

**Regulation der eukaryotischen Translation durch RNA-
bindende Faktoren:
Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des
La-verwandten Proteins 4B (LARP4B)**

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

vorgelegt von
Katrin M. Schäffler
aus Heidelberg, Deutschland

Würzburg 2011

Eingereicht bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie
am 23.12.2011

Gutachter der schriftlichen Arbeit:

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

Prüfer des öffentlichen Promotionskolloquiums:

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

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums: 02.03.2012

Doktorurkunde ausgehändigt am:



Diese Doktorarbeit wurde angefertigt

in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Utz Fischer
am Lehrstuhl für Biochemie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Teile dieser Arbeit gehen in folgende Veröffentlichung ein:

Schäffler K, Schulz K, Hirmer A, Wiesner J, Grimm M, Sickmann A, Fischer U.
2010. A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation.
RNA **16**(8): 1488-1499.

“There is no sadder sight in the world than to see a beautiful theory killed by a brutal fact.”

Thomas Henry Huxley (1825-95)

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	17
2. Einleitung	21
2.1. Die eukaryotische Translation - ein Überblick.....	22
2.1.1. Die Regulation der eukaryotischen Translation.....	27
2.2. Die Familie der LaM-enthaltenden Proteine.....	29
2.2.1. Das La Protein.....	29
2.2.2. Struktur des La Molduls	31
2.2.3. La-verwandte Proteine (engl. La-related proteins, LARPs).....	32
2.3. LARPs – eine Proteinfamilie mit heterogener Funktionalität	34
2.3.1. LARP7 reguliert die Pol. II Transkription	34
2.3.2. LARP6 reguliert die Translation von Collagen-mRNAs.....	35
2.3.3. LARP1-Faktoren sind in den zellulären mRNA-Metabolismus involviert	36
2.3.4. Die Familie der LARP4-Faktoren	36
2.4. Ziele dieser Arbeit	37
3. Ergebnisse	38
3.1. Identifikation LARP4B-interagierender Faktoren	38
3.1.1. Generierung induzierbarer Zelllinien zur stabilen Expression von LARP4B	38
3.1.2. LARP4B ist Bestandteil mRNA-assoziiertes mRNPs	40
3.2. Bestimmung von LARP4B-Interaktionsstellen.....	44
3.2.1. LARP4B interagiert über zwei voneinander unabhängige Domänen mit PABPC1	46
3.2.2. Der C-Terminus von LARP4B bindet RACK1	49

4.4. LARP4, LARP4B und LARP1 regulieren die Translation auf unterschiedliche Weise	90
4.5. Strukturelle Besonderheiten von LARP4B: die vPAM2-Domäne	92
4.6. Ausblick.....	94
5. Material.....	96
5.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	96
5.1.1. Chromatographische Matrizes	96
5.1.2. Längenstandards	96
5.1.3. Reaktions-Sets (Kits) und Fertiglösungen	97
5.1.4. Dialyse-und Filtermaterialien	98
5.1.5. Kunststoffwaren- und gefäße.....	98
5.1.6. Röntgenfilme, Screens und Transfermembranen	100
5.2. Lösungen, Puffer und Medien	100
5.2.1. Allgemeine Lösungen.....	100
5.2.2. Gelelektrophoresepuffer	110
5.2.3. Probenpuffer.....	111
5.2.4. Medien und Zusätze für die Gewebekultur	113
5.2.4.1. Medienzusammensetzung.....	114
5.2.5. Medien und Zusätze für die Bakterienkultur.....	115
5.2.5.1. Medienzusammensetzung.....	115
5.3. Oligonukleotide.....	116
5.4. Plasmidkonstrukte	117
5.5. Antikörper	119
5.6. Bakterienstämme und Eukaryotische Zelllinien	120
5.6.1. Bakterienstämme	120

5.6.2. Eukaryotische Zelllinien.....	120
5.7. Geräte	121
5.7.1. Rotoren.....	124
6. Methoden	125
6.1. Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren.....	125
6.1.1 Aufreinigung und Isolierung.....	125
6.1.1.1. Ethanol-fällung von Nukleinsäuren aus wässriger Phase.....	125
6.1.1.2. Phenolextraktion von RNA	125
6.1.1.3. Reinigung radioaktiv markierter RNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen.....	126
6.1.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	126
6.1.3. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	127
6.1.3.1. Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	127
6.1.3.2. Native Agarose-Gelelektrophorese	127
6.1.3.3. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	127
6.1.3.4. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese	128
6.2. Methoden zur DNA-Analyse und -Präparation	128
6.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	128
6.2.2. Linearisierung von Plasmiden	128
6.2.3. Amplifikation von DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)	129
6.2.3.1. Amplifizierung von DNA-Fragmenten	129
6.2.3.2. Kolonie-PCR.....	130
6.2.4. Klonierung von DNA in Plasmidvektoren.....	130
6.2.4.1. Restriktionsverdau von DNA	131
6.2.4.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase	131

6.2.4.3.	Ligation von DNA-Fragmenten	131
6.2.4.4.	Präparation kompetenter Bakterienzellen	132
6.2.4.5.	Transformation kompetenter Bakterienzellen	132
6.2.4.6.	Anlegen von E. coli Glycerol Kulturen	133
6.2.5.	Reverse Transkription (RT-PCR)	133
6.2.6.	Quantitative Real-Time PCR (qPCR)	133
6.3.	Methoden zur RNA-Analyse	134
6.3.1.	<i>In vitro</i> Transkription.....	134
6.3.2.	Capping von <i>in vitro</i> generierten Transkripten.....	135
6.3.3.	5'-End-Markierung von RNA	135
6.3.4.	Northern Blot	136
6.3.4.1.	Denaturierender Agarose Blot	136
6.3.4.2.	Elektrophoretischer Polyacrylamid Blot	137
6.3.5.	RNA-Protein UV-Crosslink.....	137
6.3.6.	Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)	138
6.4.	Methoden zur Analyse von Proteinen	138
6.4.1.	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	138
6.4.2.	Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) 139	
6.4.3.	pH-neutrale Gradienten-Gelelektrophorese (Novex NuPAGE®) .. 139	
6.4.4.	Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen	140
6.4.5.	Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen	140
6.4.6.	Autoradiographie von Elektrophoresegelen.....	140
6.4.7.	Proteinpräzipitation.....	141
6.4.7.1.	Proteinpräzipitation mit Aceton.....	141
6.4.7.2.	Proteinpräzipitation mit TCA	141

6.4.8.	Western Blot und Immunoblot Analyse	142
6.4.9.	Interaktionsassays.....	143
6.4.9.1.	Immunopräzipitation.....	143
6.4.9.2	Protein Pulldown Assay.....	143
6.4.9.3.	CLIP Assay.....	144
6.4.9.4.	Oligo (dT)-Aufreinigung mRNA-assoziiertes mRNPs	147
6.4.9.5.	Elution Cap-bindender Komplexe durch m ⁷ G-Sepharose	148
6.4.10.	Proteinexpression und -aufreinigung	149
6.4.10.1	Expression rekombinanter Proteine in E. coli.....	149
6.4.10.2	Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen	149
6.4.10.3.	Affinitätsaufreinigung von His-Fusionsproteinen	150
6.4.10.4.	Kovalente Proteinbindung durch Dimethylpimelidate (DMP)	150
6.4.10.5.	Dialyse von Proteinen	151
6.4.11.	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation.....	151
6.4.12.	Proteintandemmassenspektrometrie (Protein-MS/MS).....	152
6.5.	Immunologische und immunbiochemische Verfahren	153
6.5.1.	Immunfluoreszenzmikroskopie.....	153
6.5.2.	Gewinnung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper	154
6.5.3.	ELISA	154
6.6.	Methoden zur Analyse von Ribosomen	155
6.6.1.	Lineare Dichtegradientenzentrifugation.....	155
6.6.1.1.	Dichtegradientenzentrifugation von Protein-Ribosomen-Komplexen	155
6.6.1.2.	EDTA-vermittelte Ribosomendissoziation und Monosomen-gradientenzentrifugation.....	156

6.6.1.3.	Polysomengradientenzentrifugation.....	157
6.6.2.	Hochsalzaufreinigung von 80S-Ribosomen aus Zellextrakt.....	158
6.6.3.	Aufreinigung von Puromycin dissoziierten 40S/60S-Komplexen aus Zellextrakt	159
6.7.	Präparation von Zellextrakten.....	161
6.7.1.	Herstellung von HeLa S3-Gesamtzellextrakt auf Fermenterbasis..	161
6.7.2.	Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Zellkulturschalen	161
6.8.	Zellkulturmethoden	162
6.8.1.	Kultivierung von Säugerzellen	162
6.8.2.	Zelldichtenbestimmung	162
6.8.3.	Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen.....	163
6.8.4.	Transfektionstechniken	163
6.8.4.1.	Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit Nanofectin.....	163
6.8.4.2.	siRNA-Transfektion mit Lipofectamin 2000	164
6.8.4.3.	Cotransfektion von siRNA und Plasmid-DNA mit Lipofectamin 2000	165
6.8.5.	<i>In vivo</i> Proteinmarkierung durch [³⁵ S]-Methionin Inkorporation....	166
6.8.6.	Luziferase-basierende Reporteranalysen.....	166
6.8.7.	Generierung stabiler FlpTRex-Zelllinien.....	167
6.8.7.1.	Kultivierung von Flp-In T-REx Zellen, sowie den daraus hergestellten stabilen Zelllinien.....	167
6.8.7.2.	Stabile Plasmidtransfektion und Selektion stabiler Klone	168
6.8.7.3.	Analyse der β -Galaktosidaseaktivität	168
6.8.7.4.	Induktion stabiler Zelllinien	169
7.	Literaturverzeichnis	170
8.	Anhang	184

8.1. Abkürzungsverzeichnis	184
8.2. Buchstabenabkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide	188
8.2.1. Aminosäuren.....	188
8.2.2. Nukleotide	188
8.3. Aminosäuresequenzen	189
Danksagung	191
Erklärung	193

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.	Die eukaryotische Genexpression.	21
Abbildung 2.	Zytoplasmatische Regulation der Translation.	25
Abbildung 3.	Cryo-EM Analyse von RACK1 am 80S-Ribosom.	27
Abbildung 4.	La-abhängige Prozessierung naszierender Pol. III Transkripte.	30
Abbildung 5.	Röntgenstrukturanalyse des La Moduls von La.	32
Abbildung 6.	Nomenklatur, Definition und Spezifikation der fünf Familien LaM-enthaltender Proteine.	33
Abbildung 7.	Vergleich humaner LARPs.	34
Abbildung 8.	Generierung von FlpTRex-Zelllinien zur stabilen induzierbaren <i>in vivo</i> Expression von LARP4B.	39
Abbildung 9.	Identifizierung von Translationsfaktoren als LARP4B-Interaktoren.	43
Abbildung 10.	LARP4B ist Bestandteil mRNA-gebundener mRNPs.	44
Abbildung 11.	Klonierung und Expression verschiedener LARP4B-Trunkationen.	45
Abbildung 12.	Charakterisierung einer N-terminalen vPAM2-Domäne in LARP4B und deren Einfluss auf die PABPC1-Interaktion.	48
Abbildung 13.	<i>In vitro</i> Bindungsstudien copräzipitierter LARP4B-Interaktoren... ..	50
Abbildung 14.	LARP4B assoziiert mit dem 80S ribosomalen Komplex und Polysomen.	52
Abbildung 15.	Der C-Terminus von LARP4B bindet an die 40S-Untereinheit des 80S-Ribosoms.	54
Abbildung 16.	LARP4B ist ein zytoplasmatisches Protein und akkumuliert in SGs.	57
Abbildung 17.	LARP4B sedimentiert mit assemblierten 80S-Ribosomen.	58
Abbildung 18.	Überexpression von LARP4B stimuliert die Translation <i>in vivo</i>	60
Abbildung 19.	siRNA-induzierter Knockdown von LARP4B senkt die Translationsrate <i>in vivo</i>	63

Abbildung 20. Die vPAM2-MLE-Interaktion hat keinen direkten Einfluss auf den translations-stimulierenden Effekt von LARP4B.	66
Abbildung 21. LARP1 und LARP4B weisen identische Interaktionen und Lokalisationen auf.	69
Abbildung 22. LARP1 und LARP4B weisen keine spezifischen IRES-Regulationen auf.	70
Abbildung 23. RACK1, LARP1 und LARP4B beeinflussen unterschiedliche Translationsphasen.....	72
Abbildung 24. LARP1 und LARP4B weisen zahlreiche vergleichbare zelluläre Eigenschaften auf.....	73
Abbildung 25. LARP4B bindet (U)-reiche RNA-Sequenzen.	75
Abbildung 26. Die Bindung von LARP4B an RNA-Oligo (U) ist konzentrationsabhängig.	76
Abbildung 27. Untersuchung der Bindungsaffinität von LARP4B zu RNA-Oligo (U).	78
Abbildung 28. Crosslinking and immunprecipitation Assay (CLIP Assay).	79
Abbildung 29. Identifizierung der endogenen Ziel-RNA-Sequenz von LARP4B mittels CLIP.	81
Abbildung 30. LARP4B ist Bestandteil eines mRNA-assoziierten, translationsaktiven mRNP-Komplexes.	85
Abbildung 31. Vergleich des La Motivs verschiedener La Proteine und LARPs.	89
Abbildung 32. Strukturelle Analyse der vPAM2-MLE-Interaktion von LARP4B. .	93

1. Zusammenfassung

In Zellen liegen RNAs in Form von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP) vor, wobei das Zusammenwirken von RNA und Proteinen die Funktionen der einzelnen RNPs definiert. RNA-bindenden Proteinen kommt demnach eine zentrale Bedeutung beim Verständnis des RNA-Metabolismus zu. Zu dieser Proteingruppe zählen auch die La-verwandten Proteine (engl. La-related proteins, LARPs), welche eine evolutionär konservierte Familie von Faktoren bilden und durch eine putative RNA-bindende Domäne, dem La Modul, charakterisiert sind. Bereits für zwei Vertreter dieser Proteinklasse (LARP3 und LARP7) konnte eine über das La Modul vermittelte spezifische Interaktion mit uridylreichen RNA-Sequenzen gezeigt werden. Ziel dieser Arbeit war es, einen Vertreter der LARP-Familie, das sogenannte LARP4B, sowohl biochemisch als auch strukturell zu untersuchen und es somit einem zellulären Prozess zuzuordnen. Zellbiologische Studien zeigten zunächst, dass LARP4B unter normalen Wachstumsbedingungen eine homogene zytoplasmatische Verteilung aufweist. Unter Stressbedingungen akkumuliert LARP4B hingegen in diskreten subzellulären Domänen, den sogenannten Stress Granules (SGs). Obwohl SGs bislang noch wenig funktionell untersucht sind, wird davon ausgegangen, dass sie der reversiblen Speicherung von mRNA-gebundenen Translationsfaktoren dienen. Durch Affinitätschromatographische Strategien ließen sich spezifische Interaktionspartner von LARP4B identifizieren. Als direkte Bindungspartner wurden das zytoplasmatische Poly (A) bindende Protein 1 (PABPC1) und der Rezeptor für aktivierte C Kinase 1 (RACK1) gefunden. Darüber hinaus zeigten Sedimentationsanalysen, dass LARP4B nahezu quantitativ mit Ribosomen und Polyribosomen assoziiert vorliegt. Diese Studie identifizierte daher LARP4B als ein Protein, das mit Schlüsselfaktoren der eukaryotischen Translation wechselwirkt. In Übereinstimmung mit diesen Befunden reduziert ein RNAi-induzierter Mangel des Proteins die Translationsrate drastisch, während die Überexpression von LARP4B *in vivo* zu einer Stimulation der Proteinbiosynthese führt. Da dieser stimulatorische Einfluss

bei einer Vielzahl unterschiedlicher mRNA-Spezies detektiert werden konnte, kann LARP4B als genereller, positiver Translationsfaktor angesehen werden. Interessanterweise wurden in Studien, die zeitgleich für das verwandte LARP1 durchgeführt wurden, vergleichbare zelluläre Interaktionen wie für LARP4B beschrieben. Um zu klären, ob beide LARPs Orthologe darstellen und funktionelle Redundanz zeigen, wurde in der vorgelegten Arbeit ein Vergleich von LARP4B mit LARP1 durchgeführt. Unabhängige *in vivo* Studien und Sedimentationsanalysen zeigten deutlich, dass beide Proteine im mRNA-Metabolismus agieren, jedoch in diesem unterschiedliche Phasen der eukaryotischen Proteinbiosynthese beeinflussen.

Summary

The cooperation of RNA with different classes of proteins in so called ribonucleoprotein complexes (RNPs) is essential for the function of these RNPs. Therefore, RNA-binding proteins play a crucial role to understand the complex mechanisms of RNA-metabolism. One family of such proteins comprise the La-related proteins (LARPs). These evolutionary conserved factors are characterized by a putative RNA-binding domain, named the La module. For two of these factors (LARP3 and LARP7) a specific interaction with RNA containing uridine-rich sequence elements mediated via their La module could be described. The present work describes the biochemical and structural characterization of LARP4B, a thus far uncharacterized member of the LARP family. Immunofluorescence analyses identified LARP4B as a cytosolic protein that accumulates upon arsenite treatment in cellular stress granules (SGs). While still not sufficiently determined, these domains are believed to serve as storage pools for stalled, mRNA-bound translation initiation complexes formed upon polyribosome disassembly. Biochemical experiments further uncovered an interaction of LARP4B with the Poly(A) binding protein cytosolic 1 (PABPC1) and the receptor for activated C Kinase 1 (RACK1). Moreover, under physiological conditions, LARP4B co-sediments almost quantitatively with polysomes in cellular extracts, suggesting a role in translation. In agreement with this notion, knockdown of LARP4B by RNA-interference impaired translation of cellular mRNAs whereas over-expression stimulated protein synthesis. As this stimulatory effect could be detected for a wide range of different mRNA-species, LARP4B hence represents a general stimulator of translation. Interestingly, parallel studies uncovered comparable cellular interactions for another LARP family member (LARP1). To test whether LARP4B and LARP1 represent orthologs possessing redundant function, these two factors have been compared in this work using several independent *in vivo* and *in vitro* studies. These data clearly showed that both proteins

positively influence RNA-metabolism but influence different phases of protein biosynthesis.

2. Einleitung

Im Verlauf der Genexpression wird die genetische Information der DNA in funktionelle RNA- bzw. Protein-Moleküle umgewandelt (64). Dieser Prozess wird in Eukaryoten primär durch die RNA-Polymerasen I-III (Pol. I-III) katalysiert. Während alle Protein-codierenden Gene durch Pol. II transkribiert werden, katalysieren Pol I und III die Expression nicht-codierender RNAs mit diversen zellulären Funktionen (255, 256). Die Hauptprodukte der Pol II-Transkripte sind die mRNA-Vorläufer (Prä-mRNAs, engl. *pre-messenger RNA*) (32, 171). Um als Matrize für die Translation durch das Ribosom zu dienen, müssen diese im Folgenden exzessiv prozessiert werden. Hierzu zählen neben der Modifikation durch eine 5'-Cap-Struktur (102), der Spleißvorgang durch das Spleißosom (51, 96) und die 3'-Polyadenylierung (102) wonach die mRNA in das Zytoplasma exportiert wird (27, 102, 204, 227) (Abb. 1).

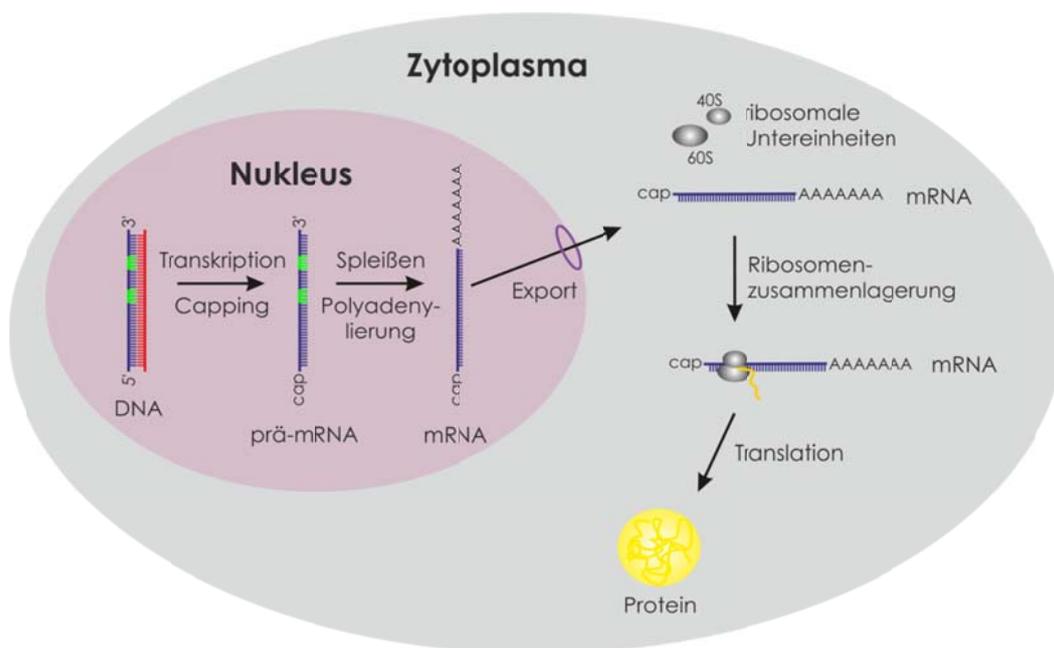


Abbildung 1. Die eukaryotische Genexpression.

Schematische Darstellung der zellulären Genexpression in Eukaryoten.

Sowohl die Prozessierung der mRNA als auch deren Translation in Proteine stellen hoch komplexe Prozesse dar, welche durch eine Vielzahl transagierender Faktoren, sogenannter Ribonukleoprotein-Komplexe (RNP),

maßgeblich beeinflusst werden (51, 225, 239). Abhängig von vorhandenen mRNA-Modifikationen wie 5'-Cap-Struktur, Poly (A)-Schwanz oder anderen mRNA-internen Strukturelementen und der zellulären Lokalisation der RNA-Zielmoleküle variieren die Zusammensetzungen dieser RNPs. Durch die kombinatorische Bindung unterschiedlicher RNA-bindender Proteine (RBPs) an die mRNA kann somit eine post-transkriptionelle Genregulation ermöglicht werden (126).

Eine Familie von RBPs, die erst kürzlich durch bioinformatische Studien entdeckt wurde, stellen die La-verwandten Proteine (engl. La-related Proteine, LARPs) dar. Deren gemeinsames Strukturmerkmal ist eine, als La Modul bezeichnete Domäne. Für einige Mitglieder dieser Familie wurden Funktionen im zellulären RNA-Metabolismus nachgewiesen, wobei die meisten jedoch nur wenig charakterisiert sind (28, 38, 39, 210, 262). Im Fokus dieser Arbeit stand die biochemische und strukturelle Analyse des noch völlig uncharakterisierten LARP4B (engl. La-related protein 4B). Wie sich herausstellte, handelt es sich bei LARP4B um einen Faktor, der in der Translation agiert (210). Im Folgenden soll daher zunächst ein Überblick über die eukaryotische Translation gegeben werden.

2.1. Die eukaryotische Translation - ein Überblick

Der Prozess der Translation, d.h. das Umschreiben der eindimensionalen Erbinformation in dreidimensional gefaltete Proteine lässt sich formal in drei Phasen unterteilen: (a) Initiation, (b) Elongation und (c) Termination. Während die Elongations- und Terminationsphasen durch ein relativ invariables Set an Translationsfaktoren gesteuert werden, bietet die Initiation diverse Angriffspunkte für Regulationsmechanismen und benötigt daher eine große Anzahl an speziellen Faktoren (188, 195, 223). Die meisten translatierbaren mRNAs besitzen charakteristische Struktur- bzw. Sequenzmerkmale, die spezifisch mit Faktoren der Translationsmaschinerie interagieren. Hierzu

gehören z. B. die m⁷G-Cap-Struktur am 5'-Ende, der Poly (A)-Schwanz am 3'-Ende, 5'- und 3'-untranslatierte Bereiche (engl. untranslated regions, UTR) und schließlich das offene Leseraster (engl. open readinframe, ORF) (84). Für die Regulation der eukaryotischen Translationsinitiation sind besonders die 5'-Cap-Struktur und der 3'-Poly (A)-Schwanz von großer Bedeutung. Beide Strukturen werden durch transagierende Faktoren erkannt, die maßgeblich die Translationseffizienz bestimmen. Das 3'-Ende der meisten mRNAs wird durch das evolutionär hoch konservierte zytoplasmatische Poly (A) bindende Protein 1 (engl. poly (A) binding protein cytoplasmic 1, PABPC1) gebunden. PABPC1 spielt sowohl in der Translationsinitiation als auch der -termination und dem mRNA-Abbau eine wichtige Rolle, wobei es die 3'-Poly (A)-Sequenz mit hoher Spezifität bindet (15). Der ekaryotische Initiationsfaktor 4E (eIF4E) hingegen stellt den Cap-bindenden Faktor dar und ist Bestandteil eines als eIF4F bezeichneten Proteinkomplexes. Dieser umfasst außerdem eIF4A, eine DEAD-Box-RNA-Helikase, welche möglicherweise essentiell für den Scanning Prozess des 43S Prä-Initiations Komplexes ist (engl. 43S Pre-Initiation complex, 43S PIC, siehe 2.1.1.), sowie eIF4G (Brückenprotein zur eIF4E-, 4A- und eIF3-Bindung) (222).

Durch zeitgleiche Interaktion von eIF4G mit eIF4E und dem am 3'-Poly (A)-Schwanz gebundene PABPC1 (113, 122, 124, 139, 149) findet die Ausbildung einer zirkulären („closed-loop“) mRNA statt. Hierdurch wird die 3'-untranslatierte Region (3'-UTR) in direkte Nähe des 5'-Endes der mRNA gebracht, was die Re-Initiation der Translation und damit die Translationseffizienz begünstigt (Abb. 2) (37, 117, 233, 234, 253). Die 3'-Interaktion mit PABPC1 stellt demnach die Basis der synergistischen Translationskontrolle 5'-gecappter und 3'-polyadenylierter mRNAs durch zusätzliche 3'-UTR Faktoren dar (36, 82, 86, 89, 170, 234). Diese kooperativen Interaktionen steigern zudem die Affinität von eIF4F zur Cap-Struktur der mRNA (31, 94), die Aktivität der PABPC1-RNA-Bindung (142) und die Helikaseaktivität von eIF4A (25). Die präferentielle Translation von mRNAs mit 5'-Cap und

3'-Poly (A) sowie das Ribosomenrecycling vom 3'- zum 5'-Ende einer mRNA werden durch diese Synergie ermöglicht.

Die Translation der mRNA erfolgt an den Ribosomen, welche in der Lage sind, Proteine durch sequenzielle Polymerisation von tRNA-assoziierten Aminosäuren zu synthetisieren. Um die Translation zu initiieren, muss ein funktionelles 80S-Ribosom, bestehend aus der kleinen (40S) und der großen (60S) ribosomalen Untereinheit am Startcodon der mRNA zusammengelagert werden. Dies geschieht zunächst in Form des 43S PIC (engl. 43S Pre-Initiation complex). Dieser setzt sich aus der 40S ribosomalen Untereinheit, den eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIFs) 3, 1, 1A, 5 und einem ternären Komplex zusammen, der sowohl die Methionin-beladene Initiator-tRNA (Met-tRNA) als auch eIF2 in seiner GTP-gebundenen Form umfasst (116, 188). Der 43S PIC bindet den 5'-Cap-assoziierten eIF4F-Proteinkomplex und „scannt“ die 5'-UTR der mRNA zur Bindung des 5'-proximalen AUG-Initiationscodons (16, 185-187, 193). Dieser an der mRNA lokalisierte 43S-Komplex wird als 48S PIC bezeichnet.

Nach der Positionierung des 48S PIC am Startcodon erfolgt die Hydrolyse des eIF2-gebundenen GTPs. Dieser Schritt wird durch eIF5 stimuliert und bewirkt die Dissoziation eines Großteils der an 40S-assoziierten Initiationsfaktoren (84). Diese Reaktion ist essentiell, jedoch nicht ausreichend für die Anlagerung der 60S ribosomalen Untereinheit an den Initiationskomplex. Inhibitorische Translationsfaktoren wie z. B. eIF6 verhindern in dieser Phase die produktive Initiation durch Assoziation mit 60S (46). Um dessen Dissoziation zu initiieren, ist eine Interaktion mit dem an 40S gebundenen RACK1-PKC-Komplex nötig (166). Der 40S-assoziierte Rezeptor für aktivierte C Kinase 1 (engl. Receptor for activated C Kinase 1; RACK1) dient hierbei als Bindungsstelle der aktivierten Protein Kinase C (PKC) (Abb. 3) (46, 175). Erst nach der Phosphorylierung von eIF6 durch PKC kann eIF6 von 60S dissoziieren und ermöglicht die Zusammenlagerung des 80S-Ribosoms am Startcodon der mRNA (Abb. 2)

(42, 90). Nach Initiation der Translation findet daraufhin die Elongation vom 5'- zum 3'-Ende der mRNA statt.

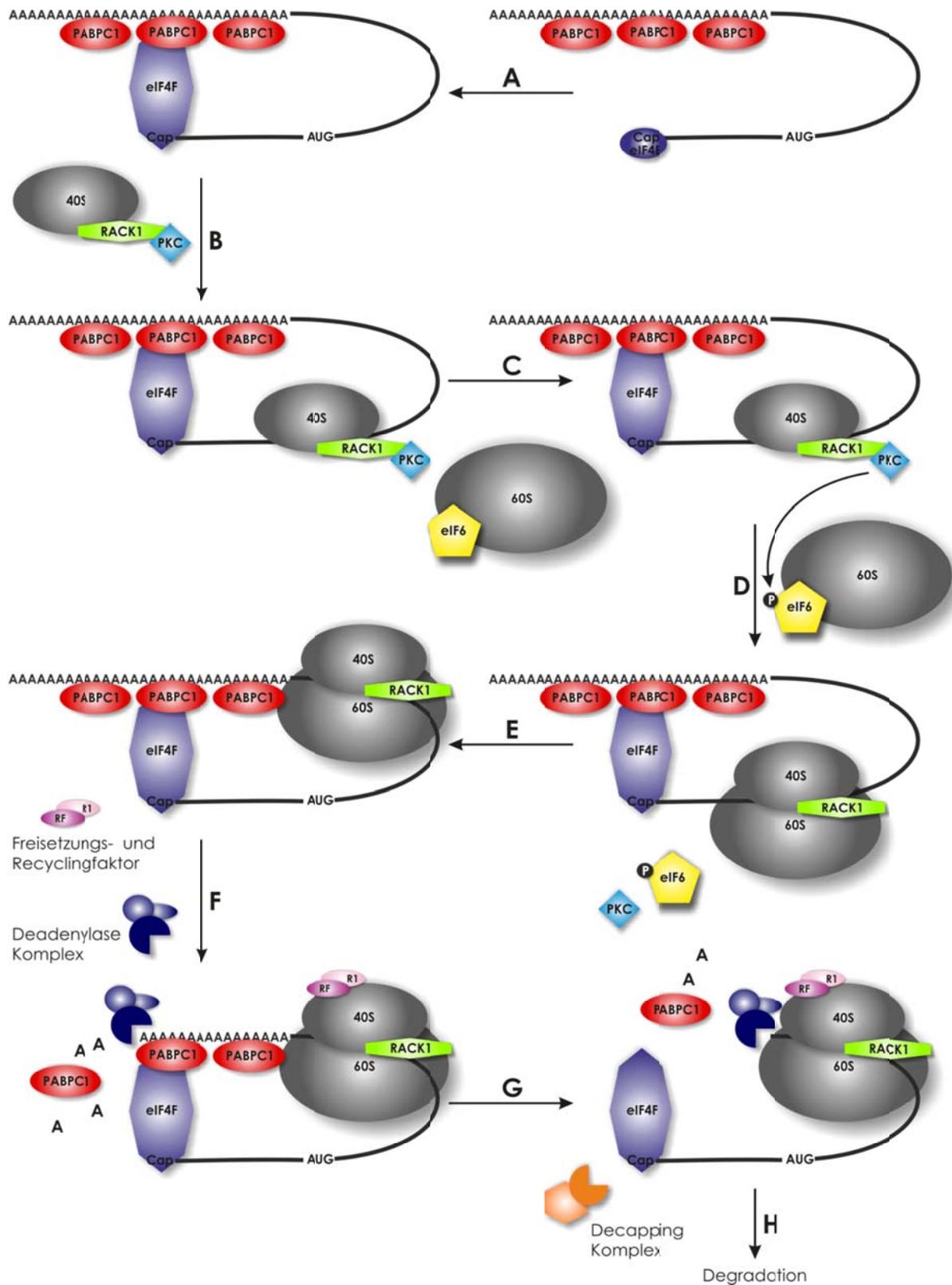
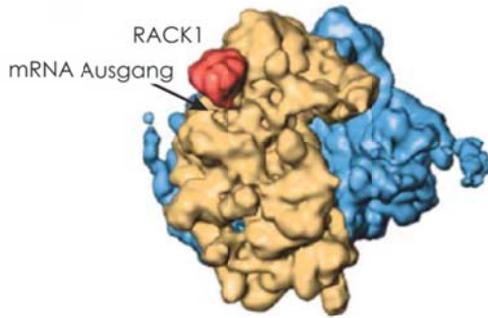


Abbildung 2. Zytoplasmatische Regulation der Translation.

(A) Nach Anlagerung spezifischer Initiationsfaktoren an die 5'-Cap-Struktur der mRNA wird durch Interaktion von PABPC1 mit dem Initiationskomplex eIF4F (eIF4G/4E/4A) die Zirkularisierung der mRNA möglich. (B) Die 40S ribosomale Untereinheit wird in Form des 43S PIC (40S, eIF1/1A/3/2/5, Met-tRNA) am AUG verankert und der 48S-Komplex ausgebildet. (C) Rekrutierung der 60S ribosomalen Untereinheit. (D) Die über RACK1 an 40S gebundene aktivierte PKC phosphoryliert eIF6, was zu dessen Dissoziation von der 60S ribosomalen Untereinheit führt. Dies ermöglicht das Zusammenlagern von 60S und 40S am Startcodon und die Initiation der Translation durch das 80S-Ribosom. (E) Translationsinitiations- und -elongationsphase. (F) Nach der Elongationsphase wird die Translationstermination durch Recycling- (R1) und Freisetzungsfaktoren (engl. release factor, RF), sowie einen speziellen Deadenylierungskomplex eingeleitet. (G) Decapping und Dissoziation von mRNPs. (H) 5'-3'-mRNA-Degradation.

Nach Abschluss der Elongationsphase erfolgt die Termination der Translation an einem Stoppcodon am 3'-Ende der mRNA (190). Hierbei findet neben der Freisetzung der synthetisierten Polypeptidkette das Ribosomenrecycling statt. Die Termination wird hauptsächlich durch den eukaryotischen Releasefaktor 1 (eRF1) reguliert, welcher, aktiviert durch die GTPase eRF3, die Polypeptidhydrolyse nach Erkennung einer der drei Stoppcodons (UAG, UAA, UGA) durch das Ribosom katalysiert (Abb. 2) (127). Die aminoterminalen Region von eRF3 bindet zudem simultan einen carboxyterminalen Bereich des an den 3'-Poly (A)-mRNA-Schwanz gebundenen PABPC1 (62, 106), wodurch die Effektivität der Termination gesteigert und das Ribosomenrecycling für mehrmalige Translationszyklen innerhalb einer mRNA induziert wird (243).

Die zelluläre Abundanz des mRNA-Pools unterliegt einer stetigen Kontrolle. Diese erfolgt zum Einen auf Ebene der Transkription, zum Anderen jedoch auch in der post-transkriptionellen Phase (67, 118). Hierbei kann der mRNA-Abbau in drei verschiedene Prozesse unterteilt werden: (a) endonukleolytische Spaltung, (b) Entfernung der 5'-Cap-Struktur und (c) Poly (A)-Kürzung (Abb. 2). Jeder dieser Abbauprozesse führt zum Verlust der 5'-3'-interagierenden, zirkulären mRNA-Struktur und inaktiviert somit den stimulierenden Effekt von PABPC1 auf die Translationsinitiation. Auf Grund seiner Funktion als Antagonist bzw. Initiator des Poly (A)-Abbaus durch die Interaktion mit bestimmten zusätzlichen Abbau-induzierenden oder -hemmenden Faktoren beeinflusst PABPC1 zudem die Stabilität der mRNA (30, 58, 86, 89, 128, 248, 250).



Wiedergabe nach:
 Nilsson J. et al 2004.
 EMBO Rep 5 (12): 1137-1141.
 (mit Genehmigung von Nature
 Publishing Group)

Abbildung 3. Cryo-EM Analyse von RACK1 am 80S-Ribosom.

Die Cryoelektronenmikroskopie eines 80S-Ribosoms von *Saccharomyces cerevisiae* lokalisierte RACK1 (rot) an der kleinen ribosomalen Untereinheit (40S, gelb). Der mRNA-Ausgang ist durch einen Pfeil gekennzeichnet (175).

2.1.1. Die Regulation der eukaryotischen Translation

Nahezu jede Phase des mRNA-Metabolismus und damit der Genexpression wird durch Faktoren beeinflusst, die mit der mRNA permanent oder transient interagieren (136). Hierzu gehören u.a. die abundanten mRNA-Bindungsproteine der PABP- oder hnRNP-Familie (52, 97, 224). Diese Proteine interagieren häufig sequenzspezifisch mit Modulen der mRNA, wodurch sie selektiv die Translation oder hiermit in Zusammenhang stehende Prozesse des mRNA-Metabolismus beeinflussen können (196). Dabei kann generell zwischen zwei Arten der Regulation unterschieden werden: (a) der globalen Kontrolle, bei der die Translation eines Großteils des zellulären mRNA-Pools reguliert wird und (b) der spezifischen Kontrolle, bei der lediglich eine Subklasse an mRNAs beeinflusst wird. Die globale Translationsregulation basiert hauptsächlich auf der Modifikation einzelner, genereller Translationsinitiationsfaktoren oder der Ribosomen. So wird beispielsweise für die Assoziation des eIF4E an eIF4G eine kleine Domäne innerhalb des eIF4G benötigt, welche ebenfalls in einer weiteren Proteinfamilie, den 4E-bindenden Proteinen (engl. 4E binding proteins, 4E-BPs) vorhanden ist. Das hyperphosphorylierte 4E-BP ist in der Lage, kompetitiv eIF4E zu binden, wodurch dessen eIF4G-Bindung verhindert wird. Dies führt zur Inhibierung der

43S-Assoziation mit der mRNA und damit zu einer Translationsrepression (84). Dieser Prozess ist jedoch reversibel.

Die spezifische Translationskontrolle wird hingegen z. B. durch Regulatorproteinkomplexe wie mRNA-bindende Proteine (RBPs) oder microRNAs (miRNAs) induziert, welche selektiv an Sequenzmotive der mRNA binden (84, 95, 169). Häufig erfolgt die spezifische Translationsregulation durch Faktoren, die mit der 3'-UTR der mRNA interagieren und somit die Ausbildung einer inhibitorischen „closed loop“-Struktur induzieren. Parallel erfolgt meist die Rekrutierung zahlreicher Cofaktoren wie beispielsweise CPEB (engl. cytoplasmic polyadenylation element-binding protein) oder 4EHP (engl. eIF4E homologous protein) (84). Eine relativ späte 3'-UTR-vermittelte Regulation findet im Fall der Interaktionen von hnRNPK, hnRNPE1 oder ZBP statt (111, 178).

Auch miRNAs können die Translation durch Hybridisierung mit der 3'-UTR der mRNA beeinflussen. Da nach der Basenpaarung der miRNA an die mRNA diese jedoch intakt verbleibt, wird hierbei vielmehr eine Repressions- statt eine Degradations-vermittelte Inhibierung der Translation induziert. Dies geschieht ebenfalls meist in Wechselwirkung mit unterschiedlichen RBPs. So dienen miRNAs beispielsweise als Adaptermoleküle für eine sequenzspezifische mRNA-Bindung an AGO (engl. argonaute protein) in definierten miRNA-enthaltenden Ribonukleoprotein-Komplexen (miRNPs) (119, 179, 192). Dem Repressionsmechanismus liegen zwei Prozesse zugrunde: (a) die eigentliche Repression der mRNA-Translation durch die miRNA-Assoziation und (b) eine gesteigerte Degradationsrate der mRNA durch den allgemeinen Deadenylierungsprozess (24).

2.2. Die Familie der LaM-enthaltenden Proteine

Durch bioinformatische Analyse eukaryotischer Genome gelang es kürzlich, eine Klasse putativer RBPs zu identifizieren, die auf Grund ihrer Sequenzmotive den RNA-Metabolismus direkt beeinflussen könnten. Da das seit langem bekannte Lupus Antigen (La Protein) vermutlich den evolutionären Ursprung dieser Proteinfamilie darstellt, werden die ihm zugeordneten Faktoren als La-Homologe bzw. La-verwandte Proteine (engl. La-related proteins, LARPs) bezeichnet (Abb. 6, 7) (33).

2.2.1. Das La Protein

Erstmals identifiziert wurde das humane La Protein als spezifisches Autoantigen in Autoimmunerkrankungen (43, 54, 150, 208) wie Systemischer Lupus erythematodes (SLE) (164) oder Sjögrens Syndrom (SS). Hierbei isolierte man La als Bestandteil eines autoantikörperinduzierenden RNP-Partikels (9, 56, 78, 85, 160, 201, 207, 208). Dieser ansonsten nukleäre RNP-Komplex wurde insbesondere in abgeschnürten Vesikeln (Membranbläschen) an der Zelloberfläche apoptotischer Zellen gefunden (45, 69, 141, 235).

Das La Protein besitzt eine charakteristische Domäne, die als La Modul bezeichnet wird (6, 12, 17, 76, 181). Das La Modul besteht aus dem ca. 90 Nukleotide umfassenden sogenannten La Motiv (LaM) und einem direkt benachbarten klassischen RNA-Erkennungsmotiv 1 (engl. RNA Recognition Motif 1, RRM1). Neben mehreren Phosphorylierungsstellen sind zudem ein zweites RRM (RRM2) (33, 154) und ein nukleares Lokalisierungssignal (NLS) (105, 220) im C-Terminus des Proteins lokalisiert.

La repräsentiert somit ein abundantes Phosphoprotein, das hauptsächlich im Nukleus lokalisiert ist. Abhängig von seinem Phosphorylierungsstatus ist es jedoch in der Lage, in das Zytoplasma zu translokalisieren (14, 26, 44, 45, 77, 107, 115, 153, 180, 182, 205, 238). In ersten funktionellen Studien wurde eine

präferentielle Bindung von La an 3'-terminale Oligo (U)-reiche RNA-Sequenzen identifiziert, wie sie Pol. III generierte Transkripte aufweisen (65, 74, 109, 159, 177, 200, 226, 259).

Eine wichtige Klasse der Pol. III-Transkripte stellen die Vorläufer-tRNAs (prä-tRNAs) dar. Während deren Prozessierung wird das Oligo (U)-enthaltende 3'-Ende entfernt, was mit der zellulären Lokalisierung der meisten La-RNPs korreliert (101). Durch die Bindung des La Proteins an 3'-UUU-OH RNA-Sequenzen werden diese vor vorzeitigem 3'-Exonucleaseabbau oder exzessivem „Trimmen“ geschützt, was die zelluläre Primärfunktion des Proteins darstellt (Abb. 4) (22, 23, 47, 59, 60, 66, 72, 108, 114, 138, 172, 211, 259). Zu den La-bindenden Pol. III-Transkripten werden neben prä-tRNAs auch prä-5S RNA, prä-U6 snRNA, naszierende Formen von 7SK RNAs, 7SL SRP RNA, Y RNAs, Alu, B1, B2 und einige weitere zelluläre und virale RNAs gezählt (29, 48, 50, 79, 87, 88, 99, 145, 151, 152, 155, 203, 206, 216, 247, 252, 265). Neben den präferentiellen Interaktionen mit Pol. III-Transkripten konnte zudem ein Einfluss des La Proteins auf den Metabolismus kurzlebiger Pol. II-Intermediate der unterschiedlichen U-snRNAs in Hefe (137, 138, 260) sowie eine Interaktion mit einem humanen U1-Vorläufer gefunden werden (8, 49, 148, 214).

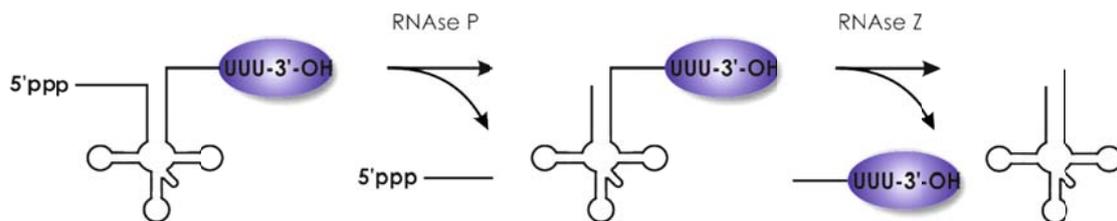


Abbildung 4. La-abhängige Prozessierung naszierender Pol. III Transkripte.

Dargestellt ist der Einfluss des La Proteins auf die prä-tRNA Prozessierung in Hefe (23). La ist als blaues Oval gekennzeichnet. Das gebundene La Protein schützt das 3'-UUU-OH der tRNA vor vorzeitigem Abbau durch eine 3'-Exonuclease. Gleichzeitig wird der 5'-Endonucleaseverdau begünstigt.

La besitzt möglicherweise auch eine Funktion im Metabolismus spezieller mRNAs (7, 35, 63, 100, 104, 125, 161, 162, 168, 174, 183, 197-199, 213, 229, 231, 232, 242, 268). Dies gilt insbesondere für mRNAs mit einem „atypischen“ Translationsinitiationskontext, wie z. B. IRES-enthaltende virale oder zelluläre

mRNAs (103), mRNAs mit 5'-terminalen Oligopyrimidin-Bereichen (TOPs) (41, 115, 213) oder uORFs (242). La zeigt hier sowohl stimulierende als auch inhibierende Effekte auf die Translation, wobei häufig die Anwesenheit von PABP eine entscheidende Rolle spielt. Die genaue Wirkweise von La in diesen Prozessen ist jedoch weitestgehend unklar.

2.2.2. Struktur des La Moduls

Die Interaktion des La Proteins mit seinen zellulären RNA-Zielmolekülen wird durch sein La Modul vermittelt. Dies konnte bereits in Röntgenstrukturanalysen des humanen La Proteins gezeigt werden. Für das enthaltene LaM wurde hierbei eine helikale Faltung identifiziert (6, 71, 123), wie sie bereits für verschiedene DNA-bindende Transkriptionsfaktoren oder RBPs beschrieben wurde (57, 80, 81, 266). Der angrenzenden RRM1 konnte eine typische $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_3$ -Topologie zugewiesen werden, welche in einer Vielzahl RRM-enthaltender Proteine zu finden ist (156).

Für die Assoziation von La mit 3'-terminalen Oligo (U)-Resten ist das La Modul essentiell (siehe Abschnitt 2.2.1.) (65, 129, 237). Die Cokristallisation des La Moduls mit einem kurzen 3'-UUU-OH-enthaltenden RNA-Fragment zeigte, dass die RNA-Oligo (U)-Bindung hauptsächlich induziert durch das LaM vorliegt (Abb. 5). Die putativ RNA-bindende α -Helix-Schleife ist jedoch an der untersuchten RNA-Interaktion nicht beteiligt. Sie verbleibt größtenteils zugänglich für weitere Nukleinsäure- oder Proteinbindungen. Zusätzlich konnte eine „atypische Interaktion“ mit der RRM1- β_2 -Unterseite gefunden werden (Abb. 5).

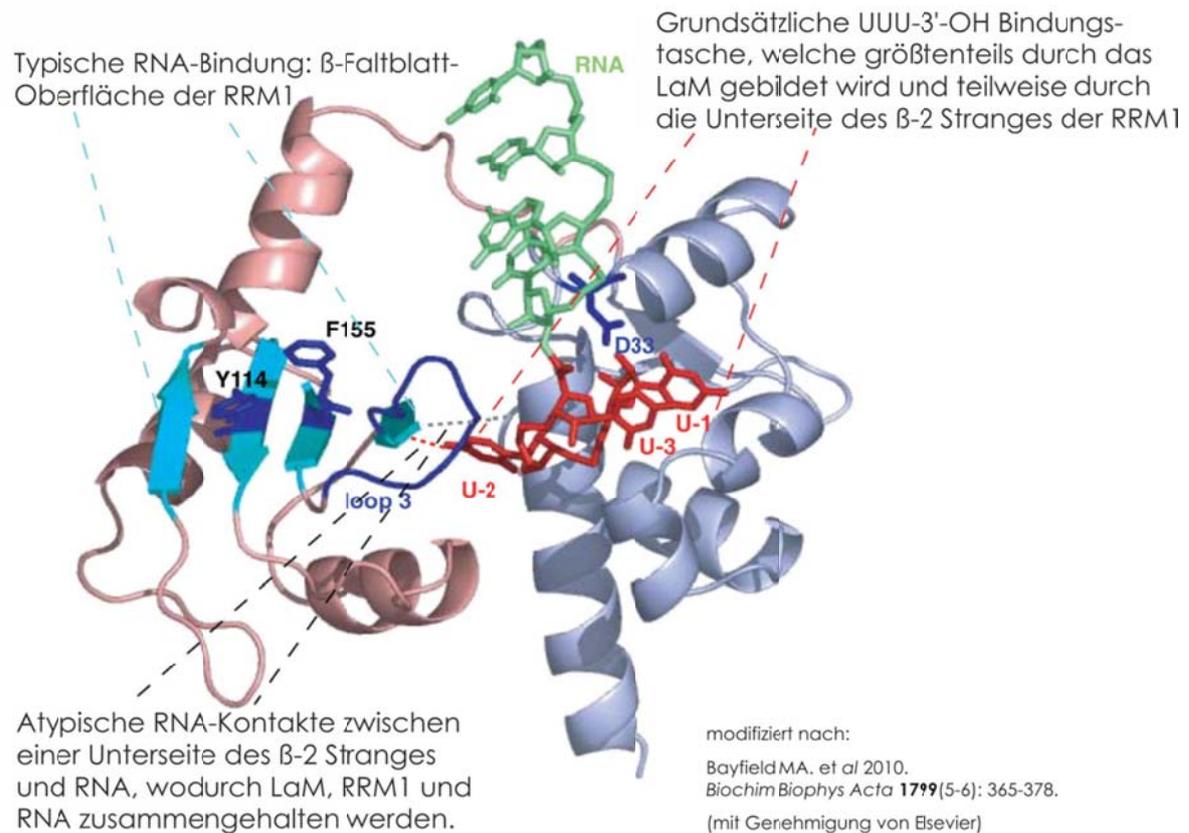
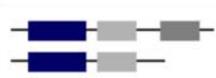
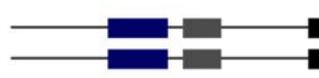


Abbildung 5. Röntgenstrukturanalyse des La Moduls von La.

Das La Motiv (LaM) bildet zusammen mit der ersten RRM (RRM1) eine Bindungstasche für eine spezifische 3'-UUU-OH RNA-Bindung aus (23).

2.2.3. La-verwandte Proteine (engl. La-related proteins, LARPs)

La-verwandte Proteine (LARPs) sind evolutionär mit dem klassischen La Protein über das konservierte LaM verwandt (23, 33). An Stelle der klassischen RRM1 ist jedoch häufig lediglich eine RRM-ähnliche Domäne zu finden (Abb. 6) (2, 3, 167, 194, 228, 258). Anhand evolutionärer und struktureller Untersuchungen verschiedener eukaryotischer Spezies lassen sich fünf Subfamilien LaM-enthaltender Proteine definieren: ursprüngliches La (LARP3), LARP1, LARP4, LARP6 und LARP7 (Abb. 6) (33). Die Nomenklatur folgt einer XyLARPfz Zuordnung. Xy kennzeichnet hierbei die jeweilige Spezies, f die Familiennummer und z dient der Unterscheidung mehrerer Proteine einer Spezies innerhalb einer Familie. Die Familiennummern beschreiben die ihnen zugeordneten humanen LARPs.

Familie	Name	Struktur	Publikationen	RNA Ligand
tatsächliche La	XyLa		La Autoantigen	3'-UUU-OH Pol.III Transkription
Familie 1	XyLARP1z		CeLARP1	mRNAs ?
			DpLARP1	
			HsLARP1	
Familie 4	XyLARP4z		HsLARP4 HsLARP4B	mRNAs ?
Familie 6	XyLARP6z		Acheron HsLARP6	Colα1mRNA 5'Stamm- Schleife
Familie 7	XyLARP7z		HsLARP7	7SK snRNA
			p43 und p65	Telomerase snRNA
ohne Klassifiz.	XyLARPz		Sif1p und Sro9p	3'-UUU-OH Pol.III Transkription

modifiziert nach:

Bousquet-Antonelli C, Deragon JM. 2009. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA* **15**(5): 750-764. Bayfield MA, Yang R, Marais RJ. 2010. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta* **1799**(5-6): 365-378.

(mit Genehmigung von Cold Spring Harbor)

Abbildung 6. Nomenklatur, Definition und Spezifikation der fünf Familien LaM-enthaltender Proteine.

Xy: Spezies Abkürzung; La: tatsächliche La Proteine; LARP: engl. La-related protein; 1-7: Familiennummer; z: weitere Unterbezeichnung innerhalb der Familie bei mehreren Proteinen einer Spezies (33). Der Farbencode entspricht jenem in Abbildung 7. Das LaM ist dunkelblau, die DM15 Domäne rot gekennzeichnet. RRM-s und RRM-ähnliche Motive sind hellblau bis grau markiert.

Neben dem ursprünglichen La Autoantigen (La, LARP3) konnten sechs weitere humane LARPs identifiziert werden LARP1, 1B/2, 4, 4B/5, 6 und 7 (Abb. 7). Proteine, die zwar ein LaM besitzen, jedoch auf Grund des Fehlens einer RRM keiner der Familien eindeutig zugeordnet werden konnten, wie z. B. im Fall der beiden LARPs Sro9p und Sif1p aus *S. cerevisiae*, sind in Abbildung 6 als „ohne Klassifizierung“ gekennzeichnet.

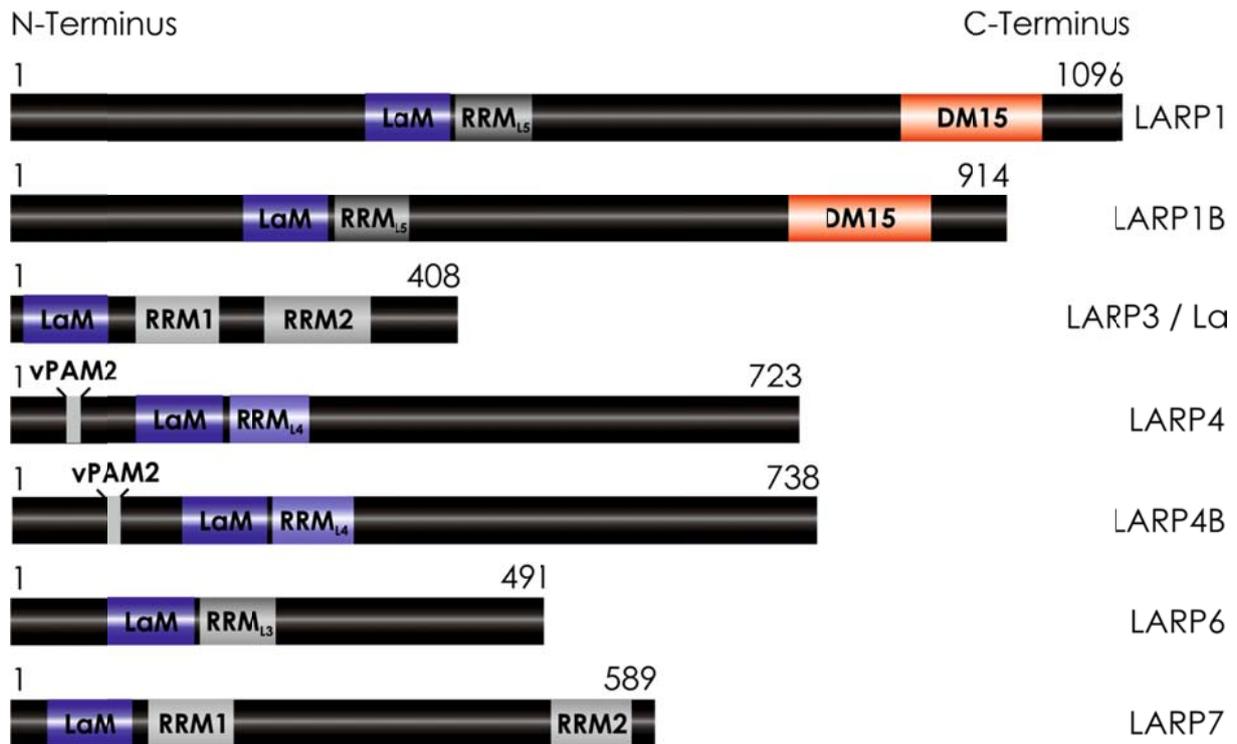


Abbildung 7. Vergleich humaner LARPs.

Innerhalb der humanen LARPs werden 7 Proteine unterschieden (LARP1-7), welche sich alle durch das konservierte LaM (dunkelblau), sowie eine direkt benachbarten RRM oder RRM-ähnliche Domäne (hellblau bis grau) auszeichnen. La und LARP7 besitzen zusätzlich eine zweite RRM im C-terminalen Bereich (RRM2, hellgrau), während LARP1/1B ein DM15 Motiv (rot) mit unbekannter Funktion aufweisen (33). Für LARP4/4B wurde ein N-terminales vPAM2 Motiv identifiziert, das spezifisch mit der MLE von PABPC1 interagiert (262).

2.3. LARPs – eine Proteinfamilie mit heterogener Funktionalität

2.3.1. LARP7 reguliert die Pol. II Transkription

Während die Funktion des La Proteins im Metabolismus prämaturer Pol. III-Transkripte weitestgehend untersucht wurde, ist nur wenig über die zellulären Funktionen der anderen LARPs bekannt. LARP7 stellt das bislang am besten charakterisierte LARP dar und weist auch strukturell die größte Ähnlichkeit zum La Protein auf (23). Neben dem charakteristischen LaM (129, 237) besitzt LARP7 als einziges humanes LARP zudem ein zweites C-terminales RRM (RRM2) (33).

LARP7 ist ein negativer Transkriptionsfaktor, der seine Funktion im Kontext mit dem positiven Transkriptionselongationsfaktor pTEFb ausübt (121, 189) und spezifisch mit der 7SK snRNA interagiert (einem Pol. III Transkript). LARP7 trägt hier unter anderem zur Stabilisierung der RNA bei (70, 92, 99, 135, 157, 158, 221). pTEFb besteht aus der Kinase Cdk9 sowie CyclinT1 und stimuliert durch Phosphorylierung von Pol. II die Transkriptionselongation (189). Zusammen mit den Proteinen Hexim-1 bzw. -2 sowie dem 5'-Methylphosphate Capping Enzym (MeCPE) bildet LARP7 einen 7SK snRNP-Komplex, der sowohl die pTEFb - als auch die Capping-Aktivität blockiert (20, 135, 157, 173, 261, 263, 264).

2.3.2. LARP6 reguliert die Translation von Collagen-mRNAs

Bioinformatische Untersuchungen zeigten, dass in Proteinen der LARP6-Familie alle konservierten Aminosäuren zur effektiven 3'-UUU-OH Interaktion vorliegen. Erste funktionelle Studien des humanen LARP6 identifizierten eine spezifische Interaktion des Proteins mit einem hoch konservierten Stem-Loop Motiv in der 5'-UTR der $\alpha 1$ Collagen-mRNA sowie mRNAs Collagen-ähnlicher Proteine. Man vermutet, dass LARP6 durch diese Interaktion in der Lage sein könnte, die Translation dieser mRNAs zu regulieren (39, 40, 213).

Das in *M. sexta* als Acheron bezeichnete LARP6-Protein hingegen wurde als Apoptose-induzierter Faktor und als Interaktor von Id-Transkriptionsfaktoren (engl. inhibitor of differentiation) und CASK (engl. Ca^{2+} /calmodulin-dependent serine protein kinase) identifiziert (246, 249, 254). Acheron reguliert die Muskelentwicklung und ist möglicherweise an der mRNA-Synthese beteiligt. Neuere Studien zeigten außerdem ein durch Acheron induziertes, gesteigertes Tumorstadium und eine erhöhte Gefäßneubildung bei humanem Brustkrebs (215).

2.3.3. LARP1-Faktoren sind in den zellulären mRNA-Metabolismus involviert

Proteine der LARP1-Familie besitzen an Stelle der klassischen RRM des ansonsten hoch konservierten La Moduls lediglich eine sogenannte „RRM-like 5“ (RRML₅) Domäne. Diese sollt zwar nach bioinformatischen Berechnungen über die RRM-typische Faltung verfügen, jedoch keine internen RNP1 und RNP2 Konsensussequenzen (engl. ribonucleoprotein consensus sequences) besitzen (33). Die essentiellen Aminosäuren innerhalb des LaM, welche zur Oligo (U)-Interaktion des La benötigt werden, finden sich jedoch auch in der LARP1-Familie (23). Zudem identifizierte man ein C-terminales Motiv unbekannter Funktion (DM15) (176).

In *H. sapiens* existieren zwei Proteine der LARP1-Familie (LARP1 und 1B), bei denen 59 % der Aminosäuresequenzen identisch und 73 % ähnlich sind (33). Studien des humanen LARP1 identifizierten eine Interaktion des Proteins mit Translationsfaktoren (38). Zudem konnte ein stimulierender Einfluss von LARP1 auf das globale Translationslevel gezeigt werden, ebenso wie ein mitotischer Arrest und eine verzögerte Zellmigration bei RNAi-induziertem LARP1-Mangel. LARP1-Proteine wurden auch in *D. melanogaster* und *C. elegans* untersucht. dLARP1 interagiert wie hLARP1 mit PABPC1 und ist für die Spermatogenese essentiell (28, 53, 112, 221). *C. elegans*-LARP1 hingegen colokalisiert in Prozessierungskörperchen (engl. Processing-bodies, P-bodies), zeigt eine präferentielle Oligo (U)- und Oligo (G)-RNA-Bindung *in vitro* und scheint den mRNA-Abbau zu induzieren (176, 267). An Hand dieser Daten wird vermutet, dass LARP1 eine Funktion in der Proteinbiosynthese ausübt.

2.3.4. Die Familie der LARP4-Faktoren

Die Familie der LARP4-Proteine unterscheidet sich strukturell am stärksten von La. Ihnen fehlt nicht nur die klassische RRM1 des La Moduls, sie besitzen auch als einzigeLARPs ein weniger konserviertes LaM. Da zwei bzw. drei der für die La 3'-UUU-OH Bindung essentiellen Aminosäuren variieren (RRML₄) und

demnach die RNA-Bindetasche des LaM im Vergleich zu La oder anderen LARPs sehr divergent ist, war bislang unklar, ob auch diese Faktoren RNA-bindern können (21, 33). Die Aminosäuresequenzen der beiden humanen LARPs (LARP4 und 4B) sind zu 37 % identisch und zu 53 % ähnlich. Keiner der beiden Faktoren wurde bislang biochemisch oder funktionell charakterisiert.

2.4. Ziele dieser Arbeit

Die Proteine der einzelnen LARP-Familien weisen eine bemerkenswerte Heterogenität bezüglich ihrer zellulären Interaktionen und Funktionen auf. Zwar besitzen alle LARPs das charakteristische La Modul, sie binden jedoch sehr wahrscheinlich auf Grund interner, struktureller Abweichungen dieser Domäne unterschiedliche RNA-Zielstrukturen (23, 33). Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher Interaktionen und Funktionen des humanen LARP4B biochemisch untersucht werden, um das Protein letztlich einem spezifischen zellulären Prozess zuordnen zu können.

Für erste Hinweise auf die mögliche Funktion von LARP4B sollten zunächst Zelllinien generiert werden, die eine stabile LARP4B-Überexpression erlauben, um über affinitätschromatographische Techniken LARP4B-interagierende Faktoren identifizieren zu können. Hierbei wurde sowohl nach putativen Protein- als auch möglichen spezifischen RNA-Interaktoren gesucht. Mit der Identifizierung LARP4B-interagierender Faktoren wurde daraufhin die Möglichkeit der funktionellen Analyse eröffnet. Zusätzlich sollten LARP4B und LARP1 in biochemischen Studien miteinander verglichen werden, um diese auf mögliche Unterschiede in ihrer Funktion als Faktoren der Translationsregulation hin zu untersuchen. Durch strukturbiologische Analysen wurden schließlich identifizierte LARP4B-Interaktionen weiter verifiziert.

3. Ergebnisse

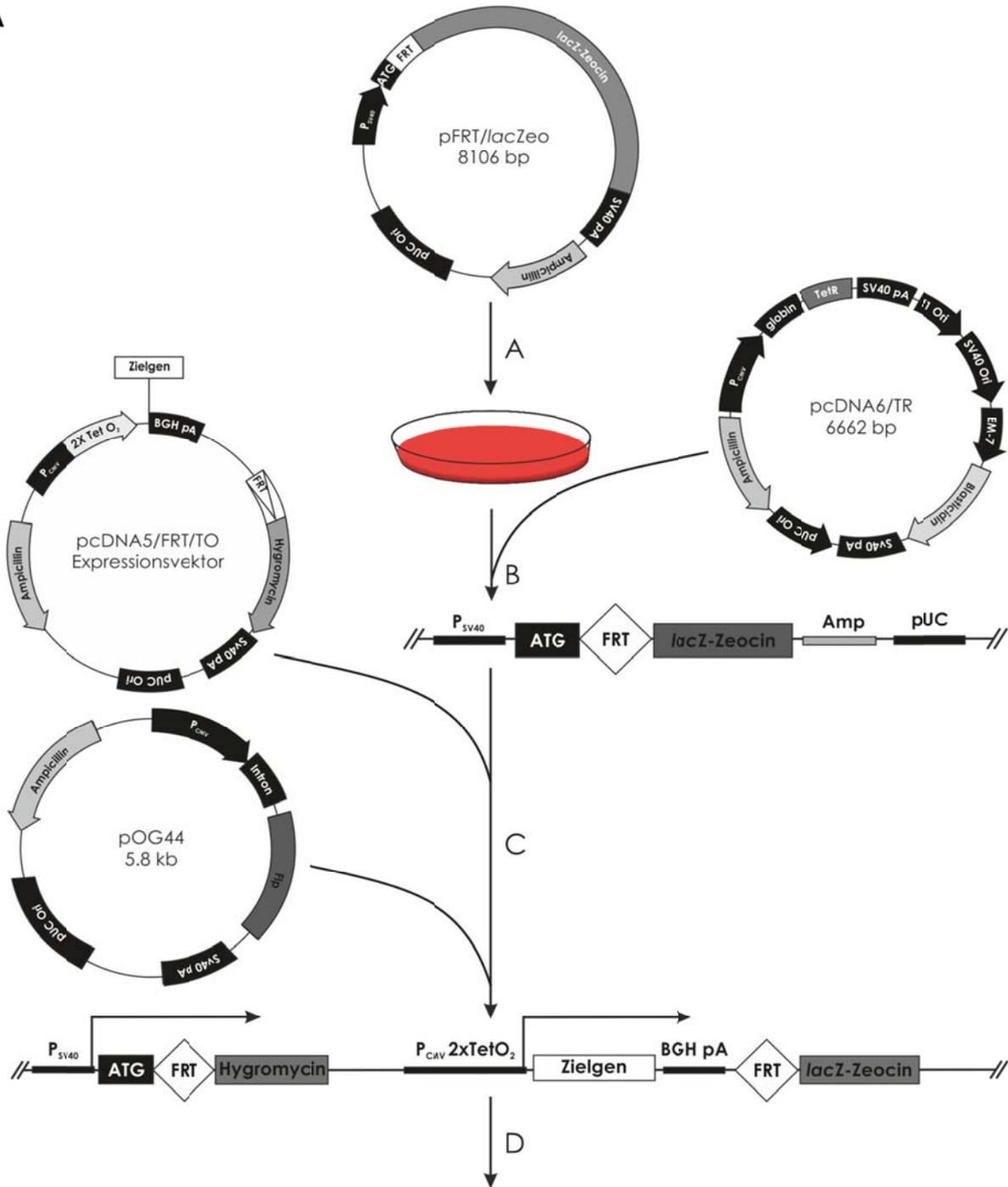
Das klassische La Protein stellt einen gut untersuchten Faktor mit vielen Funktionen im mRNA-Metabolismus dar. Auf Grund der evolutionären Verwandtschaft zum La Protein sind somit die erst kürzlich bioinformatisch charakterisierten LARPs wissenschaftlich von großem Interesse. Ziel dieser Arbeit war daher die biochemische und zellbiologische Analyse zweier Vertreter der LARP-Familie, LARP4B und LARP1. Als Grundlage für spätere Funktionsanalysen stand hierfür zunächst die Identifizierung zellulärer Interaktionen im Vordergrund.

3.1. Identifikation LARP4B-interagierender Faktoren

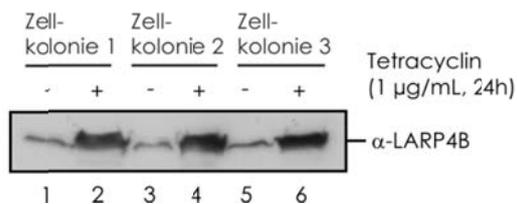
3.1.1. Generierung induzierbarer Zelllinien zur stabilen Expression von LARP4B

In dieser Arbeit sollten zunächst LARP4B-interagierende Faktoren biochemisch identifiziert werden, um somit auf putative Funktionen des Proteins schließen zu können. Mit Hilfe des Flp-In T-Rex Zell Systems von Invitrogen wurde hierfür eine Tetracyclin-induzierbare Zelllinie zur stabilen Expression des LARP4Bs *in vivo* hergestellt (Abb. 8A). Dieses zelluläre Expressions-System basiert auf einer Rekombinase-vermittelten Integration des Zielgens in Säugerzellen und erlaubt, neben spezifischer Selektion durch Resistenzantibiotika, eine temporäre und induzierte Überexpression des zu untersuchenden Proteins. Hierzu wurde zunächst durch Transfektion der Vektoren pFRT//*lacZ* und pcDNA6/TR die Flp-In T-REx Wirtszelllinie generiert (Abb. 8A, A-B), welche sowohl die Rekombinationsstelle (FRT-site) als auch den aktiven Tetracyclin-Repressor (TetR) beinhaltet. Die Selektion positiver Zellen erfolgte mit dem Antibiotikum Zeocin und der Expression der β -Galaktosidaseaktivität (Abb. 8A, A-B). Das Zielgen wurde daraufhin in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO/HA kloniert.

A



B



C

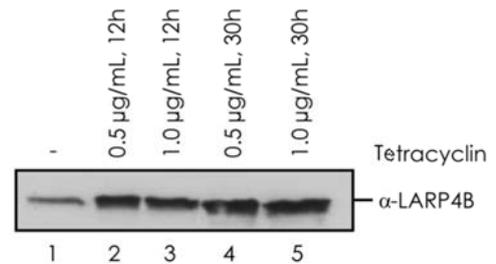


Abbildung 8. Generierung von FlpTrex-Zelllinien zur stabilen induzierbaren *in vivo* Expression von LARP4B.

(A) Generierung von FlpTRex-LARP4B-Zelllinien. Um zunächst die FlpTRex-Wirtszelllinie zu erhalten wurden pFRT//acZeo und pcDNA6/TR in eine FlpIn-Zelllinie transfiziert, durch Zeocin und Blasticidin selektioniert und auf ihre β -Galaktosidaseaktivität überprüft (A-B). Nach Klonierung des Zielgens in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/TO wurde dieser mit pOG44 in die Wirtszellen cotransfiziert und mit Hygromycin selektioniert (C). Durch Zugabe von Tetracyclin zum Medium induzierte man die Expression des Zielgenes (D). (B) Expressionstest generierter FlpTRex-LARP4B-Zelllinien. Mehrere Kolonien wurden isoliert, mit Tetracyclin induziert und die Proteine mittels Western Blot detektiert (Spuren 2, 4 und 6). Als Kontrolle wurden die uninduzierten Zellen lysiert (Spuren 1, 3 und 5). (C) Induktionsanalyse. Zu den FlpTRex-LARP4B-Zelllinien wurden unterschiedliche Mengen Tetracyclin zugegeben und die Expression bei verschiedenen Zeitpunkten untersucht (Spuren 2-5). Die uninduzierten Zellen dienten als Kontrollen (Spur 1).

Durch Cotransfektion des Expressionsvektors mit pOG44, einem Flp-Rekombinase-codierenden Plasmid, in die Flp-In T-REx Wirtszelllinie (Abb. 8A, C) wurde schließlich LARP4B unter Kontrolle des TetR, durch DNA-Rekombination an der FRT-site, in die Zellen integriert. Positive Zellen wurden mittels Hygromycin selektioniert. Durch Zugabe von Tetracyclin zum Zellmedium erfolgte daraufhin die Expression von HA-getagtem LARP4B (Abb. 8A, D).

Wie in Abbildung 8B gezeigt, konnte eine *in vivo* Überexpression von LARP4B induziert werden (Abb. 8B, Spuren 2, 4 und 6). Um geeignete Expressionsbedingungen für spätere biochemische Analysen zu finden, wurde das Expressionsverhalten der Zellen nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen an Tetracyclin über verschiedene Inkubationszeiträume getestet (Abb. 8C). Die in dieser Arbeit beschriebenen LARP4B-Expressionen wurden, wenn nicht anders angegeben, durch Zugabe von 1 μ g/ml Tetracyclin nach 24 h erzielt. Damit war die Voraussetzung für erste Untersuchungen zum zellulären Verhalten des Proteins gegeben.

3.1.2. LARP4B ist Bestandteil mRNA-assoziiierter mRNPs

Zur Isolierung LARP4B-bindender Faktoren wurden zunächst Immunopräzipitationsexperimente (IPs) aus Extrakten von induzierten FlpTRex-LARP4B-Zellen durchgeführt (Abb. 9A). Hierfür wurde ein spezifischer Antikörper gegen LARP4B verwendet (Abb. 9A, Spur 1). Zur Spezifitätskontrolle

der Immunpräzipitationen wurden alle Extrakte parallel auch mit einem Prä-Immunserum (PIS) getestet (Abb. 9A, rechte Spur). Immunpräzipitierte Proteine wurden mittels diskontinuierlicher Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE) separiert, silbergefärbt und über Massensspektroskopie (MS) identifiziert (Abb. 9A, obere Abbildung). Die Verifizierung der durch MS gefundenen Proteine erfolgte durch Western Blot Analyse (Abb. 9A, untere Abbildungen). Es wurden hauptsächlich Faktoren der Translationsregulation als LARP4B-Interaktoren identifiziert. Hierzu gehörten PABPC1 (●), RACK1 (★), eIF4G, eIF4E und LARP1 (☼) (siehe jeweils LARP4B, Abb. 9A-C, ◆). Diese Daten wurden in unabhängigen Immunpräzipitationen in HEK293-Zellen und reziproken IP-Experimenten verifiziert (Abb. 9B-C). Verwendet wurden spezifischer Antikörper gegen LARP1 (Abb. 9B-C, Spuren 2), eIF4E (Abb. 9B-C, Spur 3), PABPC1 (Abb. 9B-C, Spur 4) und RACK1 (Abb. 9C, Spur 5).

PABPC1 und RACK1 sind RNA-assoziierte Faktoren, die an den Poly (A)-Schwanz von mRNAs (PABPC1) bzw. an die 40S ribosomale Untereinheit (RACK1) binden (1, 86, 149, 175). Dennoch beeinflusste eine RNase-Behandlung der Extrakte vor der Immunpräzipitation keine der aufgezeigten Proteininteraktionen (Abb. 9D-E, untere Abbildungen, siehe auch 9F für die Effizienz der RNase-Behandlungen). Es wurde daher eine RNA-unabhängige Wechselwirkung von LARP4B, PABPC1 und RACK1 miteinander vermuten. Lediglich die Copräzipitation von LARP4B und eIF4E erwies sich als RNase-sensitiv und ist somit sehr wahrscheinlich durch RNA vermittelt (Abb. 9D, untere Abbildungen). Diese initialen, biochemischen Daten deuteten daher an, dass LARP4B mit prominenten Vertretern der Translationsmaschinerie interagiert und daher möglicherweise eine Rolle in der Proteinsynthese spielt.

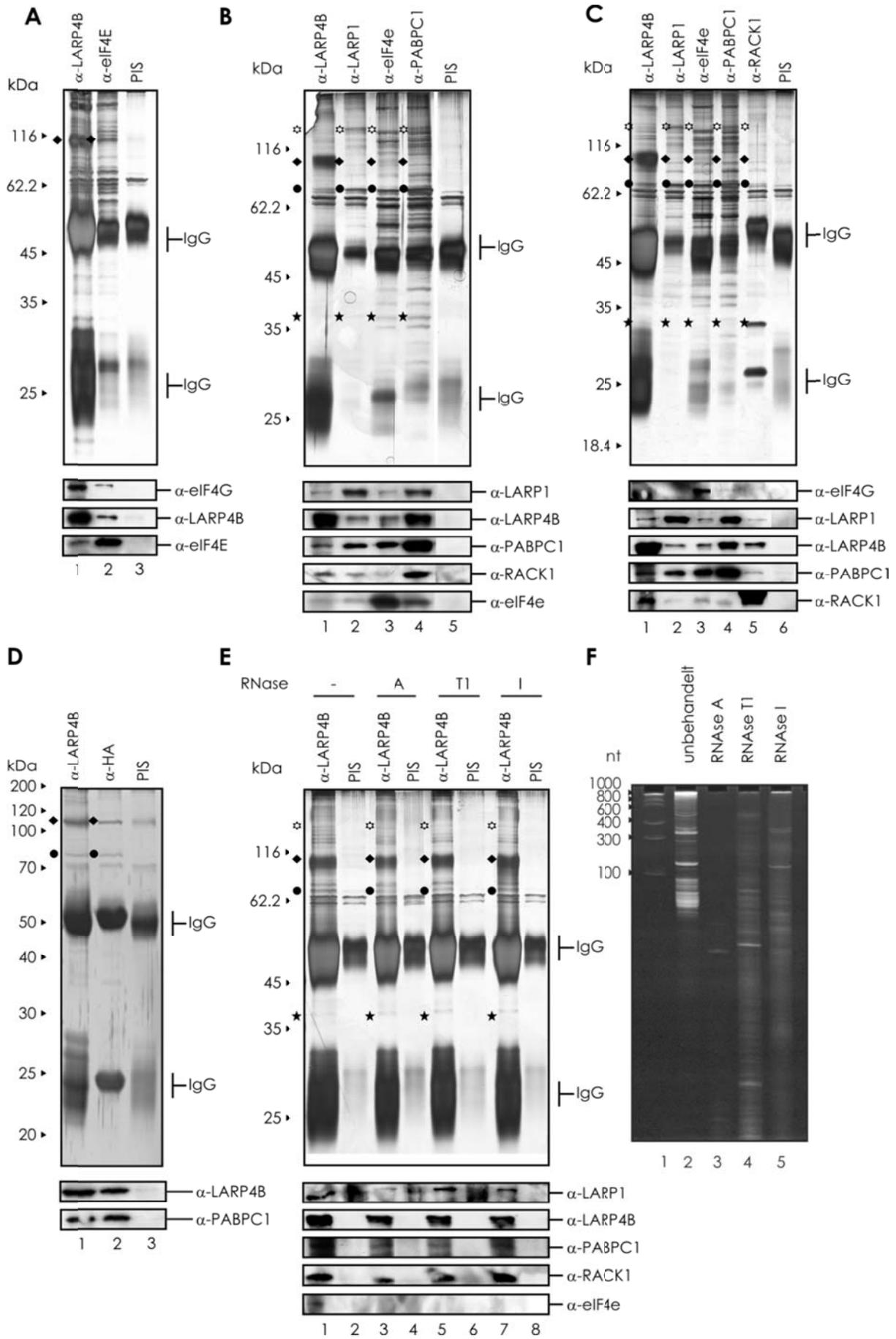


Abbildung 9. Identifizierung von Translationsfaktoren als LARP4B-Interaktoren.

(A) FlpTRex-LARP4B Zellen wurden mit Tetracyclin induziert und mit anti-LARP4B- (Spur 1) oder anti-eIF4E- (Spur 2) Antikörper immunpräzipitiert. Zur Kontrolle wurde ein PIS (Spur 3) verwendet. (B) Extrakt aus untransfizierten HEK293-Zellen wurde mit Antikörpern gegen LARP4B (Spur 1), LARP1 (Spur 2), eIF4E (Spur 3), PABPC1 (Spur 4) oder einem PIS (Spur 5) immunpräzipitiert. (C) Immunpräzipitation von untransfiziertem HEK293-Zellextrakt mit Antikörpern gegen LARP4B (Spur 1), LARP1 (Spur 2), eIF4E (Spur 3), PABPC1 (Spur 4), RACK1 (Spur 5) oder PIS (Spur 6). (D) RNase A-vorbehandelter, Tetracyclin-induzierter FlpTRex-LARP4B-Zellextrakt wurde mit Antikörpern gegen LARP4B (Spur 1), HA (Spur 2) oder einem PIS (Spur 3) immunpräzipitiert. (E) Immunpräzipitation RNase-vorbehandelter HEK293-Zellextrakte mit einem Antikörper gegen LARP4B (Spuren 1, 3, 5 und 7) oder einem PIS (Spuren 2, 4, 6 und 8). Interagierende Proteine wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt (obere Abbildungen) oder durch Western Blotting analysiert (untere Abbildungen). (♦) LARP4B; (⊙) LARP1; (●) PABPC1; (★) RACK1. (F) Proben der RNase-vorbehandelten Extrakte wurden Phenol-extrahiert, Ethanol-gefällt und enthaltende RNA-Fragmente über ein 0.8 % Agarosegel aufgetrennt. Unbehandelter HEK293-Extrakt (Spur 2); RNase A (Spur 3); RNase T1 (Spur 4); RNase I (Spur 5).

Um diese Hypothese weiter zu untermauern, sollten im Folgenden durch zwei affinitätschromatographische Methoden gezielt mRNPs bzw. mRNP-gebundene Faktoren isoliert werden. Als Affinitätsmatrizes dienten (a) eine 7-Methyl-GTP-Sepharose™ (m⁷G), welche die gezielte Isolierung des Cap-bindenden Komplexes und somit „früher“ Translationsfaktoren ermöglicht und (b) eine Oligo (dT)-Zellulose-Matrix zur Isolierung Poly (A)-mRNA-gebundener Proteinkomplexe. Nach Inkubation der Matrizes mit HEK293-Zellextrakten wurden eluierte Proteinkomplexe mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western Blotting analysiert (Abb. 10A-B). Neben den typischen Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF4G, RACK1 und PABPC1 konnten durch m⁷G- Sepharose auch LARP1 und LARP4B copräzipitiert werden (Abb. 10A, Spur 1). Eine Präinkubation des Extraktes mit RNase A beeinflusste hierbei weder die gefundene Assoziation mit LARP1 noch mit LARP4B (Abb. 10A, Spur 2), was auf eine RNA-unabhängige Interaktion der beiden Proteine hin deutete. Auch im Fall der Oligo (dT)-Zellulose konnte LARP4B eindeutig in der Elution nachgewiesen werden. Diese Daten identifizierten LARP4B als Bestandteil von mRNP-Komplexen und sind im Einklang mit den zuvor erhaltenen Immunpräzipitationsergebnissen.

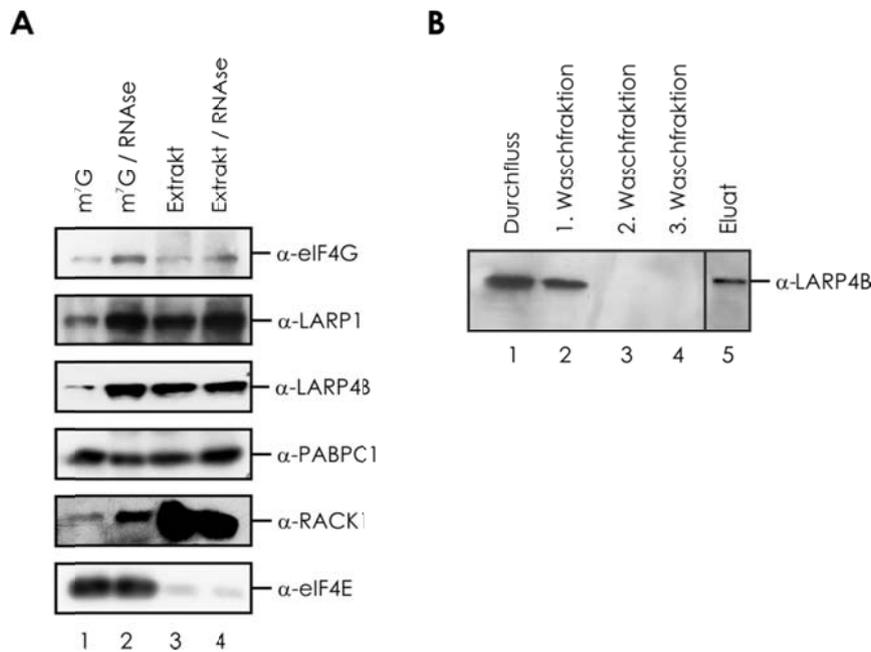


Abbildung 10. LARP4B ist Bestandteil mRNA-gebundener mRNPs.

(A) Bindungsassay mit m⁷G-Sepharose. HEK293-Zellextrakt wurde entweder direkt verwendet (Spur 1) oder RNase A-vorbehandelt (Spur 2). Inputs: Spur 3 und 4. (B) Oligo d(T)-Aufreinigung von HEK293-Zellextrakt mit Oligo d(T)-Zellulose. Spur 1: Durchfluss; Spur 2-4: Waschfraktionen 1-3; Spur 4: Eluierte Proteine. Gebundenes LARP4B wurde durch Western Blotting nachgewiesen.

3.2. Bestimmung von LARP4B-Interaktionsstellen

Die bisherigen Daten deuten auf mögliche direkte Interaktionen von LARP4B mit PABPC1 und RACK1 hin. Die molekulare Basis dieser Interaktionen wurde daher *in vitro* detaillierter untersucht. Hierzu wurden die einzelnen Proteine bzw. Fragmente dieser in *E. coli* rekombinant exprimiert. Die LARP4B-Fragmente umfassten entweder nur den N- bzw. C-Terminus (NTD, CTD), das LaM bzw. La Modul, oder ein RRML₄ enthaltendes Fragment des C-Terminus (Abb. 11A). Die Expressioneffizienz in *E. coli* ist in Abb. 11B dargestellt (siehe 6.4.10.). Nach Optimierung der Aufreinigungsbedingungen wurden die GST-Fusionsproteine mittels Glutathion-Sepharose isoliert (Abb. 11C) und der fusionierte GST-Tag durch PreScission-Protease-Verdau entfernt (Abb. 11D).

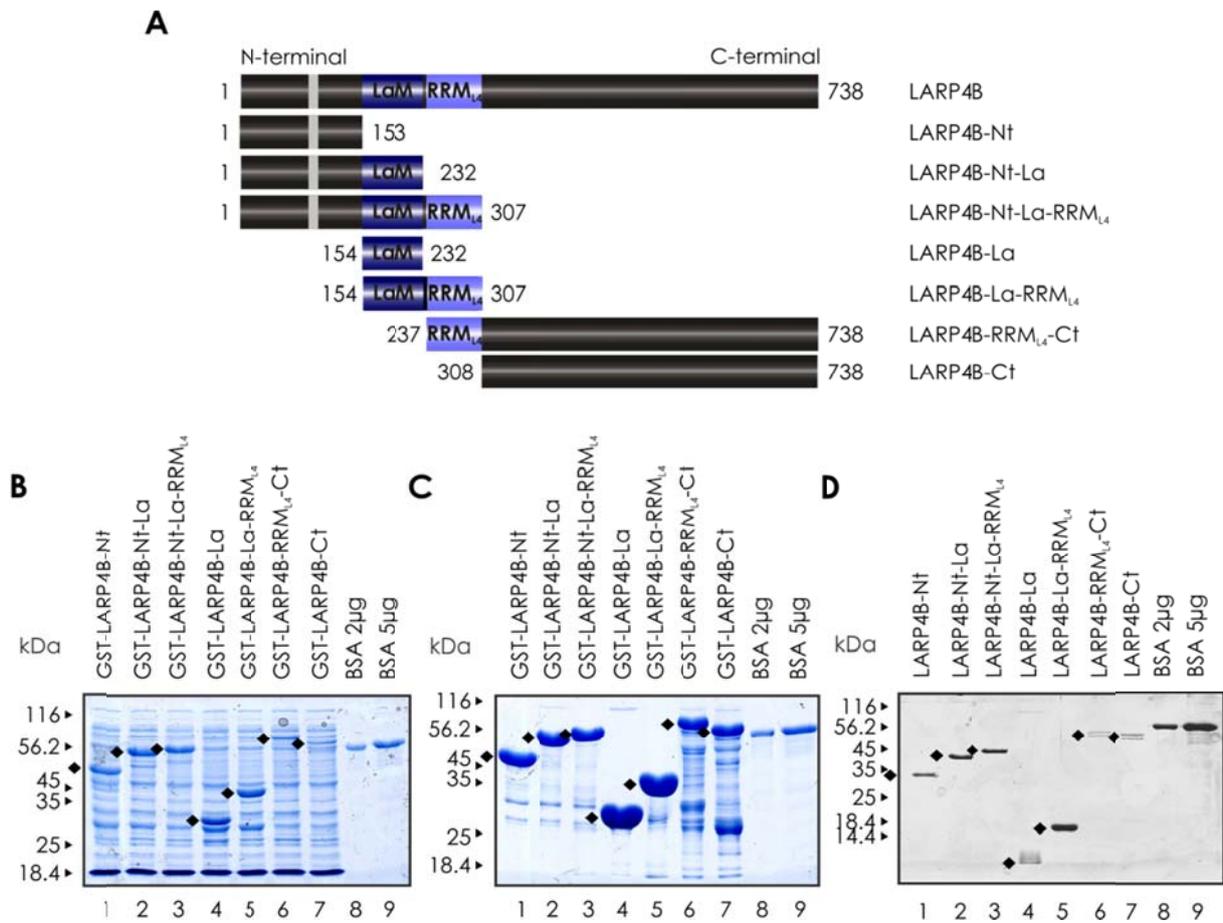


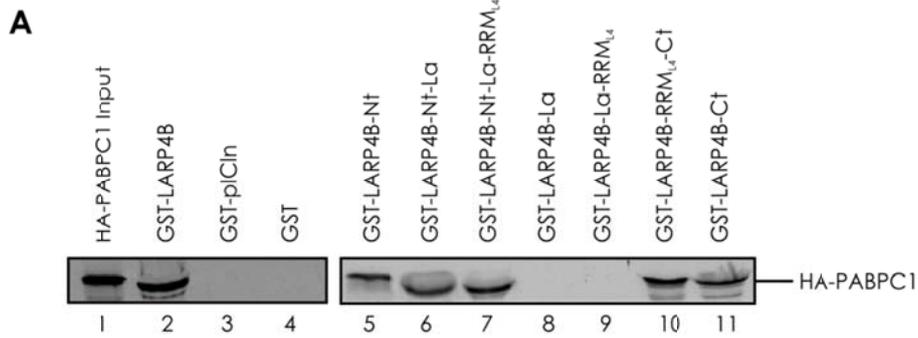
Abbildung 11. Klonierung und Expression verschiedener LARP4B-Trunkationen.

(A) Schematische Darstellung generierter LARP4B-Trunkationen. (B) Expression der LARP4B-Konstrukte in *E. coli* BL21 rosetta pLys. (C) Über GST-Sepharose-Matrix aufgereinigte, überexprimierte LARP4B-Konstrukte nach Elution mit Glutathion. (D) Verdau GST-aufgereinigter LARP4B-Trunkate mit PreScission-Protease. Spuren 8 und 9: 2 bzw. 5 µg BSA zur Konzentrationsbestimmung. (♦) LARP4B-Konstrukte.

3.2.1. LARP4B interagiert über zwei voneinander unabhängige Domänen mit PABPC1

Zunächst sollten die Interaktionen von LARP4B und PABPC1 näher untersucht werden. Hierzu wurden GST-LARP4B-Fusionsproteine an Gluthation-Sepharose immobilisiert und mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem HA-PABPC1 inkubiert. Nach Waschen der Matrix wurden die gebundenen Proteine durch SDS-PAGE separiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht. GST-pICln (Abb. 12A, Spur 3) und GST (Abb. 12A, Spur 4) dienten der Spezifitätskontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl das volle Länge-GST-LARP4B (Abb. 12A, Spur 2) als auch Fragmente, die den N- bzw. C-terminalen Bereich des Proteins enthielten, in der Lage waren, effizient *in vitro* translatiertes HA-PABPC1 zu binden (Abb. 12A, Spuren 5-7 und 10-11). Protein-Fragmente welche lediglich die La-Domänen und RRML₄ umfassten, zeigten hingegen keine Bindungsaffinität zu PABPC1 (Abb. 12A, Spuren 8-9). Diese *in vitro* Interaktionsstudien identifizierten somit zwei Sequenzbereiche in der N- bzw. C-terminalen Region von LARP4B, welche voneinander unabhängig die Bindung von PABPC1 vermitteln können.

Eine bioinformatische Analyse der beiden PABPC1-interagierenden Regionen des LARP4B-Proteins erlaubte die Identifizierung eines konservierten im N-Terminus lokalisierten Motivs, welches als vPAM2 Domäne bezeichnet wurde (Abb. 12B). Ein ähnliches Motiv ist sehr häufig in PABPC1-bindenden Faktoren unterschiedlicher Spezies anzutreffen, wobei es die spezifische Interaktion mit der MLLE-Domäne von PABPC1 vermittelt (5, 55, 68, 110, 130-132, 134, 146, 209, 241). Im C-Terminus des LARP4B konnte hingegen keine bekannte Domäne gefunden werden.



B

Hs eRF3/GSPT1 N-PAM	52	LNVNAKPF	VPNVHAAEFVPSFLRGPTQP
Hs eRF3/GSPT1 C-PAM	61	PNVHAAEF	VPSFLRGPTQPPTLPAGSGS
Dm eEF1-like protein	16	LNVNAVEF	VPSFSYNSVNVAAEAAAVV
Hs TTC3	1207	LNPAAREF	KPDVKSQKPVSDSSSAPAFEN
At ERD15	11	LNPDAPLF	IPAAVRQVEDFSPWWQLVT
Hs USP10	83	LNPQAPEF	ILGCTASKITPDGITKEASY
At Paip2	12	LNPNAPEF	DPVEFREVEDFSPKWDLVT
Dm Paip2	105	LNPMADEF	VPRCHVIDFPAS-----
Hs Ataxin-2	914	LNPNAKEF	NPRSFSSQKPSITPTSPRPQ
Hs Paip1	111	LSVNAPEF	YPSGYSSSYTESYEDGCEDY
Hs LARP4	15	LNPNAKVV	QEIAPGNTDTPVTHGTESS
Hs LARP4B	56	LNPNAEVV	GAPVLHLEASSAADGVSAAW
Hs GW182	1385	WPPEF	HPGVFWKGLQ

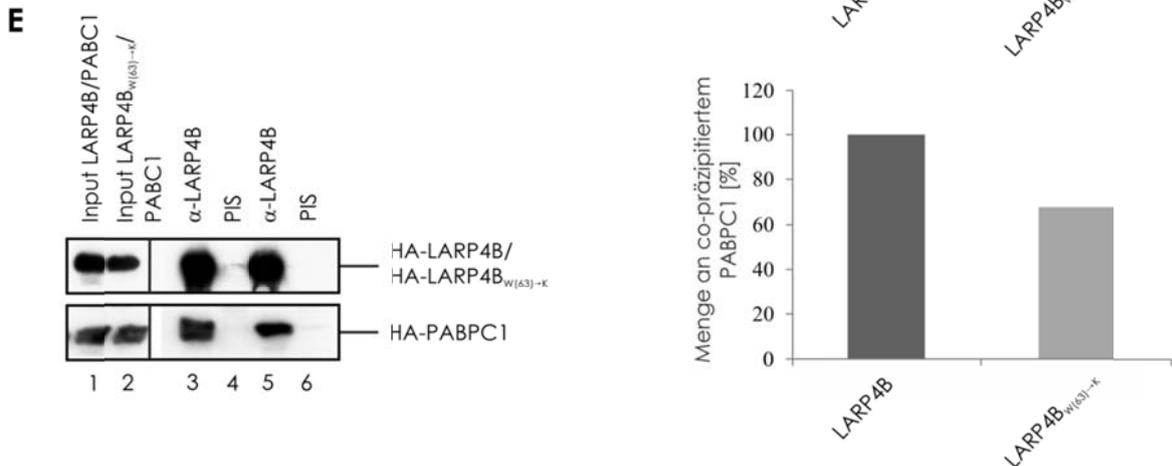
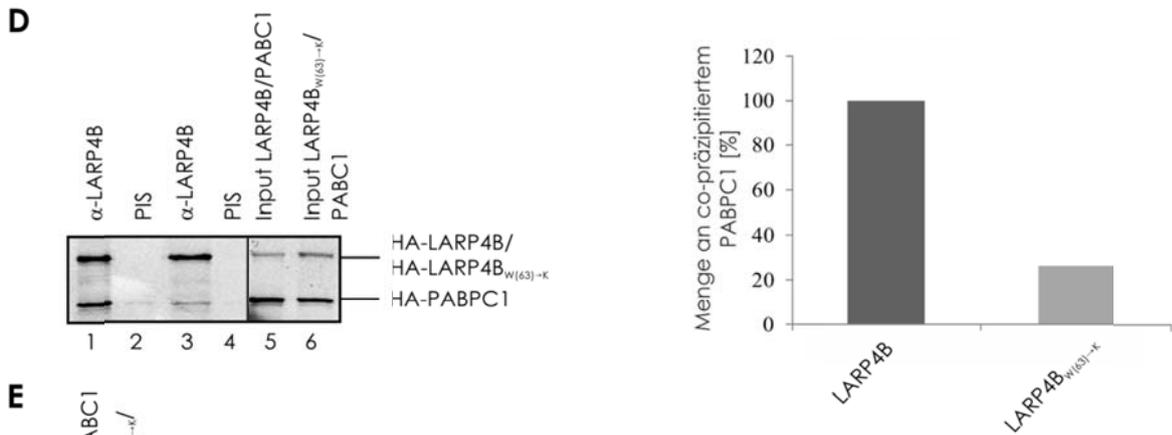
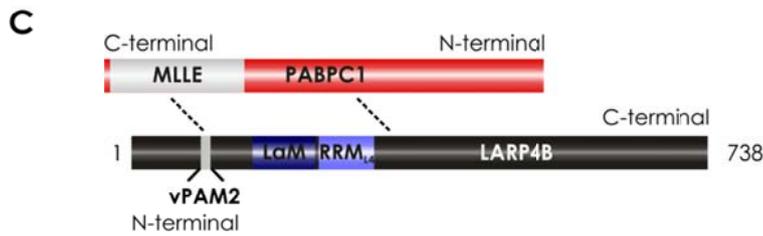


Abbildung 12. Charakterisierung einer N-terminalen vPAM2-Domäne in LARP4B und deren Einfluss auf die PABPC1-Interaktion.

(A) *In vitro* Interaktionsassay unter Verwendung der angegebenen GST-LARP4B-Fusionsproteine mit *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem HA-PABPC1. Gebundenes PABPC1 wurde durch Autoradiographie detektiert. (B) Sequenzvergleich verschiedener PAM2-enthaltender Proteine unterschiedlicher Spezies. Hs: *Homo sapiens*; Dm: *Drosophila melanogaster*; At: *Arabidopsis thaliana*. Konservierte PAM2 Motiv-Aminosäuren sind fett hervorgehoben. Der für LARP4/4B variierende Tryptophan-Rest ist zusätzlich unterstrichen und lila dargestellt. (C) Schematisches Model der etablierten LARP4B-PABPC1-Interaktionen. (D) *In vitro* Interaktionsassay mit [³⁵S]-Methionin markierten Cotranslaten von HA-LARP4B/HA-PABPC1 oder HA-LARP4B_{W63→K}/HA-PABPC1 und immobilisierten Antikörpern gegen LARP4B (Spuren 1 und 3) bzw. einem PIS (Spuren 2 und 4). Spuren 5, 6: je 5 % Input der Cotranslate. Gebundene Proteine wurden durch Autoradiographie detektiert (links) und die copräzipitierte PABPC1-Menge relativ zum Wildtyp-LARP4B bestimmt (rechts). (E) Immunpräzipitation von HA-LARP4B oder HA-LARP4B_{W63→K} transfizierten HEK293-Zellen mit anti-LARP4B-Antikörper (Spuren 3 und 5) oder einem PIS (Spuren 4 und 6). Transfektionseffizienz (Spuren 1 und 2) und gebundene Proteine wurden durch Western Blotting analysiert (links). Rechts: Bestimmung der copräzipitierten PABPC1-Menge.

Im Fall des LARP4B entsprach die gefundene Domäne jedoch nicht der, als LNxxAxEFxP definierten Konsensus-Sequenz bekannter, kanonischer PAM2 Domänen (5). Ein Tryptophan-Rest ersetzt das ansonsten hoch konservierte Phenylalanin (Abb. 12B), weshalb die gefundene Domäne als „variante“ PAM2 bezeichnet wird. Die vPAM2-MLLE-Bindung konnte schließlich unter Verwendung eines spezifischen MLLE-Peptids (AS 546-619) und eines LARP4B-vPAM2-Peptids (AS 55-70) mittels Röntgenstrukturanalyse verifiziert werden (Abb. 32) (184). Um die Notwendigkeit der gefundenen LARP4B-vPAM2-Punktmutation (W63→K) für eine vPAM2-MLLE-Assoziation genauer untersuchen zu können, wurden zudem Immunpräzipitationsexperimente durchgeführt. Dazu wurden zunächst wildtypisches oder punktmutiertes (W63→K) HA-LARP4B mit HA-PABPC1 *in vitro* cotranslatiert und mit [³⁵S]-Methionin markiert (Abb. 12D, Spuren, 5 und 6). Nach Immunpräzipitation mit einem anti-LARP4B-Antikörper (Abb. 12D, Spuren, 1 und 3) und einem PIS als Kontrolle (Abb. 12D, Spuren, 2 und 4), konnten isolierte Komplexe über SDS-PAGE aufgetrennt, autoradiographisch ausgewertet und die Menge an präzipitiertem PABPC1 ermittelt werden. Während für Wildtyp-LARP4B ein nahezu stöchiometrischer PABPC1-Komplex nachgewiesen werden konnte, reduzierte sich die Menge an gebundenem PABPC1 um ca. 80 % im Fall des vPAM2 defekten Proteins (Abb.12D, rechts).

Um zu testen, ob die *in vitro* aufgezeigte Interaktion zwischen vPAM2 des LARP4B und der MLE des PABPC1 auch *in vivo* relevant ist, wurden entweder Wildtyp-HA-LARP4B oder HA-LARP4B_{W(63)→K} mit HA-PABPC1 in HEK293-Zellen cotransfiziert und 48 Stunden nach Transfektion mit einem Antikörper gegen LARP4B immunpräzipitiert (Abb. 12E, Spuren, 3 und 5). Als Kontrolle wurde ein PIS verwendet (Abb. 12E, Spuren, 4 und 6). Die Menge an präzipitiertem PABPC1 wurde mittels Western Blot bestimmt (Abb. 12D). Es konnte zwar wie in der vorangegangenen *in vitro* Studie eine verminderte PABPC1-Interaktion im Fall der LARP4B-Mutante bestätigt werden, die gefundene Reduktion der PABPC1 Bindungsaffinität war jedoch wesentlich geringer. Die vPAM2-MLE-Assoziation trägt somit zur effektiven PABPC1-Bindung von LARP4B bei.

3.2.2. Der C-Terminus von LARP4B bindet RACK1

Nachdem die direkte Interaktion des PABPC1 mit LARP4B strukturell und biochemisch nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden die Bindung des ebenfalls in der IP identifizierten RACK1 mit LARP4B durch entsprechende Bindungsstudien untersucht werden. Hierzu wurde His-RACK1 *in vitro* translatiert und mit [³⁵S]-Methionin markiert. Nach Inkubation des Proteins mit den rekombinanten, immobilisierten LARP4B-Fragmenten (siehe Abb. 11A) konnte auch für RACK1 eine LARP4B-Assoziation nachgewiesen werden (Abb. 13A, Spur 2). Anders jedoch als im Fall der PABPC1-Interaktion war diese lediglich durch die C-terminale Region des LARP4B vermittelt (Abb. 13A, Spuren 2, 8, 9), während die N-terminale Domäne (NTD) sowie das La Modul keine Bindung aufwies (Abb. 13A, Spuren 3-7).

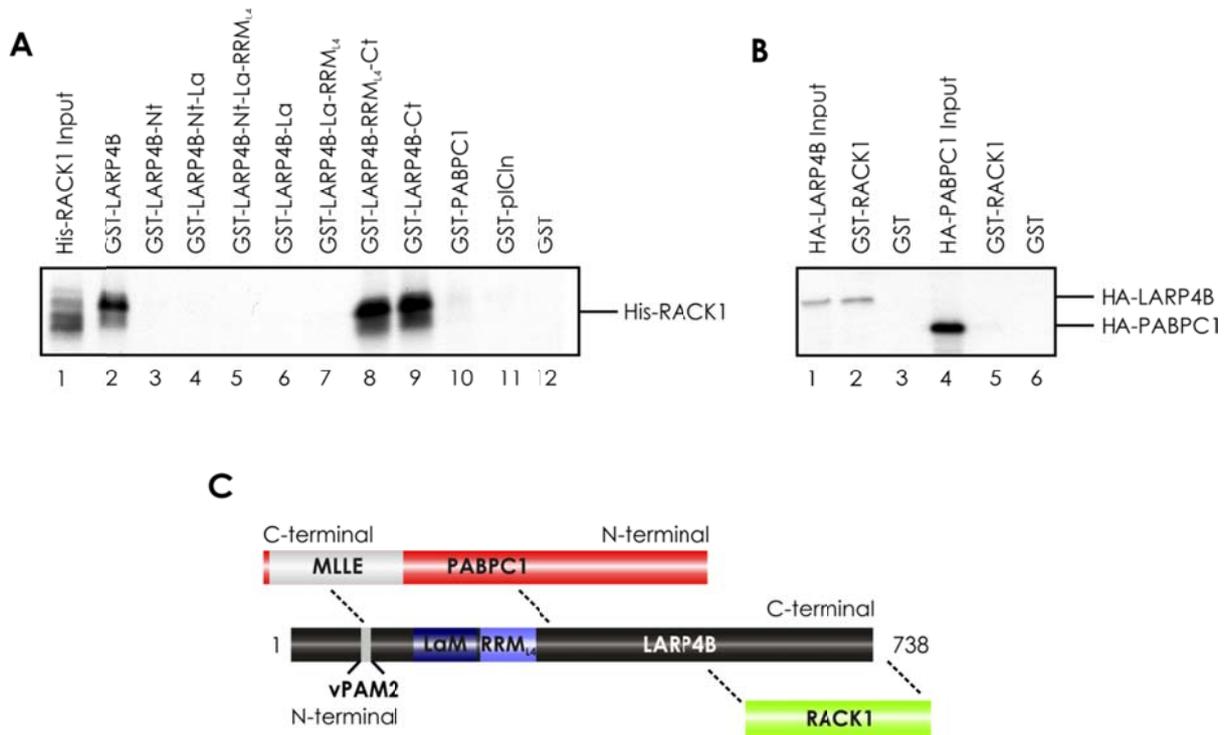


Abbildung 13. *In vitro* Bindungsstudien copräzipitierter LARP4B-Interaktoren.

(A) Bindungsstudie von *in vitro* translatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem His-RACK1 mit den angegebenen GST-LARP4B-Trunkationen. (B) *In vitro* Interaktionsassay mit HA-PABPC1 bzw. HA-LARP4B und immobilisiertem GST-RACK1 (Spuren 2 und 5). GST diente als Kontrolle (Spuren 3 und 6). Spur 1: 5 % des [³⁵S]-markierten HA-LARP4B Input; Spur 4: 5 % des eingesetzten [³⁵S]-markierten HA-PABPC1. (C) Schematisches Modell der in A-D nachgewiesenen LARP4B-Interaktionen.

In weiteren Untersuchungen konnte zudem eine direkte Interaktion zwischen PABPC1 und RACK1 ausgeschlossen werden (Abb. 13B, Spur 5). Diese Bindungsstudien sind konsistent mit einer Funktion von LARP4B als Brückenfaktor, der die beiden Proteine RACK1 und PABPC1 miteinander verbindet. Eine schematische Darstellung der biochemisch charakterisierten LARP4B-Interaktionen ist in Abbildung 13C gezeigt.

3.3. Charakterisierung einer ribosomalen LARP4B-Assoziation

3.3.1. LARP4B assoziiert mit 80S ribosomalen Komplexen und Polysomen

Die direkte Interaktion von LARP4B mit zwei Schlüsselfaktoren der Translationsmaschinerie sowie Hinweise auf eine Assoziation mit Poly (A)-mRNPs ließen vermuten, dass es sich bei dem Protein um einen Translationsfaktor handeln könnte. Um diese Möglichkeit biochemisch zu untersuchen, wurden lineare Dichtegradientenzentrifugationen von HeLa-Zellextrakt durchgeführt und die Sedimentation von LARP4B im Vergleich zu ribosomalen Komplexen ermittelt. Die Fraktionierung der Extrakte in einem 15-45 % Saccharose-Gradienten ermöglichte die Separierung von 40S, 60S und 80S Ribosomen sowie polysomaler Komplexe (Abb. 14A, obere Abbildung). Die Sedimentation der Ribosomen und der einzelnen Untereinheiten wurde über das A_{260} -Absorptionsprofil bestimmt. Über Western Blot Analyse mit Antikörpern gegen eIF3k (an 40S assoziierter Faktor) (Abb. 14A, Spur C) und RPL7, einem ribosomalen Protein der großen Untereinheit (engl. ribosomal protein large subunit 7; 60S Marker) (Abb. 14A, Spur D) wurden Ribosomen-enthaltende Fraktionen detektiert. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl LARP4B (Abb. 14A, Spur A) als auch PABPC1 (Abb. 14A, Spur B) hauptsächlich in 80S- bzw. Polysomen-enthaltenden Fraktionen sedimentierten. Geringe Mengen der Proteine wurden zudem in subribosomalen Fraktionen detektiert. Eine Präinkubation des Extraktes mit RNase A vor der Dichtegradientenzentrifugation führte zu einem quantitativen „Shift“ von LARP4B und PABPC1 in die „leichten“ Fraktionen des Gradienten (Abb. 14A, Spuren E und F; Effizienz der RNase-Behandlung siehe Abb. 14B). Dieser Befund ist konsistent mit der Annahme, dass LARP4B durch Proteinvermittelte Interaktionen Bestandteil translationsaktiver mRNPs ist.

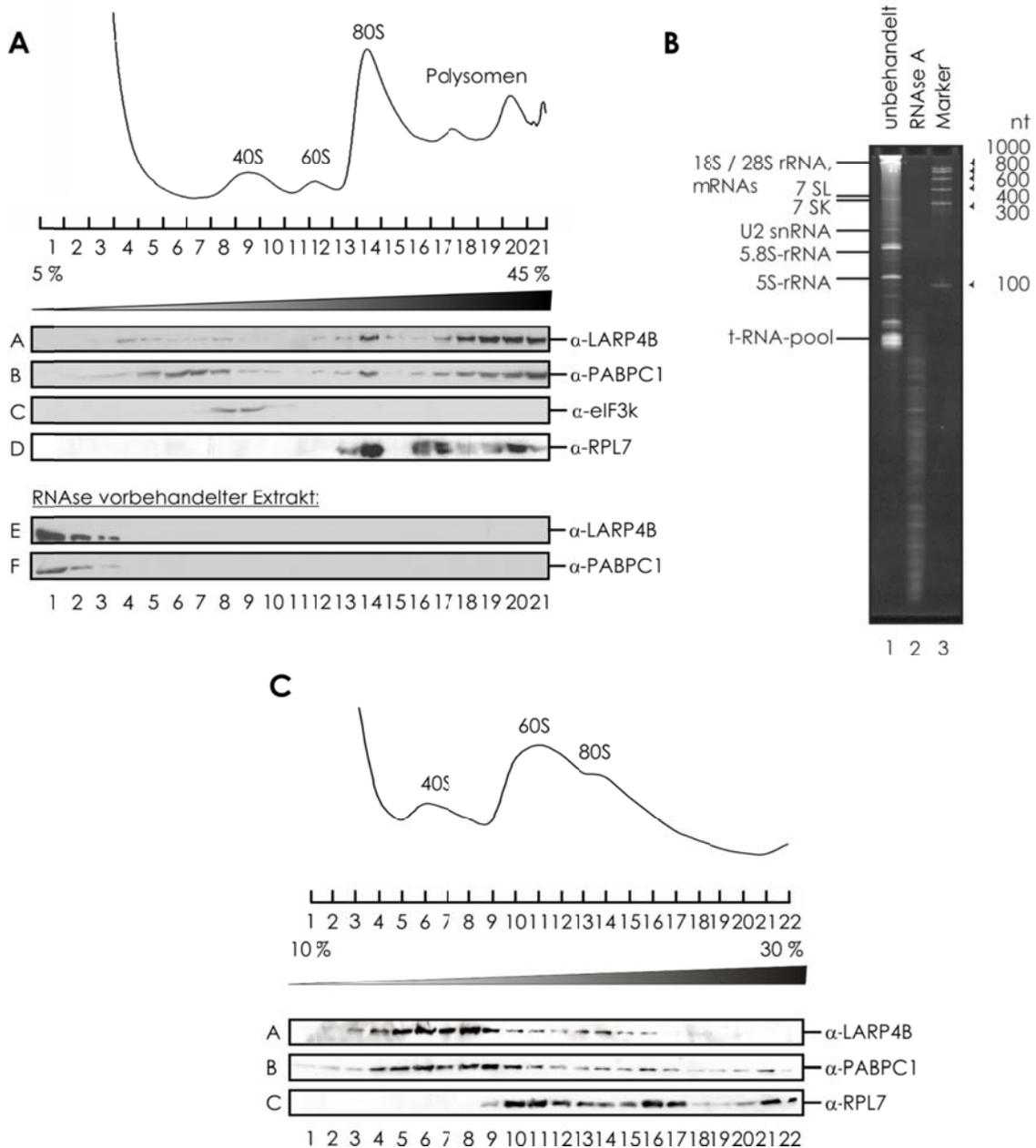


Abbildung 14. LARP4B assoziiert mit dem 80S ribosomalen Komplex und Polysomen.

(A) 5-45 % Saccharose-Gradient von Cycloheximid-behandeltem HeLa-Zellextrakt. Dargestellt sind die Western Blot Analysen der einzelnen Gradientenfraktionen mit Antikörpern gegen LARP4B, PABPC1, eIF3k und RPL7 (Spuren A-D). Spuren E und F: Sedimentation von LARP4B und PABPC1 in einem Gradienten eines RNase A-vorbehandelten Extraktes. (B) Agarosegel der RNase A-Behandlung (Spur 2). Spur 1: unbehandelter Extrakt. (C) 10-30 % Saccharose-Gradient eines EDTA-behandelten HeLa-Extraktes. Die einzelnen Gradientenfraktionen wurden mittels Western Blotting mit Antikörpern gegen LARP4B, PABPC1 und RPL7 analysiert (Spuren A-C).

In weiteren Experimenten sollte nun untersucht werden, ob die identifizierte 80S-Cosedimentation von LARP4B tatsächlich durch eine Assoziation mit einer der beiden ribosomalen Untereinheiten vermittelt wird. Hierfür wurde der

Zellextrakt vor der Gradientenfractionierung mit EDTA behandelt, was zu einer nahezu quantitativen Dissoziation der Ribosomen in seine 40S und 60S Untereinheiten führte. Nach Auftrennung durch einen 10-30 % Saccharose-Gradienten konnte die Sedimentation von LARP4B bzw. PABPC1 durch Western Blot Analyse untersucht werden (Abb. 14C, Spuren A-B). LARP4B und PABPC1 befanden sich nahezu ausschließlich in den 40S-enthaltenden Fraktionen des Gradienten (Abb. 14C, Spur A-B).

3.3.2. Der C-Terminus von LARP4B bindet die 40S ribosomale Untereinheit des assemblierten 80S-Komplexes

Als nächstes wurde untersucht, ob die Cosedimentation von LARP4B und 80S- bzw. Polysomen-enthaltenden Fraktionen auf eine direkte Interaktion mit dem Ribosom zurückzuführen war. Um dies zu untersuchen wurden 80S-Ribosomen, sowie 40S und 60S ribosomale Untereinheiten aus HeLa-Zellen aufgereinigt. Die Aufreinigung von 40S und 60S erfolgte hierbei durch Behandlung isolierter 80S-Ribosomen mit dem Antibiotikum Puromycin. Dieses induziert wie EDTA die Dissoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten, stellt jedoch im Vergleich zu einer EDTA-Behandlung der Extrakte eine wesentlich schonendere Methode dar (Abb. 15C, obere Abbildung, A₂₆₀-Profil; untere Abbildung, Western Blot).

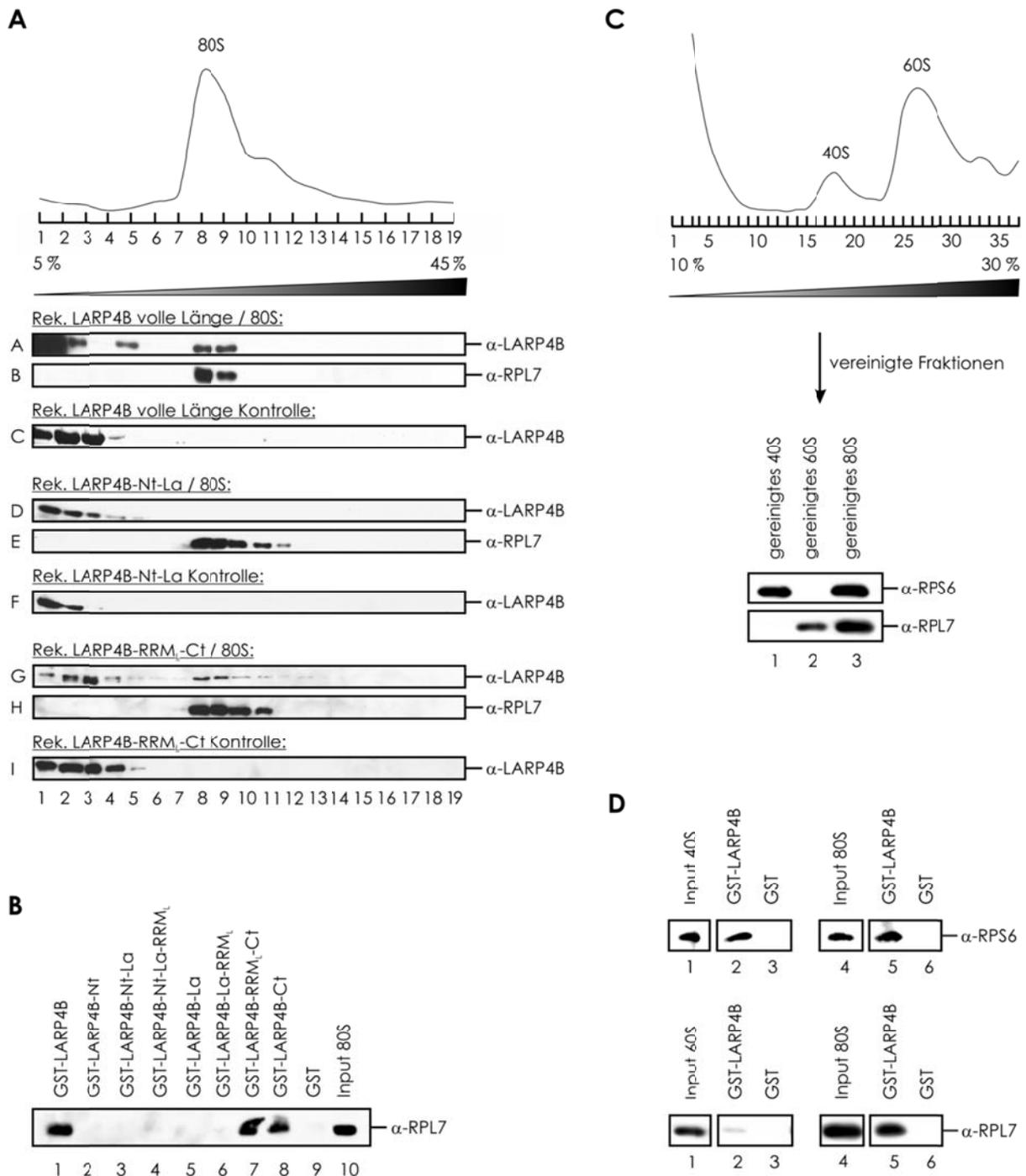


Abbildung 15. Der C-Terminus von LARP4B bindet an die 40S-Untereinheit des 80S-Ribosoms.

(A) Bestimmung der ribosomalen Bindungsstelle von LARP4B an 80S. Die angegebenen rekombinanten LARP4B-Proteine sowie gereinigte 80S-Komplexe wurden vereinigt, präinkubiert und mittels eines 5-45 % Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Abgebildet sind das A₂₆₀-RNA-Profil (oberer Teil) und die Western Blot Analysen der einzelnen Fraktionen mit Antikörpern gegen LARP4B (Spuren A, D, G) und RPL7 (Spuren B, E, H). Als Kontrolle wurde die Migration der LARP4B-Konstrukte in Abwesenheit von 80S getestet (Spuren C, F und I). (B) *In vitro* Interaktion von immobilisierten GST-LARP4B-Fusionsproteinen und aufgereinigten 80S-Komplexen. Assoziierte Ribosomen wurden durch Western Blotting unter Verwendung eines anti-RPL7-Antikörpers detektiert. (C) Aufreinigung von 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten. 80S-Komplexe wurden durch Puromycin dissoziiert und über einen 10-30%

Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Oberer Teil: A₂₆₀-RNA-Profil; unterer Teil: Analyse der vereinigten ribosomalen Gradientenfraktionen mit Antikörpern gegen RPS6 (40S Marker) und RPL7 (60S Marker). (D) *In vitro* Bindungsassay aufgereinigter 40S und 60S ribosomaler Untereinheiten mit immobilisierten GST-LARP4B-Fusionsproteinen. Kontrolle: GST (Spuren 3 und 6). Gebundene Ribosomen wurden durch Western Blot mittels anti-RPS6- oder anti-RPL7-Antikörpern analysiert (Spuren 2 und 5).

In einem ersten Experiment wurden isolierte 80S-Ribosomen zunächst mit rekombinantem GST-LARP4B oder LARP4B-Fragmenten präinkubiert und daraufhin über einen 5-45 % Saccharose-Gradienten separiert (Abb. 15A, obere Abbildung, A₂₆₀-Profil). Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot analysiert, wobei ein anti-RPL7-Antikörper zum Nachweis 80S-enthaltender Fraktionen diente (Abb. 15A, Spuren B, E, H). Als Kontrolle wurden die rekombinanten LARP4B-Proteine in Abwesenheit ribosomaler Komplexe im Dichtegradienten aufgetrennt (Abb. 15A, Spuren C, F, I). Es konnte gezeigt werden, dass LARP4B mit den 80S-Ribosomen im Gradienten cosedimentierte, was eine direkte Bindung des Proteins an die Ribosomen impliziert (Abb. 15A, Spur A). Diese Interaktion liegt vermittelt über den C-Terminus von LARP4B vor (Abb. 15A, Spur G), wohingegen die NTD von LARP4B für die Bindung an Ribosomen nicht ausreichend ist (Abb. 15A, Spur D). Dieses Ergebnis konnte durch *in vitro* Bindungsexperimente bestätigt werden. Hierbei wurde getestet, ob isolierte 80S-Ribosomen mit immobilisierten GST-LARP4B-Fusionsproteinen interagieren können (Abb. 15B, anti-RPL7-Antikörper; GST-Kontrolle siehe Spur 9). Auch in diesem Fall konnte eine Interaktion von LARP4B mit 80S-Ribosomen eindeutig bestätigt werden (Abb. 15B, Spur 1), wobei auch hier die C-terminale Region von LARP4B für eine Ribosomenassoziation ausreichend war (Abb. 15B, Spuren 7 und 8).

Im Folgenden sollte untersucht werden, welche der beiden ribosomalen Untereinheiten die Interaktion mit LARP4B ermöglichte. Hierzu wurden die isolierten 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten in Bindungsstudien verwendet (Abb. 15C, siehe A₂₆₀-Profil oben; unterer Teil: Western Blot Analyse der gereinigten Ribosomen). Die gereinigten ribosomalen Untereinheiten wurden ebenso wie 80S-Ribosomen als Kontrolle (Abb. 15D, Spuren 5-6) mit immobilisiertem GST-LARP4B (Abb. 15D, Spuren 2, 5) bzw. unspezifischem

GST (Abb. 15D, Spuren 3, 6) inkubiert, über SDS-PAGE aufgetrennt und gebundene Ribosomen durch Western Blot Analyse identifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass LARP4B präferenziell an die 40S ribosomale Untereinheit bindet (Abb. 15D, Spur 3). Zusammenfassend zeigen diese Experimente, dass LARP4B mit Ribosomen assoziiert, wobei diese Bindung sehr wahrscheinlich durch die kleine ribosomale Untereinheit vermittelt wird. Ob diese Interaktion direkt durch Assoziation von LARP4B mit ribosomalen RNA- oder Proteinmolekülen erfolgt, konnte jedoch in diesen Experimenten nicht eindeutig nachgewiesen werden.

3.4. Untersuchungen der zellulären Lokalisation von LARP4B unter Normal- oder Stressbedingungen

Alle bis dahin erhaltenen Daten deuten auf eine Funktion von LARP4B im mRNA-Metabolismus hin. Es sollte daher in weiteren Studien die zelluläre Lokalisation von LARP4B unter Normal- und Stressbedingungen untersucht werden. Hierbei war insbesondere von Interesse, ob LARP4B Bestandteil zytoplasmatischer „Stress granules“ (SGs) ist. Diese subzellulären Domänen werden durch verschiedene Arten von Stress, wie z. B. oxidativem Stress, Hitzeschock oder viraler Infektion gebildet. Es wird vermutet, dass sie der Verwahrung mRNA-gebundener Translationsinitiationskomplexe nach stress-induziertem Polysomenverlust dienen (10, 13). Viele mRNA-bindende Faktoren mit Funktionen bei der mRNA-Stabilisierung oder der Regulation des mRNA-Metabolismus sind daher Bestandteile von SGs (10). Hierzu zählt unter anderem auch PABPC1, das im Rahmen dieser Arbeit als LARP4B-interagierendes Protein identifiziert werden konnte.

Zunächst wurde die zelluläre Lokalisation von LARP4B unter Normalbedingungen untersucht. Hierzu wurden zunächst FlpTRex-LARP4B-Zellen durch Zugabe von Tetracyclin induziert und durch indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) untersucht. Zur Detektion von endogenem

sowie überexprimiertem LARP4B wurde ein anti-LARP4B-Antikörper (Abb. 16A, a) verwendet. Ein anti-HA-Antikörper (Abb. 16A, b) diente der spezifischen Markierung des überexprimierten HA-LARP4B-Proteins. In beiden Fällen war LARP4B prädominant zytoplasmatisch lokalisiert (Abb. 16A, d), was mit der zuvor gefundenen Ribosomenassoziation in Einklang steht.

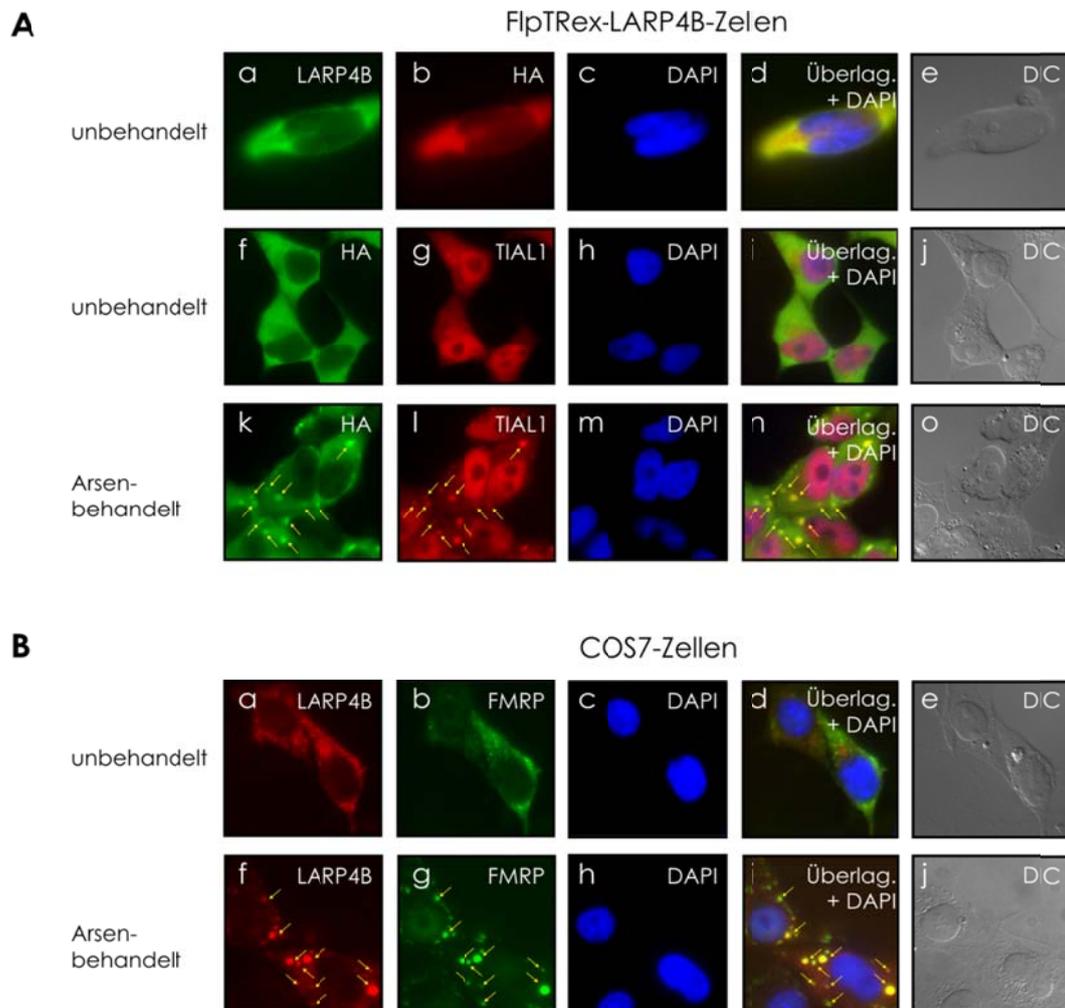


Abbildung 16. LARP4B ist ein zytoplasmatisches Protein und akkumuliert in SGs.

(A) Tetracyclin-induzierte FlpTRex-LARP4B-Zellen wurden entweder direkt (a-j) oder nach Arsen-Behandlung (k-o) mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. LARP4B wurde entweder durch anti-LARP4B- oder anti-HA-Antikörper visualisiert. Ein anti-TIAL1-Antikörper diente als SG-Marker. a-e: Cofärbung von anti-LARP4B- und anti-HA-Antikörpern; k-o: Stressinduzierte SG-Lokalisierung von LARP4B und TIAL1. (B) Immunfluoreszenz endogener Proteine in COS7-Zellen mit Antikörpern gegen LARP4B und FMRP als SG-Marker. Die Zellen waren entweder unbehandelt (a-e) oder Arsen-behandelt (f-j).

Beide Zelllinien wurden in einem separaten Ansatz mit Arsen behandelt, um so die Ausbildung von SGs zu induzieren (Abb. 16). Die SGs wurden durch

indirekte Immunfluoreszenz mit Antikörpern gegen zwei bekannte SG-Markerproteine lokalisiert (a) TIAL1 (engl. cytotoxic granule-associated RNA binding protein-like 1; Abb. 16A, g, l), bzw. (b) FMRP (engl. fragile X mental retardation protein; Abb. 16B, b, g). Die LARP4B-Detektion erfolgte erneut durch Verwendung eines anti-HA- (Abb. 16A, f, k) oder anti-LARP4B-Antikörpers (Abb. 16B, a, f). Es konnte eine eindeutige, stressbedingte SG-Akkumulation von LARP4B nachgewiesen werden (Abb. 16A, f-o; Abb. 16B, a-j).

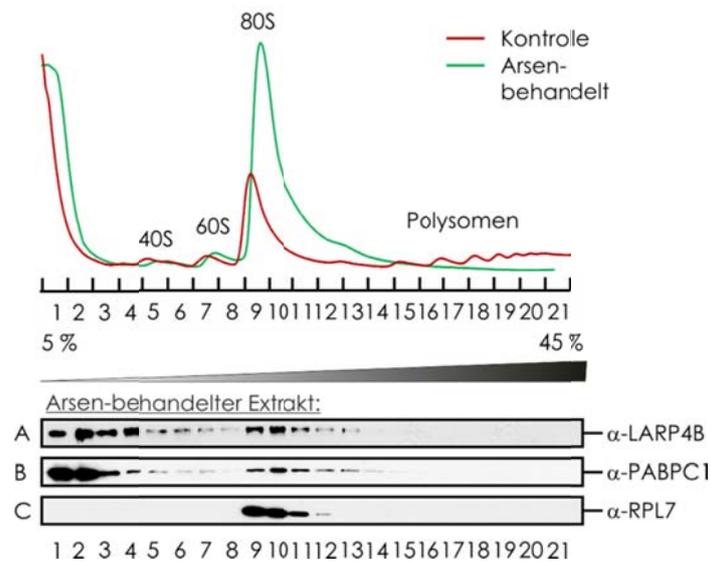


Abbildung 17. LARP4B sedimentiert mit assemblierten 80S-Ribosomen.

5-45 % Saccharose-Gradienten eines unbehandelten bzw. mit Arsen vorbehandelten HEK293-Zelllysates. Die jeweiligen A_{260} -RNA-Profile sind im oberen Bereich der Abbildung dargestellt.

Auf Grund dieser Befunde wurde des Weiteren untersucht, ob ein Arsen-induzierter Translationsarrest und der daraus resultierende Verlust aktiv translatierender Polysomen das Sedimentationsverhalten von LARP4B verändert. Die Fraktionierung eines Arsen-behandelten Extraktes in einem 15-45 % Saccharose-Gradienten zeigte eine Umverteilung von LARP4B und PABPC1 aus den Polysomenfraktionen in 80S-enthaltende (Abb. 17, Spuren A und B, Fraktionen 9-11) und subribosomale Fraktionen (Abb. 17, Spuren A und B, Fraktionen 1-4).

3.5. LARP4B stimuliert die Translation

3.5.1. Überexpression von LARP4B stimuliert die Translation *in vivo*

Sowohl die identifizierten Interaktionen von LARP4B mit essentiellen Faktoren der Translation als auch seine subzelluläre Lokalisation deuteten auf eine direkte Funktion von LARP4B in der Translationsregulation polyadenylierter mRNAs hin. Die globale Translationsrate sollte somit in direkter Abhängigkeit zum LARP4B-Expressionslevel stehen, was im Folgenden *in vivo* durch die Verwendung spezifischer Luziferasereporter in Überexpressionsexperimenten untersucht werden sollte. Hierzu wurden Tetracyclin-induzierte bzw. unbehandelte FlpTRex-LARP4B-Zellen zur Normierung verwendet. Die Expression der Luziferase-codierenden Reporterplasmide (pRL-TK, *Renilla* Luziferase; pGL3, *firefly* Luziferase) wurde 24 h nach Transfektion unter Verwendung eines Luminometers ermittelt. Es konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression von LARP4B (Western Blot siehe Abb. 18A, rechts) zu einer deutlichen Stimulierung der Reporter-vermittelten Luziferaseexpression führte (Abb. 18A, Diagramm). Um transkriptionelle Effekte von LARP4B anhand des mRNA-Levels auszuschließen, wurden zusätzlich qPCR-Messungen durchgeführt. Wie in Abbildung 18B gezeigt, konnte keine Erhöhung der mRNA-Menge nach Überexpression von LARP4B festgestellt werden. Dies zeigte, dass LARP4B spezifisch die Translation des eingesetzten Reporters stimuliert.

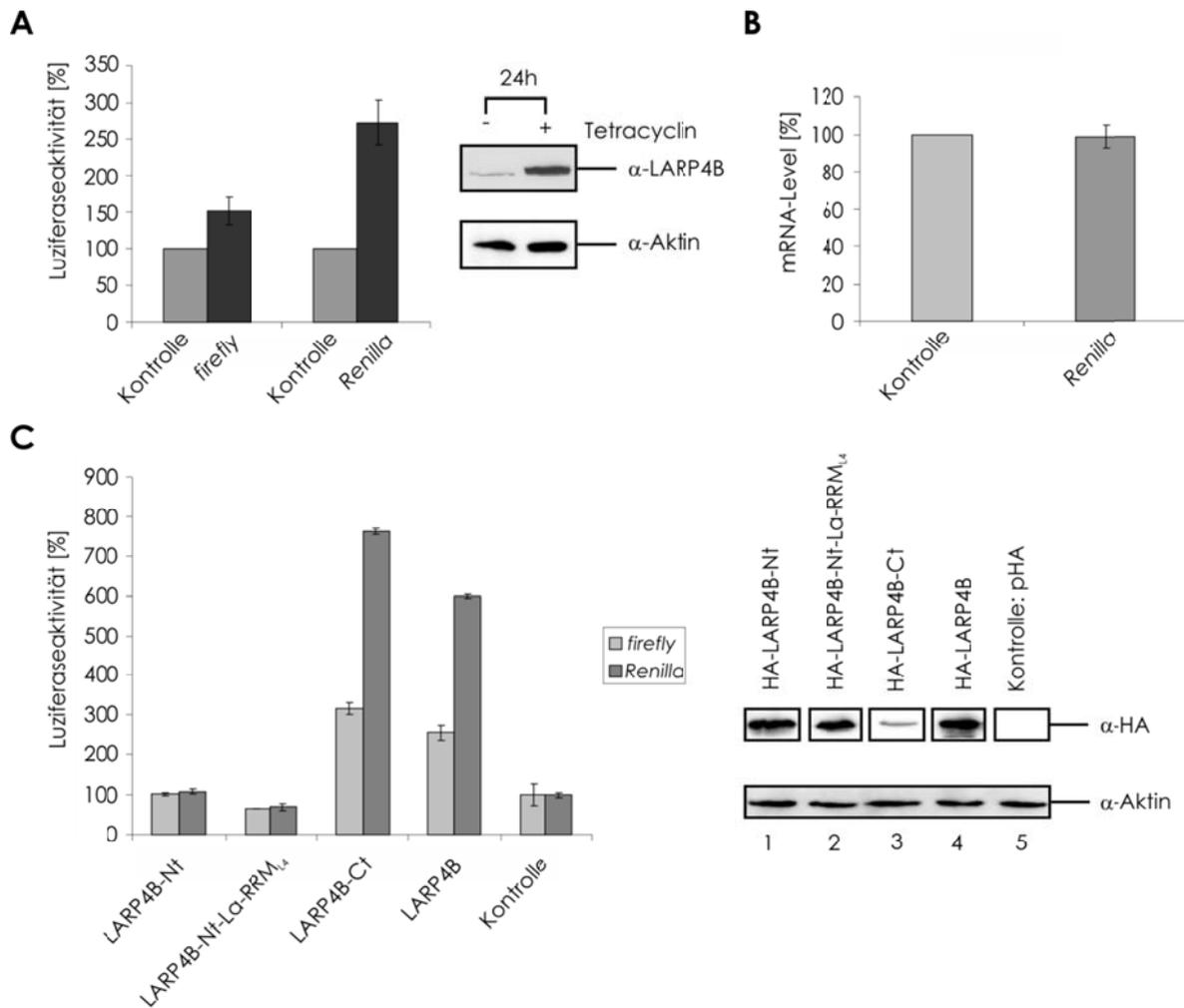


Abbildung 18. Überexpression von LARP4B stimuliert die Translation *in vivo*.

(A) Luziferaseaktivität Tetracyclin-induzierter FpITRex-LARP4B-Zellen (schwarze Balken) oder uninduzierter Kontrollzellen (graue Balken) nach 24 h Zellwachstum. Dargestellt sind die *firefly*- (Expression durch pGL3) und *Renilla*- (Expression durch pRL-TK) Luziferaseaktivitäten. Die Tetracyclin-induzierte Überexpression von HA-LARP4B wurde mittels Western Blot kontrolliert (anti-LARP4B- und anti-Aktin-Antikörper). Alle Daten wurden nach Bradford normalisiert. (B) qRT-PCR vom *Renilla*-Luziferase mRNA-Level in Tetracyclin-induzierten FpITRex-LARP4B-Zellen (dunkelgraue Balken). (C) Einfluss verschiedener, in HEK293-Zellen transfizierter HA-LARP4B-Konstrukte auf die Luziferaseexpression. Dargestellt sind die *firefly*- (pGL3, graue Balken) und *Renilla*- (pRL-TK, dunkelgraue Balken) Luziferaseaktivität 48 h nach Transfektion. Als Kontrolle wurde der pHA-Leervektor transfiziert (siehe Balken ganz links). Die Transfektionseffizienz wurde mittels Western Blot mit Antikörpern gegen HA und Aktin analysiert. Die Proteinlevel wurden nach Bradford normalisiert.

In den vorangegangenen Bindungsstudien konnte bereits gezeigt werden, dass der C-Terminus von LARP4B eine Assoziation des Proteins mit PABPC1, RACK1 und ribosomalen Komplexen vermittelt. Für die NTD des LARP4B konnte hingegen die Bindung an die MLE-Domäne des PABPC1 nachgewiesen werden. Es sollte daher im Folgenden untersucht werden, welcher Bereich

und somit welche der gefundenen Interaktionen von LARP4B für den translationsstimulierenden Effekt verantwortlich ist. Hierzu wurden verschiedene LARP4B-Trunkate und Luziferasereporter in HEK293-Zellen cotransfiziert. 48 h nach Transfektion wurde an einem Luminometer die Expression der Luziferasen ermittelt (Abb. 18C). Die Expressionslevel der HA-LARP4B-Proteine wurde zudem durch Western Blot überprüft (Abb. 18C, rechts). Wie in Abbildung 18C gezeigt, konnte eine Stimulierung der Translationsrate ausschließlich nach Überexpression des volle Länge-Proteins und des C-terminalen LARP4B-Fragments nachgewiesen werden. LARP4B-Konstrukte, die lediglich die NTD oder das La Modul codierten, zeigten hingegen keinen Effekt auf die Translationsrate der Reporter (Abb. 18C). Diese Daten lassen vermuten, dass LARP4B seine translationsstimulierende Wirkung durch seine C-terminale Region vermittelt. Somit scheint insbesondere die Assoziation des Proteins mit Ribosomen kritisch für dessen Funktion in der Translation zu sein.

3.5.2. LARP4B defiziente Zellen zeigen eine Erniedrigung des globalen Translationslevels

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Überexpression von LARP4B die Translation stimuliert, sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, ob auch die RNAi-vermittelte Reduktion des Proteins einen Einfluss auf die zelluläre Translationsrate zur Folge hat. Um diese Frage zu klären, wurden unterschiedliche Methoden verwendet. In einem ersten Ansatz wurde zunächst eine „globale Translationsanalyse“ durch ein „metabolisches Markierungsexperiment“ vorgenommen. 48 h nach Transfektion einer siRNA gegen LARP4B in HEK293-Zellen wurde die temporäre Translationsrate an Hand einer *in vivo* [³⁵S]-Methionin Markierung von neu synthetisierten Proteinen ermittelt. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Zellextrakte wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie analysiert (Abb. 19A, linke Abbildung; siehe auch Abb. 19B, verschiedene

Inkubationszeiträume). Die Effizienz des siRNA-induzierten LARP4B-Mangels wurde durch Western Blot untersucht (Abb. 19A, untere Abbildung). Die erhaltenen Daten zeigten, dass die Reduktion des LARP4B-Levels eine Verringerung des globalen Translationslevels um ca. 50 % zur Folge hat (Abb. 19C). Dieser Befund bestätigte den in den Überexpressionsversuchen gefundenen stimulierenden Effekt von LARP4B auf die Translationsrate der Reporter.

In einem weiteren Experiment wurde ein Luziferase-codierender Reporter mit der gegen LARP4B gerichteten siRNA in HEK293-Zellen cotransfiziert und die Luziferaseexpression luminometrisch analysiert. Unbehandelte Zellen dienten erneut als Kontrolle und die Knockdown-Effizienz wurde durch Western Blot Analyse untersucht (Abb. 19E, rechte Abbildung). Auch hier konnte eine Verminderung der Luziferaseexpression beobachtet werden (Abb. 19E, linkes Diagramm, dunkelgrauer Balken). Um erneut einen Effekt von LARP4B auf die Transkription ausschließen zu können, wurden auch für dieses Experiment qPCR-Messungen durchgeführt. RPLP0 (engl. ribosomal protein large subunit P0) wurde hierbei als Normalisierungsfaktor verwendet und die erhaltenen Daten nach der „ $\Delta\Delta ct$ -Methode“ ausgewertet. Es konnte auch hier ein unverändertes mRNA-Level nachgewiesen werden (Abb. 19D, grauer Balken rechts).

Die LARP4B-vermittelte Translationsstimulierung sollte im Folgenden detaillierter untersucht werden. Um zunächst insbesondere die Bedeutung der Initiationsstruktur untersuchen zu können, wurde *in vivo* der Effekt RNAi-induzierten LARP4B-Mangels auf die Translationsrate gecappter bzw. IRES-abhängiger Luziferasereporter ermittelt. Bei den Reportern handelte es sich um bicistronische Plasmide, wobei die Expression der *Renilla*-Luziferase jeweils Cap-abhängig erfolgte, die *firefly*-Luziferaseexpression hingegen durch unterschiedliche IRES-Strukturen.

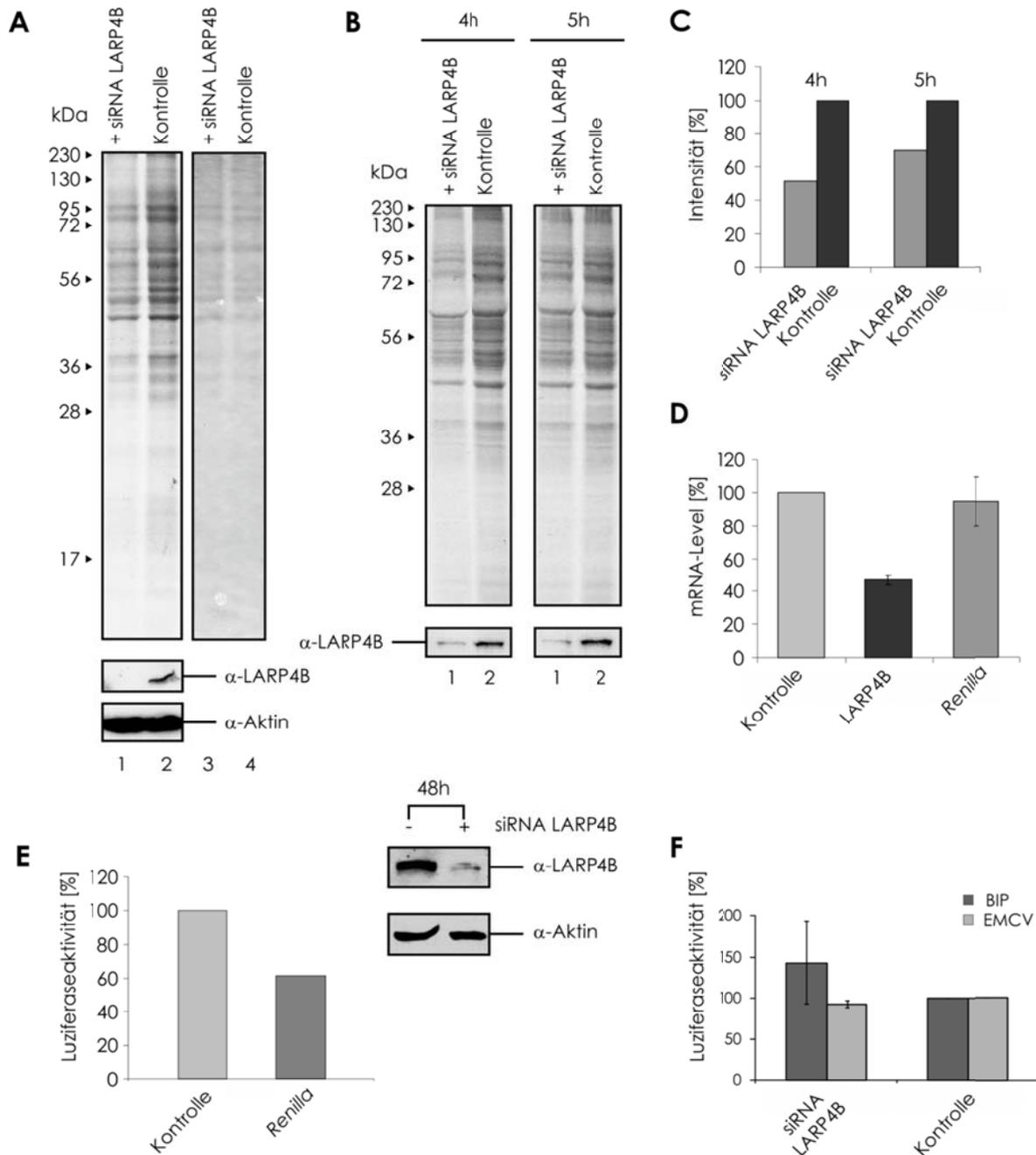


Abbildung 19. siRNA-induzierter Knockdown von LARP4B senkt die Translationsrate *in vivo*.

(A) HEK293-Zellen wurden mit einer siRNA gegen LARP4B transfiziert und 48 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von [³⁵S]-Methionin-enthaltendem Medium und 5-stündiger Inkubation wurden die Zellen geerntet und der Zellextrakt mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde durch Autoradiographie (Spuren 1 und 2) und Coomassiefärbung (Spuren 3 und 4) untersucht. Die Effizienz des siRNA-induzierten Knockdowns wurde mittels Western Blot analysiert (anti-LARP4B- und anti-Aktin-Antikörper). (B) Vergleich des globalen Translationslevel nach unterschiedlicher Inkubationsdauer in [³⁵S]-Methionin-enthaltendem Medium. (C) Translationslevel nach LARP4B-Knockdown und 4 bzw. 5 h Inkubation mit [³⁵S]-Methionin. (D) qRT-PCR Analyse des mRNA-Level von LARP4B (dunkelgrauer Balken) und *Renilla*-Luziferase (grauer Balken) in LARP4B-Knockdownzellen. (E) Einfluss des siRNA-induzierten LARP4B-Knockdowns auf *Renilla*-Luziferaseaktivität *in vivo*. Gezeigt ist die Luziferaseaktivität 48 h nach Transfektion der siRNA gegen LARP4B (pRL-TK, dunkelgrauer

Balken). (F) Effekt von LARP4B auf verschiedene IRES-abhängige Luziferasekonstrukte. Dargestellt ist der relative LARP4B-Einfluss auf die EMCV-IRES- (125) bzw. BIP-IRES-vermittelte (125) Luziferaseexpression 48 h nach Transfektion.

Es wurden zwei verschiedene IRES-Konstrukte getestet, welche unterschiedliche Initiationsfaktoren, jedoch nicht den eIF4F-Komplex benötigen: (a) EMCV-IRES (Encephalomyocarditis virus, IRES Typ II) (19, 75) oder (b) BIP-IRES (Homo sapiens, zelluläre IRES) (75, 143). Nach Cotransfektion der Reporter mit einer LARP4B-spezifischen siRNA in HEK293-Zellen wurden die unterschiedlichen Luziferaseaktivitäten 48 h später luminometrisch bestimmt und die Ratio der beiden Luziferasen gebildet. Somit ließ sich der relative Einfluss des LARP4B auf die IRES-vermittelte Genexpression im Verhältnis zur Cap-abhängigen Translation bestimmen. Für LARP4B konnte in diesem Experiment kein spezifischer Einfluss auf die IRES-induzierte Translation festgestellt werden (Abb. 19F), anders als beispielsweise bereits für La gezeigt (61, 63, 104, 125, 218, 219, 230). Dies lässt vermuten, dass LARP4B seine translationsstimulierende Funktion unabhängig von der Initiationsstruktur ausübt.

3.5.3 Die LARP4B vPAM2-MLLE-Interaktion hat keinen direkten Einfluss auf die Translationsrate

Nachdem in den vorangegangenen Experimenten eine charakteristische, N-terminale vPAM2-MLLE-Interaktion von LARP4B mit PABPC1 identifiziert werden konnte, sollte nun untersucht werden, inwiefern diese spezifische Assoziation Einfluss auf den translationsregulierenden Effekt von LARP4B vermittelt. Hierfür wurden zunächst Luziferasereporterplasmide mit einer vPAM2-Mutante (HA-LARP4B_{W(63)→K}), HA-LARP4B, oder ein Kontrollplasmid (pHA-Leervektor) in HEK293-Zellen cotransfiziert. Die Effizienz der Überexpressionen wurde durch Western Blot Analyse mit einem anti-HA-Antikörper nachgewiesen (Abb. 20A, Mitte) und die Expressionen der Luziferasen an einem Luminometer analysiert (Abb. 20A). Der translationsstimulierende Effekt des wildtypischen HA-LARP4B konnte erneut eindeutig gezeigt werden. Dabei entsprach die

Translationsrate der Luziferasereporter der des mutierten LARP4B-Konstruktes (Abb. 20A, rechts). Diese Daten deuten an, dass die Interaktion der vPAM2-Domäne von LARP4B mit der MLE-Domäne des PABPC1 nicht essentiell für die Funktion von LARP4B als Stimulator der Translation ist.

Wie bereits in Abschnitt 3.4. gezeigt, handelt es sich bei LARP4B um einen zytoplasmatischen Faktor, der nach zellulärer Stressinduktion in SGs akkumuliert (Abb. 16). Da die vPAM2-MLE-Interaktion nicht für die translationsstimulierende Funktion von LARP4B verantwortlich ist, wurde als nächstes untersucht, ob die vPAM2-MLE-Assoziation für die SG-Lokalisation von Bedeutung ist. Hierzu wurden im Folgenden, wie in 3.4. bereits beschrieben, Immunfluoreszenzexperimente unter Normal- oder Stressbedingungen durchgeführt. Es wurde entweder ein C-terminales LARP4B-Trunkat (d.h. ohne die vPAM2-Domäne, HA-LARP4B-RRML₄-Ct), eine vPAM2-Mutante (HA-LARP4B_{W(63)→K}) oder HA-LARP4B als Kontrolle transfiziert (schematische Darstellung siehe Abb. 20B oben) und deren Lokalisierung mit einem Antikörper gegen den N-terminalen HA-Tag ermittelt. Als SG-Markerprotein wurde FMRP verwendet. Unter Normalbedingungen konnte für alle verwendeten LARP4B-Konstrukte eine prädominant zytoplasmatische Lokalisierung nachgewiesen werden (Abb. 20B, a-e, k-o, u-y). Nach Arsen-vermittelter SG-Ausbildung zeigte sich zudem für alle verwendeten Konstrukte eine perfekte Colokalisation mit FMRP (Abb. 20B, f-j, p-t, z-d'). Somit ist die vPAM2-Domäne von LARP4B und deren MLE-Interaktion nicht essentiell für seine zelluläre Verteilung, da die CTD von LARP4B für eine effiziente Akkumulation in SG ausreicht. Vielmehr wird vermutet, dass die C-terminale Interaktion von LARP4B mit Faktoren der Translationsmaschinerie für die Funktionalität des Proteins von entscheidender Bedeutung ist.

Ergebnisse

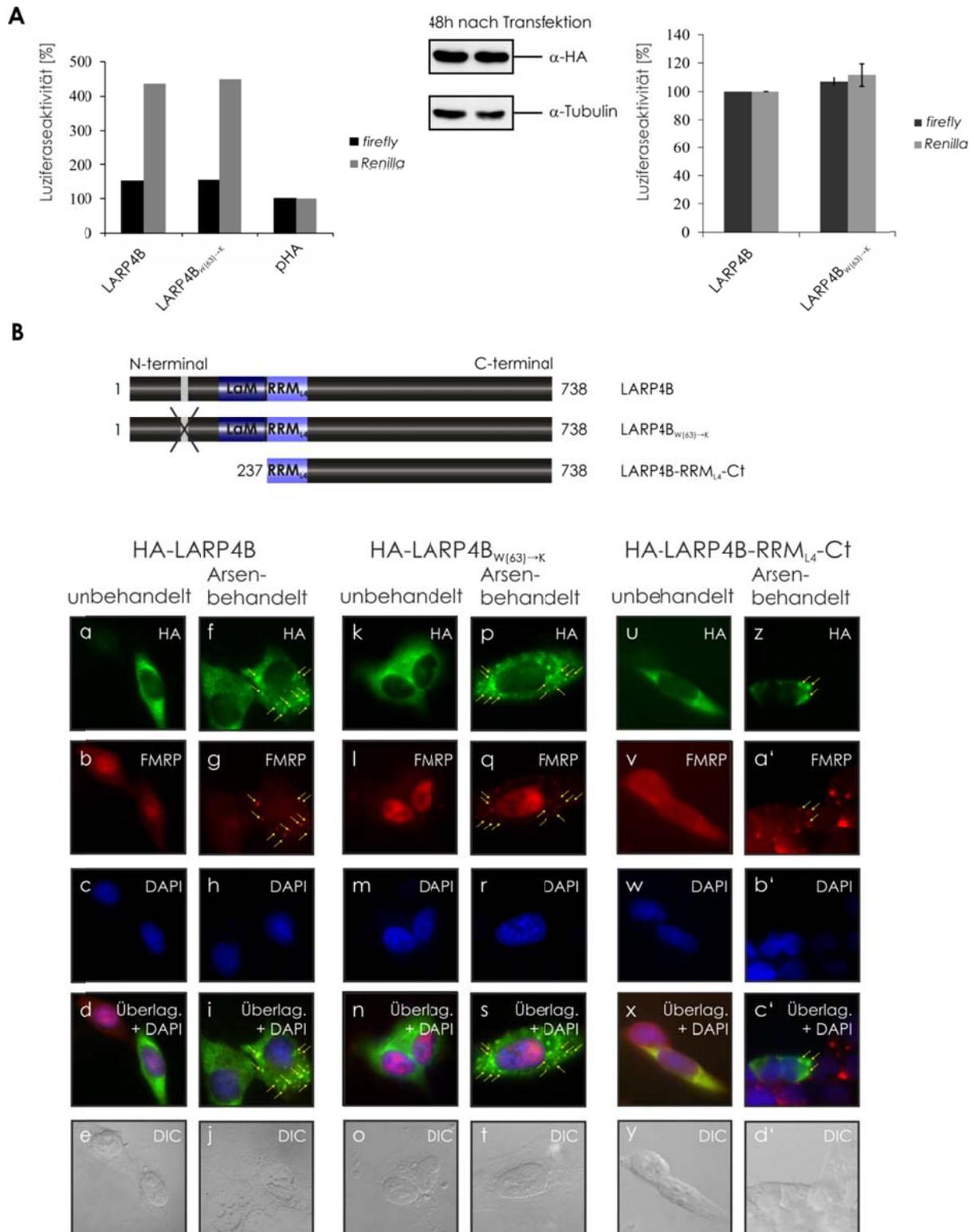


Abbildung 20. Die vPAM2-MLE-Interaktion hat keinen direkten Einfluss auf den translationsstimulierenden Effekt von LARP4B.

(A) HA-LARP4B, HA-LARP4B_{W(63)→K} oder pHA-Leervektor wurden in HEK293-Zellen transfiziert und die Luciferaseaktivitäten bestimmt. Dargestellt sind die *firefly*- (pGL3, schwarze Balken) und *Renilla*- (pRL-TK, graue Balken) Luciferaseaktivitäten relativ zu einer Kontrolle 48 Stunden nach Transfektion (linkes Diagramm). Alle Daten wurden nach Bradford normalisiert. Rechtes

Diagramm: Luziferaseaktivitäten der LARP4B-Mutante relativ zum Wildtyp-Protein. (B) Oberer Bereich: Schematische Darstellung der für die Immunfluoreszenz verwendeten LARP4B-Konstrukte. Untere Abbildung: Immunfluoreszenzen verschiedener transfizierter LARP4B-Konstrukte in HeLa-Zellen unter Verwendung von Antikörpern gegen HA und FMRP als SG-Marker. Die Zellen waren entweder unbehandelt (a-e, k-o und u-y) oder Arsen-behandelt (f-j, p-t und z-d'). SGs sind mit gelben Pfeilen gekennzeichnet.

3.6. Biochemischer und funktioneller Vergleich der humanen LARPs 1 und 4B

Parallel zu den in dieser Arbeit vorgestellten Studien zu LARP4B wurde durch Burrows et al. LARP1 charakterisiert. Hierbei stellte sich heraus, dass es ähnlich wie LARP4B mit PABPC1 interagiert und eine Cosedimentation mit 80S-Ribosomen und Polysomen aufweist (38). Es stellte sich daher die Frage, ob beide Proteine teilweise redundante Funktionen erfüllen oder ob sie in unterschiedlichen Phasen der Translation agieren.

3.6.1. LARP4B und LARP1 weisen vergleichbare Interaktionen und zelluläre Lokalisationen auf

Zunächst wurde durch Verwendung eines LARP1-spezifischen Antikörpers eine Copräzipitation von LARP1 in den LARP4B-Immunpräzipitationsexperimenten bestätigt (Abb. 9B-C). Zudem gelang es LARP1, wie bereits LARP4B, als Bestandteil zellulärer mRNP-Komplexe zu identifizieren (Abb. 10A). In einem 5-45 % Saccharose-Gradienten konnte außerdem die 80S- bzw. Polysomen-Assoziation von LARP1 nachgewiesen werden, wobei für LARP1 und LARP4B ein nahezu identisches Sedimentationsverhalten gefunden wurde (Abb. 21A, Spuren A, B). In weiteren Sedimentationsanalysen EDTA-behandelter Extrakte konnte ferner gezeigt werden, dass LARP1 wie LARP4B mit der 40S ribosomalen Untereinheit sedimentiert (Abb. 21B, Spur A, B). LARP1 und LARP4B scheinen demnach Bestandteile Ribosomen-assoziiierter mRNPs zu sein wobei beide Faktoren prädominant mit der 40S ribosomalen Untereinheit interagieren.

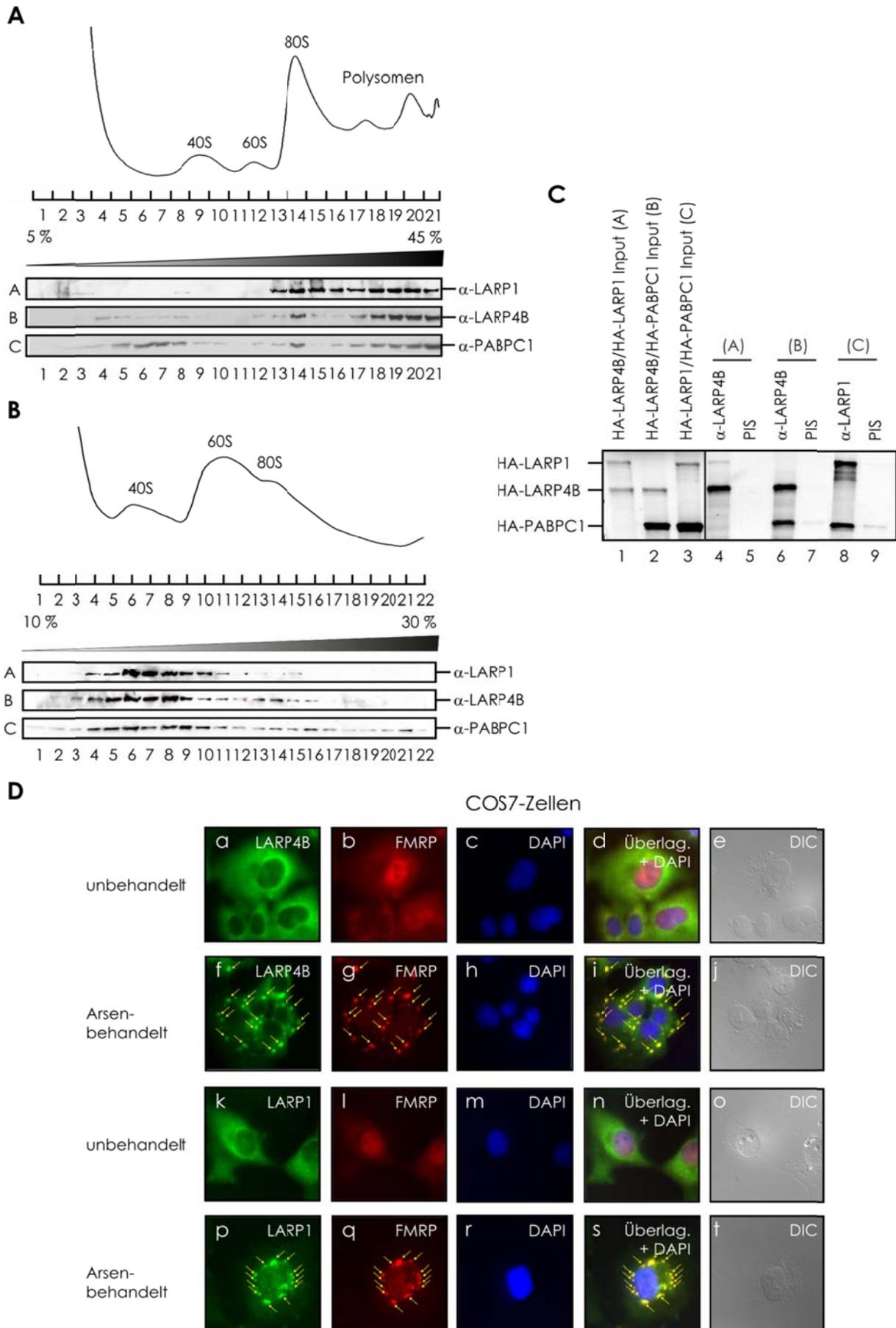


Abbildung 21. LARP1 und LARP4B weisen identische Interaktionen und Lokalisationen auf.

(A) 5-45 % Saccharose-Gradient von Cycloheximid-behandeltem HeLa-Zellextrakt. Dargestellt sind die Western Blot Analysen der einzelnen Gradientenfraktionen mit Antikörpern gegen LARP4B, LARP1 und PABPC1 (Spuren A-C). (B) 10-30 % Saccharose-Gradient eines EDTA-behandelten HeLa-Extraktes. Die einzelnen Gradientenfraktionen wurden mittels Western Blot mit Antikörpern gegen LARP4B, LARP1 und PABPC1 analysiert (Spuren A-C). (C) Immunpräzipitation von *in vitro* cotranslatiertem, [³⁵S]-Methionin markiertem HA-LARP4B/HA-LARP1 (Spuren 4, 5), HA-LARP4B/HA-PABPC1 (Spuren 6, 7) oder HA-LARP1/HA-PABPC1 (Spuren 8, 9) mit an GST immobilisierten Antikörpern gegen LARP4B (Spuren 4, 6), LARP1 (Spur 8) oder einem PIS (Spuren 5, 7 und 9). Spuren 1-3: 5 % der jeweils eingesetzten [³⁵S]-Methionin-markierten *in vitro* Translate. (D) Immunfluoreszenz von unbehandelten COS7-Zellen (a-e, k-o) und Arsen-behandelten COS7-Zellen (f-j, p-t) mit anti-LARP1-, anti-LARP4B- oder anti-FMRP-Antikörpern als SG-Markerprotein. SGs sind durch gelbe Pfeile gekennzeichnet.

Eine PABPC1-Bindung wurde mit der vorliegenden Arbeit bislang lediglich für LARP4B zweifelsfrei nachgewiesen (Abb. 12A). Daher sollte untersucht werden, ob auch für LARP1 eine PABPC1-Assoziation existiert und ob eine Interaktion der beiden LARPs untereinander besteht. Hierzu wurden HA-LARP4B/HA-LARP1, HA-LARP4B/HA-PABPC1 bzw. HA-PABPC1/HA-LARP1 *in vitro* cotranslatiert und mit [³⁵S]-Methionin markiert. Die *in vitro* Translate wurden daraufhin unter Verwendung eines anti-LARP4B- bzw. anti-LARP1-Antikörpers immunpräzipitiert. Nach Auftrennung über SDS-PAGE wurden gebundene Faktoren autoradiographisch analysiert (Abb. 21 C). Ein PIS wurde als Kontrolle unspezifischer Präzipitationen verwendet (Abb. 21 C; Spuren 5, 7, 9). Für beide LARPs konnte die PABPC1-Bindung bestätigt werden (Abb. 21 C, Spuren 6 und 8). Eine Interaktion von LARP4B mit LARP1 wurde jedoch nicht gefunden (Abb. 21 C, Spur 4). Somit scheinen LARP4B und LARP1 voneinander unabhängig mit PABPC1 zu assoziieren.

In weiteren Experimenten sollte die zelluläre Lokalisation von LARP1 unter Normal- und Stressbedingungen mit den gefundenen LARP4B-Daten verglichen werden. Hierzu wurden spezifische Antikörper gegen LARP1 (Abb. 21D, k, p) oder LARP4B als Kontrolle (Abb. 21D, a, f) in Immunfluoreszenzexperimenten verwendet. Als SG-Markerprotein diene FMRP (Abb. 21D, b, g, l, q). In den unbehandelten Zellen wurden erwartungsgemäß LARP1 und LARP4B prädominant im Zytoplasma detektiert

(Abb. 21 D, a-e und k-o). Interessanterweise translokalisierte LARP1 ebenso wie LARP4B durch eine Arsen-vermittelte Stressinduktion in SGs (Abb. 21 D, p-t).

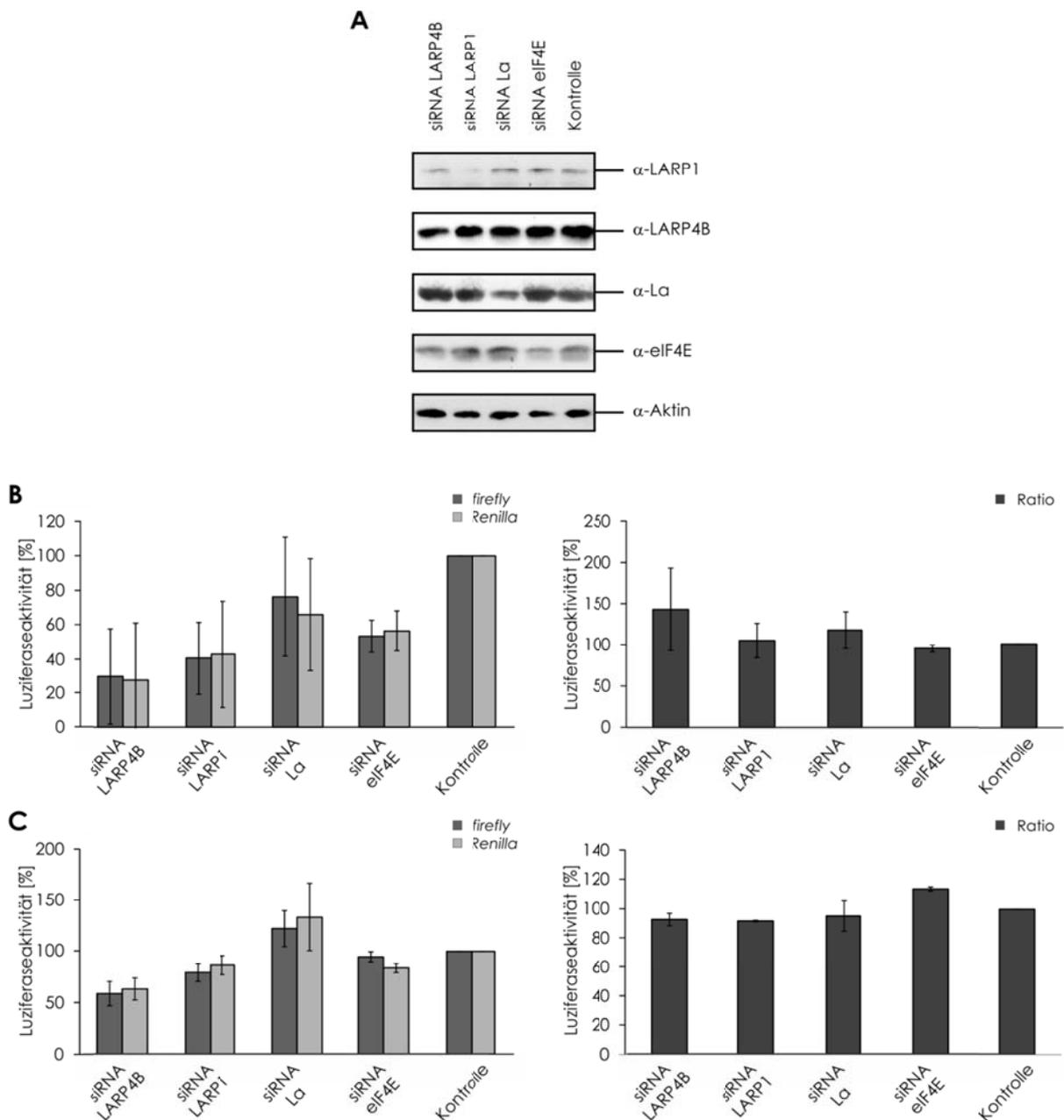


Abbildung 22. LARP1 und LARP4B weisen keine spezifischen IRES-Regulationen auf.

(A) Einfluss des siRNA-induzierten LARP4B- bzw. LARP1-Knockdowns auf Luziferaseaktivität *in vivo* 48 h nach Transfektion der siRNA (pGL3, hellgraue Balken; pRL-TK, dunkelgraue Balken). (B) Effekt von LARP4B und LARP1 auf verschiedene IRES-abhängige Luziferasekonstrukte. Dargestellt ist der relative Einfluss von LARP4B bzw. LARP1 auf eine EMCV-IRES- (125) bzw. BIP-IRES-vermittelte (125) Luziferaseexpression 48 h nach Transfektion.

Somit konnte gezeigt werden, dass LARP1 und LARP4B offensichtlich einen gemeinsamen Satz an Bindungspartnern besitzen. Es wurde daher vermutet,

dass LARP1, ähnlich wie LARP4B, eine Funktion in der Regulation der Translation ausüben könnte. Diese Hypothese wurde durch Burrows et al. untermauert, welche einen translationsstimulierenden Effekt von LARP1 auf die globale Translationsrate nachweisen konnten (38). Diese war allerdings nicht so stark ausgeprägt wie im Fall von LARP4B. Um die beiden Proteine direkt funktionell zu vergleichen, wurde der Einfluss auf Luziferasereporter untersucht (vgl. Abschnitt 3.5.2.). In Übereinstimmung mit den veröffentlichten Daten führte eine Senkung des LARP1-Expressionslevels zur Inhibition der Luziferasetranslation (Abb. 22B-C linke Diagramme). Interessanterweise hatte weder die reduzierte Expression von LARP1 noch von LARP4B einen messbaren Einfluss auf die IRES-vermittelte Translation zweier Reporterplasmide (BIP-IRES, Abb. 22B, rechts; EMCV-IRES, Abb. 22C, rechts). Diese Daten sind konsistent mit der Annahme, dass beide Proteine die Translation möglicherweise unabhängig von der Initiationsstruktur und somit eher durch die Assoziation mit 80S-Komplexen beeinflussen.

3.6.2. LARP4B und LARP1 beeinflussen unterschiedliche Translationsphasen

Die vorangegangenen Studien haben Gemeinsamkeiten bezüglich einiger Bindungspartner und der Funktion von LARP4B und LARP1 aufgezeigt. Es stellte sich daher als nächstes die Frage, inwiefern beide Proteine in der Tat redundante Funktionen in der Translationsregulation ausüben. Um dies zu klären, wurde der Einfluss der beiden Faktoren auf die Translationszustände untersucht. Hierfür wurden zunächst Sedimentationsanalysen LARP4B-, LARP1- bzw. RACK1-defizienter Extrakte durchgeführt und die individuellen Ribosomenverteilungen anhand der A_{260} -Profile analysiert (Abb. 23A).

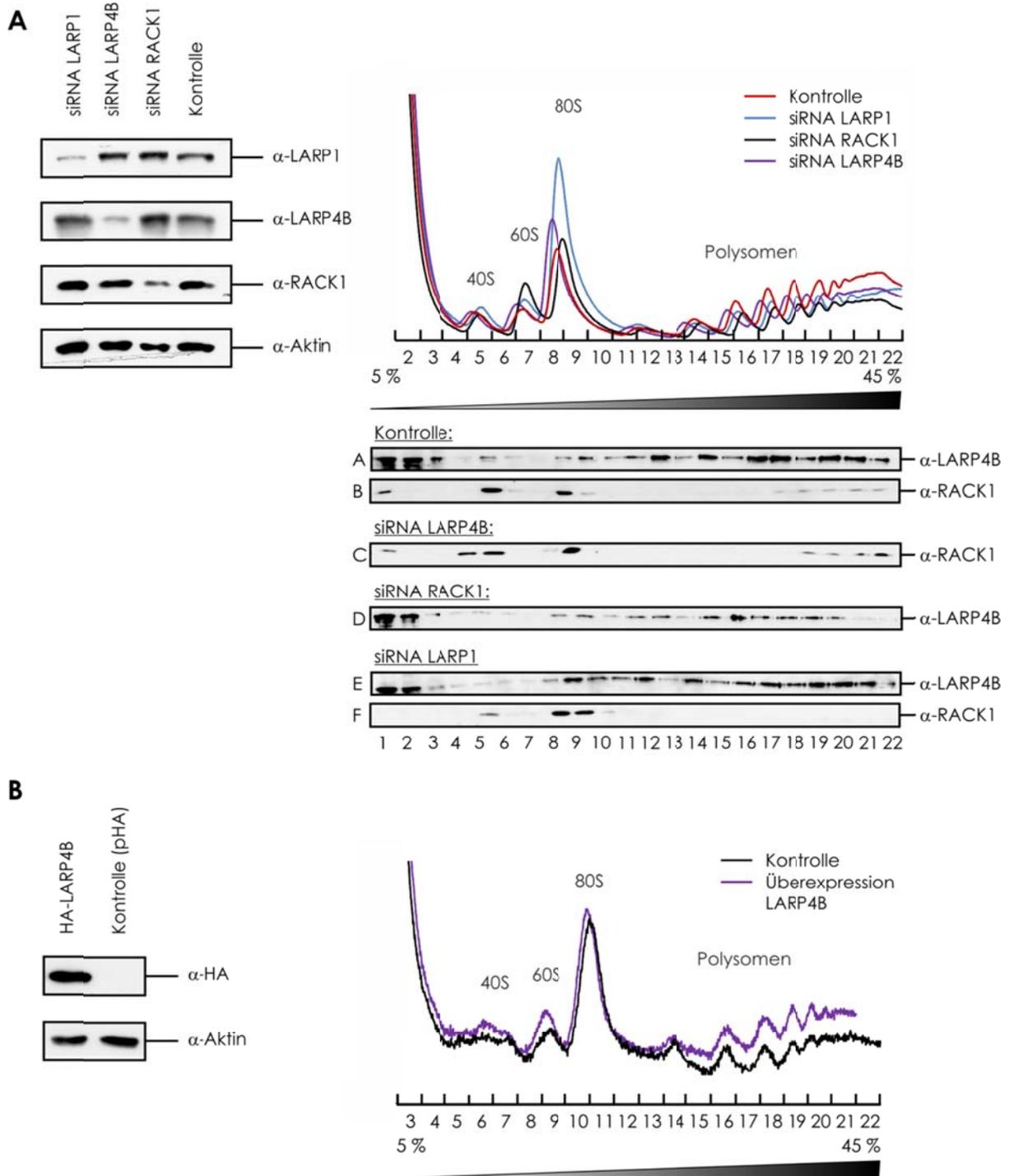


Abbildung 23. RACK1, LARP1 und LARP4B beeinflussen unterschiedliche Translationsphasen.

(A) HEK293-Zellen wurden mit siRNAs gegen RACK1, LARP1 oder LARP4B transfiziert und 48 h inkubiert. Die Extrakte wurden Cycloheximid-behandelt, nach Bradford normalisiert und in einem 5-45 % Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Western Blot mit anti-LARP4B- und anti-RACK1-Antikörpern analysiert (rechte Abbildung, Spuren A-F). Die A_{260} -RNA-Profile sind im oberen Teil dargestellt (Kontrolle: rot; siRNA LARP1: blau; siRNA LARP4B: lila; siRNA RACK1: schwarz). Links: Western Blot Analyse zur Knockdownkontrolle mit Antikörpern gegen LARP1, LARP4B, RACK1 und Aktin. (B) 5-45 % Saccharose-Gradienten eines unbehandelten bzw. HA-LARP4B transfizierten HEK293-Zellextraktes. Gezeigt sind die A_{260} -RNA-Profile (Kontrolle: schwarz; HA-LARP4B: lila).

Eine Gegenüberstellung der für LARP1 und LARP4B gefundenen Interaktionen und Funktionen ist in Abbildung 24 zusammengefasst.

3.7. RNA-Bindungsstudien von LARP4B

3.7.1. LARP4B bindet spezifisch (U)-reiche RNA-Sequenzen

Sowohl La als auch LARP7 binden über ihr LaM spezifisch Oligo (U)-reiche Sequenzen unterschiedlicher RNAs (65, 74, 157, 159, 177, 200, 226). Auch die anderen LARPs stellen auf Grund des konservierten La Moduls potentiell RNA-bindende Proteine dar. So konnte bereits für LARP6 dessen Bindung an die Oligo (U)-Sequenz der $\alpha 1$ Collagen mRNA gezeigt werden (39, 40). *In vitro* Bindungsstudien mit LARP1 deuten hingegen auf eine bevorzugte Interaktion des Proteins mit Oligo (U)- und Oligo (G)-reichen RNA-Sequenzen hin (176). Diese Daten sind möglicherweise durch den Verlust der klassischen RRM des La Moduls zu erklären (33).

Da sich die RNA-Bindetasche des LaM der LARP4-Familie im Vergleich zu La oder anderen LARPs deutlich unterscheidet, sollte im Zuge dieser Arbeit geklärt werden, ob LARP4B direkt an RNA bindet und ob hierbei bevorzugte Sequenzmotive existieren. Für folgende Elektrophoretische-Mobilitäts-Shift-Assays (EMSA) wurde daher zunächst rekombinantes GST-LARP4B exprimiert und der GST-Fusionsteil durch Protease-Verdau entfernt (Abb. 25A). Definierte Mengen des rekombinanten Proteins wurden mit unterschiedlichen, [³²P]-markierten RNA- bzw. DNA-Oligos inkubiert. Die Ansätze wurden daraufhin über native RNA-Gelelektrophorese separiert und autoradiographisch untersucht (Abb. 25B).

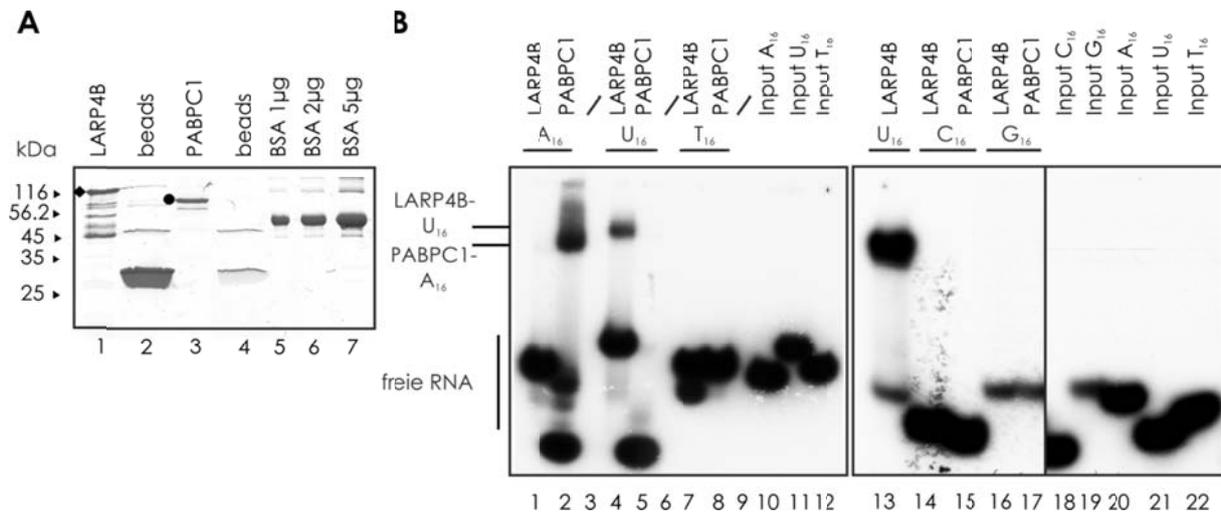


Abbildung 25. LARP4B bindet (U)-reiche RNA-Sequenzen.

(A) GST-LARP4B und GST-PABPC1 wurden in *E. coli* BL21 rosetta pLys exprimiert und mittels Gluthation-Sepharose aufgereinigt (124). Gebundene Fusionsproteine wurden mittels PreScissionprotease (PSP) von der Gluthation-Sepharose geschnitten und eine Probe über SDS-PAGE analysiert (Spuren 1 und 3). Spuren 2 und 4: Gluthation-Sepharose nach Proteaseverdau. BSA diente der Konzentrationsbestimmung (Spuren 5-7). (♦) LARP4B; (●) PABPC1. (B) Native RNA-Gelelektrophorese verschiedener [³²P]-markierter RNA- bzw. ssDNA-Oligos nach Inkubation mit LARP4B (Spuren 1, 4, 7, 13, 14, 16) oder PABPC1 (Spuren 2, 5, 8, 15, 17). Spuren 10-12 und 18-22: 100 % Input der Oligos.

Für die EMSA-Untersuchungen wurden 16 Nukleotide lange, [³²P]-markierte Oligo (U)-, (G)-, (C)- und (A)-RNA-Sequenzen verwendet, sowie ein Oligo (T)-ssDNA-Fragment (Abb. 25B). PABPC1 wurde als Kontrolle eingesetzt (Abb. 25B Spuren 2, 5, 8, 15, 17) (124). Während für PABPC1 erwartungsgemäß eine Bindung an Oligo (A)-RNA gezeigt werden konnte (Abb. 25B, Spur 2), komplexierte LARP4B ausschließlich das Oligo (U)-RNA-Fragment (Abb. 25B, Spuren 4, 13). Auch eine Vorbehandlung des rekombinanten LARP4B mit Micrococcusnuclease führte nicht zum Verlust der RNA-Bindung, wodurch eine mögliche Nukleotidverunreinigung während der Aufreinigung des Proteins ausgeschlossen ist (Daten nicht abgebildet). LARP4B ist demnach in der Lage, spezifisch Oligo (U)-reiche RNA-Sequenzen zu binden und zeigt somit eine zu La, LARP6 und 7 ähnliche RNA-Bindungsaffinität.

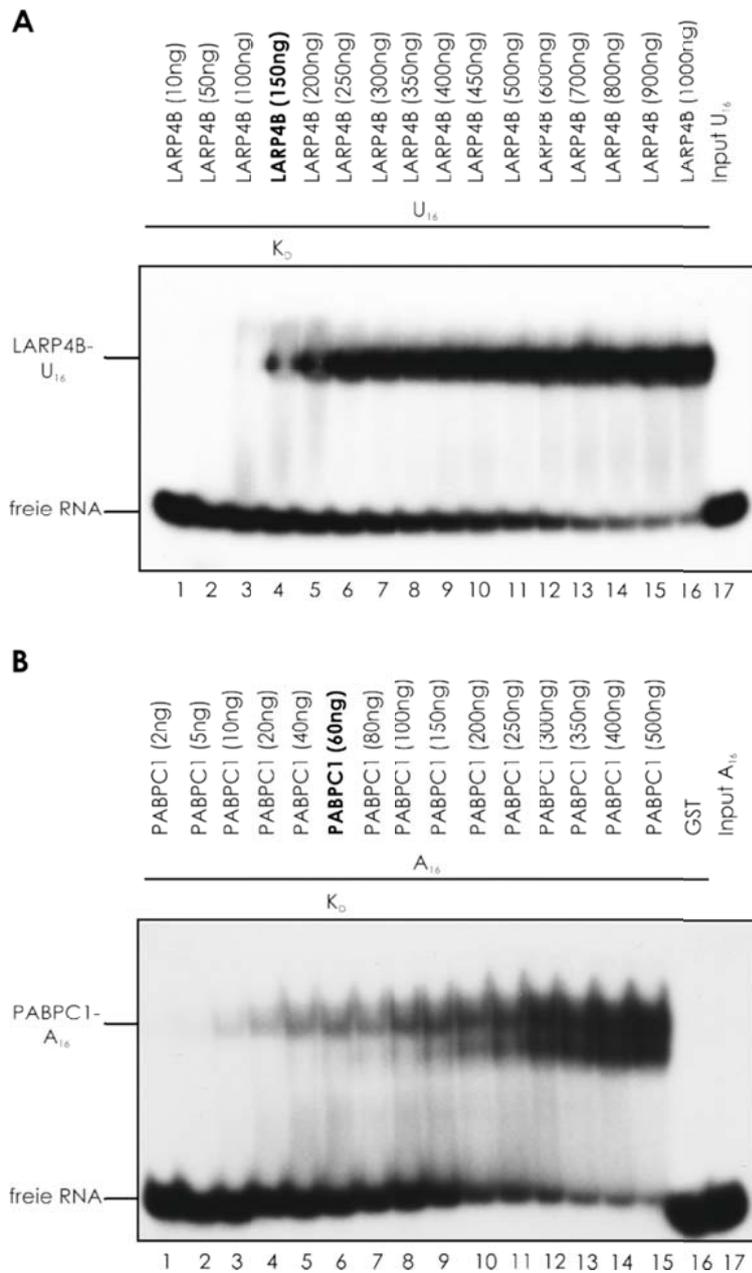


Abbildung 26. Die Bindung von LARP4B an RNA-Oligo (U) ist konzentrationsabhängig.

(A) Native RNA-Gel-elektrophorese von ³²P-markiertem RNA-Oligo (U) nach Inkubation mit unterschiedlichen Mengen an LARP4B (Spuren 1-16). Spur 17: 100 % RNA-Oligo (U) Input. (B) EMSA präinkubierter ³²P-markierter Oligo (A)-RNA mit verschiedenen PABPC1-Konzentrationen (Spuren 1-15). Spur 16: Kontrolle; Spur 17: 100 % RNA-Oligo (A) Input. Die zum K_D gehörigen Proteinnengen sind fett hervorgehoben. RNA-Protein-Komplexe wurden durch Autoradiographie detektiert.

Durch Titrationsexperimente mit steigender Proteinkonzentration konnte im Folgenden ein K_D-Wert für die LARP4B-Oligo (U)-Interaktion von 150 ng bestimmt werden (Abb. 26A, Spur 4). Im Vergleich hierzu lag der K_D der PABPC1-Oligo (A)-Bindung bei lediglich 60 ng (Abb. 26B, Spur 6) (124). Ab einer Zugabe von 100 ng PABPC1 konnte zudem eine „Mehrfachkomplexierung“ des RNA-Oligo (A)-Fragmentes detektiert werden (Abb. 26B, Spuren 8-15). LARP4B bindet demnach konzentrationsabhängig an Oligo (U)-reiche Sequenzen. Allerdings konnten bereits nach einer Zugabe

von 0,5 µg Heparin (als Spezifitätskontrolle) deutlich geringere Mengen des LARP4B-Oligo (U)-Komplexes detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Dieser Befund, sowie die im Vergleich zu PABPC1 schwächere RNA-Bindung, ist möglicherweise auf die „Natur“ des verwendeten RNA-Fragmentes zurückzuführen. So entspricht das eingesetzte Oligo (A)-Fragment annähernd der natürlichen PABPC1-Zielsequenz, während das zelluläre LARP4B-Bindemotiv lediglich „vergleichbar“ mit dem eingesetzten Oligo (U)-Fragment sein könnte. Zur Bestimmung der kinetischen und thermodynamischen Eigenschaften der LARP4B-Oligo (U)-Interaktion wurden außerdem unterschiedliche Inkubationsbedingungen getestet (Daten nicht abgebildet). Hierbei zeigte sich, dass bereits nach 30 min Inkubation bei 0 °C eine vollständige Komplexierung der RNA mit LARP4B vorliegt. Eine konstante Inkubation bei 30 °C führte hingegen zu keinerlei Bindung. Eine Temperaturerhöhung auf 30 °C nach Inkubation auf Eis führte des Weiteren nicht zum Verlust des gebildeten LARP4B-Oligo (U)-Komplexes.

Durch Kompetitionsanalysen sollte zudem die Bindungsaffinität von LARP4B zu RNA-Oligo (U)-Sequenzen näher untersucht werden. In einem ersten Experiment wurde rekombinantes LARP4B mit verschiedenen Mengen an unmarkiertem RNA-Oligo (A) präinkubiert, die Reaktionsansätze mit konstanten Mengen [³²P]-markiertem RNA-Oligo (U) versetzt und gebildete LARP4B-Oligo (U)-Komplexe autoradiographisch analysiert (Abb. 27, Spuren 2-6). Bei steigenden RNA-Oligo (A)-Konzentrationen wurde eine geringere Menge an gebildetem LARP4B-Komplex detektiert. Es erfolgt offensichtlich bevorzugt die Oligo (A/U)-Doppelstrangbildung, wobei LARP4B nicht in der Lage ist diese Doppelstränge zu trennen oder zu binden. LARP4B bindet demnach spezifisch einzelsträngige Oligo (U)-reiche Sequenzen.

In einem weiteren Ansatz wurde rekombinantes LARP4B-Protein mit steigenden Mengen an unmarkiertem RNA-Oligo (U) präinkubiert und daraufhin konstante Mengen an [³²P]-markiertem RNA-Oligo (U) zugegeben. Gebildete Komplexe wurden mittels Autoradiographie analysiert (Abb. 27,

Spuren 7-11). Es konnte gezeigt werden, dass kein nachträglicher Einbau der radioaktiven RNA vorlag und somit keine Dissoziation der zuvor bereits gebildeten LARP4B-Komplexe mit unmarkiertem RNA-Oligo (U) stattfindet.

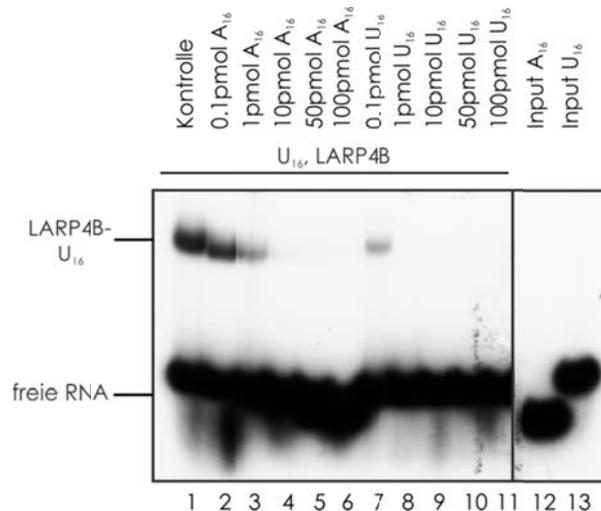


Abbildung 27. Untersuchung der Bindungsaffinität von LARP4B zu RNA-Oligo (U).

Rekombinantes LARP4B wurde mit unterschiedlichen Mengen an unmarkiertem RNA-Oligo (A) (Spuren 2-6) bzw. Oligo (U) (Spuren 7-11) präinkubiert, [³²P]-markiertes RNA-Oligo (U) zugegeben und erneut inkubiert. Gezeigt ist der EMSA der Kompetitionsstudie. Spuren 12 und 13: 100 % der eingesetzten RNA. Gebildete RNA-Protein-Komplexe wurden durch Autoradiographie ermittelt.

3.7.2. Isolierung eines LARP4B-RNA-Bindemotivs durch CLIP

Die unter 3.7.1. vorgestellten Experimente zeigen deutlich, dass LARP4B prinzipiell mit (U)-haltigen RNA-Sequenzen interagieren kann. Auf Grund dieses Befundes zusammen mit den funktionellen Daten, welche eine Rolle von LARP4B in der Translation zeigen, sollten daher zelluläre RNAs identifiziert werden welche, mit LARP4B *in vivo* assoziieren. Eine Methode, die eine Identifizierung von RNA-Zielmolekülen unter *in vivo* Bedingungen erlaubt, ist der sogenannte Crosslinking and immunprecipitation Assay (CLIP Assay) (244, 245). Bei diesem werden Protein-RNA-Komplexe durch UV-Bestrahlung *in vivo* kovalent verknüpft und gezielt interagierende Protein-RNA-Sequenzen isoliert. Diese Komplexe können daraufhin durch die Verwendung proteinspezifischer Antikörper immunpräzipitiert werden. Gebundenen RNA-Fragmente werden radioaktiv markiert, aufgereinigt und mit RNA-Linkern

verknüpft. Nach Amplifikation mit adapterspezifischen Primern kann schließlich durch Sequenzierung der Bereich der RNA bestimmt werden, der sich zuvor crosslinken ließ. In Abbildung 28 ist eine schematische Darstellung des CLIP Assays gezeigt.

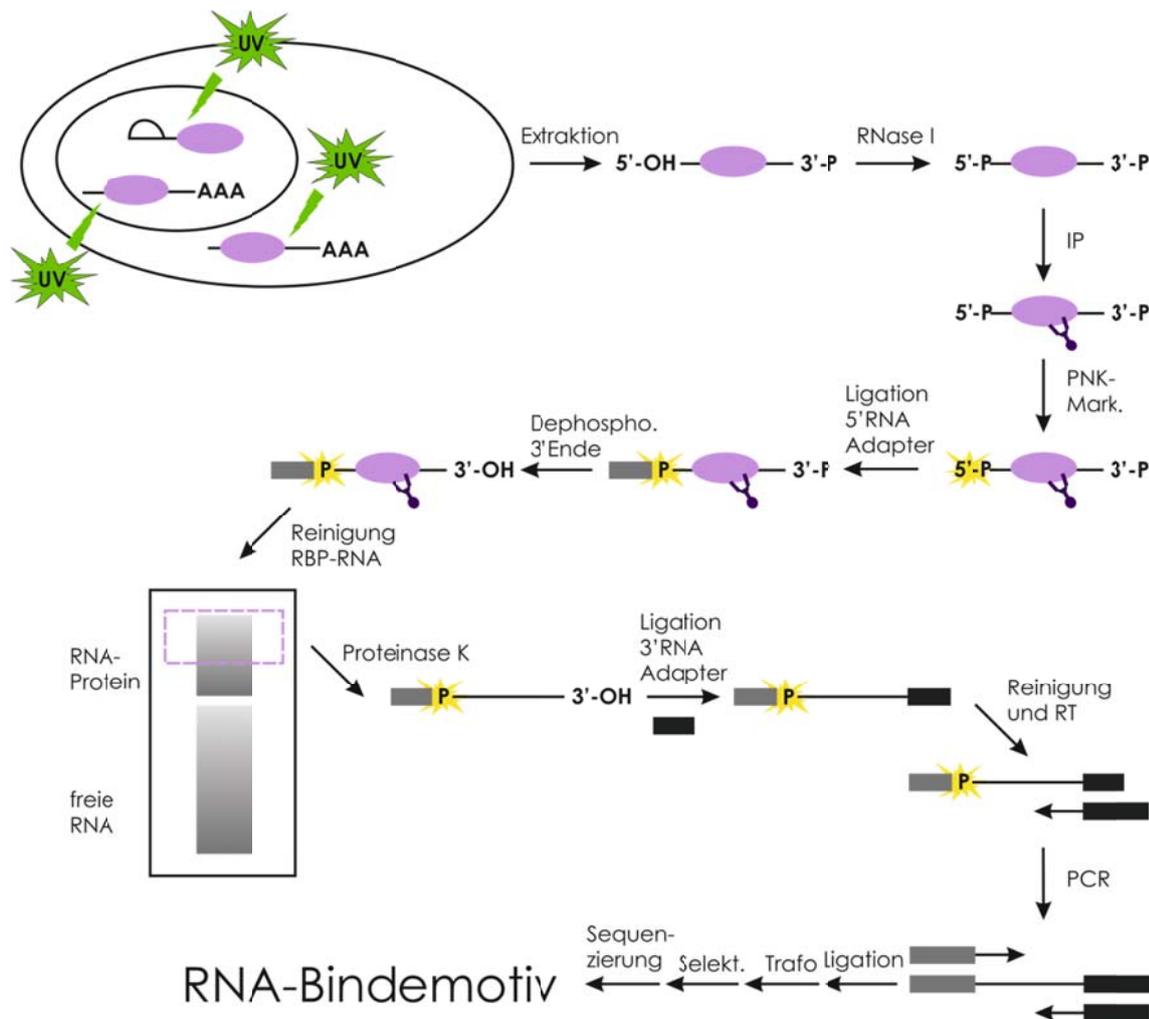


Abbildung 28. Crosslinking and immunoprecipitation Assay (CLIP Assay).

Schematische Darstellung eines CLIP Assays. Nach *in vivo* Crosslink von RNA-Protein-Interaktionen und partiellem RNase-Verdau wird der zu untersuchende Faktor mittels IP als RNP isoliert. Nach PNK-Markierung mit $[^{32}\text{P}]\text{-}\gamma\text{ATP}$ und 5'-Linkerligation werden vorhandene RNA-Protein-Komplexe elektrophoretisch aufgetrennt und isoliert. Durch Ligation des 3'-Adapters und Klonierung kann das gesuchte RNA-Bindemotiv mittels Sequenzierung ermittelt werden.

Zur Isolierung der LARP4B-Komplexe dienten entweder induzierte FlpTREx-LARP4B oder endogene HEK293-Zellen. Parallel wurde zur Kontrolle der Methode überexprimiertes HA-LARP7 gecrosslinkt und immunpräzipitiert, da für dieses eine spezifische 7SK-Bindung bereits bekannt ist (157). Gebundene RNA wurde nach der IP [³²P]-markiert. Um nachträgliche Hydrolyse der RNA zu vermeiden, wurden die Präzipitate mittels pH-neutraler NOVEX-Gelelektrophorese separiert und die Effizienzen der IPs durch Silberfärbung (Abb. 29A) und Western Blot Analyse ermittelt (Abb. 29B, unterer Teil). Die durch NOVEX separierten Proteinkomplexe wurden elektrophoretisch auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und gebundene RNA autoradiographisch detektiert (Abb. 29B, oberer Teil). Durch die vorangegangene RNase-Behandlung wurde ein radioaktiver „Schmierbereich“ entsprechend der Proteinmasse detektiert, aus welchem die RNA schließlich isoliert werden konnte. Im Fall von LARP4B entsprach dies einer Höhe von ca. 110 kDa. Für die HA-LARP7-Kontrolle wurde keine RNase-Behandlung durchgeführt, da hier nicht die direkte Bindesequenz isoliert, sondern lediglich die Funktionalität des Experiments nachgewiesen werden sollte. Daher fand sich für LARP7 eine definierte Bande im Autoradiogramm (Abb. 29C). Zur Kontrolle der Effizienz der RNA-Isolierung wurde die LARP7 gebundene 7SK RNA durch PCR amplifiziert (Abb. 29D). Somit konnte gezeigt werden, dass sowohl der *in vivo* UV-Crosslink, die Immunpräzipitation, als auch die RNA-Isolierung aus der Membran gelungen war, womit die Grundlage für eine folgende Bestimmung der *in vivo* RNA-Bindesequenz von LARP4B geschaffen ist.

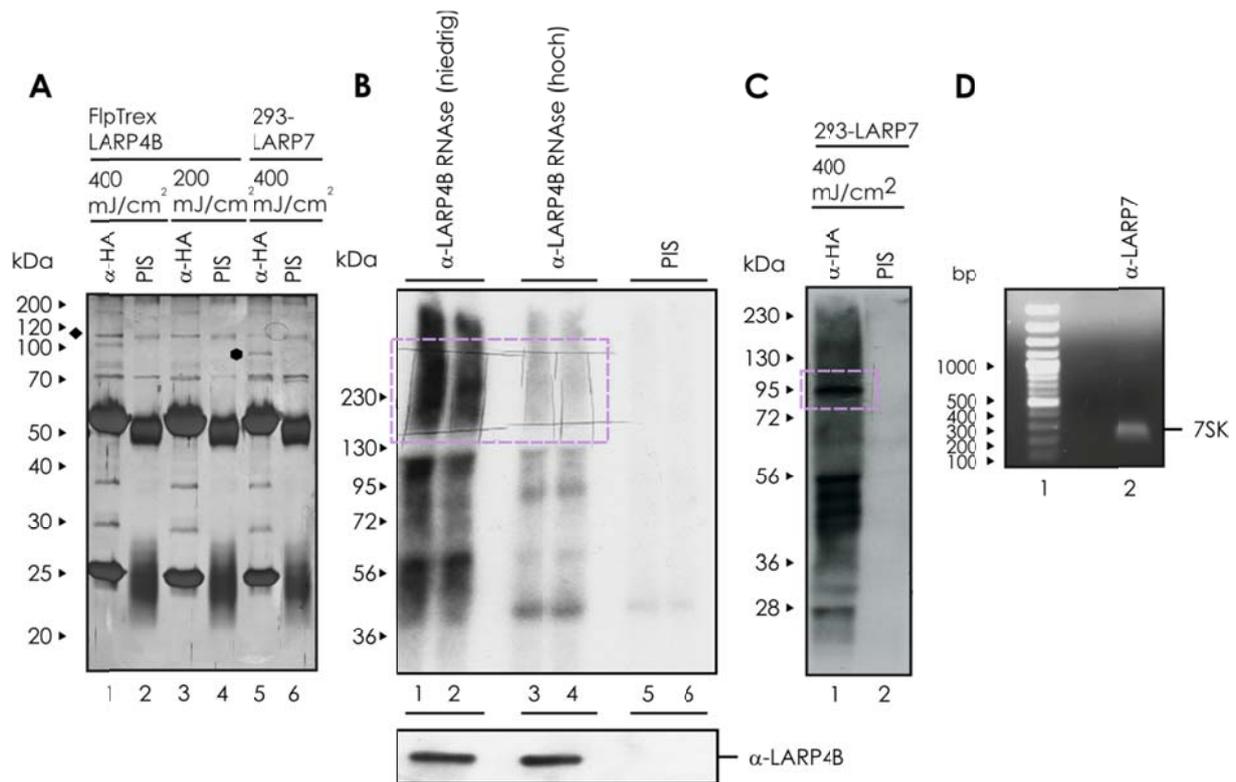


Abbildung 29. Identifizierung der endogenen Ziel-RNA-Sequenz von LARP4B mittels CLIP.

(A) Induzierte FlpTrex-LARP4B oder HA-LARP7 transfizierte HEK293-Zellen wurden UV-Strahlung ausgesetzt (200 bzw. 400 mJ/cm²) und lysiert. Nach Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen HA (Spuren 1, 3, 5) oder einem PIS (Spuren 2, 4, 6) wurden gebundene Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. (B) Nach UV-Crosslink von HEK293-Zellen *in vivo* wurden diese lysiert und RNase I-behandelt. Mit einem Antikörper gegen LARP4B wurden LARP4B-RNPs immunpräzipitiert (Spuren 1-4), gebundene RNAs PNK-markiert und die Komplexe über NOVEX-Gelelektrophorese aufgetrennt. RNPs wurden mittels Western Blot auf eine Nitrozellulosemembran überführt und autoradiographisch untersucht (obere Abbildung). Zu untersuchende Bereiche wurden ausgeschnitten (lila markiert) und mit Proteinase K verdaut. Spuren 5, 6: PIS Kontrollen. Western Blot Analysen der IPs sind im unteren Teil dargestellt. (C) Zu sehen ist die autoradiographische Analyse der Nitrozellulosemembran. LARP7 transfizierte HEK293-Zellen wurden *in vivo* gecrosslinkt, immunpräzipitiert (ohne RNase-Behandlung; Spur 1: Antikörper gegen HA), PNK-markiert und elektrophoretisch aufgetrennt (NOVEX). Lila dargestellte Bereiche wurden ausgeschnitten und weiterverarbeitet. Spur 2: PIS Kontrolle. (D) Die aus Abbildungsteil C isolierte RNA wurde durch RT-PCR mit spezifischen Primern als 7SK RNA identifiziert.

4. Diskussion

Bezogen sich funktionelle Studien bislang hauptsächlich auf das ursprüngliche La Autoantigen (LARP3) und LARP7 (70, 99, 135, 157), rückten in den letzten Jahren kontinuierlich auch die anderen LARPs in den Fokus der Forschung. Insbesondere die Klassifizierung der einzelnen LARPs in definierte Subfamilien war grundlegend für diesen Interessensanstieg (23, 33). Die gefundenen strukturellen Unterschiede der einzelnen LARP-Familien deuteten darauf hin, dass LARPs nicht ausschließlich redundante Funktionen von La ausüben, sondern teilweise in völlig divergenten Prozessen eine Rolle spielen könnten. Auf Grund der Präsenz des La Moduls wurde dennoch vermutet, dass viele, möglicherweise sogar alle LARPs direkt mit RNA interagieren und damit distinkte Funktionen im RNA-Metabolismus haben. Diese Hypothese konnte durch die vorliegende Studie für LARP4B bestätigt werden.

4.1. LARP4B ist ein mRNP-assoziierter Translationsfaktor

Während La und LARP7 prädominant im Nukleus lokalisieren und durch spezifische 3'-Oligo (U)-Interaktion mit naszierenden Transkripten der Polymerase III deren Reifung und Funktion beeinflussen, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass LARP4B ein zytoplasmatisches Protein darstellt, das eine Rolle im mRNA-Metabolismus aufweist (210). Hierfür wurden die folgenden experimentellen Evidenzen gefunden:

- 1) Durch Immunpräzipitationsexperimente zellulärer Extrakte ließen sich Interaktionen von LARP4B mit PABPC1 und RACK1 identifizieren (vgl. Abschnitt 3.1.). Beides sind essentielle Faktoren der Translationsmaschinerie, die einerseits direkt mit dem Ribosom (RACK1) und andererseits mit der zu translatierenden mRNA (PABPC1) interagieren. Durch *in vitro* Bindungsstudien ließ sich weiterhin zeigen, dass diese Interaktionen durch die direkte Bindung von LARP4B an

RACK1 und PABPC1 zustande kommen und nicht durch weitere Brückenfaktoren vermittelt werden (vgl. Abschnitt 3.2.). Hierbei wurden für PABPC1 zwei voneinander unabhängige Interaktionsstellen in LARP4B identifiziert, die im N- bzw. C-terminalen Bereich des Proteins lokalisiert sind. Bioinformatische und strukturblogische Untersuchungen charakterisierten die N-terminale PABPC1-bindende Domäne als eine Variante des sogenannten PAM2-Motivs (vPAM2). Für dieses Motiv wurde eine spezifische Interaktion mit der MLE-Domäne von PABPC1 gezeigt. Im Gegensatz hierzu zeigte RACK1 lediglich eine Interaktion mit der C-terminalen Region von LARP4B, welche sich jedoch von der PABPC1-Interaktionsoberfläche unterscheidet (212). Die identifizierten Interaktionen erfolgten RNA-unabhängig und ohne detektierbare Beteiligung des La Moduls von LARP4B. Diese Daten lassen die Vermutung zu, dass *in vivo* ein ternärer Proteinkomplex, bestehend aus LARP4B, RACK1 und PABPC1 ausgebildet werden kann.

- 2) Sedimentationsstudien mit nativen Extrakten eukaryotischer Zellen zeigten, dass unter physiologischen Bedingungen LARP4B mit 80S-Ribosomen und Polysomen assoziiert ist (vgl. Abschnitt 3.3.). Durch welche Wechselwirkungen diese Interaktion zustande kommt, ist bislang noch weitestgehend unverstanden. Eine Möglichkeit wäre, dass RACK1 als 40S-assoziiertes Protein den Brückenfaktor für die LARP4B-Bindung an Ribosomen darstellt (175). Hierfür sprechen weitere Daten: So verbleibt LARP4B auch Ribosomen-gebunden, wenn die Dissoziation der ribosomalen Untereinheiten durch EDTA-Behandlung induziert wurde. LARP4B assoziiert hierbei hauptsächlich mit der 40S ribosomalen Untereinheit. Weitere *in vitro* Bindungsexperimente identifizierten ferner den C-Terminus von LARP4B als Ribosomen-interagierende Domäne. Der Befund, dass die C-terminale Region des LARP4B ebenfalls für die Interaktion des Proteins mit RACK1 verantwortlich ist, lässt eine RACK1-

vermittelte Bindung von LARP4B an ribosomale Komplexe wahrscheinlich erscheinen (Abb. 30) (175).

- 3) Neben den oben zusammengefassten *in vitro* Daten deuteten auch verschiedene *in vivo* Studien auf eine Funktion von LARP4B im Kontext des mRNA-Metabolismus hin. So ist die Beobachtung, dass LARP4B nach Arsen-vermittelter Stressinduktion in zytoplasmatischen Stress granules (SGs) akkumuliert, ein weiteres Indiz hierfür, da diese subzellulären Domänen der Verwahrung mRNA-gebundener Translationsinitiationskomplexe dienen (vgl. Abschnitt 3.4.). Ausreichend für die SG-Assoziation ist der C-Terminus von LARP4B, dem in den *in vitro* Bindungsstudien Interaktionen mit PABPC1, RACK1 und dem Ribosom nachgewiesen werden konnte (Abb. 30). Interessanterweise sind unter Stressbedingungen PABPC1 (10) und RACK1 (13) ebenfalls Bestandteile von SGs. Es ist auf Grund dieser Befunde zu vermuten, dass LARP4B durch die Interaktion mit Translationsfaktoren in diese subzellulären Domänen translokalisiert und somit grundlegende Funktionen in der Regulation der eukaryotischen Translation haben könnte. Unklar ist, inwiefern LARP4B über seine Bindungspartner in SGs dirigiert wird, oder ob LARP4B möglicherweise selbst der Rekrutierung einzelner Translationsfaktoren in SGs dient.
- 4) Explizite Hinweise auf eine Funktion von LARP4B in der Proteinbiosynthese lieferten eine Reihe unabhängiger *in vivo* Experimente (vgl. Abschnitt 3.5.). Zum einen stimuliert die Überexpression von LARP4B die Expression zweier unterschiedlicher Luziferasereporter. Zum anderen induziert der RNAi-induzierte Mangel des Proteins den entgegengesetzten Effekt. qRT-PCR-Analysen konnten ferner zeigen, dass der mRNA-Level der verwendeten Reporter jeweils unverändert bleibt, so dass ein Effekt von LARP4B auf die Transkription ausgeschlossen werden kann. Durch metabolische Markierungsstudien von HEK293-Zellen mit RNAi-vermitteltem LARP4B-Mangel konnte

außerdem gezeigt werden, dass LARP4B die Translation einer Vielzahl zellulärer mRNAs stimuliert.

Somit erfüllt LARP4B essentielle Kriterien eines positiven Translationsfaktors. Die in dieser Arbeit erhaltenen Daten stehen im Einklang mit einer kürzlich veröffentlichten Studie, die zeigte, dass LARP4B, PABPC1 und RACK1 Bestandteile Ribosomen-assoziiierter mRNPs in Hirnextrakten der Ratte sind (11).

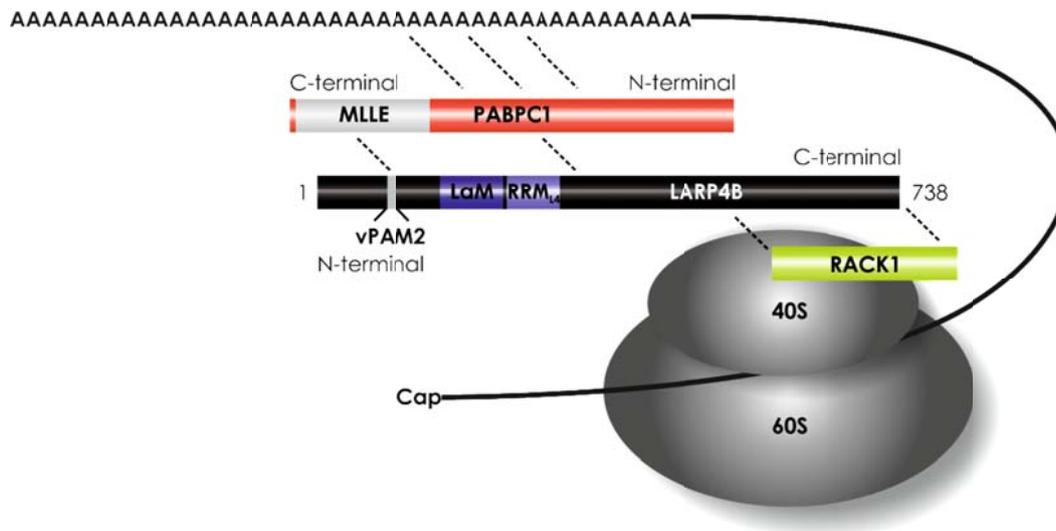


Abbildung 30. LARP4B ist Bestandteil eines mRNA-assoziierten, translationsaktiven mRNP-Komplexes.

Schematisches Modell der identifizierten LARP4B-Interaktionen.

Da Änderungen des zellulären LARP4B-Levels offensichtlich die Translation einer sehr großen Anzahl von mRNAs beeinflussen (vgl. Abschnitt 3.5.), lässt dies vermuten, dass es sich hierbei um einen generellen Translationsfaktor handelt. Dem gegenüber steht jedoch die Beobachtung, dass LARP4B präferenziell an uridylreiche RNA-Sequenzen bindet und damit höchstwahrscheinlich lediglich einen geringen Satz zellulärer mRNAs. Somit kann eine bevorzugte Regulation von bestimmten mRNA-Spezies, wie z. B. TOP-mRNAs oder anderen (U)-reichen RNAs nicht ausgeschlossen werden. Die Identifizierung der *in vivo* Zielmoleküle ist daher für das Verständnis der Funktion von LARP4B von entscheidender Bedeutung. Um den Wirkmechanismus von LARP4B aufklären zu können, ist es daher notwendig,

ein *in vivo* Translationssystem zu etablieren, welches direkt über das Expressionslevel des Proteins reguliert werden kann. Derartige Experimente wurden durch technologische Entwicklungen der letzten Jahre ermöglicht. Ein Beispiel hierfür ist der sogenannte PAR-CLIP Assay, der im Rahmen dieser Arbeit begonnen wurde. Erste unabhängige *in vivo* Untersuchungen wiesen darauf hin, dass die Translationsraten sowohl Cap- als auch IRES-abhängiger Reportergene in gleichem Maße von LARP4B beeinflusst werden (vgl. Abschnitt 3.5. und 3.6.). Dies lässt vermuten, dass LARP4B die Translation unabhängig vom Initiationsmechanismus reguliert. Zur Verifizierung dieser Hypothese sind jedoch noch weitere Studien notwendig.

4.2. Die Regulation der Translation durch LARP4B: Eine Hypothese

Alle gefundenen Daten deuten auf eine positive (d.h. stimulierende) Rolle von LARP4B bei der Translation einer großen Anzahl zellulärer mRNAs hin. Es stellt sich nunmehr die Frage, auf welche Weise LARP4B auf molekularer Ebene diesen Effekt induziert. Prinzipiell sind mehrere Szenarien denkbar, um die Funktion von LARP4B zu erklären. Zum einen scheint es möglich, dass LARP4B als Ribosomen-assoziiertes Faktor die Effizienz der Translationsmaschinerie generell erhöht. Dies würde erklären, warum offensichtlich die Translation eines Großteils der zellulären mRNAs durch LARP4B beeinflusst wird. Hierbei könnte LARP4B zum einen mit inhibitorischen Faktoren um eine Assoziation am Ribosom kompetieren. Alternativ und in Analogie zu RACK1 (175) könnte LARP4B dazu dienen, stimulierende Cofaktoren an das Ribosom zu rekrutieren. Ebenfalls möglich wäre die Stimulierung der Translation durch Inhibierung eines alternativen Prozesses, wie beispielsweise für das Ribosomen-assoziierte p97 beschrieben. Dessen RNAi-vermittelter Mangel führt zu einer verminderten globalen Translationsrate und korreliert mit der erhöhten Expression Zellzyklus-inhibierender Faktoren wie p27/Kip1 (144), was in einer deutlich gesenkten CDK2-Kinaseaktivität resultiert.

Die in dieser Arbeit erhaltenen biochemischen Daten legen zudem nahe, dass LARP4B möglicherweise maßgeblich an der Zirkularisierung der mRNA und somit an der Stimulierung der Translation beteiligt sein könnte. Die Zirkularisierung wird typischerweise durch den bekannten PABPC1-eIF4G-eIF4E-Komplex induziert, der das 5'- mit dem 3'-Ende der mRNA verknüpft (253) („closed-loop“-Modell; vgl. Abschnitt 2.1.). Hierdurch wird die Kooperation 3'-UTR- und 5'-UTR-bindender Faktoren begünstigt und somit eine effiziente Translationsreinitiation gewährleistet. Diese kooperativen Interaktionen steigern die eIF4E-Cap-Bindungsaffinität durch Reduktion der Dissoziationsrate, stimulieren die RNA-Bindungsaktivität von PABPC1 und erhöhen die ATPase- und RNA-Helikase-Aktivitäten von eIF4A, eIF4B und eIF4F (25, 31, 94, 142). Zusätzlich wird die Rekrutierung der 40S ribosomalen Untereinheit an das Startcodon der mRNA initiiert. Im vorliegenden Fall wäre diese 3'-5'-Verknüpfung durch gleichzeitige Interaktion des LARP4B mit PABPC1 (3'-Ende) und RACK1 (5'-Ende) vermittelt (Abb. 30). Diese Interaktionen könnten somit die für den PABPC1-eIF4G-eIF4E-Komplex gefundenen Effekte zusätzlich unterstützen. Denkbar wäre insbesondere eine erhöhte 40S-Anlagerungseffizienz durch parallele LARP4B-Bindung mit PABPC1 und RACK1, ähnlich wie für das „closed-loop“-Modell beschrieben. Auch die Reinitiation der Translation könnte durch die gefundenen LARP4B-Bindungen potentiell gefördert werden. Ob jedoch ein solcher Komplex (PABPC1-LARP4B-RACK1) tatsächlich existiert, oder ob die gefundenen Interaktionen von LARP4B zeitlich und räumlich getrennt verlaufen, muss noch geklärt werden. Zudem ist unklar, ob durch die an RACK1 gebundene aktivierte Protein Kinase C (PKC) neben eIF6 weitere Translationsfaktoren phosphoryliert werden können, wie z. B. LARP4B (1, 11, 91, 175). Dies wäre durchaus von großem Interesse, da durch post-translationale Modifikationen, wie Phosphorylierungen, zelluläre Einflüsse einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine *in vivo* reguliert werden. Bekanntes Beispiel ist das La Protein, welches abhängig von seinem Phosphorylierungsgrad variierende Lokalisation und Funktionen aufweist (115).

4.3. LARP4B als möglicher RNA-bindender Faktor

Für die in dieser Arbeit identifizierten Proteininteraktionen konnte gezeigt werden, dass sie unabhängig vom La Modul erfolgen. Untersuchungen der Proteine LARP3, LARP6 und LARP7 hatten gezeigt, dass das La Modul eine selektive Bindung an Oligo (U)-reiche RNA-Sequenzen vermittelt. Es lag daher die Vermutung nahe, dass das La Modul von LARP4B ebenfalls eine direkte RNA-Interaktion *in vivo* ausübt (39, 157, 176). Konsistent mit dieser Annahme ließ sich eine spezifische RNA-Oligo (U)-Interaktion von LARP4B durch *in vitro* Studien nachweisen (vgl. Abschnitt 3.7.). Trotz des sehr ähnlichen RNA-Bindungspotentials erscheint es jedoch wahrscheinlich, dass LARP4B Pol. II- und nicht Pol. III-Transkripte, wie für La, LARP6 oder LARP7 gezeigt, bindet. Die in dieser Arbeit beschriebene generelle Funktion von LARP4B in der Translation sowie die Tatsache, dass nahezu jede mRNA uridylreiche Sequenzmotive aufweist, sind mit dieser Vermutung konsistent. Eine neu entwickelte Methode zur Identifizierung von RNA-Bindemotiven *in vivo* stellt der sogenannte PAR-CLIP Assay da, der im Rahmen dieser Arbeit für das LARP4B-Protein etabliert wurde. Erste vorläufige Daten zeigten hierbei in der Tat eine *in vivo* RNA-Quervernetzung von LARP4B (vgl. Abschnitt 3.7.2.). Da bislang die Analyse der von LARP4B komplexierten RNA-Sequenzen noch nicht abgeschlossen ist, können jedoch noch keine „*in vivo* RNA-Zielmoleküle“ definiert werden. So kann gegenwärtig lediglich spekuliert werden, welche RNAs von LARP4B reguliert werden. Neben der bereits angesprochenen „globalen Bindung“ an die große Mehrzahl von zellulären mRNAs erscheinen auch andere Szenarien denkbar. Beispielsweise wurden bereits für das ursprüngliche La Protein spezifische Interaktionen mit TOP mRNAs oder einigen IRES-Strukturen beschrieben (41, 61, 63, 125, 197-199, 213). Insbesondere die Klasse der TOP mRNAs ist hierbei von großem Interesse, da sie ein charakteristisches Oligo (U)-reiches Sequenzmotiv in der 5'-UTR besitzen. Zudem codieren diese mRNAs für eine Vielzahl an Translationsfaktoren, wie ribosomale Proteine, Initiations-, Elongations- und Terminationsfaktoren. Der

beobachtete Effekt von LARP4B auf die Translation ließe sich hierbei als sekundäres Ergebnis der veränderten Expression von essentiellen Translationsfaktoren erklären. Eine mögliche LARP4B-vermittelte Regulation dieser RNA-Spezies muss jedoch erst durch spezifische reporterbasierte *in vitro* Studien geklärt werden. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt scheint außerdem eine direkte Bindung von LARP4B an ribosomale RNAs denkbar. Insbesondere die Interaktion des Proteins mit RACK1 an der 40S ribosomalen Untereinheit macht ein derartiges Szenario durchaus plausibel. Eine solche Interaktion sollte sich ebenfalls durch den bereits etablierten PAR-CLIP Assay nachweisen lassen.

		20	2324	33	35	55																																											
Hs	La	I	C	H	I	E	Y	F	G	D	F	N	L	P	R	K	F	L	K	E	Q	I	K	L	D	-	E	G	W	V	P	L	E	I	M	I	K	F	N	R	L	N	R	L	T	T	D		
S.pom	Slalp	L	K	Q	V	E	F	F	S	D	T	N	L	P	H	K	F	L	W	T	S	Q	K	N	-	D	G	W	V	P	I	Q	T	I	A	N	F	K	R	M	R	R	F	Q	P	-			
S.cer	Lhp1p	L	K	Q	V	E	F	F	S	E	F	N	F	P	Y	R	F	L	R	T	T	A	E	K	N	-	D	G	W	V	P	I	S	T	I	A	N	F	K	R	M	K	K	Y	R	P	-		
Hs	LARP7	I	A	K	Q	V	D	F	W	F	G	D	A	N	L	H	K	R	F	L	R	E	Q	I	E	K	S	R	D	G	Y	V	D	I	S	L	L	V	S	E	N	K	M	K	K	L	T	T	D
Th	p65	L	K	L	Q	M	E	Y	F	C	D	T	N	L	H	S	Y	L	R	G	I	S	K	S	P	K	N	C	V	D	I	K	V	L	K	F	N	K	I	Q	I	L	K	Q	-				
Eu	p43	L	Q	K	L	E	F	F	S	D	A	N	L	N	S	F	L	R	K	L	V	L	K	S	G	E	Q	R	V	E	I	E	T	L	L	M	F	K	K	I	R	S	L	L	K	E			
Hs	LARP6	L	V	D	Q	I	E	F	F	S	D	E	N	L	K	D	A	F	L	L	K	H	V	R	R	N	K	L	G	V	S	V	K	L	L	T	S	E	K	K	V	K	H	L	T	R	D		
Hs	LARP1	I	K	R	Q	I	E	Y	F	S	V	D	N	L	R	S	F	F	L	R	R	K	M	D	A	-	-	D	G	F	L	P	I	T	L	I	A	S	E	H	R	V	Q	A	L	T	T	D	
Hs	LARP1B	I	K	R	Q	I	E	Y	F	S	V	E	N	L	R	S	F	F	L	R	G	K	M	D	E	-	-	Q	G	F	L	P	I	S	L	I	A	G	E	F	Q	R	V	Q	A	L	T	T	N
Hs	LARP4	L	K	K	Q	L	E	F	C	F	S	R	E	N	L	S	K	L	I	L	I	S	Q	M	D	S	-	-	D	Q	F	I	P	I	W	T	V	A	N	M	E	E	I	K	K	L	T	T	D
Hs	LARP4B	L	K	K	L	E	F	C	L	S	R	E	N	L	A	S	M	Y	L	I	S	Q	M	D	S	-	-	D	Q	Y	V	P	I	T	T	V	A	N	D	H	I	K	K	L	S	T	D		

modifiziert nach:

Bayfield MA. et al 2010. *Biochim Biophys Acta* 1799(5-6): 365-378.

(mit Genehmigung von Elsevier)

Abbildung 31. Vergleich des La Motivs verschiedener La Proteine und LARPs.

Sequenzvergleich verschiedener La Motiv-enthaltender Proteine unterschiedlicher Spezies: Hs: *Homo sapiens*; S. pom: *Saccharomyces pombe*; S. cer: *Saccharomyces cerevisiae*; Eu: *Euplotes aediculatus*; Th: *Tetrahymena thermophila*. Konservierte La Motiv-Aminosäuren sind fett dargestellt. Wichtige Aminosäuren zur UUU-OH-Bindung sind durch graue Kästen hervorgehoben, wobei Dunkelgrau OH-abhängige Bindungsstellen symbolisiert

Es ist auf Grund der vorhergegangenen Studien der LARPs klar geworden, dass La, LARP6, LARP7 und LARP4B präferentiell mit (U)-reichen Sequenzen interagieren. Interessanterweise stehen dem gegenüber Studien von Yang et al. für LARP4, die zeigen, dass dieses Protein eine Bindungspräferenz für (A)-reiche Sequenzen aufweist (262). Dieser Befund kann möglicherweise durch die im Vergleich zu La veränderte Aminosäuresequenz innerhalb der Oligo (U)-bindenden Domäne des Proteins erklärt werden. Essentiell für die charakteristische Oligo (U)-Interaktion der LARPs sind die konservierten

Aminosäuren Q20, Y23, Y24, D33, F35 und F55 (23). Es konnte gezeigt werden, dass einige dieser Aminosäuren innerhalb des La Motivs von LARP4 variieren (Abb. 31; Y23→F, Y24→C, F35→Y und F55→M) (23). Zwar ist die Homologie des LaM von LARP4 und 4B im Vergleich zum C-Terminus am Größten, es finden sich jedoch auch in dieser Domäne charakteristische Sequenzunterschiede. Zusätzlich zu den für LARP4 gefundenen Sequenzabweichungen weist das LaM von LARP4B weitere Aminosäuresubstitutionen auf (Abb. 31; Q20→T, Y23→F, Y24→C, F35→Y und F55→L) (23). Die RNA-Bindungstaschen der Familie 4-LARP sind somit am divergentesten im Vergleich zu La. Dies lässt auf ein mögliches, abweichendes RNA-Bindungsverhalten oder spezifische RNA-Zielmoleküle für diese LARPs schließen. Möglicherweise ist speziell die „heterogene“ RNA-Interaktion von LARP4 und 4B entscheidend für deren verschiedene zelluläre Funktionen.

4.4. LARP4, LARP4B und LARP1 regulieren die Translation auf unterschiedliche Weise

LARP4B konnte in der vorliegenden Arbeit erstmals als ein Faktor identifiziert werden, der einen stimulierenden Einfluss auf die Translation einer Vielzahl zellulärer mRNAs ausübt. Zeitgleich mit den Untersuchungen des LARP4B-Proteins wurden sehr ähnliche Studien für LARP1 und LARP4 veröffentlicht. Hierbei stellte sich heraus, dass die Proteine vergleichbare zelluläre Interaktionen und Funktionen aufweisen (vgl. Abb. 21 und 24) (28, 38, 176, 262). Für jeden dieser Faktoren wurde letztlich ein Einfluss auf den mRNA-Metabolismus gezeigt:

- 1) Immunpräzipitations- und *in vitro* Bindungsexperimente zeigten für LARP4B, LARP4 als auch LARP1 eine direkte Bindung mit PABPC1 sowie die Copräzipitation verschiedener Translationsinitiationsfaktoren (RACK1, eIF4E, eIF4G) (vgl. Abschnitt 3.1.) (38, 210, 262). Eine direkte Interaktion der LARPs untereinander konnte jedoch ausgeschlossen

werden (vgl. Abschnitt 3.6.1.). Die in dieser Arbeit gefundene Copräzipitation von LARP4B mit LARP1 kann somit durch eine voneinander unabhängige Assoziation der beiden Proteine mit PABPC1 erklärt werden.

- 2) Durch Immunfluoreszenzanalysen konnte eine sehr ähnliche zytoplasmatische Lokalisation von LARP4, LARP4B und LARP1 nachgewiesen werden. Auch eine Akkumulation in SGs nach Arsenvermittelter Stressinduktion ließ sich für jeden der Faktoren nachweisen (vgl. Abschnitt 3.6.1.) (210, 262).
- 3) Durch eine Reihe unabhängiger Experimente konnte des Weiteren gezeigt werden, dass alle drei LARPs mit Ribosomen und/oder mRNPs assoziiert vorliegen (vgl. Abschnitte 3.1., 3.3. und 3.6.) (38, 210, 262).

Diese Daten lassen erneut vermuten, dass einige LARPs durchaus in der Lage sind, auf spezifische Weise den zytoplasmatischen mRNA-Metabolismus zu beeinflussen. Funktionelle Unterschiede auf Ebene der Translationsregulation konnten bislang nur für LARP4 und 4B gefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass LARP4 die Stabilität der mRNA positiv beeinflusst (262), während LARP4B einen stimulierenden Effekt auf die Proteinsynthese ausübt (210). Anders als im Fall von LARP4B wurde für LARP4 zudem eine hohe Affinität zur Bindung (A)-reicher RNA-Sequenzen an Stelle der für La und andere LARPs beschriebenen (U)-reichen RNAs gezeigt (vgl. Abschnitt 4.3.). Diese Daten geben somit den ersten Hinweis auf eine funktionelle Divergenz der beiden humanen LARP-Vertreter der 4. Familie und machen deutlich, dass die bereits beschriebenen geringen Sequenzunterschiede (vgl. Abschnitt 4.3.) entscheidenden Einfluss auf die Funktion der Faktoren zu haben scheinen.

An Hand der Befunde scheint es möglich, dass LARP4B und LARP1 möglicherweise in der Translationsinitiation, in den ersten Elongationsprozessen oder dem ribosomalen Recyclingprozess beteiligt sein könnten. Sedimentationsanalysen RNAi-induzierter Knockdown-Zellextrakte belegten

hierbei den Standpunkt, dass die untersuchten Faktoren unterschiedliche Funktionen in der Proteinbiosynthese übernehmen (vgl. Abb. 24). Während im Fall des durch siRNA-Behandlung resultierenden RACK1-Mangels eine erhöhte Menge freien 60S mit daraus folgender Polysomenverminderung gefunden wurde (202), konnte eine durch LARP1-Mangel hervorgerufene Akkumulation an 80S-Komplexen identifiziert werden. Dies könnte auf eine gehemmte Translationsinitiation und eine Funktion des Proteins als essentieller Faktor der Ribosomenzusammenlagerung hindeuten. Ähnliche Daten wurden für eIF6 veröffentlicht (83, 166). Wurde hingegen das zelluläre LARP4B-Proteinlevel reduziert, so konnte lediglich eine Reduktion an aktiv translatierenden Polysomen nachgewiesen werden. Die Menge an assemblierten 80S-Ribosomen bleibt unter diesen Bedingungen jedoch konstant.

Somit stellen sowohl LARP4 und LARP4B als auch LARP1 in der Translationsregulation agierende Faktoren dar, welche jedoch trotz vergleichbarer zellulärer Interaktionspartner voneinander divergente Funktionen aufweisen und demnach möglicherweise an unterschiedlichen Prozessen, wie z. B. mRNA-Stabilisierung oder Translationsinitiation, beteiligt sind.

4.5. Strukturelle Besonderheiten von LARP4B: die vPAM2-Domäne

Die biochemischen Studien dieser Arbeit zeigen, dass der N-Terminus von LARP4B, zusammen mit einem weiteren C-terminalen Element, mit PABPC1 interagiert (Abb. 30, 31) (vgl. Abschnitt 3.2.1.). Bioinformatische Untersuchungen identifizierten in der N-terminalen Region von LARP4B ein Sequenzmotiv, welches Homologie zur sogenannten PAM2-Domäne aufweist. Für eine diverse Anzahl an Proteinen konnte bereits gezeigt werden, dass dieses Motiv spezifisch an die MLE-Domäne von PABPC1 bindet (130-133). Das MLE-Motiv setzt sich aus fünf miteinander verbundenen α -Helices zusammen, wobei die PAM2-Interaktion durch Helices α_2 , α_3 und α_5 vermittelt

wird. Diese bilden zwei definierte Bindungstaschen aus. Die Röntgenstrukturanalysen der MLE-Domäne in Komplex mit einem LARP4B-vPAM2-Peptid (in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von C. Grimm) zeigte hierbei interessanterweise neben den „klassischen“, für PAM2-Proteine beschriebenen Interaktionen, signifikante Unterschiede im Bindungsverhalten. Die zweite MLE-Bindungstasche, welche normalerweise mit einem hoch konservierten Phenylalanin des PAM2-Motivs interagiert, wird im Fall der LARP4B-vPAM2-Domäne durch einen, an dieser Stelle substituierten Tryptophan-Rest besetzt (Abb. 32). Trotz des größeren Tryptophan-Durchmessers liegt hierbei eine, mit anderen MLE-PAM2-Komplexen vergleichbare Bindung vor (184), wobei, vermittelt durch den heterozyklischen Stickstoff des Tryptophan-Restes, eine zusätzliche Wasserstoffbrückenbindung an Gln560 vorliegt (Abb. 32) (184).

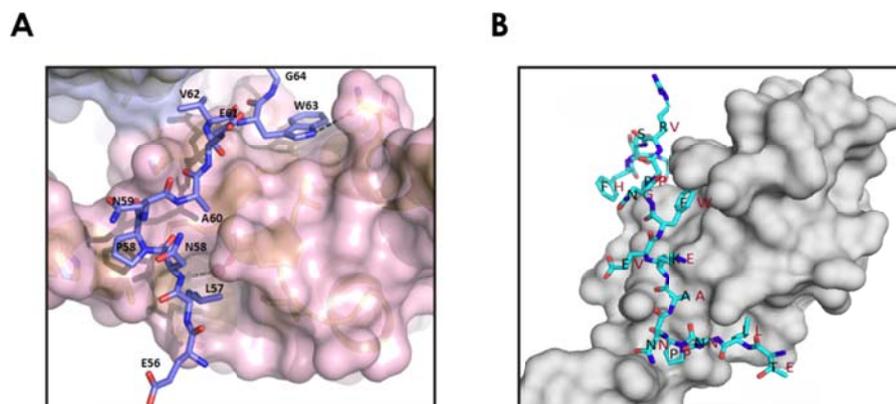


Abbildung 32. Strukturelle Analyse der vPAM2-MLE-Interaktion von LARP4B.

(A) Röntgenstrukturanalyse der vPAM2-MLE-Bindung von LARP4B (184). (B) Struktur einer Interaktion der konventionellen PAM2-Domäne von Ataxin2 mit der MLE-Domäne von PABPC1 (133).

Zwar konnte durch Mutationsexperimente gezeigt werden, dass die vPAM2-Domäne von LARP4B *in vitro* und *in vivo* für eine effektive PABPC1-Bindung wichtig ist, ein direkter Effekt auf die Translationsstimulation konnte jedoch bislang für die vPAM2-MLE-Interaktion nicht nachgewiesen werden (vgl. Abschnitte 3.2.1. und 3.5.3.). Um die eigentliche Funktion dieser Bindung *in vivo* bestimmen zu können sind daher weitere Reporter-basierte Studien nötig.

4.6. Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit beschreiben LARP4B erstmals als einen Ribosomen-assoziierten Faktor, der in mRNP-Komplexen vorliegt und die Translation stimuliert (210). Vergleichbare Befunde wurden für die beiden verwandten Faktoren LARP4 und LARP1 erhalten (38, 262). Obwohl für LARP4, LARP4B und LARP1 vergleichbare Interaktionsprofile identifiziert wurden und auch die zellulären Lokalisationen identisch sind, zeigen die Daten dieser Arbeit, dass jeder der Faktoren den mRNA-Metabolismus auf spezifische Weise beeinflusst. Diese Befunde wurden vor allem durch Yang et al. bestätigt, welche LARP4 als mRNA-stabilisierenden Faktor identifizierten, sowie durch Sedimentationsanalysen, in welchen für LARP1 und 4B verschiedene Effekte auf die Monosomen/Polysomen-Verteilungen gefunden werden konnten (vgl. Abschnitt 4.4.).

Die Tatsache, dass einige LARPs translationsregulatorische Effekte aufweisen, macht detailliertere Funktionsanalysen dieser Proteine nun möglich. Neben der Identifizierung der RNA-Zielmoleküle *in vivo*, müssen in folgenden Studien insbesondere die genauen regulatorischen Mechanismen der einzelnen LARPs analysiert werden. Gezielte, Reporter-basierte *in vitro* Modellsysteme scheinen hierzu am geeignetsten. Somit könnte z. B. die für LARP4B postulierte Brückenfunktion zwischen 3'- und 5'-Ende der mRNA untersucht werden. Von besonderem Interesse wäre hierbei, ob die gefundene PABPC1, RACK1/Ribosomen Interaktion von LARP4B tatsächlich zeitgleich erfolgt, oder ob LARP4B möglicherweise in unterschiedlichen RNP-Komplexen integriert vorliegt. Zur Isolierung LARP4B-interagierender RNA-Zielmoleküle könnte der bereits in dieser Arbeit etablierte PAR-CLIP Assay dienen. Durch Reporter-Luziferase-Experimente müsste zudem untersucht werden, ob LARP4B tatsächlich durch Bindung an spezielle RNA-Subklassen diese für die Translation im Vergleich zu anderen mRNAs bevorzugen könnte. Insbesondere TOP mRNAs oder IRES-regulierte mRNAs stellen hierfür interessante Zielmoleküle dar (vgl. Abschnitt 4.3.). Inwiefern zudem eine mögliche Phosphorylierung des

Proteins durch die aktivierte Protein Kinase C (PKC) Einfluss auf die Interaktionen, Lokalisation oder Funktion von LARP4B haben könnte, müsste ebenfalls durch weiterführende *in vitro* und *in vivo* Phosphorylierungsexperimente geklärt werden.

5. Material

5.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht anders angegeben wurde steriles, deionisiertes Reinstwasser (ddH₂O) als Lösungsmittel verwendet. Die in dieser Arbeit eingesetzten Chemikalien wurden in p.A.-Qualität von BD Biosciences (Heidelberg), Merck (Darmstadt), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) bezogen. Radiochemikalien stammten von Perkin Elmer (Pfaffenhofen), Restriktionsenzyme und Phosphatasen von MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) und New England Biolabs (Frankfurt am Main), DNA-Polymerasen von MBI Fermentas und peqlab (Erlangen). Oligonukleotide wurden bei biomers.net (Ulm) oder Eurofins MWG Operon (Ebersberg) synthetisiert.

5.1.1. Chromatographische Matrices

Glutathion-Sepharose	GE Healthcare, München
7-Methyl GTP-Sepharose™ 4B	GE Healthcare, München
<u>Ni-nitrilo</u> triacetic acid Sepharose (Ni-NTA)	QIAGEN, Hülse
Oligo (dT)-Zellulose	Boehringer, München
Protein G-Sepharose	Amersham, Freiburg

5.1.2. Längenstandards

GeneRuler™ DNA Ladder Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
Precision Plus Protein Dual Color Standards	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein Unstained Standard	Bio-Rad, München
RiboRuler™ High Range RNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot
RiboRuler™ Low Range RNA Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot

5.1.3. Reaktions-Sets (Kits) und Fertiglösungen

Amersham Rapid-hyb™ Buffer	GE Healthcare, München
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad, München
Desoxynucleotidmix	Roche, Mannheim
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
Flp-In™ T-REx™ Core Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Lipofectamine 2000 Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Nanofectin Transfection Reagent	PAA, Linz (Österreich)
NucleoBond® Purification System	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Extract II	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin® Plasmid QuickPure	Macherey-Nagel, Düren
NuPAGE® Antioxidant	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE MOPS SDS Running buffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE®Novex 4-12 % Bis-Tris Gel 1,0 mm, 12 well	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE®Novex 4-12 % Bis-Tris Gel 1,0 mm, 9 well	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Reducing Agent	Invitrogen, Karlsruhe
Oligofectamine Transfection Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
PCR Mastermix (Taq Polymerase)	Promega, Mannheim
PureYield™ Plasmid Midiprep System	Promega, Mannheim
Renilla Luciferase Assay System	Promega, Mannheim
Ribonucleotidmix	Roche, Mannheim
Rotiphorese Gel 30	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel 40	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel A	Roth, Karlsruhe
Rotiphorese Gel B	Roth, Karlsruhe
Roti®-Phenol	Roth, Karlsruhe

ScriptCap™ m ⁷ G Capping System	Epicenter, Madison (USA)
SuperScript® First Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe
TA Cloning® Kit, pCR®2.1 Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
ThermoABsolute™ QPCR SYBR® Green	ABgene, Hamburg
TNT® T7 Quick Coupled Transcription/Translations System	Promega, Mannheim
Vectashield® Mounting Medium mit DAPI	Linaris, Wertheim

5.1.4. Dialyse-und Filtermaterialien

Dialyseschlauch, MWCO 30kDa	Roth, Karlsruhe
Faltenfilter 11 cm	Macherey-Nagel, Düren
MF-Millipore Membranfilter	Sigma, München
Millipore Nitrocellulosemembran 0,22 µm GSWP	Millipore, Schwalbach
Minisart® Single use filter unit, 0,2 µm, steril	Sartorius Stedim, Göttingen
Slide-A-Lyzer® MINI Dialysis Units, 7.000 MWCO	Thermo Scientific, Rockford (USA)
VIVASPIN 6, 30.000 MWCO PES	Sartorius Stedim, Göttingen
Whatman 3 MM-Filterpapier	Hartenstein, Würzburg

5.1.5. Kunststoffwaren- und gefäße

DC-Plastikfolien PEI Cellulose F	Merck, Darmstadt
Einmalküvetten PS, halbmikro, 1,6 ml	Hartenstein, Würzburg
Einmalspritzen Luer-Lock 5, 10, 20 und 50 ml	Hartenstein, Würzburg
Einmalspritzen 2, 5, 10 und 20 ml	Hartenstein, Würzburg
Gewebekulturflasche, steril 50 ml, 25 cm ² , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturflasche, steril 250 ml, 75 cm ² , mit Filter	Greiner, Frickenhausen

Gewebekulturflasche, steril 550 ml, 175 cm ² , mit Filter	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril 60 mm	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril 100 mm	Greiner, Frickenhausen
Gewebekulturschale, steril 145 mm	Greiner, Frickenhausen
CRYO.S PP mit Schraubverschluss, 2 ml, steril	Greiner, Frickenhausen
PARAFILM®, M	Pechiney, Chicago (USA)
PCR Soft Tubes, 0,2 ml, Flachdeckel	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
PCR 8er-Soft Strips, 0,2 ml, Flachdeckel	Biozym Scientific, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen	Peske, Aindling-Pichl
CELLSTAR® Tubes, PP, 15 und 50 ml, steril	Greiner, Frickenhausen
Reaktionsgefäße 0,5, 1,5 und 2,0 ml	Eppendorf, Hamburg
Seton Open Top Centrifugation Tubes, Polyclear	Seton, (USA)
UVette® 220-1600 nm, disposable single sealed	Eppendorf, Hamburg
96 Well Platten, weiss (LumiNunc), F96, CC, steril, Deckel	Thermo Fisher Scientific, Schwerte
Zellkultur Multiwell Platte 6 Well	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur Multiwell Platte 12 Well	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur Multiwell Platte 24 Well	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur Microplatte 96 Well Format	Greiner, Frickenhausen
Zellkulturpipetten, steril 5, 10 und 25 ml	Greiner, Frickenhausen
Zellschaber 24, 30 und 38 cm	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen (Schweiz)

5.1.6. Röntgenfilme, Screens und Transfermembranen

Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, München
Amersham Hyperfilm™ ECL	GE Healthcare, München
BioTrace NT™, Pure Nitrocellulosemembran	Pall Corporation, Pensacola (USA)
CEA RP NEW Medical X-ray Screen	Agfa Healthcare, Mortsel (Belgien)
Hybond™-N + Nylon Transfermembran	Amersham, Freiburg

5.2. Lösungen, Puffer und Medien

5.2.1. Allgemeine Lösungen

Agarosegel (0,8 %)	0,8 g/	
	100ml	Agarose
	100 ml	1x TBE
	10 µl	Ethidiumbromid (1 %)
Amidoschwarz-Färbelösung	0,2 %	Amidoschwarz
	10 % (v/v)	Methanol
	3 % (v/v)	Essigsäure
2x Bandshiftpuffer (PABPC1)	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	5 mM	MgCl ₂
	200 mM	KCl
	30 % (v/v)	Glycerin
	1 %	Triton-X 100

Material

Blaha A Puffer	20 mM	Hepes (pH 7,6)
	6 mM	Mg(OAc) ₂
	30 mM	NH ₄ Cl
	4 mM	β-Mercapto.
	Bei Gebrauch (Lyse)	1 % (w/v)
Blocklösung für Western Blot	5 % (v/v)	Milchpulver
	1x	PBS-T
CLIP Hochsalzpuffer	50 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	1 M	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 % (v/v)	NP40
	0,5 %	Na-Deoxycholat
	0,1 %	SDS
CLIP Lysepuffer	50 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	100 mM	NaCl
	1 mM	MgCl ₂
	0,1 mM	CaCl ₂
	0,5 %	Na-Deoxycholat
	0,1 %	SDS
CLIP PNK-Puffer	20 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	10 mM	MgCl ₂
	0,2 % (v/v)	Tween
CLIP PK-Puffer	100 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	50 mM	NaCl
	10 mM	EDTA

Material

Coomassie-Färbelösung	50 % (v/v)	Methanol
	10 % (v/v)	Essigsäure
	0,25 % (w/v)	SERVA Blue R (Serva)
Coomassie-Entfärbelösung	35 %	Methanol
	7 %	Essigsäure
Cumarinsäure (100 ml)	6,8 mM	Cumarinsäure
	100 ml	DMSO
Formaldehydgel (1 %)	1g/	
	100 ml	Agarose
	10 % (v/v)	10x MOPS Puffer
	30 % (w/v)	Formaldehyd (37 %)
GST-Aufschlusspuffer 1	700 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	10 mM	EDTA
	1:50	DTT
	1:1000	Proteaseinhib.
GST-Aufschlusspuffer 2	1x	PBS
	1 % (v/v)	Triton-X 100
	1:1000	Proteaseinhib.
	1:1000	DTT
GST-Elutionspuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
	20 mM	Glutathion

Material

His-Aufreinigungspuffer	700 mM	NaCl
	50 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	5 mM	β -Mercaptoeth.
	5 mM	Imidazol
	1:1000	Proteaseinhib.
IP-Puffer	1x	PBS
	0,01% (v/v)	NP40
Luminol	1,25 mM	Luminol
	100 mM	Tris-HCl (pH 8,5)
Lysepuffer	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	100 mM	NaCl
	0,5 % (v/v)	NP40
	0,5 mM	EDTA
	0,5 mM	PMSF
Lysepuffer II (Ribosomenaufreinigung)	20 mM	Hepes (pH 7,5)
	5 mM	Mg(OAc) ₂
	10 mM	KoAc
	2 mM	DTT
	1:1000	Proteaseinhib.
MOPS Denaturierungspuffer	10 μ l	Formamid
	3,5 μ l	Formaldehyd
	2 μ l	10x MOPS Puffer
Oligo (dT)-Bindepuffer	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA
	500 mM	NaCl
	0,1 % (v/v)	SDS

Material

Oligo (dT)-Elutionspuffer	10 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 mM	EDTA
	0,1 % (v/v)	SDS
10x PBS	130 mM	NaCl
	40 mM	Na ₂ HPO ₄
	20 mM	NaH ₂ PO ₄
	pH 7,4	
1x PBS-T	1x	PBS
	0,05 % (w/v)	Tween
10x Polysomengradientenpuffer	200 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	1 M	KCl
	50 mM	MgCl ₂
Polysomengradientenlysepuffer (1 ml)	10 % (v/v)	10x
	2 % (v/v)	CHX (5 mg/ml)
	5 % (v/v)	NP40 (10 %)
	1:1000	DTT
	1:1000	Proteaseinhib.
	1:1000	RNAasin
Pulldownpuffer	200 mM	NaCl
	5 mM	Tris-HCl (pH 7,6)
	1 mM	EGTA
	1 mM	EDTA
	0,01 % (v/v)	NP40
Resuspensionspuffer 1 (Ribosomen)	20 mM	Hepes (pH 7,5)
	500 mM	KOAc
	5 mM	Mg(OAc) ₂
	2 mM	DTT
	1:1000	Proteaseinhib.

Material

Resuspensionspuffer 2 (Ribosomen)	20 mM	Hepes (pH 7,5)
	100 mM	KOAc
	5 mM	Mg(OAc) ₂
	2 mM	DTT
	1:1000	Proteaseinhib.
Ribosomenlysepuffer	20 mM	Hepes (pH 7,5)
	10 mM	KOAc
	5 mM	Mg(OAc) ₂
	2 mM	DTT
	1:1000	Proteaseinhibitor
40/60S Ribosomenpuffer 1	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	100 mM	KCl
	5 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
40/60S Ribosomenpuffer 2	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	50 mM	KCl
	1,5 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
40/60S Ribosomenpuffer 3	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	500 mM	KCl
	4 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
40/60S Ribosomenpuffer 4	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	100 mM	KCl
	2 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT

Material

40/60S Ribosomenpuffer 5	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	100 mM	KCl
	4 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT
RNA-Elutionspuffer	500 µl	5 M NH ₄ OAc
	4,5 ml	ddH ₂ O
	5 µl	0,1 M EDTA
	5 µl	MgCl ₂
	10 µl	20 % SDS
	Bei Gerauch	300 µl
	10 µl	Glykogen
RNA-Polyacrylamid-Gele		
Denaturierend, 6 %	15 % (v/v)	Rotiphorese Gel 40
	8 M	Harnstoff
	0,5x	TBE
	450 µl /	
	50 ml	APS
	45 µl/	
	50 ml	TEMED
Denaturierend, 10 %	25 % (v/v)	Rotiphorese Gel 40
	8 M	Harnstoff
	0,5x	TBE
	450 µl /	
	50 ml	APS
	45 µl/	
	50 ml	TEMED

Material

Denaturierend, 15 %	37,5 % (v/v)	Rotiphorese Gel 40
	8 M	Harnstoff
	0,5x	TBE
	450 µl /	
	50 ml	APS
	45 µl/	
	50 ml	TEMED
Nativ, 6 %	20 % (v/v)	Rotiphorese Gel A
	3,25 % (v/v)	Rotiphorese Gel B
	0,3x	TBE
	10 % (v/v)	Glycerin 86 %
	250 µl/	
	50 ml	APS
	40 µl/	
50 ml	TEMED	
Nativ, 7,5 %	25 % (v/v)	Rotiphorese Gel A
	4,69 % (v/v)	Rotiphorese Gel B
	0,5x	TBE
	10 % (v/v)	Glycerin 86 %
	250 µl/	
	50 ml	APS
	30 µl/	
50 ml	TEMED	

Material

SDS-Polyacrylamid-Gele

Sammelgellösung	3,2 ml	4x Sammelgel- puffer
	1,6 ml	Rotiphorese Gel 30
	7,6 ml	ddH ₂ O
	100 µl	APS
	20 µl	TEMED
Trenngellösung 10 %	10,5 ml	4x Trenngel- puffer
	13,5 ml	Rotiphorese Gel 30
	16,5 ml	ddH ₂ O
	200 µl	APS
	200 µl	TEMED
Trenngellösung 12 %	10,5 ml	4xTrenngel- puffer
	17,7 ml	Rotiphorese Gel 30
	12 ml	ddH ₂ O
	200 µl	APS
	200 µl	TEMED
Silbergelentwicklerlösung	60 g/L	NaCO ₃
	0,05 % (v/v)	Formaldehyd (37 %)
Silbergelfixierlösung	50 % (v/v)	Methanol
	12 % (v/v)	Essigsäure
	0,05 % (v/v)	Formaldehyd (37 %)

Material

Silbergelsilbernitratlösung	2 g/L 0,075 % (v/v)	Silbernitrat Formaldehyd (37 %)
10x SSC Puffer	150 mM 15 mM	NaCl Natriumcitrat
Stopplösung (ELISA)	1M	NaOH
Substratlösung (ELISA)	0,02 M 1 mg/ml 0,01 % (v/v)	Na ₂ HPO ₄ (pH 6,8) 5-Aminosalicyl- säure H ₂ O ₂
TCA-Waschpuffer	70 % (v/v) 20 % (v/v) 7,5 % (v/v) 2,5 % (v/v)	Aceton Ethanol ddH ₂ O 2 M Tris-HCl (pH 8,0) Bromphenolblau
Tfbl Puffer	30 mM 100 mM 10 mM 50 mM 15 % (w/v) pH 5,8	KOAc RbCl CaCl ₂ MnCl ₂ Glycerin
Tfbll Puffer	10 mM 75 mM 10 mM 15 % (w/v)	MOPS CaCl ₂ RbCl Glycerin

Material

10x Towbin	250 mM	Tris
	192 mM	Glycin
	35 m	SDS
Bei Gebrauch (1x)	100 ml	10x Towbin
	800 ml	ddH ₂ O
	100 ml	Methanol
Vollers Puffer (ELISA)	1,59 g	Na ₂ CO ₃
	0,20 g	NaN ₃
	2,93 g	NaHCO ₃
	1x	PBS
	pH 9,2	
Waschpuffer (40/60S Ribosomen)	20 mM	Tris-HCl (pH 7,5)
	300 mM	KCl
	2 mM	MgCl ₂
	2 mM	DTT

5.2.2. Gelelektrophoresepuffer

10x Lämmli Puffer	440 mM	Tris-base
	2 M	Glycerin
	1,5 % (w/v)	SDS
	pH 8,3	
Bei Gebrauch (1x)	100 ml	10x Lämmli
	900 ml	ddH ₂ O
10x MOPS Puffer	0,4 M	Mops
	0,1 M	NaOAc
	0,01 M	EDTA

20x NuPAGE® Novex MOPS Laufpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
Bei Gebrauch	25 ml 20x MOPS
	475 ml ddH ₂ O
4x SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl
	0,4 % (w/v) SDS
	pH 6,8
4x SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl
	0,4 % (w/v) SDS
	pH 8,8
10x TBE	890 mM Tris
	890 mM H ₃ BO ₄
	20 mM Na ₂ EDTA
	pH 8,3
Bei Gebrauch (1x)	100 ml 10x TBE
	900 ml ddH ₂ O
Bei Gebrauch (0,5x)	50 ml 10x TBE
	950 ml ddH ₂ O

5.2.3. Probenpuffer

DNA-Probenpuffer	10 mM Tris-HCl
	50 mM EDTA
	1 % (w/v) SDS
	30 % (w/v) Glycerin
	0,1 % (w/v) Bromphenolblau
	pH 8,0
Harnstoff-Protein-Probenpuffer	2x Protein-Probenpuffer
	8 M Harnstoff

Material

MOPS-Ladepuffer	50 % (w/v) Glycerin 1 mM EDTA 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
NuPAGE® LDS Sample Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
2x Protein-Probenpuffer	2 % (w/v) SDS 50 mM Tris-HCl (pH 7,5) 15 % (w/v) Glycerin 0,6 % (v/v) β -Mercaptoeth. 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
6x Protein-Probenpuffer	12 % (w/v) SDS 300 mM Tris-HCl (pH 6,8) 30 % (w/v) Glycerin 600 mM β -Mercaptoeth. 0,04 % (w/v) Bromphenolblau
RNA-Probenpuffer (denaturierend)	95 % (v/v) Formamid 18 mM EDTA 0,025 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Xylencyanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau
RNA-Probenpuffer (nativ)	0,5x TBE 20 % (w/v) Glycerin 0,1 % (w/v) Xylencyanol 0,1 % (w/v) Bromphenolblau

5.2.4. Medien und Zusätze für die Gewebekultur

Blasticidin S	InvivoGen, San Diego (USA)
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)	PAA, Linz (Österreich)
Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) ohne L-Methionin	PAA, Linz (Österreich)
DMSO	Roth, Karlsruhe
Earls + L-Glutamin (Medium 199)	PAA, Linz (Österreich)
Fötales Kälber Serum (FKS)	PAA, Linz (Österreich)
Hybridoma Cloning supplement (HCS)	PAA, Linz (Österreich)
Hybridoma Express plus	PAA, Linz (Österreich)
Hypoxanthin/Aminopterin/Thymidin (HAT) (50x)	Invitrogen, Karlsruhe
Hypoxanthin/Thymidin (HT) (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Hygromycin B	InvivoGen, San Diego (USA)
L-Glutamin	PAA, Linz (Österreich)
OPTI-MEM® I	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Saline (PBS)	PAA, Linz (Österreich)
Penicillin-Streptomycin (Pen/Strep)	Gibco, Karlsruhe
RPMI 1640 + L-Glutamin + Hapes	PAA, Linz (Österreich)
Tetracyclin	Serva, Heidelberg
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
Zeocin	InvivoGen, San Diego (USA)

5.2.4.1. Medienzusammensetzung

Cryopreservationsmedium		DMEM
	10 % (v/v)	DMSO
	10 % (v/v)	FKS
1,5x HAT Selektionsmedium	60.5 %	RPMI 1640
	20 %	Medium 199
	10 % (v/v)	FKS
	3 %	HAT (50x)
	5 %	HCS
	1,5 %	Pen/Strep
HT/Hyd Medium	40 %	HAT Medium
	60 %	Hybridoma Express Plus
	10 %	HCS
1x HT Medium	67 %	RPMI 1640
	20 %	Medium 199
	10 % (v/v)	FKS
	1 %	HT (100x)
	1 %	L-Glutamin
	1 %	Pen/Strep
Host cell Medium (Flp-In TRex)		DMEM
	10 % (v/v)	FKS
	100 µg/ml	Zeocin
	15 µg/ml	Blasticidin
Flp-TRex LARP4B Standardmedium		DMEM
	10 % (v/v)	FKS
	100 µg/ml	Hygromycin
	15 µg/ml	Blasticidin

Flp-TREx LARP4B Induktionsmedium		DMEM
	10 % (v/v)	FKS
	100 µg/ml	Hygromycin
	15 µg/ml	Blasticidin
	1 µg/ml	Tetracyclin
Präinkubationsmedium für Transfektion		DMEM
	10 % (v/v)	FKS
Standardmedium		DMEM
	10 % (v/v)	FKS
	1 %	Pen/Strep

5.2.5. Medien und Zusätze für die Bakterienkultur

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bacto-Agar	Clontech, Heidelberg
Bacto-Trypton	Clontech, Heidelberg
Bacto-Yeast-Extract	Clontech, Heidelberg
Chloramphenicol	Boehringer, Mannheim
1-Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG)	Roche, Mannheim
Kanamycin	Boehringer, Mannheim
A-D(+)-Glukose Monohydrat	Roth, Karlsruhe

5.2.5.1. *Medienzusammensetzung*

LB-Medium	0,5 %	Hefe-Extrakt
	1 %	Trypton
	170 mM	NaCl
Superbroth-Medium (SB)	3,5 % (w/v)	Bactotrypton
	2 % (w/v)	Hefeextrakt
	0,5 % (w/v)	NaCl

Expressionsmedium GST-LARP4B		SB-Medium
	1:1000	Ampicillin
	1:1000	Chloramphen.
	5 % (w/v)	Glukose
Expressionsmedium GST-PABPC1 und LARP4B Trunkationen		SB-Medium
	1:1000	Ampicillin
	1:1000	Chloramphen.
Expressionsmedium His-RACK1		SB-Medium
	1:1000	Kanamycin
	1:1000	Chloramphen.

LB-Festmedien wurden durch Zugabe von 1,5 % (w/v) Agarose hergestellt. Selektionsmedien enthielten 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin.

5.3. Oligonukleotide

Für Transfektionen in HEK293-Zellen wurden folgende siRNAs eingesetzt:

Kontroll-siRNA (h): 68 % GC		Eurofins, Ebersberg
sense	5'-UGCGCUAGGCCUCGGUUGC(dTdT)-3'	
antisense	5'-GCAACCGAGGCCUAGCGCA(dTdT)-3'	
LARP1-siRNA (h)		Eurofins, Ebersberg
sense	5'-GAAUGGAGAUGAGGAUUGC(dTdT)-3'	
antisense	5'-GCAAUCCUCAUCUCCAUUC(dTdT)-3'	
LARP4B-siRNA (h): sc-90603		Santa Cruz, Heidelberg
LARP4B-siRNA (h)		Eurofins, Ebersberg
sense	5'-CAGGCUAUCUAGCUUGAUA(dTdT)-3'	
antisense	5'-UAUCAAGCUAGAUAGCCUG(dTdT)-3'	

RACK1-siRNA (h): sc-36354 Santa Cruz, Heidelberg

RACK1-siRNA (h) Eurofins, Ebersberg

sense 5'-CCAUCAAGCUAUGGAAUAC(dTdT)-3'

antisense 5'-GUAUCCAAGCUUGAUGG(dTdT)-3'

5.4. Plasmidkonstrukte

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren:

pcDNA5/FRT/TO	Invitrogen, Karlsruhe
pET28-a	AG Fischer
pGEX6P-1	AG Fischer
pGL3 Promotor	Promega, Mannheim
pHA	AG Fischer
pOG44	Invitrogen, Karlsruhe
pR-BIP-F	(125)
pR-EMCV-F	(125)
pRL-TK	Promega, Mannheim

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Plasmidkonstrukte:

Gen	AS	Vektor	Referenz	5' – 3' Restriktionsenzyme
LARP1	1096	FLAG-Plasmid	(38)	
LARP4B	738	pGEX6P-1	Sabine Knaup (Uni Würzburg)	Sall - NotI
LARP4B	738	pET28-a	Sabine Knaup (Uni Würzburg)	Sall - NotI
LARP4B	738	pHA	Sabine Knaup (Uni Würzburg)	BamHI - NotI

Material

LARP4B	738	pcDNA5/FRT/TO	Sabine Knaup (Uni Würzburg)	BamHI - NotI
LARP4B-Ct	430	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B-La	78	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- La-RRM	153	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B-Nt	153	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- Nt-La	232	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- Nt-La-RRM	307	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- RRM-Ct	501	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B-Ct	430	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B-La	78	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- La-RRM	153	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B-Nt	153	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- Nt-La	232	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- Nt-La-RRM	307	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP4B- RRM-Ct	501	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
LARP7	589	pHA	Andreas Markert (Uni Würzburg)	EcoRI - Sall
PABPC1	636	pHA	diese Arbeit	BamHI - NotI
PABPC1	636	pGEX6P-1	diese Arbeit	BamHI - NotI
RACK1	317	pET28-a	Kristina Schulz (Uni Würzburg)	Sall – NotI

RACK1	317	pGEX6P-1	Kristina Schulz (Uni Würzburg)	Sall – NotI
RACK1	317	pHA	Kristina Schulz (Uni Würzburg)	NotI – NotI

5.5. Antikörper

Übersicht über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper:

Alexa Fluor 494 anti-mouse			Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 595 anti-mouse			Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 488 anti-rabbit			Invitrogen, Karlsruhe
Alexa Fluor 594 anti-rabbit			Invitrogen, Karlsruhe
Antikörper	Art	Wirt	Herkunft
anti-Aktin	monoklonal	Maus	Sigma, Steinheim
anti-eIF3k	monoklonal	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
anti-eIF4E	polyklonal	Kaninchen	AG Fischer
anti-eIF4G	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)
anti-FMRP	monoklonal	Maus	AG Fischer
anti-HA	monoklonal	Maus	Covance, Berkeley (USA)
anti-HA (Y-11)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz, Heidelberg
anti-LARP1	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)
anti-LARP4B	polyklonal	Kaninchen	diese Arbeit
anti-LARP7	polyklonal	Kaninchen	Andreas Markert, Uni Würzburg
anti-mouse	polyklonal	Kaninchen	Sigma, Steinheim

anti-PABPC1	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)
anti-rabbit	polyklonal	Ziege	Sigma, Steinheim
anti-RACK1	monoklonal	Maus	Santa Cruz, Heidelberg
anti-RPL7	polyklonal	Kaninchen	AG Fischer
anti-RPS6	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)
anti-TIAL1	polyklonal	Kaninchen	Abcam, Cambridge (UK)
anti-Tubulin	monoklonal	Maus	Sigma, Steinheim

5.6. Bakterienstämme und Eukaryotische Zelllinien

5.6.1. Bakterienstämme

E. coli BL21

E. coli BL21 rosetta 2

E. coli BL21 rosetta pLys

E. coli DH5a

5.6.2. Eukaryotische Zelllinien

COS7: Nierengewebe von Grünen Meerkatzen

(*Cercopithecus aethiops*), Fibroblasten-Zelllinie DSMZ, Braunschweig

Flp-In T-Rex: modifizierte HEK293 Zelllinie Invitrogen, Karlsruhe

HEK293: menschliche embryonale Nierenzellen

(Human Embryonic Kidney) mit DNA-Teilen des Adenovirus DSMZ, Braunschweig

HeLa: menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms

(Gebärmutterhalskrebs) ECACC, Salisbury (UK)

HeLa S3: Subklon der HeLa Zelllinie, Suspensions-
Wachstum

ECACC, Salisbury (UK)

Ta3-Hauschka Zellen: aus Maus Mamarium Carzinoma AG Sendtner,
Würzburg

5.7. Geräte

Accument® pH Meter Model 15

Denver Instruments,
New York (USA)

Avanti® J-20XP Kühlzentrifuge

Beckman Coulter, Krefeld

Avanti® J-26XP Kühlzentrifuge

Beckman Coulter, Krefeld

Avanti® J-HC Kühlzentrifuge

Beckman Coulter, Krefeld

Biofuge pico

Heraeus, Hanau

Biometra® Standard Power Pack P25

Analytik Jena, Jena

BioPhotometer

Eppendorf, Hamburg

Bio-Rad Mini PROTEAN® 3 Cell Gelkammer

Bio-Rad, München

Certomat® BS-1 Bakterieninkubator/-schüttler

Braun Biotech, Melsungen

Chyo JL-180 Feinwaage

Hartenstein, Würzburg

CL-100 UV Crosslinker

UVP, Cambridge (UK)

Elektrophoresis Power Supply EP S 601

Amersham, Freiburg

Fedegari Autoclavi SPA

Biomedis, Gießen

Fuchs-Rosenthal-Zählkammer

Hartenstein, Würzburg

GeneAmp® PCR System 2400

Perkin Elmer, Pfaffenhofen

GeneAmp® PCR System 9700

Perkin Elmer, Pfaffenhofen

Gel Dryer Model 583

Bio-Rad, München

Gradient Mat™ Gradientenmischer

Biocomp, München

Heizblock

Störktronic, Stuttgart

Holten LaminAir Model 1.2 Sterilbank

Thermo, Dreieich

Holten LaminAir Model 1.5 Sterilbank

Thermo, Dreieich

Horizontale Gelelektrophoreseapparatur

Eigenbau Institut Bio-
chemie, Würzburg

IKA® Combimag RC0 Magnetrührer	IKA, Staufen
IKA® Vibrax VXR basic	IKA, Staufen
Inkubator Function Line	Heraeus, Hanau
Inkubator Nunc™ Galaxy S	RS Biotech, Irvine (UK)
Innova® 4300 Inkubator Shaker Series	New Brunswick Scien., Nürtingen
Innova® 44 Inkubator Shaker Series	New Brunswick Scien., Nürtingen
Jouan VX490S -80 °C Freezer	Schilling, Leipzig
Kelvitron® † Bakterieninkubator	Heraeus, Hanau
Kühlzentrifuge 5414R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer	Gesellschaft für Labor- bedarf, Würzburg
Membran Vakuum Pumpe	Vacuubrand, Wertheim
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Jena
Mikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mikrowellenherd	Philips, Böblingen
Mithras LB 940 Luminometer	Berthold Techn., Bad Herrenalb
MyLab Sample Cooler SC-2	Esaote, Köln
NuPAGE® Novex Gel Kammer	Invitrogen, Karlsruhe
OPTIMA® L-80XP Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
OPTIMA® L-90K Ultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Pharmacia LKB ECPS 3000/150 Power Supply	Pharmacia, Berlin
PG Fip Piston Gradient Fractionator	Biocomp, München
Rundschüttler HT	Infors, Stuttgart
Savant Speed Vac SC110	Thermo, Dreieich
Semi-Dry-Blotapparatur	Eigenbau Institut Bio- chemie, Würzburg

Series900 mini-monitor	Perspective, Instrum., Wiltshire (UK)
Sonifikator	Heinemann, Schwä- bisch Gmünd
Specord 50 Photometer	Analytik Jena, Jena
Speed Vac Concentrator	Bachofer, Reutlingen
Stratagene MX3000P qPCR System	Stratagene, La Jolla (USA)
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
TKA-LAB-HP Millopore System	TKA, Niederelbert
TL-100 Tischultrazentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
Transcreen HE Verstärkerfolie	GE Healthcare, München
Transcreen LE Verstärkerfolie	GE Healthcare, München
Transilluminator	Peqlab, Erlangen
Überkopffrotor	Kisker, Mühlhausen
Vacupack Plus Vakuum Schweißer	Krupps, Offenbach
Varioclav® Dampfsterilisator	Hölzel, Hörlkofen
Vertikale Gelelektrophoreseapparatur	Eigenbau Institut Bio- chemie, Würzburg
Vortex Genie 2	Scientific Industrie, New York (USA)
Vortexer	Hartenstein, Würzburg
Vortexgerät	Bachofer, Reutlingen
Waage BL1500S	Sartorius Stedim, Göttingen
Waage PG8001-S	Mettler, Giessen
Wasserbad	Köttermann, Uetze
Zentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg

5.7.1. Rotoren

SW41Ti	Beckman Coulter, Krefeld
SW32Ti	Beckman Coulter, Krefeld
SW60Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Typ45Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Typ60Ti	Beckman Coulter, Krefeld
Typ70Ti	Beckman Coulter, Krefeld
TLA100.3	Beckman Coulter, Krefeld
JA25.5	Beckman Coulter, Krefeld
JA10	Beckman Coulter, Krefeld
JS 4.2	Beckman Coulter, Krefeld

6. Methoden

Die verwendeten Lösungen und Plastikgefäße wurden soweit nicht anders angegeben autoklaviert (20 min bei 120 °C) und alle Glasgeräte gebacken (2 h bei 150 °C).

6.1. Methoden zur Analyse von Nukleinsäuren

6.1.1 Aufreinigung und Isolierung

6.1.1.1. *Ethanol-fällung von Nukleinsäuren aus wässriger Phase*

Die Präzipitation von Nukleinsäuren aus wässriger Lösung erfolgte durch Zugabe von 0,1 Vol. 5 M NH₄OAc (pH 5,2) und 3 Vol. 96 % Ethanol für 1-24 h bei -20 °C. Das Präzipitat wurde durch Zentrifugation (17.000 g, 4 °C, 10 min) pelletiert, nach Abnahme des Überstandes mit 1 Vol. kaltem (-20 °C) 70 % Ethanol gewaschen und erneut zentrifugiert (13.000 g, 4 °C, 10 min). Das Nukleinsäurepellet wurde im Vakuum getrocknet und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen.

6.1.1.2. *Phenolextraktion von RNA*

Um RNA aus Zellextrakten oder Immunpräzipitaten von RNPs zu trennen, wurde 1 Vol. der Probe in 1 Vol. ddH₂O aufgenommen und mit 2 Vol. Phenol (Reinheitsgrad für die RNA-Extraktion) versetzt. Nach kurzem Mischen auf dem Schüttler wurden die Phasen durch Zentrifugation bei 13.000 rpm getrennt. Die obere wässrige Phase wurde abgenommen, die RNA daraus mittels Ethanolpräzipitation (6.1.1.1.) gefällt und das Pellet in einem geeignetem Volumen ddH₂O aufgenommen.

6.1.1.3. Reinigung radioaktiv markierter RNA aus denaturierenden Polyacrylamidgelen

Nach der Gelelektrophorese (6.1.3.) wurde das Gel in Frischhaltefolie eingewickelt und für 1 min gegen einen CEA RP NEW Medical X-ray Screen exponiert. Nach Unterlegen des belichteten Filmes wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 300 µl RNA-Elutionspuffer über Nacht bei RT unter Schütteln inkubiert. Das erhaltene Eluat wurde Ethanol präzipitiert (6.1.1.1.) und in einem geeigneten Volumen ddH₂O resuspendiert.

6.1.2. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Nukleinsäuren erfolgte UV-spektralphotometrisch auf Grundlage des Lambert Beer'schen Gesetzes:

$A = e \times c \times d$, wobei e den molaren Extinktionskoeffizienten darstellt.

Die Absorption (A) ist demnach proportional zur molaren Konzentration der absorbierenden Substanz (c) und der Länge des Lichtweges in cm (d). Wenn d 1 cm ist, entspricht eine Absorption von 1 einer Konzentration von 50 µg/ml für doppelsträngige DNA und 40 µg/ml für einzelsträngige RNA. Um die Reinheit der aufgereinigten Nukleinsäuren bestimmen zu können, wurde ein Absorptionsspektrum von 210–340 nm gemessen und die Differenz aus OD_{260}/OD_{280} berechnet. Eine OD_{260}/OD_{280} Differenz von 1,8 oder 2,0 deutet hierbei auf kontaminierende DNA oder RNA in der gemessenen Probe. Als Referenz diente das Lösungsmittel. Um eine passende Konzentration zwischen 0,05 und 50 µg/ml zu erreichen, wurden die Proben entsprechend verdünnt.

6.1.3. Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

6.1.3.1. **Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese**

Die denaturierende Agarose-Gelelektrophorese diente der Auftrennung von RNA für folgende Northern Blot Analysen (6.3.4.). Als denaturierendes Detergenz wurde Formaldehyd verwendet. Für das Agarosegel löste man die entsprechende Menge Agarose (w/v) in ddH₂O und kühlte die Lösung auf 60 °C. Daraufhin wurden 30 % (v/v) Formaldehyd und 10 % (v/v) 10x MOPS Puffer zugegeben und das Gel bei RT polymerisiert. 1 Vol. RNA-Probe wurde mit 2 Vol. RNA-Probenpuffer (denaturierend) versetzt, bei 65 °C für 15 min aufgeköcht und auf Eis überführt. Nach Zugabe von je 1 µl Ethidiumbromid und 2 µl MOPS Ladepuffer wurde die Probe durch Gelelektrophorese in 1x MOPS Puffer bei 50–110 V aufgetrennt und UV-spektrometrisch untersucht.

6.1.3.2. **Native Agarose-Gelelektrophorese**

Die Auftrennung von rRNA- oder DNA-Proben erfolgte in Ethidiumbromid-haltigen (0,5 µg/ml) Agarosegelen auf der Basis von 0,5x TBE-Puffer. Je nach Größe der zu trennenden DNA-Fragmente wurden 0,8 bis 1,0 % Agarosegele hergestellt. Für die Elektrophorese wurde eine Spannung von 110 V angelegt. Banden wurden bei langwelligem UV-Licht (302 nm) sichtbar gemacht und digital archiviert.

6.1.3.3. **Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese diente zur Auftrennung von kleineren RNA-Molekülen (keine rRNA oder mRNA). Für denaturierende RNA-Gelelektrophoresen wurden 6–10 % RNA-Polyacrylamid-Gele mit 8 M Harnstoff verwendet. RNA-Proben wurden maximal 1:5 mit denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und 3 min bei 95 °C erhitzt, um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen. Die Elektrophorese erfolgte bei 15–30 mA in 1x TBE.

6.1.3.4. Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für native RNA-Gelelektrophoresen wurden 6–7,5 % RNA-Polyacrylamidgele mit 4 % Glycerin verwendet. Die Proben wurden möglichst 1:1, maximal 1:2, mit nativem RNA-Probenpuffer versetzt und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 100–200 V für 4 h in 0,3 bzw. 0,5x TBE bei 4 °C, um mögliche Konformationsänderungen in der RNA oder den Proteinen aufgrund des sich erwärmenden Gels zu verhindern. Im Anschluss wurde das Gel für 12 h bei -80 °C gegen einen CEA RP NEW Medical X-ray Screen exponiert.

6.2. Methoden zur DNA-Analyse und -Präparation

6.2.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolation von Plasmiden aus *E. coli* Bakterien im kleinen Maßstab (Mini-Präp.) wurden 4 ml LB-Medium mit den entsprechenden Antibiotika (1:1000) versetzt, durch eine einzelne Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid oder NucleoSpin® Plasmid QuickPure Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt. Für die Isolierung von Plasmid-DNA in großem Maßstab (Midi-Präp) wurden das NucleoBond® Purification System oder PureYield™ Plasmid Midiprep System oder das Promega PureYield™ Plasmid Midiprep System verwendet.

6.2.2. Linearisierung von Plasmiden

Plasmid-DNA wurde als Template für *in vitro* RNA-Synthesen verwendet (6.3.1.). Hierzu linearisierte man das Plasmid durch Zugabe eines geeigneten Restriktionsenzym. 5 µg Plasmid-DNA wurden mit 15 Units Restriktionsenzym in entsprechendem 1x Restriktionspuffer bei 37 °C für 3–12 h inkubiert und über native Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt. Linearisierte DNA wurde mit

Hilfe des NucleoSpin® Extract II Kits aus dem Gel aufgereinigt und die Nukleinsäurekonzentration bestimmt (6.1.2.).

6.2.3. Amplifikation von DNA durch Polymerase Kettenreaktion (PCR)

6.2.3.1. *Amplifizierung von DNA-Fragmenten*

Zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Sämtliche Reaktionen wurden mit Pfu-, Taq- oder Phusion-Polymerase von MBI Fermentas nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Reaktionsansatz (50 µl):

5 µl	10x Polymerase Puffer
100 ng	Plasmid-DNA
1 µl	dNTPs (10 µM)
1 µl	5'-Primer (100 µM)
1 µl	3'-Primer (100 µM)
1 µl	DNA-Polymerase
Rest	ddH ₂ O

Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5 °C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur beider DNA-Oligonukleotide (Primer) gewählt. Alle anderen Temperaturen entsprachen den allgemeinen Standards für die verschiedenen Polymerasen (95 °C Denaturierung, 68–70 °C Elongation, etc.). In der Regel wurden 30 Reaktionszyklen durchgeführt. Zur Aufreinigung der erhaltenen PCR-Fragmente wurde das NucleoSpin® Extract II Kit verwendet.

6.2.3.2. Kolonie-PCR

Die PCR wurde des Weiteren zur Kontrolle transformierter Bakterienklone (6.2.4.5.) verwendet. Hierbei diente eine einzelne Bakterienkolonie an Stelle einer Plasmid-DNA als Template zur Amplifikation. Folgendes Protokoll wurde verwendet:

Reaktionsansatz (110 µl für 5 Kolonien):

55 µl	2x PCR Mastermix (Taq-Polymerase)
1,25 µl	5'-Primer (100 µM)
1,25 µl	3'-Primer (100 µM)
52,5 µl	ddH ₂ O

Dieser Reaktionsansatz wurde auf fünf PCR Gefäße aufgeteilt und jeweils eine Bakterienkolonie durch Picken einer Agarplatte zugegeben. Die Hybridisierungstemperatur wurde jeweils 5 °C unterhalb der niedrigeren Schmelztemperatur beider DNA-Oligonukleotide (Primer) gewählt. Alle anderen Temperaturen entsprachen den allgemeinen Standards für die verschiedenen Polymerasen (95 °C Denaturierung, 68–70 °C Elongation, etc.).

6.2.4. Klonierung von DNA in Plasmidvektoren

Die DNA-Klonierung dient der Produktion spezifischer DNA-Konstrukte in Bakterienzellen. Prinzipiell wird das zu klonierende DNA-Fragment in einen ausgewählten Plasmidvektor durch enzymatische Ligation eingefügt und das Ligationsprodukt in Bakterienzellen vermehrt. Hierzu müssen sowohl Vektor als auch DNA zuvor durch Restriktionsenzyme verdaut werden, um komplementäre Enden zu generieren. Um die Religation des Vektors zu verhindern wurde mit Hilfe einer alkalinen Phosphatase das 5'-Phosphat-Ende entfernt. Die dephosphorylierte Plasmid-DNA wird daraufhin mit dem DNA-Insert ligiert (T4 DNA Ligase) und ein zirkuläres DNA-Konstrukt generiert (cDNA). Das Ligationsprodukt wird in *E. coli* Zellen transformiert.

6.2.4.1. Restriktionsverdau von DNA

Zu je 1 µg DNA wurden 1 bis 3 Units Restriktionsenzym zugegeben. Die Dauer der Restriktionsspaltung betrug, bei der vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen optimalen Temperatur, mindestens 3 h. DNA Doppelspaltungen erfolgten in den geeigneten Puffern nach Angaben der Hersteller. Die DNA wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit aus den Reaktionsansätzen isoliert.

6.2.4.2. Dephosphorylierung von DNA-Enden mit alkalischer Phosphatase

Um bei ungerichteten Plasmid-Insert-Ligationen die Religation des Plasmids zu unterdrücken, wurden die freien Enden des Plasmids vor der Ligation möglichst vollständig dephosphoryliert. Die Dephosphorylierung wurde ohne Pufferwechsel direkt an die Linearisierung durch die geeignete Restriktionsendonuklease angeschlossen (6.2.4.1.). Dazu wurde der Restriktionsansatz mit 2 µl CIAP (1 Unit/µl), 10 µl 10x CIAP Puffer und 38 µl ddH₂O versetzt, 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 65 °C für 15 min abgebrochen. Die DNA wurde anschließend mit dem NucleoSpin® Extract II Kit aus den Reaktionsansätzen isoliert.

6.2.4.3. Ligation von DNA-Fragmenten

In einem Endvolumen von 20 µl wurden 50 bis 100 ng Plasmid-DNA, verdaut und dephosphoryliert (6.2.4.1. und 6.2.4.2.), und ein dreifacher bis zehnfacher molarer Überschuss des DNA-Fragments mit 2 µl 10x Ligasepuffer und 1 Unit T4 DNA-Ligase 3 h bei RT oder über Nacht bei 14 °C inkubiert. 5 µl des Ligationsansatzes wurden direkt zur Transformation kompetenter Zellen eingesetzt.

6.2.4.4. Präparation kompetenter Bakterienzellen

Hitzekompetente *E.coli* wurden nach der Methode von Hanahan (98) gewonnen. 1 ml LB-Medium wurde mit einer Bakterienkolonie beimpft und unter Schütteln über Nacht bei 37 °C inkubiert (180 rpm). Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml LB-Medium beimpft und bis zu einer optischen Dichte OD₆₀₀ 0,5 wachsen gelassen. Hatte die Kultur die geforderte Zelldichte erreicht, wurde die Zellsuspension auf Eis abgekühlt, in zwei 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt, 15 min auf Eis inkubiert und anschließend zentrifugiert (4.000 rpm, 4 °C, 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Sediment vorsichtig in 33,3 ml eiskalter TfbI Lösung resuspendiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien erneut abzentrifugiert (4.000 rpm, 4 °C, 5 min) und nach Entfernen des Überstandes in 8 ml eisgekühlter TfbII Lösung aufgenommen. Die hierdurch durch kompetent gemachten Bakterien wurden in 100 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und können so mehrere Jahre bei -80 °C gelagert werden.

6.2.4.5. Transformation kompetenter Bakterienzellen

Tiefgefrorene kompetente Bakterien wurden 10 min auf Eis aufgetaut und mit mindestens 10 ng DNA für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Hitzeschock für 90 Sekunden bei 42 °C behandelt und sofort wieder auf Eis transferiert. Nach weiteren 2 min wurden die Proben mit LB-Medium ohne Antibiotikum auf 500 µl aufgefüllt und zur Regeneration für 40 min bei 37 °C inkubiert. Die Zellen konnten dann entweder auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert werden.

6.2.4.6. Anlegen von *E. coli* Glycerol Kulturen

Zur Lagerung von transformierten Bakterien bei -80 °C wurden 650 µl einer dichtgewachsenen Kultur mit 350 µl Glycerol 86 % versetzt und in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Um Kulturen aus Gefrierstocks anzusetzen, wurde mit einer Pipettenspitze ein wenig der gefrorenen Bakterien abgekratzt und in Flüssigkultur aufgenommen.

6.2.5. Reverse Transkription (RT-PCR)

Das erstmals von H. Temin und später von D. Baltimore beschriebene Enzym Reverse Transkriptase, ermöglicht eine selektive Amplifikation von RNAs unter der gleichzeitigen Bildung stabiler cDNA (18, 236). Hierzu wurde eine gentechnisch veränderte Variante der Reversen Transkriptase des Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV-RT) mit reduzierter RNase H-Aktivität und verbesserter Thermostabilität verwendet (SuperScript® First Strand Synthesis Kit). Die Amplifikation der RNA erfolgte nach Angaben des Herstellers, wobei im Anschluss eine PCR, wie unter 6.2.3.1. beschrieben durchgeführt wurde.

6.2.6. Quantitative Real-Time PCR (qPCR)

Quantitative Real-Time PCR Analysen wurden mit Hilfe eines Stratagene MX 3000P Cyclers und des ThermoABsolute™ QPCR SYBR® Green nach Hersteller Angaben durchgeführt. Die verwendeten Primer wurden basierend auf Angaben der *universal probe library* der Firma Roche gewählt:

LARP4B-1	5'-GAAGAATTCCTTTGGCTACCG-3'
LARP4B-2	5'-AGACTGTGTCTGGCTGCTTG-3'
RPLP0-1	5'-TTCCAGGCTTAGGTATCAC-3'
RPLP0-2	5'-ACTTCAGGGTTGTAGATG-3'
pRF-1	5'-GCCTCGTGAAATCCCGTTAGTAAAAGG-3'
pRF-2	5'-GGAAACTTCTTGGCACCTCAACAATAGC-3'

PCR-Reaktionen erfolgten nach einem initialen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 1 min in 40 Zyklen von 95 °C für 30 s, und 60 °C für 30 s. Die einzelnen Reaktionen wurden in dreifacher Ausführung und zur Kontrolle jeweils 1 mal ohne cDNA analysiert. Die erhaltenen Werte wurden daraufhin anhand des Schwellenwerts der exponentiellen Reaktion gewählt und auf die Transkription von GAPDH normiert. Hierzu wurden die Mittelwerte der Einzelreaktionen gebildet, von diesen der jeweilige Wert von GAPDH subtrahiert woraufhin die erhaltenen Werte n nach der Beziehung $2^{(-n)}$ die auf die Transkription von GAPDH normierten Transkriptionslevel der zu untersuchenden RNA-Spezies ergaben (191).

6.3. Methoden zur RNA-Analyse

6.3.1. *In vitro* Transkription

Mit Hilfe der DNA-abhängigen RNA-Polymerase aus dem Bakteriophagen T7, T3 bzw. SP6 lassen sich DNA Sequenzen, die unter Kontrolle des entsprechenden Promotors stehen, *in vitro* transkribieren (165). In einem Volumen von 100 µl wurden 1-2 µg linearisierte Plasmid-DNA in folgendem Reaktionsmix für mindestens 6 h bei 37 °C inkubiert. Die Transkripte wurden, wenn gewünscht, durch Zugabe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ radioaktiv markiert.

Reaktionsansatz (100 µl):

500 ng	DNA
20 µl	5x Transkriptionspuffer
3 µl	ATP (100 mM)
3 µl	GTP 100 mM)
3 µl	CTP (100 mM)
3 µl	UTP (100 mM) oder $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-UTP}$ (10 µCi/µl)
3 µl	RNA-Polymerase
1,5 µl	RNAsin (10 Units/µl)

3 µl	DTT (0,1 M)
Rest	ddH ₂ O

Nach der Reaktion wurde der Ansatz mit denaturierendem RNA-Probenpuffer versetzt und zur Aufreinigung auf einem denaturierenden RNA-Gel aufgetrennt (6.1.3.3.).

6.3.2. Capping von *in vitro* generierten Transkripten

Zur Generierung m⁷G gecappter RNA, wurde das ScriptCap™ m⁷G Capping System verwendet. 10 µg *in vitro* Transkript wurden auf 13,5 µl mit ddH₂O aufgefüllt und für 10 min bei 65 °C die RNA denaturiert. Daraufhin wurde folgender Reaktionsmix zugegeben:

2 µl	10x Scrit Capping Puffer
2 µl	10 mM GTP
1 µl	2 mM SAM
0,5 µl	Script Guard RNase Inhibitor
1 µl	Script Cap Capping Enzyme

Nach Inkubation für 90 min bei 37 °C wurde die gecappte RNA Phenol-extrahiert (6.1.1.2.) und Ethanol gefällt (6.1.1.1.), 1 µl der Probe gelelektrophoretisch aufgetrennt (6.1.3.2.) und UV-spektrometrisch untersucht.

6.3.3. 5'-End-Markierung von RNA

RNAs zu EMSA-Zwecken oder RNA-Hybridisierungs sonden wurden durch 5'-End-Markierung radioaktiv markiert. Hierzu wurde folgender Reaktionsansatz für 45 min bei 37 °C inkubiert:

3 µl	γ-[³² P]-ATP (10 µCi/µl)
1 µl	10x PNK-Puffer A
1 µl	T4 PNK

1 µl RNA Template (10 pmol/µl)
4 µl dd H₂O

Die Proben wurden in denaturierendem RNA-Probenpuffer aufgenommen und bei 70 °C für 10 min denaturiert. Nach Auftrennung der Proben mittels denaturierender RNA-Gelelektrophorese, wurden die jeweiligen RNAs aus dem Gel aufgereinigt (6.1.1.3.) und in geeignetem Volumen ddH₂O resuspendiert.

6.3.4. Northern Blot

Zum Nachweis quantitativer Mengen bestimmter RNAs wurden Northern Blot Analysen durchgeführt. Hierzu wurde die zu untersuchende Probe zunächst über ein denaturierendes Agarose- bzw. Polyacrylamidgel aufgetrennt (6.1.3.1. und 6.1.3.3.) und auf eine Hybond™-N + Nylon Transfermembran übertragen. Je nach Auftrennverfahren durch denaturierende Agarose Blot Technik (6.3.4.1.) oder elektrophoretisch (6.3.4.2.). Transferierte RNAs wurden daraufhin in einem UV-Crosslinker bei 240 mJ/cm² fixiert. Zur Detektion der gesuchten RNA wurde die Membran mit Amersham Rapid-hyb™ Buffer bei 42 °C in einem Hybridisierungsofen für 2 h vorinkubiert und mit der radioaktiv markierten Oligonukleotid-Sonde in Amersham Rapid-hyb™ Buffer für 2-12 h bei 42 °C hybridisiert. Nach Abnahme der Sonde wurde die Membran 3 mal mit 1x SSC-Puffer gewaschen und anschließend autoradiographisch analysiert.

6.3.4.1. Denaturierender Agarose Blot

Der Transfer von großen RNA-Molekülen, die durch ein denaturierendes Agarose Gel getrennt wurden, erfolgte durch passiven Abwärtstransfer (Aufbau siehe auch www.ambion.com). Als Transfer Puffer diente 5x SSC/10 mM NaOH. Folgender Aufbau wurde verwendet:

Platte mit ca. 300 g Gewicht
Whatman 3 MM-Filterpapier Brücke zum Puffer Reservoir
Stapel saugfähiges Zellpapier
denaturierendes Agarose Gel
Hybond™-N + Nylon Transfermembran
Stapel saugfähiges Zellpapier
Tablett

Der Transfer bei RT erfolgte über Nacht.

6.3.4.2. Elektrophoretischer Polyacrylamid Blot

Zum Blotting eines Polyacrylamidgeles wurde folgender Aufbau in einer Semi-Dry-Blotapparatur verwendet:

3 Whatman 3 MM-Filterpapiere (1x TBE)
Hybond™-N + Nylon Transfermembran (1x TBE)
denaturierendes Polyacrylamidgel
3 Whatman 3 MM-Filterpapiere (1x TBE)

Der Transfer erfolgte bei 400 mA für 1 ¼ Stunden.

6.3.5. RNA-Protein UV-Crosslink

Zur Detektion der Bindung spezifischer RNA-Moleküle mit Proteinen aus Rohextrakten von HEK293-Zellen wurden UV-Quervernetzungsexperimente (UV-Crosslink) durchgeführt. Hierzu wurden HEK293- oder COS7-Zellen auf 14 cm² Kulturschalen bis zu einer Dichte von 70-80 % wachsen gelassen, mit 10 ml kaltem 1x PBS gewaschen und mit 10 ml 1x PBS beschichtet. In einem UV-Crosslinker wurden die Schalen mit 200-400 mJ/cm² UV bestrahlt, abgeschabt und zentrifugiert (2.500 rpm, 3 min, 4 °C). Das PBS wurde abgesaugt, die Zellen in 500 µl kaltem 1x PBS resuspendiert, in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und abermals zentrifugiert (13.000 rpm,

10 s, 4 °C). Der Überstand wurde abgenommen, die Pellets in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert.

6.3.6. Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay (EMSA)

EMSA-Studien wurden zum Nachweis der Bindung rekombinant hergestellter Proteine an RNA/DNA unter nativen Bedingungen herangezogen. Hierbei wird ein gebildeter RNA-Proteinkomplex in Relation zur freien RNA in einem nativen Polyacrylamidgel stärker retardiert und so durch „Bandenshift“ als solcher erkennbar. [³²P]-markierte RNA oder DNA (6.3.3.) wurde hierzu mit verschiedenen Mengen des zu untersuchenden Proteins für 60 min bei 0 °C in EMSA-Puffer oder 1x PBS Puffer unter Zugabe von je 1 µg BSA und 5 Units RNAsin inkubiert. Nach Zugabe von nativem RNA-Probenpuffer wurden die Proben unverzüglich durch native PAGE aufgetrennt (6.1.3.4.) und autoradiographisch analysiert.

6.4. Methoden zur Analyse von Proteinen

6.4.1. Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte entweder anhand eines Vergleichs einer gereinigten Proteinprobe mit einem Rinderserumalbumin-Standard (BSA) im Coomassie gefärbten SDS-PAGE oder nach der Methode von Bradford (34). Zur Messung wurde zunächst mit Hilfe des Bio-Rad Protein Assay eine Eichkurve über 0,5 µg, 1 µg, 2 µg, 3 µg, 4 µg und 5 µg BSA erstellt. Parallel wurden 2 µl Probe auf 798 µl ddH₂O gegeben und mit 200 µl Bradford-Reagenz versetzt. Als Referenz wurde der Probenpuffer verwendet. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur bestimmte man daraufhin die Konzentration der Probe bei 595 nm.

6.4.2. Diskontinuierliche Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Bei der diskontinuierlichen Gelelektrophorese (140) werden Proteine zunächst in einem niederprozentigen Sammelgel fokussiert und anschließend in einem höherprozentigen Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Zur Herstellung eines Gels wurde die Trenngellösung direkt nach Zugabe von TEMED und APS luftblasenfrei zwischen zwei Glasplatten bis zu einer Höhe von 2 cm vom oberen Rand gegossen und zur Glättung der Gelkante vorsichtig mit Isopropanol überschichtet. Nach Polymerisation des Trenngels und Entfernen des Isopropanols wurde das Sammelgel eingegossen und ein geeigneter Taschenformer eingesetzt. Die zu analysierenden Proteinproben wurden SDS-Probenpuffer versetzt, 3 min bei 95 °C denaturiert und in die zuvor mit 1x Lämmli Puffer gespülten Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte entweder in einer Bio-Rad Mini PROTEAN® 3 Cell Gelkammer bei 40 mA oder einer vertikalen Gelelektrophorese-Apparatur bei 65 mA.

6.4.3. pH-neutrale Gradienten-Gelelektrophorese (Novex NuPAGE®)

Zur pH-neutralen Auftrennung von nativen und RNA vernetzten Proteinen (Crosslink siehe 6.3.5.) wurde das Novex NuPAGE® System eingesetzt. Verwendet wurden die zugehörigen bereits fertig gegossenen NuPAGE® 4-12 % Bis-Tris Gradientengele (1,0 mm). Als Laufpuffer diente 1x NuPAGE MOPS SDS Running Puffer. Die Proben wurden in 15 µl PNK-Puffer aufgenommen, mit 15 µl NuPAGE® LDS Sample Puffer versetzt und auf das eingespannte Gradientengel geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 80-120 V. Bei Bedarf (reduzierende Bedingungen) setzte man 10 % (v/v) NuPAGE® Reducing Agent zur Probe und 0,25 % (v/v) NuPAGE® Antioxidant zum Laufpuffer zu.

6.4.4. Coomassie-Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Das SDS-Gel wurde nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine für 30 min in Coomassie-Färbelösung inkubiert und anschließend unter mehrmaligem Wechsel der Entfärbelösung bis zum Erreichen des optimalen Kontrasts entfärbt. Das Gel wurde digital archiviert und zur dauerhaften Fixierung zwischen einem Whatman 3 MM-Filterpapier und Frischhaltefolie auf dem Geltrockner 40 min bei 80 °C getrocknet.

6.4.5. Silberfärbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Die Färbung von SDS-Gelen mit Silber weist gegenüber der Coomassie-Färbung eine wesentlich höhere Sensitivität mit einer Nachweisgrenze von 50-100 pg Protein je Bande auf. Darüber hinaus eignet sich diese erstmals von Merrill *et al.* 1981 etablierte Methode für eine anschließende massenspektrometrische Analyse des Gels (163). Zur Fixierung der Proteine wurde das Gel nach SDS-PAGE-Auftrennung der Proteine 1-12 h in Fixierlösung inkubiert. Anschließend wurde das Gel 3 mal für 20 min mit 50 % Ethanol p.a. gewaschen, für eine Minute in 0,02 % (w/v) Natriumthiosulfatlösung inkubiert und 3 mal mit ddH₂O für je 20 s gewaschen. Das Gel wurde dann für 20 min in Silbernitratlösung imprägniert, 2 mal 20 s mit ddH₂O gewaschen und durch Zugabe von Natriumcarbonatlösung entwickelt. Nach gewünschter Farbtintensität wurde das Gel kurz mit ddH₂O gespült und die Reaktion mit Fixierlösung (ohne Formaldehyd) gestoppt. Zur Lagerung wurde das Gel in 50 % (v/v) Methanol überführt und dokumentiert.

6.4.6. Autoradiographie von Elektrophoresegelen

Durch Autoradiographie können radioaktiv markierte Proteine (oder Nukleotide) auf einem Röntgenfilm nachgewiesen werden. Da die Emissionsenergie meist relativ schwach ist und der *Quenching*-Effekt der Gelmatrix die Emissionsenergie zusätzlich mindert, kann die Detektionseffizienz

nach der Auftrennung der Proteine unter Verwendung von Szintillatoren gesteigert werden (Bonner und Laskey, 1974). Das Prinzip der Szintillation beruht darauf, dass die ausgesendeten Elektronen über Lösungsmittelmoleküle Fluorophore anregen, deren Fluoreszenz dann durch Photomultiplier gemessen wird oder zur Schwarzfärbung eines Röntgenfilms führt. Zur Sichtbarmachung radioaktiv [³⁵S]-markierter Proteine oder [³²P]-markierter RNA/DNA wurden die Gele zunächst bei 80 °C unter Vakuum getrocknet, in eine entsprechende Entwicklerkassette überführt und zur Verstärkung der radioaktiven Signale in „Transcreen HE-“ (für [³²P]) oder „Transcreen LE-“ (für [³⁵S]) (Amersham Pharmacia Biotech) Verstärkerfolie eingeschlagen. Die Gele wurden bei -80°C für 12-48 h gegen einen Röntgenfilm exponiert.

6.4.7. Proteinpräzipitation

6.4.7.1. Proteinpräzipitation mit Aceton

Zur Präzipitation von Proteinen aus Phenolphasen (6.1.1.2.) wurden zu diesen das 5 fache Volumen eiskaltes Aceton zugegeben und bei 4 °C für 12-24 h inkubiert. Präzipitierte Proteine wurden durch Zentrifugation (16.000 rpm, 4 °C, 30 min) pelletiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde getrocknet und in einer geeigneten Menge Puffer aufgenommen.

6.4.7.2. Proteinpräzipitation mit TCA

Das 0,1-0,2 fache Volumen an TCA wurde zu der Probe gegeben und diese für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Pelletieren bei 13.000 rpm für 30 min bei 4 °C wurde das Pellet mit TCA-Waschpuffer gewaschen und abermals zentrifugiert (13.000 rpm, 10 min, 4 °C). Dieser Schritt wurde so lange wiederholt, bis sich der Waschpuffer (enthält pH-Indikator) nicht mehr gelb verfärbte sondern blau blieb. Das Pellet wurde getrocknet und resuspendiert.

6.4.8. Western Blot und Immunoblot Analyse

Mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteine und Proteinkomplexe können zur weiteren, spezifischeren Charakterisierung auf eine Membran übertragen werden. Dieses als Western Blotting bezeichnete Verfahren wurde 1979 von Towbin et *al.* entwickelt und zur Verwendung von Polyvinylidendifluorid (PVDF) Membranen durch Gültiken erweitert (93, 240). Für den Transfer wurde eine Semi Dry Blotapparatur verwendet. Das SDS-Gel wurde zwischen je 3 Lagen, in 1x Towbin Puffer getränktem Whatman 3 MM-Filterpapier auf einer Nitrozellulose Membran platziert. Der Transfer erfolgte 2 h bei Raumtemperatur und 0,8 mA je cm² Gelfläche.

Zur Blockierung aller potentiellen unspezifischen Antikörperbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran nach dem Blotvorgang wurde diese mindestens 1 h bei Raumtemperatur in Blockierlösung (1x PBS-T mit 5 % (w/v) Magermilchpulver) unter Schwenken inkubiert. Nach Waschen mit 1x PBS-T wurde der, gegen das nachzuweisende Protein gerichtete Primärantikörper in einer geeigneten Verdünnung (1x PBS-T) auf die Membran gegeben und für 1 h bei Raumtemperatur bzw. 12 h bei 4 °C geschwenkt. Nach Entfernen von ungebundenen Primärantikörpern durch Waschen mit 1x PBS-T, konnte ein, gegen den ersten Antikörper gerichteter, an Peroxidase gekoppelter Zweitantikörper (in 1x TBT verdünnt) für 1 h bei Raumtemperatur auf der Membran inkubiert werden. Ungebundener Sekundärantikörper wurde anschließend erneut gewaschen. Die Sichtbarmachung der spezifischen Proteine erfolgte mit Luminol. Dafür wurden 10 ml Luminol mit 100 µl Cumarinsäure und 8 µl H₂O₂ (30 %) gemischt, die Membran für eine Minute in dieser Lösung inkubiert und anschließend gegen einen Röntgenfilm exponiert.

6.4.9. Interaktionsassays

6.4.9.1. **Immunopräzipitation**

Durch Immunpräzipitation können Antigene und ihre Komplexpartner spezifisch und selektiv isoliert werden. Alle Schritte wurden bei 4 °C oder auf Eis unter Verwendung vorgekühlter Lösungen und Zentrifugen ausgeführt. Zunächst wurde der spezifische Antikörper durch Bindung an Protein G-Sepharose immobilisiert. Hierzu wurden 50 µl Protein G-Sepharose 3 mal mit je 600 µl IP-Puffer gewaschen, um restliches Ethanol zu entfernen und mit 400 µl IP-Puffer überschichtet. Nach Zugabe von ca. 1-3 µg des spezifischen Antikörpers wurde der Ansatz 1-12 h (Überkoprotator) bei 4 °C inkubiert. Durch anschließendes 3 maliges Waschen mit je 600 µl IP-Puffer wurden ungebundene und unspezifisch an der Gefäßwand haftende Antikörper beseitigt. Zur Antigen-Antikörperkomplexbildung (Immunpräzipitation) wurden entweder 400 µl IP-Puffer und 10 µl *in vitro* translatierte, [³⁵S]-markierte Proteine (6.4.11.), oder 1 ml des entsprechenden Extraktes (6.7.2.) zugegeben und für 1-12 h inkubiert (Überkoprotator, 4 °C). Nach erneutem Waschen (3 mal, IP-Puffer) wurde eine geeignete Menge Sepharose in SDS-Probenpuffer aufgenommen, 3 min bei 95 °C denaturiert und mittels SDS-PAGE (6.4.2.) und Western Blot (6.4.8.) analysiert.

6.4.9.2 **Protein Pulldown Assay**

Für Bindungsexperimente wurde eine Komponente jeweils rekombinant als GST-Fusion exprimiert (6.4.10.) und immobilisiert, während die anderen Komponenten in Form von *in vitro* translatierten Proteinen (6.4.11.) zugegeben wurden. 2 µg des jeweiligen, mit GST fusionierten, immobilisierten Polypeptides wurden dazu mit 10 µl *in vitro* translatierten, [³⁵S]-markierte Proteinen in 400 µl Pulldownpuffer (+ 1 mg/ml BSA) für 1-2 h bei 4 °C auf dem Überkoprotator inkubiert. Durch 3 maliges Waschen mit Pulldownpuffer/BSA gefolgt von 3 maligem Waschen mit Pulldownpuffer ohne BSA wurden ungebundene

Faktoren entfernt und die Sepharose vollständig drainagiert. Die an der Matrix gebundenen Komplexe wurden dann durch Zugabe von SDS-PAGE-Probenpuffer eluiert und mittels SDS-PAGE (6.4.2.), anschließender Coomassie-Färbung (6.4.4.) und Autoradiographie (6.4.6.) analysiert.

6.4.9.3. CLIP Assay

Der Crosslinking and Immunoprecipitation Assay (CLIP) dient der Isolierung *in vivo* kovalent gekoppelter Protein-RNA-Komplexe zur gezielten Identifikation von RNA-Bindemotiven eines definierten Proteins (120, 244, 245, 251).

Hierzu wurden zunächst HEK293- oder COS7-Zellen auf 14 cm² Schalen bis zu einer Konfluenz von max. 80 % kultiviert, *in vivo* kovalent in einem UV-Crosslinker vernetzt und pelletiert (6.3.5.). Die Pellets wurden in je 1,5 ml CLIP Lysepuffer resuspendiert (+ 1:1000 Proteaseinhibitoren, 10 Units RNasin) und 20 min auf Eis lysiert. Man stellte währenddessen folgende RNase-Stocklösungen her:

RNase low: 1:500 RNase I in CLIP Lysepuffer

RNase high: 1:50 RNase I in CLIP Lysepuffer

Nach der Lyse versetzte man die Extrakte mit 10 µl/ml RNase-Stocklösung low bzw. high, sowie 5 µl/ml RQ1 DNase und inkubierte bei 37 °C für 20 min. Die Extrakte wurden daraufhin zentrifugiert (13.000 rpm, 4 °C, 3 min).

Für die Immunpräzipitation verwendete man je 100 µl Protein G-Sepharose, wusch diese 3 mal mit je 600 µl 1x PBS/0,01 % (v/v) NP40 und inkubierte die Protein G-Sepharose mit einer geeigneten Menge an Antikörper bzw. PIS für 2-12 h bei 4 °C auf dem Überkoprotator in 400 µl 1x PBS/0,01 % (v/v) NP40. Ungebundene Antikörper wurden durch 3 maliges Waschen mit je 600 µl 1x PBS/0,01 % (v/v) NP40 entfernt.

Folgende Reaktionsansätze wurden hergestellt:

- (a) 1,5 ml RNase low Extrakt, Antikörper an Protein G-Sepharose
- (b) 1,5 ml RNase high Extrakt, Antikörper an Protein G-Sepharose
- (c) 1,5 ml RNase low Extrakt, PIS an Protein G-Sepharose

Die Reaktionsansätze wurden für 2-12 h bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeweils 2 mal mit je 600 µl CLIP Hochsalzpuffer und 2 mal mit je 600 µl CLIP PNK-Puffer gewaschen. 5 µl der Protein G-Sepharose wurden zur Kontrolle der Immunpräzipitation in SDS Probenpuffer aufgenommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt (6.4.2.) und mittels Western Blot analysiert (6.4.8.). Die PNK-Markierung wurde wie folgt durchgeführt:

8 µl	10x T4 PNK Probenpuffer A
3 µl	T4 PNK
2 µl	γ -[³² P] ATP
65 µl	ddH ₂ O

Zur radioaktiven Markierung wurden die Ansätze für 30 min bei 37 °C inkubiert, wobei alle 10 min für 10 s bei 1.000 rpm geschüttelt wurde. Daraufhin wurden je 10 µl 1 mM ATP (kalt) dazu gegeben und erneut bei 37 °C für 10 min inkubiert. Es wurde auf 16 °C abgekühlt, 2 mal mit 700 µl CLIP Hochsalz-Puffer, 2 mal mit 900 µl CLIP PNK-Puffer gewaschen und je Ansatz 30 µl 1x Ligationpuffer zu der Protein G-Sepharose gegeben. Es folgte die 5'-Adapter-Ligation (244) über Nacht bei 14 °C (alle 10 min 1.000 rpm für 10 s):

5 µl	5'-Adapter (20 µM)
7,5 µl	PEG 6000 (50 %)
1,5 µl	10x Ligationpuffer
0,75 µl	BSA (0,2 µg/µl)
0,25 µl	T4 RNA Ligase

Die Protein G-Sepharose wurden mit 900 µl CLIP PNK-Puffer gewaschen und mit 30 µl Phosphatase Mix folgender Zusammensetzung versetzt:

3 µl	10x FAST AP Puffer
6 µl	0,5 % (v/v) Tween
20 µl	ddH ₂ O
1 µl	FAST AP

Es wurde bei 37 °C für 20 min bei 1.000 rpm inkubierte, 2 mal mit je 900 µl CLIP PNK-Puffer gewaschen und die Proben mit je 15 µl CLIP PNK-Puffer und 15 µl NuPAGE® LDS Sample Puffer versetzt. Gebundene Protein-RNA-Komplexe wurden auf einem NuPAGE®Novex 4-12 % Bis-Tris Gel (1,0 mm) aufgetrennt (80-120 V), auf eine BioTrace NT™ Pure Nitrocellulosemembran geblottet (6.4.8.) und bei -80 °C für 1-3 h autoradiographisch detektiert.

Radioaktiv markierte Bereiche der Membran, die dem Laufverhalten des Proteins entsprachen, wurden ausgeschnitten und mittels Proteinase K gebundene RNAs ausgewaschen. Dazu versetzte man die Membranstücke zunächst mit 200 µl einer vorgewärmten Proteinase K-Lösung (2 mg/ml in CLIP PK-Puffer), inkubierte für 20 min bei 37 °C und 1.000 rpm, gab dann jeweils 200 µl einer vorgewärmten 7 M Urea Lösung (in CLIP PK-Puffer) zu und inkubierte erneut bei 60 °C und 1.000 rpm für 20 min. Die Reaktionsansätze wurden auf 37 °C gekühlt und mit 540 µl Rotiphenol versetzt. Nach Schütteln und Zentrifugation (6.1.1.2.) wurden 300 µl der wässrigen Phase in ein neues 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und enthaltene RNA Ethanol-präzipitiert (6.1.1.1.).

Die RNA wurde pelletiert, mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet und in 2,6 µl 50 µM 3'-Adapter (244) resuspendiert. Für die 3'-Adapter-Ligation wurde folgender Ansatz pipettiert:

4 µl	PEG 6000 (25 %)
0,8 µl	10x Ligationspuffer
0,4 µl	BSA (0,2 µg/µl)

0,2 µl T4 RNA Ligase

Der Adapter wurde über Nacht bei 14 °C ligiert. Nach Zugabe von denaturierendem RNA-Probenpuffer wurden die Proben auf einem 8 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (6.1.3.3.) und Bereiche der Größe 100-200 Nukleotide ausgeschnitten. Nach Elution der RNA aus den Gelfragmenten (6.1.1.3.) wurde diese mit Ethanol gefällt (6.1.1.1.), mit 500 µl 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in folgendem Ansatz resuspendiert:

18 µl ddH₂O
0,4 µl RQ1 DNase
2 µl 10x DNase Puffer

Es wurde bei 37 °C für 10 min inkubiert, 2 µl DNase Stopp zugegeben, 2 min bei 1.000 rpm und 37 °C geschüttelt und die RNA Phenol extrahiert (6.1.1.2.)/Ethanol gefällt (6.1.1.1.). Mit Hilfe des SuperScript® First Strand Synthesis Kits wurde eine RT-PCR gemacht (6.2.5.) und die generierte DNA in einer folgenden PCR vermehrt (6.2.3.). Als Primer wurden die in Ule et al. beschriebenen Nukleotide verwendet (244). Nach Aufreinigung der PCR (6.2.5.) ligierte man die erhaltene DNA mittels des TA Cloning® Kit in den dazugehörigen pCR®2.1 Vektor nach Herstellerangaben (6.2.4.). Positive Klone wurden gepickt und entweder direkt als Kulturen in 96 Well Multiwell Platten oder nach Mini-Präparation (6.2.1.) zum Sequenzieren an entsprechende Firmen versendet.

6.4.9.4. Oligo (dT)-Aufreinigung mRNA-assoziierter mRNPs

Zytoplasmatische mRNAs weisen distinkte 5'- und 3'-Modifikationen auf: (a) eine 5'-Cap-Struktur und (b) ein polyadenyliertes 3'-Ende. Diese Modifikationen können genutzt werden, um mRNAs gezielt zu isolieren. Eine Methode hierzu ist die Verwendung von Oligo (dT)-Zellulose. Diese besitzt auf ihrer Oberfläche verankerte Oligo (dT)-Seitenketten, die in der Lage sind

spezifisch an den 3'-Poly (A)-Schwanz der mRNAs zu binden und diese somit an der Zellulose zu immobilisieren. Neben der eigentlichen mRNA können so auch mRNA-assoziierte mRNPs isoliert werden.

Für diese Aufreinigung wurden zunächst 40 mg der Zellulose in Oligo (dT)-Elutionspuffer für 15 min bei RT aufgequollen und in eine Säule überführt. Zur Äquilibrierung und Aktivierung wurde diese daraufhin 7 mal mit je 10 ml Oligo (dT)-Bindepuffer bei RT gewaschen. 2 ml der auf zu reinigenden Probe (HEK293-Zellextrakt oder Gesamt-RNA) wurden auf 500 mM NaCl eingestellt und für 90 min bei RT mit der Zellulose auf einem Überkoprotator inkubiert. Der Überstand wurde gesammelt, die Säule 3 mal mit je 1 ml Oligo (dT)-Bindepuffer gewaschen und gebundene mRNAs durch 3 malige Elution mit je 500 µl Oligo (dT)-Elutionspuffer isoliert. Die Wasch- und Elutionsfraktionen wurden Phenol-extrahiert (6.1.1.2.), Proteine Aceton- (6.4.7.1.) und RNA Ethanol-gefällt (6.1.1.1.). Isolierte Proteine wurden mittels Western Blot analysiert (6.4.8.) und RNA auf einem Agarosegel visualisiert (6.1.3.1.).

6.4.9.5. Elution Cap-bindender Komplexe durch m⁷G-Sepharose

Ein weiteres Verfahren zur gezielten Isolierung mRNA-assoziiierter mRNPs ist die Verwendung von 7-Methyl GTP-Sepharose™ 4B. Diese entsprechen der Struktur der mRNA 5'-Cap und kompetitieren so die Interaktion Cap-bindender Faktoren.

Pro Ansatz wurden 50 µl m⁷G-Sepharose verwendet. Diese wurden zunächst 3 mal in je 600 µl 1x PBS/0,01 % (v/v) NP40 gewaschen und der zu präzipitierende Extrakt (HEK293, HeLa oder FlpTRex-LARP4B) für 90 min bei 4 °C auf dem Überkoprotator inkubiert. Die m⁷G-Sepharose wurden abzentrifugiert (3.000 rpm, 2 min, 4 °C), der Extrakt abgenommen und 3 mal mit 1x PBS/0,01 % (v/v) NP40 gewaschen. Nach Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer wurden gebundene Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt (6.4.2.) und mittels Western Blot (6.4.8.) oder Silberfärbung (6.4.5.) analysiert.

6.4.10. Proteinexpression und -aufreinigung

6.4.10.1 Expression rekombinanter Proteine in *E. coli*

Zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die entsprechenden Plasmid Konstrukte in einen geeigneten BL21 *E. coli* Stamm (6.2.4.5.) transformiert und eine Einzelkolonie auf 200 ml Superbroth-Medium (SB) mit 1:1000 Ampicillin (100 mg/ml)/ Chloramphenicol (30 mg/ml) für GST-Fusionsproteine oder Kanamycin (25 mg/ml) für His-Fusionsproteine überimpft. Für die Expression von GST-LARP4B wurden zusätzlich 5 % (w/v) Glukose zum Medium gegeben. Nach 24 h Inkubation für 12 h bei 37 °C im Bakterenschüttler wurden jeweils 2 l SB aus den Vorkulturen angeimpft und nach einer exponentiellen Wachstumsphase die Proteinexpression bei einer OD₆₀₀ von 0,5-1,0 mit 1 mM IPTG induziert. Nach 4-12 h bei 15 °C wurden die Zellen abzentrifugiert (4.500 g, 10 min, 4 °C) und direkt weiter aufgearbeitet bzw. bei -80°C gelagert.

6.4.10.2 Affinitätsaufreinigung von GST-Fusionsproteinen

Alle Schritte wurden zur Verminderung von Proteaseaktivität auf Eis bzw. in vorgekühlten Zentrifugen durchgeführt. Proteine wurden rekombinant als GST-Fusion in *E. coli* exprimiert (6.4.10.1.) und daraus gereinigt. Zur Aufreinigung wurde das Bakterienpellet in 40 ml GST-Aufschlusspuffer 1 oder 2 aufgenommen. Bei Expression in *E. coli* ohne integrierte Lyseaktivität wurden 5 mg/ml Lysozym zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert. Ein zusätzlicher Zellaufschluss erfolgte durch Sonifikation mit einem Branson Sonifier 250 in 3 Zyklen a 90 s, gefolgt von 30 s Pause auf Eis. Die aufgebrochenen Bakterienzellen wurden zur Abtrennung der Zelltrümmer 45 min bei 25.000 rpm zentrifugiert. 100-1000 ml Glutathion-Sepharose (Kapazität 10 mg Protein je ml) wurden 1 mal in ddH₂O und 2 mal in Aufschlusspuffer gewaschen und anschließend mit dem Bakterienlysat für 3 h bei 4 °C auf einem Überkoprotator inkubiert. Das immobilisierte Protein wurde 3 mal mit dem

jeweiligen Aufschlusspuffer gewaschen. Zur Elution wurde die Glutathion-Sepharose in GST-Elutionspuffer für 20 min bei 4 °C inkubiert. Alternativ wurde der GST-Fusionsanteil mit Hilfe eines PreScission-Protease-Verdau entfernt, um so dessen potentiell störenden Einfluss in folgenden Assays zu verhindern. Vorteilhaft bei dieser Methode erweist sich die Präzision der Protease, deren Schnittstelle im Expressionsvektor des Fusionsproteins kodiert wird, sowie deren Verbleiben an der Matrix nach der Reaktion. Hierzu wurde das immobilisierte GST-Protein mit einer geeigneten Menge PreScission-Protease für 2-16 h bei 4 °C inkubiert. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (6.4.2.) und Coomassie-Färbung (6.4.4.) analysiert und gegen 1x PBS bzw. die benötigten Puffer dialysiert (6.4.10.5.). Zur weiteren Verwendung wurden die Proteine bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

6.4.10.3. Affinitätsaufreinigung von His-Fusionsproteinen

His-Fusionsproteine wurden rekombinant in *E.coli* exprimiert, zentrifugiert, die Bakterienpellets in 40 ml His-Aufschlusspuffer aufgenommen und wie unter 6.4.10.2. beschrieben aufgereinigt. An Stelle der in 6.4.10.2. verwendeten Glutathion-Sepharose wurde ProBond Nickel-Chelating Resin (Kapazität 5 mg Protein je ml) zur Immobilisierung verwendet. Die Elution erfolgte bei 6x-His-Fusionsproteinen durch Zugabe von 300 mM Imidazol. Die erhaltenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE (6.4.2.) und Coomassie-Färbung (6.4.4.) analysiert und gegen 1x PBS bzw. die benötigten Puffer dialysiert (6.4.10.5.). Zur weiteren Verwendung wurden die Proteine bei 4 °C oder -20 °C gelagert.

6.4.10.4. Kovalente Proteinbindung durch Dimethylpimelidate (DMP)

Zur kovalenten Bindung von GST-Fusionsproteinen an die Matrix, wurde die Glutathion-Sepharose zunächst 2 mal in dem 10 fachen Volumen an 0,2 M Natriumboratlösung (pH 9,0) bei RT gewaschen. Danach resuspendierte man diese in 20 mM DMP/0,2 M Natriumboratlösung und inkubierte für 30 min

bei RT auf einem Überkoprotator. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) gestoppt (12 h, 4 °C). Nach der Inkubation wurde die Glutathion-Sepharose mit 1x PBS/0,01 % NP40 gewaschen und bei 4 °C gelagert. Um die Effizienz der kovalenten Bindung festzustellen, untersuchte man eine geeignete Menge Probe durch SDS-PAGE (6.4.2.) und Coomassie-Färbung (6.4.4.).

6.4.10.5. Dialyse von Proteinen

Um störende Einflüsse von Salzen oder anderen Substanzen wie Imidazol für Folgereaktionen zu vermeiden, wurden rekombinant hergestellte Proteine (6.4.10.) oder gewonnene Antikörper (6.5.2.) dialysiert. Die Eluate wurden hierzu in einem Dialyseschlauch/-Eppendorf Reaktionsgefäß geeigneter Ausschlussgröße über Nacht in 2,5-5 l entsprechendem Dialysepuffer langsam bewegt (Rührer). Durch Zugabe von 20 % Glycerin (v/v) in den Dialysepuffer wurde einer Verdünnung der Proteinprobe vorgebeugt.

6.4.11. Gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation

Zur gekoppelten *in vitro* Transkription und Translation wurde das TNT Quick coupled Transkription/Translation System der Firma Promega verwendet. Für die radioaktive Markierung der Translationsprodukte wurde [³⁵S]-Methionin eingesetzt. Mit Hilfe dieses Systems konnten einzelne, für spätere Bindungsstudien radioaktiv markierte Proteine hergestellt werden. Voraussetzung ist hierbei ein Vektor mit T7-Promotor, weshalb die Vektoren pHA oder pET28a eingesetzt wurden. Für einen typischen Reaktionsansatz (~ 25 µl) wurden 1-2 µg der jeweiligen Plasmid-DNA mit 20 µl Retikulozytenlysat und 2 µl [³⁵S]-Methionin (15 µCi/µl) versetzt und 90 min bei 30 °C inkubiert. Zur Überprüfung der Translationseffizienz wurde 1 µl des Ansatzes durch SDS-PAGE (6.4.2.) aufgetrennt. Das Lysat wurde direkt für Interaktionsstudien eingesetzt.

6.4.12. Proteintandemmassenspektrometrie (Protein-MS/MS)

Das Verfahren der Proteintandemmassenspektrometrie dient der direkten Identifizierung unbekannter Proteine und wurde erst durch die Verfügbarkeit komplett sequenzierter Genome und Verbesserungen der Messapparaturen einer breiten Anwendung zugänglich. Die massenspektrometrische Analyse immunaffinitätsgereinigter Komplexe wurde von Julia Wiesner am Rudolf-Virchow-Zentrum für experimentelle Biomedizin in Würzburg durchgeführt. Zum Einsatz kam hierbei ein LTQ XL Massenspektrometer (Thermo Scientific, Dreieich), welches zur Konzentrierung der Probe direkt mit einer Flüssigchromatographie gekoppelt war (LC-MS/MS). Im Einzelnen wurden die Proben elektrophoretisch getrennt und gefärbt (257). Proteine von Interesse wurden aus dem Gel ausgeschnitten, gewaschen, mit DTT reduziert und mit Jodacetamid alkyliert. Es erfolgte ein enzymatischer Verdau der Proteine im Gel durch Trypsin, und eine Aufnahme der generierten Peptide mittels Umkehrphasenchromatographie in Trifluoressigsäure (217). Die Peptide wurden daraufhin (durch Elektronenspray-Ionisation, ESI) ionisiert, in einer (linearen) Ionenfalle gesammelt und in einem „peptide mass fingerprint“ übersichtsweise analysiert (MS). Einzelne Peptide wurden aus der Ionenfalle selektiert, durch Kollision mit Helium-Atomen fragmentiert („collision induced decay“, CID) und die Fragmentionen erneut massenspektrometrisch analysiert (MS/MS). Die auf diese Weise abgeleiteten Peptidsequenzen wurden dann mit einem *in silico*-Verdau der aus der SWISS-PROT-Datenbank erhaltenen Proteinsequenzen verglichen.

6.5. Immunologische und immunbiochemische Verfahren

6.5.1. Immunfluoreszenzmikroskopie

Immunfluoreszenzmikroskopie wurde wie in Linder *et al.* beschrieben durchgeführt (147). Adhärente wildtypische oder zuvor transfizierte Säugerzellen (24-48 h nach der Transfektion) wurden auf sterile Deckgläschen in Zellkultur Multiwell Platten (6 Well) ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 40 % kultiviert. Zur Untersuchung von stress granules (SGs) versetzte man das Medium mit 500 μ M Arsen und inkubierte bei 37 °C für 1 h. Die Zellen wurden direkt nach Absaugen des Standardmediums bei RT mit je 4 ml 3,7 % Formaldehydlösung (in 1x PBS) pro Well für 7 min auf den Deckgläsern fixiert. Anschließend wurden die Zellen 2 mal mit 1x PBS gewaschen, mit 4 ml einer 0,2 % Triton-X 100 Lösung pro Well für 5 min auf Eis permeabilisiert und anschließend 2 mal mit 2 % BSA in 1x PBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Verdünnung 1:50–1:1000, je nach eingesetztem Antikörper, in 2 % (w/v) BSA/1x PBS) erfolgte für 1-5 h bei Raumtemperatur. Die Zellen wurden erneut 2 mal mit 2 % (w/v) BSA/1x PBS gewaschen und 1 h mit dem sekundären Antikörper (Alexa Fluor, 1:500 in 2 % (w/v) BSA/1x PBS) im Dunkeln inkubiert. Für Cofluoreszenzanalysen inkubierte man daraufhin den zweiten Primärantikörper gefolgt von dem entsprechenden Sekundärantikörper wie bereits beschrieben. Abschließend wurden die Deckgläschen 2 mal mit 1x PBS gewaschen und mit Vectashield® Mounting Medium (mit DAPI) überschichtet, mit einem Deckgläschen fixiert und mittels Nagellack auf einem Objektträger abgedichtet. Die Auswertung erfolgte an einem inversen Auflichtfluoreszenzmikroskop Axiovert 200M (Zeiss, Göttingen) mit den Zeiss Standardfiltersätzen, einer AxioCam MRm und der Bildaufnahmesoftware AxioVision 4.6.

6.5.2. Gewinnung und Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung des Antigens wurden die jeweiligen Proteine bzw. Proteinfragmente als 6xHis- oder GST-Fusionen rekombinant in *E. coli* exprimiert und aufgereinigt. GST-Fusionsproteine wurden mit PreScission-Protease verdaut. Die Immunisierung der Kaninchen erfolgte im 2 Wochen Abstand über einen Zeitraum von 2 Monaten in einer jeweiligen Dosis von 250 µg durch die Fa. Immunoglobule (Himmelstadt).

Zur Affinitätsreinigung des Antikörpers aus den gewonnenen Seren wurden 2-4 mg des als 6xHis- oder GST-Fusionsprotein exprimierten Antigens zunächst kovalent an Glutathion Sepharose Matrix gekoppelt (6.4.10.4.). Anschließend wurde die Matrix mit 10 Vol. 0,1 M Glyzin pH 2,7 gewaschen, um so eine möglichst quantitative Kopplung des Antigens sicherzustellen, in 1x PBS äquilibriert und mit 10 ml Serum für 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Elution des gebundenen Antikörpers erfolgte nach mehrfachem Waschen mit 1x PBS durch pH-Schock mit 0,1 M Glycin pH 2,7, wobei die jeweiligen Elutionsvolumina mit 10 % (v/v) 1 M Tris-HCl (pH 8,8) gepuffert wurden. Antikörper enthaltende Fraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt (6.4.2.), Coomassie gefärbt (6.4.4.), vereinigt und gegen 50 Vol. 1x PBS bei 4° C über Nacht dialysiert (6.4.10.5.).

6.5.3. ELISA

Zur Analyse des Detektionsverhaltens generierter Antikörper wurden ELISAs (enzyme-linked immuno sorbent assays) durchgeführt. Hierzu beschichtete man zunächst 96 Well Multiwell Platten mit einer definierten Menge rekombinant hergestellter Proteine (6.4.10.). Diese wurden in Vollers Puffer gelöst (5 µg/µl) und je 100 µl der Proteinlösung in jedes Well gegeben. Die Platten inkubierte man bei 4 °C über Nacht auf einem Schüttler. Die Proteinlösungen wurden daraufhin entfernt und die Platten 4 mal mit je 100 µl 1x PBS/0,04 % (w/v) Tween gewaschen. Zum Blocken wurden 100 µl

1x PBS/1 % (w/v) BSA pro Well zugegeben und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die überschüssige Lösung wurde verworfen, die Platten bei RT getrocknet und bei -20 °C in Aluminiumfolie bis zum Gebrauch aufbewahrt. Zu testende Antiseren wurden auf die Platten pipettiert und bei RT für 90 min inkubiert. Nach 5 maligem Waschen mit je 100 µl 1x PBS/0,04 % (w/v) Tween wurde der entsprechende Sekundärantikörper in einer geeigneten Verdünnung (1x PBS/1 % (w/v) BSA) über Nacht bei 4 °C gebunden. Die Platten wurden erneut 5 mal mit je 100 µl 1x PBS/0,04 % (w/v) Tween gewaschen, je 100 µl der Substratlösung zugegeben und für maximal 45 min bis zur gewünschten Färbung entwickelt. Durch Zugabe der Stopplösung wurde die Reaktion beendet und die Platten mittels Scannen dokumentiert.

6.6. Methoden zur Analyse von Ribosomen

6.6.1. Lineare Dichtegradientenzentrifugation

6.6.1.1. **Dichtegradientenzentrifugation von Protein-Ribosomen-Komplexen**

Um eine direkte Interaktion eines Proteins mit 80S ribosomalen Komplexen nachweisen zu können, präinkubierte man zunächst aus Extrakten aufgereinigte 80S-Ribosomen (6.6.2.) mit rekombinantem Protein (6.4.10.) in 1x Blaha A Puffer (Endkonzentration) für 20 min bei 30 °C. Die Reaktionsansätze wurden daraufhin auf die vorher frisch gegossenen 5-45 % linearen Gradientenlösungen geschichtet (siehe 6.6.1.3. für die Herstellung) und wie folgt aufgetrennt:

SW41Ti: 39.000 rpm, 4 °C, 1.45 h, Bremse 9 oder slow

SW60Ti: 34.500 rpm, 4 °C, 1.45 h, Bremse 9 oder slow

Die Gradienten wurden per Hand oder mittels eines PG Fip Piston Gradient Fractionator fraktioniert. Die Fraktionen wurden Phenol-extrahiert (6.1.1.2.), RNA Ethanol- (6.1.1.1.) und Proteine Aceton-gefällt (6.4.7.1.).

6.6.1.2. EDTA-vermittelte Ribosomendissoziation und Monosomen-gradientenzentrifugation

HEK293-Zellen wurden auf 14 cm² Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % kultiviert, 1 mal mit 1x PBS gewaschen und durch Zugabe des entsprechenden Lysepuffers lysiert. Nach 15-30 minütiger Lyse auf Eis zentrifugierte man die Zelltrümmer ab (4 °C, 10.000 rpm, 10 min) und überführte den Extrakt in ein neues Reaktionsgefäß. Zur Dissoziation der 80S-Ribosomen wurden 60 µl 0,5 M EDTA zugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert.

Zur Auftrennung dissoziierter Ribosomen wurden entsprechende Saccharoselösungen hergestellt:

10 % Saccharoselösung:	25 ml	2x Blaha A Puffer
	5 g	Saccharose
	Add 50 ml	ddH ₂ O

30 % Saccharoselösung:	25 ml	2x Blaha A Puffer
	15 g	Saccharose
	Add 50 ml	ddH ₂ O

Die Gradienten wurden wie unter 6.6.1.3. beschrieben gegossen, die Reaktionsansätze auf die Gradientenlösungen geschichtet und aufgetrennt:

SW60Ti: 34.500 rpm, 4 °C, 4 h, Bremse 9 oder slow

Die Gradienten wurden per Hand oder mittels eines PG Fip Piston Gradient Fractionators fraktioniert. Die Fraktionen wurden Phenol-extrahiert (6.1.1.2.), RNA Ethanol- (6.1.1.1.) und Proteine Aceton-gefällt (6.4.7.1.).

6.6.1.3. Polysomengradientenzentrifugation

Zur Auftrennung polysomaler Komplexe durch Dichtegradientenzentrifugation (5-45 % oder 15-45 %) wurden zunächst entsprechende Saccharoselösungen hergestellt:

5 % Saccharoselösung: 5 ml 10x Polysomengradientenpuffer
 2,5 g Saccharose
 Add 50 ml ddH₂O

15 % Saccharoselösung: 5 ml 10x Polysomengradientenpuffer
 7,5 g Saccharose
 Add 50 ml ddH₂O

45 % Saccharoselösung: 5 ml 10x Polysomengradientenpuffer
 22,5 g Saccharose
 Add 50 ml ddH₂O

Seton Open Top Centrifugation Tubes (für SW41Ti) wurden bis zur Hälfte mit der leichten Lösung gefüllt, mit der schweren Lösung vorsichtig unterschichtet und mit Hilfe des Gradient Mat™ Gradientenmischers lineare Gradienten nach Herstellerangaben erzeugt. Diese wurden für 1-3 h bei 4 °C gekühlt.

Behandelte (z. B. siRNA-Transfektion) oder unbehandelte HEK293-Zellen wurden auf 14 cm² Kulturschalen bis zu einer Konfluenz von maximal 80 % kultiviert und 1 mal mit 1x PBS/100 µg/ml Cycloheximid (5 mg/ml in DMSO) gewaschen. Durch Zugabe von 300 µl Polysomengradienten Lysepuffer wurden die Zellen für 15-30 min lysiert, abzentrifugiert (10 min, 10.000 rpm, 4 °C) und die Extrakte nach Bradford normiert (6.4.1.).

Von den Gradienten wurden je 300 µl Lösung vorsichtig abgenommen und der Extrakt langsam auf die Gradientenlösung geschichtet. Folgende Zentrifugationsprogramme wurden verwendet:

5-45 % Gradient: 2 h, 34.500 rpm, 4 °C, SW41Ti, Bremse 9 bzw. slow

15-45 % Gradient: 2 h, 38.000 rpm, 4 °C, SW41Ti, Bremse 9 bzw. slow

Die Gradienten wurden mittels eines PG Fip Piston Gradient Fractionators fraktioniert. Die Fraktionen wurden entweder direkt durch SDS-PAGE aufgetrennt (6.4.2.) und durch Western Blot analysiert (6.4.8.) oder Phenol-extrahiert (6.1.1.2.), RNA Ethanol- (6.1.1.1.) und Proteine Aceton-gefällt (6.4.7.1.).

6.6.2. Hochsalzaufreinigung von 80S-Ribosomen aus Zellextrakt

12 Liter HeLa S3-Zellen aus Fermentersuspension wurden geerntet (6.7.1.), in 1x PBS gewaschen und mit 90 ml Lysepuffer II auf Eis resuspendiert. Durch mehrfaches Douncen mit einem B-tight Douncer (20 mal) wurden die Zellen aufgebrochen und Zelltrümmer bei 25.000 rpm und 4 °C für 30 min in einem JA 25.5 Rotor abzentrifugiert.

Zur Abtrennung niedermolekularer Bestandteile wurden zunächst je 15 ml des Extraktes über 50 ml eines 1 M Saccharosekissens (in Lysepuffer) pelletiert (Typ45Ti, 4 h, 40.000 rpm, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde 2 mal mit je 7 ml Resuspensionspuffer 1 gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 2 ml Resuspensionspuffer 1 gelöst.

Zur weiteren Aufreinigung durch Hochsalz pelletierte man die resuspendierten Pellets (je 2 ml) erneut über 1 M Saccharosekissen (18 ml in Resuspensionspuffer 1) (Typ60Ti, 4 h, 40.000 rpm, 4 °C), wusch diese 2 mal mit je 7 ml Resuspensionspuffer 1 und resuspendierte erneut über Nacht bei 4 °C in 2 ml Resuspensionspuffer 1.

Durch lineare Dichtegradientenzentrifugation (10-30 % Saccharoselösungen in Resuspensionspuffer 1) trennte man im nächsten Schritt monosomale und polysomale Komplexe auf:

SW32Ti: 22.000 rpm, 4 °C, 12 h, Bremse 9 bzw. slow

Die Gradienten wurden per Hand fraktioniert und die RNA-Profile spektrometrisch bestimmt. 80S-beinhaltende Fraktionen wurden vereinigt und erneut pelletiert (Typ45Ti, 4 h, 4 °C, 40.000 rpm). Die erhaltenen Pellets wurden 2 mal mit je 7 ml Resuspensionspuffer 2 gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 500-1500 µl Resuspensionspuffer 2 gelöst. Die 80S-Ribosomen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde die RNA einer Probe Phenol-extrahiert (6.1.1.) und auf einem Agarosegel visualisiert (6.1.3.1.).

6.6.3. Aufreinigung von Puromycin dissoziierten 40S/60S-Komplexen aus Zellextrakt

Um ribosomale Untereinheiten dissoziierter 80S-Komplexe zu isolieren, wurde diese mit Puromycin behandelt (193).

Pellets aus HeLa-Suspensionen (5×10^5) (6.7.1.) wurden zunächst in Ribosomenlysepuffer resuspendiert und 5 min auf Eis zum Quellen inkubiert. Nach mehrmaligem Douncen mit einem B-Tight Douncer wurde das Lysat durch Zentrifugation geklärt (JA 25.5, 23.000 g, 30 min, 4 °C) und auf 100 mM KCl eingestellt. Je 15 ml des Extraktes wurden über 50 ml eines 1 M Saccharosekissen (in 40/60S Ribosomenpuffer 1) pelletiert (Typ45Ti, 4 h, 40.000 rpm, 4 °C). Das erhaltene Pellet wurde 2 mal mit je 7 ml 40/60S Ribosomenpuffer 2 gewaschen und über Nacht bei 4 °C in 2 ml 40/60S Ribosomenpuffer 2 über Nacht gelöst.

Zur Puromycin Behandlung wurde eine 0,1 M Stocklösung (in ddH₂O) hergestellt und das erhaltene Ribosomenpellet wie folgt behandelt:

3,9 ml	Pellet
9,1 ml	Ribosomenpuffer 2
266 ml	Puromycin (0,1 M)

Es wurde auf Eis für 30 min und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Unter Rühren wurden daraufhin langsam 1,65 ml 4 M KCl Lösung zugetropft, bis eine Salzkonzentration von 0,5 M KCl erreicht worden war. Das Präzipitat wurde bei 10.000 rpm für 5 min bei 4 °C pelletiert.

Durch lineare Dichtegradientenzentrifugation (10-30 % Saccharoselösungen in 40/60S Ribosomenpuffer 3) trennte man die ribosomalen Untereinheiten auf:

SW32Ti: 22.000 rpm, 4 °C, 18 h, Bremse 9 bzw. slow

Die Gradienten wurden per Hand fraktioniert und die RNA-Profile spektrometrisch bestimmt. 40S- und 60S-beinhaltende Fraktionen wurden vereinigt, mit 40/60S Ribosomenpuffer 4 verdünnt (1:2) und pelletiert:

40S: Typ60Ti, 15 h, 4 °C, 35.500 rpm

60S: Typ45Ti, 13 h, 4 °C, 40.000 rpm

40S-Pellets wurden mit 40/60S Ribosomenpuffer 1 gewaschen und in diesem resuspendiert.

Das 60S-Pellet wurde 2 mal mit 40/60S Ribosomenpuffer 5 gewaschen, in diesem Puffer resuspendiert und erneut über einen linearen Dichtegradienten aufgetrennt (10-30 % Saccharoselösungen in 40/60S Ribosomenpuffer 4), um mögliche 40S-Dimere zu entfernen:

SW32Ti: 22.000 rpm, 4 °C, 18 h, Bremse 9 bzw. slow

Die Gradienten wurden per Hand fraktioniert, die RNA-Profile spektrometrisch bestimmt, 60S-beinhaltende Fraktionen vereinigt und pelletiert:

60S: Typ45Ti, 13 h, 4 °C, 40.000 rpm

Nach 2 maligem Waschen des Pellets mit 40/60S Ribosomenpuffer 1, löste man dieses in 40/60S Ribosomenpuffer 1 und schockfrostete 40S- und 60S-Aliquots in flüssigem Stickstoff. Bis zum Gebrauch wurden diese bei -80 °C gelagert. Zur Kontrolle der Aufreinigung wurde die RNA einer Probe Phenol-

extrahiert (6.1.1.1.), Ethanol-gefällt (6.1.1.2.) und auf einem Agarosegel visualisiert (6.1.3.1.). Zudem testete man durch Western Blot die Reinheit der ribosomalen Untereinheiten (6.4.8.) mittels Verwendung spezifischer 40S- bzw. 60S-Antikörper.

6.7. Präparation von Zellextrakten

6.7.1. Herstellung von HeLa S3-Gesamtzellextrakt auf Fermenterbasis

5 x 10⁵ HeLa S3-Zellen aus einer proliferierenden Fermenter Kultur wurden für 10 min bei 800 rpm und 4 °C pelletiert. Nach 3 maligem Waschen mit autoklaviertem 1x PBS wurden die abzentrifugierten Pellets entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren (Lagerung bei -80 °C), oder direkt mit einer geeigneten Menge des, für den folgenden Assay verwendeten, Lysepuffer versetzt. Zum verbesserten Zellaufschluss douncete man das Lysat in einem Glashomogenisator (Douncer) durch 20 bis 30 Pistillstöße. Die Suspension wurde für 30 min bei 23.000 g zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Die Extrakte wurden entweder sofort eingesetzt oder aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

6.7.2. Herstellung von Gesamtzellextrakt aus Zellkulturschalen

Zur Herstellung von Zellextrakten adhärenter Kulturen (COS7, HEK293, HeLa) wurden diese in einer Gewebekulturschale (steril, 145 mm) bis zu einer Konfluenz von 70-80 % gezogen. Nach Waschen mit 10 ml 1x PBS wurden die Zellen mit 10 ml kaltem 1x PBS überschichtet. Falls erwünscht, wurden die geöffneten Schalen im Folgenden mit 200-400 mJ/cm² in einem UV-Crosslinker bestrahlt, um Protein-RNA-Komplexe *in vivo* zu vernetzen (CLIP Assay, 6.4.9.3.). Die Zellen wurden mit Hilfe eines Zellschabers von der Schale gelöst, in ein Falcon überführt, bei 2.500 rpm für 3 min bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet resuspendierte man in 500 µl 1x PBS,

Überführte die Suspension in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß, zentrifugierte erneut (13.000 rpm, 10 s, 4 °C) und nahm den Überstand ab. Das erhaltene Zellpellet wurde entweder in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert oder direkt mit dem einer geeigneten Menge des gewünschten Lysepuffers versetzt.

6.8. Zellkulturmethoden

6.8.1. Kultivierung von Säugerzellen

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Säugerzelllinien (COS7, HeLa, HEK293) wurden in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 10% (v/v) fötales Kälberserum (FKS) bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in Zellkulturschalen oder -flaschen kultiviert. Das Medium wurde dem Zellwachstum entsprechend bei Bedarf gewechselt. Bei maximal 80 % Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Dazu wurden sie zunächst mit 1x PBS (pH 7,4) gewaschen, mit 1 % Trypsin gelöst und in geeigneter Verdünnung auf neue Kulturschalen/-flaschen oder Multiwellplatten ausgesät.

6.8.2. Zelldichtenbestimmung

Zur Bestimmung der Zelldichte wurden 10 µl einer verdünnten Zellsuspension auf beide Seiten eines Hämazytometers (Neubauer) gegeben. Durch das aufgebrachte Deckgläschen kommen die Zellen in einer einzelligen Schicht zu liegen und können in den Feldern der Kammer ausgezählt werden. Aus statistischen Gründen wurden mindestens sechs Felder ausgezählt. Die Zellzahl je ml Lösung ergibt sich infolge der Division des erhaltenen Wertes durch die Anzahl der gezählten Felder, multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und einem Kammer-spezifischen Faktor von 10⁴.

6.8.3. Einfrieren und Auftauen von Gewebekulturzellen

Die Zellen wurden aus einer logarithmisch wachsenden Population eingefroren. Dazu wurden entweder Suspensionszellen abgenommen oder adhärenente Zellen mit Trypsin behandelt, in Medium aufgenommen, abzentrifugiert (400 rpm, 5 min) und in Cryopreservationsmedium resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden in ein Einfrierröhrchen aliquotiert, langsam auf -80 °C (möglichst 1 °C/min) abgekühlt und zur dauerhaften Lagerung in flüssigen Stickstoff überführt. Zum Auftauen der Zellen wurden diese angetaut und sofort in 10 ml vorgewärmtes Zellmedium gegeben. Zum Entfernen des im Einfriermedium enthaltenen DMSO zentrifugierte man die Zellen (1.000 rpm, 2 min), entfernte den Überstand, resuspendierte die Zellen in Zellmedium und kultivierte sie in entsprechenden Kulturflaschen. 24 h nach der Aussaat wurde erneut ein Mediumwechsel vorgenommen um letzte DMSO Reste zu entfernen.

6.8.4. Transfektionstechniken

6.8.4.1. *Transiente Transfektion von Plasmid-DNA mit Nanofectin*

Zur Expression HA-markierter Proteinen in Säugerzellen wurden diese 24 h vor der eigentlichen Transfektion in einer Konfluenz von 40 % in geeignete Schalen oder Multiwellplatten in Standardmedium ausgesät. Zur Transfektion mit Nanofectin wurden die, dem Transfektionsansatz angemessene Menge DNA mit entsprechendem Volumen NaCl (150 mM) nach Herstellerangaben gemischt und kurz inkubiert. Parallel wurden notwendige Mengen Nanofectin in NaCl (150 mM) gegeben und anschließend DNA- und Nanofectin-Lösung vermischt. Nach 30 min Inkubation bei RT wurde die Transfektionslösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Diese konnten nach 24-48 h im Kulturschrank zur Extraktpräparation (6.7.2.) oder immunohistochemischen Analyse (6.5.1.) entnommen werden.

Transfektionsprotokoll:

Ansatz	DNA	Nanofectin	NaCl	Well
24 Well	1 µg	3,2 µl	50 µl	0,5 ml
12 Well	2 µg	6,4 µl	50 µl	1 ml
6 Well	3 µg	9,6 µl	100 µl	2 ml
6 cm ²	5 µg	16 µl	250 µl	5 ml
10 cm ²	8 µg	25 µl	500 µl	10 ml
14 cm ²	16,9 µg	52,3 µl	1050 µl	20 ml

Die Überexpression wurde mittels Western Blot (6.4.8.) überprüft.

6.8.4.2. siRNA-Transfektion mit Lipofectamin 2000

In Säugerzellen lässt sich die Expression einzelner Gene mit Hilfe der RNA-Interferenz Technik gezielt unterdrücken. Hierbei wird die Degradation spezifischer mRNAs durch kleine synthetische, komplementäre RNAs (siRNAs) vermittelt (73). Diese Strategie erlaubt es vielen Eukaryonten fremde doppelsträngige RNAs als zelluläres Abwehrsystem gegen das jeweilige Pathogen zu nutzen. Diese kurzen RNA-Fragmente werden dabei in den RISC (RNA induced silencing complex) inkorporiert und entwunden, wobei einer der beiden Stränge selektiv die zu ihm komplementäre mRNA bindet. Diese wird anschließend durch die RISC eigene Endonuklease Ago2 abgebaut.

Hierzu wurden HEK293-Zellen je nach Bedarf auf entsprechende Kulturschalen oder Multiwellplatten in Antibiotika-defizientem Medium (siehe Präinkubationsmedium für Transfektion) ausgesät und 24 h später bei einer Konfluenz von 30-50 % transfiziert. Eine geeignete Menge siRNA wurde zunächst in das empfohlene Volumen OPTI-MEM gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel mischte man die entsprechende Menge Lipofectamin 2000 mit OPTI-MEM und inkubierte ebenfalls für 5 min bei RT. Die beiden Lösungen wurden daraufhin vereinigt und weitere 15-20 min bei RT

komplexiert. In dieser Zeit entfernte man das Präinkubationsmedium von den Zellen, wusch diese 2 mal mit 1x PBS und überschichtete sie mit dem vorgeschriebenen Volumen OPTI-MEM (ohne FKS oder Antibiotika). Schließlich wurde die Transfektionslösung vorsichtig zu den Zellen gegeben und die Zellen weiter kultiviert. Nach 4 h wurde OPTI-MEM/30 % FKS zu den Zellen gegeben, bis eine Endkonzentration von 10 % FKS erreicht war. Nach 24-72 h (siRNA abhängig) konnten die Zellen mittels eines Zellschabers oder durch Trypsinierung geerntet werden.

Transfektionsprotokoll:

Ansatz	siRNA	Lipofectamin	OPTI-MEM	Well
24 Well	20 pmol	1 µl	50 µl	500 µl
12 Well	40 pmol	2 µl	100 µl	1 ml
6 Well	100 pmol	5 µl	250 µl	2 ml
6 cm ²	200 pmol	10 µl	500 µl	5 ml
10 cm ²	600 pmol	30 µl	1,5 ml	15 ml

Der Erfolg der RNA-Interferenz wurde mittels Immunoblot (6.4.8.) überprüft.

6.8.4.3. Cotransfektion von siRNA und Plasmid-DNA mit Lipofectamin 2000

HEK293-Zellen wurden je nach Bedarf auf entsprechende Kulturschalen oder Multiwellplatten in Präinkubationsmedium ausgesät und 24 h später bei einer Konfluenz von 80-90 % cotransfiziert. Eine geeignete Menge siRNA wurde zunächst mit der jeweiligen DNA-Konzentration in das empfohlene Volumen OPTI-MEM gegeben und für 5 min bei RT inkubiert. Parallel mischte man die entsprechende Menge Lipofectamin 2000 mit OPTI-MEM und inkubierte ebenfalls für 5 min bei RT. Die weitere Vorgehensweise entspricht der unter 6.8.4.2. beschriebenen Methode. Nach 24-48 h (siRNA-abhängig) konnten die Zellen geerntet werden.

Transfektionsprotokoll:

Ansatz	siRNA	DNA	Lipofectamin	OPTI-MEM	Well
24 Well	1-10 pmol	100-200 ng	0,5-1,5 µl	50 µl	0,5 ml
12 Well	2-20 pmol	200-400 ng	1-3 µl	100 µl	1 ml
6 Well	5-50 pmol	500-1000 ng	2,5-6 µl	250 µl	2 ml

Der Erfolg der RNA-Interferenz und Überexpression wurde mittels Western Blot (6.4.8.) überprüft.

6.8.5. *In vivo* Proteinmarkierung durch [³⁵S]-Methionin Inkorporation

Zur Analyse der *in vivo* Proteinsynthese nach RNAi-induzierter Interferenz wurde die entsprechende siRNA zunächst in HEK293-Zellen mit Lipofectamin 2000 transfiziert (6.8.4.2.), für 24 h kultiviert, auf 10 cm² Kulturschalen überführt und für weitere 24 h kultiviert. Die Zellen wurden daraufhin 1 mal mit 3 ml 1x PBS und 2 mal mit je 3 ml Methionin-freiem DMEM gewaschen (+ 10 % FKS, 1 % Pen/Strep, 1 % Glutamin) und mit [³⁵S]-Methionin-enthaltendem Medium (100 µCi/10 cm²) überschichtet. Nach jeweils 1-5 h Inkubation bei 37 °C wurden die Zellen 2 mal mit je 3 ml kaltem 1x PBS gewaschen und lysiert (6.7.2.). Die Zellextrakte wurden mittels Bradford normalisiert (6.4.1.), durch SDS-PAGE aufgetrennt (6.4.2.), Coomassie gefärbten (6.4.4.) und autoradiographisch untersucht (6.4.6.).

6.8.6. Luziferase-basierende Reporteranalysen

Reporteranalysen eignen sich zur Untersuchung der Genexpression gleichermaßen wie zur Bestimmung von Promotoraktivitäten, intrazellulären Signaltransduktionswegen oder Protein-Protein Wechselwirkungen (4). Dabei findet, auf Grund ihrer leichten Quantifizierung und der schnellen, äußerst sensitiven Anwendbarkeit häufig eine aus der amerikanischen Feuerfliege *P. pyralis* isolierte Luziferase Verwendung.

HEK293- oder COS7-Zellen wurden zunächst mit entsprechenden Luziferasereportern (pRL-TK, pGL3, pR-BIP-F, pR-EMCV-F) sowie siRNA für Interferenz- oder Plasmid-DNA für Überexpressionsstudien cotransfiziert (6.8.4.3.) und 24-48 h kultiviert. Die Zellen wurden 2 mal mit 1x PBS gewaschen und in passivem Lysepuffer der Firma Promega nach Hertsellerangaben (Dual-Luziferase Assay) lysiert. Nach Normalisierung durch Bradford (6.4.1.) wurden 20 µl der Extrakte in eine 96 Well Platte (weiß, LumiNunc) überführt und die Luziferaseexpression mit Hilfe eines Luziferase Reporter Assay Systems von Promega (Dual-Luciferase Reporter Assay System, Luciferase Assay System oder Renilla Luciferase Assay System) an einem Mithras LB 940 Luminometer ermittelt. Die Messung erfolgte im Abstand von 2 s bei einer Dauer von 10 s. Die Experimente wurden zur Validierung der erhaltenen Daten dreifach wiederholt.

6.8.7. Generierung stabiler FlpTRex-Zelllinien

6.8.7.1. ***Kultivierung von Flp-In T-REx Zellen, sowie den daraus hergestellten stabilen Zelllinien***

Die Kultivierung der Flp-In T-REx-Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit in Host cell Medium (Flp-In TRex) auf Zellkulturschalen und -flaschen variabler Größe. Die stabilen Zelllinien für HA-LARP4B und HA-LARP6 wurden in Flp-TRex-LARP4B Standardmedium kultiviert. Das Medium wurde bei Bedarf, jedoch spätestens jeden dritten Tag gewechselt. Um eine kontinuierliche Proliferation zu gewährleisten wurden die Zellen bei einer Konfluenz von maximal 80 % passagiert. Dazu wurden die Zellen nach Waschen mit 1x PBS trypsinisiert, bis sie sich von der Kulturschale ablösten und anschließend durch auf- und abpipettieren vereinzelt. Man säte sie in einer geeigneten Verdünnung aus.

6.8.7.2. Stabile Plasmidtransfektion und Selektion stabiler Klone

Zur Generierung stabiler Expressionszellen klonierte man zunächst die cDNA des Zielgens in den pcDNA5/FRT/TO/HA Expressionsvektor und cotransfizierte diesen zusammen mit pOG44 in Flp-In T-REx Host Zellen (6.8.4.1.). Durch Verwendung Expressionsvektor-integrierter Selektionsantibiotika (Blasticidin, Hygromycin) erfolgte eine Selektion positiver Zellen durch Medienwechsel. Dieses wurde alle zwei bis drei Tage erneuert. Nach ca. 6 Wochen isolierte man 12 resistente Kolonien in eine 12 Well Multiwell Platte. Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Zellen auf größere Schalen passagiert. Ein Teil der Zellen wurde durch Kultivierung in Zeocin-haltigem Medium (Host cell Medium) auf ihre Zeocinsensibilität untersucht. Zusätzlich wurden die Zellen auf β -Galaktosidaseaktivität getestet (6.8.7.3.). Positive Zelllinien wurden weiter kultiviert.

6.8.7.3. Analyse der β -Galaktosidaseaktivität

Flp-In T-Rex-Zellen besitzen ein, ins Genom integriertes lacZ-Gen wodurch eine β -Galaktosidase exprimiert wird. Dieses Enzym ist in der Lage X-Gal zu spalten, wodurch eine blaue Färbung der Zellen erfolgt. Bei der Generierung stabiler Zelllinien aus den Flp-In T-Rex-Zellen geht durch die Rekombination zwischen der FRS-Stelle im Genom der Zellen und der FRS-Stelle im pcDNA5/FRT/TO/HA Vektor die Fähigkeit β -Galaktosidase zu exprimieren verloren, so dass diese Zellen bei Inkubation mit X-Gal haltiger Lösung keine Verfärbung zeigen. Auf diese Weise kann zwischen transfizierten und untransfizierten Zellen unterschieden werden.

Flp-In T-Rex-Zellen sowie Zellen der stabilen Zelllinie wurden in 12 Well Multiwell Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80 % kultiviert. Nach Waschen mit 1x PBS wurden die Zellen mit X-Gal-Färbelösung (2,5 ml pro Platte) über Nacht bei 37 °C inkubiert. β -Galaktosidase inaktive Zellen wurden weiter kultiviert.

6.8.7.4. Induktion stabiler Zelllinien

Die Flp-In T-REx Zellen exprimieren einen Tetracyclin Repressor (Tet-Repressor), der durch Bindung an den TetO₂-Promotor die Überexpression des Zielgens in den stabilen Zelllinien inhibiert. Durch Zugabe von Tetracyclin zum Kulturmedium kann die Expression jedoch induziert werden. Dabei bindet Tetracyclin an den Repressor, wodurch eine Konformationsänderung ausgelöst wird und der Repressor vom Promotor diffundiert.

Soweit nicht anders beschrieben, wurde die Expression mit 1 µg/ml Tetracyclin für 24 h induziert (Induktionsmedium) und anschließend Zellextrakte hergestellt (6.7.2.).

7. Literaturverzeichnis

1. **Adams, D. R., D. Ron, and P. A. Kiely.** 2011. RACK1, A Multifaceted Scaffolding Protein: Structure and Function. *Cell Commun Signal* **9**:22.
2. **Aigner, S., and T. R. Cech.** 2004. The Euplotes telomerase subunit p43 stimulates enzymatic activity and processivity in vitro. *RNA* **10**:1108-18.
3. **Aigner, S., J. Postberg, H. J. Lipps, and T. R. Cech.** 2003. The Euplotes La motif protein p43 has properties of a telomerase-specific subunit. *Biochemistry* **42**:5736-47.
4. **Alam, J., and J. L. Cook.** 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem* **188**:245-54.
5. **Albrecht, M., and T. Lengauer.** 2004. Survey on the PABC recognition motif PAM2. *Biochem Biophys Res Commun* **316**:129-38.
6. **Alfano, C., D. Sanfelice, J. Babon, G. Kelly, A. Jacks, S. Curry, and M. R. Conte.** 2004. Structural analysis of cooperative RNA binding by the La motif and central RRM domain of human La protein. *Nat Struct Mol Biol* **11**:323-9.
7. **Ali, N., G. J. Pruijn, D. J. Kenan, J. D. Keene, and A. Siddiqui.** 2000. Human La antigen is required for the hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* **275**:27531-40.
8. **Allmang, C., J. Kufel, G. Chanfreau, P. Mitchell, E. Petfalski, and D. Tollervey.** 1999. Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J* **18**:5399-410.
9. **Alspaugh, M. A., and E. M. Tan.** 1975. Antibodies to cellular antigens in Sjogren's syndrome. *J Clin Invest* **55**:1067-73.
10. **Anderson, P., and N. Kedersha.** 2008. Stress granules: the Tao of RNA triage. *Trends Biochem Sci* **33**:141-50.
11. **Angenstein, F., A. M. Evans, R. E. Settlage, S. T. Moran, S. C. Ling, A. Y. Klintsova, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, and W. T. Greenough.** 2002. A receptor for activated C kinase is part of messenger ribonucleoprotein complexes associated with polyA-mRNAs in neurons. *J Neurosci* **22**:8827-37.
12. **Arhin, G. K., S. Shen, I. F. Perez, C. Tschudi, and E. Ullu.** 2005. Downregulation of the essential *Trypanosoma brucei* La protein affects accumulation of elongator methionyl-tRNA. *Mol Biochem Parasitol* **144**:104-8.
13. **Arimoto, K., H. Fukuda, S. Imajoh-Ohmi, H. Saito, and M. Takekawa.** 2008. Formation of stress granules inhibits apoptosis by suppressing stress-responsive MAPK pathways. *Nat Cell Biol* **10**:1324-32.
14. **Ayukawa, K., S. Taniguchi, J. Masumoto, S. Hashimoto, H. Sarvotham, A. Hara, T. Aoyama, and J. Sagara.** 2000. La autoantigen is cleaved in the COOH terminus and loses the nuclear localization signal during apoptosis. *J Biol Chem* **275**:34465-70.
15. **Baer, B. W., and R. D. Kornberg.** 1983. The protein responsible for the repeating structure of cytoplasmic poly(A)-ribonucleoprotein. *J Cell Biol* **96**:717-21.
16. **Bag, J.** 2001. Feedback inhibition of poly(A)-binding protein mRNA translation. A possible mechanism of translation arrest by stalled 40 S ribosomal subunits. *J Biol Chem* **276**:47352-60.
17. **Bai, C., and P. P. Tolias.** 2000. Genetic analysis of a La homolog in *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* **28**:1078-84.
18. **Baltimore, D.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature* **226**:1209-11.
19. **Balvay, L., R. Soto Rifo, E. P. Ricci, D. Decimo, and T. Ohlmann.** 2009. Structural and functional diversity of viral IRESes. *Biochim Biophys Acta* **1789**:542-57.
20. **Barboric, M., T. Lenasi, H. Chen, E. B. Johansen, S. Guo, and B. M. Peterlin.** 2009. 7SK snRNP/P-TEFb couples transcription elongation with alternative splicing and is essential for vertebrate development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:7798-803.

21. **Bayfield, M. A., T. E. Kaiser, R. V. Intine, and R. J. Maraia.** 2007. Conservation of a masked nuclear export activity of La proteins and its effects on tRNA maturation. *Mol Cell Biol* **27**:3303-12.
22. **Bayfield, M. A., and R. J. Maraia.** 2009. Precursor-product discrimination by La protein during tRNA metabolism. *Nat Struct Mol Biol* **16**:430-7.
23. **Bayfield, M. A., R. Yang, and R. J. Maraia.** 2010. Conserved and divergent features of the structure and function of La and La-related proteins (LARPs). *Biochim Biophys Acta* **1799**:365-78.
24. **Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork, and E. Izaurralde.** 2006. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**:1885-98.
25. **Bi, X., and D. J. Goss.** 2000. Wheat germ poly(A)-binding protein increases the ATPase and the RNA helicase activity of translation initiation factors eIF4A, eIF4B, and eIF-iso4F. *J Biol Chem* **275**:17740-6.
26. **Bitko, V., A. Musiyenko, M. A. Bayfield, R. J. Maraia, and S. Barik.** 2008. Cellular La protein shields nonsegmented negative-strand RNA viral leader RNA from RIG-I and enhances virus growth by diverse mechanisms. *J Virol* **82**:7977-87.
27. **Bjork, P., and L. Wieslander.** 2011. Nucleocytoplasmic mRNP export is an integral part of mRNP biogenesis. *Chromosoma* **120**:23-38.
28. **Blagden, S. P., M. K. Gatt, V. Archambault, K. Lada, K. Ichihara, K. S. Lilley, Y. H. Inoue, and D. M. Glover.** 2009. Drosophila Larp associates with poly(A)-binding protein and is required for male fertility and syncytial embryo development. *Dev Biol* **334**:186-97.
29. **Boire, G., and J. Craft.** 1990. Human Ro ribonucleoprotein particles: characterization of native structure and stable association with the La polypeptide. *J Clin Invest* **85**:1182-90.
30. **Bollig, F., R. Winzen, M. Gaestel, S. Kostka, K. Resch, and H. Holtmann.** 2003. Affinity purification of ARE-binding proteins identifies polyA-binding protein 1 as a potential substrate in MK2-induced mRNA stabilization. *Biochem Biophys Res Commun* **301**:665-70.
31. **Borman, A. M., Y. M. Michel, and K. M. Kean.** 2000. Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* **28**:4068-75.
32. **Borukhov, S., and E. Nudler.** 2008. RNA polymerase: the vehicle of transcription. *Trends Microbiol* **16**:126-34.
33. **Bousquet-Antonelli, C., and J. M. Deragon.** 2009. A comprehensive analysis of the La-motif protein superfamily. *RNA* **15**:750-64.
34. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-54.
35. **Brenet, F., N. D. Socci, N. Sonenberg, and E. C. Holland.** 2009. Akt phosphorylation of La regulates specific mRNA translation in glial progenitors. *Oncogene* **28**:128-39.
36. **Brook, M., J. W. Smith, and N. K. Gray.** 2009. The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction* **137**:595-617.
37. **Burgui, I., T. Aragon, J. Ortin, and A. Nieto.** 2003. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. *J Gen Virol* **84**:3263-74.
38. **Burrows, C., N. Abd Latip, S. J. Lam, L. Carpenter, K. Sawicka, G. Tzolovsky, H. Gabra, M. Bushell, D. M. Glover, A. E. Willis, and S. P. Blagden.** 2010. The RNA binding protein Larp1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic Acids Res* **38**:5542-53.
39. **Cai, L., D. Fritz, L. Stefanovic, and B. Stefanovic.** 2010. Binding of LARP6 to the conserved 5' stem-loop regulates translation of mRNAs encoding type I collagen. *J Mol Biol* **395**:309-26.

40. **Cai, L., D. Fritz, L. Stefanovic, and B. Stefanovic.** 2010. Nonmuscle myosin-dependent synthesis of type I collagen. *J Mol Biol* **401**:564-78.
41. **Cardinali, B., C. Carissimi, P. Gravina, and P. Pierandrei-Amaldi.** 2003. La protein is associated with terminal oligopyrimidine mRNAs in actively translating polysomes. *J Biol Chem* **278**:35145-51.
42. **Carotenuto, R., N. De Marco, S. Biffo, M. Wilding, M. C. Vaccaro, P. C. Marchisio, T. Capriglione, G. L. Russo, and C. Campanella.** 2005. Phosphorylation of p27(BBP)/eIF6 and its association with the cytoskeleton are developmentally regulated in *Xenopus* oogenesis. *Cell Mol Life Sci* **62**:1641-52.
43. **Carroll, M. C.** 2004. A protective role for innate immunity in systemic lupus erythematosus. *Nat Rev Immunol* **4**:825-31.
44. **Casciola-Rosen, L., F. Andrade, D. Ulanet, W. B. Wong, and A. Rosen.** 1999. Cleavage by granzyme B is strongly predictive of autoantigen status: implications for initiation of autoimmunity. *J Exp Med* **190**:815-26.
45. **Casciola-Rosen, L. A., G. Anhalt, and A. Rosen.** 1994. Autoantigens targeted in systemic lupus erythematosus are clustered in two populations of surface structures on apoptotic keratinocytes. *J Exp Med* **179**:1317-30.
46. **Ceci, M., C. Gaviraghi, C. Gorrini, L. A. Sala, N. Offenhauser, P. C. Marchisio, and S. Biffo.** 2003. Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* **426**:579-84.
47. **Chakshumathi, G., S. D. Kim, D. A. Rubinson, and S. L. Wolin.** 2003. A La protein requirement for efficient pre-tRNA folding. *EMBO J* **22**:6562-72.
48. **Chambers, J. C., M. G. Kurilla, and J. D. Keene.** 1983. Association between the 7 S RNA and the lupus La protein varies among cell types. *J Biol Chem* **258**:11438-41.
49. **Chanfreau, G., S. A. Elela, M. Ares, Jr., and C. Guthrie.** 1997. Alternative 3'-end processing of U5 snRNA by RNase III. *Genes Dev* **11**:2741-51.
50. **Chang, D. Y., K. Hsu, and R. J. Maraia.** 1996. Monomeric scAlu and nascent dimeric Alu RNAs induced by adenovirus are assembled into SRP9/14-containing RNPs in HeLa cells. *Nucleic Acids Res* **24**:4165-70.
51. **Chari, A., M. M. Golas, M. Klingenhager, N. Neuenkirchen, B. Sander, C. Englbrecht, A. Sickmann, H. Stark, and U. Fischer.** 2008. An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal SnRNPs. *Cell* **135**:497-509.
52. **Chaudhury, A., P. Chander, and P. H. Howe.** 2010. Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles. *RNA* **16**:1449-62.
53. **Chauvet, S., C. Maurel-Zaffran, R. Miassod, N. Jullien, J. Pradel, and D. Aragnol.** 2000. *dlarp*, a new candidate Hox target in *Drosophila* whose orthologue in mouse is expressed at sites of epithelium/mesenchymal interactions. *Dev Dyn* **218**:401-13.
54. **Chen, M., M. R. Daha, and C. G. Kallenberg.** 2010. The complement system in systemic autoimmune disease. *J Autoimmun* **34**:J276-86.
55. **Cheng, S., and D. R. Gallie.** 2007. eIF4G, eIFiso4G, and eIF4B bind the poly(A)-binding protein through overlapping sites within the RNA recognition motif domains. *J Biol Chem* **282**:25247-58.
56. **Cheng, S. T., T. Q. Nguyen, Y. S. Yang, J. D. Capra, and R. D. Sontheimer.** 1996. Calreticulin binds hYRNA and the 52-kDa polypeptide component of the Ro/SS-A ribonucleoprotein autoantigen. *J Immunol* **156**:4484-91.
57. **Clark, K. L., E. D. Halay, E. Lai, and S. K. Burley.** 1993. Co-crystal structure of the HNF-3/fork head DNA-recognition motif resembles histone H5. *Nature* **364**:412-20.
58. **Coller, J. M., N. K. Gray, and M. P. Wickens.** 1998. mRNA stabilization by poly(A) binding protein is independent of poly(A) and requires translation. *Genes Dev* **12**:3226-35.
59. **Copela, L. A., G. Chakshumathi, R. L. Sherrer, and S. L. Wolin.** 2006. The La protein functions redundantly with tRNA modification enzymes to ensure tRNA structural stability. *RNA* **12**:644-54.

60. **Copela, L. A., C. F. Fernandez, R. L. Sherrer, and S. L. Wolin.** 2008. Competition between the Rex1 exonuclease and the La protein affects both Trf4p-mediated RNA quality control and pre-tRNA maturation. *RNA* **14**:1214-27.
61. **Cordes, S., Y. Kusov, T. Heise, and V. Gauss-Muller.** 2008. La autoantigen suppresses IRES-dependent translation of the hepatitis A virus. *Biochem Biophys Res Commun* **368**:1014-9.
62. **Cosson, B., A. Couturier, S. Chabelskaya, D. Kiktev, S. Inge-Vechtomov, M. Philippe, and G. Zhouravleva.** 2002. Poly(A)-binding protein acts in translation termination via eukaryotic release factor 3 interaction and does not influence [PSI(+)] propagation. *Mol Cell Biol* **22**:3301-15.
63. **Costa-Mattioli, M., Y. Svitkin, and N. Sonenberg.** 2004. La autoantigen is necessary for optimal function of the poliovirus and hepatitis C virus internal ribosome entry site in vivo and in vitro. *Mol Cell Biol* **24**:6861-70.
64. **Crick, F. H.** 1958. On protein synthesis. *Symp Soc Exp Biol* **12**:138-63.
65. **Curry, S., and M. R. Conte.** 2006. A terminal affair: 3'-end recognition by the human La protein. *Trends Biochem Sci* **31**:303-5.
66. **de la Sierra-Gallay, I. L., O. Pellegrini, and C. Condon.** 2005. Structural basis for substrate binding, cleavage and allostery in the tRNA maturase RNase Z. *Nature* **433**:657-61.
67. **Decker, C. J., and R. Parker.** 2002. mRNA decay enzymes: decappers conserved between yeast and mammals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:12512-4.
68. **Deo, R. C., N. Sonenberg, and S. K. Burley.** 2001. X-ray structure of the human hyperplastic discs protein: an ortholog of the C-terminal domain of poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:4414-9.
69. **Dieker, J., and S. Muller.** 2009. Post-translational modifications, subcellular relocation and release in apoptotic microparticles: apoptosis turns nuclear proteins into autoantigens. *Folia Histochem Cytobiol* **47**:343-8.
70. **Diribarne, G., and O. Bensaude.** 2009. 7SK RNA, a non-coding RNA regulating P-TEFb, a general transcription factor. *RNA Biol* **6**:122-8.
71. **Dong, G., G. Chakshusmathi, S. L. Wolin, and K. M. Reinisch.** 2004. Structure of the La motif: a winged helix domain mediates RNA binding via a conserved aromatic patch. *EMBO J* **23**:1000-7.
72. **Dubrovsky, E. B., V. A. Dubrovskaya, L. Lvinger, S. Schiffer, and A. Marchfelder.** 2004. *Drosophila* RNase Z processes mitochondrial and nuclear pre-tRNA 3' ends in vivo. *Nucleic Acids Res* **32**:255-62.
73. **Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl.** 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**:494-8.
74. **Fairley, J. A., T. Kantidakis, N. S. Kenneth, R. V. Intine, R. J. Maraia, and R. J. White.** 2005. Human La is found at RNA polymerase III-transcribed genes in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:18350-5.
75. **Fitzgerald, K. D., and B. L. Semler.** 2009. Bridging IRES elements in mRNAs to the eukaryotic translation apparatus. *Biochim Biophys Acta* **1789**:518-28.
76. **Fleurdepine, S., J. M. Deragon, M. Devic, J. Guilleminot, and C. Bousquet-Antonelli.** 2007. A bona fide La protein is required for embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Res* **35**:3306-21.
77. **Fok, V., K. Friend, and J. A. Steitz.** 2006. Epstein-Barr virus noncoding RNAs are confined to the nucleus, whereas their partner, the human La protein, undergoes nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Biol* **173**:319-25.
78. **Fouraux, M. A., P. Bouvet, S. Verkaart, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 2002. Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *J Mol Biol* **320**:475-88.
79. **French, S. L., Y. N. Osheim, D. A. Schneider, M. L. Sikes, C. F. Fernandez, L. A. Copela, V. A. Misra, M. Nomura, S. L. Wolin, and A. L. Beyer.** 2008. Visual analysis of the yeast 5S rRNA gene transcriptome: regulation and role of La protein. *Mol Cell Biol* **28**:4576-87.

80. **Gajiwala, K. S., and S. K. Burley.** 2000. Winged helix proteins. *Curr Opin Struct Biol* **10**:110-6.
81. **Gajiwala, K. S., H. Chen, F. Cornille, B. P. Roques, W. Reith, B. Mach, and S. K. Burley.** 2000. Structure of the winged-helix protein hRFX1 reveals a new mode of DNA binding. *Nature* **403**:916-21.
82. **Gallie, D. R.** 1991. The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* **5**:2108-16.
83. **Gandin, V., A. Miluzio, A. M. Barbieri, A. Beugnet, H. Kiyokawa, P. C. Marchisio, and S. Biffo.** 2008. Eukaryotic initiation factor 6 is rate-limiting in translation, growth and transformation. *Nature* **455**:684-8.
84. **Gebauer, F., and M. W. Hentze.** 2004. Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**:827-35.
85. **Gordon, T., F. Topfer, C. Keech, P. Reynolds, W. Chen, M. Rischmueller, and J. McCluskey.** 1994. How does autoimmunity to La and Ro initiate and spread? *Autoimmunity* **18**:87-92.
86. **Gorgoni, B., and N. K. Gray.** 2004. The roles of cytoplasmic poly(A)-binding proteins in regulating gene expression: a developmental perspective. *Brief Funct Genomic Proteomic* **3**:125-41.
87. **Gottlieb, E., and J. A. Steitz.** 1989. Function of the mammalian La protein: evidence for its action in transcription termination by RNA polymerase III. *EMBO J* **8**:851-61.
88. **Gottlieb, E., and J. A. Steitz.** 1989. The RNA binding protein La influences both the accuracy and the efficiency of RNA polymerase III transcription in vitro. *EMBO J* **8**:841-50.
89. **Gray, N. K., J. M. Collier, K. S. Dickson, and M. Wickens.** 2000. Multiple portions of poly(A)-binding protein stimulate translation in vivo. *EMBO J* **19**:4723-33.
90. **Grosso, S., V. Volta, L. A. Sala, M. Vietri, P. C. Marchisio, D. Ron, and S. Biffo.** 2008. PKC β modulates translation independently from mTOR and through RACK1. *Biochem J* **415**:77-85.
91. **Grosso, S., V. Volta, M. Vietri, C. Gorrini, P. C. Marchisio, and S. Biffo.** 2008. Eukaryotic ribosomes host PKC activity. *Biochem Biophys Res Commun* **376**:65-9.
92. **Gruber, A. R., C. Kilgus, A. Mosig, I. L. Hofacker, W. Hennig, and P. F. Stadler.** 2008. Arthropod 7SK RNA. *Mol Biol Evol* **25**:1923-30.
93. **Gultekin, H., and K. H. Heermann.** 1988. The use of polyvinylidenedifluoride membranes as a general blotting matrix. *Anal Biochem* **172**:320-9.
94. **Haghighat, A., and N. Sonenberg.** 1997. eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J Biol Chem* **272**:21677-80.
95. **Hamilton, T. L., M. Stoneley, K. A. Spriggs, and M. Bushell.** 2006. TOPs and their regulation. *Biochem Soc Trans* **34**:12-6.
96. **Han, J., J. Xiong, D. Wang, and X. D. Fu.** 2011. Pre-mRNA splicing: where and when in the nucleus. *Trends Cell Biol.*
97. **Han, S. P., Y. H. Tang, and R. Smith.** 2010. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* **430**:379-92.
98. **Hanahan, D., and M. Meselson.** 1983. Plasmid screening at high colony density. *Methods Enzymol* **100**:333-42.
99. **He, N., N. S. Jahchan, E. Hong, Q. Li, M. A. Bayfield, R. J. Maraia, K. Luo, and Q. Zhou.** 2008. A La-related protein modulates 7SK snRNP integrity to suppress P-TEFb-dependent transcriptional elongation and tumorigenesis. *Mol Cell* **29**:588-99.
100. **Heise, T., L. G. Guidotti, and F. V. Chisari.** 2001. Characterization of nuclear RNases that cleave hepatitis B virus RNA near the La protein binding site. *J Virol* **75**:6874-83.
101. **Hendrick, J. P., S. L. Wolin, J. Rinke, M. R. Lerner, and J. A. Steitz.** 1981. Ro small cytoplasmic ribonucleoproteins are a subclass of La ribonucleoproteins: further characterization of the Ro and La small ribonucleoproteins from uninfected mammalian cells. *Mol Cell Biol* **1**:1138-49.
102. **Hocine, S., R. H. Singer, and D. Grunwald.** 2010. RNA processing and export. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**:a000752.

103. **Holcik, M., and N. Sonenberg.** 2005. Translational control in stress and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:318-27.
104. **Honda, M., T. Shimazaki, and S. Kaneko.** 2005. La protein is a potent regulator of replication of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C through internal ribosomal entry site-directed translation. *Gastroenterology* **128**:449-62.
105. **Horke, S., K. Reumann, M. Schweizer, H. Will, and T. Heise.** 2004. Nuclear trafficking of La protein depends on a newly identified nucleolar localization signal and the ability to bind RNA. *J Biol Chem* **279**:26563-70.
106. **Hoshino, S., M. Imai, T. Kobayashi, N. Uchida, and T. Katada.** 1999. The eukaryotic polypeptide chain releasing factor (eRF3/GSPT) carrying the translation termination signal to the 3'-Poly(A) tail of mRNA. Direct association of erf3/GSPT with polyadenylate-binding protein. *J Biol Chem* **274**:16677-80.
107. **Huang, M., H. Ida, K. Arima, H. Nakamura, T. Aramaki, K. Fujikawa, M. Tamai, M. Kamachi, A. Kawakami, H. Yamasaki, T. Origuchi, and K. Eguchi.** 2007. La autoantigen translocates to cytoplasm after cleavage during granzyme B-mediated cytotoxicity. *Life Sci* **81**:1461-6.
108. **Huang, Y., M. A. Bayfield, R. V. Intine, and R. J. Maraia.** 2006. Separate RNA-binding surfaces on the multifunctional La protein mediate distinguishable activities in tRNA maturation. *Nat Struct Mol Biol* **13**:611-8.
109. **Huang, Y., R. V. Intine, A. Mozlin, S. Hasson, and R. J. Maraia.** 2005. Mutations in the RNA polymerase III subunit Rpc11p that decrease RNA 3' cleavage activity increase 3'-terminal oligo(U) length and La-dependent tRNA processing. *Mol Cell Biol* **25**:621-36.
110. **Huntzinger, E., J. E. Braun, S. Heimstadt, L. Zekri, and E. Izaurralde.** 2010. Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J.*
111. **Huttelmaier, S., D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dichtenberg, M. Lorenz, X. Meng, G. J. Bassell, J. Condeelis, and R. H. Singer.** 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* **438**:512-5.
112. **Ichihara, K., H. Shimizu, O. Taguchi, M. Yamaguchi, and Y. H. Inoue.** 2007. A Drosophila orthologue of larp protein family is required for multiple processes in male meiosis. *Cell Struct Funct* **32**:89-100.
113. **Imataka, H., A. Gradi, and N. Sonenberg.** 1998. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J* **17**:7480-9.
114. **Intine, R. V., A. L. Sakulich, S. B. Koduru, Y. Huang, E. Pierstorff, J. L. Goodier, L. Phan, and R. J. Maraia.** 2000. Control of transfer RNA maturation by phosphorylation of the human La antigen on serine 366. *Mol Cell* **6**:339-48.
115. **Intine, R. V., S. A. Tenenbaum, A. L. Sakulich, J. D. Keene, and R. J. Maraia.** 2003. Differential phosphorylation and subcellular localization of La RNPs associated with precursor tRNAs and translation-related mRNAs. *Mol Cell* **12**:1301-7.
116. **Jackson, R. J., C. U. Hellen, and T. V. Pestova.** 2010. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:113-27.
117. **Jacobson, A., and M. Favreau.** 1983. Possible involvement of poly(A) in protein synthesis. *Nucleic Acids Res* **11**:6353-68.
118. **Jacobson, A., and S. W. Peltz.** 1996. Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* **65**:693-739.
119. **Jannot, G., S. Bajan, N. J. Giguere, S. Bouasker, I. H. Banville, S. Piquet, G. Hutvagner, and M. J. Simard.** 2011. The ribosomal protein RACK1 is required for microRNA function in both *C. elegans* and humans. *EMBO Rep.*
120. **Jensen, K. B., and R. B. Darnell.** 2008. CLIP: crosslinking and immunoprecipitation of in vivo RNA targets of RNA-binding proteins. *Methods Mol Biol* **488**:85-98.
121. **Jeronimo, C., D. Forget, A. Bouchard, Q. Li, G. Chua, C. Poitras, C. Therien, D. Bergeron, S. Bourassa, J. Greenblatt, B. Chabot, G. G. Poirier, T. R. Hughes, M. Blanchette, D. H. Price, and B. Coulombe.** 2007. Systematic analysis of the protein interaction network for the human transcription machinery reveals the identity of the 7SK capping enzyme. *Mol Cell* **27**:262-74.

122. **Kahvejian, A., Y. V. Svitkin, R. Sukarieh, M. N. M'Boutchou, and N. Sonenberg.** 2005. Mammalian poly(A)-binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev* **19**:104-13.
123. **Kenan, D. J., and J. D. Keene.** 2004. La gets its wings. *Nat Struct Mol Biol* **11**:303-5.
124. **Khanam, T., R. S. Muddashetty, A. Kahvejian, N. Sonenberg, and J. Brosius.** 2006. Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. *RNA Biol* **3**:170-7.
125. **Kim, Y. K., S. H. Back, J. Rho, S. H. Lee, and S. K. Jang.** 2001. La autoantigen enhances translation of BiP mRNA. *Nucleic Acids Res* **29**:5009-16.
126. **Kishore, S., S. Lubner, and M. Zavolan.** 2010. Deciphering the role of RNA-binding proteins in the post-transcriptional control of gene expression. *Brief Funct Genomics* **9**:391-404.
127. **Kisselev, L., M. Ehrenberg, and L. Frolova.** 2003. Termination of translation: interplay of mRNA, rRNAs and release factors? *EMBO J* **22**:175-82.
128. **Korner, C. G., M. Wormington, M. Muckenthaler, S. Schneider, E. Dehlin, and E. Wahle.** 1998. The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J* **17**:5427-37.
129. **Kotik-Kogan, O., E. R. Valentine, D. Sanfelice, M. R. Conte, and S. Curry.** 2008. Structural analysis reveals conformational plasticity in the recognition of RNA 3' ends by the human La protein. *Structure* **16**:852-62.
130. **Kozlov, G., G. De Crescenzo, N. S. Lim, N. Siddiqui, D. Fantus, A. Kahvejian, J. F. Trempe, D. Elias, I. Ekiel, N. Sonenberg, M. O'Connor-McCourt, and K. Gehring.** 2004. Structural basis of ligand recognition by PABC, a highly specific peptide-binding domain found in poly(A)-binding protein and a HECT ubiquitin ligase. *Embo J* **23**:272-81.
131. **Kozlov, G., and K. Gehring.** 2010. Molecular basis of eRF3 recognition by the MLE domain of poly(A)-binding protein. *PLoS One* **5**:e10169.
132. **Kozlov, G., M. Menade, A. Rosenauer, L. Nguyen, and K. Gehring.** 2010. Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLE domain of poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* **397**:397-407.
133. **Kozlov, G., N. Safaee, A. Rosenauer, and K. Gehring.** 2010. Structural basis of binding of P-body-associated proteins GW182 and ataxin-2 by the Mle domain of poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **285**:13599-606.
134. **Kozlov, G., N. Siddiqui, S. Coillet-Matillon, J. F. Trempe, I. Ekiel, T. Sprules, and K. Gehring.** 2002. Solution structure of the orphan PABC domain from *Saccharomyces cerevisiae* poly(A)-binding protein. *J Biol Chem* **277**:22822-8.
135. **Krueger, B. J., C. Jeronimo, B. B. Roy, A. Bouchard, C. Barrandon, S. A. Byers, C. E. Searcey, J. J. Cooper, O. Bensaude, E. A. Cohen, B. Coulombe, and D. H. Price.** 2008. LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic Acids Res* **36**:2219-29.
136. **Kuersten, S., and E. B. Goodwin.** 2003. The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet* **4**:626-37.
137. **Kufel, J., C. Allmang, G. Chanfreau, E. Petfalski, D. L. Lafontaine, and D. Tollervey.** 2000. Precursors to the U3 small nucleolar RNA lack small nucleolar RNP proteins but are stabilized by La binding. *Mol Cell Biol* **20**:5415-24.
138. **Kufel, J., C. Allmang, L. Verdone, J. Beggs, and D. Tollervey.** 2003. A complex pathway for 3' processing of the yeast U3 snoRNA. *Nucleic Acids Res* **31**:6788-97.
139. **Kuhn, U., and E. Wahle.** 2004. Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta* **1678**:67-84.
140. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-5.
141. **Lamkanfi, M., W. Declercq, M. Kalai, X. Saelens, and P. Vandenabeele.** 2002. Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man. *Cell Death Differ* **9**:358-61.

142. **Le, H., R. L. Tanguay, M. L. Balasta, C. C. Wei, K. S. Browning, A. M. Metz, D. J. Goss, and D. R. Gallie.** 1997. Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increase its RNA binding activity. *J Biol Chem* **272**:16247-55.
143. **Le, S. Y., and J. V. Maizel, Jr.** 1997. A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic Acids Res* **25**:362-69.
144. **Lee, S. H., and F. McCormick.** 2006. p97/DAP5 is a ribosome-associated factor that facilitates protein synthesis and cell proliferation by modulating the synthesis of cell cycle proteins. *EMBO J* **25**:4008-19.
145. **Lerner, M. R., N. C. Andrews, G. Miller, and J. A. Steitz.** 1981. Two small RNAs encoded by Epstein-Barr virus and complexed with protein are precipitated by antibodies from patients with systemic lupus erythematosus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**:805-9.
146. **Lim, N. S., G. Kozlov, T. C. Chang, O. Groover, N. Siddiqui, L. Volpon, G. De Crescenzo, A. B. Shyu, and K. Gehring.** 2006. Comparative peptide binding studies of the PABC domains from the ubiquitin-protein isopeptide ligase HYD and poly(A)-binding protein. Implications for HYD function. *J Biol Chem* **281**:14376-82.
147. **Linder, B., O. Plottner, M. Kroiss, E. Hartmann, B. Lagerbauer, G. Meister, E. Keidel, and U. Fischer.** 2008. Tdrd3 is a novel stress granule-associated protein interacting with the Fragile-X syndrome protein FMRP. *Hum Mol Genet* **17**:3236-46.
148. **Madore, S. J., E. D. Wieben, and T. Pederson.** 1984. Eukaryotic small ribonucleoproteins. Anti-La human autoantibodies react with U1 RNA-protein complexes. *J Biol Chem* **259**:1929-33.
149. **Mangus, D. A., M. C. Evans, and A. Jacobson.** 2003. Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol* **4**:223.
150. **Manoussakis, M. N., C. Georgopoulou, E. Zintzaras, M. Spyropoulou, A. Stavropoulou, F. N. Skopouli, and H. M. Moutsopoulos.** 2004. Sjogren's syndrome associated with systemic lupus erythematosus: clinical and laboratory profiles and comparison with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum* **50**:882-91.
151. **Maraia, R., M. Zasloff, P. Plotz, and S. Adeniyi-Jones.** 1988. Pathway of B1-Alu expression in microinjected oocytes: *Xenopus laevis* proteins associated with nuclear precursor and processed cytoplasmic RNAs. *Mol Cell Biol* **8**:4433-40.
152. **Maraia, R. J.** 1996. Transcription termination factor La is also an initiation factor for RNA polymerase III. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:3383-7.
153. **Maraia, R. J., and R. V. Intine.** 2002. La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs. *Gene Expr* **10**:41-57.
154. **Maraia, R. J., and R. V. Intine.** 2001. Recognition of nascent RNA by the human La antigen: conserved and divergent features of structure and function. *Mol Cell Biol* **21**:367-79.
155. **Maraia, R. J., D. J. Kenan, and J. D. Keene.** 1994. Eukaryotic transcription termination factor La mediates transcript release and facilitates reinitiation by RNA polymerase III. *Mol Cell Biol* **14**:2147-58.
156. **Maris, C., C. Dominguez, and F. H. Allain.** 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J* **272**:2118-31.
157. **Markert, A., M. Grimm, J. Martinez, J. Wiesner, A. Meyerhans, O. Meyuhas, A. Sickmann, and U. Fischer.** 2008. The La-related protein LARP7 is a component of the 7SK ribonucleoprotein and affects transcription of cellular and viral polymerase II genes. *EMBO Rep* **9**:569-75.
158. **Marz, M., A. Donath, N. Verstraete, V. T. Nguyen, P. F. Stadler, and O. Bensaude.** 2009. Evolution of 7SK RNA and its protein partners in metazoa. *Mol Biol Evol* **26**:2821-30.
159. **Mathews, M. B., and A. M. Francoeur.** 1984. La antigen recognizes and binds to the 3'-oligouridylylate tail of a small RNA. *Mol Cell Biol* **4**:1134-40.

160. **Mattioli, M., and M. Reichlin.** 1974. Heterogeneity of RNA protein antigens reactive with sera of patients with systemic lupus erythematosus. Description of a cytoplasmic nonribosomal antigen. *Arthritis Rheum* **17**:421-9.
161. **McLaren, R. S., N. Caruccio, and J. Ross.** 1997. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. *Mol Cell Biol* **17**:3028-36.
162. **Meerovitch, K., Y. V. Svitkin, H. S. Lee, F. Lejbkowitz, D. J. Kenan, E. K. Chan, V. I. Agol, J. D. Keene, and N. Sonenberg.** 1993. La autoantigen enhances and corrects aberrant translation of poliovirus RNA in reticulocyte lysate. *J Virol* **67**:3798-807.
163. **Merril, C. R., M. L. Dunau, and D. Goldman.** 1981. A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* **110**:201-7.
164. **Merrill, J. T., D. Erkan, and J. P. Buyon.** 2004. Challenges in bringing the bench to bedside in drug development for SLE. *Nat Rev Drug Discov* **3**:1036-46.
165. **Milligan, J. F., and O. C. Uhlenbeck.** 1989. Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol* **180**:51-62.
166. **Miluzio, A., A. Beugnet, V. Volta, and S. Biffo.** 2009. Eukaryotic initiation factor 6 mediates a continuum between 60S ribosome biogenesis and translation. *EMBO Rep* **10**:459-65.
167. **Mollenbeck, M., J. Postberg, K. Paeschke, M. Rossbach, F. Jonsson, and H. J. Lipps.** 2003. The telomerase-associated protein p43 is involved in anchoring telomerase in the nucleus. *J Cell Sci* **116**:1757-61.
168. **Mondal, T., U. Ray, A. K. Manna, R. Gupta, S. Roy, and S. Das.** 2008. Structural determinant of human La protein critical for internal initiation of translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* **82**:11927-38.
169. **Muckenthaler, M., N. K. Gray, and M. W. Hentze.** 1998. IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell* **2**:383-8.
170. **Munroe, D., and A. Jacobson.** 1990. mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* **10**:3441-55.
171. **Naar, A. M., B. D. Lemon, and R. Tjian.** 2001. Transcriptional coactivator complexes. *Annu Rev Biochem* **70**:475-501.
172. **Nashimoto, M., C. Nashimoto, M. Tamura, R. L. Kaspar, and K. Ochi.** 2001. The inhibitory effect of the autoantigen La on in vitro 3' processing of mammalian precursor tRNAs. *J Mol Biol* **312**:975-84.
173. **Nguyen, V. T., T. Kiss, A. A. Michels, and O. Bensaude.** 2001. 7SK small nuclear RNA binds to and inhibits the activity of CDK9/cyclin T complexes. *Nature* **414**:322-5.
174. **Ni, Q., Z. Chen, H. P. Yao, Z. G. Yang, K. Z. Liu, and L. L. Wu.** 2004. Inhibition of human La protein by RNA interference downregulates hepatitis B virus mRNA in 2.2.15 cells. *World J Gastroenterol* **10**:2050-4.
175. **Nilsson, J., J. Sengupta, J. Frank, and P. Nissen.** 2004. Regulation of eukaryotic translation by the RACK1 protein: a platform for signalling molecules on the ribosome. *EMBO Rep* **5**:1137-41.
176. **Nykamp, K., M. H. Lee, and J. Kimble.** 2008. *C. elegans* La-related protein, LARP-1, localizes to germline P bodies and attenuates Ras-MAPK signaling during oogenesis. *RNA* **14**:1378-89.
177. **Ohndorf, U. M., C. Steegborn, R. Knijff, and P. Sodermann.** 2001. Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity. *J Biol Chem* **276**:27188-96.
178. **Ostareck, D. H., A. Ostareck-Lederer, I. N. Shatsky, and M. W. Hentze.** 2001. Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* **104**:281-90.
179. **Otsuka, M., A. Takata, T. Yoshikawa, K. Kojima, T. Kishikawa, C. Shibata, M. Takekawa, H. Yoshida, M. Omata, and K. Koike.** 2011. Receptor for Activated Protein Kinase C: Requirement for Efficient MicroRNA Function and Reduced Expression in Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* **6**:e24359.

180. **Pan, Z. J., K. Davis, S. Maier, M. P. Bachmann, X. R. Kim-Howard, C. Keech, T. P. Gordon, J. McCluskey, and A. D. Farris.** 2006. Neo-epitopes are required for immunogenicity of the La/SS-B nuclear antigen in the context of late apoptotic cells. *Clin Exp Immunol* **143**:237-48.
181. **Park, J. M., R. V. Intine, and R. J. Maraia.** 2007. Mouse and human La proteins differ in kinase substrate activity and activation mechanism for tRNA processing. *Gene Expr* **14**:71-81.
182. **Peek, R., G. J. Pruijn, A. J. van der Kemp, and W. J. van Venrooij.** 1993. Subcellular distribution of Ro ribonucleoprotein complexes and their constituents. *J Cell Sci* **106 (Pt 3)**:929-35.
183. **Pellizzoni, L., B. Cardinali, N. Lin-Marq, D. Mercanti, and P. Pierandrei-Amaldi.** 1996. 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* **259**:904-15.
184. **Pelz, J.-P.** 2010. Structural basis of the interaction between the La-related protein 4B (LARP4B) and the cytosolic poly (A) binding protein (PABPC1). diploma thesis. julius-maximilians university wuerzburg, wuerzburg.
185. **Pestova, T. V., S. I. Borukhov, and C. U. Hellen.** 1998. Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature* **394**:854-9.
186. **Pestova, T. V., and C. U. Hellen.** 2001. Functions of eukaryotic factors in initiation of translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **66**:389-96.
187. **Pestova, T. V., and V. G. Kolupaeva.** 2002. The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev* **16**:2906-22.
188. **Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, I. B. Lomakin, E. V. Pilipenko, I. N. Shatsky, V. I. Agol, and C. U. Hellen.** 2001. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:7029-36.
189. **Peterlin, B. M., and D. H. Price.** 2006. Controlling the elongation phase of transcription with P-TEFb. *Mol Cell* **23**:297-305.
190. **Petry, S., A. Weixlbaumer, and V. Ramakrishnan.** 2008. The termination of translation. *Curr Opin Struct Biol* **18**:70-7.
191. **Pfaffl, M. W., T. M. Georgieva, I. P. Georgiev, E. Ontsouka, M. Hageleit, and J. W. Blum.** 2002. Real-time RT-PCR quantification of insulin-like growth factor (IGF)-1, IGF-1 receptor, IGF-2, IGF-2 receptor, insulin receptor, growth hormone receptor, IGF-binding proteins 1, 2 and 3 in the bovine species. *Domest Anim Endocrinol* **22**:91-102.
192. **Pillai, R. S., C. G. Artus, and W. Filipowicz.** 2004. Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis. *RNA* **10**:1518-25.
193. **Pisarev, A. V., A. Unbehau, C. U. Hellen, and T. V. Pestova.** 2007. Assembly and analysis of eukaryotic translation initiation complexes. *Methods Enzymol* **430**:147-77.
194. **Prathapam, R., K. L. Witkin, C. M. O'Connor, and K. Collins.** 2005. A telomerase holoenzyme protein enhances telomerase RNA assembly with telomerase reverse transcriptase. *Nat Struct Mol Biol* **12**:252-7.
195. **Preiss, T., and W. H. M.** 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays* **25**:1201-11.
196. **Proweller, A., and J. S. Butler.** 1997. Ribosome concentration contributes to discrimination against poly(A)- mRNA during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**:6004-10.
197. **Pudi, R., S. Abhiman, N. Srinivasan, and S. Das.** 2003. Hepatitis C virus internal ribosome entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. *J Biol Chem* **278**:12231-40.
198. **Pudi, R., S. S. Ramamurthy, and S. Das.** 2005. A peptide derived from RNA recognition motif 2 of human La protein binds to hepatitis C virus internal ribosome entry site, prevents ribosomal assembly, and inhibits internal initiation of translation. *J Virol* **79**:9842-53.

199. **Pudi, R., P. Srinivasan, and S. Das.** 2004. La protein binding at the GCAC site near the initiator AUG facilitates the ribosomal assembly on the hepatitis C virus RNA to influence internal ribosome entry site-mediated translation. *J Biol Chem* **279**:29879-88.
200. **Reddy, R., D. Henning, E. Tan, and H. Busch.** 1983. Identification of a La protein binding site in a RNA polymerase III transcript (4.5 I RNA). *J Biol Chem* **258**:8352-6.
201. **Reed, J. H., M. W. Jackson, and T. P. Gordon.** 2008. B cell apotopes of the 60-kDa Ro/SSA and La/SSB autoantigens. *J Autoimmun* **31**:263-7.
202. **Regmi, S., K. G. Rothberg, J. G. Hubbard, and L. Ruben.** 2008. The RACK1 signal anchor protein from *Trypanosoma brucei* associates with eukaryotic elongation factor 1A: a role for translational control in cytokinesis. *Mol Microbiol* **70**:724-45.
203. **Rinke, J., and J. A. Steitz.** 1982. Precursor molecules of both human 5S ribosomal RNA and transfer RNAs are bound by a cellular protein reactive with anti-La lupus antibodies. *Cell* **29**:149-59.
204. **Rodriguez-Navarro, S., and E. Hurt.** 2011. Linking gene regulation to mRNA production and export. *Curr Opin Cell Biol*.
205. **Romero, V., E. Fellows, D. E. Jenne, and F. Andrade.** 2009. Cleavage of La protein by granzyme H induces cytoplasmic translocation and interferes with La-mediated HCV-IRES translational activity. *Cell Death Differ* **16**:340-8.
206. **Rosa, M. D., E. Gottlieb, M. R. Lerner, and J. A. Steitz.** 1981. Striking similarities are exhibited by two small Epstein-Barr virus-encoded ribonucleic acids and the adenovirus-associated ribonucleic acids VAI and VAII. *Mol Cell Biol* **1**:785-96.
207. **Routsias, J. G., and A. G. Tzioufas.** 2010. Autoimmune response and target autoantigens in Sjogren's syndrome. *Eur J Clin Invest* **40**:1026-36.
208. **Routsias, J. G., and A. G. Tzioufas.** 2007. Sjogren's syndrome--study of autoantigens and autoantibodies. *Clin Rev Allergy Immunol* **32**:238-51.
209. **Roy, G., G. De Crescenzo, K. Khaleghpour, A. Kahvejian, M. O'Connor-McCourt, and N. Sonenberg.** 2002. Paip1 interacts with poly(A) binding protein through two independent binding motifs. *Mol Cell Biol* **22**:3769-82.
210. **Schaffler, K., K. Schulz, A. Hirmer, J. Wiesner, M. Grimm, A. Sickmann, and U. Fischer.** 2010. A stimulatory role for the La-related protein 4B in translation. *RNA* **16**:1488-99.
211. **Schiffer, S., S. Rosch, and A. Marchfelder.** 2002. Assigning a function to a conserved group of proteins: the tRNA 3'-processing enzymes. *EMBO J* **21**:2769-77.
212. **Schulz, K.** 2010. Identifizierung und biochemische Charakterisierung des LARP5 Proteins. Diplomarbeit. Julius-Maximilians Universität Würzburg, Würzburg.
213. **Schwartz, E. I., R. V. Intine, and R. J. Maraia.** 2004. CK2 is responsible for phosphorylation of human La protein serine-366 and can modulate rpL37 5'-terminal oligopyrimidine mRNA metabolism. *Mol Cell Biol* **24**:9580-91.
214. **Seipelt, R. L., B. Zheng, A. Asuru, and B. C. Rymond.** 1999. U1 snRNA is cleaved by RNase III and processed through an Sm site-dependent pathway. *Nucleic Acids Res* **27**:587-95.
215. **Shao, R., S. J. Scully, Jr., W. Yan, B. Bentley, J. Mueller, C. Brown, C. Bigelow, and L. M. Schwartz.** 2011. The novel lupus antigen related protein acheron enhances the development of human breast cancer. *Int J Cancer*.
216. **Shen, C. K., and T. Maniatis.** 1982. The organization, structure, and in vitro transcription of Alu family RNA polymerase III transcription units in the human alpha-like globin gene cluster: precipitation of in vitro transcripts by lupus anti-La antibodies. *J Mol Appl Genet* **1**:343-60.
217. **Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, and M. Mann.** 1996. Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem* **68**:850-8.
218. **Shimazaki, T., M. Honda, S. Kaneko, and K. Kobayashi.** 2002. Inhibition of internal ribosomal entry site-directed translation of HCV by recombinant IFN-alpha correlates with a reduced La protein. *Hepatology* **35**:199-208.
219. **Shirasaki, T., M. Honda, H. Mizuno, T. Shimakami, H. Okada, Y. Sakai, S. Murakami, T. Wakita, and S. Kaneko.** 2010. La protein required for internal ribosome entry site-

- directed translation is a potential therapeutic target for hepatitis C virus replication. *J Infect Dis* **202**:75-85.
220. **Simons, F. H., F. J. Broers, W. J. Van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 1996. Characterization of cis-acting signals for nuclear import and retention of the La (SS-B) autoantigen. *Exp Cell Res* **224**:224-36.
221. **Singh, N., H. Morlock, and S. D. Hanes.** 2011. The Bin3 RNA methyltransferase is required for repression of caudal translation in the *Drosophila* embryo. *Dev Biol*.
222. **Sonenberg, N., and T. E. Dever.** 2003. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol* **13**:56-63.
223. **Sonenberg, N., and A. G. Hinnebusch.** 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* **136**:731-45.
224. **Spirin, A. S.** 1979. Messenger ribonucleoproteins (informosomes) and RNA-binding proteins. *Mol Biol Rep* **5**:53-7.
225. **Staley, J. P., and J. L. Woolford, Jr.** 2009. Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines. *Curr Opin Cell Biol* **21**:109-18.
226. **Stefano, J. E.** 1984. Purified lupus antigen La recognizes an oligouridylate stretch common to the 3' termini of RNA polymerase III transcripts. *Cell* **36**:145-54.
227. **Stewart, M.** 2010. Nuclear export of mRNA. *Trends Biochem Sci* **35**:609-17.
228. **Stone, M. D., M. Mihalusova, M. O'Connor C, R. Prathapam, K. Collins, and X. Zhuang.** 2007. Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. *Nature* **446**:458-61.
229. **Svitkin, Y. V., V. M. Evdokimova, A. Brasey, T. V. Pestova, D. Fantus, A. Yanagiya, H. Imataka, M. A. Skabkin, L. P. Ovchinnikov, W. C. Merrick, and N. Sonenberg.** 2009. General RNA-binding proteins have a function in poly(A)-binding protein-dependent translation. *EMBO J* **28**:58-68.
230. **Svitkin, Y. V., K. Meerovitch, H. S. Lee, J. N. Dholakia, D. J. Kenan, V. I. Agol, and N. Sonenberg.** 1994. Internal translation initiation on poliovirus RNA: further characterization of La function in poliovirus translation in vitro. *J Virol* **68**:1544-50.
231. **Svitkin, Y. V., L. P. Ovchinnikov, G. Dreyfuss, and N. Sonenberg.** 1996. General RNA binding proteins render translation cap dependent. *EMBO J* **15**:7147-55.
232. **Svitkin, Y. V., A. Pause, and N. Sonenberg.** 1994. La autoantigen alleviates translational repression by the 5' leader sequence of the human immunodeficiency virus type 1 mRNA. *J Virol* **68**:7001-7.
233. **Tarun, S. Z., Jr., and A. B. Sachs.** 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* **15**:7168-77.
234. **Tarun, S. Z., Jr., S. E. Wells, J. A. Deardorff, and A. B. Sachs.** 1997. Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:9046-51.
235. **Taylor, R. C., S. P. Cullen, and S. J. Martin.** 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:231-41.
236. **Temin, H. M., and S. Mizutani.** 1970. RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature* **226**:1211-3.
237. **Teplova, M., Y. R. Yuan, A. T. Phan, L. Malinina, S. Ilin, A. Teplov, and D. J. Patel.** 2006. 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* **21**:75-85.
238. **Terzoglou, A. G., J. G. Routsias, S. Avrameas, H. M. Moutsopoulos, and A. G. Tzioufas.** 2006. Preferential recognition of the phosphorylated major linear B-cell epitope of La/SSB 349-368 aa by anti-La/SSB autoantibodies from patients with systemic autoimmune diseases. *Clin Exp Immunol* **144**:432-9.
239. **Topisirovic, I., and N. Sonenberg.** 2011. Translational control by the eukaryotic ribosome. *Cell* **145**:333-4.
240. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4350-4.

241. **Tritschler, F., E. Huntzinger, and E. Izaurralde.** Role of GW182 proteins and PABPC1 in the miRNA pathway: a sense of déjà vu. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**:379-84.
242. **Trotta, R., T. Vignudelli, O. Candini, R. V. Intine, L. Pecorari, C. Guerzoni, G. Santilli, M. W. Byrom, S. Goldoni, L. P. Ford, M. A. Caligiuri, R. J. Maraia, D. Perrotti, and B. Calabretta.** 2003. BCR/ABL activates mdm2 mRNA translation via the La antigen. *Cancer Cell* **3**:145-60.
243. **Uchida, N., S. Hoshino, H. Imataka, N. Sonenberg, and T. Katada.** 2002. A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem* **277**:50286-92.
244. **Ule, J., K. Jensen, A. Mele, and R. B. Darnell.** 2005. CLIP: a method for identifying protein-RNA interaction sites in living cells. *Methods* **37**:376-86.
245. **Ule, J., K. B. Jensen, M. Ruggiu, A. Mele, A. Ule, and R. B. Darnell.** 2003. CLIP identifies Nova-regulated RNA networks in the brain. *Science* **302**:1212-5.
246. **Valavanis, C., Z. Wang, D. Sun, M. Vaine, and L. M. Schwartz.** 2007. Acheron, a novel member of the Lupus Antigen family, is induced during the programmed cell death of skeletal muscles in the moth *Manduca sexta*. *Gene* **393**:101-9.
247. **Van Horn, D. J., C. J. Yoo, D. Xue, H. Shi, and S. L. Wolin.** 1997. The La protein in *Schizosaccharomyces pombe*: a conserved yet dispensable phosphoprotein that functions in tRNA maturation. *RNA* **3**:1434-43.
248. **Wang, Z., N. Day, P. Trifillis, and M. Kiledjian.** 1999. An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol Cell Biol* **19**:4552-60.
249. **Wang, Z., H. Glenn, C. Brown, C. Valavanis, J. X. Liu, A. Seth, J. E. Thomas, R. O. Karlstrom, and L. M. Schwartz.** 2009. Regulation of muscle differentiation and survival by Acheron. *Mech Dev*.
250. **Wang, Z., and M. Kiledjian.** 2000. The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Mol Cell Biol* **20**:6334-41.
251. **Wang, Z., J. Tollervey, M. Briese, D. Turner, and J. Ule.** 2009. CLIP: construction of cDNA libraries for high-throughput sequencing from RNAs cross-linked to proteins in vivo. *Methods* **48**:287-93.
252. **Weinmann, R., T. G. Brendler, H. J. Raskas, and R. G. Roeder.** 1976. Low molecular weight viral RNAs transcribed by RNA polymerase III during adenovirus 2 infection. *Cell* **7**:557-66.
253. **Wells, S. E., P. E. Hillner, R. D. Vale, and A. B. Sachs.** 1998. Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* **2**:135-40.
254. **Weng, H., C. Kim, C. Valavanis, Z. Wang, and L. M. Schwartz.** 2009. Acheron, an novel LA antigen family member, binds to CASK and forms a complex with Id transcription factors. *Cell Mol Biol Lett* **14**:273-87.
255. **Werner, M., P. Thuriaux, and J. Soutourina.** 2009. Structure-function analysis of RNA polymerases I and III. *Curr Opin Struct Biol* **19**:740-5.
256. **White, R. J.** 2008. RNA polymerases I and III, non-coding RNAs and cancer. *Trends Genet* **24**:622-9.
257. **Winkler, C., K. Denker, S. Wortelkamp, and A. Sickmann.** 2007. Silver- and Coomassie-staining protocols: detection limits and compatibility with ESI MS. *Electrophoresis* **28**:2095-9.
258. **Witkin, K. L., and K. Collins.** 2004. Holoenzyme proteins required for the physiological assembly and activity of telomerase. *Genes Dev* **18**:1107-18.
259. **Wolin, S. L., and T. Cedervall.** 2002. The La protein. *Annu Rev Biochem* **71**:375-403.
260. **Xue, D., D. A. Rubinson, B. K. Pannone, C. J. Yoo, and S. L. Wolin.** 2000. U snRNP assembly in yeast involves the La protein. *EMBO J* **19**:1650-60.
261. **Xue, Y., Z. Yang, R. Chen, and Q. Zhou.** 2010. A capping-independent function of MePCE in stabilizing 7SK snRNA and facilitating the assembly of 7SK snRNP. *Nucleic Acids Res* **38**:360-9.
262. **Yang, R., S. A. Gaidamakov, J. Xie, J. Lee, L. Martino, G. Kozlov, A. K. Crawford, A. N. Russo, M. R. Conte, K. Gehring, and R. J. Maraia.** 2010. LARP4 binds poly(A), interacts

- with poly(A)-binding protein MLE domain via a variant PAM2w motif and can promote mRNA stability. *Mol Cell Biol*.
263. **Yang, Z., Q. Zhu, K. Luo, and Q. Zhou.** 2001. The 7SK small nuclear RNA inhibits the CDK9/cyclin T1 kinase to control transcription. *Nature* **414**:317-22.
264. **Yik, J. H., R. Chen, R. Nishimura, J. L. Jennings, A. J. Link, and Q. Zhou.** 2003. Inhibition of P-TEFb (CDK9/Cyclin T) kinase and RNA polymerase II transcription by the coordinated actions of HEXIM1 and 7SK snRNA. *Mol Cell* **12**:971-82.
265. **Yoo, C. J., and S. L. Wolin.** 1997. The yeast La protein is required for the 3' endonucleolytic cleavage that matures tRNA precursors. *Cell* **89**:393-402.
266. **Yoshizawa, S., L. Rasubala, T. Ose, D. Kohda, D. Fourmy, and K. Maenaka.** 2005. Structural basis for mRNA recognition by elongation factor SelB. *Nat Struct Mol Biol* **12**:198-203.
267. **Zanin, E., A. Pacquelet, C. Scheckel, R. Ciosk, and M. Gotta.** 2010. LARP-1 promotes oogenesis by repressing fem-3 in the *C. elegans* germline. *J Cell Sci* **123**:2717-24.
268. **Zhu, J., A. Hayakawa, T. Kakegawa, and R. L. Kaspar.** 2001. 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* **1521**:19-29.

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
40S	kleine ribosomale Untereinheit
60S	große ribosomale Untereinheit
80S	translationsaktives Ribosom (40S + 60S)
α	alpha
β	beta
γ	gamma
μ	mikro
A	Amper
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-Triphosphatase
BSA	Rinderserum-Albumin (engl.: Bovine Serum Albumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
°C	Grad Celsius
Ci	Curie
cm	Centimeter
cpm	Zerfälle pro Minute(engl.: counts per minute)
Ct	Carboxyterminal
CTD	C-terminale Domäne
CTP	Cytosin-5'-Triphosphat

d	desoxy
Da	Dalton
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl.: deoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
engl.	Englisch
eRF	eukaryotischer Recyclingfaktor
et al.	und andere (lat.: et alterae)
FKS	Fötale Kälberserum (engl.: fetal calf serum)
g	Gramm
Gppp	G Guanylyl-(5'-5')-Guanosin-Triphosphat
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie
GST	Glutathion-S-Transferase
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
h	Stunde
i.v.T.	<i>In vitro</i> Translation
HERDS	heterogene ektopische RNP-abgeleitete Strukturen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-2-Ethansulfonsäure
hnRNPs	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins
IgG	Immunglobulin der Klasse G
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
IRES	Interne Ribosomen Startseite (engl.: Internal ribosome entry site)
k	kilo

L	Liter
LaM	La Motif
LARP	La ähnliches Protein (engl.: La-related protein)
m	milli
M	molar
MCS	Klonierungsstelle eines Vektors (engl.: multiple cloning site)
MeCPE	5'-Methylphosphat Capping Enzym
m ³ G	N ² ,N ² ,N ⁷ -Trimethylguanosin
m ⁷ G	N ⁷ -Monomethylguanosin
min	Minute
miRNA	mikro RNA
MLLE	Madmoiselle Domäne
mRNA	Boten-RNA (engl.: messenger-RNA)
mRNP	mRNA Ribonukleoproteinpartikel
n	nano
NK	natürliche Killerzellen
NLS	nukleares Lokalisierungssignal
Nt	Aminoterminal
NTD	N-terminale Domäne
ORF	Offenes Leseraster (engl.: Open reading frame)
p	piko
P	Phosphat
PAA	Polyacrylamid
PABPC1	Poly (A) bindendes Protein cytoplasmatisch 1
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	PABP assoziierende Domäne
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: phosphatebuffered saline)
PCD	programmierten Zelltod (engl.: programmed cell death)
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction)

pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PIC	Prä-Initiation complex
PKC	Protein Kinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Pol. II	RNA Polymerase II
Pol. III	RNA Polymerase III
prä-mRNA	Primärtranskript einer mRNA
RACK1	Rezeptor für aktivierte C Kinase
RBP	RNA bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure (engl.: ribonucleic acid)
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoproteinpartikel
rpm	Umdrehungen pro Minute (engl.: revolutions per minute)
RRM	RNA Erkennungsmotif (engl.: RNA recognition motif)
RT	Reverse Transkription
s	Sekunden
s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SDS	Natrium-Dodecylsulfat (engl.: sodium dodecyl sulfate)
SLE	Systemischer Lupus erythematoses
snRNA	kleine nukleäre RNA (engl.: small nuclear RNA)
snRNP	kleines nukleäres RNP (engl.: small nuclear RNP)
snoRNA	kleine nukleoläre RNA (engl.: small nucleolar RNA)
snoRNP	kleines nukleoläres RNP (engl.: small nucleolar RNP)
SS	Sjögren Syndrom
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TOP	5'-terminale Oligopyrimidine
Tris	Tris-(Hydroxymethyl-)Aminomethan
tRNA	Transfer-RNA

UTP	Uridin-5'-Triphosphat
UTR	Untranslatierte Region einer mRNA
UV	Ultraviolette Strahlung
V	Volt
v/v	Volumenanteil am Gesamtvolumen
Vol.	Volumenanteil
w/v	Gewichtsanteil am Gesamtvolumen
z. B.	zum Beispiel

8.2. Buchstabenabkürzungen für Aminosäuren und Nukleotide

8.2.1. 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

8.2.2. Nukleotide

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

8.3. Aminosäuresequenzen

Aminosäuresequenz von LARP4B, *accession number*: NP_055970

MTSDQDAKVVAEPQTQRVQEGKDSAHLMNQPI SQTTSSQTSI PPLSQVPATKVSELNPNAEV
 WGAPVLHLEASSAADGVSAAWEEVAGHHADRG PQGSDANGDGDQGHENAALPDPQESDPADM
 NALALGPSEYDSL PENSETGGNESQ PDSQEDPREVLKKTLEFCLSRENLASDMYLISQMDSD
 QYVPITTVANLDHIKKLSTDVDLIVEVLRSLPLVQVDEKGEKVRPNQNR CIVILREISESTP
 VEEVEALFKGDNLPKF INCEFAYNDNWFITFETEADAQQAYKYLREEVKTFOGKPIKARIKA
 KAI AINTFLPKNGFRPLDVSLYAQQRYATSFYFPPMYS PQQQFPLYSLITPQTWSATHSYLD
 PPLVTPFPNTGFINGFTSPA FKPAA SPLTSLRQYPPRSRNP SKSHLRHAI PSAERGPGLLES
 PSIFNFTADRLINGVRSPQTRQAGQTRTRI QNPSAYAKREAGPGRVEPGSLESSPGLGRGRK
 NSFGYRKKREEKFTSSQTQSPTPPKPPSPS FELGLSSF PPLPGAAGNLKTEDLFENRLSSLI
 IGPSKERTLSADASVNTLPVVVSREPSVPASCAVSATYERSP SPAHL PDDPKVAEKQRETHS
 VDRLPSALTATAACKSVQVNGAATELRKPSYAEICQRTSKEPPSSPLQPQKEQKPN TVGCGKE
 EKKLAEPAERYREPPALKSTPGAPRDQRRPAGGRPSPS AMGKRLSREQSTPPKSPQ

Aminosäuresequenz von LARP1, *accession number*: NP_056130

MLWRVLLSKRPPFPHP ELDFQEAPI PSCPGRLPGRKNSVALAAAPRKEPTGDREKPLPFPVL
 APFSNPEHSAPAKVVRAAVPKQRKGSKVGDFGDAINWPTPGEIAHKS VQPQSHKPQPTRKLP
 PKKDMKEQEKGE GSDSKESPKTKSDES GEEKNGDEDCQRGGQKKKG NKHKWVPLQIDMKPEV
 PREKLASRPTRPPEPRHIPANRGEIKGSESATYVPVAPPTPAWQPEIKPEPAWHDQDETSSV
 KSDGAGGARASFRGRGRGRGRGRGRGGTRTHFDYQFGYRKF DGVEGPRTPKYMNNITYYF
 DNVSSTELYSVDQELLKDYIKRQIEYYFSVDNLERDFFLRKMDADGFLPITLIASFHRVQA
 LTTDISLIFAALKDSKVVEIVDEKVR RREEPEKWPLPPIVDYSQTD FSQLLNCPEFVPRQHY
 QKETESAPGSPRAVTPVPTKTEEVSNLKTLPKGLSASLPDL DSENWIEVKKRPRPSPARPKK
 SEESRFSHLTSLPQQLPSQQLMSKDQDEQEELDFLFDEEME QMDGRKNTFTAWSDEESDYEI
 DDRDVNKILIVTQTPHYMRRHPGGDR TGNHTSRKMSAELAKVINDGLFYEQDLWAEKFEP
 EYSQIKQEVENFKKVNMI SREQFDTLTPEPPVDPNQEVPPGPPRFQQVPTDALANKLFGAPE
 PSTIARSLPTTVPESPNYRNTRTPRTPRTPQLKDSSQTSRFY PVVKEGRTLDAKMPRKRKTR
 HSSNPPLSHVGVWMDSREHRPRTASISSPSEGTPTVGSYGCTPQSLPKFQHP SHELLKEN
 GFTQHVVYHKYRRRCLNERKRLGIGQSQEMNTLFRFWSFFLRDHF NKKMYEEFKQLALEDAKE
 GYRYGLECLFRYYSYGLEKKFRLDIFKDFQEETVKDYEAGQLYGLEKFWAFLKYSKAKNLDI

DPKLQEYLKGFRRLEDFRVDPMPGEEGNHKRHSVVAGGGGEGRKRCPSQSSSRPAAMISQP
PTPPTGQPVREDAKWTSQHSNTQTLGK

Aminosäuresequenz von PABPC1, *accession number*: NP_002559

MNPSAPSYPMASLYVGD LHPDVTEAMLYEKFSPAGPILSIRVCRDMITRRSLGYAYVNFQQP
ADAERALDTMNF DVIK GKPV RIMWSQRDP SLR KSGVGNIFIKNL DKSIDNKALYDTFSAFGN
ILSCKVVCDENGSKGYGFVHFETQEAAERAIEKMNGMLLNDRKVFVGRFKSRKEREAE L GAR
AKEFTNVYIKNF GEDMDDERLKD LFGKFGPALS VKVMTDESGKSKGFGFVS FERHEDAQKAV
DEMNGKELNGKQIYVGRAQKKVERQTE LKRKFEQMKQDRITRYQGVNLYVKNLDDGIDDERL
RKEFSPFGTITSAKVMMEGGRSKGFGFVCFSSPEEATKAVTEMNGRIVATKPLYVALAQRKE
ERQAHLTNQYMQRMASVRAVNPVINPYQPAPPSGYFMAAIPQTQNR AAYPPSQIAQLRPS
PRWTAQGARPHPFQNMPGAIRPAAPRPPFSTMRPASSQVPRVMSTQRVANTSTQTMGPRPAA
AAAAATPAVRTVPQYKYAAGVRNPQQHLNAQPQVTMQQPAVHVQGEPLTASMLASAPPQEQ
KQMLGERLFLPLIQAMHPTLAGKITGMLLEIDNSEL LHMLESPESLRSKVDEAVAVLQAHQAK
EAAQKAVNSATGVPTV

Aminosäuresequenz von RACK1 (GNB2L1), *accession number*: NP_006089

MTEQMTLRGTLKGHNGWVTQIATTPQFPDMILSASRDKTIIMWKLTRDETNYGIPQRALRGH
SHFVSDVVISSDGQFALSGSWDGT LRLWDLTTGTTTRRFVGH TKDVL SVAFSSDNRQIVSGS
RDKTIKLNWNTLGVC KYTVQDESHSEWVSCVRFSPNSSNPIIVSCGWDKLVKVVNLANCKLKT
NHIGHTGYLNTVTVSPDGLCASGGKDGQAMLWDLNEGKHL YTLDGDIINALCFSPNRYWL
CAATGPSIKIWDLEGIIVDELKQEVISTSSKA EPPQCTSLAWSADGQTLFAGYTDNLVRVW
QVTIGTR

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere Prof. Dr. Utz Fischer für die Vergabe dieses Themas. Vielen Dank für die großartige Unterstützung und Förderung bei der Durchführung dieser Arbeit und für die immer offen stehenden Türen bei allen kleineren und größeren Problemen.

Prof. Dr. Alexander Buchberger und Prof. Dr. Stefan Gaubatz möchte ich für die Übernahme des Zweit- bzw. Drittgutachtens danken.

Ich danke Dr. Michael Grimm für die zahlreichen wertvollen Diskussionsrunden. Danke dass Du immer ein offenes Ohr für mich hattest und jegliche „Schreibarbeit“ so geduldig ertragen hast! Ich wünsche dir auch weiterhin alles Gute und hoffe, eines Tages doch noch in den Genuss eines Grimm'schen Weines zu kommen!

Mein ganz besonderer Dank geht an Anja. Du bist die tollste Freundin die man sich wünschen kann! Ich danke Dir für alles! Deine liebenswerte Art, deine phänomenale Unterstützung egal bei welchen Sorgen und die vielen verrückten Stunden! Ich finde wir sind ein unschlagbares Team! Und sollte ich Dich das eine oder andere Mal nahe des Wahnsinns getrieben haben: Ich mach's wieder gut, versprochen! ☺

Auch Dir Flo möchte ich ganz besonders danken. Dafür dass du mich immer aufgemuntert hast und ich immer auf Dich zählen kann. Auf das die legendären Laby-Abende Tradition bleiben! ☺ Vielen Dank für alles! Ich wünsche Dir noch viel Erfolg!

Ganz viel Dank geht auch an Maritta und Kristina für die schöne Zeit im Labor. Es hat immer sehr viel Spaß gemacht mit Euch beiden. Viele unterschiedliche Charaktere können eben doch ein tolles Team ergeben. Noch viel Erfolg ihr beiden! (Ach und Kristina, falls Du was suchen solltest... ist bestimmt in einer meiner Schubladen... ☺)

Herzlichen Dank Annelie für die Hilfe bei so manchen formellen Problemen.

Außerdem möchte ich mich bei allen Anderen der AG Fischer für hilfreiche Diskussionen und eine angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken. Danke auch an die gesamte AG Buchberger und Szalay.

Ich danke meiner Familie für ihre Unterstützung seit Beginn meines Studiums.

Mein Dank geht auch an alle meinen Freunden aus Würzburg und Eberbach die mich während meines Studiums und der Promotion unterstützt haben. Es ist schön zu wissen, dass ich mich auf Euch verlassen kann. Danke für die schöne Zeit!

Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation: „Regulation der eukaryotischen Translation durch RNA-bindende Faktoren: Strukturelle und funktionelle Charakterisierung des La-verwandten Proteins 4B (LARP4B)“, selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

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

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

Würzburg, 23.12.2011

Katrin Schäffler