

Untersuchung der Rolle von Makorin1-short in der Regulation des RNA-Metabolismus in Neuronen

Dissertation

zur Erlangung der Würde des
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
Fachbereich Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

André Friedrich

aus Neubrandenburg

Hamburg, 2018

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde in dem von Prof. Dr. Christian Kubisch geleiteten Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Kindler durchgeführt.

Gutachter der Dissertation:

1. Gutachter: Prof. Dr. Stefan Kindler
2. Gutachter: Prof. Dr. Thorsten Burmester

Vorsitzender der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Christian Lohr

Datum der Disputation: 01.02.2019

I Inhaltsverzeichnis

I	Inhaltsverzeichnis	2
II	Abkürzungsverzeichnis	5
1	Zusammenfassung / Summary	8
1.1	Zusammenfassung	8
1.2	Summary	9
2	Einleitung	11
2.1	Synaptische Plastizität	11
2.2	Dendritischer mRNA-Transport	12
2.3	Lokale Proteinsynthese in Dendriten	14
2.4	Ablauf der Translation	17
2.5	<i>Stress granules</i>	19
2.6	Neuronale Translationskontrolle durch mTORC1	21
2.7	Makorin RING Finger Protein 1	23
3	Ziel der Arbeit	25
4	Materialien	26
4.1	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	26
4.2	Geräte	26
4.3	Puffer und Lösungen	27
4.4	Kommerzielle Kits und Zubehör	30
4.5	Zellkulturmedien	30
4.6	Antikörper	31
4.7	Enzyme	32
4.8	Plasmide	33
4.9	siRNA	35
4.10	Oligonukleotide	35
4.11	Zellen und Gewebe	38
4.12	Software	39
5	Methoden	40
5.1	Molekularbiologische Methoden	40
5.1.1	Herstellung chemisch kompetenter <i>E. Coli</i> -Bakterien	40
5.1.2	Transformation chemisch kompetenter <i>E. Coli</i> -Bakterien	40
5.1.3	Isolierung von Plasmid-DNA	41
5.1.3.1	Alkalische Lyse	41

5.1.3.2	DNA-Maxipräparation.....	41
5.1.4	Isolierung von RNA	42
5.1.5	Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA-Enden.....	42
5.1.6	Ligation	43
5.1.7	Sequenzierung Plasmid-DNA.....	43
5.1.8	Agarose-Gelelektrophorese.....	43
5.1.9	Polymerase-Ketten-Reaktion.....	44
5.2	Proteinbiochemische Methoden	44
5.2.1	Herstellung Zelllysate	44
5.2.2	Immunpräzipitation	45
5.2.3	Affinitätsaufreinigung mit m7GTP-Agarose.....	46
5.2.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot	46
5.2.5	Massenspektrometrie	47
5.3	Zellkultur	47
5.3.1	Zellkulturroutine eukaryotische Zelllinien	47
5.3.2	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	48
5.3.3	Präparation kortikaler Neurone aus Rattenembryonen	48
5.3.4	Plasmid-Transfektion.....	49
5.3.5	siRNA-Transfektion	49
5.3.6	CRISPR/Cas9-LARP1- <i>knockout</i>	50
5.3.7	Immunzytochemische Färbung	51
5.4	Mikroskopie.....	51
5.5	Messung Photinus- und Renilla-Luciferase-Aktivität.....	51
6	Ergebnisse.....	52
6.1	hMKRN1s stimuliert die Translation in kortikalen Zellen	52
6.2	hMKRN1s akkumuliert in SGs	59
6.3	Identifikation von hMKRN1s-Interaktionspartnern.....	63
6.4	Validierung putativer Interaktionen	70
6.5	Rolle von UPF1 bei der MKRN1s-vermittelten Stimulation der Translation.....	74
6.6	Rolle von LARP1 bei der MKRN1s-vermittelten Stimulation der Translation.....	77
6.7	Identifikation der Interaktionsdomänen von PABP und LARP1	82
6.8	PABP als Interaktionsgerüst für hMKRN1s.....	86
6.9	Assoziation von hMKRN1s an dem 5'-Cap-Bindungskomplex.....	87
6.10	Einfluss von hMKRN1s auf eIF4E-unabhängige Translation	90
7	Diskussion.....	92
7.1	Funktionelle Domänen von hMKRN1s.....	92
7.2	Identifikation translationsregulierender Interaktionspartner.....	95
7.3	Relevanz von LARP1 und UPF1 für die Translationsförderung	98
7.4	Abhängigkeit von eIF4E-vermittelter Translation	100

7.5	Ausblick.....	101
8	Referenzen.....	104
9	Liste der Abbildungen	115
10	Anhang	116
11	Danksagungen	125
12	Eidenstattliche Versicherung	126

II Abkürzungsverzeichnis

n.s.	nicht signifikant
4EBP	eIF4E-bindendes Protein
5'TOP	<i>5'-terminal oligopyrimidine</i>
AMPAR	α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazol-propionsäure Rezeptor
Arc	<i>activity-regulated cytoskeleton-associated protein</i>
ATP5A1	<i>ATP synthase subunit alpha, mitochondrial</i>
ATX2	Ataxin-2
BBS	BES-gepufferte Salzlösung
BCL2	B-Zell-Lymphoma-2
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
C ₃ H	Cys-Cys-Cys-His
CaMKII	Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II
CCT6A	<i>T-complex protein 1 subunit zeta</i>
CLIP	<i>UV crosslinking and immunoprecipitation</i>
CMV	<i>cytomegalovirus</i>
CPE	<i>cytoplasmic polyadenylation element</i>
CPEB1	<i>cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1</i>
CYFIP1	<i>cytoplasmic FMR1-interacting protein 1</i>
DDX6	<i>DEAD box protein 6</i>
DHX30	DExH-box helicase 30
DHX9	<i>protein ATP-dependent RNA helicase A</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	<i>dendritic targeting element</i>
DYNC1H1	<i>cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1</i>
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eEF'X'	eukaryotischer Elongationsfaktor 'X'
eEF2K	eukaryotischer Elongationsfaktor 2 Kinase
EGFP	verbessertes grün fluoreszierendes Protein
eIF'X'	eukaryotischer Initiationsfaktor 'X'
EMCV	<i>encephalomyocarditis Virus</i>
FAT	<i>focal adhesion targeting</i>
<i>FMR1</i>	<i>fragile X mental retardation</i>
FMRP	<i>fragile X mental retardation protein</i>
FRB	<i>FKBP12-rapamycin binding</i>
G3BP	<i>ras GTPase-activating protein-binding protein 1</i>
GCN1L1	<i>eIF2 alpha kinase activator homolog</i>
GCN2	<i>general control non-derepressible-2</i>
GLD2	<i>germ line development 2</i>
gRNA	<i>guide RNA</i>
GST	<i>glutathione S-transferase</i>
HEAT	<i>huntington, elongation factor 3, PR65/A, TOR</i>
hMKRN1s	humanes MKRN1s

HNRNP1	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1</i>
HRI	<i>heme-regulated inhibitor</i>
hTERT	<i>telomerase reverse transcriptase</i>
IgG	Immunglobulin G
IMP1	<i>insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	interne ribosomale Eintrittsstelle
KAR	Kainat-Rezeptor
KH	<i>hnRNP K homology</i>
KIF5c	<i>kinesin heavy chain isoform 5C</i>
La-Modul	Abschnitt im LARP1 Protein, welches die LAM- und RRM-L5-Domäne enthält
LARP1	<i>La-related protein 1</i>
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LPP	Laemmli Probenpuffer
L-Puffer	Lysepuffer
m7GTP	7-Methyl-Guanosine-5'-Triphosphat
MAP2	Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2
MARTA	<i>MAP2 RNA trans-acting protein</i>
mGluR	Metabotroper Glutamatrezeptor
MKRN1	Makorin RING Finger Protein 1
MKRN1s	Makorin RING Finger Protein-1 <i>short</i>
MLLE	<i>mademoiselle</i>
mLST8	<i>target of rapamycin complex subunit LST8</i>
Mnk1	<i>MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1</i>
MOV10	moloney leukemia virus 10 protein
mRIPA	modifizierter RIPA Puffer
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
mTORC1	mTOR Komplex 1
MTZF	MKRN-typischen Zinkfinger
N-	N22-
NF-	N22-Flag3-
NFBP	NF-κB binding protein
NGDN	<i>neuroguidin</i>
NMD	nonsense-mediated mRNA decay
NMDAR	N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor
N-Puffer	Neutralisationspuffer
PABC	<i>C-terminale MLLE-Domäne von PABP</i>
PABP	Poly(A)-bindendes Protein 1
PABPC'X'	Poly(A)-bindendes Protein Isoform'X'
PAIP	<i>polyadenylate-binding protein-interacting protein</i>
PAM2	<i>PABC recognition motif 2</i>
PARN	<i>polyadenylate-specific ribonuclease</i>
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PDCD11	<i>programmed cell death protein 11</i>

PDLIM7	<i>PDZ and LIM domain protein 7</i>
PERK	<i>protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase</i>
PhoLuc	Photinus-Luciferase
PKM	Pyruvate Kinase Isoenzym M
PKR	<i>RNA activated protein kinase</i>
PLZF	<i>promyelocytic leukemia zinc finger</i>
PRKDC	<i>DNA-dependent protein kinase catalytic subunit</i>
PRRC2A	<i>proline-rich and coiled-coil-containing protein 2A</i>
PSD	postsynaptische Dichte
PSM	<i>peptide spectrum matches</i>
QKI	<i>protein quaking</i>
RAPTOR	<i>regulatory associated protein of mTOR</i>
recLARP1	rekombinantes LARP1
RenLuc	Renilla-Luciferase
RF Δ CC	unvollständige RING Domäne von MKRN1s
RFP	rot fluoreszierendes Protein
RGG	<i>cluster of arginine and glycine residues</i>
RING	<i>really interesting new gene</i>
RIP-Chip	<i>RNP immunoprecipitation-microarray</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rPABP	PABP der Ratte
RPL17P40	<i>ribosomal protein L17 pseudogene 40</i>
R-Puffer	Resuspensionspuffer
RRM	<i>RNA recognition motifs</i>
S6K1	<i>ribosomal protein S6 kinase beta-1</i>
SG	<i>stress granules</i>
Shank3	<i>SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3</i>
SMG1	nonsense mediated mRNA decay associated PI3K related kinase
SURF	<u>SMG1-UPF1-eRF1-eRF3</u>
TCP1	<i>T-complex protein 1 subunit alpha</i>
TIA-1	<i>nucleolysin TIA-1 isoform p40</i>
tPOTS	<i>transcript probability of off-target score</i>
TUBA3E	<i>tubulin alpha-3E chain</i>
TUBB8	<i>tubulin beta-8 chain</i>
UBC	<i>ubiquitin C</i>
UPF1	<i>regulator of nonsense transcripts 1</i>
UTR	Untranslatierter Bereich
ZBTB16	<i>zinc finger and BTB domain containing 16</i>
ZF	Zink Finger

1 Zusammenfassung / Summary

1.1 Zusammenfassung

Bestimmte Formen synaptischer Plastizität setzen die lokale Proteinsynthese in Dendriten voraus. Das Makorin RING Finger Protein-1 *short* (MKRN1s) ist ein potenziell positiver Regulator der lokalen Translation in Nervenzellen und als solcher an der Regulation synaptischer Plastizität beteiligt.

Dieser Arbeit lag die Beobachtung zugrunde, dass MKRN1s mit dem poly(A)-bindenden Protein (PABP) interagiert und zusammen mit PABP in granulatartigen Strukturen entlang von Dendriten lokalisiert. PABP ist eine Schlüsselkomponente verschiedener Ribonukleoprotein-Komplexe (RNPs) und übernimmt bedeutende Funktionen bei der Kontrolle der Translation, der Stabilität und der subzellulären Lokalisierung von mRNAs. MKRN1s ist im Gehirn der Ratte die primäre MKRN1-Isoform und assoziiert in RNPs mit dendritisch lokalisierten mRNAs. Nach elektrischer Stimulation von Dendriten wird MKRN1s an aktivierte Synapsen rekrutiert. Wenn MKRN1s an eine Reporter-mRNA gebunden ist, stimuliert es die Translationsrate dieser mRNA in primären Neuronen. MKRN1s enthält drei Zinkfinger-Domänen vom Typ C₃H, ein PAM2- (*PABC recognition motif 2*) Motiv, einen MKRN-typischen Zinkfinger und eine verkürzte C₃HC₄-RING-Domäne.

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkweise von MKRN1s im RNA-Metabolismus besser zu verstehen. Dazu wurde die Bedeutung einzelner Domänen für die MKRN1s-vermittelte Translationsstimulation untersucht und neue Interaktionspartner von MKRN1s identifiziert. In gestressten eukaryotischen Zellen akkumulierte MKRN1s in sogenannten *stress granules*, zytoplasmatische Strukturen, in denen mRNPs transient der Translation entzogen werden. Für diesen Prozess ist der erste Zinkfinger (ZF1) und das PAM2-Motiv essenziell. Für die effiziente Translationsstimulation einer Reporter-mRNA sind ebenfalls ZF1 und das PAM2-Motiv essenziell.

Infolge einer massenspektrometrischen Untersuchung und anschließender Validierung putativer Interaktionspartner konnten LARP1 (*La-related protein 1*) und UPF1 (*regulator of nonsense transcripts 1*) als neue Interaktionspartner von MKRN1s identifiziert werden. Für die Wechselwirkung der zwei Proteine mit MKRN1s ist ein funktionelles PAM2-Motiv essenziell. Durch Rekrutierung von MKRN1s an eine Reporter-mRNA in Abwesenheit von LARP1 bzw. UPF1 konnte gezeigt werden, dass die Wechselwirkung von MKRN1s mit

LARP1 und UPF1 für die translationsfördernde Wirkung von MKRN1s essenziell ist. MKRN1s interagiert mit LARP1 indirekt über PABP als Interaktionsgerüst. Dabei bindet MKRN1s über das PAM2-Motiv an die vier RRM- (*RNA recognition motifs*) und der MLLE- (*mademoiselle*) Domäne von PABP. LARP1 bindet über das La-Modul an die vier RRM-Domänen von PABP. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass MKRN1s in Abhängigkeit der Bindung mit PABP mit dem Translationsinitiationskomplex eIF4F interagiert. Die effiziente translationsfördernde Wirkung von MKRN1s auf eine Reporter-mRNA ist davon abhängig, dass das vollständige Set an Translationsinitiationsfaktoren vorhanden ist. Die beobachteten Daten deuten darauf hin, dass MKRN1s in Wechselwirkung mit LARP1, PABP und UPF1 die Translationsinitiation reguliert.

1.2 Summary

Certain forms of synaptic plasticity require local protein synthesis in dendritic spines. Makorin RING Finger Protein-1 short (MKRN1s) is a potential positive regulator of local translation in nerve cells and may therefore participate in the regulation of such forms of synaptic plasticity.

This work is based on the observation that MKRN1s interacts with poly(A) binding protein (PABP) and co-localizes together with it in granular structures along dendrites. PABP is a key component of various ribonucleoprotein complexes (RNPs) and plays an important role in controlling translation rate, stability and subcellular localization of mRNAs. MKRN1s is the most common MKRN1 isoform in the rat brain and is associated with mRNAs in RNPs of dendrites. MKRN1s is recruited to activated synapses after electrical stimulation. In primary neurons, when MKRN1s is bound to a reporter mRNA, it increases its translation rate. MKRN1s contains three C₃H-type zinc finger domains, a PAM2 (PABC recognition motif 2) motif, a MKRN-type zinc finger and a truncated C₃HC₄-RING domain. The aim of this dissertation was to better understand the unknown mode of action of MKRN1s in RNA metabolism. For this purpose, the relevance of individual domains for MKRN1s-mediated translation stimulation was investigated and new interaction partners of MKRN1s were identified. MKRN1s accumulates in stressed eukaryotic cells in so-called stress granules: cytoplasmic structures in which mRNPs are transiently removed from translation. The first zinc finger (ZF1) and the PAM2 motif are essential for this process.

ZF1 and the PAM2 motif are also essential for efficient translation stimulation of a reporter mRNA in neurons.

Mass spectrometric investigation and subsequent validation of putative interaction partners have identified two new binding partners of MKRN1s: LARP1 (La-related protein 1) und UPF1 (regulator of nonsense transcripts 1). The interaction of these proteins with MKRN1s depends on a functional PAM2 motif. The recruitment of MKRN1s to a reporter mRNA in the absence of LARP1 or UPF1 has shown that the interaction of MKRN1s with LARP1 and UPF1 is essential for the translation-promoting effect of MKRN1s. Interaction analyses have shown that the interaction of MKRN1s with LARP1 is mediated via PABP. Previous studies have shown that MKRN1s interacts with all PABP domains via its PAM2 motif. This dissertation shows that LARP1 binds to the four RRM (RNA recognition motifs) domains of PABP via its La module. Finally, it has been demonstrated that MKRN1s interacts with the eIF4F translation initiation complex in a manner dependent on of the interaction with PABP. The translation promoting effect of MKRN1s on reporter mRNA depends on the availability of the complete set of translation initiation factors. The observed data suggest that MKRN1s regulates translation initiation in association with LARP1, PABP and UPF1.

2 Einleitung

2.1 Synaptische Plastizität

Die primäre Funktion von Neuronen ist es, Informationen zu empfangen, zu verarbeiten und weiterzuleiten. Die Übertragung von Signalen zwischen Neuronen erfolgt über Synapsen. Das menschliche Gehirn besitzt etwa 86 Millionen Neuronen mit insgesamt ca. $1,5 \times 10^{14}$ Synapsen (Azevedo *et al.*, 2009; Pakkenberg *et al.*, 2003). Das Nervensystem passt sich an, lernt und speichert Informationen. Grundlage hierfür sind aktivitätsbedingte Modifikationen der synaptischen Verbindungen. Dieses Modell der Plastizität wurde 1949 von Donald Hebb postuliert (Hebb, 1950). Synaptische Plastizität ist die Fähigkeit von Neuronen die Physiologie und Morphologie der Synapse zu verändern und somit die synaptische Stärke zu modulieren. Diese Fähigkeit der Neurone stellt vermutlich die zelluläre Grundlage für Lern- und Gedächtnisprozesse dar. Die synaptische Stärke korreliert häufig mit der Größe von dendritischen Dornen. Dendritische Dornen sind Membranausstülpungen, die die Mehrheit der Postsynapsen im Gehirn ausbilden (Engert und Bonhoeffer, 1999; Maletic-Savatic *et al.*, 1999; Matsuzaki *et al.*, 2001; Matsuzaki *et al.*, 2004; Murthy *et al.*, 2001; Nusser *et al.*, 1998; Takumi *et al.*, 1999).

Verantwortlich für die chemische Signalübertragung durch den exzitatorischen Neurotransmitter L-Glutamat an Synapsen sind L-Glutamat-Rezeptoren wie NMDAR (N-Methyl-D-Aspartat Rezeptor), AMPAR (α -Amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolpropionsäure Rezeptor), KAR (Kainat-Rezeptor) und mGluR (Metabotroper Glutamatrezeptor) (Meldrum, 2000). Die Aktivierung des NMDAR führt zu einem Kalziumeinstrom in die Postsynapse (Burnashev, 1998). Dieser bewirkt eine Rekrutierung der CaMKII (Calcium-Calmodulin-abhängige Proteinkinase II) an die postsynaptische Dichte (PSD). Dort bindet sie unter anderem die GluN2B-Untereinheit des NMDAR und phosphoryliert anschließend Proteine der PSD (Barria *et al.*, 1997; Halt *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2007). Zusätzlich fördert CaMKII die lokale Aktivierung von Ras- und Rho-GTPasen (Murakoshi *et al.*, 2011). Diese aktivieren weitere Signalkaskaden, die zur Entstehung einer Langzeit-Potenzierung oder Langzeit-Depression beitragen (Lee *et al.*, 2009b).

Zudem beeinflussen NMDAR-assoziierte Signalkaskaden die lokale Synthese dendritischer Proteine (Cohen und Greenberg, 2008; Fernandez-Moya *et al.*, 2014). Dendritische mRNAs werden durch Assoziation mit mRNA-bindenden Proteinen in mRNP- (Boten-Ribonukleoprotein) Komplexe verpackt und mithilfe von Motorproteinen entlang des Zytoskelettes in Dendriten transportiert. Die anschließende Synthese neuer Proteine erfolgt lokal an Synapsen. Dies kann zu einer Veränderung der synaptischen Stärke einer Synapse beitragen (Bramham und Wells, 2007; Martin und Zukin, 2006).

2.2 Dendritischer mRNA-Transport

Die meisten dendritisch lokalisierten Proteine werden im Zytoplasma synthetisiert und anschließend in die Dendriten transportiert (Kennedy und Ehlers, 2006; Tang, 2008). Einige mRNA-Spezies werden aktiv in die Dendriten transportiert und lokal an der Synapse translatiert (Kiebler und DesGroseillers, 2000; Steward und Levy, 1982) (Abbildung 1). Die lokale Proteinsynthese reduziert die Gefahr, dass Proteine beim Transport Einflüssen ausgesetzt sind, die zu einem Funktionsverlust führen (Jung *et al.*, 2014). Weiterhin hat die lokale Proteinsynthese den Vorteil, dass entsprechende Proteine ihre Wirkung erst am Zielort entfalten. Die lokale Translation ermöglicht zudem zeitnah, zum Beispiel nach Aktivierung einer Synapse, neue Proteine zu synthetisieren, die zur Modifikation der Morphologie und Funktion des synaptischen Kontakts beitragen (Steward und Schuman, 2003). Zusätzlich birgt die lokale Translation energetische Vorteile im Vergleich zum Proteintransport in Dendriten, da eine einzelne mRNA mehrfach translatiert werden kann und neue Proteine nicht energieintensiv transportiert werden müssen (Doyle und Kiebler, 2011; Wu *et al.*, 2016). Entscheidend ist die lokale Translation für langanhaltende Veränderungen der synaptischen Stärke. Kurzzeiteffekte sind unabhängig von lokaler Translation (Kandel, 2001).

Dendritisch lokalisierte mRNAs kodieren meist für synaptische Proteine. Dazu gehören Kinasen (CaMKII α , Pyruvate Kinase Isoenzym M \triangleq PKM), Neurotransmitterrezeptoren (AMPA, mGluR, NMDAR) und Regulatoren des Zytoskelettes (β -Actin, *activity-regulated cytoskeleton-associated protein* \triangleq Arc, Mikrotubuli-assoziiertes Protein 2 \triangleq MAP2) (Andreassi und Riccio, 2009; Bramham und Wells, 2007; Wang *et al.*, 2010). Allen dendritischen mRNAs ist gemein, dass sie ein *cis*-aktives Element besitzen, das der

dendritischen Lokalisierung dient (*dendritic targeting element* \triangleq DTE). Diese Elemente scheinen für den nukleären Export, die Lokalisation im Zellkörper oder in anderen Zellkompartimenten, die mRNA-Stabilität und die Translationskontrolle von Bedeutung zu sein. RNA-bindenden Proteine, die diese *cis*-aktiven Elemente spezifisch binden und so zum RNA-Transport und der Lokalisation beitragen, werden *trans*-agierende Faktoren genannt. Durch die Interaktion zwischen *trans*-agierenden Faktoren und *cis*-aktiven Elementen bilden sich mRNP-Komplexe (Andreassi und Riccio, 2009; Kindler *et al.*, 2005).

Transkripte der postsynaptisch lokalisierten CaMKII α enthalten zwei DTE in der 3'UTR (untranslatierter Bereich), die für den Transport der CaMKII α -mRNA in Dendriten verantwortlich sind (Blichenberg *et al.*, 2001; Mori *et al.*, 2000). Zusätzlich enthält die 3'UTR von CaMKII α -Transkripten zwei *cis*-aktive CPE- (*cytoplasmic polyadenylation element*) Elemente, die mit dem *trans*-agierenden Faktor CPEB1 (*cytoplasmic polyadenylation element binding protein 1*) interagieren. Neuronale CPEB-mRNP-Komplexe enthalten Kinesin- und Dynein-Motorproteine für den bidirektionalen Transport entlang des dendritischen Mikrotubuli-Netzwerks (Huang *et al.*, 2003). Eine Mutagenese im CaMKII α -Gen, die für den Verlust der kompletten 3'UTR in der mRNA verantwortlich ist, verhindert in transgenen Mäusen den dendritischen mRNA-Transport von CaMKII α -Transkripten und reduziert die CaMKII α -Proteinmenge in der PSD von hippocampalen Neuronen dramatisch. Dies hat negative Auswirkungen auf das Langzeitgedächtnis der Mäuse (Miller *et al.*, 2002). Diese Untersuchung zeigt, dass der dendritische Transport und die lokale Translation der CaMKII α -mRNA an der Synapse essenziell für synaptische Plastizität ist.

Auch MAP2-Transkripte werden postsynaptisch translatiert und enthalten DTEs zur dendritischen Lokalisierung. Der Transport wird durch die Bindung der *trans*-agierenden Faktoren MARTA1 und MARTA2 (*MAP2 RNA trans-acting protein*) über KH-Domänen (*hnRNP K homology*) vermittelt (Rehbein *et al.*, 2000; Rehbein *et al.*, 2002). MAP2-mRNP-Komplexe interagieren mit dem Mikrotubuli-Motorprotein KIF5c (*kinesin heavy chain isoform 5C*). Nach Inhibierung von KIF5c werden endogene MAP2-Transkripte nicht mehr in Dendriten transportiert (Zivraj *et al.*, 2013).

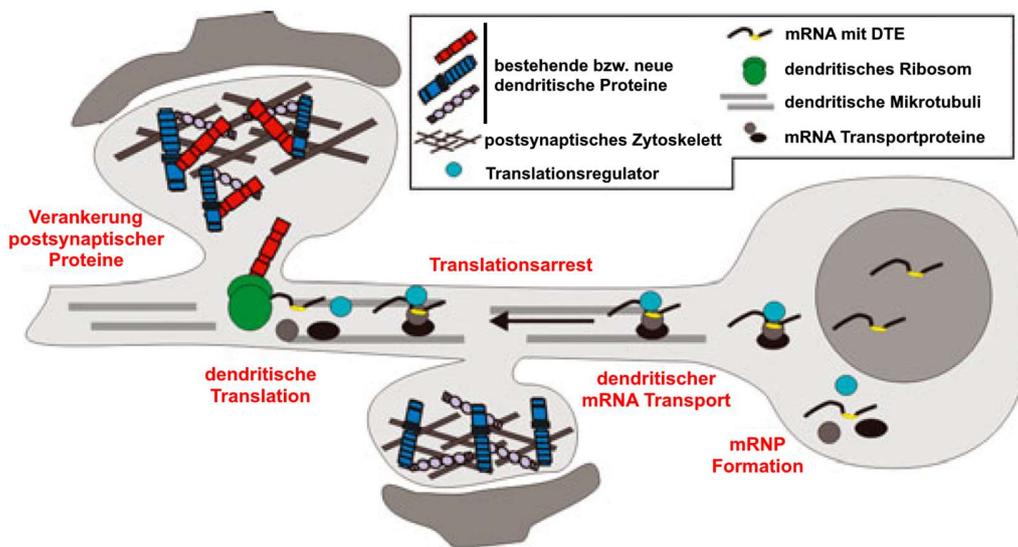


Abbildung 1 Modell des aktiven Transportes dendritischer Transkripte. DTE-enhaltende, neu-transkribierte mRNAs werden nach der RNA-Prozessierung aus dem Zellkern exportiert. mRNA-bindende Proteine binden das DTE-Element der mRNA und bilden mRNP-Komplexe im Zellkörper. Diese werden entlang des dendritischen Mikrotubuli-Netzwerkes transportiert. An der Postsynapse kann anschließend die lokale Translation durch dendritische Ribosomen stattfinden. Neu-synthetisiertes Protein kann anschließend direkt in die Postsynapse rekrutiert werden. (modifizierte Abbildung nach Kremerskothen *et al.* (2006)).

2.3 Lokale Proteinsynthese in Dendriten

Neu synthetisierte Proteine können unter anderem die Signaltransduktion in aktivierten Synapsen regulieren und degradierte und inaktive Proteine vor Ort ersetzen (Bramham und Wells, 2007; Jung *et al.*, 2014; Martin und Zukin, 2006). Die zur lokalen Translation nötigen Ribosomen und Translationsfaktoren befinden sich im dendritischen Dorn bzw. im Schaft des Dorns (Steward und Levy, 1982; Torre und Steward, 1992). Der Transport von Ribosomen und Translationsfaktoren an den dendritischen Dorn erfolgt vermutlich in mRNP-Komplexen über das Zytoskelett (Kanai *et al.*, 2004; Knowles *et al.*, 1996; Krichevsky und Kosik, 2001). Dendritisch lokalisierte Transkripte für ribosomale Proteine dienen nur zur Reparatur bestehender Ribosomen (Zhong *et al.*, 2006).

Die Translationskapazität an einer einzelnen Synapse ist begrenzt, da im Hippocampus und Gyrus dentatus nur 1 bis 3 Ribosomen im Durchschnitt pro dendritischen Dorn zur Verfügung stehen (Ostroff *et al.*, 2002; Steward und Reeves, 1988). Aufgrund der geringen Zahl an Ribosomen geht man davon aus, dass nicht mehr als zwei mRNA-Moleküle gleichzeitig translatiert werden (Ostroff *et al.*, 2002; Schuman *et al.*, 2006).

Die Initiation der Translation unterliegt einer komplexen Kontrolle. Die Mehrheit der charakterisierten Translationsregulatoren in Dendriten wirken reprimierend (Cioni *et al.*, 2018; Fernandez-Moya *et al.*, 2014; Khalil *et al.*, 2018). Erst die Aktivierung von Synapsen und die damit einhergehende Aktivierung von Signalkaskaden bewirkt eine Stimulation der Translation, unter anderem durch die Phosphorylierung von Mnk1 (*MAP kinase-interacting serine/threonine-protein kinase 1*), eIF4E (eukaryotischer Initiationsfaktor 4E), 4EBP (eIF4E-bindendes Protein) und S6K1 (*ribosomal protein S6 kinase beta-1*). Dies stimuliert die Bildung des Translationsinitiationskomplexes eIF4F und erhöht somit die Translationsrate (Banko *et al.*, 2004; Banko *et al.*, 2005; Kelleher *et al.*, 2004; Klann und Dever, 2004).

Ein Regulator der lokalen dendritischen Translation ist CPEB1. Es bindet an in der 3'UTR lokalisierte CPEs und inhibiert die Translation dieser mRNAs, wie zum Beispiel mRNAs für CaMKII α und die NMDAR Untereinheit 2A (Wu *et al.*, 1998). Dabei liegt CPEB1 in einem Komplex mit der poly(A)-Polymerase GLD2 (*germ line development 2*), der Deadenylase PARN (*polyadenylate-specific ribonuclease*) und dem Translationsrepressor NGDN (*neuroguidin*) vor. In nicht aktivierten Synapsen verhindert dieser Komplex durch die Deadenylase-Aktivität von PARN die Assoziation von PABP (poly(A)-bindendes Protein) mit dem poly(A)-Schwanz der mRNA und inhibiert so die Rekrutierung des eIF4F-Komplexes an das 5'-Ende der mRNA. Dies inhibiert die Translationsinitiation. Nach NMDAR-Aktivierung wird CPEB1 phosphoryliert. Dies inhibiert die Interaktion mit PARN, welches sich aus dem mRNP-Komplex löst. Anschließend ist GLD2 in der Lage den poly(A)-Schwanz der assoziierten mRNA zu verlängern. Dies erlaubt die Rekrutierung von PABP, was den Aufbau des eIF4F-Komplexes fördert. Auf diese Weise wird die Synthese von CaMKII α und der NMDAR-Untereinheit 2A ermöglicht (Huang *et al.*, 2002; Udagawa *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 1998).

Ein weiteres Beispiel für Translationskontrolle stellt die Phosphorylierung der eIF2- α -Untereinheit dar. Für die Translationsinitiation ist es notwendig, dass an eIF2 gebundenes GDP durch GTP ersetzt wird. Dies erfolgt durch den GTP-Austauschfaktor eIF2B. Der ternäre Komplex eIF2-GTP-tRNA^{Met} kann somit an die 40S ribosomale Untereinheit rekrutiert werden. Die Phosphorylierung von Serin S51 in eIF2 α inhibiert die eIF2B-Aktivität. Aufgrund des Mangels an ternären Komplexen kommt es zum Erliegen der Translationsinitiation (Pavitt *et al.*, 1998). Die Phosphorylierung von Serin S51 erfolgt

durch vier eIF2 α -Kinasen: PKR (*RNA activated protein kinase*), PERK (*protein kinase R-like endoplasmic reticulum kinase*), GCN2 (*general control non-derepressible-2*) und HRI (*heme-regulated inhibitor*). Die Aktivität der eIF2 α -Kinasen unter normalen physiologischen Bedingungen, speziell in Neuronen, ist nicht bekannt (Trinh und Klann, 2013). Durch Reduzierung der Konzentration von phosphoryliertem eIF2 α in kortikalen Zellen nach BDNF- (*brain-derived neurotrophic factor*) Behandlung, wird die globale Translationsrate in Neuronen erhöht (Takei *et al.*, 2001). Wenn die Regulation der eIF2 α Phosphorylierung durch *knockout* der Kinase GCN2 in Mäusen gestört ist, kommt es zu einer Beeinträchtigung von Lern- und Gedächtnisprozessen (Costa-Mattioli *et al.*, 2005). Eine Störung der Translationskontrolle in Dendriten kann unter anderem Ursache für neuronale Erkrankungen sein. Ein gut verstandenes Beispiel stellt das Fragile-X-Syndrom dar. Diese Erbkrankheit führt zu kognitiven Behinderungen. Auslöser ist eine Expansion von GCG-Wiederholungen im *FMR1* (*fragile X mental retardation*) Gen. Dies führt zur Inaktivierung der Transkription von *FMR1* (Garber *et al.*, 2008). Das Genprodukt FMRP (*fragile X mental retardation protein*) ist ein neuronales RNA-bindendes Protein, das die lokale Translation in Dendriten reguliert (Wang *et al.*, 2012b).

Als *trans*-aktivierender Faktor ist FMRP über KH- und RGG-*box*- (*cluster of arginine and glycine residues*) Domänen in der Lage, RNA zu binden. Durch Bindung an Polyribosomen verzögert FMRP die Translokation der Ribosomen in der Elongationsphase (Stefani *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008). Zusätzlich wird FMRP durch die Interaktion mit *microRNAs* reguliert (Edbauer *et al.*, 2010). Davon betroffen sind Transkripte, die für Autismus-assoziierte prä- und postsynaptische Proteine kodieren, wie zum Beispiel die NMDAR Untereinheit 2A (Brown *et al.*, 2001; Darnell *et al.*, 2011). Zudem ist FMRP an der Inhibierung der Translationsinitiation in Dendriten beteiligt. Dies geschieht über die Interaktion mit CYFIP1 (*cytoplasmic FMR1-interacting protein 1*). Dieser Interaktionspartner bindet im Komplex mit FMRP direkt den Initiationsfaktor eIF4E und inhibiert dessen Assoziation mit dem Initiationsfaktor eIF4G. Dies verhindert den Aufbau des eIF4F-Komplexes und inhibiert so die Initiation. Die Translationsrepression durch FMRP und CYFIP1 wird aktivitätsabhängig reguliert. Die Translation wird nach Stimulation mittels BDNF wieder aktiviert, sobald CYFIP1 von eIF4E dissoziiert (De Rubeis und Bagni, 2011; Napoli *et al.*, 2008).

2.4 Ablauf der Translation

Die Translation besteht aus drei Schritten: Initiation, Elongation und Termination. Die Initiation ist dabei der limitierende und am strengsten regulierte Schritt der Translation (Sonenberg und Hinnebusch, 2009b). In der Initiationsphase wird das 80S Ribosom an das Startcodon rekrutiert und die Elongation kann beginnen (Abbildung 2). Für die Initiation sind mindestens neun eukaryotische Initiationsfaktoren notwendig (Jackson *et al.*, 2010). Zunächst wird der 43S-Präinitiationskomplex aufgebaut. Dabei wird tRNA_i^{Met} mit dem GTP-gebundenen eukaryotischen Initiationsfaktor eIF2 an die 40S ribosomale Untereinheit rekrutiert. An den Komplex binden außerdem eIF1, eIF1A und eIF3. Durch die Interaktion von eIF3 mit eIF4F wird der 43S-Präinitiationskomplex an das 5'-Ende von m⁷GTP- (7-Methyl-Guanosine-5'-Triphosphat) mRNAs rekrutiert. Zu den Bestandteilen des eIF4F-Komplexes gehören das 5'-Cap-bindende Protein eIF4E, die *DEAD-box* RNA-Helikase eIF4A und das Gerüstprotein eIF4G. Durch die Interaktion zwischen eIF4G und PABP kommt es zur Zirkularisierung der mRNA. Die Helikase eIF4A wird durch die Interaktion mit eIF4G und eIF4B stimuliert (Marintchev *et al.*, 2009). Anschließend bewegt sich der 43S-Komplex entlang der mRNA in 5' – 3' Richtung zum Auffinden des ersten Startcodons. Die optimale Sequenz zur Erkennung des Startcodons ist GCC(A/G)CCA**AUGG** mit einer Purin-Base in der -3 und einem Guanin in der +4 Position, relativ zum AUG-Codon (Kozak, 1991). Nach der Erkennung des Startcodons durch die Bindung an das Anticodon der tRNA_i^{Met} stoppt dieser Prozess und eIF5 bindet die β-Untereinheit von eIF2. eIF5 ist ein GTPase-aktivierendes Protein und induziert die Hydrolyse von eIF2-gebundenem GTP (Paulin *et al.*, 2001). eIF2-GDP hat eine reduzierte Affinität zur tRNA_i^{Met}. Anschließend katalysiert der Faktor eIF5B-GTP die Dissoziation von eIF1, eIF3, eIF2-GDP (Pestova *et al.*, 2000; Unbehaun *et al.*, 2004). Das GDP gebunden an eIF2 wird durch eIF2B, einen GTP-Austauschfaktor, für die nächste Runde der Translation durch GTP ersetzt. Die Bindung von eIF5B-GTP an die A-Stelle der 40S ribosomalen Untereinheit führt zur Rekrutierung der 60S-Untereinheit und zur Ausbildung des 80S Ribosoms. Nach Hydrolyse von eIF5B-gebundenem GTP dissoziieren eIF5B und eIF1A vom reifen 80S Ribosom ab.

Anschließend werden Translationselongationsfaktoren rekrutiert, um die Elongation der Polypeptidkette zu starten. Die eukaryotische Elongationsfaktoren 1A (eEF1A) und 1B (eEF1B) sind am Laden der Aminoacyl-tRNAs an die P-Stelle des Ribosoms beteiligt.

eEF2 steuert die Translokation des Ribosoms. Nach dem Erreichen des Stoppcodons binden Terminationsfaktoren an das Ribosom. Dies initiiert die hydrolytische Abspaltung der Polypeptidkette vom Ribosom.

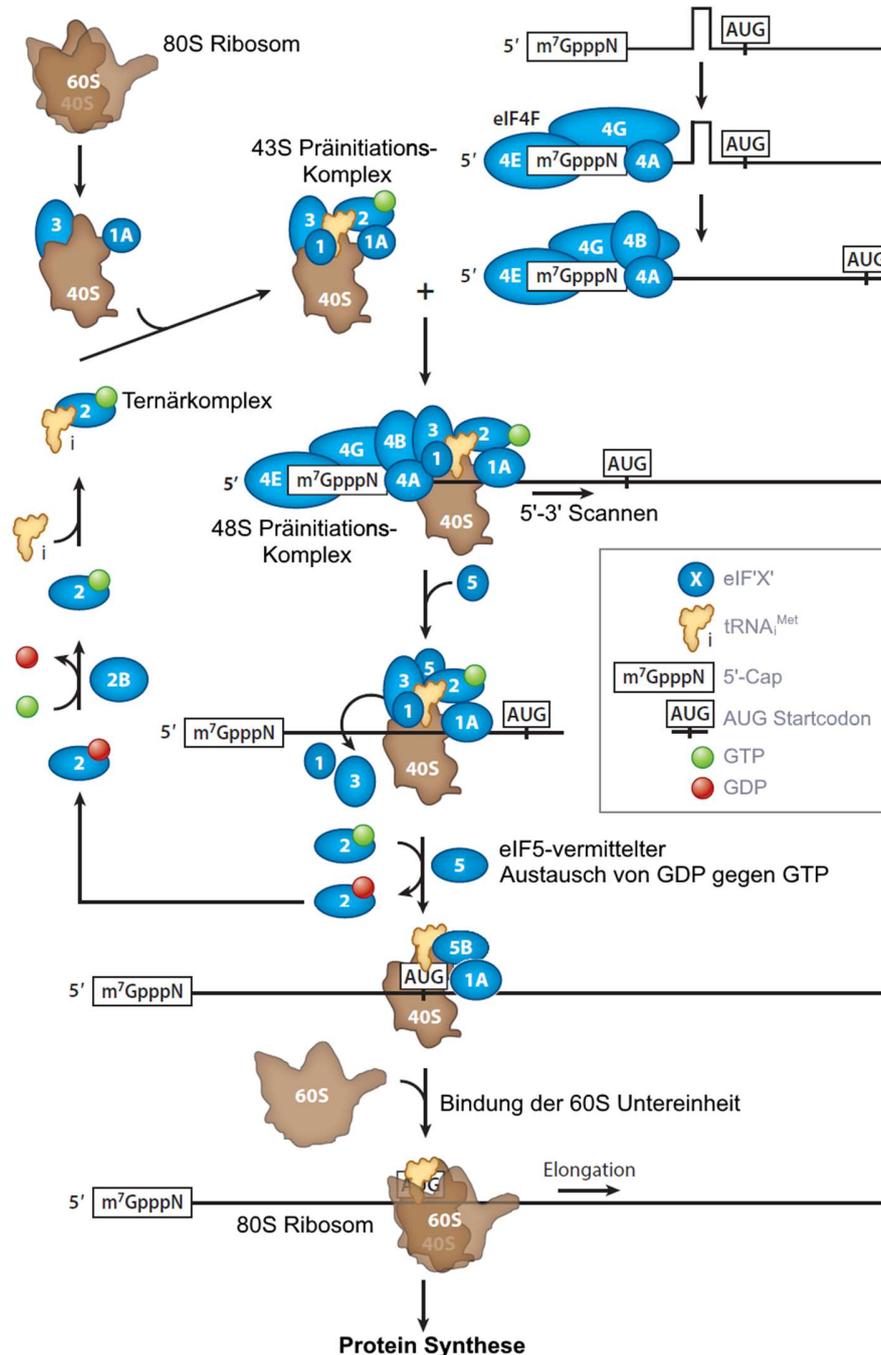


Abbildung 2 Schematisches Modell der Translationsinitiation. Nach der Bildung des 43S Präinitiationskomplexes wird der Komplex von eIF3 über die Interaktion mit eIF4F direkt an die mRNA rekrutiert. Anschließend wird die mRNA in 5' – 3' Richtung gescannt, bis das erste AUG-Startcodon durch das Anticodon von tRNA^{Met} erkannt wird. Darauffolgend wird die 60S ribosomale Untereinheit an die 40S Untereinheit rekrutiert. Der reife 80S Komplex kann nach Rekrutierung der Elongationsfaktoren in die Elongation übergehen (modifizierte Abbildung nach Buffington *et al.* (2014)).

2.5 Stress granules

In lebenden Zellen besteht ein Gleichgewicht zwischen aktiv translatierten und translatorisch ruhenden mRNAs. Unter Stress reduziert sich der Anteil aktiv translaterter mRNAs, zugunsten der Translation von Schutzproteinen und dem Schutz bestehender mRNA-Moleküle. Unter physiologischen Bedingungen wird der Wechsel des Gleichgewichts unter Stress durch Bildung von *stress granules* (SGs) reguliert (Protter und Parker, 2016). SGs sind zytoplasmatische mRNP-Partikel und bestehen aus mRNA und RNA-bindenden Proteinen. SGs werden in eukaryotischen Zellen nach Einwirkung von Hitze, elektromagnetischer Strahlung, sowie osmotischem oder oxidativem Stress erzeugt. Sie dienen dem Schutz von zu Stressbeginn vorhandenen mRNA-Molekülen, indem diese transient der Translation entzogen und in zytosolischen Aggregaten gespeichert wird. Außerdem wird die Synthese von Proteinen, die dem Schutz vor Stresseinflüssen dienen, gefördert, wie zum Beispiel die Synthese von Hitzeschutzproteinen und Chaperonen. Am Ende der Stressphase können in SGs vorliegende mRNAs entweder in *P-bodies* (*processing bodies*) abgebaut oder wieder der Translation zugeführt werden (Bentmann *et al.*, 2013; Kedersha *et al.*, 2005).

Häufig akkumulieren mRNAs mit 5'-*terminal oligopyrimidine*-(5'TOP) Elementen in SGs. Diese mRNAs kodieren primär für ribosomale Proteine und Translationsfaktoren. Durch Aggregation dieser mRNA-Spezies unter Stress wird unter anderem die energieintensive Ribosomen-Biogenese vermieden. Weiterhin befindet sich ein großer Anteil von mRNAs in SGs, die 5'-Cap- und eIF4F-abhängig translatiert werden (Damgaard und Lykke-Andersen, 2011; Hamilton *et al.*, 2006; Spriggs *et al.*, 2010). Einige Transkripte können durch nicht-kanonische Translationsinitiation auch unter Stress translatiert werden (Bornes *et al.*, 2004; Spriggs *et al.*, 2010). Ein Beispiel dafür ist die Synthese des B-Zell-Lymphoma-2- (BCL2) Proteins unter Stress. Die BCL2-mRNA enthält eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) in der 5'-UTR, die die Rekrutierung des Ribosoms unabhängig von der 5'-Cap-Struktur mit einem geringeren Set an Translationsinitiationsfaktoren ermöglicht (Sherrill *et al.*, 2004).

Typischerweise führen durch Umweltstress ausgelöste Signalkaskaden zur Phosphorylierung von eIF2 (Kedersha *et al.*, 1999). Die Phosphorylierung von eIF2 vermindert die Translationsinitiation, da der 48S Präinitiationskomplex nicht komplett

aufgebaut werden kann (Siehe Abschnitt 2.3). Sobald die inhibierten Translationsinitiationskomplexe sich anhäufen, kommt es zur SG-Assemblierung, indem aggregationsaffine Proteine wie G3BP (*ras GTPase-activating protein-binding protein 1*), TIA-1 (*nucleolysin TIA-1 isoform p40*), FMRP und Tristetraprolin an die mRNPs binden (Abbildung 3). Durch weitere Protein-Protein Interaktionen sowie mRNA-Protein Interaktionen, zum Beispiel vermittelt durch PABP, kommt es zur Quervernetzung einzelner mRNPs. Dies führt zur weiteren Aggregation bis zur Bildung reifer SGs (Anderson und Kedersha, 2002; Bentmann *et al.*, 2013; Reineke *et al.*, 2012). Reife SGs erreichen Größen von 100-300 nm und sind damit mikroskopisch sichtbar (Kayali *et al.*, 2005; Wheeler *et al.*, 2016). Nach Beendigung der Stressphase erfolgt ein schneller Abbau der SGs. Die gelagerten Präinitiationskomplexe können anschließend in die Elongationsphase übergehen (Kedersha *et al.*, 1999).

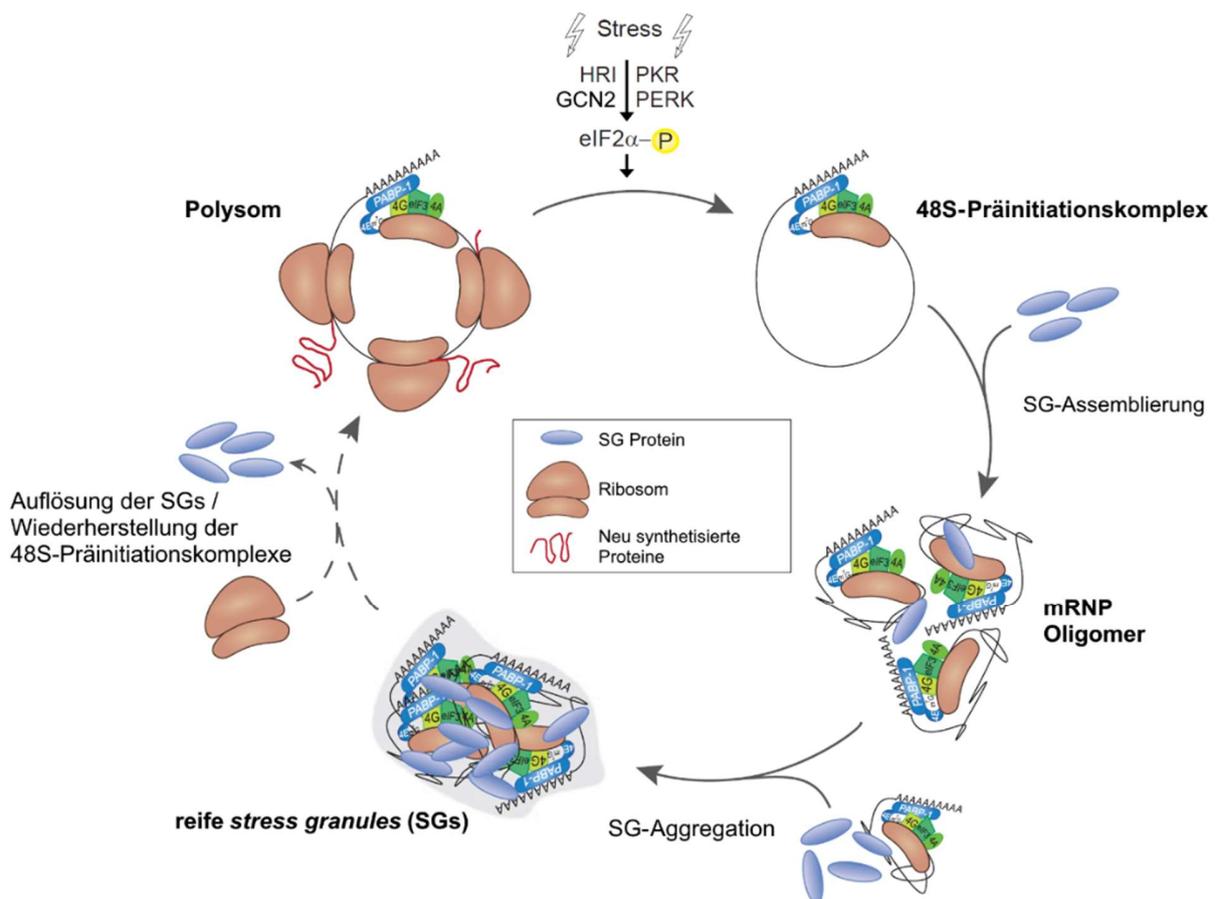


Abbildung 3 Schematisches Modell der SG-Bildung. Unter Stressbedingungen kommt es zum Erliegen der Translation von mRNAs durch Mangel an verfügbaren eIF2-GTP-tRNA_{Met}-Komplexen. Daraufhin häufen sich 48S Präinitiationskomplexe an. Durch die Rekrutierung von aggregationsaffinen Proteinen (SG Proteine) wie TIA-1 kommt es zur Aggregation der mRNPs. Weitere Protein-Protein Interaktionen zwischen den mRNPs führen zur Ausbildung reifer SGs. Nach Ende der Stresssituation bauen sich die SGs wieder ab, und die mRNA wird wieder translatiert (modifizierte Abbildung nach Bentmann *et al.* (2013)).

2.6 Neuronale Translationskontrolle durch mTORC1

In Neuronen wird eIF4E während der Initiation der Translation durch aktivitätsabhängige Kinase-Signalkaskaden reguliert. Eine dieser Kinasen ist mTOR (*mechanistic target of rapamycin*) (Kindler und Kreienkamp, 2012). mTOR vermittelt die Regulation der Translation von dendritisch-lokalisierten mRNAs, wie zum Beispiel die mRNAs für CaMKII α , MAP2 und GluR1 (Gong *et al.*, 2006; Schratt *et al.*, 2004; Slipczuk *et al.*, 2009). Für translationsabhängige Formen synaptischer Plastizität ist mTOR essenziell.

Die Kinase-Domäne von mTOR liegt C-terminal in einer FRB-Domäne (*EKBP12-rapamycin binding*). Flankiert wird der Bereich von zwei FAT-Domänen (*focal adhesion targeting*), wobei die C-terminale Domäne FATC genannt wird. Der N-Terminus besteht aus mehreren HEAT-Domänen (*huntington, elongation factor 3, PR65/A, TOR*). FAT-, FRB- und HEAT-Domänen vermitteln Protein-Protein Interaktionen zur Regulation der mTOR Kinaseaktivität. Durch die Interaktion mit Adapterproteinen kann mTOR Regulatoren der Translation phosphorylieren und diese Proteine so aktivieren oder inaktivieren. Die Kinase mTOR selbst ist nicht in der Lage, an mRNAs zu binden und ist somit auf Adapterproteine angewiesen. Zwei funktionelle mTOR-Komplexe sind bekannt, wobei primär mTORC1 (mTOR Komplex 1) für die Translationsregulation in Neuronen eine Rolle spielt. Im mTORC1-Komplex interagiert mTOR mit RAPTOR (*regulatory associated protein of mTOR*) und mLST8 (*target of rapamycin complex subunit LST8*) (Guertin *et al.*, 2006; Takei und Nawa, 2014; Wang *et al.*, 2012a). Diese Interaktionen vermitteln die Substratspezifität von mTORC1. Die primären Zielproteine des mTORC1-Komplexes sind 4EBP und S6K1 (Hay und Sonenberg, 2004). Die Phosphorylierung der Zielproteine hat einen direkten Einfluss auf die Translation assoziierter mRNAs.

In Neuronen führt die Inhibierung von mTORC1 durch Rapamycin zu einem Verlust der mTORC1-Aktivität und zu einer Störung des Langzeitgedächtnisses (Casadio *et al.*, 1999; Tang *et al.*, 2002). Dies zeigt, dass mTORC1 durch eine Kontrolle der lokalen Translation an Synapsen einen Einfluss auf synaptische Plastizität ausübt. Der genaue Mechanismus, wie mTORC1 die Translation reguliert, ist bis jetzt unbekannt. Möglich wäre eine generelle Förderung der Translation aller oder nur spezifischer dendritischer Transkripte.

Ein primäres Phosphorylierungsziel von mTORC1 ist 4EBP. Das Protein bindet das 5'-Cap-bindende Protein eIF4E und inhibiert damit die Interaktion von eIF4E mit dem Gerüstprotein eIF4G. Dadurch wird die Bildung des eIF4F-Komplexes verhindert, und der 43S Präinitiationskomplex kann nicht an die mRNA rekrutiert werden. Die Bindung von 4EBP an eIF4E wird inhibiert, sobald vier Phosphorylierungsstellen an 4EBP phosphoryliert sind (T37, T46, S65, T70) (Gingras *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung von zwei dieser Positionen erfolgt durch mTORC1 (Thoreen *et al.*, 2009). Im menschlichen Gehirn liegt vorwiegend die 4EBP2-Isoform vor (Banko *et al.*, 2005). Die Aktivierung von Neurotransmitterrezeptoren führt unter anderem zur Phosphorylierung und Aktivierung von mTORC1. Aktiviertes mTORC1 phosphoryliert anschließend 4EBP2 und stimuliert somit die Initiation der Translation (Takei und Nawa, 2014). mRNAs, deren Translation auf diesem Weg verstärkt wird, sind jedoch nicht bekannt. Da die Mehrheit (> 90%) der zellulären mRNAs einer 5'-Cap-abhängigen Translation unterliegen, ist davon auszugehen, dass diese mRNAs auch von 4EBP kontrolliert werden (Graber und Holcik, 2007).

Ein zweites Phosphorylierungsziel von mTORC1 ist die S6 Kinase. Im Nervensystem werden zwei Isoformen, S6K1 und S6K2, exprimiert. S6K1 phosphoryliert das ribosomale Protein S6, eIF4B, eEF2K (*eukaryotic elongation factor 2 kinase*) und FMRP. Dadurch wird sowohl die Initiation wie auch die Elongation stimuliert (Narayanan *et al.*, 2008; Ruvinsky und Meyuhas, 2006; Shahbazian *et al.*, 2006; Tsokas *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2001).

2.7 Makorin RING Finger Protein 1

Makorin Ring Finger Protein 1 (MKRN1) ist ein potenzieller positiver Regulator der Translation in Nervenzellen. Dort interagiert MKRN1 mit PABP. Das Gerüstprotein PABP besitzt verschiedenen Funktionen im mRNA-Metabolismus (Kuhn und Wahle, 2004; Mangus *et al.*, 2003). Durch die Interaktion von PABP mit eIF4G und der Bindung von PABP an den poly(A)-Schwanz von mRNAs, wird die mRNA zirkularisiert. Dies fördert die Initiation und die Termination der Translation. Die Zirkulierung schützt zusätzlich beide Enden der mRNA vor der Degradation. Weiterhin stimuliert zirkulierte mRNA die Rate des Ribosomen-Recyclings (Bernstein und Ross, 1989; Imataka *et al.*, 1998; Ivanov *et al.*, 2016; Kahvejian *et al.*, 2001; Sonenberg und Hinnebusch, 2009a; Tarun und Sachs, 1996; Wilusz *et al.*, 2001). Zusätzlich dient PABP als Ankerpunkt für weitere Proteine, die regulatorisch an der Balance aus Translation und Degradation von mRNA beteiligt sind (Brook und Gray, 2012). In Neuronen ist PABP in dendritisch lokalisierten mRNA-Komplexen anzutreffen, was die Beteiligung von PABP am dendritischen mRNA-Metabolismus nahelegt (Brendel *et al.*, 2004; Krichevsky und Kosik, 2001; Wang *et al.*, 2005).

MKRN1 besitzt zwei Isoformen, die aus alternatives Spleißen und differentieller Polyadenylierung hervorgehen (Abbildung 4). Die lange Isoform, im folgenden MKRN1-long genannt, zeigt E3 Ubiquitin-Ligase-Aktivität und reguliert die Ubiquitylierung von hTERT (*telomerase reverse transcriptase*) (Kim *et al.*, 2005), p53 und p21 (Lee *et al.*, 2009a) und hat damit Einfluss auf die Telomerlänge, Zellzykluskontrolle und Apoptose. Im Vergleich zur kurzen Isoform ist MKRN1-long niedrig in Zellen konzentriert. Dies ist vermutlich auf Autoubiquitinierung von MKRN1-long und der anschließenden Degradierung zurückzuführen. MKRN1s, die kurze Isoform, wurde erstmalig durch Miroci *et al.* (2012) entdeckt und beschrieben. MKRN1s ist die im Gehirn der Ratte primär exprimierte Isoform. Strukturell besteht MKRN1s aus drei Zinkfinger Domänen vom Typus C₃H (Cys-Cys-Cys-His), einem PAM2-Motiv (*PABC recognition motif 2*), einem MKRN-typischen Zinkfinger (MTZF) und einer unvollständigen C₃HC₄-RING Domäne (RF Δ CC).

Diese besitzt keine Ubiquitin-Ligaseaktivität. Zudem fehlt der vierte Zinkfinger. Die C₃H-Zinkfinger binden möglicherweise an mRNA (Cano *et al.*, 2010; Fu und Blackshear, 2017). Die Interaktion von MKRN1s mit PABP wird über das PAM2-Motiv vermittelt, welches den PAM2-Motiven von PAIP1 und -2 (*polyadenylate-binding protein-interacting protein 1/2*) und Ataxin-2 ähnlich ist. PABP interagiert mit MKRN1s über die RRM-Domänen (*RNA recognition motifs*) und der MLLE-Domäne (*mademoiselle*) im C-Terminus des Proteins, wobei die Interaktion mit RRM1+2 am stärksten ist. MKRN1 wird in allen Geweben der Ratte exprimiert. Die stärkste Expression von MKRN1 erfolgt im Gehirn und im Hoden. In hippocampalen Neuronen ist MKRN1s im Zellkern, im Zellkörper und in Dendriten lokalisiert.

Im Weiteren untersuchten Miroci *et al.* (2012) die potenzielle Funktion von MKRN1s im RNA-Metabolismus. So konnte in kortikalen Neuronen gezeigt werden, dass rekombinant exprimiertes MKRN1s in Komplexen mit dendritischen mRNAs, wie MAP2- und Arc-mRNA, vorliegt. Durch Rekrutierung von MKRN1s an eine Reporter-mRNA konnte gezeigt werden, dass MKRN1s die Translation stimuliert, ohne dabei die Stabilität der Reporter-mRNA zu beeinflussen. Die Beobachtung das MKRN1s, im Hippocampus nach elektrischer Stimulation, an aktivierte Synapsen akkumuliert deutet darauf hin, dass MKRN1s synaptischen Plastizität beeinflusst.

Die Fähigkeit von MKRN1s zur Translationsstimulation, der Assoziation mit dendritisch lokalisierter mRNA und der aktivitätsabhängigen Akkumulation an aktivierte Synapsen *in vivo* deutet darauf hin, dass MKRN1s eine Funktion als positiver Regulator der Proteinsynthese in Dendriten besitzt. Über die Interaktion von MKRN1s mit PABP, vermittelt und/oder beeinflusst MKRN1s vermutlich die Interaktion von PABP mit Regulatoren der Translation.

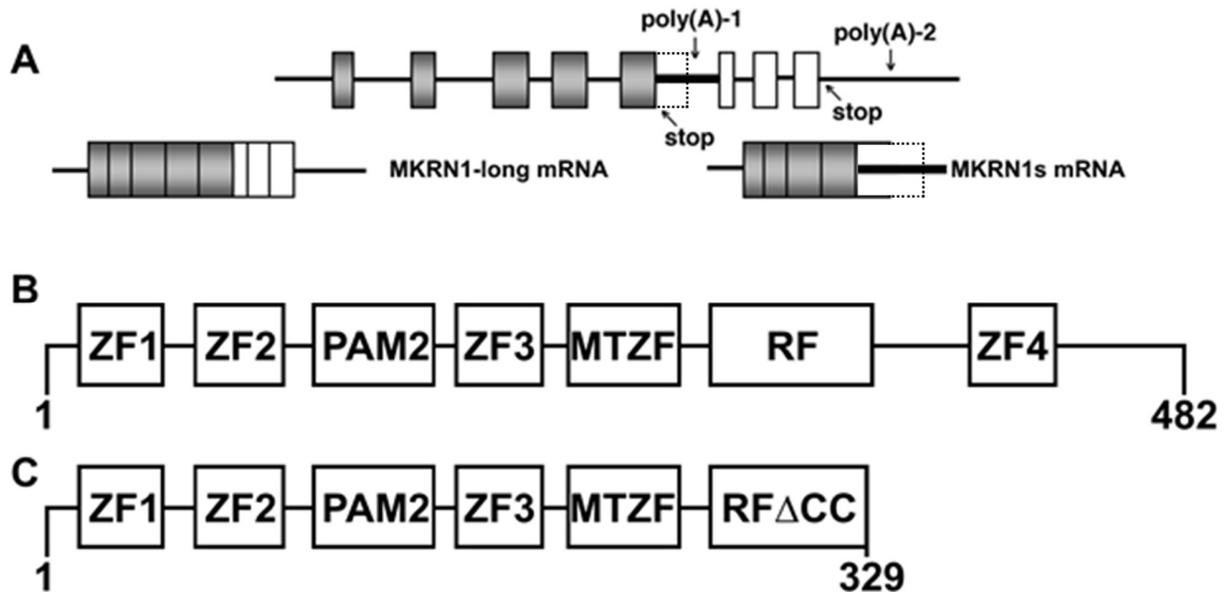


Abbildung 4 MKRN1. A) Schematische Darstellung des humanen *MKRN1* Gens bestehend aus 8 Exons (graue und weiße Boxen). Durch alternatives Spleißen und differenzieller Polyadenylierung der entsprechenden prä-mRNA entstehen zwei unterschiedlich lange mRNAs. Die 3'UTR beider mRNAs sind dadurch jeweils unterschiedlich. B) *MKRN1-long* besteht aus vier Zinkfingern des Typus C₃H (ZF), einem PAM2-Motiv, einem MTFZ und einer RING-Finger Domäne (RF). C) Im Vergleich zu *MKRN1-long* fehlt *MKRN1s* der vierte Zinkfinger und die letzten sechs Aminosäuren der RF-Domäne. (modifizierte Abbildung nach Miroci *et al.* (2012)).

3 Ziel der Arbeit

Diese Arbeit soll dazu beitragen, die Wirkungsweise von *MKRN1s* im RNA-Metabolismus in Neuronen besser zu verstehen. Dabei wird insbesondere die Bedeutung einzelner Domänen für die Stimulation der Translation durch *MKRN1s* untersucht. Des Weiteren sollen neue Interaktionspartner von *MKRN1s* identifiziert werden. Darüber hinaus soll die Bedeutung der einzelnen identifizierten Interaktionen für die Kontrolle der Translation untersucht werden. Die durchgeführten Untersuchungen dienen dem besseren Verständnis, wie *MKRN1s* die Translation assoziierter mRNA stimuliert und in welchen Schritt der Translation *MKRN1s* regulatorisch beteiligt ist.

4 Materialien

4.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Soweit nicht weiter angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien von Carl Roth GmbH & Co. KG (Karlsruhe, Deutschland), Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) und ThermoFisher Inc. (Waltham, USA) bezogen. Alle Verbrauchsmaterialien wurden von Greiner Bio-One International GmbH (Kremsmünster, Österreich), Sarstedt AG & Co. KG (Nürnbrech, Deutschland) und ThermoFisher Inc. (Waltham, USA) bezogen.

4.2 Geräte

Tabelle 1 Liste der genutzten Geräte

Geräte	Hersteller
Analysewaage	Sartorius AG (Göttingen, Deutschland)
Autoklav	MediTech Service GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Bunsenbrenner	Integra Biosciences (Zizers, Schweiz)
ChemiDoc MP	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Elektrophorese Apparatur für Agarosegele	Owl Separation Systems Inc. (Portsmouth, USA)
Elektrophorese Apparatur für Polyacrylamidgele	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Fluoreszenz Mikroskop Zellkultur	Carl Zeiss Microscopy GmbH (Jena, Deutschland)
Heizblock	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG (Bielefeld, Deutschland)
Inkubator Bakterien	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Inkubator für eukaryotische Zellen	Panasonic Biomedical Sales Europe (Etten-Leur, Niederlande)
Konfokal Mikroskop Leica SP5	Leica Microsystems Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Laborwaage	Sartorius Lab Instruments GmbH & Co. KG (Goettingne, Deutschland)
Magnetrührer	IKA®-Werke GmbH & Co. KG (Staufen, Deutschland)
Magnetständer	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
Mikroplattenluminometer	Berthold Technologies GmbH & Co. KG (Bad Wildbad, Deutschland)
Netzteil für Elektrophorese Apparatur	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA) Amersham plc (Little Chalfont, UK)
PCR Thermal Cyclers	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
pH-Meter	Xylem Analytics GmbH & Co. KG (Weilheim, Deutschland)
Pipettierhilfen (elektrisch / manuell)	INTEGRA Biosciences Corp. (Hudson, USA) Gilson Inc. (Middleton, USA)
Rotator	Cole-Parmer Ltd. (Staffordshire, UK) BioSan (Riga, Lettland)
Schüttelinkubator	Infors AG (Bottmingen, Schweiz)
Sicherheitswerkbank	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
Spektralphotometer	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) BioTek Instruments Inc. (Winooski, USA)
Stereomikroskop	Leica Microsystems Vertrieb GmbH (Wetzlar, Deutschland)
Vortexer	Heidolph Instruments GmbH & CO. KG (Schwabach, Deutschland)

Wasserbäder	GFL Gesellschaft für Labortechnik mbH (Burgwedel, Deutschland)
Western Blot Transferkammer	Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)
Zentrifugen	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland) DuPonts Instruments (Newtown, USA)

4.3 Puffer und Lösungen

Tabelle 2 Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Lösungen

Puffer / Lösung	Zusammensetzung
modifizierter RIPA Puffer (mRIPA)	Aqua bidest 50 mM HEPES 150 mM NaCl 1 % (v/v) NP-40 0,5 % (w/v) Na-Desoxycholat 0,05 % (w/v) SDS 1 mM EDTA 1x complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail pH 7,6
Versene	Aqua bidest 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 KH ₂ PO ₄ 0,5 mM EDTA pH 7,4
1x Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	Aqua bidest 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 KH ₂ PO ₄ pH 7,4
5x Laemmli Probenpuffer (LPP)	Aqua bidest 0,5 M DTT 10 % (w/v) SDS 0,4 M Tris-HCl pH 6,8 50 % (v/v) Glycerin Bromphenolblau zum Anfärben
1x RNA-Probenpuffer	Aqua bidest 60 % (v/v) Glycerin 0,5 x TBE pH 8,7 Bromphenolblau zum Anfärben
PBST	Aqua bidest 137 mM NaCl 2,7 mM KCl 10 mM Na ₂ HPO ₄ 1,76 KH ₂ PO ₄ 0,3 % (v/v) Tween-20 pH 7,4
SDS-PAGE-Laufpuffer	Aqua bidest 192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1 % (w/v) SDS
Transferpuffer	Aqua bidest 20 % (v/v) Methanol 192 mM Glycin 25 mM Tris 0,05 % (w/v) SDS

Materialien

2x BES-gepufferte Salzlösung (BBS)	Aqua bidest 50 mM BES 280 mM NaCl 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ pH 6,96
Poly-L-Lysin Boratpuffer	Aqua bidest 100 mM Borsäure 0,1 mg/ml Poly-L-Lysin pH 8,5
CaCl ₂ Puffer	Aqua bidest 2,5 M CaCl ₂
5x KCM	Aqua bidest 0,5 M KCl 0,15 M CaCl ₂ 0,25 M MgCl ₂
1x TAE Puffer	Aqua bidest 40 mM Tris 20 mM Essigsäure 1 mM EDTA pH 8,0
1x TBE Puffer	Aqua bidest 90 mM Tris 90 mM Borsäure 2 mM EDTA pH 8,3
Lysepuffer Cap-Affinitätsaufreinigung	Aqua bidest 50 mM HEPES 120 mM NaCl 1 mM EDTA 0,5 % (v/v) NP-40 5 % (v/v) Glycerin 1x complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail pH 7,6
Puffer A + BSA	Aqua bidest 50 mM HEPES 100 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin 0,5 mM DTT 0,1 mg/ml BSA pH 7,6
2x GTP-Puffer	Aqua bidest 100 mM HEPES 200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTT 0,5 mM GTP 2x complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail pH 7,6
2x m ⁷ GP ₃ G -Puffer	Aqua bidest 100 mM HEPES 200 mM NaCl 5 mM MgCl ₂ 10 % (v/v) Glycerin 1 mM DTT 0,5 mM m ⁷ GP ₃ G 2x complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail pH 7,6

Materialien

Puffer A + GTP	Aqua bidest 50 mM HEPES 100 mM NaCl 1 mM EDTA 10 % (v/v) Glycerin 0,5 mM DTT 0,1 mM GTP 1x complete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail pH 7,6
6 % Trenngel	Aqua bidest 6 % (w/v) Acrylamid 0,375 M Tris 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,004 % (v/v) TEMED pH 8,8
8 % Trenngel	Aqua bidest 8 % (w/v) Acrylamid 0,375 M Tris 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,004 % (v/v) TEMED pH 8,8
10 % Trenngel	Aqua bidest 10 % (w/v) Acrylamid 0,375 M Tris 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,004 % (v/v) TEMED pH 8,8
12 % Trenngel	Aqua bidest 12 % (w/v) Acrylamid 0,375 M Tris 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,004 % (v/v) TEMED pH 8,8
Sammelgel	Aqua bidest 6 % (w/v) Acrylamid 0,125 M Tris 0,1 % (w/v) SDS 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat 0,01 % (v/v) TEMED pH 6,8
Blockierpuffer Immunocytochemie	10 % (v/v) Pferdeserum in 1x PBS
Permeabilisierungspuffer Immunocytochemie	0,2 % (v/v) Triton-X100 in 1x PBS
TSB	Aqua bidest 1x LB pH 6,1 10 % (v/v) PEG 3350 5 % (v/v) DMSO 0,01 M MgSO ₄ 0,01 M MgCl ₂

LB-Medium	Aqua bidest 10 g/L Trypton 5 g/L Hefeextrakt 10 g/L NaCl pH 7,4 Bei Bedarf: 100 µg/mL Ampicillin 50 µg/mL Kanamycin 15 µg/mL Tetrazyklin
LB-Agar	1x LB-Medium 15 g/L Agar

4.4 Kommerzielle Kits und Zubehör

Tabelle 3 Kommerzielle Kits und Zubehör

Kit / Chemikalie / Material	Hersteller
Amersham Protran 0.45 NC Nitrozellulose Membran	GE Healthcare (Chalfont St Giles, UK)
BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
Dual-Luciferase® Reporter Assay System	Promega Corporation (Fitchburg, USA)
Dynabeads™ Protein G Beads	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Gel Extraction Kit, peqGOLD	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
GFP-Trap®_A Agarose	ChromoTek GmbH (Planegg-Martinsried, Deutschland)
GFP-Trap®_MA magnetische Agarose	ChromoTek GmbH (Planegg-Martinsried, Deutschland)
m ⁷ GP ₃ G (Monomethylated Cap Analog) - Lösung	Jena Bioscience GmbH (Jena, Deutschland)
Maus-IgG-Agarose	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
NucleoBond® Xtra Maxi	MACHEREY-NAGEL GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland)
peqGOLD RNAPure	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Primocin	InvivoGen (San Diego, USA)
RNasin® Plus RNase Inhibitor	Promega Corporation (Fitchburg, USA)
γ-Amino-octyl-GTP Agarose	Jena Bioscience GmbH (Jena, Deutschland)
γ-Aminophenyl-m ⁷ GTP (C10-spacer) Agarose	Jena Bioscience GmbH (Jena, Deutschland)

4.5 Zellkulturmedien

Tabelle 4 Liste der Zellkulturmedien

Zellkulturmedium	Zusammensetzung
Kulturmedium HeLa / HEK293T / NIH3T3 Zellen	DMEM 10 % FCS
Einfriermedium HeLa / HEK293T / NIH3T3 Zellen	DMEM 10 % FCS 10 % (v/v) DMSO
Plattiermedium für primäre Neuronen	MEM 10 % Pferdeserum 0,6 % D-Glucose

Kulturmedium für primäre Neurone	Neurobasal™ Medium 2 % B27 Serum Zusatz 0,5 mM L-Glutamin 0,1 mg/ml Primocin 25 µM Glutamat (Nur bei Aussaat zugegeben)
----------------------------------	---

4.6 Antikörper

Tabelle 5 Liste primärer Antikörper

Antikörper	Host-Spezies	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Anti-FLAG® M2	Maus	1:1000	#200472	Stratagene (La Jolla, USA)
Anti-Myc tag antibody	Kaninchen	1:1000	ab9106	abcam PLC (Cambridge, UK)
Ataxin-2	Ratte	1:10	Sonderanfertigung	AG Kindler
eIF2C2	Maus	1:1000	H00027161-M01	Abnova (China)
eIF4A (C32B4)	Kaninchen	1:1000	#2013	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)
eIF4E	Kaninchen	1:1000	#2067	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)
eIF4G	Kaninchen	1:1000	#2498	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)
GAPDH	Maus	1:20000	AM4300	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
GCN1L1	Kaninchen	1:2000	A301-843A	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, USA)
hnRNP H	Kaninchen	1:5000	A300-511A	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, USA)
IMP1	Kaninchen	1:1000	#8482	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)
LARP1	Kaninchen	1:2000	A302-087A	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, USA)
LARP1	Kaninchen	1:1000	PA5-35911	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
LARP1	Kaninchen	1:1000	#14763	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)
LARP1	Kaninchen	1:2000	A302-088A	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, USA)
LARP1 (Oxford)	Kaninchen	1:2000	Aliquot zur Verfügung gestellt durch AG Blagden	Department of Oncology - University of Oxford (Oxford, England)
MKRN1	Kaninchen	1:1000	HPA000567	Atlas Antibodies AB (Bromma, Schweden)
MKRN1	Kaninchen	1:1000	ab58768	abcam PLC (Cambridge, UK)
MKRN1	Kaninchen	1:2000	A300-990A	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, USA)
MKRN1	Maus	1:1000	ab119096	abcam PLC (Cambridge, UK)
MKRN1	Ziege	1:1000	NBP2-27545	Novus Biologicals (Littleton, USA)
MKRN1	Maus	1:1000	NBP2-45816	Novus Biologicals (Littleton, USA)
MKRN1	Kaninchen	1:1000	PA5-30480	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
MKRN1	Kaninchen	1:1000	GTX106459	GeneTex Inc. (Alton Pkwy, USA)
MKRN1	Maus	1:1000	H00023608-M01	Abnova (China)
MKRN1	Kaninchen	1:1000	60-673	ProSci Inc. (Poway, USA)
MKRN1	Kaninchen	1:1000	29-841	ProSci Inc. (Poway, USA)

MKRN1	Kaninchen	1:1000	PA5-28461	ThermoFisher Inc. (Waltham, USA)
MKRN1 (Pineda)	Kaninchen	1:5000	Sonderanfertigung vs. GST-hMKRN1s	Pineda Antikörper-Service (Berlin, Deutschland)
PABP	Kaninchen	1:1000	#4992S	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)
Purified anti-GFP Epitope Tag	Maus	1:1000	MMS-118P	Covance Inc. (Princeton, USA)
SMG1	Kaninchen	1:1000	#9149	Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)
UPF1	Kaninchen	1:2000	A301-902A	Bethyl Laboratories Inc. (Montgomery, USA)
α Tubulin	Maus	1:5000	ab7291	abcam PLC (Cambridge, UK)

Tabelle 6 Sekundäre Antikörper für Western Blot

Antikörper	Host-Spezies	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
IRDye® 800CW Anti-Kaninchen IgG (H + L)	Ziege	1:15.000	P/N 925-32211	LI-COR Inc. (Lincoln, USA)
IRDye® 680RD Anti-Maus IgG (H + L)	Ziege	1:15.000	P/N 925-68070	LI-COR Inc. (Lincoln, USA)
Anti-Ratte IgG (H+L)-HRPO,	Ziege	1:10.000	112-035-062	Jackson ImmunoResearch Inc. (West Grove, USA)
Anti-Kaninchen IgG (H+L)-HRPO	Ziege	1:10.000	111-035-144	Jackson ImmunoResearch Inc. (West Grove, USA)
Anti-Maus IgG (H+L)-HRPO	Ziege	1:10.000	115-035-062	Jackson ImmunoResearch Inc. (West Grove, USA)
Anti-Ziege IgG (H+L)-HRPO	Esel	1:10.000	705-035-003	Jackson ImmunoResearch Inc. (West Grove, USA)

Tabelle 7 Sekundäre Antikörper für Immunfluoreszenz

Antikörper	Host-Spezies	Verdünnung	Katalognummer	Hersteller
Anti-Ratte IgG (H+L) Alexa Fluor 546	Ziege	1:200	A-11081	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor 546	Ziege	1:200	A-11035	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Anti-Ziege IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Esel	1:200	A-11055	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Anti-Kaninchen IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Ziege	1:200	A-11034	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
Anti-Maus IgG (H+L) Alexa Fluor 488	Ziege	1:200	A-11001	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

4.7 Enzyme

Tabelle 8 Liste der verwendeten Enzyme

Enzym	Hersteller
Ambion™ RNase I, cloned, 100 U/ μ L	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
FastDigest Restriktionsenzyme	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
<i>Pfu</i> DNA Polymerase	Promega Corporation (Fitchburg, USA)
T4 DNA Ligase (5 U/ μ L)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)
Trypsin (2.5%), ohne Phenolrot (10x)	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

4.8 Plasmide

hMKRN1s-Insertionen enthalten den Einzelnukleotid-Polymorphismus rs2272095 (Sherry *et al.*, 2001). Dies hat den Austausch von Valin V243 mit Leucin zur Folge.

Tabelle 9 eukaryotische Expressionsvektoren

Name des Vektors	Grundgerüst	Insertion kodierend für	Quelle
pEGFP-C3	pEGFP-C3	EGFP	AG Kindler
pN22-Flag3-C3	pN22-Flag3-C3	N22-Flag3	AG Kindler
pinFiRein-BoxB16	pinFiRein-BoxB16	PhoLuc, RenLuc	AG Kindler
pN22-Flag3-rShank3 ₁₋₂₉₀	pN22-Flag3-C3	rShank3 ₁₋₂₉₀	AG Kindler
pN22-hDDX6	pN22-C3	hDDX6	AG Kindler
pinF-boxB16X	pinF-boxB16X	PhoLuc, RenLuc	AG Kindler
pGEX-2T	pGEX-2T	GST	AG Kindler
pFiRein	pFiRein	PhoLuc, RenLuc	AG Kindler
pinGEiFiRein-BoxB16	pinF-boxB16X	PhoLuc, RenLuc, GST	Generiert: PCR + Ligation
pinLARP1-X1	pinF-boxB16X	LARP1 ₁₋₁₀₉₆	Generiert: PCR + Ligation
pEGFP-LARP1-X1	pEGFP-C3	LARP1 ₁₋₁₀₉₆	Generiert: PCR + Ligation
pEGFP-LARP1-X1-A	pEGFP-C3	LARP1 ₁₋₃₂₅	Generiert: PCR + Ligation
pEGFP-LARP1-X1-B2	pEGFP-C3	LARP1 ₃₁₆₋₇₃₇	Generiert: PCR + Ligation
pEGFP-LARP1-X1-C	pEGFP-C3	LARP1 ₇₂₇₋₁₀₉₆	Generiert: PCR + Ligation
473	pEGFP-C2	rPABP ₂₋₆₃₆	AG Mohr
479	pEGFP-C2	rPABP ₂₋₁₈₁	AG Mohr
480	pEGFP-C2	rPABP ₈₂₋₂₇₆	AG Mohr
481	pEGFP-C2	rPABP ₁₇₉₋₃₇₀	AG Mohr
482	pEGFP-C2	rPABP ₃₇₁₋₆₃₆	AG Mohr
398	pEGFP-C3	hMKRN1s ₁₋₃₂₉	AG Mohr
464	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ90-108}	AG Mohr
467	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ109-128}	AG Mohr
468	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ194-213}	AG Mohr
470	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ161-176}	AG Mohr
471	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ177-193}	AG Mohr
465	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ214-232}	AG Mohr
449	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s ₁₋₃₂₉	AG Mohr
472	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s _{Δ90-108}	AG Mohr
473	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s _{Δ109-128}	AG Mohr
474	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s _{Δ194-213}	AG Mohr
475	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s _{Δ161-176}	AG Mohr
476	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s _{Δ177-193}	AG Mohr
477	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s _{Δ214-232}	AG Mohr
495	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ1-18}	Generiert: PCR + Ligation
496	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ19-36}	Generiert: PCR + Ligation
497	pEGFP-C3	hMKRN1s _{Δ37-54}	Generiert: PCR + Ligation

Materialien

498	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 55-72	Generiert: PCR + Ligation
499	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 73-89	Generiert: PCR + Ligation
500	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 129-144	Generiert: PCR + Ligation
501	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 145-160	Generiert: PCR + Ligation
502	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 233-252	Generiert: PCR + Ligation
503	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 253-272	Generiert: PCR + Ligation
504	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 273-292	Generiert: PCR + Ligation
505	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 293-312	Generiert: PCR + Ligation
506	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 313-329	Generiert: PCR + Ligation
519	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 161-193	Generiert: PCR + Ligation
520	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 1-82	Generiert: PCR + Ligation
521	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 83-160	Generiert: PCR + Ligation
522	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 161-235	Generiert: PCR + Ligation
523	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 236-329	Generiert: PCR + Ligation
524	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 1-50	Generiert: PCR + Ligation
525	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 279-329	Generiert: PCR + Ligation
526	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 61-108	Generiert: PCR + Ligation
527	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 61-232	Generiert: PCR + Ligation
537	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 55-72 161-193	Generiert: PCR + Ligation
539	pEGFP-C3	hMKRN1sC61A C69A C75A	Generiert: PCR + Ligation
540	pEGFP-C3	hMKRN1sF172A	Generiert: PCR + Ligation
541	pEGFP-C3	hMKRN1sC61A C69A C75A F172A	Generiert: PCR + Ligation
545	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 51-89	Generiert: PCR + Ligation
546	pEGFP-C3	hMKRN1s Δ 151-203	Generiert: PCR + Ligation
507	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 1-18	Generiert: PCR + Ligation
508	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 19-36	Generiert: PCR + Ligation
509	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 37-54	Generiert: PCR + Ligation
510	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 55-72	Generiert: PCR + Ligation
511	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 73-89	Generiert: PCR + Ligation
512	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 129-144	Generiert: PCR + Ligation
513	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 145-160	Generiert: PCR + Ligation
514	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 233-252	Generiert: PCR + Ligation
515	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 253-272	Generiert: PCR + Ligation
516	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 273-292	Generiert: PCR + Ligation
517	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 293-312	Generiert: PCR + Ligation
518	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 313-329	Generiert: PCR + Ligation
528	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 161-193	Generiert: PCR + Ligation
529	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 1-82	Generiert: PCR + Ligation
530	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 83-160	Generiert: PCR + Ligation
531	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 161-235	Generiert: PCR + Ligation
532	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 236-329	Generiert: PCR + Ligation
533	pN22-Flag3-C3	hMKRN1s Δ 1-50	Generiert: PCR + Ligation

534	pN22-Flag3-C3	hMKRN1 _{SΔ279-329}	Generiert: PCR + Ligation
535	pN22-Flag3-C3	hMKRN1 _{SΔ61-108}	Generiert: PCR + Ligation
536	pN22-Flag3-C3	hMKRN1 _{SΔ61-232}	Generiert: PCR + Ligation
538	pN22-Flag3-C3	hMKRN1 _{SΔ55-72 161-193}	Generiert: PCR + Ligation
542	pN22-Flag3-C3	hMKRN1 _{SC61A C69A C75A}	Generiert: PCR + Ligation
543	pN22-Flag3-C3	hMKRN1 _{SF172A}	Generiert: PCR + Ligation
544	pN22-Flag3-C3	hMKRN1 _{SC61A C69A C75A F172A}	Generiert: PCR + Ligation
LARP1 CRISPR/Cas9 KO Plasmid*			Santa Cruz sc-404097
LARP1 HDR Plasmid**			Santa Cruz sc-404097-HDR

* Mix aus drei Plasmiden kodierend für je eine von drei *guide*-RNAs

** Mix aus drei Plasmiden mit homologer Sequenz für je eine von drei Schnittstellen

Tabelle 10 *guide* RNA LARP1 CRISPR/Cas9 KO Plasmide

Guide RNA Sequenz	Zielgen	Ziel-Exon
ACCTTTGATCTCTCCGCGAT	LARP1	5
TCTTCTTCTGCCCGCCTCGC	LARP1	4
GCTGTCCTAAACAGCGCAA	LARP1	2

4.9 siRNA

Die siRNAs wurden mit RNase-freien sterilem Wasser auf eine Konzentration von 10 µM eingestellt.

Tabelle 11 siRNA Liste

Name der siRNA	Sequenz (5' – 3')	Hersteller	Katalognummer
Kontroll-siRNA #1	-Firmengeheimnis-	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	1027280
Kontroll-siRNA #2	UGGUUUACAUGUCGACUAA	Dharmacon Inc. (Lafayette, USA)	D-001910-01-05
siUPF1 #1	CAGCGGAUCGUGUGAAGGAA	Dharmacon Inc. (Lafayette, USA)	J-011763-05
siUPF1 #2	GCAGCCACAUUGUAAAUCA	Dharmacon Inc. (Lafayette, USA)	J-011763-07
siUPF1 #3	TGGCGTCATCATTGTGGGCAA	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	SI03120432
siUPF1 #4	CACCATGAGCGTGGAGGCGTA	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	SI00045598
siLARP1 #1	CAAGCGCCAGATTGAATACTA	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	SI03157350
siLARP1 #2	TCCATGACTCTTGACATCCTA	Qiagen GmbH (Hilden, Deutschland)	SI04235196
siPABP	CCUAAAUGAUCGCAAAGUATT	Ambion (Waltham, USA)	S25665

4.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins Genomics GmbH (Ebersberg, Deutschland) bezogen. Die Oligonukleotide wurden mit sterilen und doppelt-destilliertem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt.

Tabelle 12 Sequenzierungsprimer

Sequenzierungsprimer	Sequenz (5' – 3')
BGH-rev1	TAGAAGGCACAGTCGAGG
BGH-rev2	GGCAAACAACAGATGGCTGG
CMV1	TGTCGTAACAACCTCCGCCCC
EGFP-1-sense	GTCCGCCCTGAGCAAAGACC
FlyLuc-as	CAGCGGATAGAATGGCGCC
FlyLuc-s	GAGATCCTCATAAAGGCCAAG
GEX-seq-as	GTGTCAGAGGTTTTACCGTC
GEX-seq-s	GGTGGCGACCATCCTC
LARP1-int-as	ATGGCCGAGGCCTCTT
LARP1-int-s	AAGAGGCCTCGGCCAT
LARP1-seq2-as	ACGGAAGGAAGCCCC
LARP1-seq2-s	GACCAGGATGAGACATCGAGT
LARP1-seq3-as	GATGGAAGCAGTACGGGG
LARP1-seq3-s	ATGCCTCGAAAAAGAAAGACA
RenLuc-as	CAAATCGTTCGTTGAGCGAGT
RenLuc-s	CCCACCACTGCGGACCAG
SVPA2	ATTCATTTTATGTTTCAGGTTTCAG
T7-sense	AATACGACTCACTATAGG

Tabelle 13 Primer für Subklonierungen

Name des Primers	Sequenz (5' – 3')	Zum Subklonieren von:
EMCV-IRES sense	TCTAGTACCGGTGCGCCCTCTCCCTCCCCCCCCCTAACG TACTGGCCGAAGCCGCTTG	EMCV-IRES
EMCV-IRES antisense	TTGAGATGCATTCCATGGTTGTGGCAAGATTATCATCGTG TTTTTCAAAGGAAAACACGTCCCCGTGGTTCCGGGGGGC CTAGACGTTT TTTAACCTCG	EMCV-IRES
T7-GST-sense	AAAAAAGGTTACCGCCGCCACCATGGCTAGCATGACTGG TGGACAGCAAATGGGTATGTCCCCTATACTAGGTTATTG G	GST
GST-HA-as	TTTTTACCGGTTACGCTAGTTAGCTAGTTAGTCAAGCGT AATCTGGAACATCGTATGGGTAACGCGGAACCAGATCCG ATTTTG	GST
Brücken-Oligo	GCATGGTTACCAAAGGGCTCGAGAAAGGGGGCGCGCCA AAGGGGTTACCTACG	Eco91I Schnittstelle
495	GCATCTCGAGATGGCGGAGGCTGCAACT	hMKRN1s
385A	GCATGAATTCTCACTTTATGATCTTGCTCTCAAATTG	hMKRN1s
EGFP-LARP1-X1-A-s	CAGATCTCGAGATGGCCACTCAGGTGGAGCCG	LARP1
LARP1-EGFP-as	ACTGCAGAATTCTCACTTTCCCAAAGTCTGTGTGTTTCG	LARP1

Tabelle 14 Primer für PCR-erzeugte Insertionen

Name des Primers	Sequenz (5' – 3')	Für Insertion in Vektor:
100	GCATTCTCGAGGACAGTCCGTATAGTGTAGTGTG	520/529
101	CACCCAGTCTCTGAACCTGCAGAGAGGTCATGCGAGTAGCGA	521/530
102	TCGCTACTCGCATGACCTCTCTGCAGGTTTCAGAGGACTGGGTG	521/530

Materialien

103	CCACACATGTCACAAGAATCTCCTCTACAGTTGCAAAGTTTGAATT TC	522/531
104	GAAATTCAAACTTTGCAACTGTAGGAGGAGATTCTTGTGACATGTGT GG	522/531
105	GCATGAATTCTCAGTGGAGATACACACAGTTCTCCC	523/532
106	GCATTCTCGAGAGCGGCGGCGGCTGGACTAA	523/532
107	GCATGAATTCTCACATGTCCTTGCTGCGCTGCAC	525/534
108	CTTCTTCTGTTTCAATGGTTTGCTGGTGACCTGTTTAGTCCAGCCG	526/535
109	CGGCTGGACTAAACAGGTCACCAGCAAACCATTGAAACAGGAAGAA G	526/535
110	CCACACATGTCACAAGAATCTCCGGTGACCTGTTTAGTCCAGCCG	527/536
111	CGGCTGGACTAAACAGGTCACCGGAGATTCTTGTGACATGTGTGG	527/536
568	GCATCTCGAGGCAGCGGCGACGGCGGC	495/507
569	GCATCTCGAGATGGCGGAGGCTGCAACTCCCGGAACAACAGCCAC AACATCAGGAGCAGGAGCGCCGTCCCTGGGGGCGGG	496/508
570	CATCAGGAGCAGGAGCGCCGTCCCTGGGGGCGGG	496/508
571	GTGACCTGTTTAGTCCAGGCGGTGACT	497/509
572	ATCCCCACAGTCACCGCTGGACTAAACAGGTCAC	497/509
573	GAGTAGCGACAGTTGTCGCCGCCGCCGCTGCCGTC	498/510/537/538
574	GACGGCAGCGGCGGCGGCGACAACACTGTCGCTACTC	498/510/537/538
575	CGCTAAAATACTTGCATCCTTCTTACAAACCC	499/511
576	GGGTTTGTAAAGGAAGGATGCAAGTATTTTCAGCG	499/511
577	CTCAGCTTCGCCTGTATTAAGGGATGACTTTGTAG	500/512
578	CTACAAAGTCATCCCTTAATACAGGCGAAGCTGAG	500/512
579	CAGTCTCTGAACCTGCCATTTCAACAAGTGGTC	501/513
580	GACCACTTGTTGAAATGGCAGGTTGAGAGGACTG	501/513
581	GATTTGATATGCTGCGAGTGAGATACACACAGTT	502/514
582	AACTGTGTGTATCTCCACTCGCAGCATATCAAATC	502/514
583	GTCCTTGCTGCGCTGCACTCTCTGGGCAGCATCCAT	503/515
584	ATGGATGCTGCCAGAGAGTGACGCGCAGCAAGGAC	503/515
585	CGGCGCTCACTGGGGTTGGCAAATGAGAGCTCCAT	504/516
586	ATGGAGCTCTCATTTGCCAACCCAGTGAGCGCCG	504/516
587	CTCCACTTGCGAATGCAGGCTTTCTCATAGACCAC	505/517
588	GCATGAATTCTCACTTTATGATCTTGTCTCAAATTGCTTAGCACTC CTCCACTTGCGAATGCAGGCTTTCTCATAGACCAC	505/517
589	GCATGAATTCTCACTTGAGACAGTAGGTGTGG	506/518
EGFP-LARP1- A-as	GACTGCAGAATTCTCACACACTCGATGTCTCATCCTGGTC	pEGFP-LARP1-X1-A
EGFP-LARP1- B2-as	GACTGCAGAATTCTCAAGGAGGAACTTCTGGTT	pEGFP-LARP1-X1-B2
EGFP-LARP1- B2-s	CAGATCTCGAGTGGCAGCACCAGGATGAGA	pEGFP-LARP1-X1-B2
EGFP-LARP1- C-s	CAGATCTCGAGCCTGTGGATCCCAACCAGGAAGTT	pEGFP-LARP1-X1-C
EGFP-LARP1- X1-A-s	CAGATCTCGAGATGGCCACTCAGGTGGAGCCG	pEGFP-LARP1-X1-A
LARP1-EGFP- as	ACTGCAGAATTCTCACTTTCCCAAAGTCTGTGTGTTCCG	pEGFP-LARP1-X1-C
MKRN1s- C61A-as	CATAAAATACCTGGCGGTGACCTGTTTAG	539/541/542/544

MKRN1s-C61A-s	CTAAACAGGTCACCGCCAGGTATTTTATG	539/541/542/544
MKRN1s-C69A-as	GACAGTTGTCTCCTTCCTTGGCAACCCCATGCATAAAATAC	539/541/542/544
MKRN1s-C69A-s	GTATTTTATGCATGGGGTTGCCAAGGAAGGAGACAACCTGTC	539/541/542/544
MKRN1s-C75A-as	GGTCATGCGAGTAGCGGGCGTTGTCTCCTTCCTTAC	539/541/542/544
MKRN1s-C75A-s	GTAAGGAAGGAGACAACGCCCGCTACTCGCATGACC	539/541/542/544
MKRN1s-F172A-as	GTTGCCCAGGAACGGCCTCAATAGCATTG	540/541/543/544
MKRN1s-F172A-s	GAATGCTATTGAGGCCGTTCTGGGCAAC	540/541/543/544
PAM2-as-MKRN1	GCATGAATTCTCACTCTTTCTCTGATTCTTCCTTGGTCACTGAGCCC TGCA	546
PAM2-s-MKRN1	GCATCTCGAGTCAAGAAATTCAAACCTTTGCAACTGTAGGAGCAGGT TCAGAGGACTG	546
X1-LARP-as	CGCGGCCAGATCTATTCACTTTCCCAAAGTCTGTGTGTTCGA	pinLARP1-X1
X1-LARP-s	CGGTGTTAACATGCATGCCGCCACCATGGCCACTCAGGTGGAGCC G	pinLARP1-X1
ZF1-as-MKRN1	GCATGAATTCTCACACTACACTATACGGACTGTCAGAGAGGTCATG C	545
ZF1-s-MKRN1	GCATCTCGAGAGCGGCCGGCGCTGGACTAAACAGGTC	545

4.11 Zellen und Gewebe

Tabelle 15 Prokaryotische Zellen

Bakterienstamm	Vertrieb
<i>E. coli</i> TOP 10F'	Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, USA)

Tabelle 16 Eukaryotische Zellen

Zelllinien	Zellursprung	Vertrieb
HEK 293T	menschliche embryonale Nierenzellen mit <i>SV40 large T-Antigen</i>	ATCC (Manassas, USA)
HeLa	menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms	ATCC (Manassas, USA)
NIH3T3	embryonale Fibroblasten der Maus	ATCC (Manassas, USA)
Primäre kortikale Neurone der Ratte	Primärkultur aus Cortex von <i>rattus norvegicus</i> -Embryonen (E20); Wistar-Stamm	Forschungstierhaltung UKE (Hamburg, Deutschland)

Tabelle 17 Tierisches Gewebe

Gewebe	Bezugsquelle
Cortex aus adulten weiblichen Ratten, Wistar-Stamm, <i>rattus norvegicus</i>	Forschungstierhaltung UKE (Hamburg, Deutschland)

4.12 Software

Tabelle 18 Software zur Datenauswertung

Verwendungszweck	Software	Vertrieb
Auswertung Western Blot	Image Lab Version 6.0.0 build 25	Bio-Rad Laboratories Inc., USA
Auswertung Mikroskopie	ImageJ 1.51k	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Statistische Auswertung	GraphPad PRISM Version 7.00	GraphPad Software Inc., USA
Auswertung Luciferase Messungen	Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, USA
Auswertung Sequenzierdaten	DNA Star Lasergene 12 Core Suit	DNASTAR Inc., USA
Dokumentation Vektoren	Gene Construction Kit 4.5	Textco BioSoftware, Inc., USA

5 Methoden

5.1 Molekularbiologische Methoden

5.1.1 Herstellung chemisch kompetenter *E.Coli*-Bakterien

Aus bestehenden *E.Coli*- (*Escherichia coli*) Stocks wurde ein fraktionierter Ausstrich auf LB-Agar-Platten mit Tetracyclin durchgeführt. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde mit einer Kolonie eine 5 ml LB-Medium-Vorkultur mit Tetracyclin angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 m⁻¹ inkubiert. Mit der Vorkultur wurde die 500 ml-LB-Medium-Hauptkultur angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37 °C und 200 m⁻¹ inkubiert, bis die Bakterienkultur eine optische Dichte OD₆₀₀ zwischen 0,3 und 0,6 erreichte. Anschließend wurde die Kultur für 2 min in Eiswasser abgekühlt und dann bei 3795 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 50 ml eiskaltem TSB resuspendiert. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurde die Kultur aliquotiert und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der Bakterien erfolgte bei -80 °C.

5.1.2 Transformation chemisch kompetenter *E.Coli*-Bakterien

Chemisch kompetente *E.Coli*-Bakterien wurden für Vervielfältigung rekombinanter DNA transformiert. Dafür wurden 0,1 bis 1 µg Plasmid-DNA oder 10 µl Ligationsansatz in 1x KCM-Puffer verdünnt. Die Bakterien wurden langsam auf Eis aufgetaut, dann mit dem DNA-Ansatz im 1 zu 1 Verhältnis gemischt und anschließend für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 37 °C einen Hitzeschock ausgesetzt. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C und 800 m⁻¹ inkubiert. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 16.000 g für 1 min zentrifugiert, das Pellet resuspendiert in LB-Medium und auf einer LB-Agarplatte mit entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die Agarplatte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden am darauffolgenden Tag zum Animpfen von Vorkulturen zur späteren Isolierung von Plasmid-DNA genutzt.

5.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA

5.1.3.1 Alkalische Lyse

Zur Aufreinigung kleiner DNA-Mengen wurden 1,5 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikum mit einer einzelnen Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C und 200 m⁻¹ inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden die 1,5 ml Bakteriensuspension bei 16.000 g für 1 min zentrifugiert. Für die anschließende alkalische Lyse wurden Resuspensions- (R), Lyse- (L) und Neutralisationspuffer (N) der Firma Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) verwendet.

Nach erfolgter Zentrifugation wurde das Pellet in 100 µl R-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde 100 µl L-Puffer hinzugegeben und das Reaktionsgefäß 3- bis 5-mal invertiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 100 µl N-Puffer wurde das Reaktionsgefäß erneut 3- bis 5-mal invertiert. Daraufhin wurde das Lysat bei 16.000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit 0,7 ml kalten Ethanol überführt. Das Reaktionsgefäß wurde mehrfach invertiert und bei 16.000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 70 %igem Ethanol überschichtet. Anschließend wurde bei 16.000 g für 10 min bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig entfernt und das Pellet bei 56 °C für 5 bis 10 min getrocknet. Anschließend wurde das Pellet in 50 µl sterilen Wasser aufgenommen. Die isolierte DNA wurde durch einen Restriktionsverdau oder mittels Sequenzierung überprüft.

5.1.3.2 DNA-Maxipräparation

Für eine Maxipräparation von Plasmid-DNA wurden 200 ml LB-Medium mit entsprechenden Antibiotikum mit einer 1,5 ml-Vorkultur angeimpft. Anschließend wurde die Kultur über Nacht bei 37 °C und 200 m⁻¹ inkubiert. Die Maxipräparation wurde entsprechend der Herstellerangaben mit Hilfe des NucleoBond® Xtra Maxi-Kits durchgeführt. Nach erfolgter Maxipräparation wurde die DNA-Konzentration und die Reinheit der DNA mit dem Epoch™-Spektralphotometer bestimmt. Die DNA-Konzentration wurde auf 1 µg/µl eingestellt mit sterilem Wasser. Anschließend wurde die DNA durch einen Restriktionsverdau und Sequenzierung überprüft.

5.1.4 Isolierung von RNA

Zur Isolation von RNA aus eukaryotischen Zellen wurden je 100 µl Zelllysat bzw. Immunpräzipitation-Überstand mit dem peqGOLD-RNAPure-Kit aufgereinigt. Die Aufreinigung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die aufgereinigte RNA wurde in 20 µl RNase-freien Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert. Zum Nachweis intakter RNA bzw. RNA-Abbaus wurde 2 µl 5x TBE Puffer, pH 8,7 und 2 µl 1x RNA-Probepuffer der RNA-Lösung hinzugefügt. Für 10 min wurde die RNA bei 70 °C inkubiert und dann auf Eis abgekühlt. Von der RNA-Lösung wurden 14 µl auf einen 0,8 %igen TBE-Agarosegel (pH 8,7) aufgetragen. Durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese wird die RNA aufgetrennt um die 18S bzw. 28S rRNA mittels Ethidiumbromid nachzuweisen.

5.1.5 Restriktionsverdau und Dephosphorylierung von DNA-Enden

Der Restriktionsverdau von doppelsträngiger DNA wurde eingesetzt, um kohäsive bzw. glatte Enden in DNAs zu erzeugen. Anschließend wurden die geschnittenen DNA-Fragmente für Ligationen oder zur Qualitätskontrolle von Plasmiden genutzt. Für die Ligation von Insertionen in restriktionsverdautes Plasmid wurde der Grundvektor mit der FastAP-Phosphatase dephosphoryliert um eine Ligation der Vektorenden zu verhindern. Alle Restriktions- bzw. Dephosphorylierungsansätze wurden für 30 min bei 37 °C inkubiert. Falls nötig wurde die Enzymaktivität der Restriktionsenzyme bzw. der Phosphatase bei 65 °C oder 80 °C inaktiviert. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für verschiedene Arten des Restriktionsverdaus ist in folgender Tabelle gezeigt.

Tabelle 19 Reaktionsansatz Restriktionsverdau und Dephosphorylierung

	Qualitätskontrolle Plasmide	Restriktionsverdau Grundvektor	Restriktionsverdau Insertion
DNA	0,1 – 1 µg	1 µg	0,1 - 1 µg
10x FastDigestPuffer	2 µl	4 µl	4 µl
FastDigest Restriktionsenzym I	0,2 µl	1,5 µl	1,5 µl
FastDigest Restriktionsenzym II	-	1,5 µl	1,5 µl
FastAP	-	1 µl	-
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl	ad 40 µl	ad 40 µl

5.1.6 Ligation

Die T4-DNA-Ligase katalysiert die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen zwischen 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Kettenenden in doppelsträngiger DNA. Das Enzym wurde genutzt um kohäsive bzw. glatte DNA-Enden zu verbinden, umso zum Beispiel neue Insertionen in Grundvektoren einzufügen. Reaktionsansätze wurden 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Insertions-DNA wurde im Überschuss zur Grundvektor-DNA eingesetzt.

Tabelle 20 Reaktionsansatz Ligation

	Ligation
T4-DNA-Ligase Puffer 10x	2 µl
T4-DNA-Ligase (5 U/µl)	1 µl
Insertions-DNA	100-500 ng
Grundvektor	20-100 ng
Nuklease-freies Wasser	ad 20 µl

5.1.7 Sequenzierung Plasmid-DNA

Zur Bestimmung der DNA-Sequenz einer Plasmid-DNA wurde das BigDye™ Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit genutzt. Die Sequenzier-Reaktion und die Fällung der DNA erfolgte nach Herstellerangaben. Die gefällte DNA wurde in Hi-Di™ Formamide gelöst. Durch die Diagnostik der Humangenetik am UKE wurde die DNA-Sequenz in einer Kapillarelektrophorese-Apparatur analysiert. Die DNA-Sequenz der sequenzierten Plasmide wurde mit der Soll-Sequenz verglichen.

5.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese wurde genutzt um DNA- bzw. RNA-Fragmente nach molekularer Größe aufzutrennen. Hierfür wurden 0,8 bis 1,5 %iger Agarosegele hergestellt. Für DNA bzw. RNA wurde Agarose in 1x TAE- bzw. TBE-Puffer erhitzt, bis sich die Agarose komplett löste. Pro 100 ml flüssiger Agarose wurde 1 µl Ethidiumbromid hinzugefügt. Nach dem Erkalten des Agarosegels wurden DNA- bzw. RNA-Proben auf das Gel beladen, zusammen mit dem 100bp-DNA-Marker oder dem 1kb-DNA-Marker von ThermoFisher Inc. (Waltham, USA). Falls die DNA-Proben nicht bereits im Ladepuffer vorliegen wurden sie mit 1x FastDigestGreen-Puffer versetzt. DNA- bzw. RNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese bei 100 V nach der Größe ausgetrennt und mittels UV-Licht

detektiert. Falls erforderlich wurde anschließend ein DNA-Fragment per Skalpell aus dem Agarose-Gel ausgeschnitten. Die DNA wurde aus dem Agarosegel mit dem peqGOLD Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben isoliert.

5.1.9 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Erzeugung von Insertionen zur Ligation in Plasmiden wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) genutzt. Mutationen, Deletionen oder Insertionen in der DNA-Sequenz wurden durch Überhänge in den PCR-Produkten realisiert (Ho *et al.*, 1989). Die Primer zur Erzeugung von Insertionen wurden mit Übergang-Sequenz zum Restriktionsverdau und Ligation in den Grundvektor designt. Als Template dienten bereits vorhandene Plasmide mit gewünschten Insertionsprodukt oder cDNA aus menschlichen Gehirngewebe (zur Verfügung gestellt durch AG Kutsche – UKE Humangenetik). Für die PCR wurde die *Pfu*-Polymerase nach Herstellerangaben genutzt.

Alternativ zum Restriktionsverdau wurde der Erfolg der Ligation von Plasmiden auch durch PCR und anschließender Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dafür wurde ein Primer-Paar genutzt, welches im Grundvektor und in der Insertion hybridisiert. Dadurch entsteht nur ein PCR-Produkt, wenn die Insertion erfolgreich in den Grundvektor ligiert. Für die Analyse wurde eine Bakterienkolonie direkt in einen PCR-Reaktionsansatz eingeführt und anschließend auf eine LB-Agar Platte überführt. Für diese Analyse-PCR wurde die *Taq*-Polymerase nach Herstellerangaben genutzt.

5.2 Proteinbiochemische Methoden

5.2.1 Herstellung Zelllysate

Konfluente eukaryotische Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen. Bei Kultur in 10 cm-Schalen bzw. 6-Well Platten wurden anschließend 1 bzw. 0,5 ml mRIPA-Puffer hinzugefügt. Sollte später eine RNA-Abbau durchgeführt werden, wurde mRIPA ohne SDS verwendet. Die Zellen wurden für 15 min auf Eis lysiert. Zur Lyse von Gehirngewebe wurden je zwei Kortizes-Hälften einer adulten Ratte in einen *dounce*-Homogenisator mit 8 ml mRIPA-Puffer homogenisiert. Anschließend wurde das Zell- bzw. Gewebe-Lysat in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und 30 min für 16.000 g bzw. 25.000 g bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde weiter genutzt oder in flüssigen Stickstoff

schockgefroren und bei -80°C gelagert. Zur weiteren Nutzung wurde der Überstand für Immunpräzipitation genutzt oder mit 1x LPP versetzt und bei 99°C für 10 min gekocht. Lysate in LPP wurden anschließend bei -20°C gelagert oder direkt der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zugeführt. Falls erforderlich wurde die Proteinkonzentration im Überstand mit dem DC™ Protein Assay (Bio-Rad Laboratories Inc. (Hercules, USA)) nach Herstellerangaben bestimmt.

5.2.2 Immunpräzipitation

Rekombinante Proteine mit Flag- bzw. EGFP-Epitope wurden unter Zuhilfenahme von ‚EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel‘ und GFP-Trap®_MA-Agarose immunpräzipitiert. Vor Zugabe der Lysate wurden die eingesetzten Agarose-Varianten fünf Mal mit mRIPA ohne SDS gewaschen. Zellysate aus einer 10 cm-Kulturschale wurden, zur Vermeidung unspezifischer Bindungen an die Agarose, mit Maus-IgG-Agarose bzw. Magnetischer Bindungskontroll-Agarose vorbehandelt. Dazu wurde 1 ml Lysat mit 20 μl Agarose-Lösung versetzt und für 1 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Durch Zentrifugation bzw. mittels Magnetständer wurde die Agarose pelletiert. Der Überstand wurde auf 20 μl ‚EZview™ Red ANTI-FLAG® M2 Affinity Gel‘ bzw. GFP-Trap®_MA-Agarose überführt. Der Überstand wurde mit der Agarose für 2 h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Falls erforderlich erfolgte anschließend ein RNA-Abbau mit 100 U RNase One bei Raumtemperatur unter Rotation. Die Agarose wurde anschließend fünf Mal mit mRIPA gewaschen. Die Elution erfolgte in 20 bis 50 μl 1x LPP bei 99°C für 10 min. Präzipitate wurden bei -20°C gelagert oder direkt der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zugeführt.

Endogenes Protein wurden mit Dynabeads™ Protein-G-Kügelchen immunpräzipitiert. Zur Immunpräzipitation wurde 1 ml Lysat mit 5 μg Protein/ml eingesetzt. Sofern die Konzentration der Antikörperseren bekannt war wurden 0,6 bis 4 μg Antikörper an die Protein-G-Matrix gekoppelt. Die Präzipitation erfolgte nach dem empfohlenen Protokoll der Herstellerangaben. Das Präzipitat wurde in 20 μl 1x LPP bei 99°C für 10 min gekocht. Präzipitate von rekombinanten oder endogenen Protein wurden bei -20°C gelagert oder direkt der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zugeführt.

5.2.3 Affinitätsaufreinigung mit m7GTP-Agarose

Konfluente HEK293T-Zellen wurden zwei Tage nach Transfektion 1x mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden abgeschabt und in PBS 1x gewaschen. Zur Lyse wurde dem Zellpellet 1 ml Lysepuffer-Cap-Affinitätsaufreinigung zugeführt. Unter Zuhilfenahme einer Spritze und kurzen Kanüle wurden die Zellen homogenisiert. Die Zellkerne und die Zelldebris wurde durch Zentrifugation bei 1000g, 4 °C und 15 min entfernt. Ein Teil des Überstands wurde in 1x LPP aufgenommen und bei 99 °C für 10 min inkubiert. Der restliche Überstand wurde aufgeteilt und mit gleichen Mengen 2x GTP- bzw. m⁷GP₃G - Puffer versetzt. Vor Zugabe der Lysate wurden die eingesetzten Agarose-Varianten fünf Mal mit Puffer A + BSA gewaschen. Für eine Stunde wurden die Überstände dann bei 4 °C unter Rotation mit 10 µl GTP-Agarose inkubiert. Anschließend wurde die GTP-Agarose präzipitiert und die Überstände in ein frisches Reaktionsgefäß mit 10 µl m7GTP-Agarose überführt. Darauf erfolgte eine Inkubation bei 4 °C für 2 h unter Rotation. Die m7GTP-Agarose wurde fünf Mal gewaschen mit Puffer A + GTP. Assoziierte Proteine wurden durch Zugabe von 50 µl 1x LPP und 10 min kochen bei 99 °C gelöst. Präzipitate wurden bei -20 °C gelagert oder direkt der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zugeführt.

5.2.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Proteine in Zelllysaten wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach dem Molekulargewicht aufgetrennt. Hierzu wurden Polyacrylamid-Gele bestehend aus Trenn- und Sammelgel (siehe Tabelle 2) im Mini-PROTEAN-System der Firma BioRad frisch angesetzt. Um das Molekulargewicht der detektierten Proteine bestimmen zu können wurde der PageRuler Plus Pre-Stained Proteinmarker genutzt. Die Polyacrylamid-Gele wurden mit 10 µl Proteinmarker und 10 bis 40 µl Proteinprobe beladen. Die Elektrophorese erfolgte im SDS-PAGE-Laufpuffer zunächst für 5 min bei 80 V und dann bei 150 V bis die gewünschte Auftrennung der Proteine erreicht wurde.

Mit dem Western Blot wurden Proteine, die zuvor im Polyacrylamid-Gel nach dem Molekulargewicht aufgetrennt wurden, auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und anschließend mit spezifischen Antikörper nachgewiesen. In der Tank-Blot-Apparatur (Mini Trans-Blot® Cell) der Firma BioRad wurden die Proteine im Transferpuffer vom Polyacrylamid-Gel auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei

100 V für 90 min unter Kühlung. Anschließend wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur unter Schwenken in 10 % Milchpulver/PBST bzw. Animal-Free Blocking Solution (Cell Signaling Technology Inc. (Danvers, USA)) inkubiert. Der Primärantikörper wurde in 5 % Milchpulver/PBST verdünnt entsprechend der Angaben von Tabelle 5 und über Nacht bei 4 °C mit der Membran inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Membran drei Mal für 5 min mit PBST gewaschen und dann mit dem Sekundärantikörper verdünnt in PBST für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurde die Membran erneut drei Mal mit PBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran falls erforderlich im ECL-Substrat (WesternBright, advansta Inc (Menlo Park, USA)) inkubiert. Das Chemilumineszenz- bzw. das Infrarotsignal des sekundären Antikörpers wurde im ChemiDoc MP-System detektiert.

5.2.5 Massenspektrometrie

Zur Analyse der Zusammensetzung von Immunpräzipitaten wurde massenspektrometrische Proteomik genutzt. Dafür wurden Immunpräzipitate auf ein 10 %-Polyacrylamid-Trenngel aufgetragen. Sobald die Probe ca. 1 cm in das Gel eingedrungen ist wurde die Elektrophorese gestoppt, das entsprechende Gelfragment per Skalpell isoliert und der Core Facility Massenspektrometrische Proteomik am UKE übergeben zur weiteren Analyse. Dort wurden die Proteine proteolytisch verdaut, aus dem Gel isoliert und mittels Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung (LC-MS) analysiert.

5.3 Zellkultur

5.3.1 Zellkulturroutine eukaryotische Zelllinien

HEK293T-, HeLa- und NIH3T3-Zellen wurden alle drei bis vier Tage passagiert und in 10 cm-Zellkulturschalen bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Zum Passagieren wurden die Zellen einmal mit 8 ml Versene gewaschen und anschließend für 2-5 min mit 2 ml 1x Trypsin/Versene inkubiert bei 37 °C. Der Trypsin-Verdau wurde durch Zugabe von 8 ml Kulturmedium inhibiert. Die Zellen wurden anschließend zentrifugiert (1000 g, Raumtemperatur). Das Pellet wurde in Kulturmedium aufgenommen und die

Zellsuspension auf neue Zellkulturschalen bzw. -Platten in gewünschter Zelldichte ausgesät.

5.3.2 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um Zelllinien der Langzeitlagerung zuzuführen wurden 1/3 der Zellen einer konfluenten 10 cm-Zellkulturplatte in 1 ml Einfriermedium aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Mit einer Einfrierhilfe wurden die Zellen langsam über Nacht auf -80 °C heruntergekühlt. Anschließend wurden die Zellen zur Langzeitlagerung bei -80 °C bzw. vorzugsweise bei -150 °C gelagert.

Zum Auftauen der kryokonservierten Zellen wurde eine Zellsuspension im Kryoröhrchen im 37 °C Wasserbad aufgetaut, in ein 15 ml-Reaktionsgefäß überführt und mit 9 ml vorgewärmten Kulturmedium versetzt. Anschließend wurden die Zellen für 5 min bei 1000 g auf Raumtemperatur zentrifugiert. Das Pellet wurde in 12 ml Kulturmedium resuspendiert und auf eine 10 cm-Zellkulturplatte ausplattiert. Die Zellen wurden anschließend bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und der normalen Zellkulturroutine unterzogen.

5.3.3 Präparation kortikaler Neurone aus Rattenembryonen

Für die Kultivierung kortikaler Neurone wurden 6-Well-Zellkulturplatten zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurde jedes Well mit 2 ml Poly-L-Lysin-Boratpuffer beschichtet. Nach einer Inkubation über Nacht bei 4 °C wurden die Platten fünf Mal mit sterilen Wasser gewaschen und anschließend mit Wasser überschichtet bei 4 °C gelagert.

Eine tragende Ratte wurde 20 Tage nach der Verpaarung (E20) mit CO₂ betäubt und anschließend dekapitiert. Anschließend wurde die Bauchdecke geöffnet und der Uterus mit den Embryonen herausgenommen und auf Eis gekühlt. Die Embryonen wurden aus den Fruchtblasen isoliert und dekapitiert. Das Gehirn der Embryonen wurde unter Verwendung eines Binokulars seziiert. Nach Entfernung der Hirnhaut und des Hippocampus wurden die Kortizes-Hälften in HBSS-Puffer mit Penicillin und Streptomycin überführt. Der Kortex mehrerer Ratten wurde mechanisch zerkleinert und in 40 ml 1x Trypsin/HBSS überführt. Für 15 bis 20 min wurden die Kortizes im 37 °C Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Kortex-Gewebe fünf Mal in 30 ml Plattiermedium

gewaschen. Die Kortex-Neuronen wurden dann je 10-mal mit sterilen Glas-Pasteurpipetten mit drei unterschiedlich Öffnungsgrößen durch Hoch- und Herunterpipettieren vereinzelt. Die Zellsuspension wurde dann im Zellsieb mit 70 µm Porengröße filtriert. Nach der Faustformel 1,5 Embryonen je 6-Well-Zellkulturplatte wurden die kortikalen Neurone anschließend auf Poly-L-Lysin beschichtete Zellkulturplatten ausgesät. Nach drei Stunden Inkubation im Plattiermedium bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium durch Kulturmedium für primäre Neurone ausgetauscht. Die weitere Kultivierung erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂.

5.3.4 Plasmid-Transfektion

Zur generellen Plasmid-Transfektion in NIH3T3-, HeLa- und HEK293T-Zellen wurde die Reagenz Turbofect nach Herstellerangaben genutzt. Zur optimalen Transfektion wurden HeLa- und HEK293T-Zellen bei einer Konfluenz von 70 bis 90 % transfiziert.

Primäre kortikale Neurone bzw. HeLa-Zellen wurde sieben bzw. ein Tag(e) nach der Aussaat auf 6-Well-Zellkulturplatten mit zwei Plasmiden für das *N22-tethering*-Experiment kotransfiziert. Die Transfektion erfolgte mittels des Calciumphosphat-Protokolls. Dafür wurden je 2 µg pinFiRein-BoxB16 bzw. pinGEIFiRein-BoxB16 zusammen mit 8 µg pN22-Plasmid in 250 mM CaCl₂ in einem Volum von 100 µl gemischt. Der DNA-Lösung wurde eine gleiche Menge 2x BBS-Puffer tropfenweise zugegeben während die Lösung gevortext wurde. Nach einer 20-minütigen Inkubation auf Raumtemperatur wurde die Lösung auf kortikale Neurone bzw. HeLa-Zellen gegeben. Nach 3h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellen sieben Mal mit DMEM gewaschen. Anschließend wurde DMEM entfernt und die Zellen unter normalen Kulturmedium (ohne Glutamat bei Neuronen) weiter inkubiert.

5.3.5 siRNA-Transfektion

Die *knockdown*-Methode ermöglichte die Minderung der Genexpression von LARP1, PABP und UPF1 mittels spezifischer siRNAs. Dafür wurde siRNA in HeLa- und HEK293T-Zellen transfiziert. Die siRNAs der Firma Dharmacon wurden mit den Transfektionsmittel DharmaFECT1 nach Herstellerangaben transfiziert. HeLa-Zellen wurden gleichzeitig zur

Aussaat von 600.000 Zellen / 6-Well mit 50 pmol siRNA und 4 µl DharmaFECT1 transfiziert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Calciumphosphat-Transfektion für das *N22-tethering*-Experiment. Die siRNA-transfizierten Zellen wurden für insgesamt 72 h inkubiert. Die siRNAs der Firma Qiagen wurden mit dem Transfektionsmittel Lipofectamine RNAiMax nach Herstellerangaben transfiziert. Dafür wurden HeLa-Zellen gleichzeitig zur Aussaat von 500.000 Zellen / 6-Well mit 15 pmol siRNA und 9 µl Lipofectamine RNAiMax transfiziert. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Calciumphosphat-Transfektion für das *N22-tethering*-Experiment. Die siRNA-transfizierten Zellen wurden für insgesamt 72 h inkubiert.

Für den PABP-*knockdown* in HEK293T-Zellen wurde siRNA von ThermoFisher verwendet. Zur Kontrolle wurde die Kontroll-siRNA #1 von Qiagen genutzt. EGFP-hMKRN1s-exprimierende HEK293T-Zellen wurden mit 1.000.000 Zellen / 6-Well ausgesät und gleichzeitig mit siRNA transfiziert. Dafür wurden 60 pmol siPABP bzw. Kontroll-siRNA #1 nach Herstellerprotokoll mit 9 µl Lipofectamine RNAiMax transfiziert. Nach 96 h Inkubationszeit wurden die Zellen lysiert und EGFP-hMKRN1s wurde immunpräzipitiert.

5.3.6 CRISPR/Cas9-LARP1-*knockout*

HeLa-Zellen wurden mit eine Mix aus drei LARP1-CRISPR/Cas9-KO-Plasmiden und LARP1-HDR-Plasmiden kotransfiziert. Das KO-Plasmid kodiert für die *guide*-RNA (gRNA), die Cas9-Nuklease und GFP. Eine gRNA ist spezifisch für ein Exon im humanen *LARP1*-Gen und ermöglicht die spezifische Rekrutierung der Cas9-Nuklease zur Initiierung eines Doppelstrangbruches in der DNA. Das LARP1-HDR-Plasmid ermöglicht die Homologe Rekombination einer spezifischen DNA-Sequenz an die Position des gRNA-induzierten Doppelstrangbruches im Genom. Dieses DNA-Element kodiert den offenen Leserahmen für das rot fluoreszierende Protein (RFP) und einer Puromycin Resistenz unter der Kontrolle des EF1a-Promoters. Die *knockout*-HeLa-Zellen wurden 10 Tage mittels 1 µg/µl Puromycin im Kulturmedium selektioniert. Die Zellpopulation wurde anschließend auf 96-Well-Zellkulturplatten vereinzelt. Nach einer Woche in Puromycin-haltigen Medium wurden RFP-positive Einzelzell-Klone passagiert und expandiert. Anschließend wurden die Einzelzell-Klone lysiert und im Western Blot auf die Anwesenheit von endogenen LARP1 hin untersucht. LARP1-*knockout*-Klone ohne

detektierbares vollständiges und unvollständiges LARP1 wurden für nachfolgende Experimente genutzt.

5.3.7 Immunzytochemische Färbung

NIH3T3 Zellen wurden mit 6.000 Zellen / Well auf ein Deckglas in 12-Well-Zellkulturplatten ausgesät und am nächsten Tag mittels Turbofekt transfiziert. Nach 24-stündiger Inkubationszeit wurden Zellen bei Bedarf für zwei Stunden bei 43,5 °C inkubiert um SGs zu induzieren. Anschließend wurden gestresste und ungestresste Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Danach wurden die Zellen vier Mal mit PBS gewaschen, mit 0,2 % Triton-X100 in PBS für 5 min auf Raumtemperatur permeabilisiert und nochmals vier Mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 10 % Pferdeserum in PBS für 1 h bei Raumtemperatur zur Blockierung unspezifischer Bindestellen inkubiert. Die Deckgläser wurden über Nacht bei 4 °C in primären Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vier Mal mit PBS gewaschen und für eine Stunde auf Raumtemperatur mit den sekundären Antikörpern inkubiert. Die primären und sekundären Antikörper wurden verdünnt in 10 % Pferdeserum in PBS. Nach weiteren viermaligen Waschen mit PBS wurden die Deckgläser in DAPI-haltigen Eindeckmedium auf Objektträgern eingebettet.

5.4 Mikroskopie

Zur Mikroskopie von immunzytochemische Färbungen wurde das konfokale Mikroskope SP5 der UKE Microscopy Imaging Facility verwendet

5.5 Messung Photinus- und Renilla-Luciferase-Aktivität

Primäre kortikale Neurone bzw. HeLa-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion für das *N22-tethering*-Experiment lysiert. Die Zellyse und die Aktivitätsmessung der Photinus- und Renilla-Luciferasen erfolgte nach Herstelleranleitung mit dem Dual-Luciferase® Reporter Assay System.

6 Ergebnisse

6.1 hMKRN1s stimuliert die Translation in kortikalen Zellen

In vorherigen Studien wurde gezeigt, dass humanes MKRN1s, im Folgenden hMKRN1s, die Translationsrate von einer Reporter-mRNA in primären kortikalen Neuronen der Ratte um das 4-fache steigert (Miroci *et al.*, 2012). Um die für den translationsfördernden Effekt notwendigen Domänen des Proteins zu identifizieren, wurden unvollständige hMKRN1s-Varianten mit Hilfe eines sogenannten *N22-tethering*-Experiments untersucht hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Stimulation der Translation.

Für das *N22-tethering*-Experiment wurden kultivierte kortikale Neurone mit zwei eukaryotischen Expressionsvektoren transfiziert (Abbildung 5A). Einer der Vektoren, pinFiRein-boxB16, enthält zwei separate Gene, jeweils unter der Kontrolle eines CMV- (*cytomegalovirus*) Promotors. Beide Gene enthalten ein Intron vor dem offenen Leserahmen kodierend für Photinus- (PhoLuc) bzw. Renilla- (RenLuc) Luciferase. Die PhoLuc-mRNA enthält 16 Kopien einer BoxB genannten Haarnadelstruktur in der 3'-UTR. Ein aus 22 Aminosäuren bestehendes N22 genanntes Peptid bindet an eine BoxB-Struktur. Somit werden Proteine, die die N22-Domäne besitzen, spezifisch an PhoLuc-mRNA rekrutiert, ohne jedoch an RenLuc-Transkripte zu binden. (Cai *et al.*, 1998; Legault *et al.*, 1998). Der zweite Vektor kodiert ein N22-Fusionsprotein. Nach zwei Tagen wurden die kortikalen Zellen geerntet und die Aktivität der beiden Luciferasen in den Zelllysaten bestimmt. Zum Ausgleich möglicher Unterschiede in der Transfektionsrate wurden die Enzymaktivitäten der beiden Luciferasen zueinander ins Verhältnis gesetzt. Dieses Verhältnis wird im Folgenden bezeichnet als nPhoLuc-Aktivität. Die nPhoLuc-Aktivität von Zellen, die ein N22-Flag3 Protein exprimieren, diente als Referenz und wurde willkürlich auf den Wert 1 gesetzt, da die Rekrutierung des N22-Flag3 Peptides an die PhoLuc-mRNA den Metabolismus des Transkriptes nicht verändern sollte. Lag die nPhoLuc Aktivität nach Expression eines anderen NPs über 1, deutete dies darauf hin, dass die mRNA Stabilität erhöht ist oder eine Stimulation der Translation stattfindet (Abbildung 5B). nPhoLuc-Werte unter 1 deuteten auf eine Translationsrepression oder Degradation der mRNA hin (Abbildung 5C). Als interne Kontrollen im *N22-tethering*-Experiment dienten die Fusionsproteine N22-Flag3-rShank3₁₋₂₉₀ (NF-rShank3₁₋₂₉₀) und N22-hDDX6 (N-hDDX6). Das Gerüstprotein Shank3 (*SH3 and multiple ankyrin repeat domains protein 3*)

besitzt hinsichtlich der Regulation des RNA-Metabolismus keine Funktion und sollte daher die Translation und Stabilität der PhoLuc-mRNA nicht beeinflussen (Naisbitt *et al.*, 1999). Die humane Variante von DDX6 (*DEAD box protein 6*) ist an der Degradation von mRNA beteiligt (Ayache *et al.*, 2015; Naarmann *et al.*, 2010).

Zur Identifikation der für die Translationsstimulation relevanten Proteinabschnitte in hMKRN1s wurden unvollständige N22-Flag3-hMKRN1s-Varianten (NF-hMKRN1s) im *N22-tethering*-Experiment analysiert. Den unvollständigen Varianten fehlten Abschnitte im hMKRN1s-Protein in der Größe von 50 bis 90 Aminosäuren. In den Untersuchungen wurde nach unvollständigen NF-hMKRN1s-Varianten gesucht, welche die Translation der Reporter-mRNA nicht stimulieren. Die Ergebnisse grenzten die funktionellen Domänen ein, die in weiteren Untersuchungen genauer analysiert wurden.

Es konnte beobachtet werden, dass NF-hMKRN1s Δ 1-82, NF-hMKRN1s Δ 61-108 und NF-hMKRN1s Δ 161-235 zwar die Translation der Reporter-mRNA stimuliert, aber nicht in dem Maße, wie das vollständige Protein NF-hMKRN1s (Abbildung 6B) (*one-way anova p*-Werte: NF-hMKRN1s Δ 1-82 vs. NF-rShank3₁₋₂₉₀ <0,0001; NF-hMKRN1s Δ 61-108 vs. NF-rShank3₁₋₂₉₀ <0,0001; NF-hMKRN1s Δ 161-235 vs. NF-rShank3₁₋₂₉₀ 0,0112). Dahingegen zeigte NF-hMKRN1s Δ 61-232, in dem die ersten drei Zinkfinger und das PAM2-Motiv fehlten, keinen translationsfördernden Effekt mehr (*one-way anova p*-Werte: NF-hMKRN1s Δ 61-232 vs. NF-rShank3₁₋₂₉₀ 0,9795). Immer dann, wenn der komplette ZF1 fehlte, konnte ein partieller Verlust der translationsfördernden Wirkung beobachtet werden (NF-hMKRN1s Δ 1-82 und NF-hMKRN1s Δ 61-108). Wenn ZF2 (NF-hMKRN1s Δ 83-160), MTZF zusammen mit RF Δ CC (NF-hMKRN1s Δ 236-329) oder RF Δ CC (NF-hMKRN1s Δ 279-329) fehlte wurde keine Beeinträchtigung des stimulierenden Effektes auf die Translation der Reporter-mRNA beobachtet. Durch das Fehlen des PAM2-Motives und von ZF3 konnte ebenfalls ein partieller Verlust der translationsfördernden Wirkung beobachtet werden (NF-hMKRN1s Δ 161-235). Die interne Kontrolle N-hDDX6 wies eine Reduktion der Translationsrate der Reporter-mRNA gegenüber der NF-rShank3₁₋₂₉₀ Probe auf. Damit zeigte sich, dass das Fehlen vom ZF1 oder dem ZF3 zusammen mit dem PAM2-Motiv die translationsfördernde Wirkung partiell aufhebt. Das Fehlen aller drei Domänen stimulierte die Translation der Reporter-mRNA nicht mehr. Die Daten weisen darauf hin, dass ZF1, ZF3 und das PAM2-Motiv essenziell für die Stimulation der Translation assoziierter mRNAs sind.

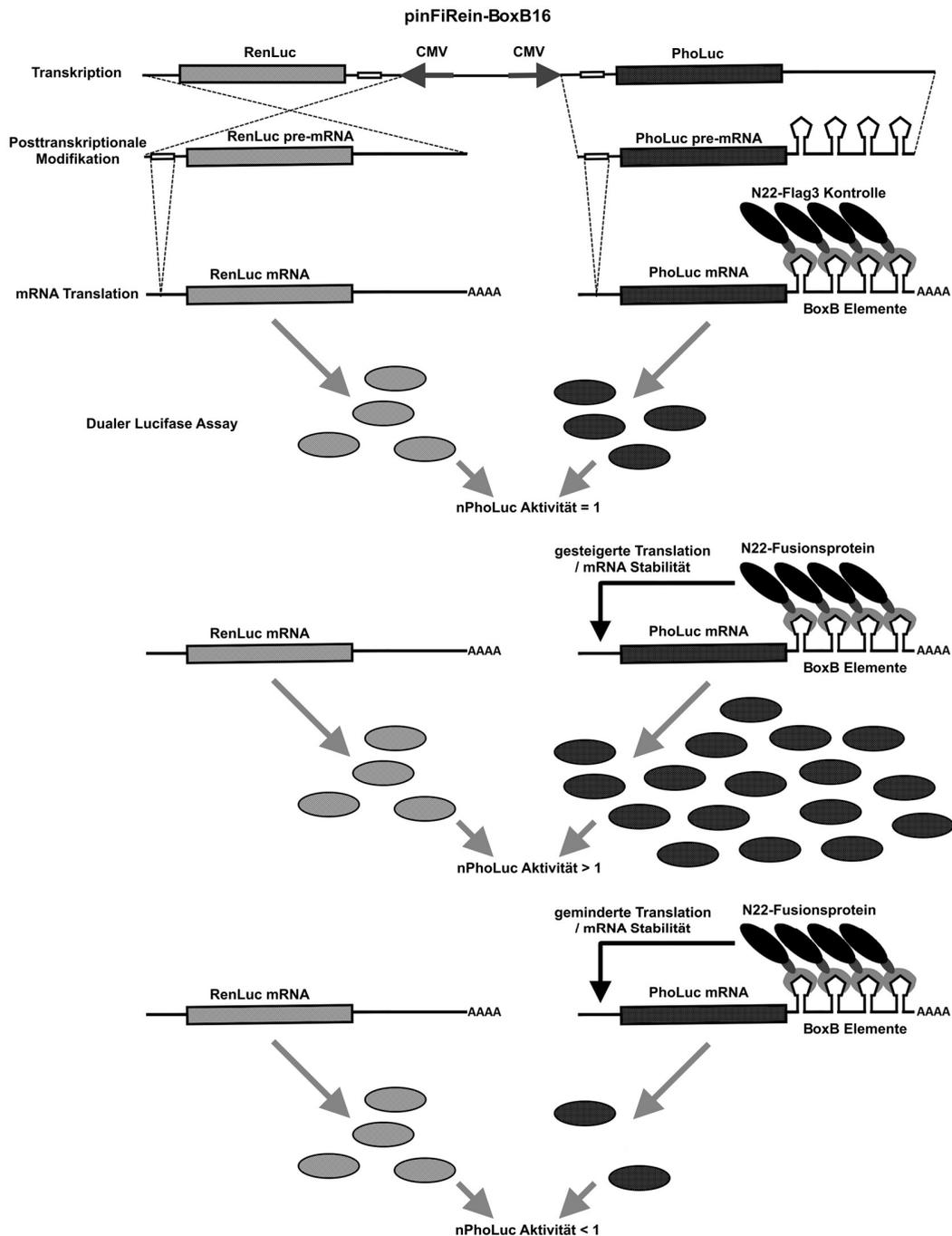


Abbildung 5 Schematische Darstellung des N22-tethering-Experiments. A) Der eukaryotische Expressionsvektor *pinFiRein-BoxB16* (oberste Linie) enthält zwei Gene für Photinus- (*PhoLuc*) und Renilla- (*RenLuc*) Luciferase. Beide Gene stehen unter der Kontrolle eines eigenen CMV-Promotors. Dem offenen Leserahmen der Luciferasen (graue bzw. schwarze Box) ist je eine Intronsequenz (weiße Box) vorangestellt. Primäre kortikale Neurone wurden mit *pinFiRein-BoxB16* und N22-Fusionsprotein-kodierenden Plasmiden kotransfiziert. N22-Fusionsproteine wurden an die BoxB-Haarnadelstrukturen in der 3'UTR der *PhoLuc*-mRNA rekrutiert. Anschließend erfolgte die Messung der Aktivität der beiden Luciferasen. Die *RenLuc* Aktivität diente der Normalisierung der *PhoLuc*-Aktivität (nPhoLuc). Die nPhoLuc-Aktivität von N22-Flag3 Lysaten wurde als Referenzkontrolle willkürlich auf 1 gesetzt. B) Im Vergleich zur N22-Flag3 Kontrolle erhöhte nPhoLuc-Werte deuten auf eine Stimulation der Translation oder Erhöhung der mRNA-Stabilität hin. C) Fällt die nPhoLuc-Aktivität unter den Kontrollwert, wird von einer Translationsrepression oder Störung der mRNAs Stabilität ausgegangen.

Um die translationsrelevanten Domänen von hMKRN1s genauer spezifizieren zu können wurden unvollständige NF-hMKRN1s-Varianten mit je ca. 20 fehlenden Aminosäuren analysiert, auf ihre Fähigkeit die Translation der PhoLuc-Reporter-mRNA zu stimulieren. Diese Untersuchung sollte auch klären, ob das PAM2-Motiv oder ZF3 einzeln einen Einfluss auf die translationsfördernde Wirkung von hMKRN1s haben.

Es konnte beobachtet werden, dass unvollständiges hMKRN1s ohne ZF1 und PAM2-Motiv nur noch partiell die Translation der Reporter-mRNA stimuliert (NF-hMKRN1s Δ 55-72, NF-hMKRN1s Δ 161-176, NF-hMKRN1s Δ 177-193 und NF-hMKRN1s Δ 161-193) (Abbildung 6C). Für hMKRN1s ohne ZF3 konnte kein Verlust des translationsfördernden Effekts beobachtet werden (NF-hMKRN1s Δ 214-232). Demnach ist ZF3 nicht essenziell für die translationsfördernde Wirkung von hMKRN1s.

Die Befunde deuteten darauf hin, dass ZF1 und das PAM2-Motiv für eine Stimulation der Translationsrate essenziell sind. Dabei zeigte sich, dass hMKRN1s unter Verlust des PAM2-Motives die Translation weniger stark stimuliert als unter Verlust von ZF1.

Nachfolgend sollte untersucht werden, wie sich ein gleichzeitiger funktioneller Verlust vom ZF1 und dem PAM2-Motiv auf die hMKRN1s vermittelte Translationsregulation auswirkt. Weiterhin wurde analysiert, ob die Inaktivierung von ZF1 und PAM2-Motiv durch Aminosäureaustausch ebenfalls zur verminderten Translationsstimulation der Reporter-mRNA führt. Durch Austausch der Cystein-Reste C61, C69 und C75 in ZF1 durch Alanin (NF-hMKRN1s $_{C61A|C69A|C75A}$) wurde die Struktur der Domäne aufgehoben und damit die Zinkbindung verhindert (Gray *et al.*, 2000; Liang *et al.*, 2008). Das PAM2-Motiv wurde durch Austausch des Phenylalanins F172 gegen Alanin (NF-hMKRN1s $_{F172A}$) inaktiviert. F172 ist essenziell für die Interaktion mit der MLLE-Domäne von PABP (Kozlov *et al.*, 2010a). In NF-hMKRN1s $_{C61A|C69A|C75A|F172A}$ waren beide Domänen zugleich inaktiviert.

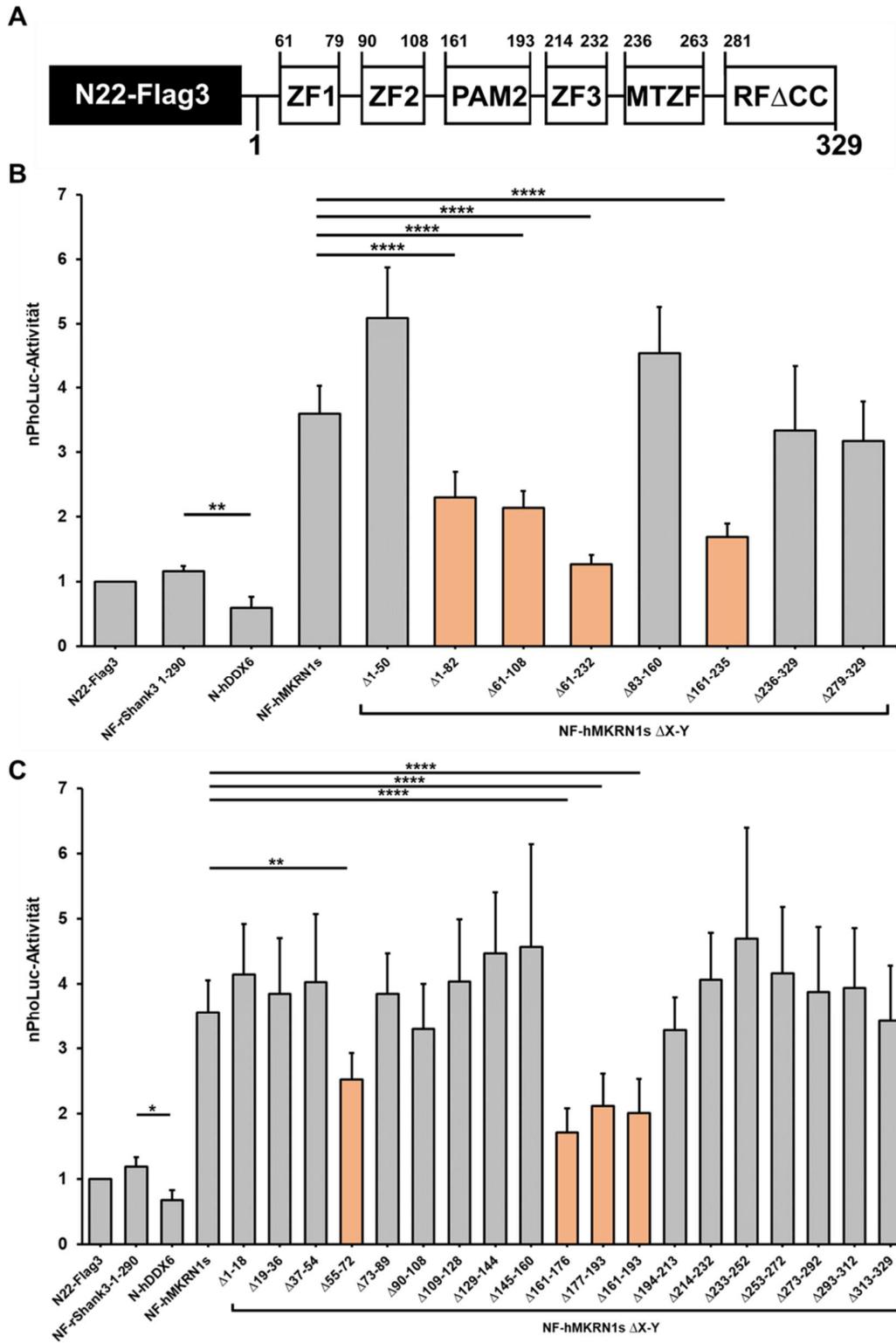


Abbildung 6 ZF1 und PAM2-Motiv sind essenziell für eine effiziente hMKRN1s vermittelte Translationsstimulation

Abbildung 6 ZF1 und PAM2-Motiv sind essenziell für eine effiziente hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation. A) Schematische Darstellung vom NF-hMKRN1s mit Angabe der Aminosäureposition der Domänen in der Peptidkette. B, C) Vektoren kodierend für N22-Flag3, vollständige und unvollständige NF-hMKRN1s-Varianten, NF-rShank3₁₋₂₉₀ und N-hDDX6 wurden mit dem pinFiRein-BoxB16 Vektor in kortikalen Neuronen (7 Tage *in vitro* kultiviert) transfiziert. Anschließend wurde die Aktivität von PhoLuc und RenLuc bestimmt. Dargestellt ist die nPhoLuc-Aktivität in Lysaten transfizierter kortikaler Neurone. Für NF-hMKRN1s konnte eine 4-fach gesteigerte Translationsrate beobachtet werden. Die interne Kontrolle N-hDDX6 zeigte eine deutliche Erniedrigung der Translationsrate der Reporter-mRNA im Vergleich zu NF-rShank3₁₋₂₉₀. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$). B) Untersuchung von unvollständigen hMKRN1s mit 50-90 fehlenden Aminosäuren. (n=14). Ohne ZF1 ($\Delta 1-82$; $\Delta 61-108$) oder PAM2-Motiv und ZF3 ($\Delta 161-235$) wurde nur noch eine partielle Stimulierung der Translation beobachtet. Fehlten alle Domänen vom ZF1 bis zum ZF3 zeigte hMKRN1s keinen translationsfördernden Effekt mehr. C) Untersuchung von unvollständiges hMKRN1s mit ca. 20 fehlenden Aminosäuren (n=22). Ohne ZF1 ($\Delta 55-72$) und PAM2-Motiv ($\Delta 161-193$, $\Delta 161-176$ und $\Delta 177-193$) konnte nur eine partielle Translationsstimulation der Reporter-mRNA nachgewiesen werden.

Sowohl NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A} wie auch NF-hMKRN1s_{F172A} zeigten im Vergleich zu NF-hMKRN1s eine reduzierte nPhoLuc-Aktivität (Abbildung 7B). Der partielle Verlust der translationsfördernden Wirkung was ähnlich zu den hMKRN1s-Varianten in denen ZF1 oder das PAM2-Motiv fehlten (NF-hMKRN1s _{$\Delta 55-72$} , NF-hMKRN1s _{$\Delta 161-176$} , NF-hMKRN1s _{$\Delta 177-193$} und NF-hMKRN1s _{$\Delta 161-193$}). Wurden sowohl ZF1 als auch das PAM2-Motiv gleichzeitig inaktiviert (NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A|F172A}) konnte keine translationsstimulierende Wirkung mehr beobachtet werden. Auch nach dem Fehlen beider Domänen (NF-hMKRN1s _{$\Delta 55-72|161-193$}) konnte kein translationsstimulierender Effekt beobachtet werden (*one-way anova* *p*-Werte: NF-hMKRN1s _{$\Delta 55-72|161-193$} vs. NF-rShank3₁₋₂₉₀ >0,9999; NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A|F172} vs. NF-rShank3₁₋₂₉₀ 0,9619).

Diese Befunde zeigen, dass für die translationsfördernde Wirkung von hMKRN1s der ZF1 und das PAM2-Motiv essenziell sind. Durch Fehlen oder Inaktivierung beider Domänen zeigte hMKRN1s keinen Einfluss mehr auf die Translation assoziierter mRNAs.

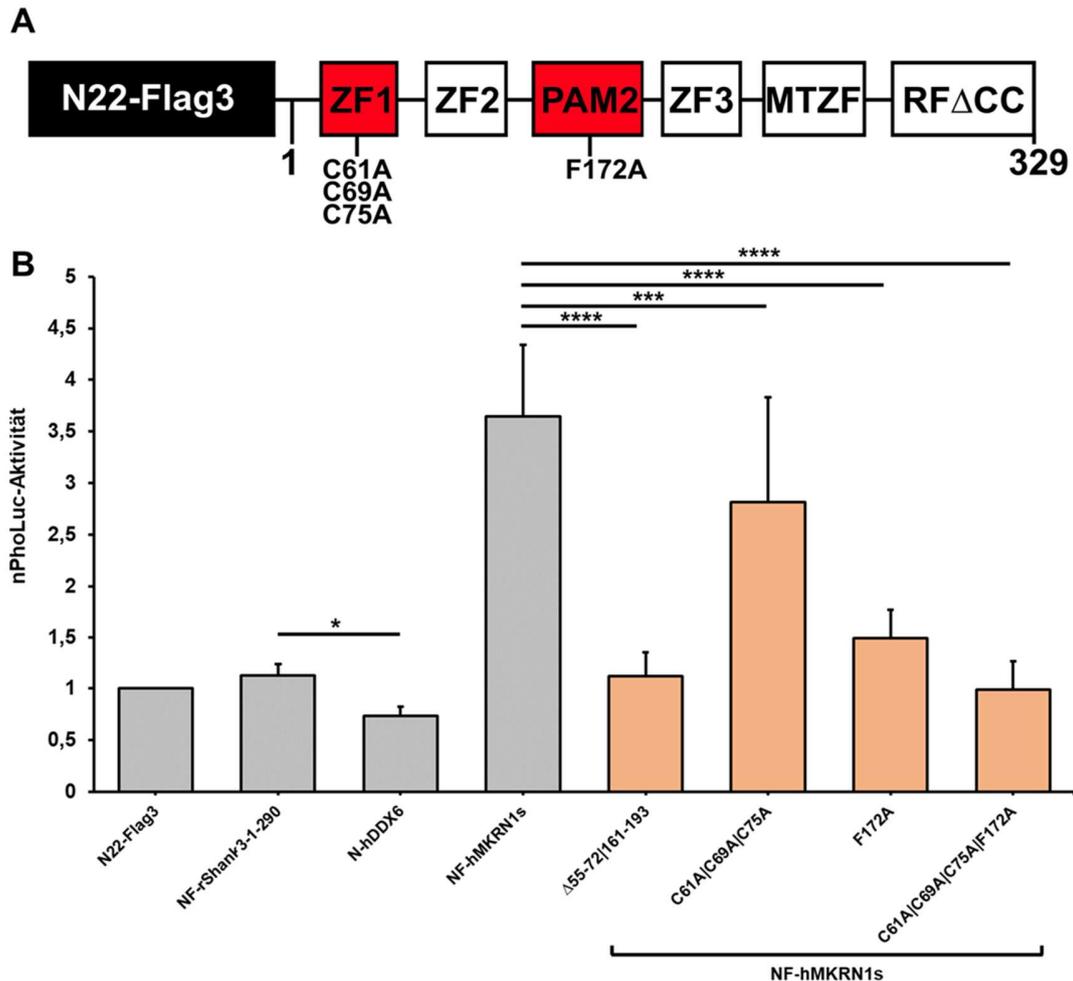


Abbildung 7 Inaktivierung von ZF1 und PAM2 unterbindet hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation. A) Schematische Darstellung vom NF-hMKRN1s mit Angabe der Aminosäureaustauschstellen. B) Vektoren kodierend für N22-Flag3, NF-hMKRN1s-Varianten, NF-rShank31-290 und N-hDDX6 wurden mit dem pinFiRein-BoxB16 Vektor in kortikalen Neuronen transfiziert (n=11). Anschließend wurde die Aktivität von PhoLuc und RenLuc bestimmt. Dargestellt ist die nPhoLuc-Aktivität in Lysaten transfizierter kortikaler Neurone. Für NF-hMKRN1s konnte eine 4-fach gesteigerte Translationsrate beobachtet werden. Nach Inaktivierung von ZF1 oder des PAM2-Motives (NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A} und NF-hMKRN1s_{F172A}) konnte ein partieller Verlust der hMKRN1s-vermittelten translationsfördernden Wirkung beobachtet werden. Beim Fehlen bzw. bei Inaktivierung beider Domänen (NF-hMKRN1s_{Δ55-72|161-193} und NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A|F172A}) wurde der komplette Verlust der translationsfördernden Wirkung von hMKRN1s beobachtet. Die interne Kontrolle N-hDDX6 zeigte eine deutliche Erniedrigung der Translationsrate der Reporter-mRNA im Vergleich zu NF-rShank31-290. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (* $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

6.2 hMKRN1s akkumuliert in SGs

In einer Stresssituation werden zahlreiche translationsregulierende Proteine sowie die assoziierten mRNAs in SGs rekrutiert. Nachfolgend sollte daher analysiert werden, ob hMKRN1s in SGs rekrutiert wird und welche Domänen für die Interaktion von hMKRN1s mit Präinitiationskomplexen in SGs verantwortlich sind. Dafür wurde in NIH3T3-Fibroblasten durch Hitzestress die Bildung von SGs induziert. Dabei wurde untersucht, ob alle zuvor beschriebenen hMKRN1s-Varianten als N22- oder EGFP- (verbessertes grün fluoreszierendes Protein) Fusionsprotein in dieser Stresssituation in SGs akkumulieren.

Endogenes Ataxin-2 (ATX2) wurde als immunozytischer Marker von SGs eingesetzt. In allen ungestressten Zellen war ATX2 gleichmäßig im Zellkörper verteilt. Gestresste Zellen bildeten SGs aus, erkennbar an großen runden Aggregaten, die sich präferentiell um den Zellkern verteilen (Abbildung 8 und 9). Die Expression von hMKRN1s-Fusionsproteinen oder Negativkontrollen zeigte keine Auswirkungen auf die Verteilung von ATX2 im ungestressten und gestressten Zustand. Unter Hitzestress akkumulierte EGFP- und NF-hMKRN1s in ATX2-positive Aggregate. Folglich war vollständiges hMKRN1s in der Lage in SGs zu akkumulieren. EGFP- und NF-hMKRN1s war in ungestressten Zellen ebenfalls gleichmäßig im Zellkörper verteilt. Im direkten Vergleich mit NF-Fusionsproteinen (Abbildung 9) wiesen die EGFP-Fusionsproteine (Abbildung 8) von hMKRN1s-Varianten eine minimale Tendenz auf im Zellkern zu akkumulieren. Dieser Effekt ist von EGFP-Fusionsproteinen bekannt, da EGFP dazu neigt in den Zellkern zu akkumulieren (Seibel *et al.*, 2007).

Das Akkumulationsverhalten von EGFP- und NF-hMKRN1s $_{\Delta 1-18}$ stand repräsentativ für alle analysierten zuvor beschriebenen hMKRN1s-Varianten, in denen ZF1 und das PAM2-Motiv nicht fehlen bzw. inaktiviert sind. Identisch zum vollständigen hMKRN1s wurde EGFP- und NF-hMKRN1s $_{\Delta 1-18}$ unter Stress in SGs rekrutiert. Ungestresst war EGFP- und NF-hMKRN1s sowie EGFP- und NF-hMKRN1s $_{\Delta 1-18}$ gleichmäßig im Zellkörper verteilt. Das Fehlen und die Inaktivierung vom ZF1 durch Aminosäureaustausch zeigte weder Einfluss auf die gleichmäßige Verteilung von hMKRN1s im Zellkörper unter Kontrollbedingungen noch auf die effiziente Rekrutierung in SGs unter Hitzestress (EGFP- und NF-hMKRN1s $_{\Delta 55-72}$ bzw. -hMKRN1s $_{C61A|C69A|C75A}$). Sobald das PAM2-Motiv

fehlt oder inaktiviert wurde, wurde eine ineffiziente Rekrutierung in SGs beobachtet (EGFP- und NF-hMKRN1s Δ 161-193 bzw. -hMKRN1s Δ F172A). Zusätzlich wurde für EGFP- und NF-hMKRN1s Δ 161-193 bzw. -hMKRN1s Δ F172A eine Akkumulation in den Zellkern unter Stress beobachtet. Auf die gleichmäßige Verteilung von hMKRN1s im Normalzustand hatte das PAM2-Motiv keinen Einfluss. Varianten von hMKRN1s in den beiden Domänen, ZF1 und das PAM2-Motiv, fehlten waren nicht mehr in der Lage unter Hitzestress in SGs zu akkumulieren (EGFP- und NF-hMKRN1s Δ 55-72|161-193 und -hMKRN1s Δ SC61A|C69A|C75A|F172A). Wie EGFP- und NF-hMKRN1s unter Normalbedingungen zeigten diese Varianten eine gleichmäßige Verteilung im Zellkörper. Negativkontrollen N22-Flag3 und EGFP zeigten unter Hitzestress keine Akkumulation in SGs und waren unter Stress und unter Kontrollbedingungen gleichmäßig im Zellkörper verteilt.

Die gezeigten Daten lassen den Schluss zu, dass ZF1 und das PAM2-Motiv essenziell für die Akkumulation in SGs sind. Potentiell sind die beiden Domänen verantwortlich für die Interaktion von hMKRN1s mit in SGs akkumulierten Präinitiationskomplexen.

Abbildung 8 Rekombinantes EGFP-hMKRN1s akkumuliert in SGs. Vollständiges und unvollständiges hMKRN1s, sowie Aminosäureaustauschvarianten wurden in NIH3T3-Mausfibroblasten als EGFP-Fusionsprotein exprimiert (n=3). Als Negativkontrolle diente EGFP. Um die Bildung von SGs zu induzieren wurden die Zellen für zwei Stunden bei 43,5 °C inkubiert. Zellen die bei 37 °C inkubiert wurden dienten als Kontrolle. Die Zellen wurden mit ATX2-spezifischen Antikörper, sekundären Antikörper Alexa-546 und DAPI angefärbt. Die weiße Markierung verweist auf die einzelnen Farbkanäle korrespondierend zu EGFP, ATX2 und DAPI unter dem Übersichtsbild. Skalenbalken entsprechen 10 μ m. Endogenes ATX2 verteilte sich im Kontrollzustand im Zellkörper. In hitzebehandelten Zellen bildeten sich runde Zellstrukturen, die sich präferenziell um den Zellkern verteilten. Mit Ausnahme von EGFP-hMKRN1s Δ 55-72|161-193 und EGFP-hMKRN1s Δ SC61A|C69A|C75A|F172A akkumulierten alle hier untersuchten EGFP-hMKRN1s-Varianten in SGs unter Hitzestress. Nach Inaktivierung oder Fehlen des PAM2-Motives wurde eine ineffiziente Rekrutierung in SGs und zudem eine Akkumulation in den Zellkern beobachtet (EGFP-hMKRN1s Δ 161-193 und EGFP-hMKRN1s Δ F172A). Beim Fehlen oder der Inaktivierung von ZF1 und dem PAM2-Motiv erfolgte keine Akkumulation in SGs unter Stress (EGFP-hMKRN1s Δ 55-72|161-193 und EGFP-hMKRN1s Δ SC61A|C69A|C75A|F172A).

Abbildung 9 Rekombinantes NF-hMKRN1s akkumuliert in SGs. Vollständiges und unvollständiges hMKRN1s, sowie Aminosäureaustauschvarianten wurden in NIH3T3-Mausfibroblasten als NP exprimiert (n=3). Als Negativkontrolle diente N22-Flag3. Zur Bildung von SGs wurden die Zellen wie in Abbildung 8 beschrieben induziert. Die Zellen wurden mit ATX2-spezifischen Antikörper, sekundären Antikörper Alexa-546 und Alexa-488 und DAPI angefärbt. Die weiße Markierung verweist auf die einzelnen Farbkanäle korrespondierend zu Flag, ATX2 und DAPI unter dem Übersichtsbild. Die Skalenbalken entsprechen 10 μ m. Endogenes ATX2 verteilte sich im Kontrollzustand im Zellkörper. In hitzebehandelte Zellen bildeten sich runde Zellstrukturen die sich präferenziell um den Zellkern verteilten. Mit Ausnahme von NF-hMKRN1s Δ 55-72|161-193 und NF-hMKRN1s Δ SC61A|C69A|C75A|F172A akkumulierten alle hier untersuchten NF-hMKRN1s-Varianten in SGs unter Hitzestress. Nach Inaktivierung oder Fehlen des PAM2-Motives wurde eine ineffiziente Rekrutierung in SGs und zudem eine Akkumulation in den Zellkern beobachtet (NF-hMKRN1s Δ 161-193 und NF-hMKRN1s Δ F172A). Beim Fehlen oder der Inaktivierung von ZF1 und dem PAM2-Motiv erfolgte keine Akkumulation in SGs unter Stress (NF-hMKRN1s Δ 55-72|161-193 und NF-hMKRN1s Δ SC61A|C69A|C75A|F172A).

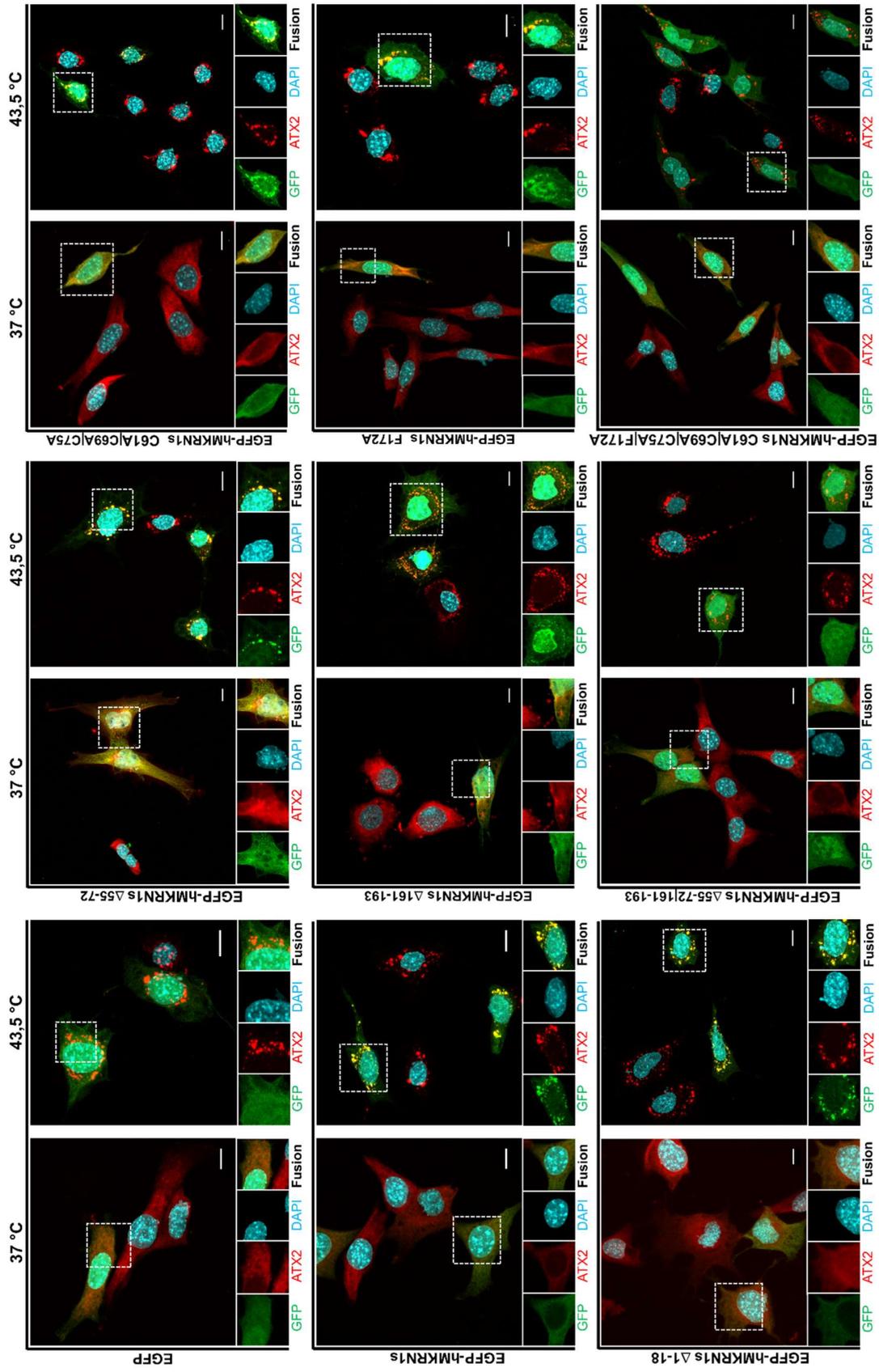


Abbildung 8 Rekombinantes EGFP-hMKRN1s akkumuliert in SGs.

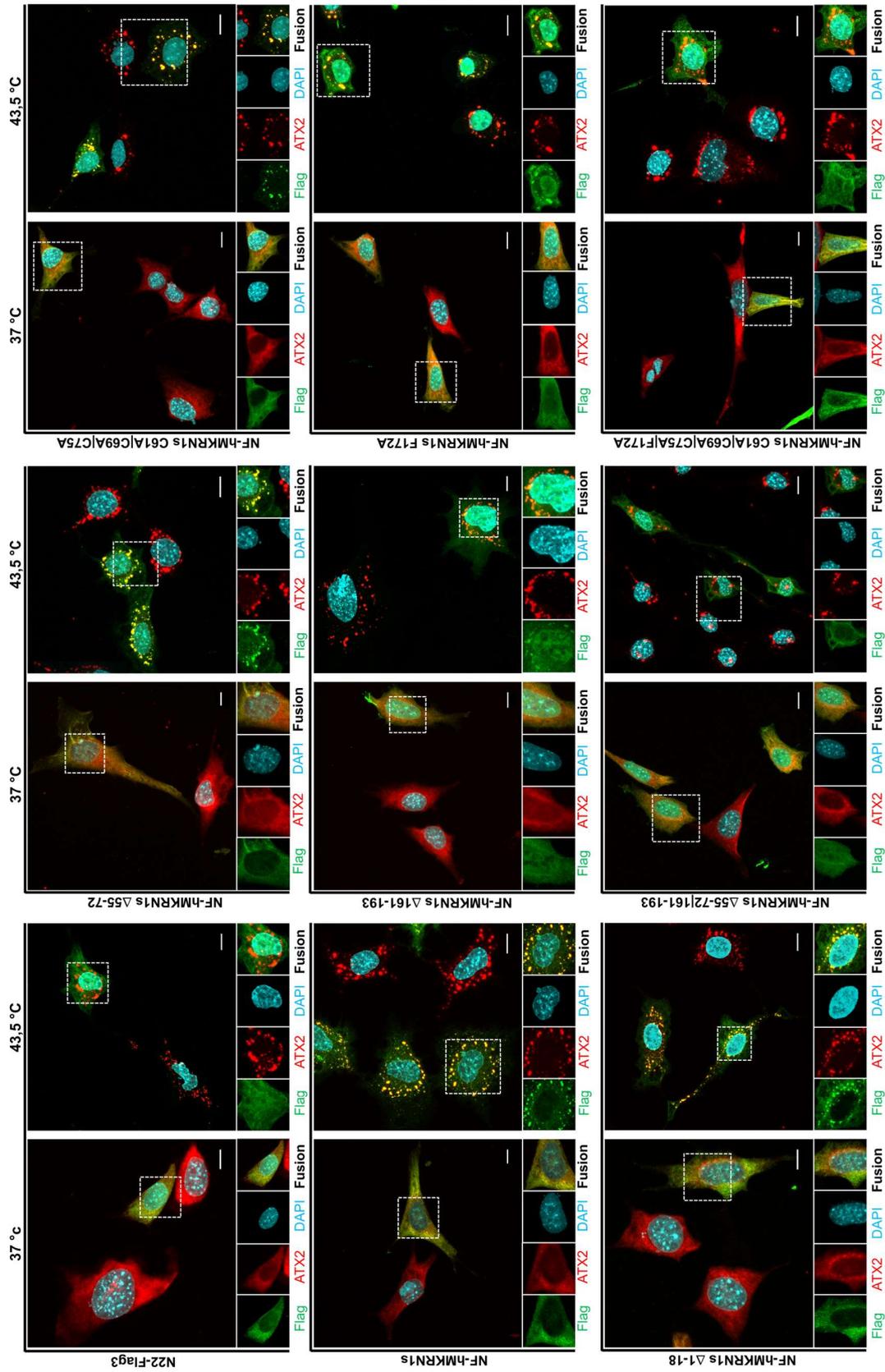


Abbildung 9 Rekombinantes NF-hMKNR1s akkumuliert in SGs.

6.3 Identifikation von hMKRN1s-Interaktionspartnern

Um die molekularen Grundlagen der beschriebenen MKRN1s-vermittelten Translationskontrolle besser zu verstehen, sollten Interaktionspartner des Proteins identifiziert und charakterisiert werden. Hierfür wurden EGFP-hMKRN1s und EGFP-hMKRN1_{SF172A} aus Lysaten transfizierter HEK293T-Zellen immunpräzipitiert (Abbildung 10). Die Präzipitate wurden mittels LC-MS-Massenspektrometrie analysiert.

Für die Auswertung der massenspektrometrischen Daten wurde der Parameter *peptide spectrum matches* (PSM) genutzt. Dieser Parameter beschreibt die gesamte Anzahl aller identifizierten Peptidspektren, die einem bestimmten Protein zugeordnet werden können (Frank, 2009). Hohe relative PSM-Werte deuten darauf hin, dass das entsprechende Protein in der untersuchten Proteinlösung in hoher Konzentration vorliegt.

Die Daten der EGFP-hMKRN1s-Immunpräzipitation (IP) wurden nach absteigender Differenz der PSM-Werte der EGFP-hMKRN1s- und EGFP-IP sortiert ($\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s}} = \text{PSM}_{\text{hMKRN1s}} - \text{PSM}_{\text{EGFP}}$). Alle putativen Interaktionspartner von hMKRN1s sind im Anhang in der Tabelle 1 aufgelistet und sortiert nach absteigend $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s}}$ -Wert. Der Schwellenwert für $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s}}$ wurde willkürlich auf 6 gesetzt. Tabelle 21 zeigt alle Interaktionspartner, die in der UniProt-Datenbank den Eintrag „RNA *binding*“ oder „*translation*“ aufwiesen (The UniProt, 2017, Stand Mai 2018). Dies traf für 29 % aller identifizierten Proteine zu (51 Treffer). In beiden Tabellen wurden PAM2-Motiv-abhängige Interaktionspartner orange vorgehoben. Putative Interaktionspartner erfüllten dieses Kriterium, wenn der PSM-Wert für EGFP-hMKRN1_{SF172A} mindestens zu 2/3 niedriger als der $\text{PSM}_{\text{hMKRN1s}}$ -Wert ist.

Unter den putativen Interaktionspartnern von hMKRN1s wurden einige Komponenten, die an der Translationsinitiation bzw. -elongation beteiligt identifiziert: das zytosolische PABPC1 (*polyadenylate-binding protein 1*, im folgenden PABP genannt), eIF4A1, eEF1A1, eEF1G, LARP1 (*La-related protein 1*), GCN1L1 (*eIF2 alpha kinase activator homolog*) und UPF1 (*regulator of nonsense transcripts 1*).

Proteine die nach Inaktivierung des PAM2-Motives (EGFP-hMKRN1_{SF172A}) an hMKRN1s nicht mehr effizient gebunden haben sind: PABP, TUBB8 (*tubulin beta-8 chain*), PABPC4, LARP1, PABPC3, PDLIM7 (*PDZ and LIM domain protein 7*), HNRNPH1 (*heterogeneous*

nuclear ribonucleoprotein H), DHX30 (*DExH-box helicase 30*), IMP1 (*insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1*), MOV10 (*moloney leukemia virus 10 protein*) und UPF1. Dies deutete darauf hin, dass ein aktives PAM2-Motiv essenziell ist für die Bindung dieser Interaktionspartner.

Die PAM2-Motiv-vermittelte Interaktion ist relevant, da hMKRN1s mit fehlenden oder inaktiven PAM2-Motiv nur ineffizient in der Lage war in SGs zu akkumulieren. Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass hMKRN1s mit RNA-regulierenden Proteinen, Translationsfaktoren und Regulatoren der Translation interagiert.

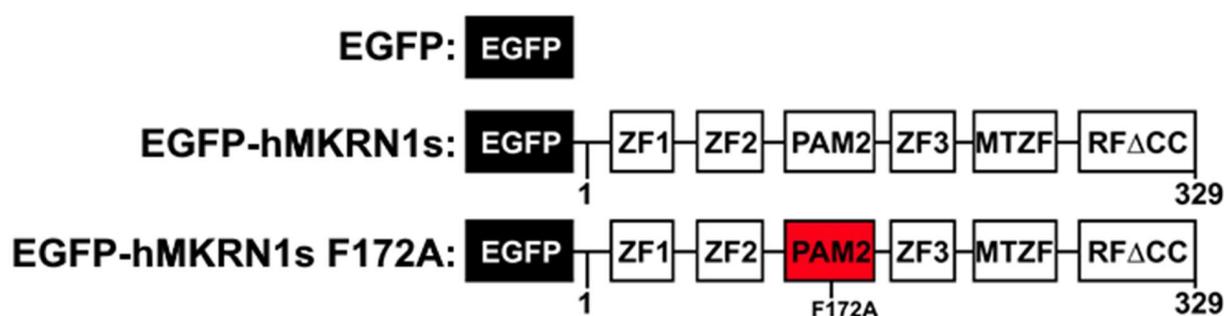


Abbildung 10 Schematische Darstellung der für die IP sowie die anschließende LC-MS-Analyse eingesetzten rekombinanten hMKRN1s-Proteine. Die rekombinanten Proteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert und mittels GFP-Trap-Agarose präzipitiert. Assoziierte Proteine wurden mittels LC-MS identifiziert.

Tabelle 21 hMKRN1s-IP LC-MS Daten sortiert nach $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s}}$. RNA-bindende und Translation-regulierende Proteine (n=1)

UniProt-Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s IP	hMKRN1s F172A IP	EGFP Kontroll IP
			PSM	PSM	PSM
Q9UHC7	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 (MKRN1)	53,315	546	437	31
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (PRKDC)	468,788	193	242	63
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 (PABPC1)	70,626	113	22	18
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 (DYNC1H1)	532,072	90	126	13
O14980	Exportin-1 (XPO1)	123,306	85	100	24
P06733	Alpha-enolase (ENO1)	47,139	87	49	28
Q92616	Translational activator GCN1 (GCN1L1)	292,572	60	83	4
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 (EEF1A1)	50,109	78	49	23
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP1)	60,306	83	96	31
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 (EEF1A1P5)	50,153	74	46	22

Ergebnisse

UniProt- Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s IP	hMKRN1s _{F172A} IP	EGFP Kontroll IP
			PSM	PSM	PSM
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma (CCT3)	60,495	64	60	14
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	59,714	73	62	25
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 (PABPC4)	70,738	58	10	12
Q6PKG0	La-related protein 1 (LARP1)	123,434	45	3	2
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I (EIF4A1)	46,125	48	39	15
P50991	T-complex protein 1 subunit delta (CCT4)	57,888	55	43	24
Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (HUWE1)	481,589	32	35	5
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2 (EEF1A2)	50,438	36	27	11
Q9H361	Polyadenylate-binding protein 3 (PABPC3)	69,987	31	9	7
Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))- methyltransferase (NSUN2)	86,416	31	29	7
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A (SMC1A)	143,144	27	46	3
P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial (TUFM)	49,51	39	36	16
P07814	Bifunctional glutamate/proline-- tRNA ligase (EPRS)	170,483	38	58	16
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta (CCT6A)	57,988	34	26	12
P26641	Elongation factor 1-gamma (EEF1G)	50,087	28	15	6
P42704	Leucine-rich PPR motif- containing protein, mitochondrial (LRPPRC)	157,805	22	28	0
P23396	40S ribosomal protein S3 (RPS3)	26,671	36	31	15
Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1 (HEATR1)	242,215	36	54	16
Q14147	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX34 (DHX34)	128,04	20	17	0
P02786	Transferrin receptor protein 1 (TFRC)	84,818	20	14	0
P05141	ADP/ATP translocase 2 (SLC25A5)	32,831	27	24	8
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 (UPF1)	124,267	37	21	19
P19338	Nucleolin (NCL)	76,568	28	11	11
O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A (DDX39A)	49,098	27	30	10
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (HNRNPH1)	49,198	49	21	33
Q9Y2L1	Exosome complex exonuclease RRP44 (DIS3)	108,934	23	26	8
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (HSD17B10)	26,906	18	21	3

Ergebnisse

UniProt-Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s IP	hMKRN1s _{F172A} IP	EGFP Kontroll IP
			PSM	PSM	PSM
P50454	Serpin H1 (SERPINH1)	46,411	17	11	2
Q14527	Helicase-like transcription factor (HLTF)	113,857	21	28	7
Q7L2E3	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 (DHX30)	133,855	18	5	4
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (SNRNP200)	244,353	30	37	17
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	61,016	29	36	16
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HNRNPF)	45,643	27	12	14
Q7L8L6	FAST kinase domain-containing protein 5 (FASTKD5)	86,519	13	12	0
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IMP1)	63,441	26	6	14
Q92973	Transportin-1 (TNPO1)	102,289	19	27	7
Q9HAV4	Exportin-5 (XPO5)	136,222	17	24	5
Q9UMR2	ATP-dependent RNA helicase DDX19B (DDX19B)	53,893	13	5	1
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic (YARS)	59,106	13	6	1
Q9HCE1	Putative helicase MOV-10 (MOV10)	113,599	13	2	1
O00411	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial (POLRMT)	138,532	12	14	0

Im *N22-tethering*-Experiment und der Untersuchung zur Akkumulation in SGs zeigte sich, dass ZF1 und das PAM2-Motiv von hMKRN1s essenziell für die Stimulation der Translation und die Interaktion mit Präinitiationskomplexen sind. In einer weiteren Analyse wurde untersucht in wie fern neben dem PAM2-Motiv auch ZF1 für die Assoziation mit einzelnen putativen Interaktionspartnern von Bedeutung ist. Hierfür wurden EGFP-hMKRN1_{s51-89} und EGFP-hMKRN1₁₅₁₋₂₀₃ aus Lysaten transfizierter HEK293T-Zellen immunpräzipitiert (Abbildung 11). Die Präzipitate wurden mittels LC-MS-Massenspektrometrie analysiert.

Die Daten der EGFP-hMKRN1_{s51-89} und EGFP-hMKRN1₁₅₁₋₂₀₃ Immunpräzipitationen wurden nach der absteigenden Differenz der PSM-Werte von EGFP-hMKRN1_{s151-203} und der EGFP-Kontrolle sortiert ($\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 151-203} = \text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 151-203} - \text{PSM}_{\text{EGFP}}$). Da die überwiegende Mehrheit der Interaktionspartner an EGFP-hMKRN1₁₅₁₋₂₀₃ band, wurde die Tabelle 22 und Anhang Tabelle 2 nach dem absteigenden $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 151-203}$ sortiert. In beiden Tabellen wurden orange unterlegte Interaktionspartner spezifisch mit EGFP-

hMKRN1s₅₁₋₈₉ assoziiert ($\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 51-89} = \text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 51-89} - \text{PSM}_{\text{EGFP Kontrolle}}$). Der Grenzwert für $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 51-89}$ und $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 151-203}$ wurde willkürlich auf 5 gesetzt. Tabelle 22 zeigt alle Interaktionspartner, die in der UniProt-Datenbank den Eintrag „RNA binding“ oder „translation“ aufwiesen.

Mit dem PAM2-Motiv (EGFP-hMKRN1s₁₅₁₋₂₀₃) interagierten überwiegend RNA-bindende Proteine (55 Treffer; 88,7 % aller Interaktionspartner). Neben PABP interagierte das PAM2-Motiv mit eIF2C2 (*protein argonaute-2*), eIF4G1, LARP1, MOV10 und UPF1. Dies deutete darauf hin, dass das PAM2-Motiv an der Interaktion mit Bestandteilen des Initiationskomplexes und Regulatoren der Translation interagiert.

Mit DHX9 (*protein ATP-dependent RNA helicase A*), einen Regulator des RNA-Metabolismus, und dem Zytoskelettprotein TUBA3E (*tubulin alpha-3E chain*) fanden sich zwei Interaktionspartner, die gleich stark mit ZF1 und dem PAM2-Motiv interagierten.

Nur wenige Proteine interagierten direkt mit ZF1. Dazu zählen PRKDC (*DNA-dependent protein kinase catalytic subunit*), TCP1 (*T-complex protein 1 subunit alpha*), ATP5A1 (*ATP synthase subunit alpha, mitochondrial*), CCT6A (*T-complex protein 1 subunit zeta*) und DYNC1H1 (*cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1*). Diese Proteine wurden bereits als mögliche Interaktionspartner des vollständigen hMKRN1s identifiziert (Tabelle 21). Die *in vivo* Funktionen dieser Proteine sind DNA Reparatur (PRKDC), Vesikeltransport (TCP1), ATP Synthese (ATP5A1), Proteinfaltung (CCT6A) und interzellulärer Cargo Transport (DYNC1H1) (Dun *et al.*, 2011; Reck-Peterson *et al.*, 2018; Seo *et al.*, 2010; Stock *et al.*, 1999; Yavuzer *et al.*, 1998).

Im Vergleich zum ZF1 banden die meisten translationsregulierenden Interaktionspartner über das PAM2-Motiv an hMKRN1s. Interaktionen, die nur durch ZF1 vermittelt wurden, zeigten keine direkte Interaktion zu Translationsfaktoren oder regulatorischen Proteinen. Unter den putativen Kandidaten sind LARP1 und UPF1 interessant, da sie translationsregulatorische Funktionen besitzen und sich durch eine starke Assoziation an hMKRN1s, in Form eines hohen ΔPSM -Wertes, auszeichnen.



Abbildung 11 Schematische Darstellung der für die IP sowie die anschließende LC-MS-Analyse eingesetzten hMKRN1s-Domänen. Die rekombinanten Proteine wurden in HEK293T-Zellen exprimiert und mittels GFP-Trap-Agarose präzipitiert. Assoziierte Proteine wurden mittels LC-MS identifiziert.

Tabelle 22 EGFP-hMKRN1s₅₁₋₈₉- und EGFP-hMKRN1₁₅₁₋₂₀₃-IP LC-MS Daten sortiert nach $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 151-203}$. RNA-bindende oder Translations-regulierende Proteine (n=1)

UniProt-Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s ₅₁₋₈₉ IP	hMKRN1s ₁₅₁₋₂₀₃ IP	EGFP Kontroll IP
			PSM	PSM	PSM
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 (PABPC1)	70,626	6	91	6
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 (PABPC4)	70,738	2	49	5
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRNPL)	64,092	0	41	0
Q9H361	Polyadenylate-binding protein 3 (PABPC3)	69,987	3	38	3
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 (UPF1)	124,267	0	33	0
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 (ILF3)	95,279	2	32	0
Q6PKG0	La-related protein 1 (LARP1)	123,434	0	32	0
Q9HCE1	Putative helicase MOV-10 (MOV10)	113,599	0	29	0
Q09161	Nuclear cap-binding protein subunit 1 (NCBP1)	91,781	0	19	0
Q9NZ18	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IMP1)	63,441	4	19	2
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (HNRNPM)	77,464	6	17	1
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2 (ILF2)	43,035	2	15	1
Q4VXU2	Polyadenylate-binding protein 1-like (PABPC1L)	68,349	0	14	1
O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3)	63,666	0	12	0
O43143	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 (DHX15)	90,875	1	12	0
Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 (SRRM2)	299,438	0	12	0
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (HNRNPR)	70,899	2	13	2

Ergebnisse

UniProt- Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s ⁵¹⁻⁸⁹	hMKRN1s ¹⁵¹⁻²⁰³	EGFP Kontroll IP
			IP	IP	IP
			PSM	PSM	PSM
Q9UKV8	Protein argonaute-2 (EIF2C2)	97,146	0	11	0
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A (DHX9)	140,869	15	16	6
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1)	57,186	1	12	2
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 (HNRNPUL1)	95,679	0	10	0
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)	70,854	17	34	25
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (EIF4G1)	175,382	0	13	4
Q9UHC7	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 (MKRN1)	53,315	7	10	1
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (HNRNPC)	33,65	0	9	0
Q9UL18	Protein argonaute-1 (AGO1)	97,152	0	9	0
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (IGF2BP2)	66,081	0	9	0
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK)	50,944	1	14	6
O14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRNPDL)	46,409	1	9	1
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit (U2AF2)	53,467	0	8	0
P42694	Probable helicase with zinc finger domain (HELZ)	218,833	0	8	0
Q8TEQ6	Gem-associated protein 5 (GEMIN5)	168,483	0	8	0
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (PRKDC)	468,788	25	18	11
P16989	Y-box-binding protein 3 (YBX3)	40,066	1	10	3
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (HNRNPH1)	49,198	1	9	2
Q96SB4	SRSF protein kinase 1 (SRPK1)	74,278	0	7	0
Q9H9G7	Protein argonaute-3 (AGO3)	97,298	0	7	0
Q9UHX1	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (PUF60)	59,838	0	7	0
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (SYNCRIP)	69,56	2	9	3
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (HNRNPD)	38,41	1	7	1
Q14444	Caprin-1 (CAPRIN1)	78,318	0	7	1
Q14684	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B (RRP1B)	84,375	2	7	1
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1 (SRRM1)	102,274	0	6	0
Q96S19	Spermatid perinuclear RNA- binding protein (STRBP)	73,606	0	6	0
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP1)	60,306	12	8	7

UniProt- Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s ₅₁₋₈₉ IP	hMKRN1s ₁₅₁₋₂₀₃ IP	EGFP Kontroll IP
			PSM	PSM	PSM
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	59,714	9	5	4
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta (CCT6A)	57,988	7	2	2
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 (DYNC1H1)	532,072	7	1	1

6.4 Validierung putativer Interaktionen

Um die putativen Interaktionspartner zu validieren wurden NF-hMKRN1s, NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A}, NF-hMKRN1s_{F172A} und NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A|F172A} aus HEK293T-Zellysten immunpräzipitiert (Abbildung 12A). Als Negativkontrolle diente NF-rShank3₁₋₂₉₀. Um RNA-abhängige und -unabhängige Interaktionen voneinander unterscheiden zu können wurde die RNA mittels RNase One abgebaut (Spahr und Hollingworth, 1961).

Die Immunpräzipitate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen einzelne putative hMKRN1s-Interaktionspartner untersucht. Die untersuchten Proteine konnten im HEK293T-Zellysat nachgewiesen werden (Abbildung 12B und C). Mit Ausnahme von NF-hMKRN1s_{F172A} und NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A|F172A} wurde eIF4G, LARP1, PABP und UPF1 durch NF-hMKRN1s-Varianten kopräzipitiert (Abbildung 12B). UPF1 wurde nach RNA-Abbau weniger effizient kopräzipitiert. SMG1 (*nonsense mediated mRNA decay associated PI3K related kinase*) kopräzipitierte mit allen NF-hMKRN1s-Varianten nach RNA-Abbau. Der RNA-Abbau degradierte die 28S und 18S rRNA vollständig. In Lysaten ohne RNase One-Behandlung blieb die 28S und 18S RNA intakt. Die putativen Interaktionspartner eIF2C2, eIF4A, GCN1L1, hnRNP H und IMP1 kopräzipitierten mit NF-rShank3₁₋₂₉₀ und allen NF-hMKRN1s-Varianten (Abbildung 12C). Die Interaktion von hMKRN1s mit den putativen Partnern eIF4G, LARP1 und UPF1 wurde damit im Western Blot bestätigt. Zusätzlich zeigte SMG1 eine Bindung an hMKRN1s, aber nur in Abwesenheit von RNA. SMG1 war kein putativer Interaktionspartner von hMKRN1s, wurde aber als Komponente des SURF- (SMG1-UPF1-eRF1-eRF3) Komplexes analysiert, um eine mögliche Rolle von hMKRN1s am *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) zu untersuchen. Da die Abwesenheit von RNA eine artifizielle Situation darstellt, ist davon auszugehen, dass SMG1 *in vivo* nicht mit hMKRN1s interagiert. Das eIF4G,

LARP1, PABP und UPF1 nicht an NF-hMKRN1_{SF172A} und NF-hMKRN1_{SC61A|C69A|C75A|F172A} binden, deutet darauf hin, dass das PAM2-Motiv für diese Interaktionen essenziell ist. Weiterhin lässt sich vermuten, dass die PAM2-Motiv-vermittelten Interaktionen PABP als Interaktionsgerüst zur Bindung an hMKRN1s nutzen. Die Interaktionen von LARP1, PABP und eIF4G mit NF-hMKRN1s sind nicht RNA-abhängig. Die Interaktion von NF-hMKRN1s mit UPF1 ist dagegen partiell RNase-sensitiv. Die weiteren putative Bindungskandidaten eIF2C2, eIF4A, GCN1L1, hnRNP H und IMP1 kopräzipitierten auch mit NF-rShank3₁₋₂₉₀ und wurden deshalb als unspezifische Bindungspartner klassifiziert.

Um zu untersuchen, ob hMKRN1s auch *in vivo* mit den Regulatoren der Translation LARP1 und UPF1 interagiert, wurden IPs in kortikalen Lysaten der adulten Ratte mit Antikörpern gegen endogenes LARP1, MKRN1s bzw. UPF1 durchgeführt. Die Präzipitate wurden im Western Blot auf eine Kopräzipitation von PABP und MKRN1s, bzw. LARP1 in der IP von MKRN1s, hin analysiert.

Mittels der genutzten Antikörper war es möglich LARP1 und UPF1 zu präzipitieren (Abbildung 13A und B). Die IP beider Proteine führte zur Kopräzipitation von endogenen PABP. MKRN1s wurde in den LARP1- bzw. UPF1-IPs nicht kopräzipitiert. Endogenes MKRN1s konnte nicht erfolgreich mit dem α -MKRN1s-Pineda-Antiserum präzipitiert werden (Abbildung 13B). Neben einer möglichen schwachen Bande mit dem Molekulargewicht von MKRN1s im Western Blot sind Kreuzreaktivitäten vorhanden. Mit dem Pineda-Antiserum wurde PABP kopräzipitiert. Die beobachtete starke Bande auf Höhe von LARP1 in der MKRN1s-IP ist auf Kreuzreaktivitäten zurückzuführen. Zwölf weitere kommerzielle Antikörper gegen MKRN1s wurden für die Arbeit getestet. Keines davon war spezifisch für MKRN1s und viele wiesen zahlreiche Kreuzreaktivitäten auf (Daten nicht gezeigt).

Die Validierung der putativen Interaktionspartner bestätigte die Interaktion von hMKRN1s mit den Translationsinitiationsfaktor eIF4G und den Translationsregulatoren LARP1 und UPF1. Da diese Interaktionen ein funktionelles PAM2-Motiv voraussetzen ist davon auszugehen, dass PABP als Interaktionsgerüst an der Interaktion beteiligt ist. In den IPs gegen endogenes Protein konnte gezeigt werden, dass LARP1 und UPF1 an PABP binden. Die IP von endogenen MKRN1s war nicht möglich, da kein Antiserum gegen MKRN1s für IPs zur Verfügung steht. Die Interaktion mit den RNA-bindenden putativen

Interaktionspartnern EIF2C2, eIF4A, GCN1L1, hnRNP H und IMP1 konnte nicht bestätigt werden.

Da sich LARP1 und UPF1 als spezifische Interaktionspartner bestätigen ließen und diese beiden eine Rolle in der Translationsregulation einnehmen, fokussiert sich weitere funktionelle Untersuchungen auf diese beiden Proteine.

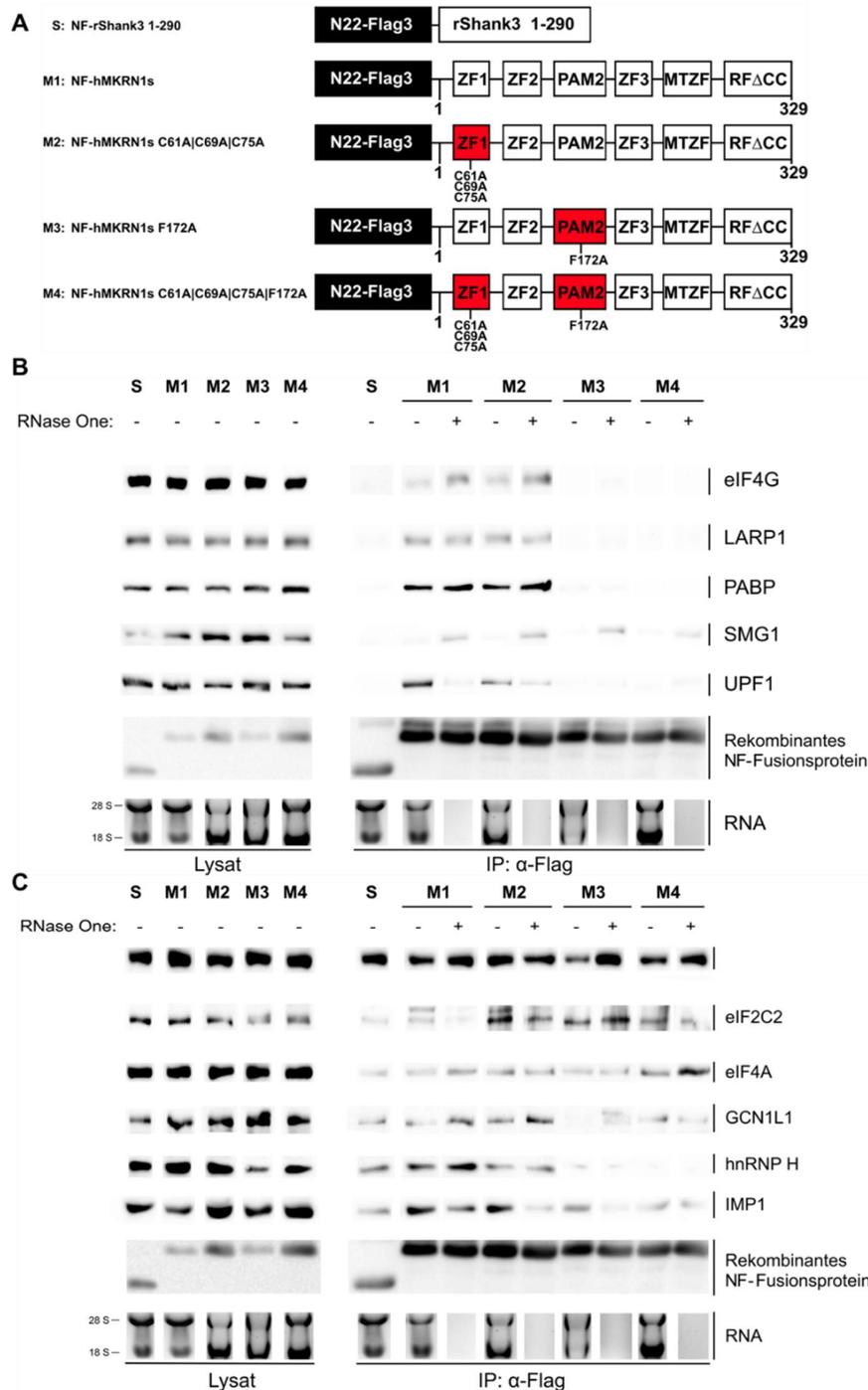


Abbildung 12 Kopräzipitation endogener Interaktionspartner von hMKRN1s.

Abbildung 12 Kopräzipitation endogener Interaktionspartner von hMKRN1s. A) NF-rShank3-1-290 (S) und vollständige NF-hMKRN1s-Varianten mit und ohne Aminosäureaustausch (M1-4) wurden aus HEK293T-Zelllysaten immunpräzipitiert. Zum Ausschluss von RNA-abhängigen Bindungen wurde die RNA mit der RNase One abgebaut. B, C) Kopräzipitierte Proteine wurden im Western Blot mittels spezifischer Antikörper analysiert. Die rekombinanten Fusionsproteine wurden mit Flag-Epitop spezifischen Antikörper detektiert. Die Detektion von endogenen LARP1 erfolgte mit dem Cell Signaling #14763 Antikörper. In IPs ohne RNase-Behandlung (-) blieben die Banden für 28S und 18S rRNA erhalten. Unter RNase-Verdau (+) war keine rRNA mehr nachweisbar. B) Die putativen Interaktionspartner eIF4G, LARP1, PABP und UPF1 kopräzipitierten mit NF-hMKRN1s Varianten M1 und M2 (n=3). Die Interaktion mit SMG1 erfolgt mit allen NF-hMKRN1s-Varianten (M1-4) nach RNA-Abbau. Die Interaktion zwischen UPF1 und NF-hMKRN1s (M1 und M2) ist partiell RNase-sensitiv. Keines der Proteine interagierte unspezifisch mit NF-rShank3₁₋₂₉₀ (S). C) Weitere putative Interaktionspartner von hMKRN1s kopräzipitieren mit NF-rShank3₁₋₂₉₀ (S) und NF-hMKRN1s (M1-M4) (n=3).

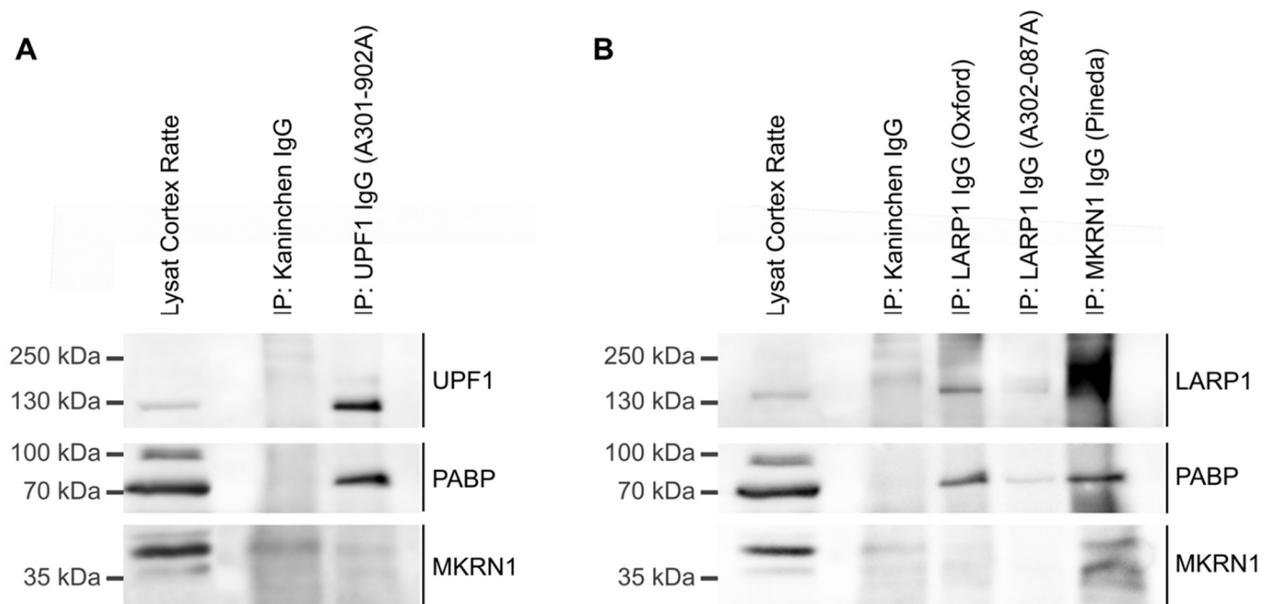


Abbildung 13 Analyse Protein-Interaktionen in Ratten Cortex. Endogenes LARP1, MKRN1s und UPF1 wurden aus kortikalen Lysaten von adulten weiblichen Ratten mittels spezifischer Antikörper immunpräzipitiert. Die IP mit Kaninchen Immunglobulin G (IgG) dient als Negativkontrolle. Im Western Blot wurden Präzipitate auf die Kopräzipitation von LARP1, PABP und MKRN1s analysiert. A) Die IP mit spezifischen UPF1 Antikörpern führte zur Präzipitation endogenen UPF1 und zur Kopräzipitation von PABP (n=3). Unspezifische Bindungen in der IP mit Kaninchen-IgG waren nicht nachweisbar. Im Lysat war MKRN1s, PABP und UPF1 nachweisbar. B) Endogenes LARP1 konnte mit beiden getesteten Antikörpern präzipitiert werden (n=3). Beim Bethylantikörper A302-087A konnte eine effizientere Präzipitation beobachtet werden. Zusammen mit endogenen LARP1 kopräzipitierte PABP, nicht aber MKRN1s. Die Präzipitation von MKRN1s war nicht spezifisch, da eine im Western Blot eine Kreuzreaktivität mit ähnlichen Molekulargewicht wie MKRN1s nachweisbar war (n=3). PABP wurde durch das Pineda-Antiserum kopräzipitiert. Die Kaninchen-IgG-Negativkontrolle zeigte keine unspezifischen Bindungen auf. Die Detektion von LARP1 im Western Blot erfolgte mittels Bethyl A302-087A Antikörper.

6.5 Rolle von UPF1 bei der MKRN1s-vermittelten Stimulation der Translation

In vorrangigen Untersuchungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass UPF1 mit hMKRN1s assoziiert. Diese Interaktion wurde durch das PAM2-Motiv vermittelt und benötigt vermutlich PABP als Interaktionsgerüst. Mittels Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass endogenes UPF1 an endogenes PABP assoziiert. Da auch das Fehlen des PAM2-Motives die Translationsstimulation und die Akkumulation in SGs beeinträchtigt, ist davon auszugehen, dass Interaktionen über das PAM2-Motiv funktionell relevant sind. UPF1 ist ein essenzieller Bestandteil des NMD (Kashima *et al.*, 2006), besitzt aber auch translationsfördernde Eigenschaften (Graber *et al.*, 2017; Isken *et al.*, 2008; Nott *et al.*, 2004).

Um die Rolle von UPF1 bei der Translationsstimulation durch hMKRN1s zu untersuchen, wurden *N22-tethering*-Experimente mit hMKRN1s in Abwesenheit von UPF1 durchgeführt. Die Konzentration von endogenem UPF1 wurde mit Hilfe von siRNAs in HeLa-Zellen reduziert (*knockdown*-Methode). Getestet wurden vier UPF1-spezifische, zwei Kontroll-siRNAs, die nicht komplementär zu bekannten humanen Transkripten sind, und Kontrollen ohne siRNA, die nicht mit dem Transfektionsreagenz behandelt wurden. Je zwei UPF1-spezifische siRNAs sowie eine Kontroll-siRNA wurden mit DharmaFECT 1 (siUPF1 #1 und #2 und Kontroll-siRNA #2) oder Lipofectamine RNAiMAX (siUPF1 #3 und #4 und Kontroll-siRNA #1) transfiziert. Der *N22-tethering*-Experiment wurde mit dem Referenzpeptid N22-Flag3, den internen Kontrollen NF-rShank3₁₋₂₉₀ und N-hDDX6, sowie für NF-hMKRN1s durchgeführt.

Um zu kontrollieren, ob der *knockdown* effizient war, wurden die HeLa-Zelllysate nach der Messung der Luciferase Aktivitäten mittels Western Blot analysiert. Wie in den Abbildung 14A und B zu sehen, führte die Behandlung mit UPF1-spezifischen siRNAs zu einer deutlichen Reduktion der UPF1-Menge. Nach Transfektion von siUPF1 #1 und #2 war eine Reduktion der UPF1-Konzentration um 70 % bzw. 73 % zu beobachten (Abbildung 14A). Nach Transfektion von siUPF1 #3 und #4 war eine Reduktion der UPF1-Konzentration um 93 % bzw. 97 % beobachtet werden (Abbildung 14B). Die Transfektion mit einer der Kontroll-siRNAs führte zu keiner signifikanten Veränderung der UPF1-Menge verglichen mit unbehandelten Zellen. Bedingt durch den Einsatz verschiedener Transfektionsreagenzien für siUPF1 #1/2 und siUPF1 #3/4 erfolgte die Auswertung getrennt nach dem jeweiligen Reagenz. Die Transfektion mit Kontroll- sowie UPF1-

spezifischen-siRNAs mit beiden Transfektionsreagenzien zeigte keinen Einfluss auf die nPhoLuc-Aktivität von NF-rShank3₁₋₂₉₀ und der RNA-Degradation durch N-hDDX6.

In unbehandelten Kontrollzellen zeigte NF-hMKRN1s einen translationsstimulierenden Effekt mit 4-fach erhöhter nPhoLuc-Aktivität (Abbildung 14C und D). Nach Behandlung mit siUPF1 #1 und #2 wurde eine Reduktion der Translationsstimulation durch NF-hMKRN1s beobachtet (Abbildung 14C). Dabei zeigte nur siUPF1 #2 eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontroll-siRNA #2 (Reduktion um 23 %). Im Vergleich zur Kontrolle ohne siRNA zeigten beide siRNAs eine signifikante Reduktion (Reduktion um 24 % (#1) bzw. 32 % (#2)). Die Kontroll-siRNA #2 zeigte bei der Transfektion mit DharmaFECT 1 keinen Effekt auf die Translationsstimulation durch NF-hMKRN1s.

Die Transfektion von siUPF1 #3 und #4 mit Lipofectamine RNAiMAX bewirkte bereits eine Reduzierung der hMKRN1s-vermittelten Translationsstimulation (Abbildung 14D). Die Transfektion mit Kontroll-siRNA #1 führte beim Einsatz des Lipofectamines zu einer signifikanten Reduktion der Translationsstimulation durch NF-hMKRN1s gegenüber nicht transfizierten Zellen (Reduktion um 17 %). Gegenüber der Kontroll-siRNA #1 führte nur siUPF1 #3 zur signifikanten Reduktion (Reduktion um 35 %). Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle zeigte die sich bei Verwendung von siUPF1 #3 und #4 eine signifikante Reduktion der Translationsstimulation durch NF-hMKRN1s (Reduktion um 46 % (#3) bzw. 16 % (#4)).

Zusammenfassend zeigte sich im Trend, dass die Reduktion der UPF1-Menge in HeLa Zellen zur um ca. 30 % verminderten translationsfördernden Wirkung durch hMKRN1s führte. So zeigten zwar nur zwei siRNAs eine signifikante Reduktion der translationsfördernden Wirkung durch hMKRN1s im Vergleich zu den Kontroll-siRNAs, aber alle vier getesteten siRNAs zeigten eine signifikante Reduktion im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Dies lässt vermuten, dass UPF1 an der Regulation der Translation durch hMKRN1s beteiligt sein ist.

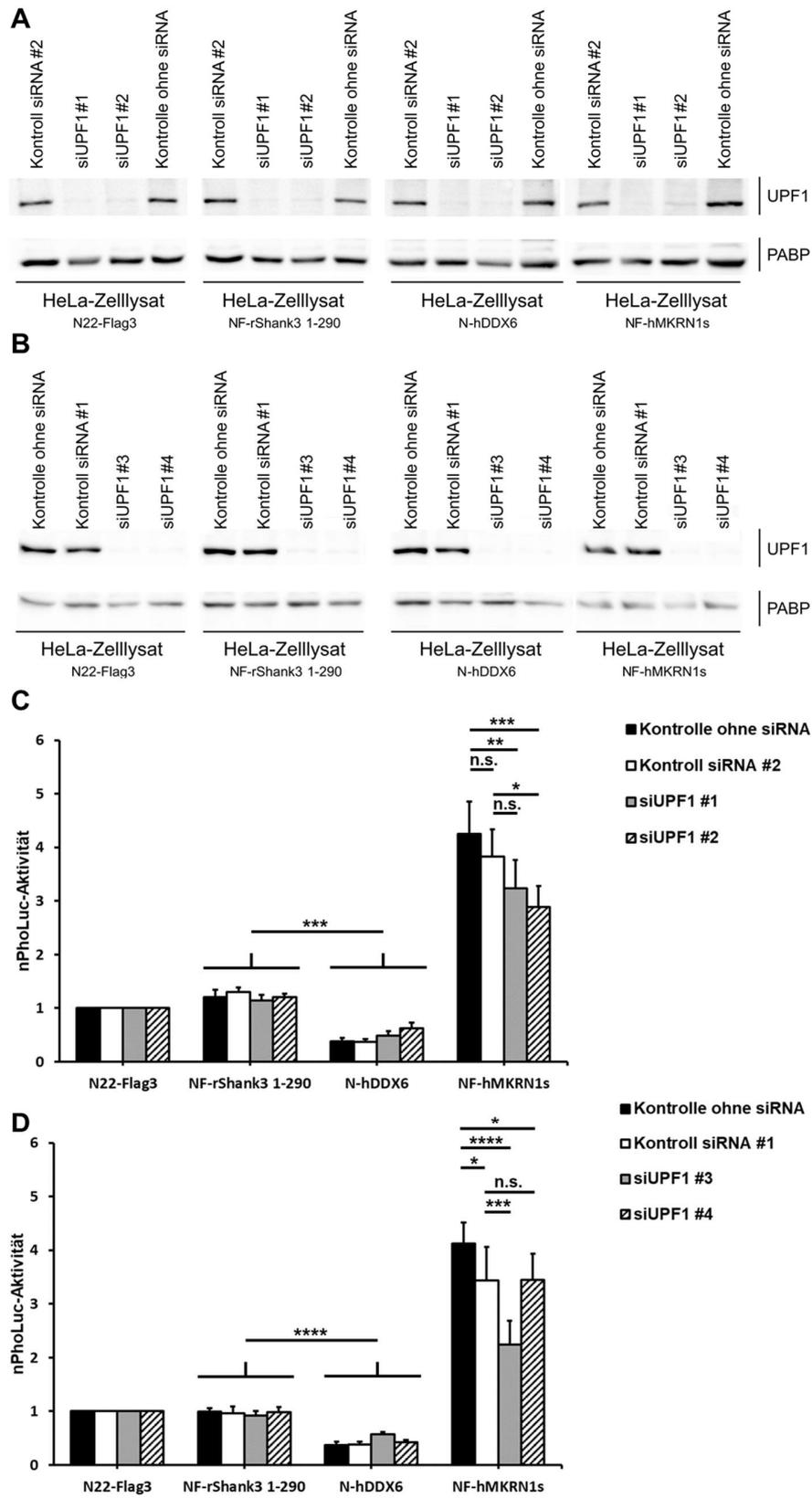


Abbildung 14 Translationsstimulation von hMKRN1s unter UPF1-knockdown.

Abbildung 14 Translationsstimulation von hMKRN1s unter UPF1-knockdown. HeLa-Zellen wurden zeitgleich zur Aussaat mit UPF1-spezifischer siRNAs oder einer Kontroll-siRNA transfiziert. Anschließend erfolgte die Transfektion für das *N22-tethering*-Experiment. Zelllysate wurden für Western Blot-Analysen und die Messung der PhoLuc- und RenLuc-Aktivität genutzt. A, B) Die siUPF1 #1-4 bewirkten eine deutliche Reduktion der UPF1-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen (Reduktion der UPF1-Menge um 70 % (#1), 73 % (#2), 93 % (#3) und 97 % (#4)). Die Kontroll-siRNAs zeigten keinen Einfluss auf die UPF1-Menge. PABP diente als Ladekontrolle. C, D. Im *N22-tethering*-Experiment hatten die siRNAs keinen Einfluss auf die nPhoLuc-Aktivitäten der NF-rShank3₁₋₂₉₀- und N-hDDX6-Proben. Zwischen beiden Probensätzen zeigte sich eine deutliche Erniedrigung der nPhoLuc-Aktivität in N-hDDX6 Proben im Vergleich zur NF-rShank3₁₋₂₉₀ Kontrolle (*two-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$)). C) siUPF1 #1 zeigte im Vergleich zur Kontroll-siRNA #2 keinen Effekt auf die hMKRN1s-vermittelte Stimulation der Translation. siUPF1 #2 reduzierte die NF-hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation deutlich. Unter siUPF1 #1- und #2-Behandlung wurde eine verminderte Translationsstimulation durch NF-hMKRN1s im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet (n=5). Die Transfektion mit der Kontroll-siRNA #2 hatte keinen Einfluss auf die hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. D) Unter siUPF1 #3 und #4 wurde eine Erniedrigung der hMKRN1s-vermittelten Stimulation der Translation gegenüber der unbehandelten Kontrolle beobachtet (n=6). Nur die siUPF1 #3 wies einen signifikanten partiellen Verlust der translationsfördernden Wirkung auf. Bei Behandlung mit Lipofectamine RNAiMAX wurde für die Kontroll-siRNA #1 ein partieller Verlust der translationsfördernden Wirkung durch NF-hMKRN1s nachgewiesen. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (n.s. $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$).

6.6 Rolle von LARP1 bei der MKRN1s-vermittelten Stimulation der Translation

LARP1 ist ein RNA-bindendes Protein, welches die Translation von 5'TOP-mRNAs reguliert (Hong *et al.*, 2017; Lahr *et al.*, 2017; Philippe *et al.*, 2018). Mit den vorhergehenden Befunden konnte gezeigt werden, dass endogenes LARP1 mit PABP und hMKRN1s interagiert. Da LARP1 über das PAM2-Motiv an hMKRN1s bindet und das Fehlen des PAM2-Motives die Translationsstimulation und Akkumulation in SGs von hMKRN1s beeinträchtigt, könnte die Interaktion von hMKRN1s mit LARP1 funktionell für die Translationsregulation durch hMKRN1s von Bedeutung sein.

Um die Rolle von LARP1 zu charakterisieren, wurde die translationsfördernde Wirkung von hMKRN1s bei gleichzeitiger Reduktion der LARP1-Konzentration in der Zelle untersucht. Mittels der CRISPR/Cas9-Technik wurden LARP1-defiziente HeLa-Zellen erzeugt. Die Validierung der resultierenden *knockout*-Klone erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung LARP1-spezifischer Antikörper. Wie die Abbildung 15 zeigt, war kein LARP1-Protein mit korrektem Molekulargewicht in den *knockout*-Klonen mehr nachweisbar. Die Mehrheit der Klone exprimierte allerdings in unterschiedlichen Ausmaß verkürzte LARP1-Proteine im Größenbereich von 110 bis 130 kDa. Für die funktionellen Analysen wurden die LARP1-*knockout*-Klone #9 und #11 ausgewählt, da in ihnen keine LARP1-Varianten nachgewiesen werden konnten.

Ergebnisse

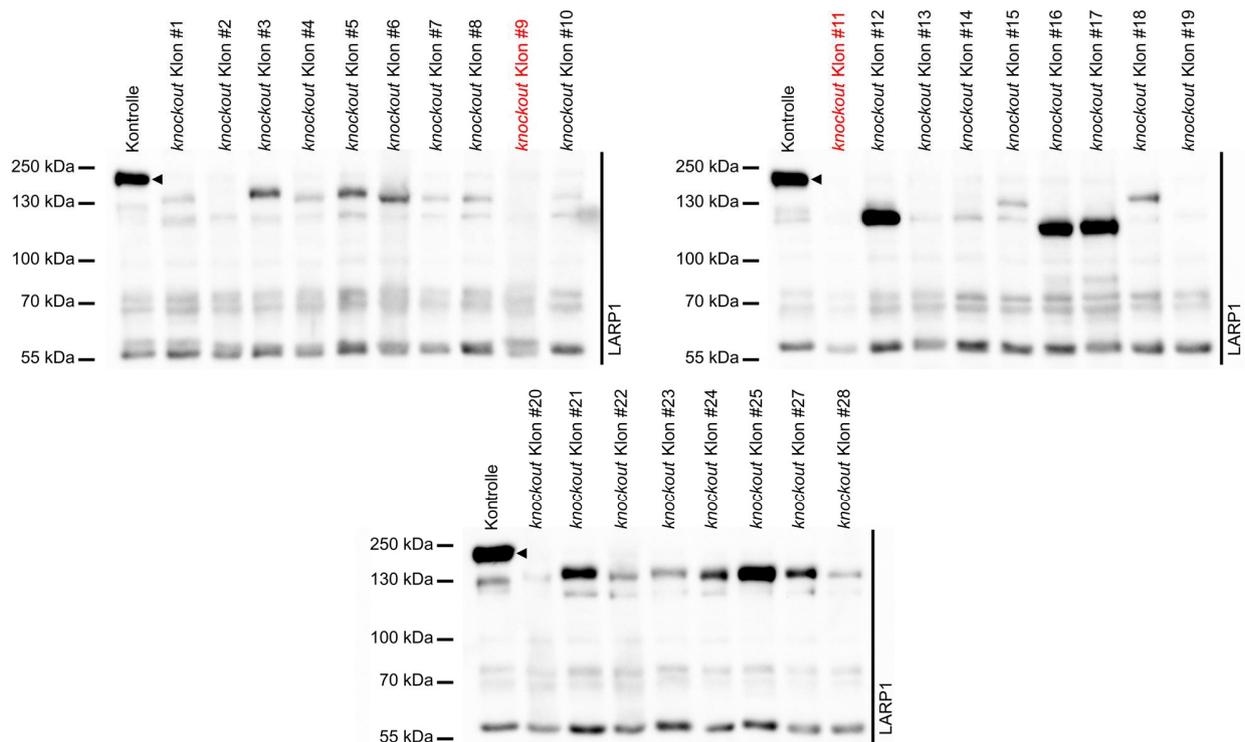


Abbildung 15 LARP1-knockout mittels CRISPR/CAS9. HeLa-Zellen wurden mit LARP1-CRISPR/Cas9-*knockout*-Plasmid und LARP1-HDR-Plasmid kotransfiziert. Nach der Selektionierung mittels Puromycin wurden die *knockout*-Klone im Western Blot auf die Präsenz von LARP1 hin analysiert. Die Detektion von endogenen LARP1 erfolgte mit dem Cell Signaling #14763 Antikörper. Untransfizierte HeLa-Zellen dienten als Kontrolle für endogenes LARP1 (Pfeil). Die Mehrheit der Klone exprimierten unvollständige LARP1-Varianten. Die Klone #9 und #11 exprimierten kein detektierbares unvollständiges LARP1-Protein und wurden für die weiteren Analysen verwendet (Rote Markierung).

Zur Wiederherstellung der ursprünglichen LARP1-Menge in den *knockout*-Klonen, im Folgenden *rescue* genannt, wurden Zellen mit einem LARP1-Expressionsplasmid transfiziert (kodiert LARP1-Isoform mit dem NCBI-Eintrag XP_005268461.1). Das rekombinante LARP1 (recLARP1) besitzt eine identische Größe wie das endogene Protein (Abbildung 16B). Das *N22-tethering*-Experiment wurde in den LARP1-*knockout*-Zellen identisch zu den Versuchen in kortikalen Zellen durchgeführt. Dabei wurden *knockout*-Zellen mit und ohne *rescue* verwendet. Der *rescue* führte über alle Zellen gemittelt zur Wiederherstellung von lediglich 38 % der endogenen LARP1-Menge von unbehandelten Zellen (Abbildung 16B). Zellen, die recLARP1 überexprimierten, starben vermehrt ab, sodass zum Zeitpunkt der Ernte für die Luciferase-Messung der Zellrasen weniger dicht war als in *knockout*- oder Kontrollzellen. Der relative Anteil transfizierter Zellen reduzierte sich kontinuierlich über drei Tage nach der Transfektion. Es ist anzunehmen, dass die Expression von recLARP1 unter Kontrolle eines CMV-Promoters zelltoxisch für HeLa-Zellen ist.

Ergebnisse

Die beiden LARP1-*knockout*-Klone #9 und #11 führten zu einem partiellen Verlust der translationsfördernden Wirkung von hMKRN1s auf die Reporter-mRNA (Abbildung 16C). Die nPhoLuc-Aktivität von NF-hMKRN1s verringerte sich in den *knockout*-Klonen um 47 %. Die Expression von recLARP1 (~38 % der Menge des endogenen Proteins in unbehandelten Kontrollzellen) bewirkte eine leichte, aber nicht signifikante Steigerung der Translationsstimulation der Reporter-mRNA um 14 %. Weder *knockout*- noch *rescue*-Zellen wiesen Unterschiede in der nPhoLuc-Aktivität von NF-rShank3₁₋₂₉₀ und N-hDDX6 im Vergleich zu Kontrollzellen auf.

Das Ergebnis des *N22-tethering*-Experimentes an LARP1-*knockout*-Zellen deutet darauf hin, dass die Interaktion von LARP1 mit hMKRN1s essenziell für die Translationsstimulation ist. Das Ausmaß des partiellen Verlustes der translationsfördernden Wirkung von hMKRN1s unter LARP1-*knockout* ist vergleichbar mit dem partiellen Verlust durch Inaktivierung oder Fehlen des PAM2-Motives in kortikalen Neuronen. Der *rescue* stellte im Trend nur partiell den vollen translationsfördernden Effekt von hMKRN1s wieder her. Es ist davon auszugehen, dass die Wiederherstellung endogener LARP1-Mengen nicht möglich ist, da die CMV-Promotor-gesteuerte recLARP1-Expression zelltoxisch wirkt.

Mit den LARP1-*knockout*-Zellen konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von LARP1 den translationsfördernden Effekt von NF-hMKRN1s vermindert. Die Wiederherstellung endogener LARP1-Mengen zur Analyse, ob der beobachtete Effekt spezifisch auf das Fehlende LARP1 zurückzuführen ist, war nicht möglich. Zur weiteren Validierung des Einflusses von LARP1 auf die hMKRN1s-vermittelte Translationsregulation wurde die translationsfördernde Wirkung von NF-hMKRN1s unter siRNA-induzierten LARP1-*knockdown* durchgeführt. Dafür wurden HeLa-Zellen mit Kontroll-siRNA #1 oder einer von zwei LARP1-spezifischen siRNAs (siLARP1 #1 und #2) transfiziert. Kontrollen ohne siRNA wurden nicht mit der Transfektionsreagenz Lipofectamine RNAiMAX behandelt.

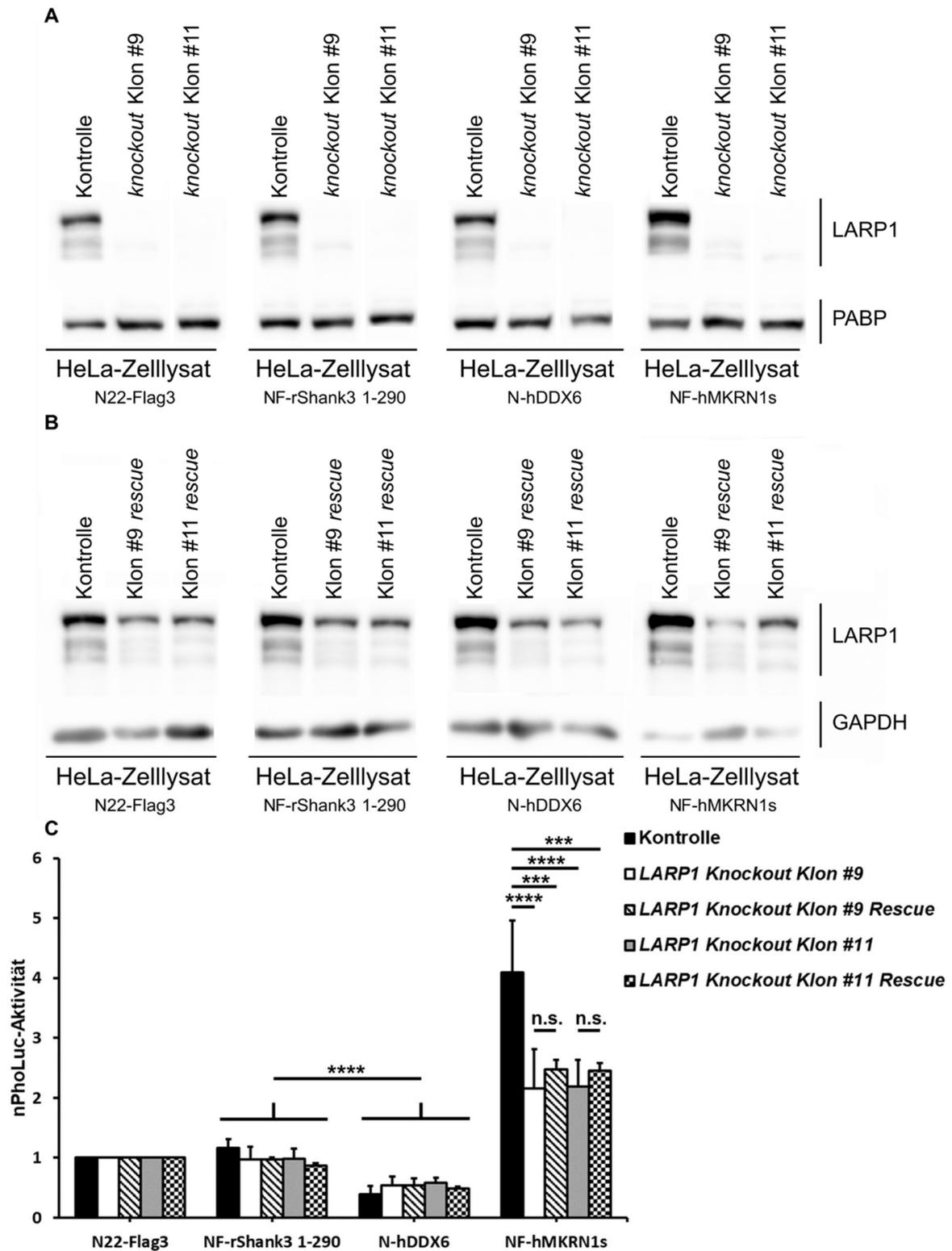


Abbildung 16 Translationsstimulation von hMKRN1s unter LARP1-knockout.

Abbildung 16 Translationsstimulation von hMKRN1s unter LARP1-knockout. Unbehandelte HeLa- und LARP1-knockout-Zellen mit (n=5) und ohne (n=15) *rescue* wurden transfiziert für das *N22-tethering*-Experiment. Zelllysate wurden für Western Blot-Analysen und für die Messung der PhoLuc- und RenLuc-Aktivität genutzt. A, B) In beiden LARP1-knockout-Zelllysaten wurde kein LARP1 nachgewiesen. Die Zelllysate von *rescue*-Zellen enthielten im Mittel 38 % der endogenen LARP1-Menge von unbehandelten Kontrollzellen. Die Auswertung erfolgte im Western Blot mittels LARP1-Antikörper (Bethyl A302-087A) und PABP- sowie GAPDH-spezifischen Antikörper als Ladekontrolle. C) In beiden LARP1-knockout-Klone wurde die Erniedrigung der nPhoLuc-Aktivität in NF-hMKRN1s-Lysaten um 47 % beobachtet. Durch *rescue* mit recLARP1 wurde eine Steigerung der nPhoLuc-Aktivität um 14 % beobachtet. Im Vergleich zu den *knockout*-Zellen war dieser Effekt nicht signifikant. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (n.s. $p > 0,05$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$). Weder der LARP1-knockout noch die Expression von recLARP1 hatten Einfluss auf die nPhoLuc-Aktivitäten von NF-rShank3₁₋₂₉₀ und N-hDDX6 Proben. Gegenüber NF-rShank3₁₋₂₉₀ zeigte N-hDDX6 eine deutliche Erniedrigung der nPhoLuc-Aktivität (*two-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (**** $p \leq 0,0001$)).

Die Inkubation von HeLa-Zellen mit siLARP1 #1 und #2 reduzierte die Menge des endogenen Proteins um 91 % & bzw. 73% im Vergleich zu unbehandelten Zellen (Abbildung 17A). Die Transfektion der Kontroll-siRNA #1 hatte keinen Einfluss auf die endogene LARP1-Menge. Beide LARP1-spezifischen siRNAs bewirkten eine signifikante Reduktion der MKRN1s-vermittelten Translationsstimulation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Kontroll-siRNA-#1-transfizierte Zellen zeigten nach Transfektion mit Lipofectamine RNAiMAX eine signifikante Reduktion der hMKRN1s-vermittelten Translationsstimulation im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen. Möglicherweise bewirkte das Transfektionsreagenz diese Reduktion. Die Transfektion von Kontroll- oder LARP1-spezifischen-siRNAs hatte keinen Einfluss auf die Translation der Reporter-mRNA in NF-rShank3₁₋₂₉₀ und N-hDDX6 exprimierenden Lysaten. Dies Ergebnis deutet darauf hin, dass eine Wechselwirkung von LARP1 mit hMKRN1s für dessen translationsregulatorische Wirkung von Bedeutung ist. Die Interaktion von hMKRN1s und LARP1 ist damit funktionell essenziell.

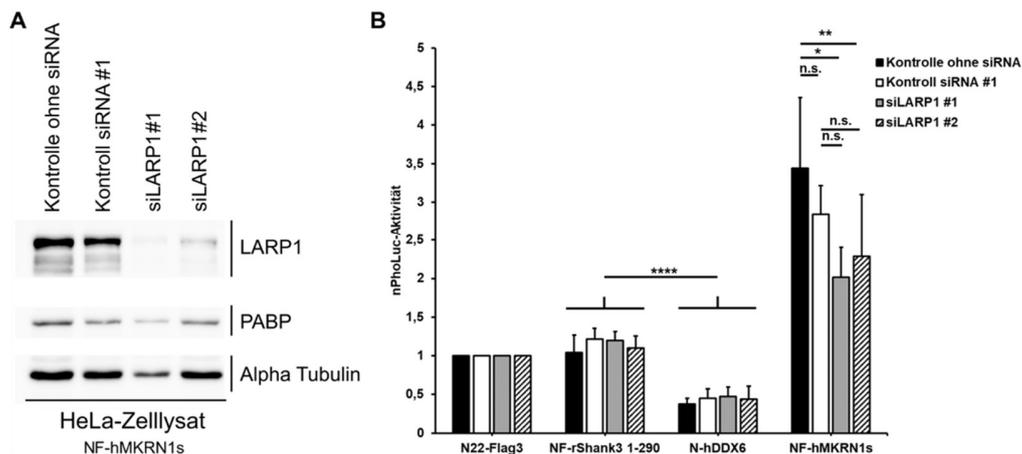


Abbildung 17 LARP1 moduliert die hMKRN1s-vermittelte Translationsregulation. HeLa-Zellen wurden zeitgleich zur Aussaat mit LARP1-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA #1 transfiziert. Anschließend erfolgte die Transfektion für das *N22-tethering*-Experiment. Zelllysate wurden für Western Blot-Analysen und der Messung der PhoLuc- und RenLuc-Aktivität genutzt. A) Zelllysate wurden im Western Blot mit LARP1- (Bethyl-A302-087A), PABP- und Alpha-Tubulin-spezifischen Antikörpern analysiert. Alpha-Tubulin diente als Ladekontrolle. Die Transfektion mit siLARP1#1 und #2 reduzierte die endogene LARP1-Menge durchschnittlich um 91 % bzw. 73 %. B) Unter LARP1-*knockdown* durch siLARP1#1 und #2 wurde eine verminderte Translationsstimulation durch NF-hMKRN1s im Vergleich zu unbehandelten Zellen beobachtet (n=8). Im Vergleich zur Kontroll-siRNA #1 war dieser reduzierte Effekt nicht signifikant. Die Transfektion mit Kontroll-siRNA #1 zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Translationsstimulation von NF-hMKRN1s im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (n.s. $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$). Die eingesetzten siRNAs hatten keinen Einfluss auf die nPhoLuc-Aktivitäten der NF-rShank3₁₋₂₉₀- und N-hDDX6-Proben. Gegenüber NF-rShank3₁₋₂₉₀ zeigte N-hDDX6 eine deutliche Erniedrigung der nPhoLuc-Aktivität (Two-way Anova unter Verwendung des Dunnett Tests (**** $p \leq 0,0001$)).

6.7 Identifikation der Interaktionsdomänen von PABP und LARP1

Die vorherigen Analysen zeigten eine Wechselwirkung von LARP1 bzw. UPF1 mit hMKRN1s für dessen Translationsstimulation. Beide Proteine benötigten zur Assoziation mit hMKRN1s das PAM2-Motiv und interagierten mit endogenen PABP. Im Folgenden sollte zunächst ermittelt werden, welche Domänen von PABP mit LARP1 bzw. UPF1 interagieren.

Hierzu wurden rekombinante Varianten von PABP der Ratte (rPABP) aus HEK293T-Zelllysaten immunpräzipitiert (Abbildung 18A). Als Kontrolle diente EGFP. Um die Bedeutung von RNA für die Interaktion zu ergründen, wurden die RNA in einigen Lysaten durch RNase One abgebaut. In den Präzipitaten wurden endogenes LARP1 und UPF1 mittels Western Blot nachgewiesen.

LARP1 kopräzipitierte mit vollständigen EGFP-rPABP (P1) und den RRM-enhaltenen EGFP-rPABP-Varianten P2, P3 und P4 (Abbildung 18B). Die Menge des kopräzipitierten LARP1 bei präzipitierten RRM-Domänen war untereinander annähernd gleich. UPF1 war

Ergebnisse

in der Lage mit vollständigen EGFP-rPABP, allen vier RRM-Domänen und der PABC-Domäne zu interagieren (Abbildung 18B). UPF1 kopräzipitierte effizienter mit dem vollständigen EGFP-rPABP, als an einzelne RRM-Domänen und der PABC-Domäne. Alle Interaktionen konnten auch in Abwesenheit intakter RNA nachgewiesen werden. In der IP mit Antikörpern gegen EGFP wurde keines der beiden Proteine kopräzipitiert.

Dies zeigte, dass sowohl LARP1 und UPF1 am vollständigen PABP binden können. LARP1 interagierte dabei nur über die RRM Domänen 1-4 mit PABP, wobei keiner der einzelnen Domänen bevorzugt wurde. Dagegen war UPF1 in der Lage über die RRM-Domänen und der PABC-Domäne an PABP zu binden, wobei die Interaktion über die vier RRM-Domänen bevorzugt wurde. Die Wechselwirkung von LARP1 bzw. UPF1 mit PABP war nicht von intakter RNA abhängig.

Die bisherigen Ergebnisse zeigten, dass hMKRN1s über das PAM2-Motiv sowohl mit PABP wie auch mit LARP1 interagieren kann (Abbildung 12). PABP wiederum assoziiert über RRM1-4 mit LARP1 (Abbildung 18). hMKRN1s interagiert mit PABP sowohl über die vier RRM-Domänen, wie auch über die C-terminalen MLLD-Domäne (Miroci *et al.*, 2012). Nachfolgend sollte analysiert werden, welche Domänen in LARP1 für die Assoziation mit hMKRN1s bzw. PABP von Bedeutung sind.

Hierzu wurden rekombinante Varianten von EGFP-LARP1 aus HEK293T-Zelllysaten immunpräzipitiert (Abbildung 19A). Als Kontrolle diente EGFP. Um die Bedeutung von RNA für die Interaktion zu ergründen, wurden die RNA in einigen Lysaten durch RNase One abgebaut. In den Präzipitaten wurden endogenes PABP und rekombinantes NF-hMKRN1s mittels Western Blot nachgewiesen.

Rekombinantes NF-hMKRN1s kopräzipitierte mit vollständigen EGFP-LARP1 (L1) und dem La-Modul (LAM+RRM-L5-Domäne) der unvollständigen EGFP-LARP1-Variante L3 (Abbildung 19B). Die Köpräzipitation von rekombinanten NF-hMKRN1s war auch nach RNA-Abbau nachweisbar. Endogenes PABP kopräzipitiert mit vollständigen EGFP-LARP1, der unvollständigen EGFP-LARP1-Variante mit dem La-Modul (L3) und der LARP1-Variante, die die DM15-Domäne enthält (L4) (Abbildung 19C). Nach RNA-Abbau wird PABP mit DM15-Domäne-enthaltenden EGFP-LARP1-Variante L4 nicht mehr kopräzipitiert. Die beiden Interaktionen von PABP mit L1 und PABP mit L3 persistieren nach RNA-Abbau. In der IP vom EGFP-Protein aus Zelllysaten wurde weder NF-hMKRN1s noch endogenes PABP kopräzipitiert.

Ergebnisse

Die Daten wiesen darauf hin, dass hMKRN1s und PABP, unabhängig von intakter RNA, mit LARP1 wechselwirkt. Diese Interaktion an LARP1 wurde durch das La-Modul vermittelt. PABP war über die Assoziation mit intakter RNA zusätzlich in der Lage mit der DM15-Domäne von LARP1 zu interagieren. Das La-Modul ist essenziell für die Interaktion von LARP1 mit hMKRN1s bzw. PABP.

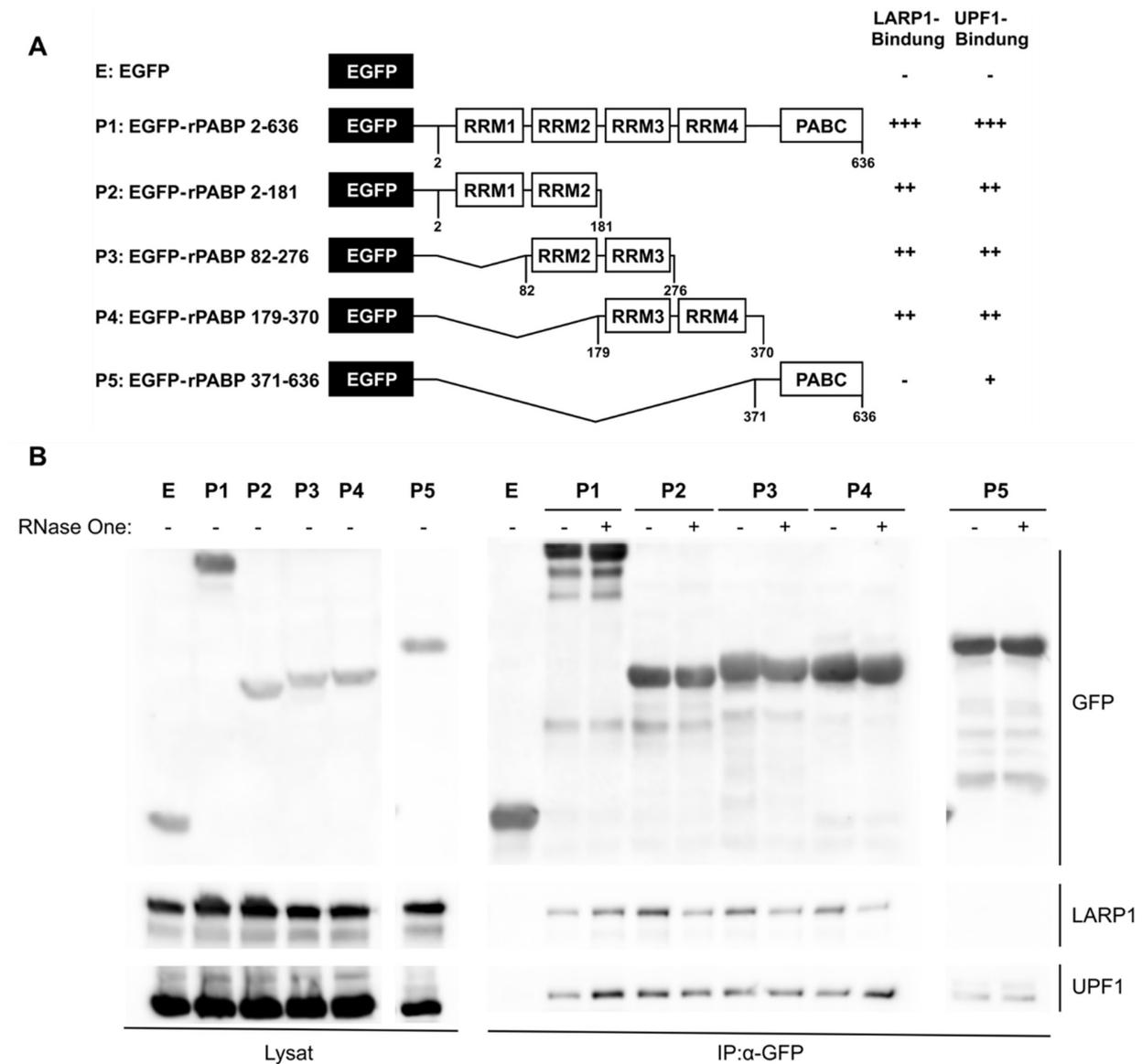


Abbildung 18 Verschiedene Domänen von PABP binden an LARP1 und UPF. A) Die schematische Darstellung zeigt rekombinante EGFP-rPABP-Varianten (P1-5), die aus HEK293T-Zelllysaten immunpräzipitiert wurden. Die Bindungsstärke der Proteine an die PABP-Domänen wurde qualitativ abgeschätzt durch -, +, ++ und +++. B) Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen EGFP-Epitope, LARP1 (Bethyl A302-087A) und UPF1 analysiert (n=3). Zum Abschluss von RNA-abhängigen Bindungen wurde die RNA mit der RNase One abgebaut (gekennzeichnet durch +). LARP1 kopräzipitierte mit vollständigen EGFP-rPABP (P1) und den RRM-Domänen 1-4 (P2-P4). UPF1 kopräzipitierte in absteigenden Proteinmengen mit vollständigen EGFP-rPABP (P1), allen vier RRM-Domänen (P2-P4) und der PABC-Domäne (P5). Die Interaktionen von LARP1 bzw. UPF1 mit EGFP-rPABP-Varianten waren nicht RNase-sensitiv. Es fand keine Kopräzipitation von LARP1 bzw. UPF1 mit EGFP statt.

Ergebnisse

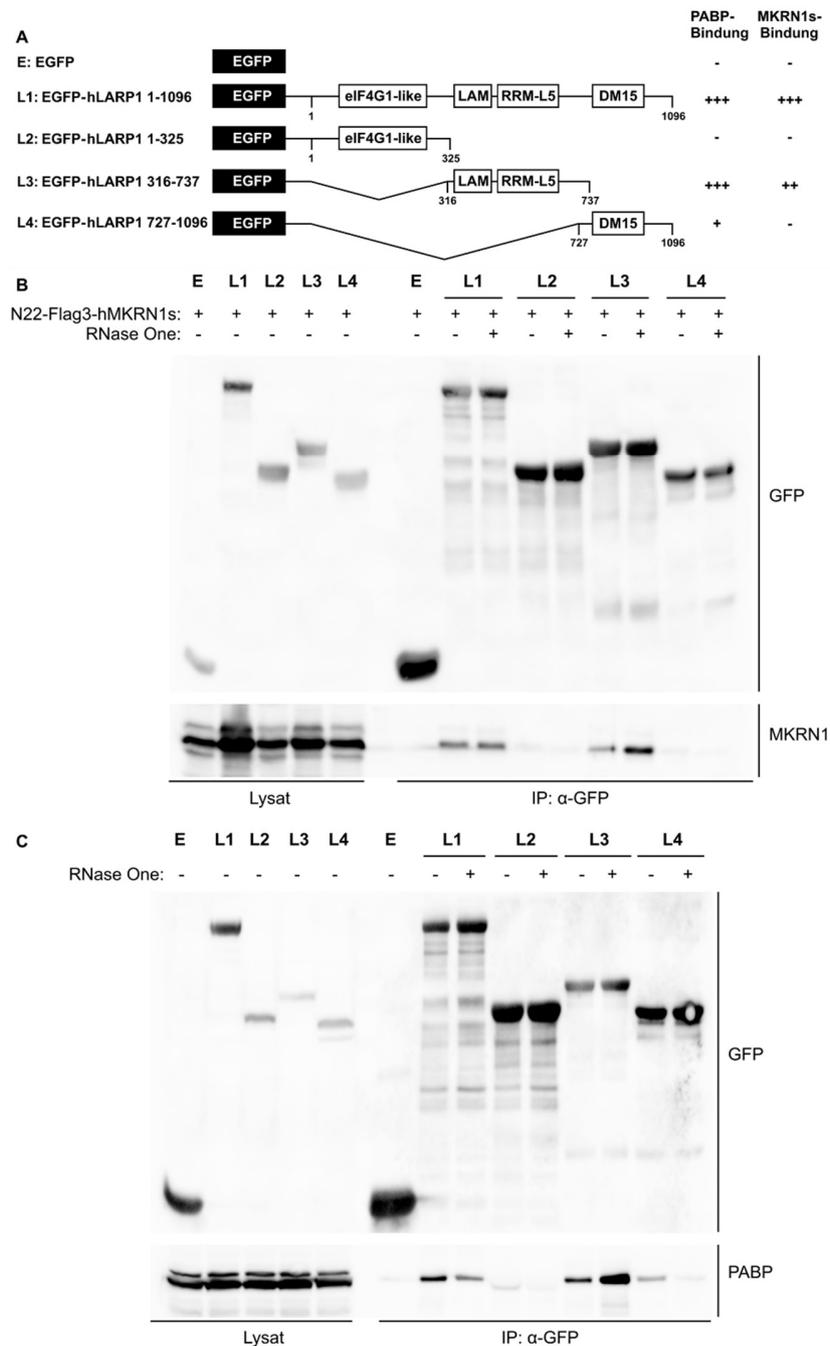


Abbildung 19 LARP1 interagiert über LAM + RRML5 mit PABP und hMKRN1s. A) Die schematische Darstellung zeigt rekombinante EGFP-LARP1-Varianten (L1-4), die aus HEK293T-Zelllysaten immunpräzipitiert wurden. Die Bindungsstärke der Proteine an die LARP1 Domänen ist qualitativ abgeschätzt durch -, +, ++ und +++. B,C) Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen EGFP-Epitope, MKRN1s und PABP analysiert (n=3). Zum Ausschluss von RNA-abhängigen Bindungen wurde die RNA mit der RNase One abgebaut (gekennzeichnet durch +). B) HEK293T-Zellen exprimierten zusätzlich NF-hMKRN1s. NF-hMKRN1s kopräzipitierte mit vollständigen EGFP-LARP1 (L1) und dem La-Modul-enthaltenden EGFP-LARP1₃₁₆₋₇₃₇ (L3). Die Interaktion von hMKRN1s mit L1 und L3 war nicht RNase-sensitiv. Es fand keine Kopräzipitation von NF-hMKRN1s mit EGFP statt. C) Endogenes PABP kopräzipitiert mit vollständigen EGFP-LARP1 (L1) und zwei unvollständigen EGFP-LARP1-Varianten, mit La-Modul (L3) bzw. DM15-Domäne (L4). Im Gegensatz zur Interaktion von PABP mit L1 und L3 war die Interaktion mit L4 RNase sensitiv. Es fand keine Kopräzipitation von PABP mit EGFP statt.

6.8 PABP als Interaktionsgerüst für hMKRN1s

Da hMKRN1s über sein PAM2-Motiv direkt an PABP bindet und dieses wiederum direkt mit LARP1 bzw. UPF1 interagieren kann, könnte PABP als Interaktionsgerüst für eine indirekte Assoziation von LARP1 bzw. UPF1 mit hMKRN1s verantwortlich sein. Die bisherigen Interaktionsanalysen zeigten, dass hMKRN1s und PABP an das La-Modul von LARP1 binden. So könnte PABP die Interaktion von LARP1 mit hMKRN1s vermitteln, indem hMKRN1s bzw. LARP1 zeitgleich über das PAM2-Motiv bzw. das La-Modul an eine der vier RRM-Domänen von PABP oder im Falle vom PAM2-Motiv zusätzlich an den C-Terminus von PABP bindet. In dem Falle sollte die Interaktion von hMKRN1s mit LARP1 vermindert sein, wenn die PABP-Konzentration in der Zelle gesenkt wird.

Um zu überprüfen, ob PABP als Interaktionsgerüst die Bindung von hMKRN1s mit LARP1 vermittelt, wurde rekombinantes EGFP-hMKRN1s aus HEK293T-Zelllysaten unter siRNA-vermittelten PABP-*knockdown* immunpräzipitiert. Die Zellen wurden mit Kontroll-siRNA #1 oder PABP-spezifischer siRNA (siPABP) transfiziert. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Die Menge des kopräzipitierten endogenen LARP1, rekombinanten EGFP-hMKRN1s und endogenen PABP wurde mittels Western Blot bestimmt. Anschließend wurde die Menge von präzipitierten LARP1 ins Verhältnis mit der Menge des präzipitierten EGFP-hMKRN1s gesetzt.

Der PABP-*knockdown* mit siPABP führte zur reduzierten PABP-Konzentration in den HEK293-Zelllysaten (Abbildung 20A). Im Vergleich zu unbehandelten Zelllysaten wurde die PABP-Konzentration im Mittel um 57 % reduziert (Abbildung 20B). Die Kontroll-siRNA #1 hatte keinen Einfluss auf die PABP-Konzentration im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Behandlung mit Kontroll-siRNA #1 oder siPABP hatte keinen Einfluss auf die endogenen α -Tubulin- und LARP1- sowie auf die rekombinanten EGFP-hMKRN1s-Mengen. Die Behandlung mit siPABP reduziert die Menge von kopräzipitierten LARP1 und PABP (Abbildung 20A). Die Menge an kopräzipitierten LARP1 wurde auf die Hälfte reduziert (Abbildung 20C). Die Behandlung mit Kontroll-siRNA #1 hatte keinen Einfluss auf kopräzipitierte LARP1- bzw. PABP-Mengen.

Die Daten zeigten, dass eine Halbierung der endogenen PABP-Menge zur Halbierung der Menge an kopräzipitierten LARP führt. Dieses Ergebnis bestätigte die Annahme, dass PABP als Interaktionsgerüst fungiert. Die Reduktion der verfügbaren PABP-Menge reduzierte im gleichen Ausmaß die Bindung zwischen hMKRN1s und LARP1. Dies deutet

darauf hin, dass die Translationsregulation durch hMKRN1s durch Assoziation mit anderen Proteinen, wie zum Beispiel LARP1, über die Interaktion mit PABP ermöglicht wird.

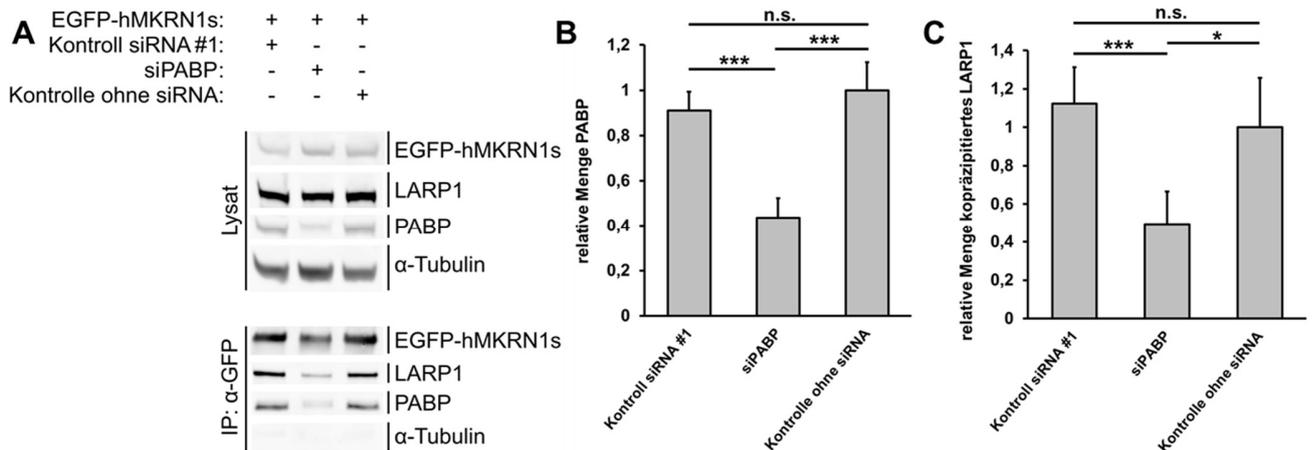


Abbildung 20 PABP als Interaktionsgerüst der LARP1:hMKRN1s Interaktion. A) Rekombinantes EGFP-hMKRN1s wurde aus HEK293T-Zelllysaten immunpräzipitiert (n=8). HEK293T-Zellen wurden zuvor mit Kontroll-siRNA #1 oder siPABP behandelt. Die Zelllysate wurden im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen EGFP-Epitope, LARP1, PABP und α -Tubulin analysiert. Die siRNA-Behandlung der Lysate ist durch + und – angezeigt. Die Behandlung mit siPABP reduzierte im Lysat die Menge an endogenen PABP und im Präzipitat die Menge an koprazipitierten LARP1 und PABP. α -Tubulin wurde nicht durch rekombinantes EGFP-hMKRN1s-koprazipitiert. B) Die relative Menge von endogenen PABP wurde anhand des Verhältnisses der PABP- und α -Tubulin-Menge bestimmt. Nach Behandlung mit siPABP wurde die Reduktion der endogenen PABP-Konzentration um 57 % beobachtet. Die Behandlung mit Kontroll-siRNA #1 hatte keinen Einfluss auf die endogene PABP-Menge. C). Die relative Menge von koprazipitierten LARP1 wurde anhand des Verhältnisses der Menge von koprazipitierten rekombinanten EGFP-hMKRN1s und koprazipitierten LARP1 bestimmt. Nach Behandlung mit siPABP wurde die Reduzierung der koprazipitierten LARP1-Menge auf 50 % beobachtet. Die Behandlung mit Kontroll-siRNA #1 hatte keinen Einfluss auf die relative Menge von koprazipitierten LARP1. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (n.s. $p > 0,05$, * $p \leq 0,05$, *** $p \leq 0,001$).

6.9 Assoziation von hMKRN1s an dem 5'-Cap-Bindungskomplex

Die massenspektrometrischen Untersuchungen sowie nachfolgende Validierungen zeigten, dass hMKRN1s mit Proteinen der Translationsmaschinerie interagiert. Insbesondere die Interaktion mit PABP und eIF4G (Abbildung 12), deutet darauf hin, was hMKRN1s eine funktionelle Rolle in der Regulation der Translationsinitiation einnimmt. Bestärkt wird diese Vermutung, durch die Rekrutierung von hMKRN1s in SGs, da dort eine Interaktion mit Präinitiationskomplexen vorliegt. Die Interaktion von eIF4E an die 5'-Cap-Struktur der mRNA ermöglicht den Aufbau des Initiationskomplexes eIF4F, bestehend aus eIF4E, eIF4G und eIF4A. Nachfolgend sollte analysiert werden, ob hMKRN1s mit dem eIF4F wechselwirkt.

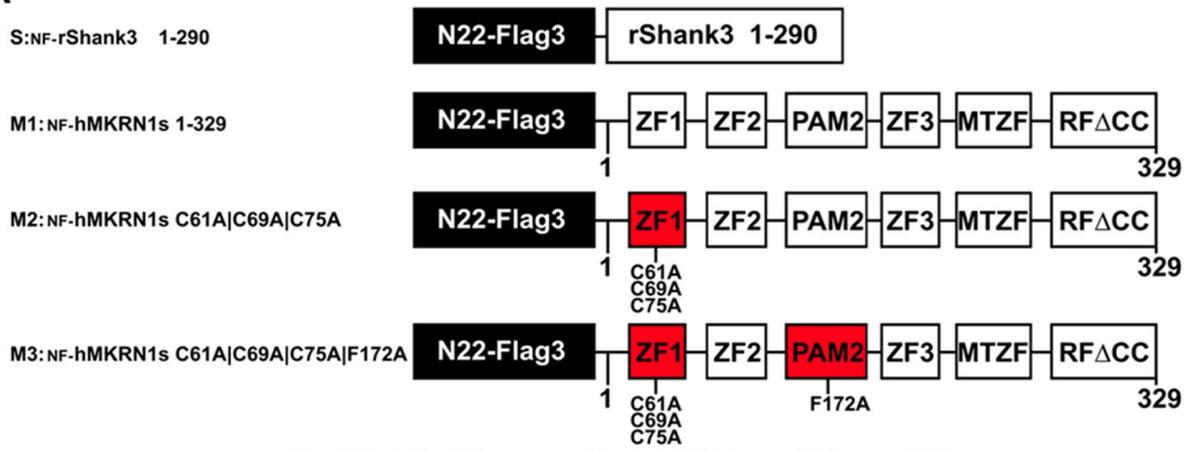
Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob hMKRN1s mit eIF4F interagieren kann, wurden eIF4F-Komplexe aus HEK293T-Zellen mittels γ -Aminophenyl-m7GTP-(C10-spacer)-Agarose isoliert. Zusätzlich wurden NF-hMKRN1s, NF-hMKRN1_{SC61A|C69A|C75A}, NF-hMKRN1_{SC61A|C69A|C75A|F172A} und NF-rShank3₁₋₂₉₀ in den HEK293T-Zellen exprimiert (Abbildung 21A). Damit sollte untersucht werden, ob die Wechselwirkung von eIF4F mit hMKRN1s abhängig vom funktionellen ZF1 bzw. PAM2-Motiv ist. Als Negativkontrolle der Isolation von eIF4F wurde den Lysaten ein Überschuss an freien m7G(5')ppp(5')G-Cap-Analogon beigefügt. Dies inhibierte die Interaktion von eIF4E mit der m7GTP-Agarose. In dem affinitätsaufgereinigtem Proteingemisch wurden eIF4F-Proteine, LARP1, PABP, UPF1 und rekombinantes NF-hMKRN1s und NF-rShank3₁₋₂₉₀ mittels Western Blot nachgewiesen.

Die endogenen Proteine eIF4E, eIF4G und PABP wurden im Zelllysat und im affinitätsaufgereinigten Proteingemisch detektiert (Abbildung 21B). Obwohl es Teil des eIF4F-Komplexes ist, konnte eIF4A nur im Lysat detektiert werden. Vollständiges NF-hMKRN1s und NF-hMKRN1_{SC61A|C69A|C75A} wurden im isolierten Proteingemisch detektiert. Weiterhin war NF-hMKRN1_{SC61A|C69A|C75A|F172A}, LARP1 und UPF1 nur im Lysat detektierbar. Unter Überschuss von freien m7G(5')ppp(5')G-Cap-Analogon waren eIF4E, eIF4G, NF-hMKRN1_{SC61A|C69A|C75A} und PABP nicht mehr detektierbar. Die Assoziation von NF-hMKRN1s zur m7GTP-Agarose wurde durch den Überschuss an freien m7G(5')ppp(5')G-Cap-Analogon nicht komplett aufgehoben.

Diese Befunden deuteten darauf hin, dass hMKRN1s mit dem eIF4F-Komplex interagiert. Diese Interaktion war unabhängig vom ZF1. Das PAM2-Motiv dagegen war essenziell für die Wechselwirkung mit eIF4F. Ferner lässt sich aus den Befunden schlussfolgern, dass die Interaktion von hMKRN1s mit eIF4F durch PABP über das PAM2-Motiv vermittelt wird. Da die Translationsregulatoren LARP1 und UPF1 nicht detektiert wurden ist davon auszugehen, dass die beiden Proteine nicht mit eIF4F interagieren.

A



B

	S	M1	M2	M3	S	M1	M2	M3				
GTP:	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
m7G(5')ppp(5')G:	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+

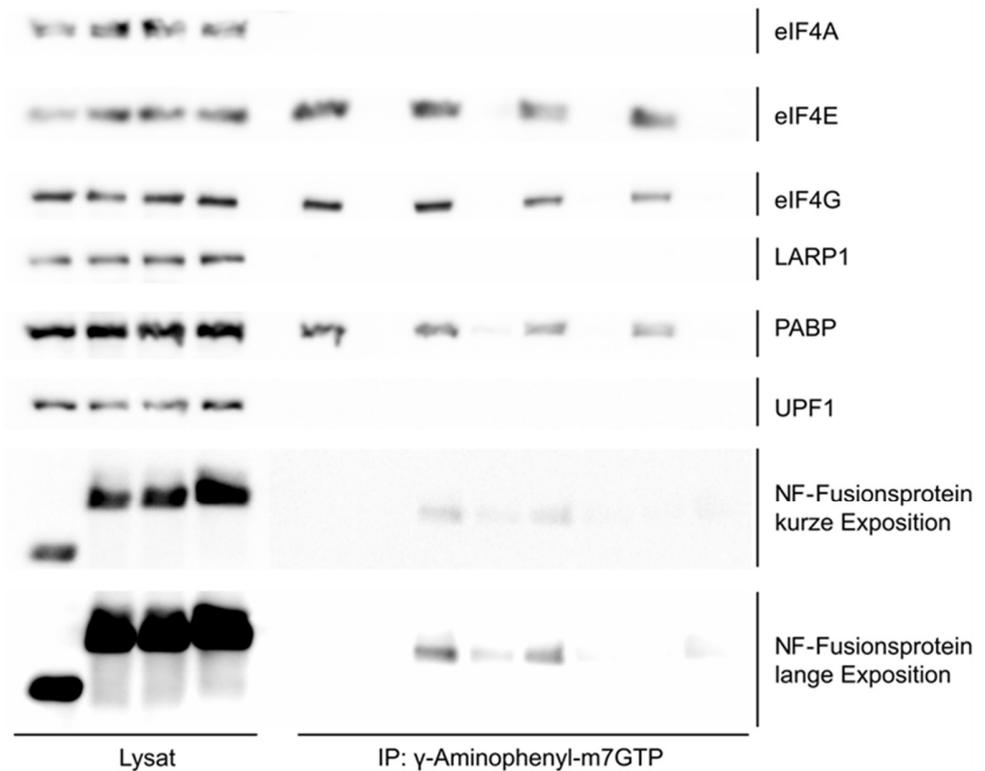


Abbildung 21 hMKRN1s interagiert mit dem 5'-Cap-Bindungskomplex. A) NF-rShank3₁₋₂₉₀ (S) sowie NF-hMKRN1s-Varianten mit und ohne Aminosäureaustausch (M1-3) wurden in HEK293T Zellen exprimiert. B) Die Zelllysate wurden einer Isolation durch γ -Aminophenyl-m7GTP Agarose mit und ohne Überschuss an freien m7G(5')ppp(5')G-Cap-Analogon zugeführt (n=3). Das affinitätsaufgereinigte Proteingemisch wurde im Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen eIF4A, eIF4E, eIF4G, LARP1 (Cell Signaling #14763), PABP, UPF1 und Flag-Epitope analysiert. Die Zugabe von freien m7G(5')ppp(5')G-Cap-Analogon bzw. GTP ist durch + und – dargestellt. Die endogenen Proteine eIF4E, eIF4G, PABP und rekombinantes NF-hMKRN1s und NF-hMKRN1s_{C61A|C69A|C75A} wurden mit m7-GTP-Agarose isoliert. Die endogenen Proteine eIF4A, LARP1 und UPF1 waren nur im Lysat detektierbar. Einzig rekombinantes NF-hMKRN1s persistierte partiell an der Agarose bei Überschuss von freien m7G(5')ppp(5')G-Cap-Analogon.

6.10 Einfluss von hMKRN1s auf eIF4E-unabhängige Translation

Die vorherigen Ergebnisse deuteten darauf hin, dass hMKRN1s über PABP direkt mit dem eIF4F-Initiationskomplex interagiert. Die 5'-Cap-abhängige Translation setzt die Bindung von eIF4E an die 5'-Cap-Struktur voraus. Im Folgenden wurde untersucht, ob hMKRN1s auch dann einen stimulierenden Effekt auf die Translation ausübt, wenn nicht alle Initiationsfaktoren beteiligt sind. Dafür wurde untersucht, ob hMKRN1s die Translation einer Reporter-mRNA mit einem IRES-Element fördert. Die Translation unter Kontrolle des *encephalomyocarditis* Virus-(EMCV) IRES-Elements erfordert keine 5'Cap-Struktur und somit keine Bindung von eIF4E an die mRNA. Die Rekrutierung der 40S ribosomalen Untereinheit erfolgt direkt an die Haarnadelstrukturen des IRES-Elementes unter der Wechselwirkung mit eIF4G und eIF4A (Chamond *et al.*, 2014).

Um die IRES-vermittelte Translation zu untersuchen, wurde der bisherige Vektor für das *N22-tethering*-Experiment modifiziert. Der Vektor kodierte nun für eine modifizierte PhoLuc-mRNA. Diese enthielt nun folgende Elemente in 5'-3' Richtung: offener Leserahmen GST (*glutathione S-transferase*), EMCV-IRES, offener Leserahmen PhoLuc und 16 BoxB-Elemente (Abbildung 22A). Dies ermöglichte den Translationsstart am offenen Leserahmen der Photinus-Luciferase durch direkte Rekrutierung des Ribosoms an die IRES-Sequenz. Dies erfolgte unabhängig von eIF4E. N22-Fusionsproteine wurden weiterhin über BoxB-Elemente an die PhoLuc-mRNA, aber nicht an die RenLuc-mRNA, rekrutiert. Das modifizierte *N22-tethering*-Experiment wurde wie das bisherige *N22-tethering*-Experiment durchgeführt und ausgewertet (Siehe Abschnitt 6.1).

Die Koexpression von NF-hMKRN1s führte zu einer moderaten, 1,6-fachen Steigerung der nPhoLuc-Aktivität, gegenüber der Kontrolle NF-rShank3₁₋₂₉₀ (Abbildung 22B). Das NF-rShank3₁₋₂₉₀ bewirkte keine Stimulation der Translation. N-hDDX6 führte zur Halbierung der nPhoLuc-Aktivität, was auf die Rolle von hDDX6 an der mRNA-Degradation zurückzuführen ist.

Im Vergleich zur 4-fachen Steigerung der Translationsrate durch NF-hMKRN1s im nicht modifizierten *N22-tethering*-Experiment, war dies ein deutlich reduzierter Effekt. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die effiziente Translationsförderung durch hMKRN1s das komplette Set an Initiationsfaktoren benötigt, inklusive eIF4E.

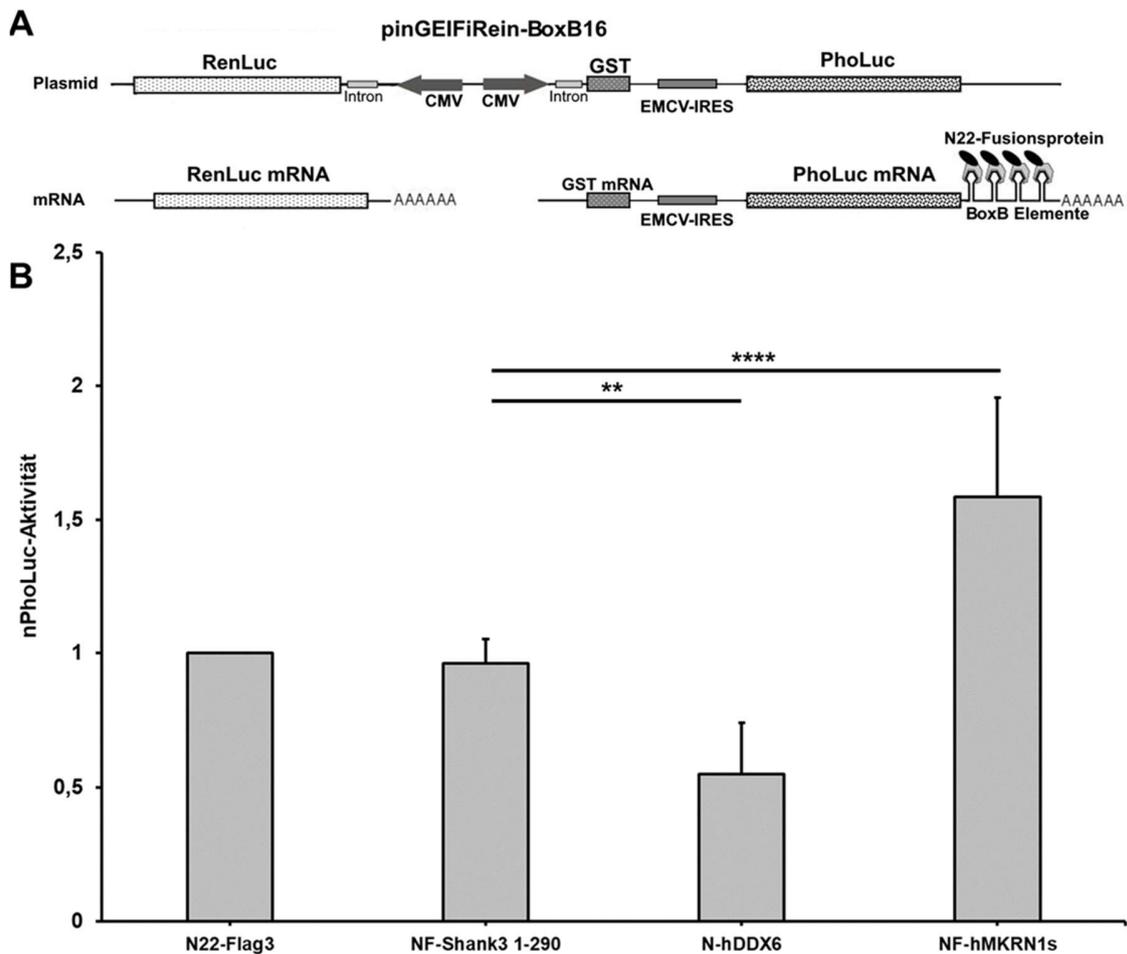


Abbildung 22 hMKRN1s stimuliert geringfügig die 5'-Cap-unabhängige Translation. A) Schematische Darstellung des pinGEIFiRein-boxB16 Plasmides für den Einsatz im modifizierten *N22-tethering-Experiment*. Der eukaryotische Expressionsvektor pinGEIFiRein-BoxB16 kodiert für eine modifizierte PhoLuc-mRNA. Diese enthält den offenen Leserahmen für GST, die EMCV-IRES-Sequenz, den offenen Leserahmen für PhoLuc und 16 BoxB-Elemente. B) Vektoren kodierend für N22-Flag3, NF-hMKRN1s, NF-rShank31-290 und N-hDDX6 wurden mit dem pinGEIFiRein-BoxB16 Vektor in kortikalen Neuronen transfiziert (n=9). Anschließend wurde die Aktivität von PhoLuc und RenLuc im Zelllysate bestimmt. NF-hMKRN1s stimuliert die Translation der PhoLuc-mRNA moderat um den Faktor 1,6. Die interne Kontrolle N-hDDX6 zeigt eine deutliche Erniedrigung der Translationsrate der Reporter-mRNA im Vergleich zu NF-rShank31-290. Die statistische Analyse erfolgte mittels *one-way anova* unter Verwendung des Dunnett-Tests (** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,0001$).

7 Diskussion

Synaptische Plastizität beruht unter anderem auf einer lokalen Synthese von Proteinen an Synapsen (Giustetto *et al.*, 2003; Pfeiffer und Huber, 2006). Die neu entstandenen Proteine können zu physiologischen und morphologischen Veränderungen der Synapse beitragen (Duffy *et al.*, 1981; Ostroff *et al.*, 2010; Steward und Levy, 1982; Zhong *et al.*, 2006). Dies stellt eine Voraussetzung für Lern- und Gedächtnisprozesse dar (Flexner *et al.*, 1963; Nader *et al.*, 2000; Squire und Barondes, 1973). Dies setzt voraus, dass die Proteinsynthese lokal an einzelnen Synapsen reguliert werden kann.

Die Mehrheit dieser regulatorischen Prozesse wirkt reprimierend auf die Translation (Cioni *et al.*, 2018; Fernandez-Moya *et al.*, 2014; Khalil *et al.*, 2018). Ein möglicher positiver Regulator der Translation an Synapsen ist MKRN1s. MKRN1s ist ein neuer PABP-Interaktionspartner, der in Neuronen aktivitätsabhängig an Synapsen akkumuliert und die Translation assoziierter mRNAs stimuliert. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die Rolle von hMKRN1s im RNA-Metabolismus näher untersucht. Der Fokus lag hierbei auf der Identifikation von translationsfördernden Domänen von hMKRN1s und das Auffinden von hMKRN1s-Proteininteraktionspartnern. Aus der Gesamtheit an identifizierten Proteinen waren primär die Proteine interessant, die entweder direkt an einer funktionellen Domäne banden oder, bei Inaktivierung einer funktionellen Domäne, nicht mehr mit hMKRN1s interagierten. Weiterhin ermöglichte die Identifikation von Proteininteraktionspartnern eine Einordnung der Beteiligung von hMKRN1s an Aspekten des RNA-Metabolismus. Dies ermöglichte es, Interaktionspartner auf ihre Funktion bei der hMKRN1s-vermittelten Förderung der Translation einer Reporter-mRNA hin zu untersuchen.

7.1 Funktionelle Domänen von hMKRN1s

Um translationsrelevante Domänen von hMKRN1s zu identifizieren, wurden unvollständige hMKRN1s-Varianten auf ihre translationsfördernde Wirkung auf eine Reporter-mRNA hin untersucht. Zusätzlich wurde überprüft ob vollständige und unvollständige hMKRN1s-Varianten mit inhibierten 43S-Präinitiationskomplexen, wie sie in SGs auftreten, interagierten. Pathogene Mutationen im *MKRN1*-Gen, die auf

funktionelle Domänen hinweisen könnten, waren nicht bekannt (Stand Juni 2018, HGMD-Datenbank, Stenson *et al.*, 2003).

Bei den Untersuchungen zeigte sich, dass ZF1 und das PAM2-Motiv gemeinsam essenziell sowohl für die hMKRN1s-vermittelte Translationsförderung einer Reporter-mRNA als auch der Akkumulation in SGs sind. Die funktionelle Inaktivierung einer Domäne führte zum partiellen Verlust der translationsfördernden Wirkung von hMKRN1s. Die Abwesenheit des PAM2-Motives unter Hitzestress reduzierte die Akkumulation von hMKRN1s in SGs und führte zusätzlich zu einer Akkumulation in den Zellkern. Die Inaktivierung des ZF1 hatte keine Auswirkung auf die Akkumulation von hMKRN1s in SGs.

Die Inaktivierung des PAM2-Motives führte im Vergleich zur Inaktivierung vom ZF1 zum größeren Funktionsverlust von hMKRN1s, charakterisiert durch eine schwächere Stimulation der Translation der Reporter-mRNA und einer ineffizienten SG-Akkumulierung. Generell sind PAM2-Motive für die Interaktion mit der MLL- Domäne von PABP verantwortlich (Kozlov *et al.*, 2010b; Xie *et al.*, 2014). Die PAM2-ähnliche Domäne von hMKRN1s interagiert stärker mit den RRM-Domänen von PABP, insbesondere mit RRM1+2, als mit der MLL- Domäne (Miroci *et al.*, 2012). Aus diesen Beobachtungen deutete sich an, dass die Interaktion von PABP mit MKRN1s eine wesentliche Voraussetzung für die Stimulation der Translation durch MKRN1s ist. Die Bindung von hMKRN1s an mehrere Bereiche von PABP ist die Voraussetzung, dass weitere translationsregulierende-Proteine durch MKRN1s an PABP rekrutiert werden können. Aus den Untersuchungen mit hMKRN1s ohne funktionelles PAM2-Motiv ließ sich schlussfolgern, dass die Interaktion von hMKRN1s mit PABP und mit über PABP-vermittelten weiteren Regulatoren essenziell für die translationsfördernde Wirkung von MKRN1s ist. ZF1 war für eine Interaktion mit SG-mRNP-Komplexen zwar nicht von Bedeutung, spielte aber eine Rolle bei der Translationsstimulation. Zinkfinger vom C₃H-Typus gehen typischerweise Interaktionen mit RNA oder DNA ein (Fu und Blackshear, 2017; Lai *et al.*, 2002). Allerdings wurden für den ZF1 von hMKRN1s putative Proteininteraktionspartner identifiziert (Tabelle 22). Die identifizierten putativen ZF1-Partner CCT6A, DYNC1H1 und TCP1 haben zwar keinen direkten Einfluss auf die Translation, sind aber in Neuronen an den gerichteten Transport von mRNP-Komplexen beteiligt. DYNC1H1 ist Bestandteil des Dynein-Motor-Komplexes und direkt für den

aktiven Transport von assoziierten mRNPs essentiell (Hafezparast *et al.*, 2003; Sasaki *et al.*, 2000). CCT6 und TCP1 sind Chaperone für Tubulin und Aktin *in vivo* (Sternlicht *et al.*, 1993). Zur Translationsregulation trägt ZF1 wahrscheinlich durch mRNA- oder Proteininteraktionen nur minimal bei. Viel mehr lassen deuten die putativen Interaktionen darauf hin, dass der gerichtete Transport in Neuronen von hMKRN1s bzw. hMKRN1s-mRNP-Komplexe durch den ZF1 vermittelt wird.

Die Akkumulation des Proteins hMKRN1s in SGs ist ein Hinweis darauf, dass hMKRN1s Teil des Präinitiationskomplexes ist. Dies deutet darauf hin, dass hMKRN1s an der Kontrolle die Initiation der Translation beteiligt ist. Die Kontrolle von hMKRN1s auf die Elongation ist unwahrscheinlich, da in SGs Polyribosomen von der RNA dissoziiert sind (Kedersha *et al.*, 2000) und hMKRN1s nicht mit Polysomen assoziiert (Miroci *et al.*, 2012). Zusammenfassend zeigte sich, dass die Rolle vom hMKRN1s im RNA-Metabolismus abhängig von PAM2-Motiv-vermittelten Interaktionen über PABP, sowie von ZF1-vermittelte Protein- oder RNA-Interaktionen ist. Die Stimulation der Translation durch MKRN1s ist auf der Wechselwirkung in der Initiation der Translation zurückzuführen.

Ungeklärt bleibt die Akkumulation von hMKRN1s ohne funktionelles PAM2-Motiv im Zellkern. Eine mögliche Erklärung lieferte die Identifikation von Interaktionspartnern mit Hilfe der Massenspektrometrie. So führte die Deaktivierung des PAM2-Motives zur verstärkten Bindung an PRKDC (Tabelle 21). PRKDC ist an DNA-Reparaturprozessen beteiligt und primär im Zellkern lokalisiert (Chan *et al.*, 2002). Die verstärkte Akkumulation von hMKRN1s in den Zellkern nach PAM2-Inaktivierung könnte durch die Interaktion mit PRKDC bedingt sein. Statt mit dem PAM2-Motiv an PABP zu binden, wird die Interaktion von hMKRN1s mit PRKDC bevorzugt. Bleibt das PAM2-Motiv dagegen intakt, bleibt hMKRN1s durch die Interaktion mit PABP im Zellkörper. Die Akkumulation im Zellkern war nicht mehr nachweisbar, sobald ZF1 und das PAM2-Motiv inaktiviert wurde. In der Massenspektrometrie war PRKDC als putativer Interaktionspartner des ZF1 identifiziert worden (Tabelle 22). Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion von MKRN1s mit PRKDC durch ZF1 vermittelt wird. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass hMKRN1s möglicherweise neben der Rolle im RNA-Metabolismus zusammen mit PRKDC eine Rolle in der DNA-Reparatur einnimmt.

7.2 Identifikation translationsregulierender Interaktionspartner

Um die Funktion von hMKRN1s im RNA-Metabolismus besser zu verstehen, wurden Proteininteraktionspartner identifiziert. Zusätzlich wurde überprüft welche Interaktionspartner an ZF1 und das PAM2-Motiv binden. Da diese beiden Domänen essentiell für die Translationsstimulation durch hMKRN1s waren, konnte so die Gesamtheit der identifizierten Partner von MKRN1s eingegrenzt werden, auf Proteine mit bekannter Funktion in der Translationsregulation. Denn Proteine die direkt an einer der beiden Domäne binden oder, bei Inaktivierung einer Domäne, nicht mehr mit hMKRN1s interagieren sind potentiell an translationsfördernden Wirkung von hMKRN1s beteiligt. Dafür wurden verschiedene rekombinante hMKRN1s-Varianten massenspektrometrisch untersucht.

Nahezu 30 % der Interaktionspartner von hMKRN1s waren RNA-bindende Proteine. Unter diesem wurden auch eIF4G, LARP1 und UPF1 als neue hMKRN1s-Interaktionspartner identifiziert. Für die Interaktion von hMKRN1s mit den drei Proteinen war das PAM2-Motiv essenziell. Dies deutete darauf hin, dass die Interaktionen über PABP vermittelt wurden. Dies wurde für die Interaktion von LARP1 mit hMKRN1s näher untersucht. LARP1 interagiert mit PABP über die RRM-Domänen 1-4 (Abbildung 18). Auch *in vivo* interagiert LARP1 mit PABP (Abbildung 13). hMKRN1s interagiert mit allen Domänen von PABP, dabei bevorzugt mit RRM-1 und -2 (Miroci *et al.*, 2012). Diese Daten zeigen, dass sowohl LARP1 wie auch hMKRN1s direkt mit PABP interagieren. hMKRN1s und PABP binden beide über das selbe Strukturelement, dem La-Modul, an LARP1. Aus diesen Beobachtungen lässt sich schlussfolgern, dass PABP als Interaktionsgerüst für die Interaktion von hMKRN1s mit LARP1 dient (Abbildung 23). Nach diesem Modell müsste die Interaktion zwischen hMKRN1s und LARP1 gestört werden, wenn die PABP-Konzentration in der Zelle reduziert wird. Dies wurde durch Immunpräzipitation von MKRN1s unter *knockdown* von PABP bestätigt (Abbildung 20). Die Interaktion des LAM-Moduls an PABP wird durch ein PAM2-ähnliches Motiv vermittelt (Fonseca *et al.*, 2015).

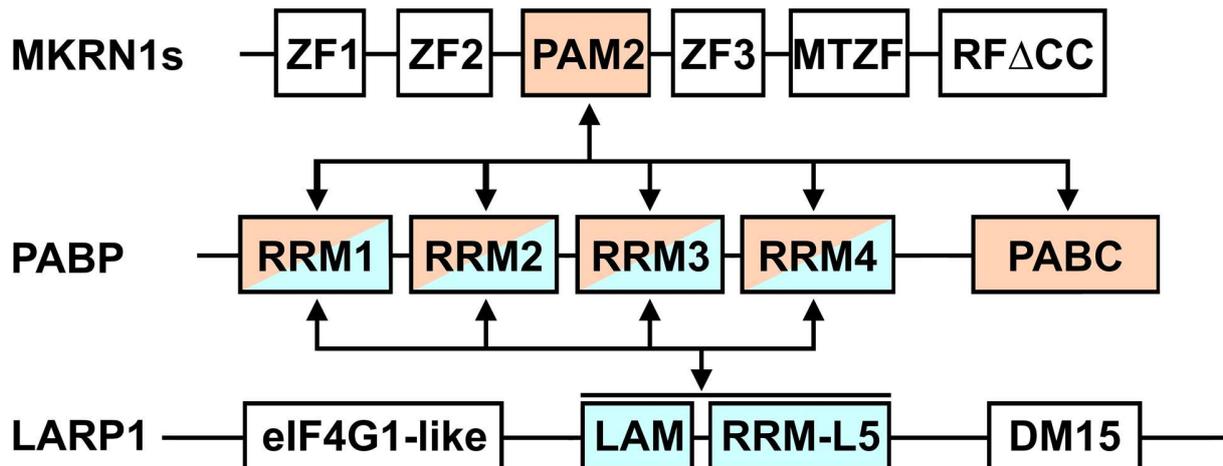


Abbildung 23 PABP als Interaktionsgerüst. MKRN1s interagiert über das PAM2-Motiv mit jeder Domäne von PABP, dabei bevorzugt an RRM1 und -2. LARP1 interagiert über das La-Modul (LAM und RRM-L5) mit den vier RRM-Domänen von PABP. Es findet keine direkte Interaktion zwischen MKRN1s und LARP1 statt.

Die drei neuen Interaktionspartner eIF4G, LARP1 und UPF1 wurden zur näheren Betrachtung ausgewählt, da alle drei Proteine Funktionen im RNA-Metabolismus einnehmen, speziell in der Regulation der Translation, und stark mit hMKRN1s bzw. dem PAM2-Motiv interagieren (Tabelle 21 und 22).

eIF4G ist das zentrale Adapterprotein im Initiationskomplex eIF4F. Durch die Interaktion von eIF4G mit PABP wird die mRNA zirkularisiert, und die Affinität von eIF4E an die 5'-Cap-Struktur wird erhöht (Borman *et al.*, 2002; Imataka *et al.*, 1998). Diese Interaktionen von eIF4G fördern die Translationsinitiation. Aufgrund der universellen Rolle von eIF4G in der Translation wurden keine funktionellen Untersuchungen zum Einfluss von eIF4G auf die hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation durchgeführt.

Die Beteiligung von UPF1 an der Regulation der Translation ist nur unzureichend untersucht. Durch Untersuchungen an Neuronen ist bekannt, dass UPF1 am Transport von neuronalen mRNPs in Dendriten beteiligt ist (Graber *et al.*, 2017). Diese mRNPs bestehen aus inhibierten Polysomen und dendritischer mRNA (Graber *et al.*, 2017). An der Synapse ist UPF1 an der Translationsregulation zusammen mit Staufen2 beteiligt (Graber *et al.*, 2017). Der *knockdown* von UPF1 führt in Neuriten zum reduzierten Transport von mRNPs, die inhibierte Polysomen enthalten, sowie dem Erliegen der aktivitätsabhängigen lokalen Translation an der Synapse (Graber *et al.*, 2017). Auch die Translationsinitiation kann durch UPF1 beeinflusst werden. Phosphoryliertes UPF1 ist in

der Lage, eIF3 direkt zu binden. Dadurch wird der Zusammenschluss der 40S und 60S ribosomalen Untereinheiten verhindert (Isken *et al.*, 2008).

Auch LARP1 besitzt eine Funktion in der Regulation der Translation. Die Untersuchungen von Burrows *et al.* (2010) zeigten, dass LARP1 mit PABP und eIF4E interagiert. Durch diese Interaktionen greift LARP1 regulierend in die Initiation der Translation ein. Der *knockdown* von LARP1 führte zur globalen Reduktion der Proteinsyntheserate in HeLa-Zellen. Neben dem direkten Einfluss auf die Translation ist LARP1 auch am Transport von mRNPs entlang des Zytoskelettes beteiligt. Diese Daten deuten darauf hin, dass LARP1 sowohl am intrazellulären Transport von mRNP-Komplexen sowie an der Translationsregulation am Zielort beteiligt ist. Weitere Untersuchungen durch Tcherkezian *et al.* (2014) zeigten eine Assoziation von LARP1 mit Monosomen, ribosomalen Untereinheiten und Polysomen. Dies deutet darauf hin, dass LARP1 während der Initiation der Translation an mRNA bindet und anschließend weiter an translatierenden Ribosomen assoziiert bleibt. Als spezifische Ziel-mRNAs von LARP1 wurden 5'TOP-Transkripte identifiziert, die präferentiell ribosomale Proteine und Translationselongationsfaktoren kodieren. Die LARP1-vermittelte Translationsregulation ist dabei abhängig von der mTORC1-Aktivität (Tcherkezian *et al.*, 2014). In RIP-Chip Untersuchungen (*RNP immunoprecipitation-microarray*) der Arbeitsgruppe um Mura *et al.* (2015) wurde gezeigt, dass LARP1 unter anderem in mRNP-Komplexen mit mRNAs assoziiert, die dendritischen Transkripten enthalten. Dazu zählen MAP2-, CAMKII α -, NMDAR-Untereinheit- 1, A, 2B, 2D und 3A sowie mGluR-Isoform- 2, 4, 6 und 7 mRNAs.

Die Literatur zu LARP1 und UPF1 zeigte, dass beide Proteine sowohl am dendritischen mRNA-Transport sowie an der Translationsregulation beteiligt sind. Auch ist für beide Proteine eine regulatorische Rolle in der Translationsinitiation beschrieben. Aus dem Zusammenspiel der Interaktion zwischen hMKRN1s mit LARP1 und UPF1 sowie der Interaktion der drei Proteine mit Faktoren der Translationsinitiation deutet sich an, dass beide Proteine in der hMKRN1s-vermittelten Förderung der Translation eine regulatorische Funktion in der Initiation übernehmen.

7.3 Relevanz von LARP1 und UPF1 für die Translationsförderung

Die Rolle von LARP1 und UPF1 in der hMKRN1s-vermittelten Stimulation der Translation einer Reporter-mRNA wurde in Abwesenheit von LARP1 bzw. UPF1 untersucht. Zur Analyse wurden LARP1- oder UPF1-Mengen in HeLa-Zellen mittel siRNA-*knockdown* oder CRISPR/Cas9-*knockout* reduziert. Zur Überprüfung, ob der beobachtete Effekt spezifisch auf die Reduktion der Proteinmenge von LARP1 zurückzuführen ist, wurden LARP1-Mengen durch Expression von recLARP1 wiederhergestellt.

Die Reduktion der zellulären UPF1-Konzentration führte im Mittel zur Verminderung der hMKRN1s-vermittelten Translationsförderung um 30 %. Alle vier eingesetzten UPF1-spezifischen siRNAs führten zum partiellen Verlust der Stimulation der Translation der Reporter-mRNA durch hMKRN1s im Vergleich zur Negativkontrolle. Dies deutet darauf hin, dass UPF1 an der hMKRN1s-vermittelten Translationsstimulation beteiligt ist. Allerdings zeigten nur zwei der verwendeten siRNAs einen signifikanten partiellen Verlust der translationsfördernden Wirkung von hMKRN1s im Vergleich zur Kontroll siRNA. Die verminderte Stimulation der Translation durch hMKRN1s durch die beiden anderen siRNAs zeigte einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle, nicht aber zur Kontroll-siRNA auf.

Die Diskrepanz der *knockdown*-Ergebnisse im *N22-tethering*-Experiment könnte auf unterschiedliche *off-target* Effekte der verschiedenen siRNAs beruhen. So kann es durch die Transfektion mit siRNA zur Reduktion der Konzentration unbekannter Proteine kommen (Fedorov *et al.*, 2006; Jackson und Linsley, 2004; Qiu *et al.*, 2005). Für die verwendeten UPF1-spezifischen siRNAs wurde mit dem *siRNA POTS lookup*-Algorithmus nach potenziellen *off-target*-mRNAs gesucht, deren Translationsprodukte einen Einfluss auf den mRNA-Metabolismus oder auf die Translation haben (Boudreau *et al.*, 2013). Dabei wurden fünf *off-target*-mRNAs mit den höchsten tPOTS- (*transcript probability of off-target score*) Werten berücksichtigt. Dieser Wert gibt an, wie häufig und mit wie vielen fehlerhaften Basenpaarungen die siRNA mit anderen Transkripten bindet. Nach der Analyse zeigte lediglich siUPF1 #2 einen *off-target*-Effekt an der QKI- (*protein quaking*) mRNA. Es sind mehrere Isoformen des QKI-Proteins bekannt, die an mRNA-Stabilität, Spleißen und Translationsrepression beteiligt sind (Fagg *et al.*, 2017). Aufgrund

fehlender Informationen zum Mechanismus der Translationsrepression durch QKI, war die Interpretation der Daten nicht möglich.

Das Fehlen von LARP1, induziert durch einen LARP1-*knockout*, führte zu einer um 50 % reduzierten hMKRN1s-vermittelten translationsfördernden Wirkung auf die Reporter-mRNA. Um *off-target*-Effekte durch fehlerhafte Bindung der *guide*-RNAs im Genom auszuschließen, wurde der *Cas-OFFinder*-Algorithmus verwendet (Bae *et al.*, 2014). Unter den verwendeten Filterkriterien (*mismatch number*=2, *DNA bulge size*=2 und *RNA bulge size*=2) wurden vier Exon-lokalisierte *off-target*-Positionen im menschlichen Genom gefunden. Betroffen waren die Gene für *PDCD11* (*programmed cell death protein 11*), *PRRC2A* (*proline-rich and coiled-coil-containing protein 2A*), *RPL17P40* (*ribosomal protein L17 pseudogene 40*) und *ZBTB16* (*zinc finger and BTB domain containing 16*). Bei *RPL17P40* handelte es sich um ein Pseudogen ohne bekanntes Proteinprodukt. Zum *PRRC2A* Genprodukt gab es keine funktionellen Studien. *ZBTB16* kodiert das PLZF-Protein (*promyelocytic leukemia zinc finger*), ein Repressor der Transkription, der letztlich Auswirkung auf Spermatogenese, Extremitätenentwicklung, Hämatopoese und Immunregulation hat (Suliman *et al.*, 2012). Einzig das *PDCD11* Genprodukt NFBP (*NF- κ B binding protein*) ist an der Reifung der 18S rRNA beteiligt und hätte somit einen indirekten Einfluss auf die Translation (Sweet *et al.*, 2008). Zusammenfassend war nicht davon auszugehen, dass die verminderte Stimulation der Translation durch MKRN1s in LARP1-defizienten Zellen durch *off-target*-Effekte zustande kommt. Die Halbierung der von hMKRN1s-vermittelten Translationsstimulation ist damit auf den Verlust von LARP1 zurückzuführen.

Eine vollständige Kompensation der LARP1-Konzentration in *knockout*-Zellen durch die Expression von recLARP1 konnte nicht erreicht werden. Auf die translationsfördernde Wirkung durch hMKRN1s hatte die Expression von recLARP1 nur einen kleinen Effekt, aber nicht signifikanten Effekt. Dies ist vermutlich auf toxische recLARP1-Konzentrationen durch Expression unter der Kontrolle des CMV-Promoters zurückzuführen. Zur Vermeidung toxischer LARP1-Mengen durch Überexpression, sollte die Expression von recLARP1 unter der Kontrolle eines schwächeren Promoters, wie zum Beispiel dem UBC- (*ubiquitin C*) Promoter, erfolgen (Qin *et al.*, 2010).

Um die verminderte Translationsstimulation durch hMKRN1s in LARP1-*knockout*-Zellen zu verifizieren, wurde die LARP1-Menge durch siRNA-*knockdown* reduziert. Dies führte

ebenfalls Verminderung der Translationsrate der Reporter-mRNA um 50 %. *Off-target*-Effekte der LARP1-spezifischen siRNAs, die Transkripte des RNA-Metabolismus betreffen, konnten mithilfe des *siRNA POTS lookup*-Algorithmus ausgeschlossen werden. Die verminderte Stimulation der Translation durch hMKRN1s in LARP1- und UPF1-defizienten Zellen deutete darauf hin, dass LARP1 und UPF1 als Interaktionspartner von hMKRN1s funktionell an der Translation beteiligt sind. PABP könnte dabei die Interaktion von hMKRN1s mit LARP1 und UPF1 vermitteln. Die Interaktion von LARP1 mit hMKRN1s ist im Vergleich zu UPF1 wichtiger für die Regulation der Translation, da der LARP1-Mangel den translationsfördernden Effekt von hMKRN1s stärker beeinträchtigt.

7.4 Abhängigkeit von eIF4E-vermittelter Translation

Die Interaktion von hMKRN1s mit eIF4G und PABP, sowie die Assoziation an Präinitiationskomplexe in SGs, lässt darauf schließen, dass hMKRN1s *in vivo* an frühen Schritten der Initiation beteiligt ist und möglicherweise direkt den Initiationskomplex eIF4F bindet.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden eIF4E und assoziierende Proteine affinitätsaufgereinigt. Dabei zeigte sich, dass hMKRN1s abhängig von der Interaktion mit PABP über das funktionelle PAM2-Motiv mit dem eIF4F-Komplex interagiert (Abbildung 21). Dies lässt vermuten, dass hMKRN1s eine Funktion in der eIF4F-vermittelten Translation einnimmt. Eine Interaktion von eIF4A, LARP1 und UPF1 mit dem eIF4F-Komplex konnte in der vorliegenden Arbeit nicht gezeigt werden. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass LARP1 und UPF1 erst nach der Bildung des eIF4F-Komplexes an der mRNA in die Translationsinitiation eingreifen. Entgegengesetzt zu dieser Beobachtung konnten Burrows *et al.* (2010) und Tcherkezian *et al.* (2014) für LARP1 zeigen, dass LARP1 mit m⁷-GTP-Agarose isoliert wird. Jedoch beruht diese Interaktion nicht auf direkte Bindung von LARP1 and eIF4E bzw. eIF4G (Tcherkezian *et al.*, 2014). Diese Differenz zwischen der Beobachtung der vorliegenden Arbeit und den Literaturangaben beruht möglicherweise auf dem Einsatz unterschiedlicher m⁷GTP-Agarosen. Unter Einsatz der m⁷-GTP-Sepharose 4B von GE Healthcare war die Isolation von LARP1 möglich (Burrows *et al.*, 2010; Tcherkezian *et al.*, 2014). Publierte Daten mit dem selben Produkt wie aus der vorliegenden Arbeit Produkt zeigten, dass LARP1 nicht

spezifisch angereichert werden konnte (Bell *et al.*, 2018; Fonseca *et al.*, 2015). Dass in der vorliegenden Arbeit die eIF4F-Komponente eIF4A nicht isoliert wurde, könnte auf hohe Konzentration von Detergenzien im Lyse-Puffer, im Vergleich zu Literaturdaten, zurückzuführen sein, die die Interaktion von eIF4A mit eIF4F inhibieren (Bell *et al.*, 2018). Durch die Affinitätsaufreinigung wurde gezeigt, dass hMKRN1s Teil des eIF4F-Initiationskomplexes ist. Weiterhin wurde überprüft, ob hMKRN1s in der Lage ist, die Initiation in Abwesenheit von eIF4E, unter einem reduzierten Set an Translationsinitiationsfaktoren, zu beeinflussen. Unter dem reduzierten Set an Translationsinitiationsfaktoren führte hMKRN1s lediglich zu einer 1,6-fachen Steigerung der Translationsrate der Reporter-mRNA. Der translationsfördernde Effekt von hMKRN1s ohne Beteiligung von eIF4E war deutlich geringer als die Stimulation der Translation unter Beteiligung von eIF4E. Dieser beobachtete Effekt deutet darauf hin, dass für die effiziente translationsfördernde Wirkung von hMKRN1s die Interaktion von hMKRN1s mit eIF4E und dem vollen Set an Initiationsfaktoren essenziell ist. Zusätzlich ist die Interaktion von hMKRN1s an den Initiationskomplex abhängig von PABP. hMKRN1s interagiert also nicht direkt mit eIF4F sondern benötigt die Interaktion mit PABP als Interaktionsgerüst für Initiationsfaktoren und translationsregulierende Proteine.

7.5 Ausblick

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden LARP1 und UPF1 als funktionelle Interaktionspartner von hMKRN1s identifiziert. Für LARP1 wurde gezeigt, dass die Interaktionen durch PABP vermittelt wird. Dass die Reduktion der LARP1- und UPF1-Mengen nur einen partiellen Verlust der translationsfördernden Wirkung durch hMKRN1s verursachte, deutet darauf hin, dass weiteren unbekanntem Interaktionspartnern an der Translationsregulation zusammen mit hMKRN1s beteiligt sind. In weiteren Untersuchungen sollten diese Interaktionspartner identifiziert werden. Aufgrund der RNA-unabhängigen Interaktion zwischen LARP1 und hMKRN1s sowie dem stärkeren Einfluss von LARP1 auf die hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation im Vergleich zu UPF1, sollte der molekulare Mechanismus hinter dieser Interaktion weiter untersucht werden.

Hong *et al.* (2017) konnten mittels PAR-CLIP (*photoactivatable ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation*) zeigen, dass phosphoryliertes LARP1 an die 3'UTR von 5'TOP-mRNAs bindet und so die Translation dieser mRNA stimuliert durch Induktion

der Initiation. Den Effekt erklären Hong *et al.* (2017) damit, dass phosphoryliertes LARP1 als Interaktionsgerüst über seine DM15-Domäne mTORC1 an die 3'UTR der mRNAs rekrutiert. Dieser ist anschließend in der Lage, 4EBP1 und S6K1 zu phosphorylieren. Nach Phosphorylierung dissoziiert 4EBP1 von eIF4E ab, was dessen Bindung an die 5'-Cap-Struktur, und damit die Initiation der Translation ermöglicht (Beretta *et al.*, 1996; Gingras *et al.*, 1999). Durch Phosphorylierung wird auch die Kinase S6K1 aktiviert, die das Ribosomale Protein S6, die eEF2-Kinase und den eIF4B phosphoryliert und aktiviert (Um *et al.*, 2006). Durch diese Prozesse wird die Translationsinitiation der LARP1-assoziierten mRNAs stimuliert.

Dieser molekulare Mechanismus stellt eine mögliche Grundlage für die translationsfördernde Wirkung von hMKRN1s durch Interaktion mit LARP1 dar. Im Falle der *N22-tethering*-Experimente, in welchen NF-hMKRN1s an die 3'UTR der Reporter-mRNA rekrutiert wurde, könnte die Interaktion mit LARP1 zur Rekrutierung von mTORC1 führen. Dieses könnte zur Phosphorylierung von 4EBP und S6K1 und somit zur Stimulation der Translation der Reporter-mRNA beitragen (Abbildung 24A). Dafür spricht, dass hMKRN1s mit den mTORC1-Proteinen mTOR und RAPTOR interagiert (siehe Anhang Tabelle 1). Zur Validierung dieser Interaktion sollten IPs von MKRN1s, mTOR und RAPTOR durchgeführt werden. Weiterhin wäre es sinnvoll, durch CLIP-Experimente (*UV crosslinking and immunoprecipitation*) *in vivo* Ziel-mRNAs von hMKRN1s zu identifizieren. Diese Methode ermöglicht die Identifikation von RNAs über UV-Quervernetzung, Immunpräzipitation und anschließender Sequenzierung, die spezifisch an einem RNA-bindenden Protein oder ganzen mRNP-Komplexen gebunden sind (Lee und Ule, 2018).

Sollte hMKRN1s primär an 3'UTRs von Ziel-mRNAs binden, könnte die Theorie der Rekrutierung von mTORC1 an den Komplex aus hMKRN1s und LARP1 auch *in vivo* relevant sein. Da hMKRN1s an aktive Synapsen rekrutiert wird und dort möglicherweise die Translation unbekannter Ziel-mRNAs stimuliert, wäre die Identifikation dieser Transkripte hilfreich, um die Funktion von MKRN1s an der synaptischen Plastizität aufzuklären. Dafür ist es erforderlich, geeignete Antikörper für eine Immunpräzipitation gegen hMKRN1s zu produzieren.

Falls sich die Interaktion von hMKRN1s mit dem mTORC1-Komplex über LARP1 bestätigt, sollte die funktionelle Bedeutung der Interaktion hinsichtlich der

Translationsförderung untersucht werden. Dazu kann die Auswirkung von reduzierten mTOR- und Raptor-Mengen auf die Translationsstimulation einer Reporter-mRNA durch hMKRN1s untersucht werden. Da der postulierte Mechanismus abhängig von aktiviertem mTORC1 ist, sollte der Einfluss von mTORC1-Inaktivierung auf die hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation untersucht werden. Die Inaktivierung von mTORC1 kann durch spezifische Inhibitoren wie Rapamycin oder durch Nährstoffmangel erfolgen (Kim *et al.*, 2002).

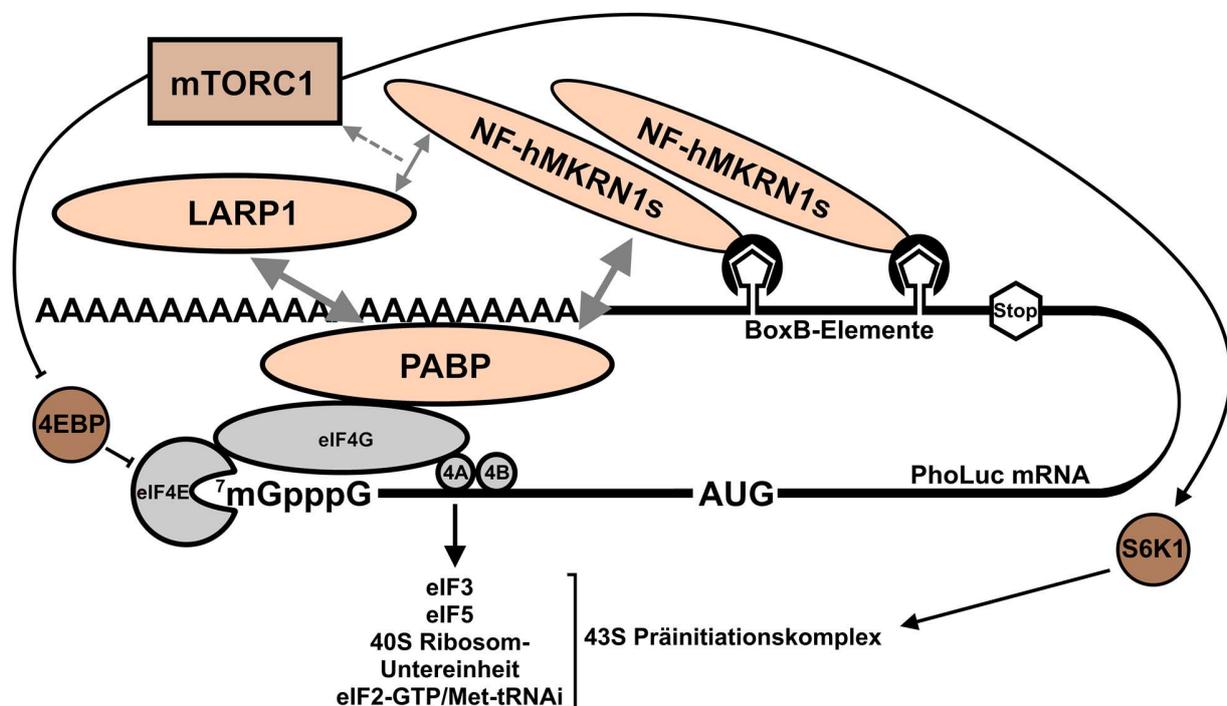


Abbildung 24 Modell der Rekrutierung mTORC1 durch hMKRN1s und LARP1. Nachdem NF-hMKRN1s an die 3'-UTR der PhoLuc-mRNA über BoxB-Elemente rekrutiert wurde, interagiert NF-hMKRN1s mit LARP1 über PABP. Die Interaktion zwischen hMKRN1s und LARP1 ermöglicht die Rekrutierung von mTORC1 an die mRNA. Dieses phosphoryliert und aktiviert 4EBP1 und S6K1. Dies stimuliert die Translationsinitiation an der PhoLuc-mRNA.

8 Referenzen

- Anderson, P., Kedersha, N. (2002). Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress & Chaperones*, 7(2), 213
- Andreassi, C., Riccio, A. (2009). To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends. *Trends Cell Biol*, 19(9), 465-474
- Ayache, J., Bénard, M., Ernoult-Lange, M., Minshall, N., Standart, N., Kress, M., Weil, D., Matera, A. G. (2015). P-body assembly requires DDX6 repression complexes rather than decay or Ataxin2/2L complexes. *Molecular Biology of the Cell*, 26(14), 2579-2595
- Azevedo, F. A., Carvalho, L. R., Grinberg, L. T., Farfel, J. M., Ferretti, R. E., Leite, R. E., Jacob Filho, W., Lent, R., Herculano-Houzel, S. (2009). Equal numbers of neuronal and nonneuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain. *J Comp Neurol*, 513(5), 532-541
- Bae, S., Park, J., Kim, J. S. (2014). Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics*, 30(10), 1473-1475
- Banko, J. L., Hou, L., Klann, E. (2004). NMDA receptor activation results in PKA- and ERK-dependent Mnk1 activation and increased eIF4E phosphorylation in hippocampal area CA1. *J Neurochem*, 91(2), 462-470
- Banko, J. L., Poulin, F., Hou, L., DeMaria, C. T., Sonenberg, N., Klann, E. (2005). The translation repressor 4E-BP2 is critical for eIF4F complex formation, synaptic plasticity, and memory in the hippocampus. *J Neurosci*, 25(42), 9581-9590
- Barria, A., Muller, D., Derkach, V., Griffith, L. C., Soderling, T. R. (1997). Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science*, 276(5321), 2042-2045
- Bell, J. B., Eckerdt, F., Dhruv, H. D., Finlay, D., Peng, S., Kim, S., Kroczyńska, B., Beauchamp, E. M., Alley, K., Clymer, J., Goldman, S., Cheng, S. Y., James, C. D., Nakano, I., Horbinski, C., Mazar, A. P., Vuori, K., Kumthekar, P., Raizer, J., Berens, M. E., Plataniias, L. C. (2018). Differential Response of Glioma Stem Cells to Arsenic Trioxide Therapy Is Regulated by MNK1 and mRNA Translation. *Mol Cancer Res*, 16(1), 32-46
- Bentmann, E., Haass, C., Dormann, D. (2013). Stress granules in neurodegeneration—lessons learnt from TAR DNA binding protein of 43 kDa and fused in sarcoma. *FEBS J*, 280(18), 4348-4370
- Beretta, L., Gingras, A. C., Svitkin, Y. V., Hall, M. N., Sonenberg, N. (1996). Rapamycin blocks the phosphorylation of 4E-BP1 and inhibits cap-dependent initiation of translation. *EMBO J*, 15(3), 658-664
- Bernstein, P., Ross, J. (1989). Poly(A), poly(A) binding protein and the regulation of mRNA stability. *Trends Biochem Sci*, 14(9), 373-377
- Blichenberg, A., Rehbein, M., Muller, R., Garner, C. C., Richter, D., Kindler, S. (2001). Identification of a cis-acting dendritic targeting element in the mRNA encoding the alpha subunit of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II. *Eur J Neurosci*, 13(10), 1881-1888
- Borman, A. M., Michel, Y. M., Malnou, C. E., Kean, K. M. (2002). Free poly(A) stimulates capped mRNA translation in vitro through the eIF4G-poly(A)-binding protein interaction. *J Biol Chem*, 277(39), 36818-36824
- Bornes, S., Boulard, M., Hieblot, C., Zanibellato, C., Iacovoni, J. S., Prats, H., Touriol, C. (2004). Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *J Biol Chem*, 279(18), 18717-18726

- Boudreau, R. L., Spengler, R. M., Hylock, R. H., Kusenda, B. J., Davis, H. A., Eichmann, D. A., Davidson, B. L. (2013). siSPOTR: a tool for designing highly specific and potent siRNAs for human and mouse. *Nucleic Acids Res*, *41*(1), e9
- Bramham, C. R., Wells, D. G. (2007). Dendritic mRNA: transport, translation and function. *Nat Rev Neurosci*, *8*(10), 776-789
- Brendel, C., Rehbein, M., Kreienkamp, H. J., Buck, F., Richter, D., Kindler, S. (2004). Characterization of Staufen 1 ribonucleoprotein complexes. *Biochem J*, *384*(Pt 2), 239-246
- Brook, M., Gray, N. K. (2012). The role of mammalian poly(A)-binding proteins in co-ordinating mRNA turnover. *Biochem Soc Trans*, *40*(4), 856-864
- Brown, V., Jin, P., Ceman, S., Darnell, J. C., O'Donnell, W. T., Tenenbaum, S. A., Jin, X., Feng, Y., Wilkinson, K. D., Keene, J. D., Darnell, R. B., Warren, S. T. (2001). Microarray identification of FMRP-associated brain mRNAs and altered mRNA translational profiles in fragile X syndrome. *Cell*, *107*(4), 477-487
- Buffington, S. A., Huang, W., Costa-Mattioli, M. (2014). Translational control in synaptic plasticity and cognitive dysfunction. *Annu Rev Neurosci*, *37*, 17-38
- Burnashev, N. (1998). Calcium permeability of ligand-gated channels. *Cell Calcium*, *24*(5-6), 325-332
- Burrows, C., Abd Latip, N., Lam, S. J., Carpenter, L., Sawicka, K., Tzolovsky, G., Gabra, H., Bushell, M., Glover, D. M., Willis, A. E., Blagden, S. P. (2010). The RNA binding protein Lar1 regulates cell division, apoptosis and cell migration. *Nucleic Acids Res*, *38*(16), 5542-5553
- Cai, Z., Gorin, A., Frederick, R., Ye, X., Hu, W., Majumdar, A., Kettani, A., Patel, D. J. (1998). Solution structure of P22 transcriptional antitermination N peptide-box B RNA complex. *Nature Structural Biology*, *5*(3), 203-212
- Cano, F., Miranda-Saavedra, D., Lehner, P. J. (2010). RNA-binding E3 ubiquitin ligases: novel players in nucleic acid regulation. *Biochem Soc Trans*, *38*(6), 1621-1626
- Casadio, A., Martin, K. C., Giustetto, M., Zhu, H., Chen, M., Bartsch, D., Bailey, C. H., Kandel, E. R. (1999). A transient, neuron-wide form of CREB-mediated long-term facilitation can be stabilized at specific synapses by local protein synthesis. *Cell*, *99*(2), 221-237
- Chamond, N., Deforges, J., Ulryck, N., Sargueil, B. (2014). 40S recruitment in the absence of eIF4G/4A by EMCV IRES refines the model for translation initiation on the archetype of Type II IRESs. *Nucleic Acids Res*, *42*(16), 10373-10384
- Chan, D. W., Chen, B. P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M. D., Qin, J., Chen, D. J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev*, *16*(18), 2333-2338
- Cioni, J. M., Koppers, M., Holt, C. E. (2018). Molecular control of local translation in axon development and maintenance. *Curr Opin Neurobiol*, *51*, 86-94
- Cohen, S., Greenberg, M. E. (2008). Communication between the synapse and the nucleus in neuronal development, plasticity, and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, *24*, 183-209
- Costa-Mattioli, M., Gobert, D., Harding, H., Herdy, B., Azzi, M., Bruno, M., Bidinosti, M., Ben Mamou, C., Marcinkiewicz, E., Yoshida, M., Imataka, H., Cuello, A. C., Seidah, N., Sossin, W., Lacaille, J. C., Ron, D., Nader, K., Sonenberg, N. (2005). Translational control of hippocampal synaptic plasticity and memory by the eIF2alpha kinase GCN2. *Nature*, *436*(7054), 1166-1173
- Damgaard, C. K., Lykke-Andersen, J. (2011). Translational coregulation of 5'TOP mRNAs by TIA-1 and TIAR. *Genes Dev*, *25*(19), 2057-2068
- Darnell, J. C., Van Driesche, S. J., Zhang, C., Hung, K. Y., Mele, A., Fraser, C. E., Stone, E. F., Chen, C., Fak, J. J., Chi, S. W., Licatalosi, D. D., Richter, J. D., Darnell, R. B. (2011). FMRP stalls ribosomal translocation on mRNAs linked to synaptic function and autism. *Cell*, *146*(2), 247-261

- De Rubeis, S., Bagni, C. (2011). Regulation of molecular pathways in the fragile X syndrome: insights into autism spectrum disorders. *J Neurodev Disord*, 3(3), 257-269
- Doyle, M., Kiebler, M. A. (2011). Mechanisms of dendritic mRNA transport and its role in synaptic tagging. *EMBO J*, 30(17), 3540-3552
- Duffy, C., Teyler, T. J., Shashoua, V. E. (1981). Long-term potentiation in the hippocampal slice: evidence for stimulated secretion of newly synthesized proteins. *Science*, 212(4499), 1148-1151
- Dun, M. D., Smith, N. D., Baker, M. A., Lin, M., Aitken, R. J., Nixon, B. (2011). The chaperonin containing TCP1 complex (CCT/TRiC) is involved in mediating sperm-oocyte interaction. *J Biol Chem*, 286(42), 36875-36887
- Edbauer, D., Neilson, J. R., Foster, K. A., Wang, C. F., Seeburg, D. P., Batterton, M. N., Tada, T., Dolan, B. M., Sharp, P. A., Sheng, M. (2010). Regulation of synaptic structure and function by FMRP-associated microRNAs miR-125b and miR-132. *Neuron*, 65(3), 373-384
- Engert, F., Bonhoeffer, T. (1999). Dendritic spine changes associated with hippocampal long-term synaptic plasticity. *Nature*, 399(6731), 66-70
- Fagg, W. S., Liu, N., Fair, J. H., Shiue, L., Katzman, S., Donohue, J. P., Ares, M., Jr. (2017). Autogenous cross-regulation of Quaking mRNA processing and translation balances Quaking functions in splicing and translation. *Genes Dev*, 31(18), 1894-1909
- Fedorov, Y., Anderson, E. M., Birmingham, A., Reynolds, A., Karpilow, J., Robinson, K., Leake, D., Marshall, W. S., Khvorova, A. (2006). Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA*, 12(7), 1188-1196
- Fernandez-Moya, S. M., Bauer, K. E., Kiebler, M. A. (2014). Meet the players: local translation at the synapse. *Front Mol Neurosci*, 7, 84
- Flexner, J. B., Flexner, L. B., Stellar, E. (1963). Memory in mice as affected by intracerebral puromycin. *Science*, 141(3575), 57
- Fonseca, B. D., Zakaria, C., Jia, J. J., Graber, T. E., Svitkin, Y., Tahmasebi, S., Healy, D., Hoang, H. D., Jensen, J. M., Diao, I. T., Lussier, A., Dajadian, C., Padmanabhan, N., Wang, W., Matta-Camacho, E., Hearnden, J., Smith, E. M., Tsukumo, Y., Yanagiya, A., Morita, M., Petroulakis, E., Gonzalez, J. L., Hernandez, G., Alain, T., Damgaard, C. K. (2015). La-related protein 1 (LARP1) represses terminal oligopyrimidine (TOP) mRNA translation downstream of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 290(26), 15996-16020
- Frank, A. M. (2009). A ranking-based scoring function for peptide-spectrum matches. *J Proteome Res*, 8(5), 2241-2252
- Fu, M., Blackshear, P. J. (2017). RNA-binding proteins in immune regulation: a focus on CCCH zinc finger proteins. *Nat Rev Immunol*, 17(2), 130-143
- Garber, K. B., Visootsak, J., Warren, S. T. (2008). Fragile X syndrome. *Eur J Hum Genet*, 16(6), 666-672
- Gingras, A. C., Gygi, S. P., Raught, B., Polakiewicz, R. D., Abraham, R. T., Hoekstra, M. F., Aebersold, R., Sonenberg, N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev*, 13(11), 1422-1437
- Gingras, A. C., Raught, B., Gygi, S. P., Niedzwiecka, A., Miron, M., Burley, S. K., Polakiewicz, R. D., Wyslouch-Cieszyńska, A., Aebersold, R., Sonenberg, N. (2001). Hierarchical phosphorylation of the translation inhibitor 4E-BP1. *Genes Dev*, 15(21), 2852-2864
- Giustetto, M., Hegde, A. N., Si, K., Casadio, A., Inokuchi, K., Pei, W., Kandel, E. R., Schwartz, J. H. (2003). Axonal transport of eukaryotic translation elongation factor 1 α mRNA couples transcription in the nucleus to long-term facilitation at the synapse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(23), 13680-13685
- Gong, R., Park, C. S., Abbassi, N. R., Tang, S. J. (2006). Roles of glutamate receptors and the mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling pathway in activity-dependent dendritic protein synthesis in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 281(27), 18802-18815

- Graber, T. E., Freemantle, E., Anadolu, M. N., Hebert-Seropian, S., MacAdam, R. L., Shin, U., Hoang, H. D., Alain, T., Lacaille, J. C., Sossin, W. S. (2017). UPF1 governs synaptic plasticity through association with a STAU2 RNA granule. *J Neurosci*, *37*(38), 9116-9131
- Graber, T. E., Holcik, M. (2007). Cap-independent regulation of gene expression in apoptosis. *Mol Biosyst*, *3*(12), 825-834
- Gray, T. A., Hernandez, L., Carey, A. H., Schaldach, M. A., Smithwick, M. J., Rus, K., Marshall Graves, J. A., Stewart, C. L., Nicholls, R. D. (2000). The ancient source of a distinct gene family encoding proteins featuring RING and C(3)H zinc-finger motifs with abundant expression in developing brain and nervous system. *Genomics*, *66*(1), 76-86
- Guertin, D. A., Stevens, D. M., Thoreen, C. C., Burds, A. A., Kalaany, N. Y., Moffat, J., Brown, M., Fitzgerald, K. J., Sabatini, D. M. (2006). Ablation in mice of the mTORC components raptor, rictor, or mLST8 reveals that mTORC2 is required for signaling to Akt-FOXO and PKCalpha, but not S6K1. *Dev Cell*, *11*(6), 859-871
- Hafezparast, M., Klocke, R., Ruhrberg, C., Marquardt, A., Ahmad-Annuar, A., Bowen, S., Lalli, G., Witherden, A. S., Hummerich, H., Nicholson, S., Morgan, P. J., Oozageer, R., Priestley, J. V., Averill, S., King, V. R., Ball, S., Peters, J., Toda, T., Yamamoto, A., Hiraoka, Y., Augustin, M., Korthaus, D., Wattler, S., Wabnitz, P., Dickneite, C., Lampel, S., Boehme, F., Peraus, G., Popp, A., Rudelius, M., Schlegel, J., Fuchs, H., Hrabe de Angelis, M., Schiavo, G., Shima, D. T., Russ, A. P., Stumm, G., Martin, J. E., Fisher, E. M. (2003). Mutations in dynein link motor neuron degeneration to defects in retrograde transport. *Science*, *300*(5620), 808-812
- Halt, A. R., Dallapiazza, R. F., Zhou, Y., Stein, I. S., Qian, H., Juntti, S., Wojcik, S., Brose, N., Silva, A. J., Hell, J. W. (2012). CaMKII binding to GluN2B is critical during memory consolidation. *EMBO J*, *31*(5), 1203-1216
- Hamilton, T. L., Stoneley, M., Spriggs, K. A., Bushell, M. (2006). TOPs and their regulation. *Biochem Soc Trans*, *34*(1), 12-16
- Hay, N., Sonenberg, N. (2004). Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*, *18*(16), 1926-1945
- Hebb, D. O. (1950). Organization of behavior. *Journal of Clinical Psychology*, *6*(3), 307-307
- Ho, S. N., Hunt, H. D., Horton, R. M., Pullen, J. K., Pease, L. R. (1989). Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*, *77*(1), 51-59
- Hong, S., Freeberg, M. A., Han, T., Kamath, A., Yao, Y., Fukuda, T., Suzuki, T., Kim, J. K., Inoki, K. (2017). LARP1 functions as a molecular switch for mTORC1-mediated translation of an essential class of mRNAs. *Elife*, *6*
- Huang, Y. S., Carson, J. H., Barbarese, E., Richter, J. D. (2003). Facilitation of dendritic mRNA transport by CPEB. *Genes Dev*, *17*(5), 638-653
- Huang, Y. S., Jung, M. Y., Sarkissian, M., Richter, J. D. (2002). N-methyl-D-aspartate receptor signaling results in Aurora kinase-catalyzed CPEB phosphorylation and alpha CaMKII mRNA polyadenylation at synapses. *EMBO J*, *21*(9), 2139-2148
- Imataka, H., Gradi, A., Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J*, *17*(24), 7480-7489
- Isken, O., Kim, Y. K., Hosoda, N., Mayeur, G. L., Hershey, J. W., Maquat, L. E. (2008). Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell*, *133*(2), 314-327
- Ivanov, A., Mikhailova, T., Eliseev, B., Yeramala, L., Sokolova, E., Susorov, D., Shuvalov, A., Schaffitzel, C., Alkalaeva, E. (2016). PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. *Nucleic Acids Res*, *44*(16), 7766-7776
- Jackson, A. L., Linsley, P. S. (2004). Noise amidst the silence: off-target effects of siRNAs? *Trends Genet*, *20*(11), 521-524

- Jackson, R. J., Hellen, C. U., Pestova, T. V. (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11(2), 113-127
- Jung, H., Gkogkas, C. G., Sonenberg, N., Holt, C. E. (2014). Remote control of gene function by local translation. *Cell*, 157(1), 26-40
- Kahvejian, A., Roy, G., Sonenberg, N. (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 66, 293-300
- Kanai, Y., Dohmae, N., Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron*, 43(4), 513-525
- Kandel, E. R. (2001). The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science*, 294(5544), 1030-1038
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*, 20(3), 355-367
- Kayali, F., Montie, H. L., Rafols, J. A., DeGracia, D. J. (2005). Prolonged translation arrest in reperfused hippocampal cornu Ammonis 1 is mediated by stress granules. *Neuroscience*, 134(4), 1223-1245
- Kedersha, N., Cho, M. R., Li, W., Yacono, P. W., Chen, S., Gilks, N., Golan, D. E., Anderson, P. (2000). Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. *J Cell Biol*, 151(6), 1257-1268
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M. J., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Golan, D. E., Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, 169(6), 871-884
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., Anderson, P. (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*, 147(7), 1431-1442
- Kelleher, R. J., 3rd, Govindarajan, A., Jung, H. Y., Kang, H., Tonegawa, S. (2004). Translational control by MAPK signaling in long-term synaptic plasticity and memory. *Cell*, 116(3), 467-479
- Kennedy, M. J., Ehlers, M. D. (2006). Organelles and trafficking machinery for postsynaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci*, 29(1), 325-362
- Khalil, B., Morderer, D., Price, P. L., Liu, F., Rossoll, W. (2018). mRNP assembly, axonal transport, and local translation in neurodegenerative diseases. *Brain Res*, 1693(Pt A), 75-91
- Kiebler, M. A., DesGroseillers, L. (2000). Molecular insights into mRNA transport and local translation in the mammalian nervous system. *Neuron*, 25(1), 19-28
- Kim, D. H., Sarbassov, D. D., Ali, S. M., King, J. E., Latek, R. R., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Sabatini, D. M. (2002). mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell*, 110(2), 163-175
- Kim, J. H., Park, S. M., Kang, M. R., Oh, S. Y., Lee, T. H., Muller, M. T., Chung, I. K. (2005). Ubiquitin ligase MKRN1 modulates telomere length homeostasis through a proteolysis of hTERT. *Genes Dev*, 19(7), 776-781
- Kindler, S., Kreienkamp, H. J. (2012). Dendritic mRNA targeting and translation. *Adv Exp Med Biol*, 970, 285-305
- Kindler, S., Wang, H., Richter, D., Tiedge, H. (2005). RNA transport and local control of translation. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 21, 223-245
- Klann, E., Dever, T. E. (2004). Biochemical mechanisms for translational regulation in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*, 5(12), 931-942

- Knowles, R. B., Sabry, J. H., Martone, M. E., Deerinck, T. J., Ellisman, M. H., Bassell, G. J., Kosik, K. S. (1996). Translocation of RNA granules in living neurons. *J Neurosci*, 16(24), 7812-7820
- Kozak, M. (1991). Structural features in eukaryotic mRNAs that modulate the initiation of translation. *Journal of Biological Chemistry*, 266(30), 19867-19870
- Kozlov, G., Menade, M., Rosenauer, A., Nguyen, L., Gehring, K. (2010a). Molecular determinants of PAM2 recognition by the MLE domain of poly(A)-binding protein. *J Mol Biol*, 397(2), 397-407
- Kozlov, G., Safaee, N., Rosenauer, A., Gehring, K. (2010b). Structural basis of binding of P-body-associated proteins GW182 and ataxin-2 by the MLE domain of poly(A)-binding protein. *J Biol Chem*, 285(18), 13599-13606
- Kremerskothen, J., Kindler, S., Finger, I., Veltel, S., Barnekow, A. (2006). Postsynaptic recruitment of Dendrin depends on both dendritic mRNA transport and synaptic anchoring. *J Neurochem*, 96(6), 1659-1666
- Krichevsky, A. M., Kosik, K. S. (2001). Neuronal RNA granules: a link between RNA localization and stimulation-dependent translation. *Neuron*, 32(4), 683-696
- Kuhn, U., Wahle, E. (2004). Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1678(2-3), 67-84
- Lahr, R. M., Fonseca, B. D., Ciotti, G. E., Al-Ashtal, H. A., Jia, J. J., Niklaus, M. R., Blagden, S. P., Alain, T., Berman, A. J. (2017). La-related protein 1 (LARP1) binds the mRNA cap, blocking eIF4F assembly on TOP mRNAs. *Elife*, 6, e24146
- Lai, W. S., Kennington, E. A., Blackshear, P. J. (2002). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *J Biol Chem*, 277(11), 9606-9613
- Lee, E. W., Lee, M. S., Camus, S., Ghim, J., Yang, M. R., Oh, W., Ha, N. C., Lane, D. P., Song, J. (2009a). Differential regulation of p53 and p21 by MKRN1 E3 ligase controls cell cycle arrest and apoptosis. *EMBO J*, 28(14), 2100-2113
- Lee, F. C. Y., Ule, J. (2018). Advances in CLIP technologies for studies of protein-RNA interactions. *Mol Cell*, 69(3), 354-369
- Lee, S. J., Escobedo-Lozoya, Y., Szatmari, E. M., Yasuda, R. (2009b). Activation of CaMKII in single dendritic spines during long-term potentiation. *Nature*, 458(7236), 299-304
- Legault, P., Li, J., Mogridge, J., Kay, L. E., Greenblatt, J. (1998). NMR structure of the bacteriophage λ N peptide/boxB RNA complex: recognition of a GNRA fold by an Arginine-rich motif. *Cell*, 93(2), 289-299
- Liang, J., Song, W., Tromp, G., Kolattukudy, P. E., Fu, M. (2008). Genome-wide survey and expression profiling of CCCH-zinc finger family reveals a functional module in macrophage activation. *PLoS ONE*, 3(8), e2880
- Maletic-Savatic, M., Malinow, R., Svoboda, K. (1999). Rapid dendritic morphogenesis in CA1 hippocampal dendrites induced by synaptic activity. *Science*, 283(5409), 1923-1927
- Mangus, D. A., Evans, M. C., Jacobson, A. (2003). Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol*, 4(7), 223
- Marintchev, A., Edmonds, K. A., Marintcheva, B., Hendrickson, E., Oberer, M., Suzuki, C., Herdy, B., Sonenberg, N., Wagner, G. (2009). Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell*, 136(3), 447-460
- Martin, K. C., Zukin, R. S. (2006). RNA trafficking and local protein synthesis in dendrites: an overview. *J Neurosci*, 26(27), 7131-7134
- Matsuzaki, M., Ellis-Davies, G. C., Nemoto, T., Miyashita, Y., Iino, M., Kasai, H. (2001). Dendritic spine geometry is critical for AMPA receptor expression in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *Nat Neurosci*, 4(11), 1086-1092
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G. C., Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature*, 429(6993), 761-766

- Meldrum, B. S. (2000). Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. *J Nutr*, 130(4S Suppl), 1007S-1015S
- Miller, S., Yasuda, M., Coats, J. K., Jones, Y., Martone, M. E., Mayford, M. (2002). Disruption of dendritic translation of CaMKII α impairs stabilization of synaptic plasticity and memory consolidation. *Neuron*, 36(3), 507-519
- Miroci, H., Schob, C., Kindler, S., Olschlager-Schutt, J., Fehr, S., Jungenitz, T., Schwarzacher, S. W., Bagni, C., Mohr, E. (2012). Makorin ring zinc finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells. *J Biol Chem*, 287(2), 1322-1334
- Mori, Y., Imaizumi, K., Katayama, T., Yoneda, T., Tohyama, M. (2000). Two cis-acting elements in the 3' untranslated region of alpha-CaMKII regulate its dendritic targeting. *Nat Neurosci*, 3(11), 1079-1084
- Mura, M., Hopkins, T. G., Michael, T., Abd-Latip, N., Weir, J., Aboagye, E., Mauri, F., Jameson, C., Sturge, J., Gabra, H., Bushell, M., Willis, A. E., Curry, E., Blagden, S. P. (2015). LARP1 post-transcriptionally regulates mTOR and contributes to cancer progression. *Oncogene*, 34(39), 5025-5036
- Murakoshi, H., Wang, H., Yasuda, R. (2011). Local, persistent activation of Rho GTPases during plasticity of single dendritic spines. *Nature*, 472(7341), 100-104
- Murthy, V. N., Schikorski, T., Stevens, C. F., Zhu, Y. (2001). Inactivity produces increases in neurotransmitter release and synapse size. *Neuron*, 32(4), 673-682
- Naarmann, I. S., Harnisch, C., Muller-Newen, G., Urlaub, H., Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H. (2010). DDX6 recruits translational silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA*, 16(11), 2189-2204
- Nader, K., Schafe, G. E., Le Doux, J. E. (2000). Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. *Nature*, 406(6797), 722-726
- Naisbitt, S., Kim, E., Tu, J. C., Xiao, B., Sala, C., Valtschanoff, J., Weinberg, R. J., Worley, P. F., Sheng, M. (1999). Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and Cortactin. *Neuron*, 23(3), 569-582
- Napoli, I., Mercaldo, V., Boyl, P. P., Eleuteri, B., Zalfa, F., De Rubeis, S., Di Marino, D., Mohr, E., Massimi, M., Falconi, M., Witke, W., Costa-Mattioli, M., Sonenberg, N., Achsel, T., Bagni, C. (2008). The fragile X syndrome protein represses activity-dependent translation through CYFIP1, a new 4E-BP. *Cell*, 134(6), 1042-1054
- Narayanan, U., Nalavadi, V., Nakamoto, M., Thomas, G., Ceman, S., Bassell, G. J., Warren, S. T. (2008). S6K1 phosphorylates and regulates fragile X mental retardation protein (FMRP) with the neuronal protein synthesis-dependent mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling cascade. *J Biol Chem*, 283(27), 18478-18482
- Nott, A., Le Hir, H., Moore, M. J. (2004). Splicing enhances translation in mammalian cells: an additional function of the exon junction complex. *Genes Dev*, 18(2), 210-222
- Nusser, Z., Lujan, R., Laube, G., Roberts, J. D., Molnar, E., Somogyi, P. (1998). Cell type and pathway dependence of synaptic AMPA receptor number and variability in the hippocampus. *Neuron*, 21(3), 545-559
- Ostroff, L. E., Cain, C. K., Bedont, J., Monfils, M. H., Ledoux, J. E. (2010). Fear and safety learning differentially affect synapse size and dendritic translation in the lateral amygdala. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(20), 9418-9423
- Ostroff, L. E., Fiala, J. C., Allwardt, B., Harris, K. M. (2002). Polyribosomes redistribute from dendritic shafts into spines with enlarged synapses during LTP in developing rat hippocampal slices. *Neuron*, 35(3), 535-545
- Pakkenberg, B., Pelvig, D., Marnier, L., Bundgaard, M. J., Gundersen, H. J., Nyengaard, J. R., Regeur, L. (2003). Aging and the human neocortex. *Exp Gerontol*, 38(1-2), 95-99
- Paulin, F. E. M., Campbell, L. E., O'Brien, K., Loughlin, J., Proud, C. G. (2001). Eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) acts as a classical GTPase-activator protein. *Current Biology*, 11(1), 55-59

- Pavitt, G. D., Ramaiah, K. V. A., Kimball, S. R., Hinnebusch, A. G. (1998). eIF2 independently binds two distinct eIF2B subcomplexes that catalyze and regulate guanine–nucleotide exchange. *Genes & development*, 12(4), 514-526
- Pestova, T. V., Lomakin, I. B., Lee, J. H., Choi, S. K., Dever, T. E., Hellen, C. U. (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature*, 403(6767), 332-335
- Pfeiffer, B. E., Huber, K. M. (2006). Current advances in local protein synthesis and synaptic plasticity. *J Neurosci*, 26(27), 7147-7150
- Philippe, L., Vasseur, J. J., Debart, F., Thoreen, C. C. (2018). La-related protein 1 (LARP1) repression of TOP mRNA translation is mediated through its cap-binding domain and controlled by an adjacent regulatory region. *Nucleic Acids Res*, 46(3), 1457-1469
- Protter, D. S., Parker, R. (2016). Principles and properties of stress granules. *Trends Cell Biol*, 26(9), 668-679
- Qin, J. Y., Zhang, L., Clift, K. L., Hular, I., Xiang, A. P., Ren, B. Z., Lahn, B. T. (2010). Systematic comparison of constitutive promoters and the doxycycline-inducible promoter. *PLoS ONE*, 5(5), e10611
- Qiu, S., Adema, C. M., Lane, T. (2005). A computational study of off-target effects of RNA interference. *Nucleic Acids Res*, 33(6), 1834-1847
- Reck-Peterson, S. L., Redwine, W. B., Vale, R. D., Carter, A. P. (2018). The cytoplasmic dynein transport machinery and its many cargoes. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(6), 382-398
- Rehbein, M., Kindler, S., Horke, S., Richter, D. (2000). Two trans-acting rat-brain proteins, MARTA1 and MARTA2, interact specifically with the dendritic targeting element in MAP2 mRNAs. *Molecular Brain Research*, 79(1-2), 192-201
- Rehbein, M., Wege, K., Buck, F., Schweizer, M., Richter, D., Kindler, S. (2002). Molecular characterization of MARTA1, a protein interacting with the dendritic targeting element of MAP2 mRNAs. *J Neurochem*, 82(5), 1039-1046
- Reineke, L. C., Dougherty, J. D., Pierre, P., Lloyd, R. E. (2012). Large G3BP-induced granules trigger eIF2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell*, 23(18), 3499-3510
- Ruvinsky, I., Meyuhas, O. (2006). Ribosomal protein S6 phosphorylation: from protein synthesis to cell size. *Trends Biochem Sci*, 31(6), 342-348
- Sasaki, S., Shionoya, A., Ishida, M., Gambello, M. J., Yingling, J., Wynshaw-Boris, A., Hirotsune, S. (2000). A LIS1/NUDEL/cytoplasmic dynein heavy chain complex in the developing and adult nervous system. *Neuron*, 28(3), 681-696
- Schratt, G. M., Nigh, E. A., Chen, W. G., Hu, L., Greenberg, M. E. (2004). BDNF regulates the translation of a select group of mRNAs by a mammalian target of rapamycin-phosphatidylinositol 3-kinase-dependent pathway during neuronal development. *J Neurosci*, 24(33), 7366-7377
- Schuman, E. M., Dynes, J. L., Steward, O. (2006). Synaptic regulation of translation of dendritic mRNAs. *J Neurosci*, 26(27), 7143-7146
- Seibel, N. M., Eljouni, J., Nalaskowski, M. M., Hampe, W. (2007). Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. *Anal Biochem*, 368(1), 95-99
- Seo, S., Baye, L. M., Schulz, N. P., Beck, J. S., Zhang, Q., Slusarski, D. C., Sheffield, V. C. (2010). BBS6, BBS10, and BBS12 form a complex with CCT/TRiC family chaperonins and mediate BBSome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(4), 1488-1493
- Shahbazian, D., Roux, P. P., Mieulet, V., Cohen, M. S., Raught, B., Taunton, J., Hershey, J. W., Blenis, J., Pende, M., Sonenberg, N. (2006). The mTOR/PI3K and MAPK pathways converge on eIF4B to control its phosphorylation and activity. *EMBO J*, 25(12), 2781-2791
- Sherrill, K. W., Byrd, M. P., Van Eden, M. E., Lloyd, R. E. (2004). BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. *J Biol Chem*, 279(28), 29066-29074
- Sherry, S. T., Ward, M. H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E. M., Sirotkin, K. (2001). dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, 29(1), 308-311

- Slipczuk, L., Bekinschtein, P., Katche, C., Cammarota, M., Izquierdo, I., Medina, J. H. (2009). BDNF activates mTOR to regulate GluR1 expression required for memory formation. *PLoS ONE*, 4(6), e6007
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A. G. (2009a). Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell*, 136(4), 731-745
- Sonenberg, N., Hinnebusch, A. G. (2009b). Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell*, 136(4), 731-745
- Spahr, P. F., Hollingworth, B. R. (1961). Purification and mechanism of action of ribonuclease from escherichia coli ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 236(3), 823-831
- Spriggs, K. A., Bushell, M., Willis, A. E. (2010). Translational regulation of gene expression during conditions of cell stress. *Mol Cell*, 40(2), 228-237
- Squire, L. R., Barondes, S. H. (1973). Memory impairment during prolonged training in mice given inhibitors of cerebral protein synthesis. *Brain Res*, 56, 215-225
- Stefani, G., Fraser, C. E., Darnell, J. C., Darnell, R. B. (2004). Fragile X mental retardation protein is associated with translating polyribosomes in neuronal cells. *J Neurosci*, 24(33), 7272-7276
- Stenson, P. D., Ball, E. V., Mort, M., Phillips, A. D., Shiel, J. A., Thomas, N. S., Abeyasinghe, S., Krawczak, M., Cooper, D. N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat*, 21(6), 577-581
- Sternlicht, H., Farr, G. W., Sternlicht, M. L., Driscoll, J. K., Willison, K., Yaffe, M. B. (1993). The t-complex polypeptide 1 complex is a chaperonin for tubulin and actin in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(20), 9422-9426
- Steward, O., Levy, W. B. (1982). Preferential localization of polyribosomes under the base of dendritic spines in granule cells of the dentate gyrus. *J Neurosci*, 2(3), 284-291
- Steward, O., Reeves, T. M. (1988). Protein-synthetic machinery beneath postsynaptic sites on CNS neurons: association between polyribosomes and other organelles at the synaptic site. *The Journal of neuroscience*, 8(1), 176-184
- Steward, O., Schuman, E. M. (2003). Compartmentalized synthesis and degradation of proteins in neurons. *Neuron*, 40(2), 347-359
- Stock, D., Leslie, A. G., Walker, J. E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science*, 286(5445), 1700-1705
- Suliman, B. A., Xu, D., Williams, B. R. (2012). The promyelocytic leukemia zinc finger protein: two decades of molecular oncology. *Front Oncol*, 2, 74
- Sweet, T., Yen, W., Khalili, K., Amini, S. (2008). Evidence for involvement of NFBP in processing of ribosomal RNA. *J Cell Physiol*, 214(2), 381-388
- Takei, N., Kawamura, M., Hara, K., Yonezawa, K., Nawa, H. (2001). Brain-derived neurotrophic factor enhances neuronal translation by activating multiple initiation processes: comparison with the effects of insulin. *J Biol Chem*, 276(46), 42818-42825
- Takei, N., Nawa, H. (2014). mTOR signaling and its roles in normal and abnormal brain development. *Front Mol Neurosci*, 7, 28
- Takumi, Y., Ramirez-Leon, V., Laake, P., Rinvik, E., Ottersen, O. P. (1999). Different modes of expression of AMPA and NMDA receptors in hippocampal synapses. *Nat Neurosci*, 2(7), 618-624
- Tang, B. L. (2008). Protein trafficking mechanisms associated with neurite outgrowth and polarized sorting in neurons. *J Neurochem*, 79(5), 923-930
- Tang, S. J., Reis, G., Kang, H., Gingras, A. C., Sonenberg, N., Schuman, E. M. (2002). A rapamycin-sensitive signaling pathway contributes to long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(1), 467-472
- Tarun, S. Z., Jr., Sachs, A. B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J*, 15(24), 7168-7177

- Tcherkezian, J., Cargnello, M., Romeo, Y., Huttlin, E. L., Lavoie, G., Gygi, S. P., Roux, P. P. (2014). Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev*, 28(4), 357-371
- The UniProt, C. (2017). UniProt: the universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res*, 45(D1), D158-D169
- Thoreen, C. C., Kang, S. A., Chang, J. W., Liu, Q., Zhang, J., Gao, Y., Reichling, L. J., Sim, T., Sabatini, D. M., Gray, N. S. (2009). An ATP-competitive mammalian target of rapamycin inhibitor reveals rapamycin-resistant functions of mTORC1. *J Biol Chem*, 284(12), 8023-8032
- Torre, E. R., Steward, O. (1992). Demonstration of local protein synthesis within dendrites using a new cell culture system that permits the isolation of living axons and dendrites from their cell bodies. *The Journal of neuroscience*, 12(3), 762
- Trinh, M. A., Klann, E. (2013). Translational control by eIF2alpha kinases in long-lasting synaptic plasticity and long-term memory. *Neurobiol Learn Mem*, 105, 93-99
- Tsokas, P., Ma, T., Iyengar, R., Landau, E. M., Blitzer, R. D. (2007). Mitogen-activated protein kinase upregulates the dendritic translation machinery in long-term potentiation by controlling the mammalian target of rapamycin pathway. *J Neurosci*, 27(22), 5885-5894
- Udagawa, T., Swanger, S. A., Takeuchi, K., Kim, J. H., Nalavadi, V., Shin, J., Lorenz, L. J., Zukin, R. S., Bassell, G. J., Richter, J. D. (2012). Bidirectional control of mRNA translation and synaptic plasticity by the cytoplasmic polyadenylation complex. *Mol Cell*, 47(2), 253-266
- Um, S. H., D'Alessio, D., Thomas, G. (2006). Nutrient overload, insulin resistance, and ribosomal protein S6 kinase 1, S6K1. *Cell Metab*, 3(6), 393-402
- Unbehaun, A., Borukhov, S. I., Hellen, C. U., Pestova, T. V. (2004). Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev*, 18(24), 3078-3093
- Wang, D. O., Martin, K. C., Zukin, R. S. (2010). Spatially restricting gene expression by local translation at synapses. *Trends Neurosci*, 33(4), 173-182
- Wang, H., Dichtenberg, J. B., Ku, L., Li, W., Bassell, G. J., Feng, Y. (2008). Dynamic association of the fragile X mental retardation protein as a messenger ribonucleoprotein between microtubules and polyribosomes. *Mol Biol Cell*, 19(1), 105-114
- Wang, H., Iacoangeli, A., Lin, D., Williams, K., Denman, R. B., Hellen, C. U., Tiedge, H. (2005). Dendritic BC1 RNA in translational control mechanisms. *J Cell Biol*, 171(5), 811-821
- Wang, T., Blumhagen, R., Lao, U., Kuo, Y., Edgar, B. A. (2012a). LST8 regulates cell growth via target-of-rapamycin complex 2 (TORC2). *Mol Cell Biol*, 32(12), 2203-2213
- Wang, T., Bray, S. M., Warren, S. T. (2012b). New perspectives on the biology of fragile X syndrome. *Curr Opin Genet Dev*, 22(3), 256-263
- Wang, X., Li, W., Williams, M., Terada, N., Alessi, D. R., Proud, C. G. (2001). Regulation of elongation factor 2 kinase by p90(RSK1) and p70 S6 kinase. *EMBO J*, 20(16), 4370-4379
- Wheeler, J. R., Matheny, T., Jain, S., Abrisch, R., Parker, R. (2016). Distinct stages in stress granule assembly and disassembly. *Elife*, 5
- Wilusz, C. J., Wormington, M., Peltz, S. W. (2001). The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2(4), 237-246
- Wu, B., Eliscovich, C., Yoon, Y. J., Singer, R. H. (2016). Translation dynamics of single mRNAs in live cells and neurons. *Science*, 352(6292), 1430-1435
- Wu, L., Wells, D., Tay, J., Mendis, D., Abbott, M.-A., Barnitt, A., Quinlan, E., Heynen, A., Fallon, J. R., Richter, J. D. (1998). CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation and the regulation of experience-dependent translation of α -CaMKII mRNA at synapses. *Neuron*, 21(5), 1129-1139

Referenzen

- Xie, J., Kozlov, G., Gehring, K. (2014). The "tale" of poly(A) binding protein: the MLLE domain and PAM2-containing proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1839(11), 1062-1068
- Yavuzer, U., Smith, G. C., Bliss, T., Werner, D., Jackson, S. P. (1998). DNA end-independent activation of DNA-PK mediated via association with the DNA-binding protein C1D. *Genes Dev*, 12(14), 2188-2199
- Zhong, J., Zhang, T., Bloch, L. M. (2006). Dendritic mRNAs encode diversified functionalities in hippocampal pyramidal neurons. *BMC Neurosci*, 7, 17
- Zhou, Y., Takahashi, E., Li, W., Halt, A., Wiltgen, B., Ehninger, D., Li, G. D., Hell, J. W., Kennedy, M. B., Silva, A. J. (2007). Interactions between the NR2B receptor and CaMKII modulate synaptic plasticity and spatial learning. *J Neurosci*, 27(50), 13843-13853
- Zivraj, K. H., Rehbein, M., Olschlager-Schutt, J., Schob, C., Falley, K., Buck, F., Schweizer, M., Schepis, A., Kremmer, E., Richter, D., Kreienkamp, H. J., Kindler, S. (2013). The RNA-binding protein MARTA2 regulates dendritic targeting of MAP2 mRNAs in rat neurons. *J Neurochem*, 124(5), 670-684

9 Liste der Abbildungen

Abbildung #	Quelle / Autor	Seite	
#1	Modell des aktiven Transportes dendritischer Transkripte.	Kremerskothen et al. (2006), modifiziert	14
#2	Schematisches Modell der Translationsinitiation.	Buffington et al. (2014), modifiziert	18
#3	Schematisches Modell der SG-Bildung.	Bentmann et al. (2013), modifiziert	20
#4	MKRN1.	Miroci et al. (2012), modifiziert	25
#5	Schematische Darstellung des N22-tethering-Experiments.	André Friedrich	54
#6	ZF1 und PAM2-Motiv sind essenziell für eine effiziente hMKRN1s vermittelte Translationsstimulation.	André Friedrich / eigene Daten	57
#7	Inaktivierung von ZF1 und PAM2 unterbindet hMKRN1s-vermittelte Translationsstimulation.	André Friedrich / eigene Daten	58
#8	Rekombinantes EGFP-hMKRN1s akkumuliert in SGs.	André Friedrich / eigene Daten	60
#9	Rekombinantes NF-hMKRN1s akkumuliert in SGs.	André Friedrich / eigene Daten	60
#10	Schematische Darstellung der für die IP sowie die anschließende LC-MS-Analyse eingesetzten rekombinanten hMKRN1s-Proteine.	André Friedrich	64
#11	Schematische Darstellung der für die IP sowie die anschließende LC-MS-Analyse eingesetzten hMKRN1s-Domänen.	André Friedrich	68
#12	Kopräzipitation endogener Interaktionspartner von hMKRN1s.	André Friedrich / eigene Daten	73
#13	Analyse Protein-Interaktionen in Ratten Cortex.	André Friedrich / eigene Daten	73
#14	Translationsstimulation von hMKRN1s unter UPF1- <i>knockdown</i> .	André Friedrich / eigene Daten	77
#15	LARP1- <i>knockout</i> mittels CRISPR/CAS9.	André Friedrich / eigene Daten	78
#16	Translationsstimulation von hMKRN1s unter LARP1- <i>knockout</i> .	André Friedrich / eigene Daten	81
#17	LARP1 moduliert die hMKRN1s-vermittelte Translationsregulation.	André Friedrich / eigene Daten	82
#18	Verschiedene Domänen von PABP binden an LARP1 und UPF	André Friedrich / eigene Daten	84
#19	LARP1 interagiert über LAM + RRML5 mit PABP und hMKRN1s	André Friedrich / eigene Daten	85
#20	PABP als Interaktionsgerüst der LARP1:hMKRN1s Interaktion.	André Friedrich / eigene Daten	87
#21	hMKRN1s interagiert mit dem 5'-Cap-Bindungskomplex.	André Friedrich / eigene Daten	89
#22	hMKRN1s stimuliert geringfügig die 5'-Cap-unabhängige Translation.	André Friedrich / eigene Daten	91
#23	PABP als Interaktionsgerüst.	André Friedrich	96
#24	Modell der Rekrutierung mTORC1 durch hMKRN1s und LARP1.	André Friedrich	103

10 Anhang

Anhang Tabelle 1 EGFP-hMKRN1s-IP LC-MS Daten sortiert nach $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s}}$.

UniProt Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s IP	hMKRN1s ^{F172A} IP	EGFP Kontroll IP
			PSM	PSM	PSM
Q9UHC7	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 (MKRN1)	53,315	546	437	31
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (PRKDC)	468,788	193	242	63
P68363	Tubulin alpha-1B chain (TUBA1B)	50,12	204	169	53
Q9BQE3	Tubulin alpha-1C chain (TUBA1C)	49,863	197	160	52
P68371	Tubulin beta-4B chain (TUBB4B)	49,799	206	150	70
P07437	Tubulin beta chain (TUBB)	49,639	214	166	78
Q71U36	Tubulin alpha-1A chain (TUBA1A)	50,104	183	144	51
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain (TUBB2B)	49,921	197	147	69
P04350	Tubulin beta-4A chain (TUBB4A)	49,554	188	137	60
Q13885	Tubulin beta-2A chain (TUBB2A)	49,875	195	146	69
P68366	Tubulin alpha-4A chain (TUBA4A)	49,892	162	138	37
Q13748	Tubulin alpha-3C/D chain (TUBA3C)	49,928	158	123	45
Q13509	Tubulin beta-3 chain (TUBB3)	50,4	153	109	47
Q6PEY2	Tubulin alpha-3E chain (TUBA3E)	49,827	143	106	38
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 (PABPC1)	70,626	113	22	18
Q9BUF5	Tubulin beta-6 chain (TUBB6)	49,825	112	77	32
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 (DYNC1H1)	532,072	90	126	13
Q3ZCM7	Tubulin beta-8 chain (TUBB8)	49,744	70	0	0
Q13434	Putative E3 ubiquitin-protein ligase makorin-4 (MKRN4P)	52,875	70	51	0
O14980	Exportin-1 (XPO1)	123,306	85	100	24
P06733	Alpha-enolase (ENO1)	47,139	87	49	28
Q92616	Translational activator GCN1 (GCN1L1)	292,572	60	83	4
P68104	Elongation factor 1-alpha 1 (EEF1A1)	50,109	78	49	23
P27708	CAD protein (CAD)	242,829	92	115	38
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP1)	60,306	83	96	31
Q5VTE0	Putative elongation factor 1-alpha-like 3 (EEF1A1P5)	50,153	74	46	22
P49368	T-complex protein 1 subunit gamma (CCT3)	60,495	64	60	14
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	59,714	73	62	25
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 (PABPC4)	70,738	58	10	12

Anhang

Q92621	Nuclear pore complex protein Nup205 (NUP205)	227,776	64	85	19
Q6PKG0	La-related protein 1 (LARP1)	123,434	45	3	2
P54136	Arginine-tRNA ligase, cytoplasmic (RARS)	75,331	56	50	13
Q5VYK3	Proteasome-associated protein ECM29 homolog (ECM29)	204,16	43	56	2
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8- dissociated protein 1 (CAND1)	136,289	55	67	15
P33993	DNA replication licensing factor MCM7 (MCM7)	81,257	65	61	29
Q9UJS0	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar2 (SLC25A13)	74,129	52	53	16
P16615	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2 (ATP2A2)	114,683	41	60	5
P60842	Eukaryotic initiation factor 4A-I (EIF4A1)	46,125	48	39	15
Q43592	Exportin-T (XPOT)	109,893	41	57	8
P43490	Nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT)	55,487	38	26	6
P50991	T-complex protein 1 subunit delta (CCT4)	57,888	55	43	24
Q9Y678	Coatmer subunit gamma-1 (COPG1)	97,655	36	45	5
Q9NU22	Midasin (MDN1)	632,42	31	44	0
P28340	DNA polymerase delta catalytic subunit (POLD1)	123,553	35	35	5
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)	56,525	42	33	13
Q9NV11	Fanconi anemia group I protein (FANCI)	149,229	29	46	0
Q13064	Probable E3 ubiquitin-protein ligase makorin-3 (MKRN3)	55,609	31	24	3
Q7Z6Z7	E3 ubiquitin-protein ligase HUWE1 (HUWE1)	481,589	32	35	5
P53618	Coatmer subunit beta (COPB1)	107,074	39	55	13
Q9UG63	ATP-binding cassette sub-family F member 2 (ABCF2)	71,245	37	47	11
P31689	DnaJ homolog subfamily A member 1 (DNAJA1)	44,839	31	13	5
Q05639	Elongation factor 1-alpha 2 (EEF1A2)	50,438	36	27	11
P55060	Exportin-2 (CSE1L)	110,346	38	50	13
Q9H361	Polyadenylate-binding protein 3 (PABPC3)	69,987	31	9	7
Q08J23	tRNA (cytosine(34)-C(5))- methyltransferase (NSUN2)	86,416	31	29	7
Q14683	Structural maintenance of chromosomes protein 1A (SMC1A)	143,144	27	46	3
P22695	Cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial (UQCRC2)	48,413	34	27	10
P57678	Gem-associated protein 4 (GEMIN4)	119,96	27	30	3
P23258	Tubulin gamma-1 chain (TUBG1)	51,138	25	9	1

P49411	Elongation factor Tu, mitochondrial (TUFM)	49,51	39	36	16
P33991	DNA replication licensing factor MCM4 (MCM4)	96,498	35	46	12
Q8N1F7	Nuclear pore complex protein Nup93 (NUP93)	93,43	30	50	7
O75746	Calcium-binding mitochondrial carrier protein Aralar1 (SLC25A12)	74,715	27	29	4
P07814	Bifunctional glutamate/proline-- tRNA ligase (EPRS)	170,483	38	58	16
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta (CCT6A)	57,988	34	26	12
P26641	Elongation factor 1-gamma (EEF1G)	50,087	28	15	6
P42704	Leucine-rich PPR motif- containing protein, mitochondrial (LRPPRC)	157,805	22	28	0
Q13085	Acetyl-CoA carboxylase 1 (ACACA)	265,385	32	35	10
Q9Y4L1	Hypoxia up-regulated protein 1 (HYOU1)	111,266	24	27	2
P43246	DNA mismatch repair protein Msh2 (MSH2)	104,677	24	19	2
P23396	40S ribosomal protein S3 (RPS3)	26,671	36	31	15
O14654	Insulin receptor substrate 4 (IRS4)	133,685	36	45	15
Q9UQE7	Structural maintenance of chromosomes protein 3 (SMC3)	141,454	30	34	9
Q96T76	MMS19 nucleotide excision repair protein homolog (MMS19)	113,217	23	45	2
Q9UI26	Importin-11 (IPO11)	112,463	22	41	1
Q9UIA9	Exportin-7 (XPO7)	123,828	22	32	1
Q9H583	HEAT repeat-containing protein 1 (HEATR1)	242,215	36	54	16
Q14147	Probable ATP-dependent RNA helicase DHX34 (DHX34)	128,04	20	17	0
P02786	Transferrin receptor protein 1 (TFRC)	84,818	20	14	0
O95347	Structural maintenance of chromosomes protein 2 (SMC2)	135,572	27	29	7
P56192	Methionine--tRNA ligase, cytoplasmic (MARS)	101,052	26	24	6
P28331	NADH-ubiquinone oxidoreductase 75 kDa subunit, mitochondrial (NDUFS1)	79,417	22	21	2
P05141	ADP/ATP translocase 2 (SLC25A5)	32,831	27	24	8
Q86Y56	HEAT repeat-containing protein 2 (HEATR2)	93,462	25	27	6
Q9Y5L0	Transportin-3 (TNPO3)	104,136	20	27	1
Q9UNY4	Transcription termination factor 2 (TTF2)	129,508	19	21	0
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 (UPF1)	124,267	37	21	19
Q8TEX9	Importin-4 (IPO4)	118,64	22	43	4
Q15386	Ubiquitin-protein ligase E3C (UBE3C)	123,844	22	31	4
P57740	Nuclear pore complex protein Nup107 (NUP107)	106,307	20	21	2

Anhang

Q9NSE4	Isoleucine--tRNA ligase, mitochondrial (IARS2)	113,719	20	22	2
Q15021	Condensin complex subunit 1 (NCAPD2)	157,082	19	26	1
P42345	Serine/threonine-protein kinase mTOR (MTOR)	288,707	18	18	0
P04049	RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase (RAF1)	73,005	18	17	0
P19338	Nucleolin (NCL)	76,568	28	11	11
O00148	ATP-dependent RNA helicase DDX39A (DDX39A)	49,098	27	30	10
Q9UBF2	Coatomer subunit gamma-2 (COPG2)	97,56	19	20	2
A0FGR8	Extended synaptotagmin-2 (ESYT2)	102,294	17	12	0
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (HNRNPH1)	49,198	49	21	33
A6NHL2	Tubulin alpha chain-like 3 (TUBAL3)	49,877	23	16	7
P28288	ATP-binding cassette sub-family D member 3 (ABCD3)	75,428	18	16	2
Q96P70	Importin-9 (IPO9)	115,889	18	16	2
A1L0T0	Acetolactate synthase-like protein (ILVBL)	67,825	17	12	1
Q9NRH3	Tubulin gamma-2 chain (TUBG2)	51,06	17	7	1
Q5SRE5	Nucleoporin NUP188 homolog (NUP188)	195,917	17	42	1
Q9NR12	PDZ and LIM domain protein 7 (PDLIM7)	49,813	17	4	1
O43264	Centromere/kinetochore protein zw10 homolog (ZW10)	88,773	16	16	0
Q9Y4W6	AFG3-like protein 2 (AFG3L2)	88,528	16	7	0
Q9Y2L1	Exosome complex exonuclease RRP44 (DIS3)	108,934	23	26	8
Q99714	3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2 (HSD17B10)	26,906	18	21	3
P50454	Serpin H1 (SERPINH1)	46,411	17	11	2
P25205	DNA replication licensing factor MCM3 (MCM3)	90,924	27	19	12
Q9Y277	Voltage-dependent anion- selective channel protein 3 (VDAC3)	30,639	23	25	8
Q14C86	GTPase-activating protein and VPS9 domain-containing protein 1 (GAPVD1)	164,876	18	18	3
P12235	ADP/ATP translocase 1 (SLC25A4)	33,043	18	23	3
P51617	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)	76,489	16	15	1
Q9H9B4	Sideroflexin-1 (SFXN1)	35,596	15	10	0
Q14527	Helicase-like transcription factor (HLTF)	113,857	21	28	7
Q7L2E3	Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30 (DHX30)	133,855	18	5	4
O43175	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase (PHGDH)	56,614	28	29	14

Anhang

P55786	Puromycin-sensitive aminopeptidase (NPEPPS)	103,211	28	38	14
Q93008	Probable ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase FAF-X (USP9X)	292,094	24	35	10
P05023	Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha-1 (ATP1A1)	112,824	20	28	6
P12004	Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)	28,75	19	18	5
P30837	Aldehyde dehydrogenase X, mitochondrial (ALDH1B1)	57,17	17	6	3
Q9H3U1	Protein unc-45 homolog A (UNC45A)	103,011	16	14	2
P09104	Gamma-enolase (ENO2)	47,239	16	12	2
Q8N122	Regulatory-associated protein of mTOR (RPTOR)	148,942	16	28	2
P35658	Nuclear pore complex protein Nup214 (NUP214)	213,488	16	20	2
P51530	DNA replication ATP-dependent helicase/nuclease DNA2 (DNA2)	120,337	15	16	1
O60884	DnaJ homolog subfamily A member 2 (DNAJA2)	45,717	15	13	1
O14981	TATA-binding protein-associated factor 172 (BTAF1)	206,756	15	33	1
Q9BSJ2	Gamma-tubulin complex component 2 (TUBGCP2)	102,469	15	16	1
P09884	DNA polymerase alpha catalytic subunit (POLA1)	165,807	15	22	1
Q6PGP7	Tetratricopeptide repeat protein 37 (TTC37)	175,375	14	33	0
O14617	AP-3 complex subunit delta-1 (AP3D1)	130,076	14	16	0
Q9Y4C2	Protein FAM115A (FAM115A)	102,061	14	13	0
Q07864	DNA polymerase epsilon catalytic subunit A (POLE)	261,351	14	10	0
P42858	Huntingtin (HTT)	347,383	14	20	0
O75643	U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase (SNRNP200)	244,353	30	37	17
P10809	60 kDa heat shock protein, mitochondrial (HSPD1)	61,016	29	36	16
P52597	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F (HNRNPF)	45,643	27	12	14
Q7L8L6	FAST kinase domain-containing protein 5 (FASTKD5)	86,519	13	12	0
P22102	Trifunctional purine biosynthetic protein adenosine-3 (GART)	107,699	49	50	36
P48643	T-complex protein 1 subunit epsilon (CCT5)	59,633	24	14	11
P12236	ADP/ATP translocase 3 (SLC25A6)	32,845	19	26	6
O95163	Elongator complex protein 1 (IKBKAP)	150,159	19	23	6
Q00325	Phosphate carrier protein, mitochondrial (SLC25A3)	40,069	16	17	3
P48735	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial (IDH2)	50,877	16	8	3
O60716	Catenin delta-1 (CTNND1)	108,103	16	15	3

P31153	S-adenosylmethionine synthase isoform type-2 (MAT2A)	43,633	16	19	3
Q01813	ATP-dependent 6-phosphofructokinase, platelet type (PFKP)	85,542	15	17	2
O14983	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 (ATP2A1)	110,182	14	19	1
Q9UBB4	Ataxin-10 (ATXN10)	53,455	14	11	1
Q9UBX3	Mitochondrial dicarboxylate carrier (SLC25A10)	31,262	13	14	0
Q9H223	EH domain-containing protein 4 (EHD4)	61,137	13	5	0
Q7Z5K2	Wings apart-like protein homolog (WAPAL)	132,863	13	24	0
P21359	Neurofibromin (NF1)	319,168	13	22	0
Q9NZI8	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IMP1)	63,441	26	6	14
Q92973	Transportin-1 (TNPO1)	102,289	19	27	7
Q9HAV4	Exportin-5 (XPO5)	136,222	17	24	5
Q9UMR2	ATP-dependent RNA helicase DDX19B (DDX19B)	53,893	13	5	1
P54577	Tyrosine--tRNA ligase, cytoplasmic (YARS)	59,106	13	6	1
Q9HCE1	Putative helicase MOV-10 (MOV10)	113,599	13	2	1
O00411	DNA-directed RNA polymerase, mitochondrial (POLRMT)	138,532	12	14	0
Q9P2J5	Leucine--tRNA ligase, cytoplasmic (LARS)	134,379	22	22	10
P07197	Neurofilament medium polypeptide (NEFM)	102,411	17	25	5
P13929	Beta-enolase (ENO3)	46,957	15	13	3
Q8WUM0	Nuclear pore complex protein Nup133 (NUP133)	128,898	14	21	2
O14757	Serine/threonine-protein kinase Chk1 (CHEK1)	54,399	13	6	1
Q9Y4R8	Telomere length regulation protein TEL2 homolog (TELO2)	91,689	12	21	0
O60313	Dynamamin-like 120 kDa protein, mitochondrial (OPA1)	111,561	12	14	0
O00429	Dynamamin-1-like protein (DNM1L)	81,826	12	6	0
Q6AI08	HEAT repeat-containing protein 6 (HEATR6)	128,699	12	16	0
P52701	DNA mismatch repair protein Msh6 (MSH6)	152,689	12	18	0
P18074	TFIIH basal transcription factor complex helicase XPD subunit (ERCC2)	86,854	12	13	0
Q13547	Histone deacetylase 1 (HDAC1)	55,068	12	7	0
P06493	Cyclin-dependent kinase 1 (CDK1)	34,074	12	16	0

Anhang Tabelle 2 EGFP-hMKRN1s₅₁₋₈₉- & EGFP-hMKRN1s₁₅₁₋₂₀₃ LC-MS Daten sortiert nach $\Delta\text{PSM}_{\text{hMKRN1s } 151-203}$.

UniProt Eintrag	hMKRN1s assoziiertes Protein	Molekulare Masse [kDa]	hMKRN1s ₅₁₋₈₉ IP	hMKRN1s ₁₅₁₋₂₀₃ IP	EGFP Kontroll IP
			PSM	PSM	PSM
P11940	Polyadenylate-binding protein 1 (PABPC1)	70,626	6	91	6
Q13310	Polyadenylate-binding protein 4 (PABPC4)	70,738	2	49	5
P14866	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L (HNRNPL)	64,092	0	41	0
Q9H361	Polyadenylate-binding protein 3 (PABPC3)	69,987	3	38	3
Q92900	Regulator of nonsense transcripts 1 (UPF1)	124,267	0	33	0
Q12906	Interleukin enhancer-binding factor 3 (ILF3)	95,279	2	32	0
Q6PKG0	La-related protein 1 (LARP1)	123,434	0	32	0
Q9HCE1	Putative helicase MOV-10 (MOV10)	113,599	0	29	0
P67809	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 (YBX1)	35,903	2	26	4
Q09161	Nuclear cap-binding protein subunit 1 (NCBP1)	91,781	0	19	0
Q9NZ18	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IMP1)	63,441	4	19	2
P52272	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M (HNRNPM)	77,464	6	17	1
Q12905	Interleukin enhancer-binding factor 2 (ILF2)	43,035	2	15	1
Q4VXU2	Polyadenylate-binding protein 1-like (PABPC1L)	68,349	0	14	1
O00425	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3)	63,666	0	12	0
O43143	Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15 (DHX15)	90,875	1	12	0
Q9UQ35	Serine/arginine repetitive matrix protein 2 (SRRM2)	299,438	0	12	0
O43390	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R (HNRNPR)	70,899	2	13	2
Q9UKV8	Protein argonaute-2 (EIF2C2)	97,146	0	11	0
Q08211	ATP-dependent RNA helicase A (DHX9)	140,869	15	16	6
P26599	Polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1)	57,186	1	12	2
Q9BUJ2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1 (HNRNPUL1)	95,679	0	10	0
P11142	Heat shock cognate 71 kDa protein (HSPA8)	70,854	17	34	25
Q04637	Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1 (EIF4G1)	175,382	0	13	4
P11387	DNA topoisomerase 1 (TOP1)	90,669	0	10	1
Q9UHC7	E3 ubiquitin-protein ligase makorin-1 (MKRN1)	53,315	7	10	1
P07910	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 (HNRNPC)	33,65	0	9	0

Anhang

Q9UL18	Protein argonaute-1 (AGO1)	97,152	0	9	0
Q9Y6M1	Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2 (IGF2BP2)	66,081	0	9	0
P61978	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (HNRNPK)	50,944	1	14	6
O14979	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like (HNRNPDL)	46,409	1	9	1
P26368	Splicing factor U2AF 65 kDa subunit (U2AF2)	53,467	0	8	0
P42694	Probable helicase with zinc finger domain (HELZ)	218,833	0	8	0
Q8TEQ6	Gem-associated protein 5 (GEMIN5)	168,483	0	8	0
P78527	DNA-dependent protein kinase catalytic subunit (PRKDC)	468,788	25	18	11
P16989	Y-box-binding protein 3 (YBX3)	40,066	1	10	3
P31943	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H (HNRNPH1)	49,198	1	9	2
Q96SB4	SRSF protein kinase 1 (SRPK1)	74,278	0	7	0
Q9H9G7	Protein argonaute-3 (AGO3)	97,298	0	7	0
Q9UHX1	Poly(U)-binding-splicing factor PUF60 (PUF60)	59,838	0	7	0
O60506	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q (SYNCRIP)	69,56	2	9	3
Q14103	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 (HNRNPD)	38,41	1	7	1
Q14444	Caprin-1 (CAPRIN1)	78,318	0	7	1
Q14684	Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B (RRP1B)	84,375	2	7	1
Q8IYB3	Serine/arginine repetitive matrix protein 1 (SRRM1)	102,274	0	6	0
Q96S19	Spermatid perinuclear RNA-binding protein (STRBP)	73,606	0	6	0
Q6PEY2	Tubulin alpha-3E chain (TUBA3E)	49,827	10	12	7
P22626	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 (HNRNPA2B1)	37,407	2	8	3
P62424	60S ribosomal protein L7a (RPL7A)	29,977	2	7	2
Q92841	Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17 (DDX17)	80,222	4	7	2
Q9Y2T7	Y-box-binding protein 2 (YBX2)	38,495	1	7	2
B2RXH8	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 2 (HNRNPCL2)	32,053	0	5	0
O60812	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C-like 1 (HNRNPCL1)	32,123	0	5	0
P08621	U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa (SNRNP70)	51,526	0	5	0
P23246	Splicing factor, proline- and glutamine-rich (SFPQ)	76,102	0	5	0
P51991	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 (HNRNPA3)	39,571	0	5	0
Q08945	FACT complex subunit SSRP1 (SSRP1)	81,024	1	5	0

Anhang

Q13435	Splicing factor 3B subunit 2 (SF3B2)	100,165	2	5	0
Q15393	Splicing factor 3B subunit 3 (SF3B3)	135,492	1	5	0
Q659C4	La-related protein 1B (LARP1B)	105,257	0	5	0
Q6P2Q9	Pre-mRNA-processing-splicing factor 8 (PRPF8)	273,427	0	5	0
Q9BY44	Eukaryotic translation initiation factor 2A (EIF2A)	64,949	0	5	0
Q9HCK5	Protein argonaute-4 (AGO4)	97,035	0	5	0
Q9UNK9	Protein angel homolog 1 (ANGEL1)	75,227	0	5	0
P68363	Tubulin alpha-1B chain (TUBA1B)	50,12	16	14	11
P06737	Glycogen phosphorylase, liver form (PYGL)	97,087	11	3	1
P17987	T-complex protein 1 subunit alpha (TCP1)	60,306	12	8	7
P25705	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial (ATP5A1)	59,714	9	5	4
Q86VP6	Cullin-associated NEDD8-dissociated protein 1 (CAND1)	136,289	12	5	4
P40227	T-complex protein 1 subunit zeta (CCT6A)	57,988	7	2	2
Q14204	Cytoplasmic dynein 1 heavy chain 1 (DYNC1H1)	532,072	7	1	1
Q8N4J0	UPF0586 protein C9orf41 (C9orf41)	47,155	25	0	0
Q13885	Tubulin beta-2A chain (TUBB2A)	49,875	15	8	10
Q9BVA1	Tubulin beta-2B chain (TUBB2B)	49,921	15	8	10
P06576	ATP synthase subunit beta, mitochondrial (ATP5B)	56,525	11	4	6

11 Danksagungen

Hiermit möchte ich mich herzlichst bei meinen Projekt-Betreuern PD Dr. Evita Mohr und Prof. Dr. Stefan Kindler bedanken für die Möglichkeit an diesem Forschungsprojekt arbeiten zu dürfen. Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Thorsten Burmester für seine Co-Betreuung danken.

Mein Dank geht auch an alle Kollegen des Institutes für Humangenetik im Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf. Dabei geht ein besonderer Dank an Hans-Hinrich Hönck, ohne den der Forschungsbetrieb im Institut kaum möglich wäre. Ein weiterer Dank geht an meine Kollegen Dennis Zorndt, Malte Klüssendorf, Victoria Martens, Sarah von Loh, Stefanie Meien und Yingzhou Edward Pan für ein freundschaftliches Verhältnis auch nach Feierabend! Zusätzlich möchte ich mich bei den Arbeitsgruppen von Prof. Dr. Kerstin Kutsche, Prof. Dr. Hans-Jürgen Kreienkamp und PD Dr. Georg Rosenberger für eine gute Kooperation und sehr hilfreichen Anmerkungen bedanken. Dabei geht ein Extra-Dank an die Mädels der AG Kutsche, AG Kubisch und AG Rosenberger, für die Unterstützung und all die guten Gespräche in den Mittagspausen.

Hiermit möchte ich mich auch ganz besonders für die Unterstützung von Dr. Antonio Virgilio Failla und Dr. Bernd Zobiak (UKE Microscopy Imaging Facility) sowie von Sönke Harder (Core Facility Massenspektrometrische Proteomik) bedanken.

Eidenstattliche Versicherung

12 Eidenstattliche Versicherung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Hamburg, den

André Friedrich