

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-Homotrimern 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 Röntgenstrukturbestimmungen 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.