-Amaldi P., Campioni N., Beccari E., Bozzoni I., Amaldi F. Expression of ribosomal-protein genes in *Xenopus laevis* development. *Cell.* 1982 Aug; 30(1):163-71.
151. Amaldi F., Bozzoni I., Beccari E., Pierandrei-Amaldi P. Expression of ribosomal protein genes and regulation of ribosome biosynthesis in *Xenopus* development. *Trends Biochem Sci.* 1989 May; 14(5):175-8.
152. Amaldi F., Camacho-Vanegas O., Cardinall B., Cecconi F., Crosio C., Loreni F., Mariottini P., Pellizzoni L., Pierandrei-Amaldi P. Structure and expression of ribosomal protein genes in *Xenopus laevis*. *Biochem Cell Biol.* 1995;73:969-977.
153. Amaldi F., Pierandrei-Amaldi P. TOP genes: a translationally controlled class of genes including those coding for ribosomal proteins. *Prog Mol Subcell Biol.* 1997;18:1-17
154. Amaldi F., Pierandrei-Amaldi P. Translational regulation of the expression of ribosomal protein genes in *Xenopus laevis*. *Enzyme.* 1990; 44(1-4):93-105.
155. Schwab M.S., Kim S.H., Terada N., Edfjäll C., Kozma S.C., Thomas G., Maller J.L. p70(S6K) controls selective mRNA translation during oocyte maturation and early embryogenesis in *Xenopus laevis*. *Mol Cell Biol.* 1999 Apr;19(4):2485-94.
156. Biberman Y., Meyuhas O. TOP mRNAs are translationally inhibited by a titratable repressor in both wheat germ extract and reticulocyte lysate. *FEBS Lett.* 1999 Aug 13;456(3):357-60.
157. Tsay Y.F., Thompson J.R., Rotenberg M.O., Larkin J.C., Woolford J.L. Jr. Ribosomal protein synthesis is not regulated at the translational level in *Saccharomyces cerevisiae*: balanced accumulation of ribosomal proteins L16 and rp59 is mediated by turnover of excess protein. *Genes Dev.* 1988 Jun;2(6):664-76.

158. Avni D., Biberman Y., Meyuhas O. The 5terminal oligopyrimidine tract confers translational control on TOP mRNAs in a cell type and sequence context-dependent manner. *Nucleic Acids Res.* 1997 Mar 1;25(5):995-1001.
159. Jefferies H.B., Reinhard C., Kozma S.C., Thomas G. Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 May 10;91(10):4441-5.
160. Jefferies H.B., Fumagalli S., Dennis P.B., Reinhard C., Pearson R.B., Thomas G. Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.* 1997 Jun 16;16(12):3693-704.
161. Barth-Baus D., Stratton C.A., Parrott L., Myerson H., Meyuhas O., Templeton D.J., Landreth G.E., Hensold J.O. S6 phosphorylation-independent pathways regulate translation of 5'-terminal oligopyrimidine tract-containing mRNAs in differentiating hematopoietic cells. *Nucleic Acids Res.* 2002 May 1;30(9):1919-28.
162. Stolovich M., Tang H., Horstein E., Levy G., Cohen R., Bae S.S., Birnbaum M.J., Meyuhas O. Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2002 Dec;22(23):8101-13.
163. Tang H., Hornstein E., Stolovich M., Levy G., Livingstone M., Templeton D., Avruch J., Meyuhas O. Amino acid-induced translation of TOP mRNAs is fully dependent on phosphatidylinositol 3-kinase-mediated signaling, is partially inhibited by rapamycin, and is independent of S6K1 and rpS6 phosphorylation. *Mol Cell Biol.* 2001 Dec;21(24):8671-83.
164. Kaspar R.L., Rychlik W., White M.W., Rhoads R.E., Morris D.R. Simultaneous cytoplasmic redistribution of ribosomal protein L32 mRNA and phosphorylation of eukaryotic initiation factor 4E after mitogenic stimulation of Swiss 3T3 cells. *J Biol Chem.* 1990 Mar 5; 265(7):3619-22.
165. Hammond M.L., Merrick W., Bowman L.H. Sequences mediating the translation of mouse S16 ribosomal protein mRNA during myoblast differentiation and in vitro and possible control points for the in vitro translation. *Genes Dev.* 1991 Sep; 5(9):1723-36.
166. Aloni R., Peleg D., Meyuhas O. Selective translational control and nonspecific posttranscriptional regulation of ribosomal protein gene expression during development and regeneration of rat liver. *Mol Cell Biol.* 1992 May; 12(5):2203-12.
167. Shama S., Avni D., Frederickson R.M., Sonenberg N., Meyuhas O. Overexpression of initiation factor eIF-4E does not relieve the translational repression of ribosomal protein mRNAs in quiescent cells. *Gene Expr.* 1995;4(4-5):241-52.

168. Thoreen C.C., Chantranupong L., Keys H.R., Wang T., Gray N.S., Sabatini D.M. A unifying model for mTORC1-mediated regulation of mRNA translation. *Nature*. 2012 May 2;485(7396):109-13.
169. Cardinali B., Di Cristina M., Pierandrei-Amaldi P. Interaction of proteins with the mRNA for ribosomal protein L1 in *Xenopus*: structural characterization of in vivo complexes and identification of proteins that bind in vitro to its 5'UTR. *Nucleic Acids Res*. 1993 May 25;21(10):2301-8.
170. Loreni F., Amaldi F. Translational control of terminal oligopyrimidine mRNAs requires a specific regulator. *FEBS Lett*. 1997 Oct 27;416(3):239-42.
171. Pestka S. The use of inhibitors in studies on protein synthesis. *Methods Enzymol*. 1974;30:261-82.
172. Duncan R.F., Cavener D.R., Qu S. Heat shock effects on phosphorylation of protein synthesis initiation factor proteins eIF-4E and eIF-2 alpha in *Drosophila*. *Biochemistry*. 1995 Mar 7;34(9):2985-97.
173. Pellizzoni L., Cardinali B., Lin-Marq N., Mercanti D., Pierandrei-Amaldi P. 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. *J Mol Biol*. 1996 Jun 28;259(5):904-15.
174. Pellizzoni L., Lotti F., Maras B., Pierandrei-Amaldi P. Cellular nucleic acid binding protein binds a conserved region of the 5' UTR of *Xenopus laevis* ribosomal protein mRNAs. *J Mol Biol*. 1997 Mar 28;267(2):264-75.
175. Pellizzoni L., Lotti F., Rutjes S.A., Pierandrei-Amaldi P. (Involvement of the *Xenopus laevis* Ro60 autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5'UTR of L4 ribosomal protein mRNA. *J Mol Biol*. 1998 Aug 28;281(4):593-608.
176. Crosio C., Boyl P.P., Loreni F., Pierandrei-Amaldi P., Amaldi F. La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res*. 2000 Aug 1;28(15):2927-34.
177. Cardinali B., Carissimi C., Gravina P., Pierandrei-Amaldi P. La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *J Biol Chem*. 2003 Sep 12;278(37):35145-51.
178. Zhu J., Hayakawa A., Kakegawa T., Kaspar R.L. Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Oct 31;1521(1-3):19-29.
179. Ørom U.A., Nielsen F.C., Lund A.H. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):460-71.

180. Tian Q., Streuli M., Saito H., Schlossman S.F., Anderson P. A polyadenylate binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cells. *Cell*. 1991 Nov 1;67(3):629-39.
181. Kawakami A., Tian Q., Duan X., Streuli M., Schlossman S.F., Anderson P. Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Sep 15;89(18):8681-5.
182. Anderson P., Kedersha N. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones*. 2002 Apr;7(2):213-21.
183. Del Gatto-Konczak F., Bourgeois C.F., Le Guiner C., Kister L., Gesnel M.C., Stévenin J., Breathnach R. The RNA-Binding Protein TIA-1 Is a Novel Mammalian Splicing Regulator Acting through Intron Sequences Adjacent to a 5' Splice Site. *Mol Cell Biol*. 2000 Sep;20(17):6287-99..
184. Kedersha N.L., Gupta M., Li W., Miller I., Anderson P. RNA-Binding Proteins Tia-1 and Tiar Link the Phosphorylation of Eif-2 α to the Assembly of Mammalian Stress Granules. *J Cell Biol*. 1999 Dec 27; 147(7): 1431-42.
185. Damgaard C.K., Lykke-Andersen J. Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev*. 2011 Oct 1; 25(19): 2057-68.
186. Dember L.M., Kim N.D., Liu K.Q., Anderson P. Individual RNA Recognition Motifs of TIA-1 and TIAR Have Different RNA Binding Specificities. *J Biol Chem*. 1996 Feb 2;271(5):2783-8.
187. Kuwasako K., Takahashi M., Tochio N., Abe C., Tsuda K., Inoue M., Terada T., Shirouzu M., Kobayashi N., Kigawa T., Taguchi S., Tanaka A., Hayashizaki Y., Güntert P., Muto Y., Yokoyama S. Solution Structure of the Second RNA Recognition Motif (RRM) Domain of Murine T Cell Intracellular Antigen-1 (TIA-1) and Its RNA Recognition Mode. *Biochemistry*. 2008 Jun 17;47(24):6437-50.
188. Bauer W.J., Heath J., Jenkins J.L., Kielkopf C.L. Three RNA Recognition Motifs Participate in RNA Recognition and Structural Organization by the Pro-Apoptotic Factor TIA-1. *J Mol Biol*. 2012 Jan 27;415(4):727-40.
189. Li W., Li Y., Kedersha N., Anderson P., Emara M., Swiderek K.M., Moreno G.T., Brinton M.A. Cell proteins TIA-1 and TIAR interact with the 3' stem-loop of the West Nile virus complementary minus-strand RNA and facilitate virus replication. *J Virol*. 2002 Dec;76(23):11989-2000.
190. Kim H.S., Headey S.J., Yoga Y.M., Scanlon M.J., Gorospe M., Wilce M.C., Wilce J.A. Distinct binding properties of TIAR RRM3 and linker region. *RNA Biol*. 2013 Apr;10(4):579-89.

191. Wang I., Hennig J., Jagtap P.K., Sonntag M., Valcárcel J., Sattler M. Structure, dynamics and RNA binding of the multi-domain splicing factor TIA-1. *Nucleic Acids Res.* 2014 May;42(9):5949-66.
192. Mattioli M., Reichlin M. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Descriptions of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum.* 1974;17:421–429.
193. Alspaugh M.A., Tan E.M. Antibodies to cellular antigens in Sjögren's syndrome. *J Clin Invest.* 1975 May; 55(5):1067-73.
194. Stefano J.E. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell.* 1984;36:145–154.
195. Intine R.V., Tenenbaum S.A., Sakulich A.S., Keene J.D., Maraia R.J. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Mol Cell.* 2003 Nov;12(5):1301-7.
196. Crosio C., Boyl P.P., Loreni F., Pierandrei-Amaldi P., Amaldi F. La protein has a positive effect on the translation of TOP mRNAs in vivo. *Nucleic Acids Res.* 2000;28:2927–2934.
197. Schwartz E., Intine R.V., Maraia R.J. CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine-366 and can modulate 5'TOP mRNA metabolism. *Mol Cell Biol.* 2004;24:9580–9591.
198. Zhu J., Hayakawa A., Kakegawa T., Kaspar R.L. Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochim Biophys Acta.* 2001;1521:19–29.
199. Schaffler K., Schulz K., Hirmer A., Wiesner J., Grimm M., Sickmann A., Fischer U. A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation. *RNA.* 2010;16:1488–1499.
200. Alfano C., Sanfelice D., Babon J., Kelly G., Jacks A., Curry S., Conte M.R. Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nat Struct Mol Biol.* 2004 Apr; 11(4):323-9.
201. Kenan D.J., Keene J.D. La gets its wings (News and Views) *Nat Struct & Mol Biol* 11. 2004;11:303–305.
202. Dong G., Chakshusmathi G., Wolin S.L., Reinisch K.M. Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *EMBO J.* 2004;23:1000–1007.

203. Maris C., Dominguez C., Allain F.H. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J.* 2005 May;272(9):2118-31. (!!!= ref 5 aus Ergebnisteil)
204. Jacks A., Babon J., Kelly G., Manolaridis I., Cary P.D., Curry S., Conte M.R. Structure of the C-terminal domain of human La protein reveals a novel RNA recognition motif coupled to a helical nuclear retention element. *Structure (Camb)* 2003;11:833–843.
205. Teplova M., Yuan Y.R., Phan A.T., Malinina L., Ilin S., Teplov A., Patel D.J. Structural basis for recognition and sequestration of UUU(OH) 3' termini of nascent RNA polymerase III transcripts by La, a rheumatic disease autoantigen. *Mol Cell.* 2006 Jan 6;21(1):75-85.
206. Curry S., Conte M.R. A terminal affair: 3'-end recognition by the human La protein. *Trends Biochem Sci.* 2006 Jun;31(6):303-5.
207. Bayfield M.A., Yang R., Maraia R.J. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta.* 2010;1799(5-6):365–378.
208. Bousquet-Antonelli C., Deragon J.M. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA.* 2009 May;15(5):750-64.
209. Chauvet S., Maurel-Zaffran C., Miassod R., Jullien N., Pradel J., Aragnol D. dlarp, a new candidate Hox target in *Drosophila* whose orthologue in mouse is expressed at sites of epithelium/mesenchymal interactions. *Dev Dyn.* 2000 Jul;218(3):401-13.
210. Blagden S.P., Gatt M.K., Archambault V., Lada K., Ichihara K., Lilley K.S., Inoue YH, Glover DM. *Drosophila* Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Dev Biol.* 2009 Oct 1;334(1):186-97.
211. Nykamp K., Lee M.H., Kimble J. C. *elegans* La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *RNA.* 2008 Jul;14(7):1378-89.
212. Burrows C., Abd Latip N., Lam S.J., Carpenter L., Sawicka K., Tzolovsky G., Gabra H., Bushell M., Glover D.M., Willis A.E., Blagden S.P. The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep;38(16):5542-53.
213. Aoki K., Adachi S., Homoto M., Kusano H., Koike K., Natsume T. Larp1 specifically recognizes the 3' terminus of poly(A) mRNA. *FEBS Lett.* 2013 Jul 11;587(14):2173-8.
214. Tcherkezian J., Cargnello M., Romeo Y., Huttlin E.L., Lavoie G., Gygi S.P., Roux P.P. Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev.* 2014 Feb 15;28(4):357-71.

-
215. Lahr R.M., Fonseca B.D., Ciotti G.E., Al-Ashtal H.A., Jia J.J., Niklaus M.R., Blagden S.P., Alain T., Berman A.J. La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs. *Elife*. 2017 Apr 7;6. pii: e24146.
216. Markert A., Grimm M., Martinez J., Wiesner J., Meyerhans A., Meyuhos O., Sickmann A., Fischer U. The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep*. 2008 Jun;9(6):569-75.
217. Nguyen V.T., Kiss T., Michels A.A., Bensaude O. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature*. 2001 Nov 15;414(6861):322-5.
218. Yang Z., Zhu Q., Luo K., Zhou Q. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature*. 2001 Nov 15;414(6861):317-22.
219. Blencowe B.J. 173. Transcription: surprising role for an elusive small nuclear RNA. *Curr Biol*. 2002 Feb 19;12(4):R147-9.
220. Barboric M., Kohoutek J., Price J.P., Blazek D., Price D.H., Peterlin B.M. Interplay between 7SK snRNA and oppositely charged regions in HEXIM1 direct the inhibition of P-TEFb. *EMBO J*. 2005 Dec 21; 24(24):4291-303.
221. Blazek D., Barboric M., Kohoutek J., Oven I., Peterlin B.M. Oligomerization of HEXIM1 via 7SK snRNA and coiled-coil region directs the inhibition of P-TEFb. *Nucleic Acids Res*. 2005; 33(22):7000-10.
222. Byers S.A., Price J.P., Cooper J.J., Li Q., Price D.H. HEXIM2, a HEXIM1-related protein, regulates positive transcription elongation factor b through association with 7SK. *J Biol Chem*. 2005 Apr 22; 280(16):16360-7.
223. Li Q., Price J.P., Byers S.A., Cheng D., Peng J., Price D.H. Analysis of the large inactive P-TEFb complex indicates that it contains one 7SK molecule, a dimer of HEXIM1 or HEXIM2, and two P-TEFb molecules containing Cdk9 phosphorylated at threonine 186. *J Biol Chem*. 2005 Aug 5; 280(31):28819-26.
224. Yik J.H., Chen R., Pezda A.C., Zhou Q. Compensatory contributions of HEXIM1 and HEXIM2 in maintaining the balance of active and inactive positive transcription elongation factor b complexes for control of transcription. *J Biol Chem*. 2005 Apr 22; 280(16):16368-76.
225. Marshall N.F., Price D.H. Purification of P-TEFb, a transcription factor required for the transition into productive elongation. *J. Biol. Chem*. 1995; 270: 12335-12338
226. Peng J., Zhu Y., Milton J.T., Price D.H. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev*. 1998;12(5):755-762.

227. Reddy R., Singh R., Shimba S. Methylated cap structures in eukaryotic RNAs: structure, synthesis and functions. *Pharmacol Ther.* 1992; 54(3):249-67.
228. Jeronimo C., Forget D., Bouchard A., Li Q., Chua G., Poitras C., Thérien C., Bergeron D., Bourassa S., Greenblatt J., Chabot B., Poirier G.G., Hughes T.R., Blanchette M., Price D.H., Coulombe B. Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell.* 2007 Jul 20;27(2):262-74.
229. Hogg J.R., Collins K. RNA-based affinity purification reveals 7SK RNPs with distinct composition and regulation. *RNA.* 2007 Jun;13(6):868-80.
230. Ji X., Zhou Y., Pandit S., Huang J., Li H., Lin C.Y., Xiao R., Burge C.B., Fu X.D. SR proteins collaborate with 7SK and promoter-associated nascent RNA to release paused polymerase. *Cell.* 2013 May 9;153(4):855-68.
231. Krueger B.J., Jeronimo C., Roy B.B., Bouchard A., Barrandon C., Byers S.A., Searcey C.E., Cooper J.J., Bensaude O., Cohen E.A., Coulombe B., Price D.H. LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic Acids Res.* 2008 Apr;36(7):2219-29.
232. Wassarman D.A., Steitz J.A. Structural analyses of the 7SK ribonucleoprotein (RNP), the most abundant human small RNP of unknown function. *Mol Cell Biol.* 1991;11:3432–3445.
233. Berkhout B., Jeang K.T. trans activation of human immunodeficiency virus type 1 is sequence specific for both the single-stranded bulge and loop of the trans-acting-responsive hairpin: A quantitative analysis. *J Virol.* 1989 Dec;63(12):5501-4.
234. Berkhout B., Silverman R. H., Jeang K.T. Tat trans-activates the human immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell.* 1989 Oct 20;59(2):273-82.
235. Roebuck K.A., Saifuddin M. Regulation of HIV-1 transcription. *Gene Expr.* 1999;8(2):67-84.
236. Durney M.A., D'Souza V.M. Preformed Protein-binding Motifs in 7SK snRNA: Structural and Thermodynamic Comparisons with Retroviral TAR. *J Mol Biol.* 2010 Dec 10;404(4):555-67
237. Ivanov P., Kedersha N., Anderson P. Stress puts TIA on TOP. *Genes Dev.* 2011 Oct 15;25(20):2119-24.
238. Waris S., García-Mauriño S.M., Sivakumaran A., Beckham S.A., Loughlin F.E., Gorospe M., Díaz-Moreno I., Wilce M.C.J., Wilce J.A. TIA-1 RRM23 binding and recognition of target oligonucleotides. *Nucleic Acids Res.* 2017 May 5;45(8):4944-57.

-
239. Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C.P. SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 May 26;95(11):5857-64.
240. Letunic I., Doerks T., Bork P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. *Nucleic Acids Res*. 2015 Jan;43(Database issue):D257-60.
241. Letunic I., Bork P. 20 years of the SMART protein domain annotation resource. *Nucleic Acids Res*. 2018 Jan 4;46(D1):D493-D496.
242. Jones D.T. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol*. 1999 Sep 17;292(2):195-202.
243. Buchan D.W.A., Jones D.T. The PSIPRED Protein Analysis Workbench: 20 years on. *Nucleic Acids Res*. 2019 Jul 2;47(W1):W402-W407.
244. Amlacher S., Sarges P., Flemming D., van Noort V., Kunze R., Devos D.P., Arumugam M., Bork P., Hurt E. Insight into structure and assembly of the nuclear pore complex by utilizing the genome of a eukaryotic thermophile. *Cell*. 2011 Jul 22;146(2):277-89.
245. Förch P., Puig O., Martínez C., Séraphin B., Valcárcel J. The splicing regulator TIA-1 interacts with U1-C to promote U1 snRNP recruitment to 5' splice sites. *EMBO J*. 2002 Dec 16;21(24):6882-92.
246. Eisinger-Mathason T.S., Andrade J., Groehler A.L., Clark D.E., Muratore-Schroeder T.L., Pasic L., Smith J.A., Shabanowitz J., Hunt D.F., Macara I.G., Lannigan D.A. Codependent functions of RSK2 and the apoptosis-promoting factor TIA-1 in stress granule assembly and cell survival. *Mol Cell*. 2008 Sep 5;31(5):722-36.
247. Mathews M.B., Francoeur A.M. La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylylate tail of a small RNA. *Mol. Cell. Biol*. 1984;4:1134-1140
248. Reddy R., Henning D., Tan E., Busch H. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA) *J. Biol. Chem*. 1983;258:8352-8356.
249. Marz M., Donath A., Verstraete N., Nguyen V.T., Stadler P.F., Bensaude O. Evolution of 7SK RNA and its protein partners in metazoa. *Mol Biol Evol*. 2009 Dec;26(12):2821-30. (urspr. Ref 55 Einleitung war aber nicht mehr in den Referenzen vorhanden)
250. Cruz-Gallardo I., Aroca Á., Gunzburg M.J., Sivakumaran A., Yoon J.H., Angulo J., Persson C., Gorospe M., Karlsson B.G., Wilce J.A., Díaz-Moreno I. The binding of TIA-1 to RNA C-rich sequences is driven by its C-terminal RRM domain. *RNA Biol*. 2014;11(6):766-76.

251. Shibui-Nihei A., Ohmori Y., Yoshida K., Imai J., Oosuga I., Iidaka M., Suzuki Y., Mizushima-Sugano J., Yoshitomo-Nakagawa K., Sugano S. The 5' terminal oligopyrimidine tract of human elongation factor 1A-1 gene functions as a transcriptional initiator and produces a variable number of Us at the transcriptional level. *Gene*. 2003 Jun 5;311:137-45.
252. Fonseca B.D., Zakaria C., Jia J.J., Graber T.E., Svitkin Y., Tahmasebi S., Healy D., Hoang H.D., Jensen J.M., Diao I.T., Lussier A., Dajadian C., Padmanabhan N., Wang W., Matta-Camacho E., Hearnden J., Smith E.M., Tsukumo Y., Yanagiya A., Morita M., Petroulakis E., González J.L., Hernández G., Alain T., Damgaard C.K. La-related protein 1 (LARP1) Represses terminal oligopyrimidine (TOP) mRNA translation downstream of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*. 2015 Jun 26;290(26):15996-6020.
253. Uniacke J., Holterman C.E., Lachance G., Franovic A., Jacob M.D., Fabian M.R., Payette J., Holcik M., Pause A., Lee S. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. *Nature*. 2012 May 6;486(7401):126-9.
254. Muniz L., Egloff S., Kiss T. RNA elements directing in vivo assembly of the 7SK/MePCE/Larp7 transcriptional regulatory snRNP. *Nucleic Acids Res*. 2013 Apr;41(8):4686-98.
255. Uchikawa E., Natchiar K.S., Han X., Proux F., Roblin P., Zhang E., Durand A., Klaholz B.P., Dock-Bregeon A.C. Structural insight into the mechanism of stabilization of the 7SK small nuclear RNA by LARP7. *Nucleic Acids Res*. 2015 Mar 31;43(6):3373-88.
256. Hussain R.H., Zawawi M., Bayfield M.A. Conservation of RNA chaperone activity of the human La-related proteins 4, 6 and 7. *Nucleic Acids Res*. 2013 Oct;41(18):8715-25
257. Chambers J.C., Kurilla M.G., Keene J.D. Association between the 7 S RNA and the lupus La protein varies among cell types. *J Biol Chem*. 1983 Oct 10;258(19):11438-41. (ref. 37 in Hussain et al.)
258. Yamaguchi Y., Takagi T., Wada T., Yano K., Furuya A., Sugimoto S., Hasegawa J., Handa H. NELF, a multisubunit complex containing RD, cooperates with DSIF to repress RNA polymerase II elongation. *Cell*. 1999 Apr 2;97(1):41-51.
259. He N., Zhou Q. New insights into the control of HIV-1 transcription: when Tat meets the 7SK snRNP and super elongation complex (SEC). *J Neuroimmune Pharmacol*. 2011 Jun;6(2):260-8.
260. Aboul-ela F., Karn J., Varani G. The structure of the human immunodeficiency virus type-1 TAR RNA reveals principles of RNA recognition by Tat protein. *J Mol Biol*. 1995 Oct 20;253(2):313-32.
261. Michels A.A., Fraldi A., Li Q., Adamson T.E., Bonnet F., Nguyen V.T., Sedore S.C., J. Price J.P., Price D.H., Lania L., Bensaude O. Binding of the 7SK snRNA turns the HEXIM1 protein into a P-TEFb (CDK9/cyclin T) inhibitor. *EMBO J*. 2004 Jul 7;23(13):2608-19.

262. Michels A.A., Nguyen V.T., Fraldi A., Labas V., Edwards M., Bonnet F., Lania L., Bensaude O. MAQ1 and 7SK RNA interact with CDK9/cyclin T complexes in a transcription-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 2003 Jul;23(14):4859-69.
263. Yik J.H., Chen R., Pezda A.C., Samford C.S., Zhou Q. A human immunodeficiency virus type 1 Tat-like arginine-rich RNA-binding domain is essential for HEXIM1 to inhibit RNA polymerase II transcription through 7SK snRNA-mediated inactivation of P-TEFb. *Mol Cell Biol.* 2004 Jun;24(12):5094-105.
264. Egloff S., Van Herreweghe E., Kiss T. Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol Cell Biol.* 2006 Jan;26(2):630-42.
265. Muniz L., Egloff S., Ughy B., Jady B.E., Kiss T. Controlling cellular P-TEFb activity by the HIV-1 transcriptional transactivator Tat. *PLoS Pathog.* 2010 Oct 14;6(10):e1001152.
266. Richter S., Ping Y. H., Rana, T.M. TAR RNA loop: a scaffold for the assembly of a regulatory switch in HIV replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Jun 11;99(12):7928-33.
267. Zhang J., Tamilarasu N., Hwang S., Garber M.E., Huq I., Jones K. A., Rana T.M. HIV-1 TAR RNA enhances the interaction between Tat and cyclin T1. *J Biol Chem.* 2000 Nov 3;275(44):34314-9.
268. Calnan, B.J., Tidor B., Biancalana S., Hudson D., Frankel A.D. Arginine-mediated RNA recognition: the arginine fork. *Science.* 1991 May 24;252(5009):1167-71.
269. Tao J., Frankel A.D. Specific binding of arginine to TAR RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Apr 1;89(7):2723-6.
270. Hasler D., Meduri R, Bık M., Lehmann G., Heizinger L., Wang X., Li Z.T., Sement F.M., Bruckmann A., Dock-Bregeon A.C., Merkl R., Kalb R., Grauer E., Kunstmann E., Zavolan M., Liu M.F., Fischer U., Meister G. The Alzami Syndrome-Associated Protein LARP7 Guides U6 Small Nuclear RNA Modification and Contributes to Splicing Robustness. *Mol Cell.* 2020 Mar 5;77(5):1014-1031.e13.
271. Wang X., Li Z.T., Yan Y., Lin P., Tang W., Hasler D., Meduri R., Li Y., Hua M.M., Qi H.T., Lin D.H., Shi H.J., Hui J., Li J., Li D., Yang J.H., Lin J., Meister G., Fischer U., Liu M.F. LARP7-Mediated U6 snRNA Modification Ensures Splicing Fidelity and Spermatogenesis in Mice. *Mol Cell.* 2020 Mar 5;77(5):999-1013.e6.
272. Grabowski P.J., Sharp P.A. 1986. Affinity chromatography of splicing complexes: U2, U5, and U4 + U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in the spliceosome. *Science* 233:1294–1299.
273. Black D.L., Steitz J.A. 1986. Pre-mRNA splicing in vitro requires intact U4/U6 small nuclear ribonucleoprotein. *Cell* 46:697–704.

274. Tycowski K.T., You Z.H., Graham P.J., Steitz J.A. 1998. Modification of U6spliceosomal RNA is guided by other small RNAs. *Mol Cell*2:629–638.
275. Ganot P., Jády B.E., Bortolin M.L., Darzacq X., Kiss T. 1999. Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. *Mol Cell Biol*19:6906–6917.
276. Lange T.S., Gerbi S.A. 2000. Transient nucleolar localization Of U6 smallnuclear RNA in *Xenopus Laevis*oocytes. *Mol Biol Cell*11:2419–2428.
277. Bohnsack M.T., Sloan K.E. Modifications in Small Nuclear RNAs and Their Roles in Spliceosome Assembly and Function. *Biol Chem.* 2018 Oct 25;399(11):1265-1276.
278. Alazami A.M., Al-Owain M., Alzahrani F., Shuaib T., Al-Shamrani H., Al-Falki Y.H, Al-Qahtani S.M., Alsheddi T., Colak D., Alkuraya F.S. Loss of function mutation in LARP7, chaperone of 7SK ncRNA, causes a syndrome of facial dysmorphism, intellectual disability, and primordial dwarfism. *Hum Mutat.* 2012 Oct;33(10):1429-34.
279. Towbin H., Staehelin T., Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979 Sep;76(9):4350-4.
280. Gültekin H., Heermann K.H. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem.* 1988 Aug 1;172(2):320-9.
281. Wang Y., Rando R.R. Specific Binding of Aminoglycoside Antibiotics to RNA. *Chem Biol.* 1995 May;2(5):281-90.
282. Hartmuth K., Urlaub H., Vornlocher H.P., Will C.L., Gentzel M., Wilm M., Lührmann R. Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Dec 24;99(26):16719-24.
283. Moreira J.M., Shen T., Ohlsson G., Gromov P., Gromova I., Celis J.E. A combined proteome and ultrastructural localization analysis of 14-3-3 proteins in transformed human amnion (AMA) cells: definition of a framework to study isoform-specific differences. *Mol Cell Proteomics.* 2008 Jul;7(7):1225-40
284. Kleppe R., Martinez A., Døskeland S.O., Haavik J. The 14-3-3 proteins in regulation of cellular metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 2011 Sep;22(7):713-9.
285. Shumway S.D., Li Y., Xiong Y. 14-3-3beta binds to and negatively regulates the tuberous sclerosis complex 2 (TSC2) tumor suppressor gene product, tuberin. *J Biol Chem.* 2003 Jan 24;278(4):2089-92.
286. Gwinn D.M., Shackelford D.B., Egan D.F., Mihaylova M.M., Mery A., Vasquez DS, Turk BE, Shaw RJ. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell.* 2008 Apr 25;30(2):214-26.

287. Meek S.E., Lane W.S., Piwnica-Worms H. Comprehensive proteomic analysis of interphase and mitotic 14-3-3-binding proteins. *J Biol Chem.* 2004 Jul 30;279(31):32046-54.
288. Xu Y., Fulciniti M., Samur M.K., Ho M., Deng S., Liu L., Wen K., Yu T., Chyra Z., Dereibal S., Zhang L., Yao Y., Chakraborty C., Morelli E., Li N., Lopez M.A., Perini T., Mu S., An G., Alonso R., Bianchi G., Tai Y.T., Anderson K.C., Qiu L., Munshi N.C. YWHAE/14-3-3 ϵ expression impacts the protein load, contributing to proteasome inhibitor sensitivity in multiple myeloma. *Blood.* 2020 Jul 23;136(4):468-479.
289. Küsspert M. Untersuchung zur Rolle des La-verwandten Proteins LARP4B im mRNA-Metabolismus. Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades. 2014. urn:nbn:de:bvb:20-opus-107490
290. Meyuhas O., Kahan T. The race to decipher the top secrets of TOP mRNAs. *Biochim Biophys Acta.* 2015 Jul;1849:801–811.
291. Hong S., Freeberg M.A., Han T., Kamath A., Yao Y., Fukuda T, Suzuki T., Kim J.K, Inoki K. LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife.* 2017 Jun 26;6:e25237.
292. Philippe L., Vasseur J.J., Debart F., Thoreen C.C. La-related protein 1(LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Res.* 2018 Feb 16;46(3):1457–1469.
293. Patursky-Polischuk I., Stolovich-Rain M., Hausner-Hanochi M., Kasir J., Cybulski N., Avruch J., Rüegg M.A., Hall M.N., Meyuhas O. The TSC-mTOR pathway mediates translational activation of TOP mRNAs by insulin largely in a raptor- or rictor-independent manner. *Mol Cell Biol.* 2009 Feb;29(3):640–649.
294. Miloslavski R., Cohen E., Avraham A., Iluz Y., Hayouka Z., Kasir J., Mudhasani R., Jones S.N., Cybulski N., Rüegg M.A., Larsson O., Gandin V., Rajakumar A., Topisirovic I., Meyuhas O. Oxygen sufficiency controls TOP mRNA translation via the TSC-Rheb-mTOR pathway in a 4E-BP-independent manner. *J Mol Cell Biol.* 2014 Jun 6(3):255–266.
295. Patursky-Polischuk I., Kasir J., Miloslavski R., Hayouka Z., Hausner-Hanochi M., Stolovich-Rain M., Tsukerman P., Biton M., Mudhasani R., Jones S.N., Meyuhas O. Reassessment of the role of TSC, mTORC1 and microRNAs in amino acids-mediated translational control of TOP mRNAs. *PLoS One.* 2014 Oct 22;9(10):e109410.
296. Ogami K., Oishi Y., Nogimori T., Sakamoto K., Hoshino S. LARP1 facilitates translational recovery after amino acid refeeding by preserving long poly(A)-tailed TOP mRNAs. *bioRxiv*2019:716217

9. Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Prof. Dr. Utz Fischer für die Bereitstellung des Projekts sowie die hervorragende Unterstützung und Betreuung bedanken – du hast mich während der Arbeit durch Höhen und Tiefen begleitet und hattest immer ein offenes Ohr für Fragen und Probleme. Sowohl während meiner Labor - als auch während meiner anschließenden Schreibphase hast du viel Zeit und Mühe investiert – hierfür und für deine wertvolle Hilfe und Begleitung bedanke ich mich ganz herzlich!

Für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanke ich mich ganz herzlich bei Frau Prof Dr. Susanne Kramer – vielen Dank für Ihre Unterstützung!

Mein weiterer besonderer Dank gilt Dr. Michael Grimm - Lieber Michael, du hast mich und meine Arbeit während der gesamten Zeit hervorragend betreut und unterstützt, hierfür ganz herzlichen Dank! Du hast mir jederzeit deine Hilfe angeboten und mich durch alle Projekte begleitet und somit einen ganz wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen!

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt auch Dr. Clemens Grimm und Dr. Jann – Patrick Pelz – herzlichen Dank euch für die großartige Zusammenarbeit und eure wertvollen Beiträge zu meiner Arbeit!

Auch möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Laborkolleginnen bedanken! Bei euch, liebe Maritta, Katrin und Kristina, für eure wertvolle Hilfe sowie emotionale Unterstützung, wenn es mal schwieriger wurde – Ihr habt mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden, vielen herzlichen Dank für die schöne gemeinsame Zeit!

Dir, liebe Anja, ebenfalls ganz herzlichen Dank für deine wertvolle Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit im Labor – du wusstest immer, was zu tun ist, wenn ich nicht mehr weiterwusste! Auch bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Alexander Buchberger sowie der gesamten AG Buchberger, bei Farah, Basti und Lissy, Nadine und Georg aka „Schorsch“, Conny, Elham und Ashwin, Thomas, Archana, Nils und Jürgen, Stefan und Katrin sowie bei allen

weiteren Kolleginnen und Kollegen – vielen lieben Dank euch für Hilfe, Unterstützung und so einige lustige Stunden auch außerhalb des Labors!

Lieber Hämmer, auch bei dir möchte ich mich für alles ganz herzlich bedanken, auch für die Freundschaft außerhalb des Labors – ich hoffe, ich kann dies demnächst im Rahmen eines Bierchens persönlich tun!

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie für die Unterstützung, Motivation und unendliche Geduld bedanken – Liebe Mama und Papa, lieber Felix und Rolf, liebe Oma: Vielen herzlichen Dank für alles!

Liebe Julia, dir gilt mein ganz spezieller Dank dafür, dass du immer für mich da bist und meine „Launen“ während der Arbeit geduldig ertragen hast. Du, mein lieber Jonah, hast mich ebenfalls nochmal ordentlich motiviert, obwohl es dich noch gar nicht lange gibt – danke dir ganz herzlich, lieber Sohnmann!

Zu guter Letzt danke ich meinem Opa Martin - dir ist diese Arbeit gewidmet. Du hast dich immer erkundigt, wie es vorangeht, dir geduldig meine Laborgeschichten angehört, überhaupt mein Interesse an den Naturwissenschaften geweckt und bist der Grund für meinen Werdegang zum Biologen. Sicher wärst du stolz auf mich!

10. Eidesstattliche Erklärungen nach §7 Abs. 2 Satz 3, 4, 5 der Promotionsordnung der Fakultät für Biologie

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation: „**Identifizierung und Untersuchung TOP-mRNA - bindender Faktoren**“, eigenständig, d. h. insbesondere selbständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters, angefertigt und keine anderen, als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

Ich erkläre außerdem, dass die Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Weiterhin erkläre ich, dass bei allen Abbildungen und Texten bei denen die Verwertungsrechte (Copyright) nicht bei mir liegen, diese von den Rechtsinhabern eingeholt wurden und die Textstellen bzw. Abbildungen entsprechend den rechtlichen Vorgaben gekennzeichnet sind sowie bei Abbildungen, die dem Internet entnommen wurden, der entsprechende Hypertextlink angegeben wurde.

Affidavit

I hereby declare that my thesis entitled: „**Identification and examination of TOP mRNA binding factors**“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore I verify that the thesis has not been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Besides I declare that if I do not hold the copyright for figures and paragraphs, I obtained it from the rights holder and that paragraphs and figures have been marked according to law or for figures taken from the internet the hyperlink has been added accordingly.

Heidelberg, den _____

Signature PhD-student