Identifikation und Charakterisierung funktioneller Domänen des humanen La Proteins

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von Sven Horke
Hamburg, 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
Auf Antrag von Herrn Professor Dr. H. Will
Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. U. Wienand

Tag der Disputation: 20. Juni 2003

Hamburg, den 30. Mai 2003

Professor Dr. A. Frühwald
Dekan

Abkürzungsverzeichnis 1
1 Einleitung 3
1.1 Das La Protein: Aufbau und Funktionen 3
1.2 Das La Protein und das Hepatitis B Virus 7
1.2.1 Das Hepatitis B Virus 7
1.2.2 Die Wechselwirkung zwischen HBV RNA und La Protein 10
1.3 Die Funktion des La Proteins in der Prozessierung von tRNAs 12
1.4 Der Nukleolus: eine Übersicht 15
1.5 Aufgabenstellung der Arbeit 17

2 Material und Methoden 18
2.1 Materialien 18
2.1.1 Chemikalien 18
2.1.2 Verbrauchsmaterialien 18
2.1.3 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme 19
2.2 Enzyme, Standards, Antikörper und radioaktive Stoffe 20
2.3 Plasmide 21
2.4 Bakterienstämme, Zell-Linien und Medien 22
2.5 Oligonukleotide 22
2.5.1 Oligonukleotide für Mutationen des humanen La Proteins 22
2.5.2 Oligonukleotide zur Umklonierung von DNA Sequenzen aus prokaryotischen in eukaryotische Vektoren 23
2.5.3 Oligonukleotide zur N-terminalen Fusion des hLa-NoLS an PTB-GFP 24
2.5.4 Oligonukleotide zur C-terminalen Fusion des hLa-NoLS an PTB-GFP 24
2.5.5 Oligonukleotide für die Generierung von *templates* zur *in vitro* Transkription 24
2.5.6 Oligonukleotide zur Hybridisierung in Northern Blots 25
2.5.7 Sequenzen der siRNA Oligonukleotide 25
2.5.8 Sequenzen der IRD-Primer für Sequenzierungen 26
2.6 Puffer, Medien, Reagenzien und Lösungen 26
2.7 Geräte 27
2.7.1 Herstellernachweis 28
2.8 Allgemeine proteinbiochemische Methoden 29
2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration 29
2.8.2 Konzentrierung von Proteinen 30
2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese 30
2.8.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat 31
2.8.5 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit *Coomassie-Brilliant-Blue* 32
2.8.6 Western Blot – immunbiologischer Nachweis von Proteinen 32
2.8.7 *In vitro* (De-)Phosphorylierung des hLa Proteins durch Casein-Kinase-II / alkalische Phosphatase 33
2.8.8 Analyse der Homogenität der hLa Präparation durch 2-D-Gelelektrophorese, MALDI-TOF und dynamisches *Light-Scattering* (in Kooperationen) 34
2.9 Synthese, Reinigung und Analyse des rekombinanten hLa Proteins 35
2.9.1 Expression rekombinanter hLa Proteine in prokaryotischen Kulturen 35
2.9.2 Reinigung rekombinanten HIS-tag Proteins mittels Nickel-NTA-Technologie 36
2.9.3 Dialyse von rekombinanten Proteinen 37
2.9.4 Eichung der präparativen Gelfiltrations-Säule S200HR-pg und Reinigung des humanen La Proteins 38
2.9.5 Eichung der analytischen Gelfiltrations-Säule S200-HR-ag und Analyse von Protein-Lösungen 40
2.9.6 Versuche zur ATP-Bindung und ATPase Aktivität des rekombinanten hLa 41
2.10 Klonierung, Extraktion und Analytik von DNA 42
2.10.1 Einführung von Mutationen in hLa-cDNA-Sequenzen mittels PCR 42

2.10.2 Umklonierung von hLa-Sequenzen aus prokaryotischen in eukaryotische Expressionsvektoren ... 44
2.10.3 Herstellung von hLa-PTB-GFP Fusionsproteinen ... 47
2.10.4 Überprüfung von Klonierungen mittels PCR ... 48
2.10.5 Plasmid-DNA-Präparationen ... 49
2.10.6 Cracking – schnelle Extraktion von Plasmid-DNA aus prokaryotischen Zellen ... 49
2.10.7 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung ... 49
2.10.8 DNA-Sequenzierungen ... 50
2.11 RNA-Synthese und RNA-Protein-Wechselwirkungen ... 51
2.11.1 Vektoren für *in vitro* Transkriptionen und die Synthese der Matrizen DNA ... 51
2.11.2 Synthese von RNA-Sonden durch *in vitro* Transkription ... 52
2.11.3 Berechnung der Konzentration der *in vitro* transkribierten, radioaktiven RNA-Sonde ... 53
2.11.4 Analyse von radioaktiven RNAs durch denaturierende Gelelektrophorese ... 54
2.11.5 Präparative Gelelektrophorese und Gelelution nicht radioaktiver RNAs (*UV-Shadowing*) ... 54
2.11.6 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren ... 55
2.11.7 Radioaktive 5'-Markierung von nicht-radioaktiven RNAs und Oligonukleotiden ... 55
2.11.8 Northern Blot als Nachweismethode für RNAs ... 56
2.11.9 EMSA – *electrophoretic mobility shift assay* ... 57
2.11.10 Auswertung von EMSAs mittels Phosphorimager ... 59
2.11.11 Auswertung von EMSAs mittels Autoradiogramm ... 59
2.12 Allgemeine Arbeiten mit prokaryotischen Zellen ... 60
2.12.1 Herstellung kompetenter Zellen ... 60
2.12.2 Transformation von Plasmid-DNA in prokaryotische Zellen ... 60
2.13 Allgemeine Arbeiten mit eukaryotischen Zellen ... 61
2.13.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen ... 61
2.13.2 Zellzählung und DNA-Transfektion in eukaryotische Zellen ... 61
2.13.3 RNAi Behandlung eukaryotischer Zellen ... 62
2.13.4 Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbungen eukaryotischer Zellen ... 63
2.13.5 FRAP – *Fluorescence Recovery After Photobleaching* ... 63
2.13.6 Herstellung von Gesamt-Protein Extrakten aus eukaryotischen Zellen ... 64
2.13.7 Extraktion von gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen ... 65

3 Ergebnisse ... 66
3.1 Reinigung des rekombinanten, humanen La Proteins ... 66
3.1.1 Ni-NTA-Technologie und präparative Gelfiltration ... 66
3.1.2 Weitere Dokumentation der Proteinreinigung durch 2-D-Gelelektrophorese, MALDI-TOF und *Light-Scattering* ... 70
3.1.3 Untersuchungen zur Phosphorylierung des rekombinanten hLa Proteins ... 73
3.2 Herstellung von Mutanten ... 75
3.3 Analytische Gelfiltrations-Chromatographie ... 78
3.4 Interaktion des humanen La Proteins mit HBV RNA-B2 ... 82
3.4.1 Allgemeine Charakterisierung der hLa HBV RNA-B2 Interaktion ... 83
3.4.2 Humanes La Protein bindet hochaffin an HBV RNA-B2 ... 86
3.4.3 Die Spezifität der Bindung des humanen La Proteins an HBV RNA-B2 in nativen EMSAs ... 88
3.4.4 Die Phosphorylierung des humanen La Proteins beeinflusst nicht dessen Bindung an die HBV RNA-B2 ... 92
3.4.5 Bindungsstudien mit HBV RNA-B2 und den Mutanten des humanen La Proteins ... 93
3.5 Wechselwirkungen des humanen La Proteins mit tRNA ... 99

3.5.1 Spezifität der Bindung zwischen humanem La Protein und $tRNA^{Val}$ im nativen EMSA 99
3.5.2 Die Phosphorylierung des humanen La Proteins beeinflusst nicht dessen Bindung an $tRNA^{Val}$ 101
3.5.3 Die Funktionen der Domänen des humanen La Proteins in der Wechselwirkung mit $tRNA^{Val}$ im nativen EMSA 102
3.5.4 Modell über die Hierarchie der RNA-Bindungsstellen des humanen La Proteins 108
3.5.5 Temporärer *knockout* des endogenen La Proteins in humanen Zellen und die Unterbrechung der tRNA Synthese 109
3.6 Subzelluläre *in vivo* Lokalisation des humanen La Proteins 116
3.6.1 Vergleich zwischen endogenem hLa und transfiziertem GFP-hLa 117
3.6.2 Lokalisation der Mutanten des humanen La Proteins 118
3.6.3 Die *in vivo* Funktionalität des hLa-NoLS: Fusion des Signals mit PTB-GFP 126
3.7 Untersuchungen zur *in vivo* Mobilität des hLa Proteins durch FRAP-Experimente 128

4 Diskussion 135
4.1 Reinigung und Analyse des rekombinanten humanen La Proteins 136
4.2 Die Wechselwirkung des humanen La Proteins mit HBV RNA-B2 142
4.3 Die Funktion des humanen La in der Bindung und Synthese von tRNA 150
4.3.1 Die *in vitro* Bindung von $tRNA^{Val}$ durch das humane La Protein 150
4.3.2 Die *in vivo* Funktion des hLa Proteins in der tRNA Synthese 155
***4.4 „Quo vadis, La?“:* RNA als Sprache zwischen La und Nukleolus? 158**
4.5 Zusammenfassung 165
4.6 Aussicht und weiterführende Experimente 167

Literaturverzeichnis 169

Anhang - Sequenzen der hauptsächlich benutzten RNAs und des humanen La Proteins 179

Abkürzungsverzeichnis

aa	*amino acid(s)* = Aminosäure(n)
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	*Bovine Serum Albumin* = Rinder-Serum-Albumin
cDNA	*complementary DNA* = komplementäre DNA
cpm	*counts per minute* = gezählte Signale pro Minute
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DLS	dynamisches *Light-Scattering*
DNA	Deoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP(s)	2'-Desoxyribonukleotid-5'-Triphosphat(e)
dsDNA	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E.coli	*Escherichia coli*
EDTA	*Ethylendiamintetraaceticacid* = Ethylendiamintetraessigsäure
EMSA	*electrophoretic mobility shift assay*
FRAP	*fluorescence recovery after photobleaching*
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBV	Hepatitis B Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HIS	Histidin
HIV	humanes immundefizienz Virus
hLa	humanes La Protein
IPTG	isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid
IRES	*internal ribosomal entry site*
kBp	kilo Basenpaare (1000 Basenpaare)
kDa	Kilodalton
K_D	Dissoziationskonstante
l	Liter
LB	Luria Broth Medium
M	Mol
MALDI-TOF	*matrix assisted laser desorption ionisation- time of flight*
min	Minute(n)

MG	Molekulargewicht
mLa	Maus La Protein
MOPS	(3-[N-Morpholino]propansulfonsäure)
mRNA	*messenger* (Boten-) Ribonukleinsäure
NiNTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
pI	isoelektrischer Punkt
PTB	*polypyrimidine-tract-binding-protein*
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein
Rpm	*rounds per minute* = Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RRM	*RNA recognition motif* = RNA Erkennungs-Motiv
RT	Raumtemperatur
sek	Sekunde
S.cerevisiae	*Saccharomyces cerevisiae*
SDS	Natriumdodecylsulfat
siRNA	*silencer* Ribonukleinsäure
S.pombe	*Schizosaccharomyces pombe*
ssDNA	einzelsträngige DNA
Taq	Thermus aquaticus
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethyl-Ethylendiamin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminoethan
tRNA	*transfer* Ribonukleinsäure
Tyr	Tyrosin
U	Unit(s)
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
Val	Valin
v/v	*volume per volume* = Volumen pro Volumen
v/w	*volume per weight* = Volumen pro Gewicht
WT	Wildtyp
w/v	*weight per volume* = Gewicht pro Volumen
w/w	*weight per weight* = Gewicht pro Gewicht
X.laevis	*Xenopus laevis*

1 Einleitung

1.1 Das La Protein: Aufbau und Funktionen

Die ersten Berichte über das La Protein stammen aus Beschreibungen, welche das Protein als Autoantigen im Serum von Patienten identifizierten, die an rheumatischen Erkrankungen wie systemischem Lupus Erythematodes und dem Sjögrens Syndrom litten (8, 130). Das humane La Protein ist ein 47 kDa Phosphoprotein, welches ubiquitär exprimiert wird, mit etwa $2x10^7$ Molekülen (ca. 50 nM) pro Zelle vorliegt und sich hauptsächlich im Zellkern befindet (57, 72, 91, 221). Der Kernimport erfolgt auf einem Karyopherin-vermittelten Weg (173, 174). Die Lokalisation des Proteins im Nukleolus ist während der späten G_1 und frühen S-Phase Zellzyklus-reguliert (54) und wird durch zellschädigende Einflüsse wie UV-Licht beeinflusst (16). Ferner kommt es zu einer cytoplasmatischen Anreicherung während der Apoptose, da das hLa Protein C-terminal proteolytisch gespalten wird und dadurch das NLS verliert (14, 175). Dieses gilt gleichermaßen für die Infektion von Zellkulturen mit Poliovirus (187), was ebenfalls zu einem Verlust des NLS durch Abspaltung des C-Terminus führt. Eine transiente Anreicherung des hLa im Cytoplasma ohne Verlust des NLS wurde bei Herpes-Simplex-Virus Infektionen beobachtet (17). Die subzelluläre Lokalisation des humanen La Proteins oder des Hefe-Homolog Lhp1p wird nicht durch eine (De-) Phosphorylierung beeinflusst (30, 120).

Das La Protein und Homologe konnten in humanen Zellen sowie in mehreren verschiedenen Spezies nachgewiesen werden, wie z.B. in Ciliaten (3), in den Hefen *S.pombe* und *S.cerevisiae* (226), in *Drosophila melanogaster* (226), *Trypanosoma brucei* (218)*, Xenopus laevis* (158, 181) und es wird wahrscheinlich in *Caenorhabditis elegans* exprimiert (diskutiert in (221)). Dabei unterscheidet sich das Protein in seiner Länge und in dem Gehalt der einzelnen Proteindomänen je nach Spezies. Der N-terminale Teil des Proteins ist größtenteils hoch konserviert, wohingegen deutliche Unterschiede im C-Terminus zu finden sind (Übersichtsartikel (126, 221)). Ferner sind die homologen Proteine in Hefe, aus denen viele der Ergebnis zum La Protein stammen, gegenüber dem humanen La Protein (298 bzw. 275 Aminosäuren für *S.pombe* bzw. *S.cerevisiae* gegenüber 408 Aminosäuren für das humane La) deutlich verkürzt.

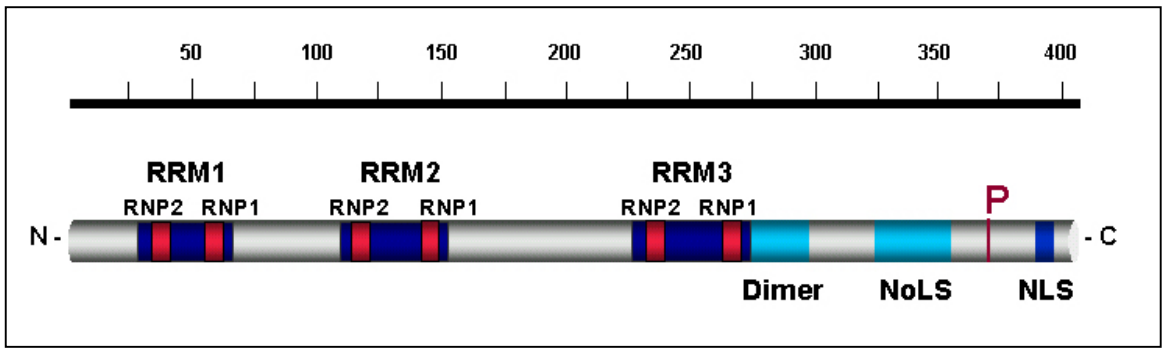
Das humane La Protein (hLa) besitzt folgende Domänen (siehe Übersichtsartikel (127, 221) und nachfolgende Verweise): 3 RNA Erkennungs-Motive (RRMs) mit je 2 Ribonukleoprotein-Konsensus-Sequenzen (RNPs), eine Multimerisierungsdomäne, mindestens ein Nukleus-Lokalisations-Signal (NLS), ein Nukleolus-Lokalisations-Signal (NoLS; in dieser Arbeit identifiziert), vermutlich zwei Sequenzmotive, welche das La Protein im Kern zurückhalten (*nuclear retention elements* (NREs)), mehrere Phosphorylierungsstellen (hauptsächlich Serin-366), sowie C-terminal eine sehr basische Region und ein potentielles Walker-A-Motiv, welches möglicherweise eine ATP-Bindungsstelle darstellt. Durch frühere Arbeiten wurde die

Existenz von sogenannten PEST-Sequenzen im hLa postuliert, welche reich an den Aminosäuren Prolin (P), Glutamat (E), Serin (S) und Threonin (T) sind und potentielle proteolytische Spaltstellen darstellen (213). Mit heutigen Computerprogrammen, welche verschiedenste Motive in Protein-Sequenzen vorhersagen, werden jedoch keine PEST-Sequenzen identifiziert. In weiteren Arbeiten wurde eine Helikase-Aktivität und eine ATPase-Aktivität identifiziert (18, 19, 97). Eine Übersicht über die verschiedenen Domänen des humanen La Proteins wird in der folgenden Tabelle gegeben:

Bezeichnung der Domäne	**Position (Aminosäuren)**	**Referenzen**
RRM1, RNP-2	aa 20 – 25	(126, 127)
RRM1, RNP-1	aa 64 – 69	(126, 127)
RRM2, RNP-2	aa 113 – 118	(126, 127)
RRM2, RNP-1	aa 151 – 158	(126, 127)
RRM3, RNP-2	aa 235 – 240	(100, 126, 127)
RRM3, RNP-1	aa 268 – 276	(100, 126 , 127)
NRE	aa 165 – 337, insbesondere 266 – 269	(191)
NRE	aa 316 – 332	(98), gegensätzlich zu (191)
Multimerisierung	aa 298 – 348	(44)
Multimerisierung	aa 274 – 291	diese Studie, (94)
NoLS	aa 323 – 354	diese Studie
WAM	aa 333 – 339	(206)
PBS (konservierte, basische Region)	aa 348 – 368	BLOCKS-Programm, (92)
NLS	aa 383 – 400	(191)

Tabelle 1.1-1: Übersicht über die bisher beschriebenen Domänen und Regionen des humanen La Proteins. Dargestellt sind die verschiedenen Regionen des hLa, welche bislang funktionell und/oder durch strukturelle Vorhersagen beschrieben sind. Die entsprechenden Referenzen sind angegeben; für die RRMs wurden teilweise Übersichtsartikel genannt. RRM = RNA Erkennungs-Motiv; RNP = Ribonukleoprotein-Partikel-Konsensussequenz; NRE = *nuclear retention element*; NoLS = Nukleolus-Lokalisations-Signal; WAM = Walker-A-Motiv (potentielles ATPase Motiv); PBS = Phosphat-Bindungstelle; NLS = Nukleus-Lokalisations-Signal; ATP = Adenosintriphosphat; aa = Aminosäure.

Abbildung 1.1-1: Schematische Übersicht über die Domänen des humanen La Proteins, welche für diese Studie von besonderer Relevanz sind. Oben ist die ungefähre Position der Aminosäuren 1 – 408 des hLa angegeben. Einige der zuvor genannten Motive sind in die Schemazeichnung des hLa Proteins einbezogen. Diese umfassen die aus der Literatur bekannten Regionen sowie zur Vollständigkeit und Aktualität die hier identifizierte Domäne. RRM = RNA-Erkennungs-Motiv; RNP = Ribonukleoprotein-Konsensussequenz; Dimer = Dimerisierungs-Domäne; NoLS = Nukleolus-Lokalisations-Signal; NLS = Nukleus-Lokalisations-Signal. Weitere nicht einbezogene potentielle Domänen sowie Referenzen finden sich in Tabelle 1.1-1.



Das La Protein gehört zur Familie der RNA bindenden Proteine, welche sich durch die Existenz eines oder mehrerer RNA-Erkennungs-Motive (RRMs) auszeichnen (25, 34-36, 105). Neben Arginin-reichen Motiven, KH-Motiven oder einer RGG-Box (RGG = Arg-Gly-Gly) sind insbesondere diese 80 – 100 Aminosäuren langen RRMs als RNA Bindungsmotive beschrieben, welche sich durch die Präsenz von zwei charakteristischen RNP-Konsensussequenzen auszeichnen (32, 105). Das RNP-1 und RNP-2 liegen als Oktamer bzw. Hexamer vor und sind durch einen etwa 30 Aminosäuren langen *Spacer* getrennt. Das gesamte RRM nimmt eine β1α1β2β3α2β4-Struktur ein, wie es für andere RRM enthaltende Proteine gezeigt wurde (93, 144, 220). Dabei liegen die RNP-Sequenzen in den β1 und β3 Strukturen in einer Ebene nebeneinander, wobei extern orientierte aromatische Reste in diesen Sequenzen die RNA-Bindung vermitteln (69). Demgegenüber sind aromatische Reste außerhalb der β-Faltblätter für die richtige Positionierung der RNA und des RRMs verantwortlich (69).

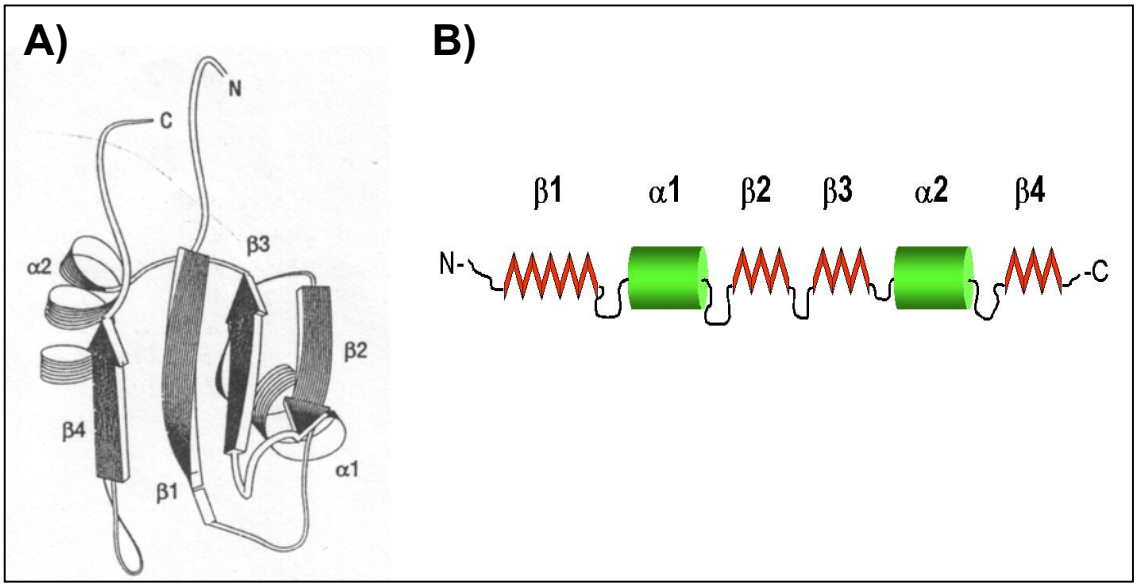


Abbildung 1.1-2: Strukturelle Organisation von RRMs. (A) Die Abbildung zeigt die Struktur des RRMs des mRNA-bindenden Proteins hnRNP C (220). Dieses Motiv weist eine β1α1β2β3α2β4-Organisation auf, wie sie für RRMs typisch ist. Die hochkonservierten RNP-1 und RNP-2 Konsensussequenzen, welche sich je in der β3 und β1 Struktur befinden, liegen sich in einer Ebene gegenüber und sind an der direkten Kontaktbildung mit der RNA beteiligt. Pfeile = β-Faltblätter; gerollte Bänder = α-Helices; N = N-Terminus; C = C-Terminus. **(B)** Schematische Darstellung der RRM-Struktur mit angedeuteten β-Faltblättern (*rot*) und α-Helices (*grün*) wie oberhalb angegeben. Konsensussequenzen der RNPs –1 und –2 finden sich in Abb. 3.4.5-2C.

Die Funktionen des La Proteins liegen insbesondere in RNA-Protein-Wechselwirkungen, da das Protein mit einer Vielzahl unterschiedlicher RNAs interagiert. Dazu zählen zelluläre RNAs, wie z.B. Histon mRNA (132), Telomerase RNA (60), prä-5S rRNA (171, 186), prä-tRNA (57, 99, 171, 227), snRNAs (152, 170, 203) und snoRNAs (108) sowie mehrere virale RNAs, wie z.B. die von HIV (39), HBV (85, 87), HCV (7, 194, 223), Epstein-Barr Virus (115), Adenovirus (82) und Poliovirus (133).

Unter den zellulären RNAs finden sich hauptsächlich RNA Polymerase III Transkripte, welche als gemeinsames Merkmal ein 3´-(UUU-OH) Terminus aufweisen (197), sowie mehrere RNA Polymerase II Produkte (s.o. und (108, 224)). Diese Interaktionen dienen in den meisten Fällen vor allem dem Schutz der RNAs vor unspezifischen Degradationen durch Endo- oder Exonukleasen. Des weiteren hält das La Protein die RNA wahrscheinlich in einer bestimmten Struktur und macht diese den an der Prozessierung beteiligten Faktoren zugänglich. Deshalb wird das La Protein auch als RNA-Chaperon bezeichnet. Von anderen Proteinen ist bekannt, dass eine mittels RRM gebundene RNA relativ exponiert und für andere Faktoren weiterhin zugänglich ist (70, 107, 143, 166). Zusätzlich hält das La Protein bestimmte RNAs vermutlich im Nukleus, bis diese vollständig prozessiert sind und in andere Regionen transportiert (26, 73, 75, 192) oder zu funktionellen RNPs assoziiert werden (152). Zusätzlich wurde eine Funktion des hLa als ein RNA-Exportfaktor in das Cytoplasma diskutiert, was für hY1 RNA (192), nicht aber für 5S rRNA zutrifft (75). Der genaue Mechanismus, welcher die subzelluläre Verteilung des La Proteins regelt, ist jedoch ungeklärt und könnte sich aus der Wechselwirkung mit verschiedenen RNAs ergeben.

Die Stabilisierung von RNA Vorläufern ist insbesondere während der molekularen Reifung dieser prä-RNAs von Bedeutung, bevor sie ihre jeweiligen Funktionen einnehmen. Dies konnte beispielsweise bereits für zelluläre U6snRNA und prä-tRNA gezeigt werden (siehe 1.3 sowie (170, 171)). Daneben stabilisiert das La Protein verschiedene virale RNAs und schützt diese vor exo-/endonukleolytischen Aktivitäten, wie beispielsweise für die RNA des Hepatitis B Virus vermutet ((85, 86), siehe 1.2). Hierbei ist unbekannt, wie die Differenzierung zwischen den verschiedenen RNA Substraten erfolgt und welche Domänen des La Proteins dafür verantwortlich sind.

Daneben scheint das La Protein als Terminationsfaktor und am Recycling der RNA Polymerase III Aktivität beteiligt zu sein, und könnte hierin durch eine Phosphorylierung an Serin-366 reguliert werden (58, 125). Dem Modell zufolge, welches durch Maraia und Mitarbeitern aufgestellt wurde, dient La als Terminationsfaktor der RNA Polymerase III, bindet an die transkribierte RNA und führt zur Re-Initiation des Transkriptionskomplexes, sobald es sich von der RNA abgelöst hat. Dieses impliziert einen negativen Antwort-Mechanismus im Hinblick auf den zellulären Gehalt an unprozessierten-, durch La gebundenen RNA Polymerase III Produkten (67, 125, 128). Demgegenüber wurde diese Regulierung in anderen Arbeiten als unabhängig vom La Protein eingestuft (117, 217). Somit ist diese Funktion nicht einwandfrei

geklärt oder unterscheidet sich zwischen den homologen La Proteinen aus Hefe, *Xenopus* und humanen Zellen, welche in jenen Studien benutzt wurden.
Zusätzlich wurde ein verstärkender Effekt des La Proteins auf die Translation der Poliovirus- und HCV RNA beschrieben, wobei sogenannte IRES-Elemte (*internal ribosomal enty site*) benutzt werden (7, 22, 133, 198). Des weiteren stimuliert das La Protein die Translation von HIV-1 RNAs mit 5´TAR Sequenz (200) und verhindert die Translation von mRNAs mit fehlender 5´-Cap-Modifizierung (199).
Eine Regulation bestimmter Funktionen (s.u.) des La Proteins über eine (De-) Phosphorylierung wird in verschiedenen Arbeiten diskutiert, wobei dieses jedoch in Abhängigkeit von der Spezies unterschiedlich sein kann. So wurde für Lhp1p, das La homologe Protein in *S.cerevisiae*, gezeigt, dass die Phosphorylierung des Proteins keinen Einfluss auf die Prozessierung oder Stabilität von prä-tRNAs ausübt (120). Hingegen wurde für das humane La Protein gezeigt, dass die Phosphorylierung die Prozessierung der prä-tRNA steuert, wobei nur etwa 15% des La Proteins in HeLa Nukleusextrakten dephosphoryliert sind (57, 99). Dieses zeigt deutliche Unterschiede zwischen der Funktion der Phosphorylierung im humanen La Protein oder in homologen Proteinen anderer Spezies. Des weiteren wurde gezeigt, dass sowohl *X.laevis* als auch die Hefen *S.pombe* und *S.cerevisiae* Mechanismen für die tRNA Reifung besitzen, welche ein Fehlen des La Proteins kompensieren können (117, 120, 222). Für humane Zellen war zu Beginn der Arbeit unklar, ob ein Fehlen des La Proteins für bestimmte Funktionen wie z.B. der tRNA Prozessierung ausgeglichen werden kann.
Durch die aufgeführten Ergebnisse und Daten sind eine Vielzahl verschiedener Funktionen und Wechselwirkungen des La Proteins beschrieben. Es ist jedoch bisher nur ansatzweise verstanden, wie das La Protein zwischen verschiedenen RNAs unterscheidet, welchen Einfluss hierauf die einzelnen Domänen oder die Phosphorylierung haben und wie sich die Interaktion mit RNAs auf die subzelluläre Verteilung des Proteins auswirkt.

1.2 Das La Protein und das Hepatitis B Virus

1.2.1 Das Hepatitis B Virus

Das humane Hepatitis B Virus (HBV) gehört zu den Orthohepadnaviren, welche zur Virusfamilie der *Hepadnaviridae* gehören und gemeinsam mit den *Papovaviridae*, *Adenoviridae*, *Herpesviridae* und *Poxviridae* zur Familie der Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom zählen. Eine Infektion mit einem Hepatitis B Virus kann zu einer akuten oder einer chronischen Leberentzündung führen, wobei schätzungsweise 350 Millionen Menschen weltweit chronisch mit HBV infiziert sind und ein deutlich erhöhtes Risiko zur Ausbildung von

hepatozellulären Karzinomen aufweisen (28, 31, 183). Eine Schädigung der Leber wird dabei nicht oder nur selten durch eine cytopathogene Funktion des Virus ausgelöst, sondern hautsächlich durch Schädigung der infizierten Hepatocyten durch das Immunsystem des Wirts (40, 159). Obwohl ein rekombinanter Impfstoff gegen das Virus bereits seit den 1980ern existiert (131), verursachen das Virus und die Folgen der Infektion jährlich etwa 1,5 Million Todesfälle (153). Die Therapie einer bereits bestehenden Infektion ist nur relativ selten erfolgreich, so dass die Entwicklung neuartiger antiviraler Strategien von großer Bedeutung und eine Herausforderung für die medizinische Forschung ist.

Im Zentrum des Lebenszyklus des Hepadnavirus steht die Synthese eines ~3,5 kB langen partiell-doppelsträngigen rcDNA Genoms (*relaxed circular* DNA), welches aus der reversen Transkription eines RNA Vorläufers hervorgeht, dem sogenannten Prägenom. Der Mechanismus der RNA-abhängigen DNA Synthese und der überwiegende Teil der Abläufe während der viralen Replikation ist weitgehend bekannt und ist in mehreren Übersichtsartikeln detailliert beschrieben (65, 183). Jedoch sind die frühen Schritte in der viralen Replikation, wie z.B. der Eintritt in die Zelle, der Verlust der Hüllmembran nach Eintritt in die Zelle und der Transport des Genoms in den Zellkern nur wenig untersucht. Gründe hierfür liegen unter anderem im Fehlen von infizierbaren Zell-Linien.
Das infektiöse Viruspartikel hat einen Durchmesser von 42 nm und besitzt eine aus dem endoplasmatischen Retikulum des Wirts stammende Lipidmembran, in der das HBsAg (*Hepatitis B virus surface antigen*) eingelagert ist. Darin eingeschlossen befindet sich ein ikosaedrisches Kapsid, welches aus dem HBcAg (*Hepatitis B virus core antigen*) aufgebaut ist und welches das DNA-Genom enthält. Neben diesen infektiösen Partikeln existieren noch sphärische und fadenförmige Partikel, welche keine DNA enthalten und nicht infektiös sind. Das Genom des HB Virus ist zirkulär, partiell-doppelsträngig, hat eine Länge von 3182 Basen (Galibert-Sequenz) und ist kovalent mit der viralen Polymerase verbunden. Das Genom ist sehr kompakt organisiert, so dass jedes Nukleotid kodierend ist, der überwiegende Teil der Nukleotide für mehr als einen Leseraster genutzt wird und die Leseraster teilweise überlappend sind (178, 183). Die Transkription wird über vier virale Promotoren gesteuert. Die von der zellulären RNA Polymerase II transkribierten viralen RNAs sind ca. 3,35 kB, 2,4 kB, 2,1 kB und 0,8 kB lang und weisen das gleiche 3´-Ende auf, da das HBV nur ein einziges Prozessierungs-/Polyadenylierungssignal besitzt. Von den viralen Transkripten werden 7 virale Proteine translatiert, nämlich drei Oberflächenproteine (L-, M-, und S-HBsAg), ein Kapsidprotein (HBcAg), ein sezerniertes Protein (HBeAg), ein P-Protein mit DNA-Primer-, Polymerase und RNase H Aktivität, sowie das HBx-Protein, welches Transkriptions-modulierende Funktionen hat (siehe Übersichtsartikel (139, 183)).

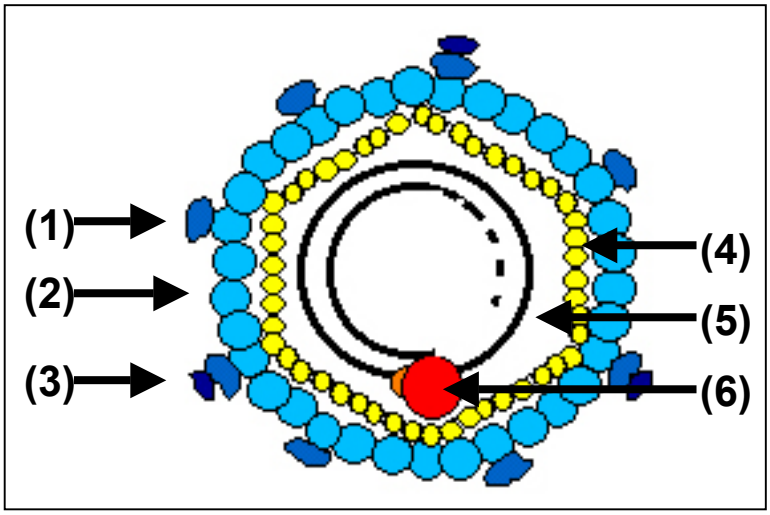


Abbildung 1.2.1-1:

Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus. In die Lipidmembran des infektiösen HBV sind die Oberflächenproteine L **(3)**, M **(1)** und S **(2)** eingelagert. Die Hülle umschließt das aus dem Kapsidprotein **(4)** aufgebaute Kapsid, welches das partiell-doppelsträngige DNA Genom **(5)** mit kovalent gebundener Polymerase **(6)** enthält.

Bei den viralen Hüllproteinen S, M und L (auch als S, prä-S2 und prä-S1 bezeichnet) ist das S-Protein das kleinste der drei und das M und L Protein stellen N-terminale Verlängerungen des S Proteins da, so dass diesen drei Proteinen die S Domäne gemeinsam ist. Das HBx Protein scheint für eine *in vivo* Infektion essentiell, während das HBeAg dafür nicht notwendig ist (38, 233). Die Funktionen beider Proteine sind nicht vollständig geklärt.

Nach der Infektion einer Hepatozyte über einen bisher nicht identifizierten Rezeptor verliert das Virus die Hüllmembran und das Genom wird in den Zellkern transportiert. Dort wird das partiell-doppelsträngige DNA Genom von Enzymen der Wirts-Zelle zu einer doppelsträngigen DNA aufgefüllt und in eine kovalent geschlossene zirkuläre Form überführt (cccDNA; *covalently closed circular DNA*). Dieses Molekül ist die Matrize für die Transkription aller viralen RNAs, so dass die Bildung von cccDNA die erfolgreiche Initiation der Infektion anzeigt. Aus den 3,35 kB, 2,4 kB und 2,1 kB langen RNAs gehen das HBcAg und die HBsAg Proteine hervor, während von den 3,35 kB langen RNAs die Polymerase, das HBcAg sowie die Vorstufen des HBeAg gebildet werden. Des weiteren dient dieses Transkript als pregenomische RNA, welche durch die multifunktionelle virale Polymerase zu einem Minusstrang und dieser anschließend zu einem Plusstrang transkribiert wird. Die Polymerase besitzt Reverse-Transkriptase-Aktivität und eine RNase H Aktivität. Zudem bindet die Polymerase über eine weitere Domäne, die sogenannte terminale Proteinregion, an das Enkapsidierungssignal *Epsilon* der pregenomischen RNA und initiiert somit die Verpackung des Virus (139, 169). Die reverse Transkriptase-Aktivität der viralen Polymerase stellt eine Verwandtschaft zur Replikation von Retroviren dar und endet mit der Herstellung des rcDNA Genoms mit komplettem Minusstrang und einem nicht kompletten Plusstrang.

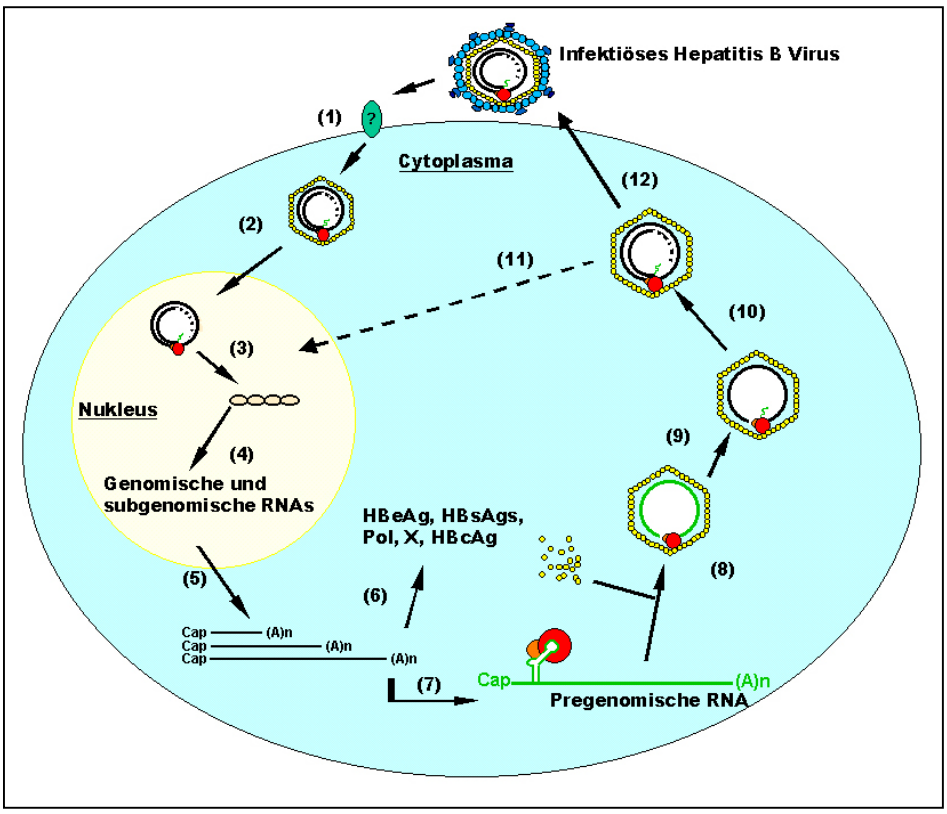


Abbildung 1.2.1-2: Schematische Darstellung des Lebenszyklus des humanen Hepatitis B Virus. Über einen nicht bekannten Rezeptor dringt das Virus in die Zelle ein **(1)**, verliert Hüllmembran **(2)** und Kapsid, und das Genom wird in den Zellkern transportiert. Nach Reparatur des partiell-doppelsträngigen DNA Genoms zur cccDNA **(3)** erfolgt die Transkription der pregenomischen und subgenomischen RNA **(4)** und der Transport der RNAs ins Cytoplasma **(5)**. Von diesen werden die viralen Proteine synthetisiert **(6)**, so dass die virale Polymerase an ihre eigene mRNA-, die pregenomische RNA binden kann **(7)**, um die Verpackung in das Kapsid einzuleiten **(8)** wo die virale DNA Synthese stattfindet **(9-10)**. Nachdem die DNA synthetisiert und das Kapsid gereift wurde, erhält es während des Transports durch das endoplasmatische Retikulum eine Hüllemembran mit viralen Strukturproteinen und verlässt die Zelle **(12)**. Alternativ kann das Kapsid auch in den Nukleus zurückkehren **(11)**, um mehr Moleküle an cccDNA im Zellkern zu generieren, da diese nicht semikonservativ repliziert wird.

1.2.2 Die Wechselwirkung zwischen HBV RNA und La Protein

Da das Hepatitis B Virus eine hohe Wirtsspezifität aufweist, gab es lange Zeit kein Tiermodell, welches die genauere Untersuchung der Wechselwirkung zwischen Wirt und Virus zuließ. Besonderes Interesse galt der Untersuchung der Immunantwort des infizierten Wirts und einer damit verbundenen Eliminierung des Virus. Dieses wurde durch die Entwicklung eines transgenen Mausmodells möglich, in welchem das gesamte HBV Genom exprimiert wird und das Virus repliziert (15, 41, 77, 79-81, 141). In einschlägigen Arbeiten hierzu wurde gezeigt, dass in den HBV-replizierenden transgenen Mäusen Peptide des HBsAg in MHC-I Komplexen (*major histocompatibility complex*) auf der Zelloberfläche infizierter Zellen präsentiert werden. Bei einer Injektion von HBsAg-spezifischen cytotoxischen T-Lymphozyten (CTLs) in die transgenen Mäuse wurde eine drastische Hemmung der viralen Expression beobachtet (76).

Weitere Studien ergaben, dass dabei zwei verschiedene Wege der Viruseliminierung induziert wurden. Während einer der Wege zur Cytolyse der HBV infizierten Zellen führte (79), leitete der andere Weg einen nicht-cytotoxischen Abbau der viralen Proteine und replikativen Intermediate ein. Es wurden alle viralen Genprodukte eliminiert, wobei die viralen RNAs erst verspätet abgebaut wurden (79). Ferner wurde gezeigt, dass der Abbau der viralen RNA durch einen post-transkriptionalen Mechanismus über die Cytokine IFN-γ und TNF-α erfolgte (77, 207).

Auf der Suche nach zellulären Proteinen, welche zum CTL-induzierten post-transkriptionellen Abbau der HBV RNA führten, wurde in Maus-Kernextrakten das La Protein als HBV RNA bindendes Protein identifiziert (85, 87). Des weiteren ergaben diese Studien, dass der Cytokin-vermittelten Abbau der HBV RNA mit einer Prozessierung des La Proteins in kleinere Fragmente eng korrelierte. Dieses erlaubte die Annahme, dass das La Protein an der Stabilisierung der HBV RNA beteiligt ist. In weiteren Untersuchungen wurde die Region in der HBV RNA bestimmt, welche durch das La Protein gebunden wird. Diese Region umfasst ein 91 Nukleotid langes Segment der HBV RNA (HBV RNA-B, Position 1243 – 1333), in welcher die La-Bindungsstelle auf die Bereiche 1275 – 1291 eingegrenzt wurde. Dieser Bereich befindet sich am 5´-Ende des PREs (*post-transkriptional regulatory element*), welches möglicherweise den Transport der viralen RNA aus dem Nukleus vermittelt (225). Eine computer-gestützte Berechnung der potentiellen Struktur der HBV RNA-B ergab eine Haarnadelschleife im Bereich der La Bindungsstelle (Abb. 1.2.2-1A). Die Einführung von Mutationen in diese Region führte zu einer reduzierten Bindung durch das mLa Protein und zeigte, dass die Struktur für die Bindung durch mLa entscheidend ist (87). Zusätzlich konnte dargestellt werden, dass die Mutations-bedingte Auflösung der Haarnadelschleife zu einer verringerten Halbwertszeit der viralen RNA führte (52). Ferner wurde gezeigt, dass ein CTL-induzierter Abbau der HBV RNA in transgenen Mäusen eine endonukleolytische Spaltung der HBV RNA an Stellen hervorrief, welche in unmittelbarer Nähe zur La Bindungsstelle liegen (86). Daraus wurde geschlussfolgert, dass das La Protein die HBV RNA durch seine Bindung schützen kann, indem es die Erkennung der Spaltstellen durch Endonukleasen verhindert.

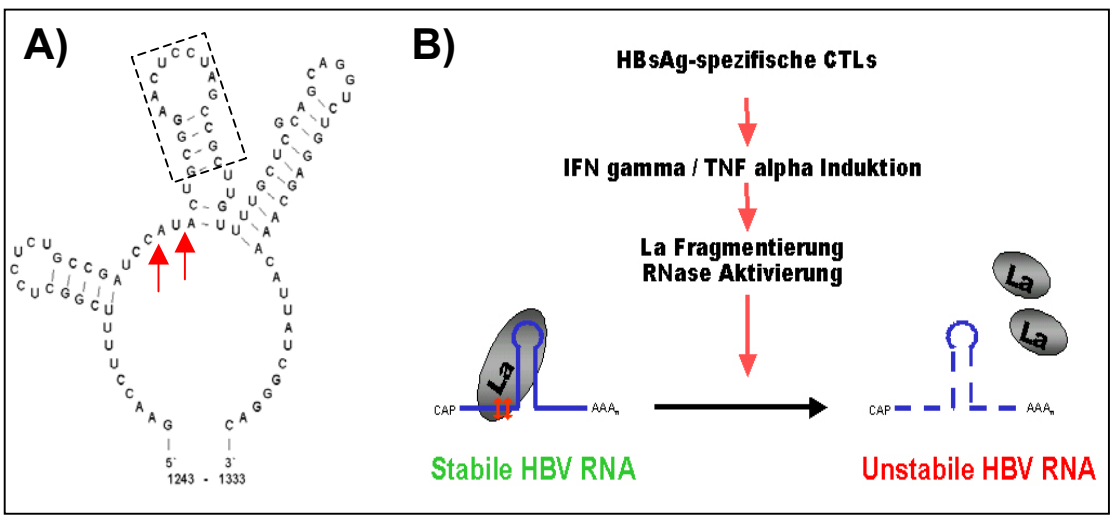


Abbildung 1.2.2-1: (A) Computer-berechnete Struktur der HBV RNA-B. Die Abbildung zeigt die berechnete, durch Computer vorhergesagte Struktur der HBV RNA-B (nt 1243 – 1333). Die Haarnadelstruktur, an welche das La Protein bindet ist durch einen gestrichelten Kasten angedeutet. Die roten Pfeile signalisieren die endonukleolytischen Spaltstellen. **(B) Hypothetische schematische Darstellung der HBV RNA (De-)Stabilisierung.** Das La Protein bindet an die in (A) bezeichnete Region der HBV RNA (*blau*) und schützt die endonukleolytischen Spaltstellen (*rote Pfeile*). Eine Behandlung mit HBsAg-spezifischen cytotoxischen T-Lymphocyten (CTLs) führt zur Freisetzung von IFN-γ und TNF-α, was eine Fragmentierung des La Proteins bewirkt und schlussendlich zur Destabilisierung der HBV RNA durch RNasen führt.

Es ist bisher ungeklärt, welcher Signaltransduktionsweg die Fragmentierung des La Proteins bewirkt, durch welche Enzyme oder Mechanismen die Spaltung des Proteins entsteht und an welchen Stellen genau die Trennung in Bruchstücke erfolgt. Ferner ist nicht bekannt, über welche Domänen des Proteins die HBV RNA gebunden wird, und ob sich die Charakteristika der Bindung für das Maus-La und das humane La Protein gleichen. Kenntnisse der Wechselwirkungen der HBV RNA mit dem La Protein könnten zur Entwicklung einer antiviralen Strategie beiragen. Daher ist das genaue Verständnis der Wechselwirkung zwischen dem humanen La Protein und der HBV RNA zwingend für eine antivirale Therapie erforderlich, welche an der Stabilisierung der HBV RNA durch das La Protein ansetzt.

1.3 Die Funktion des La Proteins in der Prozessierung von tRNAs

Zelluläre transfer-RNAs (tRNAs) werden durch die RNA Polymerase III transkribiert und besitzen eine 5´-*leader*-Sequenz und eine 3´-*trailer*-Sequenz (222), sowie in 35% der Fälle ein Intron (121). Bevor diese prä-tRNAs in das Cytoplasma transportiert werden können, um dort als reifes Molekül ihre Funktion in der Translation einzunehmen, werden sie verschiedenen molekularen Reifungsprozessen unterzogen, die man insgesamt als Prozessierung zusammenfasst. Dazu zählen die Entfernung der 5´- und 3´-Sequenzen der prä-tRNA, das Spleißen des Introns, mehrere Basenmodifikationen, Aminoacylierung und die Addition des 3´-CCA Terminus (siehe unten sowie Übersichtsartikel (222)). Obwohl Jahrzehnte intensiver Forschung in diesen Bereich investiert wurden, ist die genaue Reihenfolge der einzelnen Reaktionen der Prozessierung noch ungeklärt. Ebenso konnte die subzelluläre Lokalisation der Reaktionen nicht immer belegt werden und erscheint teilweise inkonsistent oder variiert unter den tRNAs und den Spezies. Zudem sind für humane Zellen viele Erkenntnisse aus dem Hefe-System oder anderen übertragen. Nachfolgend werden die Schritte der Prozessierung von prä-tRNAs und die Beteiligung des La Proteins dargestellt, wie es sich derzeit aus der Literatur ergibt (siehe auch Abb. 1.3-1).

Die prä-tRNAs werden durch die RNA Polymerase III im Nukleoplasma transkribiert (165), besitzen typischerweise einen poly-(U) 3´-Terminus und werden als erstes durch das La Protein

gebunden. Als einer der ersten Schritte in der Reifung erfolgt eine Entfernung der 5-*leader*-Sequenz durch die Endonuklease RNase P (103, 114), welcher in Hefe im Nukleolus erfolgt (24). In humanen Zellen könnte dies jedoch im Nukleoplasma erfolgen (101).

Es erscheint unklar, in welcher Reihenfolge zwei der hauptsächlichen Schritte der nachfolgenden Prozessierung erfolgen, nämlich die Entfernung des 3´-Terminus sowie des eventuell vorhandenen Introns. Die Regulierung könnte durch eine „Qualitätskontrolle" eines nachgeschalteten Vorgangs der Reifung erfolgen. An dieser Stelle werden sowohl Argumentationen für die „Spleißen-vor-3´Reifung"- als auch die „3´Reifung-vor-Spleißen" Theorie vorgetragen.

Die Entfernung des 3´-*trailers* wird durch ein bisher nicht genau identifiziertes Enzym durchgeführt, welches als 3´-tRNase bezeichnet wird (140, 142). Für *S.cerevisiae* wurde gezeigt, dass die Prozessierung der 5´ und 3´ Termini der prä-tRNA vor dem Spleißen des Introns erfolgt (114, 148, 227), obwohl dieses durch die Temperatur oder ggf. durch Sättigung der Spleißing-Maschinerie verändert werden kann (122, 148). Der Export von tRNAs ins Cytoplasma erfolgt in Hefen durch den Exportfaktor Los1p (90).

In humanen Zellen erscheinen diese Vorgänge zum Teil komplexer und variieren offensichtlich mit der jeweiligen prä-tRNA. So werden für einige der Basenmodifikationen die Intron-Sequenzen in prä-tRNAs benötigt (74), wohingegen andere nur nach Entfernung des Introns modifiziert werden (195). Das Spleißen selbst scheint in der Nähe der inneren Kernmembran zu erfolgen (42) und erfordert die Lsm-Proteine (109). Eine effiziente Bindung des tRNA Exportfaktors Exportin-t (Xpo-t) erfolgt nur mit reifen Termini von tRNAs und unreife tRNA Moleküle werden im Nukleus zurückgehalten (13, 111, 118, 122). Demnach kann ein Modell für die Reifung von prä-tRNAs nur bedingt erstellt werden.

Das La Protein bindet vermutlich an alle RNA Polymerase III Transkripte und dies erfolgt unter anderem durch Erkennung des 3´-(UUU-OH) Terminus, welcher allen RNA Polymerase III Transkripten gemeinsam ist (57, 58, 67, 99, 128, 197, 227). Durch die Bindung an den 3´-*trailer* schützt das La Protein die prä-tRNAs solange vor verfrühter und unspezifischer Exonuklease-Aktivität bis der 5´-*leader* entfernt wurde (57, 62, 63, 148, 227). Dieses führt zu dem Modell demgemäss das La Protein als ein molekulares Chaperon für RNAs angesehen wird. Aufgrund der vielfältigen Funktionen des La Proteins kann angenommen werden, dass es sich bei dem humanen La Protein um ein essentielles Protein handelt, welches für verschiedene RNA-Metabolismen in der Zelle notwendig ist. Interessanterweise erscheint das La Protein jedoch für die tRNA Prozessierung in Hefen und in *X.leavis* entbehrlich (56, 117, 210, 227). Ob dieses auch für humane Zellen zutreffend ist, ist noch unklar.

Die beschriebenen Erkenntnisse werden hier zu folgendem Modell der tRNA Prozessierung zusammengefasst, welches jedoch wahrscheinlich nicht für alle Spezies oder tRNAs zutreffend ist.

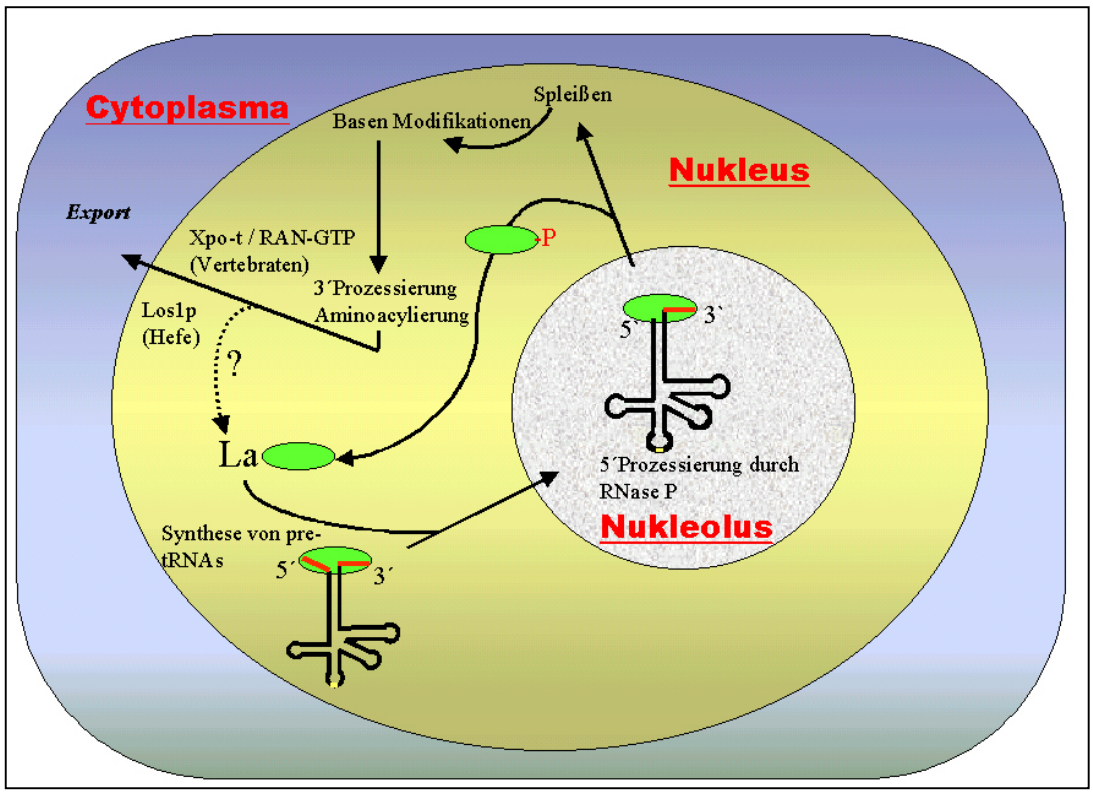


Abbildung 1.3-1: Schematische Darstellung der potentiellen Reaktionsabfolgen in der tRNA Prozessierung. Die Synthese von prä-tRNAs durch die RNA Polymerase III erfolgt im Nukleoplasma und die Transkripte werden als erstes durch das La Protein gebunden. Prä-tRNAs sind in der Kleeblatt-Struktur angedeutet und enthalten 5´-*leader* und 3´-*trailer* Sequenzen (*rot*) sowie in einigen Fällen ein Intron (*gelb*). Vermutlich nach Translokation des Komplexes in den Nukleolus erfolgt die Entfernung der 5´-*leader* Sequenz durch RNase P, woran sich die weiteren Schritte der Prozessierung im Nukleoplasma anschließen. Es ist unklar, ob das La Protein anschließend nach Phosphorylierung an Serin-366 durch Casein Kinase II den Komplex verlässt, oder ob dieses erst nach weiteren Schritten der molekularen Reifung der tRNAs erfolgt. Der Export der größtenteils gereiften tRNAs erfolgt in Hefe und humanen Zellen mit jeweils anderen Systemen (Los1p bzw. Xpo-t) wie angegeben. Erläuterungen und Referenzen finden sich im Text.

Dieses Modell der prä-tRNA / hLa Wechselwirkung, welche transient im Nukleolus stattfindet, ergibt mehrere Möglichkeiten für den Transport des hLa Proteins in dieses Kompartiment: (I.) das hLa Protein könnte als Transportfaktor agieren und prä-tRNAs in den Nukleolus führen, (II.) das hLa Protein könnte durch die Bindung an prä-tRNAs selbst in den Nukleolus transportiert werden, (III.) das Protein könnte dieses Kompartiment durch freie Diffusion erreichen, oder (IV.) das hLa Protein erreicht den Nukleolus aufgrund bisher nicht identifizierter Faktoren. Die Funktion des La Proteins im Nukleolus ist nicht vollständig aufgeklärt und es ist ebenso wenig bekannt, welche Sequenzen im Protein oder welche Wechselwirkungen den Transport in den Nukleolus vermitteln. Obwohl SRP RNA, 5S rRNA, MRP RNA und RNase P RNA vermutlich unabhängig vom La Protein in den Nukleolus transportiert werden (124, 126, 221), wurde für prä-tRNAs bisher kein anderes Protein außer La identifiziert, welches den Transport in den Nukleolus vermitteln kann. Alternativ zu prä-tRNAs könnte der Nukleolus-Import des hLa durch die von hLa gebundene Telomerase RNA erfolgen (60), welche wahrscheinlich zur Zusammensetzung der Telomerase RNPs in den Nukleolus transportiert

wird (55, 156). Dieses würde die nukleoläre Lokalisation des La Proteins erklären und gleichzeitig darstellen, welcher Faktor den Transport dieser RNAs vermittelt. Weiterhin ist bekannt, dass das Protein mit prä-U6 snRNA assoziiert und diese RNA im Laufe ihrer Prozessierung ebenfalls in den Nukleolus transportiert wird (siehe 1.4). Ein Verständnis der Funktionen des hLa Proteins im gesamten Nukleus erfordert daher die Identifizierung der den Transport vermittelnden Regionen im Protein, sowie eine genaue Kenntnis der unterschiedlichen Wechselwirkungen des hLa Proteins mit unterschiedlichen RNAs.

1.4 Der Nukleolus: eine Übersicht

Im Rahmen der vielfältigen Funktionen des hLa Proteins in der Zelle wird das Protein transient in den Nukleolus transportiert. Der Nukleolus ist wahrscheinlich die am intensivsten untersuchte Struktur im Nukleus und ist aufgrund seiner hohen Dichte das einzige Kompartiment, welches mikroskopisch im Nukleus sichtbar ist. Während der Mitose wird der Nukleolus aufgelöst und mit Eintritt in die G_1-Phase wieder aufgebaut, wobei dies vermutlich über eine cdc2-Cyclin B Kinase gesteuerte Repression der RNA Polymerase I Aktivität zwischen Prophase und Anaphase geregelt wird (89). Zudem konnte in Hefe dargestellt werden, dass die Regulation der RNA Polymerase I Aktivität vermutlich mit der Aktivität der RNA Polymerase III gekoppelt ist (29), so dass unter Umständen über die regulierte Aktivität der RNA Polymerase III eine Reformierung des Nukleolus erfolgen könnte.

Der Nukleolus befindet sich in einer Region mit angehäuften, tandemartig wiederholten rDNA (ribosomaler DNA) Genen, welche durch die RNA Polymerase I transkribiert werden. Die Anordnung dieser Gene schafft so die Grundlage für die strukturelle Organisation des Nukleolus, welcher sich morphologisch in drei Sektionen unterteilen lässt: von innen nach außen finden sich ein fibrilläres Zentrum, eine dichte, fibrilläre Komponente sowie eine granuläre Komponente (50). An der Peripherie des fibrillären Zentrums findet die Transkription der rDNA Gene statt und die primären Transkripte werden von innen nach außen transportiert, begleitet von der Einführung erheblicher Modifikationen (50). Die Hauptaufgabe des Nukleolus liegt vermutlich in der Biosynthese der Ribosomen. Hierbei assoziieren die ribosomalen Proteine bereits mit den Primärtranskripten der rRNAs zum 90S prä-Ribosom, woran sich die Prozessierung der teilweise polycistronischen rRNAs anschließt, sowie die Trennung der prä-ribosomalen Untereinheiten (4, 50). Schließlich erfolgt der Export der prä-ribosomalen Untereinheiten aus dem Nukleus in das Cytoplasma über einen Rezeptor-gekoppelten Transportweg, welcher unter anderem Ran/GTP erfordert (4, 50).

Neben prä-tRNAs (siehe 1.3) und ribosomalen RNAs finden sich u.a. weitere, kleine RNAs im Nukleolus, nämlich die snRNAs (*small nuclear RNAs*)(nur transient) sowie die snoRNAs (*small*

nucleolar RNAs). Diese werden durch die RNA Polymerase II (snRNAs U1, U2, U4, U5, U7, U11, U12; snoRNAs U3, U8, U14, U15, U16, U20, U22 und andere) oder RNA Polymerase III (U6 snRNA, neben RNase P und MRP RNA) transkribiert (228) und unterscheiden sich in den Prozessierungswegen wie auch in Funktion und Lokalisation. Dabei modifizieren sich die snRNAs und snoRNAs gegenseitig in verschiedenen Kompartimenten und sind sehr komplexen und differentiellen Prozessierungen unterworfen (siehe Übersichtsartikel (204)).
Die vermutlich im Nukleoplasma durch RNA Polymerase III synthetisierte U6 snRNA wird unmittelbar nach der Transkription durch das La Protein gebunden (110, 170, 203), während die durch RNA Polymerase II transkribierten snRNAs erst mit dem La Protein assoziieren, nachdem durch RNase III ein poly-(U) 3´-Terminus erzeugt wurde (221). Nach Reifung des 3´-Terminus und Ersatz des La Proteins durch Sm-Proteine im Cytoplasma (219, 224) erfolgt ein Wiedereintritt in den Nukleus (151, 229) und die weitere Reifung im Nukleolus. Diese nukleoläre Reifung wird unter anderem unter Beteiligung der snoRNAs ausgeführt (66, 102, 113) und endet mit einem Transport der reifen snRNAs in die Cajal-Körper oder in das Spleißosom, wo sie ihre Funktionen in der Entfernung von Introns einnehmen.
Die snoRNAs hingegen werden nach ihrer Synthese als teilweise polycistronische prä-snoRNAs in den Cajal-Körper transportiert und dort u.a. durch snRNAs prozessiert (145). Schließlich erfolgt der Transport in den Nukleolus, wo die snoRNAs die 2´OH-Methylierung (C/D-Box snoRNAs) oder die Pseudouridin-Konversion (H/ACA snoRNAs) der ribosomalen prä-rRNAs vornehmen (135).

Weitere Funktionen des Nukleolus liegen in der Zusammensetzung der SRP-(*signal recognition particle*) Komplexe (156, 164) und der Telomerase-RNP-Komplexe (156). Zudem werden mehrere mRNAs aus bisher nicht vollständig bekannten Gründen durch den Nukleolus transportiert (156), wie auch die virale HIV-1 mRNA (136). Ferner dient der Nukleolus für einige Proteine wie z.B. Mdm2 oder die Proteinphosphatase Cdc14 als eine Art „Lager“, und diese sind dort vermutlich in einer für bestimmte Funktionen inaktivierten Form vorzufinden (188, 216). Somit nimmt der Nukleolus eine Vielzahl verschiedener Funktionen ein, wobei das La Protein an mehreren dieser Prozesse wie z.B. der tRNA Prozessierung oder ggf. auch viraler RNA-Metabolismen beteiligt ist. Von herausragender Bedeutung für das Verständnis grundlegender zellulärer Vorgänge ist daher eine Kenntnis des Transportweges des hLa Proteins in den Nukleolus sowie der damit assoziierten Funktionen.

1.5 Aufgabenstellung der Arbeit

Das La Protein ist an verschiedenen Prozesse in der Zelle beteiligt und interagiert mit einer großen Anzahl an zellulären und viralen RNAs, zu denen auch die des Hepatitis B Virus zählt. Die Stabilisierung der HBV RNA durch das Maus-La Protein wurde in einem HBV transgenen Mausmodell gezeigt. Im Hinblick auf eine neue Strategie für eine antivirale Therapie, welche an der Wechselwirkung zwischen dem La Protein und der HBV RNA ansetzen sollte, waren genauere Kenntnisse über die Wechselwirkung zwischen dem humanen La Protein und der HBV RNA von grundlegender Bedeutung. Zu diesem Zweck sollte das humane La Protein rekombinant synthetisiert werden, wofür ein Protokoll zur Expression und Reinigung des Proteins etabliert werden musste. Im Hinblick auf eine spätere Kristallisation des Proteins zur Auflösung der bis heute unbekannten und überaus wichtigen atomaren Struktur sollte dabei eine höchst reine und hoch-konzentrierte Präparation des humanen La Proteins erreicht werden.
Für die Untersuchung der Interaktion zwischen HBV RNA und dem humanen La Protein sollte die Wechselwirkung des rekombinanten Proteins mit einer *in vitro* synthetisierten HBV RNA in nativen EMSAs untersucht werden. Hierzu mussten die Bindungsbedingungen optimiert werden und darüber hinaus sollten verschiedene Charakteristika wie Affinität und Spezifität der Bindung detailliert dargestellt werden. Zudem sollten diverse Mutationen in das Protein eingefügt werden, um die zur RNA-Bindung notwendigen und beteiligten Domänen im humanen La Protein identifizieren zu können. Diese Untersuchungen sollten die Grundlage für die Selektion von Molekülen schaffen, welche selektiv die für das Hepatitis B Virus notwendige Wechselwirkung mit dem humanen La Protein unterbinden. Um diese Wechselwirkung von jener mit zellulären RNAs abgrenzen zu können, sollte auch die Interaktion des humanen La Proteins mit einer zellulären tRNA untersucht werden, wobei ebenfalls die zur tRNA Bindung notwendigen Domänen identifiziert werden sollten. Ferner galt es, die subzelluläre Verteilung des Proteins und der Mutanten in Zellkulturen zu analysieren, um eine Korrelation der *in vitro* Daten mit der Lokalisation und ggf. Funktion *in vivo* darzustellen. Zudem galt es, Signale und Wechselwirkungen zu identifizieren, welche den Transport des hLa in und aus dem Nukleolus bewirken. In diesem Zusammenhang sollte zusätzlich untersucht werden, ob das humane La Protein *in vivo* für die Zelle essentiell ist, oder ob bestimmte Funktionen wie die tRNA Prozessierung durch La-unabhängige Stoffwechselwege ausgeglichen werden können.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle nicht einzeln aufgeführten Chemikalien wurden durch die Firma Merck bezogen.

Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Biozym
Bactoagar	Difco
DEPC	Serva
Ethidiumbromid	Roche
Mineralöl	Sigma
MOPS	Biometra
Moviol	Sigma
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
NP-40	Sigma
Phenol	Appligene
Ponceau S	Fluka
Rinder-Serum-Albumin (BSA)	Sigma
Scintillations-Cocktail Ultima Gold	Packard
Sequagel-XR, Puffer & Acrylamidlösung	National Diagnostics
TEMED	Serva
Tris	ICN
Triton X-100	Serva
Tween-20 Lösung	Serva
Tween-20	Serva
Xylencyanol	Fluka

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-*well*-Reaktionsplatten	Falcon
Amicon-YM10 Konzentratoren	Amicon, Millipore
Blottingpapier	BioRad
DC-Alufolie-Kieselgel-60F Platte	Merck
Dialyseschlauch Spectra/Por MWCO 6-8000	Spectrum Laboratories Inc.

Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf
G25-*spin columns*	Amersham-Pharmacia
GF/C-Rundfilter	Whatman
Hybond-N^+ Nylon-Transfer-Membran	Amersham-Pharmacia
Kanülen	Braun
Lab-Tek Doppelkammer-System	Nunc
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
PEI-Cellulose-F Dünnschichtchromatographie-Platte	Merck
Röntgenfilm, Medical X-Ray-Film	Fuji
Whatman-Papier	Whatman
Zellkultur-Flachen, 250ml / 75 cm^2	Greiner
Zellkultur-Gefäße	Greiner
Zellophanfolien zur Geltrocknung	Promega

2.1.3 Gebrauchsfertige Reagenziensysteme

Bradford Protein-Färbereagenz	Bio-Rad
DNA Präparations-Kit Qiagen-Maxi /-Mini	Qiagen
DNA Präparations-Kit Wizard-Plus	Promega
FuGene-6 Transfektionsreagenz	Roche
Oligofectamin	Invitrogen
Opti-MEM	Gibco BRL/Life Technologies
QIAquick Gel Extraktion Kit	Qiagen
QIAquick PCR Purification Kits	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Roche
RiboProbe In Vitro Transkriptions System	Promega
SequiTherm-Cycle-Sequenzier-Kits Li-Cor	MWG Biotech
silencer-RNA-construction-kit	Ambion
SuperSignal Chemiluminescent Peroxidase Solution System	Pierce
TOPO-Klonierungs-Kit	Invitrogen
TriPure-Isolation-Reagent	Roche
ULTRAhyb™-Oligo-Hybridization-Buffer	Ambion

2.2 Enzyme, Standards, Antikörper und radioaktive Stoffe

λ-Protein-Phosphatase	New England Biolabs
λ-Protein-Phosphatase, 10x $MgCl_2$	New England Biolabs
λ-Protein-Phosphatase, 10x Puffer	New England Biolabs
[α^{32}-P] ATP (10,8 µCi/µl; 3000 Ci/mmol)	Hartmann Analytics
[α^{32}-P] UTP (10 µCi/µl, 800 Ci/mmol)	Hartmann Analytics
alkalische Phosphatase	Roche
alkalische Phosphatase, 10x Puffer	Roche
Apyrase	Sigma
Casein Kinase II, 10x Puffer	New England Biolabs
Casein-Kinase-II (500 U/µl)	New England Biolabs
DNA Größenstandard λDNA, *EcoR-I* / *Hind-III*	MBI Fermentas
DNA Größenstandard GeneRuler	MBI Fermentas
DNA Größenstandard Smart	Eurogentec
DNase, RNase-frei	Promega
dNTPs	Promega
Eichfarbstoff Dextran (MW 2000000)	Sigma
Eichprotein Albumin (MW 66000)	Sigma
Eichprotein Alkohol Dehydrogenase (MW 150000)	Sigma
Eichprotein Kohlenstoff-Anhydrase (MW 29000)	Sigma
Eichprotein Ovalbumin (MW 42700)	Sigma
Lysozym	Serva
Meerettich-Peroxidase-konjugierter sekundärer Antikörper, Ziege-anti-Kaninchen IgG (H+L)	Dianova
Monoklonaler α-hLa-Antikörper 3B9 (Maus Hybrioma, IGG-2A) (s.u.)	
Monoklonaler α-hLa-Antikörper 4B6 (Maus Hybridoma, IGG-2A) (s.u.)	
Monoklonaler α-hLa-Antikörper SW5 (Maus Hybridoma)	Alle freundlichst zur Verfügung gestellt durch M. Bachmann, Oklahoma Medical Research Foundation, Oklahoma City, USA
Monoklonaler Maus-anti-NOH61 Antikörper	zur Verfügung gestellt durch M.S.Schmidt-Zachmann, DKFZ, Heidelberg
Pfu-Turbo Klonierungs-Puffer, 5x	Stratagene
Pfu-Turbo Polymerase	Stratagene

Phosphoenolpyruvat	Roche
PK/L-LDH (Pyruvat-Kinase/L-Lactat-Dehydrogenase) (3:1)	Roche
Polyklonaler Kaninchen-α-hLa Antikörper 1982	freundlichst zur Verfügung gestellt durch T. Heise
Proteinstandard: prestained broad-range Marker	New England Biolabs
Pwo-DNA-Polymerase	Roche
Pwo-DNA-Polymerase, 10x-Reaktionspuffer	Roche
Restriktionsenzym *Dpn* I	New England Biolabs
Restriktionsenzym *Eco* RI	Amersham Pharmacia
Restriktionsenzym *Hind* III	MBI
Restriktionsenzym *Sal* I	MBI
Restriktionsenzym *Xho* I	New England Biolabs
rNTPs	Promega
sekundärer Antikörper Ziege-anti-Maus, Rhodamin-gekoppelt, Alexa-Fluor 594	Molecular Probes
Shrimps-alkalische Phosphatase	Roche
Shrimps-alkalische Phosphatase, 10x Puffer	Roche
T4 Polynukleotid Kinase	Roche und Ambion
T4 Polynukleotid Kinase, 10x Puffer	Roche und Ambion
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen
Taq-DNA-Polymerase, 10x Puffer	Invitrogen

2.3 Plasmide

pcDNA4-HIS-Maxx-TOPO	Invitrogen
pEGFP-C1	Clontech, BD Bioscience
pET28b(+) Vektor	Novagen
pET28b(+)-hLa-WT	freundlichst zur Verfügung gestellt durch E.Chan, Scripps-Research-Institute, San Diego, Kalifornien, USA

Die Vektoren für *in vitro* Transkriptionen sind in Abschnitt 2.11.1 beschrieben.

2.4 Bakterienstämme, Zell-Linien und Medien

Als bakterielle Kulturen wurden Zellen der *E.coli* Stämme DH5α und BL21 benutzt. Für Experimente mit eukaryotischen Zellen erfolgten die Untersuchungen mit der humanen Cervix-Karzinoma Zell-Linie HeLa und den humanen Hepatoma-Linien Huh7 und HepG2.2.15.
Standard-I-Medium für bakterielle Kulturen wurde entweder als Fertigmischung über die Firma Merck bezogen, oder in gleicher Mischung selbst angesetzt. Bei einer Fertigmischung in Pulverform wurden 25 g des Mediums in 1 l Wasser aufgelöst und autoklaviert. Alternativ wurden die folgenden Substanzen eingewogen, auf 1 Liter Wasser aufgefüllt und ebenfalls autoklaviert: 15 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 1 g D(+)-Glucose, 6g NaCl.
Zur Bereitung von Agar-Festmedien wurde vor dem Autoklavieren 15 g Baktoagar pro Liter Medium hinzugefügt. Vor dem Gießen der Platten wurde dieses auf etwa 35°C abgekühlt, so dass Antibiotika hinzugefügt und die Platten gegossen werden konnten. Antibiotika wurden mit 0,1 mg/ml Ampicillin bzw. 0,03 mg/ml Kanamycin für die Anzucht resistenter Bakterien-Stämme eingesetzt. Flüssigmedien enthielten 0,03 µg/ml Kanamycin. Die Platten wurden im Dunkeln und bei 4° C gelagert.
Das Medium für eukaryotische Zellen setzte sich wie folgt zusammen: Dulbecco´s Modified Eagle Medium, 10% fötales Kälberserum, 1 mM Pyruvat, 3,5 mM L-Arginin, 2 mM L-Glutamin, je 100 IE Penicillin und Streptomycin, 10 ml/l MEM (nichtessentielle Aminosäuren). Alle Substanzen wurden über die Firma Gibco BRL bezogen. Fötales Kälberserum wurde vor der Verwendung zur Inaktivierung der Komplementfaktoren 3min bei 56°C im Wasserbad erhitzt, aliquotiert und bei –20°C gelagert. Das fertige Medium wurde bei 4°C gelagert und vor der Verwendung auf RT erwärmt. Die zur Ablösung adherenter Zellen benutzte Trypsin-Lösung enthielt 0,125 % Trypsin und 0,1 % EDTA in 1x PBS Puffer und wurde ebenfalls über Gibco BRL bezogen.

2.5 Oligonukleotide

2.5.1 Oligonukleotide für Mutationen des humanen La Proteins

Mutation hLa-Δ1 (Deletion aa 11 bis 99)
sense-Primer M39: 5´-GTG ACT GAT GAG TAT AAA AAT G-3´
antisense-Primer M40: 5´-CAT CTT TTC ATT ATC ACC-3´
Mutation hLa-Δ2 (Deletion aa 113 – 118)
sense-Primer M26: 5´-CCA ACT GAT GCA ACT CTT G-3´
antisense-Primer M27: 5´-AGA TCT GTT TTT TAC ATC-3´

Mutation hLa-Δ3 (Deletion aa 151 – 158)

sense-Primer M28: 5′-GAT AGC ATT GAA GCT GCT AAG-3′

antisense-Primer M29: 5′-AAA TGC TTT ATG CAA TGT TC-3′

Anmerkung: der Primer M28 fügt durch einen Synthese-Fehler die Punktmutation S163A ein.

Mutation hLa-Δ4 (Deletion aa 235 – 242)

sense-Primer M22: 5′-GAT GAT CAG ACC TGT AGA G-3′

antisense-Primer M23: 5′-CAG CAA GCA TCC AAT CTT TTC-3′

Mutation hLa-Δ5 (Deletion aa 266 – 276)

sense-Primer M24: 5′-AAA GAA AAA GCC AAG GAA GC-3′

antisense-Primer M25: 5′-TCC TCT GAC GAA GTC TAT CC-3′

Mutation hLa-Δ6 (Deletion aa 274 – 354)

sense-Primer M30: 5′-GTA CAG TTT CAG GGC AAG-3′

antisense-Primer M35: 5′-AAT TAT CCC CTC TTT TGC-3′

Mutation hLa-Δ6.2 (Deletion aa 291 - 354)

sense Primer M30, s.o.

antisense-Primer M44: 5′-ATT TGC ATC TTT GGC TTT ACC-3′

Mutation hLa-Δ6.3 (Deletion aa 323 - 354)

sense-Primer M30, s.o.

antisense-Primer M45: 5′-TTG GTC TTC TAT TAT TTT CTT CAG TGC-3′

Mutation hLa-Δ7 (Deletion aa 353 – 393)

sense-Primer M41: 5′-CCT GCA TCC AAA CAA CAG-3′

antisense-Primer M36: 5′-TTT ACC AGA CCC AGG CTG-3′

Mutation hLa-M43 (Punktmutation F118A)

sense-Primer M43S: 5′-GTA AAA AAC AGA TCT GTT TAT ATT AAA GGC GCC CCA ACT GAT GCA ACT C-3′

antisense-Primer M43AS: 5′-GAG TTG CAT CAG TTG GGG CGC CTT TAA TAT AAA CAG ATC TGT TTT TTA C-3′

2.5.2 Oligonukleotide zur Umklonierung von DNA Sequenzen aus prokaryotischen in eukaryotische Vektoren

sense-primer La-37S: 5′-AGA TCT C*GA GCT C*AA ATG GCT GAA AAT GGT GAT-3′

Die Kursiv-Sequenz beschreibt dabei die eingefügte *Sac-I* Restriktionsschnittstelle

antisense-primer La38AS: 5′-GCT CCC *AAG CTT* GCC CCG CAA ACA AAA GTC G-3′

Die Kursiv-Sequenz beschreibt dabei die eingefügte *Hind-III* Restriktionsschnittstelle

sense-primer La15S: 5′-ATG GCT GAA AAT GGT GAT AAT G-3′

antisense-primer La14AS: 5´-GCC CCG CAA ACA AAA GTC G-3´

2.5.3 Oligonukleotide zur N-terminalen Fusion des hLa-NoLS an PTB-GFP

sense-Primer THHULA-M58S:

5´-CCT ACA **CTC GAG** GCC ACC *ATG* CAA GAA TCC CTA AAC AAA TGG-3´

Der 5´-unmarkierte Bereich beschreibt dabei eine Zufallssequenz, gefolgt von einer **Xho-I** Schnittstelle, einer Kozak-Erkennungssequenz, dem *Start-ATG* und schließlich der hLa-Sequenz ab Aminosäure 323.

antisense-Primer THHULA-M59AS:

5´-CCT ACA **AAG CTT** TTT TCC TTT ACC AGA CCC AGG-3´

Der 5´-unmarkierte Bereich beschreibt dabei eine Zufallssequenz, gefolgt von einer **Hind-III** Schnittstelle und der hLa-Sequenz bis Aminosäure 354.

2.5.4 Oligonukleotide zur C-terminalen Fusion des hLa-NoLS an PTB-GFP

sense-Primer THHULA-M60S:

5´-CCT ACA **GAA TTC** TA CAA GAA TCC CTA AAC AAA TGG-3´

Der 5´-unmarkierte Bereich beschreibt dabei eine Zufallssequenz, gefolgt von einer **EcoR-I** Schnittstelle, einem Codon für Leucin (zur Erhaltung des Leserasters) und der hLa-Sequenz ab Aminosäure 323.

antisense-Primer THHULA-M61AS:

5´-CCT ACA **GTC GAC** GC TTT TTC TTT ACC AGA CCC AGG-3´

Der 5´-unmarkierte Bereich beschreibt dabei eine Zufallssequenz, gefolgt von einer **Sal-I** Schnittstelle, einem Codon für Alanin (zur Erhaltung des Leserasters) sowie der hLa-Sequenz bis Aminosäure 354.

2.5.5 Oligonukleotide für die Generierung von *templates* zur *in vitro* Transkription

THTVALAS-1: 5´-AAA GCG ACT CTC TTT GTT TCC-3´

THTVALAS-2: 5´-TGT TTC CGC CCG GTT TCG AAC-3´

THTVALT7-1: 5´-CCA TCG ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGT TGG TTT CCG TAG TGT AGT GG-3´

THTVALT7-2: 5′-CCA TCG ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGT TTC CGT AGT GTA GTG GTT ATC ACG–3′

THACT2-T7: 5′-CCA TCG ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG GCC GCT CTA GGC ACC AA-3′

THACT2-AS: 5′-TGT TCA ATG GGG TAC TTC AG-3′

THGAP2-T7: 5′-CCA TCG ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AGC CAA ACG GGT CAT CA-3′

THGAP2-AS: 5′-TGC AGG ATG CAT TGC TGA CA-3′

TH9T7-S: 5′-CCA TCG ATT AAT ACG ACT CAC TAT AGG AAC CTT TTC GGC TCC TCT-3′

Die Sequenz des T7 Promotors ist unterstrichen. Die HBV Sequenz (Subtyp *ayw*), die sich an die T7 Promotor Sequenz anschließt, umfasst die Nukleotide 1243 bis 1261.

TH13-AS: 5′- GTC CCG ATA ATG TTT GCT CCA G –3′

Dieses Oligonukleotid umfasst die antisense-Sequenz zu der HBV Region zwischen Nukleotid 1317 und 1333.

2.5.6 Oligonukleotide zur Hybridisierung in Northern Blots

Nachweis der prä-tRNA^{Val} mit TH-VAL-AS1: 5′-AAA GCG ACT CTC TTT GTT TCC-3′

Nachweis der reifen tRNA^{Val} mit TH-VAL-AS2: 5′-TGT TTC CGC CCG GTT TCG AAC-3′

Nachweis der prä-tRNA^{Tyr} mit TH-TYR-INTRON-AS: 5′-GGA TGT CTC CTG CTG AGG AAG TAG CTA C-3′

Nachweis der reifen tRNA^{Tyr} mit TH-TYR-MATURE-AS: 5′-GGA TGT CTC CTG CTG AGG AAG TAG CTA C-3′

Nachweis der 5S-rRNA mit TH-5SrRNA-AS: 5′-CAC CCG GTA TTC CCA GGC GGT CTC CCA TCC-3′

Nachweis der 5.8S-rRNA mit TH-5.8SrRNA-AS: 5′-TGC GTT CGA AGT GTC GAT GAT CAA TGT GTC-3′

2.5.7 Sequenzen der siRNA Oligonukleotide

siRNA hLa:

sense-siRNA: 5′-GAA ACA GAC CUG CUA AUA CTT-3′

antisense-siRNA: 5′-GUA UUA GCA GGU CUG UUU CTT-3′

siRNA Luziferase:

sense-siRNA: 5′-CGU ACG CGG AAU ACU UCG AdTdT-3′

antisense-siRNA: 5´-UCG AAG UAU UCC GCG UAC GdTdT-3´

2.5.8 Sequenzen der IRD-Primer für Sequenzierungen

IRD-Xpress Forward-Primer: 5´-TAT GGC TAG CAT GAC TGG T-3´
IRD-TH-La-711(-): 5´-AGC TCT TAA TTT AGC TTC CAC-3´
IRD-TH-La-691(+): 5´-GTG GAA GCT AAA TTA AGA GC-3´
IRD-TH-T7-Pro: 5´-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3´
IRD-TH-T7-Ter: 5´-TGC TAG TTA TTG CTC AGC GG-3´
Die Synthese der Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide erfolgte durch MWG Biotech.

2.6 Puffer, Medien, Reagenzien und Lösungen

In diesem Abschnitt sind alle Puffer, Medien, Lösungen und Reagenzien aufgelistet, die in den jeweiligen Abschnitten beschrieben und benutzt wurden.

10x-one-for-all-Puffer	Amersham Pharmacia
Cracking-Puffer	50 mM Tris/HCl pH 6,8, 1% SDS, 2 mM EDTA, 400 mM Sucrose, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol, 100 µg/ml hitzeinaktivierter (10min 95° C) RNase A
DC-Laufpuffer	0,5 M LiCl, 1 M Ameisensäure
DNA-Ladepuffer	1x TAE-Puffer, 0,01% Bromphenolblau, 40% Glycerin
Elutions-Puffer	50 mM NaH_2PO_4 pH8, 300 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 1% Protease-Inhibitor Complete™
EMSA-Bindungspuffer	10 mM Tris/HCL pH 7,4, 100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 0,5% NP-40
EMSA-Ladepuffer	10% Glycerin, 0,01% Bromphenolblau
Hanahan-Lösung 1	30 mM Ka-Acetat, 50 mM $MnCl_2$, 10 mM $CaCl_2$, 100 mM KCl, 15% Glycerin
Hanahan-Lösung 2	10 mM MOPS, 75 mM $CaCl_2$, 10 mM KCl, 15% Glycerin, pH 7,0
Hoechst-Farbstoff	Sigma
Kanamycin	Serva
Lysis-Puffer	50 mM NaH_2PO_4 pH8, 10 mM Imidazol, 300 mM NaCl, 4% Protease-Inhibitor Complete™

Methylenblau-Lösung	0,5 M Natriumacetat pH 5,2, 5% Essigsäure, 0,04% Methylenblau
MOPS, 20x	400 mM MOPS pH 7,0, 100 mM Natriumacetat, 20 mM EDTA
PBS-Puffer	137 mM NaCl, 3 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4, 2 mM KH_2PO_4, pH 7,4
Ponceau-S Färbelösung	0,5% (w/v) Ponceau-S, 1% Essigsäure
Protease-Inhibitor Complete™	Boehringer/Roche
Puffer A	10 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 0,5 mM ETDA, 5% Glycerin
RNA-Ladepuffer	2,88 ml deionisiertes Formamid, 0,32 ml 20xMOPS, 1,0 ml Formaldehyd, 0,72 ml DEPC-H_2O, 0,72 ml Glycerin, 0,01% Bromphenolblau, 0,01% Xylencyanol; (100 ml Formamid wurden mit 5 g Ionenaustauscher (Biorad 501-X8) 1 h bei RT gerührt, steril filtriert, aliquotiert und bei –20°C aufbewahrt)
RNasin	Promega
SDS-Ladepuffer, 5x	0,4 M Tris/HCl pH 6,8, 0,5 M DTT, 40% Glycerin, 10% SDS
SDS-Laufpuffer	250 mM Tris, 19,2 mM Glycin, 0,35 mM SDS
SSC, 20x	3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0
Standard-I-Nährmedium	Merck
TAE-Puffer	50 mM Tris pH 7,4, 20 mM Na-Acetat, 2 mM EDTA
TBE-Puffer, 40x	1,8 M Tris/HCl, pH 8,5, 1,8 M Borat, 0,04 M ETDA
TBS-Puffer	10 mM Tris/HCl pH 7,6, 100 mM NaCl, 0,18% Tween-20
TCA-Lösung	10% Trichloressigsäure, 1% Natrium-Pyrophosphat
TNE-Puffer, 10x	200 mM Tris/HCl, pH 8,0, 100 mM EDTA, 3 M NaCl
Wasch-Puffer	50 mM NaH_2PO_4 pH8, 42,5 mM Imidazol, 1 M NaCl, 0,11% Triton-X100, 1% Protease-Inhibitor Complete™
Wasser	jegliches in dieser Arbeit benutzte Wasser war destilliert, durch eine Millipore-Anlage deionisiert, steril-filtriert und autoklaviert
Western-Blot Transferpuffer	25 mM Tris/HCl pH 8,3, 192 mM Glycin, 20% Ethanol

2.7 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammern Easy Cast	OWL Scientific, Inc.
Bakterieninkubator	New Brunswick Scientific
BioCad Sprint HPLC-System	Applied Biosystems

Brutschränke	New Brunswick Scientific
ELISA-Reader ThermoMax Microplate-Reader	Molecular Devices, MWG
Fluor-S MultiImager System	Bio-Rad
Gelektrophorese Apparatur Mini-Protean-III	Bio-Rad
Gelfiltrationssäule Superdex S200HR-ag 10/30	Amersham-Pharmacia
Gelfiltrationssäule Superdex S200HR-pg 26/60	Amersham-Pharmacia
Geltrockner Bio-Rad Slab Dryer Model 483	Bio-Rad
GSA-Rotor	Beckmann
Neubauer-Zählkammer, 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm^2	Marienfeld
PCR-Gerät Robocycler Gradient 96	Stratagene
PCR-Gerät Thermocycler	MWG Biotech
Phosphorimager Bildplatte Fuji-BAS-2000	Fuji
Phosphorimager System FujiX-Bas 2000	Fuji
Photometer Ultrospec 3000pro	Amersham Pharmacia
Röntgenfilmentwickler Agfa Curix-60	Agfa
Scintillations-Zähler Liquid Scintillation Counter 1409	Walac
Sorvall RC5B+ Zentrifuge	Beckmann
SS34 Rotor	Beckmann
Stratalinker 1800	Stratagene
Thermomixer	Eppendorf
Tischzentrifuge 5417C	Eppendorf
Trans-Blot-Semi-Dry-Transfer-Cell	BioRad
Ultraschall-Behandlung	Branson Sonic
Western Blot Trans Blot Kammer	Bio-Rad
Zeiss Axiophot Mikroskop	Zeiss

2.7.1 Herstellernachweis

Agfa, D-50670 Köln

Amersham-Pharmacia Biotech Europe GmbH, D-79111 Freiburg

Applied Biosystems, D-64293 Darmstadt

Beckmann Instruments GmbH, D-80807 München

BioRad Laboratories GmbH, D-80939 München

Biozym Diagnostik GmbH, D-31883 Hessisch Oldendorf

Clontech, BD Biosciences, D-69126 Heidelberg

Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, D-22331 Hamburg

Eurogentec, D-50667 Köln

Dianova, D-20148 Hamburg
Gibco BRL / Life Technologies GmbH, D-76339 Eggenstein
Greiner, D-72636 Frickenhausen
Haereus Instruments GmbH, D-63450 Hanau
Hartmann Analytics, D-38124 Braunschweig
Invitrogen, San Diego, CA, USA
MBI Fermentas, D-68789 St.Leon-Rot
Merck KGaA, D-64271 Darmstadt
Mo Bi Tec, Wagenstieg 5, D-37077 Göttingen
MWG-Biotech AG, D-85560 Ebersberg
New England Biolabs, D-65926 Frankfurt am Main
New Brunswick Scientific, NJ, USA
Nunc GmbH & Co.KG, Postfach 120543, D-65083 Wiesbaden
Promega GmbH, High-Tech-Park, D-68199 Mannheim
Qiagen GmbH, D-40724 Hilden
Roche, D-69112 Heidelberg
Schleicher & Schuell Bioscience GmbH, D-37586 Dassel/Relliehausen
Serva Feinbiochemica & Co. KG, D-69042 Heidelberg
Sigma-Aldrich Chemie GmbH, D-82039 Deisenhofen
Stratagene GmbH, D-69000 Heidelberg
Whatman, Springfield Mill, UK
Zeiss, D-07745 Jena

2.8 Allgemeine proteinbiochemische Methoden

2.8.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung des Proteingehalts einer zu analysierenden Probe erfolgte in Anlehnung an die Originalmethode von Bradford (27). Diese Methode beruht darauf, dass sich bei der Bindung von Coomassie-Brilliant-Blue G-250 an Proteine das Absorptionsmaximum des Farbstoffs von 465 nm zu 595 nm verschiebt. Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Dazu wurden je nach erwarteter Proteinkonzentration 1 – 30 µl der Lösung mit einem Gemisch aus Färbereagenz (1:5 (v/v) Färbelösung : Wasser)) auf 1 ml aufgefüllt. Nach mindestens 5 minütiger Inkubation erfolgte die Bestimmung der OD_{595} in einem Photometer. Alternativ wurde die Bestimmung in einer 96-*well* Mikrotiterplatte durchgeführt. Dazu wurde die Proteinlösung mit obigem Gemisch auf 200 µl aufgefüllt und

mindestens 2 Minuten inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Adsorption OD_{595} in einem ELISA-Reader. Dieses eignete sich insbesondere für die Proteinbestimmung bei größerer Anzahl zu vermessender Proben.
Parallel dazu wurde bei jeder Bestimmung eine Eichreihe aufgestellt, indem bekannte Mengen (1 bis 7,5 µg) an BSA mit demselben Reagenz versetzt wurden und ebenfalls die OD_{595} bestimmt wurde. Die daraus resultierenden optischen Dichten wurden graphisch gegen die Proteinkonzentration aufgetragen, so dass der Proteingehalt der zu analysierenden Proben aus dieser Kurve abgelesen werden konnte.

2.8.2 Konzentrierung von Proteinen

Zur Erhöhung der Proteinkonzentration einer Lösung wurden Amicon-YM10 Konzentratoren benutzt. Hierbei wird eine Proteinlösung über eine Membran zentrifugiert, welche ein bestimmtes Ausschlussvolumen aufweist und alle Substanzen mit kleinerer Masse durch den Filter passieren lässt. Dadurch erhöht sich die Proteinkonzentration in der Lösung. Die Konzentratoren wurden zunächst für 12h mit einer 1% Tween-20 Lösung inkubiert, was zur Verminderung unerwünschter Proteinadsorption an die Matrix-Oberfläche erfolgte. Nach ausreichender Spülung der Konzentratoren mit H_2O wurde die Proteinlösung aufgetragen und durch Zentrifugation bei 5000 x g auf das gewünschte Volumen eingeengt.

2.8.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde in Anlehnung an die Originalmethode von Lämmli (112) durchgeführt. Hierbei wird eine Proteinlösung mit dem Detergenz SDS behandelt. Die meisten Proteine binden SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis. Ferner denaturiert SDS die Proteine zusammen mit den reduzierenden Agenzien DTT oder β-Mercaptoethanol und unterbindet Protein-Protein-Wechselwirkungen. Somit unterscheiden sich die Proteine nur noch in ihrer Masse und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. In der SDS-PAGE wandern die SDS-Protein-Komplexe im elektrischen Feld zum Pluspol, wobei die Polyacrylamidmatrix als ein molekulares Sieb fungiert und die Proteine nach Stokes-Radius auftrennt.
Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-Protean-III-Apparatur durchgeführt. Die Trenngelkonzentration betrug 12,5%, die Konzentration des Sammelgels 5%. Als Stammlösung für die Gele diente eine 30% Acrylamid-/Bisacrylamidlösung. Die Endkonzentrationen im Trenngel betrugen 375 mM Tris/HCl pH 8,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (v/v) TEMED und 0,05%

(w/v) APS. Die Endkonzentrationen im Sammelgel betrugen 125 mM Tris/HCl pH 6,8, 0,1% (w/v) SDS, 0,05% (v/v) TEMED und 0,05% (w/v) APS. Zunächst wurde das Trenngel gegossen, wobei der Prozess der Polymerisierung nach Zugabe von TEMED und APS gestartet wurde. Während der Polymerisierung wurde das Trenngel mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Oberfläche zu erzeugen und eventuelle Luftblasen zu vermeiden. Anschließend erfolgte das Gießen des Sammelgels. Für eine Gelelektrophorese wurden die zu untersuchenden Proteinproben in Volumina von zumeist 20 µl mit $^1/_4$ Vol. des Probenvolumens an 5 x SDS-Ladepuffer (siehe 2.6) versetzt, für 5min bei 90° C denaturiert und in die Taschen des Sammelgels pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 180 V für eine Dauer von 60min in SDS-Laufpuffer.

2.8.4 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Silbernitrat

Die Silbernitrat-Färbung von Proteinen stellt eine sehr sensitive Methode dar, mit der noch etwa 20 – 50 ng Protein in einer Bande nachgewiesen werden können. Dabei bildet das Ag^+ Komplexe mit Glu-, Asp- und Cys-Resten in den Proteinen, wobei diese durch alkalisches Formaldehyd zu Ag reduziert werden. Die genauen Vorgänge der Reaktion sind unbekannt. Alle Inkubationen wurden in Glasgefäßen durchgeführt, da Plastikoberflächen die Reaktionen stören.

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Gele zwischen 30 und 45min in Ethanol/Essigsäure/dH_2O (30/15/55; v/v/v) fixiert. Die Gele wurden dann für 1-12 h in die Inkubationslösung (500 mM Natriumacetat, 25% (v/v) Ethanol, sowie frisch hinzugefügt 0,2% (v/v) Glutardialdehyd-Lösung und 14 mM Natriumthiosulfat) überführt. Es folgte eine gründliche Spülung mit H_2O (3 x 5min), bevor die Gele für 30min in der Färbelösung (6 mM $AgNO_3$, 0,03% (v/v) Formaldehyd (37%) pH 11,5) inkubierten. Anschließend wurden die Gele kurz in H_2O gewaschen und in die Entwicklerlösung (262 mM Na_2CO_3, 0,03% (v/v) Formaldehyd (37%) pH 11,5) gegeben. Alle Inkubationen erfolgten unter Schütteln. Die Entwicklung wurde nach ausreichender Färbung der Proteinbanden durch sofortige Überführung in die Stopp-Lösung (50 mM Na_2-EDTA) beendet. Nach weiteren 10min konnten die Gele in dH_2O abgedunkelt bei 4° C bis zur Trocknung gelagert werden.

Zur Aufbewahrung silbergefärbter, nicht radioaktiver Gele wurden diese zwischen zwei Zellophanfolien in einen Rahmen eingespannt und über Nacht getrocknet. Bei diesem Vorgang entweicht jegliche Feuchtigkeit aus dem Gel und der Folie, so dass die getrockneten Gele gelagert werden können.

2.8.5 Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit *Coomassie-Brilliant-Blue*

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel in einer Lösung von 0,25% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blue R-250 in Methanol/dH_2O/Essigsäure (45/45/10; v/v/v) für mindestens 30min unter Schütteln gefärbt. Die Entfärbung erfolgte im Anschluss ebenfalls unter Schütteln in einer Lösung aus Methanol/dH_2O/Essigsäure (45/45/10; v/v/v). Die Gele wurden bis zur Trocknung (siehe 2.8.5) in H_2O zwischengelagert. Die Entfärbelösung konnte mehrfach verwendet werden, indem diese nach Gebrauch in eine Flasche mit Aktivkohle gefüllt wurde. Nach Absetzen der Aktivkohle, welche den Farbstoff bindet, wurde die Lösung filtriert und wiederverwendet.

2.8.6 Western Blot – immunbiologischer Nachweis von Proteinen

Diese Methode wurde für den Nachweis der hLa-Proteine in Zellextrakten oder nach Reinigung aus prokaryotischen Systemen benutzt. Ferner eignete sich dieses zur Quantifizierung der für nachfolgende Analysen eingesetzten Mengen an hLa-Protein und für den Vergleich an hLa-Gehalt verschiedener Protein-Präparationen. Diese Methode stellt einen sensitiven Nachweis dar, da noch etwa bis zu 40 ng hLa nachweisbar waren (in Abhängigkeit vom Antikörper waren leichte Differenzen der Sensitivität zu beobachten). Ferner handelt es sich um eine sehr spezifische Methode, da die eingesetzten Antikörper nur ein definiertes Epitop erkennen.
Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proteine (siehe 2.8.3) wurde das Gel aus der Apparatur entnommen und auf eine Nitrozellulosemembran gelegt, welche zuvor für 10min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Dieses wurde beiderseits mit ebenfalls in Transferpuffer (siehe 2.6) äquilibriertem Whatman-Papier bedeckt und in eine Western-Blot Transfer-Kammer eingespannt. Letztere war entweder eine Bio-Rad Trans Blot Kammer oder eine Mini-Protean-III-Apparatur und richtete sich nach der Größe des zuvor benutzten Gels. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte in auf 4° C vorgekühltem Transferpuffer bei 60 Volt für 60-90 Minuten.
Um die Qualität des Transfers und die Quantität der transferierten Proteine zu überprüfen wurde die Nitrozellulosemembran vor der weiteren Behandlung mit Antikörpern 5min mit einer Ponceau-S Färbelösung inkubiert. Nach der Färbung der Proteinbanden wurde das Ponceau-S (siehe 2.6) durch mehrmaliges Spülen mit dH_2O wieder von der Membran entfernt.
Anschließend wurde die Membran mit 20 ml 5% Milchpulver in TBS-Puffer (siehe 2.6) für mind. 1 Stunde blockiert, um eine unspezifische Bindung der Antikörper an die Membran zu unterbinden. Dieser und alle weiteren Schritte erfolgten unter Schütteln und bei RT oder bei

über-Nacht Inkubationen bei 4° C. Nach der Blockierung unbesetzter Proteinbindungsstellen auf der Membran erfolgte die Inkubation mit dem primären α-hLa Antikörper. Dazu standen 3 monoklonale Maus-αhLa-Antikörper 3B9, 4B6 und SW5 sowie ein polyklonaler Kaninchen-αhLa-Antikörper 1982 zur Verfügung. Diese wurden in insgesamt 10 ml Blocklösung (s.o.) 1:250 (monoklonale Antikörper) bzw. 1:2000 (polyklonaler Antikörper) eingesetzt. Nach dreimaligem Waschen der Membran mit 20 ml TBS-Puffer für je 10min folgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper für mind. 60min. Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:20000 in 20 ml Blockpuffer eingesetzt. Schließlich erfolgte nach erneutem Waschen der Membran (3 x 10min in je 20 ml TBS-Puffer) die Visualisierung der Antikörper-detektierten Proteine durch 2 minütige Inkubation mit 4 ml des SuperSignal Chemiluminescent Peroxidase Solution System. Dabei wird durch die konjugierte Meerrettich-Peroxidase Aktivität des sekundären Antikörpers das Substrat in der zugegebenen Lösung umgesetzt und ein Chemilumineszenz-Signal erzeugt. Dieses kann durch Exposition der Membran auf einen Röntgenfilm sichtbar gemacht werden. Für die genaue Quantifizierung der Signale stand ein Fluor-S MultiImager System zur Verfügung, welches die Signalintensitäten der Banden aufzeichnete und eine quantitative Bestimmung erlaubte. Dadurch konnte für nachfolgende Analysen gewährleistet werden, dass exakt gleiche Mengen an Protein mit voller Länge eingesetzt werden.
Durch die immunbiologische Detektion der verschiedenen Mutanten des hLa mit internen Deletionen ist belegt, dass die oben genannten monoklonalen Antikörper 3B9, 4B6 und SW5 an verschiedene Regionen des Proteins binden (siehe Abb. 3.2-2). Demzufolge erkennt der Antikörper 3B9 die Region zwischen Aminosäure 11 und 99, der Antikörper SW5 eine Region, die die Reste 113 und 158 einschließt, und der Antikörper 4B6 ein Motiv, welches die Aminosäuren 274 bis 354 einschließt.

2.8.7 *In vitro* (De-)Phosphorylierung des hLa Proteins durch Casein-Kinase-II / alkalische Phosphatase

In mehreren Arbeiten wurde eine *in vivo* und *in vitro* Phosphorylierung des La Proteins durch Casein Kinase II gezeigt (58, 160). Hierbei erfolgt hauptsächlich eine Phosphorylierung des Serin-366 im humanen La Protein und dieses stellt vermutlich eine Regulation bestimmter Aktivitäten des Proteins dar (siehe 1.1, 1.3). Die Kinase phosphoryliert Serin und Threonin Reste in Proteinen und besteht aus zwei Untereinheiten. Das hier benutzte Enzym ist eine rekombinante Form mit beiden Untereinheiten und fungiert als Holoenzym. Um den Effekt einer Phosphorylierung des hLa auf die RNA-Bindungsaktivität oder die Multimerisierung zu untersuchen war die Etablierung eines Protokolls zur (De-) Phosphorylierung des hLa notwendig.

Zur Phosphorylierung des hLa mit Casein Kinase II wurde folgender Versuchansatz benutzt: in einem 30 µl Reaktionsansatz wurde 1 µg hLa Protein mit 0,2 µl Casein-Kinase-II, 3 µl 10x-Kinase-Puffer, 6 µl 1 mM ATP und 0,2 µl [α^{32}-P] ATP für 1 – 12 h bei 37° C phosphoryliert. Sofern eine nicht-radioaktive Phosphorylierung erfolgte wurde obigem Ansatz das radioaktive ATP entzogen und das Volumen durch H_2O ausgeglichen.

Die Dephosphorylierung erfolgte mit verschiedenen Enzymen um sicherzustellen, dass jeweils alle Aminosäuren im hLa dephosphoryliert wurden. Für die Dephosphorylierung mit shrimps-alkalischer-Phosphatase wurden 100 µg hLa Protein mit 2 µl (=2 U) alkalischer Phosphatase und 3 µl 10x-Phosphatase-Puffer in 30 µl für 12 h inkubiert. Des weiteren wurde die λ-Protein-Phosphatase benutzt, welche spezifisch die phosphorylierten Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin erkennt und dephosphoryliert. Dazu wurden 100 µg hLa Protein mit 5 µl 10x $MnCl_2$, 5 µl 10x-Puffer sowie 2 µl λ-Phosphatase (=800 U) im 50 µl Reaktionsvolumen ü.N. bei 30° C inkubiert.

Die Überprüfung der Phosphorylierung / Dephosphorylierung erfolgte über die Verwendung radioaktiver Markierungen, wobei untersucht wurde, ob Casein Kinase II bei Zugabe von radioaktiven ATP eine radioaktive Markierung des hLa bewirkt. Im Unkehrschluss wurde analysiert, ob diese radioaktive Markierung durch eine Behandlung mit den eingesetzten Phosphatasen entfernt werden kann. Ferner erfolgte die Analyse über eine zweidimensionale Gelelektrophorese mit anschließender Silbernitratfärbung, welche ausschließlich durch Herrn Heukeshoven, Heinrich-Pette-Institut, durchgeführt wurde.

2.8.8 Analyse der Homogenität der hLa Präparation durch 2-D-Gelelektrophorese, MALDI-TOF und dynamisches *Light-Scattering* (in Kooperationen)

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche zur Kristallisation des humanen La Proteins beschränkten sich zunächst auf die Etablierung eines Reinigungsprotokolls für das Protein, welches eine größtmögliche Abtrennung von jeglichen Kontaminationen erreichen sollte. Dazu wurde das Protein wie oben beschrieben in prokaryotischen Kulturen exprimiert und mittels NiNTA-Technologie und Gelfiltrations-Chromatographie gereinigt. Des weiteren wurde das Protein aufkonzentriert und es wurde analysiert, bis zu welchen Konzentrationen das Protein stabil in Lösung bleibt und ob ggf. aufgrund fehlender Faktoren eine Temperatursensitivität entsteht.

Die nachfolgenden Analysen wurden ausschließlich im Rahmen von Kooperationen durch die genannten Personen durchgeführt und die dabei gewonnenen Ergebnisse zur Verfügung gestellt. Daher ist anschließend die entsprechende Methode nur jeweils im Prinzip dargestellt.

Die Reinheit der Protein-Lösung wurde durch 2-D-Gelelektrophorese und MALDI-TOF Analysen dokumentiert, welche allesamt ausschließlich durch Herrn Heukeshoven (Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt wurden. Die zweidimensionale Elektrophorese trennt Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt pI und ihrem Molekulargewicht auf und erlaubt damit die Analyse komplexer Proteinmischungen. Dazu wird die Probe in Harnstoff, Detergenz und reduzierendem Agens aufgelöst, was zur Denaturierung der Proteine und Spaltung möglicher Untereinheiten führt. Danach separiert eine isoelektrische Fokussierung (1. Dimension) die Proteine in einem Gemisch aus geeigneten Ampholyten je nach pI. Schließlich erfolgt die Auftrennung nach Molekulargewicht (2. Dimension) in einem SDS-Polyacrylamidgel, woran sich die Detektion der Proteine durch Silberfärbung oder immunbiologischen Nachweis anschließt.

Für eine MALDI-TOF (*matrix assisted laser desorption ionization time of flight*) Analyse wird die Proteinprobe in eine UV-absorbierende Matrix eingebaut und im Hochvakuum mit einem UV-Laser bestrahlt. Dadurch werden die UV-absorbierenden Moleküle inklusive der Proteine freigesetzt. Dieses überträgt eine positive Ladung auf die Proteine („*matrix assisted laser desorption ionization*"), welche in einem Hochspannungsfeld beschleunigt und in einem magnetischen Feld abgelenkt werden. In der freien Flugbahn werden die ionisierten Proteine gemäß ihrem Masse zu Ladungs-Verhältnis aufgetrennt und fliegen auf einen Detektor zu. Dieser misst dabei die Zeit für eine definierte Wegstrecke („*time of flight*"), woraus sich die Masse des Proteins ergibt.

Ferner bestand eine Kooperation mit Herrn H.J. Hecht in der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) in Braunschweig, welcher die Versuche zur Kristallisation des Proteins durchführte und dazu die Proteinsuspension im dynamischen *Light-Scattering* analysierte. Diese Methode erlaubt eine Aussage über die Größe (in nm) der Partikel in der Lösung und gibt einen ersten Anhalt über die Homogenität und die Konformation des Proteins. Dazu werden alle in einer Lösung befindlichen Partikel in einem Lichtstrahl eines Photometer-ähnlichen Geräts detektiert, wobei die Streuung des Lichts („*light scattering*") ein Maß ist für die Größe des Partikels.

2.9 Synthese, Reinigung und Analyse des rekombinanten hLa Proteins

2.9.1 Expression rekombinanter hLa Proteine in prokaryotischen Kulturen

Um das rekombinante hLa Protein zu synthetisieren und anschließend aufreinigen zu können wurde es in bakteriellen Kulturen exprimiert. Das in diesen Vektor einklonierte hLa-Gen steht

unter der Kontrolle eines mit IPTG (Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranosid) induzierbaren T7 Promotors und wird erst nach Verfügbarkeit von IPTG abgerufen. Hierbei ist IPTG ein nicht metabolisierbarer Induktor des Lactose-Operons. Zur Erreichung maximaler Gen-Expression wird IPTG zu einem Zeitpunkt in das Kulturmedium gegeben, zu welchem die Bakterien in einer exponentiellen Wachstumsphase sind. Ferner werden die Proteine durch dieses Expressionsplasmid mit einer N-terminalen hexa-Histidin Markierung versehen, welche für die anschließend beschriebene Reinigung essentiell ist.

Dazu wurde das jeweilige prokaryotische pET-28-hLa Expressionsplasmid in *E.coli* Zellen des Stammes DH5α transformiert und über Nacht auf einer selektiven Agarplatte (mit Kanamycin) inkubiert. Eine der bis zum nächsten Tag gewachsenen Kolonien wurde in ein Reagenzgefäß überführt, welches 3 ml Standard-I-Nährmedium (siehe 2.4) und 9 µl Kanamycin enthielt, und wurde über Nacht durch bei 37° C unter Schütteln (200 rpm) in einem Bakterieninkubator wachsen lassen. Dieses wurde am Folgetag in eine 100 ml Kultur aus Standard-I-Nährmedium und 300 µl Kanamycin in einem 1 l Erlenmeyer-Kolben überführt und bei 37° C unter Schütteln wachsen gelassen, bis es eine optische Dichte von $OD_{600} = 0{,}5$ erreichte. Nach Zugabe von 1 ml IPTG (100 mM) und weiterer Kultivierung für 4 – 5 Stunden wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 5000 x g sedimentiert. Nach Entfernen des Medium-Überstandes wurden die Zell-Präzipitate bei –20° C gelagert. Die Zellen wurden in 2 ml Lysis-Puffer (siehe 2.6) resuspendiert und durch Zugabe von 1 mg/ml Endkonzentration Lysozym und 2 – 4 stündiger Inkubation mit anschließender Ultraschall-Behandlung (3 x 10 sec) lysiert. Lysozym wirkt in diesem Fall unterstützend zur Lysis der bakteriellen Zellen, da es als eine (N-Acetyl-) Muramidase die Zellwände prokaryotischer Zellen auflöst. Eine Lysis der Zellen wurde ebenfalls durch die Behandlung mit Ultraschall erreicht. Zur Trennung von löslichen Proteinen und Membranbruchstücken oder eventuell denaturiertem Protein erfolgte eine Zentrifugation für 15min bei 20000 x g und aus dem sich dabei bildenden Überstand konnte wie nachfolgend beschrieben das lösliche, Histidin-markierte hLa Protein gewonnen werden.

2.9.2 Reinigung rekombinanten HIS-tag Proteins mittels Nickel-NTA-Technologie

Die Ni-NTA-Technologie ist eine Weiterentwicklung der IMAC (immobilisierte Metall Affinitätschromatographie) und hat den Vorteil, dass Nitrilotriessigsäure (NTA) stabile und hochaffine Bindungen mit Nickel eingeht, welches seinerseits hochaffin durch Histidin gebunden wird. Durch eine Markierung des hLa Proteins mit einer hexa-Histidin Sequenz kann das Protein über diese Methode effizient gereinigt werden. Dieses stellt somit eine spezifische und wenig arbeitsintensive Methode der Reinigung Histidin-markierter Proteine da. Die Elution

des Histidin-markierten Proteins erfolgt über Imidazol-Applikation. Imidazol wirkt in diesem Fall als Kompetitor zu Histidin in der Bindung an die Ni-NTA-Matrix und führt zur Freisetzung des zuvor gebundenen Proteins, so dass die Konzentration des Imidazol im Elutionspuffer am höchsten ist. Für die Expression des Proteins in prokaryotischen Zellen wurde der *E.coli* Stamm BL21 benutzt.

Das mit einer N-terminalen hexa-Histidin-Markierung versehene hLa-Protein wurde wie folgt über Nickel-NTA Säulen gereinigt: bei allen genannten Schritten wurden gekühlte Puffer (4° C, siehe 2.6) verwendet, denen zuvor Protease-Inhibitor Complete™ frisch zugefügt wurde. Jegliche Zentrifugationen wurden für 2min bei 700 x g und 4° C durchgeführt.

Die Säulen wurden mit 600 µl Lysis-Puffer mit anschließender Zentrifugation äquilibriert, bevor 600 µl des Zell-Lysats (siehe 2.9.1) aufgetragen und die Histidin-markierten Proteine an die Matrix gebunden wurden. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation wie oben, und die eluierende Durchlauf-Fraktion enthielt die nicht an die Matrix gebundenen Proteine. Dieses wurde insgesamt solange wiederholt bis das gesamte Lysat aufgetragen war. Anschließend wurden unspezifisch an die Matrix adsorbierte Proteine durch waschen mit 4 x 600 µl Wasch-Puffer entfernt, bevor das spezifisch gebundene Protein durch Zugabe von 3 x 200 µl Elutions-Puffer eluiert wurde.

Zur Reinigung größerer Mengen Proteins wurde die Reinigung in 1,5 x 15 cm selbstgepackten Säulen durchgeführt, welche durch eine Peristaltik-Pumpe mit einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min betrieben wurde. Dazu wurden etwa 5 – 8 ml Ni-NTA-Agarose in die Säule gegeben und nach Absetzen der Agarose zunächst mit 50 ml Lysis-Puffer äquilibriert. Das Lysat aus 1 l Bakterien-Suspension (siehe 2.9.1) und die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose wurden anschließend mit einer 25 ml Glaspipette in ein 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Während einer 1 h Inkubation bei 4° C wurden die Histidin-markierten Proteine an die äquilibrierte Ni-NTA-Agarose gekoppelt. Um ein Absetzen der Agarose und damit eine unzureichende Bindung des Histidin-markierten Proteins zu vermeiden erfolgte diese Inkubation in einem Kopf-über-Kopf-Rotator mit 25 rpm. Durch Zentrifugation mit 1000 x g bei 4° C für 5min erfolgte die Sedimentation der Ni-NTA-Agarose mit den daran gebundenen Proteinen. Nach vorsichtiger Entfernung des Überstandes (entspricht obiger Durchlauf-Fraktion) durch Absaugen wurde die Ni-NTA-Agarose wieder mit einer 25 ml Glaspipette in die Säule überführt, wo durch waschen mit 50 ml Wasch-Puffer unspezifisch adsorbierte Proteine entfernt wurden. Die Elution erfolgte mit 15 x 1 ml Elutions-Puffer, wobei diese separat in 1,5 ml Reaktionsgefäßen gesammelt wurden.

2.9.3 Dialyse von rekombinanten Proteinen

Die Dialyse von Ni-NTA-Agarose gereinigten Proteinen erfolgte zur Entfernung störender oder zu hoher Salzkonzentrationen aus der Reinigung des Proteins. Insbesondere für eine

nachfolgende Gelfiltration (s.u.), bei der eine empfindliche Messung der OD erfolgte, wirkten sich höhere Konzentrationen an Imidazol störend aus. Bei der Dialyse wird die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch gegeben, welcher eine definierte Porengröße (MWCO, *molecular weight cut-off*) aufweist. Dieser wird anschließend für eine bestimmte Zeit in jene Lösung gegeben, in welcher die Proteine anschließend vorliegen sollen, wobei diese Lösung mehrfach gewechselt wird. Bei diesem Prozess können alle Bestandteile der Proteinlösung, welche unterhalb der Porengröße liegen, durch die Membran passieren und verteilen sich in der gesamten Lösung aufgrund freier Diffusion. Proteine oder andere Substanzen mit größerer Masse werden dabei in dem Dialyseschlauch zurückgehalten. Dadurch wird der Puffer der Proteinlösung ausgetauscht und in Abhängigkeit vom Dialysepuffer die Salzkonzentration erniedrigt.
Für die Dialyse von Ni-NTA-gereinigten hLa Proteinpräparationen wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch pipettiert, welcher anschließend an beiden Seiten durch Klammern fest verschlossen wurde. Die Dialyse erfolgte 3 x gegen je 500 ml Puffer A (siehe 2.6) bei 4° C für je 1h. Danach wurde der Dialyseschlauch an einer Seite geöffnet und die dialysierte Lösung mit einer Pipette entnommen. Um eventuell ausgefallene Proteine abzutrennen wurde das Eluat erneut für 5min bei 20000 x g zentrifugiert.

2.9.4 Eichung der präparativen Gelfiltrations-Säule S200HR-pg und Reinigung des humanen La Proteins

Die Gelfiltration (oder Größenausschlußchromatographie) beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen in einer gegebenen Matrix. Diese Matrix besteht zumeist aus Gel-artigen Zucker-Konjugaten, welche je nach Beschaffenheit eine unterschiedliche, definierte Porengröße aufweisen. Wird eine Proteinlösung auf diese Matrix aufgetragen und in einem Puffer darüber aufgetrennt, dann wandern große Moleküle schneller durch die Matrix, weil diese nicht oder vermindert in die Poren eindringen können. Kleine Moleküle hingegen dringen in die Poren ein und haben somit eine verlangsamte Fließgeschwindigkeit. Diese kleineren Moleküle eluieren später von der Säule. Somit ist das Elutionsvolumen eines Proteins von seiner Größe im Bezug auf die gewählte Matrix abhängig und die Methode trennt Proteine in Abhängigkeit von ihrer Größe. Sofern ein Protein mit anderen Proteinen aggregiert werden die Komplexe bei nicht-denaturierenden Bedingungen als Gesamtkomplex eluiert. Hierdurch lässt sich bestimmen, ob ein Protein als monomeres Molekül oder assoziiert mit anderen Molekülen vorliegt. Mit einem hinter die Säule geschalteten Fraktionssammler und OD-Detektor wird der Proteingehalt einer jeden Fraktion angezeigt. Hierüber wird das Elutionsvolumen des jeweiligen Proteins bestimmt. Zu Beginn muss über die Aufzeichnung der Elutionsvolumina von Eichproteinen mit bekannten Massen eine Eichgerade erstellt werden, welche das Elutionsvolumen relativ zur Masse der Proteine anzeigt.

Die präparative Gelfiltration von hLa Proteinlösungen erfolgte mit einer Superdex S200HR-pg Säule mit 26 mm Durchmesser und 600 mm Länge. Zur Gewährleistung einer konstanten Fließrate von 0,5 ml/min und einer sensitiven Detektion der OD_{280} und OD_{254} wurde die Säule an ein BioCad Sprint HPLC-System angeschlossen, welches mit einem externen Fraktionssammler verbunden war. Das HPLC-System wurde mit der BioCad Perfusion Cromatography Workstation Software Version 3.0 betrieben. Die Säule wie auch die gesamte Anlage wurde mit sterilem und entgasten Puffer A (siehe 2.6) äquilibriert. Die Sterilisierung des Puffers erfolgte durch Filtrierung durch einen 0,22 µm Filter. Die Entgasung wurde für 15min unter Vakuum durchgeführt.

Zur Eichung der Säule wurden in getrennten Läufen je 1 mg der Eichproteine Alkohol Dehydrogenase (MW 150000), Albumin (MW 66000), Ovalbumin (MW 42700), Kohlenstoff-Anhydrase (MW 29000) sowie zur Bestimmung des Leervolumens 1 mg Dextran (MW 2000000) aufgetrennt. Dabei wurde das Elutionsvolumen jedes Proteins aufgezeichnet und anschließend der jeweilige Elutionskoeffizienten K_{AV} zur Erstellung einer Eichgeraden anhand folgender Gleichung berechnet:

$$K_{AV} = (V_e - V_0) / (V_t - V_0)$$

Dabei gilt: V_t = Bettvolumen der Säule; V_0 = Leervolumen (Dextran-Bestimmung); V_e = Elutionsvolumen des Proteins. Für die graphische Darstellung der Eichgeraden zeigt die X-Achse den Elutionskoeffizienten K_{AV} und die Y-Achse logarithmisch die molekulare Masse.

Vor der Auftragung auf die Gelfiltrationssäule wurde die Proteinlösung zunächst 10min bei 20000 x g zentrifugiert, um eventuell ausgefallene Substanzen zu sedimentieren und aus der Lösung abzutrennen. Die Applikation der Probenlösung auf die Säule erfolgte in einer Menge von mindestens 1 mg in einem Volumen von nicht mehr als 2 ml. Durch ein möglichst geringes Auftragsvolumen wird eine fokussierte Elution der Proteine erreicht. Die Auftragung der Probe erfolgte durch Injektion mit einer Spritze in einen Einlassventil im HPLC-System. Während des Laufs wurden die Elutionsvolumina eluierender Proteine durch den OD-Detektor der HPLC-Anlage detektiert und die Fraktionen wurden im Fraktionssammler zu je 1 ml in Reagenzgläsern gesammelt. Somit wurden die Fraktionen den detektierten Peaks zugeordnet. Anschließend erfolgte die Berechnung der Elutionskoeffizienten K_{AV} und die Bestimmung des Molekulargewichts anhand der erstellten Eichgeraden.

Die Identifizierung des hLa Proteins in den jeweiligen Fraktionen erfolgte durch einen immunbiologischen Western-Blot (2.8.6). Die Kontrolle der Homogenität der Fraktionen erfolgte durch ein- und zweidimensionale Gelelektrophorese, MALDI-TOF und *Light-Scattering*.

2.9.5 Eichung der analytischen Gelfiltrations-Säule S200-HR-ag und Analyse von Protein-Lösungen

Die analytische Gelfiltration eignet sich zur Analyse geringer Proteinmengen. Hierbei entsprechen das Prinzip und die Durchführung der Methode der oben genannten präparativen Gelfiltration. Durch die analytische Gelfiltration wurde analysiert, ob das humane La Protein als monomeres oder multimeres Molekül vorlag und ob dieses durch Bestandteile des Puffers beeinflusst wurde. Bei dieser Methode ist mit der gewählten Säule darauf zu achten, dass die einzelnen Fraktionen sehr eng beieinander liegen. Der Unterschied zwischen 150 kDa und 50 kDa betrug nur wenig mehr als 2 ml, so dass Fraktionen mit entsprechend kleinen Abständen (0,5 ml) gesammelt wurden. Das Sammeln der Fraktionen war notwendig, um in späteren Analysen (immunologischer Western-Blot) das hLa Protein in den entsprechenden Peaks bzw. Fraktionen nachzuweisen und es von restlichen Kontaminationen abzugrenzen. Die überaus sensitive Detektion der OD_{280} durch das HPLC-System und das durch die Software angezeigte und erstellte sehr exakte Elutionsprofil waren besonders bei dieser Methode von großem Vorteil. Auch für diese Säule erfolgte zunächst die Erstellung einer Eichgeraden, wie für die präparative Gelfiltration beschrieben (siehe 2.9.4).

Die Analyse von Proteinen erfolgte mit einer analytischen Superdex S200HR-ag Gelfiltrationssäule mit einem Durchmesser von 10 mm und einer Länge von 30 mm. Diese Säule wurde unter den gleichen Bedingungen wie unter 2.9.4 genannt betrieben. Zur Unterbindung einer Kation-vermittelten Oligomerisierung der Proteine über die Histidin-Markierung wurden dem Puffer A jeoch teilweise (siehe Ergebnisteil) 10 mM EDTA zugesetzt. Für die Erstellung der Eichgeraden wurden die unter 2.9.4 beschriebenen Eichproteine mit 0,2 mg eingesetzt.

Vor dem Auftragen einer Probe auf die analytische Gelfiltrationssäule wurde diese für 10min bei 20000 x g zentrifugiert, um eventuell ausgefallene Substanzen zu sedimentieren. Der sich dabei bildende Überstand enthielt die löslichen Proteine und wurde in einer Menge von 0,05 mg in einem Volumen von 0,5 ml mit einer Spritze in ein Einlassventil des HPLC-Systems injiziert. Anschließend wurde das Elutionsvolumen der Proteine aufgezeichnet, und über die gesammelten Fraktionen konnte über einen nachfolgenden immunbiologischen Western-Blot das entsprechende hLa Protein den jeweiligen Peaks zugeordnet werden. Aus dem Elutionsprofil der Peaks wurde der Elutionskoeffizient berechnet und das Molekulargewicht anhand der Eichkurve bestimmt.

2.9.6 Versuche zur ATP-Bindung und ATPase Aktivität des rekombinanten hLa

Für das humane La Protein wurden eine ATPase- und Helikase-Aktivität postuliert (18, 19, 97) und durch Topfer et al. ein Walker-A-Motiv beschrieben, welches ein potentielles ATP Bindungsmotiv darstellt (206). In der vorliegenden Arbeit sollte unter anderem untersucht werden, ob das rekombinante hLa Protein eine ATPase Aktivität aufweist und ggf. ob eine ATP-abhängige Helikase-Aktivität gemessen werden kann. Dieses könnte das Verständnis der Wechselwirkung zwischen dem hLa Protein und seinen RNA-Substraten entschieden verbessern. Zu diesem Zweck wurde diese Aktivität des rekombinanten Proteins in verschiedenen experimentellen Ansätzen und unter diversen Bedingungen getestet. Dazu wurden drei unterschiedliche Methoden benutzt, welche nachfolgend beschrieben sind. Als Kontrolle für ein Enzym mit bekannter ATPase Aktivität wurde Apyrase eingesetzt.

Radioaktiver ATPase Versuch: Hierbei werden radioaktives γ-ATP und das zu untersuchende Protein unter optimierten Bedingungen inkubiert. Anschließend wird ein Aliquot der Reaktion an einem Ende einer Dünnschichtplatte aufgetragen und durch einen Laufpuffer aufgetrennt. Dabei verbleibt ATP fast unverändert an seiner Position. Wurde durch das zugegebene Protein ATP zu ADP+P gespalten, so wandert das radioaktive Phosphat durch den Laufpuffer mobilisiert über die Dünnschichtplatte, bis diese Reaktion durch Trocknung der Platte gestoppt wird. Wird ATP durch das Protein direkt zu AMP+P_2 umgesetzt, so wandert das Pyrophosphat ebenfalls im Laufpuffer, aufgrund der höheren Masse und geringeren Mobilität jedoch weniger weit als ein Phosphatrest. Die Detektion radioaktiver Signale erfolgt durch einen Phosphorimager.
Variierende Mengen hLa (10 – 500 ng) wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen (10 – 625 fmol) [γ^{32}-P]ATP (400 Ci/mmol, 10 µCi/µl) in Anwesenheit von 100 pM bis 10 mM ATP in einer 20 µl Reaktion mit 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$ und 0,05% NP-40 für 30min bei RT oder 37° C inkubiert. Von diesem Ansatz wurde 1 µl auf eine PEI-Cellulose-F Dünnschichtchromatographie-Platte aufgetragen. Diese wurde mit der unteren Kante für 45min in DC-Laufpuffer gegeben, was die aufgetragenen und vorhandenen radioaktiven ATP, ADP und AMP Moleküle auftrennte. Nach Trocknung der Platte erfolgte die Exposition einer Phosphorimager-Bildplatte und die Quantifizierung wie an anderer Stelle beschrieben (siehe 2.11.10).
Colorimetrischer ATPase Versuch: Dieser Ansatz basiert auf dem regenerativen Enzym-gekoppelten Prinzip (5). In die Reaktion gegebenes ATP wird durch das zu untersuchende Protein umgesetzt, wobei ein Wiederauffüllen des ATP-Gehalts durch eine PK-gesteuerte Phosphorylierung von ADP auf Kosten von Phosphoenolpyruvat erfolgt. Hierbei entsteht

Pyruvat, welches durch L-LDH auf Kosten von NADH reduziert wird. Somit wird in diesem Prozess NADH zu NAD^+ oxidiert, was einen Verlust der optischen Dichte im NADH Absorptionsmaximum von 340 nm erzeugt. Dieses steht in direktem stöchiometrischen Verhältnis zur Menge an phosphoryliertem ADP, so dass die Änderung der OD_{340} direkt ein Maß für die ATP Hydrolyse ist.

Der 200 µl Standard-Ansatz enthielt 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 0,05% NP-40, 1 mM EDTA, 10 nM ATP, 0,1 mM NADH, 2 mM Phosphoenolpyruvat und 0,2 mg PK/L-LDH. Nach Zugabe von 100 ng hLa-WT wurde die OD_{340} für einen Zeitraum von 0 – 30min dokumentiert.

ATP Bindungs-Versuch: Durch diesen Versuch wurde überprüft ob ATP durch hLa-WT gebunden wird. Dazu wurde radioaktives α-ATP mit dem Protein in besonders dünnwandigen PCR-Reaktionsgefäßen inkubiert und anschließend durch eine UV-Bestrahlung quervernetzt. Schließlich erfolgte eine SDS-PAGE des Proteins und eine Auswertung mittels Phosphorimager. Sofern das Protein das α-ATP gebunden hatte wird es durch die Quervernetzung eine radioaktive Markierung erhalten haben, da es durch das UV-Licht kovalent an das α-ATP gebunden wurde. Auch wenn das Protein das α-ATP nur kurz bindet und dieses zu ADP+P oder AMP+P_2 umsetzt wird durch die Verwendung von α-ATP nach wie vor eine Markierung des Proteins erreicht. Zudem kann durch die Methode der UV-Quervernetzung auch eine sehr kurzlebige Bindungsdauer aufgezeichnet werden.

Dazu wurden variierende Mengen hLa-WT (50 – 600 ng) mit variierenden Mengen (0,1 – 10 µCi) [α^{32}-P]ATP im 15 µl Ansatz mit 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 3 mM $MgCl_2$, 100 mM NaCl, 0,5 M EDTA, 0,5% NP-40 und 10 nM ATP für 10min bei RT inkubiert. Nach UV-Quervernetzung mit 1 Joule in einem Stratalinker folgte die Zugabe von SDS-Ladepuffer und die elektrophoretische Auftrennung wie unter 2.8.3 beschrieben. Die Auswertung wurde mittels Phosphorimager durchgeführt (siehe auch 2.11.10).

Als Präparation des hLa-WT wurden sowohl Ni-NTA gereinigte als auch zusätzlich Gelfiltrations-gereinigte Präparationen eingesetzt. Neben einer weitreichenden Veränderung der Versuchsbedingungen wurde ebenfalls der Einfluss von Polynukleotiden und RNAs (HBV RNA-B2, tRNA) bestimmt.

2.10 Klonierung, Extraktion und Analytik von DNA

2.10.1 Einführung von Mutationen in hLa-cDNA-Sequenzen mittels PCR

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Funktionen des hLa analysiert und es sollte möglichst dargestellt werden, welche Domäne des Proteins für die jeweilige Funktion essentiell

ist oder in welcher Form diese Region zur untersuchten Funktion beiträgt. Um dieses analysieren zu können waren verschiedene Mutationen des hLa Proteins erforderlich. Bei den gewählten Mutationen handelte es sich überwiegend um interne Deletionen, welche die gewünschte Region insgesamt aus dem Protein entfernten. Alternativ wurden Punktmutationen eingefügt, bei welchen die Funktionen einzelner Aminosäuren dargestellt werden sollten, indem diese gegen eine Aminosäure mit anderen Eigenschaften ausgetauscht wurde.

Die Mutationen wurden in Anlehnung an das *site-directed-mutagenesis* Protokoll der Firma Stratagene eingeführt. Hierbei wird die Mutation durch eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in das Expressionsplasmid eingefügt. Zu diesem Zweck werden ein *sense* und ein *antisense* Oligonukleotid ausgewählt, welche flankierend in 5´- und 3´-Richtung zu jener Sequenz liegen, welche deletiert werden soll. Durch die PCR wird der je in 3´-Richtung zwischen den Oligonukleotiden liegende Bereich amplifiziert, was in diesem Fall zur Amplifikation des gesamten Vektors mit Ausnahme der je in 5´-Richtung zwischen den Oligonukleotiden liegenden Sequenz führt. Entscheidend für interne Deletionen ist, dass bei der Deletion nicht der Leseraster verschoben wird, so dass stets nur eine durch 3 teilbare Anzahl an Nukleotiden aus der DNA entfernt werden darf. Da bei dieser Reaktion eine lineare DNA-Sequenz entsteht, muss anschließend eine Ligation des Amplifikats durchgeführt werden. Bei Punktmutationen werden Oligonukleotide gewählt, welche über der zu mutierenden Sequenz liegen und in denen bereits die veränderte Nukelotidsequenz vorkommt. Da diese Oligonukleotide aufgrund der sich ergebenden Fehlpaarung mit der DNA nur schlechter hybridisieren, müssen derartige Oligonukleotide möglichst längere Sequenzen aufweisen.

Das pET28b(+)-hLa-WT Plasmid, welches die Expression des hLa unter die Kontrolle eines IPTG induzierbaren T7-Promotors und mit einer N-terminalen hexa-Histidin-Markierung versetzt, wurde freundlichst durch E. Chan (Scripps Research Institute, California, USA) zur Verfügung gestellt und dient als Matrizen-DNA:

Reaktionsansatz:		PCR-Reaktionsprofil (im Robocycler):
1 µl	Pfu Turbo Polymerase (10 U)	10 Zyklen 1min 94°C, 1min 54°C, 7min 72°C
5 µl	Pfu-Klonierungs-Puffer 5x	3 Zyklen 1min 94°C, 1min 52°C, 7,5min 72°C
2 µl	dNTPs (10 mM)	3 Zyklen 1min 94°C, 1min 52°C, 8min 72°C
2 µl	je Oligonukleotid (10 pmol/µl)	4 Zyklen 1min 94°C, 1min 52°C, 8,75min 72°C
10 ng	Matrizen-DNA	1 Zyklus 10min 72°C

ad 50 µl, mit Mineralöl überschichten.

Für Punktmutationen wurde die gleiche Zusammensetzung des Reaktionsansatzes gewählt. Die PCR erfolgte jedoch mit 15 Zyklen zu 30sek 95° C, 1min 46 ° C, 15min 72° C. Hierbei wurde jedoch kein Robocycler benutzt, sondern ein 1-Block-PCR-System (Thermocycler), welches sich aufgrund der im Vergleich zum Robocycler langsameren Änderungen der Temperatur als vorteilhafter erwies.

Um anschließend die mutierte DNA von der als *template* eingesetzten parentalen DNA abzutrennen wurde ein spezifischer Restriktionsverdau mit dem Enzym Dpn I durchgeführt. Dieses Enzym erkennt die Methylierung der parentalen DNA, welche der neu amplifizierten DNA fehlt, so dass das *template* selektiv abgebaut wird. Dieser Verdau erfolgte mit 10 U Enzym für 1 h bei 37° C. Anschließend wurden die Amplifikate auf ihre richtige Größe durch eine Agarose-Gelelektrophorese (siehe 2.10.7) überprüft, wozu ein Aliquot der PCR-Reaktion (10 µl) im Gel aufgetrennt wurde. Danach wurden die Amplifikate durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt. Für eine nachfolgende Ligation der DNA-Enden war eine Phosphorylierung der 5´-Termini notwendig, welche durch wie folgt durchgeführt wurde:

1 µl	rATP (20 pM)	
14 µl	DNA	
2 µl	H_2O	
2 µl	T4-Polynukleotidkinase 10x Puffer	
1 µl	T4 Polynukleotidkinase (=10 U)	30min 37° C

Daran schloss sich eine erneute Reinigung der DNA an, um das Enzym sowie die Pufferbestandteile aus dem Ansatz zu entfernen. Dazu wurde die DNA mit $^1/_{10}$ Vol 3 M NaCl und 2 Vol Ethanol abs. versetzt und nach 5min RT für 5min bei 20000 x g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abpipettiert, das DNA-Sediment 2 x mit je 100 µl 75% Ethanol gewaschen und daraufhin in 8 µl H_2O resuspendiert. Die Ligation der DNA erfolgte mit dem Rapid DNA Ligation Kit nach den Angaben des Herstellers. Schließlich wurde die DNA in Zellen des *E.coli* Stammes DH5α transformiert werden (siehe 2.12.2) und die eingeführten Mutationen wurden anschließend auf ihre Richtigkeit überprüft (siehe 2.10.6 und 2.10.8).

2.10.2 Umklonierung von hLa-Sequenzen aus prokaryotischen in eukaryotische Expressionsvektoren

Da viele der bestimmten Funktionen des hLa *in vitro* mit anderen Funktionen *in vivo* korreliert werden sollten war eine Expression des humanen La Proteins in eukaryotischen Zellen notwendig. Ferner mussten die in prokaryotische Vektoren eingefügten Mutationen so auch in den eukaryotischen Plasmiden vorhanden sein, damit diese Funktionen exakt verglichen werden konnten. Zu diesem Zweck wurde die gesamte jeweilige Sequenz des hLa (Wildtyp oder mutiert) in einer PCR aus dem prokaryotischen Plasmid amplifiziert. Die dazu benutzten Oligonukleotide mussten einerseits passend sein zum 5´- und 3´-Terminus der hLa cDNA im pET28 Vektor, sowie andererseits eine Klonierung über Restriktionsenzyme in den offenen Leseraster eukaryotischer Vektoren zulassen. Zu diesem Zweck wurden die Oligonukleotide

bereits mit terminalen Restriktionsschnittstellen versehen, welche zu Schnittstellen im neuen eukaryotischen Plasmid passten. Nach der PCR konnten somit die Amplifikate gereinigt und mit geeigneten Enzymen verdaut werden. Eine Linearisierung des neuen Vektors mit den gleichen Enzymen erschafft passende Enden, so dass Amplifikat und Plasmid ligiert werden können und sich dadurch die hLa Sequenz im eukaryotischen Vektor befindet.
Als eukaryotisches Plasmid wurde unter anderem der pEGFP-C1 Vektor benutzt, durch welchen das hLa Protein als hLa-GFP-Fusionsprotein (GFP am C-Terminus von hLa) in eukaryotischen Zellen exprimiert wird. Dieses erlaubt eine mikroskopische Detektion des hLa-GFP-Fusionsproteins in lebenden eukaryotischen Zellen, wenn diese mit einer geeigneten Wellenlänge beleuchtet werden.
Die Umklonierung der jeweiligen hLa cDNA erfolgte mittels PCR mit den Oligonukleotide La37S und La38AS (mit *Sac-I* bzw. *Hind-III* Restriktionsschnittstellen, siehe 2.5.2).

Reaktionsansatz:		Reaktionsprofil:
20 ng	*template*-DNA	1 Zyklus 2min 95°C
5 µl	je Oligonukleotid (10 pmol/µl)	25 Zyklen 1min 95°C, 1min 56°C, 2min 72°C
2 µl	dNTPs (10 mM)	1 Zyklus 5min 72°C
1 µl	Pwo-DNA-Polymerase (=10 U)	
5 µl	Pwo-DNA-Polymerase 10x-Puffer	
ad 50 µl, mit Mineralöl überschichten		

Danach wurden die Amplifikate durch das QIAquick PCR Purification Kit gereinigt (Elution in 30 µl) und im Agarosegel auf richtige Länge überprüft. Anschließend wurden folgende weitere Reaktionen durchgeführt:

30 µl	PCR Amplifikat	5 µg	EGFP-C1 Vektors
5 µl	10x-one-for-all-Puffer	5 µl	10x-one-for-all-Puffer
1 µl	Sac *I*	1 µl	*Sac* I
1 µl	*Hind* III	1 µl	*Hind* III
ad 50 µl		ad 50 µl	

Nach einem Verdau für 2h bei 37° C erfolgte eine Hitzeinaktivierung der Enzyme für 10min bei 65° C. Danach wurde die Dephosphorylierung des geschnittenen Vektors durchgeführt:

5 µl	geschnittener Vektor EGFP-C1 (= 500 ng)
4 µl	alkalische Phosphatase
1 µl	alkalische Phosphatase, 10x Puffer

Dieses erfolgte für 1h bei 37° C, gefolgt von erneuter Hitzeinaktivierung für 10min bei 65° C. Nach der Reinigung des geschnittenen, dephosphorylierten Vektors und der ebenfalls geschnittenen PCR-Amplifikate über das QIAquick PCR Purification Kit (Elution in 30 µl)

schloss sich die Ligation von geschnittenem Amplifikat und geschnittenem, dephosphoryliertem Vektor mit dem Rapid-DNA-Ligation-Kit an:

2 µl Vektor
6 µl Amplifikat
2 µl *Dilution-buffer*
10 µl *Ligase-Buffer*
1 µl T4 Ligase

Dieses wurde für 30min bei RT stehen gelassen und anschließend zur Amplifikation und späteren Kontrolle des Vektors in *E.coli* DH5α transformiert.
Des weiteren wurden die hLa Sequenzen (Wildtyp und mutiert) in einen eukaryotischen pcDNA4-HIS-Maxx-TOPO Vektor umkloniert, welcher das Protein mit einer N-terminalen Histidin-Markierung versieht. Dieses ermöglicht die Expression des hLa Proteins in eukaryotischen Zellen mit anschließender Reinigung des Proteins über Ni-NTA-Säulen. Dies ähnelt somit der Expression des rekombinanten Proteins in bakteriellen Zellkulturen, erzielt hier aber eine eukaryotsiche Expression des Proteins. Für die Umklonierung wurde zunächst die hLa Sequenz wie oben dargestellt mittels PCR aus dem prokaryotischen Vektor pET28-hLa amplifiziert. Der Reaktionsansatz entsprach dem oben für die GFP-Klonierung genannten Protokoll, erfolgte aber unter Verwendung der *Primer* THLA14AS und THLA15S (siehe 2.5). Dazu wurde folgendes PCR-Reaktionsprofil in einem Robocycler ausgeführt:

1 Zyklus zu 2min 95°C
35 Zyklen zu je 1min 95°C, 1min 56°C, 2min 72°C
1 Zyklus zu 5min 72°C
Hinzufügen von 1 µl (=10 U) Taq-DNA-Polymerase, inkubieren für 10min bei 72° C

Der letzte Schritt der Taq-Polymerase fügt ein zusätzliches Adenin an das 3´-Ende des Amplifikats, welches für die nachfolgende Klonierung entscheidend ist. Hierbei wird ein linerarisierter Vektor benutzt, der an seinen 5´-Enden jeweils ein überhängendes Thymidin trägt, an welches eine TOPO-Isomerase gekoppelt ist, welche später die Ligation zwischen Amplifikat und Vektor ausführt und dafür diese Adenine benötigt. Nach Reinigung des PCR-Amplifikats mittels PCR Purification Kit wurde ein Aliquot des PCR-Produkts mit dem TOPO-Klonierungs-Kit nach den Angaben des Herstellers kloniert.
Bei dieser Klonierung durch die TOPO-Isomerase kann das Amplifikat („*Insert*“) in beiden Orientierungen in den Vektor einkloniert werden, so dass dieses anschließend überprüft werden muss. Die richtige Orientierung des *Inserts* wurde zunächst durch eine PCR überprüft (Protokoll siehe 2.10.4). Für diese PCR wurden zwei Oligonukleotide gewählt, wobei eines in der Vektor-Sequenz hybridisiert und in Richtung *Insert* orientiert ist, während das zweite Oligonukleotid im *Insert* liegt und in Richtung des ersten Oligonukleotids orientiert ist. Sofern das *Insert* nicht die

richtige Orientierung aufweist, weisen die 3´-Termini der Oligonukleotide nicht aufeinander zu und es bildet sich in dieser PCR kein Amplifikat. Demgegenüber wird ein Amplifikat sichtbar, wenn die Oligonukleotide aufeinander zugerichtet sind, sofern das Insert die richtige Orientierung aufweist. Als Oligonukleotid mit Vektor-Hybridisierung wurde der Xpress-Forward *Primer* gewählt. Die hLa-spezifischen Oligonukleotide mussten mit ihrem 3´-Terminus in Richtung des Gen-Anfangs weisen, wie z.B. die antisense-Primer M40 und M27. Des weiteren erfolgte eine Sequenzierung des jeweiligen Plasmids (siehe 2.10.8).

2.10.3 Herstellung von hLa-PTB-GFP Fusionsproteinen

Zur Überprüfung der Funktionalität des potentiellen Nukleolus-Lokalisations-Signals (NoLS) im hLa Protein wurde diese Sequenz mit jener des C-terminal GFP-markierten PTB-Proteins in einem eukaryotischen EGFP-N1-Vektor fusioniert. Hierzu musste zunächst die Sequenz des NoLS des hLa aus dem prokaryotischen Vektor amplifiziert werden. Um eine Fusion mit dem PTB-GFP im EGFP-N1 Vektor zu erreichen, war auch hier eine Einklonierung durch Restriktionsenzyme notwendig. Das Prinzip ist oben (siehe 2.10.2) erläutert. Für die Fusion wurde das hLa-NoLS einerseits zwischen den C-Terminus des PTB und den N-Terminus des GFP lokalisiert, und andererseits N-terminal zu PTB-GFP. Dies erforderte unterschiedliche Oligonukleotid-Kombinationen, u.a. zum Erhalt des Leserasters und zur Einführung eines Start-Kodons (siehe 2.5.3 / 2.5.4).

Zur Umklonierung erfolgte zunächst die Amplifikation der hLa-NoLS Sequenz (aa 323-354) aus dem prokaryotischen pET28b(+)-hLa-WT Vektor mittels PCR. Der Reaktionsansatz sowie das Reaktionsprofil entsprachen dabei oben beschriebenem Protokoll (siehe 2.10.2), mit der Ausnahme, dass 80 ng DNA als *template* eingesetzt und je nach Konstrukt die Oligonukleotide THHULA-M58S, THHULA-M59AS, THHULA-M60S und THHULA-M61AS benutzt wurden (siehe 2.5.3 + 2.5.4). Anschließend wurde der gesamte Reaktionsansatz in einem präparativen 2% Agarosegel (siehe 2.10.7) aufgetrennt und das Gel anschließend kurz mit Ethidiumbromid gefärbt. Die Beleuchtung des Gels erfolgte anschließend nur mit einer Handlampe (254/366 nm), um eine möglichst geringe UV-Beleuchtung der DNA sicherzustellen. Dabei wurde die Bande des Amplifikats mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten, wodurch eine Abtrennung von der Matrizen-DNA erfolgte. Die im Gelstück enthaltene DNA wurde danach mit dem QIAquick Gel Extraktion Kit aus dem Gel eluiert (Elution in 30 µl). Alle weiteren Arbeitsschritte erfolgten gemäß der Herstellung der hLa-GFP Plasmide (siehe 2.10.2).

2.10.4 Überprüfung von Klonierungen mittels PCR

Die Zeit- und Aufwand sparende PCR-Methode wurde gewählt, um vor einer aufwendigeren Sequenzierung Plasmide bei neuen Klonierungen daraufhin zu überprüfen, ob diese eine entsprechende Sequenz enthalten und/oder ob diese Sequenz die richtige Orientierung aufweist. Ferner erlaubte diese Technik die Vorauswahl von potentiellen Klonen und ermöglichte die schnelle Identifizierung von negativen Klonen. Zusätzlich können mit der PCR mehr potentielle Klone in weniger Zeit überprüft werden als mit einer aufwendigen Sequenzierung. Die hier dargestellte Methode fand bei mehreren experimentellen Ansätzen zu DNA-Klonierungen Verwendung.

Sofern eine neue interne Deletion kloniert wurde und eine Vielzahl von potentiellen Klonen vorhanden waren, konnte diese PCR eine Vorauswahl darüber treffen, welche Klone sequenziert werden müssen und welche falsch-positiv sind. Nach einer Plasmid-DNA Mini-Präparation der Klone (siehe 2.10.5) wurde eine PCR durchgeführt, bei welcher eines der Oligonukleotide nicht mehr hybridisieren kann, wenn die neue DNA Sequenz die gewünschte Deletion aufweist. Dabei ergeben falsche Klone (wie der Wildtyp) ein Amplifikat, während positive Klone kein Amplifikat ergeben können. Alternativ wurden die Oligonukleotide derart gewählt, dass bei einer Amplifikation der deletierte Bereich zwischen den Oligonukleotiden liegt, so dass sich bei einer internen Deletion ein gegenüber dem Wildtyp verkleinertes Amplifikat ergibt. Die gewählten Oligonukleotide variierten somit mit den Deletionen. Die Oligonukleotide wurden aber derart gewählt, dass sich ein Amplifikat von weniger als 1000 Basen ergab, um eine möglichst große Auftrennung in der nachfolgenden analytischen Gelelektrophorese (siehe 2.10.7) zu erreichen.

Reaktionsansatz:		Reaktionsprofil:
2 µl	je Oligonukleotid (10 pmol/ml)	1 Zyklus 5min 95°C
5 µl	dNTPs (10 mM)	35 Zyklen 1min 95°C, 1min 56°C, 2min 72°C
10 ng	zu analysierende DNA	
0,5 µl	Taq-Polymerase (=5 U)	
5 µl	Taq-Polymerase 10x-Puffer	
ad 50 µl, mit Mineralöl überschichten		

Nach Beendigung der PCR wurde ein Aliquot der Reaktion (10 – 20 µl) in einer analytischen Agarose-Gelelektrophorese auf oben genannte Kriterien überprüft.

2.10.5 Plasmid-DNA-Präparationen

Die Isolierung von Plasmiden erfolgte durch das Qiagen-Maxi-Präparations-Kit und das Quiagen-Mini-Präparations-Kit nach den Angaben des Herstellers. Sofern das Plasmid anschließend für Sequenzierungen eingesetzt werden sollte, hat sich ebenfalls das Wizard-Plus-Kit (Promega, Deutschland) als vorteilhaft erwiesen und wurde für diese Zwecke eingesetzt. Nach der Präparation des Plasmids wurde die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.11.6) und die Qualität der Präparation in einem analytischen Agarose-Gel überprüft (siehe 2.10.7).

2.10.6 *Cracking* – schnelle Extraktion von Plasmid-DNA aus prokaryotischen Zellen

Das *Cracking* stellt eine schnelle aber unsaubere Methode zur Plasmid-Präparation dar und wurde als Kontroll-Reaktion bei DNA-Klonierungen benutzt. Bei dieser Methode werden eine Vielzahl von bakteriellen Vorkulturen daraufhin überprüft, ob diese ein Plasmid von gewünschter Größe enthalten. Dazu wird zunächst aus bakteriellen Vorkulturen die Plasmid-DNA präpariert und nachfolgend in einem Agarose-Gel analysiert. Dabei erfolgt der Größenvergleich zu einem Plasmid mit bekannter Länge, wobei bei dieser Methode zu beachten ist, dass der hohe Zucker-Gehalt des benutzten Puffers die Laufeigenschaften von DNAs verändern kann.

Für das *Cracking* wurden 300 µl einer Vorkultur 1min bei 20000 x g zentrifugiert. Nach Entfernung des Überstandes wurde das Sediment in 60 µl *Cracking*-Puffer (siehe 2.6) resuspendiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert für 10min bei 20000 x g und 20 µl des sich bildenden Überstandes wurden zur Elektrophorese in die Taschen eines 1% Agarosegels geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Diese Methode schließt die Zellen insgesamt auf und löst die DNA heraus, so dass auf dem Gel ebenfalls die genomische DNA der Bakterien erscheint.

2.10.7 Elektrophorese von DNA in Agarosegelen mit anschließender Ethidiumbromid-Färbung

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Analyse und zur präparativen Isolierung von DNA eingesetzt, da hierbei Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld je nach Größe aufgetrennt werden. Die Konzentration der Agarose wurde der Größe der aufzutrennenden Fragmente

angepasst und lag bei 0,5% (für DNAs mit 5 – 10 kBp), 1% (für DNAs mit 1,5 – 6 kBp) oder 2% (für DNAs mit 0,1 – 1,5 kBp). Die Größe der untersuchten DNAs wurde später durch den Vergleich mit DNA-Größenstandards ermittelt, welche mit der DNA aufgetrennt wurden.
Die Agarose wurde in TAE-Puffer gelöst, bis zum Siedepunkt erhitzt und nach kurzem Abkühlen auf ca. 60° C in die Laufkammer gegossen. Nach Aushärtung der Agarose wurden die DNA-Proben mit $^1/_6$ (v/v) DNA-Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der DNA erfolgte in TAE-Puffer.
Anschließend wurde das Gel aus der Laufkammer entnommen und für 5min in eine Ethidiumbromid-Lösung (0,5 µg/ml) gegeben. Ethidiumbromid ist ein DNA-interkalierender Farbstoff, welcher bei Beleuchtung mit UV-Licht (254 nm) fluoresziert und so die Position der DNA im Gel anzeigt. Nach kurzer Entfärbung im Wasserbad (~30min) erfolgte die Visualisierung der interkalierten Ethidiumbromid-DNA-Komplexe durch Bestrahlung mit UV-Licht und die photographische Dokumentation.
Für eine präparative Isolierung von DNA aus Agarosegelen wurde das Gel nach der Färbung/Entfärbung möglichst kurz (max. 15 sec) mit einer schwachen 254/366-nm Handlampe beleuchtet, um Schädigungen der DNA durch starke UV-Bestrahlung zu vermeiden. Während der Beleuchtung wurde kurz die Position der jeweiligen DNA im Gel markiert und die Bande anschließend bei normaler Beleuchtung mit einem Skalpell ausgeschnitten.

2.10.8 DNA-Sequenzierungen

Die Sequenzierungen von DNA-Proben wurden mithilfe des Li-Cor-Systems unter Verwendung von Farbstoff markierten IRD-*Primern* und des SequiTherm-Cycle-Sequenzier-Kits durchgeführt. Die Methode beruht auf dem DNA-Kettenabbruch in einer PCR nach Sanger et al. (177) und die Detektion erfolgt über Fluoreszenz-Oligonukleotide. Der Laser des Sequenziergeräts detektiert die in einem Gel aufgetrennten DNA Fragmente und gibt die Informationen an die angeschlossene Software weiter.
Die Sequenzier-PCR erfolgte in 96-*well*-Mikrotiterplatten. Für jede Probe wurden zunächst 9 µl (oder 1 µg ad 9 µl) der DNA mit 2 µl (1 pmol/µl) IRD-Oligonukleotid, 2,5 µl 10x-Sequenzier-Puffer, 2,5 µl 10% DMSO und 1 µl (5 U) Sequi-Therm-DNA-Polymerase gemischt. Davon wurden anschließend je 3,6 µl in ein *well* gegeben, welches zuvor mit je 2 µl G-, A-, T- oder C-Long-Read-Termination-Mix befüllt wurde. Nach Überschichtung des Reaktionsansatzes mit Mineralöl erfolgte die PCR mit 1 Zyklus zu 4min 94°C und 30 Zyklen zu je 30 sek 95°C, 1min 55°C, 1min 70°C in einem Thermocycler. Anschließend wurden je Reaktion 4 µl Sequenase-Stop-Lösung zugegeben und die Proben vor dem Auftragen auf das Gel für 2,5min bei 85°C im Thermocycler denaturiert. Die Auftrennung erfolgte mit je 1,6 µl (G-,A-,T-,C-Mix) in einem 66 cm langen denaturierendem 7M Urea 5% Sequagel-Polyacrylamidgel, welches vor Auftragung

der Proben in 1x TBE-Puffer für 1h bei 2000V auf 45°C vorgewärmt wurde. Die Datensammlung wie auch die nachfolgende Analyse erfolgte mit der BaseImagIR-V2.3 Software (Li-Cor, MWG Biotech, Germany).

2.11 RNA-Synthese und RNA-Protein-Wechselwirkungen

2.11.1 Vektoren für *in vitro* Transkriptionen und die Synthese der Matrizen DNA

Folgende Vektoren lagen in der Plasmidsammlung der Arbeitsgruppe vor und wurden für die Generierung von *templates* (Matrizen DNAs) zur *in vitro* Transkription mit folgenden Oligonukleotiden benutzt:

- Für „HBV RNA B2“: ein pCHT-Plasmid (mit freundlicher Genehmigung von H. Schaller, ZMBH, Heidelberg, zur Verfügung gestellt), welches das gesamte HBV Genom (Subtyp ayw) enthält. Zudem die Oligonukleotide TH9T7S und TH13BAS.
- Für „humane β-Aktin RNA“: ein Plasmid, welches das gesamte humane β-Aktin Gen kodiert und durch T. Heise zur Verfügung gestellt wurde. Dazu die Oligonukleotide THACT2-T7 und THACT2-AS zur Synthese der aa 27-140 des humanen β-Aktin.
- Für „GAPDH RNA“ (Glyerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase): Vektor pBSK mit der gesamten humanen GAPDH-Sequenz, zur Verfügung gestellt durch T. Heise. Dazu Oligonukleotide THGAP2-T7 und THGAP2-AS zur Synthese der aa 383-497 des humanen GAPDH.
- Für „humane Telomerase RNA“: ein *Fsp-I* linearisiertes Plasmid phTR1 (zur Verfügung gestellt durch W. Filipowicz, Friedrich-Miescher-Institut, Basel, Schweiz) kodierend für das humane Telomerase-RNA Gen, fertig zur *in vitro* Transkription.
- Für „$tRNA^{Val}$“: Plasmid HtV1 (zur Verfügung gestellt durch H. Beier, Institut für Biochemie, Universität Würzburg), mit kompletter $tRNA^{Val}$ Gensequenz. Zudem folgende Oligonukleotide: prä-$tRNA^{Val}$ mit THTVALT7-1 und THTVALAS-1; prä-$tRNA^{Val}$-Δ3’ mit THTVALT7-1 und THTVALAS-2; prä-$tRNA^{Val}$-Δ5’ mit THTVALT7-2 und THTVALAS-1; reife-$tRNA^{Val}$ mit THTVALT7-2 und THTVALAS-2.

Alle PCR Produkte, welche als Matrize in einer *in vitro* Transkription eingesetzt werden, weisen einen über die Oligonukleotide eingefügten T7 Promotor auf. Die PCR-Synthese des *templates* erfolgte mit den entsprechenden Vektoren und Oligonukleotiden nach folgendem Protokoll:

Reaktionsansatz:

20 ng Matrizen-DNA
2 µl je Oligonukleotid (10 pmol/µl)
2 µl dNTPs (10 mM)
1,5 µl $MgCl_2$ (50 mM)
5 µl Taq-DNA-Polymerase 10x Puffer
1 µl Taq-DNA-Polymerase (=10 U)
ad 50 µl, mit Mineralöl überschichten

Reaktionsprofil:

1 Zyklus 5min 95°C
35 Zyklen 1min 95°C, 1min 56°C, 2min 72°C

Anschließend wurde der Reaktionsansatz auf einem präparativen 2% Agarosegel aufgetrennt, das Amplifikat ausgeschnitten, mit dem QIAquick Gel Extraction Kit gereinigt (Elution in 30 µl) und konnte nun zur *in vitro* Transkription eingesetzt werden.

2.11.2 Synthese von RNA-Sonden durch *in vitro* Transkription

RNAs wurden durch *in vitro* Transkription nach folgendem Protokoll synthetisiert, wobei das RiboProbe In Vitro Transkription System benutzt wurde und zwischen radioaktiven und nicht-radioaktiven Protokollen unterschieden wird:
Radioaktive Synthese: 4 µl 5x-T3/T7-Transkriptionspuffer, 1 µl 10 mM DTT, 0,5 µl RNasin (=20 U), 2,5 µl rNTPs (je 2,5 mM rATP, rGTP und rCTP), 0,5 µl 0,01 mM rUTP, 7 µl [α^{32}-P] UTP, 2 µl *template*, 1 µl T7-RNA-Polymerase (=15 U), ad 20 µl mit Nuklease-freiem H_2O.
Nicht-radioaktive Synthese: dieser Ansatz enthielt alle oben genannten Zugaben, außer dem radioaktiven rUTP; zudem wurde ein rNTP-Mix benutzt, welcher je 2,5 mM rATP, rUTP, rCTP und rGTP enthielt.
Die Synthese erfolgte für 1,5 bis 2 h bei 37° C. Sofern tRNA Transkripte synthetisiert werden sollten, erfolgte die *in vitro* Transkription für 6 h auf Eis, da wahrscheinlich aufgrund intensiver Strukturen der tRNA-Produkte die Effizienz der Reaktion sowie insbesondere die Homogenität der Produkte bei 37° C geringer ist. Nach einem DNase Verdau (1 U, 15min 37°C) und dem Auffüllen des Volumens auf 50 µl mit 10 mM Tris/HCl pH 7,4, erfolgte die Reinigung der Transkripte mittels G25-*spin columns* nach Angaben des Herstellers.
Um die Synthese der radioaktiven RNAs zu quantifizieren, wurde entweder direkt die Radioaktivität von 2 µl der Probe über Cerenkov-Counts mit einem Scintillations-Zähler bestimmt, oder die Berechnung der Molarität der Sonde erfolgte nach dem sich anschließenden Protokoll. Die Reinigung nicht-radioaktiver Transkripte mittels *UV-Shadowing* wird später beschrieben.

2.11.3 Berechnung der Konzentration der *in vitro* transkribierten, radioaktiven RNA-Sonde

Um den Einbau der radioaktiv markierten UTPs sowie die RNA-Synthese quantifizieren zu können, wurde vor und nach der Abtrennung der freien Nukleotide durch die G-25-*spin columns* (siehe 2.11.2) je ein 2 µl Aliquot aus dem Transkriptionsansatz entnommen und 1:50 mit DEPC-H_2O verdünnt. Von jenem Aliquot vor der Säulenreinigung wurden zur Ermittlung der Gesamt-cpm (Zerfälle pro Minute) 5 µl der Verdünnung zu 3 ml Scintillations-Cocktail gegeben. Aus der zweiten Probe wurden zur Bestimmung der mit TCA fällbaren cpm 5 µl der Verdünnung auf ein GF/C-Rundfilter aufgetragen, dieses etwa 3 bis 5min bei RT getrocknet und anschließend für 15min bei 4° C in 25 ml eiskalter TCA-Lösung (siehe 2.6) inkubiert, um ggf. noch vorhandene freie Nukleotide zu fällen. Nach kurzem Abspülen des Filterpapiers mit 70% Ethanol und Trocknen für 5min bei RT wurde dies zu 3 ml Scintillations-Cocktail in ein Scintillations-Röhrchen überführt. Die Bestimmung der Radioaktivität in beiden Proben erfolgte mit einem Scintillations-Zähler für 60 sec. Anschließend erfolgte die Berechnung der synthetisierten RNA Menge anhand der gemessenen cpm-Werte:

Die spezifische Radioaktivität der synthetisierten RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

(1) (Gesamt-cpm im Ansatz) ÷ (ng UTP im Ansatz x 4) = cpm / ng RNA

Hierbei wurde von einer molekularen Masse von 350 pro Nukleotid (nt) sowie einem Gehalt von 25% UTP je RNA-Molekül ausgegangen. Die im Säuleneluat enthaltene RNA-Konzentration wurde basierend auf der spezifischen Radioaktivität aus den gemessenen fällbaren TCA-cpm ermittelt:

(2) (TCA-cpm / µl Ansatz) ÷ (cpm / ng RNA) = ng RNA / µl

Anhand der Länge der synthetisierten RNAs und der nach oben beschriebener Formel errechneten Menge an Synthese konnte die Molarität der Sonde berechnet werden:

(3) c [RNA] in pmol / µl = ((ng RNA / µl) x 1000) ÷ (Anzahl nt x 350)

2.11.4 Analyse von radioaktiven RNAs durch denaturierende Gelelektrophorese

Durch diese Methode wurden radioaktive, mittels *in vitro* Transkription synthetisierte RNAs auf ihre Länge und Homogenität untersucht. Hierbei wird die RNA denaturiert und in einem Harnstoff-Polyacrylamidgel im elektrischen Feld aufgetrennt. Anschließend wird das Gel entnommen, in Zellophanfolie eingewickelt und mit einem Phosphorimager ausgewertet. Der Vergleich mit bestimmten Farbstoffen im Laufpuffer oder mit radioaktiven RNAs bekannter Länge ermöglichte die Abschätzung der RNA-Länge.

Je nach zu erwartender Signalstärke wurden 1 bis 5 µl der radioaktiv markierten RNA mit 50 µl RNA-Ladepuffer versetzt, für 10min bei 76° C denaturiert und vor dem Auftragen auf das Gel auf RT abkühlen lassen. Die Elektrophorese erfolgte in einem 18 x 18 cm großen, 15%igen Acrylamid-Harnstoff-Gel (1x TBE, 7 M Harnstoff, 0,05% (v/v) TEMED, 0,05% (w/v) APS) für 1,5 h bei 500 V. Zuvor wurde das Gel für 1 h in 1x TBE-Puffer (siehe 2.6) bei 500 V vorlaufen gelassen. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel entnommen, in Folie eingewickelt und quantitativ mittels Phosphorimager ausgewertet (siehe 2.11.10). Dabei dienten die im Ladepuffer enthaltenen Substanzen Bromphenolblau und Xylencyanol als grobe Größenmarker, da die entsprechende Farbfront in diesem Gel einer Nukleotidlänge von 40 Basen (Xylencyanol) bzw. 10 Basen (Bromphenolblau) entsprachen.

2.11.5 Präparative Gelelektrophorese und Gelelution nicht radioaktiver RNAs (*UV-Shadowing*)

Bei einer *in vitro* synthetisierten, nicht-radioaktiven RNA konnte die Quantifizierung der Synthese nicht wie oben für radioaktive RNAs beschrieben erfolgen, sondern wurde photometrisch durchgeführt. Dazu war eine Abtrennung der RNA von Synthese-Fragmenten und Puffersubstanzen notwendig, was wie oben beschrieben über eine Acrylamid-Gelelektrophorese erfolgte. Die nicht-radioaktive RNA musste im Gel jedoch über andere Techniken sichtbar gemacht werden, damit sie aus dem Gel ausgeschnitten, eluiert und quantifiziert werden konnte. Die RNA wurde sichtbar gemacht, indem das Gel nach der Elektrophorese auf eine Kieselgel-Platte gelegt und mit einem schwachen UV-Licht bestrahlt wurde. Dabei warf die RNA einen Schatten auf die Kieselgel-Platte und wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten.

Die mittels *in vitro* Transkription synthetisierte RNA wurde wie oben beschrieben denaturiert und in einem denaturierenden Gel aufgetrennt (siehe 2.11.4). Anschließend wurde das Gel entnommen und einseitig auf Zellophanfolie und eine DC-Alufolie-Kieselgel-60F Platte gelegt.

Durch Bestrahlung mit einer UV-Handlampe bei einer Wellenlänge von 254 nm wurde die RNA durch Schattenbildung auf der Kieselgel-Platte sichtbar und wurde mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten. Dieses Gelstück wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und für 2 h bei 56° C in 400 µl 1x TNE-Puffer (siehe 2.6) und für 1 h in 200 µl 1x TNE-Puffer bei 1200 rpm im Thermomixer eluiert. Die Gelstücke wurden verworfen, beide Ansätze wurden vereinigt und mit 100 µl 3 M Na-Acetat pH 5,2 und 100 µl (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1)) versetzt. Nach Zentrifugation der Proben für 5min bei 20000 g wurde die obere wässrige Phase in eines neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, mit 100 µl Chloroform vermischt und kräftig geschüttelt. Nach Zentrifugation bei 20000 g in einer Tischzentrifuge für 5min wurde die in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführte obere Phase mit 2 Volumen Ethanol abs. versetzt und ü.N. bei –20° C gefällt. Nach einer Zentrifugation mit 20000 x g für 10min bei 4° C wurde das RNA-Pellet mit 400 µl 75% Ethanol gewaschen und schließlich in 25 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,4 aufgenommen. Die Bestimmung der Konzentration erfolgt spektrophotometrisch.

2.11.6 Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration von Nukleinsäuren wurde der molare Extinktionskoeffizient E der Proben bei einer Wellenlänge von 260 nm in einem Spektralphotometer gemessen und in Abhängigkeit von der definierten Schichtdicke d die Nukleotidkonzentration bestimmt. Ein Adsorptionswert von $E_{260} = 1$ bei einer Schichtdicke von d = 1 cm entspricht einem Gehalt von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA oder 40 µg/ml einzelsträngiger RNA. Zusätzlich wurde die Extinktion bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen um den Proteingehalt der Probe zu bestimmen. Der Quotient aus E_{260}/E_{280} stellt einen Wert für die Reinheit der Lösung dar und sollte zwischen 1,7 und 2,0 liegen.

2.11.7 Radioaktive 5‘-Markierung von nicht-radioaktiven RNAs und Oligonukleotiden

Für analytische Zwecke wurde eine nicht-radioaktive RNA daraufhin überprüft, ob diese frei von Degradation ist und/oder ob die Länge der RNA den Zielsetzungen entspricht. Dieses wurde dadurch erreicht, dass die RNA durch eine Polynukleotid-Kinase radioaktiv markiert und anschließend in einer denaturierenden Gelelektrophorese analysiert wurde. Dazu wurden 200 fmol RNA in einem 10 µl Ansatzvolumen mit 2 µl [α^{32}P]-ATP, 1 µl 10x T4-Polynukleotid-Kinase-Puffer sowie 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase versetzt und für 60min bei 37° C inkubiert.

Die Analyse der RNAs erfolgte in einem denaturierenden Harnstoff-Polyacrylamid-Gel wie unter 2.11.4 beschrieben.

Oligonukleotide wurden radioaktiv markiert, um als Sonde in einem Northern-Blot eine bestimmte RNA-Spezies nachzuweisen. Dazu wurden in einem 20 µl Ansatzvolumen 25 pmol Oligonukleotid, 6 µl [α^{32}-P] ATP, 2 µl 10x-Polynukleotid-Kinase-Puffer sowie 1 µl T4-Polynukleotid-Kinase für 1 h bei 37° C inkubiert, mit DEPC-H_2O auf 50 µl aufgefüllt und über G25-*spin columns* nach Angaben des Herstellers gereinigt. Von 2 µl des gereinigten, markierten Oligonukleotids wurde anschließend die Markierung durch Bestimmung der Radioaktivität („Cerenkov-Counts“) in einem Scintillations-Zähler bestimmt.

2.11.8 Northern Blot als Nachweismethode für RNAs

Der nachfolgend beschriebene Northern Blot wurde als Nachweismethode für tRNAs und rRNAs benutzt und eignet sich in dieser Form als Methode für den Nachweis von RNAs mit einer Länge von 30 bis etwa 500 Basenpaaren. Für diesen Northern Blot mit Oligonukleotid-Hybridisierung wurden mindestens 5 µg RNA aus einem gesamt-RNA Extrakt aus HeLa Zellen benutzt, wobei sich dieses nach der nachzuweisenden RNA richtet – für ubiquitär und hoch exprimierte RNAs wie reife tRNAs oder rRNAs sind geringere Mengen ausreichend, jedoch stellt dieses für den Nachweis von tRNA Vorläuferstufen die Untergrenze dar.

Die RNA Proben wurden mit 2 Vol RNA-Ladepuffer (siehe 2.6) versetzt und 10min bei 95° C denaturiert. Dieses wurde in einem 12% Polyacrylamid-, 7 M Harnstoff-Gel (siehe 2.11.4) bei 600 V aufgetrennt, welches zuvor für 1 h bei 500 V vorlief. Bei dieser Konzentration des Gels diente das im Ladepuffer enthaltene Xylencyanol als Marker für eine RNA-Länge von ~40 nt und die Gele wurden so lange laufen gelassen, bis sich dieser Marker im unteren Drittel des Gels befand. Anschließend wurde das Gel entnommen und mit 2 Lagen Blottingpapier (14,2 x 16,2 cm) und einem ebenso großem Stück Hybond-N^+ Nylon-Transfer-Membran je 10min mit H_20 und 0,5x TBE (siehe 2.6) äquilibriert und in einer Trans-Blot-Semi-Dry-Transfer-Cell mit 330 mA 1 h transferiert. Nach beidseitigem *crosslinken* der Membran mit 120 mJ UV-Licht in einem Stratalinker erfolgte eine Färbung der RNA auf der Membran mit einer Methylenblau-Lösung (siehe 2.6), wobei eine solche Färbung auf dieser Membran nicht sehr beständig war. Diese Färbung zeigte, ob die RNA erfolgreich auf die Membran transferiert wurde. Die Entfärbung erfolgte durch Spülen mit H_2O. Zuletzt wurde die Membran getrocknet und gelagert oder direkt benutzt.

Der Nachweis von RNAs auf der Membran erfolgte durch Hybridisierung mit radioaktiv-markierten Oligonukleotiden (siehe 2.5.6 + 2.11.7). Dazu wurde die Membran zunächst mit 6 ml ULTRAhyb™-Oligo-Hybridization-Buffer für 1 h bei 42° C mit 6 rpm in einem Hybridisierungsofen vorhybridisiert, bevor das radioaktiv markierte Oligonukleotid mit einer

Menge von mind. 10 Mio. CPM zugegeben wurde und ü.N. hybridisierte. Schließlich wurde die Hybridisierungslösung entfernt, die Membran mit Waschpuffer (0,5% SDS, 2 x SSC) 2 x 30min bei 42° C gewaschen und mittels Phosphorimager ausgewertet (siehe 2.11.10).
Um auf einer Membran mehrere RNAs durch verschiedene radioaktive Oligonukleotide nachzuweisen musste das radioaktive Signal der ausgewerteten Hybridisierung entfernt werden. Dazu wurde die Membran für 15min mit 0,5 % SDS (auf 95° C vorgeheizt) bei 95° C inkubiert und anschließend kurz mit H_2O gewaschen. Eine erneute Vorhybridisierung war vor Zugabe einer neuen Sonde notwendig.
Der Northern Blot wurde für den Nachweis von tRNAs in RNA-Interferenz behandelten Zellen benutzt, wobei HeLa Zellen mit hLa siRNAs und Luziferase siRNAs behandelt wurden. Im Phosphorimager wurden Signalintensitäten für die tRNAs in den behandelten Proben sowie für die ribosomale 5.8S rRNA bestimmt und durch Normalisierung quantifiziert, wozu folgende Formel benutzt wurde:

$$X_v\text{-RNA-Gehalt (\%)} = \left[\frac{(X_a \div K_a)+(X_b \div K_b)}{2} \right] \div \left[\frac{(B_a \div K_a)+(B_b \div K_b)}{2} \div 100 \right]$$

Dabei gilt: X_v = verbleibender prozentualer Gehalt der untersuchten RNA „X“; X_a und X_b sind Werte a und b (bei Doppelwerten) der untersuchten RNA „X“ in den spezifisch RNAi behandelten Proben; B_a und B_b sind Werte a und b (bei Doppelwerten) der RNA „X“ in den unspezifisch RNAi behandelten Proben; K_a und K_b sind die Werte a und b (bei Doppelwerten) der Kontroll-RNA (5.8S rRNA) in allen jeweiligen Proben. Hierzu werden jeweils die Werte für RNA „X“ sowie für die Kontroll-RNA aus entsprechend gleichen Zeitpunkten gewählt.

2.11.9 EMSA – *electrophoretic mobility shift assay*

Der EMSA erlaubt die Bestimmung einer RNA-Protein-Wechselwirkung unter nativen Bedingungen. Zu diesem Zweck wurden eine radioaktiv markierte, *in vitro* synthetisierte RNA und das hLa Protein unter optimierten Pufferbedingungen inkubiert. Anschließend wurden die RNA-Protein-Komplexe unter nativen Bedingungen in einem Polyacrylamidgel aufgetrennt. Zudem wurde auf einer Spur des Gels ein Aliquot der nicht mit hLa inkubierten RNA aufgetragen, welche so die Position der ungebundenen RNA bestimmt. Bei der Bindung des hLa an die RNA bildeten sich Komplexe, die aufgrund ihrer gegenüber der ungebundenen RNA erhöhten Masse weniger weit im elektrischen Feld des Gels aufgetrennt wurden. Somit zeigte diese Methode nicht nur, ob sich RNA-Protein-Komplexe ausbildeten, sondern auch ob diese z.B. in der Anzahl variierten.
Durch eine prä-Inkubation des Proteins mit einem Antikörper vor Zugabe der RNA wurde bestimmt, ob die auftretenden Komplexe durch hLa oder durch Kontaminationen aufgebaut

wurden („Supershift“). Durch die Bindung des α-hLa-Antikörpers an hLa bildeten sich RNA-Protein-Antikörper Komplexe, welche aufgrund der hohen Masse kaum im Gel aufgetrennt wurden. Würden die Komplexe durch Kontaminationen verursacht, dann hätte ein α-hLa-Antikörper nicht die Mobilität der RNA-Protein-Komplexe verändert.

Nacheiner Auftrennung die sich bildenden Komplexe im elektrischen Feld wird das Gel getrocknet und es erfolgt schließlich die Exposition eines Röntgenfilms oder einer Phosphorimager-Bildplatte zur Visualisierung und ggf. zur Quantifizierung der Signale.

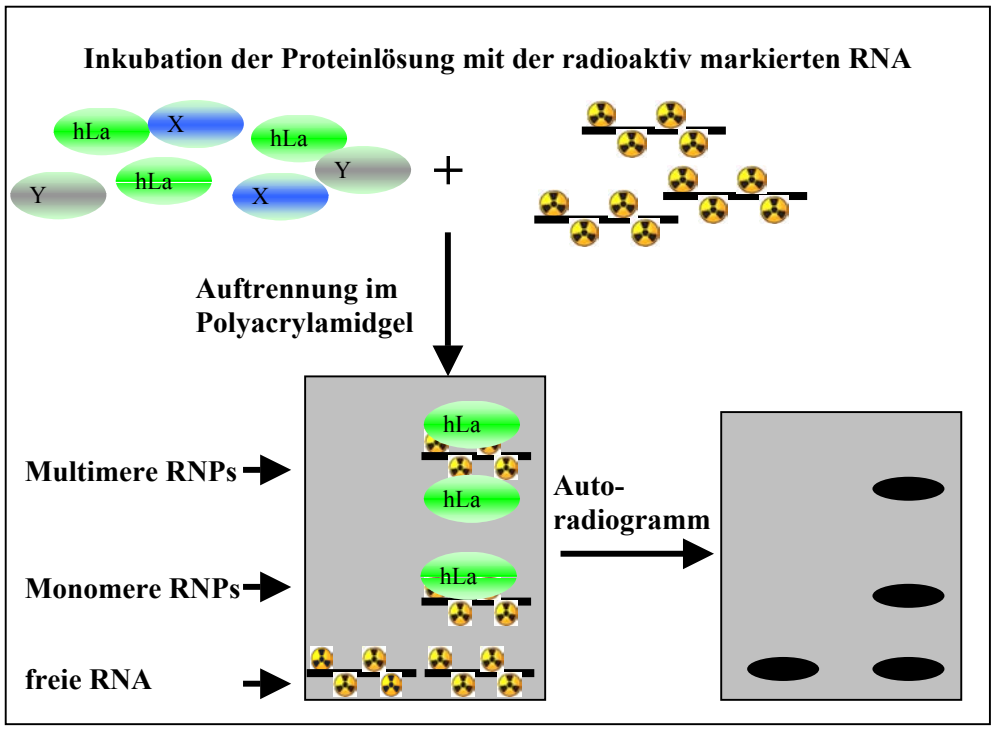


Abbildung 2.11.9-1: Schematische Darstellung der Reaktionsabfolge in einem nativen EMSA. Für Erläuterungen siehe Text. RNPs = Ribonukleoproteinkomplexe.

Die Standard-Reaktion wurde in einem Volumen von 40 µl mit 200 ng NiNTA-gereinigtem bzw. 100 ng Gelfiltrations gereinigtem Protein (wenn nicht anders angegeben) und je 200000 CPM (oder entsprechende molare Konzentrationen, wie angegeben) radioaktiv-markierter, *in vitro* transkribierter RNA durchgeführt. Die RNA wurde zunächst für 10min bei 76° C denaturiert und durch langsames Abkühlen auf RT renaturiert, bevor diese für 10min mit dem Protein im EMSA-Bindungspuffer (siehe 2.6) inkubierte. Nach Zugabe von 5 µl EMSA-Ladepuffer (siehe 2.6) erfolgte die Auftrennung der Proben in einem 18 x 18 cm großen, nativen 8% Polyacrylamidgel für 3,5h mit 185 V. Das Gel hatte zuvor einen Vorlauf mit 240 V für 1h in 1 x TBE-Puffer (siehe 2.6).

Anschließend wurde das Gel 1,5h bei 80° C auf Whatman-Papier mit einem Geltrockner getrocknet. Die Auswertung der Signale erfolgte über die Exposition eines Röntgenfilms oder mittels eines FujiX-Bas 2000 Phosphorimager Systems (siehe 2.11.10 + 2.11.11).

Für Supershift-Analysen wurde das hLa Protein mit 5 µl des jeweiligen Antikörpers und 20 U RNasin in einem 20 µl Volumen in 10 mM Tris/HCl pH 7,4 für 1h bei 4° C vorinkubiert. Anschließend wurden die radioaktiv-markierte RNA sowie die restlichen Bestandteile des Reaktionsansatzes zugefügt und der EMSA wie oben durchgeführt.
Für Untersuchungen zur Spezifität der hLa WT Bindung an HBV-RNA.B2 wurde das Protein für 5min mit den angegebenen Mengen nicht-radioaktiv markierter Kompetitor-RNAs inkubiert, bevor die radioaktiv markierte HBV RNA-B2 und die übrigen Puffersubstanzen zugegeben und der EMSA wie oben beschrieben durchgeführt wurde.

2.11.10 Auswertung von EMSAs mittels Phosphorimager

Die quantitative Auswertung von Signalstärken der radioaktiven Banden eines EMSAs erfolgte mittels eines Phosphorimagers. Dazu wurde das getrocknete Gel je nach erwarteter Signalstärke für 5min – 24 h bei RT mit einer Phosphorimager Bildplatte belegt. Diese wurde durch den Phosphorimager eingelesen und mit dem Programm *TINA 2.09* ausgewertet. Je länger die Bildplatte dabei dem radioaktiven Gel ausgesetzt war, desto besser war eine Unterscheidung zwischen allgemeinen Hintergrundsignalen und den tatsächlichen radioaktiven Banden möglich. Für die Auswertung wurde die absolute Signalstärke (in Pixel pro mm^2 einer ausgewählten Flächenregion) des Hintergrundes in jeder Bahn des Gels ermittelt und von der Signalstärke der jeweiligen RNA-Protein-Komplexe subtrahiert.
Für Kompetitionsanalysen wurde die absolute Signalstärke in eine relative umgewandelt, indem die Signalstärke einer unkompetierten Probe auf demselben Gel als Wert für 100% gesetzt wurde und die Signalstärken der übrigen Banden in relative Verhältnisse zu der unkompetierten Probe gesetzt wurden.
Für die Sättigungskinetik wurden die Intensitäten der monomeren RNA-La-Komplexe detektiert. Nach Subtrahieren der Hintergrund-Intensitäten wurden die Werte in relative Verhältnisse umgeformt (angegeben als Prozent der maximalen Werte) und einer nicht-linearen Regression unterzogen.

2.11.11 Auswertung von EMSAs mittels Autoradiogramm

Für eine autoradiographische Auswertung der getrockneten Gele eines EMSAs wurden die Gele mit einem Röntgenfilm belegt, der in einer Röntgenfilmkassette in Abhängigkeit von der zu erwartenden Signalstärke 5 – 24 h bei RT oder bei schwachen Signalen bei –80° C exponiert wurde. Anschließend wurde der Röntgenfilm in einem Entwicklergerät entwickelt.

2.12 Allgemeine Arbeiten mit prokaryotischen Zellen

2.12.1 Herstellung kompetenter Zellen

Durch Behandlung mit eiskaltem Kalziumchlorid wird in Bakterien ein vorübergehender Zustand der Kompetenz ausgelöst, wodurch die Zellen bei zusätzlicher Behandlung (siehe 2.12.2) DNA aufnehmen können. Hierfür wurden *E.coli* Zellen der Stämme DH5α und BL21 benutzt.

Die Herstellung kompetenter Zellen erfolgte in Anlehnung an die Hanahan-Methode (83). Dazu wurden 100 µl einer 3 ml über-Nacht Vorkultur des entsprechenden *E.coli* Stammes in 100 ml steriles Standard-I-Medium gegeben und bei 37° C unter Schütteln inkubiert bis sich eine OD_{600} = 0,5 eingestellt hatte. Alle anschließenden Arbeitsschritte erfolgten stets auf Eis und mit vorgekühlten, sterilen Lösungen (siehe 2.6). Nach Zentrifugation für 10min mit 300 rpm und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 40 ml Hanahan-Lösung 1 resuspendiert und 10min inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 8min bei 3000 rpm und Entfernung des Überstandes wurde das Pellet in 4 ml Hanahan-Lösung 2 resuspendiert, anschließend aliquotiert und mit etwa –70° C (Trockeneis in Ethanol abs.) schockgefrostet. Die Lagerung erfolgte bei –70° C.

2.12.2 Transformation von Plasmid-DNA in prokaryotische Zellen

Durch die Transformation werden Plasmide in Bakterien eingeschleust und dafür wurde hier die Hitzeschock-Methode benutzt. Als bakterielle Zellen dienten die *E.coli* Stämme DH5α zur Amplifizierung von Plasmiden sowie BL21 zur Expression von hLa Proteinen. Die Herstellung der Chemokompetenz der Zellen ist in vorigem Abschnitt beschrieben.

Für die Transformation von Plasmiden in prokaryotische Zellen wurden 10 ng Plasmid verwendet. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Zellen mit dem Plasmid für 30min auf Eis (4° C) inkubiert, bevor durch einen Hitzeschock (5min 37° C) und anschließender Inkubation für 2min bei 4° C die Aufnahme der Plasmid-DNA in die Zellen bewirkt wurde. Nach einer Zugabe von 900 µl Standard-I-Nährmedium und einer 1 stündigen Inkubation bei 37° C wurden die Zellen für 2min mit 5000 rpm sedimentiert, der Überstand bis auf einen Rest von 50 µl abgenommen und die Zellen in dem verbleibenden Medium resuspendiert. Schließlich wurden die transformierten Zellen auf selektiven LB-Agarplatten (siehe 2.4) ausplattiert und wuchsen über Nacht bei 37° C in einem Brutschrank.

2.13 Allgemeine Arbeiten mit eukaryotischen Zellen

2.13.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Die Kultivierung der humanen Cervix-Karzinom und Hepatoma-Zellinien erfolgte in dem unter 2.4 genannten Medium im Brutschrank bei einer konstanten Temperatur von 37° C sowie einen CO_2-Gehalt von 5%.
Zum Ablösen adherenter Zellen wurde das Medium mit einer sterilen Pasteurpipette abgesogen und es wurde das Trypsin-EDTA Gemisch (siehe 2.4) auf die Zellen gegeben (für eine 75cm^2 Kulturflasche 1 ml) und für 3min inkubiert. Anschließend wurde durch die Zugabe von Serum-haltigem Medium das Trypsin inaktiviert und die Zellen wurden wie unter 2.13.2 beschrieben gezählt und neu ausplattiert.

2.13.2 Zellzählung und DNA-Transfektion in eukaryotische Zellen

Für die Transfektion von Plasmid-DNA wurden die Zellen wie folgt am Tag vor der Transfektion ausplattiert: für Experimente in 24-*well* Platten mit 4 x 10^4 Zellen ad 500 µl Medium, für Experimente in Schälchen mit 6 cm Durchmesser mit 1,5 x 10^6 Zellen ad 4 ml Medium (siehe 2.4). Dazu wurde das Medium aus der Zellkultur-Flasche mit einer sterilen Pasteurpipette abgesogen und die adhärenten Zellen mit 1 ml Trypsin-EDTA für 3min inkubiert. Die Zugabe des Trypsin bewirkt eine Ablösung der Zellen von der Oberfläche der Kulturflasche. Die enzymatische Reaktion wird durch das Serum-haltige Medium gestoppt. Es wurden 9 ml Medium hinzugegeben und die Suspension wurde in ein steriles 50 ml Falcon-Röhrchen überführt, wo die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer 10 ml Spritze (Durchmesser der Kanüle erst 0,9 dann 0,4 mm) vereinzelt wurden. Nachdem dadurch die Zellverbände aufgelöst waren, wurden wenige Tropfen der Suspension auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und es wurden insgesamt 4 Großquadrate ausgezählt. Der Durchschnittswert dieser Ergebnisse wurde mit dem Faktor 10000 multipliziert, welcher sich aus der Art der Zählkammer ergab und lieferte die Anzahl an Zellen / ml. Daraufhin wurden die Zellen entsprechend der benutzten Kulturschale (s.o.) ausplattiert. Am Folgetag hatten die Zellen eine Konfluenz von etwa 60% und es konnte die Transfektion von DNA erfolgen, wozu 2 h vor der Transfektion das Medium gewechselt wurde.
Die oben genannten Zell-Mengen wurden mit 1 µg DNA transfiziert, wobei FuGene-6 als Transfektions-Reagenz benutzt wurde. Es wurden pro 1 µg zu transfizierender DNA 100 µl serumfreies Medium und 3 µl FuGene-6 für 5min bei RT in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß inkubiert, bevor 1 µg DNA hinzugefügt und für 15min RT erneut inkubiert wurde. Schließlich

wurde der gesamte Transfektions-Ansatz in die Zell-Suspension pipettiert, gleichmäßig verteilt und die Zellen wuchsen über Nacht im Brutschrank. Etwa 12 h nach der Transfektion wurde das Medium abgesogen und durch neues Medium ersetzt.

2.13.3 RNAi Behandlung eukaryotischer Zellen

Die RNA-Interferenz (RNAi) stellt eine Methode dar, bei welcher eukaryotische Zellen mit kurzen dsRNAs (siRNAs) behandelt werden, welche in der Zelle zu einer selektiven Abschaltung bestimmter Genexpressionen führen. Die Bestimmung darüber, welche RNA durch RNAi Behandlung reguliert wird, entsteht durch die Sequenz der jeweiligen siRNAs. Durch die Anlagerung der siRNAs an eine komplementäre mRNA Sequenz wird der Abbau dieser mRNA in der Zelle induziert.

Die RNA-Interferenz wurde zunächst in *C.elegans* und später in Insekten, Fröschen, Mäusen und anderen Spezies entdeckt und existiert auch in humanen Zellen (59, 106, 149, 201). Die RNA-Interferenz stellt einen ähnlichen Mechanismus zum posttransktiptionellen *gene-silencing* in Pflanzen und Pilzen dar und ist in einigen Übersichtsartikeln intensiv behandelt (20, 184, 185, 189). Die natürliche Funktion der RNAi scheint dabei die Verteidigung des Genoms gegen Viren oder mobile genetische Elemente wie Tansposons zu sein. Dieser Vorgang wird durch kurze, 21 bis 23 nt lange doppel-strängige RNAs (dsRNAs) vermittelt, die den spezifischen Abbau von mRNAs mit homologen Sequenzen verursachen und ist auf das Cytoplasma beschränkt (230, 231).

Bei den benutzten siRNAs handelte es sich einerseits um synthetische RNAs (hergestellt durch IBA GMBH Göttingen, eingesetzt mit 100 mM) oder um Synthesen, welche mithilfe des *silencer-RNA-construction-kit* durchgeführt wurden. Bei den Zielsequenzen handelte es sich einerseits um die Sequenz des humanen La Proteins sowie andererseits um die Sequenz des nicht in humanen Zellen vorkommenden Luciferase Proteins. Alle nicht durch die IBA GmbH synthetisierten siRNAs wurden von Julia Dittmann (AG T. Heise) hergestellt (Sequenzen siehe 2.5.7).

Eukaryotische HeLa Zellen wurden für die siRNA Behandlung in *6-well-plates* mit einer Dichte von 0,2 x 10^6 Zellen ausplattiert, um am Folgetag eine Konfluenz von 30 – 40% aufzuweisen. Zur Transfektion der siRNAs wurden in 2 Ansätzen 200 µl Opti-MEM mit 100 mmol des jeweiligen siRNA-Oligonukleotids, sowie 12 µl Oligofectamin mit 48 µl Opti-MEM 10min bei RT inkubiert, bevor diese vereinigt und 25min bei RT inkubiert wurden. Nach Zugabe von weiteren 140 µl Opti-MEM wurde der gesamte Ansatz in das Medium der Zellen pipettiert. Ein Wechsel des Mediums am Folgetag erfolgte nicht. Der Tag für die Lysis der Zellen richtete sich nach den Anforderungen des jeweiligen Experiments.

2.13.4 Fixierung und Immunfluoreszenz-Färbungen eukaryotischer Zellen

Um die subzelluläre Lokalisation des hLa Proteins und seiner Mutanten verfolgen zu können, wurde das Protein als GFP-Fusionsprotein exprimiert. Dies erlaubt eine Dokumentation der Verteilung in der lebenden Zelle. Es war jedoch notwendig, bestimmte andere Strukturen in den Zellen, wie Nuklei oder andere Proteine anzufärben. Dafür mussten die Zellen auf einem Deckglas fixiert werden. Ferner mussten die Zellen permeabilisiert werden, damit anschließend Färbereagenzien zugegeben werden konnten, sowie primäre und sekundäre Antikörper, die gegen bestimmte zelluläre Proteine gerichtet waren. Schließlich wurden die Zellen mit dem Deckgläschen auf einem Objektträger fixiert und anschließend wurde die Lokalisation der jeweiligen Proteine und Strukturen im Mikroskop ausgewertet.

Für Immunfluoreszenz-Färbungen transfizierter, eukaryotischer Zellen wurden die Zellen in 24-*well* Platten wie oben beschrieben ausplattiert, wobei zuvor in das jeweilige *well* ein Deckgläschen eingelegt wurde. Zur späteren Detektion des hLa Proteins wurde das Protein 1 Tag vor der Fixierung der Zellen als GFP-hLa-Fusionsprotein transient transfiziert (siehe 2.10.2 + 2.13.2). Die Fixierung der Zellen erfolgte nach der folgenden Methanol-Aceton-Methode (alle Volumina = 500 µl, alle Lösungen –20° C, sowie die Zellen gekühlt auf Eis): nach Absaugen des Mediums und zweimaligen Waschens der Zellen mit PBS-Puffer folgte eine Inkubation mit Methanol für 5min und mit Aceton für 30 sec. Nach Absaugen des Acetons wurden die Glasplättchen über Nacht im Dunkeln getrocknet. Bei allen Vorgängen verblieben die Glasplättchen in der Kulturschale.

Die Zellen wurden zunächst durch Zugabe von PBS-Puffer (etwa 500 µl, RT (siehe 2.6)) für 20min rehydriert. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit je 60 µl eines α-NOH61 Antikörpers (1:100 in PBS verdünnt) inkubiert. Nach dreimaligen Waschens der Zellen mit PBS-Puffer erfolgte die Inkubation für 1 h mit einem Gemisch aus Hoechst-Farbstoff (4 ng/ml) in PBS und dem sekundären Antikörper Ziege-anti-Maus (2 mg / ml) 1 : 400 in PBS. Schließlich wurden die Zellen erneut 3 x mit PBS-Puffer gewaschen und das Glasplättchen letztlich mit 10 µl Moviol auf einem Objektträger fixiert und für mindestens 24 h bei 4° C getrocknet. Die Fluoreszenz-Aufnahmen wurden mit einem Zeiss Axiophot Mikroskop durchgeführt, welches mit der AxioVision 3.0.6.38 Software ausgestattet war.

2.13.5 FRAP – *Fluorescence Recovery After Photobleaching*

Die Methode der FRAP-assays wurde zur Bestimmung der Mobilität von Fluoreszenz-markierten Proteinen in lebenden Zellen mit einem konfokalen Mikroskop benutzt. Zu diesem Zweck wird das Fluoreszenz-Signal in einer ausgewählten Flächenregion durch einen

hochenergetischen Laserstrahl gelöscht. Durch Vergleich der Fluoreszenz vor dem Bleichen durch den Laser und der Aufzeichnung der Wiederherstellung der Fluoreszenz-Intensität durch Einstrom in Abhängigkeit von der Zeit kann die Mobilität des untersuchten Moleküls berechnet werden. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit M. Schweizer, Zentrum für molekulare Neurobiologie, Abt. f. Elektronenmikroskopie, UKE-Hamburg, durchgeführt.
HeLa Zellen wurden mit einer Dichte von 4 x 10^4 Zellen in einem Lab-Tek Doppelkammer-System ausplattiert und wie unter 2.13.2 beschrieben mit 1 µg hLa-GFP Plasmid transfiziert. Die konfokale Mikroskopie im ZMNH an den lebenden Zellen wurde 1 Tag nach der Transfektion mit einem Leica TCS-SP2 Mikroskop (Leica, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 488 nm und dem eingebauten Argon-Laser (65 mW nominelle Leistung) durchgeführt. Für die zeitliche Auflösung wurden Intervalle zu je 657 ms gewählt. Dazu wurden vor der Behandlung 5 Aufnahmen gemacht, gefolgt von einem dreifachen Laserimpuls bei 488 nm und nachfolgender Bildaufnahmen für 30 bis 55 s.
Für die Quantifizierung der Fluoreszenz-Intensitäten in einer gewählten Flächenregion wurde diese Intensität gegen den Verlust an gesamter Intensität während des Bleichens und der Aufnahmen normalisiert. Dazu wurden die Intensitäten der Fluoreszenzen in der gesamten Zelle sowie in der ausgewählten Flächenregion zu gegebenen Zeitpunkten durch die Scion Image Beta 4.0.2 Software bestimmt. Die Berechnung erfolgte durch folgende Gleichung:

$$I_{rel} = (T_0 * I_t) / (T_t * I_0)$$

Dabei gilt: I_{rel} = relative Fluoreszenz-Intensität; T_0 = durchschnittliche Intensität in der gesamten Zelle vor dem Bleichen; I_0 = durchschnittliche Intensität in der gewählten Flächenregion vor dem Bleichen; T_t = Intensität in der gesamten Zelle zu jedem Zeitpunkt t nach dem Bleichen; I_t = Intensität in der gewählten Flächenregion zu jedem Zeitpunkt t nach dem Bleichen.
Die Ergebnisse wurden graphisch dargestellt mit der X-Achse als Zeit t und der Y-Achse als relative Fluoreszenz-Intensität I_{rel}.

2.13.6 Herstellung von Gesamt-Protein Extrakten aus eukaryotischen Zellen

Für die Herstellung von gesamt Protein-Extrakten wurden die eukaryotischen Zellen zunächst auf Eis gestellt, nach Entfernung des Mediums 2x mit kaltem PBS-Puffer gewaschen und je 10cm-Schale in 2,5 ml Lysis-Puffer (10 mM Tris/HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,5% NP-40, 4% Protease-Inhibitor Complete™) resuspendiert. Diese Suspension wurde in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Nach gründlichem Mischen (vortex), 2 x 15 sec Ultraschall-

Behandlung, 10 minütiger Inkubation auf Eis und weiterem vortexen erfolgte die Kontrolle der effizienten Lysis. Hierzu wurde ein Aliquot auf einen Objektträger gegeben, mit einem Deckgläschen bedeckt und durch ein Lichtmikroskop betrachtet. Sofern keine Nuklei mehr sichtbar waren, wurden die Proben für 10min bei 4° C mit 20000 x g zentrifugiert. Anderenfalls wurde die Ultraschall-Behandlung wiederholt. Die Überstände der Zentrifugation wurden bei – 20° C gelagert.

2.13.7 Extraktion von gesamt RNA aus eukaryotischen Zellen

Für die Extraktion der gesamten RNA aus eukaryotischen Zellen wurde grundsätzlich das TriPure-Isolation-Reagent benutzt und nach den Angaben des Herstellers angewendet. Die gesamte Ausbeute an RNA betrug beispielsweise für HeLa-Zellen (dicht bewachsene 75 cm^2 Kulturflasche) bis zu 800 µg.

3 Ergebnisse

3.1 Reinigung des rekombinanten, humanen La Proteins

In dieser Arbeit sollte rekombinant hergestelltes hLa Protein für die Durchführung von RNA-Bindungsstudien benutzt werden. Des weiteren sollten Vorversuche für eine Kristallisation des humanen La Proteins durchgeführt werden. Daher musste zunächst ein Protokoll zur Reinigung des Proteins erstellt werden, welches die Abtrennung von allen nachweisbaren Kontaminationen ermöglichte. Der Nachweis von möglichen Kontaminationen und eventuellen Protein-Modifikationen sollte mit Hilfe verschiedener Methoden erfolgen. Zu diesem Zweck wurde das humane La Protein rekombinant in *E.coli* exprimiert und mit nachfolgend beschriebenen Methoden gereinigt. Die Methoden für den Nachweis von Kontaminationen sind anschließend dargestellt.

3.1.1 Ni-NTA-Technologie und präparative Gelfiltration

Die cDNA-Sequenz des in dieser Studie benutzten humanen La Proteins lag zu Beginn der Arbeit einkloniert in einen pET28b(+) Vektor vor. In diesem Vektor ist die Expression des hLa Proteins unter der Kontrolle eines mit IPTG induzierbaren T7-Promotors und das Protein wird mit einer N-terminalen hexa-Histidin-Markierung versehen (siehe Sequenz im Anhang), welcher eine Aufreinigung des Proteins mittels Nickel-NTA-Technologie ermöglichte.
Nach der unter 2.9.1 beschriebenen Expression des Proteins wurde aus den *E.coli* Zellen ein Lysat erstellt, welches alle löslichen und nicht sezernierten Proteine enthält. Da eine native Aufreinigung des Proteins für alle weiteren Analysen notwendig war, enthielten die für die Reinigung benutzten Lösungen keinen Harnstoff. Die intensive heterologe Expression rekombinanter Proteine kann in *E.coli* zur Bildung von Einschlusskörpern („*inclusion bodies*“) führen, welche große Mengen dieses Proteins enthalten. Da diese Kompartimente durch eine native Aufreinigung nicht aufgeschlossen werden und das Protein somit verloren gehen könnte, kann die Zugabe von Harnstoff unter Umständen die Ausbeute an Protein durch Aufschluss dieser Körperchen beträchtlich erhöhen. Dieses hatte aber im Falle des hLa Proteins keinen positiven Effekt auf die Ausbeute (nicht gezeigt), so dass man annehmen kann, dass das Protein in diesem Expressionssystem in *E.coli* nicht in Einschlusskörpern akkumuliert. Nach Applikation des Zell-Lysats auf eine Ni-NTA-Matrix wurde die Säule zur Entfernung unspezifisch gebundener Proteine gewaschen und anschließend eluiert (siehe 2.9.2). Um die im Elutionspuffer enthaltenen und aufgrund von erhöhter Absorption störenden Substanzen aus dem Elutionspuffer zu entfernen wurde das eluierte Protein gegen Puffer A dialysiert (siehe

2.6). Durch eine SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung (siehe Abb. 3.1.1-1) ist dargestellt, dass das hLa Protein bei Anwendung dieser Technologie bereits nach einem Reinigungsschritt relativ rein und nur durch wenige Kontaminationen verunreinigt ist.

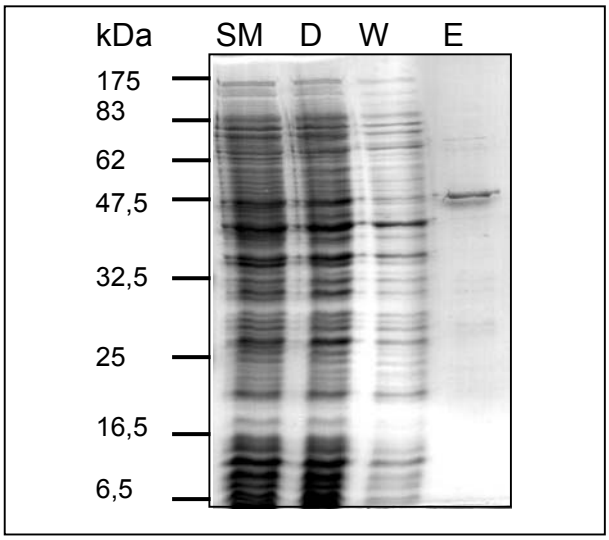


Abbildung 3.1.1-1: Reinigung des HIS-markierten hLa über Ni-NTA-Säulen. Es wurden je gleiche Volumina der sich ergebenden Fraktionen SM (Startmaterial, =Lysat), D (Durchlauf), W (erste Waschfraktion) und E (Eluat) in einer 12,5% SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt. Positionen der Proteinmarker sind linksseitig in kDa angegeben. Die im Eluat enthaltene Hauptbande wurde in einem Western Blot als hLa identifiziert (nicht gezeigt).

Zur Reinigung HIS-markierter Proteine mittels Ni-NTA-Säulen ist festzustellen, dass die Homogenität der Proben leicht variierte und meist noch einige Proteine als Verunreinigungen nachzuweisen waren (Abb. 3.1.1-1). Um das hLa weiter aufzureinigen, wurde eine präparative Gelfiltration durchgeführt, welche Proteine nach Größenunterschied bzw. nach dem Stokes-Radius des Proteins auftrennt. Für diesen Zweck wurde eine Superdex-200-Matrix gewählt, welche im Hinblick auf das Molekulargewicht des hLa Proteins eine geeignete Auftrennung der Proteine und somit optimale Reinigung erreichen sollte. Zur Präparation größerer Proteinmengen und für eine optimale Auftrennung wurde hierfür eine sehr große Säule (600 mm Länge, 320 ml Bettvolumen) gewählt. Um die Verluste bei dieser Säulendimension möglichst gering zu halten, mussten relativ große Mengen des hLa Proteins (mindestens 1 mg) aufgetragen werden. Zudem wurde das Auftragsvolumen so gering als möglich gehalten (maximal 2,5 ml), um eine möglichst konzentrierte Elution des jeweiligen Proteins zu gewährleisten.

Zur Kalibrierung der Säule wurden zunächst in einzelnen Läufen mehrere Eichproteine über die Säule aufgetrennt (siehe 2.9.4) und deren Elutionsvolumina durch Aufzeichnung der OD_{280} dokumentiert. Bei den verwendeten Proteinen handelte es sich um Alkohol Dehydrogenase (MW 150000), Albumin (MW 66000), Ovalbumin (MW 42700) und Kohlenstoff-Anhydrase (MW 29000), welche den potentiell erforderlichen Größenbereich (50 – 150 kDa) abdeckten. Zudem wurde durch die Auftragung von Dextranblau (MW 2000000) das Leervolumen der Säule bestimmt. Über die Elutionsvolumina dieser einzelnen Läufe wurde anschließend wie unter 2.9.4 beschrieben der Elutionskoeffizient K_{AV} berechnet und die nachfolgend dargestellte Eichkurve erstellt.

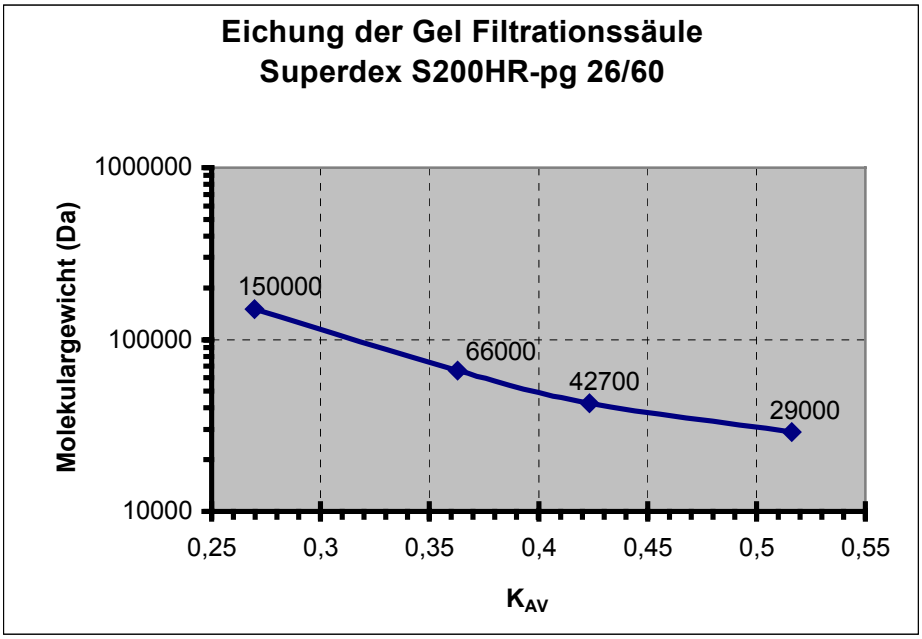


Abbildung 3.1.1-2: Eichung der präparativen Gelfiltrationssäule. Es wurden die im Text angegeben Eichproteine auf die Säule aufgetragen, die Elutionsvolumina bestimmt und der Elutionskoeffizient K_{AV} berechnet. Das Leervolumen V_0 betrug 105 ml, das Bettvolumen V_t betrug 320 ml. Die Elutionsvolumina waren: Alkohol Dehydrogenase 163 ml (K_{AV} = 0,2698), Albumin 183 ml (K_{AV} = 0,3698), Ovalbumin 196 ml (K_{AV} = 0,4233), Kohlenstoff-Anhydrase 216 ml (K_{AV} = 0,5163). Anhand dieser Werte wurde die Eichgerade erstellt, wobei der K_{AV} auf der X-Achse und die Masse (logarithmisch, in Da) auf der Y-Achse aufgetragen sind. Die Positionen der Eichproteine sind anhand ihrer Masse (in Da) oberhalb der Geraden angegeben.

Nachdem die Gelfiltrationssäule geeicht war und sichergestellt wurde, dass das humane La Protein (MW 47500, bzw. 50200 Dalton mit HIS-tag) theoretisch im linearen Bereich der Auftrennung eluiert, wurden jene Proteinpräparationen auf die Säule aufgetragen, welche zuvor über Ni-NTA aufgereinigt, dialysiert und konzentriert waren (siehe 2.9.2, 2.9.3 und 2.8.2). Wie bereits zuvor von Craig et al. (44) publiziert verfügt das humane La Protein über eine Dimerisierungsdomäne, welche durch o.g. Arbeit auf den Bereich der Aminosäuren 298-348 beschränkt wurde. Dieses war Grund zur Annahme, dass das hLa Protein als Multimer eluieren sollte, d.h. für ein Dimer mit einer Masse von ~100 kDa, als Trimer mit einer Masse von ~150 kDa usw. Die Auftrennung von Ni-NTA-gereinigtem hLa ergab, dass das Protein bei den gewählten Bedingungen hauptsächlich in einem Peak (P1) mit dem Elutionsvolumen V_e=161 ml eluierte (Abb. 3.1.1-3), was anhand der Eichgeraden unter Berechnung des K_{AV} auf eine Masse von ~150 kDa und folglich eine trimere Konformation hindeutet. Weitere Analysen zum Grad der Multimerisierung des Proteins erfolgen an anderer Stelle (siehe 3.3) und werden in diesem die Reinigung betreffenden Abschnitt nicht weiter beschrieben. Neben Peak 1 (150 kDa) fand sich ein weiterer Peak (P2) bei 200 – 210 ml (K_{AV} ~ 0,465). Die darin befindlichen Proteine waren im immunbiologischen Nachweis durch Western Blot nicht durch den monoklonalen α-hLa Antikörper 4B6, aber durch die Antikörper 3B9 und SW5 nachweisbar (siehe 2.8.6 und Abb. 3.2-2 zum Erkennungs-Motiv der Antikörper). Daher handelt es sich um N-terminale

Fragmente des hLa, welche im Gel mit einer Masse zwischen 25 und 30 kDa liefen und vermutlich aufgrund von Degradationen oder verfrühten Translations-Abbrüchen entstanden sind. Zudem wurden Peaks beobachtet, welche weit oberhalb des geeichten Bereiches lagen und seitens des Molekulargewichts lediglich auf den Bereich zwischen 250 kDa und 2 MDa eingeengt werden können. Es handelt sich dabei vermutlich um Multiproteinkomplexe oder Aggregate, welche im Startmaterial enthalten waren und unmittelbar nach dem Leervolumen und mit einem Elutionsvolumen V_e=108-145 ml von der Säule eluierten. Darin befanden sich verschiedene Proteine mit unterschiedlichsten Massen, unter denen auch das hLa Protein nachgewiesen werden konnte. Es ist nicht auszuschließen, dass es sich um denaturierte Proteine handelt. Die Wahrscheinlichkeit dafür wurde jedoch reduziert, in dem die Proben vor der Applikation zentrifugiert wurden (siehe 2.9.4).

Eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bzw. Western Blot zeigt die Homogenität der Fraktionen und die Elution des humanen La Proteins.

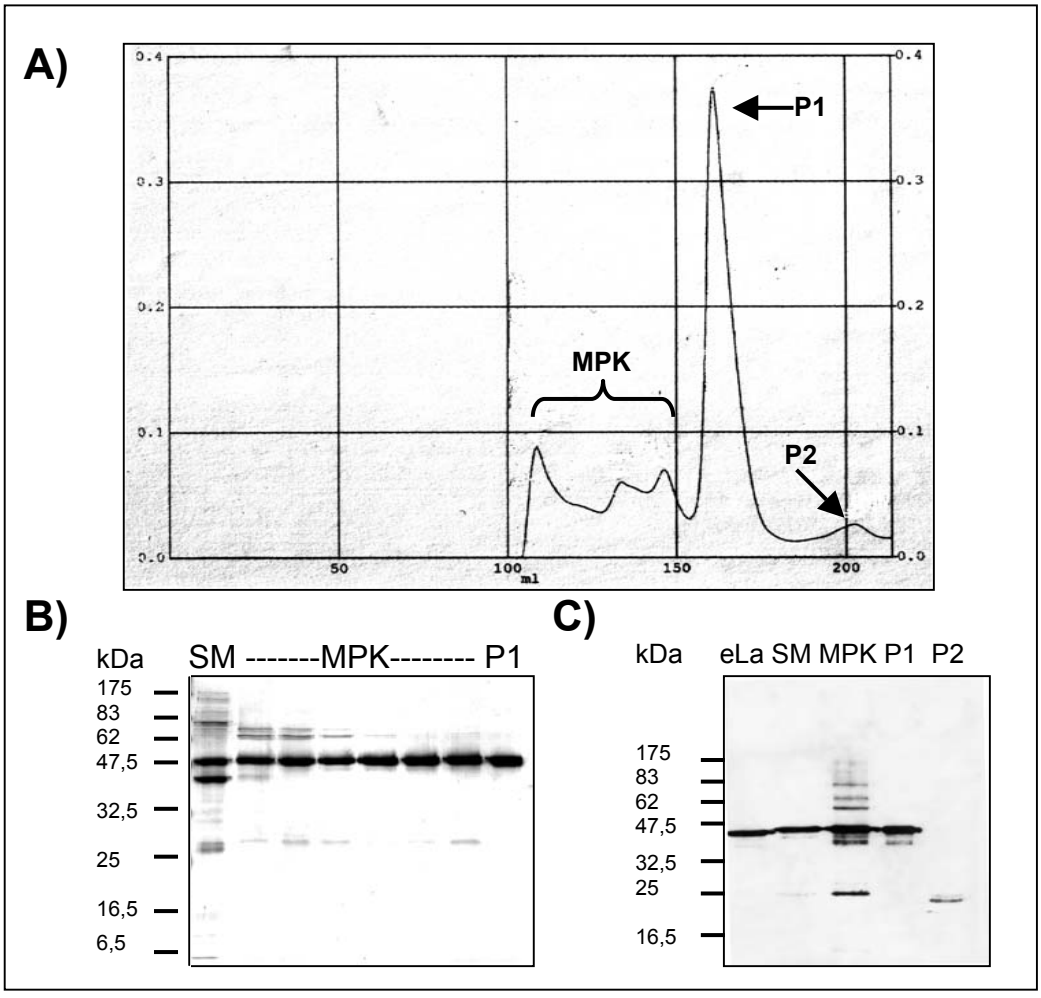


Abbildung 3.1.1-3: (A) Elutionsprofil bei Auftrennung Ni-NTA gereinigten hLa Proteins mittels präparativer Gelfiltration. Es wurden 6 mg Ni-NTA gereinigtes hLa-WT Protein auf die Säule geladen und wie unter 2.9.4 beschrieben eluiert. Gezeigt ist die Aufzeichnung der OD_{280} (Y-Achse) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen (in ml, X-Achse). Die im Text beschriebenen Peaks sind angedeutet. MPK = Multiproteinkomplexe (MW ≥250 kDa); P1 = Peak 1 (150 kDa); P2 = Peak 2 (25 – 30 kDa). **(B) SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung und (C) Western Blot mit ausgewählten Eluatfraktionen der Gelfiltration.** Aufgetragen sind je 1 µg (B) bzw. 200 ng (C) Ni-NTA gereinigtes Startmaterial (SM), verschiedene Fraktionen der Multiproteinkomplexe (MPK) sowie ein Aliquot des Peaks 1 (P1) und des Peaks 2 (P2); des weiteren HeLa Zellextrakt, welcher die Position des endogenen La (eLa) anzeigt. Für den Western Blot erfolgte der Elektrotransfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und der Nachweis des hLa mit monoklonalem α-hLa Antikörper 3B9 und sekundärem Ziege-α-Maus Antikörper.

Zusammenfassend kann das rekombinante hLa Protein mit den zwei Reinigungsschritten der Ni-NTA-Chromatographie und der sich anschließenden Gelfiltration von jeglichen Kontaminationen abgetrennt werden, welche mit einer Coomassie-Färbung (mit zu 2,5 µg Probenmenge) nachgewiesen werden könnten. Zudem wurde gezeigt, dass das rekombinante hLa Protein vermutlich Multiproteinkomplexe mit anderen Proteinen ausbildet, welche mit einem Molekulargewicht zwischen 250 kDa und 2 MDa eluieren.

3.1.2 Weitere Dokumentation der Proteinreinigung durch 2-D-Gelelektrophorese, MALDI-TOF und *Light-Scattering*

Insbesondere im Hinblick auf spätere Versuche zur Kristallisation des Proteins wurde die Homogenität der Eluate der Gelfiltration weiter untersucht. Da für die Kristallisation des hLa hohe Proteinkonzentrationen erforderlich waren, wurde analysiert, ob das Protein bei höheren Konzentrationen löslich bleibt und ob sich aufgrund der hohen Konzentration und dem Fehlen von eventuell stabilisierenden Faktoren eine Thermosensitivität einstellt. Es ergab sich, dass das Protein bis zu der höchsten getesteten Konzentration von 12 mg/ml konzentriert werden konnte, ohne dass sich Präzipitate bildeten. Jedoch wurde bei einer Lagerung bei –20° C eine sehr massive Degradation festgestellt, so dass die Lagerung bei 4° C erfolgte. Die Analyse der Homogenität der Fraktion des gereinigten Proteins erfolgte u.a. durch eine zweidimensionale Gelelektrophorese, welche im Rahmen einer Kooperation durch Herrn J. Heukeshoven (Heinrich-Pette-Institut) durchgeführt wurde (siehe 2.8.8).

Wie aus Abb. 3.1.2-1 ersichtlich ist, ergibt die zweidimensionale Auftrennung einer über Ni-NTA und Gelfiltration gereinigten hLa-WT Fraktion mit anschließender Silberfärbung ausschließlich Banden mit einem MW von ~50 kDa und einem isoelektrischen Punkt (pI) zwischen 6 und 7,5. In einem parallelen Ansatz wurde ein elektrophoretischer Transfer der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran mit anschließendem immunbiologischen Nachweis durchgeführt (nicht gezeigt), welcher alle in der Silberfärbung erscheinenden Banden als hLa

identifizierte. Aus diesem Versuch ergibt sich, dass die Homogenität der Präparation als sehr hoch einzustufen ist, da sich in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese mit Silberfärbung keine Banden ergeben, die nicht als hLa identifiziert werden können. Der Bereich der IEF wurde in anderen Versuchen auf einen Wert zwischen pH 3-11 eingestellt, wobei sich ebenfalls keine weiteren Signale ergaben.

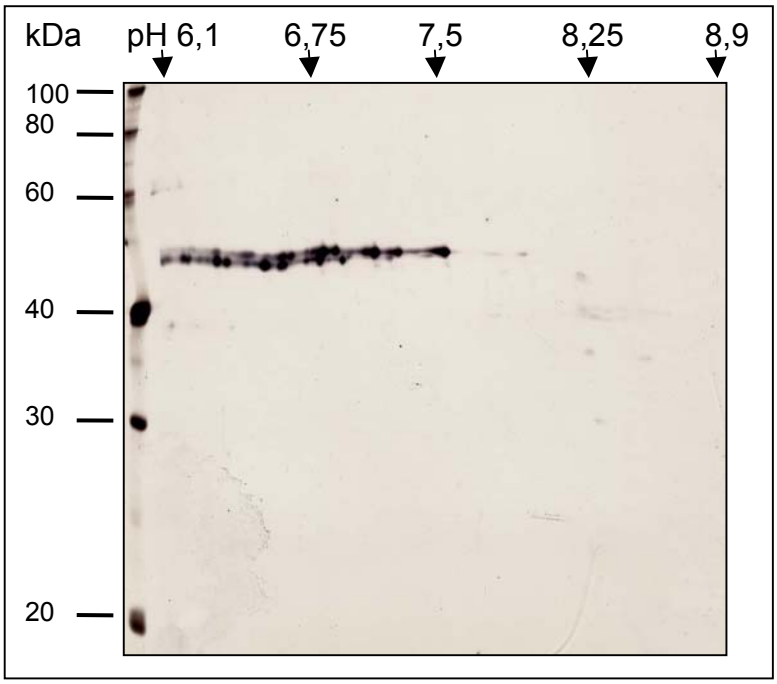


Abbildung 3.1.2-1:

2-D-Gelelektrophorese mit Silberfärbung mit 9 µg einer durch Ni-NTA und Gel Filration aufgereinigten hLa-WT Präparation. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) der 1. Dimension erfolgte in einem Bereich zwischen pH 6-9, gefolgt von einer Auftrennung anhand des Molekulargewichts in einem 11% Polyacryl-amidgel. Molekulargewicht in kDa links angegeben, pI Werte resultierend aus der IEF oberhalb des Gels.

Aus dem zweidimensionalen Gel in Abb. 3.1.2-1 ergibt sich, dass das Protein einen pI zwischen 6 und 7,5 aufweist. Es konnte nicht abschließend geklärt werden, woraus sich dieser vergrößerte Bereich ergibt, jedoch ist eine Phosphorylierung auszuschließen (siehe 3.1.3). Zudem fällt auf, dass das Protein in mindestens zwei Spezies bezüglich der Masse vorliegt, welche sich um maximal 2 kDa unterscheiden. Durch eine Analyse mittels MALDI-TOF (siehe 2.8.8), ebenfalls im Rahmen einer Kooperation durch Herrn J. Heukeshoven durchgeführt, konnte der Unterschied der Massen genauer geklärt werden.

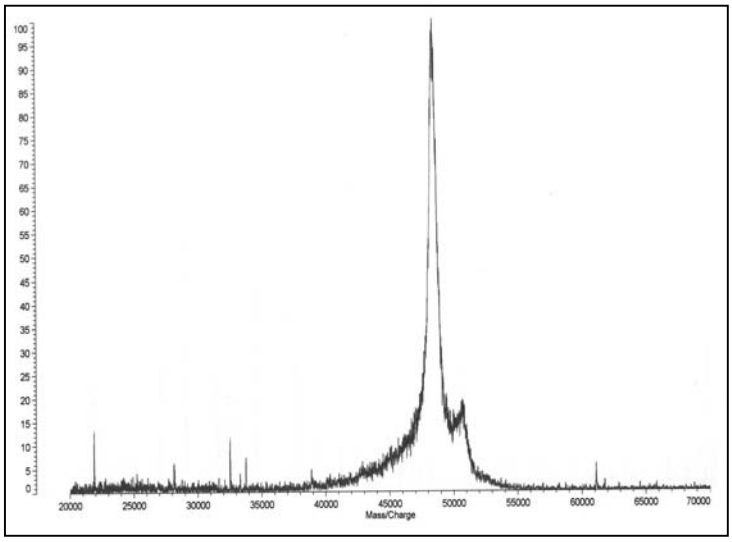


Abbildung 3.1.2-2: Massen-spektrometrie einer Ni-NTA und Gel Filrations gereinigten hLa-Wildtyp Präparation. Dargestellt ist das Ergebnis der MALDI-TOF Analyse, welche die in einer Protein-Suspension befindlichen Proteine anhand ihrer Masse auftrennt. Gezeigt ist Masse / Ladung (Da, X-Achse) gegen Signalintensität (Y-Achse). Die Peaks entsprechen Massen von 48438 und 50678 Da.

Wie aus der massenspektrometrischen Analyse (siehe Abb. 3.1.2-2) ersichtlich ist, liegt das hLa Protein in der analysierten Probe in zwei Massen von 48,5 und 50,7 kDa vor. Es war daher zu vermuten, dass es z.B. durch Degradation oder nicht vollständige Synthese C- oder N-terminal verkürzt war. Da in einer Sequenzierung die N-terminale Histidin-Markierung nachgewiesen werden konnte (nicht gezeigt) handelt es sich bei diesem Phänomen vermutlich um eine C-terminale Degradation. Es wurde jedoch festgestellt, dass sich dieses Ergebnis nur mit bestimmten Proben, welche für längere Zeit in geringeren Konzentrationen (0,1 mg/ml und niedriger) gelagert wurden, reproduzieren ließ. Dieses deutet gemäß der Masse des Peaks von 48438 Dalton darauf hin, dass das Protein unter solchen Umständen C-terminal bis zur Aminosäure 386 oder 387 degradiert wird. Alle sonstigen Proben wiesen in der Massenspektrometrie lediglich Massen von 50500 Da auf und zeigten somit eine äußerst homogene Präparation des hLa-WT Proteins an, da durch diese Methode keine weiteren Proteine nachweisbar waren.

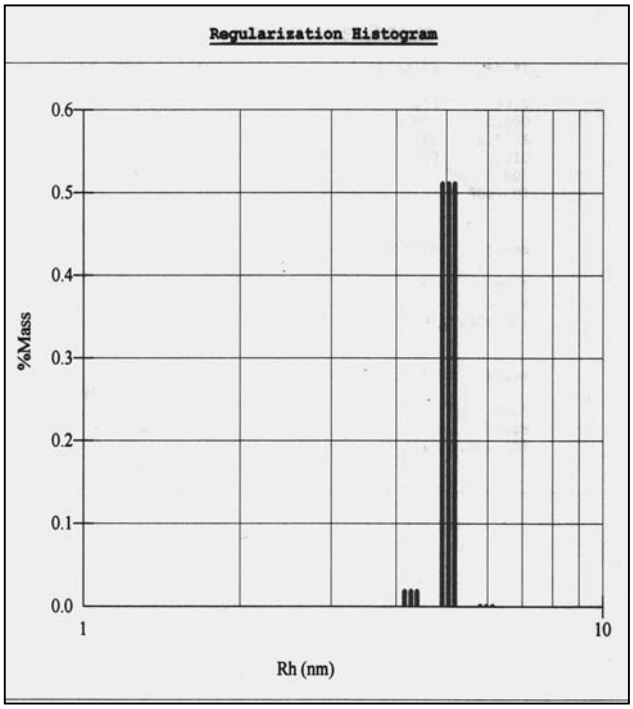


Abbildung 3.1.2-2: Regularisierungs-Histogramm des dynamischen Light-Scatterings einer Ni-NTA und Gelfiltrations gereinigten hLa-WT Präparation. Es ist die Partikelgröße (nm, X-Achse) gegen den Anteil an Gesamtmasse (%Mass, Y-Achse) aufgetragen für einen Bereich von 1 – 10 nm. Außerhalb des hier dargestellten Bereiches wurden keine Partikel detektiert. Es ergibt sich ein Hauptpeak mit über 50% der Masse bei 5,02 nm und ein Peak mit erheblich geringerem Anteil an gesamter Masse bei 4,2 nm.

Als Vorversuch für eine Kristallisation wurde zudem mit einer über Ni-NTA und Gelfiltration gereinigten Fraktion des hLa ein sogenanntes dynamisches *Light-Scattering* (DLS, siehe 2.8.8) durchgeführt. Die Methode des DLS stellt eine nichtinvasive, schnelle und einfache Methode da, welche spektrometrisch die Partikelgröße (und somit das ungefähre Molekulargewicht) von Makromolekülen in monodispersen Lösungen bestimmt (162). Diese Versuche wurden in Kooperation mit H.J. Hecht bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF), Abteilung für Strukturforschung, in Braunschweig durchgeführt. Als Material für das hier gezeigte DLS diente eine hLa-WT Präparation mit einer Konzentration von 2,5 mg/ml, wobei sich das erzielte Ergebnis in dieser Form auch bei höheren Proteinkonzentrationen reproduzieren ließ. Wie aus Abbildung 3.1.2-2 ersichtlich ist, ergab sich, dass neben einer kaum

messbaren Partikelgröße von 4,2 nm der Hauptteil des hLa-WT in Partikeln mit Größen von 5,02 nm aufzufinden ist, welches gemäß der im Analyse-Programm implementierten Software in einer Massenberechnung von 145 kDa resultiert. Dieses spricht für eine trimere Konformation des Proteins und deckt sich mit den Ergebnissen der präparativen Gelfiltration.

Aus den unter 3.2.1 und in diesem Abschnitt aufgeführten Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass das rekombinante hLa Protein mit den gewählten Methoden in ausreichendem Maße exprimiert und durch die Ni-NTA-Reinigung und Gelfiltration von jeglichen Kontaminationen befreit wurde, welche durch 2-D-PAGE mit Silberfärbung, Massenspektrometrie durch MALDI-TOF oder Spektrometrie durch dynamisches *Light-Scattering* nachweisbar wären. Zudem ist gemäß den Ergebnissen davon auszugehen, dass das rekombinante Protein vornehmlich in trimerer Konformation vorliegt. Wie in späteren Versuchen weiter beschrieben wird und durch einzelne Experimente im *Light-Scattering* ansatzweise gezeigt werden konnte, scheint das Protein eine trimere Konformation bei Verfügbarkeit von RNA zugunsten einer dimeren und hauptsächlich monomeren Form aufzugeben. Des weiteren kann gezeigt werden, dass das Protein in Multiproteinkomplexen enthalten ist, welche ein hohes Molekulargewicht aufweisen und ebenfalls nativ gewonnen werden konnten. Letztere wurden hier nicht weiter analysiert.

3.1.3 Untersuchungen zur Phosphorylierung des rekombinanten hLa Proteins

Wie bereits unter 1.1 beschrieben, besitzt das La Protein eine Reihe verschiedener potentieller Phosphorylierungsstellen in Form der Aminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin und es wird angenommen, dass diese z.T. regulierend sind für verschiedene Funktionen des Proteins. Da auch in der vorliegenden Arbeit Versuche mit (de-)phosphoryliertem hLa durchgeführt wurden, musste einerseits der Grad der Phosphorylierung des gereinigten, rekombinanten Proteins analysiert sowie andererseits ein Protokoll zur effizienten (De-) Phosphorylierung erarbeitet werden. Wie oben gezeigt (Abb. 3.1.2-1), weist das rekombinante Protein einen pI zwischen 6 und 7,5 auf. Als Ursache für diese breitere Streuung konnte eine Phosphorylierung zunächst nicht ausgeschlossen werden, da ein Phosphatrest den pI eines Proteins in Richtung des sauren Bereichs verschiebt. Um eine Phosphorylierung durch bakterielle Kinase zu überprüfen, wurde das Protein in langen Inkubationszeiten und mit großen Mengen an Phosphatasen behandelt (siehe 2.8.7) und mittels 2D-PAGE wie oben beschrieben analysiert. Als Phosphatasen dienten eine alkalische Phosphatase sowie ein weiteres Enzym, welches phosphorylierte Aminosäuren spezifisch dephosphoryliert. Unabhängig von den gewählten Enzymen oder Bedingungen ergab sich, dass keine der benutzten Phosphatasen das Bandenmuster in der zweidimensionalen

Elektrophorese veränderte (nicht gezeigt). Folglich wird das rekombinante hLa Protein während seiner Expression in *E.coli* nicht phosphoryliert.

Wie durch andere Arbeiten gezeigt, wird das humane La Protein an Serin366 durch Casein-Kinase-II *in vitro* und *in vivo* phosphoryliert (19, 58). Daher wurde dieses Enzym für die Phosphorylierung des Proteins in dieser Arbeit gewählt. In einem Vorversuch wurde festgestellt, dass das Enzym unter Zugabe von [α^{32}-P]-ATP eine radioaktive Markierung des hLa Proteins verursacht, welche durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase zu 95% rückgängig gemacht werden konnte (nicht gezeigt). Zudem wurde parallel eine Autophosphorylierung ausgeschlossen, da das unbehandelte rekombinante hLa in Anwesenheit von [α-^{32}P]-ATP ohne zugesetzte Kinasen auch nach längeren Inkubationszeiten (24 h) keine nachweisbare radioaktive Markierung aufwies (nicht gezeigt). Um die Masse und den pI des rekombinanten hLa nach nicht-radioaktiver Phosphorylierung durch Casein-Kinase-II mit einer unbehandelten Probe zu vergleichen, wurden diese in einem 2-D-Gel analysiert.

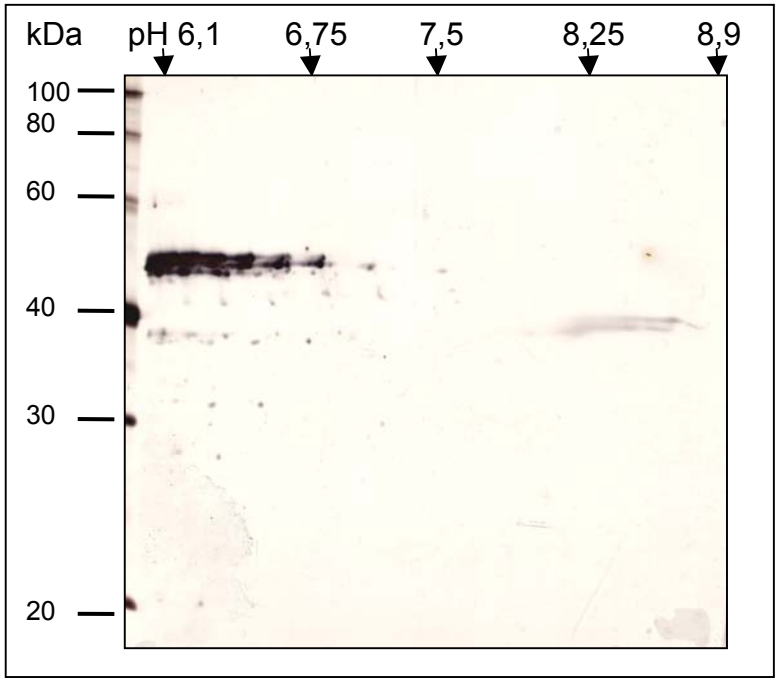


Abbildung 3.1.3-1:

2D-Gelelektrophorese mit Silberfärbung mit 9 µg einer durch Ni-NTA und Gelfiltration aufgereinigten und anschließend mit Casein-Kinase-II phosphorylierten hLaWT Präparation. Die isoelektrische Fokussierung (IEF) der 1. Dimension erfolgte in einem Bereich zwischen pH 6-9, gefolgt von einer Auftrennung in einem 11%igen Polyacrylamidgel. Das Molekulargewicht in kDa ist links angegeben, pI Werte resultierend aus der IEF oberhalb des Gels.

Bei einem Vergleich der unbehandelten Probe mit der phosphorylierten Probe (siehe Abb. 3.1.2-1 und 3.1.3-1) ist offensichtlich, dass der pI des hLa-WT durch die Phosphorylierung mit Casein-Kinase-II eindeutig in den sauren Bereich verschoben wurde. Dieses Ergebnis zeigt die Phosphorylierung des Proteins, welches aufgrund der gebundenen Phosphate einen erwartungsgemäß niedrigeren pI aufweist. Zudem ist davon auszugehen, dass das Protein in einer hyperphosphorylierten Form vorliegt, da die Änderung des pI in diesem Maße nicht durch nur einen Phosphatrest verursacht wird. In einem Western Blot mit immunbiologischen Nachweis wurden alle sichtbaren Banden als hLa identifiziert (nicht gezeigt). Ferner sind wie in Abbildung 3.1.2-1 mehrere Spezies des rekombinanten hLa zu beobachten, welche sich in der

Masse um bis zu 2 kDa unterscheiden. Die Ursache dafür ist bereits an anderer Stelle erwähnt (siehe 3.1.2 und Abb. 3.1.2-2).

Folglich ist gezeigt, dass das unbehandelte, rekombinante Protein eine vollständig dephosphorylierte Form des hLa ist, wohingegen durch Behandlung mit Casein-Kinase-II eine Phosphorylierung des Proteins erreicht wird. Es ist sehr wahrscheinlich, dass bei diesem Vorgang ebenfalls das Serin366 phosphoryliert wird.

3.2 Herstellung von Mutanten

Die Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit umfasste unter anderem die Analyse verschiedener Domänen des hLa im Hinblick auf mehrere Funktionen des humanen La Proteins, wie z.B. dessen Interaktion mit RNA und Multimerisierung sowie dessen subzelluläre Lokalisation. Zu diesem Zweck wurden eine Reihe verschiedener Mutationen in das Protein eingeführt, welche allesamt mittels PCR zunächst in dem prokaryotischen Expressionsvektor pET28b(+)-hLa-WT eingefügt wurden. Von diesem Vektor als Basis ausgehend wurden die entsprechenden Mutanten wie im Methodenteil beschrieben in eukaryotische Plasmide umkloniert, welche das Protein entweder ebenfalls mit einer hexa-Histidin-Markierung versehen oder mit einem anderen Protein fusionieren. Bei den eingefügten Mutationen handelte es sich um interne Deletionen oder um Punktmutationen mit Aminosäureaustauschen. Die Mutationen umfassten verschiedene Domänen des Proteins. Nachfolgen sind das Schema zur Methodik der Mutationssynthese sowie die Domänen des hLa graphisch und tabellarisch dargestellt.

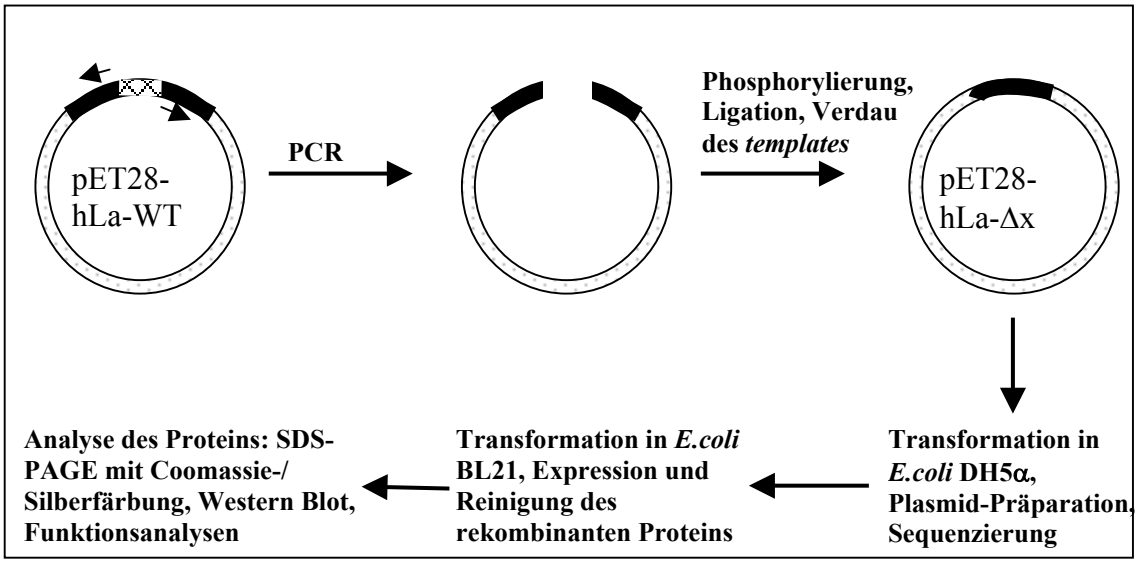


Abbildung 3.2.-1: Schematische Darstellung der Synthese von hLa-Mutanten mit internen Deletionen. Die Mutationen wurden in den pET28b(+)-hLa-WT Vektor mittels PCR eingefügt, wobei die Oligonukleotide (*Pfeile*) derart gewählt wurden, dass diese entsprechend 3´ und 5´ flankierend zu jener Region liegen, welche im hLa-WT (*schwarz*) deletiert werden soll (*schraffiert*). Nach der PCR wurde das Amplifikat phosphoryliert und ligiert. Nach selektivem Verdau der *template*-DNA durch *DPN-I* folgte die Transformation in *E.coli* DH5α mit anschließender DNA-Präparation und Sequenzierung. Positive Klone wurden zur Expression des rekombinanten Proteins in *E.coli* BL21 transformiert. Schließlich folgten Reinigung und Analyse des Proteins, bevor es für weitere Funktionsanalysen eingesetzt werden konnte.

Bezeichnung der Mutation	**Art der Mutation**	**Mutierte Region (Aminosäuren)**	**Potentielle Funktion der mutierten Region**
hLa-Δ1	Interne Deletion	RRM1 (11 – 99)	Interaktion mit RNA
hLa-Δ2	Interne Deletion	RNP2 – RRM2 (113 – 118)	Interaktion mit RNA
hLa-F118A	Punktmutation	RNP2 – RRM2 F-118 zu A	Interaktion mit RNA
hLa-Δ3	Interne Deletion	RNP2 – RRM2 (151 – 158)	Interaktion mit RNA
hLa-Δ4	Interne Deletion	RNP2 – RRM3 (235 – 242)	Interaktion mit RNA
hLa-Δ5	Interne Deletion	RNP1 – RRM3 (266 – 276)	Interaktion mit RNA
hLa-Δ6.0	Interne Deletion	Multimerisierungsdomäne (274 – 354)	Multimerisierung
hLa-Δ6.2	Interne Deletion	(291 – 354)	- " -
hLa-Δ6.3	Interne Deletion	(323 – 354)	- " – (in Teilen)
hLa-Δ7	Interne Deletion	(353 – 393)	Enthält das NLS
hLa-M18/19	Multiple Punktmutation	aa 338-341 von 5´-GKGK-3´ zu 5´-ETET-3´	Region zur NTP-Bindung /-Hydrolyse

Tabelle 3.2: Übersicht über die in dieser Arbeit beschriebenen und benutzten Mutanten des humanen La Proteins. Dargestellt sind die Bezeichnung und die Art der jeweiligen Mutation, sowie die entsprechende Position im Protein (ggf. Bezeichnung der Domänen sowie der Aminosäuren in Ein-Buchstaben-Kodierung) und, sofern aus der Literatur bekannt, die potentielle Funktion der mutierten Region. Eigene Ergebnisse sind nicht enthalten. Die Literaturverweise sind dem Text zu entnehmen. Die Kombinationen der jeweiligen Oligonukleotide für die Synthese der Mutanten mittels PCR sind unter 2.10.1 beschrieben. aa = Aminosäure; NLS = Nukleus-Lokalisations-Signal; RRM = RNA Erkennungs Motiv; RNP = RNP Konsensus-Sequenz; NTP = Nukleotidtriphosphat

Nach Klonierung der entsprechend mutierten hLa-cDNAs wurden die jeweiligen Proteine rekombinant in *E.coli* exprimiert und wie unter 2.9.1, 2.9.2 (siehe auch 3.1.1) beschrieben augereinigt. Schließlich wurden die verschiedenen Mutanten des hLa-Proteins durch SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und durch einen Western Blot mit immunbiologischem Nachweis analysiert. Für letzteren Versuch wurden verschiedene

monoklonale Antikörper gewählt, welche unterschiedliche Epitope im hLa erkennen (siehe 2.8.6). Daraus ergibt sich, dass einige der Mutationen des hLa nur mit bestimmten Antikörpern nachgewiesen werden können, weil ihnen für bestimmte andere Antikörper aufgrund einer Mutation das Epitop fehlt.

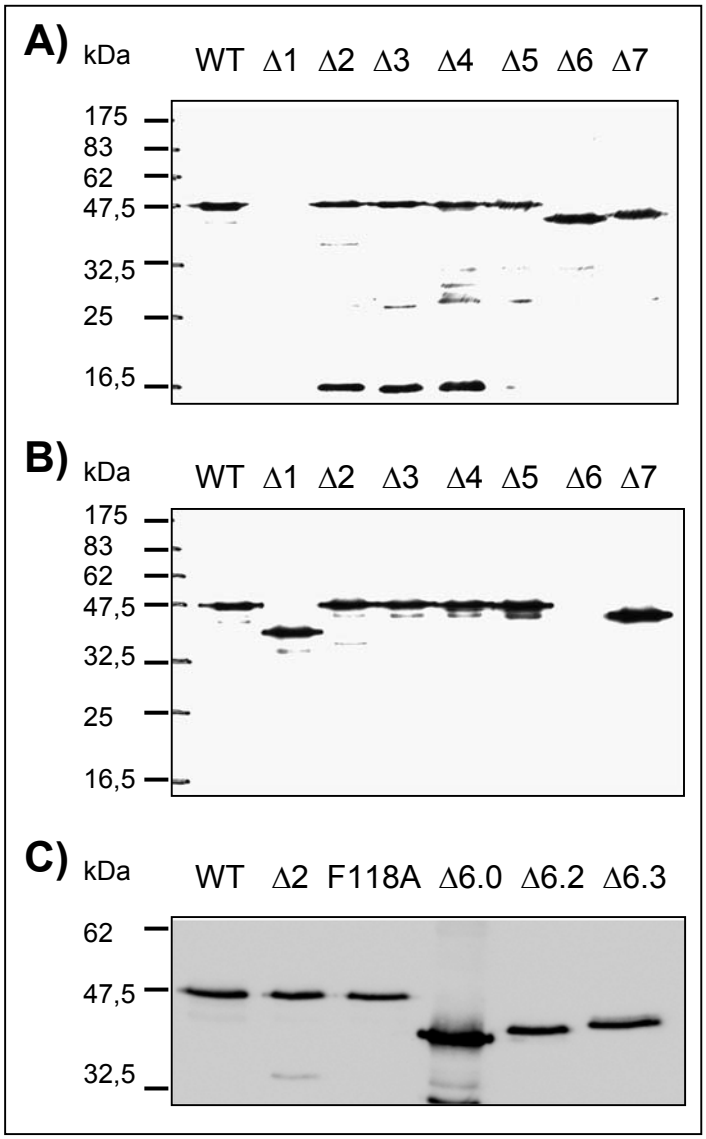


Abbildung 3.2.-2:

Analyse verschiedener Mutanten des humanen La-Proteins mittels Western Blot. Die mutierten, rekombinanten und mittels Ni-NTA-Säulen aufgereinigten La Proteine wurden mit je 200 ng in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die oberhalb der jeweiligen Gele angegebenen Bezeichnungen entsprechen den beschriebenen Mutationen (siehe Text). Linksseitig angegeben ist das Molekulargewicht (kDa). Der Nachweis erfolgte mit den primären monoklonalen Maus-α-hLa Antikörpern 3B9 **(A+C)** sowie 4B6 **(B)** und sekundären HRPO-gekoppelten Ziege-α-Maus Antikörpern, gefolgt von einer Chemilumineszenz-Entwicklung und Exposition eines Röntgenfilms. hLa-Δ6.0, -Δ6.2 und -Δ6.3 werden durch den Antikörper 4B6 nicht erkannt, weil den Proteinen aufgrund der Deletion das Epitop fehlt; dieses gilt ebenso für hLa-Δ1 und den Antikörper 3B9.

Der in Abbildung 3.2-2 dargestellte immunbiologische Nachweis der rekombinanten hLa Mutanten zeigt die Identifizierung aller Proteine durch α-hLa spezifische, monoklonale Antikörper. Die im Vergleich zum Wildtyp veränderte Masse der Proteine ergibt sich aus den in dieser Deletion fehlenden Aminosäuren. Insbesondere bei Mutationen der RRMs -2 und -3 (hLa-Δ2, -Δ3, -Δ4, -Δ5) sind vermehrt Degradationen oder verfrühte Tranlsationsabbrüche aufgetreten, da in diesen Präparationen stets N-terminale Fragmente der Proteine nachweisbar waren. Dieses geht aus Abbildung 3.2-2 hervor, welche Fragmente dieser Proteine mit N-terminal bindenden Antikörpern nachweist, nicht aber mit C-terminal bindenden Antikörpern (vergleiche hLa-Δ2,- Δ3, -Δ4, -Δ5 in Abb. 3.2-2A und B).

Neben der Identifizierung der hLa-Mutanten durch hLa spezifische monoklonale Antikörper wurde ebenso eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung durchgeführt, welche das Ausmaß an eventuellen Kontaminationen nach Ni-NTA-Aufreinigung anzeigt. Diese Ergebnisse werden hier nicht aufgeführt, und entsprechen den für das Wildtyp-Protein dargestellten im Teil 3.1.1. Auffällig war jedoch, dass Mutationen im RRM2 oder RRM3 mit einer generell geringeren Expression des Proteins in prokaryotischen Kulturen einhergehen. Wie später beschrieben, wurden die entsprechenden Mutanten cDNAs z.T. in eukaryotische Expressionsvektoren umkloniert. Es zeigte sich in diesen Fällen, dass eine Deletion der RRMs -2 und –3 auch in eukaryotischen Zellen mit einer niedrigen Expression des Proteins einherging.

3.3 Analytische Gelfiltrations-Chromatographie

Im Gegensatz zur präparativen Gelfiltration, welche wie oben beschrieben für die Reinigung des humanen La Proteins benutzt wurde, wurde durch Untersuchungen mit der analytischen Gelfiltrationssäule insbesondere die Multimerisierung des Proteins oder seiner Mutanten dargestellt. In der bisher publizierten Literatur sind nur wenige Daten zu finden, welche sich mit der Multimerisierung des Proteins beschäftigen. Hauptsächlich stammen diese Beschreibungen aus der Arbeit von Craig et al. (44), welche die Region zur Dimerisierung durch N- und C-terminale Verkürzungen des Proteins auf die Aminosäuren 293 – 348 eingeschränkt hat. In jener Arbeit wird zudem beschrieben, dass das La Protein nur dann eine positive Wirkung auf die Initiation der Translation von Poliovirus RNA und eine das HIV-TAR Element enthaltende mRNA *in vitro* ausübt, wenn es die Dimerisierungs-Domäne enthält. Weitere Daten, welche auf die Existenz einer Multimerisierungsdomäne hindeuten, stammen aus nativen RNA-Bindungsstudien. Dabei zeigte sich, dass nach Zugabe von steigenden Konzentrationen La Protein zu konstanten Mengen RNA multimere RNA-Protein-Komplexe erschienen, welche offensichtlich unspezifisch und Konzentrations-abhängig sein könnten (57, 120).

Die genaue Bestimmung der Multimerisierungsdomäne ist jedoch unstimmig, da in den Arbeiten von Ohndorf et al. (150) Multimere in RNA-Bindungsassays bereits mit Mutanten erscheinen, welche nur die Aminosäuren 11 – 300 enthalten. Dieser Mutant schließt lediglich 7 Aminosäuren der von Craig et al. (44) beschriebenen Domäne ein und es ist unwahrscheinlich, dass ein derart kurzes Element (die überlappenden Reste 293 – 300) die Multimerisierung vermittelt.

Aufgrund dieser Diskrepanzen und der Tatsache, dass in dieser Studie interne Deletionen und keine N- oder C-terminale Verkürzungen (wie in o.g. Arbeiten) benutzt wurden, erfolgte die Multimerisierung der synthetisierten Mutanten durch analytische Gelfiltrations-

Chromatographie. Zu diesem Zweck wurde eine Superdex S200HR-ag Säule benutzt, welche zunächst wie oben für die präparative Säule beschrieben geeicht wurde (siehe 3.1.1 und 2.9.5).

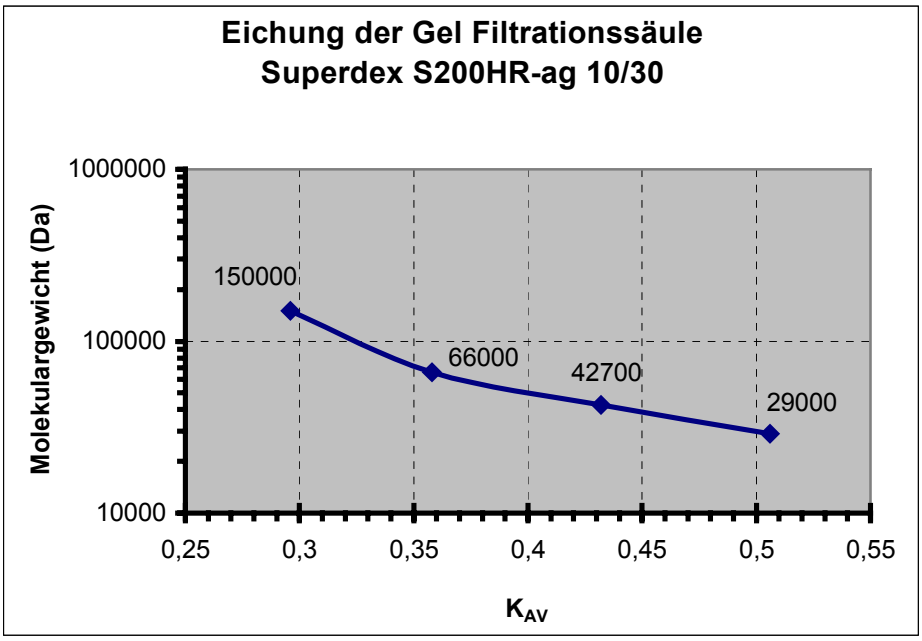


Abbildung 3.3-1: Eichung der analytischen Gelfiltrationssäule. Es wurden die im Text angegebenen Eichproteine auf die Säule aufgetragen, die Elutionsvolumina bestimmt und der Elutionskoeffizient K_{AV} berechnet. Das Leervolumen V_0 betrug 7,8 ml, das Bettvolumen V_t betrug 24,0 ml. Die Elutionsvolumina waren: Alkohol Dehydrogenase 12,6 ml (K_{AV} = 0,296), Albumin 13,6 ml (K_{AV} = 0,358), Ovalbumin 14,8 ml (K_{AV} = 0,432), Kohlenstoff-Anhydrase 16,0 ml (K_{AV} = 0,506). Anhand dieser Werte wurde die Eichgerade erstellt, wobei der K_{AV} auf der X-Achse und die Masse (logarithmisch, in Da) auf der Y-Achse aufgetragen sind. Die Positionen der Eichproteine sind anhand ihrer Masse (in Da) oberhalb der Geraden angegeben.

Durch die Eichung der Säule wurde gewährleistet, dass das hLa Protein sowohl in monomerer-, als auch in di- oder trimerer Konformation innerhalb des linearen und geeichten Bereichs der Säule eluieren wird und der Elutionskoeffizient K_{AV} des jeweiligen Peaks berechnet werden kann. Dem Puffer (Puffer A, siehe 2.6) wurde für die analytische Gelfiltration 10 mM EDTA zugesetzt, um eine unspezifische Kation-vermittelte Oligomerisierung des Proteins über die Histidin-Markierung zu unterbinden. Dieses führte dazu, dass es Unterschiede in dem Elutionsverhalten des Proteins gab. So eluierte das Wildtyp Protein ohne den EDTA Zusatz als ein trimeres Molekül mit einem Elutionsvolumen V_e = 12,6 ml, was einem K_{AV} von 0,296 und einer Masse von 150 kDa entspricht (siehe auch Abb. 3.1.1-3A). Demgegenüber wurden nach Zusatz von 10 mM EDTA zwei Peaks detektiert mit einem Elutionsvolumen von V_e = 13,0 und 14,6 ml, was einem K_{AV} von 0,321 bzw. 0,419 entsprach (Abb. 3.3-2). Die aus der Eichgeraden (Abb. 3.3-1) abgeleiteten Massen ergaben 100 kDa bzw. 45 kDa und deuten auf das Dimer und Monomer des hLa hin. Das Protein eluierte dabei größtenteils als Dimer und nur zu einem sehr geringen Anteil als Monomer. Die Identität des hLa Proteins in diesen Peaks wurde durch einen Western Blot mit Antikörper-Nachweis der entsprechenden Fraktionen bestätigt (nicht gezeigt). Dieses impliziert, dass der Aufbau von Trimeren im Gegensatz zu Dimeren zweiwertige Ionen

benötigt. Da jedoch an dieser Stelle nicht zu differenzieren ist, ob dieses unspezifisch durch die HIS-Markierung ausgeführt wird oder eine spezifische Funktion einer Region des hLa darstellt, wurden weitere Mutanten des hLa analysiert. Dazu zählt die Chromatographie der Mutation hLa-Δ1, in welcher die Aminosäuren 11 – 99 deletiert sind. Die Auftrennung im Puffer A ohne Zusatz an EDTA ergab, dass dieses Protein bei einem Elutionsvolumen von V_e = 13,3 ml eluierte, was einem K_{AV} von 0,339 und einer Masse von 80 – 85 kDa entspricht (Abb. 3.3-2). Daraus ergibt sich eine dimere Konformation dieses Proteins. Die Masse von ~80 kDa für ein dimeres hLa-Δ1 entspricht folgerichtig der doppelten Masse eines monomeren hLa-Δ1, welches in einer SDS-PAGE mit einem Molekulargewicht von ~40 kDa läuft (siehe Abb. 3.2-2B). Eine analytische Gelfiltration dieses Proteins in einem Puffer mit zugesetztem EDTA wurde nicht durchgeführt. Da diese Mutation die potentielle Multimerisierungsdomäne (aa 298 – 348) enthält bildet das Protein Dimere aus. Aufgrund der Tatsache, dass hLa-WT in Puffer A ohne Zusatz von EDTA als trimeres und hLa-Δ1 als dimeres Molekül eluiert ist belegt, dass die für die *in vitro* Trimerisierung notwendige Domäne zwischen den Aminosäuren 11 und 99 liegt und zweiwertige Ionen benötigt. Eine Kation-vermittelte unspezifische Multimerisierung durch die Histidin-Markierung kann folglich ausgeschlossen werden.

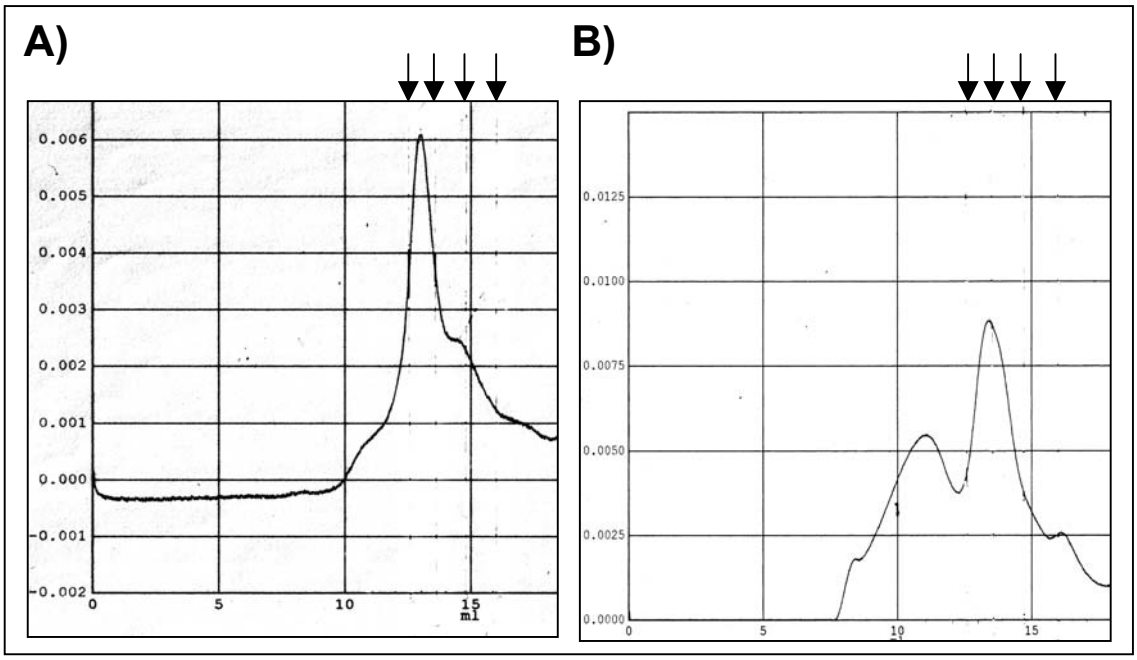


Abbildung 3.1.3-1: Das Motiv zur Ausbildung von trimeren hLa Molekülen befindet sich zwischen den Aminosäuren 11 und 99 und benötigt zweiwertige Ionen. Analytische Gelfiltration mit 50 µg hLa-WT in Puffer A mit 10 mM EDTA **(A)** und 50 µg hLa-Δ1 in Puffer A ohne zugesetztes EDTA **(B)** gemäß dem unter 2.9.5 aufgeführten Protokoll. Die Graphik zeigt jeweils die Aufzeichnung der OD_{280} (Y-Achse) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen in ml (X-Achse). Die Positionen der Eichproteine (siehe Abb. 3.3-1) sind oberhalb mit Pfeilen angedeutet: 150 kDa, 66 kDa, 42,7 kDa, 29 kDa (v.l.n.r.). Die Elutionsvolumina V_e, Elutionskoeffizienten K_{AV} und die zugeordneten Massen sind im Text beschrieben. Dieses zeigt ein dimeres hLa-WT bei Zugabe von EDTA und ein dimeres hLa-Δ1 ohne zugesetztes EDTA.

Abbildung 3.3-2 zeigt die Elutionsprofile von hLa-WT und hLa-Δ1 in der analytischen Gelfiltration. Dabei fällt auf, dass in variierender Intensität jeweils vor der Position des ersten Eichproteins und mit einem Elutionsvolumen von V_e = 7 – 12 ml eindeutige Peaks detektierbar sind. Dabei handelt es sich um die oben beschriebenen Multiproteinkomplexe, die hier nicht weiter analysiert wurden (siehe auch Abb. 3.1.1-3).

Da durch die internen Deletionen hLa-Δ6.0 (aa 274-354), hLa-Δ6.2 (aa 291-354) und hLa-Δ6.3 (aa 323-354) die potentielle Multimerisierungsdomäne (aa 298 – 348) ganz oder in Teilen deletiert wurde, wurden diese rekombinanten Proteine nach Ni-NTA-Aufreinigung im Hinblick auf ihre Multimerisierung analysiert. Wie aus Abbildung 3.3-3 hervorgeht eluiert hLa-Δ6.0 ausschließlich als monomeres Protein mit einem Elutionsvolumen von 14,3 ml, was einem K_{AV} von 0,401 und gemäß der Eichgeraden einer Masse von 45 - 50 kDa entspricht. Diese Masse liegt etwas oberhalb des mittels SDS-PAGE bestimmten Molekulargewichts von ~40 kDa für hLa-Δ6 (siehe Abb. 3.2-2A+C), jedoch ist keine der beiden Methoden zur exakten Massenbestimmung geeignet. Aus der analytischen Gelfiltration mit hLa-Δ6.0 wird geschlussfolgert, dass die für die Multimerisierung notwendige Domäne in diesem Protein deletiert wurde.

Die Mutanten hLa-Δ6.2 und hLa-Δ6.3 wurden in der analytischen Gelfiltration genauso wie der Wildtyp je nach Versuchsbedingung (= mit oder ohne EDTA im Puffer) als Di- bzw. Trimer nachgewiesen (nicht gezeigt). Dadurch wird die für die Multimerisierung notwendige Domäne auf den Bereich zwischen Aminosäure 274 und 291 eingegrenzt. Dieses steht im Gegensatz zu der von Craig et al. beschriebenen Domäne (aa 298 – 348), aber im Einklang mit den oben beschriebenen Beobachtungen aus den Arbeiten von Ohndorf et al. (44, 150).

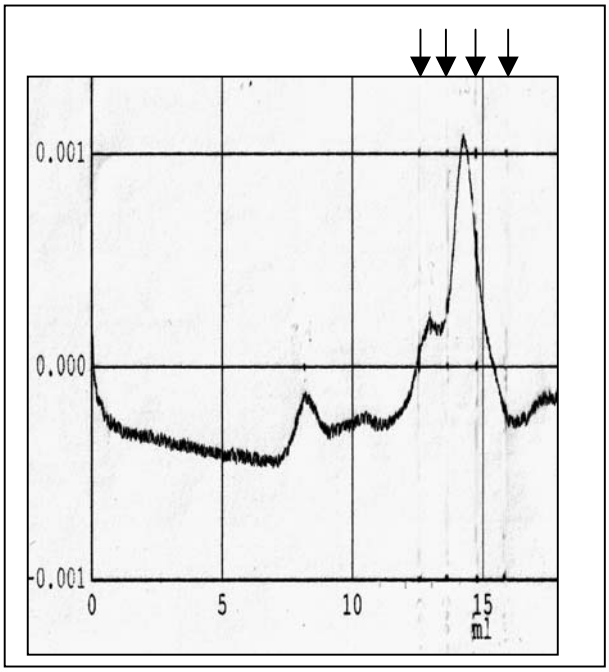


Abbildung 3.3-2:

Die Dimerisierungs-Domäne des hLa befindet sich zwischen den Aminosäuren 274 und 291. Es wurden 50 hLa-Δ6.0 in Puffer A mit 10 mM EDTA auf die Säule geladen und wie unter 2.9.5 eluiert. Die Graphik zeigt jeweils die Aufzeichnung der OD_{280} (Y-Achse) in Abhängigkeit vom Elutionsvolumen in ml (X-Achse). Die Positionen der Eichproteine sind oberhalb mit Pfeilen angedeutet (siehe auch Abb. 3.3-1): 150 kDa, 66 kDa, 42,7 kDa, 29 kDa (v.l.n.r.). Das Elutionsvolumen V_e sowie der Elutionskoeffizienten K_{AV} sind im Text beschrieben und zeigen ein monomeres Protein hLa-Δ6.0.

Abbildung 3.3-3 zeigt die analytische Gelfiltration mit hLa-Δ6.0, in der Multiproteinkomplexe mit einem Elutionsvolumen von V_e = 7 – 12 ml detektiert werden (siehe auch Abb. 3.3-2 und 3.1.1-3). Das Protein hLa-Δ6.0 war in einem immunbiologischen Nachweis nur in jenen Fraktionen und Peaks nachweisbar, welche der monomeren Masse des Proteins entsprechen (nicht gezeigt).

Nachdem somit die Multimerisierungsdomäne bestimmt wurde, folgte die Prüfung, ob die Multimerisierung von hLa durch eine Phosphorylierung des Proteins moduliert wird. Zu diesem Zweck wurde (de-) phosphoryliertes hLa-WT (siehe 3.1.3) in einzelnen Läufen in der analytischen Gelfiltration überprüft (nicht gezeigt). Dabei ergab sich, dass das Protein *in vitro* unabhängig von der Phosphorylierung als Multimer eluiert, so dass diese Modifikation des Proteins folglich keinen Einfluss auf die Multimerisierung ausübt.

3.4 Interaktion des humanen La Proteins mit HBV RNA-B2

Es wird angenommen, dass das La Protein die Hepatitis B Virus RNA stabilisiert, indem es an eine Haarnadelschleife in der viralen RNA bindet (siehe auch 1.2), welche im folgenden als HBV RNA-B2 bezeichnet wird. Die durch ein Computerprogramm berechnete Struktur befindet sich in allen viralen HBV RNAs und erfüllt daher die Anforderung eines potentiell regulativen Elements. Die Bindung des endogenen Maus La Proteins (mLa) wurde bereits intensiv studiert (85, 87) und sollte nun mit Studien des humanen La Proteins ergänzt werden. Hierzu sollte zunächst gezeigt werden, ob das hLa-WT Protein an HBV RNA-B2 bindet und, ob dies mit den Charakteristika der mLa / HBV RNA Bindung vergleichbar ist. Die Kartierung der für die Bindung an HBV RNA-B2 essentiellen Aminosäuren ist dabei von herausragender Bedeutung, da derartige Informationen die Grundlage für neuartige antivirale Therapien bilden könnten. Zu diesem Zweck wurden die hergestellten Mutanten des hLa Proteins in RNA Bindungs-Experimenten mit hLa-WT verglichen.

Um die Funktion des humanen La Proteins im Zusammenhang mit dem viralen RNA Metabolismus besser verstehen zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit die Wechselwirkung zwischen dem Protein und der RNA detailliert untersucht. Dazu wurden die optimalen Bindungsbedingungen für das rekombinante hLa mit einer *in vitro* transkribierten, radioaktiv markierten HBV RNA-B2 in nativen EMSAs (siehe 2.11.9) bestimmt. Anschließend wurde bestimmt, welchen Einfluss die Phosphorylierung des Proteins auf die Wechselwirkung mit der RNA hat. Nachdem die Dissoziationskonstante durch Sättigungskinetiken sowie die Spezifität der Bindung durch Kompetitionsanalysen bestimmt waren, erfolgten Bindungsstudien mit den beschriebenen Mutanten des Proteins. In diesen Versuchen wird gezeigt, welche Domänen des hLa essentiell oder beitragend für die Interaktion mit HBV RNA-B2 sind.

3.4.1 Allgemeine Charakterisierung der hLa HBV RNA-B2 Interaktion

In oben genannten Daten zur Charakterisierung der mLa HBV RNA Wechselwirkung wurde eine UV-Quervernetzungs-Methode gewählt. Es war daher zu Beginn dieser Arbeit unklar, ob rekombinantes hLa *in vitro* an die HBV RNA-B2 in einem nativen EMSA bindet und welche Komplexe sich dabei unter Umständen bilden. Bevor die sich anschließenden Versuche zur Affinität, Spezifität oder Domänen-vermittelten Analyse durchgeführt werden konnten, mussten daher zunächst einige Charakteristika der hLa HBV RNA-B2 Interaktion bestimmt werden, um optimale Bindungsbedingungen zu etablieren.

In einem ersten Versuch wurde daher das rekombinante hLa Protein mit einer *in vitro* transkribierten, radioaktiv markierten HBV RNA-B2 im nativen EMSA analysiert. Zusätzlich wurde in diesem Versuch ein *Supershift* (siehe Abb. 3.4.1-1 und 2.11.9) durchgeführt, welcher bestimmt, ob die sich bildenden RNA-Protein-Komplexe durch das hLa Protein vermittelt werden. Dieser Versuch dient primär der Differenzierung zwischen spezifischer Komplexbildung durch das gereinigte Protein oder unspezifischer Komplexbildung durch restliche Kontaminationen.

Als Standardpuffer für die Bindungsreaktion wurde die im Methodenteil unter 2.11.9 beschriebene Zusammensetzung gewählt. Sofern nicht anders angegeben besteht diese aus 10 mM Tris/HCl pH 7,4, 100 mM NaCl, 3 mM $MgCl_2$, 0,5 mM EDTA, 0,5% NP-40 sowie 200 ng Ni-NTA gereinigtes Protein und 200000 CPM radioaktiver RNA. Unten aufgeführte Ergebnisse zeigen an, wie die optimale Zusammensetzung des Bindungspuffers ermittelt wurde.

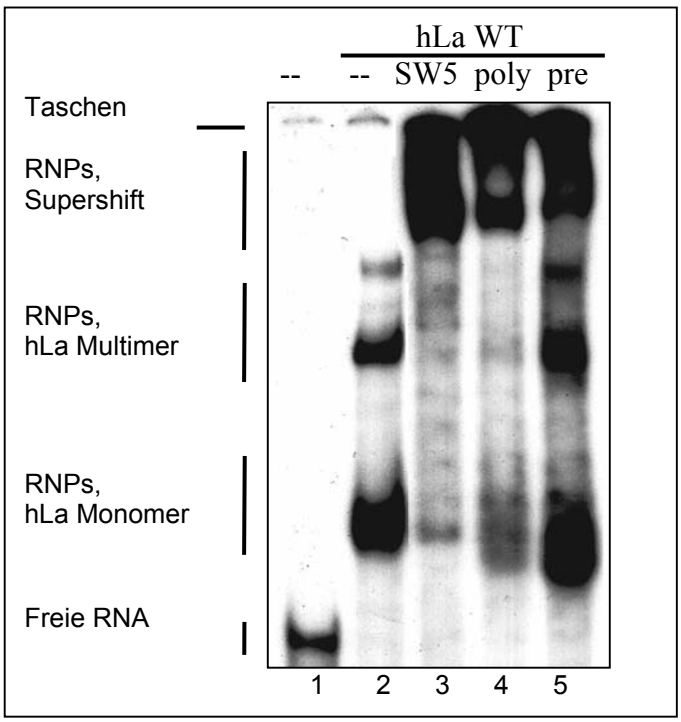


Abbildung 3.4.1-1: Rekombinantes hLa WT Protein bildet distinkte Komplexe mit HBV RNA-B2. 200 ng Ni-NTA gereinigtes hLa-WT wurden ohne (*Spur 2*) oder mit monoklonalem α-hLa Antikörper 3B9 (*Spur 3*), polyklonalem α-hLa Antikörper 1982 (*Spur 4*) oder Präimmunserum des polyklonalen Antikörpers (*Spur 5*) mit 20 U RNasin 1 h bei 4° C in 10 mM Tris-HCl pH 7,4 vorinkubiert, bevor die restlichen Bestandteile des Standardreaktionsansatzes sowie die ^{32}P-markierte HBV RNA-B2 zugegeben und im Polyacrylamidgel aufgetrennt wurden. RNA ohne Protein in *Spur 1*. Positionen der freien RNA sowie der jeweiligen RNPs und der Taschen sind linksseitig angegeben.

Wie aus Abbildung 3.4.1-1 zur Interaktion zwischen hLa-WT und HBV RNA-B2 hervorgeht, bildet das Protein mehrere Komplexe mit der RNA aus (vergleiche *Spur 1* und *2*). Dabei besteht jener mit der höchsten Mobilität aus monomeren hLa-WT, wohingegen jener mit verlangsamter Mobilität aus multimeren (vermutlich dimeren) hLa-WT / RNA Komplexen besteht. Der monomere Komplex ist dabei stets der dominierende in seiner Intensität, während multimere RNPs einer gewissen Varianz unterworfen sind. An späterer Stelle wird genauer beschrieben, welche Ergebnisse die Differenzierung zwischen monomeren und multimeren Komplexen erlauben (siehe 3.4.5). Bei einer Vorinkubation des Proteins mit spezifischen Antikörpern (*Spuren 3* und *4* in Abb. 3.4.1-1) konnten sich Antikörper-Protein Komplexe ausbilden, welche die Bindung der RNA durch das Protein nicht beeinflussten, aber die Masse dieses gesamten Komplexes sehr stark erhöhten. Folglich wurde dieser Komplex kaum im elektrischen Feld aufgetrennt. Eine Inkubation mit dem Präimmunserum des polyklonalen Antikörpers (*Spur* 5 in Abb. 3.4.1-1) hat keinen Einfluss auf die Komplexe zwischen hLa-WT und der HBV RNA-B2, da in dieser Kontrollreaktion keine hLa-WT spezifischen Antikörper enthalten sind. Dieses Experiment zeigt, dass die im EMSA sichtbare Bindung der HBV RNA-B2 durch das hLa-WT Protein aufgebaut wird und nicht durch kontaminierende Rückstände aus der Proteinreinigung.

Zu den nachfolgenden Analysen zählte die Optimierung der Pufferbedingung in der Bindungsreaktion, welche einen entscheidenden Einfluss auf die Wechselwirkung ausüben kann. Da zweiwertige Ionen wie $MgCl_2$ die Struktur von RNAs beeinflussen (209) und da EDTA im Gegenzug zweiwertige Ionen komplexiert, wurde in diesen Versuchen der Einfluss von $MgCl_2$ und EDTA analysiert. Zudem wurde durch steigende Zugabe an NaCl überprüft, bis zu welcher Salzkonzentration eine stabile Interaktion aufrechterhalten wird, was einen Hinweis auf die Art der Wechselwirkung geben kann. Ebenso wurde der Einfluss von variierenden Konzentrationen an dem reduzierenden Agens Dithiothreitol (DTT) untersucht, da dieses Reagenz die Ausbildung von Disulfidbrücken beeinträchtigt. Des weiteren wurden der Einfluss des pH Wertes und der Temperatur während der Inkubationszeit bestimmt.

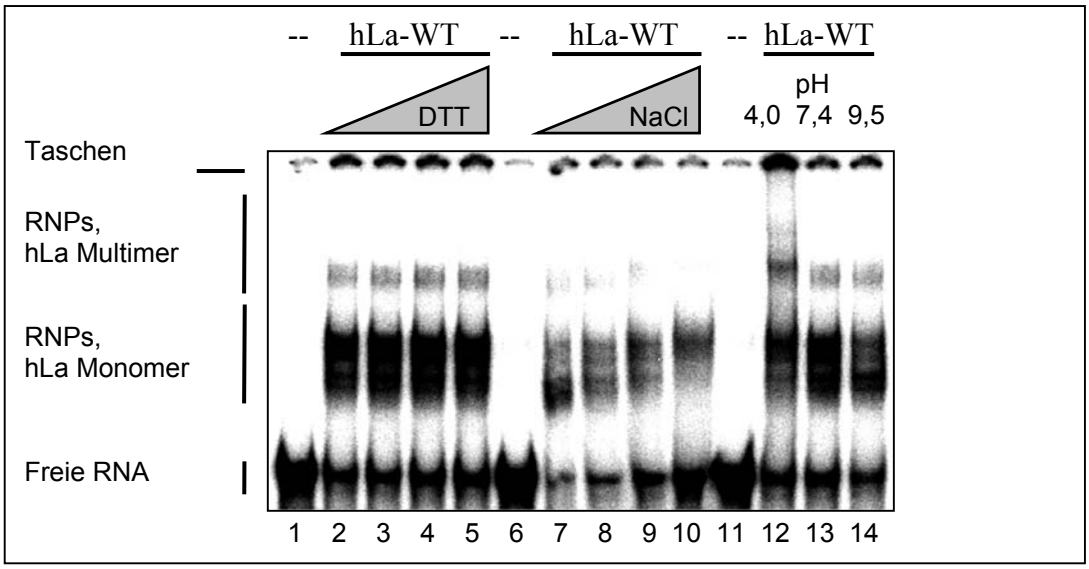


Abbildung 3.4.1-1: Charakterisierung der hLa-WT HBV RNA-B2 Wechselwirkung. 200 ng Ni-NTA gereinigtes, rekombinantes hLa-WT Protein wurden unter Standardbedingungen aber mit variierenden Konzentrationen an DTT (0, 1, 5, 10 mM in *Spuren 2-5*), NaCl (0, 250, 500, 1000 mM in *Spuren 7-10*) sowie bei verschiedenen pH Werten (4,0, 7,4, 9,5 in *Spuren 12-14*) mit je 5 fmol ^{32}P-markierte HBV RNA-B2 inkubiert und elektrophoretisch aufgetrennt. Reaktionen ohne Protein in *Spuren 1, 6* und *11*. Die Reaktionen in *Spur 2* und *13* entsprechen den Standardbedingungen. Positionen der freien RNA sowie der jeweiligen RNPs und der Taschen sind linksseitig angegeben.

Wie aus Abbildung 3.4.1-2 hervorgeht, hat die Zugabe von bis zu 1 M NaCl zur Bindungsreaktion einen nur geringen Einfluss auf die Wechselwirkung zwischen hLa und HBV RNA-B2. Dabei ist eine geringe Abschwächung der monomeren RNA-Protein-Komplexe zu beobachten, wie auch eine leichte Veränderung der Mobilität (vergleiche Abb. 3.4.1-2, *Spur 7 – 10*). Letzteres ist möglicherweise durch die hohe Salzkonzentration in diesen Proben verursacht, welche die Auftrennung von RNA-Protein-Komplexen im Gel beeinflusst. Dieses Ergebnis für den Einfluss von NaCl ist vergleichbar zur methodisch anders bestimmten Interaktion zwischen mLa und der HBV RNA (85) und deutet darauf hin, dass nicht-elektrostatische Wechselwirkungen zu dieser Bindung beitragen.

Die Zugabe des reduzierenden Agens DTT bewirkte keine Änderung der monomeren RNA-Protein-Komplexe (vergleiche Abb. 3.4.1-2, *Spur 2 – 5*). Daher ist davon auszugehen, dass Disulfidbrücken im hLa nicht an einer eventuell notwendigen Ausbildung von hLa-Multimeren oder von RNA-Protein-Komplexen beteiligt sind. Eine Änderung des pH Wertes hatte eine leichte Abweichung in den monomeren RNA-Protein Komplexen zur Folge, da bei pH 4,0 und 9,5 die intensive Bildung der monomeren Komplexe gegenüber pH 7,4 leicht eingeschränkt war (siehe Abb. 3.4.1-2, *Spur 12 – 14*).

Da die Interaktion zwischen Proteinen und RNA von $MgCl_2$ und EDTA moduliert werden kann (88, 209) wurde der Einfluss dieser Substanzen auf die hier untersuchte Bindung getestet.

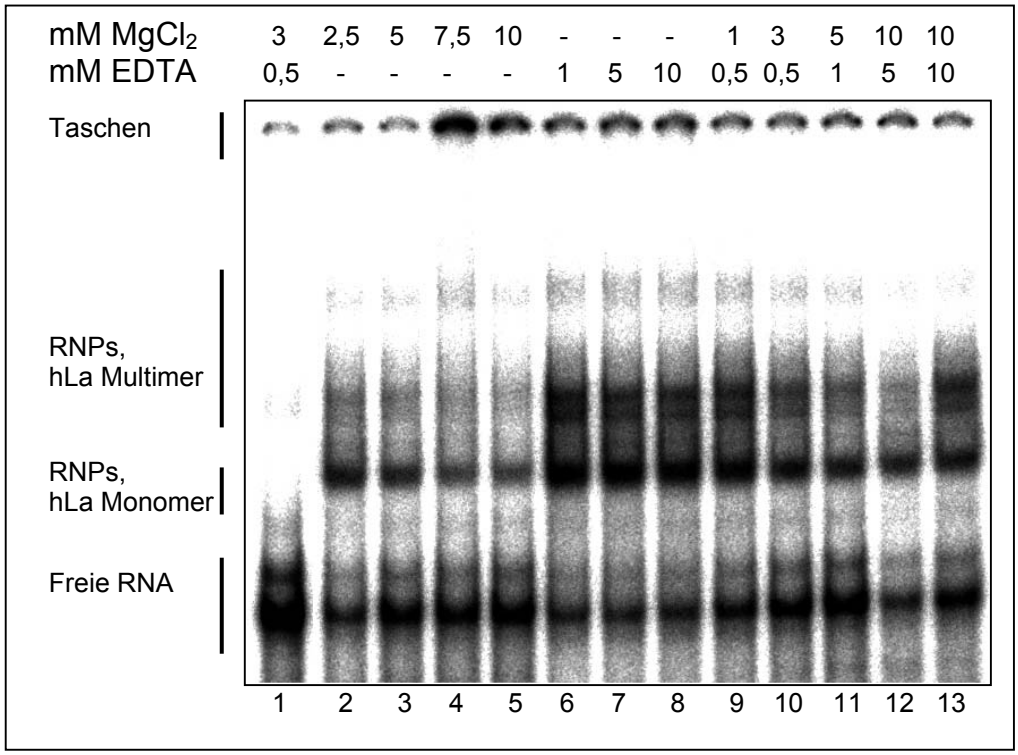


Abbildung 3.4.1-2: Bestimmung des Einflusses von $MgCl_2$ und EDTA auf die Bindung von hLa-WT an HBV RNA-B2 im nativen EMSA. Je 200 ng Ni-NTA gereinigtes, rekombinantes hLa-WT wurden unter Standardbedingungen aber mit variierenden Konzentrationen an $MgCl_2$ oder EDTA wie oberhalb angegeben mit 200000 CPM ^{32}P-markierter HBV RNA-B2 inkubiert und im nativen EMSA elektrophoretisch aufgetrennt. Reaktion ohne Protein auf *Spur 1*. Die Reaktion in *Spur 10* entspricht den Standardbedingungen. Positionen der freien RNA sowie der RNPs und der Taschen sind linksseitig angegeben.

Wie aus Abbildung 3.4.1-3, *Spuren 2 – 5* ersichtlich ist, hat $MgCl_2$ einen geringen, Konzentrations-abhängigen Einfluss auf die Bindung von hLa an HBV RNA-B2, da mit steigenden Mengen $MgCl_2$ eine leichte Reduktion der Bindung sichtbar ist. Die Bindung von mLa an HBV RNA wurde in anderen Experimenten durch $MgCl_2$ nicht beeinträchtigt (85). Demgegenüber hatte die Zugabe von EDTA bereits bei geringen Konzentrationen einen intensiv verstärkenden Effekt auf die Bindung zwischen hLa und HBV RNA-B2 (vergleiche *Spur 6 – 8* mit *2 – 5* in Abb. 3.4.1-3). Durch die Kombination der Agenzien wurden keine anderen Ergebnisse als eben beschriebene Beobachtungen erzielt (siehe Abb. 3.4.1-3, *Spuren 9 – 13*).
Temperatur (4° C, RT, 37° C) und Zeit (5 – 60 min) der Bindungsreaktion waren ohne Einfluss auf die Bildung der RNA-Protein Komplexe (nicht gezeigt). Zusammenfassend wurden daher die Standardbedingungen wie unter 2.11.9 angegeben festgelegt.
Zudem wurde sichergestellt, dass das Verhältnis zwischen RNA und Protein in einem für die Bindung optimalen Bereich ist (siehe dazu auch 3.4.2). Ferner ist gewährleistet, dass die zugegebene Menge an Radioaktivität eine Signalintensität erzeugt, welche im linearen Detektionsbereich des Phosphorimagers liegt und quantitative Auswertungen zulässt.

3.4.2 Humanes La Protein bindet hochaffin an HBV RNA-B2

Das humane La Protein nimmt die postulierte Rolle eines stabilisierenden Faktors der HBV RNA ein, was eine Spezifität dieser Bindung impliziert. Daher wird angenommen, dass diese Wechselwirkung einer Sättigungskinetik folgt und eine hohe Affinität aufweist, da vollkommen unspezifische Bindungen nicht sättigbar sind und andererseits eine hohe Spezifität oft mit hoher Affinität einhergeht. Dieser Sachverhalt wird nachfolgend durch eine Sättigungskinetik analysiert, in der steigende Konzentrationen an radioaktiv markierter RNA mit konstanten Konzentrationen an Protein inkubiert werden. Demzufolge sollte sich dabei eine Sättigung der Bindung einstellen, wobei der halbmaximale Wert der Sättigung die Dissoziationskonstante K_D bestimmt. Diese erfasst quantitativ die Affinität zwischen Ligand und Bindungsstelle. Zu diesem Zweck wurde das hLa Protein in Vorversuchen mit verschiedenen HBV RNA-B2 Konzentrationen inkubiert, um den ungefähren Bereich der Sättigung einzugrenzen (nicht gezeigt). Anschließend wurde für den eingeengten Bereich die Kinetik in kleinen Konzentrationsstufen im EMSA durchgeführt und mittels Phosphorimager quantitativ

ausgewertet. Für diese Versuchsreihe war eine genaue Bestimmung der Proteinkonzentration notwendig. Dazu wurde eine mittels Ni-NTA und präparativer Gelfiltration gereinigte hLa-WT Präparation benutzt, welche frei von nachweisbaren Kontaminationen war (siehe 3.1.1) und somit eine exakte Bestimmung der Proteinmenge erlaubte. Die Quantifizierung der *in vitro* transkribierten HBV RNA-B2 erfolgte über die Berechnung der Radioaktivität der RNA (siehe 2.11.3).

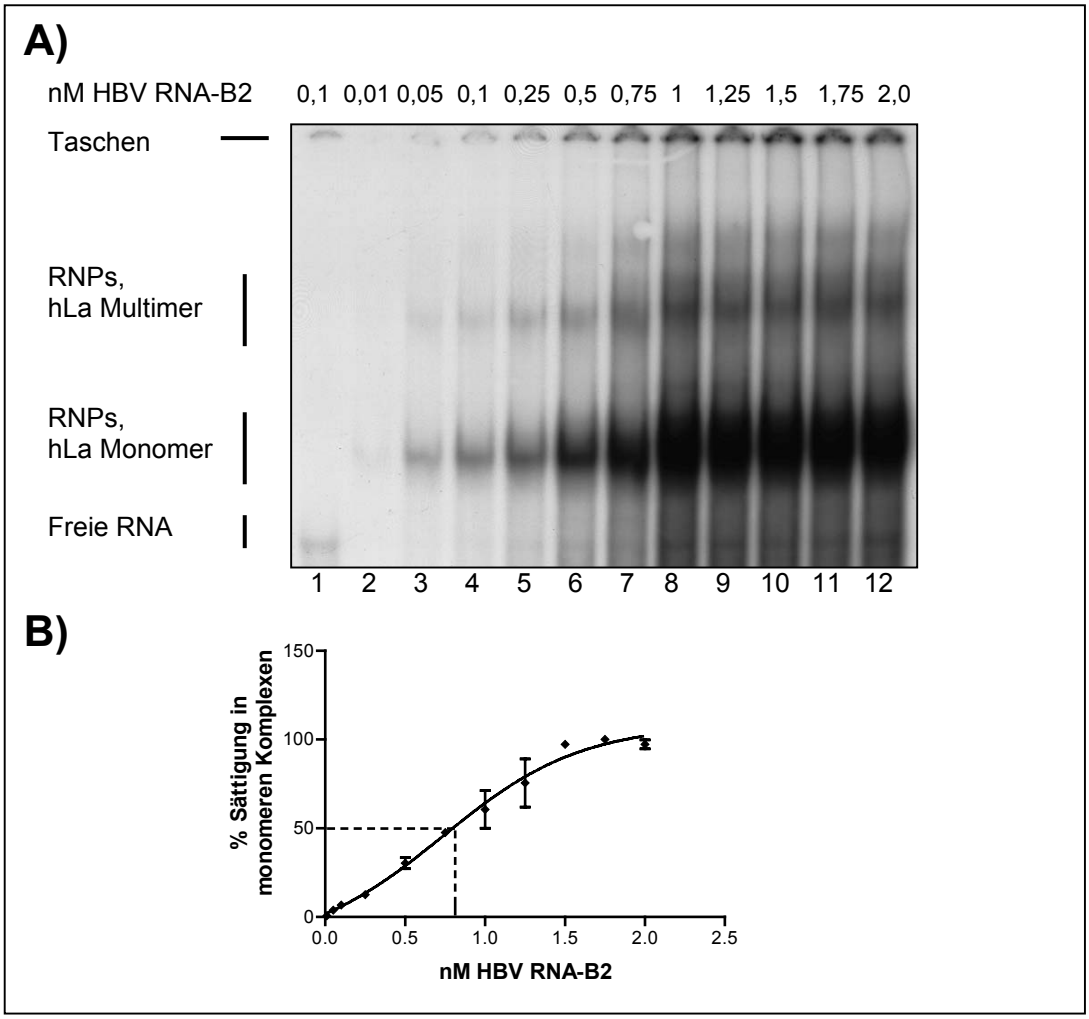


Abbildung 3.4.2-1 Sättigungskinetik zur Bestimmung der Affinität der hLa-WT HBV RNA-B2 Interaktion im nativen EMSA. (A) Es wurden je 100 ng Ni-NTA und Gelfiltration gereinigtes hLa-WT in die Reaktionen eingesetzt (*Spur 2-12*). Die Inkubation mit den oberhalb des Gels angegebenen steigenden Konzentrationen an HBV RNA-B2 erfolgte nach Standardbedingungen. Reaktion ohne Protein in *Spur 1*. **(B)** Quantitative Auswertung der Sättigungskinetiken, wobei die prozentuale Sättigung gegen die molare HBV RNA-B2 Konzentration aufgetragen ist. Es wurden jeweils die in monomeren Komplexen detektierbaren Signale gemessen und nach Abzug der Hintergrundintensität in relative Werte umgeformt. Die Daten wurden einer nicht-linearen Regression unterworfen und repräsentieren die Mittelwerte aus 5 unabhängigen Experimenten.

Wie aus Abbildung 3.4.2-1A ersichtlich ist, unterliegt die Bindung zwischen hLa-WT und der HBV RNA-B2 einer Sättigungskinetik. Dabei wird deutlich, dass die Sättigung der monomeren Komplexe bei einer Konzentration von höchstens 1,5 nM erreicht wird (Abb. 3.4.2-1A, *Spur 10*). Zudem ist eine Konzentrations-abhängige Bildung und Intensivierung der multimeren

RNA-Protein Komplexe offensichtlich, wie es bereits von anderen Gruppen beschrieben wurde (57, 120). Eine Quantifizierung der monomeren Komplexe in 5 unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 3.4.2-1B gezeigt. Daraus geht die Konzentration exakt hervor, bei welcher die Bindung im monomeren Komplex zu 50% gesättigt ist. Dieses wird als Dissoziationskonstante K_D bezeichnet und nimmt wie aus der Quantifizierung ersichtlich einen Wert von $K_D \sim 0{,}8$ nM ein. Schlussfolgernd lässt sich daher feststellen, dass die Bindung zwischen hLa-WT und HBV RNA-B2 hoch-affin ist. Dieses in der Affinität vergleichbar ist zu der mit $K_D \sim 1{,}4$ nM ähnlichen Interaktion zwischen mLa und HBV RNA (87), wobei dieses jedoch in einem anderen experimentellen Ansatz bestimmt wurde. In weiteren Experimenten wurde eine steigende Konzentration an hLa-WT mit konstanten Konzentrationen HBV RNA-B2 inkubiert und wie oben beschrieben ausgewertet (nicht gezeigt). Durch diese Ergebnisse wurde die oben beschriebene Affinität der Bindung bestätigt.

3.4.3 Die Spezifität der Bindung des humanen La Proteins an HBV RNA-B2 in nativen EMSAs

Als ein weiteres Charakteristikum der Wechselwirkung zwischen dem humanen La Protein und der HBV RNA-B2 wurde die Spezifität der Bindung im nativen EMSA analysiert. Zu diesem Zweck wurden konstante und definierte Konzentrationen an Protein und radioaktiv markierter RNA mit steigenden Konzentrationen eines Kompetitors inkubiert. Als Kompetitor können verschiedene Substanzen eingesetzt werden, wie DNA, RNA, Polynukleotide usw. Die Spezifität der Bindung zwischen dem Protein und der eingesetzten RNA ergibt sich aus dem molaren Überschuss des Kompetitors, bei dem die Wechselwirkung reduziert oder aufgehoben wird. Für die Analyse der Spezifität der hLa HBV RNA-B2 Bindung wurden RNAs als Kompetitoren eingesetzt. Dabei handelte es sich einerseits um die Telomerase RNA, Aktin RNA und GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) RNA sowie andererseits um die HBV RNA-B2 selbst. Letztere dient dabei als spezifischer Kompetitor, wohingegen die übrigen als unspezifisch anzusehen sind. Die RNAs der Kompetitoren wurden ebenfalls durch *in vitro* Transkription synthetisiert. Diese Synthese beinhaltete im Gegensatz zu jener für die HBV RNA-B2 keine radioaktive Markierung, und die Quantifizierung erfolgte photometrisch. Die Konzentrationen der Kompetitoren wurden in den Versuchen stufenweise erhöht und lagen bei einem bis zu 1000fachen molaren Überschuss gegenüber der radioaktiv markierten HBV RNA-B2. Die Quantifizierung der jeweiligen Ergebnisse erfolgte durch einen Phosphorimager.
Alternativ kann die Wechselwirkung zwischen dem Protein und einer RNA durch eine Titration bestimmt werden, welche ebenso einen Anhalt über die Spezifität der Bindung gibt. Dazu werden konstante Konzentrationen verschiedener radioaktiv markierter RNAs eingesetzt, mit steigenden Konzentrationen des Proteins inkubiert und anschließend im EMSA analysiert. Bei

einer spezifischen Bindung wird sich diese bereits bei geringeren Proteinkonzentrationen aufbauen, wohingegen bei einer unspezifischen Wechselwirkung hohe Mengen des Proteins für eine effiziente Bindung notwendig sind. In den nachfolgenden Experimenten wurden beide Arten der Bestimmung der Spezifität, nämlich Titration und Kompetition, durchgeführt.

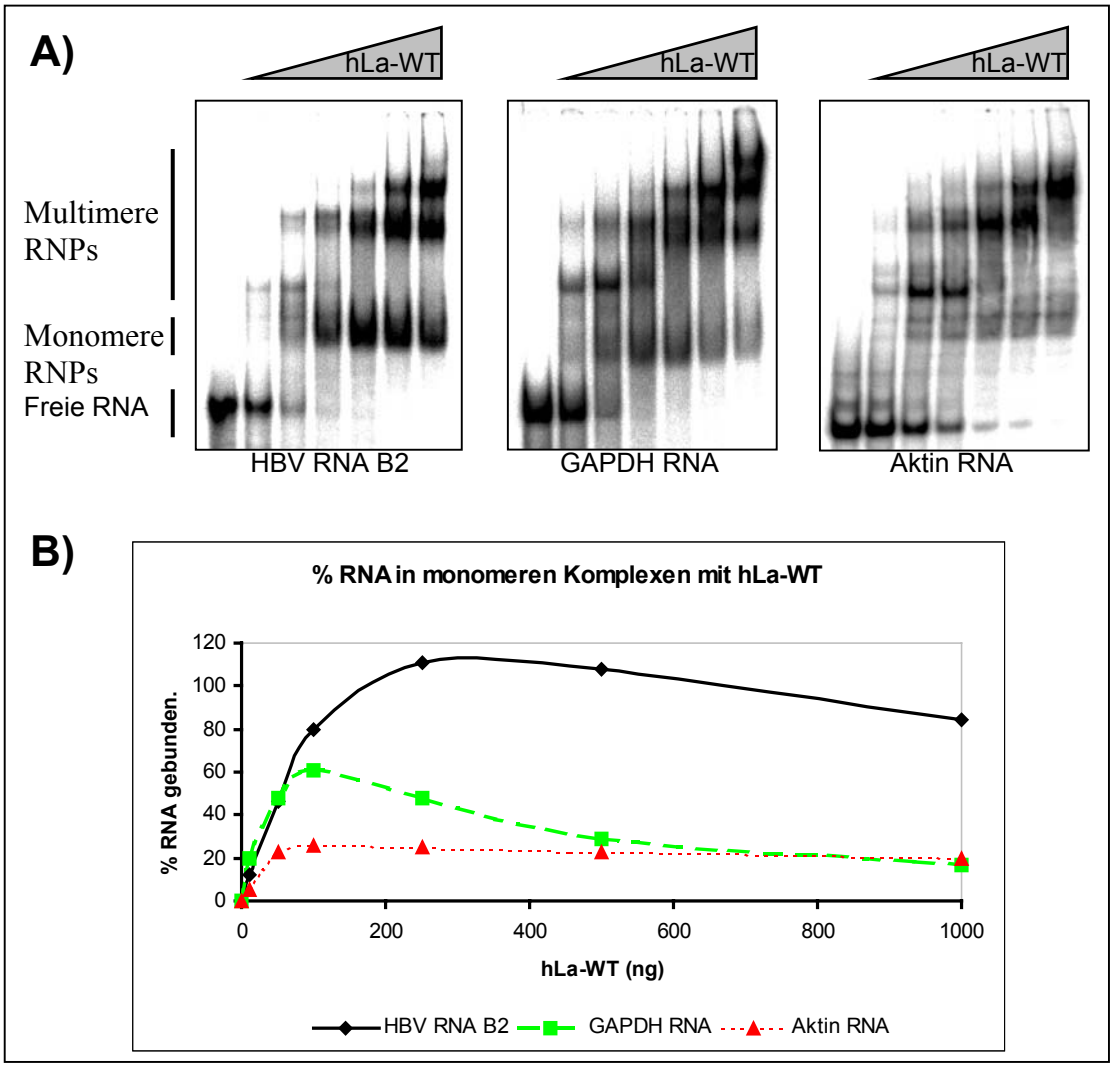


Abbildung 3.4.3-1: Bestimmung der Spezifität der hLa-WT HBV RNA-B2 Bindung durch Titration. (A) Es wurden je 0,5 nM *in vitro* transkribierte, ^{32}P-markierte HBV RNA-B2, GAPDH RNA und Aktin RNA (unterhalb der Gele angegeben) mit steigenden Mengen hLa-WT (0, 10, 50, 100, 250, 500, 1000 ng (Gel Filtrations gereinigt)) inkubiert und im EMSA analysiert. Die quantitative Auswertung dieser Versuche ist in **(B)** gezeigt, wo der in monomeren Komplexen gebundene prozentuale Anteil der RNA gegen die zugegebene Menge hLa-WT aufgetragen ist.

Wie in Abbildung 3.4.3-1A ersichtlich ist, wurden steigende Mengen des hLa-WT Proteins mit konstanten Mengen an HBV RNA-B2, GAPDH RNA und Aktin RNA inkubiert und im nativen EMSA analysiert. Das Protein bindet dabei an alle zugegebenen RNAs und bildet RNA-Protein-Komplexe mit diesen aus. Dabei bilden sich zunächst monomere Komplexe, die bei steigenden Proteinmengen um Multimere ergänzt oder von diesen ersetzt werden. Die Quantifizierung (Abb. 3.4.3-1B) der jeweils in monomeren Komplexen gebundenen RNA zeigt, dass die Bindung an alle drei RNAs mit geringen Proteinmengen (bis ca. 75 ng) in etwa gleich ist. Bei steigenden Proteinmengen wird mehr HBV RNA-B2 gebunden als GAPDH RNA, und

wesentlich mehr als Aktin RNA. Letztere RNA wird bei allen getesteten Mengen des Proteins nur zu einem sehr geringen Teil gebunden. Eine Abnahme der in monomeren Komplexen gebundenen RNAs erklärt sich aus dem Auftreten von multimeren RNPs. Es ist auffällig, dass die monomeren Komplexe mit HBV RNA-B2 noch bei wesentlich höheren Proteinmengen stabil gebildet werden, als es bei GAPDH- und Aktin RNA der Fall ist. Dieses geht eindeutig aus der in Abbildung 3.4.3-1B gezeigten Quantifizierung der monomeren Komplexe hervor. Die Ursache dafür ist bisher unklar, gibt jedoch Raum für die Annahme, dass hLa präferentiell als Monomer an HBV RNA-B2 bindet und hier unter Umständen die Spezifität der Bindung liegt.
Die jeweiligen Signale in Abbildung 3.4.3-1A für die höchsten Proteinmengen erscheinen intensiver als die entsprechenden Intensitäten der freien RNA jeweils links im Bild. Dieses zeigt an, dass entweder RNA Fragmente oder freie, radioaktive UTPs zusätzlich gebunden wurden.
Diese Ergebnisse zeigen an, dass es sich unter diesen Versuchsbedingungen um eine eher unspezifische Wechselwirkung handelt. Für eine spezifische Interaktion mit HBV RNA-B2, aber nicht mit GAPDH oder Aktin RNA wäre zu erwarten gewesen, dass diese RNAs erst mit sehr viel höheren Proteinmengen gebunden werden.

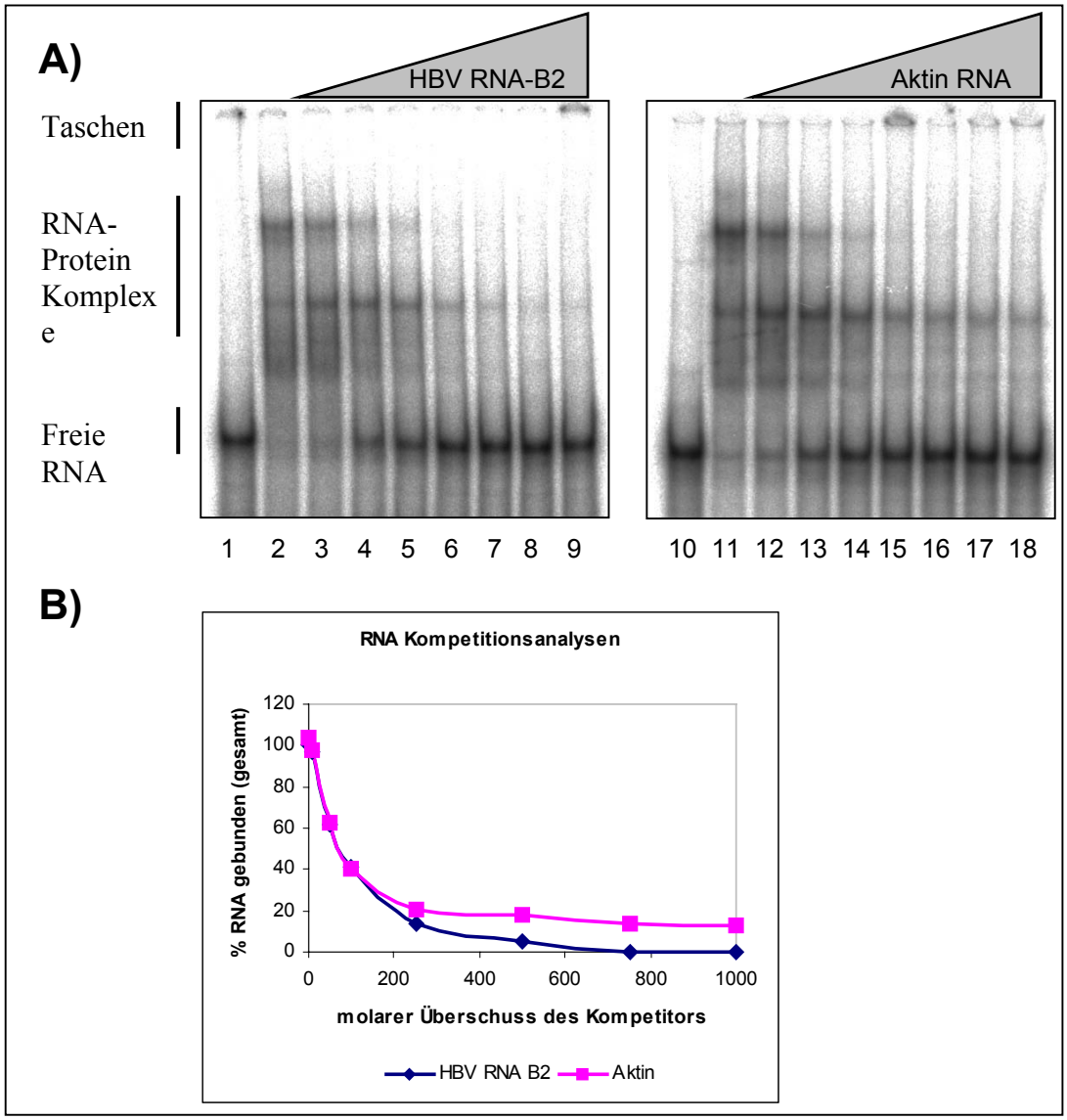


Abbildung 3.4.3-2: Bestimmung der Spezifität der hLa-WT HBV RNA-B2 Bindung durch Kompetitionen. (A) Je 100 ng hLa-WT (Gel Filtrations gereinigt) wurden mit 0,5 nM ^{32}P-markierter HBV RNA-B2 und ohne (*Spur 2+11*) oder mit (*Spur 3–9* und *12–18*) steigenden Mengen unmarkierter Kompetitor RNA (oberhalb der Gele angegeben) inkubiert und elektrophoretisch im nativen EMSA aufgetrennt. Der molare Überschuss der Kompetitoren war 0, 10, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000fach. Reaktion ohne Protein auf *Spur 1+10*. Die quantitative Auswertung dieser Versuche ist in **(B)** gezeigt, wo die insgesamt gebundene RNA prozentual gegen den molaren Überschuss des Kompetitors aufgetragen ist.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde die Spezifität der Bindung wie in Abbildung 3.4.3-2 gezeigt durch Kompetitionsanalysen untersucht. In diesen Versuchen wurden konstante Konzentrationen hLa-WT und radioaktiv markierter HBV RNA-B2 mit steigenden Mengen an Kompetitoren inkubiert. Das Verhältnis zwischen der Konzentration an Protein und radioaktiver HBV RNA-B2 wurde dabei gemäß der Affinitätsbestimmung (3.4.2) auf eine 50%ige Sättigung eingestellt. Die spezifische Kompetition erfolgte durch unmarkierte HBV RNA-B2 (Abb. 3.4.3-2A, *Spur 3 – 9*), während Aktin RNA als unspezifischer Kompetitor eingesetzt wurde (Abb. 3.4.3-2A, *Spur 12 – 18*). Diese wurden in einem entsprechend steigendem molaren Überschuss (0 – 1000fach) gegenüber der radioaktiven HBV RNA-B2 zugegeben. Wie bei der Betrachtung der EMSAs (Abb. 3.4.3-2A) offensichtlich wird, ist die kompetitive Wirkung beider RNAs vergleichbar und erzielt einen jeweils ähnlichen Effekt auf die monomeren und multimeren Komplexe. Die in Abb. 3.4.3-2B gezeigte quantitative Auswertung der jeweiligen Signalintensitäten durch einen Phosphorimager ergibt eine parallele Abnahme der Komplexe in beiden Versuchsreihen. Eine Quantifizierung der nur in monomeren gebundenen RNA und deren Kompetition ergab vergleichbare Resultate. Auch durch die Verwendung anderer Kompetitoren (Telomerase- und GAPDH RNA) ist keine höhere Spezifität der Bindung hervorgegangen (nicht gezeigt) und erzielte in etwa Werte wie die oben dargestellten.

Für eine spezifische Bindung wäre zu erwarten, dass HBV RNA-B2 als Kompetitor bei steigenden Konzentrationen wesentlich stärker und eher zu einer Abnahme der Bindung führt als Aktin RNA oder eine der anderen RNAs. Da diese Werte jedoch einander entsprechen ist von einer unter diesen Bedingungen eher unspezifischen Bindung von hLa-WT an HBV RNA-B2 auszugehen. Dieses steht im Gegensatz zu der hochspezifischen Bindung von mLa an HBV RNA (85, 87), wobei jedoch kein gereinigtes Protein sondern Nukleusextrakte benutzt wurden. Daher ist anzunehmen, dass weitere Faktoren (z.B. andere Proteine) die Spezifität der Bindung *in vivo* entsprechend beeinflussen. Zusätzliche Hinweise dafür stammen aus Daten, welche eine Modulation der hLa-WT HBV RNA-B2 Interaktion durch Zugabe von Kernextrakten in EMSAs zeigen (I. Ehlers & T. Heise, unveröffentlichte Daten). Dieses impliziert einerseits, dass in der lebenden Zelle die Spezifität durch weitere Faktoren beeinflusst wird und andererseits, dass die Spezifität der Bindung von hLa-WT an HBV RNA-B2 lediglich in der monomeren Komplexbildung liegen könnte.

3.4.4 Die Phosphorylierung des humanen La Proteins beeinflusst nicht dessen Bindung an die HBV RNA-B2

An anderer Stelle wurde bereits die Bedeutung der Phosphorylierung des humanen La Proteins detaillierter beschrieben (siehe 1.1, 1.3) und das Protein weist eine Vielzahl potentieller Stellen zur Phosphorylierung auf. Da eine große Anzahl von Funktionen und Prozessen einzelner Proteine oder ganzer Reaktionsverläufe durch geringe Modifikationen wie eine Phosphorylierung gesteuert werden können, wird der Einfluss der Phosphorylierung des Proteins auf die Interaktion mit HBV RNA.B2 überprüft. Zudem wurde durch Heise et al. (87) gezeigt, dass die Phosphorylierung des mLa ein Faktor sein kann, welcher die Bindung dieses Proteins an die HBV RNA moduliert. In jener Arbeit ist demonstriert, dass die Behandlung des eingesetzten Kernextrakts mit alkalischer Phosphatase zu einer stark reduzierten Bindung des mLa an die HBV RNA führt. Es ist jedoch nicht differenziert, ob die Dephosphorylierung des mLa oder eines anderen Faktors diese Modulation bewirkt. Zudem geht aus anderen Arbeiten hervor, dass die Phosphorylierung des humanen Proteins die Bindung an andere RNAs oder Polynukleotide beeinflussen kann (57, 58, 150).

Aus diesem Grund wurde in nachfolgenden Experimenten analysiert, ob eine Phosphorylierung des hochgereinigten hLa die Bindung an HBV RNA-B2 verändert. Dazu wurden vergleichend in einander entsprechenden Mengen die phosphorylierte und die dephosphorylierte Form des Proteins (siehe 3.1.2 und 3.1.3) mit gleichen Mengen HBV RNA-B2 in einem EMSA analysiert.

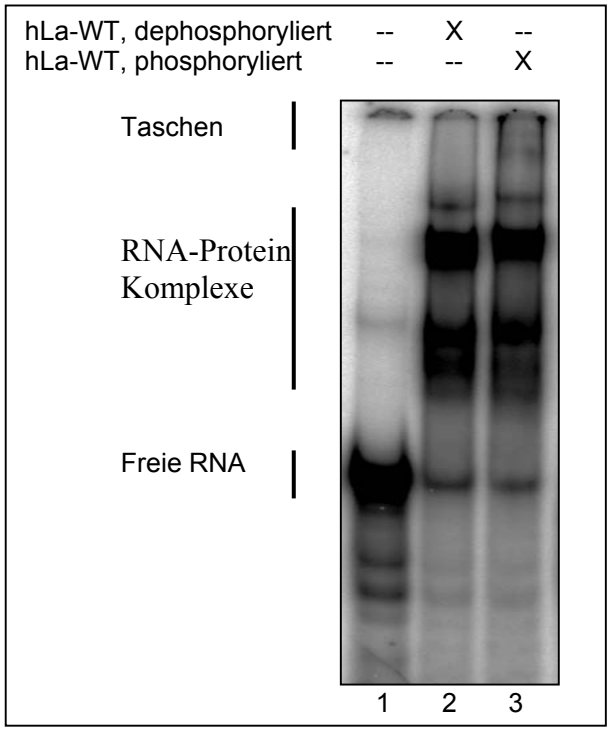


Abbildung 3.4.4-1: Die Phosphorylierung des humanen La Proteins hat keinen Einfluss auf die Bindung an HBV RNA-B2 im nativen EMSA. 200000 CPM ^{32}P-markierter RNA wurden mit je 100 ng dephosphoryliertem (*Spur 2*) oder phosphoryliertem (*Spur 3*), Gel Filtrations gereinigten hLa-WT inkubiert und im nativen EMSA elektrophoretisch aufgetrennt. Reaktion ohne Protein auf *Spur 1*. Die Positionen der freien RNA sowie der RNPs sind linksseitig angegeben.

Aus Abbildung 3.4.4-1 und der nicht gezeigten Quantifizierung der Signalintensitäten geht hervor, dass die Phosphorylierung des Proteins unter den gewählten Bedingungen keine Bedeutung hat für die Bindung an HBV RNA-B2. Dieses wurde in mehreren Versuchen

bestätigt, von denen in obiger Abbildung ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist. In einigen Experimenten schien die Phosphorylierung einen Einfluss zu haben auf das Verhältnis zwischen mono- und multimeren Komplexen. Dieses war jedoch nicht reproduzierbar und wird daher als nicht wesentlich angesehen. Zudem ist bereits vorher aufgeführt (siehe 3.3), dass die Phosphorylierung des Proteins nicht die Oligomerisierung verändert.
Sofern die für die Interaktion zwischen mLa und HBV RNA gezeigten Ergebnisse auf die Bindung des humanen Proteins übertragen werden können ist anzunehmen, dass zusätzliche Faktoren notwendig sind, welche die Bindung der HBV RNA in Abhängigkeit von der Phosphorylierung des Proteins vermitteln. Dabei bleibt offen, ob ein anderer Faktor die (De-) Phosphorylierung des hLa erkennt und die Bindung an HBV RNA entsprechend moduliert, oder ob ein anderer Faktor selbst phosphoryliert wird und sich entsprechend auf die Bindung auswirkt.

3.4.5 Bindungsstudien mit HBV RNA-B2 und den Mutanten des humanen La Proteins

In oben genannten Versuchsreihen sind die Optimierung der Bindungsreaktionen und die allgemeine Charakterisierung der Wechselwirkung zwischen hLa WT und HBV RNA-B2 gezeigt, wie auch die Analysen der Affinität, Spezifität und der Einfluss der Phosphorylierung. Dabei ist gezeigt, dass die Bindung von hLa-WT an HBV RNA-B2 hochaffin ist, aber unter den gewählten Versuchsbedingungen offensichtlich nur mit geringerer Spezifität erfolgt. In den sich anschließenden Experimenten wird analysiert, durch welche Domänen des hLa die Bindung an die HBV RNA-B2 vermittelt wird. Dabei sollte zudem zwischen essentiellen oder beitragenden Domänen unterschieden werden. In Anlehnung an die über die Bindung an tRNA bekannten Daten ist davon auszugehen, dass die einzelnen Domänen des hLa Proteins unterschiedliche Funktionen in der Erkennung von RNA haben (126, 221). Des weiteren haben diese Experimente das Ziel, Unterschiede in der Bindung des hLa an verschiedene RNAs aufzuzeigen. Dieses stellt einen entscheidenden Faktor in der Entwicklung antiviraler Strategien dar.
Zu diesem Zweck wurden die unter 3.2 beschriebenen Mutanten des humanen La Proteins als rekombinante Form exprimiert, gereinigt und im nativen EMSA eingesetzt. Die eingefügten Mutationen umfassten dabei die RNA Erkennungs-Motive RRM1, RRM2 und RRM3, die Multimerisierungsdomäne, das WAM sowie verschiedene weitere, C-terminale Regionen, welche in Tabelle 3.2-1 beschrieben sind. Des weiteren sollte durch die Ergebnisse dargestellt werden, welche der im EMSA auftretenden Komplexe tatsächlich aus monomeren oder multimeren Formen des Proteins bestehen und warum sich monomere Komplexe ausbilden, während das Wildtyp Protein wie u.a. in der analytischen Gelfiltration gezeigt als Multimer

vorliegt (siehe 3.3). Hierfür ist insbesondere die Mutation hLa-Δ6.0 von Bedeutung, da in dieser Mutation die Multimerisierungsdomäne deletiert ist und das Protein nur als monomere Form vorliegt.

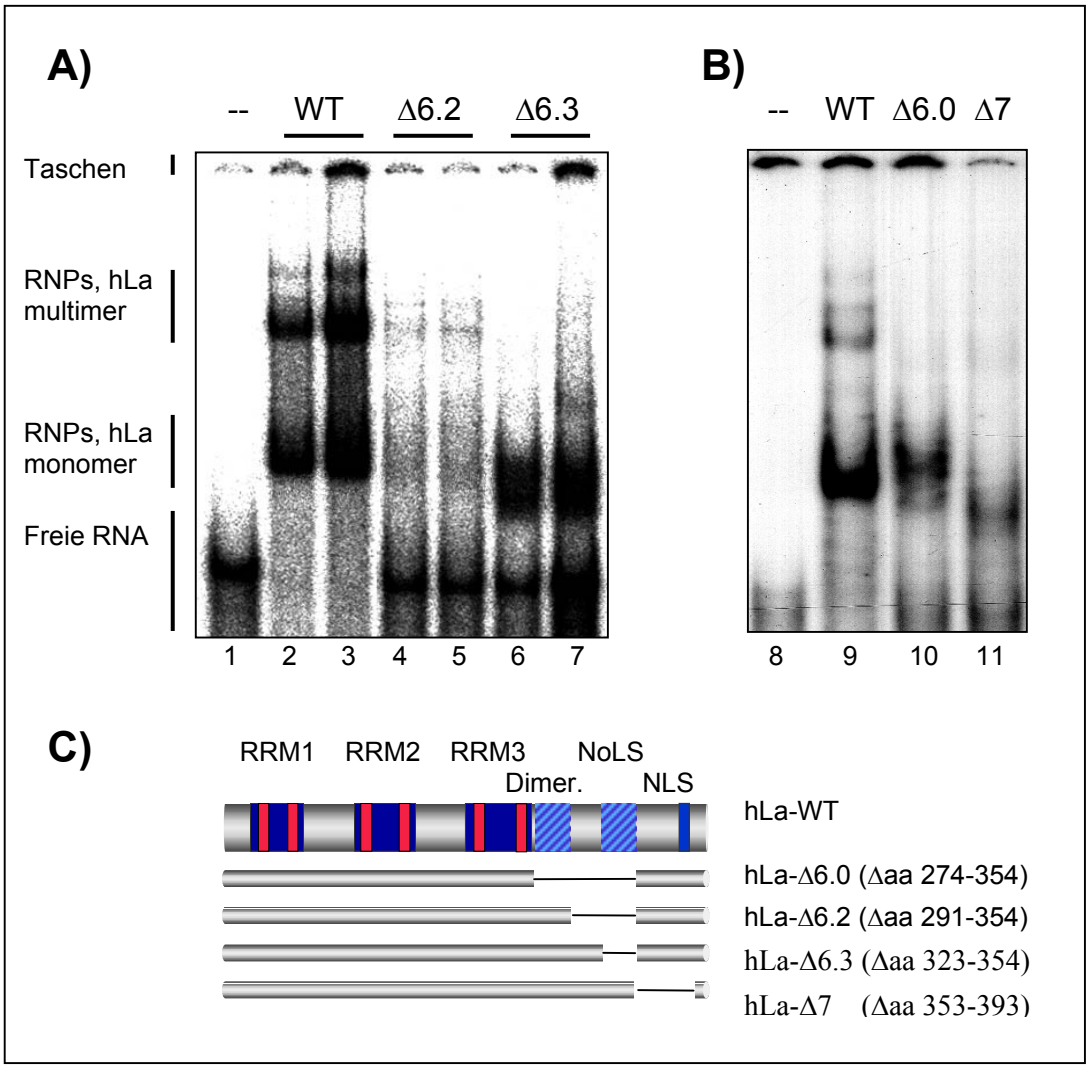


Abbildung 3.4.5-1: Der C-terminale Bereich des Proteins trägt zu einer effizienten Bindung der HBV RNA-B2 bei. (A) Je 200 ng Ni-NTA gereinigtes hLa-WT, hLa-Δ6.2 und hLa-Δ6.3 (in Doppelwerten, *Spuren 2 - 7*, oberhalb des Gels angegeben) wurden mit ^{32}P-markierter HBV RNA-B2 inkubiert und im nativen EMSA elektrophoretisch aufgetrennt. Positionen der freien RNA und der monomeren oder multimeren RNPs sind linksseitig angegeben. **(B)** Analyse der Interaktion zwischen hLa-Δ6.0 und hLa-Δ7 im Vergleich zum hLa-WT wie für (A) beschrieben. Reaktionen ohne Protein in *Spur 1+8*. **(C)** Schematische Darstellung des hLa-WT und der in (A) und (B) benutzten Mutanten des Proteins. Die jeweils deletierten Aminosäuren sind angegeben.

Aus Abbildung 3.4.5-1B ist ersichtlich, dass hLa-Δ6.0 nur einen Komplex mit der HBV RNA-B2 erzeugt, wohingegen das Wildtyp Protein wie zuvor gezeigt mehrere Komplexe ausbildet. Zudem zeigt die Lage des Komplexes aus HBV RNA-B2 und hLa-Δ6.0 die Position des Monomers an, da dieses Protein gemäß der analytischen Gelfiltration nur als Monomer vorliegt (siehe 3.3). Dieses ist insbesondere für die allgemeine Bindungscharakterisierung von Bedeutung, da das Wildtyp Protein wie oben gezeigt (siehe 3.3) als Multimer vorliegt. Sobald jedoch wie im nativen EMSA RNA zum Protein zugegeben wird, zerfällt das Multimer in

monomere RNA-Protein Komplexe. Daraus resultiert ein Modell, nach dem die Multimerisierung des Proteins durch RNA beeinflusst wird, da das Wildtyp Protein in der analytischen Gelfiltration als Multimer vorliegt, im nativen EMSA jedoch präferentiell als Monomer an RNA bindet.

Zudem ist festzustellen, dass die Bindung von hLa-Δ6.0 an die HBV RNA-B2 einer gewissen Schwankung unterliegt, die aber in jedem Falle gegenüber dem hLa-WT eine stark reduzierte Interaktion anzeigt (Abb. 3.4.5-1B, vergleiche *Spur 2,3 und 9 mit 10*). In einigen Experimenten ist diese Bindung erheblich schwächer gewesen als in Abbildung 3.4.5-1B dargestellt. Ebenso wie in hLa-Δ6.0 ist auch in hLa-Δ6.2 eine starke Reduktion der Bindung an die HBV RNA zu beobachten (Abb. 3.4.5-1A, *Spur 4+5*). Die Bindungsaktivität des Proteins hLa-Δ6.3 ist gegenüber der des hLa-WT nur geringfügig abgeschwächt (Abb. 3.4.5-1A, vergleiche *Spur 2+3 mit 6+7*). Auffällig ist, dass bei hLa-Δ6.3 keine multimeren Komplexe erscheinen, wobei die Bildung dieser Komplexe einer starken Varianz unterliegt und hier für hLa-Δ6.3 nicht weiter analysiert wurde. In der analytischen Gelfiltration eluierte dieses Protein als ein multimeres Molekül (siehe 3.3).

Hieraus lässt sich schlussfolgern, dass insbesondere die Aminosäuren 274 bis 323 zu einer effizienten Bindung des humanen La Proteins an HBV RNA-B2 beitragend sind. Da mit hLa-Δ6.0 noch eine Bindung gemessen werden kann, vermittelt die Funktion der Multimerisierung nicht die Bindung an diese RNA. Eindeutig ist jedoch, dass die Aminosäuren in diesem Bereich zu einer stabilen Bindung beitragend sind.

Um den weiter C-terminalen Bereich des Proteins auf seine Bindungsaktivität zu überprüfen wurde die Mutation hLa-Δ7 benutzt. Diese Mutation reduzierte die Bindung an HBV RNA-B2 im Vergleich zum Wildtyp erheblich, was eine Beteiligung dieser Aminosäuren an einer effizienten Bindung der RNA anzeigt. Andererseits könnten eventuelle strukturelle Änderungen durch die eingefügte Deletion eine negative Auswirkung auf die Interaktion mit der RNA haben und das Ergebnis verfälschen. Prinzipiell könnte dieses ebenso für die zuvor genannten Deletionen gelten. Zusammenfassend lässt sich aus diesem Experiment schlussfolgern, dass das hLa Protein präferentiell als Monomer an die HBV RNA-B2 bindet und dass das multimere Protein in ein monomeres zerfällt unter dem Einfluss von RNA. Die Funktion der Multimerisierung ist für die Bindung von HBV RNA-B2 nicht notwendig. Zudem ist die Notwendigkeit insbesondere der Aminosäuren 274 – 323 für eine effiziente Bindung dieser RNA dargestellt.

Wie eingangs beschrieben enthält das humane La Protein drei RNA-Erkennungs-Motive (RRMs), welche wie in Teilen für tRNA oder Polynukleotide gezeigt die Bindung an RNA vermitteln können (32, 126, 150). Diese Motive wurden in dieser Arbeit durch interne Deletionen oder Punktmutationen verändert (siehe 3.2). Durch die Mutation hLa-Δ1 ist ein N-terminaler Teil des Proteins deletiert (aa 11 – 99), welcher unter anderem das gesamte RRM1

beinhaltet. Für die RRMs 2 und 3 wurden wesentlich kleinere Deletionen eingefügt in Größen von 6 bis 11 Aminosäuren. Dabei wurden jeweils die RNP Motive im RRM2 und -3 deletiert, welche konservierte Sequenzen darstellen und als essentielle Motive in der RNA Bindung beschrieben sind (32). Im Falle des RNP-2 im RRM2 mit der Sequenz ^{113}-VYIKGF-^{118} passen die Aminosäuren Valin (V) und Isoleucin (I) dieses Motivs in die von Birney et al. (25) vorgeschlagene Konsensussequenz (siehe Abb. 3.4.5-2C), jedoch nicht das Phenylalanin an Position 118. Aus diesem Grund und weil insbesondere aromatische Seitengruppen an der Bindung von RNAs beteiligt sein können (32) wurde eine Punktmutation im RNP-2 des RRM2 eingefügt. Dabei wird das Phenylalanin-118 zu Alanin mutiert und im folgenden als hLa-F118A bezeichnet. Die rekombinanten, gereinigten Proteine wurden in nativen EMSAs eingesetzt, um die Beteiligung oder Notwendigkeit der jeweiligen Motive an der HBV RNA-B2 Bindung zu analysieren.

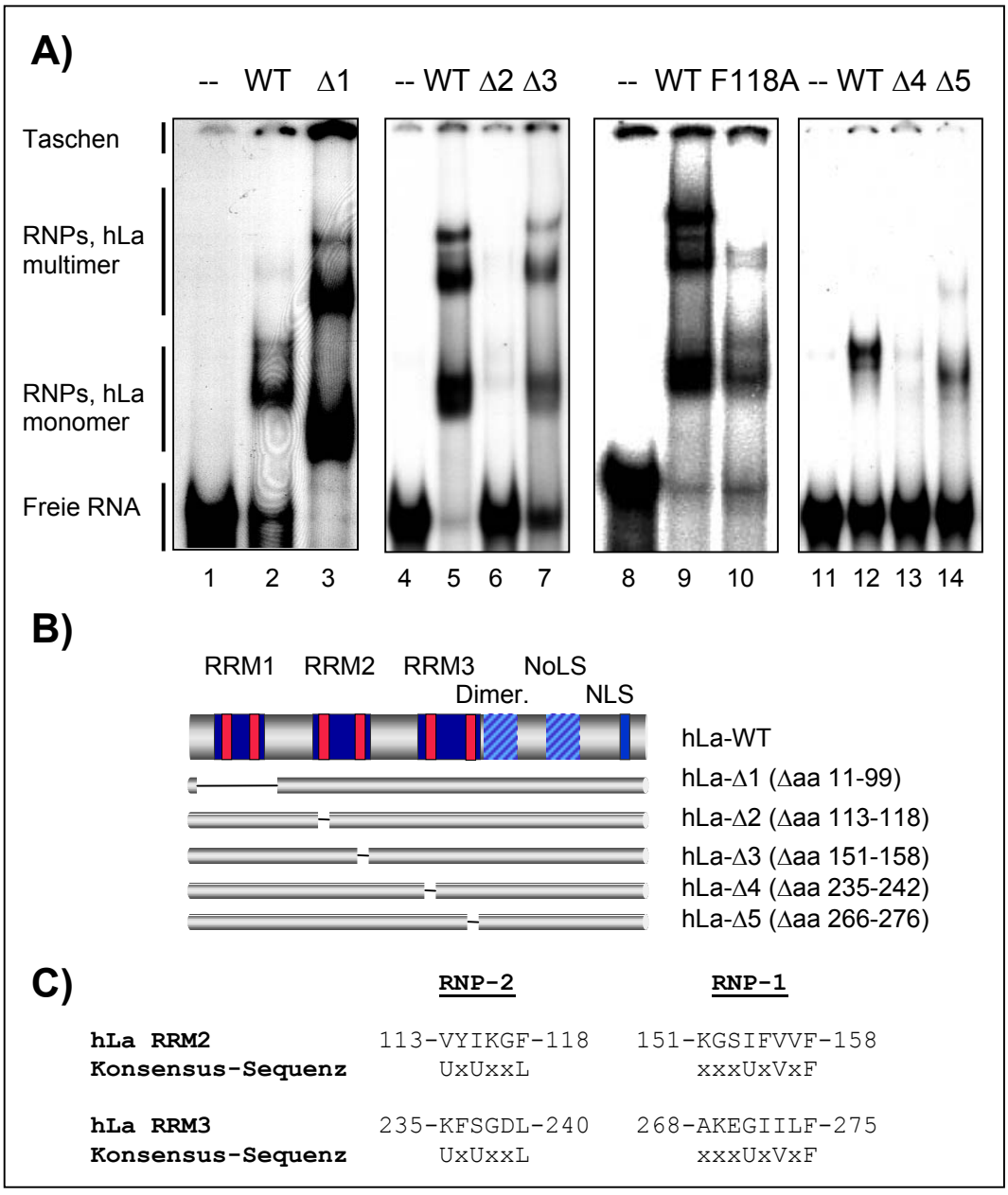


Abbildung 3.4.5-1: Daie RNP-2 Sequenzen im RRM2 und RRM3 sind essentiell für die Bindung von HBV RNA-B2. (A) Je 200 ng Ni-NTA gereinigtes hLa-WT (*Spuren 2, 5, 9, 12*), hLa-Δ1 (*Spur3*), hLa-Δ2 und hLa-Δ3 (*Spuren 6+7*), hLa-F118A (*Spur 10*) sowie hLa-Δ4 und hLa-Δ5 (*Spuren 13+14*) wurden mit ^{32}P-markierter HBV RNA-B2 inkubiert und im nativen EMSA elektrophoretisch aufgetrennt. Positionen der freien RNA und der monomeren oder multimeren RNPs sind linksseitig angegeben. Reaktionen ohne Protein auf *Spuren 1, 4, 8, 11*. **(B)** Schematische Darstellung des hLa-WT und der in (A) benutzten Mutanten des Proteins. Die jeweils deletierten Aminosäuren sind angegeben. hLa-F118A ist darin nicht gezeigt und befindet sich in der in hLa-Δ2 deletierten Region. **(C)** Vergleich der RNP-1 und RNP-2 Sequenzen des RRM2 und RRM3 mit den jeweiligen Konsensus-Sequenzen, die von Birney et al. identifiziert wurden. x = beliebige Aminosäure; U = ungeladene Aminosäure (L, I, V, A, G, F, W, Y, C, M). Dimer = Multimerisierungsdomäne

Durch die in Abbildung 3.4.5-2A dargestellten Analysen der Mutanten des humanen La Proteins in Bezug auf ihre HBV RNA-B2 Bindungsaktivität zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Proteinen im Vergleich zu hLa-WT. In der Deletion hLa-Δ1 wurden die Aminosäuren 11-99 deletiert, welche das RRM1 beinhalten. Dieses Motiv des La Proteins ist unter den verschiedenen Spezies hoch konserviert und ihm wurde eine essentielle Rolle in der Erkennung und Bindung von prä-tRNAs zugeschrieben (siehe Reviews (126, 221)). Durch die oben gezeigten Versuche ist belegt, dass das RRM1 nicht notwendig ist für eine Bindung an HBV RNA-B2. Dieses Ergebnis ließ sich in einer Vielzahl verschiedener, unabhängiger Experimente bestätigen, bei denen mehrere Proteinpräparationen eingesetzt wurden. Im Vergleich zur Bindung des hLa-WT ist auffällig, dass die Wechselwirkung des hLa-Δ1 mit HBV RNA-B2 wie auch die Bildung der verschiedenen Komplexe intensiver ist. Dieses ist umso überraschender, als dieses Motiv die Erkennung des poly-(U) 3´-Terminus von prä-tRNAs vermittelt (siehe 1.3). Da die HBV RNA-B2 weder am 5´- noch 3´-Terminus ein poly-(U) enthält, scheint das RRM1 insbesondere für die Erkennung einer spezifischen Gruppe von RNAs notwendig zu sein oder an einer internen Region der HBV RNA-B2 zu binden. Dieses Motiv hat offensichtlich keine essentielle Bedeutung für die generelle RNA Bindung des Proteins. Für die Bindung von HBV RNA-B2 ist dieses Motiv nicht notwendig, wobei die unspezifischen Bedingungen des hier benutzten EMSAs keine sehr geringen Unterschiede in der Bindung anzeigen.

Die Analyse von hLa-Δ2, in dem das RNP-2 Motiv des RRM2 deletiert ist, zeigt die absolute Notwendigkeit der Aminosäuren ^{113}VYIKGF^{118}, da ein Fehlen dieser Sequenz zu einem vollständigen Verlust der RNA-Bindungsaktivität führt (siehe Abb. 3.4.5-2A, vergleiche *Spur 5 + 6*). Dieses Ergebnis konnte mit mehreren Proteinpräparationen verifiziert werden, und auch hohe Mengen dieses Proteins im EMSA (800 ng) zeigten keinerlei Bindung der RNA. Da dieses Motiv folglich essentiell ist für die RNA Bindung, sollte möglichst ausgeschlossen werden, dass strukturelle Änderungen aufgrund der Mutation zu einer veränderten RNA Bindung führen. Daher wurde in diesem Motiv eine Punktmutation eingeführt, welche das Phenylalanin an Position 118 zu Alanin mutiert, da diese Aminosäure im Gegensatz zu den anderen Resten nicht in die von Birney et al. identifizierte Konsensus-Sequenz passte (siehe Abb. 3.4.5-2C) und da

aromatische Reste den Kontakt zu RNAs vermitteln können (32). Das Protein hLa-F118A hat gegenüber dem Wildtyp eine um 50% verminderte Bindungsaktivität (Abb. 3.4.5-2A, *Spur 9+10*). Dieses Ergebnis zeigt einerseits die Bedeutung des aromatischen Seitenrests F118 sowie andererseits die Notwendigkeit des RNP-2 im RRM2 für die generelle Bindung von HBV RNA-B2.

Die RNP-1 Sequenz ^{151}KGSIFVVF^{158} im RRM2 zeigt eine große Homologie zur beschriebenen Konsensus-Sequenz (siehe Abb. 3.4.5-2C). Die Deletion dieses Bereiches in hLa-Δ3 führt zu einer Reduktion aber nicht zu einem Ausbleiben der Bindungsaktivität (Abb. 3.4.5-2A, vergleiche *Spuren 5+7*). Daher lässt sich schlussfolgern, dass das RNP-2 im RRM2 essentiell ist für die RNA Bindung, wohingegen das RNP-1 teilweise notwendig ist. Im Gegensatz zum RRM1 ist das RRM2 demnach unentbehrlich für die RNA Bindung.

Die Untersuchung des RRM3 zeigt die Notwendigkeit des RNP-2 Motivs ^{235}**KFSGDL**DD^{242} für die Bindung an HBV RNA-B2 (siehe Abb. 3.4.5-2A, *vergleiche Spuren 12+13*), welches in der Mutation hLa-Δ4 deletiert wurde. Hierbei ist wie in der Deletion hLa-Δ2 keine Bindung detektierbar (Abb. 3.4.5-2A, *Spuren 6+13*). Dieses ist auffallend, da dieses Motiv keine große Homologie aufweist zur beschriebenen Konsensus-Sequenz (siehe Abb. 3.4.5-2C). Im Gegensatz dazu passt das RNP-1 Motiv des RRM3 wesentlich besser zur Konsensus-Sequenz und eine Deletion dieser Region in hLa-Δ5 ^{266}RG**AKEGIILFK**^{276} führt zu einer stark verminderten Bindungsaktivität (Abb. 3.4.5-2A, vergleiche *Spuren 12+14*). Dabei ist zu beachten, dass zusätzlich zur jeweiligen RNP minimal-Sequenz in hLa-Δ4 und in hLa-Δ5 zwei bis drei weitere Reste deletiert sind (siehe 2.5.1).

Des weiteren ist zu beachten, dass eine Reduktion der Bindung wie insbesondere in hLa-Δ2 und hLa-Δ4 nicht auf eine zu hohe Stringenz der Bindungsreaktion zurückzuführen ist, da in zuvor genannten Experimenten eine allgemein niedrige Spezifität der Bindung gezeigt wurde (siehe 3.4.3). Dadurch können geringe Unterschiede in den Bindungseigenschaften verschiedener Proteine nur schwer detektiert werden, aber demgegenüber erlaubt diese Methode die Identifizierung von Proteinen mit absoluten Bindungsdefekten.

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass das RRM1 nicht an der Bindung der HBV RNA-B2 beteiligt ist, wohingegen die RNP-2 Motive der RRMs2 und –3 essentiell sind. Die RNP-1 Regionen dieser Domänen sind teilweise notwendig. Daher wird ein Zusammenwirken des RRM2 und RRM3 bei der Bindung der HBV RNA-B2 abgeleitet. Ferner sind die Aminosäuren 274 – 323 zur effizienten Bindung entscheidend.

3.5 Wechselwirkungen des humanen La Proteins mit tRNA

Durch oben beschriebene Analysen (siehe 3.4.5) wurde dargestellt, welche Domänen des hLa Proteins zur Bindung der HBV RNA-B2 *in vitro* beitragen. Für die Entwicklung einer am hLa Protein ansetzenden antiviralen Strategie gegen eine HBV Infektion ist eine Analyse zellulärer Funktionen des hLa notwendig. Das La Protein ist u.a. insbesondere an der molekularen Prozessierung von tRNA Vorläufern beteiligt (siehe 1.3). Unterschiede zur Wechselwirkung mit HBV RNA bestehen dabei sowohl auf Ebene der RNA als auch auf der des Proteins. Die HBV RNA ist ein RNA Polymerase II Produkt, während prä-tRNAs ein Polymerase III Produkt sind. Letzteren ist ein (UUU-OH)-3`-Terminus gemeinsam und dieses gilt als Erkennungsmotiv für das La Protein (126, 127, 221, 222). Seitens des Proteins ist für die Interaktion mit prä-tRNA hauptsächlich das RRM1 sowie das WAM beschrieben, während die Bedeutung des RRMs 2 und 3 sowie einiger weiterer C-terminaler Regionen noch vollkommen ungeklärt ist ((126, 127, 221, 222) und Referenzen in 1.3).

In den folgenden Experimenten wird die Wechselwirkung zwischen dem humanen La Protein und der tRNA im nativen EMSA beschrieben. Dazu wurde das oben dargestellte rekombinante Protein und eine mittels *in vitro* Transkription synthetisierte $tRNA^{Val}$ benutzt, welche als prä-tRNA, als reife tRNA oder als Zwischenstufe mit 5´-*leader* oder 3´-*trailer* vorlag (siehe unten, Abb. 3.5.3-1). Zunächst wurde der Einfluss der Phosphorylierung des Proteins auf die tRNA Bindung untersucht. Anschließend wurde wie für die HBV RNA-B2 bestimmt, welche Domänen des Proteins zur Bindung der tRNA beitragend oder essentiell sind. Schließlich wurde durch RNA-Interferenz (siehe 2.13.3) die Notwendigkeit des endogenen La Proteins für die tRNA Expression in lebenden Zellen gezeigt.

3.5.1 Spezifität der Bindung zwischen humanem La Protein und $tRNA^{Val}$ im nativen EMSA

Wie aus den in Teil 1.3 dargestellten Zusammenhängen und der in Abb. 1.3-1 gezeigten schematischen Reaktionsabfolge der tRNA Prozessierung hervorgeht bindet das La Protein an prä-tRNA Moleküle. Gemäß dem in der Literatur gängigen Modell (siehe Übersichtsartikel (126, 221)) bindet das Protein mit dem RRM1 den 3´-Terminus des Vorläufer Moleküls mit poly(U) Ende und mit dem Walker-A-Motiv und / oder der basischen, C-terminalen Region den 5´-Terminus der prä-tRNA. Das RRM2 und RRM3 sollen an den Stamm des prä-tRNA Moleküls binden, wobei dieses bisher nicht untersucht ist. Dabei sind insbesondere die genannten *trailer* und *leader* Sequenzen der prä-tRNAs von Bedeutung, da das Protein an diese Bereiche bindet.

Aus diesen Gründen ist anzunehmen, dass das La Protein im nativen EMSA nicht oder wesentlich schwächer an reife tRNA bindet als an prä-tRNA. In späteren Analysen folgte die Prüfung, welche Domänen des Proteins an der tRNA Bindung beteiligt oder dafür essentiell sind. Zu diesem Zweck muss ausgeschlossen werden, dass ein eventuell auftretendes Ausbleiben der RNA Bindung z.B. aufgrund von Mutationen auf die Stringenz der Reaktionen zurückzuführen ist. Wie im Falle der HBV RNA-B2 erfolgte daher zunächst die Analyse der Spezifität der Bindung des rekombinanten hLa an die *in vitro* synthetisierte $tRNA^{Val}$. Dafür wurde die Bindung des hLa-WT *in vitro* an prä-$tRNA^{Val}$ und reife $tRNA^{Val}$ analysiert und verglichen. Zu diesem Zweck wurde die Spezifität der Bindung durch Kompetitions-Versuche dokumentiert. Erläuterungen zum Prinzip dieser Versuche sind im Teil 3.4.3 gegeben. Anschließend wurden für die weiteren Experimente unspezifische Bedingungen gewählt um Mutanten mit eindeutigen tRNA Bindungsdefekten zu identifizieren, was u.a. Ziel dieser Studie war.

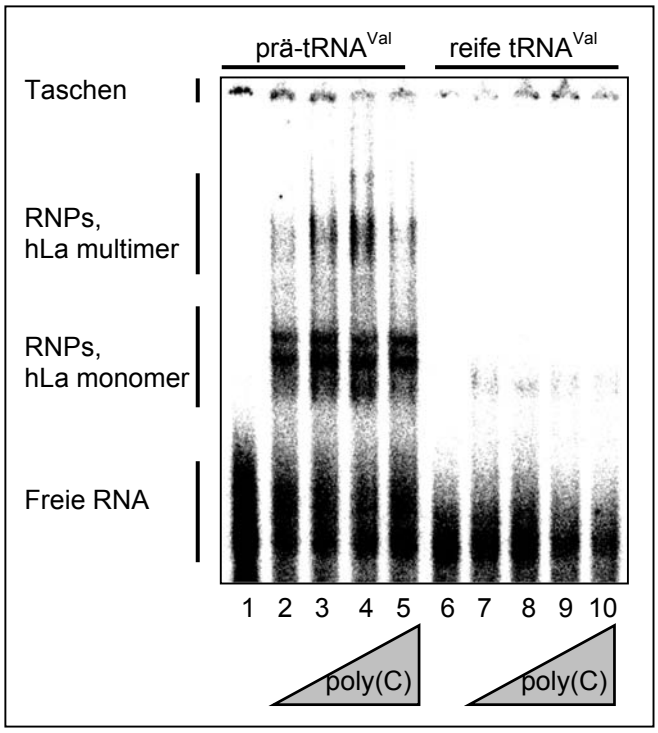


Abbildung 3.5.1-0: hLa-WT bindet spezifisch an prä-$tRNA^{Val}$. Es wurden 100 ng Ni-NTA gereinigtes hLa-WT Protein mit je 300000 CPM ^{32}P-markierter prä-$tRNA^{Val}$ (*Spuren 2*-5) oder reifer $tRNA^{Val}$ (*Spuren 7-10*) und mit steigenden Mengen unspezifischen Kompetitor poly(rC) (2, 4, 6, 8 µg) inkubiert und im nativen EMSA analysiert. Reaktionen ohne Protein und mit 2 µg poly(rC) auf *Spuren 1+6*. Die Positionen der freien RNA, der RNPs sowie der Taschen sind linksseitig angegeben.

Aus Abbildung 3.5.1-1 geht hervor, dass das hLa Protein im nativen EMSA verschiedene Komplexe mit $tRNA^{Val}$ eingeht. In Anlehnung an die mit HBV RNA-B2 erzielten Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der Komplex mit der höchsten Mobilität aus monomeren RNA-Protein-Komplexen besteht, während in jenen mit höheren Mobilitäten Multimere vorliegen. Folglich zerfällt das multimere hLa-WT nach Zugabe von tRNA ebenso wie durch HBV RNA-B2 in eine monomere Form. Dabei bindet das Protein, welches in diesem Versuch im Gegensatz zu den Standardbedingungen nur mit 100 ng eingesetzt wurde, erwartungsgemäß wesentlich stärker an prä- als an reife $tRNA^{Val}$. Mit letzterer sind unter diesen Bedingungen nur Signale erkennbar, welche kaum intensiver erscheinen als der Hintergrund. Dieses zeigt eine hohe

Spezifität des Proteins für prä-tRNA^{Val} an. Durch Zugabe von steigenden Mengen unspezifischen Kompetitors poly(rC) wurde die Spezifität der Bindung weiter belegt. Dabei hatte der höchste dargestellte Wert von 8 µg Kompetitor keinerlei Einfluss auf die Bindung des Proteins an prä-tRNA^{Val}. Es ist anzumerken, dass diese Menge an Kompetitor einem ca. 5000fachen molaren Überschuss gleichkommt, was als weiterer Beleg für die hohe Spezifität dieser Bindung gilt. Der Einfluss des Kompetitors auf die Bindung an reife tRNA^{Val} war aufgrund der allgemeinen Schwäche dieses Signals kaum detektierbar.
Um aus oben genannten Gründen in den folgenden Versuchen unspezifische Bedingungen zu wählen, wurde dem Bindungsansatz nur 2 µg Kompetitor poly(rC) zugefügt und das Protein wurde mit der doppelten Menge (200 ng) je Reaktion eingesetzt. Unter diesen Bedingungen wird auch reife tRNA^{Val} gebunden (siehe unten), was vermutlich nicht die reale Situation wiedergibt und u.a. der Identifikation von RNA-Bindungs-defekten Mutanten dient. Demgegenüber können geringe Unterschiede in der Bindungsaktivität unter diesen Bedingungen kaum detektiert werden.

3.5.2 Die Phosphorylierung des humanen La Proteins beeinflusst nicht dessen Bindung an tRNA^{Val}

An anderer Stelle ist detaillierter aufgeführt wie die Phosphorylierung des hLa Proteins unter Umständen einige der Funktionen des Proteins beeinflussen kann (siehe 1.1, 1.3, 3.4.4). Dazu wurden insbesondere Funktionen im Hinblick auf die Bindung oder Prozessierung von tRNA untersucht. Neben der Aktivität der RNA Polymerase III kann ggf. auch die Bindung von tRNA wie auch deren Prozessierung durch eine Phosphorylierung des hLa modifiziert werden ((57, 99, 120, 150) sowie Referenzen in 1.3, 3.4.4). Daher wurde auch in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der Phosphorylierung des hLa auf die Bindung an tRNA untersucht. Zudem wird durch dieses Experiment dargestellt, dass Unterschiede in der Bindungsaktivität einiger Mutanten des Proteins nicht durch eine (De-) Phosphorylierung verursacht werden.
Für die Verwendung der (de-)phosphorylierten Form des hLa-WT wurden die unter 3.1.3 beschriebenen Proteine benutzt. Sowohl mit der vollständig dephosphorylierten Form des Proteins als auch mit der hyperphosphorylierten Form bilden sich die zuvor beschriebenen RNA-Protein-Komplexe aus, welche die Bindung des Proteins an die RNA anzeigen (Abb. 3.5.2-1). In beiden Fällen werden monomere und multimere Formen der Komplexe detektiert. Eine Quantifizierung der insgesamt oder in einzelnen Komplexen gebundenen RNA zeigt keinen Unterschied bei den zwei benutzten Formen des Proteins. Folglich hat die Phosphorylierung keinen Einfluss auf die unter diesen Bedingungen analysierte Bindung von hLa-WT an tRNA^{Val}.

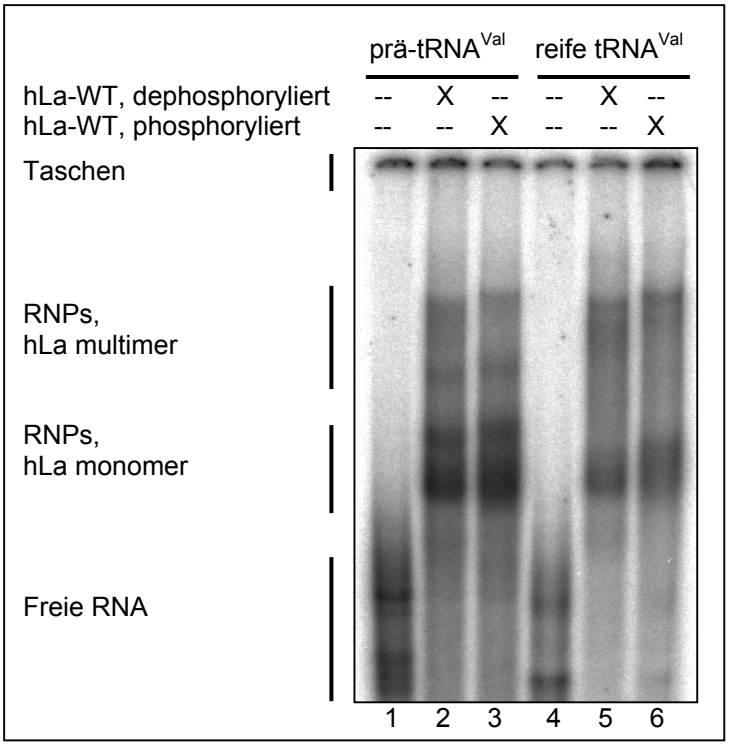


Abbildung 3.5.2-0: Die Phosphorylierung des hLa-WT ist ohne Einfluss auf die Bindung an tRNA^{Val} im nativen EMSA. 200000 CPM ^{32}P-markierter prä-tRNA^{Val} (*Spur 1-3*) oder reifer tRNA^{Val} (*Spur 4-6*) wurden mit je 200 ng dephosphoryliertem (*Spur 2+5*) oder phosphoryliertem (*Spur 3+6*),Gel Filtrations gereinigten hLa-WT inkubiert und im nativen EMSA elektrophoretisch aufgetrennt. Reaktionen ohne Protein auf *Spuren 1+4*. Die Positionen der freien RNA sowie der RNPs sind linksseitig angegeben.

Der in Abbildung 3.5.2-1 gezeigte EMSA stellt ein repräsentatives Ergebnis dar, welches in dieser Form in mehreren Versuchen und mit verschiedenen Protein Präparationen reproduzierbar war. Durch einen Western Blot wurde gewährleistet, dass je gleiche Proteinmengen in den Reaktionen eingesetzt wurden. Die Bindung an reife tRNA zeigt unspezifische Bindungsbedingungen an, welche geringe Unterschiede in der Bindungsaktivität nicht sichtbar machen. Unter stringenteren Bedingungen (100 ng Protein, 2 µg unspezifischer Kompetitor) war ebenso keine durch die Phosphorylierung veränderte Bindungsaktivität sichtbar (nicht gezeigt).

3.5.3 Die Funktionen der Domänen des humanen La Proteins in der Wechselwirkung mit tRNA^{Val} im nativen EMSA

Durch die zuvor beschriebenen Versuche wurde die Spezifität der Bindung von hLa-WT an prä-tRNA belegt und es ist aufgeführt, warum in den nachstehenden Versuchen unspezifische Bedingungen gewählt wurden. Zudem ist gezeigt, dass die Phosphorylierung des Proteins unter den Reaktionsbedingungen keinen Einfluss auf die Bindung hat. Daher wird in den folgenden Versuchen analysiert, welche Domänen des hLa Proteins essentiell oder beteiligt sind an der Bindung von tRNA^{Val}. Unter Betrachtung der für die Interaktion mit HBV RNA-B2 bestimmten Funktionalitäten einzelner Regionen des Proteins (siehe 3.4.5) ist zu erwarten, dass ebenso im Falle der tRNA Bindung einzelne Domänen stärker oder schwächer zu einer effizienten Bindung der prä-tRNA^{VAL} beitragen (siehe auch Referenzen in 1.3).

Zu diesem Zweck wurden im nativen EMSA die unter 3.2 beschriebenen Mutanten des rekombinanten humanen La Proteins benutzt. Als RNA Substrate in der Bindungsreaktion wurde *in vitro* transkribierte $tRNA^{Val}$ eingesetzt. Die Transkripte wurden dabei derart hergestellt, dass jeweils die beschriebene prä-$tRNA^{Val}$ und reife $tRNA^{Val}$ eingesetzt werden konnten. Zudem wurden zwei weitere Transkripte dieser tRNA benutzt, welche potentielle Zwischenstufen der tRNA-Prozessierung darstellen und entweder den 5´-*leader* oder den 3´-*trailer* aufweisen. Diese tRNAs wurden eingesetzt, um möglichst zu identifizieren an welche Regionen der prä-$tRNA^{VAL}$ die entsprechenden Regionen des Proteins binden. Dieses ist nur für das RRM1 sowie für eine C-terminale Region bekannt gewesen (siehe 1.3), insbesondere aber nicht für das RRM2 und RRM3.

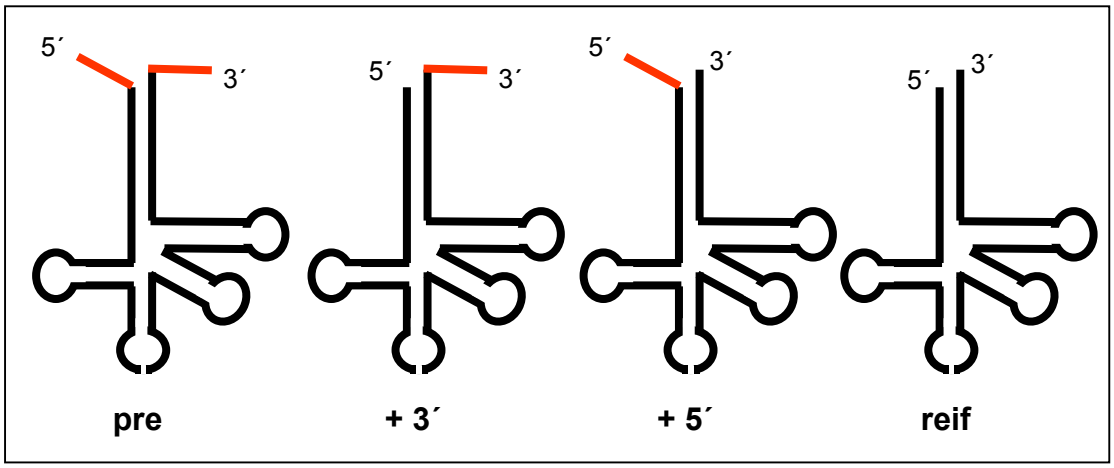


Abbildung 3.5.3-1: Schematische Darstellung der in den nachfolgenden EMSAs benutzten, durch *in vitro* Transkription synthetisierten $tRNA^{Val}$ Transkripte. Dargestellt sind die prä-tRNA, die reife tRNA sowie die Prozessierungsstufen entweder mit 5´-*leader* oder mit 3´-*trailer* (wie unterhalb angegeben). Die 5´- und 3´- Bereiche sind abgesetzt. Der Bereich des Anticodon-Akzeptors ist schraffiert dargestellt. Die Struktur ist an die allgemeine Kleeblatt-Struktur von tRNAs angepasst, welche die Gliederung in einen Akzeptor-Arm (unten), einen D-Arm (links), einen TΨC-Arm und V-Schleife (rechts) angibt.

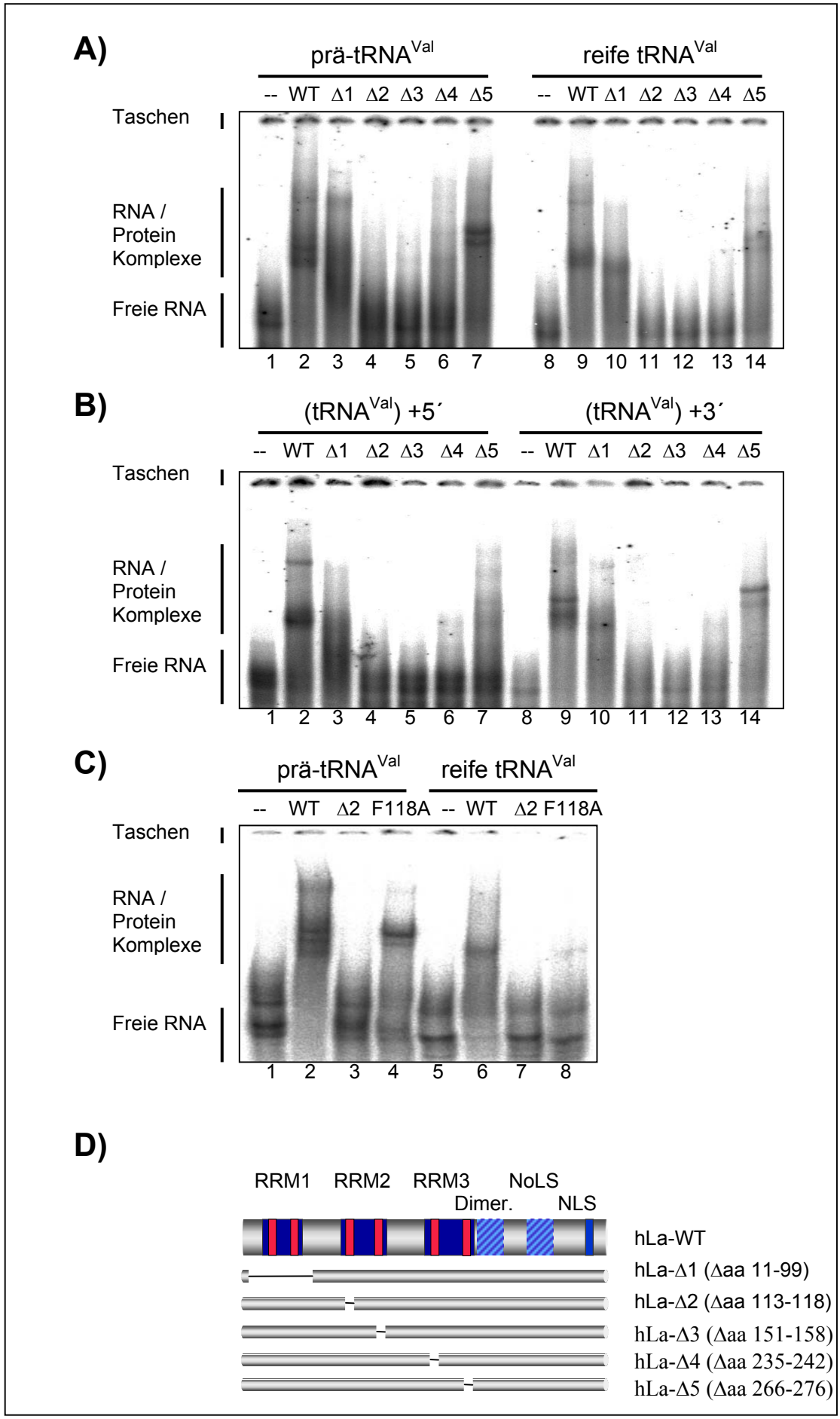

A)
prä-tRNA^{Val}
reife tRNA^{Val}
-- WT Δ1 Δ2 Δ3 Δ4 Δ5
-- WT Δ1 Δ2 Δ3 Δ4 Δ5
Taschen
RNA / Protein Komplexe
Freie RNA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
B)
(tRNA^{Val}) +5´
(tRNA^{Val}) +3´
-- WT Δ1 Δ2 Δ3 Δ4 Δ5
-- WT Δ1 Δ2 Δ3 Δ4 Δ5
Taschen
RNA / Protein Komplexe
Freie RNA
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14
C)
prä-tRNA^{Val}
reife tRNA^{Val}
-- WT Δ2 F118A -- WT Δ2 F118A
Taschen
RNA / Protein Komplexe
Freie RNA
1 2 3 4 5 6 7 8
D)
RRM1 RRM2 RRM3 NoLS Dimer. NLS
hLa-WT
hLa-Δ1 (Δaa 11-99)
hLa-Δ2 (Δaa 113-118)
hLa-Δ3 (Δaa 151-158)
hLa-Δ4 (Δaa 235-242)
hLa-Δ5 (Δaa 266-276)

Abbildung 3.5.3-2: Analyse der tRNA^{Val} Bindungsaktivitäten im nativen EMSA nach Mutation der verschiedenen RRMs im hLa Protein. Je 200 ng Ni-NTA gereinigtes hLa-WT, hLa-Δ1, hLa-Δ2, hLa-Δ3, hLa-Δ4 und hLa-Δ5 wurden mit ^{32}P-markierter prä-tRNA^{Val} und reifer tRNA^{Val} **(A)** sowie mit tRNA^{Val} +5´-*leader* und tRNA^{Val} +3´-*trailer* **(B)** inkubiert und im nativen EMSA elektrophoretisch aufgetrennt. RNAs und Proteine oberhalb angegeben, Positionen der freien RNA, der RNPs und der Taschen linksseitig. Reaktionen ohne Protein je auf *Spuren 1+8*. In **(C)** wurden hLa-WT, hLa-Δ2 und hLa-F118A wie in (A) mit prä- und reifer tRNA^{Val} inkubiert. Reaktionen ohne Protein auf *Spuren 1*+5. Die Schemazeichnung in **(D)** zeigt die benutzten Varianten des hLa Proteins. Die jeweils deletierten Aminosäuren sind angegeben. hLa-F118A ist darin nicht gezeigt und befindet sich in der in hLa-Δ2 deletierten Region. Dimer = Multimerisierungsdomäne

In Abbildung 3.5.3-2A+B wurden verschiedene hLa Mutanten sowie das Wildtyp Protein auf ihre Bindung zu verschiedenen Prozessierungsstufen der tRNA^{Val} unter unspezifischen Bedingungen analysiert, bei denen hLa-WT neben der völlig unprozessierten tRNA auch die reife tRNA sowie die 2 Zwischenstufen bindet. Unter spezifischen Bedingungen wäre ein anderes Ergebnis zu erwarten, da das La Protein insbesondere an die 5´-*leader* und 3´-*trailer* Sequenzen bindet (siehe auch (57)). Bei allen tRNAs außer der prä-tRNA sind schwache Komplexbildungen mit hLa-WT zu beobachten (vergleiche je *Spuren 2+9* in Abb. 3.5.3-2A+B). Im Falle der Deletion hLa-Δ1, welcher das N-terminale RRM1 fehlt, sind im Vergleich zum Wildtyp nur geringe Änderungen sichtbar. Die Bindung von hLa-Δ1 an prä-tRNA^{Val} ist mit der des hLa-WT vergleichbar und mit reifer tRNA^{Val} nur unwesentlich abgeschwächt (Abb. 3.5.3-2A, *Spuren 2+3* und *9+10*). Eine im Vergleich zu hLa-WT geringere Bindungsaktivität dieses Proteins an tRNA^{Val} +5´-*leader* und tRNA^{Val} +3´-*trailer* geht aus Abbildung 3.5.3-2B, *Spuren 3+10* hervor. Eine veränderte Position der Komplexe aus tRNA und hLa-WT bzw. hLa-Δ1 resultiert aus der durch die Mutation reduzierten Größe des mutierten Proteins. Es sind unabhängig von der zugegebenen tRNA im Vergleich zum Wildtyp nur leicht abgeschwächte Signale detektierbar, die unter diesen Bedingungen nicht auf eine intensive Störung der Bindung hindeuten. Es ist jedoch erneut zu bemerken, dass die gewählten unspezifischen Bindungsbedingungen keine geringen Unterschiede in der Bindungsaktivität erkennen lassen. Daher kann das RRM1 beispielsweise die Spezifität der Bindung vermitteln, was hier nicht detektiert werden würde. Zusammenfassend jedoch ist das RRM1 für eine Bindung der tRNA^{VAL} möglicherweise beitragend aber keinesfalls essentiell.

Im Falle der Deletionen hLa-Δ2, -Δ3 und -Δ4 ist ein eindeutiger Unterschied zur Bindungsaktivität des hLa-WT erkennbar, da diese Mutanten keine der eingesetzten tRNAs binden (Abb. 3.5.3.-2A+B). Demnach sind diese Motive essentiell für eine Bindung der tRNA^{Val}. Um die Bedeutung des aromatischen Seitenrests Phe-118 im RNP-2 / RRM2 Motiv zu analysieren und um die Notwendigkeit dieser Region für eine effiziente tRNA Bindung durch weniger invasive Mutationen zu zeigen wurde der Mutant hLa-F118A im nativen EMSA eingesetzt. Dabei zeigt sich nach Quantifizierung der Signale eine um 50% verringerte Bindungsaktivität gegenüber dem Wildtyp Protein (Abb. 3.5.3-2C, vergleiche *Spuren 2+4* und

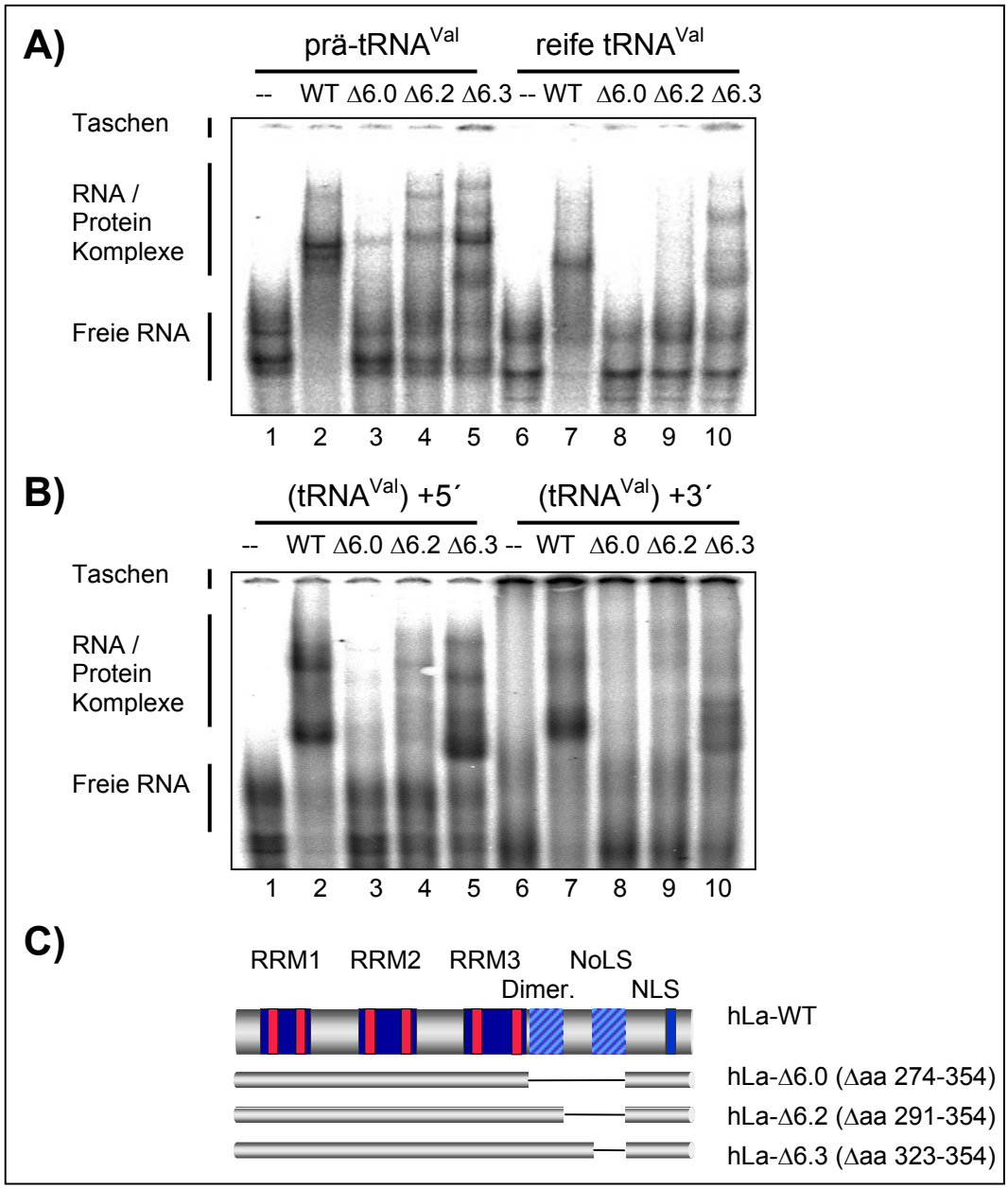
6+8). Dieses Ergebnis belegt, dass die aromatische Seitenkette F-118 an der Bindung der $tRNA^{Val}$ grundlegend beteiligt ist.

Die Deletion des RNP-1 im RRM3 in hLa-Δ5 führt ebenfalls zu einer gegenüber hLa-WT veränderten Bindungsaktivität. Während die Bindung von prä-$tRNA^{Val}$ für beide Proteine insgesamt noch ähnlich intensiv ist, wird reife $tRNA^{Val}$ durch dieses Protein kaum gebunden (Abb. 3.5.3-2A, vergleiche *Spuren 2+7* und *9+14*). Die Bindung von hLa-Δ5 an die $tRNA^{Val}$ +3´-*trailer* ist in dem überwiegenden Teil der Experimente stärker reduziert gewesen, als es zunächst aus der Abbildung 3.5.3-2B, *Spur 14* hervorgeht und zumeist wurde diese tRNA Zwischenstufe nur sehr schwache gebunden. Die Bindung von hLa-Δ5 an $tRNA^{Val}$ +5´-*leader* ist erheblich reduziert gegenüber hLa-WT (Abb. 3.5.3-2B, *Spuren 2+7*).

Aufgrund der Ergebnisse wird die Schlussfolgerung gezogen, dass die RNP-2 Sequenzen sowohl im RRM2 als auch im RRM3 für eine Bindung der prä-$tRNA^{Val}$ unerlässlich sind. Ein Fehlen dieser Regionen oder die Punktmutation des Phenylalanin-118 im RNP-2 des RRM2 führen auch unter unspezifischen Bedingungen zu einer stark reduzierten oder vollständig unterbundenen Bindung der tRNA. Für die Bindung von prä-$tRNA^{Val}$ ist ferner das RNP-1 im RRM2 essentiell, während das RNP-1 im RRM3 nur eingeschränkt zur effizienten Bindung der prä-$tRNA^{Val}$ beiträgt. Da die Ergebnisse insbesondere für das RNP-2 im RRM2 und RRM3 mit jenen für HBV RNA-B2 Bindung übereinstimmen (siehe Abb. 3.4.5-2A) sind diese Motive folglich von allgemeiner und essentieller Bedeutung für die Bindung von hLa an RNA.

In einer zweiten Versuchsreihe wurde der Einfluss der C-terminalen Region des Proteins auf die Interaktion mit $tRNA^{Val}$ bestimmt. Dazu wurden die unter 3.2 beschriebenen Mutanten hLa-Δ6.0, hLa-Δ6.2 und hLa-Δ6.3 benutzt und im nativen EMSA eingesetzt.

Abbildung 3.5.3-3: Analyse der $tRNA^{Val}$ Bindungsaktivitäten im nativen EMSA nach Deletion C-terminaler Regionen im hLa Protein. Je 200 ng Ni-NTA gereinigtes hLa-WT, hLa-Δ6.0, hLa-Δ6.2 und hLa-Δ6.3 wurden mit ^{32}P-markierter prä-$tRNA^{Val}$ und reifer $tRNA^{Val}$ **(A)** sowie mit $tRNA^{Val}$ +5´-*leader* und $tRNA^{Val}$ +3´-*trailer* **(B)** inkubiert und im nativen EMSA elektrophoretisch aufgetrennt. RNAs und Proteine oberhalb angegeben, Positionen der freien RNA, der RNPs und der Taschen linksseitig. Reaktionen ohne Protein je auf *Spuren 1+6*. **(C)** Schemazeichnung der benutzten Varianten des hLa Proteins. Die jeweils deletierten Aminosäuren sind angegeben. Dimer = Multimerisierungsdomäne



Durch die Mutationen hLa-Δ6.0 und hLa-Δ6.2 wird die Bindung der Proteine an tRNA^{Val} erheblich reduziert. Es zeigt sich im Vergleich zu hLa-WT in beiden Fällen eine sehr schwache Bindung an prä-tRNA^{Val} und ein vollständiger Verlust der Bindung an reife tRNA^{Val} (Abb. 3.5.3-3A, vergleiche *Spuren 3+4* mit *2* und *8+9* mit *7*). Ebenso ist die Bindung dieser Mutanten an tRNA^{Val} +3´-*trailer* vollständig herabgesetzt, während die Bindung der tRNA^{Val} +5´-*trailer* erheblich reduziert ist (Abb. 3.5.3-3B, vergleiche *Spuren 3+4* mit *2* und *8+9* mit *7*). Im Gegensatz dazu ist die Bindungsaktivität mit hLa-Δ6.3 mit der des hLa-WT vergleichbar, wobei die Bindung an tRNA^{Val} +3´-*trailer* verringert ist (Abb. 3.5.3-3A+B).

Schlussfolgernd lässt sich feststellen, dass insbesondere die deletierten Aminosäuren in hLa-Δ6.0 und hLa-Δ6.2-, nicht aber die in hLa-Δ6.3 essentiell sind für eine effiziente Bindung der tRNA^{Val}. Diese Ergebnisse beschrieben erstmalig die Bedeutung der Aminosäuren 291 bis 323 im hLa für die Bindung von prä-tRNA, welches somit eine bisher nicht identifizierte Domäne in

der tRNA Bindung darstellt. Sofern dieses nicht auf strukturellen Änderungen des Proteins aufgrund der internen Deletionen beruht, sind die Aminosäuren 291 – 323 erforderlich für eine effiziente Bindung der $tRNA^{Val}$. Hingegen ist die in hLa-Δ6.3 (Δaa 323 – 354) deletierte Arginin-Lysin-reiche Region wie auch das Walker-A-Motiv nicht notwendig für die Interaktion des hLa Proteins mit tRNA.

Möglicherweise lassen sich mit den gewählten Versuchsbedingungen geringe Unterschiede in der RNA-Bindungsaktivität der Aminosäuren 11 – 99 und 323 – 354 nicht nachweisen. Beide Regionen sind für die Bindung an den 5´-*leader* bzw. 3´-*trailer* von prä-tRNAs beschrieben (126, 127, 221).

3.5.4 Modell über die Hierarchie der RNA-Bindungsstellen des humanen La Proteins

Durch die Bindungsstudien mit den Mutanten des humanen La Proteins an prä-$tRNA^{Val}$ und die verschiedenen Prozessierungsstufen der $tRNA^{Val}$ (siehe Versuche und Abbildungen in 3.5.3) ist dargestellt, welche Regionen des Proteins an welche Regionen in der tRNA binden. Dieses ist für das RRM1 und für eine C-terminale Region bereits publiziert (siehe Referenzen in 1.3), jedoch wurden dort mit N- und C-terminalen Verkürzungen andersartige und wesentlich größere Mutationen in das hLa Protein eingefügt. Zudem war der Sachverhalt z.B. für das RRM2 und RRM3 unklar und nicht ausreichend beschrieben. Aufgrund der Tatsache, dass Deletionen im RNP-2 des RRM2 und RRM3 sowie zwischen den Aminosäuren 291-323 jeweils zu einem vollständigen oder erheblichen Verlust der Bindungsaktivität gegenüber allen tRNA-Stufen führen lassen sich unter anderem folgende Schlussfolgerungen ziehen:

- Die bisher publizierten und die eigenen Ergebnisse zusammenfassend gibt es vermutlich mindestens drei Stellen der Wechselwirkung: RRM1 am 3´-*trailer*, RRM2+RRM3 zwischen *leader* und *trailer* (wobei diese ggf. mit dem Stamm gemeinsam gebunden werden) und aa291-323 am 5´-*leader*.
- Deletionen im RRM2 können nie durch andere Bindungsstellen kompensiert werden und führen generell zu einem Verlust der RNA Bindung.
- Gleiches gilt für das RRM3, wobei das RNP-1 einen geringeren Anteil hat an einer effizienten Bindung der prä-$tRNA^{Val}$ als das RNP-2.
- Im Umkehrschluss können das RRM2 und RRM3 (auch gemeinsam) nicht kompensieren, wenn die beiden potentiellen anderen Stellen der Bindung (RRM1 am 3´-*trailer* und aa291-323 am 5´-*leader*) ausfallen. Folglich tragen diese RRMs nicht allein zu einer effizienten-, wohl aber zur grundsätzlichen Bindung der RNA bei.

- Das Ergebnis mit hLa-Δ6.0 und hLa-Δ6.2 mit prä-tRNA^{Val} zeigt, dass eine Störung der RNA Bindung an dieser Stelle (aa291-323) nur gemeinsam durch alle drei RRMs ausgeglichen werden kann. Zudem muss mindestens das RRM2 und/oder das RRM3 and den 5´-*leader* und 3´-*trailer* gleichzeitig binden.
- Das RRM1 ist nicht entscheidend für die generelle Bindung von RNA; die Funktionen dieses Motivs liegen eventuell in anderen Bereichen, wie z.B. der Spezifität.

Ein Modell über diese Bindungsstellen und deren Interaktion mit der tRNA wird an anderer Stelle diskutiert (siehe 4.3). Wie erwähnt wurden unspezifische Bindungsbedingungen für diese Experimente gewählt, da die Identifizierung von essentiellen Domänen u.a. Zielsetzung dieser Versuchreihe gewesen ist. Zur genaueren Analyse, welche der jeweiligen Domänen des hLa zur effizienten Bindung beitragend sind, könnte eine Analyse der Bindungen unter stringenteren Bedingungen, durch Kompetitionen oder Titrationen durchgeführt werden. Dieses könnte Hinweise geben auf Unterschiede darin, welche Regionen des Proteins in welcher Form zur Bindung der prä-tRNA beitragen.

3.5.5 Temporärer *knockout* des endogenen La Proteins in humanen Zellen und die Unterbrechung der tRNA Synthese

Wie zu Beginn dieses Abschnitts beschrieben (siehe 1.3) liegt die Funktion des La Proteins u.a. in der Bindung von prä-tRNA und deren Schutz vor unspezifischen nukleolytischen Aktivitäten während der Prozessierung. Diese Funktion nimmt das Protein unter Umständen gemeinsam mit den sogenannten Lsm-Proteinen ein, wobei das exakte Zusammenspiel ungeklärt ist ((109) sowie Referenzen in 1.3). Zwar wurde für mehrere Spezies gezeigt, dass ein Fehlen des La Proteins (oder dessen Homolog) durch alternative Systeme ausgeglichen werden kann (56, 117, 210), jedoch war dieses für humane Zellen vollkommen unbekannt.
Daher sollte analysiert werden, wie sich ein Fehlen des La Proteins in humanen Zellen auf die tRNA-Prozessierung auswirkt und an welchen Stellen der Reifung der tRNA Moleküle Defekte auftreten. Zu diesem Zweck war es notwendig, das endogene La Protein in lebenden, humanen Zellen selektiv zu inaktivieren. Dieses wurde bisher für humane Zellen noch nicht beschrieben und stellte somit eine besondere Schwierigkeit dar. Da eine genetische Lösung durch eine La-*knockout* Zell-Linie nicht existierte, mussten biochemische bzw. zellbiologische Verfahren zur selektiven Regulierung des endogenen La Proteins angewendet werden. Eine zu diesem Zweck benutzte Methode ist die RNA-Interferenz (RNAi), welche unter 2.13.3 beschrieben ist.
Durch die Transfektion von 23nt langen dsRNA Oligonukleotiden (siRNAs) mit einer passenden, spezifischen Sequenz der hLa mRNA in eukaryotische Zellen (siehe Anhang für Sequenzen) sollte die Expression des endogenen La Proteins herunterreguliert werden, da diese

mRNA theoretisch nicht mehr translatiert werden sollte. Es wird angenommen, dass die Effektivität der RNAi auf die Ziel-mRNA einen Wert von bis zu 90% Reduktion annimmt und vermutlich 80% der Zellen trifft (33, 53, 231). Die Methode wurde in der Arbeitsgruppe größtenteils durch J. Dittmann etabliert. Ebenso erfolgte durch J. Dittmann eine Erstellung der Zeitkinetik, welche die temporäre Reduktion der La Expression dokumentierte.
Zur Dokumentation des siRNA Effekts wurden nach Transfektion der siRNAs in eukaryotische Zellen zu entsprechenden Zeitpunkten (Tag 2 und 3 nach Transfektion) jeweils Protein- und RNA-Extrakte erstellt. Die Dokumentation der Expression des endogenen hLa Proteins erfolgte durch einen Western Blot. Für die Analyse des Effekts der siRNA Behandlung auf die Expression und Prozessierung der tRNAs wurde ein Northern Blot durchgeführt. In einem parallelen Ansatz wurden Zellen mit einer siRNA transfiziert, welche sich gegen die in humanen Zelle nicht vorkommende Luziferase-mRNA richtet. Dieses Experiment stellt die Kontrolle von generellen Effekten einer RNAi Behandlung dar. Des weiteren wurden die entsprechenden Extrakte ebenso von unbehandelten Zellen zu gleichen Zeitpunkten erstellt und analysiert.

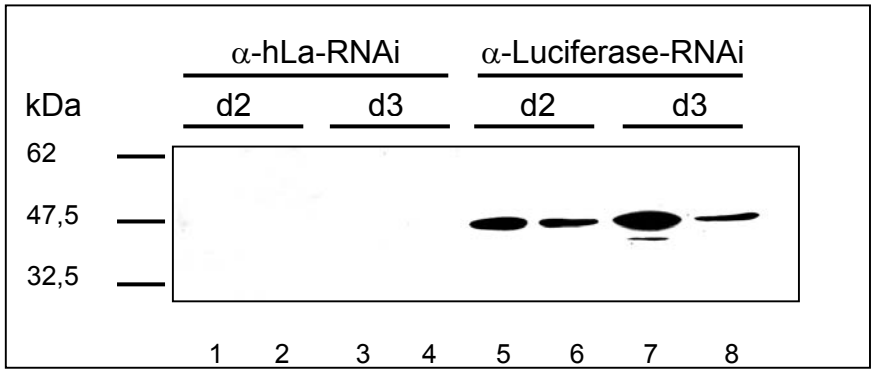


Abbildung 3.5.5-1: Die Behandlung mit α-hLa siRNAs bewirkt eine effiziente Reduktion des endogenen La Proteins. HeLa Zellen wurden in Doppelwerten mit je 100 nM α-hLa (*Spur 1-4*) oder α-Luciferase (*Spur 5-8*) siRNAs behandelt. Nach Herstellung der Zellextrakte am Tag 2 (d2) oder Tag 3 (d3) nach Transfektion erfolgte der Nachweis des endogenen La Proteins im Western Blot mit Maus-α-hLa spezifischem, monoklonalen Antikörper 4B6 und HRPO-gekoppeltem sekundären Ziege-α-Maus Antikörper. Es wurden je Spur 25 µg Zellextrakt aufgetragen.

Der Western Blot mit den Zellextrakten der siRNA behandelten Zellen zeigt eindeutig, dass die Expression des endogenen hLa Proteins durch diese Methode herunterreguliert werden kann (Abb. 3.5.5-1, vergleiche *Spur 1-4 und 5*-8). Obwohl 25 µg Zellextrakt im Western Blot eingesetzt wurden, konnte in den α-hLa-siRNA behandelten Zellen kein endogenes La Protein nachgewiesen werden. Sehr lange Expositionen von Röntgenfilmen zeigten ebenfalls keine Detektion von endogenem hLa am Tag 2, jedoch sehr schwache Signale am Tag 3. Dieses deutet darauf hin, dass der Effekt der RNA Interferenz unter diesen Umständen am Tag 3 leicht reduziert ist. Durch eine Färbung mit Ponceau-S (siehe 2.8.6) wurde gewährleistet, dass gleiche Mengen Zellextrakt in allen Spuren aufgetragen und auf die Nitrozellulosemembran transferiert

wurden (nicht gezeigt). Die Detektion des endogenen hLa in der Kontroll-Reaktion (α-Luciferase-siRNA, Abb. 3.5.5-1, *Spur 5-8*) zeigt keine veränderte hLa Expression. Dieses steht zudem in vergleichbaren Mengen zu der in unbehandelten Zellen dokumentierten Menge an endogenem hLa Protein (nicht gezeigt). Folglich wird durch die α-hLa-siRNA Behandlung spezifisch das endogene La Protein in humanen Zellkulturen in seiner Expression bis unterhalb der Nachweisgrenze (40 ng im Western Blot mit diesem Antikörper) reduziert. Dieses zeigt erstmals die spezifische Reduktion des endogenen La Proteins in humanen Zellen.
Anschließend wurden die RNAs in den jeweiligen Proben im Northern Blot analysiert, um den Effekt der siRNA-Behandlung auf die tRNAs zu analysieren.

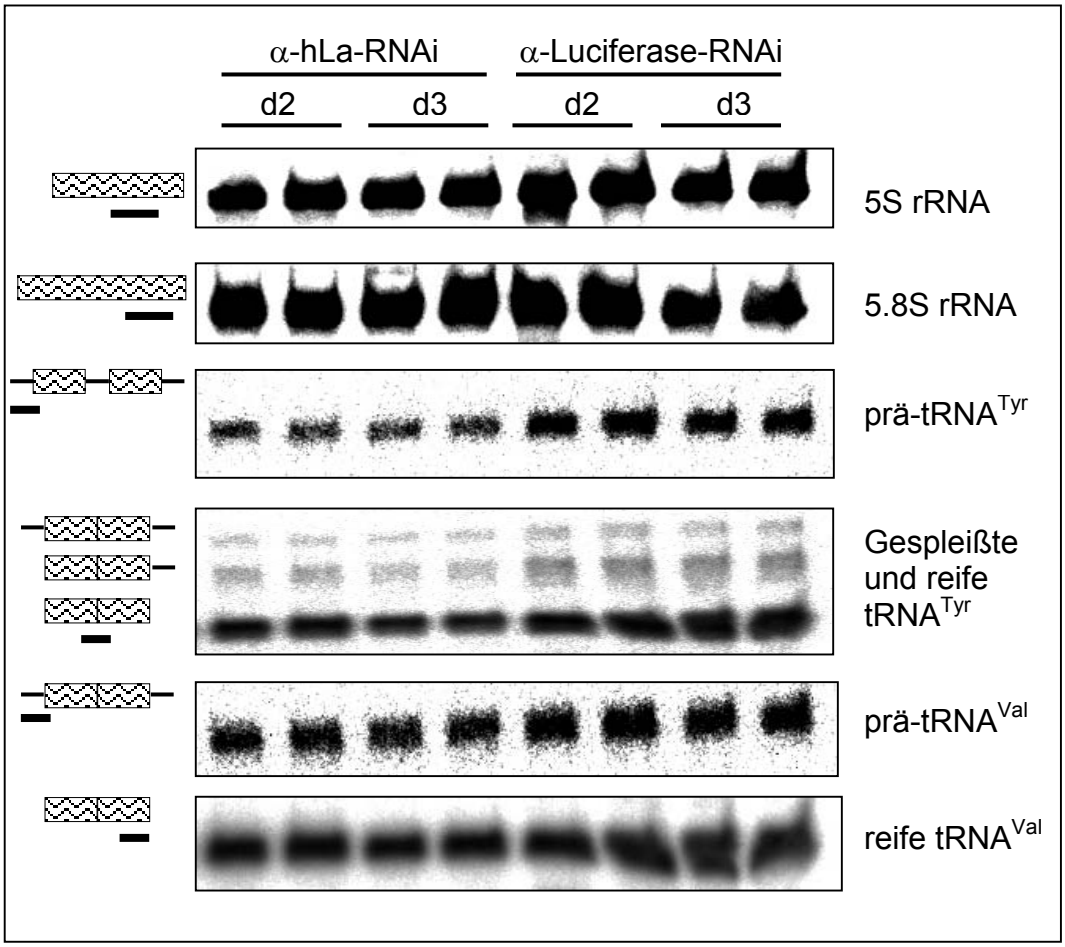


Abbildung 3.5.5-2: Die α-hLa siRNA-Behandlung führt zu einem deutlich negativen Effekt auf den Gehalt an endogenen tRNAs. HeLa Zellen wurden in Doppelwerten mit je 100 nM α-hLa (links) oder α-Luciferase-siRNAs (rechts) behandelt. Nach Herstellung der RNA-Extrakte am Tag 2 (d2) oder Tag 3 (d3) nach Transfektion wurden die entsprechenden RNAs im Northern Blot detektiert. Dazu wurden je Probe 25 µg total-RNA aufgetragen. Die Detektion erfolgte mit jeweils spezifischen Sonden. Linksseitig ist schematisch die entsprechende RNA wiedergegeben (schraffierte Boxen symbolisieren Exons, dünne Linien zeigen Introns oder flankierenden Sequenzen) sowie die Position der jeweiligen Sonde (dicke Linien darunter). Als Kontrolle des Versuchs wurden ribosomale 5S und 5.8S rRNA nachgewiesen. Zudem erfolgte die Bestimmung der unprozessierten, teil-prozessierten und/oder reifen Moleküle für die tRNA^{Val} sowie die zu spleißende tRNA^{Tyr} (rechts angegeben).

In dem in Abbildung 3.5.5-2 gezeigten Northern Blot der siRNA behandelten HeLa-Zellen wurde eine hohe Menge (25 µg) RNA aufgetragen, damit die Detektion der entsprechenden RNAs und insbesondere der prä-tRNAs nicht unterhalb der Nachweisgrenze liegt. Der Nachweis erfolgte wie unter 2.11.8 beschrieben durch Hybridisierung mit radioaktiv markierten Oligonukleotiden, welche komplementär zu entsprechenden Sequenzen der nachzuweisenden RNA sind. Für die prä-tRNAs wurden dazu Sequenzen gewählt, welche entweder im Bereich des 5´-*leaders* oder des Introns liegen (siehe Abb. 3.5.5-2, *links*) und folglich in der reifen tRNA nicht vorkommen.

Als Kontrollen wurden 5S rRNA und 5.8S rRNA nachgewiesen, wobei letztere im Gegensatz zur 5S rRNA und zu tRNAs kein RNA Polymerase III Produkt ist. Der Vergleich zwischen den spezifisch α-hLa siRNA behandelten Zellen und den unspezifisch α-Luziferase siRNA behandelten Zellen zeigt, dass bei keiner der aufgeführten ribosomalen RNAs Unterschiede sichtbar sind (Abb. 3.5.5-2, *oben*). Folglich haben die spezifische und die unspezifische RNA-Interferenz keinen generellen Effekt auf die Aktivität der RNA Polymerasen I und III. Die Signale sind bei den genannten RNAs untereinander und miteinander bei den verschiedenen Zeitpunkten vergleichbar. Die 5.8S rRNA wurde als Ladekontrolle für die Normalisierung zur Quantifizierung eingesetzt (siehe unten).

Im Falle der prä-tRNA^{Tyr} ist deutlich zu erkennen, dass der Gehalt dieses tRNA Vorläufers durch die α-hLa-, nicht aber durch die α-Luziferase siRNA-Behandlung reduziert wird (Abb. 3.5.5-2, *mitte*). Als nachfolgender Schritt in der molekularen Reifung wird diese prä-tRNA gespleißt, bevor die Prozessierung der 5´- und 3´-Termini erfolgt (211, 212). Daher erkennt die für die reife tRNA^{Tyr} eingesetzte Sonde, welche den gespleißten Bereich detektiert, neben dem reifen Molekül auch die gespleißten aber nicht End-prozessierten Zwischenstufen (Abb. 3.5.5-2, *mitte*). Auch hier ist eine erhebliche Reduktion der teilprozessierten Zwischenstufen sowie der reifen tRNA^{Tyr} erkennbar, wobei bei letzterer der Effekt der Reduktion offensichtlich am Tag 3 intensiver ist als am Tag 2. Im Falle der tRNA^{Val} ist nur eine geringe Reduktion des Vorläufer-Moleküls zu erkennen, während die reife tRNA^{Val} kaum beeinflusst ist (Abb. 3.5.5-2, *unten*). Bei dieser tRNA, welche kein Intron enthält und folglich keinen Spleiß-abhängigen Prozessierungsweg einschlägt, wurden keine Zwischenstufen der Reifung nachgewiesen.

Für die quantitative Auswertung wurden die Mittelwerte der Intensitäten der entsprechenden tRNAs zunächst auf das Signal der 5.8S rRNA normalisiert. Anschließend wurden die Intensitäten der tRNAs in den α-hLa-siRNA behandelten Zellen als relativer Wert auf die Kontrollen (α-Luziferase-siRNA) bezogen (siehe 2.11.8).

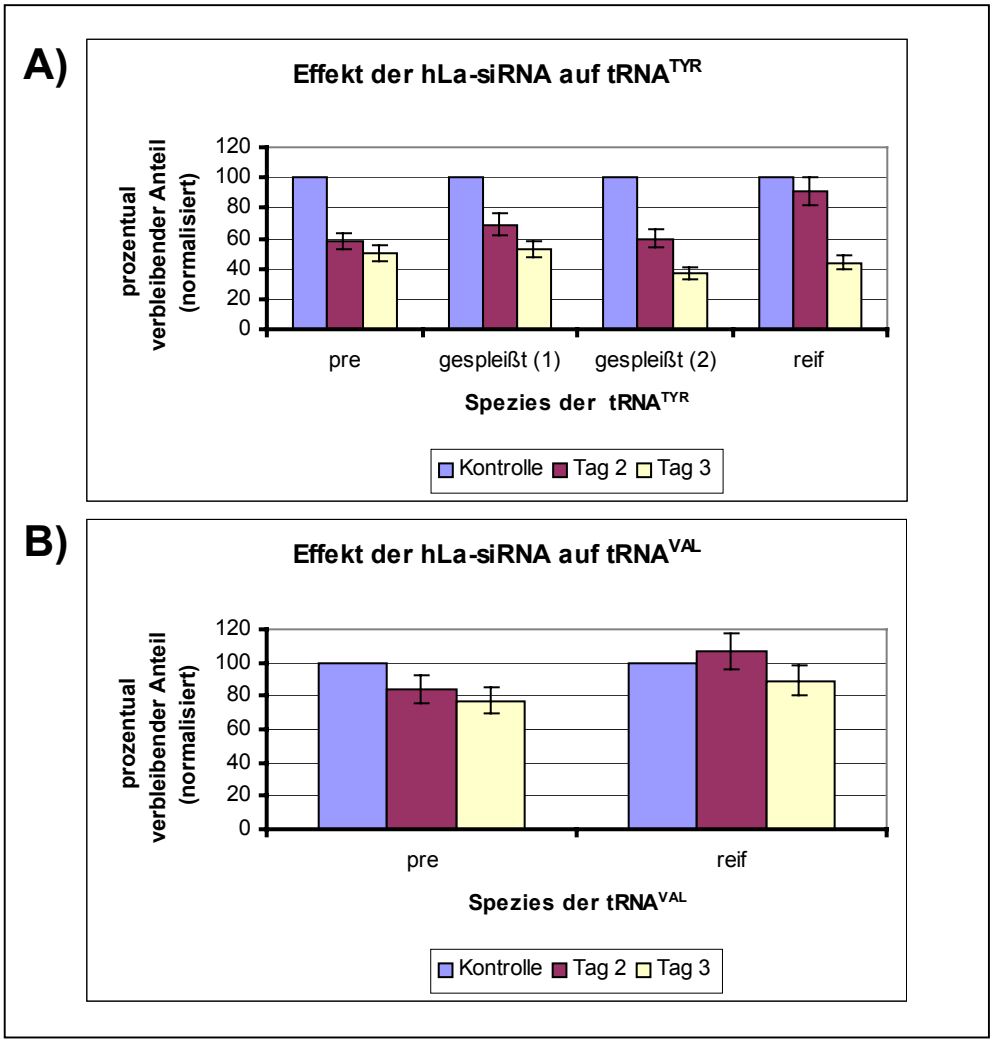


Abbildung 3.5.5-3: Die quantitative Auswertung des Effekts der α-hLa-siRNA in HeLa Zellen zeigt eine massive Reduktion endogener tRNAs. Die in Abbildung 3.5.5-2 gezeigten Northern Blots wurden wie im Methodenteil beschrieben für $tRNA^{Tyr}$ **(A)** und $tRNA^{Val}$ **(B)** quantitativ ausgewertet. Dargestellt ist der prozentual verbleibende Anteil der jeweiligen tRNA Spezies. Als Bezug („Kontrolle“) wurde der Wert zum Zeitpunkt der Transfektion als 100% eingesetzt. Die Standardabweichung zeigt die Variabilität der Doppelwerte.

Durch einen Vergleich der endogenen tRNA Spiegel in α-Luziferase-siRNA behandelten Zellen mit vollständig unbehandelten Zellen wurde gewährleistet, dass diese Methode keinen generellen Effekt auf die Expression oder Prozessierung von tRNAs ausübt, da hier vergleichbare Werte erzielt wurden (nicht gezeigt). In allen Experimenten wurde durch den Nachweis und die Quantifizierung der 5S rRNA zudem sichergestellt, dass kein genereller Effekt auf die Aktivität der RNA Polymerase III durch die α-hLa RNA-Interferenz verursacht wird (Abb. 3.5.5-2). Die Quantifizierung der oben dargestellten Northern Blots (Abb. 3.5.5-2) in Abbildung 3.5.5-3 zeigt den Effekt der α-hLa-siRNA Behandlung auf die endogenen Spiegel an tRNAs. Dazu wurden in verschiedenen Prozessierungsstufen die $tRNA^{Val}$ sowie $tRNA^{Tyr}$ detektiert. Die Tyrosin-tRNA wird im Gegensatz zur Valin-tRNA im Verlaufe der molekularen Reifung gespleißt, was folglich unterschiedliche Wege der tRNA Prozessierung darstellt.

Im Falle der $tRNA^{Tyr}$ erfolgt die Entfernung des Introns vor dem Abbau der flankierenden Sequenzen (211, 212), was im Northern Blot nachgewiesen werden kann. Folglich weist die Sonde für prä-$tRNA^{Tyr}$ nur die vollständig unprozessierte tRNA nach, während die Sonde für die reife $tRNA^{Tyr}$ neben dem reifen Molekül auch die gespleißte, aber nicht End-prozessierte $tRNA^{Tyr}$ dokumentiert, da diese Sonde den gespleißten Bereich detektiert (siehe auch Abb. 3.5.5-2, *Mitte*). Es ist nicht bekannt und auch nicht eindeutig abzuleiten, welche der zwei gespleißten aber unreifen $tRNA^{Tyr}$ Spezies in Abbildung 3.5.5-2 den 5´-*leader* und/oder 3´-*trailer* enthalten.

Die Quantifizierung der $tRNA^{Tyr}$ Signalintensitäten zeigt, dass die Runterregulierung des endogenen hLa Proteins durch RNA-Interferenz einen intensiv negativen Einfluss hat auf den Gehalt dieser tRNA. Der Spiegel an prä-$tRNA^{Tyr}$ fällt bereits am Tag 2 nach Behandlung auf unter 60% und zeigt somit sehr deutlich einen Effekt des fehlenden hLa Proteins (Abb. 3.5.5-3A). Die gespleißten Zwischenstufen sind dabei ähnlich stark vermindert. Während bei diesen unreifen $tRNA^{Tyr}$ die Wirkung auch bereits am Tag 2 belegbar ist, zeigt die Quantifizierung der reifen $tRNA^{Tyr}$ einen verzögerten Effekt an. So ist am Tag 2 noch 90% dieser tRNA nachweisbar und ein Absinken auf unter 50% des Ursprungswertes erscheint erst am Tag 3 (Abb. 3.5.5-3A). Ein durch das Fehlen des endogenen hLa Proteins verursachter, deutlicher Effekt auf die unreife $tRNA^{Tyr}$ ist damit belegt. Dieses setzt sich erst mit Verzögerung bis zur reifen $tRNA^{Tyr}$ durch, da zunächst eine Vielzahl reifer $tRNA^{Tyr}$ Moleküle in der Zelle vorliegen, welche durch ein Fehlen des hLa Proteins offensichtlich nicht mehr beeinflusst werden. Erst die fehlende Versorgung mit neuen, gereiften tRNAs zeigt die Wirkung der RNA-Interferenz auf der Ebene reifer $tRNA^{Tyr}$ Moleküle an.

Unter der Annahme, dass die Expression des endogenen La Proteins durch die siRNA-Behandlung effizient ausgeschaltet ist und keine alternativen Reifungswege für tRNAs existieren, könnte eine Bestimmung der endogenen tRNA Halbwertszeit erfolgen. Ein Rückschluss auf die Halbwertszeit der tRNAs in diesem Experiment ist jedoch nur schwer möglich, da für eine solche Quantifizierung ausschließlich siRNA-behandelte Zellen berücksichtigt werden sollten. Da hier ein Gesamt-Extrakt erstellt und nicht quantifiziert wurde, wie viel Zellen prozentual durch die siRNA-Behandlung getroffen wurden, kann diese Bestimmung nicht erfolgen. Zudem ist nicht zu bestimmen, ob in allen von der RNA-Interferenz getroffenen Zellen ein vollständiges Ausschalten des endogenen hLa Proteins bewirkt wird. Bisher ist nichts über die Halbwertszeit endogener tRNAs in humanen Zellen bekannt. Den in Abbildung 3.5.5-3 gezeigten Ergebnissen zufolge scheint es sich dabei jedoch um etwa 2 Tage zu handeln, wobei dieses aus genannten Gründen hier nicht exakt bestimmt werden kann.

Die Wirkung α-hLa RNA-Interferenz auf die $tRNA^{Val}$, welche nicht gespleißt wird (12), unterscheidet sich deutlich von eben beschriebenem Sachverhalt für die $tRNA^{Tyr}$. Unreife $tRNA^{Val}$ lässt sich am Tag 3 noch mit fast 80% des Ursprungswertes nachweisen und es zeigt sich auch ein nur geringer Effekt auf das reife, vollständig prozessierte Molekül (Abb. 3.5.5-

3B). Dieses impliziert zunächst, dass die Bedeutung des hLa Proteins für die Prozessierung von tRNAs insbesondere in Vorgängen liegt, welche ein Spleißen des Moleküls einschließen.
Dieses wurde in einem zusätzlichen Experiment analysiert. In einem weiteren, von J. Dittmann (AG T. Heise) durchgeführten Versuch wurden Huh7 Zellen mit je 50 nM oben genannter siRNAs behandelt, wobei am Tag 2,3 und 4 nach Transfektion Protein- und RNA-Extrakte erstellt wurden. Auch in diesem Experiment wurde eine spezifische Reduktion des endogenen La Proteins dokumentiert, welche dem in Abbildung 3.5.5-1 gezeigten Ergebnis gleicht (J. Dittmann, unveröffentlichte Daten). Jeweils 20 µg der entsprechenden RNA-Extrakte wurden für die hier gezeigten Analysen zur Verfügung gestellt und wie oben beschrieben analysiert (nicht gezeigt). Der Gehalt an 5S rRNA war auch dabei nicht beeinflusst durch die Runterregulierung des endogenen La Proteins. Die Quantifizierung der endogenen Spiegel an prä-tRNA^{Tyr} sowie der gespleißten Zwischenstufen zeigte am Tag 2 und 3 eine Reduktion von über 50%. Der Gehalt an reifer tRNA^{Tyr} war am Tag 3 wie in obigem Experiment auf unter 50% verringert (vgl. Abb. 3.5.5-3A). Im Gegensatz zu obigen Ergebnissen wurde jedoch ebenfalls eine 50%ige Reduktion der endogenen reifen und prä-tRNA^{Val} am Tag 2 bzw. 3 aufgezeichnet. Es bleibt daher offen, ob sich die Bedeutung des hLa Proteins in der tRNA Prozessierung nur auf gespleißte Moleküle beschränkt.
Eine weitere Beobachtung der α-hLa spezifischen siRNA Behandlung war, dass die Zellen ein deutlich verlangsamtes Wachstum aufwiesen. Es bleibt dabei ungeklärt, ob sich das Fehlen des Proteins an anderen Stoffwechselwegen oder an der Zellzyklusregulation auswirkt. Da die Aktivität der RNA Polymerase III aber nicht generell eingeschränkt wurde, wie die Kontrolle der 5S rRNA belegt, hat die Inaktivierung des endogenen La Proteins keinen generellen Effekt auf die Transkription durch die RNA Polymerase III. Daher liegt die Bedeutung des La Proteins bei der Prozessierung von tRNAs vermutlich auf einer post-transkriptionellen Ebene.

Zusammenfassend erlaubt diese Versuchsreihe die Schlussfolgerung, dass in humanen Zellen keine alternativen Stoffwechselwege existieren, welche ein Fehlen des La Proteins ausgleichen können. Dieser Sachverhalt wurde zuvor nur für andere Spezies beschrieben. Folglich ist das La Protein essentiell ist für die Prozessierung von prä-tRNAs in humanen Zellen. Ein Effekt auf die generelle Transkription durch die RNA Polymerase III war nicht feststellbar. Die Runterregulierung des endogenen La Proteins führte bei der spleiß-abhängigen Prozessierung der tRNA^{Tyr} zu einer 50%igen Reduktion des Gehalts an dieser tRNA. Demgegenüber ist der Effekt auf die nicht zu spleißende tRNA^{Val} nicht eindeutig geklärt. Es bleibt offen, ob sich die Notwendigkeit des Proteins auf Spleiß-abhängige Reifungsvorgänge von tRNAs beschränkt. Die Halbwertszeit endogener tRNAs in humanen Zellen kann nicht eindeutig bestimmt werden, beträgt aber vermutlich 2 Tage.

3.6 Subzelluläre *in vivo* Lokalisation des humanen La Proteins

In den vorausgegangenen Kapiteln wurden die Reinigung, Multimerisierung und Wechselwirkungen des hLa Proteins mit einer zellulären und viralen RNA beschrieben. Die dabei gewonnenen Ergebnisse werfen unter anderem die Frage auf, wie sich die jeweilige Änderung der Funktion *in vitro* auf die Situation in Zellkulturen *in vivo* auswirkt. Das hLa Protein befindet sich beschriebener Maßen hauptsächlich im Nukleus, aber mit merklichen Anteilen in Cytoplasma und Nukleolus (47, 48, 91). Die subzelluläre Lokalisation des Proteins wird durch verschiedene Stimuli wie virale Infektionen oder Apoptose verändert (14, 17, 175, 187). Die Funktion des Proteins liegt unter anderem in der Stabilisierung verschiedener RNA Vorläufer, während diese zum reifen Molekül prozessiert werden (1.3, 1.4, 3.5). Die prä-RNAs werden dabei an verschiedenen Stellen in der Zelle modifiziert. So z.B. werden prä-tRNAs sowohl im Nukleoplasma, als auch an der Kernmembran und dem Nukleolus prozessiert ((222), siehe 1.3), während die Reifung der snRNAs und snoRNAs im Nukleolus, Cajal-Körper sowie teilweise im Cytoplasma erfolgt (113, 145, 151, 214). Da das hLa Protein zumindest partiell während dieser Vorgänge an die jeweilige RNA bindet, deutet dies auf eine Funktions-gesteuerte und wechselnde Lokalisation des Proteins im Zellkern hin.

Mit den oben dargestellten Mutanten des hLa (3.2) lagen Varianten des Proteins vor, welche in verschiedenen Funktionen eingeschränkt waren. Aus diesem Grund lag es nahe, dass diese Proteine aufgrund gestörter Funktionen eine unterschiedliche Lokalisation in der Zelle einnehmen könnten. Um dieses zu analysieren wurden die Mutanten in einen eukaryotischen Expressionsvektor umkloniert, welcher das jeweilige Protein mit einem grün-fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert und somit die Lokalisation des entsprechenden Proteins in lebenden humanen Zellen sichtbar macht. Das methodische Vorgehen zur Umklonierung ist im Methodenteil beschrieben (2.10.2) und in der folgenden Abbildung schematisch dargestellt.

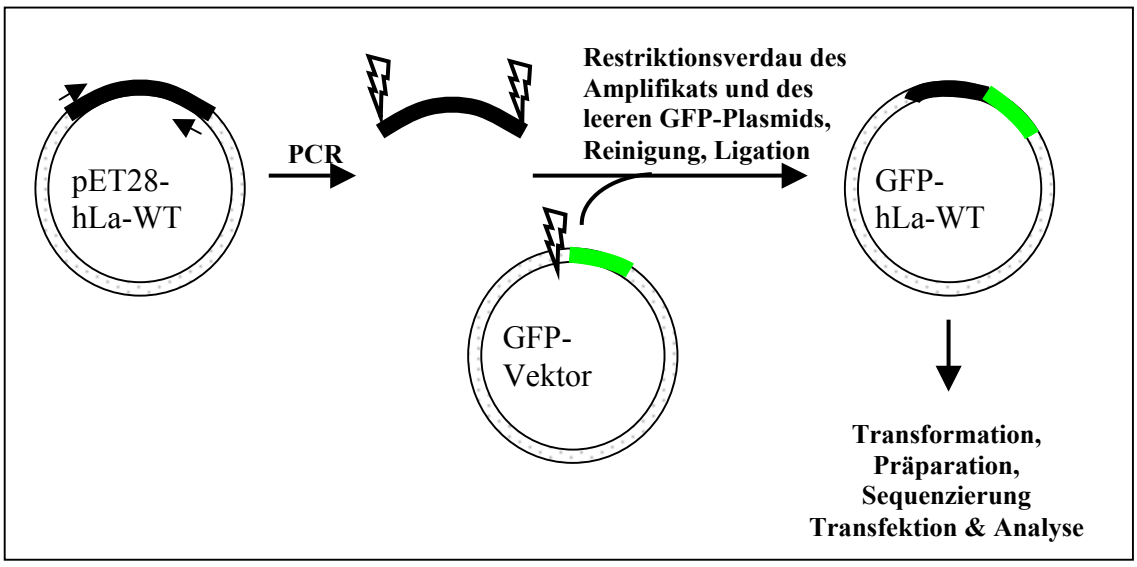


Abbildung 3.5.5-1: Schematische Darstellung der Umklonierung des hLa Proteins aus einem prokaryotischen Expressionsplasmid in einen eukaryotischen GFP-Vektor. Die Sequenz des hLa wurde aus dem prokaryotischen Plasmid pET28-hLa mittels PCR heraus amplifiziert, wobei die Oligonukleotide (*Pfeile*) Restriktionsschnittstellen aufwiesen, welche zu solchen im GFP-Vektor passten (*Blitze*). Nach entsprechendem Restriktionsverdau des neues Vektors und des Amplifikats wurden diese ligiert und in *E.*coli DH5α transformiert. Abschließend wurde das Plasmid, welches hLa als GFP Fusionsprotein exprimiert, sequenziert. Schließlich erfolgte die Transfektion in eukaryotische Zellen, um die Lokalisation des Proteins in lebenden Zellen durch Mikroskopie oder durch Immunfluoreszenzen an fixierten Zellen zu dokumentieren.

3.6.1 Vergleich zwischen endogenem hLa und transfiziertem GFP-hLa

Bevor die Lokalisation der Mutanten des humanen La Proteins analysiert werden konnte musste gewährleistet werden, dass die Fusion des hLa mit dem GFP Protein nicht zu einer veränderten subzellulären Verteilung führt. Zwar konnten dem GFP bisher in humanen Zellen keine Funktionen nachgewiesen werden, jedoch bleibt die Möglichkeit, dass das neue GFP-hLa-WT bestimmte Funktionen z.B. durch strukturelle Änderungen nicht mehr wahrnehmen kann und somit in seiner möglicherweise Funktions-bestimmten Lokalisation verändert ist. Zu diesem Zweck wurde die subzelluläre Verteilung des hLa in unbehandelten Zellen mit solchen verglichen, bei denen ein GFP-hLa-WT Plasmid transfiziert wurde. Dieses wurde für Huh7 und HeLa Zellen durchgeführt, was zu gleichen Resultaten führte.

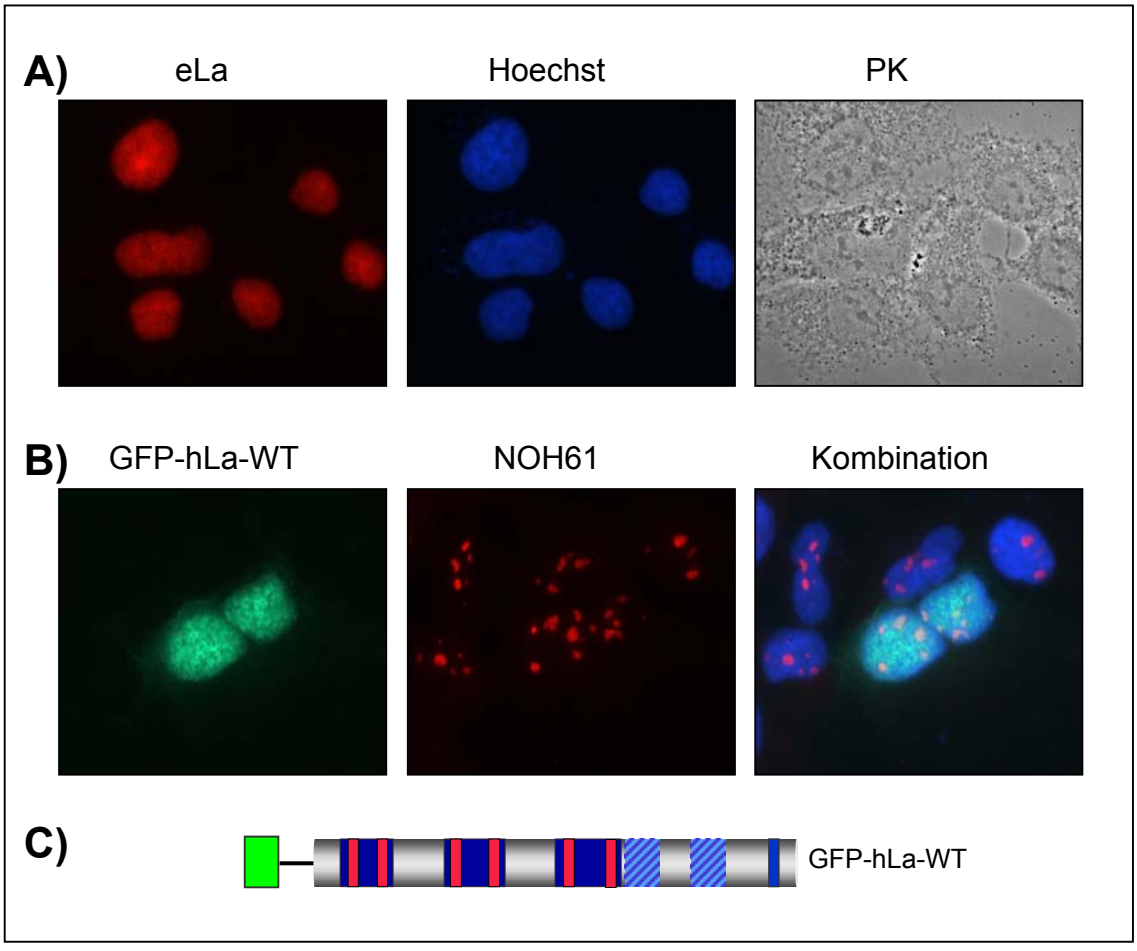


Abbildung 3.6.1-1: Die Lokalisation des transfizierten GFP-hLa-WT gleicht der des endogenen La Proteins. (A) Huh7 Zellen wurden wie im Methodenteil beschrieben fixiert. Die Detektion des endogenen La Proteins (eLa) erfolgte durch den monoklonalen α-hLa-Antikörper SW5 mit Rhodamin-gekoppeltem sekundären Antikörper und die Nukleus-spezifische Färbung der DNA mit Hoechst-Farbstoff. PK = Phasenkontrast. **(B)** Huh7 Zellen wurden mit 1 µg GFP-hLa-WT transfiziert und am Folgetag wie im Methodenteil beschrieben fixiert. Die Nukleolus-spezifische Färbung erfolgte mit einem primären α-NOH61-Antikörper und einem sekundären Rhodamin-gekoppelten Antikörper. „Kombination" zeigt eine Überlagerung der Signale für GFP-hLa-WT, NOH61 sowie eine nicht einzeln aufgeführte Hoechst-DNA-Färbung. **(C)** Schemazeichnung des GFP-hLa-WT.

Die durch indirekte Immunfluoreszenz dargestellte Lokalisation des endogenen La Proteins in humanen Zellen zeigt eine diffuse Färbung, welche durch eine parallele Färbung der DNA auf den Zellkern beschränkt werden kann (Abb. 3.6.1-1A). Eine Anreicherung des Proteins in bestimmten Regionen stellt nicht den Regelfall dar, jedoch wurde zuweilen mit dem endogenen und dem transfizierten Protein eine granulär erscheinende Verteilung beobachtet. Ebenso waren nur schwache Färbungen des Cytoplasmas festzustellen. Folglich zeigt das endogene La Protein eine überwiegend diffus-nukleäre Lokalisation. Nach Transfektion des GFP-hLa-WT exprimierenden Plasmids in Huh7 Zellen mit anschließender Analyse der Immunfluoreszenz ist sichtbar, dass dieses Fusionsprotein ebenso eine diffuse Färbung des Nukleus aufweist, was aus der parallelen Hoechst-Färbung der DNA abgeleitet werden kann (Abb. 3.6.1-1B). Zudem ist die Färbung und Lokalisation des NOH61 Proteins gezeigt, welches eine Nukleolus-spezifische Färbung bewirkt, da dieses Protein ausschließlich in diesem Kompartiment vorkommt (232). Die in Abbildung 3.6.1-1 dargestellte Verteilung des GFP-hLa-WT konnte in dieser Form auch in lebenden Zellen dokumentiert werden (siehe 3.73.7). Folglich weist das transfizierte GFP-hLa-WT die gleiche subzelluläre Lokalisation auf wie das endogene Protein und wird darin durch die Fusion mit GFP nicht verändert.

3.6.2 Lokalisation der Mutanten des humanen La Proteins

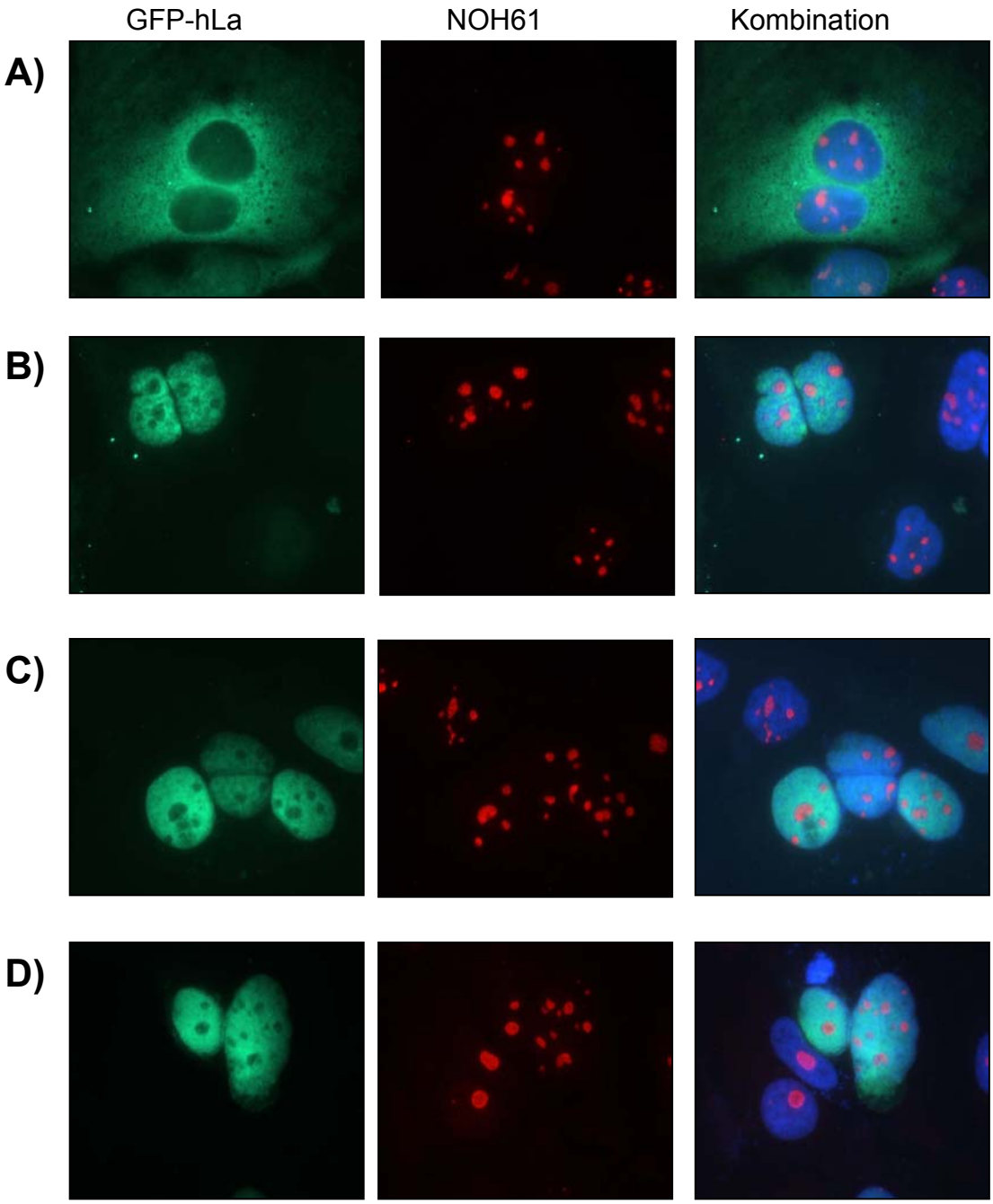
Die subzelluläre Lokalisation von Proteinen wird entweder durch spezifische Signalsequenzen oder durch eine Wechselwirkung mit anderen Proteinen, RNAs oder DNA-Sequenzen gesteuert. Sofern die Verteilung des Proteins durch die direkte Interaktion mit anderen Molekülen vermittelt wird, sind die Dauer und Art der Bindung entscheidend für ihren Einfluss. Es ist gezeigt, dass die Reifung der prä-tRNAs teilweise im Nukleolus erfolgt (24, 222). Eine Beteiligung des La Proteins an diesem Vorgang impliziert folglich eine zumindest transiente Lokalisation des Proteins in diesem Kompartiment.

Aus den Versuchen zu oben beschriebenen Mutanten (Tabelle 3.2) geht hervor, dass einige der Proteine in ihren Funktionen gegenüber dem Wildtyp eingeschränkt sind. So führt die Deletion hLa-Δ6.0 u.a. zu einem Verlust der Multimerisierungsdomäne (siehe Abb. 3.3-3) und einer reduzierten RNA-Bindung (Abb. 3.4.5-1B, 3.5.3-3A+B). Demgegenüber führen die Mutationen

im RRM2 und RRM3 in hLa-Δ2, hLa-Δ3, hLa-Δ4 und hLa-Δ5 zu einer stark oder vollständig reduzierten Bindung an HBV RNA-B2 und tRNA (siehe Abb. 3.4.5-2, 3.5.3-2). Im folgenden wurden die subzellulären Verteilungen dieser Proteine durch Immunfluoreszenzen analysiert, um eine Abhängigkeit zwischen Funktion und Lokalisation abzuleiten.
Zu diesem Zweck wurden die Mutanten mit Deletionen im C-Terminus des hLa als GFP-Fusionsproteine hergestellt. Nach Transfektion des entsprechenden Plasmids GFP-hLa-Δ6.0, GFP-hLa-Δ6.2, GFP-hLa-Δ6.3 und GFP-hLa-Δ7 in Huh7 Zellen erfolgten die Fixierung der Zellen und die spezifische Färbung des Nukleolus und der DNA wie oben beschrieben.

Aus der in Abbildung 3.6.2-2 dargestellten indirekten Immunfluoreszenz der transfizierten GFP-Plasmide für o.g. Mutanten des humanen La Proteins geht hervor, dass der C-Terminus offenbar mehrere Lokalisations-Signale enthält. Während GFP-hLa-WT eine diffuse Lokalisation im Nukleus aufwies (siehe Abb. 3.6.1-1B), wurde dieses durch die Mutation GFP-hLa-Δ7 entscheidend verändert. Mit diesem Protein wurde eine ausschließlich cytoplasmatische Lokalisation beobachtet (Abb. 3.6.2-1A). Folglich enthält der in dieser Mutation deletierte Bereich des Proteins ein aktives, funktionelles Nukleus Lokalisations-Signal. Dieses ist in Übereinstimmung mit den von Simons et al. beschriebenen Daten (191), welche ebenfalls ein NLS in dieser Region identifizierten. Zwar ist in dieser Deletion die hauptsächlich beschriebene Phosphorylierungs-Stelle Serin-366 deletiert, doch die Phosphorylierung des hLa beeinflusst nicht die subzelluläre Verteilung (30) und verursacht somit nicht die geänderte Lokalisation des GFP-hLa-Δ7.

Abbildung 3.6.2-1: Die C-terminale Region des La Proteins enthält verschiedene Lokalisations-Signale. Huh7 Zellen wurden mit je 1 µg GFP-hLa-Δ7 **(A)**, GFP-hLa-Δ6.0 **(B)**, GFP-hLa-Δ6.2 **(C)** oder GFP-hLa-Δ6.3 **(D)** transfiziert, am Folgetag fixiert und mit primärem monoklonalen α-NOH61 und sekundärem, Rhodamin-gekoppelten Antikörper sowie mit Hoechst-Färbereagenz wie im Methodenteil beschrieben inkubiert. Die Reihen für die GFP-Signale (*links*) sowie die NOH61-Signale (*mittig*) sind oberhalb angegeben. „Kombination" (*rechts*) zeigt die Überlagerung der Signale für GFP, NOH61 sowie die nicht einzeln aufgeführte Hoechst-Färbung. **(E)** Schemazeichnung der benutzten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp; die deletierten Aminosäuren sind angegeben.


GFP-hLa
NOH61
Kombination
A)
B)
C)
D)
E)
RRM1
RRM2
RRM3
NoLS
Dimer.
NLS
GFP-hLa-WT
GFP-hLa-Δ6.0 (Δaa 274-354)
GFP-hLa-Δ6.2 (Δaa 291-354)
GFP-hLa-Δ6.3 (Δaa 323-354)
GFP-hLa-Δ7 (Δaa 353-393)

Im Falle der Mutanten GFP-hLa-Δ6.0, GFP-hLa-Δ6.2 und GFP-hLa-Δ6.3 zeigt sich eine entscheidend veränderte Lokalisation gegenüber dem Wildtyp und auch gegenüber der Mutation GFP-hLa-Δ7. Wie aus den entsprechenden GFP-Signalen ersichtlich ist, zeigen diese Mutanten keine Lokalisation im Cytoplasma und ausschließlich eine diffuse Färbung des Nukleoplasmas an. Andererseits sind bestimmte Regionen im Kern ausgespart, in denen keines der mutierten Proteine detektierbar war (Abb. 3.6.1-1B-D). Durch die Co-Lokalisation mit dem Nukleolus-spezifischen Protein NOH61 (232) konnten diese Regionen als Nukleolus identifiziert werden. Demnach ist in der insgesamt deletierten Region aa 274 – 354, welche den Mutanten GFP-hLa-Δ6.0, GFP-hLa-Δ6.2 und GFP-hLa-Δ6.3 gemein ist, ein potentielles NoLS enthalten, welches den Eintritt oder den Transport in den Nukleolus ermöglicht. Ein solches Nukleolus Lokalisations-Signal (NoLS) wurde bisher für das humane La Protein nicht beschrieben und stellt damit eine neue Erkenntnis in der Domänen-Organisation des hLa dar. Aufgrund der Tatsache, dass auch die kürzeste dieser Deletionen in GFP-hLa-Δ6.3 zu diesem Phänotyp führt, kann die Position des potentiellen NoLS auf den Bereich der in diesem Mutanten deletierten Aminosäuren 323 – 354 eingegrenzt werden. Diese Region enthält das WAM und stellt zudem eine Arginin/Lysin-reiche Sequenz dar.

Wie an anderer Stelle gezeigt (siehe Abb. 3.3-3) führt die Mutation hLa-Δ6.0 zu einem Verlust der Multimerisierungsdomäne und zu einer monomeren Konformation des Proteins. Da die Mutanten hLa-Δ6.2 und hLa-Δ6.3 wie das Wildtyp-Protein Multimere ausbilden, wurde diese funktionelle Domäne auf die in hLa-Δ6.0 deletierten Aminosäuren 274 – 291 eingegrenzt. Aufgrund der Tatsache, dass GFP-hLa-Δ6.0 in den Nukleus transportiert wird kann die Funktion der Multimerisierung für den Transport in den Kern ausgeschlossen werden. Gleiches gilt für den Eintritt in den Nukleolus, so dass die Funktion der Multimerisierung ohne offensichtlichen Einfluss ist auf die Lokalisation des Proteins. Des weiteren kann die Bindung an RNA über diesen C-terminalen Bereich als Signal für den Transport in den Nukleus oder Nukleolus ausgeschlossen werden. Diese drei Proteine zeigen den gleichen Phänotyp, jedoch wurde für die Mutationen hLa-Δ6.0 und hLa-Δ6.2 eine erheblich reduzierte RNA-Bindungsaktivität nachgewiesen, wohingegen die Mutation hLa-Δ6.3 gegenüber dem Wildtyp nur zu einer geringen Reduktion dieser Funktion führte (siehe Abb. 3.4.5-1A+B und Abb. 3.5.3-3A+B).

Daran anschließend wurde überprüft, ob andere Regionen und/oder die Funktion der RNA-Bindung über andere Motive des hLa zur subnukleären Lokalisation des Proteins beitragen. Zu diesem Zweck wurden die Mutationen der verschiedenen RRMs als GFP-Fusionsproteine in humane Huh7 Zellen transfiziert und ihre Lokalisation wie oben beschrieben analysiert.

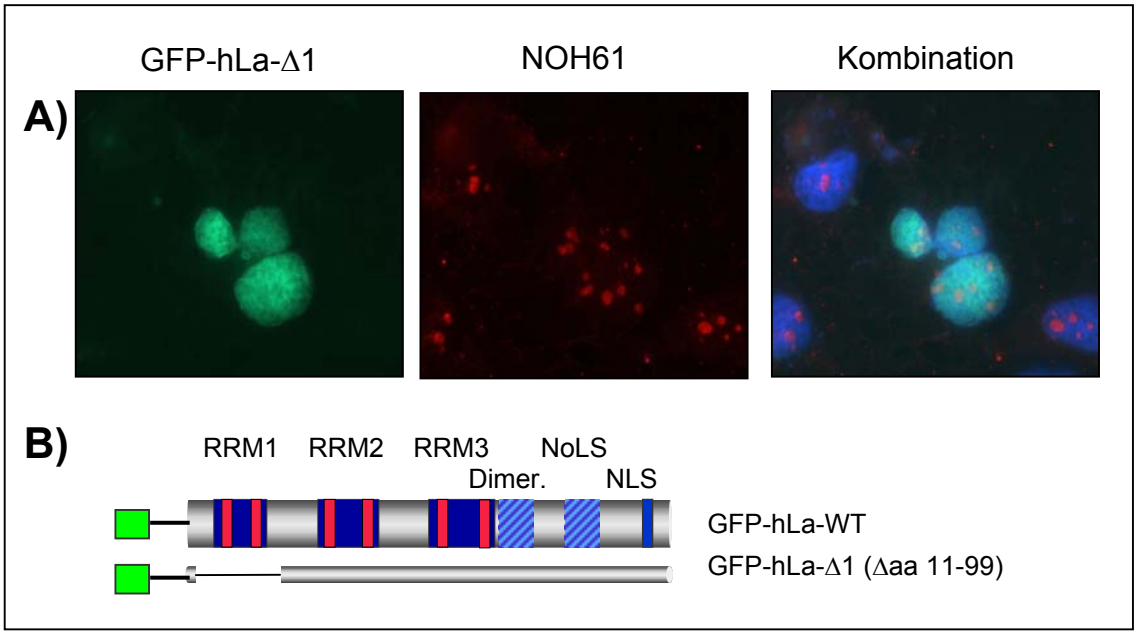
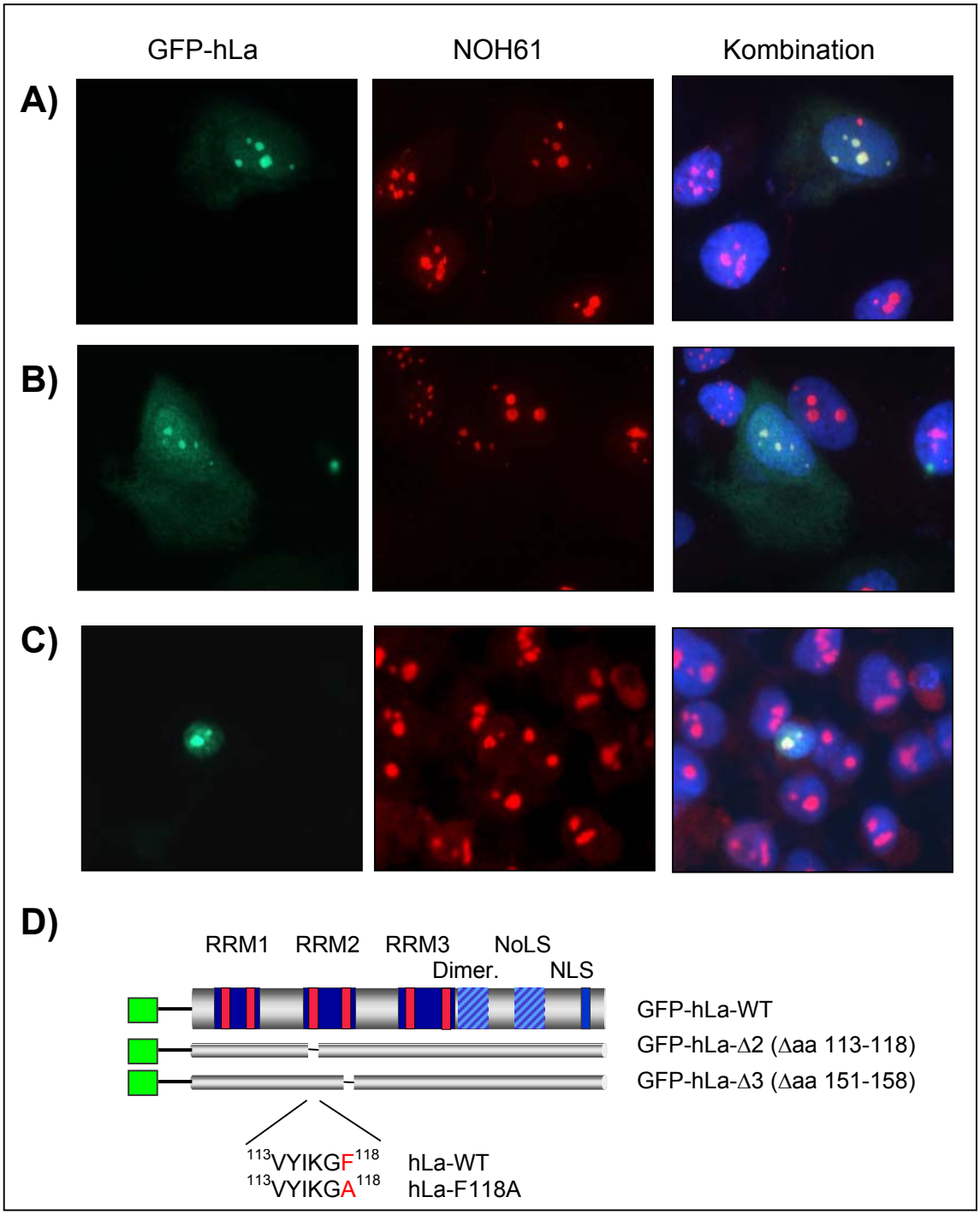


Abbildung 3.6.2-2: Das RRM1 trägt nicht zur subzellulären Lokalisation des hLa Proteins bei. Huh7 Zellen wurden mit 1 µg GFP-hLa-Δ1 **(A)** transfiziert, am Folgetag fixiert und mit primärem monoklonalen α-NOH61 und sekundärem, Rhodamin-gekoppelten Antikörper sowie mit Hoechst-Färbereagenz wie im Methodenteil beschrieben inkubiert. Die Positionen für das GFP-Signal (*links*) sowie das NOH61-Signal (*mittig*) sind oberhalb angegeben. „Kombination" (*rechts*) zeigt die Überlagerung der Signale für GFP, NOH61 sowie die nicht einzeln aufgeführte Hoechst-Färbung. **(B)** Schemazeichnung des benutzten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp; die deletierten Aminosäuren sind angegeben.

In der indirekten Immunfluoreszenz mit der Mutation GFP-hLa-Δ1 zeigt sich eine diffuse Lokalisation des Proteins im Nukleus, welche mit der des GFP-hLa-WT vergleichbar ist (vergleiche Abb. 3.6.2-2 mit 3.6.1-1B). Obwohl ein zuweilen granuläres Erscheinungsbild wie auch mit GFP-hLa-WT auffiel, war eine Akkumulation oder ein Fehlen in bestimmten Regionen nicht zu beobachten. Für GFP-hLa-Δ1 wurde keine cytoplasmatische Lokalisation festgestellt. Folglich trägt das RRM1 nicht zur Lokalisation des hLa bei. Da unter den gewählten Versuchsbedingungen keine reduzierte RNA-Bindungsaktivität gegenüber dem hLa-WT festzustellen war (siehe Abb. 3.4.5-2 und 3.5.3-2), ist die durch diese Region vermittelte RNA-Bindungsaktivität nicht von Bedeutung für die subzelluläre Verteilung des Proteins.

Abbildung 3.6.2-3: Das RRM2 ist von entscheidender Bedeutung für die Lokalisation des hLa. Huh7 Zellen wurden mit je 1 µg GFP-hLa-Δ2 **(A)**, GFP-hLa-F118A **(B)** oder GFP-hLa-Δ3 **(C)** transfiziert, am Folgetag fixiert und mit primärem monoklonalen α-NOH61 und sekundärem, Rhodamin-gekoppelten Antikörper sowie mit Hoechst-Färbereagenz wie im Methodenteil beschrieben inkubiert. Die Reihen für die GFP-Signale (*links*) sowie die NOH61-Signale (*mittig*) sind oberhalb angegeben. „Kombination" (*rechts*) zeigt die Überlagerung der Signale für GFP, NOH61 sowie die nicht einzeln aufgeführte Hoechst-Färbung. **(D)** Schemazeichnung der benutzten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp; die deletierten bzw. mutierten Aminosäuren sind angegeben. Für GFP-hLa-F118A ist lediglich die Sequenz des RNP-2 im RRM2 gezeigt und die vom GFP-hLa-WT unterscheidbare Bereich (*rot*) angedeutet.



Die in Abbildung 3.6.2-3 dargestellte indirekte Immunfluoreszenz der Mutanten GFP-hLa-Δ2, GFP-hLa-F118A und GFP-hLa-Δ3 zeigt, dass das RRM2 oder dessen Funktion entscheidend für die Lokalisation des Proteins ist. Eine Mutation in diesem Motiv führt zu einer starken Akkumulation der jeweiligen Proteine in bestimmten Arealen im Nukleus (Abb. 3.6.2-3A-C). Durch die Co-Lokalisation mit NOH61 ist belegt, dass es sich bei diesen Strukturen um die Nukleoli handelt. Diese Anhäufung der Proteine mit Mutationen im RRM2 wurde auch bei lebenden Zellen dokumentiert (siehe 3.73.7). Folglich führen Mutationen im RRM2 dazu, dass das Protein den Nukleolus nicht oder zumindest gegenüber dem Wildtyp erheblich verlangsamt verlässt. Eine veränderte subnukleäre Verteilung aufgrund potentieller Strukturänderungen

durch die Mutationen kann nahezu ausgeschlossen werden, da die Punktmutation GFP-hLa-F118A ebenso wie die internen Deletionen GFP-hLa-Δ2 und GFP-hLa-Δ3 den gleichen Phänotyp aufweist.

Da diesen Mutanten des hLa Proteins in obigen Versuchsreihen eine erheblich reduzierte bzw. nicht mehr messbare RNA-Bindungsaktivität nachgewiesen wurde (siehe Abb. 3.4.5-2A-C und 3.5.3-2A), kann geschlussfolgert werden, dass die Wechselwirkung mit RNAs oder anderen Molekülen über das RRM2 für das Verlassen des Nukleolus notwendig ist.

Ein toxischer Effekt der exogen exprimierten Mutanten, welcher die veränderte Lokalisation bewirken könnte, wurde nicht festgestellt. Jedoch waren Transfektionen dieser mutierten Proteine stets von geringen Expressionsraten begleitet. Zudem wurde bei den Mutationen GFP-hLa-Δ2 und GFP-hLa-F118A teilweise eine schwache cytoplasmatische Färbung festgestellt (siehe Abb. 3.6.2-3A+B), was möglicherweise auf einen partiell beeinflussten Import in den Zellkern hindeuten kann. Dieses impliziert eine Beteiligung des RRM2 am Kernimport durch die Bindung von RNAs oder anderen Molekülen.

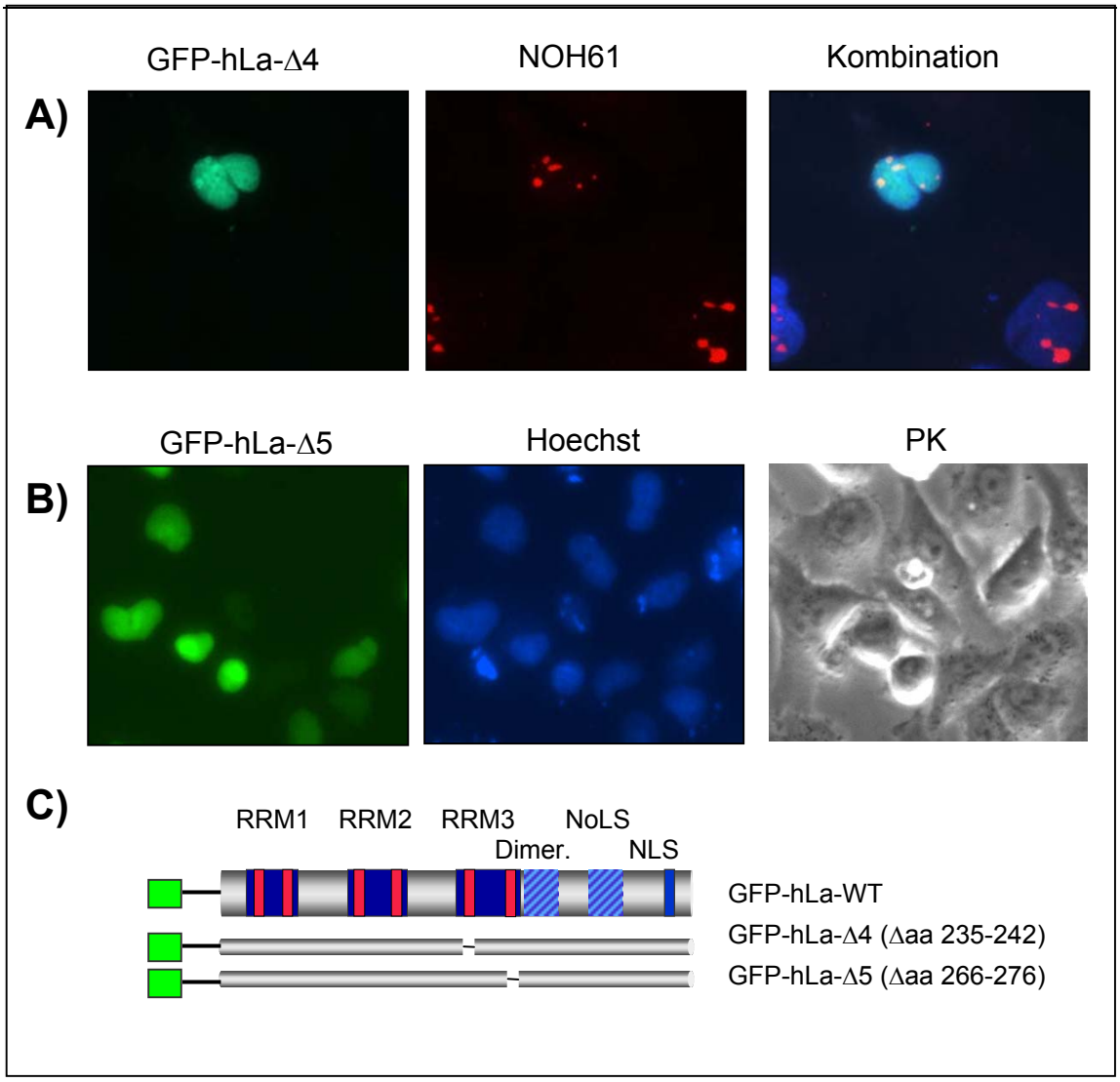


Abbildung 3.6.2-4: Das RRM3 ist von geringerer Bedeutung für die subzelluläre Lokalisation des hLa. Huh7 Zellen wurden mit 1 µg GFP-hLa-Δ4 **(A)** transfiziert, am Folgetag fixiert und mit primärem monoklonalen α-NOH61 und sekundärem, Rhodamin-gekoppelten Antikörper sowie mit Hoechst-Färbereagenz wie im Methodenteil beschrieben inkubiert. Die Reihe für das GFP-Signal (*links*) sowie das NOH61-Signal (*mittig*) sind oberhalb angegeben. „Kombination" (*rechts*) zeigt die Überlagerung der Signale für GFP, NOH61 sowie die nicht einzeln aufgeführte Hoechst-Färbung. **(B)** Huh7 Zellen wurden mit 1 µg GFP-hLa-Δ5 transfiziert. Gezeigt sind die Aufnahmen an lebenden Zellen am Folgetag, denen zuvor Hoechst-Färbereagenz zur Visualisierung der Nuklei (bzw. DNA) ins Medium zugesetzt wurde. PK = Phasenkontrast. **(C)** Schemazeichnung der benutzten Mutanten im Vergleich zum Wildtyp; die deletierten bzw. mutierten Aminosäuren sind angegeben.

Bei einer internen Deletion des RNP-2 im RRM3 in der Mutation GFP-hLa-Δ4 war keine cytoplasmatische Färbung feststellbar (Abb. 3.6.2-4A). Die Verteilung innerhalb des Nukleus zeigt ein nicht immer einheitliches Bild. So ist in einigen Fällen eine Akkumulation des Proteins in Nukleoli zu beobachten., welche in etwa der oben für das RRM2 beschriebenen Daten entspricht (Abb. 3.6.2-3A). Demgegenüber zeigte sich teilweise eine diffuse Verteilung im Nukleus, welche mit den für GFP-hLa-WT genannten Ergebnissen übereinstimmt (Abb. 3.6.1-1B). Folglich kann nicht genau bestimmt werden, ob das RNP-2 im RRM3 oder dessen Funktion einen Einfluss auf die subnukleäre Verteilung des hLa Proteins hat. Andererseits ist nicht auszuschließen, dass bestimmte Stimuli die Verteilung des Proteins beeinflussen, welche ihrerseits durch Funktionen dieses Motivs gesteuert werden können.

Die Lokalisation des GFP-hLa-Δ5 mit der internen Deletion im RNP-1 des RRM3 ist in Abbildung 3.6.2-4B an lebenden Zellen gezeigt. Da die subzelluläre Verteilung dieses Proteins der des GFP-hLa-WT entsprach, wurden keine chemischen Fixierungen der Zellen vorgenommen. Zudem war das Bild einheitlicher als mit eben beschriebener Mutation GFP-hLa-Δ4 im RNP-2 dieses Motivs. Folglich ist die RNP-1 Sequenz im RRM3 oder ihre Funktion nicht beitragend zur Lokalisation des Proteins im Nukleus.

Es kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass das hLa Protein eine diffuse Verteilung im Nukleus aufweist. Das RRM1 ist von keiner und das RRM3 von minderer Bedeutung für die subnukleäre Lokalisation des hLa, wohingegen das RRM2 entscheidend zur Verteilung beiträgt. Mutationen im diesem Motiv führen zu einer Akkumulation des Proteins im Nukleolus. Die Korrelation der Immunfluoreszenz *in vivo* mit den RNA-Bindungsstudien *in vitro* impliziert, dass die Bindung von RNA (oder anderen Molekülen) über das RRM2 essentiell ist für das Verlassen des Nukleolus. Im Gegensatz dazu hat die Multimerisierung keinen Einfluss auf die subzelluläre Verteilung. Zusätzlich ist gezeigt, dass die Aminosäuren 323 – 354 ein potentielles NoLS darstellen, da ein Fehlen dieser Sequenz zu einem Ausschluss aus dem Nukleolus führt. Diese Domäne des hLa wurde bisher nicht entdeckt und ist in dieser Arbeit erstmalig beschrieben.

3.6.3 Die *in vivo* Funktionalität des hLa-NoLS: Fusion des Signals mit PTB-GFP

Eine Deletion der Aminosäuren 323 – 354 in GFP-hLa-Δ6.3 führt zu einem Ausschluss des Proteins aus dem Nukleolus (Abb. 3.6.2-1C), was die Funktion eines potentiellen NoLS dieser Region impliziert. Um auszuschließen, dass dieser Effekt durch eine Änderung der Struktur des Proteins aufgrund der Mutation ausgelöst wird und um zu analysieren, ob dieses Signal in einem heterologen Kontext seine Funktion behält, wurde diese Sequenz mit einem anderen Protein fusioniert. Dazu wurde das *Polypyrimidin-tract-binding-protein* (PTB) benutzt, welches ein im Nukleoplasma aber nicht in Nukleoli nachweisbares Protein ist (134) und in der Arbeitsgruppe bereits als ein GFP Fusionsprotein vorlag. Für diesen Zweck wurden die Aminosäuren 323 – 354 mittels PCR aus einem Plasmid mit hLa-WT Sequenz amplifiziert und nach entsprechendem Restriktionsverdau in einem ebenfalls mittels Restriktionsverdau linearisierten PTB-GFP-Vektor einkloniert (siehe 2.10.3). Das Klonierungsschema entspricht dabei in Anlehnung dem in Abbildung 3.6-1 gezeigten Vorgehen. Nach entsprechender Klonierung, Präparation und Sequenzierung wurden die jeweiligen Plasmide in HeLa Zellen transfiziert und wie oben beschrieben analysiert. Die Proteine werden dabei entsprechend als PTB-GFP und hLa-NoLS-PTB-GFP bezeichnet.

Die indirekte Immunfluoreszenz mit PTB-GFP belegt eine diffuse Lokalisation des PTB Proteins im Nukleoplasma (Abb.3.6.3-1A). Zudem sind Regionen sichtbar, welche kein GFP-Signal aufweisen und folglich anzeigen, dass das Protein nicht in diese Areale transportiert wird. Durch die Co-Lokalisation mit NOH61 wurden diese Regionen als Nukleoli identifiziert. Diese Ergebnisse sind im Einklang mit zuvor publizierten Daten für das PTB Protein (134).

Durch oben beschriebene Klonierungsstrategie wurde das potentielle NoLS des hLa N-terminal mit dem PTB-GFP fusioniert. Wie aus Abbildung 3.6.3-1B hervorgeht, wird dieses Fusionsprotein erfolgreich in den Nukleolus transportiert und akkumuliert dort. Dieses Ergebnis belegt, dass es sich bei den Aminosäuren 323 – 354 des hLa um ein funktionelles NoLS handelt, und bestätigt die für GFP-hLa-Δ6.3 beschriebenen Ergebnisse, wo ein Fehlen des NoLS zum Ausschluss aus dem Nukleolus führte (siehe Abb. 3.6.2-1C). Zudem wirkt diese Sequenz auch in einem heterologen Kontext als NoLS, da durch dieses Signal ein anderes Protein in den Nukleolus transportiert wird, welches normalerweise nicht in diesem Kompartiment vorkommt.

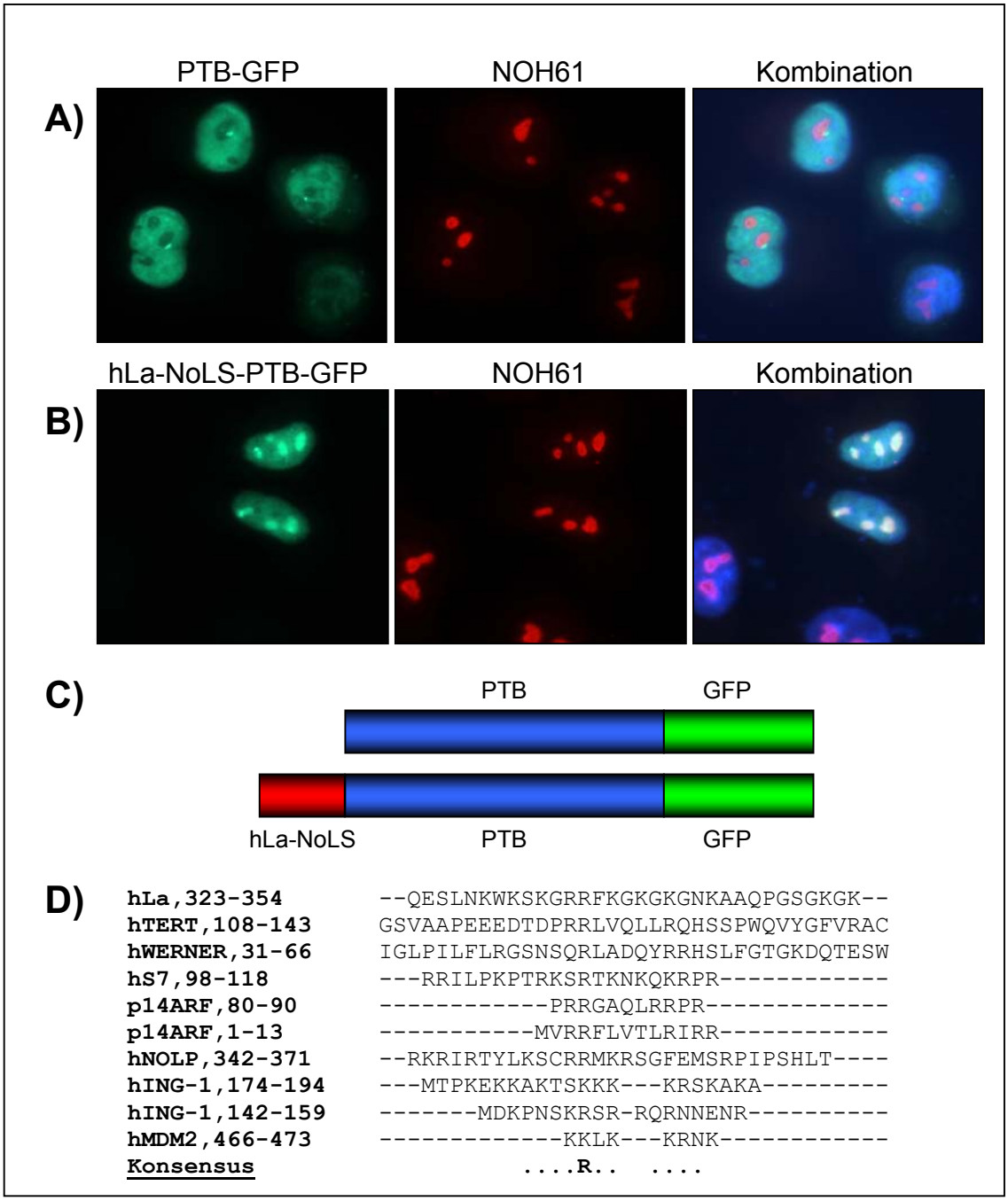


Abbildung 3.6.3-1: Die Aminosäuren 323 – 354 des hLa repräsentieren ein funktionelles NoLS. HeLa Zellen wurden mit 1 µg PTB-GFP **(A)** oder hLa-NoLS-PTB-GFP **(B)** transfiziert, am Folgetag fixiert und mit primärem monoklonalen α-NOH61 und sekundärem, Rhodamin-gekoppelten Antikörper sowie mit Hoechst-Färbereagenz wie im Methodenteil beschrieben inkubiert. Die Reihe für das GFP-Signal (*links*) sowie das NOH61-Signal (*mittig*) sind oberhalb angegeben. „Kombination" (*rechts*) zeigt die Überlagerung der Signale für GFP, NOH61 sowie die nicht einzeln aufgeführte Hoechst-Färbung. **(C)** Schemazeichnung der in (A) und (B) benutzten Proteine. Dabei stehen die Längen der einzelnen (Teil-)Proteine nicht in Relation zur ihrem realen Verhältnis. **(D)** Die Sequenzen verschiedener NoLS wurden in einem Sequenzvergleich einander gegenübergestellt. Neben dem hLa-NoLS wurden folgende Proteine benutzt: katalytische Untereinheit der humanen Telomerase (hTERT), Werner-Syndrom Protein (hWERNER), ribosomales Protein S7 (hS7), p14ARF, NOLP, ING-1 und MDM-2 (siehe Text für Referenzen). Für hTERT und hWERNER wurden die jeweils kompletten Sequenzen des NoLS für das *alignment* benutzt, aber nur relevante Regionen sind gezeigt. Das *alignment* und die Erstellung der Konsensus-Sequenz erfolgten mittels *ClustalW-alignment*, eingebettet in die MacVector-7.0 Software. Aminosäuren sind im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben; Nummerierungen zeigen die Aminosäureposition der Proteine; Punkte in der Konsensus-Sequenz bezeichnen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften.

Die Akkumulation des hLa-NoLS-PTB-GFP in Nukleoli war in lebenden Zellen nicht in allen Fällen derart intensiv, wie dieses aus obiger Abbildung hervorgeht. Jedoch wurde immer ein eindeutiger Transport dieses Fusionsproteins in den Nukleolus beobachtet. In einem parallelen Versuch wurde das hLa-NoLS zwischen die Sequenz des PTBs und GFPs kloniert (=PTB-hLa-NoLS-GFP). In diesem Konstrukt konnte ebenfalls ein Transport des Fusionsproteins in die Nukleoli beobachtet werden, wenn auch mit einer weniger intensiven Akkumulation (nicht gezeigt).

Im Gegensatz zu einer Reihe anderer Signale, welche den Einstrom in membranumschlossene Kompartimente wie das endoplamatische Reticulum oder den Nukleus bewirken (147, 190), ist für das NoLS keine Konsensus-Sequenz bekannt, welche die Lokalisation eines Proteins in den nicht-membranumschlossenen Nukleolus vermittelt. Um einen Hinweis auf mögliche Gemeinsamkeiten verschiedener NoLS zu bekommen, wurde eine Gegenüberstellung verschiedener NoLS-Sequenzen als Sequenzvergleich („*alignment*“) durchgeführt (Abb. 3.6.3-1D). Dazu wurden verschiedene NoLS Sequenzen humaner Proteine benutzt, wie jene aus der katalytischen Untereinheit der Telomerase, aus dem Werner-Syndrom Protein, aus dem ribosomalen Protein S7, sowie aus p14ARF, NOLP, ING-1 und MDM-2 (11, 55, 119, 172, 182, 208, 215). Wie in der Abbildung dargestellt ist, kann keine eindeutige Konsensus-Sequenz erstellt werden. Folglich liefert der gezeigte Vergleich der NoLS-Sequenzen verschiedener humaner Proteine keine Übereinstimmung in der Primärstruktur dieser Signale. Als einzige Gemeinsamkeit wurde gefunden, dass alle gezeigten NoLS-Regionen Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften aufweisen. Dabei handelt es sich überwiegend um polare und basische Aminosäuren, welche bezüglich ihrer räumlichen Position stark zu einer externen oder ambivalenten Orientierung neigen. Schlussendlich kann hier für ein humanes NoLS keine Konsensus-Sequenz aufgestellt werden, wobei dem Signal jedoch Aminosäuren mit basischen und extern orientierten Resten zugeordnet werden können.

3.7 Untersuchungen zur *in vivo* Mobilität des hLa Proteins durch FRAP-Experimente

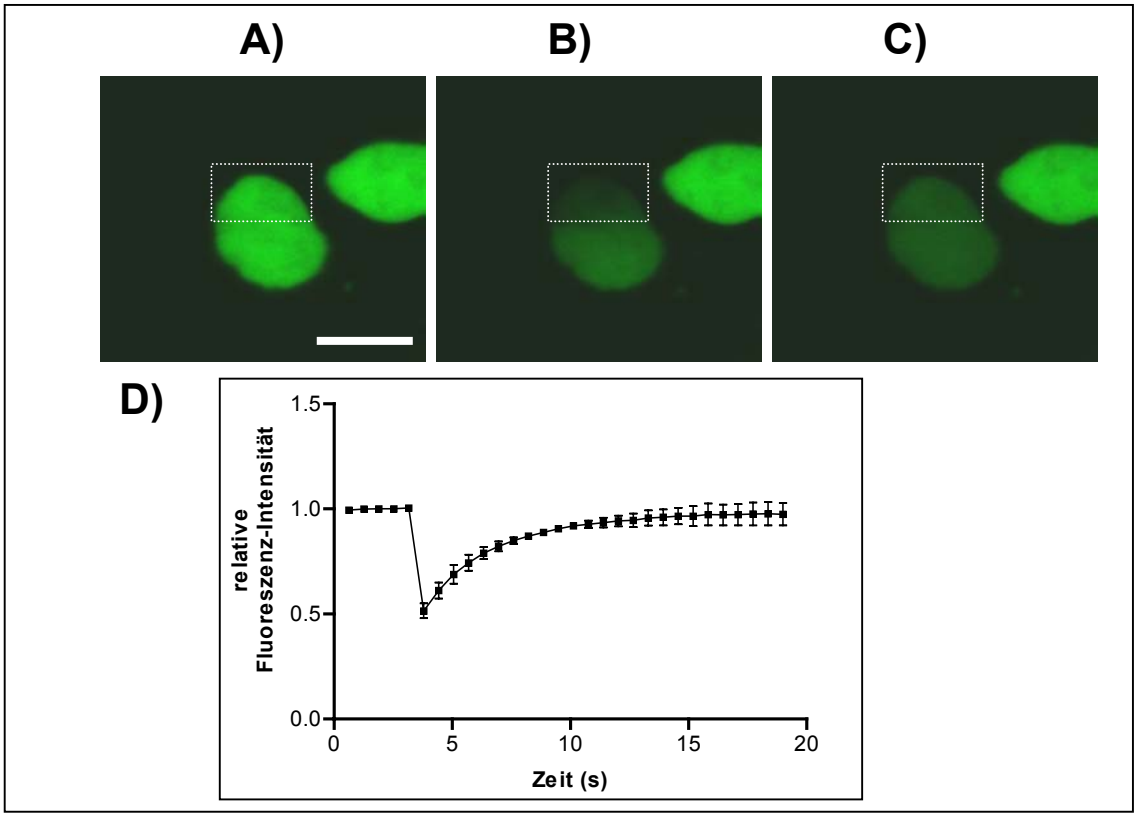
In oben beschriebenen Abschnitten ist dargestellt, welche Domänen des hLa Proteins zur Multimerisierung und zur RNA Bindung beitragen, wie sich diese Regionen und ihre Funktionen auf die subzelluläre Verteilung des Proteins auswirken und wo sich das neu identifizierte NoLS befindet. Da sich die Lokalisation von Proteinen unter anderem aus der Art und Dauer der Wechselwirkung mit anderen Molekülen ergibt, besteht die Möglichkeit, dass einige der Mutationen die Mobilität des hLa in der Zelle beeinflussen. Der Aufbau der Strukturen im Nukleus, wie auch die Bewegung einer Vielzahl von analysierten Proteinen

einschließlich des GFPs, erfolgt im Zellkern mittels freier Diffusion (116, 138, 161). Gleiches gilt vermutlich auch zumindest partiell für das Cytoplasma (137). Demgegenüber konnte gezeigt werden, dass die Mobilität von Proteinen im Nukleoplasma veränderbar ist und sich durch die Wechselwirkung mit anderen Molekülen ergibt (95). Eine veränderte Mobilität des hLa im Nukleus ist daher aufgrund einer gestörten RNA-Bindung oder Multimerisierung in den jeweiligen Mutationen möglich. Andererseits könnte sich die veränderte Lokalisation einiger Mutanten (siehe 3.6.2) aus einer unterschiedlichen Mobilität der jeweiligen Proteine ergeben. Um zu prüfen, wie die Mobilität des GFP-hLa-WT im Nukleus ist und ob diese durch die Mutationen verändert wird, wurden FRAP- (*fluorescence recovery after photobleaching*-) Experimente durchgeführt.

Für diese Technik wurden die verschiedenen hLa Proteine mit einer GFP-Fluoreszenz-Markierung in Zellen exprimiert. Für die Analyse an lebenden Zellen mit einem konfokalen Mikroskop wird die Fluoreszenz-Intensität in einer ausgewählten Zelle zunächst aufgezeichnet, bevor in einer bestimmten Flächenregion wie z.B. in einem Teilgebiet des Nukleoplasmas das Fluoreszenz-Signal durch einen hochenergetischen Laserstrahl zerstört wird. Anschließend wird die Fluoreszenz in dieser Region über einen bestimmten Zeitraum weiter aufgezeichnet und darüber bestimmt, mit welcher Geschwindigkeit neues Fluoreszenz-Signal in diese Region einströmt. Daraus lässt sich schließlich die Mobilität des untersuchten Proteins bestimmen (siehe auch (96)). Dabei ist anzumerken, dass lediglich das Fluoreszenz-Signal des betroffenen Proteins zerstört wird, nicht aber das Protein selbst oder dessen Funktion bzw. Lokalisation (96).

Für die FRAP-assays wurden die Proteine GFP-hLa-WT, GFP-hLa-Δ2, GFP-hLa-F118A und GFP-hLa-Δ6.3 gewählt. Dabei dient das Wildtyp Protein als Bezug zur Standard-Situation, während die Mutationen Δ2 und F118A zu einer Akkumulation im Nukleolus führen und der Mutation Δ6.3 das NoLS fehlt (Abb. 3.6.1-1, 3.6.2-1D, 3.6.2-3A+B). Nach Transfektion dieser Plasmide in HeLa Zellen erfolgte die Bestimmung der Mobilität *in vivo* am Folgetag.

Abbildung 3.6.3-1: FRAP-assays mit GFP-hLa-WT zeigen eine Diffusions-gesteuerte Mobilität des Proteins. HeLa Zellen wurden mit 1 µg GFP-hLa-WT transfiziert und am Folgetag auf die Mobilität des Proteins im FRAP-Experiment analysiert. Dazu wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 657 ms Aufnahmen vor und nach dem Bleichen durch den Laserstrahl gemacht. Gezeigt ist die Zelle vor dem Bleichen **(A)**, unmittelbar danach **(B)** sowie am Ende der Aufzeichnung **(C)**. Die gebleichte Flächenregion ist durch ein gestricheltes Kästchen angedeutet. Maßstabsbalken = 10 µm. Teil **(D)** zeigt die Quantifizierung der Signale, welche als relative Fluoreszenz-Intensität I_{rel} (*Y-Achse*) gegen die Zeit in Sekunden (*X-Achse*) aufgetragen ist. Dieses ergibt die Geschwindigkeit der Wiederherstellung der Fluoreszenz-Intensität, anhand derer die Mobilität des Proteins berechnet wird (siehe 2.13.5 für detaillierte Angaben zur Auswertung).



In Abbildung 3.7-1 ist die Analyse der Mobilität des GFP-hLa-WT in lebenden Zellen durch FRAP-Experimente dargestellt. Wie in den Immunfluoreszenzen an chemisch fixierten Zellen zeigt das Protein in lebenden Zellen eine diffuse Lokalisation im Nukleus (vergleiche Abb. 3.6.1-1B und 3.7-1A). Durch einen Laserimpuls in einer ausgewählten Flächenregion im Nukleoplasma wurde das GFP-Signal an dieser Stelle zerstört (siehe 3.7-1B) und der Wiedereinstrom neuen GFP-hLa-WT Fluoreszenz-Signals in Abhängigkeit von der Zeit aufgezeichnet. Hierfür wurden Aufnahmen der Zelle vor und nach dem Bleichen durch den Laserimpuls mit einer zeitlichen Auflösung von 657 ms durchgeführt. Bei einem Vergleich der Signal-Intensitäten des GFP während der Aufnahmen ist ein Verlust an Gesamt-Intensität feststellbar (vergleiche Abb. 3.7-1A mit –B und –C). Dieses begründet sich in einem Verlust an fluoreszierenden Molekülen aufgrund des Bleichens und aufgrund der Beleuchtung der Zellen während der Aufnahmen. Dieser Verlust ist in der Berechnung der relativen Fluoreszenz-Intensität einbezogen (siehe 2.13.5). Anhand der unbehandelten Zelle (je rechts in Abb. 3.7-1A-C) zeigt sich die unveränderte Verteilung des GFP-hLa-WT.

Eine Quantifizierung der Signal-Intensitäten vor und nach dem Bleichen in der gesamten Zelle und in der gewählten Flächenregion ist in Abbildung 3.7-1D gezeigt. Dabei nimmt die relative Fluoreszenz-Intensität I_{rel} vor dem Bleichen einen Wert von ~1,0 ein und fällt nach dem Bleichen auf einen Wert von ~0,5. Nach dem Bleichen wurde die Intensität für einen Zeitraum von 50 Sekunden aufgezeichnet, aber in Abbildung 3.7-1D nur bis 20 s dargestellt, da sich ein stabiles Plateau bereits nach dieser Zeit einstellte. Aus der Quantifizierung geht hervor, dass 50% der ursprünglichen Signal-Intensität nach 3 – 4 Sekunden wiederhergestellt war und dass

sich ein Plateau nach 10 – 15 Sekunden einstellte. In Anlehnung an die bisher publizierten Daten (siehe oben) kann aus dieser halbmaximalen Geschwindigkeit eine Diffusions-gesteuerte Mobilität des GFP-hLa-WT im Nukleoplasma geschlussfolgert werden. Dieses impliziert einen Energie-unabhängigen Transport im Nukleus. Um diese Folgerung weiterhin zu unterstützen wurden die analysierten Zellen in einem parallelen Versuch auf Raumtemperatur abgekühlt. Die dabei bestimmte Mobilität des Proteins unterschied sich nicht von der oben beschriebenen (nicht gezeigt), und belegt folglich einen Energie-unabhängigen Transport des Proteins.
Um festzustellen, ob die eingefügten Mutationen im hLa Protein die Mobilität des Proteins verändern, wurden FRAP-Experimente mit ausgewählten Mutanten des hLa Proteins durchgeführt.

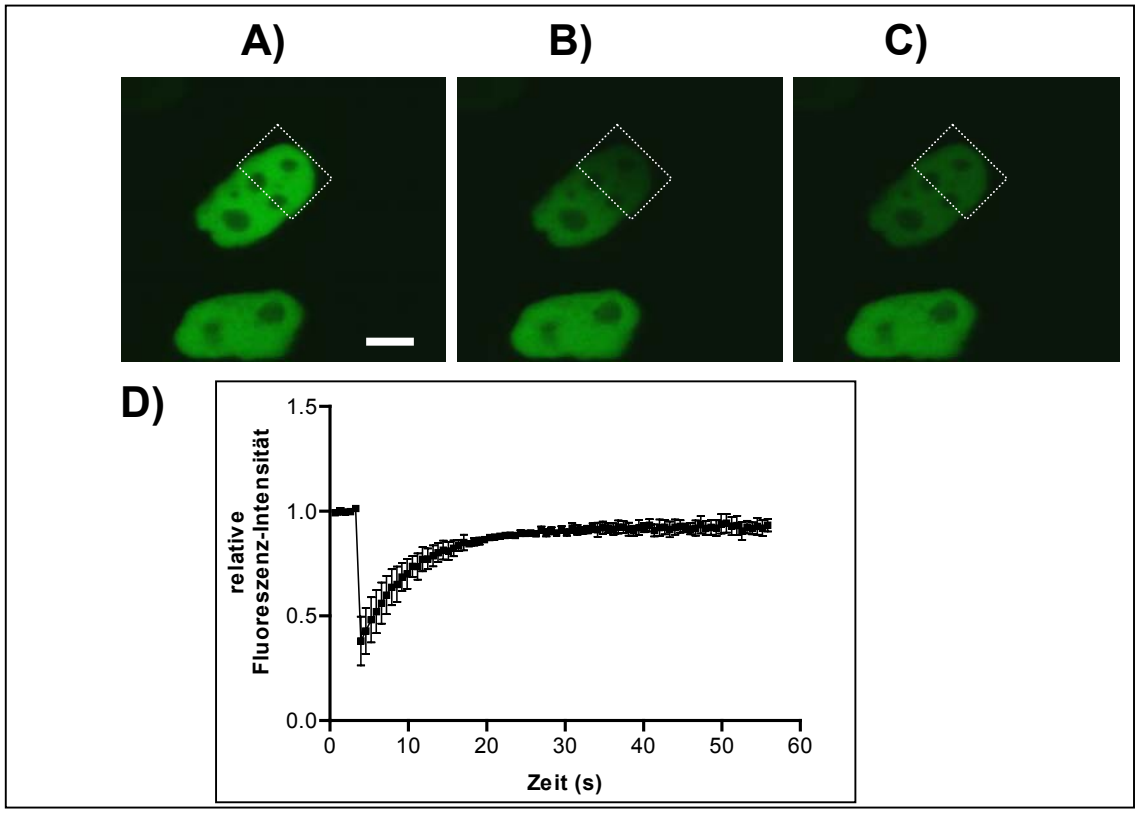


Abbildung 3.6.3-2: FRAP-Experimente mit GFP-hLa-Δ6.3 zeigen eine Diffusions-gesteuerte Mobilität des Proteins. HeLa Zellen wurden mit 1 µg GFP-hLa-Δ6.3 transfiziert und am Folgetag auf die Mobilität des Proteins im FRAP-assay analysiert. Dazu wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 657 ms Aufnahmen vor und nach dem Bleichen durch den Laserstrahl gemacht. Gezeigt ist die Zelle vor dem Bleichen **(A)**, unmittelbar danach **(B)** sowie am Ende der Aufzeichnung **(C)**. Die gebleichte Flächenregion ist durch ein gestricheltes Kästchen angedeutet. Maßstabsbalken = 10 µm. Teil **(D)** zeigt die Quantifizierung der Signale, welche als relative Fluoreszenz-Intensität I_{rel} (*Y-Achse*) gegen die Zeit in Sekunden (*X-Achse*) aufgetragen ist. Dieses ergibt die Geschwindigkeit der Wiederherstellung der Fluoreszenz-Intensität, anhand derer die Mobilität des Proteins berechnet wird (siehe 2.13.5 für detaillierte Angaben zur Auswertung).

Das Protein GFP-hLa-Δ6.3 zeigt in lebenden Zellen eine diffuse Verteilung im Nukleoplasma, wobei distinkte Bereiche ausgespart sind. Aufgrund der Tatsache, dass dieser Mutation nachweislich das NoLS fehlt (siehe Abb. 3.6.2-1C und 3.6.3-1) können die Bereiche ohne GFP-Signal als Nukleoli eingeordnet werden. Dieses wurde durch Phasenkontrast Mikroskopie

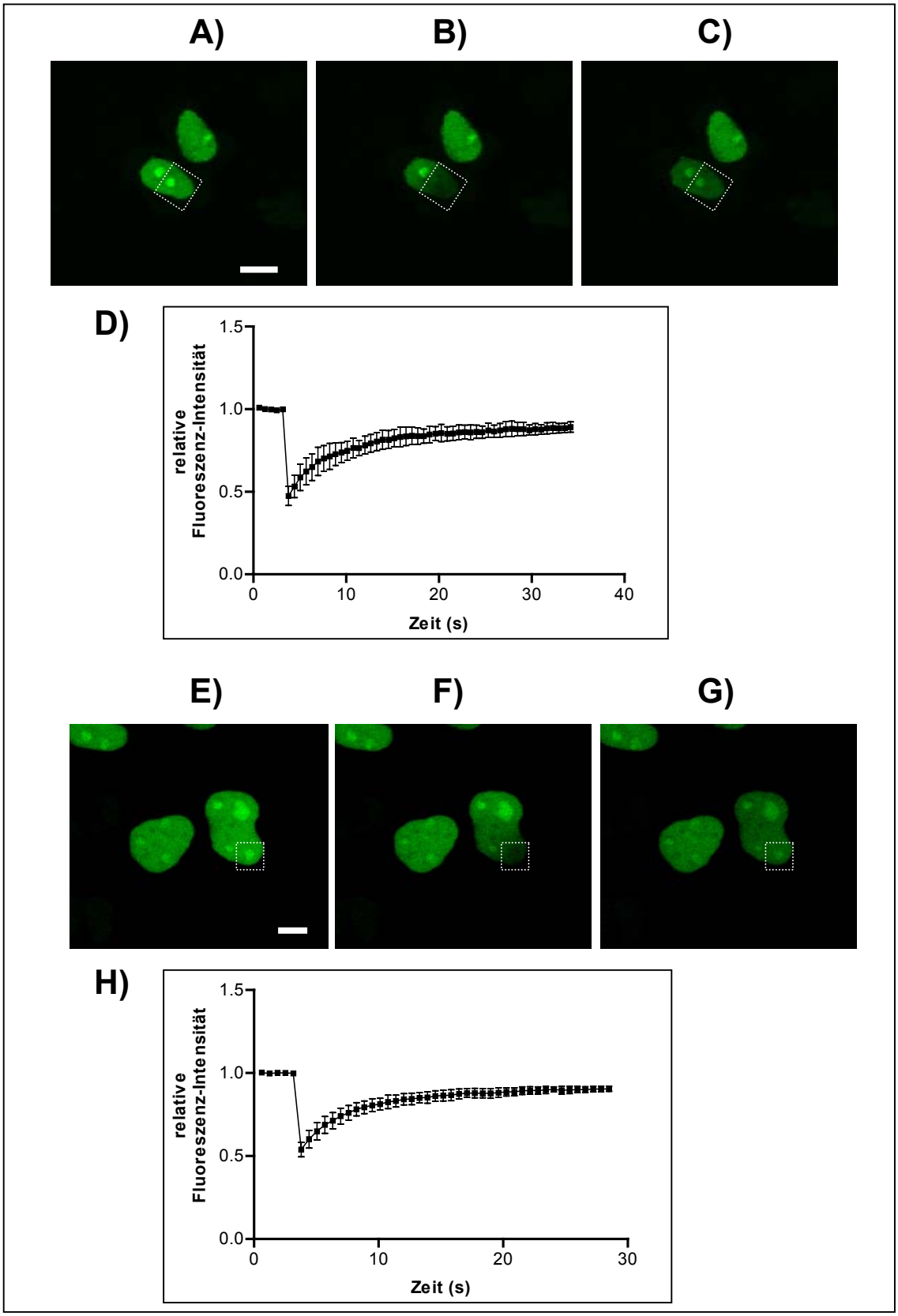
bestätigt (nicht gezeigt). Folglich kann auch in lebenden Zellen die Bedeutung der Aminosäuren 323 – 354 als NoLS belegt werden, was oben beschriebene Ergebnisse für die chemisch fixierten Zellen bestätigt.

Die Durchführung der FRAP Analysen entspricht der oben beschriebenen für GFP-hLa-WT. Für das Bleichen wurde das GFP-Signal in einem Bereich im Nukleoplasma gewählt, welcher z.T. Nukleoli enthält (siehe Abb. 3.7-2A). Durch die Bestrahlung mit dem Laser wurde der größte Anteil des GFP-Signals in der gewählten Flächenregion zerstört (Abb. 3.7-2B). In Abhängigkeit von der Zeit wurde ein effektiver Einstrom neuen Fluoreszenz-Signals in diesen Bereich detektiert, welcher nach kurzer Zeit den gesamten, zuvor gebleichten Bereich ausfüllt (Abb. 3.7-2C). Dabei ist anzumerken, dass zu keinem Zeitpunkt des Wiedereinstroms des GFP-hLa-Δ6.3 ein Signal innerhalb der Nukleoli feststellbar war. Dieses belegt, dass das Protein auch nicht vorübergehend in dieses Kompartiment transportiert wird, sondern gänzlich außerhalb dieser Region verbleibt.

Die in Abbildung 3.7-2D dargestellte Quantifizierung des Versuchs zeigt, dass die relative Fluoreszenz-Intensität I_{rel} von einem Wert 1,0 vor dem Bleichen auf ~0,4 danach absinkt. Anschließend ist eine sehr schnelle Steigerung der Intensität in diesem Bereich zu beobachten, welche einen Wert von 3 – 4 Sekunden für eine 50%ige Wiederherstellung benötigt. Folglich weist dieses Protein ebenso wie GFP-hLa-WT eine Diffusions-gesteuerte Mobilität im Nukleoplasma auf. Dementsprechend ist die in dieser Mutation eingefügte interne Deletion ohne Einfluss auf die generelle Mobilität des Proteins.

Wie im Falle der FRAP-Experimente für GFP-hLa-WT ist auch in dieser Versuchsreihe festzustellen, dass die Gesamt-Intensität der Fluoreszenz innerhalb der Zelle abnimmt aufgrund der Bestrahlung der Zellen. Dadurch kann die Wiederherstellung der Intensität keinen Wert von 1,0 erreichen, was in der Berechnung der Mobilität einbezogen ist. Jeweils unten in Abb. 3.7-2A-C ist die gleichbleibende Verteilung des Proteins in einer unbehandelten Zelle sichtbar.

Abbildung 3.6.3-3: FRAP-assays mit GFP-hLa-Δ2 und GFP-hLa-F118A zeigen eine Diffusions-gesteuerte Mobilität dieser Proteine. HeLa Zellen wurden mit 1 µg GFP-hLa-Δ2 transfiziert und am Folgetag auf die Mobilität des Proteins im FRAP-assay analysiert. Dazu wurden mit einer zeitlichen Auflösung von 657 ms Aufnahmen vor und nach dem Bleichen durch den Laserstrahl gemacht. Gezeigt ist die Zelle vor dem Bleichen **(A)**, unmittelbar danach **(B)** sowie am Ende der Aufzeichnung **(C)**. Die gebleichte Flächenregion ist durch ein gestricheltes Kästchen angedeutet. Maßstabsbalken = 10 µm. Teil **(D)** zeigt die Quantifizierung der Signale, welche als relative Fluoreszenz-Intensität I_{rel} (*Y-Achse*) gegen die Zeit in Sekunden (*X-Achse*) aufgetragen ist. Dieses ergibt die Geschwindigkeit der Wiederherstellung der Fluoreszenz-Intensität, anhand derer die Mobilität des Proteins berechnet wird (siehe 2.13.5 für detaillierte Angaben zur Auswertung). Die Versuchsreihe für GFP-hLa-F118A ist darunter gezeigt, wobei **(E)** die Zelle vor dem Bleichen darstellt. **(F)** zeigt die Zelle unmittelbar danach und **(G)** am Ende der Dokumentation. Die Quantifizierung für GFP-hLa-F118A wurde wie in (D) durchgeführt und ist in **(H)** dargestellt.



Anschließend wurde die Mobilität der Proteine GFP-hLa-Δ2 und GFP-hLa-F118A untersucht, welche nicht bzw. erheblich reduziert RNA banden (Abb. 3.4.5-2A, 3.5.3-2A-C) und in Nukleoli akkumulierten (Abb. 3.6.2-3A+B). Wie aus Abbildung 3.7-3A+E hervorgeht, ist die Lokalisation der Proteine GFP-hLa-Δ2 und GFP-hLa-F118A diffus im Nukleoplasma mit

deutlicher Akkumulation in den Nukleoli und entspricht damit den für chemisch fixierte Zellen dargestellten Ergebnissen (Abb. 3.6.2-3A+B). Durch Phasenkontrast Mikroskopie wurde belegt, dass es sich bei diesen Strukturen um Nukleoli handelt (nicht gezeigt). Dieses unterstreicht die *in vivo* Relevanz des RNP-2 im RRM2 für das Verlassen des Nukleolus.
Die FRAP Versuche wurden für diese Mutationen in der gleichen Art durchgeführt wie oben für GFP-hLa-WT beschrieben. Als zu bleichende Flächenregion wurde jeweils ein Areal im Nukleoplasma gewählt, welches einen Nukleolus enthält. Das GFP-Signal wurde durch die Bleichung mit dem Laserimpuls in beiden Fällen sowohl im Nukleoplasma als auch im Nukleolus größtenteils zerstört (Abb. 3.7-3B+F). In Abhängigkeit von der Zeit war in beiden Fällen eine sehr schnelle Steigerung der Fluoreszenz-Intensität in den zuvor gebleichten Arealen zu beobachten (Abb. 3.7-3C+G), welche wie bei oben beschriebenen Analysen 3 – 4 Sekunden für eine 50%ige Wiederherstellung benötigte. Die Quantifizierung der Signale ist in Abb. 3.7-3D für GFP-hLa-Δ2 und Abb. 3.7-3H für GFP-hLa-F118A dargestellt. Für diese Auswertung wurde jeweils der gesamte Bereich berücksichtigt und in die Berechnung einbezogen, welcher zuvor gebleicht wurde. Die nicht gezeigte Quantifizierung ausschließlich für den Bereich des Nukleolus ergab die gleiche Wiederherstellungs-Rate, so dass die Proteine mit gleichen Geschwindigkeiten in das Nukleoplasma wie auch in den Nukleolus einströmen.

Generell könnte in FRAP-Experimenten eine fälschlich Diffusions-gesteuerte Mobilität geschlussfolgert werden, wenn durch eine artifizielle Überexpression die Interaktionspartner oder –stellen übersättigt sind. Um dieses zu unterbinden, wurden für die hier gezeigten Analysen ausschließlich Zellen benutzt, welche eine vergleichsweise geringe Expression des GFP-markierten Proteins aufwiesen.
Folglich bewegen sich hLa-WT und die analysierten Mutanten mit einer Geschwindigkeit, welche einer freien Diffusion nahe kommt. Dementsprechend ändert eine Mutation im RRM2 zwar sehr deutlich die Lokalisation des Proteins im Nukleus, beeinflusst aber nicht die Mobilität. Gleiches gilt für die Mutation GFP-hLa-Δ6.3, welche eindeutig die subnukleäre Verteilung, jedoch nicht die Mobilität des Proteins beeinflusst. Schlussendlich wird die Diffusions-ähnliche Geschwindigkeit des hLa Proteins im Nukleoplasma nicht durch Wechselwirkungen beeinflusst, welche über das RRM2 oder das NoLS vermittelt werden.

4 Diskussion

Das humane Hepatitis B Virus (HBV) besitzt ein partiell doppelsträngiges DNA Genom, welches mit einer Länge von 3,2 kBp äußerst kompakt ist und für 7 verschiedene Proteine kodiert. Die Infektion mit HBV stellt eines der großen Weltgesundheitsprobleme dar. Dies gilt insbesondere für die Lebererkrankungen der weltweit etwa 350 chronischen HBV Träger und des damit verbundenen etwa 200fach erhöhten Risikos primäre Leberzellkarzinome zu entwickeln und daran zu versterben (21, 28, 31, 153, 183). Obwohl ein präventiver und effektiver Impfstoff existiert, haben die Neuinfektionen mit HBV in den letzten Jahren nur wenig abgenommen. An einem therapeutischen Impfstoff für chronische Träger wird zwar intensiv gearbeitet, ein Erfolg ist jedoch noch nicht in Sicht. Die Therapiemöglichkeiten bei einer bestehenden chronischen Infektion sind sehr eingeschränkt und wenig erfolgreich.

Mit dem Ziel die Immunreaktion gegen virale Antigene *in vivo* studieren zu können wurde vor einigen Jahren ein HBV transgenes Mausmodell entwickelt und hiermit gelang es zu zeigen, dass die Injektion von HBV-Oberflächenprotein spezifischen cytotoxischen T-Zellen in HBV-transgene Mäuse zu einer Unterdrückung der Expression aller viraler Produkte auf einem nicht cytotoxischen Weg führt (10, 40, 41, 76, 78, 79). Dieser bisher nicht vollständig geklärte Vorgang wurde durch die Cytokine Interferon-γ und Tumornekrosefaktor-α vermittelt, welche u.a. zu einer post-transkriptionellen Degradation der HBV RNA führten. Die Untersuchungen des molekularen Mechanismus, welcher den Abbau der viralen RNA auslöst, führte zur Identifizierung des Maus La Proteins (mLa) als potentielles HBV RNA stabilisierendes Protein (85, 87). Ferner wurde dabei die genaue Region der HBV RNA bestimmt, welche durch das mLa Protein gebunden wird.

Da es bisher keine HBV-infizierbaren Zellkulturen gibt, ist eine Erforschung der viralen Prozesse der Virusinfektion und Eliminierung *in vitro* sehr erschwert. Dies ist mit ein Grund dafür, dass bisher nicht erforscht wurde, ob das humane La Protein mit der HBV RNA wechselwirkt, ähnlich wie es für das Maus La Protein beschrieben wurde. Geht man von einer ähnlichen Wechselwirkung aus, so wäre darauf aufbauend theoretisch die Entwicklung neuartiger, antiviraler Strategien möglich, wenn es gelänge, mithilfe von Substanzen diese Wechselwirkung zwischen humanem La (hLa) und der HBV RNA selektiv zu zerstören, ohne die Zelle dadurch zu schädigen. Notwendige Voraussetzung hierfür sind eine detaillierte Kenntnis über die Struktur und Funktion des humanen La Proteins, über seine zellulären und viralen Wechselwirkungspartner und die molekulare Detailinformation über diese Interaktionen. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurden intensive Studien hierzu betrieben. Um die Wechselwirkung des humanen La Proteins mit HBV RNA von der mit zellulären RNAs abzugrenzen zu können, wurde dies am Beispiel der hLa tRNA Bindung untersucht. Die tRNA wird während ihrer molekularen Reifung durch das La Protein stabilisiert wird (siehe 1.3). Hierfür wurden unter anderem die für die jeweilige RNA Bindung essentiellen Domänen im

humanen La Protein identifiziert und miteinander verglichen. Zudem wurden die Multimerisierung des hLa *in vitro* und die subzelluläre Lokalisation und *in vivo* Mobilität des Proteins analysiert und korreliert.
Um die unterschiedlichen Domänen des hLa und deren Funktionen untersuchen zu können wurden diverse Mutationen in das Protein eingefügt. Für das Ziel der Bestimmung der atomaren 3D-Struktur des Proteins durch Proteinkristallisation und Röntgenstrukturanalyse gelang es, ein Protokoll für eine effiziente Reinigung von großen Mengen des rekombinanten Proteins bis zur Homogenität zu etablieren. Des weiteren gelang es, die La-Domänen zu kartieren, welche für Multimerisierung des hLa Proteins, für die Bindung an die HBV RNA als auch für die Bindung an tRNA notwendig sind. Ferner wurde eine Vielfalt von neuen Informationen über Sequenz-Motive erhalten, die für die subzelluläre Verteilung des La-Proteins verantwortlich sind und hierbei wurden zudem erste Daten über die *in vivo* Mobilität des hLa erarbeitet.
Letztlich wurde durch eine *in vivo* Versuchsreihe gezeigt, dass eine antivirale Strategie gegen HBV spezifisch die Wechselwirkung zwischen hLa und der HBV RNA unterbinden muss und nicht durch eine komplette Inaktivierung des endogenen hLa erfolgen kann, da dieses für zumindest einen bestimmten zellulären Syntheseweg essentiell ist und ein Fehlen des Proteins in humanen Zellen nicht ausgeglichen werden kann.

4.1 Reinigung und Analyse des rekombinanten humanen La Proteins

Wie an anderer Stelle detaillierter ausgeführt ist das La Protein an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt und nimmt bei verschiedenen viralen Infektionen eine bedeutende Rolle im RNA-Metabolismus des Virus ein (siehe 1.1, 1.2, 1.3). Im Falle der Wechselwirkung des La Proteins mit der viralen HBV RNA stammen die grundlegenden Untersuchungen aus einem transgenen Mausmodell und beschreiben verschiedene Charakteristika des mLa (85, 87). In der vorliegenden Arbeit werden diese Kenntnisse um Charakteristika des humanen La Proteins erweitert, wie die Bindung verschiedener RNAs, die Multimerisierung und andere. Daher war eine Reinigung des humanen La Proteins erforderlich, um es für RNA-Bindungsexperimente sowie für Kristallisationen einzusetzen.

Zu diesem Zweck wurde rekombinantes, humanes La Protein benutzt, welches bakteriell exprimiert und anschließend aufgereinigt wurde. Die in Abbildung 3.1.1-1 dargestellte Dokumentation der nativen Aufreinigung des HIS-markierten hLa belegt, dass das rekombinante Protein durch diesen ersten Schritt der Aufreinigung mittels Ni-NTA-Säulen von dem überwiegenden Teil der kontaminierenden bakteriellen Proteine abgetrennt wurde. Eine affine und unter verschiedenen chemischen Bedingungen stabile Bindung des HIS-markierten

Proteins an die Matrix erlaubte die effiziente Entfernung unspezifisch adsorbierter Proteine durch stringente Waschbedingungen. Bei einem Vergleich zwischen nativer und denaturierender Aufreinigung wurden keine unterschiedlichen Ausbeuten festgestellt (siehe 3.1), so dass hLa offensichtlich in *E.coli* löslich bleibt und nicht zur Bildung von Einschlusskörpern („*inclusion bodies*“) führt.

Für Angaben über die Konformation eines Proteins und dessen Domänen-Struktur ist kaum eine Analyse so gehaltvoll wie die atomare Auflösung der 3D-Proteinstruktur durch Kristallographie und Röntgenstrukturanalyse. Für eine erfolgreiche und homogene Kristallisation ist es jedoch notwendig, dass das Protein von jeglichen Kontaminationen befreit wird und zudem in möglichst hohen Konzentrationen vorliegt. Zu diesem Zweck wurde die Reinigung des humanen La Proteins im Großmaßstab etabliert und optimiert, und es wurden verschiedene Methoden zur Dokumentation der Reinheit der Präparationen eingesetzt.
Als Fortsetzung der Proteinreinigung wurde eine präparative Gelfiltration gewählt, da viele der kontaminierenden Proteine aus der initialen Ni-NTA-Reinigung deutliche Unterschiede in ihrer Masse (≥ 5–10 kDa) gegenüber dem hLa aufwiesen. Dabei eluierte das rekombinante hLa als trimeres Molekül mit einer Masse von 150 kDa (Abb. 3.1.1-3). Zudem erscheint hLa u.a. assoziiert mit verschiedenen anderen Proteinen in Multiproteinkomplexen (≥ 250 kDa), welche nicht weiter analysiert wurden. Es ist unklar, aus welchen Proteinen verschiedenster Massen diese Komplexe zusammengesetzt sind und ob es sich dabei um ribosomale Untereinheiten handeln könnte, mit denen das hLa in Eukaryonten assoziiert ist (157). Für diese Möglichkeit spricht, dass das rekombinante hLa wie oben genannt in *E.coli* löslich im Plasma vorliegt nicht in Einschlusskörpern aggregiert. Es ist jedoch auszuschließen, dass diese Komplexbildung durch die Trimerisierung des hLa verursacht wird, da Multiproteinkomplexe auch bei der Analyse von mutierten hLa Proteinen auftreten, welche als Dimer oder Monomer vorlagen (siehe unten und Abb. 3.3-2B, 3.3-3).
Eine Analyse des Peaks bei 150 kDa in einer ein- und zweidimensionalen SDS-PAGE zeigte keine Proteine außer dem hLa (Abb. 3.1.1-3B+C, 3.1.2-1). Dieses belegt die Homogenität der Präparation im Rahmen der Sensitivität dieser Methoden. Die verschiedenen Massen und isoelektrischen Punkte des hLa in der 2-D-PAGE werden an anderer Stelle diskutiert (siehe unten). Die massenspektrometrische Analyse per MALDI-TOF (Abb. 3.1.2-2) wies keine Kontaminationen nach und bestimmte das hLa mit Massen von 48438 und 50678 Dalton. Letztere Masse kommt der gemäß der Sequenz (einschließlich der HIS-Markierung) vorhersagbaren Masse von 50739 Dalton sehr nahe und entspricht wahrscheinlich dem Protein mit voller Länge. Die hLa Isoform mit geringerer Masse entsteht vermutlich aufgrund einer unspezifischen C-terminalen Degradation oder durch eine bakterielle Carboxypeptidase-Aktivität. Letztere enzymatische Aktivität ist wahrscheinlicher, da dieses Enzym Proteine C-terminal bis zu einer spezifischen Erkennungs-Sequenz verkürzt und der Peak bei 48438 Dalton

auch über längere Zeit und bei mehreren Messungen konstante Massen aufwies. Bei einer unspezifischen Degradation würde sich diese Masse vermutlich kontinuierlich verkleinern.
Das Ergebnis aus dem dynamischen *Light-Scattering* (Abb. 3.1.2-3) deutet aufgrund der fast homogenen Massenverteilung der detektierten Partikel ebenfalls auf die Homogenität der Proteinpräparation hin. Die gemessene Größe der jeweiligen Partikel wurde als eine trimere Konformation des rekombinanten hLa interpretiert, und die Masse im Verhältnis zur Partikelgröße wurde durch die implementierte Software als 145 kDa angegeben. Dieses kann jedoch mit der Methode nicht eindeutig bestimmt werden, da die Größe von Partikeln gemessen wird, welche je nach räumlicher Konformation des Proteins erheblich variieren kann.
Die hier etablierte Reinigungsmethode kann als sehr effizient angesehen werden, da das rekombinante hLa Protein durch lediglich zwei Reinigungsschritte von jeglichen bakteriellen Kontaminationen abgetrennt wurde, welche durch 2-D-PAGE mit Silberfärbung, MALDI-TOF oder dynamisches *Light-Scattering* nachweisbar sind. Da für eine Kristallisation oftmals hohe Proteinkonzentration benötigt werden, wurde getestet bis wie weit sich das hLa Protein konzentrieren ließ. Bis zu der maximal getesteten Konzentration von 12 mg/ml wurde dabei keine Präzipitation des hLa beobachtet. Somit wurden zwei essentielle Voraussetzungen für eine Kristallisation erfüllt, nämlich eine Präparation des Proteins in sehr reiner, homogener und hoch-konzentrierter Form.

Die Multimerisierung des hLa ist *in vivo* bisher nicht belegt. Als Funktion der Dimerisierung wurde ein verstärkender Effekt auf die Translation bestimmter viraler RNAs *in vitro* gezeigt (44). Um die Mechanismen der *in vitro* Multimerisierung des hLa aufzuklären und mit bestimmten Funktionen zu korrelieren, erfolgte der Vergleich einiger der in Tabelle 3.2 aufgeführten Mutationen des hLa mit hLa-WT in der analytischen Gelfiltration. Zusätzlich wurden die Pufferbedingungen variiert, indem teilweise EDTA zugesetzt wurde, welches zweiwertige Ionen komplexiert und somit Aufschluss gibt ob diese Ionen die Multimerisierung des Proteins beeinflussen. In Anwesenheit zweiwertiger Ionen eluierte hLa-WT hauptsächlich als trimeres- und ohne zweiwertige Ionen als dimeres Molekül, was die Notwendigkeit dieser Ionen für die Ausbildung von Trimeren demonstriert (vergleiche Abb. 3.1.1-3A und 3.3-2A). Zugleich erzeugt dieses Ergebnis jedoch Unklarheit darüber, in welcher Konformation hLa-WT denn vorliegt und durch welche Domänen oder Mechanismen dieses organisiert wird.
Um dieses aufzuklären wurden einige der Mutanten des hLa hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Multimerisierung analysiert. Da die Deletion hLa-Δ1 (Δaa11-99) auch mit zweiwertigen Ionen als Dimer vorlag, ist gezeigt, dass die für die Trimerisierung notwendige Domäne in diesem N-terminalen Teil des Proteins liegt (Abb. 3.3-2B). Demgegenüber eluierte das Protein hLa-Δ6.0 (Δaa274-354) als Monomer und zeigt folglich die Lokalisation der zur Ausbildung von Dimeren notwendigen Region (Abb. 3.3-3). Des weiteren zeigt dieses Ergebnis, dass vermutlich erst eine Dimerisierung über den C-Terminus erfolgen muss, bevor eine Trimerisierung über den N-

Terminus erfolgen kann. Eine Versuch zur Eingrenzung der C-terminalen Region zeigte, dass sich die Deletionsmutante hLa-Δ6.2 (Δaa291-354) wie der Wildtyp verhielt so dass die Dimerisierungs-Domäne demgemäss auf den Bereich der Aminosäuren 274 – 291 eingeschränkt wurde. Diese Befunde erklären, warum hLa-WT in Abhängigkeit von den Pufferbedingungen als dimeres oder trimeres Molekül vorliegt. Ferner wird eine unspezifische Multimerisierung über zweiwertige Ionen durch die HIS-Markierung ausgeschlossen, da diese ebenso in den Mutanten hLa-Δ1 und hLa-Δ6.0 vorhanden ist. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass rekombinantes hLa über die Aminosäuren 274 – 291 dimerisierte, und dass das Dimer über die Aminosäuren 11 – 99 abhängig von zweiwertigen Ionen auf ein trimeres Molekül erweitert werden kann. Tetramere wurden nicht beobachtet, so dass die Multimerisierung aus nicht bekannten Gründen scheinbar mit der Ausbildung eines Trimers endet.

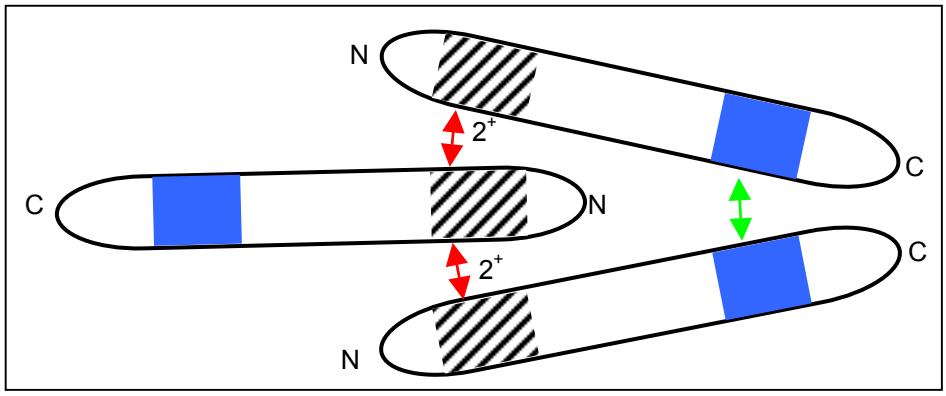


Abbildung 4.1-1: Modell über die Wechselwirkung verschiedener Domänen im hLa-WT, welche die Multimerisierung vermitteln. Gemäß den Ergebnissen der analytischen Gelfiltration wird ein Modell aufgestellt, demzufolge die Ausbildung von Dimeren über die C-terminale Region der Aminosäuren 274 – 291 erfolgt (*gefüllte Boxen*). Der Aufbau von Trimeren wird über zweiwertige Ionen durch die N-terminalen Reste 11 – 99 vermittelt (*schraffierte Boxen*).

In weiteren Analysen bleibt zu zeigen, ob die einzelne Mutation der Aminosäuren 274 – 291 zu einem Verlust der Dimerisierung führt. Durch Craig et al. (44) wurde bei Verwendung einer analytischen Gelfiltration gefunden, dass hLa-WT als dimeres Molekül vorliegt. In dem dabei benutzten Puffer sind keinerlei zweiwertige Ionen und eine geringe Menge EDTA enthalten, was die Diskrepanz zum trimeren hLa-WT gemäß obiger Daten erklären könnte. Ferner wird in der genannten Studie die Dimerisierungs-Domäne auf die Aminosäuren 293 – 348 festgelegt, während diese Funktion hier den Aminosäuren 274 – 291 zugeordnet wird. Da mit C-terminalen Verkürzungen und internen Deletionen gänzlich unterschiedliche Arten von Mutationen hier und in der o.g. Arbeit benutzt wurden, führt dieses möglicherweise zu unterschiedlichen Ergebnissen. Daher müsste durch alternative Methoden, wie z.B. einem *mammalian-two-hybrid* System, die exakte Lokalisation der Dimerisierungs-Domäne bestimmt werden.

Um weitere Hinweise auf die Existenz und Position der Dimerisierungs-Domäne zu erhalten erfolgte ein Vergleich mit einer Internet-Datenbank (*Proscan Release 3.0*, http://npsa-

pbil.ibcp.fr/cgi-bin/pattern_prosite.pl (43)), welcher für die Aminosäuren 278 – 293 im hLa-WT eine 57%ige Übereinstimmung zu einer „Helix-Loop-Helix“ Dimerisierungs-Domäne identifiziert. Diese Domäne wird als *Myc*-Typ beschrieben, da die Beschreibungen insbesondere aus DNA-bindenden *Myc*-Onkoproteinen (c-myc, N-myc, L-myc, B-myc) herrührt (104). Diese Domäne von bis zu 40 – 50 Aminosäuren bildet eine Helix-*loop*-Helix Struktur aus und wird zusätzlich durch eine 15 Reste lange basische Region ergänzt, welche bei den *myc*-Proteinen den Kontakt mit DNA herstellt. Die durch die Datenbank vorhergesagte Dimerisierungs-Domäne zischen Aminosäuren 278 – 293 stimmt gut mit der hier identifizierten Dimerisierungs-Domäne 274 – 291 überein. Gemäß der *MacVector-7.0*-Software nehmen diese Reste überwiegend strukturell externe oder ambivalente Positionen ein, und sind größtenteils als α-Helix-fomierend einzustufen. Dieser Befund unterstützt die hier erzielten Ergebnisse, so dass es sich bei diesen Resten im hLa sehr wahrscheinlich um die Dimerisierungs-Domäne handelt.
Es ist unklar, ob die *in vitro* beobachtete homo-Multimerisierung des La Proteins ebenso für die Situation *in vivo* gilt. So ist für PCBP-1 und –2 gezeigt, dass dieses RNA bindende Protein in Lösung als homo-Dimer vorliegt, welches sich nach RNA-Bindung zu einem hetereo-Dimer ändert (64). Wie an späterer Stelle aufgeführt wird ändert sich ebenfalls die Konformation des rekombinanten hLa, welches in Anwesenheit von RNA die multimere Struktur zu einer monomeren Form auflöst (s.u.).

Für mehrere Funktionen des La Proteins wird eine Regulation durch Phosphorylierung diskutiert. Dieses gilt sowohl für die Kontrolle in der Transkription durch RNA Polymerase III als auch für die Beteiligung an der Prozessierung zellulärer tRNAs (57, 99). Des weiteren gilt dies vermutlich auch für die Funktion des La Proteins im Rahmen einer HBV Infektion (87) und ist an anderer Stelle in dieser Arbeit beschrieben (siehe 1.2, 1.3). Um Kenntnisse über die Rolle der Phosphorylierung für die Funktionen des hLa zu erhalten, wurde in der vorliegenden Arbeit zunächst ein Protokoll zur (De-)Phosphorylierung etabliert. Anschließend wurde untersucht, ob diese Modifikation verschiedene Funktionen des hLa-WT moduliert.
Die Analyse des (de-)phosphorylierten Proteins erfolgte mittels 2-D-PAGE (Abb.3.1.2-1, 3.1.3-1) und zeigte, dass hLa-WT durch die gewählten Enzyme (de-)phosphoryliert wird. Auffällig ist jedoch, dass das Protein in mehreren Isoformen bezüglich der Masse und des pI vorlag. Der durch ExPASy (www.expasy.ch, Swiss-Prot Zugangsnummer P05455 für hLa) vorhergesagte pI für hLa ist 6,68, wobei die hier gefundenen Spezies einen Wert zwischen 6 und 7,5 einnahmen (Abb. 3.1.2-1). Nach einer Phosphorylierung durch Casein Kinase-II könnten die Isoformen durch eine verschiedene Anzahl an Phosphatresten erklärt werden, welche sowohl den pI verändern als auch die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen. Dieses ist auch für das La Protein durch andere Gruppen belegt (30, 58, 99, 120).
Durch Behandlung mit verschiedenen Phosphatasen, welche gemäß eigener Vorversuche auch die durch die Casein Kinase-II angefügten Phosphat-Reste wieder entfernten, zeigte sich jedoch

keine Veränderung des Bandenmusters. Somit unterscheiden sich die verschiedenen Isoformen wahrscheinlich nicht in ihrer Phosphorylierung und das rekombinante La Protein wird während seiner Expression nicht durch bakterielle Kinasen phosphoryliert. Es ist unklar und durch keine der aufgeführten Methoden endgültig festgestellt, welche Modifikationen die verschiedenen Isoformen entstehen lassen. Übereinstimmend zu hier gefundenen Daten existiert das zelluläre hLa Protein in verschiedenen isoelektrischen Formen (pI von 6,0 – 7,5), und es wurden mehrere Stellen zur Phosphorylierung bestimmt (61, 160, 163). Zudem wurde gezeigt, dass auch im rekombinanten Protein nicht alle der verschiedenen Isoformen durch Phosphorylierung entstehen (30), wobei die Natur dieser Modifikation unklar bleibt. Die geringen Massenunterschiede der einzelnen Spezies von maximal 2 kDa in der 2-D-PAGE passen zu den Ergebnissen der MALDI-TOF Analysen, in denen ebenfalls Differenzen von ca. 2 kDa bestimmt wurden (siehe oben und Abb. 3.1.2-2). Vermutlich unterliegt das rekombinante hLa wie oben diskutiert einer Carboxypeptidase-Aktivität, oder das Protein existiert in Isoformen mit verschiedenen Ladungen oder Strukturen, welche nicht durch die Denaturierung in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese aufgelöst werden.

Für das hLa Protein wurde durch Topfer et al. ein potentielles ATP-Bindungsmotiv 5´-GxxxxGK-3´ für die Aminosäuren 333 – 339 identifiziert (206), und eine ATPase- und Helikase-Aktivität konnte gezeigt werden (18, 19, 97). Um diese Aktivität auch für das rekombinante Protein zu untersuchen, wurde in mehreren experimentellen Ansätzen (siehe 2.9.6) überprüft, ob ATP durch rekombinantes hLa gebunden und/oder zu ADP+P umgesetzt wird. Dabei wurde in An- oder Abwesenheit von potentiellen Substraten weder eine spezifische Bindung noch die Hydrolyse von ATP dokumentiert. Demgemäss hat rekombinantes hLa keine ATPase Aktivität, oder es fehlen entscheidende Modifikationen am prokaryotischen Protein. Die ATPase Aktivität des hLa wurde in Anwesenheit von RNA-DNA-Hybriden oder von dsRNAs mit einem 3´-Überhang beschrieben (18, 97), welche durch das hLa Protein entwunden werden. Somit erscheint die ATPase Aktivität des hLa auf diese Substrate beschränkt und bezieht sich nicht auf die hier untersuchten dsRNAs oder Polynukleotide.

Durch die dargestellten Analysen wurden optimale Grundlagen für laufende Versuche zur La-Proteinkristallisation geschaffen und wichtige Anhaltspunkte für die Interpretation der anschließenden Röntgenstrukturanalyse gegeben. Die Reinigung bis zur Homogenität des Proteins ermöglicht zudem durch analytische Gelfiltrationen die Aufstellung eines Modells, demgemäss hLa über die Aminosäuren 274 – 291 Dimere ausbildet, welche über die Aminosäuren 11 – 99 mit zweiwertigen Ionen zu Trimeren erweitert werden. Ferner wird gezeigt, dass das rekombinante hLa nicht phosphoryliert ist, wobei weitere Modifikationen des Proteins vorliegen könnten, welche den pI und die elektrophoretische Auftrennung modulieren. Eine ATPase Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden.

4.2 Die Wechselwirkung des humanen La Proteins mit HBV RNA-B2

Das humane La Protein gehört zur RNA-bindenden Familie der Proteine mit RNA-Erkennungs-Motiven (RRMs) (34, 36, 105), und bindet neben einer Vielzahl zellulärer RNAs an verschiedene virale RNAs, wie die des Hepatitis B Virus (siehe 1.2 und Referenzen darin). Grundlegende Arbeiten dazu stammen aus einem transgenen Mausmodell, in der die Wechselwirkung des mLa mit einem Teilbereich der HBV RNA beschrieben wurde (85, 87). Dieser in allen HBV RNAs enthaltene Teilbereich wird als HBV RNA-B2 bezeichnet und nimmt gemäß Computer-Vorhersagen die Struktur einer Haarnadelschleife ein (siehe 1.2 und Abb. 4.2-1). Es ist belegt, dass die Auflösung der Haarnadelstruktur durch Mutationen *in vivo* zu einer reduzierten Halbwertszeit der pregenomischen HBV RNA führt, was die Bedeutung dieser Region für die Stabilität der RNA und die These der stabilisierenden Wirkung des La Proteins unterstützt (I. Ehlers & T. Heise, unveröffentlichte Daten). Ferner liegt die durch Bindung des La Proteins geschützte nukleolytische Spaltstelle der HBV RNA in unmittelbarer Nähe zur La Bindungsstelle (86), so dass das Protein die RNA durch seine Bindung vermutlich vor Endoribonukleasen schützen könnte. Zur Entwicklung neuartiger antiviraler Strategien, welche an der Wechselwirkung zwischen hLa und der HBV RNA ansetzen, sind detailliertere Kenntnisse über diese Bindung erforderlich. Da die Bindung des humanen La Proteins an die HBV RNA-B2 bisher nicht nachgewiesen wurde, dieser Nachweis aber für die Einschätzung der Relevanz des Mausmodells von entscheidender Bedeutung ist, war ein Ziel der vorliegenden Arbeit die Charakterisierung dieser Wechselwirkung sowie die Identifizierung der hLa Domänen, die hierfür und für andere Funktionen des Proteins essentiell sind.

Das rekombinante hLa Protein band in nativen EMSAs an *in vitro* transkribierte HBV RNA-B2 und bildete mehrere Komplexe aus (Abb. 3.4.1-1). Durch *Supershift*-Analysen wurde belegt, dass diese Bindung nicht durch Kontaminationen in der Proteinpräparation verursacht wurden (Abb. 3.4.1-1).

Die Charakterisierung unter verschiedenen Bindungsbedingungen (Abb. 3.4.1-2) belegt eine optimale Bindung bei neutralem pH Wert (7,4) im Gegensatz zu leicht abgeschwächten Signalen im sauren oder alkalischen Bereich. Ein Beitrag nicht-elektrostatischer und vielleicht hydrophober Bindungen wird durch einen geringen Einfluss auf die Bindung durch NaCl nahegelegt, wobei die Natur dieser Bindung nicht genauer bestimmt wurde. Ferner kann die Notwendigkeit von internen Disulfidbrücken im Protein für die RNA-Bindung ausgeschlossen werden, da das reduzierende Agens DTT die Bindung nicht beeinflusste und das Protein im EMSA noch als Multimer erschien. Ebenso kann dadurch ausgeschlossen werden, dass eine kovalente Bindung zwischen hLa und der HBV RNA-B2 aufgebaut wird, wie für andere RNAs beschrieben (205).

Auffallend ist das Ergebnis, dass $MgCl_2$, welches die Struktur von RNAs stabilisieren kann (209), bei höheren Konzentrationen zu einer reduzierten Bindung führte (Abb. 3.4.1-3). Demgegenüber hatte EDTA, welches zweiwertige Ionen komplexiert, einen intensivierenden Effekt auf diese Bindung (Abb. 3.4.1-3). Dieses zeigt einerseits, dass die Struktur der HBV RNA-B2 durch Mg^{2+} nicht oder nur bei geringen Konzentrationen stabilisiert werden könnte. Eine Störung der Struktur der RNA durch falsche Mg^{2+} Konzentrationen würde folglich eine verminderte Bindung des hLa-WT bewirken. Andererseits suggeriert das Ergebnis mit EDTA, dass das einzig zugesetzte zweiwertige Ion Mg^{2+} die RNA-Struktur insgesamt stört, so dass durch die gänzliche Komplexierung dieser Ionen durch EDTA eine verstärkte Bindung des hLa-WT ermöglicht wird. Der Sachverhalt für die Struktur der HBV RNA-B2 und der daraus resultierenden Bindung durch hLa-WT kann mit dieser Methode nicht exakt aufgelöst werden, deutet aber darauf hin, dass die Struktur der HBV RNA-B2 *in vitro* vermutlich von zweiwertigen Ionen unabhängig ist.
Die hier bestimmten optimalen Bindungsbedingungen ähneln teilweise den für die mLa HBV RNA Wechselwirkung beschriebenen Ergebnissen (85), wobei jedoch in jener Arbeit UV-Quervernetzungs-Experimente und Kernextrakte benutzt wurden. Dieses lässt vermuten, dass mutmaßliche post-translationale Modifikationen des La Proteins in Eukaryonten nicht die Bindung an HBV RNA-B2 modulieren. Andererseits bleibt offen, welche Rolle andere Proteine als Interaktionspartner spielen könnten (siehe unten).

Nach der Optimierung der Bindungsbedingungen wurde die Affinität der Bindung von hLa an HBV RNA-B2 bestimmt, welche für die Dissoziationskonstante K_D einen Wert von 0,8 nM einnimmt (Abb. 3.4.2-1). Folglich handelt es sich hierbei um eine hochaffine Wechselwirkung, welche mit der Affinität der Bindung zwischen mLa und HBV RNA mit 1,4 nM gut übereinstimmt (87). Des weiteren passt diese K_D zu mehreren anderen RNA-Bindungen durch das La Protein, welche überwiegend hohe Affinitäten aufweisen:

Protein	**RNA**	**Herkunft der RNA**	**K_D (nM)**
La	hY-4	natürliches RNA Polymerase III Produkt	5
La	HY-1	-„-	6
La	prä-tRNA^{Arg}	-„-	3 – 19
La	5´UTR	Fragment der Poliovirus 5´UTR RNA (nt559-624)	4
La	TAR1	*Transactivator response element*, HIV-1 *leader*RNA	17
La	U1 snRNA	Spliceosom	23

Tabelle 4.2-1: Affinitäten des humanen La Proteins zu verschiedenen RNAs. Aufgeführt sind die Affinitäten (K_D in nM) des humanen La Proteins zu verschiedenen RNA Substraten, deren Herkunft angegeben ist. Die Werte für die Arginin-prä-tRNA variieren mit der Länge des 3´*trailers*. UTR = untranslatierte Region; snRNA = *small nuclear* RNA; Referenzen (37, 67, 133, 146)

Neben der Affinität ist insbesondere auch die Spezifität für die Bindung eines Proteins an eine RNA entscheidend, da eine hohe Affinität nicht mit einer hohen Spezifität einhergehen muss. Eine hohe Spezifität eines Liganden für eine Bindungsstelle bedeutet, dass dieser nur eine geringe Affinität zu anderen Bindungsstellen aufweist und, dass deren Anzahl möglichst klein ist. Obwohl eine hohe Spezifität wiederum oft mit hoher Affinität einhergeht, besagt diese nichts über die Funktion oder die biologische Wirkung.

In verschiedenen experimentellen Ansätzen zeigte die Wechselwirkung des rekombinanten hLa-WT mit der HBV RNA-B2 im nativen EMSA unter den gewählten Bedingungen eine geringe Spezifität (Abb. 3.4.3-1, 3.4.3-2). Diese Schlussfolgerung resultiert daraus, dass in einer Titration des hLa bereits bei geringen Proteinmengen vergleichbar intensive monomere Komplexe mit der HBV RNA-B2 wie auch mit anderen RNAs ausgebildet wurden (Abb. 3.4.3-1). Für eine spezifische Wechselwirkung wäre zu erwarten, dass wesentlich mehr Protein für die Bindung an unspezifische Kontroll-RNAs notwendig wäre, als für HBV RNA-B2.

Demgegenüber entstanden multimere Komplexe aus Protein und RNA insgesamt erst in zunehmendem Maß bei steigenden Proteinmengen. Dieses zeigt an, dass die multimeren Komplexe als eher unspezifisch anzusehen sind, so dass die Spezifität der Bindung von hLa an HBV RNA-B2 vermutlich in den monomeren Komplexen liegt. Hierfür sprechen Daten aus der Literatur, welche ebenfalls eine Bildung multimerer Komplexe erst bei hohen Proteinmengen anzeigen, wenn monomere Komplexe bereits vollständig ausgebildet sind (57). Ein weiteres Argument ist, dass monomere- zugunsten multimerer Komplexe bei steigenden Proteinmengen aufgelöst werden, da das Verhältnis zwischen Protein und RNA im Sinne der Spezifität ungünstiger wird.

In den in Abbildung 3.4.3-2 gezeigten Versuchen zur Kompetition der Bindung zwischen hLa-WT und HBV RNA-B2 wurde diese Wechselwirkung vergleichbar schnell kompetiert wie die Bindung an eine unspezifische RNA. Folglich zeigt auch dieser Ansatz, dass es sich bei den gewählten Versuchsbedingungen nicht um eine sehr spezifische Interaktion zwischen hLa-WT und der HBV RNA-B2 handelte.

Im Gegensatz dazu wurde für die Bindung des mLa an HBV RNA eine hohe Spezifität nachgewiesen (85, 87), wobei in jenen Untersuchungen ein Kernextrakt und kein gereinigtes Protein benutzt wurde. Dieses zeigt, dass die Spezifität der Bindung von La an HBV RNA-B2 durch andere Faktoren im Nukleus moduliert wird und somit vermutlich entscheidend für die Ausbildung dieser Wechselwirkung ist. Unterstützt wird dieses durch den Befund, dass das Hinzufügen von Kernextrakten in obigen Bindungsversuchen zu einer Verstärkung der Bindung von hLa-WT an HBV RNA-B2 führte (52). Ferner haben diese Analysen ergeben, dass hLa-WT bei der Bindung an HBV RNA-B Multimere ausbildet, welche durch die Zugabe von Kernextrakt aus humanen Zellen ausschließlich in monomere Komplexe umgeformt werden (52). Diese Befunde untermauern, dass wahrscheinlich einzig die monomeren Komplexe als spezifische Interaktion anzusehen sind und dass Interaktionspartner des hLa in Kernextrakten

die Spezifität der HBV RNA-B2 Bindung erhöhen. So ist z.B. für das U2B´´ Protein gezeigt, dass dessen Spezifität in der RNA-Bindung durch das U2A´ Protein erhöht wird (179, 180). Folglich ist die Identifizierung von Interaktionspartnern des hLa Proteins erforderlich, da diese offenbar die Bindung an die HBV RNA ausschlaggebend beeinflussen.

In Abbildung 3.4.4-1 ist dargestellt, dass eine Phosphorylierung des hLa-WT nicht entscheidend ist für die Bindung an HBV RNA-B2. Da wie oben aufgeführt die Bindung unter den gewählten Bedingungen nicht spezifisch ist, kann eine geringe Modulation jedoch nicht ausgeschlossen werden. Dieses wäre vielleicht für die Wechselwirkung *in vivo* entscheidend, wird hier aber aufgrund der Versuchsanordnung *in vitro* nicht detektiert. Dieses Ergebnis zeigt dessen ungeachtet, dass die hier aufgezeichnete Wechselwirkung mit HBV RNA-B2 unabhängig von der (De-)Phosphorylierung des rekombinanten hLa ist.
In Untersuchungen zur Wechselwirkung zwischen mLa und HBV RNA wurde eine Reduktion der Bindung durch Dephosphorylierung nachgewiesen (87). In diesem Versuch wurde jedoch ein Kernextrakt insgesamt dephosphoryliert und anschließend im Hinblick auf die Bindung analysiert. Durch diesen Versuchansatz kann keinesfalls differenziert werden, ob die Dephosphorylierung von mLa oder eines anderen Faktors zur Reduktion der Bindung führte. Da die Bindung von rekombinantem hLa-WT an HBV RNA-B2 hingegen nicht durch eine (De-) Phosphorylierung beeinflusst wurde, ist anzunehmen, dass bisher unbekannte hLa Interaktionspartner die Bindung an HBV RNA regulieren.

Für die Entwicklung antiviraler Therapien ist nicht nur die Kenntnis darüber entscheidend, wie potentielle Interaktionspartner die Bindung zwischen hLa und der HBV RNA beeinflussen und welche Charakteristika diese Bindung auszeichnen, sondern auch welche Domänen des Proteins dafür essentiell sind. Dieses ist insbesondere deshalb von Bedeutung, da das hLa Protein mit einer Vielzahl verschiedener RNAs in der Zelle interagiert und somit Unterschiede in den einzelnen Bindungen von herausragender Bedeutung sein könnten. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Mutationen (Tabelle 3.2) in das Protein eingefügt und im nativen EMSA auf ihre Bindung zur HBV RNA-B2 analysiert.
Das Ergebnis dieser Untersuchungen zeigt zunächst, dass das N-terminale RRM1 (hLa-Δ1, aa 11 – 99) wie auch die Aminosäuren 323 – 354 (hLa-Δ6.3) nicht von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Bindung der HBV RNA-B2 sind (Abb. 3.4.5-1A, 3.4.5-2A). Da die Bindungsbedingungen wie aufgeführt eher unspezifisch sind, ist es möglich, dass diese Regionen über die Spezifität der Bindung *in vivo* entscheiden. Dieses kann von besonderer Bedeutung sein, da diesen Regionen des hLa auch in der Erkennung von tRNAs eine große Bedeutung zugeschrieben wird ((127, 221) sowie Referenzen in 1.3). An späterer Stelle wird aufgeführt, dass diese Regionen für die Bindung von $tRNA^{Val}$ in hier durchgeführten EMSAs nicht ausschlaggebend sind (siehe unten). Demnach sind diese Bereiche des Proteins für die

Wechselwirkung mit HBV RNA-B2 wie auch $tRNA^{Val}$ *in vitro* nicht essentiell, vermitteln aber vermutlich die Spezifität der RNA-Bindung allgemein.
Diese Möglichkeit wird durch Befunde unterstützt, wonach bei mehreren RRMs innerhalb eines Proteins einige RRMs die Spezifität der RNA-Bindung vermitteln können (123) und dadurch, dass für die RNA-Bindung die Beteiligung der RRMs je nach Substrat variieren kann (193). Ferner kann die spezifische RNA-Bindung insbesondere durch Aminosäuren außerhalb des RRMs bzw. der β-Strukturen der RNPs reguliert werden (69). Da im hLa Protein das RRM1 mit den direkt umliegenden Sequenzen hochkonserviert ist (127), könnte dies auf die Regulierung der Spezifität durch das RRM1 hindeuten. Dieses muss in zukünftigen Experimenten unter stringenten Versuchsbedingungen und mit Bestimmungen der Affinität und Spezifität der Mutanten analysiert werden.

Die Deletion der Multimerisierungsdomäne in hLa-Δ6.0 (aa 274 – 354) führte zu einer Reduktion der Bindung an HBV RNA-B2 (Abb. 3.4.5-1B) und das Ergebnis dieses EMSAs erlaubt folgende Schlussfolgerungen: einerseits ist dargelegt, dass die Multimerisierung über diese Domäne nicht zur Wechselwirkung beiträgt, da dieses Protein mit der HBV RNA-B2 interagierte und nur als Monomer vorlag (siehe oben). Demgegenüber zeigt dieses Ergebnis, dass die hier deletierten Aminosäuren zur effizienten Bindung beitragen und sich ihr Fehlen in einer deutlichen Reduktion der Bindung niederschlägt. Durch Craig et al. (44) wurde gezeigt, dass lediglich die N-terminalen Aminosäuren 1 – 194 zur RNA-Bindung benötigt würden. Dieser Sequenz fehlt nicht nur die hier beschriebene Region aus hLa-Δ6.0, sondern auch das RRM3, welches wie später aufgeführt unter anderem entscheidend ist für die Bindung von RNA (siehe unten). In den von Craig et al. beschriebenen Experimenten wurde nicht nur eine andere RNA (nt 1 – 111 der HIV TAR RNA) benutzt, sondern es wurden auch UV-Quervernetzungsversuche durchgeführt. Durch letztere Methode könnte unter Umständen auch eine sehr kurzlebige und schwache Interaktion detektiert werden, welche mit den hier benutzten nativen EMSAs nicht festzustellen war.
Um den in hLa-Δ6.0 deletierten Bereich weiter einzugrenzen wurden die Deletionen hLa-Δ6.2 (aa 291 – 354) und hLa-Δ6.3 (aa 323 – 354) eingefügt und auf ihre Bindung zur HBV RNA-B2 untersucht. Die Mutation hLa-Δ6.3 führte kaum zur Reduktion der Bindung, wohingegen diese durch die Mutation hLa-Δ6.2 erheblich vermindert war (Abb. 3.4.5-1A). Somit wird die hier entscheidende Domäne auf die Aminosäuren 274 – 323 festgelegt, wobei durch das Fehlen der Reste 291 – 323 die intensivste Reduktion der HBV RNA-B2 Bindung verursacht wird. Diese Region ist bisher nicht im Zusammenhang mit der RNA-Bindung beschrieben. Da den Resten 309 – 329 eine α-Helix als Struktur zugeordnet wird (100) und da α-Helices als RNA-bindend beschrieben sind (202), könnte diese Struktur mit der HBV RNA-B2 interagieren. Dieses würde

auf einen bisher unbeschriebenen, alternativen RNA-Bindungsmechanismus zu den RRMs im hLa hindeuten.
Da dieses auch unter den wenig spezifischen Bedingungen der Bindungsreaktion zu einer sehr deutlichen Reduktion der Wechselwirkung mit HBV RNA-B2 führt, ist die Bedeutung dieser Region als besonders hoch einzustufen. Diese Schlussfolgerung beruht auf der Korrelation dreier nur teilweise überlappender Mutationen, so dass die Bedeutung dieser Region in weiteren Versuchen belegt werden muss. Ferner können strukturelle Veränderungen aufgrund der Mutationen nicht ausgeschlossen werden.
Durch die Position des Komplexes aus HBV RNA-B2 und hLa-Δ6.0 wird die Lage des monomeren RNPs im EMSA gezeigt. Ferner gibt diese Information die Grundlage für ein Modell, demzufolge multimeres hLa bei Verfügbarkeit von RNA zu einem monomeren RNA-Protein-Komplex zerfällt. Das im EMSA eingesetzte hLa-WT liegt nachweislich als multimeres Molekül vor, bindet aber RNA präferentiell als Monomer. Es ist jedoch unklar, ob dieses genauso für die Situation in der Zelle gilt, da bisher eine *in vivo* Multimerisierung des hLa nicht gezeigt wurde.

Die Deletion der Aminosäuren 353 – 393 in hLa-Δ7 führten zu einer erheblichen Reduktion der Bindung an HBV RNA-B2 (Abb. 3.4.5-1B). Demzufolge trägt der hier deletierte C-terminale Bereich zur effizienten Bindung dieser RNA bei. Dieser Region ist bisher keine Funktion in der Bindung von RNA zugeschrieben. Allerdings ist durch diese Mutation die konserviert basische, potentielle Phosphatbindungsstelle (aa 348 – 366 (92)) größtenteils deletiert, welche somit zur Bindung an HBV RNA-B2 beitragen könnte. Sofern strukturelle Störungen des Proteins aufgrund der Deletion ausgeschlossen werden können, würde dieses ebenfalls auf einen zu den RRMs alternativen Bindungsmechanismus im hLa Protein hindeuten.

Das humane La Protein enthält neben oben genanntem RRM1 zwei weitere RRMs (siehe 1.1). Um die Beteiligung der Domänen RRM2 und RRM3 an der HBV RNA-B2 Bindung zu untersuchen, wurden die RNP-Konsensussequenzen durch interne Deletionen mit Größen von 6 – 11 Aminosäuren entfernt (Abb. 3.4.5-2C). Diese RNP-Sequenzen stellen das charakteristische Kennzeichen von RRMs dar und vermitteln den direkten Kontakt zur gebundenen RNA (siehe unten sowie (2, 32, 105)). Von entscheidendem Vorteil ist hierbei, dass es sich um sehr kleine Deletionen handelt, welche selektiv bestimmte Unterregionen in den RRMs ausschalten.

Die Bindungsstudien mit diesem Mutanten zeigen eindeutig, dass Deletionen im RNP-2 des RRM2 und RRM3 (hLa-Δ2 bzw. hLa-Δ4) zum vollständigen Verlust der Bindung von HBV RNA-B2 führen (Abb. 3.4.5-2A). Die Deletionen in den jeweiligen RNP-1 Sequenzen (hLa-Δ3 bzw. hLa-Δ5) führen ebenso zu einer erheblichen Verminderung der RNA-Bindung, wobei noch

schwache Signale erkennbar sind. Die uneingeschränkte Notwendigkeit der RNP-2 Domänen im RRM2 und –3 ist hierdurch belegt, da auch unter den eher unspezifischen Bedingungen keine Bindung der RNA nach Deletion dieser Motive erfolgt.
Dieses Ergebnis führt zu einem Modell, demzufolge das RRM2 und RRM3 in einem kooperativen Mechanismus gemeinsam die Bindung der HBV RNA-B2 vermitteln. Für mehrere Proteine ist die gemeinsame Bindung einer RNA durch zwei RRMs beschrieben (49, 84) und die hier gewonnenen Ergebnisse implizieren diese Möglichkeit im Falle des RRM2 und –3 im hLa Protein. Unter diesen Umständen sollte eine Störung der Struktur in diesen RRMs zu einer erheblich reduzierten Bindung führen. Obiges Resultat zeigt, dass für die Wechselwirkung mit HBV RNA-B2 ein Fehlen dieser Regionen durch keine andere Region im Protein ausgeglichen werden kann und unterstützt dieses Modell. Obwohl die RNP-2 Motive im RRM2 und RRM3 wenig Homologie zu der von Birney et al. (25) ermittelten Konsensussequenz für RNPs aufweisen (Abb. 3.4.5-2C), belegt das Resultat die Notwendigkeit dieser Domänen für die Bindung von HBV RNA-B2.
Dieses Ergebnis beschreibt nicht nur erstmalig detailliert die Bedeutung der RRMs 2 und 3 im hLa für die Bindung von HBV RNA-B2, sondern führt auch zur Identifizierung von neuen, essentiellen Domänen in der RNA-Bindung durch das humane La Protein.

In der β1α1β2β3α2β4-Struktur des RRMs (siehe 1.1 + Abb. 1.1-2) liegen sich die RNP-Sequenzen in den β1- und β3-Faltblättern in einer Ebene gegenüber, wobei extern orientierte aromatische Reste in diesen Sequenzen die RNA-Bindung vermitteln (93, 144, 220). Demgegenüber sind aromatische Reste außerhalb der β-Faltblätter für die richtige Positionierung der RNA und des RRMs verantwortlich (32, 69). Neben Tyrosin-114 (Y114) liegt Phenylalanin-118 (F118) als aromatische Gruppe im RNP-2 Motiv des RRM2, wobei letzteres im Gegensatz zum Tyrosin nicht in die RNP-Konsensussequenz passt ((25), siehe auch Abb. 3.4.5-2C). Um eine Beteiligung des F118 an der Bindung von RNA zu untersuchen und um die strukturelle Integrität des RNPs möglichst aufrecht zu erhalten, wurde die Punktmutation F118A eingefügt. Diese bewirkte eine um 50% reduzierte Bindung der HBV RNA-B2 (Abb.3.4.5-2A). Strukturelle Modifikationen des Proteins hLa-F118A im Vergleich zum Wildtyp sind aufgrund dieser geringen Mutation nahezu auszuschließen. Dieses Resultat zeigt die wichtige Funktion des Phenylalanin-118 in der Bindung der HBV RNA-B2 durch hLa, unterstützt die oben aufgeführten Ergebnisse für die Deletion im RNP-2 und entspricht in jeder Hinsicht oben erläuterten Funktionen aromatischer Seitengruppen in RNP-Sequenzen.
Die durch die Mutationen des hLa gewonnenen Bindungsdaten der verschiedenen Domänen des Proteins an die HBV RNA-B2 werden zu folgendem hypothetischen Modell der Bindung zusammengefasst:

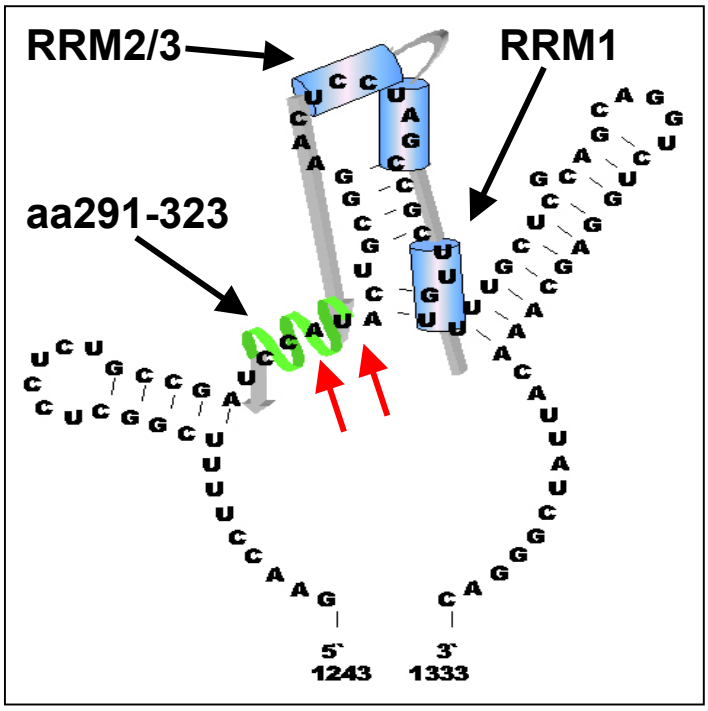


Abbildung 4.2-1: Hypothetisches Modell für die Bindung von hLa-WT an HBV RNA-B2. Die RRMs –1, -2 und –3 des hLa sind schematisch als Tonnen (*blau*) dargestellt und durch Linien (*grau*) verbunden. Gezeigt ist die vorhergesagte Struktur der HBV RNA-B, welche der der HBV RNA-B2 entspricht. Das RRM1 bindet an eine U-reiche Region, wie sie auch in tRNAs vorkommt (dort jedoch nicht intern). RRM2 und –3 binden gemeinsam an die mittlere Haarnadelschleife-2. Die endoribonukleolytischen Spaltstellen der HBV RNA (*rote* Pfeile) werden sterisch geschützt durch die überwiegend als α-Helix vorliegenden Aminosäuren 291 – 323 (*grün*). Weitere Erläuterungen finden sich im Text. Die Größenverhältnisse stimmen vermutlich nicht mit der Realität überein.

Die Abbildung 4.2-1 zeigt die hypothetische Bindung von hLa an die HBV RNA-B2, wie sie sich aus den Bindungsdaten ergeben könnte. Dabei binden die Hauptbindungsmotive RRM2 und –3 an die Hauptbindungsstelle in der Haarnadelschleife-2 (obige Resultate und in Anlehnung an (87)). Mehrere RNA Co-Kristallstrukturen von RRM-Motiven implizieren, dass etwa 5 Nukleotide je RRM gebunden werden und dass es sich dabei um überwiegend exponierte Nukleotide in Ausbuchtungen („*bulges*“) oder in „*loops*“ von Haarnadelschleifen handelt (49, 84). Im vorliegenden Fall führen sowohl Störungen dieser Haarnadelschleifen-Struktur der RNA als auch Mutationen im RRM2 oder –3 in hLa zu einem erheblichen oder vollständigen Verlust der Bindung (o.g. Ergebnisse sowie in Anlehnung an Resultate aus (87)). Die Bindungsstelle für das RRM1 wurde in Anlehnung an Ergebnisse aus prä-tRNA Studien gewählt, wo La den poly-(U) 3´-Terminus bindet, so dass auch hier eine U-reiche Region erkannt wird. Das RRM1 ist bisher für die Bindung terminaler poly-(U) Regionen beschrieben (126, 127, 171, 197, 221), obwohl vermutlich auch interne poly-(U) Sequenzen erkannt werden können (167). Die Strukturen der RRMs in hLa sind vermutlich der für diese Motive bekannten β1α1β2β3α2β4-Anordnung (144, 220) ähnlich. Die C-terminale Region (Aminosäuren 291 – 323 in Abb. 4.2-1) liegt partiell als α-Helix vor (100) und bindet in diesem Modell an die endoribonukleolytischen Spaltstellen der HBV RNA (in Anlehnung an (86)), um diese sterisch zu schützen. Es ist möglich, dass weiter C-terminale Domänen (wie z.B. das WAM) an dieser Interaktion beteiligt sind. Dem Modell zufolge würde der Verlust der C-terminalen Region durch Cytokin-induzierte Prozessierung des hLa (85, 86) die Spaltstelle der HBV RNA freigeben und in einer Destabilisierung der HBV RNA resultieren.

Im Hinblick auf die Entwicklung von Therapie-Ansätzen bei einer bestehenden Hepatitis B Infektion ist die Wechselwirkung zwischen der viralen RNA und dem La Protein ein optimaler Angriffspunkt für die Destabilisierung der HBV RNA. In der vorliegenden Arbeit sind Motive im humanen La Protein identifiziert, welche zur *in vitro* Bindung der HBV RNA beitragend und/oder absolut notwendig sind.

Als Ansatzpunkte eignen sich im hLa eventuell die Regionen der Aminosäuren 11 – 99 (RRM1) und/oder 323 – 354, da diese nicht essentiell für die Bindung sind, aber unter Umständen die Spezifität modulieren. Die Funktion der C-terminalen Reste 353 – 393 ist unklar und wurde hier nicht vergleichend für zelluläre tRNAs untersucht. Diese Ergebnisse könnten dazu beitragen, Moleküle zu finden oder zu synthetisieren, welche beispielsweise die Bindungsstellen der HBV RNA im La Protein besetzen, wie die RNP-2 Sequenzen im RRM2 und –3. Andererseits könnte im Umkehrschluss die Bindungsstelle des hLa Proteins auf der HBV RNA durch Peptide besetzt werden, welche der Struktur und/oder Sequenz der RNP-2 Motive der RRMs –2 und –3 des hLa angepasst sind. Beiderseits könnte die Unterbindung dieser Wechselwirkung zu einer verminderten oder vollständig reduzierten Stabilisierung der HBV RNA durch das La Protein führen und somit die Replikation des Virus ausschalten. Dabei ist zu gewährleisten, dass die zellulären Funktionen des hLa nicht beeinträchtigt werden. Dieses scheint erschwert, da die für die HBV RNA-B2 Bindung identifizierten, essentiellen Domänen auch für die Bindung von tRNAs entscheidend sind, wie nachfolgend diskutiert wird.

4.3 Die Funktion des humanen La in der Bindung und Synthese von tRNA

4.3.1 Die *in vitro* Bindung von $tRNA^{Val}$ durch das humane La Protein

Um die Bindungscharakteristika des hLa für HBV RNA-B2 mit der Bindung an zelluläre RNAs zu vergleichen erfolgte die Untersuchung der *in vitro* Bindung des hLa an tRNA. Diese RNAs werden *in vivo* durch das La Protein gebunden, wobei das Protein u.a. an vermutlich alle Vorläufer-Moleküle von RNA Polymerase III Transkripten (u.a.) bindet (124, 126, 221, 222). Die Bedeutung dieser Wechselwirkung liegt insbesondere in der Stabilisierung von prä-tRNAs, während diese im Laufe ihrer molekularen Reifung zur reifen tRNA prozessiert werden (siehe 1.3). Um eventuelle Abweichungen in der Bindung des Proteins an tRNA von der an HBV RNA-B2 unterscheiden zu können wurden mit oben beschriebenen Mutanten des hLa (Tabelle 3.2) ebenfalls native EMSAs durchgeführt. Als RNA Substrat wurde eine mittels *in vitro* Transkription synthetisierte $tRNA^{Val}$ eingesetzt, welche als prä-tRNA, als reife tRNA oder als Prozessierungs-Zwischenstufe vorlag (Abb. 3.5.3-1).

Durch das in Abbildung 3.5.1-1 dargestellte Ergebnis wird die Spezifität der Bindung von hLa-WT an prä-tRNA^{Val} gegenüber dem reifen Molekül dokumentiert. Die Bindung an prä-tRNA^{Val} war dabei nicht nur wesentlich intensiver, sondern konnte auch durch hohe Mengen Kompetitor nicht reduziert werden. Demgegenüber band das Protein die reife tRNA^{Val} fast überhaupt nicht und zeigte daher einen kaum messbaren Einfluss des Kompetitors. Das Ergebnis folgt den bisher publizierten Daten und stimmt mit dem Modell überein, wonach das La Protein an prä-tRNAs bindet und im Laufe der Prozessierung der prä-tRNA zur reifen tRNA durch andere Faktoren ersetzt wird ((57, 124, 126, 146, 171, 197, 222, 227) sowie auch 1.3). Die Ausbildung von multimeren Komplexen war zudem vermindert, was ein weiterer Hinweis auf die spezifischen Bedingungen ist, da diese Komplexe als unspezifisch eingestuft sind (siehe oben).

Für die Identifizierung von essentiellen Domänen seitens des Proteins muss gewährleistet sein, dass ein Ausbleiben der Bindung nicht durch stringente Bedingungen verursacht wird. Dieses könnte ansonsten zu falschen Schlussfolgerungen führen, so dass für die nachfolgenden Analysen unspezifische Bindungsbedingungen gewählt wurden. Dabei gilt ebenso wie für die Bindung an HBV RNA-B2, dass ein Ausbleiben der Wechselwirkung unter diesen Bedingungen als besonders bedeutungsvoll einzustufen ist.

Für die Funktion des hLa in der Prozessierung von tRNAs sowie in der Kontrolle der RNA Polymerase III Aktivität und dem Recycling dieses Transkriptions-Komplexes wurde eine Regulation des hLa durch Phosphorylierung an Serin-366 gezeigt ((57, 99, 120, 150) siehe auch 1.3). Daher war ebenso wie für die HBV RNA-B2 sicherzustellen, dass eventuelle Defekte in der *in vitro* RNA-Bindung nicht durch eine fehlende Phosphorylierung des rekombinanten hLa verursacht werden. Die *in vitro* Phosphorylierung des rekombinanten hLa-WT mit Casein Kinase-II wurde oben beschrieben (Abb. 3.1.2-1 und 3.1.3-1) und zeigte keinen Effekt auf die Bindung an reife- oder prä-tRNA^{Val} durch das Protein (Abb. 3.5.2-1). Somit sind in den nachstehend diskutierten EMSAs Defekte in der Bindung von tRNA^{Val} bei den Mutationen des hLa nicht auf diese Modifikation (oder ihr Fehlen) zurückzuführen. Die Bindung der reifen tRNA^{Val} sowie die Bildung multimerer Komplexe zeigt die geringe Spezifität der Bedingungen.
Endogenes La Protein existiert in humanen Zellen in phosphorylierten und dephosphorylierten Subfraktionen, welche beide gleichermaßen hY1-RNA banden (58). Auch für das Hefe-Homolog Lhp1p wurde keine Funktion aufgezeichnet, welche durch eine Phosphorylierung moduliert wird (120). Da jedoch die Phosphorylierung die Erkennung der poly-(U) Sequenz in Polymerase-III Transkripten vermitteln kann (150), trägt diese Modifikation vermutlich zur spezifischen Unterscheidung und Bindung des RNA Substrats bei. Dieses wird durch die hier benutzten unspezifischen Versuchsbedingungen nicht detektiert und führt zu einer Phosphorylierungs-unabhängigen Bindung der tRNA^{Val}.

Durch Bindungsstudien mit den Mutanten des hLa wurde analysiert, welche Domänen des rekombinanten hLa an der Bindung von $tRNA^{Val}$ beteiligt sind und sich gegebenenfalls von der Bindung an HBV RNA-B2 unterscheiden. Durch die Deletionen hLa-Δ2 und hLa-Δ4 wurden die RNP2-Konsensussequenzen im RRM2 und –3 deletiert, welche zusammen mit dem RNP-1 die charakteristischen Kennzeichen eines RRMs ausmachen (2, 32, 105). Dadurch wurde ein vollständiger Verlust der Bindungsaktivität verursacht (Abb.3.5.3-2A+B), wobei dieses unabhängig vom eingesetzten $tRNA^{Val}$-Substrat geschah. Deletionen im RNP-1 führten im Falle des RRM2 (hLa-Δ3) zum gleichen Ergebnis, wobei das RNP-1 im RRM3 (hLa-Δ5) nur teilweise zur Bindung beitrug und somit anzeigt, dass dieses Motiv für die Bindung von tRNA vermutlich weniger entscheidend ist. Hingegen belegen die Ergebnisse für das RNP-1 und –2 im RRM2 sowie das RNP-2 im RRM3 eine absolute Notwendigkeit dieser Regionen für die Bindung von $tRNA^{Val}$.
Wie oben für die Wechselwirkung mit HBV RNA-B2 gezeigt, führte die Punktmutation hLa-F118A zu einer um 50% verminderten Bindung an $tRNA^{Val}$ (Abb. 3.5.3-2C). Folglich vermittelt diese Aminosäure wie bei HBV RNA-B2 (Abb. 3.4.5-2A) auch die Bindung an $tRNA^{Val}$ und zeigt die wichtige Funktion dieser aromatischen Aminosäure für die Interaktion mit RNA. Dieses Ergebnis impliziert nicht nur, dass das RRM2 und –3 als generelle Motive in der RNA-Bindung gelten, sondern auch, dass über diese Regionen grundsätzlich über das Bilden oder Ausbleiben einer RNA-Bindung entschieden wird. Daher beschreibt diese Arbeit erstmalig die generelle Bedeutung und grundlegende Notwendigkeit dieser Motive im humanen La Protein für die Bindung von RNA.

Die Bedeutung des RRM1 ist unter den gewählten Versuchsbedingungen nur gering, da die Deletion dieses Motivs in hLa-Δ1 (Δaa11-99) zu einem nur geringen Unterschied in der Bindung von $tRNA^{Val}$ im Vergleich zum Wildtyp führte (Abb. 3.5.3-2A+B). Dieses geschah unabhängig vom $tRNA^{Val}$ Substrat und impliziert, dass dieses Motiv für die tRNA Bindung nicht essentiell ist. Diese Region des La Proteins ist unter den verschiedenen Spezies konserviert und bindet an den poly-(U) 3´-Terminus von Polymerase III Transkripten (36, 127, 150, 197, 221). Wie oben bereits für die Wechselwirkung dieses Motivs mit HBV RNA-B2 erläutert, wird eine Regulation der Spezifität der RNA-Bindung des hLa über das RRM1 geschlussfolgert, so dass unter unspezifischen Bindungsbedingungen keine Änderung der Bindungsaktivität des Proteins bewirkt wird. Durch Arbeiten von Ohndorf et al. ist gezeigt, dass Sequenzen (und RRMs) C-terminal vom RRM1 die Bindung von hLa an poly-Uridin modulieren (150). Ferner hat eine Studie ergeben, dass die Funktion des hLa in der internen Translations-Initiation des HCV IRES-Elements (*internal ribosome entry site*) auch ohne den N-Terminus erfolgt (168).

Eine Deletion der Aminosäuren 323 – 354, welche neben einer Arginin-Lysin-reichen Sequenz das WAM enthält, führte wie die Deletion des RRM1 (s.o.) nicht zu einer Reduktion der $tRNA^{Val}$ Bindung durch hLa (Abb.3.5.3-3A+B). Es wird vermutet, dass das WAM (aa 333 – 339 (206)) an das 5´-Triphosphat von prä-tRNAs bindet (57), wobei die direkte Interaktion noch nicht gezeigt wurde. Die hier gewonnenen Resultate deuten darauf hin, dass diese Region entweder nicht an der Bindung von prä-$tRNA^{Val}$ beteiligt ist, oder dass hierüber die Spezifität der Bindung beeinflusst wird. Letzteres würde aufgrund der Versuchsanordnung nicht detektiert werden. Da das hLa Protein mit einer Vielzahl verschiedener RNAs interagiert (siehe 1.1) ist eine Regulation der Spezifität erforderlich. Des weiteren könnten für eine spezifische Bindung die dafür benötigten Domänen im hLa in Abhängigkeit vom RNA-Substrat unterschiedlich sein. Durch einen Vergleich der Bindungsspezifität für hY4 RNA und HIV TAR RNA wurde eine unterschiedliche Sensitivität gegenüber verschiedenen Kompetitoren gezeigt, was einen unterschiedlichen Bindungsmodus für diese RNAs anzeigt (37). Ferner ist vergleichend zur prä-tRNA dargestellt, dass die Wechselwirkung des hLa mit dem IRES-Element der HCV RNA nur die C-terminale Region des Proteins erfordert (6).

Wie aufgeführt reduziert die Deletion der Aminosäuren 323 – 354 nicht die $tRNA^{Val}$ Bindung, wohingegen das Fehlen der Reste 274 – 354 bzw. der Minimal-Sequenz 291 – 323 zu einer erheblichen Reduktion der Bindung von $tRNA^{Val}$ führte (Abb. 3.5.3-3A+B). Dieses Ergebnis belegt die Bedeutung dieser Region für die Bindung der $tRNA^{Val}$ und zeigt erstmalig die Notwendigkeit dieses neu identifizierten Motivs für eine effiziente Wechselwirkung mit tRNA. Wie im Falle der Bindung an HBV RNA-B2 (siehe oben und Abb. 3.4.5-1A) ist diese Region beitragend zur effizienten Interaktion mit tRNA. Folglich könnte wie bei HBV RNA-B2 auch mit tRNA die Interaktion zusätzlich zum RRM über diese α-helikale Region (100) aufgebaut werden.
Da dieses Ergebnis aus der Korrelation dreier Mutationen entsteht, sollte die Bedeutung der Region für die tRNA Bindung durch eine einzelne Deletion der Reste 291 – 323 verifiziert werden. Zudem würde diese Untersuchung die Bedeutung der Aminosäuren 274 – 291 überprüfen, welche möglicherweise ebenfalls an dieser Interaktion beteiligt sind.
Zusammenfassend kann auch hier ein hypothetisches Modell aufgestellt werden, welche Regionen des humanen La Proteins an welche Regionen in der tRNA binden:

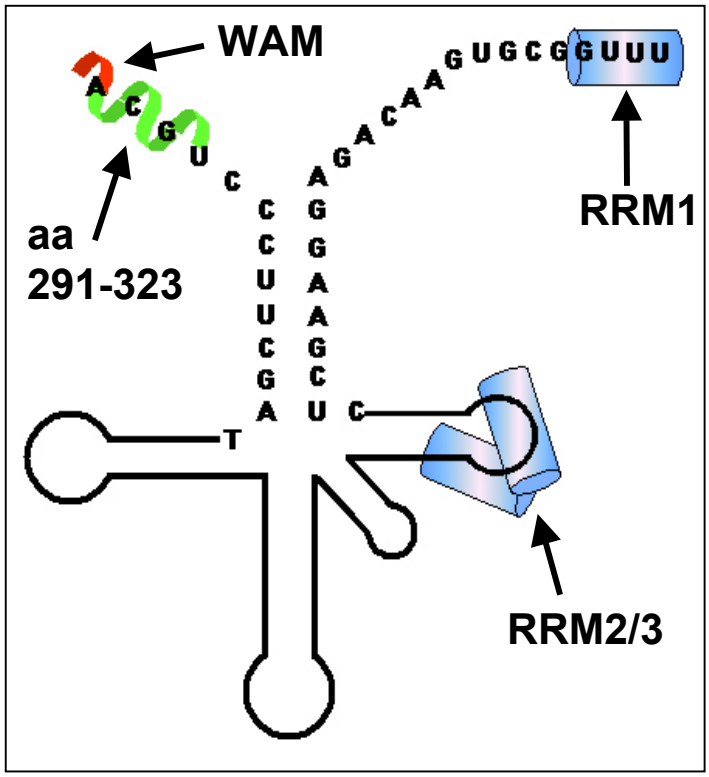


Abbildung 4.3-1: Hypothetisches Modell über die Bindung von hLa an prä-tRNA^{Tyr}. Die RRMs des hLa sind schematisch als Tonne (*blau*) dargestellt. Modell für die potentielle Bindung des hLa Proteins an prä-tRNA^{Tyr}, wie es sich aus den eigenen Bindungsdaten und den Angaben in der Literatur ergeben könnte. RRM1 bindet den poly-(U) 3´-Terminus, RRM2 und –3 binden an den T-Arm des Moleküls und die C-terminale Region bindet den 5´-Terminus der prä-tRNA^{Tyr}. Hierbei bindet das WAM (*rot*) an das 5´-Triphosphat, die Reste 291-323 (*grün*) binden den 5´-*leader*. Die Struktur der tRNA ist in Anlehnung an die Kleeblatt-Struktur gezeichnet. Zur Übersicht sind die verbindenden Reste zwischen den Proteindomänen ausgelassen. Weitere Erläuterungen im Text. Die Größenverhältnisse stimmen vermutlich nicht mit der Realität überein.

Abbildung 4.3-1 zeigt ein hypothetisches Modell für die Bindung von hLa an prä-tRNA^{Tyr}, wie es sich aus eigenen Bindungsdaten (siehe oben und 3.5) und den Angaben aus der Literatur ergeben könnte. Gemäß einer Vielzahl an Untersuchungen bindet das RRM1 an den poly-(U) 3´-Terminus der prä-tRNA (siehe Übersichtsartikel (124, 126, 127, 221, 222)). In den hier aufgeführten Untersuchungen wurde das RRM1 als nicht essentiell eingestuft und vermittelt möglicherweise die Spezifität der prä-tRNA Bindung. Das RRM2 und –3 binden wie oben beschrieben kooperativ an eine Struktur der tRNA und bilden die Hauptbindungsmotive im hLa, welche in diesem Modell an den TΨC -Arm der tRNA binden. Diese Region ist eine unter den verschiedenen Spezies am höchsten konservierten Sequenzen in tRNAs (129, 176). Der TΨC-Arm (Base 54 – 60 in reifen tRNAs) weist bei Eukaryonten und Bakterien stets ein T als Base-55 auf, welches zu einem Pseudo-Uridin (Ψ) modifiziert ist, und besitzt eine fast immer zu m^5U modifizierte Base-54 (129). Über das Motiv des TΨC-Arms werden reife tRNAs im Nukleus durch den Exportfaktor Xpo-t gebunden (13), so dass eine Bindung des hLa an diese Sequenz den verfrühten Nukleus-Export unreifer tRNAs verhindern könnte. Das WAM bindet an das 5´-Triphosphat der prä-tRNA (in Anlehnung an (57)), so dass die Reste 291 – 323 mit α-helikaler Struktur an den 5´-*leader* der prä-tRNA binden könnten. In Abbildung 4.3-1 sind die Aminosäuren, welche nicht den genannten Motiven zugeordnet werden, aus Gründen der Übersicht nicht gezeigt, und in der räumlichen Anordnung liegen die gemäß dem Modell potentiell gebundenen tRNA-Sequenzen in unmittelbarer Nähe zueinander ((129) und Referenzen darin).

In Abschnitt 3.5.4 sind die Ergebnisse der *in vitro* Bindungsstudien mit $tRNA^{Val}$ zu einem Modell über die Hierarchie der an der RNA Bindung beteiligten Regionen zusammengefasst. Dieses Modell leitet sich aus den jeweiligen Effekten der Deletionen ab. Durch die Verwendung verschiedener RNA Substrate wurde analysiert, welche Regionen im Protein an welche Regionen in der tRNA binden. Eine Schlussfolgerung ist für diese Untersuchungen jedoch nur eingeschränkt möglich, da die Deletion bei mehreren Domänen des Proteins zu einem vollständigen Verlust der Bindung führte. Dessen ungeachtet kann jedoch aus der Kombination aller Bindungsdaten eine Hierarchie der RNA-Erkennungs-Motive aufgestellt werden, welche die Regionen danach ordnet, wie entscheidend sie für die Bindung der RNA sind oder auch ob ihr Fehlen durch andere Regionen ausgeglichen werden kann. Zudem wird in dieses Modell einbezogen, dass bestimmte Regionen des hLa Proteins hier zwar nicht essentiell für eine Bindung waren, aber durch mehrere Publikationen anderer Gruppen als beitragend beschrieben wurden (siehe oben und 1.3). Demnach ergibt sich folgendes Resultat für die Wechselwirkung zwischen hLa-WT und $tRNA^{Val}$:

- Essentiell für die Bindung sind das RNP-1 und RNP-2 im RRM2 sowie RNP-2 im RRM3. Störungen in der Wechselwirkung über diese Motive können durch keine andere Region kompensiert werden.
- Beteiligt an der Bindung und erforderlich im Sinne einer effizienten Interaktion sind das RNP-1 im RRM3 sowie die Aminosäuren 291 – 323. Störungen in diesen Regionen können bedingt durch andere Regionen ausgeglichen werden.
- Nicht generell entbehrlich für die Bindung, aber vermutlich regulativ für die Spezifität sind das RRM1 und die Reste 323 – 354 (und/oder noch weiter C-terminal). Dieses Annahme soll in zukünftigen Analysen untersucht werden.

Folglich kann aufgrund dieser Ergebnisse klar differenziert werden, dass es Regionen im hLa Protein gibt, welche grundsätzlich für eine Bindung von RNA erforderlich sind. Dabei wird nicht nach dem RNA Substrat unterschieden. Demgegenüber stehen Domänen, welche nicht darüber entscheiden, ob eine RNA gebunden wird oder nicht, sondern vermutlich darüber, wie spezifisch diese Wechselwirkung erfolgt. Das Zusammenwirken aller Regionen führt zu einer effizienten Bindung des RNA Substrats mit hoher Affinität und hoher Spezifität. Nur diese komplexe Regulierung der Bindungsaktivität diverser RNA Bindungsstellen des hLa Proteins erlaubt die Wechselwirkung mit einer Vielzahl verschiedener RNAs.

4.3.2 Die *in vivo* Funktion des hLa Proteins in der tRNA Synthese

In einem neuen experimentellen Ansatz wurde untersucht, wie sich ein Fehlen des endogenen La Proteins in humanen Zellen *in vivo* auf die tRNA Synthese und Prozessierung auswirkt.

Ferner wurde untersucht ob ein Fehlen des endogenen La Proteins in humanen Zellen wie in anderen Spezies durch alternative Stoffwechselwege ausgeglichen werden kann (56, 117, 210). Durch RNA-Interferenz in humanen Zellen wurde das mit etwa 2 x 10^7 Molekülen (57) vorliegende endogene hLa Protein bis unter die Nachweisgrenze im immunologischen Nachweis runterreguliert (Abb. 3.5.5-1). Durch einen Vergleich mit einerseits unspezifisch behandelten und andererseits völlig unbehandelten Zellen wurde die Spezifität der Methode dargestellt. Dieses zeigt die effiziente und selektive Runterregulierung des endogenen La Proteins in humanen Zellen durch die RNA-Interferenz.

Die in Abbildung 3.5.5-2 dargestellten Analysen verschiedener RNAs in den siRNA behandelten Zellen zeigten teilweise erhebliche Unterschiede in den Signalintensitäten. Das hLa Protein nimmt eine regulative Funktion bezüglich der Aktivität der RNA Polymerase III ein (67, 68, 71, 72, 125, 128, 157, 217, 227), so dass ein Ausschalten des endogenen Proteins zu einer Beeinflussung dieser Aktivität führen kann. Um dieses zu untersuchen wurde die Synthese der ribosomalen 5S rRNA dokumentiert, welche ein RNA Polymerase III Produkt ist. Da die Menge dieser RNA durch die α-hLa siRNA Behandlung nicht reduziert war, erscheint ein genereller Effekt auf die Aktivität der RNA Polymerase III unwahrscheinlich und das Fehlen des hLa kann hinsichtlich der Transkription durch einen anderen Faktor *in vivo* kompensiert werden. Da sich die Promotoren wie auch die Transkriptions-Komplexe der RNA Polymerase III für die drei Klassen ihrer Produkte 5S rRNA, tRNA und snRNA unterscheiden (154), kann dieses jedoch nicht vollständig belegt werden. Hierzu müssten die Synthese-Raten bei den Promotoren der einzelnen Klassen unterschieden werden. Schlussendlich ist gezeigt, dass die generelle Aktivität dieser Polymerase in humanen Zellen nicht durch das Fehlen des endogenen hLa Proteins beeinflusst wird. Zudem wird dargestellt, dass das humane La Protein, welches die Vorläufer-Moleküle der 5S rRNA bindet (23, 75, 171, 186), nicht essentiell ist für die Prozessierung dieser RNA.
Die Mengen des RNA Polymerase I Produkts 5.8S rRNA waren unvermindert gegenüber den Kontrollen (Abb. 3.5.5-2), so dass die Aktivität dieser RNA Polymerase ebenso wenig durch das Fehlen des endogenen hLa Proteins verändert wurde.

Ein Fehlen des endogenen hLa reduzierte die Mengen an nicht- oder nicht vollständig prozessierter $tRNA^{Tyr}$ um über 50%, wobei keine Akkumulation unreifer tRNA Moleküle erfolgte (Abb. 3.5.5-2, 3.5.5-3A). Das Resultat impliziert einerseits eine erhebliche Reduktion der Synthese dieser tRNAs, was eine Funktion des hLa in der Transkription andeuten kann. Andererseits könnte durch das fehlende hLa die Stabilisierung und Halbwertszeit der prä-tRNAs während der Prozessierung gestört sein, so dass diese Transkripte nicht prozessiert und unspezifisch exo- oder endonukleolytisch abgebaut würden. Da die Reduktion der Mengen an prä-tRNA zu jenem Zeitpunkt am stärksten war (Abb. 3.5.5-3A), als die Menge des endogenem

hLa bereits wieder gering zunahm, liegt die Funktion des Proteins vermutlich eher im Schutz als in der Synthese der prä-tRNA Transkripte. Die Mengen an prä-tRNA nehmen verzögert ab, da diese vermutlich unspezifisch und unreguliert abgebaut werden. Eine Reduktion der Mengen an reifer $tRNA^{Tyr}$ ist erst später (Tag 3) festzustellen (Abb.3.5.5-3A). Dieses erklärt sich daraus, dass erst das Ausbleiben des Nachschubs an prozessierten tRNAs den verzögert reduzierten Effekt auf Ebene der reifen $tRNA^{Tyr}$ bewirkt.
In Spezies wie *S.cerevisiae* und *X.laevis* liegen alternative Wege der prä-tRNA-Stabilisierung vor, welche ein Fehlen des La Proteins ausgleichen können (109, 117, 227). Demgegenüber zeigt das hier erzielte Ergebnis in humanen Zellen eine nicht durch andere Faktoren ausgleichbare Destabilisierung von prä-tRNAs bei fehlendem hLa. Es kann jedoch nicht endgültig differenziert werden, ob der Effekt auf transkriptioneller und/oder post-transkriptioneller Ebene einsetzt. Hierzu wäre es notwendig, die Synthese einer unspezifischen RNA mit RNA Polymerase III Promotor (Klasse II für tRNAs) zu dokumentieren, wobei die Stabilität dieses Transkripts nicht post-transkriptionell durch hLa reguliert sein dürfte. Bei einem Vergleich der Synthese-Rate in Anwesenheit oder Abwesenheit des endogenen hLa würde dieses den Einfluss auf die Transkription unabhängig von post-transkriptionellen Schritten darstellen. Ferner würde dies zeigen, ob die Funktion des hLa in der RNA Polymerase III Aktivität nur auf eine bestimmte Unterklasse von Promotoren beschränkt ist.

Ein Vergleich der Mengen an reifer und unprozessierter $tRNA^{Tyr}$ mit $tRNA^{Val}$ zeigte erhebliche Unterschiede. Im Gegensatz zu $tRNA^{Tyr}$ enthält $tRNA^{Val}$ kein Intron und wird folglich in einem Spleiß-unabhängigen Weg prozessiert (12, 211, 212). Diese war im Gegensatz zu $tRNA^{Tyr}$ durch ein Fehlen des endogenen hLa Proteins nur gering in ihrer Menge reduziert (Abb. 3.5.5-3A+B) und impliziert, dass die Funktion des hLa Proteins *in vivo* insbesondere im Schutz von Intron-haltigen tRNAs liegt. In einem weiteren Experiment, welches allerdings mit einer anderen Zell-Linie und anderer siRNA-Konzentration durchgeführt wurde, waren beide tRNAs gleichermaßen reduziert. Folglich bleibt offen, ob die Funktion des hLa Proteins im Schutz der prä-tRNAs auf den Spleiß-abhängigen oder Spleiß-unabhängigen Prozessierungsweg beschränkt werden kann oder ob dieses allgemein gültig ist. Der zeitliche Ablauf sowie die exakte Reihenfolge und subzelluläre Lokalisation der einzelnen Schritte der tRNA Prozessierung sind insbesondere für humane Zellen noch teilweise unklar und aus anderen Organismen wie der Hefe übertragen (siehe Übersichtsartikel (1, 103, 142, 222)), und eine Begrenzung der Funktion des hLa auf einen der Prozessierungswege ist bisher nicht erfolgt.

Diese Experimente eröffnen eine Fülle an neuen Ansatzpunkten und sind die Grundlage für zukünftige Untersuchungen, welche die oben gewonnenen Erkenntnisse aus *in vitro* Analysen um eine Vielzahl an Informationen aus der Zelle *in vivo* erweitern. Mit diesem System kann verifiziert werden, welche der verschiedenen Domänen im hLa Protein für die Prozessierung

von tRNAs (oder anderen, siehe 1.1) essentiell sind und welche Domänen die Stabilität der HBV RNA *in vivo* regulieren. Dieses könnte erreicht werden, indem das endogene hLa Protein durch RNA-Interferenz inaktiviert wird und zugleich obige Mutanten des Proteins transfiziert werden. Diese Mutanten wären ihrerseits resistent gegen die hLa-siRNAs, wenn die Sequenz der hLa-mRNA der Mutanten in der siRNA Hybridisierungsstelle mutiert wäre. Anschließend ließe sich dokumentieren, ob die analysierte Funktion des endogenen hLa durch die mutierte Form des Proteins ausgeglichen werden kann. Dieses gäbe Aufschluss über die *in vivo* Funktion der einzelnen Domänen des Proteins und könnte Unterschiede wie z.B. zwischen der HBV RNA und tRNA in ihrer Wechselwirkung mit hLa oder anderen daran involvierten Faktoren in der lebenden Zelle aufklären.

4.4 *„Quo vadis, La?“:* RNA als Sprache zwischen La und Nukleolus?

In oben aufgeführten *in vitro* Analysen wurden detaillierte und neuartige Einblicke über die Interaktion des hLa Proteins mit viraler HBV RNA und zellulärer tRNA gewonnen, sowie Kenntnisse über die Multimerisierung des Proteins. Diese Ergebnisse wurden ferner um *in vivo* Daten erweitert, welche die Relevanz des endogenen Proteins in der lebenden Zelle darlegten. Um die insgesamt erhaltenen Informationen über die verschiedenen Domänen des Proteins mit Funktionen in der Zelle zu vergleichen wurde die subzelluläre Verteilung der mutierten Proteine in Gegenüberstellung zum Wildtyp in humanen Zellen analysiert. Zu diesem Zweck wurden die hLa Proteine als GFP-Fusionsprotein in humane Zellen transfiziert und die Lokalisation der Proteine bestimmt. Das hLa Protein ist als ein überwiegend nukleär-lokalisiertes Protein beschrieben (47, 48, 91). Da die Funktion des Proteins in der Stabilisierung verschiedener RNA-Vorläufer liegt und deren Prozessierung in verschiedenen subnukleären Strukturen ausgeführt werden (siehe 1.1, 1.3), impliziert dies eine funktionsabhängige Lokalisation des Proteins.

Zunächst wurde gewährleistet, dass die Lokalisation des hLa in humanen Zellen nicht durch die Fusion mit GFP verändert wird, in dem die subzelluläre Verteilung eines transfizierten GFP-hLa-WT mit der des endogenen hLa Proteins verglichen wurde (Abb. 3.6.1-1). Da GFP diffus in der gesamten Zelle lokalisiert (siehe z.B. (14, 51)) und da GFP-hLa-WT die gleiche subzelluläre Verteilung mit überwiegend nukleärer Lokalisation einnimmt wie das endogene Protein, wird die Lokalisation des hLa nicht durch die Fusion mit GFP beeinflusst. Zuweilen wurde für das endogene und transfizierte hLa in einigen Fällen eine granulär-erscheinende Anhäufung des Proteins im Nukleus dokumentiert (Abb. 3.6.1-1A+B), was jedoch in lebenden Zellen nur sehr selten beobachtet wurde und somit vermutlich einen Artefakt der Zell-Fixierung darstellt.

Die Analyse der subzellulären Verteilung der Mutanten des hLa Proteins gibt Aufschluss über die an der Lokalisation beteiligten Domänen und korreliert deren zuvor bestimmte Funktion in der RNA-Bindung oder Multimerisierung mit der Verteilung in der Zelle. Dieses setzt voraus, dass die Fusion mit GFP weder die Multimerisierung noch RNA-Bindung beeinflusst.
So wurde gezeigt, dass die Deletion GFP-hLa-Δ7 (Δaa353-393) zu einer ausschließlich cytoplasmatischen Lokalisation des Proteins führt und in der hier deletierten Region folglich das aktive, funktionelle NLS des hLa entfernt wurde (Abb. 3.6.2-1A). Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der von Simons et al. beschriebenen Charakterisierung der Lokalisations-Signale im hLa (191), welche ein NLS für die Aminosäuren 383 – 400 beschrieb. In anderen Arbeiten (98) wird auf die Existenz eines zusätzlichen NLS innerhalb der Region aa316-332 geschlussfolgert, welches in dem hier benutzten System jedoch als nicht existierend oder zumindest als nicht funktionell eingestuft wird.

Die Analyse der Lokalisation der Mutanten GFP-hLa-Δ6.0 (Δaa274-354), GFP-hLa-Δ6.2 (Δaa291-354) und GFP-hLa-Δ6.3 (Δaa323-354) in Abbildung 3.6.2-1 ergab mehrere Ergebnisse: zunächst zeigt die Mutation GFP-hLa-Δ6.0, welcher die Dimerisierungs-Domäne fehlt, dass die Funktion der Multimerisierung nicht notwendig für den Eintritt in den Nukleus ist, da dieses zumindest *in vitro* monomere Protein (s.o. und Abb. 3.3-3) effizient ins Nukleoplasma transportiert wird (Abb. 3.6.2-1B). In dieser Deletion wurde ein potentielles NRE (*nuclear retention element*) zwischen Aminosäuren 167 – 335 (191) oder 316 – 332 (98) deletiert, welches eine Translokation des hLa aus dem Nukleus in das Cytoplasma verhindern soll. Da mit GFP-hLa-Δ6.0 keine verstärkten cytoplasmatischen Signale detektiert wurden liegt in dieser Region folglich kein NRE, oder es gibt weitere unabhängige NRE Sequenzen im hLa, welche die Lokalisation vermitteln.
Ferner werden all diese Mutanten nicht in den Nukleolus transportiert (Abb. 3.6.2-1B-D), so dass ein NoLS für die Minimal-Sequenz aa323-354 geschlussfolgert wurde. Dieses stellt ein bisher nicht beschriebenes Lokalisations-Element im hLa Protein da.
Um die Funktion der Aminosäuren 323 – 354 als NoLS in einem heterologen System zu überprüfen, und um auszuschließen, dass eine strukturelle Störung aufgrund der Mutation die veränderte Lokalisation des Proteins bewirkt, wurden diese Aminosäuren mit einem anderen Protein fusioniert. Abbildung 3.6.3-1A zeigt, dass das zur Fusion benutzte, GFP-markierte Protein PTB im Nukleoplasma und nicht in Nukleoli detektiert werden kann (siehe auch (134)). Folglich besitzt dieses Protein kein NoLS oder geht keine Interaktion mit einem anderen Faktor ein, welcher eine Translokation in den Nukleolus bewirkt. Demgegenüber wird das PTB-GFP durch die N- oder C-terminale Fusion mit dem hLa-NoLS effizient in dieses Kompartiment transportiert (Abb. 3.6.3-1B), was zusätzlich zu oben genannten Immunfluoreszenzen die Funktionalität dieses Signals belegt.

Der Sequenzvergleich der Aminosäuren 323 – 354 im hLa mit anderen NoLS-Sequenzen aus humanen Proteinen (Abb. 3.6.3-1D, Referenzen im Text dazu) zeigt, dass keine Konsensussequenz für die Primärstruktur des NoLS aufgestellt werden kann. Ferner erfolgte durch Andersen et al. die Analyse einer Großzahl der nukleolären Proteine und führte ebenso wenig zur Identifizierung von generellen NoLS-Konsensussequenzen (9). In verschiedenen Arbeiten wurde in einem Sequenzvergleich mehrerer humaner NoLS Sequenzen die Aminosäure-Abfolge R-R-Q-R-R als potentielle Konsensussequenz eingestuft (46, 182). Diese Sequenz ist im NoLS des hLa nicht enthalten, aber die Anhäufung von basischen Aminosäuren (Arginin (R), Lysin (K), Histidin (H)) ist auch im hLa in diesem Bereich besonders ausgeprägt (siehe Anhang) und konserviert (127, 221).

Die Mutation der RNP-Konsensussequenzen im RRM2 in hLa-Δ2 (Δaa113-118), hLa-F118A und hLa-Δ3 (Δaa151-158) führte zum vollständigen Verlust oder einer erheblichen Reduktion der RNA-Bindungsaktivität des hLa (siehe oben sowie Abb. 3.4.5-2A, 3.5.3.-2A-C) und bewirkte in der subzellulären Verteilung des Proteins eine starke Akkumulation im Nukleolus (Abb. 3.6.2-3A-C). Daraus wird geschlussfolgert, dass eine Interaktion mit anderen Faktoren über das RRM2 im hLa für das Verlassen des Nukleolus notwendig ist. Hierbei handelt es sich vermutlich um einen Kontakt mit RNA, da auch die Punktmutation F118A diesen Phänotyp aufzeigte und gezeigt wurde, dass eine aromatische Aminosäure den direkten Kontakt mit RNA bewirken kann (siehe oben für F118 sowie (93, 144, 220) für andere Beispiele). Dieses kann mit den bisherigen Daten jedoch nicht eindeutig auf RNA beschränkt werden. So führte z.B. im Falle des PTB-assoziierten Spleiß-Faktors PSF eine Deletion des RRMs zu einer ebenfalls eindeutig veränderten Lokalisation des Proteins im Nukleus, doch dafür wurde eine Protein-Protein-Wechselwirkung über das RRM als entscheidend identifiziert (51). Auch das hier beschriebene Ergebnis deutet an, dass die Identifizierung von Interaktionspartnern des hLa entscheidende Vorteile bringen wird für die detaillierte Aufklärung verschiedener Funktionen des humanen La Proteins.
Ein leichter Anstieg der cytoplasmatischen Signale war bei Mutationen im RNP-2 des RRM2 zu verzeichnen (Abb. 3.6.2-3A+B), was auf einen veränderten Kernimport des hLa aufgrund dieser Mutation hindeuten könnte. Da das hLa Protein am Kern-Import von RNAs beteiligt sein kann (73), würde eine gestörte RNA-Bindung zu einer cytoplasmatischen Anreicherung des Proteins führen können. Dies wurde jedoch nicht weiter analysiert.

Neben anderen Regionen tragen auch die Aminosäuren 291 – 323 zur RNA-Bindung bei (siehe oben). Bei den hier benutzten Mutationen, welche diese Region enthalten, ist jedoch zusätzlich das NoLS entfernt, so dass nicht untersucht werden kann, ob das Fehlen dieser RNA-bindenden Domäne ebenso zu einer nukleolären Akkumulation führen würde. Hierfür sind neue Mutationen notwendig, welche in zukünftigen Arbeiten erstellt und analysiert werden sollen.

Die Mutation im N-Terminus des hLa (hLa-Δ1, Δaa11-99), welche eine Deletion des RRM1 bewirkt, führte nicht zu einer im Vergleich zum Wildtyp veränderten Lokalisation des Proteins (Abb. 3.6.2-2A). Das Ergebnis zeigt, dass diese Sequenz keine Signale zur subnukleären Lokalisation des Proteins enthält und dass jegliche über dieses Motiv vermittelten Interaktionen für die Lokalisation nicht entscheidend sind. Die subnukleäre Verteilung des Proteins wird folglich nicht durch die Bindung an die 3´-Termini von RNA Polymerase III Transkripten bestimmt. Diese Bindung ist durch verschiedene Arbeiten gezeigt (124, 127, 221), wurde in dieser Arbeit jedoch als Spezifitäts-vermittelnd und für eine generelle RNA-Bindung nicht essentiell eingestuft (s.o.). Wie im Beispiel des PSF Proteins (51), trägt auch im hLa Protein nicht jedes der RRMs zur subzellulären Verteilung bei und dieser Effekt scheint hier auf das RRM2 begrenzt zu sein.

Um eine Beteiligung des RRM3 an der RRM-vermittelten Lokalisation des hLa zu untersuchen, wurden die Mutanten GFP-hLa-Δ4 (Δaa235-242) und GFP-hLa-Δ5 (Δaa266-276) untersucht und es zeigte sich gegenüber dem Wildtyp keine eindeutig veränderte Lokalisation (Abb. 3.6.2-4A+B). Während die Deletion der RNP-2 Konsensussequenz im RRM3 in hLa-Δ4 teilweise zu einer Akkumulation in Nukleoli führte, war das RNP-1 Motiv dieses RRMs für die Verteilung im Zellkern unbedeutend. Daher hat das RRM3 nur einen geringen und hier nicht eindeutig zu bestimmenden Effekt auf die Lokalisation des hLa im Nukleus humaner Zellen. Obwohl Deletionen dieser RNPs zu einer massiven Reduktion der RNA-Bindung *in vitro* führten (Abb. 3.4.5-2A, 3.5.3-2A+B), ist die über dieses RRM vermittelte Interaktion mit anderen Molekülen nicht entscheidend für die Lokalisation. Da eine RRM3 vermittelte Akkumulation in Nukleoli nur durch die Deletion eines der zwei RNPs vermittelt wurde und da im RRM die Bindung einer RNA über beide RNPs aufgebaut wird (2, 32, 105), bleibt offen, ob eine RNA-Bindung über dieses Motiv *in vivo* über die Lokalisation entscheidet.

In den hier beschriebenen Untersuchungen wurde gezeigt, dass das diffus nukleär lokalisierte hLa-WT Protein ein bisher nicht identifiziertes NoLS enthält, welches den Eintritt in den Nukleolus vermittelt und welches auch im heterologen System funktionell ist. Ferner ist dargestellt, dass das Verlassen des Nukleolus über das RRM2 vermittelt wird und, dass eine Wechselwirkung des Motivs mit anderen Faktoren wie z.B. RNA dieses funktionell bestimmt. Demgegenüber wurde abgegrenzt, dass das RRM1, vermutlich das RRM3 sowie eine Multimerisierung weder den Eintritt in den Nukleus noch die subnukleäre Lokalisation beeinflussen.

Die subzelluläre Lokalisation eines Proteins ergibt sich entweder aus dem Vorhandensein von spezifischen Signalsequenzen oder aus der Art und Dauer der Interaktion mit anderen Molekülen. Letzteres bestimmt zudem nicht nur die Lokalisation, sondern auch die Geschwindigkeit der Proteinbewegung in der Zelle. So wurde gezeigt, dass die Mobilität des

endonukleolytischen DNA-Reparaturenzyms ERCC1/XPF durch seine Interaktion mit DNA bestimmt wird und nach Schädigung der Nukleinsäure erheblich verlangsamt ist (95). Bei ungeschädigter DNA bewegt sich dieses Protein wie viele andere im Nukleoplasma mittels freier Diffusion (siehe Übersichtsartikel (96, 116, 138)).

Da in einigen der hier benutzten Mutanten die Bindung an RNA oder die homo-Dimerisierung ausgeschaltet war (s.o.), könnte sich eine veränderte Lokalisation aus einer umgewandelten Mobilität des Proteins ergeben. Um dieses zu bestimmen, wurden FRAP Experimente durchgeführt (siehe 2.13.5) und die Ergebnisse beschreiben erstmalig die Mobilität des hLa. Die Untersuchung des GFP-hLa-WT ergab, dass nach dem Bleichen eines Areals im Nukleoplasma bereits innerhalb von 3 – 4 Sekunden 50% des GFP-Signals in dem gebleichten Bereich wieder hergestellt wurde (Abb. 3.7-1). Dieses gibt Aufschluss über die Geschwindigkeit, mit welcher das GFP-hLa-WT aus nicht-gebleichten Bereichen einströmt. Daraus kann auf die Mobilität des Proteins im Nukleoplasma geschlossen werden und es ergibt sich eine Diffusions-ähnliche Geschwindigkeit, wie für andere Proteine mit gleichen Wiederherstellungsraten beschrieben (138, 161). Ferner zeigt es eine zeitlich gleichmäßige Wechselwirkung des Proteins in den verschiedenen Arealen des Nukleus an und ist in Übereinstimmung mit verschiedenen anderen Kernproteinen (95, 161). Da eine derartige Mobilität auch für physiologisch aktive Proteine gezeigt wurde (155, 161), kann eine physiologische Inaktivität des GFP-hLa-WT ausgeschlossen werden.

Die Mutationen hLa-Δ2 und hLa-F118A führten zu einer inhibierten bzw. reduzierten Wechselwirkung mit RNA und einer Akkumulation in Nukleoli (s.o.). Um sicherzustellen, dass eine Anhäufung des Proteins im Nukleolus nicht durch eine Verlangsamung der Interaktion mit anderen Faktoren ausgelöst wird, wurden diese Proteine ebenfalls in FRAP Experimenten eingesetzt. Auch hierbei ergab sich eine Diffusions-ähnliche Mobilität (Abb. 3.7-3). Folglich bestimmt die Interaktion des hLa mit anderen Faktoren über das RRM2 nicht die Geschwindigkeit der Bewegung. Dieses zeigt, dass sich die Akkumulation dieser Proteine im Nukleolus nicht durch eine verlängerte Interaktion mit anderen Molekülen, sondern aus dem Fehlen eines Signals in Form einer Wechselwirkung ergibt.

In Anlehnung an diese Ergebnisse wurde gleichermaßen für die Mutation GFP-hLa-Δ6.3 eine Mobilität mittels freier Diffusion bestimmt (Abb. 3.7-2), so dass die Geschwindigkeit ebenso wenig durch das fehlende NoLS bestimmt wird.

Folglich bewegt sich das humane La Protein im Nukleoplasma mit einer hohen Geschwindigkeit und wird darin weder durch das NoLS noch das RRM2 und der damit assoziierten Funktionen beeinflusst. Da eine Erniedrigung der Temperatur von 37° C auf Raumtemperatur keine Änderung der Mobilität verursachte, erfolgt der Transport im Nukleus Energie-unabhängig.

Nachdem somit eine Vielzahl an Informationen aus *in vitro* und *in vivo* Analysen gewonnen wurden, welche die Multimerisierung, RNA-Bindung, subzelluläre Lokalisation und Mobilität umfassten, wurden diese Daten korreliert und zu folgendem Modell zusammengefasst.

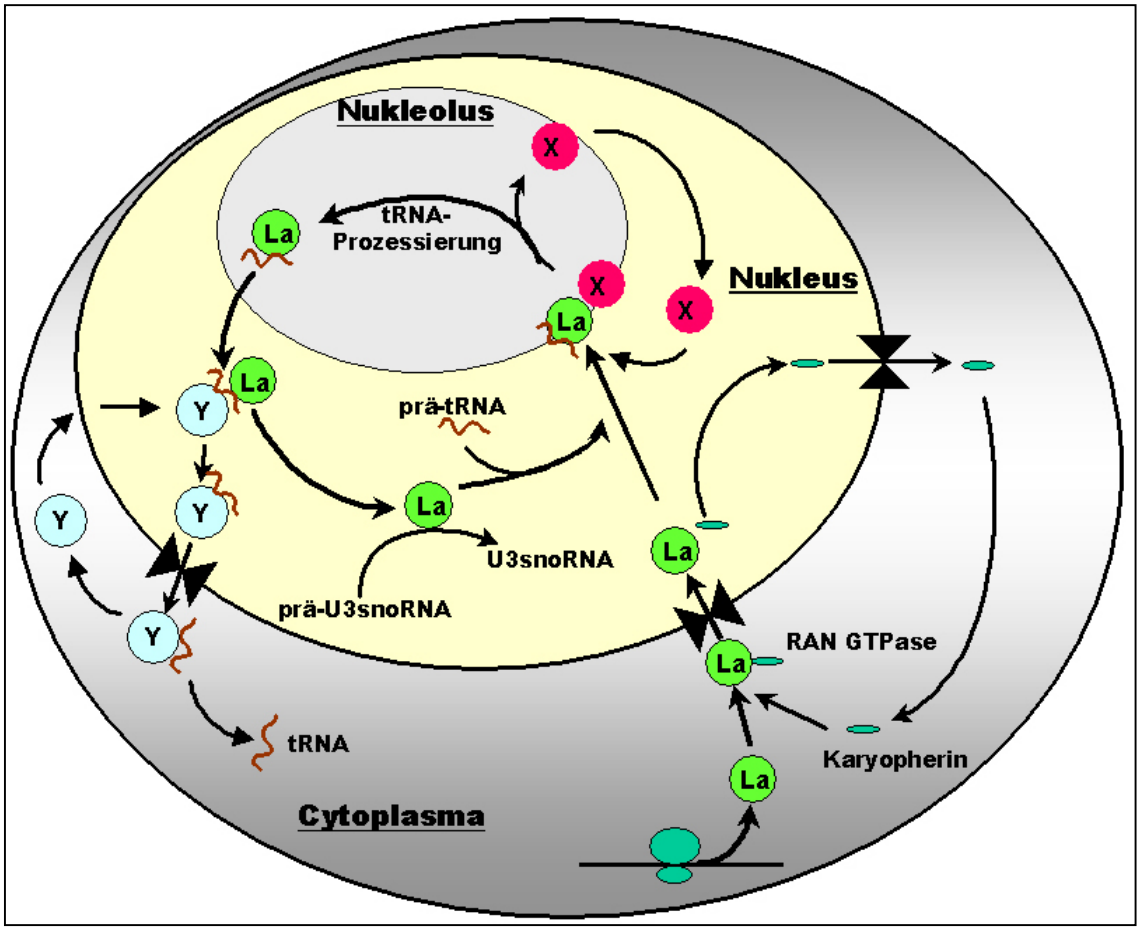


Abbildung 4.4-1: Schematische Darstellung des zellulären Transports des humanen La Proteins in Anlehnung an einen Teil der in dieser Arbeit gewonnenen Daten. Siehe Text für Erläuterungen oder Referenzen. X, Y = unbekannte Faktoren

Das Modell für den zellulären Transport beginnt mit der cytoplasmatischen Synthese des hLa, obwohl jüngsten Ergebnissen zufolge die Translation von Proteinen nicht in allen Fällen oder unter allen Umständen auf das Cytoplasma beschränkt ist (siehe Übersichtsartikel (45)). Anschließend wird das La Protein über die NLS-Sequenz in einem Karyopherin-abhängigen Transport in den Nukleus transportiert (173, 174). Dort nimmt das Protein die hauptsächlich beschriebenen Funktionen in der Stabilisierung von RNA Vorläufer-Molekülen oder viralen RNAs ein (siehe oben sowie 1.1, 1.2, 1.3).

Prä-tRNAs werden im Nukleoplasma synthetisiert (165) und weisen als ersten Interaktionspartner das La Protein auf (124, 222), so dass die Bindung vermutlich im Nukleoplasma erfolgt. Hierbei wird insbesondere das poly-(U) 3´-Ende der prä-tRNAs durch das La-spezifische RRM1 erkannt (124, 222), wobei andere Regionen, wie das RRM2/3 sowie die Aminosäuren 291 – 323 ebenfalls entscheidend zur Bindung beitragen (siehe oben). Ferner

wird vermutet, dass andere Faktoren die Spezifität dieser Bindung modulieren und dementsprechend ebenfalls an diesen Komplex gebunden sein könnten.

Als einer der ersten Schritte der prä-tRNA Reifung erfolgt die Entfernung des 5´-Terminus, was durch RNase P im Nukleolus erfolgt (103). Folglich ist eine Translokation des hLa / prä-tRNA Komplexes in dieses Kompartiment erforderlich, und in der vorliegenden Arbeit konnte das NoLS zwischen den Aminosäuren 323 – 354 als notwendige Region identifiziert werden. Es ist unklar, ob diese Region eigenständig den Import in den Nukleolus vermittelt, oder ob dazu die Interaktion mit einem anderen Faktor („X“ in Abb. 4.4-1) notwendig ist. Sofern das La Protein die teilweise prozessierte tRNA mit gereiftem 5´-Terminus nicht mehr bindet, wird der Komplex im Nukleolus aufgelöst und die tRNA wird durch andere Proteine gebunden und weiterhin stabilisiert. Da das La Protein jedoch noch die 3´-Region von prä-tRNAs bindet und deren Prozessierung stimulieren kann (146, 150) und da alle weiteren Schritte der Prozessierung im Nukleoplasma oder Cytoplasma erfolgen (siehe 1.3), verlässt La den Nukleolus vermutlich nach wie vor assoziiert mit tRNA. Hierbei ist offenbar eine Interaktion über das RRM2 entscheidend, da ein Fehlen dieser Region zur Akkumulation in Nukleoli führte. Eine Mutation an dieser Stelle bewirkte ebenfalls eine reduzierte oder vollkommen verminderte Bindung von RNAs, so dass die Bindung des RNA Substrats über diese Region erfolgen und das Signal für das Verlassen des Nukleolus darstellen könnte. Für den Eintritt in dieses Kompartiment war diese Wechselwirkung nicht erforderlich.

Es bleibt offen, ob der Nukleolus als ein Lager für das La Protein zu verstehen ist, wie es für verschiedene Proteine diskutiert wurde (96). Nach dem Transport in das Nukleoplasma wird das tRNA Substrat schließlich prozessiert und das La Protein wird durch andere Faktoren („Y“ in Abb. 4.4-1) ersetzt, welche die reife tRNA in das Cytoplasma transportieren. Das La Protein seinerseits kann im Nukleoplasma offensichtlich mehrere Funktionen einnehmen, wie beispielsweise in der Prozessierung der U3 snoRNA (214) oder in der initialen Bindung von prä-tRNAs.

Für die Multimerisierung des La Proteins konnte keine eindeutige Funktion in der Zelle korreliert werden, so dass dieses für die *in vivo* Situation ungeklärt bleibt. Zukünftige Untersuchungen müssen zeigen, ob das Protein in der Zelle Multimere ausbildet und ob dieses auf bestimmte Areale beschränkt ist.

Die Bindung von RNAs und die Interaktion mit anderen Molekülen über verschiedene Domänen des hLa stellen eine empfindliche Regulation der Funktionen des Proteins dar. Diese wirken sich nicht nur auf die Wechselwirkung mit anderen Faktoren aus, sondern beeinflussen auch in entscheidender Weise die subzelluläre Verteilung und den Transport des Proteins, nicht aber dessen Mobilität.

4.5 Zusammenfassung

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit steht das humane La Phosphoprotein, dem vielfältige Funktionen zugeschrieben werden. Nur wenige der Funktionen des La Proteins wurden auf molekularer Ebene im Detail analysiert. Dies gilt u.a. für die postulierte Funktion des La Proteins der Maus als Stabilisator der Transkripte des Hepatitis B Virus (HBV) in einem transgenen Mausmodell. Diese interessanten, aber unverstandenen Beobachtungen als auch die nicht bestimmten La Protein/RNA Wechselwirkungen waren wesentliche Gründe für die hier durchgeführten Studien zur Struktur, Funktion, intrazellulären Lokalisation und Mobilität des La Proteins, einschließlich der Bestimmung der hierfür verantwortlichen Domänen und Signale. Ein Schwerpunkt der Arbeit bestand aus der molekularen Analyse der Wechselwirkung des humanen La Proteins mit hepadnaviraler RNA im Vergleich zu zellulärer tRNA. Mittel- und langfristiges Ziel der Arbeit war und ist die Bestimmung der 3D-Struktur des La Proteins durch Röntgenstrukturanalyse von Kristallen, sowie die detaillierte Kenntnis seiner Wechselwirkungen mit zellulären und viralen Komponenten. Die Etablierung von Grundlagen für eine antivirale Therapie mit Medikamenten, die mit einer für Viren essentiellen La-Wechselwirkung interferieren ohne die Zellen zu schädigen, ist eines der Ziele bei diesem Forschungsprojekt.

Es gelang, hLa in rekombinanter Form sehr effizient zu exprimieren, durch 2 Schritte bis zur Homogenität und in großer Menge aufzureinigen sowie bis auf 12 mg/ml zu konzentrieren. Damit erfüllt es die wichtigsten Kriterien für die Herstellung von Kristallen. Die Homogenität des rekombinanten hLa wurde durch 1D- und 2D-Gelelektrophorese, MALDI-TOF und *Light-Scattering* kontrolliert. Das *Light-Scattering* lieferte auch Hinweise für die Existenz von La-Homotrimeren unter bestimmten Bedingungen. Durch analytische Gelfiltrationen konnte gezeigt werden, dass das Protein über eine C-terminale Region dimere Moleküle bildet und diese abhängig von 2-wertigen Ionen und einer N-terminalen Region zu trimeren Molekülen erweitert werden können. Durch Experimente zur (De-)Phosphorylierung wurde festgestellt, dass das rekombinante La Protein nicht phosphoryliert ist. Mit einem neu etablierten Protokoll konnte das La Protein *in vitro* phosphoryliert werden, was keinen Einfluss auf die aufgezeichneten *in vitro* Funktionen des Proteins hatte. Zugabe von RNA zu rekombinantem La Protein führte zur Dissoziation des Dimers in monomere Moleküle. Insgesamt bilden diese Studien optimale Voraussetzungen für die geplante 3D-Analyse durch Röntgenstruktur-Bestimmungen von La-Kristallen.

Sowohl für die Analyse der RNA-Protein und Protein-Protein Wechselwirkungen als auch für die Studien zur subzellulären Lokalisation wurden eine Vielzahl von neuen Mutationen des La Proteins in *E.coli* und in eukaryotischen Zellen mithilfe geeigneter Vektoren exprimiert und analysiert. Für die Bestimmung der funktionellen Domänen wurden interne Deletionen und Punktmutationen in die verschiedenen La Domänen eingeführt.

Mit dem Wildtyp Protein und den Mutanten des La Proteins wurden deren Wechselwirkung mit einer kurzen HBV RNA-Sequenz getestet, für die bisher nur eine spezifische Bindung für das Maus-La-Protein gezeigt wurde. Vergleichend wurden Analysen mit einer zellulären tRNA durchgeführt. Dabei ergab sich, dass eines der 3 vorhandenen La RNA-Erkennungs-Motive vermutlich die Spezifität der Bindungen vermittelt, wohingegen die 2 anderen für die Bindung essentiell oder von großer Bedeutung sind. Weitere neu identifizierte C-terminale Regionen trugen zur effizienten RNA-Bindung bei. Da die hLa Proteindomänen für die Bindung von HBV RNA und tRNA ähnlich oder identisch sind, wird die Spezifität der Bindung vermutlich durch die Sequenz oder Struktur der gebundenen RNA reguliert sowie durch bestimmte Regionen im humanen La Protein.

Erkenntnisse über die biologische Bedeutung der *in vivo* Wechselwirkung des humanem La Protein mit zellulären tRNAs in höheren Eukaryonten wurden erstmalig durch RNA-Interferenz-Experimente erhalten. Die sehr effiziente Reduktion der endogenen La Expression offenbarte eine um 50% reduzierte Menge an zellulärer tRNA. Diese Untersuchungen zeigten die Notwendigkeit des La Proteins für die molekulare Reifung von prä-tRNAs, nicht aber für die der 5S rRNA.

Durch eine Analyse der subzellulären Lokalisation des La Proteins durch Einsatz verschiedener GFP-La-Fusionsproteine gelang es, ein bisher unbekanntes Nukleolus-Lokalisations-Signal im C-Terminus des La Proteins zu identifizieren, welches für den Transport des La Proteins in die Nukleoli und vermutlich für den RNA-Metabolismus bedeutsam ist. Ohne das RNA-Erkennungs-Motiv 2 akkumulierte das La Protein im Nukleolus, entweder weil das Motiv ein nukleoläres Exportsignal enthält, weil dessen Deletion ein anderes inaktiviert, oder durch eine Störung der Interaktion mit einem entsprechenden Exportfaktor wie z.B. RNA. Andere Regionen hatten keinen signifikanten Einfluss auf die subzelluläre Verteilung. Eine Energie-unabhängige und Diffusions-ähnliche Mobilität des Proteins im Zellkern, welche durch keine der analysierten Mutationen verändert wurde, wurde in FRAP-Experimenten bestimmt. Dieses schließt Mutations-bedingte Änderungen der Mobilität der Proteine als Ursache für die beobachteten subzellulären Lokalisationen aus.

Zusammenfassend ist es gelungen, eine Vielzahl neuer Erkenntnisse über Struktur, Funktion, Lokalisation und Mobilität des humanen La Proteins zu gewinnen. Die Identifizierung neuer funktioneller Domänen sowie die detaillierte Analyse der La Interaktion mit viralen und zellulären RNAs und der verschiedenen *in vivo* Funktionen des humanen La Proteins sind ein wesentlicher Beitrag für ein besseres Verständnis der Biologie dieses Proteins und kann bei weiteren detaillierteren Analysen langfristig zur Entwicklung neuartiger antiviraler Therapien führen.

4.6 Aussicht und weiterführende Experimente

Eine noch immer ungeklärte und interessante Frage ist, ob das humane La Protein auch *in vivo* in der Zelle Multimere ausbildet. Dabei wäre nicht nur bedeutsam, ob das Protein mit sich selbst oder mit anderen Proteinen multimerisiert, sondern auch worin die Funktion dieses Vorgangs liegt. Ferner wäre es möglich, dass dieser Vorgang nur auf bestimmte Zellzyklusphasen oder Kompartimente beschränkt ist. Eine Multimerisierung ließe sich neben einem *mammalian-two-hybrid* durch sogenannte FRET (*fluorescence recovery after energy transfer*) Untersuchungen klären. Bei letzterem würde das Protein mit zwei verschiedenen Fluoreszenz-Markierungen in zwei Populationen in eine Zelle transfiziert werden und die Analyse der Multimerisierung würde mikroskopisch erfolgen.

Zukünftige Analysen der Spezifität der RNA-Bindung des hLa haben besondere Dringlichkeit und es wäre unbedingt sicherzustellen, ob das RRM1 und/oder andere C-terminale Regionen die Spezifität der RNA-Bindung modulieren und somit vielleicht entscheiden, welches Substrat gebunden wird. Dieses wäre von ausgesprochen großer Bedeutung für das Verständnis der Biologie des humanen La Proteins wie insbesondere für die Entwicklung antiviraler Therapien, welche selektiv und spezifisch die für ein Virus notwendige RNA-Protein-Wechselwirkung unterbinden, ohne dabei die Zelle zu schädigen. Neben HBV gilt dieses gleichermaßen für mehrere andere Virus-Erkrankungen, in denen das hLa Protein mit der viralen RNA interagiert. *In vitro* wäre dieses zu erforschen über die hier benutzten EMSAs, welche bei einer erhöhten Stringenz und Spezifität geringe Bindungsunterschiede aufzeigen könnten.

Es ist oben bereits aufgeführt und dargelegt, dass die Funktionen verschiedener Domänen oder Signale (z.B. Phosphorylierungen) durch die RNA-Interferenz *in vivo* dargestellt werden können. Durch Vorarbeiten in der Arbeitsgruppe sowie durch die hier dargestellten Ergebnisse wurden die Grundlagen für diese wichtigen Experimente gelegt, welche nicht nur Aufschluss geben über verschiedene Funktionen des hLa Proteins, sondern auch über die Notwendigkeit des Proteins für zelluläre wie auch virale Prozesse. Dadurch könnte die Bedeutung des hLa Proteins in diversen Vorgängen *in vivo* analysiert und verglichen werden. Über diese Ergebnisse könnte somit eine Vorauswahl getroffen werden über mögliche Nebenwirkungen für zelluläre Prozesse, wenn Funktionen des hLa in viralen Prozessen unterbunden werden. Eine selektive Inaktivierung des endogenen hLa Proteins durch RNA-Interferenz ist hier gezeigt, und könnte mit der Transfektion von hLa Mutanten gekoppelt werden, welche ihrerseits resistent sind gegen die Interferenz. Die Resistenz ist zu erreichen, indem an bestimmten Stellen die Nukleotid-Sequenz der mRNA geändert wird ohne die Aminosäure-Sequenz zu variieren. Diese Technik wird in der Arbeitsgruppe bereits angewandt. Die Methodik der RNA-Interferenz stellt

sicherlich eine wichtige und aufschlussreiche Technik da, welche einen überaus großen Ansatz von Fragestellungen direkt *in vivo* beantworten kann.

Eine Information von überaus großer Wichtigkeit wäre die Kenntnis von Interaktionspartnern des hLa Proteins. Durch die hier gezeigten Ergebnisse ist dargelegt, dass Interaktionspartner des hLa Proteins vermutlich die Spezifität der RNA-Bindung des hLa regulieren. Für die Entwicklung einer spezifischen und selektiven antiviralen Therapie sind diese Kenntnisse von besonderer Bedeutung. Ferner könnten grundlegende Fragestellungen untersucht werden, wie z.B. der Eintritt und das Verlassen des Nukleolus – eine Funktion des hLa, welche vermutlich ebenfalls in Wechselwirkung mit anderen Molekülen erfolgt.
Für das Auffinden direkter Interaktionspartner eignen sich mehrere Methoden, wie ein *yeast-tow-hybrid-system*, Co-Immunpräzipitation und Co-Reinigungen. Um aufzuklären, welche Proteinkomplexe an welchen RNAs gebunden sind wäre es möglich die RNA in der Zelle mit einer bestimmten, angefügten Sequenz zu versehen, welche später die Reinigung des an die RNA gebundenen Komplexes z.B. über Streptavidin-Säulen erlaubt (196). Diese Technik erscheint für die genannten Zwecke sehr hilfreich.

Die größte Herausforderung und zugleich bedeutendste Information wäre die Kristallstruktur des humanen La Proteins. Daraus ließen sich eine Fülle von Informationen gewinnen und es könnten experimentelle Untersuchungen direkt auf dieses Befund abgestimmt werden. Ein Co-Kristallisation mit verschiedenen, gebundenen RNA-Substraten wäre hierbei sicherlich ausgesprochen aufschlussreich und würde zugleich die Grundlagen-Forschung am hLa Protein beschleunigen, wie auch Möglichkeiten für antivirale Therapien aufzeigen. Daher ist dieser Ansatz von methodisch, wissenschaftlich und auch medizinisch großer Bedeutung. Die unentbehrlichen und wichtigen Grundlagen für ein solches Vorhaben wurden in der vorliegenden Studie erarbeitet.

Literaturverzeichnis

1. **Abelson, J., C. R. Trotta, and H. Li.** 1998. tRNA splicing. J Biol Chem **273:**12685-12688.
2. **Adam, S. A., T. Nakagawa, M. S. Swanson, T. K. Woodruff, and G. Dreyfuss.** 1986. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. Mol Cell Biol **6:**2932-43.
3. **Aigner, S., J. Lingner, K. J. Goodrich, C. A. Grosshans, A. Shevchenko, M. Mann, and T. R. Cech.** 2000. Euplotes telomerase contains an La motif protein produced by apparent translational frameshifting. EMBO J **19:**6230-6239.
4. **Aitchison, J. D., and M. P. Rout.** 2000. The road to ribosomes. Filling potholes in the export pathway. J Cell Biol **151:**F23-6.
5. **Ali, J. A., A. P. Jackson, A. J. Howells, and A. Maxwell.** 1993. The 43-kilodalton N-terminal fragment of the DNA gyrase B protein hydrolyses ATP and binds coumarin drugs. Biochemistry **32:**2717-2724.
6. **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.
7. **Ali, N., and A. Siddiqui.** 1997. The La antigen binds 5' noncoding region of the hepatitis C virus RNA in the context of the initiator AUG codon and stimulates internal ribosome entry site-mediated translation. Proc Natl Acad Sci U S A **94:**2249-54.
8. **Alspaugh, M. A., N. Talal, and E. M. Tan.** 1976. Differentiation and characterization of autoantibodies and their antigens in Sjogren's syndrome. Arthritis Rheum **19:**216-22.
9. **Andersen, J. S., C. E. Lyon, A. H. Fox, A. K. Leung, Y. W. Lam, H. Steen, M. Mann, and A. I. Lamond.** 2002. Directed proteomic analysis of the human nucleolus. Curr Biol **12:**1-11.
10. **Ando, K., L. G. Guidotti, A. Cerny, T. Ishikawa, and F. V. Chisari.** 1994. CTL access to tissue antigen is restricted in vivo. J Immunol **153:**482-488.
11. **Annilo, T., A. Karis, S. Hoth, T. Rikk, J. Kruppa, and A. Metspalu.** 1998. Nuclear import and nucleolar accumulation of the human ribosomal protein S7 depends on both a minimal nuclear localization sequence and an adjacent basic region. Biochem Biophys Res Commun **249:**759-66.
12. **Arnold, G. J., C. Schmutzler, U. Thomann, H. van Tol, and H. J. Gross.** 1986. The human tRNAVal gene family: organization, nucleotide sequences and homologous transcription of three single-copy genes. Gene **44:**287-97.
13. **Arts, G. J., S. Kuersten, P. Romby, B. Ehresmann, and I. W. Mattaj.** 1998. The role of exportin-t in selective nuclear export of mature tRNAs. EMBO J **17:**7430-7441.
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:**34465-34470.
15. **Babinet, C., H. Farza, D. Morello, M. Hadchouel, and C. Pourcel.** 1985. Specific expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) in transgenic mice. Science **230:**1160-3.
16. **Bachmann, M., S. Chang, H. Slor, J. Kukulies, and W. E. Muller.** 1990. Shuttling of the autoantigen La between nucleus and cell surface after uv irradiation of human keratinocytes. Exp Cell Res **191:**171-80.
17. **Bachmann, M., D. Falke, H. C. Schroder, and W. E. Muller.** 1989. Intracellular distribution of the La antigen in CV-1 cells after herpes simplex virus type 1 infection compared with the localization of U small nuclear ribonucleoprotein particles. J Gen Virol **70:**881-91.
18. **Bachmann, M., K. Pfeifer, H. C. Schroder, and W. E. Muller.** 1990. Characterization of the autoantigen La as a nucleic acid-dependent ATPase/dATPase with melting properties. Cell **60:**85-93.
19. **Bachmann, M., H. C. Schroder, K. G. Wagner, W. J. Mayet, K. Pfeifer, and W. E. Muller.** 1986. Purification and characterization of the Ro and La antigens. Modulation of their binding affinities to poly(U) by phosphorylation and the presence of ATP. Biol Chem **367:**671-80.
20. **Bass, B. L.** 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. Cell **101:**235-238.
21. **Beasley, R. P.** 1988. Hepatitis B virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. Cancer **61:**1942-1956.
22. **Belsham, G. J., N. Sonenberg, and Y. V. Svitkin.** 1995. The role of the La autoantigen in internal initiation. Curr Top Microbiol Immunol **203:**85-98.
23. **Ben-Chetrit, E.** 1992. Target antigens of the SSA/Ro and SSB/La system. Am J Repr Immunol **28:**256-8.
24. **Bertrand, E., F. Houser-Scott, A. Kendall, R. H. Singer, and D. R. Engelke.** 1998. Nucleolar localization of early tRNA processing. Genes Dev **12:**2463-8.

25. **Birney, E., S. Kumar, and A. R. Krainer.** 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. Nucleic Acids Res **21:**5803-16.
26. **Boelens, W. C., I. Palacios, and I. W. Mattaj.** 1995. Nuclear retention of RNA as a mechanism for localization. RNA. **1:**273-283.
27. **Bradford, M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye-binding. Anal Biochem **72:**248-254.
28. **Brechot, C., D. Gozuacik, Y. Murakami, and P. Paterlini-Brechot.** 2000. Molecular bases for the development of hepatitis B virus (HBV)-related hepatocellular carcinoma (HCC). Cancer Biol **10:**211-231.
29. **Briand, J. F., F. Navarro, O. Gadal, and P. Thuriaux.** 2001. Cross talk between tRNA and rRNA synthesis in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol **21:**189-95.
30. **Broekhuis, C. H., G. Neubauer, A. van Der Heijden, M. Mann, C. G. Proud, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 2000. Detailed Analysis of the Phosphorylation of the Human La (SS-B) Autoantigen. (De)phosphorylation Does Not Affect Its Subcellular Distribution. Biochem **39:**3023-3033.
31. **Buendia, M. A.** 2000. Genetics of hepatocellular carcinoma. Cancer Biol **10:**185-200.
32. **Burd, C. G., and G. Dreyfuss.** 1994. Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. Science **265:**615-21.
33. **Castanotto, D., H. Li, and J. J. Rossi.** 2002. Functional siRNA expression from transfected PCR products. RNA **8:**1454-1460.
34. **Chambers, J. C., D. Kenan, B. J. Martin, and J. D. Keene.** 1988. Genomic structure and amino acid sequence domains of the human La autoantigen. J Biol Chem **263:**18043-51.
35. **Chan, E. K., K. F. Sullivan, R. I. Fox, and E. M. Tan.** 1989. Sjogren's syndrome nuclear antigen B (La): cDNA cloning, structural domains, and autoepitopes. J Autoimmunity **2:**321-7.
36. **Chan, E. K., K. F. Sullivan, and E. M. Tan.** 1989. Ribonucleoprotein SS-B/La belongs to a protein family with consensus sequences for RNA-binding. Nucleic Acids Research **17:**2233-44.
37. **Chan, Y. N., D. J. Kenan, J. D. Keene, A. Gatignol, and K. T. Jeang.** 1994. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. J Virol **68:**7008-7020.
38. **Chang, C., G. Enders, R. Sprengel, N. Peters, H. E. Varmus, and D. Ganem.** 1987. Expression of the precore region of an avian hepatitis B virus is not required for viral replication. J Virol **61:**3322-3325.
39. **Chang, Y. N., D. J. Kenan, J. D. Keene, A. Gatignol, and K. T. Jeang.** 1995. Direct interactions between autoantigen La and human immunodeficiency virus leader RNA. J Virol **69:**618-9.
40. **Chisari, F. V.** 2000. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. Am J Pathol **156:**1117-32.
41. **Chisari, F. V., C. A. Pinkert, D. R. Milich, P. Filippi, A. McLachlan, R. D. Palmiter, and R. L. Brinster.** 1985. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. Science **230:**1157-1160.
42. **Clark, M. W., and J. Abelson.** 1987. The subnuclear localization of tRNA ligase in yeast. J Cell Biol **105:**1515-1526.
43. **Combet, C., C. Blanchet, C. Geourjon, and G. Deleage.** 2000. NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem Sci **25:**147-50.
44. **Craig, A. W., Y. V. Svitkin, H. S. Lee, G. J. Belsham, and N. Sonenberg.** 1997. The La autoantigen contains a dimerization domain that is essential for enhancing translation. Mol Cell Biol **17:**163-9.
45. **Dahlberg, J. E., E. Lund, and E. B. Goodwin.** 2003. Nuclear translation: what is the evidence? RNA **9:**1-8.
46. **Dang, C. V., and W. M. Lee.** 1989. Nuclear and nucleolar targeting sequences of c-erb-A, c-myb, N-myc, p53, HSP70, and HIV tat proteins. J Biol Chem **264:**18019-23.
47. **Deng, J. S., Y. Takasaki, and E. M. Tan.** 1981. Nonhistone nuclear antigens reactive with autoantibodies. Immunofluorescence studies in distribution in synchronized cells. J Cell Biol **91:**654-660.
48. **Deng, J. S., and E. M. Tan.** 1985. Effect of actinomycin D on the expression of nuclear antigen SS-B/La. J Invest Dermat **84:**225-8.
49. **Deo, R. C., J. B. Bonanno, N. Sonenberg, and S. K. Burley.** 1999. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. Cell **98:**835-45.
50. **Dundr, M., and T. Misteli.** 2001. Functional architecture in the cell nucleus. Biochem J **356:**297-310.

51. **Dye, B. T., and J. G. Patton.** 2001. An RNA recognition motif (RRM) is required for the localization of PTB-associated splicing factor (PSF) to subnuclear speckles. Exp Cell Res **263:**131-44.
52. **Ehlers, I.** 2001. Studien zur Funktion des La-Autoantigens bei der Hepatitis B Virusexpression. Diplomarbeit im FB Biologie, Carl von Ossietzky Universität Oldenburg.
53. **Elbashir, S. M., W. Lendeckel, and T. Tuschl.** 2000. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. Genes Dev **15:**188-200.
54. **Elenitsas, R., L. W. Bair, T. A. Medsger, and J. S. Deng.** 1986. Discordance of SSA/Ro and SSB/La cellular antigens in synchronized cells. J Invest Dermatol **87:**504-509.
55. **Etheridge, K. T., S. S. Banik, B. N. Armbruster, Y. Zhu, R. M. Terns, M. P. Terns, and C. M. Counter.** 2002. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. J Biol Chem **277:**24764-70.
56. **Evans, C. F., and D. R. Engelke.** 1990. Yeast extracts for transfer RNA gene ranscription and processing. Methods Enzymol **181:**439-450.
57. **Fan, H., J. L. Goodier, J. R. Chamberlain, D. R. Engelke, and R. J. Maraia.** 1998. 5' processing of tRNA precursors can be modulated by the human La antigen phosphoprotein. Mol Cell Biol **18:**3201-11.
58. **Fan, H., A. L. Sakulich, J. L. Goodier, X. Zhang, J. Qin, and R. J. Maraia.** 1997. Phosphorylation of the human La antigen on serine 366 can regulate recycling of RNA polymerase III transcription complexes. Cell **88:**707-15.
59. **Fire, A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver, and C. Mello.** 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in Caenorhabditis elegans. Nature **391:**806-811.
60. **Ford, L. P., J. W. Shay, and W. E. Wright.** 2001. The La antigen associates with the human telomerase ribonucleoprotein and influences telomere length in vivo. RNA **7:**1068-75.
61. **Francoeur, A. M., E. K. Chan, J. I. Garrels, and M. B. Mathews.** 1985. Characterization and purification of lupus antigen La, and RNA-binding protein. Mol Cell Biol **5:**586-90.
62. **Frank, D. N., and N. R. Pace.** 1998. Ribonuclease P: unity and diversity in a tRNA processing ribozyme. Annu Rev Biochem **67:**153-180.
63. **Furter, R., M. Snaith, D. E. Gillespie, and B. D. Hall.** 1992. Endonucleolytic cleavage of a long 3'-trailer sequence in a nuclear yeast suppressor tRNA. Biochemistry **31:**10817-10824.
64. **Gamarnik, A. V., and R. Andino.** 1997. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. RNA. **3:**882-892.
65. **Ganem, D., J. R. Pollack, and J. Tavis.** 1994. Hepatitis B virus reverse transcriptase and its many roles in hepadnaviral genomic replication. Infect Agents Dis **3:**85-93.
66. **Ganot, P., B. E. Jady, M. L. Bortolin, X. Darzacq, and T. Kiss.** 1999. Nucleolar factors direct the 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of U6 spliceosomal RNA. Mol Cell Biol **19:**6906-17.
67. **Goodier, J. L., H. Fan, and R. J. Maraia.** 1997. A carboxy-terminal basic region controls RNA polymerase III transcription factor activity of human La protein. Mol Cell Biol **17:**5823-32.
68. **Goodier, J. L., and R. J. Maraia.** 1998. Terminator-specific recycling of a B1-Alu transcription complex by RNA polymerase III is mediated by the RNA terminus-binding protein La. J Biol Chem **273:**26110-6.
69. **Gorlach, M., C. G. Burd, and G. Dreyfuss.** 1994. The determinants of RNA-binding specificity of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C proteins. J Biol Chem **269:**23074-23078.
70. **Gorlach, M., M. Wittekind, R. A. Beckman, L. Mueller, and G. Dreyfuss.** 1992. Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA. EMBO J **11:**3289-3295.
71. **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.
72. **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.
73. **Grimm, C., E. Lund, and J. E. Dahlberg.** 1997. In vivo selection of RNAs that localize in the nucleus. EMBO J **16:**793-806.
74. **Grosjean, H., Z. Szweykowska-Kulinska, Y. Motorin, F. Fasiolo, and G. Simos.** 1997. Intron-dependent enzymatic formation of modified nucleosides in eukaryotic tRNAs : a review. Biochemie **79:**293-302.
75. **Guddat, U., A. H. Bakken, and T. Pieler.** 1990. Protein-mediated nuclear export of RNA: 5S rRNA containing small RNPs in xenopus oocytes. Cell **60:**619-28.
76. **Guidotti, L. G., K. Ando, M. V. Hobbs, T. Ishikawa, L. Runkel, R. D. Schreiber, and F. V. Chisari.** 1994. Cytotoxic T lymphocytes inhibit hepatitis B virus gene expression by a noncytolytic mechanism in transgenic mice. Proc Nat Acad Sci USA **91:**3764-8.

77. **Guidotti, L. G., and F. V. Chisari.** 2000. Cytokine-mediated control of viral infections. Virol **273:**221-7.
78. **Guidotti, L. G., and F. V. Chisari.** 2001. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. Annu Rev Immunol **19:**65-91.
79. **Guidotti, L. G., T. Ishikawa, M. V. Hobbs, B. Matzke, R. Schreiber, and F. V. Chisari.** 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. Immunity **4:**25-36.
80. **Guidotti, L. G., B. Matzke, H. Schaller, and F. V. Chisari.** 1995. High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. JVirol **69:**6158-6169.
81. **Guidotti, L. G., R. Rochford, J. Chung, M. Shapiro, R. Purcell, and F. V. Chisari.** 1999. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. Science **284:**825-9.
82. **Habets, W. J., J. H. den Brok, A. M. Boerbooms, L. B. van de Putte, and W. J. van Venrooij.** 1983. Characterization of the SS-B (La) antigen in adenovirus-infected and uninfected HeLa cells. EMBO J **2:**1625-31.
83. **Hanahan, D.** 1983. Studies on transformation of Escheichia coli with Plasmid. J Mol Biol **166:**557.
84. **Handa, N., O. Nureki, K. Kurimoto, I. Kim, H. Sakamoto, Y. Shimura, Y. Muto, and S. Yokoyama.** 1999. Structural basis for recognition of the tra mRNA precursor by the Sex-lethal protein. Nature **398:**579-85.
85. **Heise, T., L. G. Guidotti, V. J. Cavanaugh, and F. V. Chisari.** 1999. Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice. J Virol **73:**474-81.
86. **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.
87. **Heise, T., L. G. Guidotti, and F. V. Chisari.** 1999. La autoantigen specifically recognizes a predicted stem-loop in hepatitis B virus RNA. J Virol **73:**5767-76.
88. **Heise, T., A. Nath, K. Jungermann, and B. Christ.** 1997. Purification of a RNA-binding protein from rat liver. Identification as ferritin L chain and determination of the RNA/protein binding characteristics. J Biol Chem **272:**20222-20229.
89. **Heix, J., A. Vente, R. Voit, A. Budde, T. M. Michaelidis, and I. Grummt.** 1998. Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. EMBO J **17:**7373-81.
90. **Hellmuth, K., D. M. Lau, F. R. Bischoff, M. Kunzler, E. Hurt, and G. Simos.** 1998. Yeast Los1p has properties of an exportin-like nucleocytoplasmic transport factor for tRNA. Mol Cell Biol **18:**6374-6386.
91. **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.
92. **Henikoff, S., and J. G. Henikoff.** 1991. Automated assembly of protein blocks for database searching. Nucleic Acids Res **19:**6565-6572.
93. **Hoffman, D. W., C. C. Query, B. L. Golden, S. W. White, and J. D. Keene.** 1991. RNA-binding domain of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein analyzed by NMR spectroscopy is structurally similar to ribosomal proteins. Proc Natl Acad Sci U S A **88:**2495-9.
94. **Horke, S., K. Reumann, A. Rang, and T. Heise.** 2002. Molecular characterization of the human La protein.hepatitis B virus RNA.B interaction in vitro. J Biol Chem **277:**34949-58.
95. **Houtsmuller, A. B., S. Rademakers, A. L. Nigg, D. Hoogstraten, J. H. Hoeijmakers, and W. Vermeulen.** 1999. Action of DNA repair endonuclease ERCC1/XPF in living cells. Science **284:**958-61.
96. **Houtsmuller, A. B., and W. Vermeulen.** 2001. Macromolecular dynamics in living cell nuclei revealed by fluorescence redistribution after photobleaching. Histochem Cell Biol **115:**13-21.
97. **Hühn, P., G. J. Pruijn, W. J. van Venrooij, and M. Bachmann.** 1997. Characterization of the autoantigen La (SS-B) as a dsRNA unwinding enzyme. Nucleic Acids Research **25:**410-6.
98. **Intine, R. V., M. Dundr, T. Misteli, and R. J. Maraia.** 2002. Aberrant nuclear trafficking of La protein leads to disordered processing of associated precursor tRNAs. Mol Cell **9:**1113-23.
99. **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.
100. **Jacks, A., G. Kelly, S. Curry, and M. R. Conte.** 2002. Letter to the editor: Resonance assignment and secondary structure determination of a C-terminal fragment of the Lupus

Autoantigen (La) protein containing a putative RNA recognition motif (RRM). J Biomolecular NMR **22:**387-388.
101. **Jacobson, M. R., L. G. Cao, K. Taneja, R. H. Singer, Y. L. Wang, and T. Pederson.** 1997. Nuclear domains of the RNA subunit of RNase P. J Cell Sci **110:**829-837.
102. **Jady, B. E., and T. Kiss.** 2001. A small nucleolar guide RNA functions both in 2'-O-ribose methylation and pseudouridylation of the U5 spliceosomal RNA. EMBO J **20:**541-51.
103. **Jarrous, N.** 2002. Human ribonuclease P: Subunits, funtion and intranuclear localization. RNA **8:**1-7.
104. **Kato, G. J., and C. V. Dang.** 1992. Function of the c-Myc oncoprotein. Faseb J **6:**3065-72.
105. **Kenan, D. J., C. C. Query, and J. D. Keene.** 1991. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. Trends Biochem Sci **16:**214-20.
106. **Kennerdell, J. R., and R. W. Carthew.** 1998. Use of ds-RNA mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. Cell **95:**1017-1026.
107. **Krainer, A. R., G. C. Conway, and D. Kozak.** 1990. Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells. Genes Dev **4:**1158-71.
108. **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.
109. **Kufel, J., C. Allmang, L. Verdone, J. D. Beggs, and D. Tollervey.** 2002. Lsm proteins are required for normal processing of pre-tRNAs and their efficient association with La-homologous protein Lhp1p. Mol Cell Biol **22:**5248-56.
110. **Kunkel, G. R., R. L. Maser, J. P. Calvet, and T. Pederson.** 1986. U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. Proc Natl Acad Sci U S A **83:**8575-8579.
111. **Kutay, U., G. Lipowsky, E. Izaurralde, F. R. Bischoff, and P. Schwarzmeier.** 1998. Identification of a tRNA-specific nuclear export receptor. Mol Cell **1:**359-369.
112. **Lämmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227:**680-685.
113. **Lange, T. S., and S. A. Gerbi.** 2000. Transient nucleolar localization of U6 small nuclear RNA in Xenopus Laevis oocytes. Mol Biol Cell **11:**2419-28.
114. **Lee, J. Y., C. E. Rohlman, L. A. Molony, and D. R. Engelke.** 1991. Characterization of RPR1, an essential gene encoding the RNA component of Saccharomyces cerevisiae nuclear RNase P. Mol Cell Biol **11:**721-730.
115. **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. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **78:**805-9.
116. **Lewis, J. D., and D. Tollervey.** 2000. Like attracts like: getting RNA processing together in the nucleus. Science **288:**1385-9.
117. **Lin-Marq, N., and S. G. Clarkson.** 1998. Efficient synthesis, termination and release of RNA polymerase III transcripts in Xenopus extracts depleted of La protein. EMBO J **17:**2033-41.
118. **Lipowsky, G., F. R. Bischoff, E. Izaurralde, U. Kutay, and S. Schafer.** 1999. Coordination of tRNA nuclear export with processing of tRNA. RNA **5:**539-549.
119. **Lohrum, M. A., M. Ashcroft, M. H. Kubbutat, and K. H. Vousden.** 2000. Identification of a cryptic nucleolar-localization signal in MDM2. Nat Cell Biol **2:**179-81.
120. **Long, K. S., T. Cedervall, C. Walch-Solimena, D. A. Noe, M. J. Huddleston, R. S. Annan, and S. L. Wolin.** 2001. Phosphorylation of the Saccharomyces cerevisiae La protein does not appear to be required for its functions in tRNA maturation and nascent RNA stabilization. RNA **7:**1589-602.
121. **Lowe, T. M., and S. R. Eddy.** 2001. A genomic tRNA database. http://rna.wustl.edu/GtRDB.
122. **Lund, E., and J. E. Dahlberg.** 1998. Proofreading and aminoacylation of tRNAs before export from the nucleus. Science **282:**2082-2085.
123. **Lutz-Freyermuth, C., C. C. Query, and J. D. Keene.** 1990. Quantitative determination that one of two potential RNA-binding domains of the A protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein complex binds with high affinity to stem-loop II of U1 RNA. Proc Natl Acad Sci U S A **87:**6393-7.
124. **Maraia, R. J.** 2001. La protein and the trafficking of nascent RNA polymerase iii transcripts. J Cell Biol **153:**F13-8.
125. **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.
126. **Maraia, R. J., and R. V. Intine.** 2002. La protein and its associated small nuclear and nucleolar precursor RNAs. Gene Expr **10:**41-57.

127. **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.
128. **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.
129. **Marck, C., and H. Grosjean.** 2002. tRNomics: Analysis of tRNA genes from 50 genomes of Eukarya, Archaea, and Bacteria reveals anticodon-sparing strategies and domain-specific features. RNA **8:**1189-1232.
130. **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 & Rheumatism **17:**421-9.
131. **McAleer, W. J., E. B. Buynak, R. Z. Maigetter, D. E. Wampler, W. J. Miller, and M. R. Hillemann.** 1984. Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast. Nature **307:**178-180.
132. **McLaren, R. S., N. Caruccio, and J. Ross.** 1997. Human La protein: a stabilizer of histone mRNA. Mol Cell Biol **17:**3028-36.
133. **Meerovitch, K., Y. V. Svitkin, H. S. Lee, F. Lejbkowicz, 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.
134. **Meissner, M., T. Dechat, C. Gerner, R. Grimm, R. Foisner, and G. Sauermann.** 2000. Differential nuclear localization and nuclear matrix association of the splicing factors PSF and PTB. J Cell Biochem **76:**559-66.
135. **Meli, M., B. Albert-Fournier, and M. C. Maurel.** 2001. Recent findings in the modern RNA world. Int Microbiol **4:**5-11.
136. **Michienzi, A., L. Conti, B. Varano, S. Prislei, S. Gessani, and I. Bozzoni.** 1998. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by nuclear chimeric anti-HIV ribozymes in a human T lymphoblastoid cell line. Hum Gene Ther **9:**621-8.
137. **Misteli, T.** 2001. The concept of self-organization in cellular architecture. J Cell Biol **155:**181-5.
138. **Misteli, T.** 2001. Protein dynamics: implications for nuclear architecture and gene expression. Science **291:**843-7.
139. **Modrow, S., and D. Falke.** 1998. Molekulare Virologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.
140. **Mohan, A., S. Whyte, X. Wang, M. Nashimoto, and L. Levinger.** 1999. The 3' end CCA of mature tRNA is an antideterminant for eukaryotic 3'-tRNase. RNA **5:**245-256.
141. **Moriyama, T., S. Guilhot, K. Klopchin, B. Moss, C. A. Pinkert, R. D. Palmiter, R. L. Brinster, O. Kanagawa, and F. V. Chisari.** 1990. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. Science **248:**361-364.
142. **Mörl, M., and A. Marchfelder.** 2001. The final cut. EMBO reports **2:**17-20.
143. **Munroe, S. H., and X. F. Dong.** 1992. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 catalyzes RNA.RNA annealing. Proc Natl Acad Sci U S A **89:**895-9.
144. **Nagai, K., C. Oubridge, T. H. Jessen, J. Li, and P. R. Evans.** 1990. Crystal structure of the RNA-binding domain of the U1 small nuclear ribonucleoprotein A. Nature **348:**515-20.
145. **Narayanan, A., W. Speckmann, R. Terns, and M. P. Terns.** 1999. Role of the box C/D motif in localization of small nucleolar RNAs to coiled bodies and nucleoli. Mol Biol Cell **10:**2131-47.
146. **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.
147. **Nunnari, J., and P. Walter.** 1992. Protein targeting to and translocation across the membrane of the endoplasmic reticulum. Curr Opin Cell Biol **4:**573-580.
148. **O'Connor, J. P., and C. L. Peebles.** 1991. In vivo pre-tRNA processing in Saccharomyces cerevisiae. Mol Cell Biol **11:**425-439.
149. **Oelgeschlager, M., J. Larrain, D. Geissert, and E. M. De Robertis.** 2000. The evolutionary conserved BMP-binding protein Twisted gastrulation promotes BMP signalling. Nature **405:**757-763.
150. **Ohndorf, U. M., C. Steegborn, R. Knijff, and P. Sondermann.** 2001. Contributions of the individual domains in human La protein to its RNA 3'-end binding activity. J Biol Chem **276:**27188-96.
151. **Palacios, I., M. Hetzer, S. A. Adam, and I. W. Mattaj.** 1997. Nuclear import of U snRNPs requires importin beta. EMBO J **16:**6783-6792.
152. **Pannone, B. K., D. Xue, and S. L. Wolin.** 1998. A role for the yeast La protein in U6 snRNP assembly: evidence that the La protein is a molecular chaperone for RNA polymerase III transcripts. EMBO J **17:**7442-53.

153. **Parkin, D. M., P. Pisani, and J. Ferlay.** 1999. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. Int J Cancer **80:**827-41.
154. **Paule, M. R., and R. J. White.** 2000. Transcription by RNA polymerases I and III. Nucleic Acids Res **28:**1283-1298.
155. **Pederson, T.** 2000. Diffusional protein transport within the nucleus: a message in the medium. Nat Cell Biol **2:**E73-4.
156. **Pederson, T.** 1998. The plurifunctional nucleolus. Nucleic Acids Res **26:**3871-6.
157. **Peek, R., G. J. Pruijn, and W. J. Van Venrooij.** 1996. Interaction of the La (SS-B) autoantigen with small ribosomal subunits. Europ J Biochem **236:**649-55.
158. **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.
159. **Penna, A., M. Artini, A. Cavalli, M. Levrero, A. Bertoletti, M. Pilli, F. V. Chisari, B. Rehermann, G. Del Prete, F. Fiaccadori, and C. Ferrari.** 1996. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. J Clin Invest **98:**1185-1194.
160. **Pfeifle, J., F. A. Anderer, and M. Franke.** 1987. Multiple phosphorylation of human SS-B/LA autoantigen and its effect on poly(U) and autoantibody binding. Biochimica et Biophysica Acta **928:**217-26.
161. **Phair, R. D., and T. Misteli.** 2000. High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. Nature **404:**604-9.
162. **Phillies, G. D. J.** 1990. Quasielectric light scattering. Anal Chem **62:**1049-1057.
163. **Pizer, L. I., J. S. Deng, R. M. Stenberg, and E. M. Tan.** 1983. Characterization of a phosphoprotein associated with the SS-B/La nuclear antigen in adenovirus-infected and uninfected KB cells. Mol Cell Biol **3:**1235-45.
164. **Politz, J. C., S. Yarovoi, S. M. Kilroy, K. Gowda, C. Zwieb, and T. Pederson.** 2000. Signal recognition particle components in the nucleolus. Proc Natl Acad Sci U S A **97:**55-60.
165. **Pombo, A., D. A. Jackson, M. Hollinshead, Z. Wang, R. G. Roeder, and P. R. Cook.** 1999. Regional specialization in human nuclei: visualization of discrete sites of transcription by RNA polymerase III. EMBO J **18:**2241-53.
166. **Portman, D. S., and G. Dreyfuss.** 1994. RNA annealing activities in HeLa nuclei. EMBO J **13:**213-221.
167. **Pruijn, G. J., R. L. Slobbe, and W. J. van Venrooij.** 1991. Analysis of protein--RNA interactions within Ro ribonucleoprotein complexes. Nucleic Acids Res **19:**5173-80.
168. **Pudi, R., S. Abhiman, N. Srinivasan, and S. Das.** 2003. Hepatitis C Virus internal entry site-mediated translation is stimulated by specific interaction of independent regions of human La autoantigen. J Biol Chem **278:**12231-12240.
169. **Radziwill, G., W. Tucker, and H. Schaller.** 1990. Mutational analysis of the Hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. J Virol **64:**613-620.
170. **Rinke, J., and J. A. Steitz.** 1985. Association of the lupus antigen La with a subset of U6 snRNA molecules. Nucleic Acids Res **13:**2617-29.
171. **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.
172. **Rizos, H., A. P. Darmanian, G. J. Mann, and R. F. Kefford.** 2000. Two arginine rich domains in the p14ARF tumour suppressor mediate nucleolar localization. Oncogene **19:**2978-85.
173. **Rosenblum, J. S., L. F. Pemberton, and G. Blobel.** 1997. A nuclear import pathway for a protein involved in tRNA maturation. J Cell Biol **139:**1655-61.
174. **Rosenblum, J. S., L. F. Pemberton, N. Bonifaci, and G. Blobel.** 1998. Nuclear import and the evolution of a multifunctional RNA-binding protein. J Cell Biol **143:**887-99.
175. **Rutjes, S. A., P. J. Utz, A. van der Heijden, C. Broekhuis, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 1999. The La (SS-B) autoantigen, a key protein in RNA biogenesis, is dephosphorylated and cleaved early during apoptosis. Cell Death Differ **6:**976-86.
176. **Saks, M. E., J. R. Sympson, and J. N. Abelson.** 1994. The transfer RNA identity problem: a search for rules. Science **263:**191-197.
177. **Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulsen.** 1977. DNA sequencing with chain termination inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A **74:**5463-5467.
178. **Schaller, H., and M. Fischer.** 1991. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. Curr Top Microbiol Immunol **168:**21-39.
179. **Scherly, D., W. Boelens, N. A. Dathan, W. J. van Venrooij, and I. W. Mattaj.** 1990. Major determinants of the specificity of interaction between small nuclear ribonucleoproteins U1A and U2B" and their cognate RNAs. Nature **345:**502-506.

180. **Scherly, D., N. A. Dathan, W. Boelens, W. J. van Venrooij, and I. W. Mattaj.** 1990. The U2B" RNP motif as a site of protein-protein interaction. EMBO J **9:**3675-3681.
181. **Scherly, D., F. Stutz, N. Lin-Marq, and S. G. Clarkson.** 1993. La proteins from Xenopus laevis. cDNA cloning and developmental expression. J Mol Biol **231:**196-204.
182. **Scott, M., F. M. Boisvert, D. Vieyra, R. N. Johnston, D. P. Bazett-Jones, and K. Riabowol.** 2001. UV induces nucleolar translocation of ING1 through two distinct nucleolar targeting sequences. Nucleic Acids Res **29:**2052-8.
183. **Seeger, C., and W. S. Mason.** 2000. Hepatitis B virus biology. Microbiol Mol Biol Rev **64:**51-68.
184. **Sharp, P. A.** 2001. RNA interference 2001. Genes Dev **15:**485-90.
185. **Sharp, P. A.** 1999. RNAi and double-strand RNA. Genes Dev **13:**139-141.
186. **Shi, H., C. A. O'Brien, D. J. Van Horn, and S. L. Wolin.** 1996. A misfolded form of 5S rRNA is complexed with the Ro and La autoantigens. RNA **2:**769-84.
187. **Shiroki, K., T. Isoyama, S. Kuge, T. Ishii, S. Ohmi, S. Hata, K. Suzuki, Y. Takasaki, and A. Nomoto.** 1999. Intracellular redistribution of truncated La protein produced by poliovirus 3Cpro-mediated cleavage. J Virol **73:**2193-200.
188. **Shou, W., J. H. Seol, A. Shevchenko, C. Baskerville, D. Moazed, Z. W. Chen, J. Jang, A. Shevchenko, H. Charbonneau, and R. J. Deshaies.** 1999. Exit from mitosis is triggered by Tem-1 dependent release of the protein phosphatase Cdc 14 from nucleolar RENT complex. Cell **97:**233-244.
189. **Sijen, T., and J. M. Kooter.** 2000. Post-transcriptional gene-silencing: RNAs on the attack or on the defense? Bioessays **22:**520-531.
190. **Silver, P. A.** 1991. How proteins enter the nucleus. Cell **64:**489-497.
191. **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.
192. **Simons, F. H., S. A. Rutjes, W. J. van Venrooij, and G. J. Pruijn.** 1996. The interactions with Ro60 and La differentially affect nuclear export of hY1 RNA. RNA **2:**264-73.
193. **Smith, C. A., V. Calabro, and A. D. Frankel.** 2000. An RNA-binding chameleon. Mol Cell **6:**1067-1076.
194. **Spangberg, K., L. Wiklund, and S. Schwartz.** 2001. Binding of the La autoantigen to the hepatitis C virus 3' untranslated region protects the RNA from rapid degradation in vitro. J Gen Virol **82:**113-20.
195. **Spinelli, S. L., S. A. Consaul, and E. M. Phizicky.** 1997. A conditional lethal yeast phosphotransferase (tpt1) mutant accumulates tRNAs with a 2'-phosphate and an undermodified base at the splice juntion. RNA **3:**1388-1400.
196. **Srisawat, C., and D. R. Engelke.** 2002. RNA affinity tags for purification of RNAs and ribonucleoprotein complexes. Methods **26:**156-161.
197. **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.
198. **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.
199. **Svitkin, Y. V., L. P. Ovchinnikov, G. Dreyfuss, and N. Sonenberg.** 1996. General RNA binding proteins render translation cap dependent [published erratum appears in EMBO J 1997 Feb 17;16(4):896]. E J **15:**7147-7155.
200. **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.
201. **Svoboda, P., P. Stein, H. Hayashi, and R. M. Schultz.** 2000. Selective reduction of dormant maternal mRNAs in mouse oocytes by RNA interference. Development **127:**4147-4156.
202. **Tan, R., L. Chen, J. A. Buettner, D. Hudson, and A. D. Frankel.** 1993. RNA recognition by an isolated α Helix. Cell **73:**1031-1040.
203. **Terns, M. P., E. Lund, and J. E. Dahlberg.** 1992. 3'-end-dependent formation of U6 small nuclear ribonucleoprotein particles in Xenopus laevis oocyte nuclei. Mol Cell Biol **12:**3032-40.
204. **Terns, M. P., and R. M. Terns.** 2002. Small nucleolar RNAs: versatile trans-acting molecules of ancient evolutionary origin. Gene Expr **10:**17-39.
205. **Thomas, L., J. Pfeifle, and F. A. Anderer.** 1987. Human SS-B/LA autoantigen contains a covalent protein-RNA linkage. Biochimica et Biophysica Acta **909:**173-82.
206. **Topfer, F., T. Gordon, and J. McCluskey.** 1993. Characterization of the mouse autoantigen La (SS-B). Identification of conserved RNA-binding motifs, a putative ATP binding site and

reactivity of recombinant protein with poly(U) and human autoantibodies. J Immunol **150:**3091-100.

207. **Tsui, L. V., L. G. Guidotti, T. Ishikawa, and F. V. Chisari.** 1995. Posttranscriptional clearance of hepatitis B virus RNA by cytotoxic T lymphocyte-activated hepatocytes. Proc Natl Acad Sci U S A **92:**12398-12402.
208. **Ueki, N., M. Kondo, N. Seki, K. Yano, T. Oda, Y. Masuho, and M. Muramatsu.** 1998. NOLP: identification of a novel human nucleolar protein and determination of sequence requirements for its nucleolar localization. Biochem Biophys Res Commun **252:**97-102.
209. **Uhlenbeck, O. C.** 1995. Keeping RNA happy. RNA. **1:**4-6.
210. **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.
211. **van Tol, H., and H. Beier.** 1988. All human tRNATyr genes contain introns as a prerequisite for pseudouridine biosynthesis in the anticodon. Nucleic Acids Res **16:**1951-66.
212. **van Tol, H., N. Stange, H. J. Gross, and H. Beier.** 1987. A human and a plant intron-containing tRNATyr gene are both transcribed in a HeLa cell extract but spliced along different pathways. EMBO J **6:**35-41.
213. **van Venrooij, W. J., R. L. Slobbe, and G. J. Pruijn.** 1993. Structure and function of La and Ro RNPs. Mol Biol Rep **18:**113-9.
214. **Verheggen, C., D. L. Lafontaine, D. Samarsky, J. Mouaikel, J. M. Blanchard, R. Bordonne, and E. Bertrand.** 2002. Mammalian and yeast U3 snoRNPs are matured in specific and related nuclear compartments. EMBO J **21:**2736-45.
215. **Von Kobbe, C., and V. A. Bohr.** 2002. A nucleolar targeting sequence in the Werner syndrome protein resides within residues 949-1092. J Cell Sci **115:**3901-7.
216. **Weber, J. D., L. J. Taylor, M. F. Roussel, C. J. Sherr, and D. Bar-Sagi.** 1999. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. Nat Cell Biol **1:**20-6.
217. **Weser, S., M. Bachmann, K. H. Seifart, and W. Meibetaner.** 2000. Transcription efficiency of human polymerase III genes in vitro does not depend on the RNP-forming autoantigen La. Nucleic Acids Res **28:**3935-42.
218. **Westermann, S., and K. Weber.** 2000. Cloning and recombinant expression of the La RNA-binding protein from Trypanosoma brucei. Biochim Biophys Acta **1492:**483-7.
219. **Will, C. L., and R. Luhrmann.** 2001. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. Curr Opin Cell Biol **13:**290-301.
220. **Wittekind, M., M. Gorlach, M. Friedrichs, G. Dreyfuss, and L. Mueller.** 1992. 1H, 13C, and 15N NMR assignments and global folding pattern of the RNA-binding domain of the human hnRNP C proteins. Biochemistry **31:**6254-6265.
221. **Wolin, S. L., and T. Cedervall.** 2002. The la protein. Annu Rev Biochem **71:**375-403.
222. **Wolin, S. L., and A. G. Matera.** 1999. The trials and travels of tRNA. Genes Dev **13:**1-10.
223. **Wood, J., R. M. Frederickson, S. Fields, and A. H. Patel.** 2001. Hepatitis C Virus 3´X region interacts with human ribosomal proteins. J Virol **75:**1348-1358.
224. **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 [published erratum appears in EMBO J 2000 Jun 1;19(11):2763]. EMBO J **19:**1650-60.
225. **Yen, T. S. B.** 1998. Posttranscriptional Regulation of Gene Expression in Hepadnaviruses. Sem Virol **8:**319-326.
226. **Yoo, C. J., and S. L. Wolin.** 1994. La proteins from Drosophila melanogaster and Saccharomyces cerevisiae: a yeast homolog of the La autoantigen is dispensable for growth. Mol Cell Biol **14:**5412-24.
227. **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.
228. **Yu, Y. T., E. C. Scharl, C. M. Smith, and J. A. Steitz.** 1999. The growing world of small nuclear ribonucleoproteins. The RNA World, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY**:**487-524.
229. **Yu, Y. T., M. D. Shu, A. Narayanan, R. M. Terns, M. P. Terns, and J. A. Steitz.** 2001. Internal modification of U2 small nuclear (sn)RNA occurs in nucleoli of Xenopus oocytes. J Cell Biol **152:**1279-88.
230. **Zamore, P. D., T. Tuschl, P. A. Sharp, and D. P. Bartel.** 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell **101:**25-33.
231. **Zeng, Y., and B. R. Cullen.** 2002. RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. RNA **8:**855-860.
232. **Zirwes, R. F., J. Eilbracht, S. Kneissel, and M. S. Schmidt-Zachmann.** 2000. A novel helicase-type protein in the nucleolus: protein NOH61. Mol Biol Cell **11:**1153-67.

233. **Zoulim, F., J. Saputelli, and C. Seeger.** 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. J Virol **68:**2026-2030.

Anhang - Sequenzen der hauptsächlich benutzten RNAs und des humanen La Proteins

Sequenz der HBV RNA B2

5´-GGAACCUUUU CGGCUCCUCU GCCGAUCCAU ACUGCGGAAC UCCUAGCCGC
UUGUUUUGCU CGCAGCAGGU CUGGAGCAAA CAUUAUCGGG ACUGAUAACU CUGUUG-3´

Der unterstrichene Bereich bezeichnet die HBV RNA-B und steht für die Nukleotide 1243-1333 im HBV Genom.

Sequenz der prä-tRNA^{Val}

5´-GUUGGUUUCC GUAGUGUAGU GGUUAUCACG UUCGCCUAAC ACGCGAAAGG
UCCCCGGUUC GAAACCGGGC GGAAACAAAG AGAGUCGCUU U-3´

5´ und 3´ Bereiche der prä-tRNA sind unterstrichen.

Sequenz der prä-tRNA^{Tyr}

5´-ACGUC**CCUUC GAUAGCUCAG CUGGUAGAGC GGAGGACUGU AG***CUACUUCC UCAGCAGGAG AC***AUCCUUAG GUCGCUGGUU CGAUUCCGGC UCGAAGGA**GA CAAGUGCGGU UU-3´

Dabei bezeichnet die *kursive* Region das Intron, die **Fett**-hervorgehobenen Bereiche die Exons; 5´ und 3´ Bereiche der prä-tRNA sind unterstrichen.

Aminosäure-Sequenz des humanen La Proteins

MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMSGGQQM GRGSKFP

^{1}MAENGDNEKM ^{11}AALEAKICHQ ^{21}IEYYFGDFNL ^{31}PRDKFLKEQI ^{41}KLDEGWVPLE
^{51}IMIKFNRLNR ^{61}LTTDFNVIVE ^{71}ALSKSKAELM ^{81}EISEDKTKIR ^{91}RSPSKPLPEV
^{101}TDEYKNDVKN ^{111}RSVYIKGFPT ^{121}DATLDDIKEW ^{131}LEDKGQVLNI ^{141}QMRRTLHKAF
^{151}KGSIFVVFDS ^{161}IESAKKFVET ^{171}PGQKYKETDL ^{181}LILFKDDYFA ^{191}KKNEERKQNK
^{201}VEAKLRAKQE ^{211}QEAKQKLEED ^{221}AEMKSLEEKI ^{231}GCLLKFSGDL ^{241}DDQTCREDLH
^{251}ILFSNHGEIK ^{261}WIDFVRGAKE ^{271}GIILFKEKAK ^{281}EALGKAKDAN ^{291}NGNLQLRNKE
^{301}VTWEVLEGEV ^{311}EKEALKKIIE ^{321}DQQESLNKWK ^{331}SKGRRFKGKG ^{341}KGNKAAQPGS
^{351}GKGKVQFQGK ^{361}KTKFASDDEH ^{371}DEHDENGATG ^{381}PVKRAREETD ^{391}KEEPASKQQK
^{401}TENGAGDQ

Der unterstrichene Bereich kennzeichnet die in pET28b(+) angefügte Aminosäuresequenz mit enthaltener Histidin-Markierung. Die Nummerierung bezieht sich auf die Aminosäuren des hLa.

Danksagung

Mein Dank gilt insbesondere folgenden Personen, die teilweise entscheidenden Einfluss nahmen auf diese Arbeit:

Herrn Professor Will danke ich herzlich für die stets gewährte Unterstützung, Motivation, Hilfsbereitschaft und nicht zuletzt für die Begutachtung der Dissertation.

Herrn Professor Wienand möchte ich dafür danken, dass er sich sofort für die Begutachtung dieser Arbeit außerhalb seines Fachbereichs bereit erklärt hat.

Herrn Dr. Tilman Heise danke ich nicht nur für die Überlassung des Themas und die stets vorhandene Aufmerksamkeit, sondern auch für die vielen, endlosen, guten und produktiven Diskussionen und gemeinsamen Planungen. Auch dank Deiner guten Anleitung und Motivation hat es sehr viel Spaß gemacht!

Herrn Dr. Heukeshoven danke ich für die Durchführung der 2D-Gelelektrophoresen, MALDI-TOF Analysen und proteinbiochemischen Beratungen, sowie Herrn. Dr. Hecht für das *Light-Scattering* und die Vorversuche zur Kristallographie und M. Schweizer für die gemeinsamen Arbeiten zu den FRAP-Analysen. Ferner gilt mein Dank der Universitätsstiftung Hamburg, welche durch ein Reisestipendium eine Kongressreise in die USA im März 2003 finanzierte.

K. Reumann, G. Tettweiler, J. Dittmann und T. Hofmann für die Hilfen, wichtigen Diskussionen, Anregungen und für den unermüdlichen Drang zum Feiern.

Auch allen weiteren Mitgliedern und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe möchte ich für die Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit danken – wenn es insgesamt so viel Spaß macht wie mit Euch, dann funktioniert es auch.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meinen Freunden und insbesondere bei Ines bedanken – für den Glauben daran, dass ich das hier schaffe und für die Hilfe.

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst, andere als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen nicht benutzt und die aus der Literatur entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hamburg, im April 2003

(Sven Horke)

Lebenslauf

Name:	Sven Horke
Geburtsdatum und -ort:	30.12.1971 Neumünster, Deutschland
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

Ausbildung:

1978 - 1982	Grundschule, Hamburg
1982 – 1992	Matthias-Claudius-Gymnasium, Hamburg
1992	Abitur
1992 – 1994	Wehrdienst als Reserveoffiziersanwärter, Soldat auf Zeit
1994 - 1997	Grundstudium Biologie an der Universität Hamburg
1997	Vordiplom in Biologie
1997 - 1999	Hauptstudium Biologie an der Universität Hamburg (Fächer: Biochemie, Genetik / Molekularbiologie, Mikrobiologie)
1999	Diplom-Prüfungen im Studiengang Biologie an der Universität Hamburg
1999 - 2000	Diplomarbeit: "Charakterisierung spezifischer Bindungsproteine des dendritischen Transportelements der MAP2-mRNA " Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie Universitätskrankenhaus Hamburg-Eppendorf
2000	Diplom in Biologie, März 2000
2000	Beginn der Promotion Heinrich-Pette-Institut für experimentelle Virologie und Immunologie an der Universität Hamburg Abteilung für Allgemeine Virologie

Hamburg, im April 2003