

**Zusammensetzung von IGF2BP1-enthaltenden  
Ribonukleoproteinkomplexen**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften  
*doctor rerum naturalium*  
(Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Frau Anne Baude

geb. am 11.10.1981 in Riesa

Tag der Verteidigung:

15.03.2019

Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Dirk Ostareck

<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 DIE POSTTRANSKRIPTIONELLE GENREGULATION .....	1
1.1.1 Aufbau von Ribonukleoproteinkomplexen .....	2
1.1.2 RNA-Bindung im Ribonukleoproteinkomplex .....	3
1.2 DIE FUNKTION VON RNA-BINDENDEN PROTEINEN .....	4
1.2.1 Die Rolle der RNA-bindenden Proteine bei der mRNA-Lokalisation/Translationskontrolle....	5
1.2.2 Die Rolle der RNA-bindenden Proteine bei der mRNA-Stabilität .....	6
1.2.3 Die Rolle der RNA-bindenden Proteine in humanen Krankheiten .....	7
1.2.4 RNA-bindende Proteine während der Karzinogenese .....	8
1.3 INSULIN LIKE GROWTH FACTOR PROTEIN 1 .....	9
1.3.1 Strukturelle Charakterisierung von IGF2BP1 .....	9
1.3.2 Funktion von IGF2BP1 im Fokus der posttranskriptionellen Genregulation .....	11
1.4 ZIELSTELLUNG .....	15
<b>MATERIAL UND METHODEN.....</b>	<b>16</b>
2.1 MATERIAL .....	16
2.1.1 Gebrauchsmaterialien .....	16
2.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	16
2.1.3 Kommerzielle Systeme .....	17
2.1.4 Häufig verwendete Puffer .....	18
2.1.5 Enzyme und Antikörper .....	20
2.1.6 Plasmide, Oligonukleotide und siRNAs .....	22
2.1.6.1 Plasmide .....	22
2.1.6.2 Oligonukleotide .....	22
2.1.6.3 siRNAs .....	23
2.1.7 Bakterienstämme und bakterielle Kulturmedien .....	23
2.1.8 Eukaryotische Zelllinien und Zellkulturmedien .....	24
2.1.9 Serviceleistungen .....	24
2.1.10 Geräte .....	25
2.2 METHODEN .....	25
2.2.1 Molekularbiologische Methoden .....	25
2.2.1.1 Klonierung .....	25
2.2.1.2 Isolierung von DNA .....	25
2.2.1.3 Agarosegelelelution - Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten .....	26
2.2.1.4 Isolierung von RNA mittels Trizol .....	26
2.2.1.5 cDNA Synhtese .....	26

2.2.1.6	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR).....	27
2.2.1.7	Synthese von in-vitro-transkribierter RNA .....	28
2.2.1.8	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	28
2.2.2	Biochemische Methoden.....	28
2.2.2.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	28
2.2.2.2	Silberfärbung von Polyacrylamidgelen .....	29
2.2.2.3	Western Blot .....	29
2.2.2.4	RNA-pulldown .....	30
2.2.2.5	Cross-linking Immunpräzipitation mit in-vitro-transkribierter RNA .....	30
2.2.2.6	Tandemaffinitätsreinigung .....	31
2.2.2.7	Sucroседichtegradienten-Zentrifugation .....	31
2.2.2.8	Aukonzentrierung von Proteinlösungen mittels TCA/NaDOC-Fällung .....	31
2.2.2.9	Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten .....	32
2.2.3	Zellbiologische Methoden .....	32
2.2.3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	32
2.2.3.2	Zelltransfektion .....	32
2.2.3.3	Fixierung und Permeabilisierung eukaryotischer Zellen auf Deckgläschen.....	32
2.2.3.4	Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie eukaryotischer Zellen .....	33
2.2.3.5	Elektronenmikroskopie .....	33
2.2.4	Statistische Auswertung.....	34
2.2.5	In silico-Analysen.....	34
<b>ERGEBNISSE</b>	.....	<b>35</b>
3.1	ZUSAMMENSETZUNG VON IGF2BP1-MRNPs .....	35
3.1.1	OPTIMIERUNG DES RNA-PULLDOWNS.....	38
3.1.2	RNA-PULLDOWN-VERFAHREN IDENTIFIZIERT NEUE PUTATIVE BINDUNGSPARTNER DER ACTB- UND MYC-MRNA .....	41
3.1.3	DIE PROTEINZUSAMMENSETZUNG DER MRNPs VARIIERT TRANSKRIPTSPEZIFISCH.....	45
3.1.4	IDENTIFIZIERUNG DER RNP-KOMPLEXBILDUNG WÄHREND DES PULLDOWN-VERFAHRENS.....	47
3.1.5	IGF2BP1 SEDIMENTIERT IM SUCROSEDICHTEGRADIENTEN IN LEICHTEN UND SCHWEREN MRNPs .....	48
3.1.6	NACHWEIS DER BINDUNG ZWISCHEN RNA UND PROTEIN MITTELS CROSS-LINKING IMMUNPRÄZIPITATION MIT IN-VITRO-TRANSKRIBIERTER RNA.....	51
3.1.7	DIE TANDEMAFFINITÄTSREINIGUNG IDENTIFIZIERT INTERAKTIONSPARTNER IM IGF2BP1-ENTHALTENEN RNP .....	53
3.2	LOKALISATION DER IGF2BP1-INTERAKTIONSPARTNER .....	55
3.2.1	PULLDOWN-ANALYSEN MITTELS ZYTOPLASMA-UND KERNEXTRAKT.....	59

3.3 UNTERSUCHUNG DER STABILITÄTS- UND TRANSLATIONSKONTROLLE DER MYC-UND ACTB-MRNA DURCH AUSGEWÄHLTE IGF2BP1-KOMPLEXPARTNER.....	60
3.3.1 EINFLUSS DER IGF2BP1-KOMPLEXPARTNER AUF DIE STABILITÄT DER MYC-MRNA UND DIE TRANSLATION DER ACTB-MRNA.....	62
3.3.2 EINFLUSS VON HNRNPE2 AUF DIE TRANSLATIONSEFFIZIENZ VON ACTB.....	65
3.3.3 STABILITÄTSREGULATION DER MYC-MRNA DURCH HNRNPM.....	67
3.3.4 HNRNPM ALS PUTATIVER ONKOGENER FAKTOR.....	68
3.4 ELEKTRONENMIKROSKOPIE.....	71
<b>DISKUSSION .....</b>	<b>73</b>
4.1 RBPS VERPACKEN DIE GEBUNDENEN TRANSKRIPTE IN KOMPACTE RNPS.....	75
4.2 KOMPONENTEN UND TRANSKRIPTSPEZIFISCHE PROTEINLIGANDEN IGF2BP1-ENTHALTENDER RNPS .....	76
4.2.1 Analyse der IGF2BP1-mRNP-Komposition und Identifizierung eines core-Komplexes .....	77
4.2.2 Identifizierung transkriptspezifischer neuer RBPs.....	81
4.2.3 Identifizierung cis-Element-spezifischer RNPs.....	83
4.3 KONTROLLE DER ACTB- UND MYC-GENEXPRESSION.....	85
4.3.1 Einfluss von HNRNPE2 auf die ACTB-Genexpression.....	85
4.3.2 HNRNPM als putativer onkogener Faktor und MYC-Regulator .....	87
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>89</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>91</b>
<b>7 ANHANG .....</b>	<b>103</b>

## Einleitung

Das Expressionsmuster einer eukaryotischen Zelle ist das Resultat einer komplexen Regulation der Expression aller einzelnen Gene. Für die Genregulation sind verschiedene Mechanismen verantwortlich, die in transkriptionelle, posttranskriptionelle und posttranslationale Regulationsmechanismen unterteilt sind (Abb. 1.1).

Während transkriptionelle Regulationsmechanismen auf der Sequenz einzelner DNA-Bereiche eines Gens basieren, zu denen Promotor, Enhancer und Silencer gehören, beschäftigt sich die posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression mit der Regulation der messenger-RNA (mRNA). Die posttranslationalen Mechanismen umfassen die Modifikation (z. B. Phosphorylierung, Hydroxylierung, Glykosylierung, proteolytische Spaltung) der einzelnen Proteine. Die mRNA ist dabei das Bindeglied zwischen DNA und Protein und ist für die Genexpression von elementarer Bedeutung.

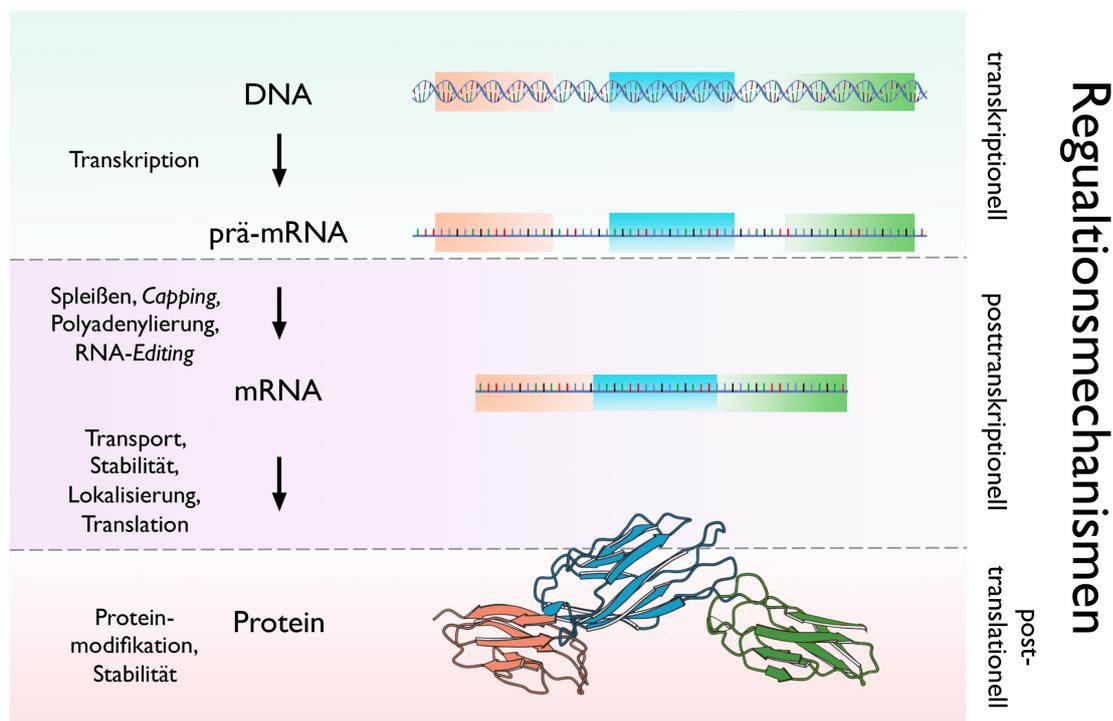


Abbildung 1.1: Darstellung der Regulationsmechanismen der Genregulation

### 1.1 Die posttranskriptionelle Genregulation

Die posttranskriptionelle Genregulation der mRNA ist entscheidend für die Steuerung der Genexpression, da sie sowohl schnelle als auch lokale Veränderungen in der Synthese bestimmter Proteine ermöglicht. Die elementaren Mechanismen beinhalten die mRNA-Prozessierung, bei der die

## Einleitung

prä-mRNA in eine reife mRNA überführt wird. Dazu gehört das Anfügen der *Cap*-Struktur an das 5'Ende, die Polyadenylierung am 3'Ende, das Spleißen und das RNA-Editing. Nach der Prozessierung schließt sich der nukleäre Export, die subzelluläre Lokalisation, die Stabilitätskontrolle und die Translation der mRNA an.

Jedes dieser Ereignisse wird durch die Bildung verschiedener Ribonukleoproteinkomplexe (RNP-Komplexe) gesteuert, in denen regulatorische Faktoren wie z. B. RNA-bindende Proteine (RBPs) und diverse Klassen von RNAs mitwirken. Die Mechanismen der posttranskriptionellen Genregulation werden dabei durch die Summe der assoziierten Faktoren bestimmt. Der RNP stellt somit die funktionelle Einheit dar, in der prä-mRNAs sowie mRNAs in der Zelle vorkommen, und ist entscheidend für das Schicksal der RNA (Dreyfuss et al., 2002).

### **1.1.1 Aufbau von Ribonukleoproteinkomplexen**

Es gibt unterschiedliche Klassen von RNPs, welche durch die zelluläre Verteilung, ihrer Größe, die vermuteten Funktionen und dem Vorhandensein spezieller Marker bestimmt sind. So unterscheidet man im Kern hauptsächlich *heterogeneous nuclear* RNPs (HNRNPs) und *small nuclear* RNPs (snRNPs), welche zum größten Teil an der RNA-Prozessierung (z. B. dem Spleißosom) beteiligt sind. Im Zytoplasma treten unter anderem: i) Ribosomen sowie *small cytoplasmic* RNPs (scRNPs) auf, welche an der Translation beteiligt sind; ii) der *RNA Induced Silencing Complex* (RISC), welcher verantwortlich ist für den Abbau der Ziel-RNA; iii) sowie die *messenger* RNPs (mRNPs), bei denen man polysomale und freie unterscheiden kann, welche die mRNA-Lokalisation,-Stabilität und-Translation beeinflussen. Zusätzlich können sich RNPs zu größeren Komplexen zusammenlagern und z. B. *processing-bodies* (PBs) und *stress granules* (SGs) bilden. PBs spielen möglicherweise beim mRNA-Abbau eine Rolle während SGs infolge des stressbedingten Erliegens der Translation entstehen (Kedersha et al., 2005). Die Zusammensetzung der RNPs variiert fortlaufend von der prä-mRNA zur translatierten mRNA, wobei einige Proteine assoziiert bleiben, andere hingegen dissoziieren oder ausgetauscht werden (Wahl et al., 2009; Lejeune et al., 2002). Ein gutes Beispiel dafür ist das Entfernen der Intron- sowie auch einiger Exon-assoziiierter RBPs aus dem RNP-Komplex nach dem Spleißen, welche durch *Exon Junction Complex* (EJC)-Proteine ersetzt werden. Die Komplexzusammensetzung zwischen ungespleißter und gespleißter mRNA unterscheidet sich daher wesentlich voneinander. Man vermutet ebenso, dass nach dem Export aus dem Zellkern eine Umstrukturierung der RNPs stattfindet und weitere RBPs, die beispielsweise für den Transport benötigt werden, mit dem RNP assoziieren (Kress et al., 2004). Im Allgemeinen erhalten RNPs durch die teilweise bestehende Konstanz der assoziierten Proteine sowie durch die Variabilität eine Anpassung an externe als auch

## Einleitung

interne Veränderungen der Zelle. Ein RNP ist demzufolge ein stabiler und gleichzeitig dynamischer Komplex.

Durch das Zusammenspiel von mRNA und RNA-bindenden Proteinen ist es möglich, das Translationsprofil eines jeden RNA-Moleküls individuell zu regulieren. Dabei werden extrazelluläre Signale über die jeweilige Zusammensetzung eines mRNP-Komplexes direkt mit dem mRNA Metabolismus verknüpft.

### **1.1.2 RNA-Bindung im Ribonukleoproteinkomplex**

Neben den RNA-bindenden Proteinen beinhalten die RNPs auch unterschiedlichen RNA-Klassen. Ursprünglich nahm man an, dass RNAs in RNPs hauptsächlich in Form von mRNA, transfer-RNA (tRNA) sowie ribosomaler-RNA (rRNA) auftritt und so der Proteinsynthese dient. Die Entdeckung nicht kodierenden RNAs, wie mi micro-RNAs, *short* RNAs oder *long non coding* RNAs (lncRNAs) führte zu einem Umdenken in der modernen Molekularbiologie und man erkannte wie vielseitig RNA sein kann (Gerstberger et al., 2014).

Obwohl die Funktion vieler nicht kodierende RNAs noch weitgehend ungeklärt ist, konnten schon einige Beispiele gezeigt werden, in denen nicht kodierende RNAs die Translationseffizienz bestimmter mRNAs auf unterschiedliche Weise beeinflussen und somit an der Genregulation beteiligt sind. Ein gut untersuchtes Beispiel ist die miRNA-Familie lethal-7 oder kurz miR-let-7. Die miR-let-7-Familie agiert in Tumorzellen hauptsächlich als Tumorsuppressor und inhibiert die Expression von diversen onkogenen Faktoren (Boyerinas et al., 2010; Wang et al., 2012).

Die Bindung der RNAs wird über sequenzbasierte Erkennungsmotive sowie komplexe Sekundär- bzw. Tertiärstrukturen vermittelt (Macdonald et al., 1993; Serano & Cohen, 1995; Gonzalez et al., 1999). Diese Motive können in allen Bereichen der mRNA vorkommen. Der größte Anteil an Erkennungsmotiven liegt jedoch überwiegend in der 5' und 3' untranslatierten Region (UTR) der mRNA (Mignone et al., 2002; Pesole et al., 2000; Wilkie et al., 2003) wie z. B. der 5' *Cap* oder der Poly-A-Schwanz in der 3'UTR.

In der Regel sind die 5'UTRs von mRNAs wesentlich kürzer und GC-reicher als die 3'UTRs. (Mignone et al., 2002). Die 5'UTR wird vor allem während der Translationsinitiation eine entscheidende Rolle zugesprochen, während der 3'UTR das größere regulatorische Potential in Bezug auf die mRNA-Lokalisationsvermittlung, mRNA-Stabilität oder die Translationseffizienz zukommt. Deshalb wird die 3'UTR auch als Hauptträger der regulativen Elemente, der sogenannten cis-regulatorischen Elemente, der mRNA angesehen (Brown et al., 1998; Pesole et al., 2000; Arn et al., 2003).

Die Interaktion von RBPs mit der RNA beruht entweder auf einer direkten Wechselwirkung oder einer indirekten Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des RNP. Dabei wird die RNA-Bindung durch

## Einleitung

RNA-Bindedomänen (RBD) innerhalb des Proteins vermittelt, welche über Bakterien, Archaea und Eukaryoten hochkonserviert sind.

Zu den am weitesten verbreiteten RNA-Bindungsmotiven zählen das RRM (*RNA-recognition motif*), die Zink-Finger-Domäne, die RGG-Box (Arginin- und Glycinreste), die DEAD-box, das dsRBM (*double-stranded RNA-binding motif*) und die KH-Domäne (*hnRNK-homology domain*) (Burd & Dreyfuss, 1994; Chen & Varani, 2005; Clery et al., 2008; Fierro-Monti & Mathews, 2000). Die am besten charakterisierte RBD der RNA-bindenden Proteine ist die RRM, welche mit rund 14.000 identifizierten Domänen in über 8.700 Proteinen vertreten ist (<http://smart.embl.de/>). Die Konsensussequenz der RRM-Domäne besteht aus ungefähr 90 Aminosäuren und bindet hauptsächlich einzelsträngige RNA. Für die spezifische Bindung ist eine einzelne Domäne zwar ausreichend, jedoch wird die Spezifität deutlich häufiger durch die Interaktion mehrerer zusammenarbeitender RRM-Domänen vermittelt (Allain et al., 1996; Allain et al., 2000b; Deo et al. 1999; Deardorff und Sachs 1997; Wang & Tanaka Hall, 2001). Die KH-Domäne wurde anfänglich im menschlichen hnRNPK identifiziert (Siomi et al., 1993) und bereits über 16.000 Mal in ca. 10.000 Proteinen unterschiedlichster Funktionalität gefunden sowie untersucht ([http://smart.embl.de](http://smart.embl.de/)). Sie ist eine evolutionär hochkonservierte Domäne, die aus rund 70 Aminosäuren besteht. KH-Domänen können – analog zu RRM – einzeln fungieren oder als Tandem-Domäne kooperieren (Farina et al., 2003; Valverde et al., 2008). Die dsRBD ist im Vergleich als dritthäufigstes RNA-Bindemotiv mit 4.200 Domänen in rund 3.000 Proteinen vertreten.

Obwohl bioinformatische und experimentelle Methoden schon so weit fortgeschritten sind, dass sie eine Untersuchung von RBPs auf systemweiter Ebene erlauben, ist die derzeitige Forschung von einer umfassenden Charakterisierung der RBPs/RBDs noch weit entfernt (Gerstberger et al., 2014). Diese umfasst das Verständnis wie Spezifität erreicht wird, wie sich die regulatorische Funktion eines einzelnen RBPs im RNP-Kontext auswirkt, in welchem RNA-Bindungswettbewerb RBPs untereinander stehen und wie unterschiedliche Mengen an RBPs die posttranskriptionelle Genregulation beeinflussen können.

Deshalb liegt der Fokus in dieser Arbeit auf der Analyse von RNA-bindenden Proteinen.

### **1.2 Die Funktion von RNA-bindenden Proteinen**

Die posttranskriptionelle Regulation beeinflusst die mRNA-Lokalisation, die zielgerichtete Translation innerhalb der Zelle und die mRNA-Halbwertszeit. Diese unterschiedlichen Prozesse werden zum größten Teil von RNP-Komplexen kontrolliert, welche unter anderem einen Einfluss auf das Zellschicksal während der Embryogenese, der Zellproliferation oder der Zellantwort auf äußere

Stresseinflüsse haben. Die Fehlregulierung des mRNA-Schicksals kann zu deutlichen Veränderungen in der Zellfunktion führen, die von der Krebsentstehung bis hin zum Zelltod reichen.

### **1.2.1 Die Rolle der RNA-bindenden Proteine bei der mRNA-Lokalisation/Translationskontrolle**

Die zielgerichtete Lokalisation von mRNA wird in den meisten Fällen über Transport-RNPs vermittelt. Diese RNPs gewährleisten eine Translationskontrolle während des Transports und spielen auch darüber hinaus eine bedeutende Rolle – z. B. bei der Organisation der Zellarchitektur (Lawrence and Singer, 1986). Durch die zielgerichtete Lokalisation kann eine räumliche und zeitlich regulierte Proteinsynthese in subzellulären Kompartimenten ermöglicht werden. Eine gestörte Lokalisation der mRNA kann z. B. zu fehlerhafter Embryogenese oder fehlerhafter Zellteilung und damit verbundenen Krankheiten führen (Eliscovich et al., 2013).

Der Lokalisationsmechanismus wird über sogenannte Lokalisierungselemente (LEs) innerhalb der mRNA gesteuert, die typischerweise in der 3-UTR liegen und von wenigen Nukleotiden bis zu einer Länge von 1 kb reichen. Während der mRNA-Lokalisierung werden die LEs im Kern von RBPs gebunden, in translatorisch inhibierte mRNPs verpackt, ins Zytoplasma transportiert, dort über Wechselwirkungen mit Motorproteinen verankert und in den meisten Fällen entlang des Zytoskeletts transportiert. Eizellen, Embryonen und Neuronen haben sich aufgrund ihrer Polarität als hervorragende Studiensysteme in Bezug auf die mRNA-Lokalisierung erwiesen.

Ein markantes Beispiel für die zielgerichtete Lokalisation ist die Festlegung der anterior-posterioren Längsachse während der Embryonalentwicklung von *Drosophila melanogaster*. Dabei werden mRNAs wie *oskar*, *bicoid* oder *nanos* asymmetrisch in der Eizelle lokalisiert und anschließend translatiert (Wilhelm & Smibert, 2005; Macchi et al., 2003; Jeske et al. 2011). Durch die asymmetrische Lokalisation entsteht ein Konzentrationsgefälle, da der Embryo noch keine Zellmembranen besitzt und die Proteine frei diffundieren. Dieser Gradient ist essentiell für die Körpersegmentierung. Ein Ungleichgewicht kann z. B. zu zwei Schwanzteilen, aber keinem Kopf führen (Dahanukar & Wharton et al., 1996).

In Neuronen beispielsweise wird ein Auswachsen von Dendriten und Axonen gewährleistet, indem die ACTB-mRNA mit Hilfe von ZBP1 (*zipcode binding protein 1*) an die Zellperipherie transportiert, dort mit der großen ribosomalen Einheit assoziiert und translatiert wird (Hüttelmaier et al., 2005). Es gibt jedoch neuronale Transportkomplexe, die häufig Ribosomen enthalten und trotzdem als translatorisch inhibierte Transport-RNPs funktionieren. Ein Beispiel dafür sind Staufer-enthaltende RNPs. Staufer ist ein Doppelstrang-RNA-Bindeprotein, das als Markerprotein für den mRNA-Transport in Neuronen identifiziert wurde (Kiebler & Bassell, 2006). Neuronale Staufer-enthaltende

## Einleitung

RNPs besitzen im Unterschied zu ZBP1-RNPs beide ribosomalen Untereinheiten und sind während des mRNA-Transports trotzdem translatorisch reprimiert.

Das deutet darauf hin, dass neuronale Transport-RNPs in ihrer Zusammensetzung und damit möglicherweise auch in ihrer Funktion wesentlich heterogener sind als bisher angenommen. Daher ist es wichtig festzustellen, ob es verschiedene Arten von z. B. Transport-RNPs gibt, die unterschiedliche mRNAs sowie assoziierte Bindungsproteine enthalten und auf unterschiedliche physiologische Signale reagieren.

### **1.2.2 Die Rolle der RNA-bindenden Proteine bei der mRNA-Stabilität**

Die Syntheserate eines Proteins wird ebenfalls über die Stabilität der mRNA reguliert. Dabei kommt es zu Interaktionen zwischen Proteinen und RNA-Bindungsmotiven, die eine stabilisierende oder destabilisierende Wirkung auf die betreffende mRNA haben (Day & Tuite, 1998). Aus diesem Grund kann die Lebensdauer der mRNAs extrem variieren und von wenigen Minuten – beispielsweise bei *early response genes* (ERGs) – bis zu mehreren Stunden (z. B. bei der beta-Globin mRNA) betragen. Die bekanntesten destabilisierenden Elemente der mRNAs sind Adenin- und Uridin-reiche Elemente (AREs) (Shaw & Kamen, 1986; Caput et al., 1986; Barreau et al., 2005). Diese befinden sich zumeist in der 3'UTR der mRNA und zeichnen sich durch einen 50–150 Nukleotid langen Bereich aus. Kennzeichnend für AREs sind die typischen AUUUA-Pentamersequenzen, die häufig auch überlappen können. Diese AREs befinden sich meist auf ERG-mRNAs zu denen Zytokine, Proto-Onkogene (wie MYC und FOS) oder Hitzeschockproteinen (z. B. HSP70) gehören. Diese Genprodukte benötigen eine sehr präzise Steuerung ihrer Expression, da sie im Fall von extrazellulärer Stimuli sehr schnell für eine Immunantwort, Entzündungsreaktion, Stressantwort oder Reparaturmechanismen zur Verfügung stehen müssen. Daher werden mRNAs, die für diese regulatorischen Proteine kodieren, ständig transkribiert, prozessiert und aus dem Zellkern exportiert. In ruhenden Zellen werden sie jedoch sehr schnell wieder abgebaut, da eine permanente Expression zu starken Schädigungen der Zelle und des Organismus führen kann (Lu et al., 2006). Durch äußere Reize ist die Zelle jedoch innerhalb kürzester Zeit in der Lage, die entsprechende mRNA zu stabilisieren, damit die regulatorischen Proteine translatiert werden können (Gyhaniyogi & Brewer, 2001). Ein Beispiel für eine stabilisierende Wirkung auf mRNAs (z. B. FOS), die über AREs in ihrer 3'UTR verfügen, wird durch die Bindung von ELAVL1 (*embryonic lethal abnormal vision like 1*) vermittelt (Chen et al., 2002; Lal et al., 2004; Raineri et al., 2004). Als Antagonist von ELAVL1 ist AUF1 (ARE poly (U) *binding degradation* factor 1) bekannt, da es in Bezug auf ERG mRNAs destabilisierend wirkt (Lal et al., 2004; Zhang et al., 1993; Brewer, 1991).

### **1.2.3 Die Rolle der RNA-bindenden Proteine in humanen Krankheiten**

Angesichts der weitreichenden Auswirkungen von RNP-Komplexen auf die Genregulation ist es nicht verwunderlich, dass RBPs an vielen Krankheiten beteiligt sind. Dabei kann das Krankheitsbild mit der gewebespezifischen Expression korrelieren. Beispielsweise ist der Verlust von keimbahn-spezifischen RNA-bindenden Proteinen wie die der DAZ-Proteinfamilie (*deleted in Azoospermia*) zwar nicht für die Lebensfähigkeit eines Lebewesens erforderlich, aber wichtig für die Produktion haploider Keimzellen und die damit verbundene geschlechtliche Fortpflanzung (Reynolds & Cooke, 2005).

Das *Fragile X Syndrom* (FraX) ist eine neurologische Erkrankung, welche von abnormalen neuronalen Morphologien sowie Defekten in der Anzahl und Funktion von Synapsen begleitet wird. Die Krankheit wird durch Mutationen im FMR1-Gen (*fragile X mental retardation 1*) verursacht, das für ein sequenzspezifisches RNA-bindendes Protein, *Fragile X Syndrom Protein* (FMRP), kodiert. FMRP wirkt im neuronalen Transport-RNP als molekularer Adapter zwischen dem RNP-Komplex und den molekularen Motoren Kinesin und Dynein. Deshalb kann eine veränderte FMRP-Expression die Assoziation zwischen dem RNP-Komplex und den Motorproteinen negativ beeinflussen und somit zu einer Beeinträchtigung der Transporteffizienz führen (Estes & O'Shea, 2008).

RBPs, die an dieselbe RNA-Klasse binden, weisen oft ähnliche Pathologien auf. Ein Beispiel dafür sind das *Diamond-Blackfan-Syndrom* und das *Shwachman-Diamond-Syndrom* welche auf eine Genmutationen im RPS19 (ribosomalen Protein S19) und das SBDS-Gen (*Shwachman-Diamond-Syndrom Protein*) zurückzuführen sind. Durch diese Mutationen ist die Bindung an rRNAs gestört, was in beiden Fällen ein Knochenmarkversagen nach sich zieht, welches durch eine schwere Anämie gekennzeichnet ist (Ganapathi et al., 2007).

Die spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine häufige autosomal rezessive neuromuskuläre Erkrankung, die mit dem Verlust eines Motorneurons im Rückenmark einhergeht und die häufigste erbliche Ursache von Kindersterblichkeit ist (Lukong et al., 2008). Verursacht ist der Verlust durch eine Mutation im SMN-Gen (*snRNP assembly factor Survival Motor Neuron*). Dadurch können die Impulse vom Gehirn nicht mehr an die angeschlossenen Muskeln weitergeleitet werden, woraus Muskelschwund (Muskelatrophie), Lähmungen (Paresen) und verminderte Muskelspannung (Muskelhypotonie) resultieren.

### **1.2.4 RNA-bindende Proteine während der Karzinogenese**

Viele RBPs sind bei verschiedenen menschlichen Krebserkrankungen falsch reguliert reguliert – z. B. durch eine veränderte Expression. Dabei wird ein breites Spektrum an Ziel-mRNAs beeinflusst, welche Auswirkungen auf jeden Schritt der Krebsentstehung haben. Die Schritte umfassen: i) die Zellproliferation; ii) das Umgehen der Apoptose und des Adhäsionsunabhängigen Wachstums; iii) der Immunerkennung; und iv) die Induktion der Tumor-Angiogenese, welche letztlich die Tumorprogression und Metastasierung beeinflussen. Ein Beispiel für die Aufrechterhaltung der Zellproliferation ist das Protein *KH domain containing RNA binding signal transduction associated 1* (KHDRBS1). Eine Überexpression von KHDRBS1 wurde bei vielen menschlichen Krebsarten festgestellt. Es moduliert das alternative Spleißen der prä-mRNAs von Onkogenen – z. B. bei der CD44-mRNA – und stimuliert somit die Zellproliferation (Matter et al., 2002).

Ein weiterer wichtiger Faktor in der Krebsentstehung ist der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). VEGF vermittelt die Gefäßneubildung im Krebsgewebe, welche erforderlich ist für die Nährstoffversorgung und um den Sauerstoffmangel zu umgehen (Li et al., 2014).

Das Umgehen der Apoptose ist ebenfalls ein wichtiger Mechanismus für die Tumorbildung. In diesem Prozess spielen einige RBPs eine entscheidende Rolle. Zu nennen ist z. B. ELAVL1 (embryonic lethal, abnormal vision-like 1), welches in vielen Krebsarten überexprimiert ist und eng mit einer negativen Prognose der Patienten korreliert (Nabors et al., 2002; Durie et al., 2011; Denkert et al., 2004). ELAVL1 fördert zudem das Zellwachstum durch Stabilisierung vieler anti-apoptotischer Gene wie Sirtuin-1 (SIRT1), Prothymosin alpha (PTMA), *B-cell lymphoma 2* (BCL2) und *myeloid cell leukemia sequence 1* (MCL1) (Abdelmohsen et al., 2007; Lal et al., 2005)

Weitere sehr wichtige regulatorische Proteine bei der Krebsentstehung sind die onkofötalen Proteine *Insulin like growth factor protein 1 and 3* (IGF2BP1 und 3), die während der Embryogenese exprimiert sind. Im adulten Gewebe fehlen sie jedoch weitgehend. *De novo* werden IGF2BP1 und 3 in verschiedenen Tumoren und Tumorzellen synthetisiert bzw. stark überexprimiert. Es konnte gezeigt werden, dass sie die invasive Aktivität von Krebszellen u.a. durch Stabilisierung der mRNA von Zelladhäsionsproteinen wie CD44 und CD164 sowie der Metalloproteinase MMP9 stimulieren können, die zur Zellinvasion beitragen (Samanta et al., 2012; Vikesaa et al., 2006). Außerdem können einige der Ziel-mRNAs der IGF2BPs den Übergang von Epithelzellen in Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften erleichtern (Zirkel et al., 2013). Dieser Prozess wird epithelial-mesenchymale-Transition (EMT) genannt und verbessert die Tumorprogression und die damit verbundene Metastasierung. Zusammengefasst fördern IGF2BP1 und 3 einen mesenchymalen, aggressiven und invasiven Zellphänotyp in der Krebsentstehung und es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass

die IGF2BPs als klinisch signifikante Krebsmarker für die zukünftige Medikamentenentwicklung dienen könnten (Bell et al., 2013). In dieser Arbeit wird das Augenmerk auf IGF2BP1 gerichtet.

### **1.3 Insulin like growth factor protein 1**

IGF2BP1 ist ein RNA-bindendes Protein, welches zusammen mit IGF2BP2 und 3 zu einer hochkonservierten Proteinfamilie gehört. Die vielen Funktionen des vorwiegend zytoplasmatischen RNA-bindenden Proteins wurden von verschiedenen Gruppen unabhängig voneinander identifiziert, weshalb es verschiedene Namen besitzt. IGF2BP1 ist unter anderem als IMP1 (*IGF2 mRNA binding protein*), CRD-BP (*coding region instability determinant protein*), ZBP1 (*zipcode binding protein 1*) oder VICKZ1 (Vg1 RBP/Vera, IMP, CRD-BP, KOC, ZBP1) bekannt.

Wie schon beschrieben wird IGF2BP1 während der Embryogenese stark exprimiert und ist für ein normales embryonales Wachstum essentiell (Nielsen et al., 1999, Yaniv & Yisraeli, 2002). Bis zur Geburt sinkt der Gehalt an IGF2BP1 stetig und im adulten Gewebe ist es kaum mehr nachweisbar (Hammer et al., 2005; Runge et al., 2000; Leeds et al., 1997). In verschiedensten malignen Tumoren wird IGF2BP1 re-exprimiert, was es zu einem onkofötalen Protein macht. Basierend auf immunohistochemischen- sowie RT-qPCR-Analysen konnte die Neusynthese von IGF2BP1 in Krebsgeweben der Brust, des Gehirns, des Darms, der Lunge, des Eierstocks und der Leber nachgewiesen werden (Boyerinas et al., 2012; Dimitriadis et al., 2007; Elcheva et al., 2008; Köbel et al., 2007; Gutschner et al., 2014). Unabhängig von der Tumorherkunft erhöht IGF2BP1 die mesenchymalen Eigenschaften der Krebszellen, welche durch ein hohes Selbsterneuerungs-, Migrations- und Invasionspotential gekennzeichnet sind (Busch et al., 2016).

#### **1.3.1 Strukturelle Charakterisierung von IGF2BP1**

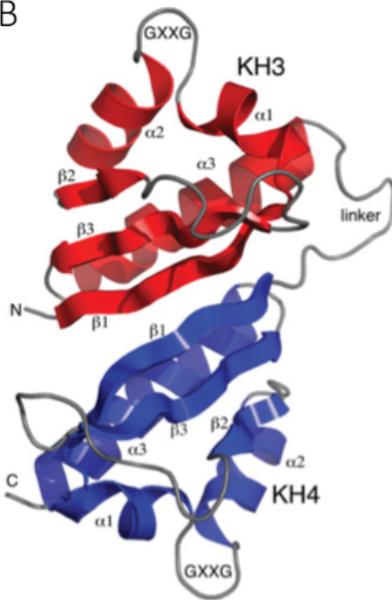
IGF2BP1 besitzt unterschiedliche RNA-Bindedomänen. Der N-terminale Bereich verfügt über zwei RRM's und der C-terminale Bereich über vier KH-Domänen. Strukturanalysen zeigen, dass die KH3+4 als intramolekularer Pseudodimer kooperiert, bei dem beide KH-Domänen antiparallel angeordnet sind. Dadurch erstrecken sich die RNA-bindenden Oberflächen auf die gegenüberliegenden Enden des Moleküls. Ein Modell der Singer-Gruppe suggeriert, dass die pseudodimere Anordnung der KH3- und KH4-Domäne die Ziel-mRNA bei der Bindung in eine spezifische Konformationsänderung zwingt und sogleich neue RNA-Bindungsstellen für andere Faktoren geschaffen werden (Chao et al., 2010) (siehe Abb. 1.2).

A

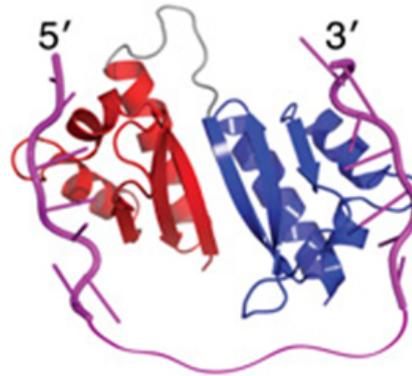
## IGF2BP1



B



C



**Abbildung 1.2: Darstellung der Didomänen-Organisation von IGF2BP1 und der Struktur des KH3-KH4-Pseudodimers von ZBP1. (A)** Im N-terminalen Bereich sind zwei RRM-Domänen und im C-terminalen Bereich sind vier KH-Domänen lokalisiert. **(B)** Die KH3-Domäne ist in Rot und die KH4-Domäne in Blau mit den jeweiligen Sekundärstrukturelementen dargestellt. **(C)** zeigt ein Modell für die Interaktion zwischen der KH3+4-Didomäne mit dem *zipcode* der ACTB-mRNA (Lila) (B und C übernommen aus Chao et al., 2010).

Die RNA-Bindung wird über die KH-Domänen vermittelt (KH1+2 und KH3+4) (Farina et al., 2003; Wächter et al., 2013; Bell et al., 2013) während den RRM keine große RNA-Bindung zugeschrieben wird. Deshalb wird vermutet, dass dieser Bereich eher für die Interaktion mit Proteinliganden verantwortlich ist (Farina et al., 2003) und zur Stabilisierung der IGF2BP1-mRNA Komplexe beiträgt (Nielsen et al., 2004; Wächter et al., 2013). Darüber hinaus verfügt IGF2BP1 über zwei nukleäre Exportsequenzen in der KH2- und KH4-Domäne und noch nicht identifizierte nukleäre Importsignale, welche sich höchstwahrscheinlich in der Linker-Region zwischen beiden RRM befinden (Nielsen et al., 2003). Die Anwesenheit von zwei nukleären Exportsignalen deutet darauf hin, dass IGF2BP1 zumindest einige seiner Ziel-RNAs im Kern bindet und dann ins Zytoplasma exportiert (Oleynikov & Singer, 2003). IGF2BP1 ist hauptsächlich in Form von RNPs im Zytoplasma anzutreffen. Dabei scheint sich der RNP als sogenannter *cage* (Käfig) um die mRNA zu legen, um die mRNA nach dem Kernexport bei Prozessen wie dem zytoplasmatischen Transport, der translationellen Repression sowie der mRNA-Stabilität zu regulieren und zu schützen (Bell et al., 2013).

Der Jonson-Gruppe gelang es IGF2BP1 enthaltende RNPs aus HEK293 Zellen durch Überexpression von Flag-getagtem IGF2BP1 zu isolieren und diese näher zu charakterisieren (Jonson et al., 2007).

## Einleitung

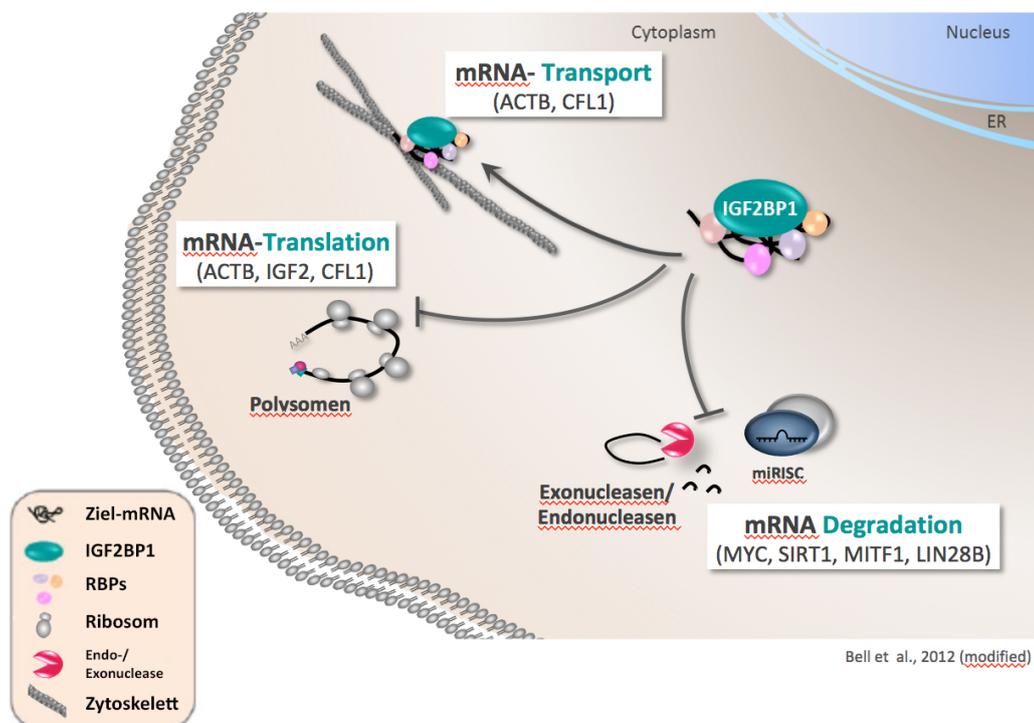
Bei diesen Untersuchungen wurden unter anderem ribosomale Proteine der 40S-Untereinheit, Mitglieder der HNRNP-Familie (HNRNPA1, A2/B1, D, L, Q, R), Poly-A-bindende Proteine (PABP), YBX1 sowie die RNA Helikase A (DHX9) entdeckt. Zudem wurde festgestellt, dass sich IGF2BP1-RNPs dem Anschein nach in der Zusammensetzung von anderen RNPs wie z. B. Staufer- oder FMRP-RNPs oder Komplexen wie den *stress granules* oder *p-bodies* unterscheiden. Aufgrund der unterschiedlichen physikalischen Dimension und des mikroskopischen Aussehens von *p-bodies* und *stress granules* war es zu erwarten, dass diese in ihrer Zusammensetzung zu IGF2BP1-RNPs verschieden sind. Jedoch war der Kontrast zu Staufer- und FMRP-RNPs sehr auffällig. Alle drei Proteine gehören zu den RNA-bindenden Proteinen, welche am RNA-Transport beteiligt sind und in neuronalen RNPs vorkommen. Im Vergleich beinhalten IGF2BP1-RNPs weder Translationsinitiationsfaktoren (eIF4E und G, eIF2 $\alpha$ ) noch 60S ribosomale Untereinheit. Dafür konnte das nukleäre CBP80 (*cap binding protein 80*) und Komponenten des EJC-Komplexes (UPF3B, ALY/REF, Y14, eIF4A3) in IGF2BP1-RNPs identifiziert (Jonson et al., 2007) werden. Diese Untersuchungen deuten darauf hin, dass IGF2BP1 einen einzigartigen zytoplasmatischen RNP darstellt, der mRNAs beinhaltet, die noch keiner Translation unterlagen. Weitere Recherchen der Jonson Gruppe zeigten, dass IGF2BP1 ca. 300 verschiedene mRNAs in RNPs bindet (3 % des HEK293-mRNA-Transkriptom). Nach Berechnungen der Arbeitsgruppe müssten ungefähr 10–30 Transkripte in einem RNP vorhanden sein. Das lässt darauf schließen, dass es einige Komplexe in der Zelle gibt, welche IGF2BP1 enthalten. Trotz verschiedener Studien, die auf eine spezifische Rolle von IGF2BP1 in Prozesse der RNA-Lokalisierung, -Stabilität sowie Translation der Ziel-mRNAs hindeuten, fehlt es noch immer an einer umfassenden Identifizierung zielgerichteter Transkripte. PAR-CLIP (*photoactivatable ribonucleoside enhanced cross-linking and immunoprecipitation*) sowie RIP-Studien (RNA-Immunpräzipitation) haben weit über 8.000 Ziel-mRNAs für IGF2BP1 vorgeschlagen (Jonson et al., 2007; Hafner et al., 2010). Es ist jedoch darauf hinzuweisen, dass diese Studien auf der stabilen Expression von Flag-markierten IGF2BP1 in HEK293-Zellen basieren, welche bereits eine ungewöhnliche Sedimentation des Proteins in der Gradientenzentrifugation im Vergleich zum endogenen Protein zeigt (siehe Abb. 3.11). Für die PAR-CLIP Analysen wurde ein simples RNA-Konsensusmotiv für alle drei IGF2BPs identifiziert, welche CAUH (H = A, U oder C) sein könnte. Nichtsdestotrotz deuten derzeit verfügbare Studien darauf hin, dass aufgrund der räumlichen Komplexität der IGF2BP-RNA-Assoziation, dieses verhältnismäßig einfache RNA-bindende Motiv nicht allein für die Bindung verantwortlich sein kann.

### **1.3.2 Funktion von IGF2BP1 im Fokus der posttranskriptionellen Genregulation**

Wie schon erwähnt beeinflusst IGF2BP1 die mRNA-Lokalisierung, -Translation oder -Stabilität in Abhängigkeit vom Zieltranskript (siehe Abb. 1.3). Manche dieser Mechanismen sind teilweise

## Einleitung

miteinander verbunden, z. B. die Regulation der ACTB-mRNA-Lokalisation und deren räumlich begrenzte Translation in der Entwicklung von Neuronen. Dabei wird die ACTB-mRNA an die Zellperipherie transportiert und dort synthetisiert. Diese lokale Translation, welche eine wichtige Rolle bei der Festlegung der Zellpolarität und der Zellmortalität spielt (Farina et al., 2003, Olynykov & Singer, 2003), kommt zustande indem das 54 Nukleotid lange Lokalisierungselement, auch *zipcode* genannt, in der 3'UTR der ACTB mRNA (Farina et al., 2003; Ross et al., 1997) von IGF2BP1 gebunden wird. Es wird angenommen, dass IGF2BP1 während des Transports im Zytoplasma die Interaktion der Ribosomen mit der mRNA blockiert und dadurch die Translation reprimiert (Dahm & Kiebler, 2005). In der Zellperipherie wird IGF2BP1 dann von der Scr-Kinase am Tyrosin 396 phosphoryliert. Dies führt zu einer Freisetzung der ACTB-mRNA. Dadurch kann sich der Translationskomplex auf der mRNA anordnen und die lokale Proteinsynthese kann ausgeführt werden (Hüttelmaier et al., 2005).



**Abbildung 1.3: Funktionen von IGF2BP1 im Zytoplasma.** IGF2BP1 assoziiert mit spezifischen Ziel-mRNAs und anderen RNA-bindenden Proteinen (RBPs) in zytoplasmatischen mRNPs. Die Freisetzung von assoziierten mRNAs aus diesen mRNPs führt entweder zum mRNA-Abbau oder zur Proteinsynthese. Es wird davon ausgegangen, dass die Bildung von mRNPs den gerichteten Transport spezifischer mRNAs entlang des Mikrotubuli und/oder des Aktin-Zytoskeletts ermöglicht (mRNA-Transport). Die Translation ist wahrscheinlich während des Transports reprimiert. (übernommen aus Bell et al., 2012 und verändert)

Jüngere Studien belegen, dass IGF2BP1 ferner die 3'UTR-vermittelte lokalisierte Translation der Cofilin1-mRNA (CFL1) in migrierenden Lungenkarzinomen reguliert (Maizels et al., 2015). CFL1 ist ein

## Einleitung

Aktin-Depolymerisationsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Lamellopodiumbildung spielt, welche essentielle Strukturen für die Zellmigration darstellen (Sidani et al., 2007).

1999 wurde entdeckt, dass IGF2BP1 mit der IGF2-mRNA (*insulin-like growth factor 2*) interagiert. Dabei wurde gezeigt, dass IGF2BP1 die Translation der IGF2-mRNA während der Embryogenese reguliert (Nielsen et al., 1999). IGF2 ist ein sezernierter onkofötaler Wachstumsfaktor, dessen Überexpression zu überproportionalen Wucherungen und Missbildungen im Embryo führt (Weksberg et al., 1993).

Im Gegensatz zu anderen mRNA-Zieltranskripten, über die IGF2BP1 an die UTRs bindet, wird MYC von IGF2BP1 in einem Bereich der kodierenden Region dem sogenannten *coding region instability determinant* (CRD) gebunden. Dieses 259 Nukleotid lange Element enthält einen Bereich mit seltenen Codons, an den eine endonukleolytische Schnittstelle grenzt. Während der Proteinsynthese kommt es aufgrund der seltenen Codons zu einem Herabsetzen der Elongationsgeschwindigkeit am Ribosom (*ribosomal pausing*) (Lemm & Ross, 2002), wobei die endonukleolytische Schnittstelle den Endonukleasen schutzlos ausgeliefert ist. IGF2BP1 vermittelt der MYC-mRNA eine gewisse Stabilität, indem es innerhalb der CRD bindet und die MYC-Expression in einer m6A-abhängigen Weise fördert (Huang et al., 2018). Dabei überlappt die IGF2BP1-Bindung mit der endonukleolytischen Schnittstelle und verhindert somit einen mRNA-Abbau. (Sparanese & Lee, 2007). Im weiteren Verlauf der Elongation wird IGF2BP1 durch die Ribosomen verdrängt. (Lemm & Ross, 2002). Die erhöhte Halbwertszeit vom MYC führt z. B. in serösen Ovarialkarzinomen zu einer deutlich verkürzten Gesamtüberlebenszeit bei Patienten (Köbel et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2007). MYC gehört zu den Protoonkogenen und aktiviert eine Vielzahl an Zielgenen, welche Einfluss auf die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose nehmen (Levens, 2003). Es wurde geschätzt, dass MYC die Expression von bis zu 10 % aller proteinkodierenden Gene im menschlichen Körper beeinflusst. Deshalb ist eine sehr präzise Steuerung der eigenen Expression sehr wichtig.

Für andere IGF2BP1-Zieltranskripte wurde gezeigt, dass IGF2BP1 die mRNA vor dem miRNA-vermittelten Abbau schützt. Beispielsweise zielt die tumorsuppressive let-7 miRNA-Familie auf verschiedene onkogen-kodierende mRNAs ab und ist in verschiedene Zelleigenschaften wie Proliferation, Zellzyklus, Metabolismus, Apoptose, Migration und Invasivität involviert (Roush & Slack, 2008). Die onkogenen Faktoren IGF2BP1, LIN28B und der Transkriptionsaktivator HMGA2, welcher einen wachstumsfördernden Einfluss hat, gehören zu den let-7 miRNA-Zieltranskripten (Boyerinas et al., 2012; Guo et al., 2006; Shell et al., 2007). Diese Faktoren wurden in Analysen als stärkste onkofötale let-7 miRNA-reprimierte Transkripte in Tumorzelllinien identifiziert (Boyerinas et al., 2008). Es wird postuliert, dass IGF2BP1, LIN28B und HMGA2 ein sogenanntes let-7-antagonistisches selbst-förderndes Netzwerk bilden.

## Einleitung

Dabei wurde in Experimenten im Ovarialkarzinom gezeigt, dass IGF2BP1 die mRNAs aller Dreiecksfaktoren, vor dem let-7-miRNA-Angriff abschirmt (*shielding*), indem es die entsprechenden mRNAs in RISC- und let-7-miRNA-freien mRNPs rekrutiert. Das onkogene Potential dieses Dreiecks konnte in ES-2-Zellen, die vom Ovarialkarzinom abgeleitet sind, bestätigt werden. Während HMGA2 das Zellwachstum fördert, sind IGF2BP1 und LIN28B unerlässlich, um das Migrations- und Selbsterneuerungspotenzial von Ovarialkarzinomzellen zu fördern (Busch et al., 2016).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das HMGA2-LIN28B-IGF2BP1-Dreieck eine vielversprechende Strategie in der Krebsbehandlung darstellen könnte.

Ein anderes Beispiel für einen *shielding*-Mechanismus von IGF2BP1 ist der Schutz der MITF-mRNA (Mikrophthalmie-assoziiertes Transkriptionsfaktor) vor dem miR-340-vermittelten Abbau. IGF2BP1 bindet in der Nähe der miR-340-Bindungsstellen und schützt die MITF mRNA dadurch vor dem Abbau. Die daraus resultierenden erhöhten MITF-Werte tragen zur Vermehrung von Melanomzellen bei (Goswami et al., 2010), was IGF2BP1 zu einem potenziellen Zielmolekül für die Prävention und Behandlung von Melanomen macht.

Der *shielding*-Mechanismus von IGF2BP1 wurde außerdem durch Studien in unserer Arbeitsgruppe gestützt, die durch die zwölf IGF2BP1-Zielkonstrukte wie SIRT1, ITGA6, MAPK1, FUT8, MTDH oder SRF etc. untersucht wurden. Es konnte gezeigt werden, dass IGF2BP1 seine Ziel-mRNAs bevorzugt vor der eigentlichen miRNA-Bindungsstelle in der 3'UTR bindet und dann in RISC-freie RNP-Komplexe rekrutiert. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die IGF2BP1-abhängige Regulation der-miRNA-Zieltranskripte strikt miRNOME abhängig ist und daher in unterschiedlichen Zellkontexten variieren kann. D.h. dass IGF2BP1 bevorzugt die miRNA-vermittelte Regulation der Ziel-mRNAs beeinträchtigt und damit das Schicksal dieser mRNAs streng miRNOME-abhängig steuert (Müller *et al.*, 2018a,b).

Zusammenfassend verdeutlichen die aufgeführten Ergebnisse die fetalen Eigenschaften von IGF2BP1. Dazu zählt die Überexpression im Krebsgewebe, welche zu einer verstärkten Ausbildung von Metastasen z.B im kolorektalen Karzinom führt (Dimitriadis et al., 2007; Vainer et al., 2008). Außerdem tritt IGF2BP1 in einigen Krebsarten wie dem Eierstockkrebs vor allem in der aggressivsten Form auf und ist mit schlechten Prognosen assoziiert (Köbel et al., 2007). Diese Befunde untermauern die prognostische Bedeutung von IGF2BP1 als Biomarker und potentiellen Therapieansatz für die zielgerichtete Tumorthherapie in der Zukunft.

Diese prognostische Bedeutung von IGF2BP1 ist ebenfalls auf ein Zusammenspiel mit anderen Faktoren vor allem mit RBPs zurückzuführen, welche zusammen im RNP agieren. Bislang ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, mit welchen RBPs IGF2BP1 innerhalb des RNPs interagiert und inwieweit diese Interaktion Einfluss auf die Expression der Zielgene nimmt. Deshalb ist es von großem Interesse, die Zusammensetzung von IGF2BP1-enthaltenen RNPs zu analysieren.

## **1.4 Zielstellung**

Wie zuvor ausführlich beschrieben, ist das onkofötale RNA-bindende Protein IGF2BP1 in wichtige Prozesse der posttranskriptionellen Genregulation involviert. Es ist an der Lokalisierung, Stabilität und Translation verschiedener Ziel-mRNAs beteiligt und nimmt Einfluss auf die Zellpolarität, die Proliferation und die Migration während der Embryogenese sowie bei der Tumorbildung. Um IGF2BP1 künftig erfolgreich in der Tumorthherapie einsetzen zu können, ist es wichtig, seine Rolle im RNP-Komplex zu verstehen und die molekulare Zusammensetzung IGF2BP1-enthaltender RNPs vollständig aufzuklären, welche noch weitgehend unklar ist. Die Isolierung dieser Komplexe und die Identifizierung der Komponenten könnten z. B. neuere Erkenntnisse über den RNA-Transportmechanismus, die Heterogenität der RNPs oder die spezifische Rolle der Proteine im Tumorzellen liefern.

Um neue Anhaltspunkte über den zellulären Wirkungsmechanismus von IGF2BP1 zu erhalten, war das Ziel der vorliegenden Arbeit, weitere IGF2BP1 Interaktionspartner zu identifizieren und funktionell zu charakterisieren. Hierzu wurden IGF2BP1-enthaltende Komplexe mittels *RNA-pulldown* isoliert und unbekannte Komponenten anhand von Massenspektrometrie identifiziert. Mit weiterführenden *x-link*-Untersuchungen sollten die gefundenen Interaktionen verifiziert werden. *Knockdown*-Analysen sollten außerdem Auskunft über die Funktion der Interaktionspartner liefern.

## Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Gebrauchsmaterialien

Tabelle 2.1: Vielfach verwendete Gebrauchsmaterialien

<i>Material</i>	<i>Firma</i>
15- und 50 ml Röhrchen	Laborfachhandel I. Schubert
384 well Microplates	VWR
6 % TBE-Urea Gels	Invitrogen
Cassettes 1.0 mm, 25/pack	Invitrogen
Deckgläschen	VWR
Dichtegradienten-Zentrifugationsröhrchen	Beckman Coulter
Nitrocellulosemembran	GE Helthcare
NuPAGE® 4–12 % Bis-Tris Gel	Invitrogen
Objektträger	VWR
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten	Laborfachhandel I. Schubert
PCR-Reaktionsgefäße (0,5 ml)	Laborfachhandel I. Schubert
Pipettenspitzen	Laborfachhandel I. Schubert
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2 ml)	VWR
Versiegelung der 384 well Microplates	VWR
Zellkultur-Material	VWR

#### 2.1.2 Chemikalien und Reagenzien

Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden Standardchemikalien und -reagenzien in Analysequalität von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und VWR bezogen. Weitere häufig verwendete spezifische Chemikalien und Reagenzien wurden, wie in Tabelle 2.2 aufgeführt, von den entsprechenden Firmen erworben.

**Tabelle 2.2: Vielfach verwendete spezifische Chemikalien und Reagenzien**

<i>Chemikalien und Reagenzien</i>	<i>Firma</i>
100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs
Anti-Flag M2-Agarose	Sigma-Aldrich
BSA (bovines serum albumin)	Sigma-Aldrich
DC™-Protein-Assay	BioRad
dNTP Mix	Promega
Flag-Agarose-beads	Sigma-Aldrich
Glutathion-Sepharose	GE Helthcare
Lipofectamin 2000	Invitrogen
Milchpulver	Edeka
NuPAGE® MOPS Running Buffer (20x)	Invitrogen
Amylose Resin Matrix	New England Biolabs
Prestained Protein Marker	New England Biolabs
ProLong® Gold antifade reagents	Invitrogen
Protein A Sepharose	GE Helthcare
SeeBlue® Plus2 Protein Marker	Invitrogen

### **2.1.3 Kommerzielle Systeme**

**Tabelle 2.3: Verwendete Kommerzielle Systeme**

<i>Systeme</i>	<i>Firma</i>
2 x PCR Mix	Promega
RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7	Promega
AllPrep DNA/RNA Protein Mini Kit (50) Kit (Thermo Fisher)	Qiagen
MEGAClear™ Transcription Clean-UP	Ambion
PCR-Cloning-Kit	Invitrogen
Plasmid Midi Kit (100)	Qiagen
SilverQuest™ Silver Staining Kit	Invitrogen
WIZARD SV Gel and Clean-Up System	Promega
Zero Blunt® PCR Cloning Kit	Invitrogen

### **2.1.4 Häufig verwendete Puffer**

Wenn nicht anders angegeben, wurden Puffer mit deionisiertem Wasser hergestellt.

**PBS** (*Phosphate Buffered Saline*; 0,01 M)

2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 10 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl

**5 x SDS-PAGE-Probenauftragspuffer**

250 mM Tris/HCl pH 6,8; 10 mM EDTA; 5 % SDS; 50 % Glycerin; 0,005 % Bromphenolblau, 5 % β-Mercaptoethanol

**10%-iges Harnstoffgel**

14,4 g Harnstoff; 8,3 ml H<sub>2</sub>O; 4,5 ml Acrylamid, 3ml TBE (5x); 150 µl APS; 15 µl TEMED

**BB-Puffer** (*binding buffer*)

20 mM Tris, pH 7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 8,7 % Glycerin; 0,05 % NP40, 1mM DTT

**Gradientenpuffer**

10 mM Hepes pH 7,4; 150 mM KCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,5 % NP-40; 1:200 Protease Inhibitor Cocktail

**Lysis Puffer**

Puffer A

10 mM HEPES/ KOH, pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 1,4 mM KCl; 0,5 mM DTT

Puffer B

300 mM HEPES/ KOH, pH 7,9; 30 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM KCl

Puffer C

20 mM HEPES/ KOH, pH 7,9; 420 mM NaCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,2 mM EDTA; 0,5 mM DTT;  
20 % (v/v) Glycerin

**Ponceau-Rot**

0,25 g Ponceau S; 0,5 mL Essigsäure; ad 50 mL Aqua Bidest

**SDS-PAGE-Trenngelpuffer**

1,5 M Tris/HCl pH 8,8; 0,4 % SDS

## Material und Methoden

### **SDS-PAGE-Sammelgelpuffer**

0,5 M Tris/HCl pH 6,8; 0,4 % SDS

### **5 x SDS-PAGE-Laufpuffer**

25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1 % (w/v) SDS pH 8,3

### **SDS-PAGE-Trenngelzusammensetzung**

12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid; 7,5 Trenngelpuffer; 9,9 ml Aqua bidest ; 10 µl TEMED; 100µl APS

### **SDS-PAGE-Sammelgelzusammensetzung**

1,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid; 2,5 ml Sammelgelpuffer; 6,2 ml Aqua bidest; 10 µl TEMED; 200 µl APS

### **NuPage-Blot-Puffer**

50 mM Tris/HCl pH 8,5; 40 mM Glycin; 10 % Methanol; 0,04 % SDS

### **Stripping-Puffer**

62,5 mM Tris, pH 6,8; 2 % (w/v) SDS; 100 mM β-Mercaptoethanol

### **5 x Probenauftragspuffer (DNA-Proben)**

250 mM Tris/HCl; 0,2 % Bromphenolblau oder 0,5 % Xylenblau; 40 % Glycerol; pH 7,5

### **50 x TAE (Tris-Acetat-EDTA)**

40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA

### **TBE (5x)**

450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 10 mM EDTA

### **TRIZOL**

0,8 M Guanidiniumthiocyanat; 0,4 M Ammoniumthiocyanat; 0,1 M Natriumacetat pH 5,0;  
5 % Glycerin; 48 % Roti-Aqua-Phenol für RNA-Isolierung

## 2.1.5 Enzyme und Antikörper

### 2.1.5.1 Enzyme

Tabelle 2.4: Verwendete Enzyme

<i>Bezeichnung</i>	<i>Firma</i>
Micrococcal nuclease	Roche Applied Science
M-MLV Reverse Transkriptase	Promega
Pfx-Polymerase	Invitrogen
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich
ProteinaseK (Solution)	Invitrogen
Restriktionsenzyme	Promega/New England Biolabs
RNase A	Promega
RNasin® Ribonuclease Inhibitor	Promega
T4 DNA Ligase	Promega

### 2.1.5.2 Antikörper

Die Verdünnungsangaben zu den jeweiligen Antikörpern in Tabelle 2.5 beziehen sich auf den Einsatz im Western Blot, falls nicht anders dargestellt.

Tabelle 2.5: Verwendete Antikörper und ihre Verdünnungen

<i>Bezeichnung</i>	<i>Wirtsspezies</i>	<i>Firma</i>	<i>Verdünnung</i>
<i>Primäre Antikörper</i>			
anti-ACTB	Maus	Sigma-Aldrich	1:5000
anti-DHX9	Kaninchen	Bethyl	1:1000; 1:150 (IF)
anti-ELAVL1	Maus	Santa Cruz	1:2500;1:150 (IF)
anti-Flag	Maus	Sigma-Aldrich	1:2500
anti-GFP	Maus	Roch Applied Science	1:1000
anti-HNRNPA2B1	Maus	Abcam	1:1000
anti-HNRNPAB	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000
anti-HNRNPA3	Kaninchen	Santa Cruz	1:1000
anti-HNRNPD	Ziege	Santa Cruz	1:1000
anti-HNRNPE2	Maus	Abnova	1:1000; 1:150 (IF)
anti-HNRNPK	Maus	Santa Cruz	1:1000

## Material und Methoden

anti-HNRNPM	Maus	Santa Cruz	1:1000; 1:150 (IF)
anti-HNRNPQ	Maus	Sigma-Aldrich	1:2500; 1:150 (IF)
anti-HNRNPR	Ziege	Santa Cruz	1:1000
anti HNRNPU	Maus	Sigma-Aldrich	1:2500; 1:300 (IF)
anti-IGF2BP1 (6A9)	Maus	Auftragsimmunisierung	1:1000; 1:150 (IF)
anti-MOV10	Kaninchen	Bethyl	1:1000
anti-MYC	Kaninchen	Millipore	1:1000
anti-NF45	Kaninchen	zur Verfügung gestellt von Prof. Behrens	1:1000
anti-NF90	Kaninchen	zur Verfügung gestellt von Prof. Behrens	1:1000
anti-PTBP1	Maus	Auftragsimmunisierung (TU Braunschweig)	1:500; 1:100 (IF)
anti-TUBA4A, DM1 $\alpha$	Maus	Sigma-Aldrich	1:5000
anti-VCL	Maus	Sigma-Aldrich	1:2500
anti-YBX1	Maus	Santa Cruz	1:1000; 1:150 (IF)

### *Sekundäre Antikörper*

Anti-Kaninchen (IRDye™ 680RD)	Esel	LI-COR Biosciences GmbH	1:10000
Anti-Kaninchen (IRDye™ 800CW)	Esel	LI-COR Biosciences GmbH	1:10000
Anti-Kaninchen (Cy3)	Esel	Dianova	IF: 1:1000
Anti- Maus (IRDye™ 680 RD)	Esel	LI-COR Biosciences GmbH	1:2500
Anti-Maus (IRDye™ 800 CW)	Esel	LI-COR Biosciences	1:25000
Anti-Maus (Cy3)	Esel	Dianova	IF: 1:1000
Anti-Maus Alexa Fluor 488 dye	Esel	Invitrogen	IF: 1:500

## 2.1.6 Plasmide, Oligonukleotide und siRNAs

### 2.1.6.1 Plasmide

Tabelle 2.5: Verwendete Plasmide

Bezeichnung	Herkunft
pCR® - blunt	Invitrogen
pcDNA3.1 (+) zeo	Invitrogen

### 2.1.6.2 Oligonukleotide

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide für Klonierungen

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
ACTB	s: GCGCAAGCTTACCGCCGAGACCGCGTCCGCCCGCG
	as: GCGCCTCGAGCAACTGGTCTCAAGTCAGTG
ACTB-CDS(1-416)	s: GAATTCATGGATGATGATATCGCCGCG
	as: CTCGAGACAGCCTGGATAGCAACGTA
ACTB-3'UTR	s: GAATTCGCGGACTATGACTTAGTTGCGTTACAC
	as: GCGCCTCGAGCAACTGGTCTCAAGTCAGTG
MYC-3'UTR	s: GAATTCGGAAAAGTAAGGAAAACGATTCCTTCTAAC
	as: CTCGAGTTTTCTAAAAACAATAGAAAAAATCAAC
MYC-CRD	s: GAATTCGAAACACACAACGTCTTGAGCGC
	as: CTCGAGTTACGCACAAGAGTTCCGTAGCTGTTC
MYC	s: GAATTCatgcccctcaacgtagcttcaccaacagg
	as: CTCGAGTTTTCTAAAAACAATAGAAAAAATCAAC

Alle in Tab. 2.6 sowie Tab. 2.7 aufgeführten Oligonukleotide wurden von den Firmen MWG und Invitrogen bezogen.

Tabelle 2.7: Verwendete Oligonukleotide für die qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz 5'→3'
ACTB	s: AGAAAATCTGGCACCCACACC
	as: AGAGGCGTACAGGGATAGCA
PPIA	s: GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT

## Material und Methoden

	as: CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT
HNRNPE2	s: CACCATCCGGCTACTTATGC
	as: GGGTCCAGCCAAAGTGATAA
HNRNPQ	s: ACTGTTGAATGGGCTGATCC
	as: CCTCCAAGTCTTTGCCATTC
HNRNPM	s: CCTAAGGGTGAAGGAGAACG
	as: TGA CTGCCATTTCACTCAA
IGF2BP1	s: TAGTACCAAGAGACCAGACCC
	as: GATTTCTGCCCGTTGTTGTC
MYC	s: AGCGACTCTGAGGAGGAAC
	as: CGTAGTTGTGCTGATGTGTG
RPLP0	s: GGCGACCTGGAAGTCCAAC
	as: CCATCAGCACCCACAGCCTTC

### 2.1.6.3 siRNAs

**Alle aufgeführten siRNAs wurden von der Firma MWG bezogen.**

Tabelle 2.8: Verwendete siRNAs

Bezeichnung		Sequenz 5'→3'
HNRNPE2	si 1	CGGAAAGAAAGGAGAATCA
	si 2	GAGAATCAGTTAAGAAGAT
HNRNPQ	si 1	CCTCCAGATTCCGTTTATT
	si 2	GCAAAGACTTGGAGGGAGA
HNRNPM	si 1	GGAAGATGCTAAAGGACAA
	si 2	GAACATGCCAGGAGAGCAA
Kontrolle	si	TGGGCGTCGTGGAGGCTTT

### 2.1.7 Bakterienstämme und bakterielle Kulturmedien

Tabelle 2-9: Verwendeter Bakterienstamm

Stamm	Genotyp	Herkunft
<i>Escherichia coli</i>	Fα80dlacZΔM15, Δ(lacZYAaegF)U169,	Invitrogen

---

DH5 $\alpha$	<i>deoR, recA1, endA1, hsdR17 (rKi,mK+), phoA, supE44, <math>\alpha</math>-thi-1, gyrA96, relA1</i>
--------------	---

---

### **LB Medium**

1 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl (zur Herstellung von LB-Agar wurde 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt)

### **Antibiotika**

Kanamycin (30  $\mu$ g/ml)

Ampicillin (100  $\mu$ g/ml)

## **2.1.8 Eukaryotische Zelllinien und Zellkulturmedien**

### **HEK293A**

Beschreibung: humane embryonale Nierenzellen (Graham et al.; 1977)

Herkunft: ATCC

ID: CRL-1573

Kulturmedium: DMEM + 10 % FBS + 2 mM L-Glutamine

Alle Zellkulturmedien, einschließlich DMEM, HANKS-Waschlösung, Trypsin, L-Glutamin, sowie das Transfektionsmedium OptiMem wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

## **2.1.9 Serviceleistungen**

Antikörpersynthese: Frau Dr. S. Buchmeier Zellbiologisches Institut der Universität Braunschweig

Massenspektrometrie: Dr. Thomas Ruppert; Zentrum für Molekulare Biologie der Universität Heidelberg (ZMBH)

Oligonukleotidsynthese: MWG bzw. Invitrogen

siRNA-Synthese: MWG

DNA-Sequenzierung: Seqlab

### **2.1.10 Geräte**

Eppendorf Mastercycler. PCR Cycler

Gradientenfraktionierer (Brandl)

Heraeus™ Biofuge™ Stratos

Heraeus™ Biofuge™ Fresco

Heraeus Instruments Megafuge 1.0R

HT7900 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems)

Infinite 200 PRO NanoQuant Spektrometer (TECAN)

Mini spin Zentrifuge (Eppendorf)

Odyssey Infrared Imaging Systems (LI-COR Biosciences)

Optima™ L-90K Ultrazentrifuge (Coulter Beckmann)

SP5X Mikroskop (Leica)

Stratalinker 2400 (Stratagene)

TE-2000E Mikroskop (Nikon)

XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresesystem (Invitrogen)

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Klonierung**

Für die Durchführung der pulldown-Analysen wurde der entsprechende Bereich von ACTB und MYC über EcoRI, XhoI-Restriktionsverdau in den Vektor pcDNA3.1 (+) zeo kloniert. Die MS2-loop Region wurde über die Restriktionsstellen XhoI/ApaI in den Vektor integriert. Zur Analyse wurde die DNA von der Firma SeqLab (Göttingen) sequenziert.

#### **2.2.1.2 Isolierung von DNA**

Die Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen und im größeren Maßstab wurden mittels des AllPrep DNA/RNA/Protein Mini Kits (50) bzw. des Plasmid Midi Kits (100) der Firma Qiagen nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### **2.2.1.3 Agarosegelelektion – Isolierung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten**

Im Anschluss an die Agarosegelelektrophorese wurden die entsprechenden DNA-Banden mit einem Skalpell unter UV-Licht von 360 nm aus dem Gel herausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Die weitere Isolation erfolgte mit Hilfe des Wizard SV Gel and PCR Clean-Up Systems nach Angaben des Herstellers.

### **2.2.1.4 Isolierung von RNA mittels Trizol**

Die Präparation von Gesamt-RNA aus Zellen oder aus Gradienten erfolgte mittels Trizol und anschließender Extraktion durch Chloroform. Zunächst wurden die Zellen mit Trizol von der Platte geerntet und in ein Eppendorfgefäß überführt. Als Richtwert für das eingesetzte Trizolvolumen kann 1 ml/well einer 6-well-Platte genommen werden. Die Zelltrümmer wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 16.000 xg und 4 °C pelletiert. Der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die RNA durch Zugabe von 0,2-fachem Volumen Chloroform unter vortexen extrahiert. Durch 10 minütige Zentrifugation bei 16.000 xg und 4 °C wurde die Phasentrennung erreicht. Die RNA-haltige wässrige, obere Phase wurde vorsichtig abgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, darauf achtend, die proteinhaltige Interphase nicht zu zerstören. Durch die Zugabe von Isopropanol (1:1 v/v) erfolgte die Fällung der RNA während einer Inkubation von 30 min bei -20°C. Bei zu erwartenden geringen Mengen RNA wurde die Fällung über Nacht bei -20 °C unter Zusatz von 1 µl Glykogen vollzogen. Im Anschluss wurde die RNA durch Zentrifugation für 10 min bei 16.000 xg und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde mit 0,2-fachem Volumen 80%igem Ethanol in einem Zentrifugationsschritt von 5 min bei 16.000 xg und 4 °C gewaschen. Nach vorsichtigem Entfernen des Überstandes und Trocknen des Pellet wurde die RNA in RNase/DNase-freiem Wasser gelöst und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.1.5 cDNA Synthese**

Für die Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA wurden standardmäßig 2 µg Gesamt-RNA unter Verwendung der M-MLV reversen Transkriptase revers transkribiert. Die RNA wurde mit 1 µl *random Primer* (50 ng/µl) in ein Reaktionsgefäß vorgelegt und mit RNase/DNase-freiem Wasser auf 14,5 µl aufgefüllt. Die Denaturierung der RNA erfolgte für 5 min bei 65 °C. Daran schloss sich ein Inkubationsschritt für weitere 5 min auf Eis an. Nach Zentrifugation der Reaktionsgefäße wurde dem Ansatz 5,5 µl Master-Mix, bestehend aus 4 µl 5 x RT-Puffer, 1 µl dNTPs, 0,25 µl RNasin und 0,25 M-MLV reverse Transkriptase, hinzugefügt. Die cDNA Synthese erfolgte für 2 h bei 42 °C. Abschließend

erfolgte ein Inaktivierungsschritt der reversen Transkriptase durch Inkubation bei 75 °C für 15 min an. Die cDNA wurde, wenn nicht direkt in eine PCR eingesetzt, bis zur weiteren Verwendung bei -80 °C gelagert.

### 2.2.1.6 Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die qRT-PCRs wurde im Rahmen dieser Arbeit in 384-*well*-Mikrotiterplatten in einem 7900 HT Fast Real-Time PCR System durchgeführt. Diese Methode basiert auf der Polymerase Kettenreaktion (PCR) und ist an einen Fluoreszenz emittierenden Prozess gekoppelt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Farbstoff SYBR® Green I verwendet. Dieser interkaliert in die doppelsträngige neu synthetisierte DNA, wodurch dessen Fluoreszenz ansteigt. Die Zunahme der *target*-DNA korreliert mit der Zunahme der Fluoreszenz nach jedem Zyklus.

Aus dem Anstieg der Fluoreszenzintensität kann der Ct-Wert (Cycle threshold) bestimmt werden. Die aufgezeichnete Schmelzkurve dient als Qualitätskontrolle, um sicherzustellen, dass nur ein spezifisches Produkt synthetisiert wurde. Für die RT-PCR wird ein spezifisches Primerpaar benötigt. Bei dessen Design ist besonders auf die Schmelztemperatur und auf mögliche Sekundärstrukturen zu achten, die unter Umständen zu Primerdimerisierungen führen könnten. Die Oligonukleotide wurden so generiert, dass sie innerhalb unterschiedlicher Exone der zu analysierenden Gene liegen, um eine Amplifikation genomischer DNA zu verhindern.

Pro Gen wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Für die Messungen wurden der SYBR® Select Master Mix (Life Technologies) mit den entsprechenden Primern versetzt. Diese Mastermixe wurden in die 384-*well*-Mikrotiterplatte vorgelegt und die 1:5 mit Nuklease-freiem Wasser verdünnte cDNA dazugegeben.

<b>Ansatz:</b>	<b>PCR-Programm:</b>	
5 µl PCR Mix (2x)	95°C, 3 min	
0,2 µl SYBR Green I	95°C, 30 s	} 40 Zyklen
0,02 µl Primer (100 µM)	60°C, 30 s	
5 µl cDNA	72°C, 30 s	

Die Auswertung der Analysen erfolgte über folgende Formel:

$$\text{rel. mRNA-Menge} = 2^{-(\text{ZZ} - \text{ZK}) - (\text{KZ} - \text{KK})}$$

ZZ – Ct des Zieltranskripts der Zielpopulation

ZK – Ct des Zieltranskripts der Kontrollpopulation

KZ – Ct des Kontrolltranskripts der Zielpopulation

KK – Ct des Kontrolltranskripts der Kontrollpopulation

### **2.2.1.7 Synthese von *in-vitro*-transkribierter RNA**

Für die RNA-*pull-down* Analysen wurden die RNA-Sequenzen der ACTB und MYC-Transkripte mittels *in-vitro*-Transkription hergestellt. Dazu wird der pcDNA3.1-Vektor durch einen Restriktionsverdau mit PspOMI (New England BioLabs GmbH, 20000 U/ml) linearisiert und die RNA mittels des RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Zum Abbau der Vektor-DNA wurde die Probe nach der *in-vitro*-Transkription mit DNase behandelt. Dazu werden dem Reaktionsansatz 5 µl RQ1 DNase 10 x Reaktionspuffer (Promega) und 2,5 µl RQ1 DNase (entspricht 1 U/µg DNA, Promega) zugegeben und dieser für zwanzig Minuten bei 37 °C inkubiert. Die anschließende Aufreinigung der *in-vitro*-transkribierten RNA erfolgte nach Herstellerangaben durch den MEGAClear™ Transcription Clean-UP Kit.

Für die Herstellung ATTO 680 markierter RNA der ACTB und MYC-Konstrukte ohne die *loop*-Region wurde folgender Ansatz pipettiert:

20 µl Transcription Optimized 5x Puffer (Promega); 10 µl DTT (Promega); 1 µl RNasin; je 1 µl rNTPs (rATP, rCTP, rGTP; finale Konzentration: je 1 mM; Promega); 0,2 µl rUTP; 1,5 µl Aminoallyl-UTP-ATTO 680 (finale Konzentration: 15 µM; Jena Bioscience); 1 µg linearisierte DNA; 2 µl T7 RNA Polymerase (Promega); auf 100 µl mit Aqua bidest auffüllen.

Der Reaktionsansatz wurde für 3 h bei 37°C inkubiert. Die Qualität der synthetisierten RNA wurde anschließend mittels Auftrennung im denaturierenden Harnstoffgel überprüft und anschließend mit Phenol/Chlorform extrahiert (2.2.1.4).

### **2.2.1.8 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels des Infinite 200 PRO NanoQuant Spektrometer und der Software i-control 1.7 bestimmt. Dazu wurden 2 µl der Nukleinsäurelösung auf eine NanoQuant Plate™ pipettiert.

## **2.2.2 Biochemische Methoden**

### **2.2.2.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Diese Form der Elektrophorese, kurz SDS-PAGE (engl.: *sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*) dient der elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen – proportional zu ihrem Molekulargewicht. Hierfür wurden meist selbst hergestellte Gele, aber zum Teil auch kommerzielle NuPAGE® 4–12 % Bis-Tris Gel, (Invitrogen) verwendet. Die Zusammensetzung von einem SDS-Gel ist

## Material und Methoden

unter 2.1.4 aufgeführt. Für die Auftrennung der Proteingemische wurden die Gele in eine Laufapparatur eingespannt und mit 1 x Elektrophoresepuffer bzw. die NuPAGE® 4–12 % Bis-Tris Gele mit 1 x MOPS-Puffer bedeckt. Die Proteinproben wurden mit 5 x Probenauftragspuffer versetzt und vor dem Auftragen 5 min bei 95 °C denaturiert. Das im Probenauftragspuffer enthaltende  $\beta$ -Mercaptoethanol wirkt reduzierend auf mögliche vorhandene Disulfidbrücken. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte für ca. 1,5 h bei 200 V und 15 mA im Sammelgel bzw. 30 mA im Trenngel. Die Größe der aufgetrennten Proteine wurde anhand von Protein-Molekulargewichtsstandard (Tab. 2.2) ermittelt. Die Darstellung der Proteine erfolgte entweder durch Coomassie- bzw. Silber-Färbung oder durch Western *blotting*.

### **2.2.2.2 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen**

Für Silberfärbungen der Gele wurde der SilverQuest™ Silver Staining Kit nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.2.2.3 Western Blot**

Der Western Blot dient der Übertragung und Fixierung von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf eine Trägermembran mit anschließender Immundetektion

Dabei werden die Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Der Transfer erfolgte bei 25 V und 400 mA für 90 min. Nach dem Transfer wurde die Membran zur Überprüfung des Transfers mit Ponceau reversibel angefärbt. Zur Absättigung unspezifischer Bindestellen wurde die Membran nachfolgend in einer Blocking-Lösung (5 % (w/v) Magermilch-Lösung in PBST) für 1h bei RT oder üN bei 4 °C inkubiert.

Im Anschluss wurde die Membran mit dem primären Antikörper (Tab. 2.5) in einer 5%igen Milchlösung unter leichtem Schwenken für 1 h bei Raumtemperatur oder üN bei 4°C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBST erfolgte die Inkubation mit dem sekundären IRDye-markierten Antikörper in einer 5%iger Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nachfolgend wurde die Membran mindestens 3x gewaschen und mittels Odyssey Infrared Imaging System (LI-COR Biosciences) bei 680 nm bzw. 800 nm die Proteinbanden detektiert. Die semiquantitative Auswertung wurde mit Hilfe der Odyssey software über die Quantifizierung der Bandenintensität durchgeführt.

### **2.2.2.4 RNA-pulldown**

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, Proteine über eine Matrix immobilisierte RNA-Sequenz zu präzipitieren. Dazu wurden 25µl der Amylose-*beads* mit BB-Puffer äquilibriert und anschließend mit 100 pmol rekombinant hergestelltem MBP-MS2BP in 1 ml BB für 1 h inkubiert. Anschließend wurde die Matrix für 30 min mit BSA (25µg/ml) in 1 ml BB geblockt. Nach einem Waschschrift wurde die *in-vitro*-transkribierte MS2-*loop* tragende RNA (10 pmol) in 1 ml BB-Puffer aufgenommen und mit der Matrix für eine 1 h versetzt. Währenddessen wurden  $6 \times 10^5$  HEK293A Zellen in 1 ml BB-Puffer auf Eis lysiert und die Zelltrümmer anschließend durch Zentrifugation für 15 min bei 4 °C und 16.000 xg pelletiert. Die Matrix wurde nach einem Waschschrift mit dem Zellextrakt (inklusive Protease Inhibitor (1:200) 400 U/ml RNAsin) für 30 min inkubiert. Alle Schritte wurden bei RT und auf dem Drehrad durchgeführt. Abschließend wurde die Matrix 3x mit dem BB-Puffer gewaschen und in 1x Probenpuffer aufgenommen, bei 65 °C eluiert und mittels Western Blot analysiert.

### **2.2.2.5 Cross-linking Immunpräzipitation mit *in-vitro*-transkribierter RNA**

Bei dieser Methode wurde die *in-vitro*-transkribierte Aminoallyl-UTP-ATTO-680 markierte RNA wie in Abschnitt 2.2.1.7 hergestellt und 10 pmol davon mit dem Lysat von  $6 \times 10^5$  HEK293A-Zellen im BB-Puffer für 20 min inkubiert. Man kann davon ausgehen, dass die Einführung des Fluoreszenzfarbstoffes auf die Struktur und das Bindungsverhalten der RNAs keinen Einfluss nimmt (Köhn et al., 2010). Daraufhin wurde die Probe mittels UV-Licht der Wellenlänge 254nm auf Eis für 20 min bestrahlt. Dabei werden kovalente Bindungen zwischen Protein und RNA eingeführt. Ein darauffolgender RNaseA-Verdau reduziert die fluoreszenzmarkierte RNA auf einen kurzen Oligonukleotidbereich, der direkt vom Protein gebunden und durch den *cross-link* vernetzt wurde. Während des *cross-links* wurden 25 µl Protein A Sepharose *beads* mit BB-Puffer 5x gewaschen und anschließend mit 2 µg des entsprechenden Antikörpers (Tab. 2.5) inkubiert. Im nächsten Schritt wurde das vernetzte Zelllysate zu den gewaschenen mit Antikörper versetzten Protein A Sepharose *beads* gegeben und 30 min auf dem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Ansätze mit Probenpuffer versetzt und mittels SDS-PAGE analysiert. Die Aminoallyl-UTP-ATTO-680 markierte RNA konnte im Gel mittels des Odyssey Infrared Imaging System bei 680 nm sichtbar gemacht werden. Anschließend wurden die Proteine im Western Blot-Verfahren auf eine Nitrocellulose-Membranen transferiert und ebenfalls mittels des Odyssey Infrared Imaging System detektiert.

### **2.2.2.6 Tandemaffinitätsreinigung**

Bei der Tandemaffinitätsreinigung stellt eine Erweiterung des *pull-down*-Verfahrens dar und ist in 2 Schritte eingeteilt: (1) einen RNA-pull-down mit (2) anschließender IGF2BP1-Immunpräzipitation bei der putative IGF2BP1-Interaktionspartner gefiltert werden. Für die bessere Anreicherung von IGF2BP1 wurde stabil überexprimiertes Flag-IGF2BP1-Lysat verwendet und wie im *pull-down*-Verfahren (Abschnitt 2.2.2.4) eingesetzt. Der Protein-RNA-Komplex des *pull-down*-Verfahrens wurde mittels 15 mM Maltose in 1ml BB-Puffer eluiert und anschließend mit 25 µl Flag-Agarose-beads für 30 min inkubiert. Anschließend wurden die beads 3x mit BB-Puffer gewaschen und in Probenpuffer aufgenommen und bei 95°C eluiert.

### **2.2.2.7 Sucrosegradienten-Zentrifugation**

Im Rahmen dieser Arbeit wurden mittels der Sucrosegradienten-Zentrifugation die unterschiedlichen Proteinkomplexe innerhalb eines Zelllysates untersucht und Polysomen- und mRNP-Fraktionen aufgrund unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeiten voneinander getrennt. Um einen kontinuierlichen linearen Sucrosegradient von 5–20 % bzw. 15–45 % (w/v) herzustellen, wurden jeweils 2,5 ml der Sucrose-Lösungen mit sinkender Dichte (20; 15; 10; 5 bzw 45; 37,5; 30; 22,5 und 15 % (w/v) Sucrose im Gradientenpuffer) vorsichtig in ein Dichtegradienten-Zentrifugationsröhrchen (14x95 mm ) übereinander geschichtet und bei 4 °C inkubiert. Von dem zu untersuchenden Zelllysate wurden 800 µl auf die vorbereiteten Gradientenlösungen geschichtet und anschließend bei 2,5 h, 285.000 xg und 4 °C ultrazentrifugiert. Die Fraktionierung erfolgte am Gradientenfraktionierer, welcher zugleich das Absorptionsprofil der einzelnen Fraktionen bei 254 nm aufgezeichnet hat. Aus den Fraktionen wurden die RNA (Abschnitt 2.2.1.4) und die Proteine (Abschnitt 2.2.2.8) präpariert.

### **2.2.2.8 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen mittels TCA/NaDOC-Fällung**

Die Fällung der Proteine mit Trichloressigsäure/Natriumdesoxycholat (TCA/NaDOC) diente der Konzentrierung der Proteinlösung des Sucroседichtegradienten. Zunächst wurden die Proben, aufgrund der zum Teil sehr hohen Sucrosekonzentrationen mit bidestiliertem Wasser verdünnt. Die Proben wurde anschließend mit 1/10 v/v einer 1%igen NaDOC-Lösung und 1/5 v/v einer 50%igen TCA-Lösung versetzt. Nach einer 20-minütigen Zentrifugation bei 16.000 xg und 4 °C wurde das Pellet zunächst mit Aceton gewaschen und nochmals zentrifugiert. Für die SDS-PAGE wurde das Pellet nach 5-minütigem Trocknen bei 95 °C in 20 µl Probenpuffer aufgenommen.

### **2.2.2.9 Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten**

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die quantitative Proteinbestimmung mittels eines *DC*<sup>TM</sup>-Protein-Assays, welcher an die Proteinbestimmung nach Lowry angelehnt ist (Lowry et al., 1951). Der Test wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Jeweils 5  $\mu$ l einer Eichlösung bzw. Zelllysate wurde in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und anschließend die entsprechende Lösung nach Herstellerangaben zugegeben. Nach 15 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion der Proben im Plattenphotometer gemessen. Als Referenzprotein diente BSA. Durch eine BSA-Verdünnungsreihe konnte eine Standardkurve erstellt werden, die zur Ermittlung der Proteinkonzentration im Zelllysate herangezogen wurde.

## **2.2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Zellen wurden bei 5 % CO<sub>2</sub>- und 90 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Haltung erfolgte in Dulbecco's modified essential medium (DMEM) mit 10 % (v/v) hitzeinaktiviertem fötalem Kälberserum (FCS) und 1 % Glutamat.

### **2.2.3.2 Zelltransfektion**

Alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen erfolgten mittels Lipofectamin 2000 (Invitrogen). Dafür wurden  $4 \times 10^5$  HEK293A-Zellen 15 h vor der Transfektion in einem 6 well ausgesät. Für die Transfektion der knockdown Analysen wurden 200 pmol der siRNA (Tab. 2.8) nach Herstellerangaben transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt.

### **2.2.3.3 Fixierung und Permeabilisierung eukaryotischer Zellen auf Deckgläschen**

Zunächst wurden Deckgläschen in einem Gemisch aus 40 % Salzsäure und 60 % Ethanol für 4 h unter stetigem Schütteln angeätzt. Anschließend wurden sie für drei Minuten unter fließendem bidestilliertem Wasser gewaschen. Die nachfolgende Aufbewahrung erfolgte in 70%igem Ethanol. Vor dem Aussäen der Zellen wurden die Deckgläschen in eine 24 well-Platte überführt und 3x mit PBS gewaschen und trocken gesaugt. Auf jeweils ein Deckgläschen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen der HEK293A-Zelllinie ausgesät, für 24 h kultiviert und mittels einer 4%igen Formalin-Lösung für 20 min fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen für 10 min in einer 0,5%igen Tritonlösung in PBS

## Material und Methoden

permeabilisiert. Die Zellen wurden anschließend mit PBS gewaschen und entweder direkt einer Immunfluoreszenzfärbung unterzogen oder bis zu deren Verwendung in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

### **2.2.3.4 Immunfluoreszenzfärbung und Fluoreszenzmikroskopie eukaryotischer Zellen**

Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die zuvor auf den Deckgläschen fixierten und permeabilisierten Zellen verwendet. Die Zellen wurden zunächst zur Absättigung unspezifischer Bindungen 1 h mit 1 % BSA (w/v) in PBS bei RT geblockt. Anschließend erfolgte die Inkubation mit den Primärantikörpern für 1h bei Raumtemperatur (Tab. 2.5). Nach zweimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörpern (Verdünnung in 2,5 % BSA/PBS siehe Tab. 2.5) für 1h. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde vor dem Einbetten eine DAPI-Färbung für 3 min vorgenommen. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen 2 x in Aqua bidest und 2x in 96 % Ethanol getaucht und anschließend vollständig getrocknet. Unter Verwendung des ProLong® Gold antifade reagents (Invitrogen) wurden die Deckgläschen auf dem Objektträger befestigt und mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Die Präparate wurden stets lichtgeschützt bei -20 °C gelagert.

### **2.2.3.5 Elektronenmikroskopie**

Dafür wurden 3µl des *pull-down*-Eluates auf ein Formvar-beschichtetes Nickel-Grid aufgetragen. Nach 1 min wurde die Lösung vorsichtig mit Filterpapier abgesaugt und kurz an der Luft getrocknet. Daraufhin erfolgte eine Fixierung mit einer 2%igen Formaldehyd/PBS-Lösung für 20 min. Nach der Fixierung wurden die Grids 3x mit PBS für jeweils 5 min gewaschen und üN bei 4 °C mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1:500 in PBS) inkubiert. Danach wurden die Grids 4x mit PBS für jeweils 5 min gewaschen. Anschließend wurde der Gold-gekoppelte Sekundärantikörper (Verdünnung 1:500 in PBS) für 90 min zu den Grids gegeben und hinterher 4x mit Aqua bidest für jeweils 5 min gewaschen. Abschließend erfolgte eine Kontrastierung durch eine kurze Inkubation (1 min) in Uranylacetatlösung (1 % (w/v)). Die Lösung wurde anschließend abgesaugt und die Grids getrocknet. Die EM-Analysen wurden an einem EM 900 (Zeiss, Jena) mit einer Beschleunigungsspannung von 80 kV durchgeführt. Die Aufnahmen der Bilder wurden mit einer Slow Scan Kamera (Variospeed SSCCD SM-1k-120, TRS, Moorenweis, Germany) unter Nutzung der ITEM Software (Olympus SIS, Münster, Deutschland) angefertigt. Die gesamten Arbeitsschritte der Elektronenmikroskopie wurden von Herrn Dr. Dr. Gerd Hause (Biozentrum, Halle) und Frau Simone Fraas (Biozentrum, Halle) ausgeführt.

#### **2.2.4 Statistische Auswertung**

In dieser Arbeit wurden alle Quantifizierungen, soweit nicht anderes vermerkt, anhand von mindestens drei unabhängigen Experimenten ausgeführt. Die Standardabweichung wurde in den entsprechenden Diagrammen dargestellt und verdeutlicht die Varianz zwischen den unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch Student's T-Test berechnet und als p-Wert in den Abbildungen gekennzeichnet. Dieser ist in den Diagrammen in folgender Form dargestellt  $p > 0,05$  n.s.;  $p < 0,05$  \*;  $p < 0,01$  \*\*;  $p < 0,005$  \*\*\*.

#### **2.2.5 In silico-Analysen**

Innerhalb dieser Arbeit wurden mRNA-Expressionsanalysen mittels der R2-Datenbank (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) basierend auf Mikroarray-Analysen durchgeführt. Zur Korrelation zweier Gene in einem bestimmten Datensatz wurde die Funktion „*correlate 2 genes*“ und für mehrere Datensätze die Funktion „*across datasets*“ angewandt. Hierbei wurden die frei zugänglichen Datensätze der TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) Datenbank analysiert, welche Tumorzelllinien verschiedensten Ursprungs umfassen.

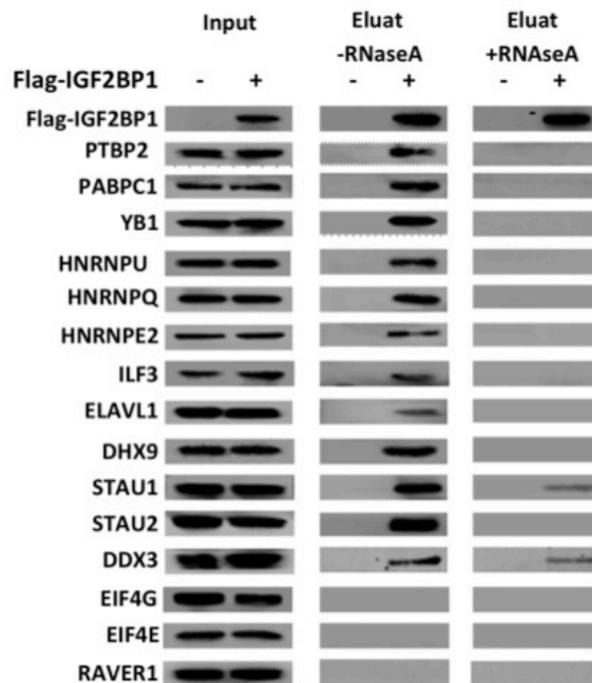
## Ergebnisse

Proteine sind seit Jahrzehnten Gegenstand wissenschaftlicher Untersuchungen. Während die DNA die Erbinformation enthält, übersetzen Proteine die Information in zelluläre Abläufe und Strukturen. Proteine regulieren wichtige Funktionen wie die Genexpression, den Proteintransport, bilden das Gerüst der Zelle und wirken unter anderem als Rezeptoren/ Botenstoffe bei der Signaltransduktion. Proteine kommen in der Zelle vorwiegend in Komplexen vor. Diese Komplexe bestehen entweder ausschließlich aus Proteinen (z. B. das Proteasom) oder setzen sich aus Nucleinsäuren und Proteinen zusammen. Zur letzteren Klasse gehören diverse Ribonukleoproteinkomplex (RNP) wie Ribosom, Spleißosom, RNA *Induced Silencing Complex* (RISC) etc. Ziel der biologisch-medizinischen Grundlagenforschung und somit auch dieser Arbeit ist es, die Funktion und Interaktion von Proteinen in RNP-Komplexen zu entschlüsseln. Mit Hilfe von IGF2BP1 sollen in dieser Arbeit neue Erkenntnisse über die Zusammensetzung, die Funktion und den zellulären Wirkungsmechanismus von IGF2BP1 und dessen Interaktionspartnern in RNPs der eukaryotischen Zelle erhalten werden.

### **3.1 Zusammensetzung von IGF2BP1-mRNPs**

Die Zusammensetzung von IGF2BP1-enthaltenen mRNPs ist noch ungeklärt. Eine dänische Arbeitsgruppe als Vorreiter hat IGF2BP1 enthaltene 100–300 nm große Partikel identifiziert, (Jonson et al., 2007), welche neben diversen RNA-bindenden Proteinen (HNRNPA1/ A2/B1, D, L, Q, R, U, Nucleolin, YBX1, DHX9, NFAR2/3) sowohl Komponenten des *exon junction complex* (EJC) (UPF3B, Aly/REF, Y14, eIF4A3) als auch CBP80 und ribosomale Proteine der 40S-Untereinheit enthalten. Weder die Translationsinitiationsfaktoren EIF4E oder EIF4G noch Proteine der 60S-Untereinheit wurden in den Studien identifiziert. Diese Erkenntnisse deuteten darauf hin, dass IGF2BP1 zum Teil in RNPs enthalten ist, welche sich vor der ersten Runde der Translation befinden und somit zu den *virgin* RNPs gehören. In fortsetzenden Studien unserer Gruppe konnten darüber hinaus Wechselwirkung von IGF2BP1 mit RNA-bindenden Proteinen wie ELAVL1, HNRNPA3, HNRNPE2, NF90, PTBP2, STAU1 und STAU2 nachgewiesen werden (Weidensdorfer et al., 2009). Außerdem konnte Doreen Weidensdorfer anhand von *knockdown*-Analysen zeigen, dass die Proteine HNRNPQ, HNRNPU, DHX9, YBX1 zusammen mit IGF2BP1 die MYC-mRNA über die CRD stabilisieren. Zudem wurden RNA-vermittelte Interaktionen von RNA-unabhängigen unterschieden, indem unbehandeltes und RNaseA-behandeltes Zelllysate für die Immunpräzipitation verwendet wurden. Die Interaktionen zeigten sich vorwiegend RNase sensitiv. Das lässt vermuten, dass die Interaktion der Proteine durch die RNA vermittelt wird, um die Komplexbildung auszulösen und die Anordnung zu bestimmen.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.1: Western Blot-Analyse der IP aus Flag-IGF2BP1 stabil überexprimierenden U2OS Zellen.** Flag-IGF2BP1 stabil überexprimierende U2OS Zellen wurden zunächst lysiert. Dabei wurde je ein Ansatz in Anwesenheit von RNaseA (+RNaseA) und ein Ansatz ohne RNase, aber mit RNasin, behandelt (-RNaseA). Anschließend wurden die Komplexe mittels Flag-Agarose-Beads präzipitiert, eluiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Naive U2OS Zellen (Flag-IGF2BP1) wurden als Kontrolle dem gleichen Verfahren unterzogen. (Doreen Weidensdorfer)

Weiterhin konnte Kristin Wächter aus unserer Arbeitsgruppe die Analysen von Jonson und Kollegen validieren. Anhand von Flag-chIGF2BP1 und GFP-chIGF2BP1 Immunpräzipitation zeigte sie ebenfalls, dass IGF2BP1 mit CBP80, der 40S ribosomalen Untereinheit und Komponenten des EJC interagiert. Darüber hinaus konnte sie eine Reihe von neuen IGF2BP1-Liganden identifizieren.

Ergebnisse

Name des Gens	Ref. Sequenz	Flag chIGF2BP1 (HEK293)				GFP-chIGF2BP1 (U2OS)			
		Peptide		Intensität		Peptide		Intensität	
		K	IP	K	IP	K	IP	K	IP
IGF2BP1;CRDBP;VICKZ1;ZBP1	NP_006537	11	21	3,70E+06	2,60E+07	1	20	0,00E+00	2,14E+07
NCL	NP_005372	8	32	3,8E+0,5	3,10E+07	1	21	0,00E+00	2,75E+06
HNRNPU;HNRPU;SAFA	NP_114032	3	29	6,20E+05	8,20E+06	11	39	5,56E+05	7,80E+06
IGF2BP2;IMP2;VICKZ2	NP_006539	1	4	2,20E+05	5,30E+06	9	22	2,26E+05	9,19E+06
DHX9;DDX9;LKP;NDH2	NP_001348	0	34	0,00E+00	1,20E+07	14	60	3,53E+05	7,87E+06
IGF2BP3;IMP3;KOC1;VICKZ3	NP_006538	2	7	1,90E+05	7,90E+06	1	4	0,00E+00	4,08E+05
TROVE2;RO60;SSA2	NP_004591	1	13	0,00E+00	4,40E+06	0	6	0,00E+00	1,16E+04
HNRNPA2B1;HNRPA2B1	NP_112533	1	12			6	22	5,16E+04	6,08E+05
ILF3;DRBF;MPHOSPH4;NF90	NP_036350	1	21	0,00E+00	1,10E+07	6	31	6,03E+04	3,07E+06
MOV10	NP_001123551	1	17	0,00E+00	6,50E+05	0	47	0,00E+00	3,33E+06
HNRNPM;HNRPM	NP_005959	3	22			11	38	3,00E+05	5,87E+06
EIF3A;EIF3S10 *	NP_003741	1	27	0,00E+00	1,30E+07	1	61	0,00E+00	2,54E+06
PTBP1;PTB	NP_114368	0	7	0,00E+00	5,10E+05	7	20	9,23E+04	1,99E+06
SYNCRIP;HNRPQ	NP_006363	0	5	0,00E+00	1,50E+05	1	28		6,66E+06
HNRNPR;HNRPR	NP_005817	1	9	0,00E+00	1,80E+06	2	27	0,00E+00	4,22E+06
YBX1;NSEP1;YB1	NP_004550	1	4	0,00E+00	7,70E+04	4	19	2,28E+05	1,46E+06
MATR3	NP_061322	0	8	0,00E+00	1,70E+05	8	36	2,88E+05	2,75E+06
ELAVL1;HUR	NP_001410	0	3	0,00E+00	8,70E+04	3	11	1,36E+04	8,37E+04
HNRNPA3;HNRPA3	NP_919223	0	5	0,00E+00	2,1<e+05	2	17	1,26E+04	2,28E+05
SSB;Lupus La protein	NP_003133	0	8	0,00E+00	1,20E+06	1	14	0,00E+00	8,82E+04
HNRNPE2;PCBP2	NP_114366	0	3	0,00E+00	6,90E+04	7	15		
UPF1 *	NP_002902					3	57	1,57E+05	4,31E+06
WIBG;PYM *	NP_001137325	0	3	0,00E+00	4,10E+03				
EIF4A3;DDX48 *	NP_055555	0	2	0,00E+00	2,10E+04				
PABPC1;PAB1;PABP1 *	NP_002559	1	14	0,00E+00	1,30E+06	15	34	3,90E+05	1,14E+07
THOC4;ALY;BEF *	NP_005773	0	1			3	8	1,29E+04	4,41E+04
NXF1;TAP *	NP_006353	0	1			0	2	0,00E+00	2,91E+03
RNPS1 *	NP_006702					1	4	0,00E+00	7,87E+03
ACIN1;ACINUS *	NP_055792					1	8	0,00E+00	3,23E+04
ROD1, PTBP3 *	NP_005147					1	9	0,00E+00	2,21E+04
LRPPRC;LRP130	NP_573566	2	14	1,60E+05	7,20E+05	0	69	0,00E+00	1,48E+06
HNRNPD;AUF1;HNRPD	NP_112738	1	2	0,00E+00	1,30E+05	1	14	0,00E+00	4,08E+05
HNRNPAB;ABBP1;HNRPAB	NP_112556	1	7	0,00E+00	4,80E+05	1	12	0,00E+00	6,96E+04
HNRNPK;HNRPK	NP_002131	1	11	0,00E+00	2,70E+06	7	21	1,29E+05	1,39E+06
CSDA;DBPA	NP_003642	1	3	0,00E+00	1,40E+05	1	15	0,00E+00	2,15E+05
QKI;HKQ	NP_996735					0	8	0,00E+00	1,01E+04
STAU1	NP_059347	0	3	0,00E+00	9,30E+04	2	26	0,00E+00	5,60E+05
STAU2	NP_055208					0	20	0,00E+00	8,09E+05

## Ergebnisse

DDX3X;DBX;DDX3	NP_001347	1	3	0,00E+00	2,50E+04	0	8	0,00E+00	4,34E+04
PABPC4	NP_001129125	1	9	0,00E+00	3,60E+05	7	34	1,66E+04	2,18E+06
HNRNPL;HNRPL	NP_001524	0	5	0,00E+00	2,90E+05	0	19	0,00E+00	3,57E+06
HNRNPA1;HNRPA1	NP_112420	4	12	4,60E+05	1,80E+06	1	19	0,00E+00	3,45E+05
ILF2;NF45	NP_004506					7	19	6,51E+04	5,5+05
NCBP1;CBP80;NCBP *	NP_002477	0	9	0,00E+00	6,70E+05	0	17	0,00E+00	2,10E+05

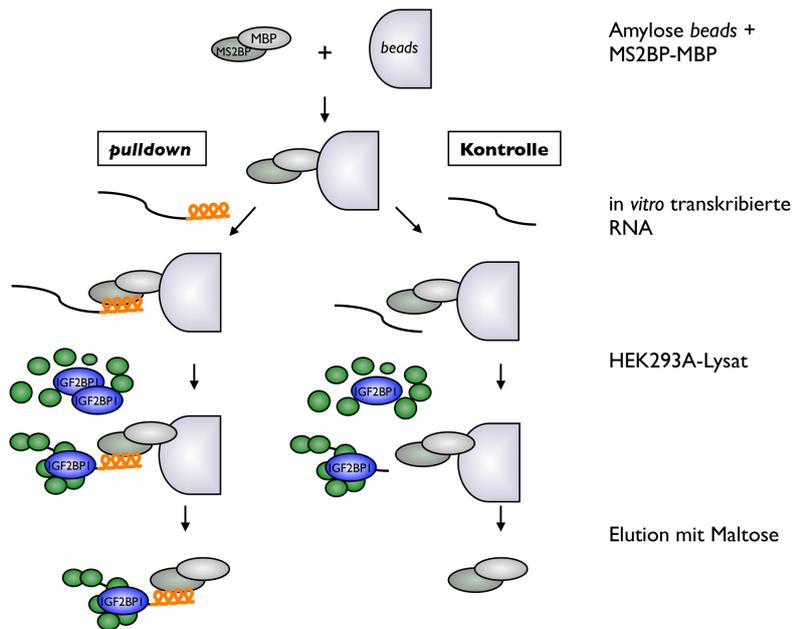
**Tabelle 3.1: Identifikation von chIGF2BP1 assoziierten Proteinen (Dissertation Dr. Kristin Wächter).** Auszug aus spezifisch angereicherte Proteine der Flag-chIGF2BP1-Immunpräzipitation (IP) aus HEK293 Zellen und der GFP-chIGF2BP1-Immunpräzipitation aus U2OS Zellen. Als Kontrolle (K) dienen jeweils parentale HEK293 und U2OS Zellen. (Bedingungen: identifizierte Peptide IP > K; Peak-Intensität IP > K; Peptide in IP  $\geq$  2; Intensität in IP > 1E+03). Für jedes Protein wurden der Name des Gens, die Referenzsequenz, die Zahl der identifizierten Peptide sowie die Peak-Intensität angegeben. Faktoren von Pionier-mRNPs sind mit Stern versehen (\*), Liganden, die bereits in MS-Analysen identifiziert wurden sind lila (Jonson *et al.*, 2007) und orange (Weidensdorfer *et al.*, 2009) markiert.

Neben diversen Vertretern der HNRNPs konnte Frau Dr. Wächter RNA-bindende Proteine wie das Zink-Finger Protein (ZFR), *oxidative stress-associated Src activator* (Ossa) Spleißingfaktoren, Helikasen, zytoskelettale Proteine und Komponenten des RISC (*RNA-induced silencing complex*) (siehe Tabelle 3.1) identifizieren. Eine andere Arbeitsgruppe (Höck *et al.*, 2007) konnte zeigen, dass chIGF2BP1 in Argonaute enthaltenden mRNPs vorkommt und mit den Komponenten des RISC interagiert, wobei IGF2BP1 keine Funktion im RISC zugeschrieben wurde. Widersprüchliche Ergebnisse findet man in Arbeiten unserer Arbeitsgruppe wieder (Busch *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2018a,b), welche beschreiben, dass IGF2BP1 in RISC-freien Komplexen vorkommt und somit seine *target*-mRNAs vor microRNA gerichteter Degradation schützt. Diese Unstimmigkeiten zeigen, dass trotz einiger Studien die Zusammensetzung IGF2BP1-enthaltener RNPs immer noch nicht geklärt ist. Entgegen der vorangegangenen Methoden der publizierten Arbeiten, sollte deshalb die Zusammensetzung der Komplexe mittels RNA-Präzipitation untersucht werden.

### 3.1.1 Optimierung des RNA-pulldowns

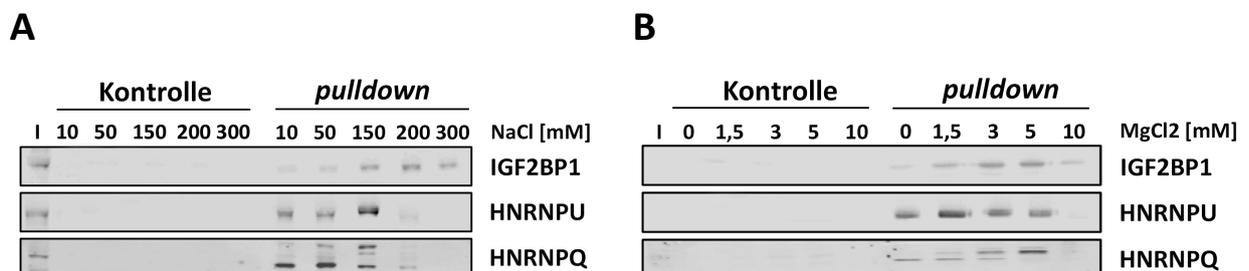
Die Methode der Immunpräzipitation ist fragwürdig, da es ungeklärt bleibt, wie viele unterschiedliche RNPs anhand der Durchführung gereinigt werden. Zu diesem Zweck wurde ein RNA-pulldown mit HEK293A-Zelllysate durchgeführt. Dieser sollte Aufschluss über die Zusammensetzung von IGF2BP1-enthaltenden RNP-Komplexen geben, welche an der Erkennung oder Bindung einer speziellen mRNA involviert ist. Damit sollten die erhaltenen Proteine der vorherigen Flag-chIGF2BP1-/GFP-chIGF2BP1 Immunpräzipitation auf Proteine reduziert werden, die in einem RNP interagieren. In Abb. 3.2 ist das Verfahren des RNA-pulldowns zur Isolierung von RNPs schematisch dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des RNA-pulldown-Versuchs.** Der RNA-pulldown beruht auf der hochaffinen Wechselwirkung der MS2 Haarnadelstruktur (MS2-loop) mit dem Hüllprotein des Bakteriophagen MS2 (MS2BP). Das Hüllprotein wird dabei über ein fusioniertes Maltosebindeprotein (MBP) an Amylose-Resin-Beads immobilisiert. Durch Zugabe von Proteinextrakten bilden sich an der MS2-loop-gekoppelten RNA die RNPs aus, welche nach der Elution mit Maltose im Western Blot analysiert wurden.

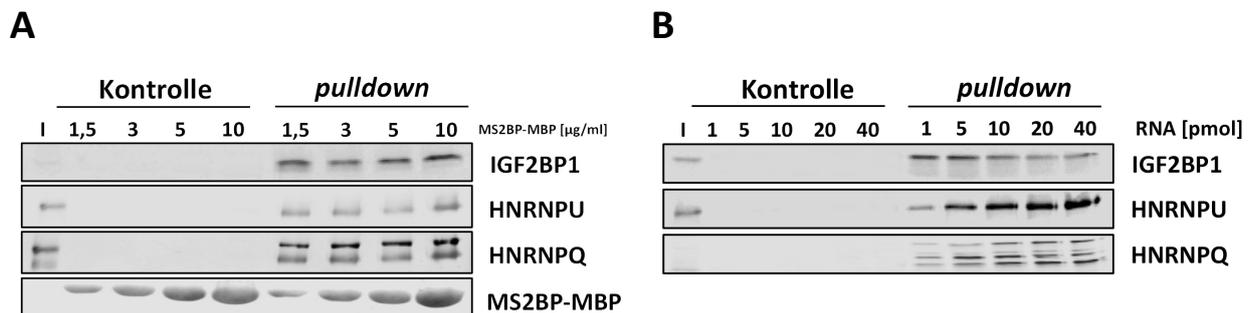
Für optimale Bedingungen während des RNA-pulldowns wurden verschiedene Pufferzusammensetzungen getestet. Anhand der schon veröffentlichten Interaktion von IGF2BP1, HNRNPU, HNRNPQ mit der MYC-mRNA wurde ein MYC-CDS-3'UTR Konstrukt ohne Spleißereignis sowie Poly-A-Schwanz mit 4 MS2-loops kloniert (Abb.3.5 B). Als Kontrolle diente das MYC-Konstrukt ohne die loop-Region. Die beschriebenen Konstrukte wurden mittels *in-vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben und in verschiedenen Ansätzen getestet. Für jeden *pull-down*-Test wurde das gesamte Eluat in einem 10%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und für die oben erwähnten Proteine im Western Blot analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass die Ausbildung der RNA-Proteinbindung ein Optimum bei 150 mM NaCl und 3 mM MgCl<sub>2</sub> besitzt (Abb. 3.3 A und B). NaCl wird hinzugefügt, um unspezifische Wechselwirkungen zu unterdrücken. MgCl<sub>2</sub> ist unter anderem für die RNA-Faltung bzw. Stabilität notwendig.



**Abbildung 3.3: Pufferoptimierung des pulldown-Verfahrens.** Dargestellt ist ein Western Blot zur Bindungsanalyse zwischen den Proteinen des Zellextrakts und der immobilisierten RNA. Die Präzipitation der Proteine sowie der Input (I) wurden mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. **(A)** Analyse des pulldowns der MYC-CDS-3'UTR mit MS2-loops und ohne (Kontrolle) bei unterschiedlichen NaCl-Konzentrationen (+20 mM Tris pH 7,4; 0,05 % NP-40; 8,7 % Glycerol; 11mM Heparin; 1mM DTT). **(B)** Analyse des pulldowns der MYC-CDS-3'UTR mit MS2-loops und ohne (Kontrolle) bei unterschiedlichen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (+20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 0,05 % NP-40; 8,7 % Glycerol; 11mM Heparin; 1mM DTT).

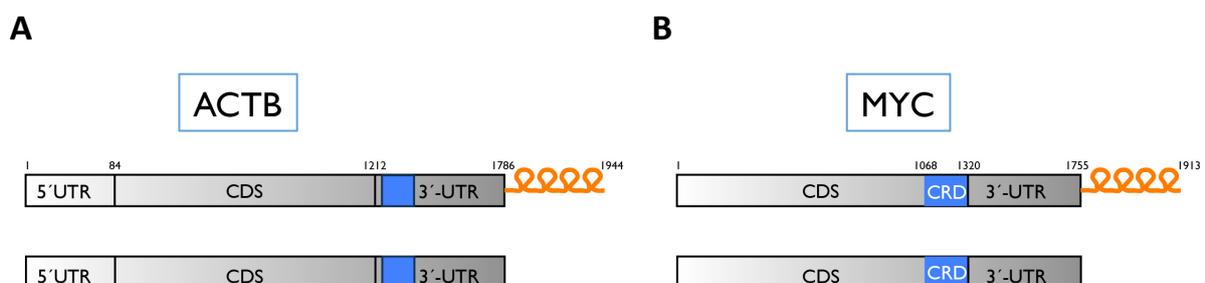
## Ergebnisse

Weiterhin wurden unterschiedliche Konzentration im Bereich von 1,5 bis 15  $\mu\text{g/ml}$  für das fusionierte MS2BP-MBP (Maltose-2-Bindeprotein-Maltosebindeprotein) untersucht. Das MS2BP-MBP assoziiert mit der *loop*-Region der *in-vitro*-transkribierten RNA und immobilisiert diese an die Amylose-Resin-Beads. Es stellten sich keine erheblichen Unterschiede in der Anreicherung der getesteten Proteine für die verschiedenen MS2BP-MBP-Mengen in der Western Blot-Analyse dar (Abb. 3.4 A). Daraufhin wurden 1,5  $\mu\text{g/ml}$  MS2BP-MBP verwendet. Für eine geeignete RNA-Konzentrationsbestimmung wurde der *pull-down*-Ansatz mit steigender RNA-Menge von 1–40 pmol inkubiert (Abb. 3.4 B) und analysiert. Daraufhin wurde eine RNA-Konzentration von 10 pmol für die weiteren Experimente gewählt.



**Abbildung 3.4: Optimierung der MS2BP-Konzentration und der Köder-RNA-Menge.** Dargestellt ist ein Western Blot zur Bindungsanalyse zwischen den Proteinen des Zellextrakts und der immobilisierten RNA. Die Präzipitation der Proteine sowie der Input (I) wurden mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. **(A)** Analyse des *pull-downs* der MYC-CDS-3' UTR mit MS2-loops und ohne (Kontrolle) bei unterschiedlichen MS2BP-MBP-Konzentrationen (+20 mM Tris pH 7,4; 150 NaCl; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,05 % NP-40; 8,7 % Glycerol; 11mM Heparin; 1mM DTT). **(B)** Analyse des *pull-downs* der MYC-CDS-3' UTR mit MS2-loops und ohne (Kontrolle) bei unterschiedlichen RNA-Konzentrationen (+20 mM Tris pH 7,4; 150 NaCl; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 0,05 % NP-40; 8,7 % Glycerol; 11mM Heparin; 1mM DTT).

Der aus den getesteten Bedingungen resultierende Bindungspuffer setzte sich wie folgt zusammen: 20 mM Tris pH 7,4; 150 mM NaCl; 3 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 8,7 % Glycerin; 0,05 % NP-40; 1 mM DTT; mit 10 pmol *in-vitro*-transkribierter RNA und 1,5  $\mu\text{g/ml}$  MS2BP-MBP. Dem Puffer wurden zusätzlich noch 11  $\mu\text{g/ml}$  Heparin zugesetzt, um unspezifische Protein-RNA Interaktionen zu minimieren (Merz et al., 2007). Als Zellysate wurden für jeden Ansatz  $6 \times 10^5$  HEK293A Zellen mit dem hier beschriebenen Puffer lysiert.



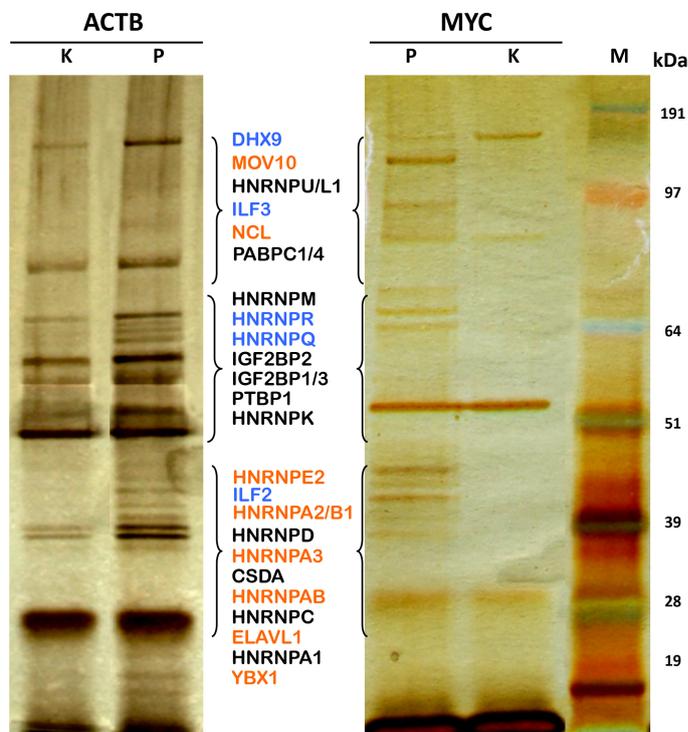
**Abbildung 3.5: Schematische Darstellung der ACTB- und MYC-Konstrukte.** Die abgebildeten Konstrukte wurden *in-vitro*-transkribiert und für die Proben der Massenanalyse eingesetzt. Das Kontrollkonstrukt ist ohne den *loop*-Bereich dargestellt und das Konstrukt für den *pull-down* mit MS2-loops (rot). Der blau hinterlegte Bereich in A und B stellt die publizierten Bindungsstellen von IGF2BP1 dar (ACTB-zipcode und MYC-CRD).

## Ergebnisse

Nach der Optimierung des RNA-*pulldowns* wurde ACTB als weitere Ziel-mRNA von IGF2BP1 mit und ohne 4 MS2-*loops* kloniert (Abb. 3.5 A). MYC und ACTB waren zu dieser Zeit die mit am besten charakterisierten IGF2BP1-Zieltranskripte und sollten deshalb zur Identifikation der Zusammensetzung von IGF2BP1-enthaltenen RNPs dienen. Außerdem sollten Gemeinsamkeiten und Unterschieden in der Zusammensetzung der RNPs analysiert und beide Proteinkomplexe miteinander verglichen werden. Ebenso wie die MYC-Konstrukte besaßen die ACTB-Konstrukte, kein Spleißereignis und kein Poly-A-Signal. Der Verzicht dieser Bereiche sollte dazu dienen, nur die Proteine zu präzipitieren, die unmittelbar in die Translationsrepression oder Stabilitätskontrolle der Zieltranskripte involviert sind.

### 3.1.2 RNA-pull-down-Verfahren identifiziert neue putative Bindungspartner der ACTB- und MYC-mRNA

Für die Analyse der MYC- und ACTB-mRNA bindenden Proteine wurden die Konstrukte in Abb. 3.5 mittels *in vitro*-Transkription in RNA umgeschrieben und für das *pull-down*-Verfahren eingesetzt.



**Abbildung 3.6: Identifizierung von Bindungsproteinen der ACTB-5'UTR-CDS-3'UTR und MYC-CDS-3'UTR mit Hilfe des RNA-pull-down-Verfahrens.**

Bindungsproteine wurden unter Verwendung *in-vitro*-hergestellter MS2-*loop*-tragender RNA (P) aus dem HEK293A-Zellextrakt gewonnen (Abb. 3.5). RNA ohne *loop* diente als Kontrolle (K). Die affinitätsgereinigten Proteine wurden über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels MALDI TOF MS in der Gruppe von Dr. Thomas Ruppert (ZMBH, Heidelberg) identifiziert. Die Abbildung zeigt eine repräsentative Darstellung der *pull-down*-Euate durch eine Silberfärbung visualisiert. Einige Faktoren die während der Massenanalyse in den Ansätzen von ACTB und MYC identifiziert wurden sind schwarz markiert. Liganden die nur im ACTB (orange) oder MYC (blau) *pull-down* vorhanden waren sind farblich markiert. (M=Proteinmarker)

Für die Analyse wurden die affinitätsgereinigten Proteine elektrophoretisch über eine SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend von Herrn Dr. Thomas Ruppert in Heidelberg am ZMBH

## Ergebnisse

massenspektrometrisch durch MALDI TOF MS analysiert. In Abb. 3.6 sind die silbergefärbten Gele des RNA-*pulldowns* von MYC und ACTB dargestellt. Eine Übersicht der identifizierten Proteine mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (MALDI-TOF-MS) ist in der Tabelle 3.2 dargestellt. In der Tabelle ist die Anzahl der gefundenen Peptide des jeweiligen Proteins und der Protein-*score* aufgelistet. Der *score* gibt an wie wahrscheinlich es ist, dass der erhaltene Wert ein zufälliges Ereignis ist. Dabei werden die Datenbank-Sequenzen mit den experimentell ermittelten Daten verglichen. Je höher der *score* ist, desto wahrscheinlicher ist ein nicht zufälliges Ereignis. Proteine mit einem Wert >100 wurden als signifikant betrachtet. Werte <100 sind rot hinterlegt und sollten sorgfältig überprüft werden. Die erhaltenen Proteine der Massenanalyse wurden in fünf Gruppen unterteilt: RNA-bindende Proteine (RBPs), Kinasen, Helikasen, Motorproteine und andere Proteine, die nicht in diese Gruppen fallen. Den größten Anteil nahmen dabei die RBPs ein. In Tabelle 3.2 sind die Proteine mit einem \* markiert, welche bereits als putative IGF2BP1 Liganden in Jonson *et al.* 2007 und in der Dissertationsarbeit von Frau Dr. Wächter identifiziert wurden.

Die Massenauswertungen weisen eine hohe Übereinstimmung mit den veröffentlichten Arbeiten von Frau Dr. Wächter und Jonson *et al.* 2007 auf. Im Vergleich konnten jedoch beim RNA-*pulldown* keine Spleißfaktoren wie U2AF2, PUF60, PRPF31 oder EJC-Komponenten angereichert werden. Dieser Befund untermauert die Spezifität des *pulldown*-Verfahrens, da die *pulldown*-Konstrukte kein Spleißereignis enthalten und das Fehlen dieser Faktoren als Zeichen der Spezifität gewertet werden kann. Die Massenauswertung der Immunpräzipitation ergab weit mehr angereicherte Proteine als beim *pulldown*-Verfahren. Das könnte darauf hinweisen, dass man mit Hilfe des RNA-*pulldowns* spezifischer reinigen kann. Dennoch konnten mit dem *pulldown*-Verfahren neue, mögliche Interaktionspartner gezeigt werden. Unter den RBPs befanden sich z. B. HNRNPCL1, HNRNPDL, RALY und KHSRP (*KH domain-containing splicing regulatory protein*). Wobei Letzteres das humane Homolog zum *chicken* ZBP2 darstellt. Es wurde gezeigt, dass ZBP2 die Bindung von ZBP1 an die ACTB-mRNA während der Transkription erleichtert (Pan *et al.*, 2007), was darauf hindeutet, dass KHSRP IGF2BP1 bei der ACTB-Bindung unterstützen könnte. Für KHSRP wurde ebenfalls beschrieben, dass es in mRNA-*trafficking* involviert ist (Kung *et al.*, 2017), was es interessant für den mRNA-Transport für ACTB macht.

Weitere RBPs wie *Paraspeckle component 1* (PSPC1) oder *Splicing Factor Prolin and Glutamin Rich* (SFPQ) wurden ebenfalls in den Massenauswertungen dieser Arbeit analysiert. In der Literatur werden beide Proteine als Kernproteine beschrieben, die *Paraspeckles* bilden. *Paraspeckles* sind dynamische Strukturen im Zellkern, welche an der Regulation der mRNA-Expression beteiligt sind (Dobson *et al.*, 2015).

Das Motorprotein KIF11 konnte ebenfalls als Bindungspartner von IGF2BP1 identifiziert werden. Dessen Funktion besteht darin, den aktiven Transport von RNPs entlang des Zytoskeletts zu

## Ergebnisse

ermöglichen. In der Gruppe der Kinasen konnte unter anderem die Proteinkinase R (PKR) detektiert werden. Diese wird durch doppelsträngige RNA (dsRNA) aktiviert, die z. B. durch eine Virusinfektion in die Zellen gelangen. Es kann auch durch Heparin aktiviert werden, welches sich im Puffer des *pull-down*-Verfahrens befindet. Die PKR phosphoryliert NF90, was für die Assoziation des NF90/NF45-Komplexes notwendig ist (Wen et al., 2014). Wahrscheinlich wurde die PKR mittels NF90 im *pull-down* präzipitiert.

Der letzten Gruppe konnten Metalloproteasen, Metallothioneine, Zinkfingerproteine etc. zugeordnet werden, welche jedoch nicht näher betrachtet wurden.

		<b>score (Anzahl der identifizierten Peptide)</b>				
		<b>ACTB</b>		<b>MYC</b>		
	<b>Name des Gens</b>	<b>Ref. Sequenz</b>	<b>K</b>	<b>IP</b>	<b>K</b>	<b>IP</b>
<b>RBPs</b>	ADAR;DRADA;IFI-4 *	NP_001102		241 (13)		
	CSDA;DBPA*	NP_003642	63 (3)	111 (12)		310 (53)
	ELAVL1;HUR*	NP_001410	302 (16)	378 (31)		
	HNRNPE2;PCBP2*	NP_114366	5	130 (6)		
	HNRNPA1;HNRPA1*	NP_112420		17 (200)		19 (180)
	HNRNPA2B1;HNRPA2B1*	NP_112533		23 (262)		
	HNRNPA3;HNRPA3*	NP_919223		19 (180)		
	HNRNPAB;ABBP1;HNRPAB*	NP_112556		114 (7)		121 (15)
	HNRNPC;C1;C2;HNRPC;SNRPC*	NP_001070910	223 (16)	264 (42)		912 (153)
	hnRNPL1	NP_001013653				451 (8)
	HNRNPD;AUF1;HNRPD*	NP_112738		73 (11)		149 (44)
	hnRNPD;JKTBP;laAUF1	NP_112740		51 (4)		153 (20)
	hnRNPG;RBMX*	NP_002130				35 (1)
	HNRNPK;HNRPK*	NP_002131	32 (1)	411 (29)		105 (7)
	HNRNPM;HNRPM*	NP_005959		905 (110)		1094 (135)
	HNRNPQ; HNRPQ;SYNCRIP;NSAP1*	NP_006363				162 (15)
	HNRNPR;HNRPR*	NP_005817				325 (34)
	HNRNPU;HNRPU;SAFA*	NP_114032		189 (15)		179 (12)
	HNRNPUL1;E1BAP5*	NP_008971		82 (3)		35 (1)
	IGF2BP1;CRDBP;VICKZ1;ZBP1*	NP_006537	124 (5)	119 (9)		942 (136)
	IGF2BP2;IMP2;VICKZ2*	NP_006539	115 (4)	93 (4)		405 (39)
	IGF2BP3;IMP3;KOC1;VICKZ3*	NP_006538	35 (2)	51 (1)		337 (37)
	ILF2;NF45*	NP_004506				185 (11)
	ILF3;DRBF;MPHOSPH4;NF90*	NP_036350				195 (7)
	KHSRP;FUBP2	NP_003676		136 (5)		
	LRC15;LRRC13;LIB	NP_001128529				45 (2)
	MYEF2;KIAA1341	NP_057216		109 (4)		
	NCL*	NP_005372		29 (1)		
PABPC1;PAB1;PABP1*	NP_002559		276 (31)		1067 (338)	

## Ergebnisse

	PABPC1L2A	NP_001012995				97 (15)
	PABPC3	NP_112241				634 (169)
	PABPC4*	NP_001129125		50 (2)		607 (106)
	PABPC4L	NP_001108206				53 (3)
	PSPC1;PSP1	NP_001035879		(108) 4		
	PTBP1;PTB;HNRNPI*	NP_114368		110 (6)		57 (4)
	PTBP2;MIBP*	NP_067013		29 (1)		
	RALY;P542	NP_057951		45 (2)		103 (4)
	RALYL;HNRPCL3	NP_001093861				53 (7)
	SFPQ;PSF	NP_005057	308 (12)	390 (19)		31 (2)
	SNRPA	NP_004587		31 (1)		49 (3)
	SNRPB;SNRPB1	NP_937859	42 (2)	76 (5)		76 (10)
	SNRPD2;SMD2	NP_004588		43 (2)		
	SNRPD3	NP_004166				73 (3)
	YBX1;NSEP1;YB1*	NP_004550		44 (2)		
	ZNF346;JAZ	NP_036411		64 (3)		
<b>Kinasen</b>	EIF2AK2;PKR	NP_001129123		69 (5)		86 (5)
<b>Heli- kasen</b>	DHX9;DDX9;LKP;NDH2	NP_001348		160 (14)		
	MOV10	NP_001123551		106 (5)		
<b>Motor- proteine</b>	KIF11;TRIP5	NP_004514		31 (6)		
	AKAP6;ADAP6	NP_004265				36 (4)
<b>andere</b>	DLK1;FA1;PREF1	NP_003827		30 (1)		
	DSP;DPI	NP_004406				55 (2)
	FANCI;BRIP1	NP_114432				39 (3)
	GTF2H1	NP_001135779				35 (5)
	HOOK2;HK2	NP_037444		34 (1)		
	KCNJ3;GIRK1	NP_002230		31 (1)		
	MIF;GIF	NP_002415		64 (4)		
	NDC80;HEC	NP_006092				56 (7)
	PITRM1;MP1	NP_055704		31 (2)		
	PPFIA1;LIP1	NP_003617		36 (5)		
	SHROOM3;SHRML	NP_065910		35 (4)		37 (3)

**Tabelle 3.2: Massenspektrometrisch identifizierte Proteine des ACTB-5'UTR-CDS-3'UTR (ACTB) bzw. des MYC-CDS-3'UTR- pulldowns (MYC).** Die Proteine wurden in fünf Klassen eingeteilt: 1. RNA-bindende Proteine (RBPs); 2. Kinasen; 3. Helikasen; 4. Motorproteine; 5. weitere Proteine, die nicht zu den anderen Gruppen gehören. Der Protein *score* gibt an wie wahrscheinlich es ist, dass der erhaltene Wert ein zufälliges Ereignis ist. Je mehr Peptidsequenzen eines Proteins zugeordnet werden können, desto höher fällt der Protein *score* aus; >100=signifikant; rot hinterlegt <100). Die Anzahl der identifizierten Peptide ist in Klammern dargestellt. P=pulldown mit *loop*-Konstrukt; K=Kontroll-pulldown ohne *loop*-Struktur.\*Liganden, die mit den MS-Analysen der chIGF2BP1-IP (durchgeführt von Dr. Kristin Wächter) und Jonson et al., 2007 übereinstimmen.

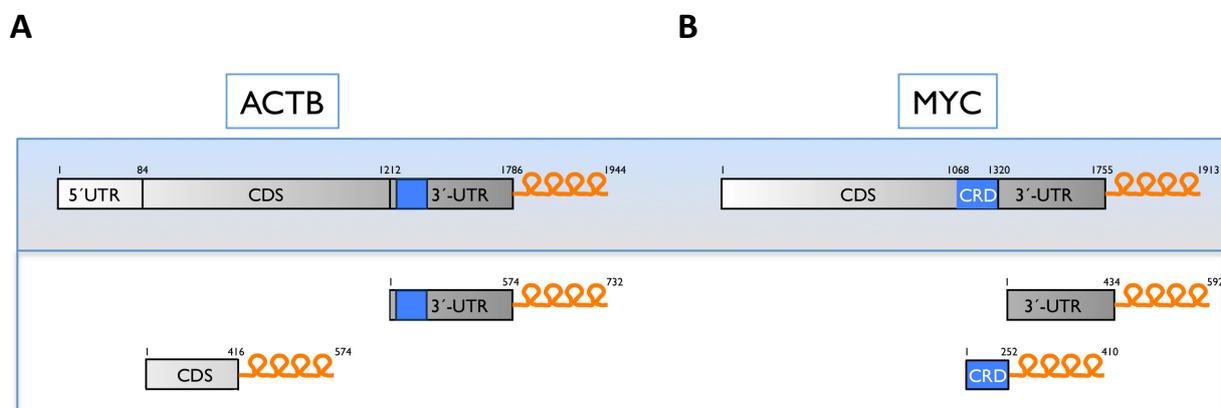
Auffällig an den Massenauswertungen der *pulldown*-Analyse ist, dass der Ansatz mit dem Kontrollkonstrukt von ACTB, Proteine wie IGF2BP1, ELAVL1 etc. anreichert. Das deutet auf

## Ergebnisse

unspezifische Bindungen hin und muss näher untersucht werden. Das Silbergel (Abb. 3.6) verdeutlicht ebenso, dass die Durchführungen mit den ACTB-Konstrukten im Vergleich zu den MYC-Konstrukten den stärkeren Hintergrund zeigt, obwohl alle Ansätze gleich behandelt und durchgeführt wurden.

### 3.1.3 Die Proteinzusammensetzung der mRNPs variiert transkriptspezifisch

Beim Vergleich der massenspektrometrischen Ergebnisse beider *pulldown*-Untersuchungen konnten sowohl Gemeinsamkeiten als auch Unterschiede hinsichtlich der Zusammensetzung festgestellt werden. So binden laut der Massenanalyse IGF2BP1-3, HNRNPAB, HNRNPC, HNRNPD, HNRNPM, HNRNPU oder PTBP1 die *in-vitro*-transkribierten 3'UTRs beider Transkripte. Proteine wie HNRNPE2, ELAVL1, YB1, DHX9 oder KIF11 interagieren im *pulldown* nur mit dem ACTB-3'UTR, während HNRNPQ, HNRNPR, HNRNPG sowie NF90 und NF45 nur mit dem MYC-Konstrukt identifiziert wurden (Tab. 3.2). Aufgrund der experimentellen Limitierung der Massenspektrometrie wurden die dargelegten Ergebnisse mittels Western Blot überprüft. Vor der Validierung wurden jedoch neue MYC und ACTB Konstrukte für diese Arbeit hergestellt (siehe Abb. 3.7; weißer Hintergrund).



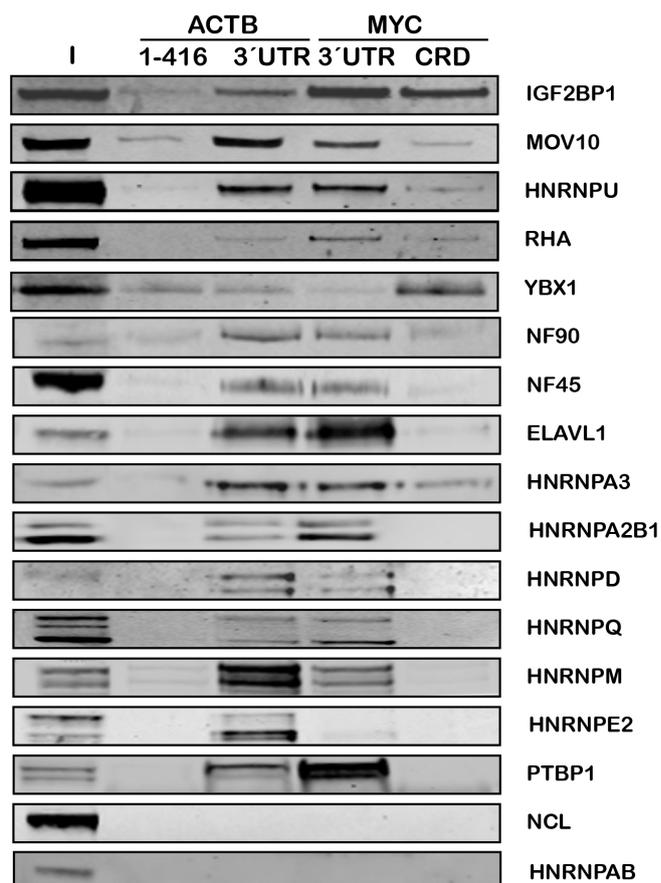
**Abbildung 3.7: Schematische Darstellung der verkürzten ACTB- und MYC-Konstrukte.** Die Abbildung zeigt die Konstrukte, welche bei der Massenanalyse verwendet wurden (grau hinterlegt) und die verkürzten Konstrukte (weißer Hintergrund), die zur Validierung der Ergebnisse der Massenanalyse eingesetzt wurden. Die Kontrolle (\*) wird durch das ACTB-CDS(1-416)-Konstrukt mit dem *loop*-Bereich (orange) dargestellt. Der blau hinterlegte Bereich in A und B zeigt die publizierten Bindungsstellen von IGF2BP1 (ACTB-*zipcode* und MYC-CRD).

Diese Konstrukte sollten sich auf das Erkennungsmotiv von IGF2BP1 beschränken. Dadurch sollten die Ergebnisse der Massenspektrometrie auf die Bindeproteine des Transport-RNPs, vermittelt durch den ACTB-*zipcode*, und die Stabilitätskomponenten des CRD-RNPs von MYC reduziert und miteinander verglichen werden. Zu den verkürzten Konstrukten wurden CRD-MYC, 3'UTR-MYC, 3'UTR

## Ergebnisse

von ACTB und ein Kontrollkonstrukt hergestellt, welches über eine *loop*-Region verfügt (ACTB-CDS(1-416)-4MS2-*loops*) und vergleichbar groß ist (siehe Abb. 3.7\*)

Zur Validierung der putativen Interaktionspartner wurden *pull-down*-Assays mit den neuen Konstrukten durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Die Untersuchungen erfolgten sowohl für bereits publizierte als auch neu identifizierte IGF2BP1-Interaktionspartner, für welche validierte Antikörper zur Verfügung standen.



**Abbildung 3.8: Identifizierung der Proteinkomposition der ACTB- und MYC-RNA enthaltenden RNP-Komplexe mit Hilfe des RNA-pull-down-Verfahrens.**

Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot zur Validierung der massenspektrometrischen Ergebnisse. Zur Bindungsanalyse zwischen den Proteinen des HEK293-Zellextrakts und der publizierten cis-Elemente der ACTB- und MYC-mRNA wurden die Konstrukte unter Abb. 3.7 (weißer Hintergrund) verwendet. ACTB-CDS(1-416) stellt dabei die Negativkontrolle dar. Die Präzipitation der Proteine sowie der Input (I) wurden mit den entsprechenden Antikörpern (rechts) untersucht.

Das Bindungsmuster von IGF2BP1 zeigt neben der Interaktion mit den bekannten Erkennungsmotiven ACTB-3'UTR und MYC-CRD, dass IGF2BP1 ebenfalls die MYC-3'UTR und zu geringen Teilen das Kontrollkonstrukt bindet. Die Assoziation von IGF2BP1 mit der Kontrolle lässt sich mit später durchgeführten Clipanalysen (Hafner et al., 2010; Conway et al., 2016; Van Nostrand et al., 2016) untermauern. Auf eine putative Bindungsstelle innerhalb der ersten 416 bp der ACTB-mRNA, wird durch die CLIP-Analysen hingewiesen (Abb. 3.27). Das ACTB-1-416-Konstrukt ist dennoch als Kontrolle geeignet, da sich dieser Bereich vom gesuchten RNP abgrenzt.

Die Wechselwirkung zwischen IGF2BP1 und der MYC-3'UTR wurde bisher noch nicht näher beschrieben und lässt folgern, dass es ebenfalls an Motive in der MYC-3'UTR bindet. Diese

## Ergebnisse

Assoziation wurde ebenfalls mit Clip-Analysen bestätigt (Hafner et al., 2010; Conway et al., 2016; Van Nostrand et al., 2016).

HNRNPU und DHX9 binden die ACTB-3'UTR, die MYC-CRD (wie schon in Weidensdorfer et al., 2009 beschrieben) und die MYC-3'UTR. Interessanterweise stellte sich heraus, dass der größte Teil der putativen Interaktionspartner eine spezifische Bindung mit beiden 3'UTR-Konstrukten eingeht, was nicht verwunderlich ist, da viele regulatorische Sequenzmotive im 3'UTR lokalisiert werden. So interagieren beispielsweise HNRNPQ, ELAVL1, NF45, HNRNPD, HNRNPA2B1, HNRNPM und PTBP1 mit der 3'UTR von MYC sowie ACTB, aber sie sind weder im *pulldown* der Kontrollsequenz noch der MYC-CRD angereichert. Für ELAVL1 konnte bereits in Weidensdorfer et al., 2009 eine Bindung zur 3'UTR der MYC-mRNA identifiziert werden. Für HNRNPQ konnte jedoch keine Assoziation mit der MYC-CRD im *pulldown* validiert werden. Andere Proteine zeigen eine spezifische Bindung, indem sie Bestandteil von nur einem *pulldown*-Konstrukt sind. So bindet HNRNPE2 nur die ACTB-3'UTR, was auch mit den Daten der Massenspektrometrie übereinstimmt (Tab. 3.2). Andere Proteine wiederum konnten mittels Western Blot nicht detektiert werden wie z. B. NCL oder HNRNPAB. Entweder ist deren Bindungsmotiv durch die Verkürzung der Konstrukte verloren gegangen (Abb. 3.7), oder die Proteinmenge liegt unterhalb des Detektionsbereichs. ELAVL1 konnte nach den Ergebnissen der Massenspektrometrie nur über ACTB gereinigt werden. NF90, NF45 und HNRNPQ hingegen wurden nur über das MYC-Konstrukt im *pulldown* identifiziert. Der Western Blot für alle vier Proteine zeigte jedoch, dass diese sowohl an ACTB als auch an MYC binden können. Dieser Befund macht deutlich, dass einige Proteine nicht eindeutig über die Massenspektrometrie detektiert werden. Zusammenfassend lassen die *pulldown*-Analysen der ACTB- und MYC-Konstrukte schlussfolgern, dass die Zusammensetzung der RNPs sich zwar überwiegend ähnelt, darüberhinaus aber auch transkriptspezifische Komponenten identifiziert werden konnten.

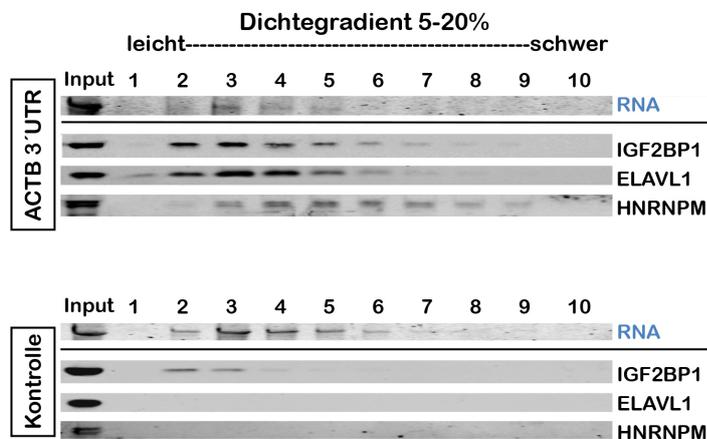
### **3.1.4 Identifizierung der RNP-Komplexbildung während des *pulldown*-Verfahrens**

Durch Ultrazentrifugation eines Gradienten kann man Zellbestandteile anhand ihrer Masse und Dichte voneinander trennen. Isoliert vorliegende Proteine kommen dabei in Regionen geringerer Dichte vor, während sich größere Komplexe aus Proteinen und Nukleinsäuren in Bereichen höherer Dichte anreichern.

Es war jedoch keineswegs gewiss, ob sich während des *pulldown*-Verfahrens ein Komplex aus *in-vitro*-transkribierten RNA und diversen RBPs bildet. Deshalb wurde die Verteilung von IGF2BP1,

## Ergebnisse

ELAVL1, HNRNPM und der *in-vitro*-transkribierten RNA nach der *pulldown*-Durchführung im 5–20%igen Sucrosedichtegradienten untersucht.



**Abbildung 3.9: Anreicherung der ACTB-3'UTR vermittelten RNP-Komplexe.**

Das Eluat des ACTB-3'UTR-*pulldowns* und der Kontrolle ACTB-CDS(1-416) wurden auf einen kontinuierlichen (5–20 %) Sucrosedichtegradienten geladen und bei 285.000 xg für 2,5 h ultrazentrifugiert. 10 Fraktionen wurden mit einem Gradientenfractionierer abgenommen. Die Fraktionen wurden zu gleichen Anteilen getrennt und daraus die Proteine und die RNA mittels Western Blot bzw. TBE-Harnstoffgel analysiert. n=3

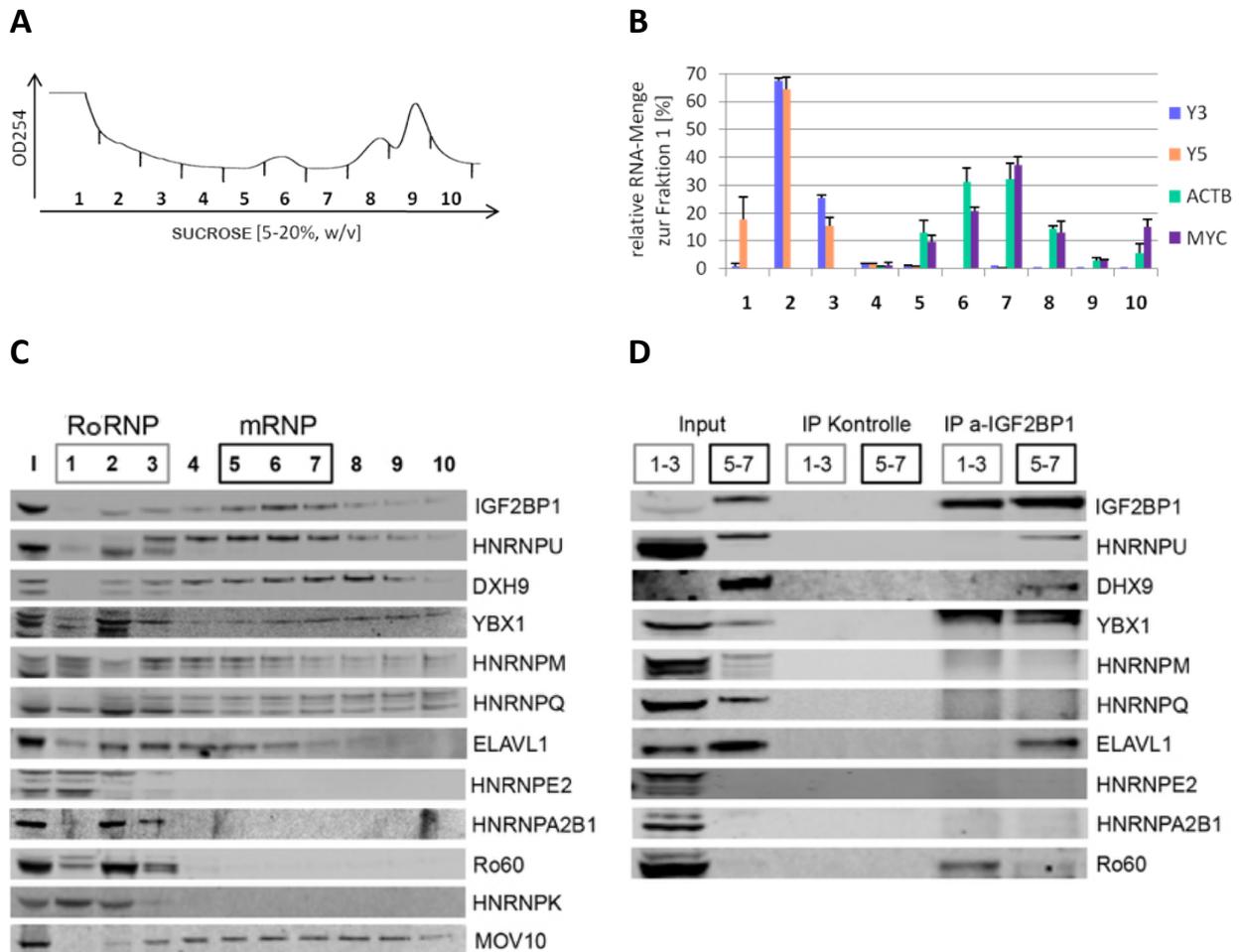
Nach der Ultrazentrifugation wurden 10 Fraktionen gesammelt und aus jeder die *in-vitro*-transkribierte RNA und die Proteine isoliert. Im Blot ist zu erkennen, dass die RNA sowie die Proteine sich im Gradienten verteilen, jedoch kaum ein Anteil in der freien Fraktion 1 zu detektieren ist (Abb.3.9). Die Proteine IGF2BP1 und ELAVL1 reichern sich in Fraktion 2–7 an, während das Maximum parallel zur *in-vitro*-transkribierten RNA in Fraktion 2–5 liegt. Dagegen befindet sich der größte Teil an HNRNPM in einem etwas dichteren/schwereren Bereich des Gradienten (Fraktion 3–9) mit einem Maximum in Fraktion 4–6. Anhand dieser Daten kann man davon ausgehen, dass sich im Verlauf des *pulldown*-Verfahrens Komplexe aus der *in-vitro*-transkribierten RNA und den Proteinen des HEK293A-Zelllysats bilden. Das Auftreten in den gleichen Fraktionen unterstützt die Annahme, dass alle 3 Proteine in gleich großen, wenn nicht in gleichen Komplexen auftreten. Mit dem Kontrollkonstrukt konnte nur IGF2BP1 in den leichten Fraktion 2 und 3 analysiert werden. Das deutet darauf hin, dass sich IGF2BP1 mit dem Kontrollkonstrukt in kleineren Komplexen befindet oder möglicherweise in gewissem Maße unspezifisch an diese RNA bindet, da sich sowohl die endogene ACTB-RNA (Abb. 3.10 B) als auch das Transkript mit der publizierten Bindestelle (Abb. 3.9) in den schwereren Fraktionen befindet.

### **3.1.5 IGF2BP1 sedimentiert im Sucrosedichtegradienten in leichten und schweren mRNPs**

Zur weiteren Charakterisierung von IGF2BP1 enthaltenden-RNPs wurde die Proteinverteilung in einem Sucrosedichtegradienten mit Gesamtzellextrakt von Frau Dr. Kristin Wächter aus unserer Arbeitsgruppe untersucht. Durch Analysen in Nielsen et al., 1999 war bereits bekannt, dass IGF2BP1

## Ergebnisse

nicht polysomassoziert vorliegt. Dieser Befund zeigt, dass IGF2BP1 überwiegend in RNPs auftritt, die nicht zum *steady state* der Translation gehören. Aufgrund dessen verwendete Frau Dr. Wächter für ihre Untersuchungen einen 5–20%igen Sucrosedichtegradienten (Abb.3.10 A).



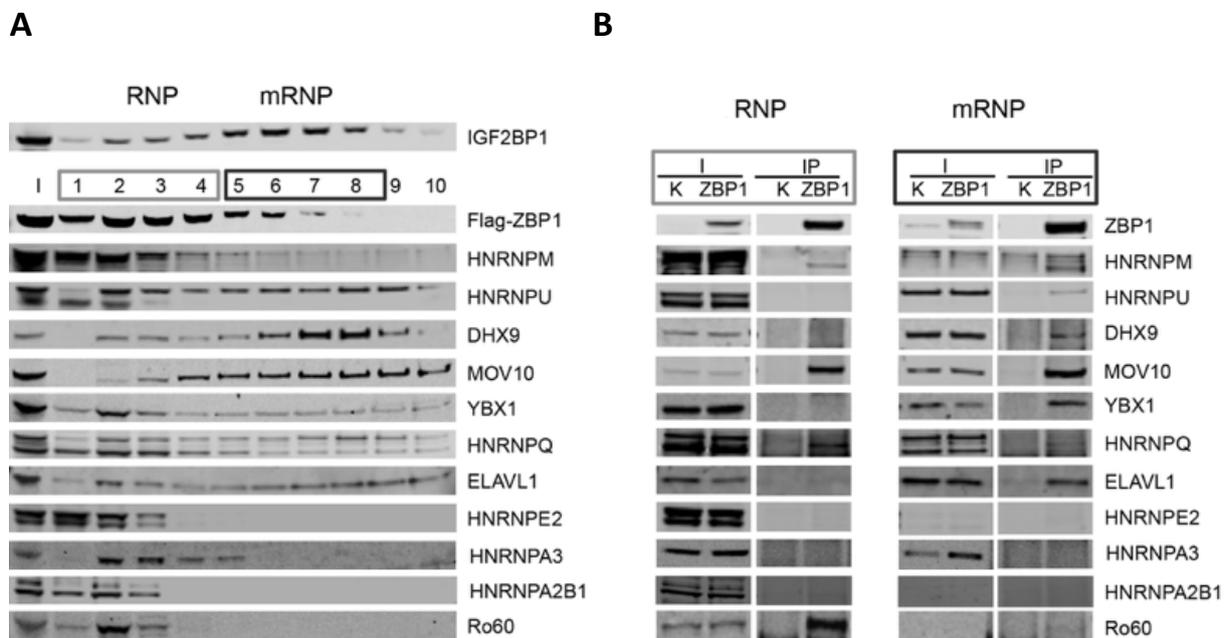
**Abbildung 3.10: Analyse IGF2BP1 enthaltener mRNPs.** Das HEK293A-Zellextrakt wurde auf einen kontinuierlichen (5–20 %) Sucrosedichtegradienten geladen und **(A)** das Absorptionsprofil bei 254 nm gemessen. **(B)** Quantifizierung der angezeigten RNAs mittels qRT-PCR. Das Diagramm zeigt die Abundanz der RNAs [%] in den einzelnen Fraktionen von drei unabhängigen Experimenten. Leichte mRNPs sind durch das Vorhandensein der YRNAs und die schwereren mRNPs durch ACTB und MYC-RNA gekennzeichnet **(C)** Die Proteine des Inputs (I) und der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. **(D)** Dargestellt ist die Western Blot-Analyse der Immunpräzipitation von IGF2BP1 aus den vereinten Fraktionen 1–3 (RoRNP) und 5–7 (mRNP). Die Proteine des Inputs, der *bead*-Kontrolle ohne Antikörper (IP Kontrolle) sowie die Immunpräzipitation (IP a-IGF2BP1) von IGF2BP1 sind abgebildet. (Durchgeführt und abgebildet von Frau Dr. Kristin Wächter. Quelle: Dissertation-Wächter)

Anhand von Ro60, welches nicht kodierenden YRNAs (Abb. 3.10 B) bindet und eine Proteinkomponente von RoRNPs ist, konnte man den Gradienten in leichte und schwere mRNPs einteilen, bei der die molare Masse von RoRNPs zwischen 200-350 kDA liegt (Fabini et al., 2000). Die funktionelle Rolle dieser zytoplasmatischen RNP-Komplexe ist jedoch noch unbekannt. Es wird postuliert, dass die RNPs Transportvorgänge koordinieren (Hu et al., 2012).

## Ergebnisse

Abbildung 3.10 C zeigt, dass IGF2BP1 in allen Fraktionen detektiert wurde. Es stellt dementsprechend eine Komponente von kleineren und größeren RNPs dar, wobei es sich überwiegend in den größeren RNP-Fraktionen 5–8 befindet. Die Analyse zeigt außerdem, dass IGF2BP1 kaum mit intakten Ribosomen der Fraktion 9–10 kosedimentiert, sondern überwiegend mit den isolierten Untereinheiten der Ribosomen. Dieser Befund bestätigt, dass es hauptsächlich ein Bestandteil von translationsinaktiven Komplexen ist.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die Proteine HNRNPU, DHX9, YBX1, HNRNPM, HNRNPQ und MOV10 ebenfalls im gesamten Gradienten verteilt sind und mit IGF2BP1 kosedimentieren. HNRNPK sowie HNRNPE2 konnten ausschließlich in den leichteren Fraktionen (RoRNPs) nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.11: Verteilung von putativen IGF2BP1 Protein-Liganden im 5–20%igem Sucrosedichtegradienten mit anschließender Flag-ZBP1 (*chicken ortholog* von IGF2BP1) Immunpräzipitation.**

Das Zelllysate (Flag-ZBP1 exprimierende HEK293A-Zellen) wurde auf einen kontinuierlichen (5–20 %) Sucrosedichtegradienten geladen und **(A)** die Proteine des Inputs (I) sowie der Fraktionen im Western Blot analysiert. **(B)** Die Proteine der Immunpräzipitation (IP) wurden mittels Western Blot analysiert (durchgeführt und abgebildet von Frau Dr. Kristin Wächter. Quelle: Dissertation-Wächter)

Um zu überprüfen, ob die Kofraktionierung der Proteine mit IGF2BP1 tatsächlich auf das Vorhandensein in einem IGF2BP1-enthaltenden Komplex hindeutet, wurden die über Dichtegradientenzentrifugation vorgereinigten Fraktionen 1–3 und 5–8 als Ausgangsmaterial für darauffolgende IGF2BP1-Immunpräzipitation eingesetzt. Die Daten zeigen, dass mit dieser Methode zwei IGF2BP1 enthaltende RNPs identifiziert werden konnten. Beide unterscheiden sich in ihrer Komposition. Während der leichtere Komplex neben IGF2BP1 aus YBX1 und Ro60 besteht (RoRNPs),

## Ergebnisse

enthalten die schwereren Komplexe (mRNPs) neben YBX1 noch HNRNPU, DHX9 und ELAVL1 (Abb. 3.10 C).

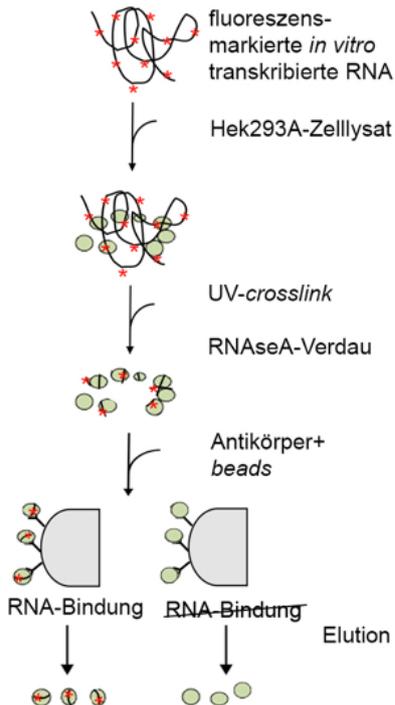
Aufgrund der schlechten Anreicherung während der Immunpräzipitation führte Frau Dr. Kristin Wächter das Experiment mit Flag-chIGF2BP1 stabil überexprimierenden HEK293A-Zellen durch. Die Proteinverteilung von Flag-chIGF2BP1 im Vergleich zum Endogenen zeigt eine deutliche Verlagerung der Proteinmenge zu leichteren Fraktionen (Abb. 3.11 A). Durch das veränderte Sedimentationsverhaltens von exogenem Flag-IGF2BP1 wurde ebenfalls HNRNPM in die leichten Fraktionen verlagert.

Nach der Flag-IGF2BP1-Immunpräzipitation konnten neben HNRNPU, DHX9, ELAVL1 und YBX1 die putativen IGF2BP1-Liganden HNRNPM, MOV10 und HNRNPQ koimmunpräzipitiert werden (Abb. 3.11 B). HNRNPA3 und HNRNPE2 wurden in keiner der IPs im Western Blot identifiziert. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass übereinstimmend mit Jonson et al., 2007 und Weidensdorfer et al., 2009 die Interaktionen von IGF2BP1 mit HNRNPU, DHX9, YBX1, ELAVL1 und HNRNPQ validiert werden konnten. Zudem konnten neue Erkenntnisse gezeigt werden: So tritt IGF2BP1 sowohl in kleineren RNPs mit Ro60, MOV10, HNRNPQ und HNRNPM auf, während es in größeren RNPs mit HNRNPU, DHX9, MOV10, ELAVL1, HNRNPM, YBX1 und HNRNPQ interagiert.

### **3.1.6 Nachweis der Bindung zwischen RNA und Protein mittels cross-linking Immunpräzipitation mit *in-vitro*-transkribierter RNA**

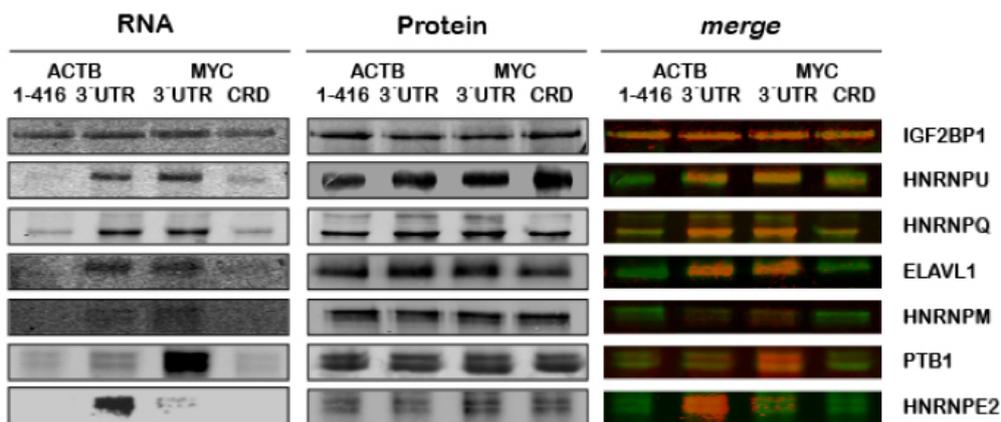
Als weitere Möglichkeit die Bindung zwischen RNA und Protein zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein *in-vitro-cross-link* mit anschließender Immunpräzipitation durchgeführt. Dadurch soll überprüft werden, ob die identifizierten RNA-bindenden Proteine, die im RNA-*pull-down* angereichert wurden, ebenfalls in der Lage sind, die jeweilige RNA aus einer komplexen Probe zu isolieren. Dafür wurden die RNA-Konstrukte von ACTB und MYC jeweils ohne die MS2-*loop*-Struktur (Abb. 3.7 weißer Hintergrund) fluoreszenzmarkiert. Für die Versuche wurde die jeweilige markierte RNA mit HEK293A-Lysat gemischt und anschließend ein *in-vitro-cross-link* bei 254 nm durchgeführt. Ein darauffolgender RNaseA-Verdau reduziert die fluoreszenzmarkierte RNA auf einen kurzen Oligonukleotidbereich, der direkt vom Protein gebunden und durch den *cross-link* vernetzt wurde. Das Protein und die durch den *cross-link* gebundenen fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidbereiche wurden anschließend mit einem für das Protein spezifischen Antikörper immunpräzipitiert. Die isolierten RNA-Protein-Komplexe wurden mittels SDS-PAGE analysiert. In Abb. 3.12 ist das Verfahren schematisch dargestellt.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.12: Schematische Darstellung des *cross-link* mit *in-vitro*-transkribierter RNA und anschließender Immunpräzipitation.** Während der *in-vitro*-Transkription werden die Elemente fluoreszenzmarkiert. Nach dem UV-*cross-link* bei 245 nm erfolgt ein RNase-Verdau, um ungebundene Bereiche zu eliminieren. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit spezifischen Antikörpern gegen IGF2BP1 durchgeführt, um die Komplexe zu reinigen und mittels Western Blot untersucht. Es wurden ausschließlich Konstrukte ohne MS2-*loops* verwendet.

Im Falle einer direkten Bindung zwischen RNA und Protein ist ein Fluoreszenzsignal der RNA in Laufrichtung des zu untersuchenden Proteins im SDS-Gel zu erkennen. Nach der Detektion des RNA-Fluoreszenzsignals mit Hilfe des LI-COR Odyssey wurde das SDS-Gel auf eine Blotmembran transferiert und die immunpräzipitierten Proteine mittels spezifischer Antikörper untersucht. Anschließend wurden die Signale der markierten RNA und des Proteins übereinandergelegt.



**Abbildung 3.13: *Cross-link* mit *in-vitro*-transkribierter RNA und anschließender Immunpräzipitation.** Repräsentativer Western Blot (n=3), der die RNA-Protein-Komplexe darstellt. Die Proteine wurden mit Hilfe der angegebenen Antikörper visualisiert (Mitte bzw. grün im Überlagerungsbild). Die Identifizierung der gebundenen RNA erfolgte über den eingebauten Fluoreszenzfarbstoff (links bzw. rot im Überlagerungsbild). In Abb. 3.13 sind die Ergebnisse des *cross-links* mit *in-vitro*-transkribierter RNA und anschließender Immunpräzipitation dargestellt. Im linken Teil sieht man das Signal der fluoreszenzmarkierten RNA im SDS-PAGE Gel, in der Mitte ist das immunpräzipitierte Protein dargestellt und rechts sind beide

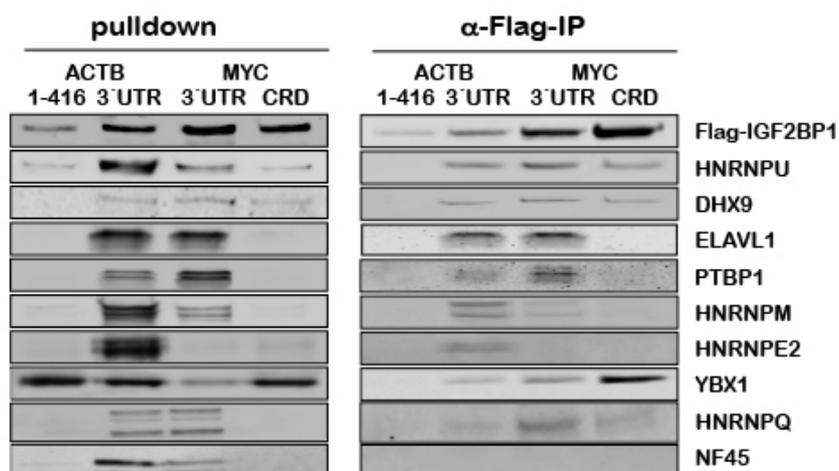
## Ergebnisse

Aufnahmen übereinandergelegt. Falls beide Signale deckungsgleich sind, erscheinen die Banden orange, was auf eine Bindung des Proteins mit der jeweiligen RNA hindeutet. Wenn das Signal grün bleibt, ist das Protein ohne die jeweilige markierte RNA präzipitiert worden und es liegt keine spezifische RNA-Bindung vor. Anhand der einheitlichen Banden für jedes immobilisierte Protein in den mittleren Spuren, kann man erkennen, dass die Immunpräzipitation in allen 4 Ansätzen gleichmäßig durchgeführt wurde. Mit Hilfe des *cross-link*-Bindungsassays konnte man für die Proteine IGF2BP1, HNRNPU, HNRNPQ, ELAVL1, HNRNPM, PTBP1 und HNRNPE2 die Ergebnisse des *pull-down*-Verfahrens validieren (Kapitel 3.1.8; Abb. 3.8). IGF2BP1 bindet alle 4 Konstrukte, HNRNPU bindet die 3'UTR-Konstrukte und zu einem geringeren Anteil das MYC-CRD-Konstrukt. ELAVL1, DHX9, HNRNPM und PTBP1 binden beide 3'UTRs. HNRNPM zeigt ebenfalls die gleiche Präferenz für die ACTB-3'UTR und PTBP1 für die MYC-3'UTR. HNRNPE2 interagiert ausschließlich nur mit dem ACTB-3'UTR-Konstrukt. Kleine Abweichungen gibt es für HNRNPQ. Es interagiert mit den 3'UTR-Konstrukten und sehr schwach mit dem Kontrollkonstrukt und der MYC-CRD. Anscheinend erhält man mit dieser Methode eine bessere Präzipitation.

### **3.1.7 Die Tandemaffinitätsreinigung identifiziert Interaktionspartner im IGF2BP1-enhaltenen RNP**

In den weiteren Experimenten sollte untersucht werden, ob die identifizierten RNA-bindenden Proteine mit IGF2BP1 in einem Komplex vorkommen. Um solche putativen IGF2BP1-Interaktionspartner zu filtern, wurde in dieser Arbeit die Tandemaffinitätsreinigung durchgeführt. Diese Art der Aufreinigung besteht aus zwei Schritten: (1) einem RNA-*pull-down* mit (2) anschließender IGF2BP1-Immunpräzipitation. Mit Hilfe des RNA-*pull-downs* werden dabei RBPs identifiziert, die die Konstrukte von ACTB und/oder MYC binden. Die IGF2BP1-IP als zweiter Aufreinigungsschritt selektiert daraus die RBPs, welche sich zusammen mit IGF2BP1 in einem RNP befinden. Um eine bessere Anreicherung von IGF2BP1 zu gewähren, wurde stabil überexprimiertes Flag-IGF2BP1-Lysat für die Tandemaffinitätsreinigung verwendet und mittels Flag-Peptid der Flag-IGF2BP1 Komplex eluiert.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.14: Western Blot-Analyse der Tandemaffinitätsreinigung.**

Die Tandemaffinitätsreinigung besteht aus zwei Schritten, (links) der RNA-pulldown, (rechts) die anschließende anti-Flag-IP mittels Flag-IGF2BP1-HEK293A-Lysat.

Durch den zweiten Aufreinigungsschritt reichern sich die RBPs an, welche mit IGF2BP1 in einem Komplex vorkommen. NF45 ist anscheinend keine Komponente des IGF2BP1-enthaltenen RNPs. n=3

Vergleicht man die Western Blot-Analyse des RNA-pulldowns mit den Ergebnissen der Flag-IGF2BP1-IP in Abb. 3.14, erkennt man ein verändertes Bindungsprofil einiger Proteine. Während sich die Ergebnisse für HNRNPU, DHX9, ELAVL1, PTBP1, HNRNPM und HNRNPE2 in beiden Verfahren decken, zeigt YBX1 nach der Immunpräzipitation ein abweichendes Bindungsmuster. Es assoziiert im pulldown vorwiegend mit dem Kontrollkonstrukt, dem ACTB-3'UTR und der MYC-CRD. Im Western Blot der Immunpräzipitation dagegen ist zu sehen, dass eine starke Bande im MYC-CRD vermittelten Ansatz, eine schwächere Bande im MYC-3'UTR Ansatz und eine schwache Bande mit der ACTB-3'UTR auftritt. Dieses Ergebnis legt nahe, dass YBX1 zwar mit dem ACTB-CDS(1-416) Konstrukt assoziiert, jedoch nicht zusammen mit IGF2BP1 in einem Komplex ist. Dafür tritt es aber im MYC-CRD-, MYC-3'UTR- und ACTB-3'UTR-vermittelten RNP zusammen mit IGF2BP1 auf. HNRNPQ zeigt wie YBX1 eine abweichende Bindung, indem es mit beiden 3'UTR-Konstrukten während des pulldowns assoziiert und im zweiten Schritt der Tandemaffinitätsreinigung ebenfalls mit dem MYC-CRD Konstrukt angereichert wird. Das weist darauf hin, dass HNRNPQ ebenfalls im MYC-CRD-vermittelten Komplex vorkommt, was den Befund in Weidensdorfer et al., 2009 validiert. Darüber hinaus erkennt man für HNRNPQ sogar nur noch eine Bande nach der Flag-Immunpräzipitation (Abb. 3.14). Anscheinend überwiegt eine Isoform in IGF2BP1-enthaltenen Partikeln.

NF45 bindet z. B. spezifisch die 3'UTRs, ist aber keine Komponente von IGF2BP1 enthaltenden RNPs, da es nach der Immunpräzipitation nicht mehr zu detektieren ist. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die gemeinsame Bindung eines Transkripts nicht dafür steht, dass beide Proteine in einem Komplex vertreten sein müssen.

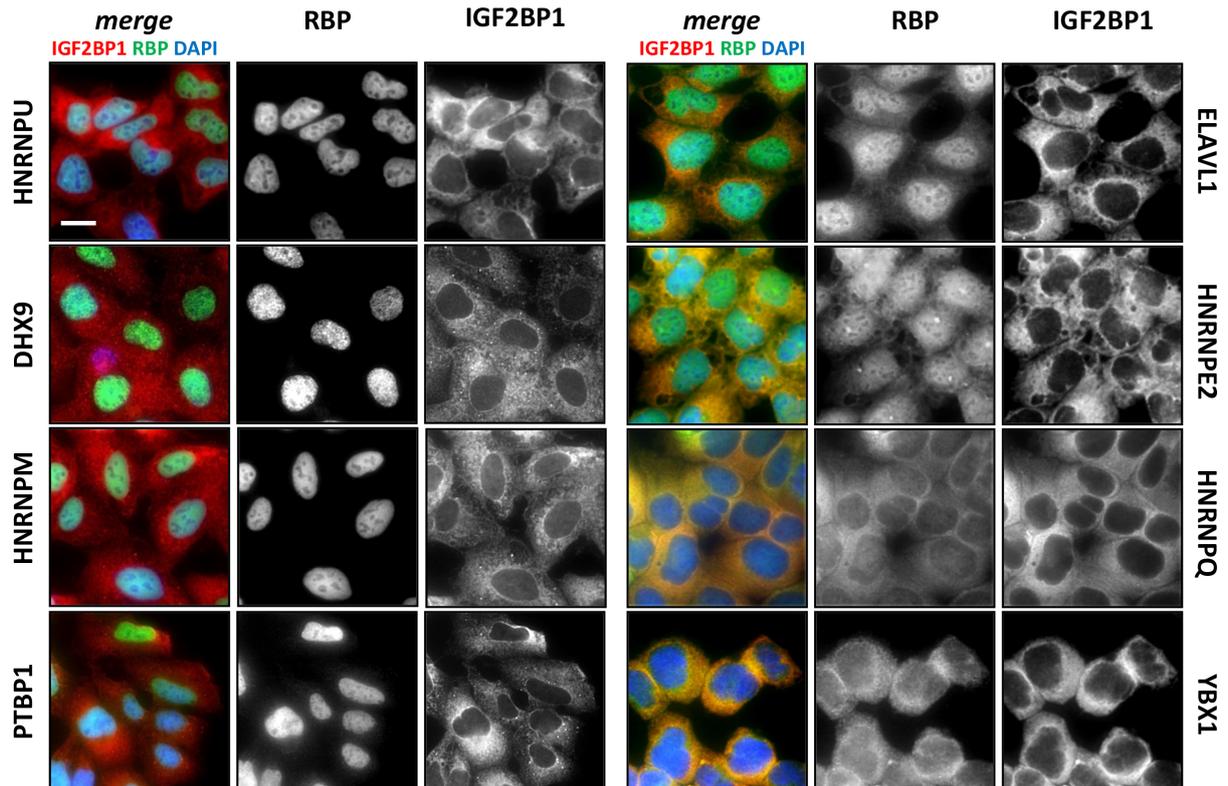
Zusammenfassend ist die Tandemaffinitätsreinigung eine gute Methode um herauszufinden, welche Proteine zusammen in einem RNP vorkommen. Zudem konnte die unterschiedliche Zusammensetzung der RNPs sowie die cis-Element-spezifische Assoziation der Proteine bestätigt

werden. Inwiefern diese Interaktionen in den gleichen Kompartimenten der Zelle vorliegen, sollte im nächsten Schritt untersucht werden.

### **3.2 Lokalisation der IGF2BP1-Interaktionspartner**

IGF2BP1 wird in der Literatur als vorwiegend zytoplasmatisches Protein beschrieben. Die Interaktion zwischen IGF2BP1 und dessen putativen Bindungspartnern wurden in Ko-Immunfluoreszenzfärbungen in HEK293A-Zellen untersucht. Dabei wurde IGF2BP1 rot und die RBPs grün dargestellt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. Die Immunfluoreszenzaufnahmen zeigen wie in der Literatur beschrieben eine deutliche Dominanz von IGF2BP1 im Zytoplasma (Nielsen et al., 1999; Oleynikov & Singer, 2003). Für HNRNPQ ist beschrieben, dass es drei Isoformen HNRNPQ1-3 besitzt, die unterschiedlich in der Zelle verteilt sind (Svitkin et al., 2013; Mizutani et al., 2000; Mourelatos et al., 2001). Hier konnten wir entsprechend der Literatur zeigen, dass HNRNPQ sich im Zytoplasma anreichert, jedoch geringfügig auch im Kern lokalisiert. YBX1 zeigt eine überwiegend zytoplasmatische Verteilung, die vergleichbar mit der IGF2BP1-Färbung ist. Es ist kaum bis gar nicht im Zellkern von HEK 293A-Zellen zu finden. HNRNPE2 und ELAVL1 treten überwiegend im Zellkern auf, sind aber auch in geringerem Ausmaß im Zytoplasma zu finden. Diese Aussagen decken sich mit den Ergebnissen der Literatur. HNRNPE2 wird als *shuttling*-Protein beschrieben (Makeyev & Liebhaber, 2002) und ELAVL1 wird als Protein charakterisiert, welches bis zu 15 % im Zytoplasma vorliegt und dort an der Zellteilung, Karzinogenese, Muskelzellendifferenzierung, Immunzellantwort und Stressantwort beteiligt ist (Atasoy et al., 1998, Kullmann et al., 2002, Figueroa et al., 2003). HNRNPU, DHX9, HNRNPM und PTBP1 weisen ein rein kernständiges Signal auf. In der Literatur wird HNRNPU ebenfalls als rein kernständiges Protein beschrieben, das sowohl RNA als auch DNA bindet. Es ist unter anderem an der Spleißregulation beteiligt (McGuffin & Huckle, 1990). DHX9 ist eine RNA-Helikase, die laut der Literatur ebenfalls nur im Zellkern vorkommt (Zhang et al., 1999). HNRNPM und PTBP1 werden als kernlokalisierte RBPs beschrieben, welche den Spleißvorgang regulieren (Hase et al., 2006; Llères et al., 2010; Valcarcel & Gebauer, 1997).

## Ergebnisse



**Abbildung 3.15a: Lokalisierung der endogenen RBPs:** HEK293A-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, nach ca. 24 Stunden fixiert, permeabilisiert und immunhistochemisch gefärbt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI (blau) verwendet. HNRNPU, DHX9, HNRNPM und PTBP1 erwiesen sich als kernständige Proteine, während HNRNPO, YBX1, HNRNPE2 und ELAVL1 zusammen mit IGF2BP1 im Zytoplasma kolokalisierten. Die Kolokalisation ist hier in der Spalte *merge* anhand der gelben bzw. orangenen Färbung zu erkennen. Balken 25  $\mu\text{m}$ . (Mikroskopie wurde durchgeführt von der CFI)

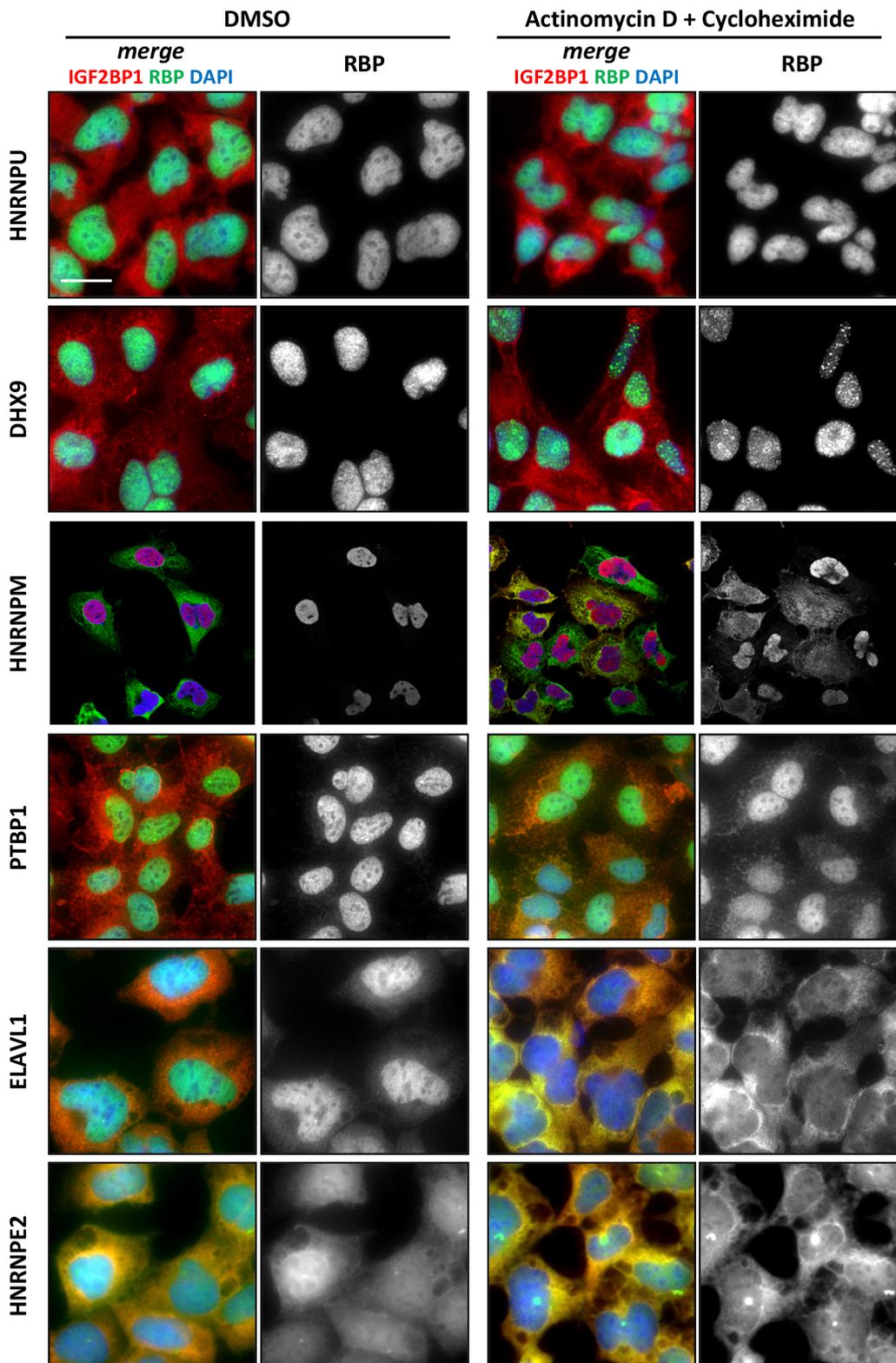
Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Proteine HNRNPO, YBX1, HNRNPE2 und ELAVL1 (partiell) im Zytoplasma vorliegen und dort mit IGF2BP1 kolokalisieren. Dies legt nahe, dass IGF2BP1 mit diesen Proteinen tatsächlich auch unter physiologischen Bedingungen in Komplexen vorliegen kann. Darüber hinaus wurden HNRNPM, PTBP1, HNRNPU und DHX9 nahezu ausschließlich im Zellkern detektiert, was die Frage aufwirft, inwiefern diese Komplexpartner unter bestimmten Bedingungen ihre Lokalisation ändern und mit IGF2BP1 in einem Kompartiment zusammenkommen. Die meisten HNRNPs besitzen ein konventionelles Kernlokalisierungssignal (NLS) und sind im *steady state* Zustand überwiegend im Kern vorhanden. Durch posttranslationale Modifikationen kommt es jedoch zu subzellulären Lokalisationsveränderungen. HNRNPs nehmen am Pre-mRNA-processing wie dem Spleißen teil und sind wichtige Bestandteile des Exports, der Lokalisierung, Translation und Stabilität des Zieltranskripts (Han et al., 2010). Deshalb sind die meisten HNRNPs in der Lage, zwischen dem Kern und dem Zytoplasma zu pendeln.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde getestet, ob diese Proteine zu den *shuttle*-Proteinen gehören. *Shuttle*-Proteine bewegen sich zwischen Kern und Zytoplasma. Einige davon befinden sich im

## Ergebnisse

Gleichgewichtszustand vorwiegend im Zellkern (Nigg, 1997), da ihr Aufenthalt im Zytoplasma sehr kurzweilig und deshalb schwer zu detektieren ist. Um *shuttle*-Proteine zu identifizieren wird die Methode der Transkriptionshemmung angewandt. *Shuttle*-Proteine akkumulieren aus bislang unerklärter Ursache im Zytoplasma, wenn die Transkription durch Agenzien wie Actinomycin D inhibiert wird. Dabei werden Guanin- und Cytosin-reiche Regionen der DNA von Actinomycin D gebunden und die Elongation der RNA Polymerase II blockiert. Daher wurde diese Behandlung herangezogen, um zu untersuchen, inwieweit kernständige Proteine wie HNRNPM, PTBP1, HNRNPU und DHX9 dadurch im Zytoplasma detektierbar werden und möglicherweise mit IGF2BP1 kolokalisieren können. Dafür wurden erneut HEK293A-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Nach 24h erfolgte eine einstündige Actinomycin D-Behandlung (5µg/ml). Anschließend wurden die Zellen fixiert und immunocytochemisch mit Antikörpern gegen IGF2BP1 und die zu untersuchenden RBPs gefärbt. Damit die Detektion der Proteine nach der Actinomycin D-Behandlung nicht auf neu-synthetisiertes Protein zurückzuführen ist, wurden die Zellen gleichzeitig mit Cycloheximid inkubiert. Cycloheximid bindet an die 60S ribosomale Untereinheit und verhindert dadurch die Protein-Neusynthese. Durch die Behandlung mit Actinomycin D konnten für die RBPs HNRNPE2 und ELAVL1 ein stärkeres zytoplasmatisches Signal als bei den unbehandelten Zellen nachgewiesen werden. Für HNRNPU und DHX9 konnte keine Relokalisierung aus dem Zellkern in das Zytoplasma gezeigt werden. Diese RBPs wurden somit entsprechend der Literatur als rein kernständige Proteine identifiziert (Pinol-Roma & Dreyfuss, 1991, Zhang et al., 1999). Es konnte jedoch bei DHX9 eine veränderte Kernlokalisierung beobachtet werden. Die Zellen zeigten granulatähnliche Strukturen im Kern im Vergleich zu den unbehandelten Zellen. Die als kernständig analysierte Proteine HNRNPM und PTBP1 konnten durch die Behandlung mit Actinomycin D als *shuttle*-Protein identifiziert werden. Demnach kommen HNRNPO, YBX1, HNRNPE2, ELAVL1, HNRNPM und PTBP1 als Interaktionspartner von IGF2BP1 in zytoplasmatischen RNPs in Frage. Es gibt jedoch Hinweise, dass IGF2BP1 ebenfalls im Zellkern auftritt. Oleynikov und Singer zeigten 2003, dass IGF2BP1 seine RNA-*targets* bereits während des laufenden Transkriptionsprozesses im Zellkern bindet (Oleynikov & Singer, 2003; Hüttelmaier et al., 2005). Demnach wäre es denkbar, dass IGF2BP1 ebenfalls mit Proteinen wie HNRNPU oder DHX9 in kernständigen RNPs agiert.

Ergebnisse



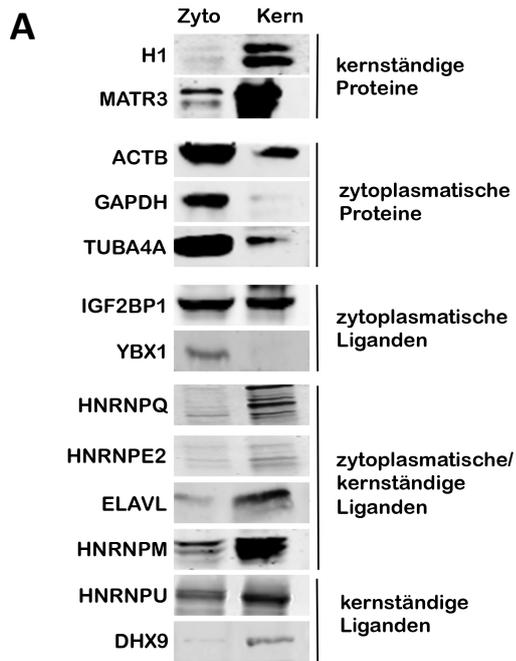
**Abbildung 3.15b: Untersuchung der Relokalisierung der RBPs unter Actinomycin D/Cycloheximid-Behandlung.** HEK293A-Zellen wurde auf Deckgläschen ausgesät, nach ca. 24 Stunden eine Stunde lang mit 5 µg/ml Actinomycin D und 0,1 µg/ml Cycloheximid behandelt, fixiert, permeabilisiert und immunhistochemisch gefärbt. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde DAPI verwendet. DMSO diente als Negativkontrolle. Durch die Zugabe von Actinomycin D konnten HNRNPM, PTBP1, ELAVL1 und HNRNPE2 als *shuttle*-Proteine identifiziert werden. HNRNPU und DHX9 wurden als rein kernständig analysiert. Die Kolokalisation mit IGF2BP1 ist hier in der Spalte *merge* anhand der gelben bzw. orangenen Färbung zu erkennen. Balken 25 µm. (Mikroskopie wurde durchgeführt von der CFI)

### 3.2.1 Pulldown-Analysen mittels Zytoplasma- und Kernextrakt

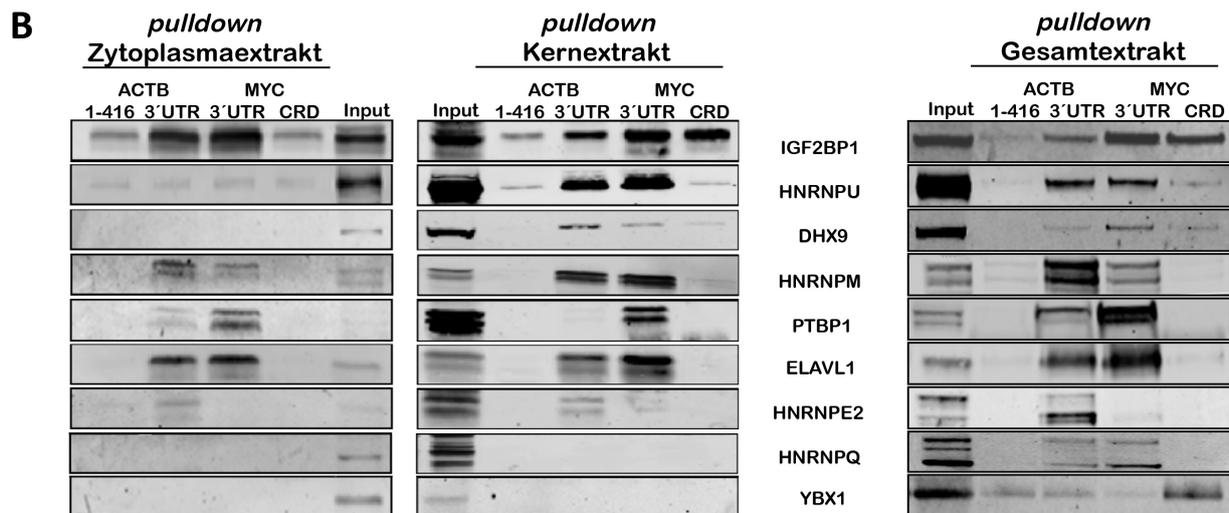
Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisation der RBPs wurden die *pulldown* Analysen mittels Kern- und Zytoplasmaextrakten durchgeführt und die Zusammensetzung der mRNPs im Zytoplasma und Kern auf Unterschiede und Gemeinsamkeiten untersucht. Die Extrakte stellte die Masterstudentin Katharina Klöditz unter meiner Anleitung aus HEK293A-Zellen her. In der Abb. 3.16 A kann man erkennen, dass die Fraktionierung keine vollständige Trennung der Kern- und Zytoplasmaproteine ergab. So erkennt man für die zytoplasmatischen Proteine Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH),  $\alpha$ -Tubulin (TUBA4A) und ACTB Rückstände in der Kernfraktion. Die kernständigen Proteine Histon H1 (H1) und Matrin 3 (MATR3) wiesen ein schwaches Signal im zytoplasmatischen Extrakt auf. Für IGF2BP1, HNRNPU und DHX9 war die Fraktionierung ebenfalls nicht ganz erfolgreich. Dennoch konnte für den Rest der Proteine eine gute Separation detektiert werden. YBX1 konnte z. B. als zytoplasmatisches Protein verifiziert werden.

Wie schon in den *pulldown*-Analysen mit Gesamtzellextrakt (Abb. 3.16) beobachtet wurde, konnte Frau Klöditz eine spezifische Bindung für die Durchführung mit Zytoplasma- und Kernextrakten gegenüber der 3'UTR-Konstrukte zeigen (Abb. 3.16). Trotzdem die kernständigen Proteine HNRNPU und DHX9 im Input des *pulldowns* mit Zytoplasmaextrakt auftraten, konnten für beide Proteine keine Präzipitation mit der *in-vitro*-transkribierten RNA detektiert werden. Dieser Befund deutet darauf hin, dass HNRNPU und DHX9 nicht zusammen mit IGF2BP1 im zytoplasmatischen RNP auftreten. Wahrscheinlich sind für eine Assoziation von HNRNPU und DHX9 zur Ziel-RNA andere Kernkomponenten notwendig. Für HNRNPE2, welches sich zwischen Kern und Zytoplasma bewegt, konnte ausschließlich die Bindung zur 3'UTR von ACTB mit den getrennten Extrakten nachgewiesen und bestätigt werden. Das in dieser Arbeit als *shuttling*-Protein identifizierte HNRNPM assoziiert mit beiden 3'UTR-Sequenzen in beiden Extraktansätzen. Wie schon im *pulldown-assay* mit Gesamtextrakt gezeigt, weist es mit dem Zytoplasmaextrakt eine Präferenz zur ACTB-3'UTR auf. Mit dem Kernextrakt ist diese Präferenz nicht zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass HNRNPM unterschiedliche Funktionen in zytoplasmatischen und kernständigen RNPs übernehmen könnte. Ähnliche Befunde sind für PTBP1 gezeigt. Die Ergebnisse der *pulldown*-Analysen des Gesamtextrakts decken sich mit denen des zytoplasmatischen Extrakts. Mittels Kernextrakt ist PTBP1 hingegen fast nur im MYC-3'UTR detektiert worden. Aus nicht erklärbaren Gründen konnte Frau Klöditz HNRNPQ und YBX1 in den Zytoplasma- und Kernextraktstudien nicht detektieren, obwohl sie die Bindung zur *in-vitro*-transkribierten RNA mittels Gesamtextrakt nachweisen konnte.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.16: Untersuchung der Zusammensetzung von ACTB- und MYC-enthaltenen RNPs mittels Zytoplasma- und Kernextrakt: (A)** Mittels Western Blot dargestellte Analyse der Qualität von Zytoplasma- und Kernextraktfraktionierung von HEK293A-Zellen. Die Fraktionierung verlief nicht ganz vollständig. Besonders HNRNPU und IGF2BP1 zeigten keine eindeutige Lokalisation in Zytoplasma bzw. im Kern. **(B)** Die Zusammensetzung der ACTB-CDS(1-416) (Kontrolle), ACTB-3'UTR, MYC-3'UTR und MYC-CRD vermittelten RNPs. Alle Konstrukte sind mit einem MS2-loop fusioniert (Abb. 3.7 weißer Hintergrund). Die Präzipitation der Proteine sowie der Input wurden mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. (unter meiner Anleitung durchgeführt von Katharina Klöditz)



Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass HNRNPQ, YBX1, HNRNPE2, ELAVL1, HNRNPM und PTBP1 in IGF2BP1 enthaltenen zytoplasmatischen RNPs auftreten. Für DHX9 und HNRNPU ist es möglich, dass sie mit IGF2BP1 und anderen RBPs in kernständigen RNPs funktionieren.

### **3.3 Untersuchung der Stabilitäts- und Translationskontrolle der MYC- und ACTB-mRNA durch ausgewählte IGF2BP1-Komplexparker**

Wie bereits in der Einleitung dieser Arbeit erwähnt, ist IGF2BP1 in Prozesse der RNA-Lokalisierung, -Stabilität und -Translation involviert. Es reprimiert die Translation der ACTB-mRNA während des

## Ergebnisse

Transports zur Zellperipherie und bindet das destabilisierende Element (CRD) innerhalb der MYC-mRNA, um den Abbau durch Endonukleasen zu verhindern. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Ergebnisse mit Hilfe des Prinzips der RNA-Interferenz (RNAi) validiert werden. Hierfür wurden HEK293A-Zellen mit zwei unterschiedlichen IGF2BP1 spezifischen *small interference* RNAs (siRNAs) und einer Kontroll-siRNA transfiziert. Der IGF2BP1 *knockdown* resultierte nach 72 h in einer Erhöhung der ACTB-Proteinmenge um ca. 27 %, was eine durch IGF2BP1 vermittelte Translationskontrolle der mRNA darstellt. Die MYC-Proteinmenge ist bis auf 15 % reduziert, was den stabilisierenden Effekt von IGF2BP1 widerspiegelt. Als Ladekontrolle diente Vinculin (VCL), Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Tubulin (TUBA4A). Analysen der RNA-Mengen wurden mittels *real time* PCR quantitativ ausgewertet. Die Ergebnisse zeigen eine starke Reduktion der MYC-mRNA. Die ACTB-mRNA blieb unverändert nach dem IGF2BP1 *knockdown*, da es sich hierbei um eine Translationsinhibierung handelt, die keinen Einfluss auf die ACTB-mRNA Gesamtmenge ausübt. Die hier gewonnenen Resultate stehen damit in Übereinstimmung mit den publizierten Daten von IGF2BP1 zur posttranskriptionellen Kontrolle von ACTB und MYC.

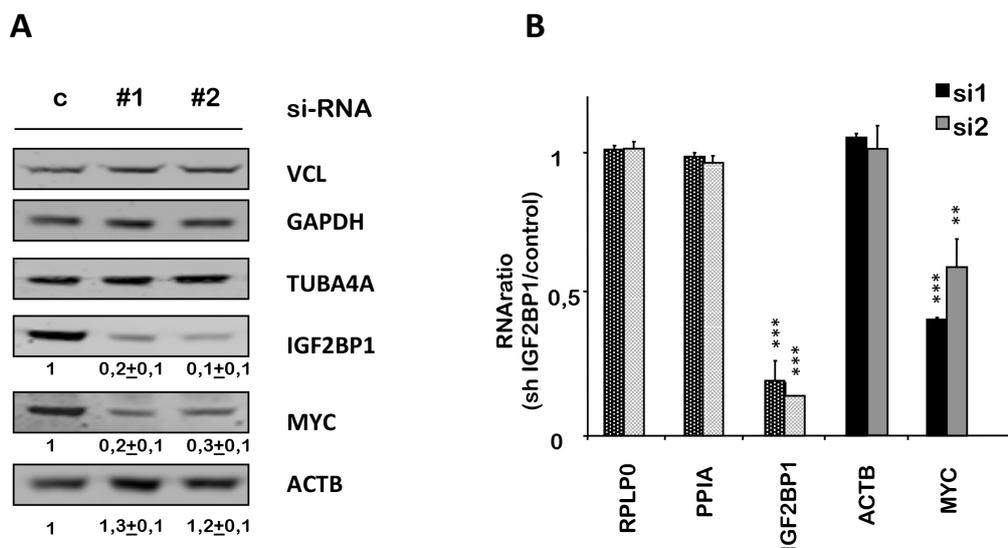


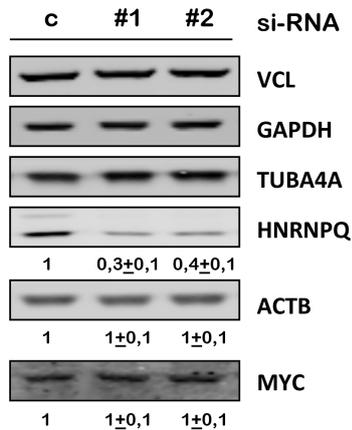
Abbildung 3.17: Knockdown-Analysen von IGF2BP1 mittels RNAi. HEK293A-Zellen wurden mit spezifischen IGF2BP1-siRNAs (#1 und #2) einschließlich einer Kontroll-siRNA (c) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde aus einem Teil der Zellen Proteinextrakt hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert (A). Vinculin (VCL), Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Tubulin (TUBA4A) dienen als Normalisierung. (B) Aus dem zweiten Teil wurde Gesamt-RNA isoliert, mittels qRT-PCR analysiert und quantifiziert. Zur Normalisierung wurden Cyclophilin A (PPIA) und RPLP0 herangezogen. Die Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen drei unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch Student's T-Test berechnet: \*\*\* $p < 0,005$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### **3.3.1 Einfluss der IGF2BP1-Komplexparker auf die Stabilität der MYC-mRNA und die Translation der ACTB-mRNA**

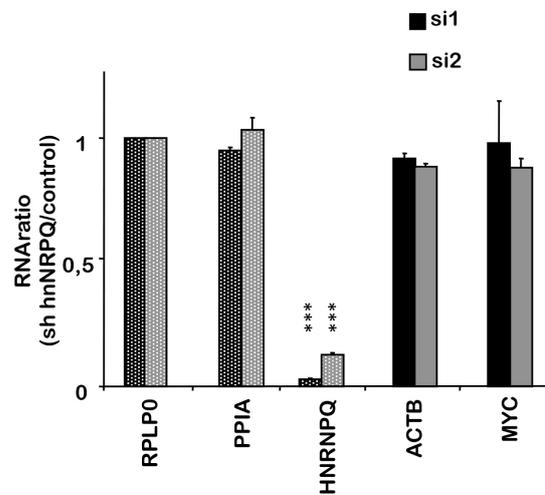
Die Ergebnisse der bisherigen Experimente haben gezeigt, dass einige der hier untersuchten RBPs mit IGF2BP1 *in vitro* interagieren. Es stellte sich nun die Frage, ob diese Interaktionen relevant für die posttranskriptionelle Kontrolle der ACTB- und MYC-mRNA sind. Um diese Frage zu untersuchen wurden knockdown Analysen durchgeführt. Als Ladekontrolle dienten wieder VCL, GAPDH und TUBA4A. In dieser Arbeit wird näher auf die RBPs HNRNPQ, HNRNPE2 und HNRNPM eingegangen. 72h nach der Transfektion wurden 10 µg Gesamtprotein mit Hilfe der Western Blot-Methode analysiert. HNRNPQ konnte bis auf 29 % reduziert werden (Abb. 3.18). Jedoch zeigt der HNRNPQ *knockdown* weder einen Einfluss auf die Gesamtmenge an ACTB-Protein /mRNA noch einen Einfluss auf die Gesamtmenge von MYC. Die Ergebnisse der RT-PCR konnten ebenfalls keine Veränderungen des ACTB- bzw. MYC-Gehaltes aufweisen. Offenbar hat HNRNPQ keine ersichtlichen Auswirkungen auf die Regulation von ACTB und MYC obwohl es im *pulldown*-Experiment mit beiden RNAs interagiert. Vorherige Arbeiten von Doreen Weidensdorfer in U2OS-Zellen zeigten, dass die Reduktion von HNRNPQ zu einer Verringerung des MYC Proteingehaltes in den U2OS-Zellen führt (Weidensdorfer et al., 2009). Demnach sei HNRNPQ involviert in die stabilitätsabhängige Kontrolle der MYC-Expression. Anscheinend liefert die Durchführung der *knockdown*-Experimente von HNRNPQ in unterschiedlichen Zelllinien unterschiedliche Ergebnisse. Ein gutes Beispiel dafür ist ebenso in Müller et al., 2018a beschrieben. Dabei zeigt die Reduktion von IGF2BP3 in den Ovarialkarzinomzellen ES-2 keine Veränderungen, während in den Lungenkarzinomzellen A549 ein deutlicher phänotypischer Effekt durch den IGF2BP3-*knockdown* erzielt werden konnte, der mit einer deutlichen Veränderung der Genexpression einhergeht. Demnach scheint es, dass RBPs die Genexpression je nach Tumorkontext unterschiedlich regulieren können. Mögliche Ursachen können RBP- Abundanzen, unterschiedliche Expression von Kofaktoren wie z. B. assoziierte Proteine oder nicht-kodierende RNAs sein.

## Ergebnisse

### A



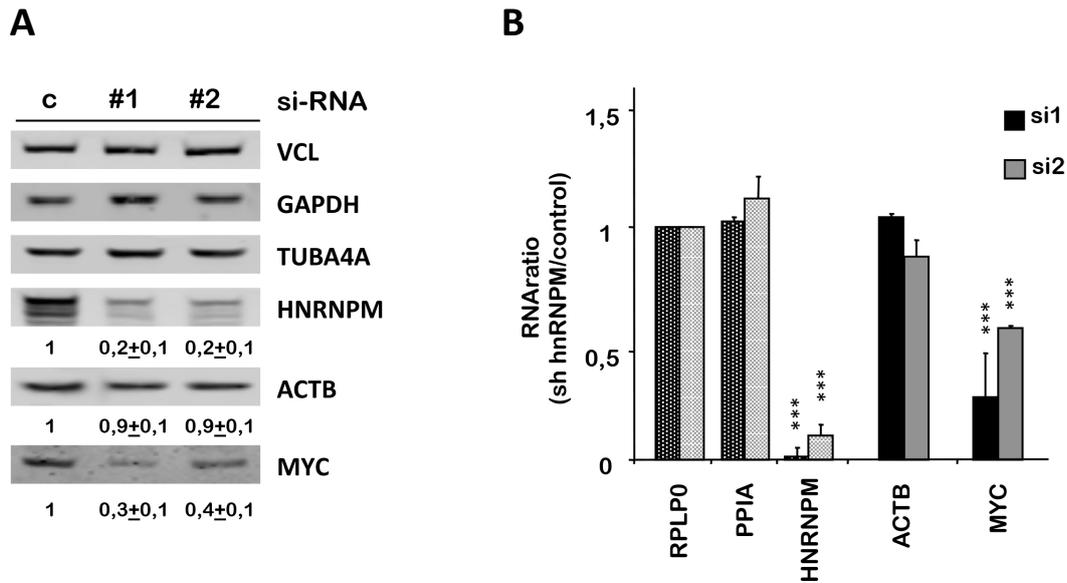
### B



**Abbildung 3.18 Knockdown-Analysen von HNRNPQ mittels RNAi:** HEK293A-Zellen wurden mit spezifischen HNRNPQ-siRNAs (#1 und #2) einschließlich einer Kontroll-siRNA (c) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde aus einem Teil der Zellen Proteinextrakt hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert (A). Vinculin (VCL), Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Tubulin (TUBA4A) dienen als Normalisierung. (B) Aus dem zweiten Teil wurde Gesamt-RNA isoliert, mittels qRT-PCR analysiert und quantifiziert. Zur Normalisierung wurden Cyclophilin A (PPIA) und RPLP0 herangezogen. Es konnten keine Regulation von ACTB oder MYC durch HNRNPQ nachgewiesen werden. Die Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen  $n > 3$  unabhängigen Experimenten.

Die Ergebnisse des HNRNPM-knockdowns zeigen, dass eine Reduktion des HNRNPM-Proteingehalts von 76 % keinen Einfluss auf die ACTB-Protein/mRNA Gesamtmenge ausübt. Es konnte jedoch die MYC-mRNA reduziert werden (siehe Abb. 3.19 B), welche eine deutliche Reduktion der MYC-Expression auf bis zu 27 % zur Folge hatte (siehe Abb. 3.19 A). Obwohl die *pulldown*-Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe der ACTB-3'UTR weitaus mehr HNRNPM isoliert werden konnte als mit der MYC-3'UTR, scheint HNRNPM keine Rolle in der Translationskontrolle von ACTB zu spielen. Es scheint jedoch einen Einfluss auf die Stabilitätskontrolle von MYC einzunehmen, was bislang noch nicht in der Literatur beschrieben ist.

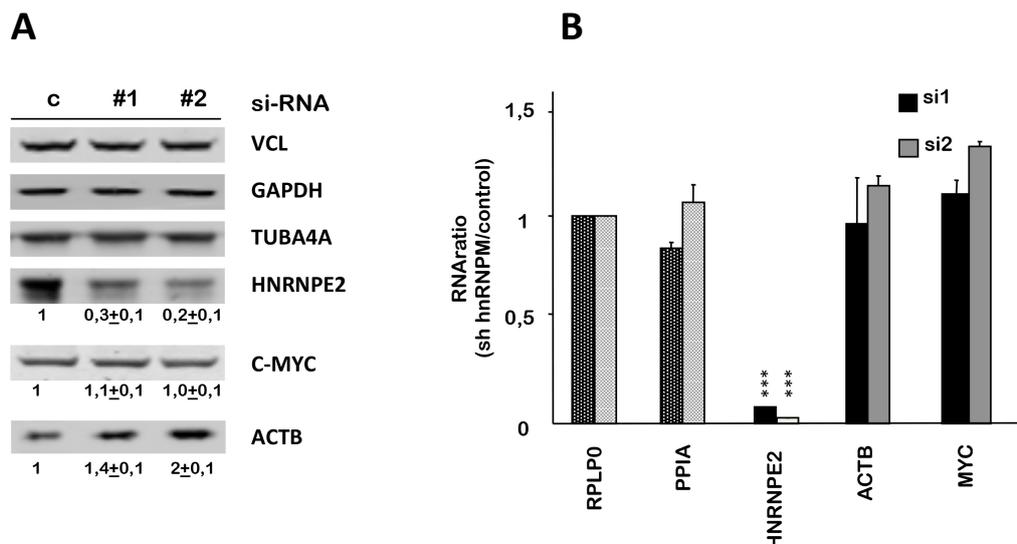
## Ergebnisse



**Abbildung 3.19 Knockdown-Analysen von HNRNPM mittels RNAi:** HEK293A-Zellen wurden mit spezifischen HNRNPM-siRNAs (#1 und #2) einschließlich einer Kontroll-siRNA (c) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde aus einem Teil der Zellen Proteinextrakt hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert (**A**). Vinculin (VCL), Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Tubulin (TUBA4A) dienen als Normalisierung. (**B**) Aus dem zweiten Teil wurde Gesamt-RNA isoliert, mittels qRT-PCR analysiert und quantifiziert. Zur Normalisierung wurden Cyclophilin A (PPIA) und RPLP0 herangezogen. Es konnte eine Stabilitätsregulation von MYC mittels HNRNPM-*knockdown* detektiert werden. Die Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen  $n > 3$  unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch Student's T-Test berechnet:  $***p < 0,005$ .

Die HNRNPE2 Untersuchungen zeigen, dass eine HNRNPE2 Reduktion von rund 80 % eine Verdopplung des zellulären ACTB-Proteinlevels mit sich führt. Die ACTB-mRNA bleibt unverändert nach dem HNRNPE2-*knockdown*, was somit auf eine Translationsinhibierung weist. Der Literatur kann man entnehmen, dass HNRNPE2 in die *internal ribosomal entry site* (IRES) vermittelte Translation von MYC in der 5'UTR involviert ist und somit einen Einfluss auf die Translation der MYC-mRNA nimmt (Evans et al., 2003). Es wird beschrieben, dass durch das Fehlen von HNRNPE2 die MYC-Expression reprimiert ist. Dieser Effekt konnte in dieser Arbeit nicht validiert werden. In Weidensdorfer et al., 2009 konnte ebenso durch den HNRNPE2 *knockdown* in U2OS Zellen kein Effekt auf MYC-Protein- oder mRNA-Level nachgewiesen werden.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.20 Knockdown-Analysen von HNRNPE2 mittels RNAi:** HEK293A-Zellen wurden mit spezifischen HNRNPE2-siRNAs (#1 und #2) einschließlich einer Kontroll-siRNA (c) transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde aus einem Teil der Zellen Proteinextrakt hergestellt, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert **(A)**. Vinculin (VCL), Glycerin-3-phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Tubulin (TUBA4A) dienen als Normalisierung. **(B)** Aus dem zweiten Teil wurde Gesamt-RNA isoliert, mittels qRT-PCR analysiert und quantifiziert. Zur Normalisierung wurden Cyclophilin A (PPIA) und RPLP0 herangezogen. Es konnte eine Translationsinhibierung der ACTB-mRNA mittels HNRNPE2-knockdown detektiert werden. Die Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen n>3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch Student's T-Test berechnet: \*\*\*\* $p < 0,005$ .

### 3.3.2 Einfluss von HNRNPE2 auf die Translationseffizienz von ACTB

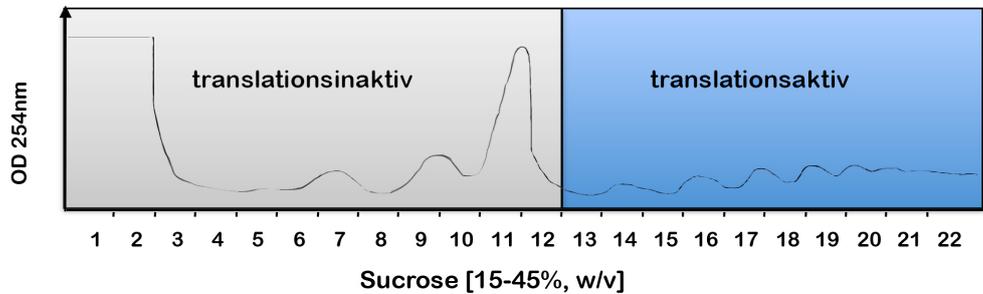
Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass HNRNPQ und HNRNPM keinen Einfluss auf die Translation von ACTB ausüben, im Gegensatz zu HNRNPE2. Um diesen Effekt zu untermauern, wurde im Folgenden die Polysomgradienten-Analyse durchgeführt.

Bei dieser Methode wird die Translationseffizienz einer mRNA bestimmt. Die Translationseffizienz wirkt hauptsächlich über die Translationsinitiation, also über eine verstärkte oder verminderte Rekrutierung von Ribosomen an die mRNA. Der Besetzungsgrad einer mRNA mit Ribosomen spiegelt dabei die Translationseffizienz für diese mRNA wieder. Die mRNAs im Zytoplasma von Zellen befinden sich hauptsächlich in zwei funktionellen Einheiten, den translationsaktiven Polysomen und den überwiegend translationsinaktiven mRNPs. Beide Fraktionen lassen sich sehr gut durch Ultrazentrifugation in einem Sucrosegradienten voneinander trennen. Anhand des UV-Profiles bei 254 nm kann man die Verteilung der RNA den Polysomen, sowie den mRNP-Komplexen zuordnen. Die Verteilung einer spezifischen mRNA innerhalb des Gradienten lässt Rückschlüsse auf den Translationsstatus zu. In Abb. 3.21 A ist das Sedimentationsverhalten der ACTB-mRNA im 15–45 % (w/v) Sucroседигredienten dargestellt. Für die Polysomgradientenanalysen werden die translationsaktiven Fraktionen von den inaktiven Fraktionen getrennt, zu denen der monosomale

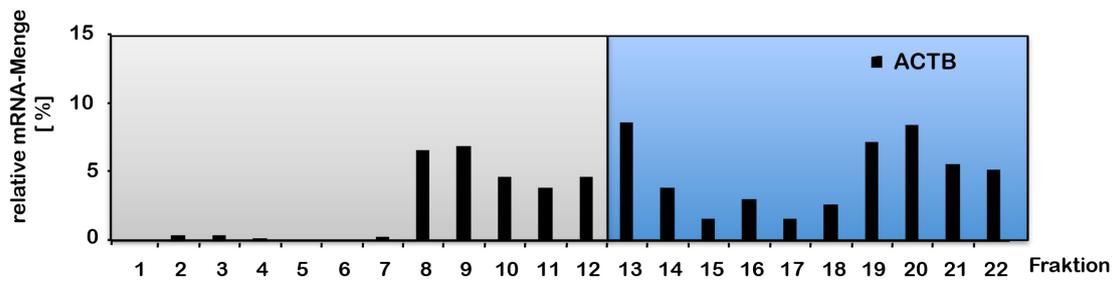
## Ergebnisse

80S-peak gehört. Die Normalverteilung der ACTB-mRNA in den Polysomenanalysen dieser Arbeit weist ca. 60 % in den polysomalen Fraktionen auf und ca. 40 % im translationsinaktiven Bereich (Abb. 3.21 B).

**A**



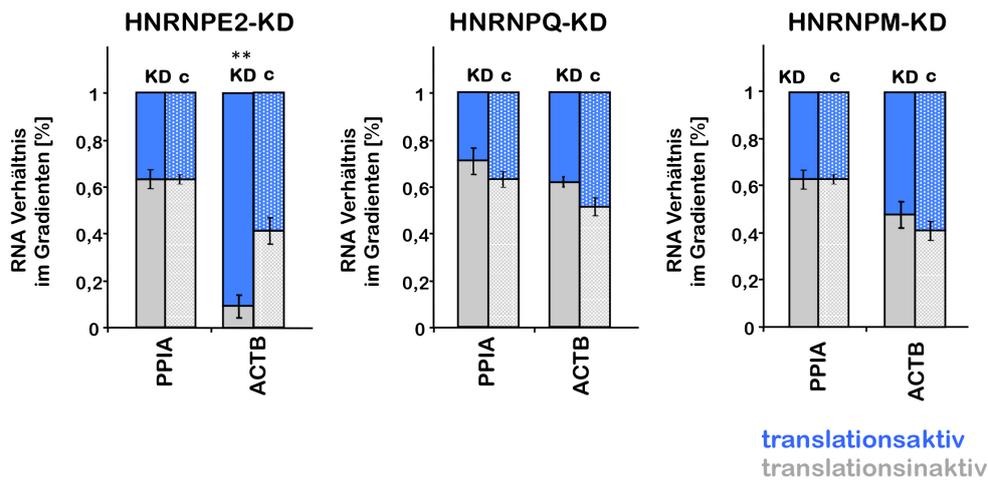
**B**



**Abbildung 3.21: Sedimentationsprofil der ACTB- und MYC-mRNA im 15–45%igem Sucroседichtegradienten.** Das HEK293A- Zellextrakt wurde auf einen kontinuierlichen (15–45 %, w/v) Sucroседichtegradienten geladen und bei 285.000 xg für 2,5 h zentrifugiert. Die Fraktionen wurden mit einem Gradientenfraktionierer abgenommen. **(A)** Das Absorptionsprofil wurde bei 254 nm gemessen. **(B)** Analyse der ACTB- und MYC-mRNA mittels qRT-PCR.

Für die Analyse von HNRNPQ-, HNRNPM-, HNRNPE2-depletierten Zellen wurde siRNA- behandeltes HEK293A-Zelllysate auf einen kontinuierlichen 15–45%igen Sucroседichtegradienten geladen und durch Ultrazentrifugation bei 285.000 xg für 2,5 h aufgetrennt. Anschließend wurde der Gradient in einen translationsaktiven und translationsinaktiven Bereich aufgeteilt und mittels RT-PCR die ACTB- und MYC-mRNA untersucht. Als Kontrolle zur Normierung wurde ein nicht reguliertes endogenes Referenzmolekül (hier Cyclophilin-A (PPIA)) verwendet. Die Ergebnisse dieser Analyse zeigen, dass es weder bei HNRNPQ- noch bei HNRNPM-depletierten Zellen zu einer Verschiebung und einem damit verbundenen Einfluss auf die Translationsinitiation der ACTB- oder MYC mRNA kommt (Abb. 3.22). Die Depletion von HNRNPE2 führt dagegen zu einer verstärkten Rekrutierung von Ribosomen an die ACTB-mRNA, was sich durch eine Verschiebung der ACTB-mRNA in die Polysomenfraktion kennzeichnet.

## Ergebnisse



**Abbildung 3.22 ACTB- und MYC-mRNA Verteilung in translationsaktive und translationsinaktive Bereiche in RBP-depletierten HEK293A-Zellen:** HEK293A-Zellen wurden mit der entsprechenden siRNA transfiziert. 72 h nach der Transfektion wurde das Zelllysat im 15–45 % (w/v) Sucrosedichtegradienten bei 285.000 xg für 2,5 h aufgetrennt. Die Gesamt-RNA wurde aus dem translationsaktiven (blau) und translationsinaktiven Bereich (grau) isoliert, mittels qRT-PCR analysiert und quantifiziert. Die Abbildungen zeigen die ACTB- und MYC-mRNA Verteilung in den RBP-depletierten Zellen (KD) und in den siRNA-Kontrollzellen (c). Cyclophilin-A (PPIA) stellt hier ein endogenes Referenzmolekül dar. HNRNPE2 KD führt zu einer verstärkten Rekrutierung von Ribosomen an die ACTB-mRNA, was auf eine Funktion von HNRNPE2 im Translationszyklus von ACTB hindeutet. Die Standardabweichungen bezeichnen die Varianz zwischen 3 unabhängigen Experimenten. Die statistische Signifikanz wurde durch Student's T-Test berechnet:

Insgesamt zeigen die Experimente, dass die Translation der ACTB-mRNA weder von HNRNPQ noch HNRNPM beeinflusst wird. Im Gegensatz dazu führt der HNRNPE2-*knockdown* zu einer erheblichen Translationssteigerung der ACTB-mRNA, was darauf hinweist, dass HNRNPE2 wie IGF2BP1 als Translationsinhibitor von ACTB wirkt.

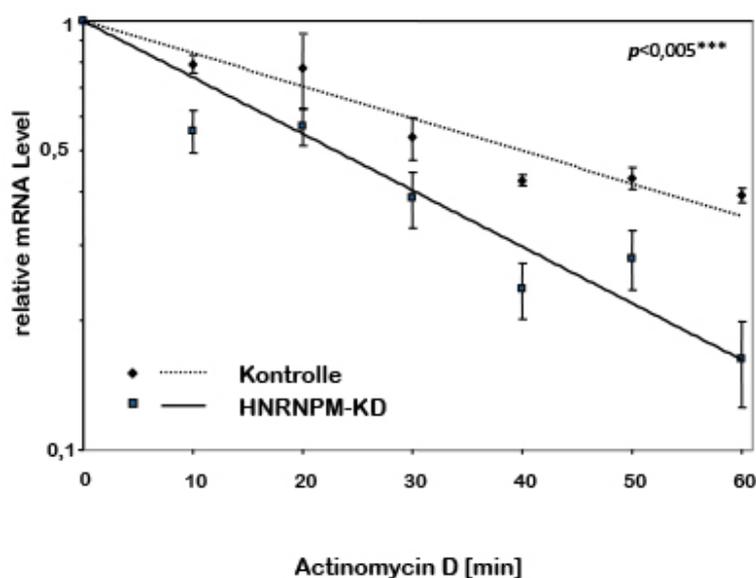
### 3.3.3 Stabilitätsregulation der MYC-mRNA durch HNRNPM

Das Protoonkogen MYC verfügt über einige seltene *codons* in der CRD des kodierenden Bereichs, die zu einem Absinken der Elongationsgeschwindigkeit bis hin zu einem Stoppen der Ribosomen führen (*ribosomal pausing*). Eine sich anschließende endonukleolytische Schnittstelle ist somit ohne Schutz und dem Angriff durch Endonukleasen ausgesetzt. Weidensdorfer et al., 2009 beschreibt, dass durch Assoziaten von RBPs in diesem Bereich, die MYC-mRNA vor einem endonukleolytischen Abbau geschützt und somit stabilisiert wird.

Wie im vorherigen Kapitel 3.3.1 gezeigt, weisen die *knockdown*-Analysen in Abschnitt 3.3.1 darauf hin, dass HNRNPM einen Einfluss auf die Stabilität der MYC-mRNA nehmen könnte. Um dies eingehend zu analysieren, wurden *decay*-Analysen durchgeführt. Um die Lebensdauer von mRNAs zu bestimmen, bedient man sich der Hilfe von Transkriptioninhibitoren wie Actinomycin D. Dieser

## Ergebnisse

Inhibitor lagert sich in die DNA und hemmt somit die Transkription. Unter diesen Bedingungen wird die messbare zelluläre RNA-Menge nur noch durch ihren Abbau beeinflusst. Über die Zeit kann dann die Abnahme der mRNA bestimmt und in unserem Fall ein Einfluss des HNRNPM-*knockdowns* auf die mRNA Stabilität untersucht werden. HNRNPM depletierte HEK293A-Zellen wurden hierzu mit Actinomycin D behandelt, in 10 min Abständen geerntet und die RNA präpariert. Anhand einer darauffolgenden qRT-PCR wurde der MYC-mRNA Gehalt bestimmt. Als Kontrolle zur Normierung wurde das nicht regulierte endogene Referenzmolekül Cyclophilin-A (PPIA) verwendet.



**Abbildung 3.23: Destabilisierung der MYC-mRNA in HNRNPM *knockdown* Zellen.** HEK293A-Zellen wurden mit HNRNPM spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. 72h nach der Transfektion wurde die Transkription durch Zugabe von Actinomycin D für die angegebenen Zeitpunkte inhibiert. Die Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels qRT-PCR analysiert, wobei Cyclophilin A als Normalisierungskontrolle diente. Die logarithmische Darstellung zeigt den Abbau der MYC-mRNA in der HNRNPM-*knockdown* (KD)- (durchgezogene Linie) sowie der Kontrollpopulation (gepunktete Linie). Die MYC-mRNA wurde nach dem HNRNPM-*knockdown* destabilisiert und zeigt eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit. (n=3)

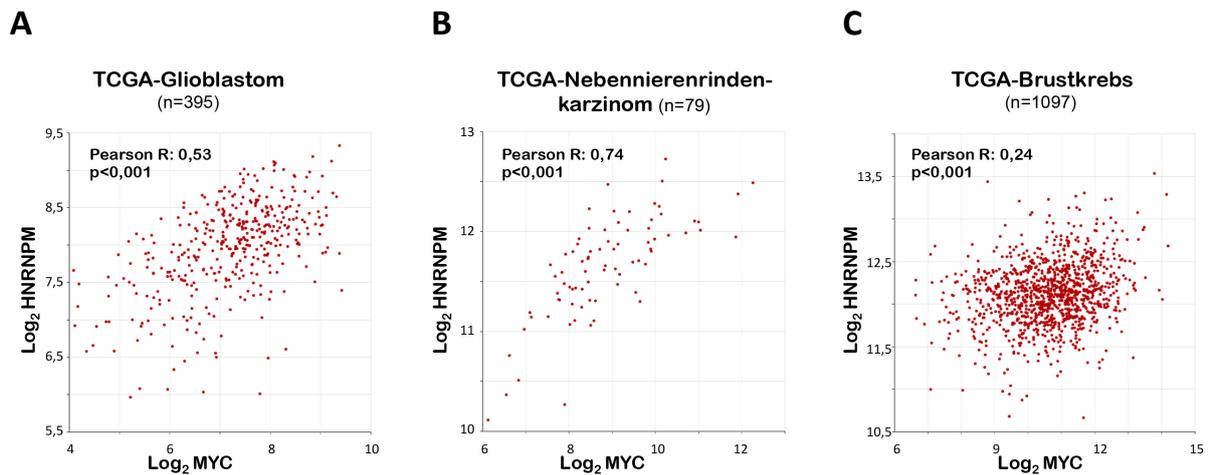
In Abb. 3.23 ist zu erkennen, dass durch die Reduktion von HNRNPM die Halbwertszeit der MYC-mRNA (ca. 41 min) auf einen Wert von  $\approx 22$  Minuten fällt. HNRNPM hat demzufolge einen Einfluss auf die Stabilität und somit auf die posttranskriptionelle Regulation der MYC-mRNA.

### 3.3.4 HNRNPM als putativer onkogener Faktor

Um zu untersuchen, inwieweit der in dieser Arbeit identifizierte Regulationsmechanismus von HNRNPM und der MYC-mRNA nicht nur *in cellulo* sondern auch *in vivo* in Tumorerkrankungen relevant ist, wurden die experimentellen Daten dieser Arbeit durch Datenbankanalysen erweitert. So wurde z. B. die Korrelation der Genexpression von HNRNPM und MYC über die R2-Plattform (<http://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) unter Verwendung der frei zugänglichen Datensätze der TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) Datenbank analysiert. Dieses Portal erlaubt die Erkenntnis auf mRNA-Ebene, wie sich die Expression zweier Gene zueinander verhält. Eine signifikante und

## Ergebnisse

positive Korrelation der mRNA-Expression von HNRNPM und dem onkogenen Faktor MYC konnte unter anderem im Glioblastom-Datensatz (GBM) (395 Tumorproben; Abb. 3.24 A), Nebennierenrindenzinon (*Adrenocortical carcinoma*-ACC) (79 Tumorproben; Abb. 3.24 B) und Brustkrebs (1079 Tumorproben; Abb. 3.24 C) identifiziert werden. Der positive Zusammenhang wird durch den Pearsonkoeffizienten angegeben.



**Abbildung 3.24 HNRNPM- und MYC-Genexpression korreliert im Krebsgewebe:** Dargestellt ist die mRNA-Expression des Zielgenes MYC und seines Regulatorproteins (der RNA-Seq-Datensätze der TCGA für Glioblastom, Nebennierenrindenzinon sowie Mammakarzinom). Die positiven Pearsonkorrelationskoeffizienten deuten auf eine Koexpression und putative sowie signifikante Abhängigkeit beider Gene voneinander hin.

Die Funktionsanalysen dieser Arbeit zusammen mit den Korrelationsanalysen lassen einen Zusammenhang zwischen HNRNPM und MYC im Tumor vermuten, der über eine Koexpression hinausgehen könnte. HNRNPM wird in der Literatur als essentieller Spleißfaktor beschrieben. In Xu et al., 2014 wird z. B. gezeigt, dass HNRNPM die Metastasierung von Brustkrebs fördert, indem es das alternative Spleißen aktiviert, welche für die Epitheliale-Mesenchymalen- Transition (EMT) notwendig ist. Jüngste Studien (Yang et al., 2018) beschreiben, dass HNRNPM in Brustkrebsgeweben und Zelllinien auf einem viel höheren Niveau exprimiert wird als in nicht-krebsartigen Geweben und Zelllinien. Außerdem wird dargestellt, dass überexprimiertes HNRNPM die Zellproliferation fördert, die Zellapoptose hemmt und unter anderem einen erhöhten Wert an MYC mit sich führt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde HNRNPM als Komponente von IGF2BP1-enthaltenen RNPs identifiziert. Datensatz-übergreifende Korrelationsstudien von IGF2BP1 und HNRNPM über die R2-Plattform zeigen, dass in 39 % der Tumore beide Gene koexprimiert werden (Tab. 3.3), was eine Ko-regulation der Zieltranskripte im gemeinsamen RNP z. B. in Tumoren des Hodens, der Leber, des Eierstocks und des Glioblastoms vermuten lassen könnte (Abb. 2.25). Im Glioblastom könnte MYC ein relevantes Zieltranskript dieser RNPs sein, da für IGF2BP1 vergleichbare Korrelationen mit dieser RNA

## Ergebnisse

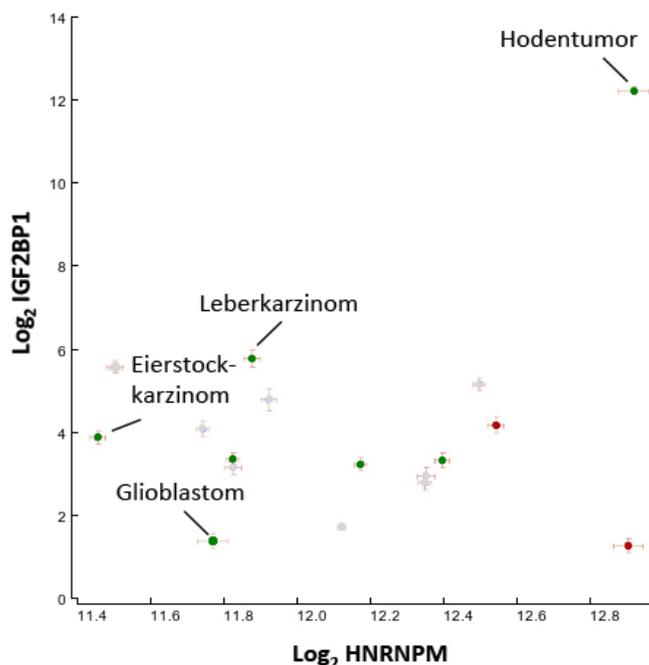
(Daten nicht gezeigt) identifiziert wurden, wie sie für HNRNPM in Abbildung 2.24 dargestellt sind. Zusammenfassend lassen die Korrelationsstudien den Schluss zu, dass die in dieser Arbeit identifizierten RNPs in verschiedenen Tumorentitäten tatsächlich von Bedeutung sein könnten.

**A**

**Abbildung 3.25: Korrelationsanalysen der IGF2BP1- und HNRNPM-Genexpression in unterschiedlichen Tumorentitäten.**

(A) Die Korrelationsanalysen wurden mittels der R2-Datenbank basierend auf RNA-Sequenzierungsstudien verschiedener TCGA-Datensätze durchgeführt. Das Diagramm präsentiert die signifikant positiven Korrelationen in Grün und die signifikant negativen Korrelationen in Rot. In Grau werden die nicht signifikanten Analysen dargestellt.

(B) Tabellenübersicht zum Diagramm A



**B**

Tumorentität	Probenanzahl	Pearson R
<i>Thymoma</i>	120	-0.265
<i>Cervical Squamous Cell Carcinoma</i>	305	-0.113
<i>Breast Invasive Carcinoma</i>	1097	-0.016
<i>Head Neck Squamous Cell Carcinoma</i>	520	-0.015
<i>Pancreatic adenocarcinoma</i>	178	-0.011
<i>Stomach adenocarcinoma</i>	415	0.001
<i>Colon Adenocarcinoma</i>	286	0.005
<i>Kidney Renal Papillary Cell Carcinoma</i>	290	0.009
<i>Kidney Renal Clear Cell Carcinoma</i>	533	0.014
<i>Sarcoma</i>	259	0.118
<i>Esophageal Carcinoma</i>	184	0.142
<i>Lung Adenocarcinoma</i>	515	0.147
<i>Bladder Urothelial Carcinoma</i>	408	0.170
<i>Skin Cutaneous Melanoma</i>	470	0.186
<i>Glioblastoma</i>	153	0.187
<i>Ovarian serous cystadenocarcinoma</i>	304	0.266
<i>Liver Hepatocellular Carcinoma</i>	371	0.328
<i>Testicular Germ Cell Tumors</i>	150	0.630

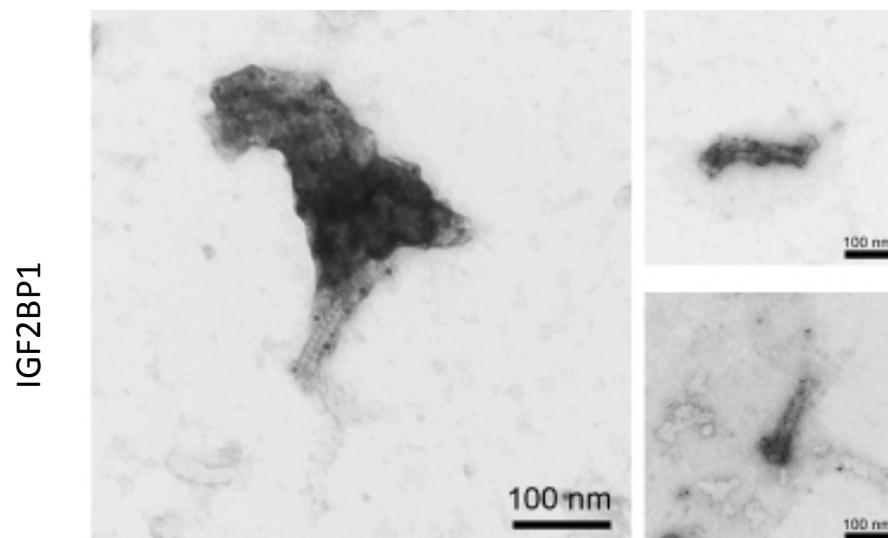
## Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit und der bereits publizierten Daten weisen darauf hin, dass HNRNPM die MYC-Expression in einigen Tumorgeweben zusammen mit IGF2BP1 im RNP und in einigen Tumorentitäten ohne IGF2BP1 fördert und als putativer Faktor bei der Krebsprogression wirkt. Um die Ergebnisse dieser Arbeit zu untermauern, müsste in zukünftigen Experimenten die Funktionsanalyse von HNRNPM in Tumorgeweben der Brust, dem Glioblastom oder dem Nebennierenrindenzinom durchgeführt werden.

### **3.4 Elektronenmikroskopie**

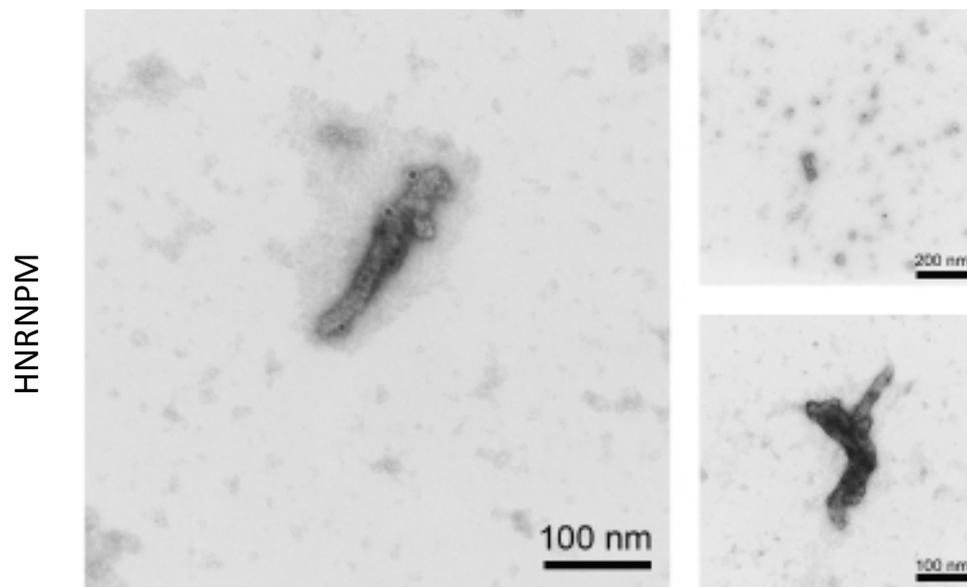
Nach der Isolierung und Charakterisierung IGF2BP1-enthaltender RNP-Komplexe, stellte sich die Frage, ob sich derartige Proteinkomplexe sichtbar machen lassen. Immunfluoreszenzanalysen lassen leider keine Aussagen über die Gestalt beobachteter Partikel zu. Elektronenmikroskopische Untersuchungen könnten diese Frage jedoch klären. Für die morphologische Charakterisierung der RNPs wurden daher – wie in Kapitel 2.2.3.5 beschrieben – die Eluate des ACTB 3'UTR-pulldowns von Dr. Dr. Gerd Hause und Simone Fraas präpariert und elektronenmikroskopisch abgebildet (siehe Abb. 3.26). Der dafür verwendete 3'UTR hat eine Länge von ca. 600 Basen. Bei visueller Betrachtung erkennt man Strukturen mit einer Länge von 100-200 nm. Diese Komplexe sind in ihrer Form mit einer Perlschnur zu vergleichen, bei der die Liganden dicht gepackt am nächsten sitzen. Mit Hilfe von kolloidalem Gold gekoppelten sekundären Antikörpern konnten HNRNPM und IGF2BP1 im Komplex dargestellt werden. Leider war es experimentell nicht möglich eine Doppel-Immungoldlokalisierung von HNRNPM und IGF2BP1 durchzuführen und eine eventuelle Kollokalisierung innerhalb eines RNPs zu verifizieren.

**A**



## Ergebnisse

**B**



**Abbildung 3.26: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von IGF2BP1 und HNRNPM im ACTB-3'UTR-RNP.**

Das Eluat vom ACTB-3'UTR-*pull-down* wurde auf Formvar-beschichtete Kupfer-Grids aufgetragen und mittels Transmissionslektronenmikroskop EM 900 (Carl Zeiss, Jena) mit einer Beschleunigungsspannung von 80kV analysiert. Der kolloidale Gold gekoppelte sekundäre Antikörper visualisiert IGF2BP1 (**A**) und HNRNPM (**B**) im Komplex.

Jonson und Kollegen analysierten 2007 Flag-IGF2BP1 gereinigte RNPs anhand von *atomic force microscopy* (AFM) (Jonson et al., 2007). Sie beschrieben die entdeckten Partikel als kugelförmig, welche einen Durchmesser zwischen 100–300 nm aufwiesen. Aufgrund des geschätzten Volumens gepaart mit Proteomanalysen wird angenommen, dass jeder RNP 10–30 mRNA-Transkripte enthält. Wenn man diese Daten mit den in dieser Arbeit erhaltenen elektronenmikroskopischen Studien vergleicht, kann man davon ausgehen, dass ein IGF2BP1 enthaltener Partikel in dem zwischen 10-30 Transkripte involviert sind, sehr dicht gepackt sein müssen, um einen Durchmesser zwischen 100-300 nm zu erhalten. Chao et al. 2010 beschrieb bereits, dass die Bindung von IGF2BP1 ein *looping* der mRNA induziert, welches auf eine dichte Verpackung der RNPs hindeuten könnte.

## Diskussion

In Eukaryoten liegt die mRNA nie isoliert, sondern immer von Proteinen gebunden als mRNP vor. Ein korrektes Zusammenspiel zwischen RNA und RNA-bindenden Proteinen ist dabei entscheidend für das Schicksal der mRNA, von der Transkription und Prozessierung, über den Transport bis hin zur Translation und dem RNA-Abbau (Glisovic et al., 2008; Keene, 2007).

Für die räumliche und zeitliche Regulation der Genexpression spielen RBPs daher eine entscheidende Rolle und der mRNP stellt dabei die funktionelle Einheit dar. Veränderungen oder Mutationen innerhalb eines RBPs oder des Bindungsmotivs im Zieltranskript können die zellulären Prozesse deregulieren, was letztlich zu verschiedensten Krankheitsbildern führen kann (Lukong et al., 2008).

Jüngste Methoden wie *next generation sequencing* (NGS) (u. a. CLIP- und RIP-seq) sowie die Protein-Massenspektrometrie erleichtern die Identifizierung von RBPs, ihren Protein-Kofaktoren und ihren Zieltranskripten. Trotz der wachsenden Datenmenge über die Funktion von RBPs bleiben jedoch viele Fragen offen: i) welche Proteine mit einzelnen mRNAs assoziieren; ii) welche Bedeutung diese Assoziationen für die Kontrolle der Genexpression haben; iii) inwieweit sich die Proteinzusammensetzung während der mRNA Lebensdauer ändert; oder iv) welche Funktion den einzelnen RBPs zugeordnet werden kann und ob diese Funktion durch das Zusammenspiel mit anderen RBPs beeinflusst wird.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht eine Aufreinigungsstrategie zu entwickeln, welche die Proteinzusammensetzung von RNPs aufklärt. Zu diesem Zweck wurden RNPs über zwei unterschiedliche Ansätze (Immunpräzipitation und RNA-pulldown) gereinigt und mit Hilfe der Massenspektrometrie analysiert. Beide experimentellen Ansätze erlaubten die Detektion einer Vielzahl von unterschiedlichen Proteinen, welche unter anderem als transkriptspezifisch identifiziert werden konnten. Anschließende Immunfluoreszenzanalysen, *cross-linking* Immunpräzipitationen mit *in-vitro*-transkribierter RNA, Gradientenuntersuchungen sowie Depletionsexperimente dienten der Validierung der Massenspektrometriedaten sowie der funktionellen Charakterisierung der identifizierten Interaktionspartner. Außerdem konnten RNPs mittels Elektronenmikroskopie visualisiert werden. Anzumerken ist, dass der praktische Teil dieser Dissertation vor mehr als fünf Jahren abgeschlossen wurde. Entsprechend fehlen dieser Arbeit *state-of-the-art*-Experimente wie *next generation sequencing* (NGS) oder Deletionsanalysen mittels CRISPR/CAS9, da diese Techniken erst zum Ende des praktischen Teils dieser Arbeit in der Arbeitsgruppe etabliert worden sind. Hervorzuheben ist jedoch an dieser Stelle auch, dass zur Identifizierung der Komposition IGF2BP1-enthaltender mRNPs erstmalig Bindungselemente aus IGF2BP1-Zieltranskripten zur Reinigung verwendet wurden und darüber hinaus eine Tandemreinigungsstrategie in dieser Arbeit etabliert wurde. Vorangegangene Studien beruhten allesamt auf Immunpräzipitationsansätzen mit IGF2BP1-

## Diskussion

überexprimierendem Zellmaterial (Jonson et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2009; Wächter et al., 2013).

Die Proteinverteilung von überexprimiertem Flag-chIGF2BP1 (=ZBP1; *chicken ortholog* zum IGF2BP1) im Vergleich zum endogenen zeigt jedoch eine deutliche Verlagerung im Sucrosedichtegradienten zu den leichteren Fraktionen in HEK293A-Zellen (Abb. 3.11 A). Durch das veränderte Sedimentationsverhalten von exogenem IGF2BP1 wurden die Verteilung anderer Proteine im Gradienten beeinträchtigt, wie z. B. HNRNPM, welches in die translationsinaktiven Fraktionen verschoben wurde. HEK293 Zellen exprimieren bereits sehr hohe endogene Mengen an IGF2BP1. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass das System möglicherweise gesättigt ist und das exogene Protein aufgrund dessen alternative Bindungen eingeht, deren physiologische Relevanz nicht gesichert ist. Zum anderen scheint dies nicht nur IGF2BP1 selbst sondern auch Bindungspartner in ihrem Verhalten zu beeinflussen, was weiterreichende Folgen für die RNP-Komposition und den gesamten Zellkontexts haben kann. Daher ist die hier vorwiegend verwendete Methode des RNA-*pulldowns* eine wichtige Alternative zur Validierung der mittels Flag-IGF2BP1 generierten Daten, da sie ohne Überexpression auskommt und stattdessen auf physiologisch vorliegende Proteine beruht. Ein Beispiel, dass mittels Flag-IGF2BP1 potentiell falsch positive Liganden isoliert wurden, zeigt die Anreicherung von Komponenten des RISC-Komplexes in den Analysen von Frau Dr. Wächter. Dies wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt, was im Einklang mit jüngeren Studien steht, welche für IGF2BP1 postulieren, dass es seine Ziel-mRNAs zusammen mit anderen RBPs in RISC-freien mRNPs vor einem miRNA-vermittelten Abbau schützt (Müller et al., 2018a,b; Busch et al., 2016). In Busch et al., 2016 wurde das Sedimentationsverhalten in einem 5–25%igen Sucrosedichtegradienten der RISC-Komponenten analysiert. Ago2 z. B. sedimentiert in den ersten leichten Fraktionen und am Ende des Gradienten der ribosomalen Fraktionen. Es wäre möglich, dass die Assoziation der RISC-Komponenten mit IGF2BP1 in überexprimierenden Flag-chIGF2BP1-Zellen dem veränderten Sedimentationsverhalten von IGF2BP1 und dem daraus resultierenden veränderten Zellkontexts zugrunde liegt.

Aufgrund dieser Tatsache war es wichtig physiologische Mengen der Proteine zur Etablierung des *pulldowns* zu verwenden und eine Reinigungsstrategie zu entwickeln, die für eine massenspektrometische Auswertung genügend Probenmaterial anreichert, um die Zusammensetzung von mRNPs zu identifizieren. Die Daten in dieser Arbeit stellen daher eine Alternative dar, die neue und transkriptspezifische Einblicke gewährt.

#### **4.1 RBPs verpacken die gebundenen Transkripte in kompakte RNPs**

Über die Struktur der mRNPs ist bisher nur sehr wenig bekannt. Viele Kenntnisse stammen aus Studien des Balbiani-Rings (BR), die mit Hilfe der Elektronenmikroskopie in den Speicheldrüsen von Zuckermückenlarven betrachtet wurden. Die großen BR-Gene kodieren für sekretorische Proteine. Die Studien zeigen, dass begleitend zur Transkription Proteine an das wachsende RNA-Molekül binden und eine lose gewundene dünne RNP-Fibrille gebildet wird, was die Annahme des *remodelings* von RNPs untermauert. Anschließend wird diese Fibrille fest verpackt und nach und nach zu einem Ring gebogen. Die fertige Struktur hat einen Durchmesser von 50 nm und wird in das Nukleoplasma freigesetzt. Beim Durchgang durch die Kernpore in das Zytoplasma hinein entfaltet es sich und gewinnt seine längliche Form wieder (Daneholt, 1997; Daneholt, 2001).

Vorliegende elektronenmikroskopische Studien von Gallagher et al., 2017 über virale RNPs zeigen ebenfalls Ring- als auch Filamentstrukturen. Diese strukturelle Flexibilität ist für die verschiedenen Funktionen im viralen Replikationszyklus erforderlich. Die RNP-Struktur in Filamenten kann dabei sowohl aus schraubenförmigen Windungen als auch aus gestapelten Ringen von Proteinen bestehen. Jonson und Kollegen beschrieben Flag-IGF2BP1 gereinigte RNPs anhand von *atomic force microscopy* (AFM) als kugelförmige Struktur, welches eine glatte Oberfläche und einen Durchmesser zwischen 100–300 nm aufweist. Aufgrund des geschätzten Volumens der Partikel, gepaart mit Proteomanalysen, wird postuliert, dass jeder Partikel 10–30 mRNA-Transkripte enthält. Die Tatsache, dass IGF2BP1 mit ca. 300 verschiedenen Transkripten assoziieren soll, gibt Grund zur Annahme, dass IGF2BP1-enthaltene RNPs sehr heterogen in ihrer Zusammensetzung sind (Jonson et al., 2007).

Wir konnten in dieser Arbeit RNPs mittels *in-vitro*-transkribierter RNA rekonstituieren und als längliche Struktur mit dem Elektronenmikroskop bildlich darstellen. Die dafür verwendete 3'UTR der ACTB-mRNA hatte eine Länge von ca. 600 Basen. Verglichen mit den Daten in Skabkin et al., 2004, welche postulieren, dass ein assoziierter 2 kb langer RNA-Strang ca. 600 nm lang und 1,5 nm breit ist, müssten die Komplexe in unseren Analysen ca. 180 nm in ihrer Länge messen. Anhand der Abb. 3.25 kann man erkennen, dass die isolierten RNPs in dieser Arbeit eine Länge von 100–200 nm aufweisen und sich damit gut mit den Ergebnissen der Daten von Skabkin et al., 2004 decken. Während in einigen vorhergehenden Arbeiten die Komplexe meist nur als längliche oder ringförmige Strukturen beschrieben wurden (Daneholt, 1997; Batische et al., 2009), zeigten die EM-Analysen in dieser Arbeit ein detaillierteres Bild der Ligandenanordnung, jeder sitzt dicht gepackt am nächsten und sogleichen sie einer Perlenschnur. Durch diese lückenlose Besetzung scheint die mRNA gut geschützt vor z. B. miRNA-vermittelter Destabilisierung vorzuliegen. Mit Hilfe von sekundären Antikörpermarkierungen via kolloidalem Gold konnte IGF2BP1 im aufgereinigten Komplex nachgewiesen werden. Man kann erkennen, dass IGF2BP1 an verschiedenen Positionen im RNP sitzt.

## Diskussion

Wenn man die Daten in Jonson et al., 2007 mit den in dieser Arbeit erhaltenden Ergebnissen vergleicht, kann man davon ausgehen, dass ein IGF2BP1 enthaltener RNP, in dem zwischen 10–30 Transkripte involviert sind, sehr dicht gepackt sein muss, um einen Durchmesser zwischen 100–300 nm zu erhalten. In Matsumoto et al., 2003 werden *in-vitro*-rekonstituierte mRNPs mittels EM analysiert, indem ein rekombinant hergestelltes RBP mit *in-vitro*-transkribierter mRNA gemischt wird. Die Analysen zeigen, dass bei der Komplexbildung die RNA bis zu vierfach dichter gepackt sein kann im Vergleich zur freien RNA. Durch die Bindung der Liganden kommt es anscheinend zu einer Ausbildung von Sekundär- und Tertiärstrukturen der RNA.

In Chao et al., 2010 wurde bereits beschrieben, dass die Bindung von IGF2BP1 eine Konformationsänderung (*looping*) induziert, welche voneinander entferntere Sequenzen im Transkript verbinden kann und damit RNA-Bindungsstellen für weitere Faktoren gebildet werden.

Zusammenfassend könnte man durch die erhaltenen Ergebnisse davon ausgehen, dass ein Komplex aus IGF2BP1, seinen Kofaktoren und dem Zieltranskript möglicherweise primär eine längliche Struktur formt, welche dann übergeordnete globuläre Strukturen annehmen kann.

### **4.2 Komponenten und transkriptspezifische Proteinliganden IGF2BP1-enthaltender RNPs**

Wie bereits ausführlich in der Einleitung beschrieben, ist IGF2BP1 aufgrund seines onkofötalen Expressionsmusters ein interessantes Protein für die zielgerichtete Tumorthherapie und ist daher Gegenstand der Forschungsarbeiten unserer und einer Reihe weiterer Arbeitsgruppen. In den letzten Jahren gab es eine Vielzahl von Publikationen, die IGF2BP1 als onkogenen Faktor beschrieben haben, der das adhäsionsunabhängige Zellwachstum, die Tumorzellmotilität und Invasivität fördert und so zur Tumorprogression beiträgt (Müller et al., 2018 a,b; Busch et al., 2016; Hamilton et al., 2013; Stöhr et al., 2012; Zirkel et al., 2013). Gleichermaßen wurden in diesem Zusammenhang eine Vielzahl neuer Zieltranskripte veröffentlicht, die je nach Tumorkontext und Zelltyp variieren (Bell et al., 2013). IGF2BP1 wird in verschiedenen Tumorentitäten als prognostischer Marker beschrieben (Köbel et al., 2007, Müller et al., 2018a, Elcheva et al., 2008; Gutschner et al., 2014), könnte sich aber noch weit besser als Therapieziel eignen. Hierfür ist neben Expressionsstudien und zellphänotypischen Analysen auch ein besseres Verständnis der Funktionsweise des Proteins und seiner Komplexpартner wichtig. Der in dieser Arbeit gewählte Ansatz trägt zur substanziellen Validierung vorangegangener Interaktionsstudien aus einem alternativen Blickwinkel bei und identifiziert zugleich neue Regulationsmechanismen.

#### 4.2.1 Analyse der IGF2BP1-mRNP-Komposition und Identifizierung eines core-Komplexes

In der hier vorgelegten Arbeit wurden IGF2BP1-enthaltende mRNPs erfolgreich isoliert und deren molekulare Zusammensetzung analysiert. Die mRNAs von ACTB und MYC wurden hierfür im RNA-*pulldown*-Verfahren verwendet, da zu Beginn der Dissertation beide Transkripte, die mit am besten charakterisierten Ziel-mRNAs von IGF2BP1 darstellten. Während ACTB, vermittelt durch den *zipcode* in der 3'UTR, von IGF2BP1 translationsinhibiert wird, ist MYC durch die Bindung in der MYC-CRD der kodierenden Region vor einem endonukleolytischen Abbau der mRNA geschützt. Die Ergebnisse der massenspektrometrischen Analysen zeigten sowohl Übereinstimmungen als auch Unterschiede der assoziierten Proteinkomponenten, was darauf hindeutet, dass die Zusammensetzung der Komplexe z. T. transkriptspezifisch ist (Tab. 3.2).

Die Massenanalysen der *pulldown*-Experimente konnten einen großen Teil der identifizierten Proteine in den parallel durchgeführten Immunpräzipitationsstudien mittels exogenem chIGF2BP1 von Frau Dr. Kristin Wächter bestätigen (Tab. 3.2). Die Helikasen MOV10 und DHX9, diverse Vertreter der HNRNPs (A1, A2B1, A3, C, D, E2, G, I, K, M, R, U), die RBPs IGF2BP2+3, PABPC1, ELAVL1, NF90, NF45, Nucleolin und YBX1 konnten als Interaktoren von IGF2BP1 in beiden Methoden identifiziert werden.

Es stellte sich die Frage, ob mRNPs einen sogenannten *core*-Komplex (Kernkomplex), d.h. Komponenten enthalten, welche zu den Grundbestandteilen verschiedener RNPs gehören. Im EJC z. B. gehören der eukaryotische Initiationsfaktor eIF4AIII, Y14, Magoh und MLN51 zum *core*, welche in jedem EJC vertreten sind (Beckmann, 2016). Vergleicht man z. B. die Analysen dieser Arbeit mit ähnlichen Präzipitationsansätzen, kann man eine Art Kernkomplex erkennen. In Tsai et al., 2011 wurde z. B. die *Lymphoid enhancer-binding factor-1* (LEF1) mRNA ebenfalls mit 4 MS2 *loops* markiert. Frau Dr. Christiane Harnisch war es gelungen, den DICE-abhängigen (*differential control element*) Translation-Inhibitions-Komplex mit Hilfe des DICE in der 3'UTR der Retikulozyten-15-Lipoxygenase-mRNA zu reinigen. Sie benutzte dafür eine RNA-Affinitätschromatographie, welche auf *boxB*-RNA-*stem-loops* beruht (Quelle: Dissertation). Vergleicht man die Ergebnisse von Frau Dr. Harnisch und Tsai et al., 2011 mit den Massenanalysen in dieser Arbeit, könnte man davon ausgehen, dass Proteine wie HNRNPA1, -K, -Q, -U sowie DHX9 zu solch einem *core*-Komplex der mRNPs gehören.

So wird HNRNPA1 mit verschiedenen Krebsarten und Metastasen in Verbindung gebracht. Es weist eine dramatisch erhöhte Expression im Lungenkrebs auf und ist mit einer erhöhten Tumorpheriferation verbunden (Liu et al., 2016).

Für HNRNPK ist es nicht verwunderlich, dass es als *core*-Protein fungieren könnte, denn was HNRNPK von den anderen Proteinen unterscheidet, ist seine funktionale Vielseitigkeit. HNRNPK übernimmt mehrere nukleare und zytosolische Funktionen, einschließlich der Transkription (Stains et al., 2004),

## Diskussion

des Spleißens (Expert-Bezancon et al., 2002; Cao et al., 2012), des mRNA-*silencings* (Ostareck et al., 1997; Ostareck et al., 2001), der mRNA-Stabilität (Fukuda et al., 2009) und der Translation (Habelhah et al. 2001; Ostareck-Lederer et al., 2002). Dabei interagiert HNRNPK mit mehreren Proteinen über seine interaktive Region K (Bomsztyk et al., 2004), die eine intrinsisch ungeordnete Struktur aufweist. Darüber hinaus führt ein Mausmodel mit einem HNRNPK-*knockout* zu einem reduzierten Überleben und einer erhöhten Tumorbildung (Gallardo et al., 2015). Durch diese Vielseitigkeit könnte man annehmen, dass HNRNPK im Zentrum eines signifikanten Interaktionsnetzwerks der Zelle steht.

Als weitere eventuelle *core*-Komponente wurde HNRNPQ in dieser Arbeit näher untersucht. Es besteht aus drei verschiedenen Isoformen (Q1 = Isoform 3, Q2 = Isoform 2 und Q3 = Isoform 1). HNRNPQ1 wird als kernständiges Protein charakterisiert, während HNRNPQ2 und HNRNPQ3 im Zytoplasma lokalisieren (Svitkin et al., 2013; Mourelatos et al., 2001). Obwohl die genaue Funktion von HNRNPQ noch nicht vollständig verstanden ist, wird eine Rolle im alternativen Spleißen vermutet. Studien am Mausmodel zeigen eine Bindung von HNRNPQ2 innerhalb der Poly-A-Bereiche im Zieltranskript und eine damit verbundene Konkurrenz zum PABP (Geuens et al., 2016; Svitkin et al., 2013), welche auf eine mögliche neue Rolle für HNRNPQ hinweist. Frau Weidensdorfer in unserer Gruppe hat HNRNPQ als Bestandteil des CRD-vermittelten Komplexes beschrieben, der die Stabilität der MYC-mRNA fördert. In der hier vorliegenden Arbeit konnte mittels der Tandemaffinitätsreinigung HNRNPQ als Komponente von IGF2BP1-enthaltenen ACTB- und MYC-mRNPs nachgewiesen werden. Darüber hinaus assoziiert sogar nur eine Isoform mit IGF2BP1-enthaltenen Komplexen in der Tandemaffinitätsreinigung (Abb. 3.14), was auf unterschiedliche Funktionen der Isoformen hinweist.

HNRNPQ bindet zwar die ACTB-3'UTR, es konnte jedoch kein Effekt auf die ACTB-Expression nachgewiesen werden. Einige Veröffentlichungen beschreiben HNRNPQ in RNA-Transport-Komplexen (Kanai et al., 2004). Jedoch konnte keine Funktion von HNRNPQ während des mRNA-Transports in den Publikationen nachgewiesen werden. RNA-Transportprozesse sind in Zelltypen wie Neuronen oder polaren Zellen wie Oozyten von Bedeutung. In kompakten und wenig polaren HEK293A-Zellen sind sie allerdings weniger relevant und zudem schwieriger zu untersuchen. Inwiefern HNRNPQ ggf. am Transport der ACTB-mRNA und möglicherweise sogar an der lokalisierten Translation, wie sie für IGF2BP1 in primären Neuronen beschrieben ist (Hüttelmaier et al., 2005; Zhang et al., 2001; Bassel et al., 1998), beteiligt sein könnte, bleibt in dieser Arbeit offen und muss in anschließenden Studien untersucht werden.

Die in Weidensdorfer et al., 2009 beschriebene Stabilitätskontrolle der MYC-mRNA, vermittelt durch HNRNPQ, konnte in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass in den Durchführungen unterschiedliche Zellsysteme verwendet wurden, die anscheinend unterschiedliche Ergebnisse liefern. Eine Erklärung für die unterschiedlichen Effekte ist ebenso in

## Diskussion

Müller et al., 2018a beschrieben. Dabei zeigt die Reduktion von IGF2BP3 in den Ovarialkarzinomzellen ES-2 keine Veränderungen, während in den Lungenkarzinomzellen A549 ein deutlicher phänotypischer Effekt durch den IGF2BP3-*knockdown* erzielt werden konnte, der mit einer deutlichen Veränderung der Genexpression einhergeht. Anscheinend ist die Genexpression je nach Zellkontext unterschiedlich reguliert. Neben den Regulationspartnern selbst, spielt auch die Expression von z. B. miRNAs und anderen regulatorischen Faktoren eine wichtige Rolle. Es bleibt also herauszufinden, welche Funktionen HNRNPQ als *core*-Komplex-Protein ausübt.

HNRNPU und die Helikase DHX9 wurden ebenfalls als *core*-Komponenten identifiziert. In der Literatur werden sie jedoch als rein kernständige Proteine beschrieben (Zhang et al., 1999; Pinol-Roma & Dreyfuss, 1991). Die Lokalisationsstudien in dieser Arbeit konnten diese Daten validieren. Aufgrund dessen würde man nicht davon ausgehen, dass IGF2BP1 zusammen mit HNRNPU sowie DHX9 in einem zytoplasmatischen RNP agiert. In den Tandemaffinitätsreinigungen mit Gesamtzellextrakt wurden beide Proteine zusammen mit IGF2BP1 in ACTB- und MYC-vermittelten RNPs identifiziert (Abb. 3.14). Diese Daten weisen darauf hin, dass HNRNPU und DHX9 zusammen mit IGF2BP1 im Kern über die Ziel-mRNAs assoziieren. Obwohl IGF2BP1 als überwiegend zytoplasmatisches Protein beschrieben wird, gibt es Hinweise, dass die Bindung von IGF2BP1 mit seinen RNA-targets bereits während des laufenden Transkriptionsprozesses im Zellkern erfolgt. So zeigten Oleynikov und Singer, dass IGF2BP1 punktuell im Zellkern an vermeintlichen Transkriptionsstellen auftreten kann (Oleynikov & Singer, 2003; Hüttelmaier et al., 2005). Während des Transports ins Zytoplasma werden HNRNPU und DHX9 wahrscheinlich durch andere zytoplasmatische Proteine ersetzt. Dieser Austausch an Proteinliganden unterstützt ebenfalls die Annahme, dass sich RNPs auf dem Weg durch die Zelle einer Umstrukturierung (*remodeling*) unterziehen (Kress et al., 2004). Es wird angenommen, dass während des Transports in das Zytoplasma der RNP umgebaut wird und zusätzliche Transportfaktoren rekrutiert werden, die die zytoplasmatische Lokalisierung bestimmen.

In Weidensdorfer et al., 2009 wurden HNRNPU und DHX9 als Komplexpartner von IGF2BP1 während der CRD-vermittelten Stabilität der MYC-mRNA im Zytoplasma beschrieben. Dabei kam es zu einer signifikant verminderten MYC-Protein- und -mRNA-Menge infolge des HNRNPU- sowie DHX9-*knockdowns*. Der Lysispuffer in Weidensdorfer et al., 2009 beinhaltetete 0,5 % des Detergenzes NP40 was aufgrund des hohen Gehaltes auf ein Gesamtzellextrakt hinweist. Die Masterstudentin Katharina Klöditz z. B. benutzte unter meiner Anweisung für die Separation von Kern- und Zytoplasmaextrakt einen Lysispuffer mit 0,05 % NP40. In Abb. 3.16 kann man immer noch eine teilweise unvollständige Trennung erkennen, besonders für HNRNPU. Deshalb ist der identifizierte Effekt in Weidensdorfer et al., 2009 von HNRNPU und DHX9 vielleicht auf eine Funktion im Kern zurückzuführen.

Es besteht die Möglichkeit die mRNA vor einem Abbau im Zellkern zu schützen. Jedoch sind bis heute nicht genügend Daten über einen mRNA-Abbau im Zellkern humaner Zellen vorhanden. Die meisten

## Diskussion

Studien dazu wurden im Hefemodell analysiert (Makino et al., 2015). HNRNPU ist z. B. am alternativen Spleißen beteiligt (Vu et al., 2013). Laut der Datenbank NCBI gibt es zwei Isoformen der MYC-mRNA, welche durch alternatives Spleißen entstehen.

In Lee et al., 2016 wird beschrieben, dass eine Reduktion der kernständigen DHX9-Helikase zu einer Verringerung des proliferativen Effekts in mehreren humanen Krebszelllinien und im murinen Myc-abhängigen E $\mu$ -Myc-Lymphom führt. Jedoch wurde für die Beobachtungen noch kein Regulationsmechanismus identifiziert. Diese Ergebnisse und die DHX9-*knockdown*-Studien in Weidensdorfer et al., 2009, können vielleicht auf die RNA-Helikasefunktion zurückzuführen sein (Zhang & Grosse, 1994). DHX9 ist Mitglied der DEAD/H-Box-Helikasen und wahrscheinlich wie andere Mitglieder dieser Familie für den mRNA-Export durch die Kernporenkomplexe verantwortlich (Snay-Hodge et al., 1998). Beim RNA-Kernexport kommt es zu einer Umstrukturierungen bzw. RNA-Entwindung mit Hilfe der Helikasen. Es ist dadurch anzunehmen, dass ein Fehlen von DHX9 den mRNA-Kernexport, unter anderem der MYC-mRNA, beeinträchtigen würde.

Festzuhalten ist, dass HNRNPU und DHX9 in kernständigen Komplexen zum *core*-mRNP gehören können, aber nicht in zytoplasmatischen RNPs auftreten. Es wäre interessant zu analysieren, welche Funktionsmechanismen beide Proteine im *core* der nukleären Komplexe ausüben.

Weiterhin konnten HNRNPM, HNRNPE2, ELAVL1, PTBP1 und YBX1 über die Tandemaffinitätsreinigung den IGF2BP1 enthaltenen RNPs im Rahmen dieser Arbeit zugeordnet werden.

Die Assoziation von IGF2BP1 mit YBX1 bekräftigt die Aussage, dass sich IGF2BP1-RNPs in der sogenannten Pionier-Runde der Translation befinden. Für YBX1 ist beschrieben, dass es seine Ziel-mRNAs vor dem Abbau schützt (Evdokimova et al., 2001) und in translatorisch inaktive mRNPs verpackt. Frau Dr. Wächter konnte in ihren Analysen ebenfalls bestätigen, dass eIF4E und eIF4G nicht mit IGF2BP1 assoziieren. Stattdessen konnte sie das *cap binding protein 80* (CBP80), einige Komponenten des EJC und des *nonsense-mediated decays* (NMD) nachweisen. Diese Befunde bestätigen zusätzlich, dass IGF2BP1 enthaltene RNPs translatorisch inaktiv sind. Für die weitere Charakterisierung konnte YBX1 mittels Immunfluoreszenzanalysen als überwiegend zytoplasmatisches Protein charakterisiert werden welches mit IGF2BP1 kolokalisiert. Die *cross-linking* Studien in Kapitel 3.1.5 sowie die Tandemaffinitätsreinigung bestätigen die Bindung von ACTB- und MYC-mRNA in IGF2BP1-enthaltenen RNPs.

Interessant ist ebenfalls, dass in den *pulldown* Analysen Vertreter der Poly-A-bindenden Proteine (z. B. PABPC1+C4) nachgewiesen werden konnten, trotzdem die *pulldown*-Konstrukte über keinen Poly-A-Schwanz verfügen. Sowohl die mRNA von ACTB als auch von MYC enthalten einige adeninreiche Bereiche mit bis zu 6 As im kodierenden Bereich und der 3'UTR. Anscheinend erfüllen

## Diskussion

PABP ihre Funktion nicht immer durch den Poly-A-Schwanz. In Patel et al., 2005 wird beschrieben, dass PABP die Repression seiner eigenen mRNA durch die Bindung an adeninreiche Sequenzen innerhalb der 5'UTR vermittelt (Patel et al., 2005).

Weitere *in-vitro*-Experimente deuten darauf hin, dass die Translation der YBX1 mRNA durch die Bindung von PABPC1 an eine A-reiche Sequenz innerhalb der 3'UTR verstärkt wird (Skabkina et al., 2003). Man könnte also vermuten, dass PABP durch z. B. Bindung der MYC-mRNA zur Stabilität des Transkripts beitragen könnte. Man kann natürlich nicht ausschließen, dass es sich bei der Assoziation eventuell um ein experimentelles Artefakt handelt. Die *in-vitro*-transkribierte RNA liegt im *pulldown*-Verfahren in weitaus höherer Konzentration vor verglichen mit der endogenen Konzentration. Dieser RNA-Überschuss könnte zu falsch positiven Ergebnissen führen.

### **4.2.2 Identifizierung transkriptspezifischer neuer RBPs**

Neben den übereinstimmenden Ergebnissen der Immunpräzipitations- und *pulldown*-Studien konnten Liganden in den massenspektrometrischen Auswertungen des *pulldowns* identifiziert werden, die mit der Immunpräzipitation nicht angereichert werden konnten. Ein Grund dafür ist, dass der RNA-*pulldown* es möglich macht, Komplexe transkriptspezifisch zu reinigen, während bei der Immunpräzipitation verschiedene RNPs, welche auf unterschiedlichen mRNAs aufbauen, und daran assoziierten RBPs angereichert werden. Mit der Methode der Immunpräzipitation erhält man zwar einen Einblick über die unterschiedlichen Assoziationspartner des Zielproteins, aber man kann die Zusammensetzung zwischen den verschiedenen Komplexen nicht unterscheiden.

Mittels der Immunpräzipation konnte Frau Dr. Wächter zwar viel mehr Proteine detektieren, z. B. Spleiß-Faktoren wie U2AF2, PUF60, PRPF31, HNRNPH3, SFRS14, SRm300, SRSF1, zahlreiche DEAD/H box Helikasen, zytoskelettale Proteine wie CKAP5, IQGAP1, MYO1C, FLNC, TUBA3C, *cap* Bindeproteine, dennoch beschränkt sich die Anzahl an immobilisiertem Protein beim RNA-*pulldown*-Verfahren auf Proteine, die in direkter oder unmittelbarer Bindung zur *in-vitro*-transkribierten RNA stehen. Außerdem verfügten die Konstrukte des *pulldowns* weder über einen Poly-A-Schwanz, noch eine *cap*-Struktur oder Spleiß-Ereignisse. Dieser experimentelle Aufbau diente vorrangig dazu, RNP-Komponenten zu identifizieren, die eventuell in die Translationsrepression oder Stabilitätskontrolle der Zieltranskripte involviert sind. Die RBPs, welche im Spleißens involviert sind oder an der Erkennung der *cap*-Struktur beteiligt sind, sollten dabei keine Rolle spielen.

Die verbesserte transkriptspezifische Identifizierung der Proteine zeigt die Anreicherung von KHSRP und KIF11 mit dem ACTB-Konstrukt sowie die PKR mit dem ACTB- und MYC-Konstrukt in der Massenauswertung der *pulldown*-Analysen. Das KH-domain-containing splicing regulatory protein (KHSRP) stellt das humane Homolog zum *chicken* ZBP2 dar, welches die Bindung des ZBP1 an die

## Diskussion

ACTB-mRNA während der Transkription (Pan et al., 2007) erleichtert, was darauf hindeutet, dass KHSRP IGF2BP1 bei der ACTB-Bindung unterstützen könnte. Für KHSRP wurde ebenfalls beschrieben, dass es am mRNA-*trafficking* involviert ist (Kung et al., 2017). Es wäre möglich, dass KHSRP verantwortlich für die Bindung zwischen der RNA und dem Zytoskelett ist. Dabei könnte es eine entscheidende Rolle z. B. beim Transport der ACTB-mRNA spielen.

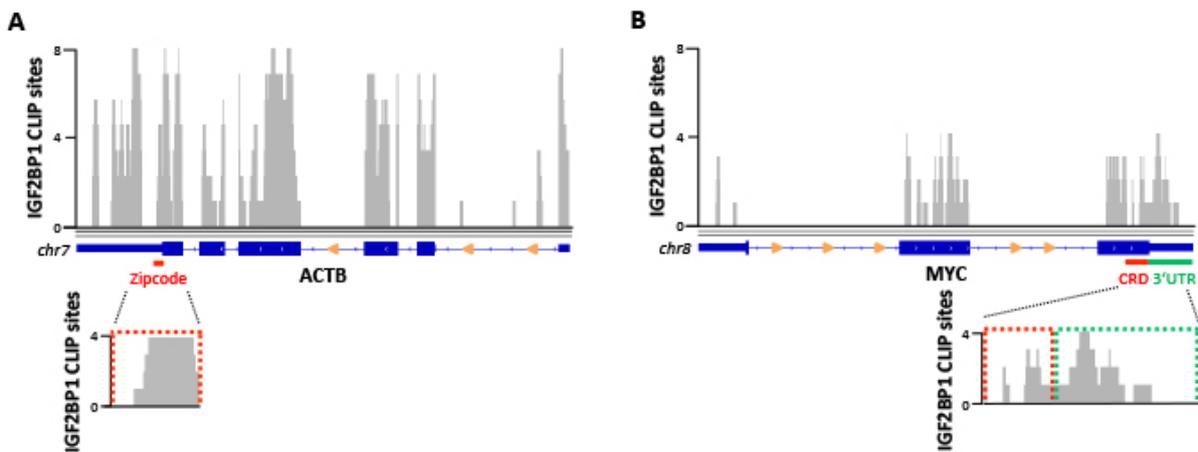
Das Motorprotein KIF11, welches zuvor laut Literatur noch nicht mit IGF2BP1 enthaltenen RNPs in Verbindung gebracht wurde, konnte anhand des ACTB-RNA-*pulldowns* in dieser Arbeit als spezifische RNP-Komponente identifiziert werden. Generell sind Interaktionen mit Motorproteinen sehr dynamisch und daher schwer zu identifizieren. Die Assoziation zwischen dem Motorprotein KIF11 und der ACTB-mRNA konnte sogar ein paar Jahre später in der Gruppe von Prof. Rob Singer durch Lokalisationsstudien bestätigt werden (Song et al., 2015). Dieses Ergebnis zeigt, wie spezifisch man mit dem RNA-*pulldown*-Verfahren Interaktoren identifizieren kann. In Song et al., 2015 ist außerdem beschrieben, dass die Fähigkeit von KIF11 die ACTB mRNA zu transportieren von IGF2BP1 abhängt. Die Interaktion von KIF11 mit IGF2BP1 trägt zum Transport von mRNAs bei, die Einfluss auf die Zellpolarität und -motilität haben und dadurch das invasive Wachstum und die Metastasierung von Tumoren beeinflussen können. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass ein gestörter Transport der ACTB-mRNA die Zellmigration und Invasivität verändert, beides Eigenschaften, die durch IGF2BP1 moduliert werden.

Ferner war es möglich, durch die *pulldown*-Analysen die Proteinkinase R (PKR) nachzuweisen, welche in den Massenanalysen von Frau Dr. Wächter nicht detektiert wurde. Die PKR wurde ursprünglich als eine Kinase identifiziert, die durch Heparin (Kim et al., 2014) oder durch virale, doppelstränge RNA (dsRNA) aktiviert wird und die Translation durch Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors EIF2A hemmt (Ehrenfeld & Hunt, 1971). PKR wurde seitdem intensiv auf seine Rolle als Translationsregulator bei Virusinfektionen untersucht (Kim et al., 2014). PKR phosphoryliert z. B. NF90, welches im Zuge dessen die Virusreplikation hemmt (Wen et al., 2014). NF90 wurde ebenfalls im *pulldown* identifiziert. Es wäre möglich, dass die PKR durch den Heparinanteil im Puffer aktiviert wurde und durch die Protein-Protein-Interaktion mit NF90 in den IGF2BP1 enthaltenen RNP gelangt. Neuere Erkenntnisse deuten sogar darauf hin, dass die physiologische Funktion der PKR über die antivirale Reaktion hinausgehen kann. Die PKR soll unter anderem in Prozesse der Zellproliferation sowie Zellzyklusprogression involviert sein, wobei der zugrundeliegende Mechanismus der PKR-Aktivierung und der Identität seiner *downstream targets* noch unbekannt ist (Kim et al., 2014). Es wäre möglich, dass die PKR im IGF2BP1-enthaltenen RNP z. B. mit NF90 interagiert und durch die enzymatische Aktivität Einfluss auf Prozesse z. B. der Zellproliferation nimmt. Schon anhand der Src-Phosphorylierung von IGF2BP1 konnte man erkennen, wie wichtig die Phosphorylierung einzelner Proteine für die Dynamik des RNPs ist (Hüttelmaier et al., 2005). Deshalb ist es interessant, dass die

PKR spezifisch in der Massenspektrometrie der *pulldowns* identifiziert wurde. Kürzlich wurde gezeigt, dass NF90 die Expression von MYC reguliert und die Zellproliferation fördert (Wu et al., 2018). Es kann daher spekuliert werden, dass NF90 zusammen mit IGF2BP1 im RNP vermittelt durch die MYC-mRNA Einfluss auf die Zellproliferation haben.

#### 4.2.3 Identifizierung cis-Element-spezifischer RNPs

Zur Validierung der Massenspektrometrie und Eingrenzung der Bindungsregionen innerhalb der mRNA wurden Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern durchgeführt. Hierfür wurden spezifische cis-Elemente der ACTB- bzw. MYC-mRNA verwendet anstelle der ACTB-5'UTR-CDS-3'UTR bzw. des MYC-CDS-3'UTR-Konstruktes verwendet (siehe Abb. 3.7), welche in die Translationsrepression oder Stabilitätskontrolle der Zieltranskripte involviert sind: i) ACTB-3'UTR-4MS2-loops; ii) MYC-CRD-4MS2-loops; iii) MYC-3'UTR-4MS2-loops und iv) ACTB-CDS(1-416)-4MS2-loops diente als Kontrolle. Eine IGF2BP1-Bindung zum MYC-3'UTR war bis dato noch nicht bekannt.



**Abbildung 3.27: CLIP-Studien für IGF2BP1 in der ACTB- und MYC-mRNA.** Die Anzahl der CLIP-sites (von 8 Experimente), bei denen IGF2BP1 mit der Ziel-mRNA assoziiert sind in der y-Achse dargestellt. Die Vergrößerungen zeigen die Anzahl der Clip sites von IGF2BP1 in den publizierten Bindungsstellen (rot) und der MYC-3'UTR (grün) der (A) ACTB- und (B) MYC-mRNA (Quelle: Encode).

Es wurde aber angenommen, dass IGF2BP1 ebenfalls über den 3'UTR die MYC-mRNA reguliert. Es konnte im Western Blot verifiziert werden (Abb. 3.8), dass IGF2BP1 die bekannten Erkennungsmotive der ACTB-3'UTR und MYC-CRD bindet sowie an den MYC-3'UTR assoziiert. Spätere CLIP-Untersuchungen weisen auf mögliche Bindungsstellen von IGF2BP1 innerhalb der MYC-3'UTR hin (Abb. 3.27) (Hafner et al., 2010; Conway et al., 2016; Van Nostrand et al., 2016).

Es stellte sich außerdem heraus, dass das mRNA-*shielding* der Zieltranskript-3'UTR zu den Hauptregulationsmechanismen von IGF2BP1 gehört, wie es unter anderem für die MITF-, SIRT1-,

## Diskussion

SRF-, LIN28B- und HMGA2-mRNAs postuliert wurde (Goswami et al., 2010; et al., 2009, Busch et al., 2016; Müller et al., 2018 a,b). Ein mRNA-*shielding*-Mechanismus für die MYC-3'UTR wurde bis heute durch IGF2BP1 noch nicht publiziert. In Braun et al., 2014 wird gezeigt, dass die miRNAs let-7-5p und miR-34-5p durch Bindung der 3'UTR die MYC-Expression regulieren. Wie in Busch et al., 2016 postuliert, schirmt IGF2BP1 die mRNAs von LIN28B- und HMGA2 vor dem let-7-miRNA-Angriff im 3'UTR ab. Diese Beobachtungen sind ein Indiz dafür, dass IGF2BP1 aufgrund der identifizierten 3'UTR-Bindung innerhalb der MYC-mRNA, neben der CRD-vermittelten Stabilität, MYC vor einem miRNA-Angriff im 3'UTR schützt. Die let-7 miRNA Familie, für die eine Bindungsstelle in der MYC-3'UTR identifiziert wurde, stellt damit einen der wichtigsten funktionellen Gegenspieler von IGF2BP1 auch bzgl. der MYC-Regulation dar.

Außerdem zeigen die *pulldown*-Ergebnisse am Beispiel von MYC (Abb. 3.8), dass die Bindung an die CRD im Bereich der kodierenden Region sehr spezifisch ist und weitaus mehr Proteine die MYC-mRNA über den 3'UTR binden. Dabei ist jedoch noch nicht beschrieben, welcher regulatorische Bereich einen stärkeren Einfluss auf die MYC-*turnover*-Rate hat. Das dürfte von unterschiedlichen Faktoren, wie beispielsweise dem Expressionslevel unterschiedlicher RBPs oder miRNAs abhängen.

Für ELAVL1 wurde in Weidensdorfer et al., 2009 beschrieben, dass es die MYC-mRNA-Stabilität über die 3'-UTR fördert. Neben der MYC-CRD im kodierenden Bereich wirken AREs in der 3'UTR destabilisierend. ELAVL1 bindet mit hoher Affinität an AUUUA-Motive und kann so in den ARE-vermittelten Abbau eingreifen (Antic & Keene, 1997). Konträre Hypothesen zum Regulationsmechanismus werden in Kim et al., 2009 postuliert. So wird vorgeschlagen, dass ELAVL1 durch die Rekrutierung des RISC-Komplexes die MYC-Expression inhibiert.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte ELAVL1 als Ligand von IGF2BP1 in ACTB-3'UTR und MYC-3'UTR-vermittelten RNPs identifiziert werden. Es konnte weder in Weidensdorfer et al., 2009 noch in den Studien dieser Arbeit eine Assoziation mit der MYC-CRD identifiziert werden, was als Nachweis dient, dass man Liganden spezifisch mit dem *pulldown*-Verfahren präzipitieren kann.

ELAVL1 wird in vielen Krebsarten überexprimiert und korreliert eng mit einer negativen Prognose der Patienten (Nabors et al., 2002; Durie et al., 2011; Denkert et al., 2004), wie es ebenfalls für IGF2BP1 postuliert wird (Boyerinas et al., 2012; Gu et al., 2004; Köbel et al., 2007). ELAVL1 fördert das Zellwachstum durch Stabilisierung vieler anti-apoptotischer Gene wie Sirtuin-1 (SIRT1), Prothymosin alpha (PTMA), *B-cell lymphoma 2* (BCL2) und *myeloid cell leukemia sequence 1* (MCL1) (Abdelmohsen et al., 2007; Lal et al., 2005). ELAVL1 wird außerdem als wichtiger Faktor bei der miRNA-vermittelten Regulation seiner Zieltranskripte beschrieben, bei der der mRNA-Umsatz (*turnover*) und die Translation entweder durch ELAVL1 gefördert oder beeinträchtigt wird (Skrikantan et al., 2012). Aufgrund des Vorkommens von ELAVL1 mit IGF2BP1 in einem RNP (Abb. 3.14) und der Tatsache, dass

## Diskussion

beide Proteine in die miRNA-vermittelte Regulation ihrer Ziel-mRNAs involviert sind, könnte man spekulieren, dass ELAVL1 und IGF2BP1 bei einer miRNA-vermittelten Regulation von MYC kooperieren oder entgegenwirken.

Weitere Proteine wie PTBP1 und HNRNPM konnten ebenfalls spezifisch mit dem ACTB-3'UTR- und dem MYC-3'UTR-Konstrukt präzipitiert (Abb. 3.13) und als Komponenten des IGF2BP1-RNPs identifiziert werden (Abb. 3.14). HNRNPM und PTBP1 sind in der Literatur als kernständige RBPs beschrieben, welche den Spleißvorgang regulieren (Hase et al., 2006; Llères et al., 2010; Valcarcel & Gebauer, 1997), wobei PTBP1 zwischen dem Kern und Zytoplasma pendeln kann (Abb. 3.15) und an der RNA-Lokalisierung sowie Translation im Zytoplasma beteiligt ist (Kamath et al., 2001). HNRNPM besitzt ein konventionelles Kernlokalisierungssignal (NLS) (Lee et al., 2006) und Analysen dieser Arbeit zeigen, dass es sich entgegen der Literatur zwischen Kern und Zytoplasma bewegen kann (Abb. 3.15) und in zytoplasmatischen IGF2BP1-enthaltenen RNPs fungiert.

Wie schon im *pulldown*-Assay mit Gesamtextrakt gezeigt, weist es mit einem zytoplasmatischen Extrakt eine Präferenz zur ACTB-3'UTR auf. Mit dem Kernextrakt ist diese Präferenz nicht zu erkennen. Das deutet darauf hin, dass HNRNPM unterschiedliche Funktionen in zytoplasmatischen und kernständigen RNPs übernehmen könnte. Ähnliche Befunde sind für PTBP1 gezeigt. Die Ergebnisse der *pulldown*-Analysen des Gesamtextrakts decken sich mit denen des zytoplasmatischen Extrakts. Mittels Kernextrakt ist PTBP1 hingegen fast nur am MYC-3'UTR detektiert worden.

### **4.3 Kontrolle der ACTB- und MYC-Genexpression**

#### **4.3.1 Einfluss von HNRNPE2 auf die ACTB-Genexpression**

Analog zu KIF11 konnte HNRNPE2 transkriptspezifisch mit dem ACTB-Konstrukt identifiziert werden. HNRNPE2 ist in die Regulation der Stabilität seiner Zieltranskripte und der Translation involviert (Han, et al., 2010), zum Teil durch einen IRES-vermittelten Mechanismus (Ostareck-Lederer et al., 1998; Evans et al., 2003). Es wurde ebenfalls berichtet, dass HNRNPE2 das Zellwachstum und somit die Tumorprogression bei Leukämie und im Gliom beeinträchtigt (Chen et al., 2018), indem HNRNPE2 die 3'UTR der Cyclin-abhängigen Kinase 2 (CDK2) bindet und positiv reguliert. CDK2 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellmitose. Eine Überexpression von CDK2 führt zu einem Tumorwachstum, wie es z. B. in Magenkrebszellen gezeigt wurde.

In den *pulldown*-Untersuchungen dieser Arbeit konnte eine Assoziation von HNRNPE2 nur an die ACTB-3'UTR-RNA detektiert werden (Abb. 3.8). Die publizierte Bindung von HNRNPE2 innerhalb der IRES in der 5'UTR konnte nicht nachgewiesen werden, da den MYC-Konstrukten dieser Arbeit der

## Diskussion

5'UTR-Bereich fehlt. Nach HNRNPE2-Depletion kam es zu einer Verdopplung des zellulären ACTB-Proteinlevels, wohingegen der ACTB-mRNA-Gehalt unverändert blieb (Abb. 3.20). Dies deutet auf eine Translationsinhibierung der ACTB-mRNA durch HNRNPE2 hin. Die Ergebnisse wurden anhand von Polysomengradienten untermauert. Infolge eines HNRNPE2-*knockdown* wurde eine Verschiebung des ACTB-mRNA-Gehaltes in die Polysomen induziert (Abb. 3.22). Dieser Befund weist auf eine erhöhte Translationseffizienz hin und unterstützt die Funktion der Translationsinhibierung von ACTB durch HNRNPE2.

Schaut man sich hingegen die Verteilung von HNRNPE2 im Sucrosegradienten an (Abb. 3.18), fällt es auf, dass HNRNPE2 in den ersten leichten Fraktionen mit IGF2BP1 kosedimentiert in denen nur sehr wenig ACTB-mRNA vorhanden ist (Abb. 3.9), was im Widerspruch zum HNRNPE2-*knockdown* und dem daraus resultierenden ACTB-Effekt stehen könnte. Betrachtet man sich andere Proteine die ähnlich sedimentieren wie z. B. HNRNPK, kann man davon ausgehen, dass die Sedimentation im Gradienten nicht unbedingt auf die Assoziation zur mRNA oder eventuellen Regulation hindeuten muss. Vielleicht ist die Antikörperdetektion auch außerhalb des Detektionsbereiches. HNRNPK interagiert z. B. spezifisch mit der IRES der MYC-mRNA und kontrolliert somit dessen Translation (Evans et al., 2003). Die MYC-mRNA sedimentiert jedoch ebenfalls erst in den Fraktionen der schwereren RNPs und nicht zusammen mit HNRNPK (Abb. 3.10 B,C). Aufgrund dessen muss sich die Funktion oder die *target*-mRNA nicht aus dem Sedimentationsverhalten eines Proteins erschließen. Die Ergebnisse zielen darauf ab, dass für HNRNPE2 eine neue Funktion identifiziert wurde und es als Komplexpartner von IGF2BP1 während der lokalen Translation von ACTB mitwirkt. Darüber hinaus wären weitere Untersuchungen von HNRNPE2 im Kontext des gerichteten Auswachsens von Dendriten und Axonen durch die lokalisierte Translation der ACTB-mRNA interessant. Wie schon postuliert, beeinflusst der Transport der ACTB-mRNA die Zellmigration und -invasion in Brustkrebszellen vermittelt durch IGF2BP1 (Gu et al., 2012). Es wäre interessant die Funktion von HNRNPE2 als Komponente IGF2BP1-enthaltender RNPs im mRNA-Transport im Tumor zu untersuchen.

Die HNRNPE2-*knockdown*-Analysen dieser Arbeit zeigten keinen Einfluss auf die Translation der MYC-mRNA obwohl eine IRES-vermittelte Regulation durch HNRNPE2 postuliert wurde. In Evans et al., 2003 wurde gezeigt, dass PCBP1, PCBP2 und HNRNPK zusammen in der Lage waren, die MYC-IRES *in vitro* zu aktivieren, wenn es in Kombination mit UNR (*upstream* von N-ras) und UNRIP (*upstream* von N-ras interagierendem Protein) inkubiert wurde. Jedoch wurde dieser Befund nicht durch *knockdown* Studien *in cellulo* untermauert. Vielleicht wird die Reduktion eines der 5 Proteine von einem anderen Interaktionspartner ausgeglichen. In Weidensdorfer et al., 2009 konnte ebenso durch den HNRNPE2-*knockdown* in U2OS-Zellen kein Effekt auf dem MYC-Protein- oder mRNA-Level identifiziert werden. Wie schon für IMP3 publiziert und HNRNPQ in dieser Arbeit gezeigt, kann es sein, dass in

unterschiedlichen Zelllinien durch gezielte *knockdown*-Analysen unterschiedliche Effekte erzielt werden (Müller et al., 2018 a). In Evans et al., 2003 wurde z. B. mit Hela-Zellen gearbeitet.

#### **4.3.2 HNRNPM als putativer onkogener Faktor und MYC-Regulator**

Wie bereits erwähnt wurde HNRNPM erfolgreich als Komponente von IGF2BP1-RNPs mittels der Tandemaffinitätsreinigung für die ACTB- und MYC-mRNA identifiziert. Weitere HNRNPM-*knockdown*-Studien zeigen eine deutliche Reduktion der MYC-Protein/mRNA-Gesamtmenge (Abb. 3.19). In der Literatur findet man keine Verbindung zwischen HNRNPM und MYC. Schaut man sich jedoch die Genexpression beider Proteine mittels der R2-Plattform (<https://hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi>) unter Verwendung der zur Verfügung stehenden TCGA Datensätze an, erkennt man eine positive Korrelation beider Gene in verschiedensten Tumoren wie z. B. im Nebennierenrindenzirrhose (ACC) oder Glioblastom (Abb. 3.24). Diese Korrelationen unterstützen den Stabilitätseffekt von HNRNPM auf die Genregulation von MYC in dieser Arbeit. Vielleicht ist HNRNPM dadurch an der Entstehung oder Progression diverser Tumore involviert, was es interessant macht HNRNPM weiter zu untersuchen.

In Xu et al., 2014 wird z. B. gezeigt, dass HNRNPM die Metastasierung von Brustkrebs fördert, indem es das alternative Spleißen aktiviert und dabei die CD44-Spleißisoformen präzise kontrolliert, was zu einem Epithelialen-Mesenchymalen-Übergang (EMT) führt. Eine Spleißvariante von CD44 ist ebenfalls als IGF2BP1- Zieltranskript publiziert (Vikesaa et al., 2006), was eine weitere mögliche Verbindung beider RBPs darstellen könnte. Alternatives Spleißen kann die proteomische Vielfalt erhöhen, die für die Flexibilität der Zelle notwendig ist, um auf verschiedene Bedingungen zu reagieren. Die Regulation der Produktion alternativer Transkripte spielt deshalb eine wichtige Rolle und kann zu Veränderungen der Funktion kommen.

Weiterhin lassen die Bindungs- und Lokalisationsstudien dieser Arbeit darauf schließen, dass IGF2BP1 und HNRNPM in gleichen Komplexen vorkommen. Untermauert wird dieses Ergebnis durch die Proteinverteilung im Sucrosegradienten. Beide Proteine zeigen das gleiche Sedimentationsverhalten im Gradienten mit endogenem und exogenem Flag-chIGF2BP1 Zellmaterial. Wie schon erwähnt, reichert sich HNRNPM gemeinsam mit exogenem chIGF2BP1 in den leichteren Fraktionen an (Abb. 3.11), während HNRNPM und das endogene IGF1BP1 in parentalen HEK293A-Zellen im gesamten Gradienten verteilt ist. Anscheinend besteht ein funktioneller oder regulatorischer Zusammenhang zwischen IGF2BP1 und HNRNPM.

Datensatz-übergreifende Korrelationsstudien der R2-Datenbank basierend auf RNA-Sequenzierungsstudien verschiedener TCGA-Datensätze von IGF2BP1 und HNRNPM zeigen unter

## Diskussion

anderem eine Koexpression beider RNP-Komponenten für Tumore des Hodens, der Leber, des Eierstocks und des Glioblastoms. Im Glioblastom z. B. könnte MYC ein relevantes Zieltranskript von HNRNPM und IGF2BP1 im gemeinsamen RNP sein (Abb. 3.24; Daten für IGF2BP1 nicht gezeigt). Die Korrelationsstudien dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die identifizierten RNPs in verschiedenen Tumorentitäten tatsächlich von Bedeutung sein könnten und HNRNPM eine relevante Rolle während der Krebsentstehung/ Tumorprogression spielt.

Weiterhin konnten durch Kaplan-Meier-Analysen von Ovarialkarzinomen und Leberkarzinomen (HCC) ([www.kmplot.com](http://www.kmplot.com)) gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression von HNRNPM, vergleichbar mit IGF2BP1 (Gutschner et al., 2014; Köbel et al., 2007), signifikant mit einer schlechten Prognose für Patienten korreliert. Die Studien dieser Arbeit weisen nicht nur darauf hin, dass HNRNPM mit IGF2BP1 im Tumor womöglich koexprimiert wird, sondern auch dass HNRNPM die Funktion eines potentiellen onkogenen Faktors ausüben könnte.

## 5 Zusammenfassung

Die posttranskriptionelle Kontrolle der Genregulation der mRNA wird im Wesentlichen durch spezifische RNPs gesteuert, in denen regulatorische Faktoren wie z. B. RNA-bindende Proteine (RBPs) und diverse Klassen von RNAs z.B. miRNAs mitwirken. In diesem Kontext beeinflusst das RNA-bindende Protein IGF2BP1 die Stabilisierung der MYC-mRNA, indem es diese vor endonukleolytischem Abbau schützt. Darüber hinaus reguliert es auch die ACTB-mRNA Translation und steuert die subzelluläre Sortierung dieses Transkripts. Durch Regulation verschiedener Zieltranskripte fördert IGF2BP1 als onkofötales Protein auf diese Weise mesenchymale Zelleigenschaften wie Polarität, Proliferation und Migration während der Embryogenese sowie der Tumorbildung. Bei diesen regulatorischen Prozessen wird davon ausgegangen, dass es sich dabei um ein Zusammenspiel mit anderen Faktoren, vor allem RBPs, handelt. Bislang ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, mit welchen RBPs IGF2BP1 innerhalb des RNPs interagiert und inwieweit diese Interaktionen Einfluss auf die Expression der Zielgene nehmen.

Mit ACTB- und MYC-RNA-vermittelten *pulldown*-Analysen und weiterführende *x-link*-Untersuchungen sowie Tandemaffinitätsreinigungen wurden Komplexpартner identifiziert, verifiziert oder falsifiziert. Die Proteine DHX9, HNRNPU, HNRNPQ, HNRNPE2, ELAVL1, PTBP1 und YBX1 wurden als Liganden von IGF2BP1-enthaltenden RNPs bestätigt, wobei DHX9 und HNRNPU hauptsächlich als Bestandteile kernständiger IGF2BP1-Komplexen auftreten. HNRNPM wurde erstmalig als IGF2BP1 Bindungspartner beschrieben und funktionell validiert. Darüber hinaus konnten die Proteine HNRNPA1, HNRNPK und HNRNPQ in eigenen und publizierten Untersuchungen in diversen IGF2BP1-haltigen und anderen mRNPs der Zelle beschrieben werden, was den Schluss zulässt, dass diese Faktoren zum Grundbestandteil von RNPs gehören könnten.

Methodisch lässt sich festhalten, dass im Vergleich zu Immunpräzipitationsstudien mit überexprimiertem Flag-chIGF2BP1, das *pulldown*-Verfahren zu einer spezifischeren Reinigung führen kann. Während bei der Immunpräzipitation verschiedene RNPs und daran assoziierten RBPs angereichert werden, welche auf unterschiedlichen mRNAs aufbauen können, bietet das *pulldown*-Verfahren die Möglichkeit, RNPs transkriptspezifisch oder sogar Bindungselement-spezifisch zu reinigen. Hierbei wurde unter anderem HNRNPE2 und das Motorprotein KIF11 spezifisch mit dem ACTB-Konstrukt identifiziert sowie eine Bindungspräferenz für die untersuchten RBPs in den 3'UTR-Bereichen festgestellt. KIF11 wurde während der Erstellung dieser Arbeit vom Labor von Rob Singer als IGF2BP1-abhängiges Motorprotein für den ACTB-Transport entlang des Mikrotubuli-Zytoskelett beschrieben und bestätigt die Spezifität der durchgeführten *pulldown*-Experimente.

Funktionelle *knockdown*-Analysen identifizierten HNRNPE2 als Regulator der ACTB-mRNA-Translation und HNRNPM erstmalig in der Stabilitätskontrolle der MYC-mRNA. Im Einklang mit IGF2BP1 konnte

## Zusammenfassung

HNRNPM als potentieller onkogener Faktor in dieser Arbeit identifiziert werden, welcher mit einer schlechten Prognose für Patienten korreliert. Das Glioblastom oder der Eierstockkrebs stellen dabei Tumorentitäten dar, für welche die IGF2BP1/HNRNPM-RNPs aufgrund der Expressionsmuster beider Faktoren am wahrscheinlichsten sind. In künftigen Studien muss nun geklärt werden, inwieweit beide RBPs als Ziele der Tumorthherapie eingesetzt werden können.

## 6 Literaturverzeichnis

Abdelmohsen, K., Lal, A., Kim, H.H., and Gorospe, M. (2007). Posttranscriptional orchestration of an anti-apoptotic program by HuR. *Cell Cycle* 6, 1288-1292.

Allain, F.H., Gilbert, D.E., Bouvet, P., and Feigon, J. (2000). Solution structure of the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and NMR study of the interaction with its RNA target. *J Mol Biol* 303, 227-241.

Allain, F.H., Gubser, C.C., Howe, P.W., Nagai, K., Neuhaus, D., and Varani, G. (1996). Specificity of ribonucleoprotein interaction determined by RNA folding during complex formulation. *Nature* 380, 646-650.

Antic, D., and Keene, J.D. (1997). Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression. *American journal of human genetics* 61, 273-278.

Arn, E.A., Cha, B.J., Theurkauf, W.E., and Macdonald, P.M. (2003). Recognition of a bicoid mRNA localization signal by a protein complex containing Swallow, Nod, and RNA binding proteins. *Dev Cell* 4, 41-51.

Atasoy, U., Watson, J., Patel, D., and Keene, J.D. (1998). ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is upregulated during serum stimulation and T cell activation. *J Cell Sci* 111 ( Pt 21), 3145-3156.

Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic acids research* 33, 7138-7150.

Bassell, G.J., Zhang, H., Byrd, A.L., Femino, A.M., Singer, R.H., Taneja, K.L., Lifshitz, L.M., Herman, I.M., and Kosik, K.S. (1998). Sorting of beta-actin mRNA and protein to neurites and growth cones in culture. *J Neurosci* 18, 251-265.

Batisse, J., Batisse, C., Budd, A., Bottcher, B., and Hurt, E. (2009). Purification of nuclear poly(A)-binding protein Nab2 reveals association with the yeast transcriptome and a messenger ribonucleoprotein core structure. *The Journal of biological chemistry* 284, 34911-34917.

Beckmann, B.M., Castello, A., and Medenbach, J. (2016). The expanding universe of ribonucleoproteins: of novel RNA-binding proteins and unconventional interactions. *Pflugers Arch* 468, 1029-1040.

Bell, J.L., Wachter, K., Mühleck, B., Pazaitis, N., Köhn, M., Lederer, M., and Hüttelmaier, S. (2013). Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 70, 2657-2675.

Bomsztyk, K., Denisenko, O., and Ostrowski, J. (2004). hnRNP K: one protein multiple processes. *Bioessays* 26, 629-638.

Boyerinas, B., Park, S.M., Hau, A., Murmann, A.E., and Peter, M.E. (2010). The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer* 17, F19-36.

## Literaturverzeichnis

Boyerinas, B., Park, S.M., Murmann, A.E., Gwin, K., Montag, A.G., Zillhardt, M., Hua, Y.J., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2012). Let-7 modulates acquired resistance of ovarian cancer to Taxanes via IMP-1-mediated stabilization of multidrug resistance 1. *Int J Cancer* 130, 1787-1797.

Boyerinas, B., Park, S.M., Shomron, N., Hedegaard, M.M., Vinther, J., Andersen, J.S., Feig, C., Xu, J., Burge, C.B., and Peter, M.E. (2008). Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer research* 68, 2587-2591.

Brewer, G. (1991). An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol Cell Biol* 11, 2460-2466.

Brown, V., Small, K., Lakkis, L., Feng, Y., Gunter, C., Wilkinson, K.D., and Warren, S.T. (1998). Purified recombinant Fmrp exhibits selective RNA binding as an intrinsic property of the fragile X mental retardation protein. *The Journal of biological chemistry* 273, 15521-15527.

Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.

Cao, W., Razanau, A., Feng, D., Lobo, V.G., and Xie, J. (2012). Control of alternative splicing by forskolin through hnRNP K during neuronal differentiation. *Nucleic acids research* 40, 8059-8071.

Caput, D., Beutler, B., Hartog, K., Thayer, R., Brown-Shimer, S., and Cerami, A. (1986). Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 1670-1674.

Chao, J.A., Patskovsky, Y., Patel, V., Levy, M., Almo, S.C., and Singer, R.H. (2010). ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping. *Genes & development* 24, 148-158.

Chen, C., Lei, J., Zheng, Q., Tan, S., Ding, K., and Yu, C. (2018). Poly(rC) binding protein 2 (PCBP2) promotes the viability of human gastric cancer cells by regulating CDK2. *FEBS Open Bio* 8, 764-773.

Chen, C.Y., Xu, N., and Shyu, A.B. (2002). Highly selective actions of HuR in antagonizing AU-rich element-mediated mRNA destabilization. *Mol Cell Biol* 22, 7268-7278.

Chen, Y., and Varani, G. (2005). Protein families and RNA recognition. *FEBS J* 272, 2088-2097.

Clery, A., Blatter, M., and Allain, F.H. (2008). RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr Opin Struct Biol* 18, 290-298.

Conway, A.E., Van Nostrand, E.L., Pratt, G.A., Aigner, S., Wilbert, M.L., Sundararaman, B., Freese, P., Lambert, N.J., Sathe, S., Liang, T.Y., Essex, A., Landais, S., Burge, C.B., Jones, D.L., and Yeo, G.W. (2016). Enhanced CLIP Uncovers IMP Protein-RNA Targets in Human Pluripotent Stem Cells Important for Cell Adhesion and Survival. *Cell Rep* 15, 666-679.

Dahanukar, A., and Wharton, R.P. (1996). The Nanos gradient in Drosophila embryos is generated by translational regulation. *Genes & development* 10, 2610-2620.

Dahm, R., and Kiebler, M. (2005). Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature* 438, 432-435.

Daneholt, B. (1997). A look at messenger RNP moving through the nuclear pore. *Cell* 88, 585-588.

## Literaturverzeichnis

- Daneholt, B. (2001). Assembly and transport of a premessenger RNP particle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *98*, 7012-7017.
- Day, D.A., and Tuite, M.F. (1998). Post-transcriptional gene regulatory mechanisms in eukaryotes: an overview. *J Endocrinol* *157*, 361-371.
- Deardorff, J.A., and Sachs, A.B. (1997). Differential effects of aromatic and charged residue substitutions in the RNA binding domains of the yeast poly(A)-binding protein. *J Mol Biol* *269*, 67-81.
- Denkert, C., Weichert, W., Winzer, K.J., Muller, B.M., Noske, A., Niesporek, S., Kristiansen, G., Guski, H., Dietel, M., and Hauptmann, S. (2004). Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* *10*, 5580-5586.
- Deo, R.C., Bonanno, J.B., Sonenberg, N., and Burley, S.K. (1999). Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell* *98*, 835-845.
- Dimitriadis, E., Trangas, T., Milatos, S., Foukas, P.G., Gioulbasanis, I., Courtis, N., Nielsen, F.C., Pandis, N., Dafni, U., Bardi, G., and Ioannidis, P. (2007). Expression of oncofetal RNA-binding protein CRD-BP/IMP1 predicts clinical outcome in colon cancer. *Int J Cancer* *121*, 486-494.
- Dobson, L., Nyitray, L., and Gaspari, Z. (2015). A conserved charged single alpha-helix with a putative steric role in paraspeckle formation. *Rna* *21*, 2023-2029.
- Dreyfuss, G., Kim, V.N., and Kataoka, N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol* *3*, 195-205.
- Durie, D., Lewis, S.M., Liwak, U., Kisilewicz, M., Gorospe, M., and Holcik, M. (2011). RNA-binding protein HuR mediates cytoprotection through stimulation of XIAP translation. *Oncogene* *30*, 1460-1469.
- Ehrenfeld, E., and Hunt, T. (1971). Double-stranded poliovirus RNA inhibits initiation of protein synthesis by reticulocyte lysates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *68*, 1075-1078.
- Elcheva, I., Goswami, S., Noubissi, F.K., and Spiegelman, V.S. (2009). CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell* *35*, 240-246.
- Elcheva, I., Tarapore, R.S., Bhatia, N., and Spiegelman, V.S. (2008). Overexpression of mRNA-binding protein CRD-BP in malignant melanomas. *Oncogene* *27*, 5069-5074.
- Eliscovich, C., Buxbaum, A.R., Katz, Z.B., and Singer, R.H. (2013). mRNA on the move: the road to its biological destiny. *The Journal of biological chemistry* *288*, 20361-20368.
- Estes, P.S., O'Shea, M., Clasen, S., and Zarnescu, D.C. (2008). Fragile X protein controls the efficacy of mRNA transport in *Drosophila* neurons. *Mol Cell Neurosci* *39*, 170-179.
- Evans, J.R., Mitchell, S.A., Spriggs, K.A., Ostrowski, J., Bomsztyk, K., Ostarek, D., and Willis, A.E. (2003). Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene* *22*, 8012-8020.
- Evdokimova, V., Ruzanov, P., Imataka, H., Raught, B., Svitkin, Y., Ovchinnikov, L.P., and Sonenberg, N. (2001). The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *The EMBO journal* *20*, 5491-5502.

## Literaturverzeichnis

- Expert-Bezancon, A., Le Caer, J.P., and Marie, J. (2002). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) K is a component of an intronic splicing enhancer complex that activates the splicing of the alternative exon 6A from chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. *The Journal of biological chemistry* *277*, 16614-16623.
- Fabini, G., Rutjes, S.A., Zimmermann, C., Pruijn, G.J., and Steiner, G. (2000). Analysis of the molecular composition of Ro ribonucleoprotein complexes. Identification of novel Y RNA-binding proteins. *Eur J Biochem* *267*, 2778-2789.
- Farina, K.L., Hüttelmaier, S., Musunuru, K., Darnell, R., and Singer, R.H. (2003). Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *The Journal of cell biology* *160*, 77-87.
- Fierro-Monti, I., and Mathews, M.B. (2000). Proteins binding to duplexed RNA: one motif, multiple functions. *Trends Biochem Sci* *25*, 241-246.
- Figuroa, A., Cuadrado, A., Fan, J., Atasoy, U., Muscat, G.E., Munoz-Canoves, P., Gorospe, M., and Munoz, A. (2003). Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes. *Mol Cell Biol* *23*, 4991-5004.
- Fukuda, T., Naiki, T., Saito, M., and Irie, K. (2009). hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. *Genes Cells* *14*, 113-128.
- Gallagher, J.R., Torian, U., McCraw, D.M., and Harris, A.K. (2017). Structural studies of influenza virus RNPs by electron microscopy indicate molecular contortions within NP supra-structures. *J Struct Biol* *197*, 294-307.
- Gallardo, M., Lee, H.J., Zhang, X., Bueso-Ramos, C., Paeon, L.R., McArthur, M., Multani, A., Nazha, A., Manshour, T., Parker-Thornburg, J., Rapado, I., Quintas-Cardama, A., Kornblau, S.M., Martinez-Lopez, J., and Post, S.M. (2015). hnRNP K Is a Haploinsufficient Tumor Suppressor that Regulates Proliferation and Differentiation Programs in Hematologic Malignancies. *Cancer Cell* *28*, 486-499.
- Ganapathi, K.A., Austin, K.M., Lee, C.S., Dias, A., Malsch, M.M., Reed, R., and Shimamura, A. (2007). The human Shwachman-Diamond syndrome protein, SBDS, associates with ribosomal RNA. *Blood* *110*, 1458-1465.
- Gerstberger, S., Hafner, M., and Tuschl, T. (2014). A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* *15*, 829-845.
- Geuens, T., Bouhy, D., and Timmerman, V. (2016). The hnRNP family: insights into their role in health and disease. *Hum Genet* *135*, 851-867.
- Glisovic, T., Bachorik, J.L., Yong, J., and Dreyfuss, G. (2008). RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS letters* *582*, 1977-1986.
- Gonzalez, I., Buonomo, S.B., Nasmyth, K., and von Ahsen, U. (1999). ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation. *Curr Biol* *9*, 337-340.

## Literaturverzeichnis

- Goswami, S., Tarapore, R.S., Teslaa, J.J., Grinblat, Y., Setaluri, V., and Spiegelman, V.S. (2010). MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor mRNA is inhibited by the coding region determinant-binding protein. *The Journal of biological chemistry* *285*, 20532-20540.
- Gu, W., Katz, Z., Wu, B., Park, H.Y., Li, D., Lin, S., Wells, A.L., and Singer, R.H. (2012). Regulation of local expression of cell adhesion and motility-related mRNAs in breast cancer cells by IMP1/ZBP1. *J Cell Sci* *125*, 81-91.
- Guhaniyogi, J., and Brewer, G. (2001). Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* *265*, 11-23.
- Guo, Y., Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., and Aburatani, H. (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* *384*, 51-61.
- Gutschner, T., Hammerle, M., Pazaitis, N., Bley, N., Fiskin, E., Uckelmann, H., Heim, A., Grobets, M., Hofmann, N., Geffers, R., Skawran, B., Longerich, T., Breuhahn, K., Schirmacher, P., Mühleck, B., Hüttelmaier, S., and Diederichs, S. (2014). Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *59*, 1900-1911.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Hentze, M.W., and Ronai, Z. (2001). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol* *3*, 325-330.
- Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jr., Jungkamp, A.C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G.S., Dewell, S., Zavolan, M., and Tuschl, T. (2010). Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* *141*, 129-141.
- Hamilton, K.E., Noubissi, F.K., Katti, P.S., Hahn, C.M., Davey, S.R., Lundsmith, E.T., Klein-Szanto, A.J., Rhim, A.D., Spiegelman, V.S., and Rustgi, A.K. (2013). IMP1 promotes tumor growth, dissemination and a tumor-initiating cell phenotype in colorectal cancer cell xenografts. *Carcinogenesis* *34*, 2647-2654.
- Hammer, N.A., Hansen, T., Byskov, A.G., Rajpert-De Meyts, E., Grondahl, M.L., Bredkjaer, H.E., Wewer, U.M., Christiansen, J., and Nielsen, F.C. (2005). Expression of IGF-II mRNA-binding proteins (IMPs) in gonads and testicular cancer. *Reproduction* *130*, 203-212.
- Han, S.P., Tang, Y.H., and Smith, R. (2010). Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J* *430*, 379-392.
- Hase, M.E., Yalamanchili, P., and Visa, N. (2006). The *Drosophila* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M protein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. *The Journal of biological chemistry* *281*, 39135-39141.
- Hock, J., Weinmann, L., Ender, C., Rudel, S., Kremmer, E., Raabe, M., Urlaub, H., and Meister, G. (2007). Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep* *8*, 1052-1060.
- Hu, S., Wu, J., Chen, L., and Shan, G. (2012). Signals from noncoding RNAs: unconventional roles for conventional pol III transcripts. *Int J Biochem Cell Biol* *44*, 1847-1851.

## Literaturverzeichnis

- Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B.S., Mesquita, A., Liu, C., Yuan, C.L., Hu, Y.C., Hüttelmaier, S., Skibbe, J.R., Su, R., Deng, X., Dong, L., Sun, M., Li, C., Nachtergaele, S., Wang, Y., Hu, C., Ferchen, K., Greis, K.D., Jiang, X., Wei, M., Qu, L., Guan, J.L., He, C., Yang, J., and Chen, J. (2018). Recognition of RNA N(6)-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nat Cell Biol* 20, 285-295.
- Hüttelmaier, S., Zenklusen, D., Lederer, M., Dichtenberg, J., Lorenz, M., Meng, X., Bassell, G.J., Condeelis, J., and Singer, R.H. (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438, 512-515.
- Jeske, M., Moritz, B., Anders, A., and Wahle, E. (2011). Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels. *The EMBO journal* 30, 90-103.
- Jonson, L., Vikesaa, J., Krogh, A., Nielsen, L.K., Hansen, T., Borup, R., Johnsen, A.H., Christiansen, J., and Nielsen, F.C. (2007). Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics* 6, 798-811.
- Kamath, R.V., Leary, D.J., and Huang, S. (2001). Nucleocytoplasmic shuttling of polypyrimidine tract-binding protein is uncoupled from RNA export. *Mol Biol Cell* 12, 3808-3820.
- Kanai, Y., Dohmae, N., and Hirokawa, N. (2004). Kinesin transports RNA: isolation and characterization of an RNA-transporting granule. *Neuron* 43, 513-525.
- Kedersha, N., Stoecklin, G., Ayodele, M., Yacono, P., Lykke-Andersen, J., Fritzler, M.J., Scheuner, D., Kaufman, R.J., Golan, D.E., and Anderson, P. (2005). Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *The Journal of cell biology* 169, 871-884.
- Keene, J.D. (2007). RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. *Nat Rev Genet* 8, 533-543.
- Kiebler, M.A., and Bassell, G.J. (2006). Neuronal RNA granules: movers and makers. *Neuron* 51, 685-690.
- Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & development* 23, 1743-1748.
- Kim, Y., Lee, J.H., Park, J.E., Cho, J., Yi, H., and Kim, V.N. (2014). PKR is activated by cellular dsRNAs during mitosis and acts as a mitotic regulator. *Genes & development* 28, 1310-1322.
- Köbel, M., Weidensdorfer, D., Reinke, C., Lederer, M., Schmitt, W.D., Zeng, K., Thomssen, C., Hauptmann, S., and Hüttelmaier, S. (2007). Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene* 26, 7584-7589.
- Köhn, M., Lederer, M., Wachter, K., and Hüttelmaier, S. (2010). Near-infrared (NIR) dye-labeled RNAs identify binding of ZBP1 to the noncoding Y3-RNA. *Rna* 16, 1420-1428.
- Kress, T.L., Yoon, Y.J., and Mowry, K.L. (2004). Nuclear RNP complex assembly initiates cytoplasmic RNA localization. *The Journal of cell biology* 165, 203-211.
- Kullmann, M., Gopfert, U., Siewe, B., and Hengst, L. (2002). ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR. *Genes & development* 16, 3087-3099.

## Literaturverzeichnis

- Kung, Y.A., Hung, C.T., Chien, K.Y., and Shih, S.R. (2017). Control of the negative IRES trans-acting factor KHSRP by ubiquitination. *Nucleic acids research* *45*, 271-287.
- Lafon, I., Carballes, F., Brewer, G., Poiret, M., and Morello, D. (1998). Developmental expression of AUF1 and HuR, two c-myc mRNA binding proteins. *Oncogene* *16*, 3413-3421.
- Lal, A., Kawai, T., Yang, X., Mazan-Mamczarz, K., and Gorospe, M. (2005). Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha. *The EMBO journal* *24*, 1852-1862.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *The EMBO journal* *23*, 3092-3102.
- Lawrence, J.B., and Singer, R.H. (1986). Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell* *45*, 407-415.
- Lee, B.J., Cansizoglu, A.E., Suel, K.E., Louis, T.H., Zhang, Z., and Chook, Y.M. (2006). Rules for nuclear localization sequence recognition by karyopherin beta 2. *Cell* *126*, 543-558.
- Lee, T., Paquet, M., Larsson, O., and Pelletier, J. (2016). Tumor cell survival dependence on the DHX9 DExH-box helicase. *Oncogene* *35*, 5093-5105.
- Leeds, P., Kren, B.T., Boylan, J.M., Betz, N.A., Steer, C.J., Gruppuso, P.A., and Ross, J. (1997). Developmental regulation of CRD-BP, an RNA-binding protein that stabilizes c-myc mRNA in vitro. *Oncogene* *14*, 1279-1286.
- Lejeune, F., Ishigaki, Y., Li, X., and Maquat, L.E. (2002). The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *The EMBO journal* *21*, 3536-3545.
- Lemm, I., and Ross, J. (2002). Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Mol Cell Biol* *22*, 3959-3969.
- Levens, D.L. (2003). Reconstructing MYC. *Genes & development* *17*, 1071-1077.
- Li, L., Wang, L., Song, P., Geng, X., Liang, X., Zhou, M., Wang, Y., Chen, C., Jia, J., and Zeng, J. (2014). Critical role of histone demethylase RBP2 in human gastric cancer angiogenesis. *Mol Cancer* *13*, 81.
- Liu, X., Zhou, Y., Lou, Y., and Zhong, H. (2016). Knockdown of HNRNPA1 inhibits lung adenocarcinoma cell proliferation through cell cycle arrest at G0/G1 phase. *Gene* *576*, 791-797.
- Lleres, D., Denegri, M., Biggiogera, M., Ajuh, P., and Lamond, A.I. (2010). Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice. *EMBO Rep* *11*, 445-451.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of biological chemistry* *193*, 265-275.
- Lu, J.Y., Sadri, N., and Schneider, R.J. (2006). Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs. *Genes & development* *20*, 3174-3184.
- Lukong, K.E., Chang, K.W., Khandjian, E.W., and Richard, S. (2008). RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet* *24*, 416-425.

## Literaturverzeichnis

- Macchi, P., Kroening, S., Palacios, I.M., Baldassa, S., Grunewald, B., Ambrosino, C., Goetze, B., Lupas, A., St Johnston, D., and Kiebler, M. (2003). Barentsz, a new component of the Staufen-containing ribonucleoprotein particles in mammalian cells, interacts with Staufen in an RNA-dependent manner. *J Neurosci* *23*, 5778-5788.
- Macdonald, P.M., Kerr, K., Smith, J.L., and Leask, A. (1993). RNA regulatory element BLE1 directs the early steps of bicoid mRNA localization. *Development* *118*, 1233-1243.
- Maizels, Y., Oberman, F., Miloslavski, R., Ginzach, N., Berman, M., and Yisraeli, J.K. (2015). Localization of cofilin mRNA to the leading edge of migrating cells promotes directed cell migration. *J Cell Sci* *128*, 1922-1933.
- Makeyev, A.V., and Liebhaber, S.A. (2002). The poly(C)-binding proteins: a multiplicity of functions and a search for mechanisms. *Rna* *8*, 265-278.
- Makino, D.L., Schuch, B., Stegmann, E., Baumgartner, M., Basquin, C., and Conti, E. (2015). RNA degradation paths in a 12-subunit nuclear exosome complex. *Nature* *524*, 54-58.
- Matsumoto, K., Tanaka, K.J., Aoki, K., Sameshima, M., and Tsujimoto, M. (2003). Visualization of the reconstituted FRGY2-mRNA complexes by electron microscopy. *Biochemical and biophysical research communications* *306*, 53-58.
- Matter, N., Herrlich, P., and Konig, H. (2002). Signal-dependent regulation of splicing via phosphorylation of Sam68. *Nature* *420*, 691-695.
- McGuffin, P., and Huckle, P. (1990). Simulation of Mendelism revisited: the recessive gene for attending medical school. *American journal of human genetics* *46*, 994-999.
- Merz, C., Urlaub, H., Will, C.L., and Luhrmann, R. (2007). Protein composition of human mRNPs spliced in vitro and differential requirements for mRNP protein recruitment. *Rna* *13*, 116-128.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., and Pesole, G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome biology* *3*, REVIEWS0004.
- Mizutani, A., Fukuda, M., Ibata, K., Shiraishi, Y., and Mikoshiba, K. (2000). SYNCRIP, a cytoplasmic counterpart of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, interacts with ubiquitous synaptotagmin isoforms. *The Journal of biological chemistry* *275*, 9823-9831.
- Mourelatos, Z., Abel, L., Yong, J., Kataoka, N., and Dreyfuss, G. (2001). SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *The EMBO journal* *20*, 5443-5452.
- Müller, S., Bley, N., Glass, M., Busch, B., Rousseau, V., Misiak, D., Fuchs, T., Lederer, M., and Hüttelmaier, S. (2018). IGF2BP1 enhances an aggressive tumor cell phenotype by impairing miRNA-directed downregulation of oncogenic factors. *Nucleic acids research* *46*, 6285-6303.
- Müller, S., Glass, M., Singh, A.K., Haase, J., Bley, N., Fuchs, T., Lederer, M., Dahl, A., Huang, H., Chen, J., Posern, G., and Hüttelmaier, S. (2018). IGF2BP1 promotes SRF-dependent transcription in cancer in a m6A- and miRNA-dependent manner. *Nucleic acids research*.
- Nabors, L.B., Gillespie, G.Y., Harkins, L., and King, P.H. (2001). HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer research* *61*, 2154-2161.

## Literaturverzeichnis

- Nielsen, J., Adolph, S.K., Rajpert-De Meyts, E., Lykke-Andersen, J., Koch, G., Christiansen, J., and Nielsen, F.C. (2003). Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. *Biochem J* 376, 383-391.
- Nielsen, J., Christiansen, J., Lykke-Andersen, J., Johnsen, A.H., Wewer, U.M., and Nielsen, F.C. (1999). A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol* 19, 1262-1270.
- Nielsen, J., Kristensen, M.A., Willemoes, M., Nielsen, F.C., and Christiansen, J. (2004). Sequential dimerization of human zipcode-binding protein IMP1 on RNA: a cooperative mechanism providing RNP stability. *Nucleic acids research* 32, 4368-4376.
- Nigg, E.A. (1997). Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature* 386, 779-787.
- Oleynikov, Y., and Singer, R.H. (2003). Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol* 13, 199-207.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N., and Hentze, M.W. (2001). Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104, 281-290.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M., and Hentze, M.W. (1997). mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* 89, 597-606.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., and Hentze, M.W. (2002). c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol* 22, 4535-4543.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., and Hentze, M.W. (1998). Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2. *Trends Biochem Sci* 23, 409-411.
- Pan, F., Hüttelmaier, S., Singer, R.H., and Gu, W. (2007). ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription. *Mol Cell Biol* 27, 8340-8351.
- Patel, G.P., Ma, S., and Bag, J. (2005). The autoregulatory translational control element of poly(A)-binding protein mRNA forms a heteromeric ribonucleoprotein complex. *Nucleic acids research* 33, 7074-7089.
- Pesole, G., Grillo, G., Larizza, A., and Liuni, S. (2000). The untranslated regions of eukaryotic mRNAs: structure, function, evolution and bioinformatic tools for their analysis. *Brief Bioinform* 1, 236-249.
- Pinol-Roma, S., and Dreyfuss, G. (1991). Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science* 253, 312-314.
- Raineri, I., Wegmueller, D., Gross, B., Certa, U., and Moroni, C. (2004). Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic acids research* 32, 1279-1288.
- Reynolds, N., and Cooke, H.J. (2005). Role of the DAZ genes in male fertility. *Reprod Biomed Online* 10, 72-80.

## Literaturverzeichnis

- Ross, A.F., Oleynikov, Y., Kislauskis, E.H., Taneja, K.L., and Singer, R.H. (1997). Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol* *17*, 2158-2165.
- Roush, S., and Slack, F.J. (2008). The let-7 family of microRNAs. *Trends Cell Biol* *18*, 505-516.
- Runge, S., Nielsen, F.C., Nielsen, J., Lykke-Andersen, J., Wewer, U.M., and Christiansen, J. (2000). H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* *275*, 29562-29569.
- Samanta, S., Sharma, V.M., Khan, A., and Mercurio, A.M. (2012). Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer. *Oncogene* *31*, 4689-4697.
- Serano, T.L., and Cohen, R.S. (1995). A small predicted stem-loop structure mediates oocyte localization of *Drosophila* K10 mRNA. *Development* *121*, 3809-3818.
- Shaw, G., and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* *46*, 659-667.
- Shell, S., Park, S.M., Radjabi, A.R., Schickel, R., Kistner, E.O., Jewell, D.A., Feig, C., Lengyel, E., and Peter, M.E. (2007). Let-7 expression defines two differentiation stages of cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *104*, 11400-11405.
- Sidani, M., Wessels, D., Mouneimne, G., Ghosh, M., Goswami, S., Sarmiento, C., Wang, W., Kuhl, S., El-Sibai, M., Backer, J.M., Eddy, R., Soll, D., and Condeelis, J. (2007). Cofilin determines the migration behavior and turning frequency of metastatic cancer cells. *The Journal of cell biology* *179*, 777-791.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., and Dreyfuss, G. (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic acids research* *21*, 1193-1198.
- Skabkin, M.A., Kiselyova, O.I., Chernov, K.G., Sorokin, A.V., Dubrovin, E.V., Yaminsky, I.V., Vasiliev, V.D., and Ovchinnikov, L.P. (2004). Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic acids research* *32*, 5621-5635.
- Skabkina, O.V., Skabkin, M.A., Popova, N.V., Lyabin, D.N., Penalva, L.O., and Ovchinnikov, L.P. (2003). Poly(A)-binding protein positively affects YB-1 mRNA translation through specific interaction with YB-1 mRNA. *The Journal of biological chemistry* *278*, 18191-18198.
- Snay-Hodge, C.A., Colot, H.V., Goldstein, A.L., and Cole, C.N. (1998). Dbp5p/Rat8p is a yeast nuclear pore-associated DEAD-box protein essential for RNA export. *The EMBO journal* *17*, 2663-2676.
- Song, T., Zheng, Y., Wang, Y., Katz, Z., Liu, X., Chen, S., Singer, R.H., and Gu, W. (2015). Specific interaction of KIF11 with ZBP1 regulates the transport of beta-actin mRNA and cell motility. *J Cell Sci* *128*, 1001-1010.
- Sparanese, D., and Lee, C.H. (2007). CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic acids research* *35*, 1209-1221.
- Srikantan, S., Tominaga, K., and Gorospe, M. (2012). Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr Protein Pept Sci* *13*, 372-379.
- St Johnston, D. (2005). Moving messages: the intracellular localization of mRNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* *6*, 363-375.

## Literaturverzeichnis

- Stains, J.P., Lecanda, F., Towler, D.A., and Civitelli, R. (2005). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses transcription from a cytosine/thymidine-rich element in the osteocalcin promoter. *Biochem J* 385, 613-623.
- Svitkin, Y.V., Yanagiya, A., Karetnikov, A.E., Alain, T., Fabian, M.R., Khoutorsky, A., Perreault, S., Topisirovic, I., and Sonenberg, N. (2013). Control of translation and miRNA-dependent repression by a novel poly(A) binding protein, hnRNP-Q. *PLoS Biol* 11, e1001564.
- Tsai, B.P., Wang, X., Huang, L., and Waterman, M.L. (2011). Quantitative profiling of in vivo-assembled RNA-protein complexes using a novel integrated proteomic approach. *Mol Cell Proteomics* 10, M110 007385.
- Vainer, G., Vainer-Mosse, E., Pikarsky, A., Shenoy, S.M., Oberman, F., Yeffet, A., Singer, R.H., Pikarsky, E., and Yisraeli, J.K. (2008). A role for VICKZ proteins in the progression of colorectal carcinomas: regulating lamellipodia formation. *J Pathol* 215, 445-456.
- Valcarcel, J., and Gebauer, F. (1997). Post-transcriptional regulation: the dawn of PTB. *Curr Biol* 7, R705-708.
- Valverde, R., Edwards, L., and Regan, L. (2008). Structure and function of KH domains. *FEBS J* 275, 2712-2726.
- Van Nostrand, E.L., Pratt, G.A., Shishkin, A.A., Gelboin-Burkhart, C., Fang, M.Y., Sundararaman, B., Blue, S.M., Nguyen, T.B., Surka, C., Elkins, K., Stanton, R., Rigo, F., Guttman, M., and Yeo, G.W. (2016). Robust transcriptome-wide discovery of RNA-binding protein binding sites with enhanced CLIP (eCLIP). *Nat Methods* 13, 508-514.
- Vikesaa, J., Hansen, T.V., Jonson, L., Borup, R., Wewer, U.M., Christiansen, J., and Nielsen, F.C. (2006). RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *The EMBO journal* 25, 1456-1468.
- Vu, N.T., Park, M.A., Shultz, J.C., Goehe, R.W., Hoferlin, L.A., Shultz, M.D., Smith, S.A., Lynch, K.W., and Chalfant, C.E. (2013). hnRNP U enhances caspase-9 splicing and is modulated by AKT-dependent phosphorylation of hnRNP L. *The Journal of biological chemistry* 288, 8575-8584.
- Wächter, K., Köhn, M., Stöhr, N., and Hüttelmaier, S. (2013). Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biological chemistry* 394, 1077-1090.
- Wahl, M.C., Will, C.L., and Luhrmann, R. (2009). The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 136, 701-718.
- Wang, X., Cao, L., Wang, Y., Wang, X., Liu, N., and You, Y. (2012). Regulation of let-7 and its target oncogenes (Review). *Oncol Lett* 3, 955-960.
- Wang, X., and Tanaka Hall, T.M. (2001). Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol* 8, 141-145.
- Weidensdorfer, D., Stöhr, N., Baude, A., Lederer, M., Köhn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E., and Hüttelmaier, S. (2009). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *Rna* 15, 104-115.

## Literaturverzeichnis

- Weksberg, R., Shen, D.R., Fei, Y.L., Song, Q.L., and Squire, J. (1993). Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature genetics* 5, 143-150.
- Wen, X., Huang, X., Mok, B.W., Chen, Y., Zheng, M., Lau, S.Y., Wang, P., Song, W., Jin, D.Y., Yuen, K.Y., and Chen, H. (2014). NF90 exerts antiviral activity through regulation of PKR phosphorylation and stress granules in infected cells. *J Immunol* 192, 3753-3764.
- Wilhelm, J.E., and Smibert, C.A. (2005). Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell* 97, 235-252.
- Wilkie, G.S., Dickson, K.S., and Gray, N.K. (2003). Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors. *Trends Biochem Sci* 28, 182-188.
- Wu, T.H., Shi, L., Adrian, J., Shi, M., Nair, R.V., Snyder, M.P., and Kao, P.N. (2018). NF90/ILF3 is a transcription factor that promotes proliferation over differentiation by hierarchical regulation in K562 erythroleukemia cells. *PLoS one* 13, e0193126.
- Xu, Y., Gao, X.D., Lee, J.H., Huang, H., Tan, H., Ahn, J., Reinke, L.M., Peter, M.E., Feng, Y., Gius, D., Siziopikou, K.P., Peng, J., Xiao, X., and Cheng, C. (2014). Cell type-restricted activity of hnRNPM promotes breast cancer metastasis via regulating alternative splicing. *Genes & development* 28, 1191-1203.
- Yang, W.H., Ding, M.J., Cui, G.Z., Yang, M., and Dai, D.L. (2018). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M promotes the progression of breast cancer by regulating the axin/beta-catenin signaling pathway. *Biomed Pharmacother* 105, 848-855.
- Yaniv, K., and Yisraeli, J.K. (2002). The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene* 287, 49-54.
- Zhang, H.L., Eom, T., Oleynikov, Y., Shenoy, S.M., Liebelt, D.A., Dichtenberg, J.B., Singer, R.H., and Bassell, G.J. (2001). Neurotrophin-induced transport of a beta-actin mRNP complex increases beta-actin levels and stimulates growth cone motility. *Neuron* 31, 261-275.
- Zhang, S., and Grosse, F. (1994). Nuclear DNA helicase II unwinds both DNA and RNA. *Biochemistry* 33, 3906-3912.
- Zhang, S., Herrmann, C., and Grosse, F. (1999). Pre-mRNA and mRNA binding of human nuclear DNA helicase II (RNA helicase A). *J Cell Sci* 112 ( Pt 7), 1055-1064.
- Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T., Crater, D., DeHaven, K., Long, L., and Brewer, G. (1993). Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol Cell Biol* 13, 7652-7665.
- Zirkel, A., Lederer, M., Stöhr, N., Pazaitis, N., and Hüttelmaier, S. (2013). IGF2BP1 promotes mesenchymal cell properties and migration of tumor-derived cells by enhancing the expression of LEF1 and SNAI2 (SLUG). *Nucleic acids research* 41, 6618-6636.

## 7 Anhang

### *Abkürzungsverzeichnis*

μ	mikro
Abb	Abbildung
ACTB	β-Actin
Ago	Argonaute
Are	Adenin- und Uridin-reiche Elemente
BB	<i>binding buffer</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
cap	<i>7-Methylguanosin (m7G) Kappe</i>
CBP80	<i>cap binding protein 80</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFL1	Cofilin1
Clip	<i>ribonucleoside enhanced cross-linking and immunoprecipitation</i>
CRD	<i>coding region instability determinat</i>
CRD-BP	<i>CRD binding protein</i>
DAZ	<i>deleted in Azoospermia</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DICE	<i>differential control element</i>
DMEM	<i>Dublecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dsRBM	<i>dsRBM (double-stranded RNA-binding motif</i>
dsRNA	doppelsträngige RNA
EIF2A	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktors 2A
EJC	<i>Exon Junction Complex</i>
ELAVL1	embryonic lethal abnormal vision like RNA binding protein 1
EMT	epithelial-mesenchymale-Transition

## Anhang

ERG	<i>early response gene</i>
et al.	<i>et altera</i>
FCS	fötale Kälberserum
FMR1	<i>fragile X mental retardation 1</i>
FMRP	<i>Fragile X Syndrom Protein</i>
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung, Zentifugationsgeschwindigkeit
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GBM	Glioblastom
h	Stunden
HCC	hepatozelluläres Karzinom
HMGA2	<i>high mobility group AT-hook 2</i>
HNRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
IGF2	<i>insulin-like growth factor 2</i>
IGF2BP, IMP1	<i>IGF2 mRNA-binding protein</i>
IP	Immunpräzipitation
IRES	<i>internal ribosomal entry site</i>
Kb	Kilobasenpaare
KH	<i>hnRNPK homology</i>
KHSRP	<i>KH domain-containing splicing regulatory protein</i>
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
LE	Lokalisierungselement
LEF1	<i>lymphoid enhancer binding factor 1</i>
Let-7	<i>lethal-7</i>
LIN28B	<i>cell lineage abnormal 28</i>
lncRNA	lange nicht kodierende RNA
m	milli
M	molar
MAPK	mitogen-activated protein kinase 4
MCL1	<i>myeloid cell leukemia sequence 1</i>
min	Minute
miRNA, miRmiRNA	microRNA
MITF	microphthalmia-associated transcription factor

## Anhang

mRNA	<i>messenger RNA</i>
MYC	<i>v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
n	nano
NCL	Nucleolin
NGS	next generation sequencing
NLS	nuclear localisation signal
nm	Nanometer
NMD	<i>nonsense-mediated decay</i>
PABP	Poly-A-bindendes Proteine
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR-CLIP	<i>photoactivatable-ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation</i>
PB	<i>processing bodies</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	<i>Potentium Hydrogenii</i>
PKR	Proteinkinase R
Poly-a	polyadenyliert
prä-mRNA	Vorläufer-mRNA
PPIA	Cyclophilin A
PTBP1	<i>Polypyrimidine Tract Binding Protein 1</i>
PTMA	Prothymosin alpha
RBD	RNA-Bindedomänen
RBP	RNA-bindende Proteine
RIP	RNA-Immunpräzipitation
RISC	<i>RNA Induced Silencing Complex</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNasin	RNase Inhibitor
RNP	Ribonukleoprotein
RPLP0	<i>Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0</i>
RRM	<i>RNA-recognition motifs</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	quantitative <i>real time</i> PCR

## Anhang

s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
scRNP	<i>small cytoplasmic RNP</i>
SG	<i>stress granule</i>
siRNA	small interfering RNA
SIRT1	Sirtuin-1
snRNP	<i>small nuclear RNP</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCGA	<i>The Cancer Genome Atlas</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TUBA4A	alpha Tubulin
üN	über Nacht
UTR	untranslatierter Bereich
V	Volt
VCL	Vinculin
v/v	Volumenprozent
w/v	Masseprozent
ZBP1	<i>zipcode binding Protein1</i>
z. B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## **Danksagung**

Mein Dank gilt all denen, die mich während meiner Promotion unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt Stefan Hüttelmaier, der mir die Möglichkeit gegeben hat, die Promotion in seiner Gruppe anzufertigen. Danke dafür, dass du so ein guter Chef bist, der immer ein Ohr offen hat für seine Schützlinge, die er stets tatkräftig unterstützt und die Projekte immer mit guten Ideen vorantreibt. Vielen Dank, Stefan!

Ein ganz großer Dank gebührt Nadine Bley und Marcell Lederer für ihre Unterstützung während der gesamten Promotion, ihr Vertrauen und ihr Korrekturlesen. Ohne Euch hätte diese Arbeit nicht diese Form erreicht. Ich danke Euch auch, weil ihr mir den Arbeitsalltag in der AG Hüttelmaier versüßt und ich gern mit Euch zusammen bin.

Ich danke ebenfalls Marcel Köhn, Markus Glaß und Simon Müller die mich ebenfalls beim Schreiben der Arbeit unterstützt haben. Danke auch an die Lieblingnachbarn Christiane Rex und Helge Missal, die mit ihrem rechtschreiberischen Gespür noch einige Fehler in dieser Arbeit aufdecken konnten.

Juliane Braun und Marcel Köhn möchte ich dafür danken, dass ich Euch während meiner Promotionszeit mit vielen Fragen löchern durfte und für eure Diskussionsbereitschaft.

Marlen Mrotzek und Juliane Braun danke ich für die unglaublich schönen Mittagspausen gespickt mit viel Witz und Humor.

Ich danke der gesamten AG Hüttelmaier: Marlen Mrotzek, Kristin Wächter, Claudia Misiak, Anne Zirkel, Juliane Braun, Nadine Bley, Danny Misiak, Markus Glaß, Alexander Mensch, Niko Pazaitis, Tommy Fuchs, Bianca Busch, Marcel Köhn, dem Becchen, Jessica Bell, Marcell Lederer und Stefan Hüttelmaier für die unglaublich schöne Zeit während meiner Promotion. Danke Euch!

Vielen Dank an Gerd Hause und Simone Fraas für die elektronenmikroskopischen Auswertungen in dieser Arbeit. Ich habe mich immer sehr wohl bei Euch gefühlt und bin gern mit meinen Proben zu Euch gekommen.

Im Voraus möchte ich mich auch ganz herzlich bei den beiden Gutachtern Prof. Dr. Elmar Wahle und Prof. Dr. Dirk Ostareck bedanken, welche die Aufgabe übernommen haben meine Doktorarbeit zu bewerten.

DANKE!!!

## Anhang

### **Lebenslauf**

Name	Anne Baude
Geburtsdatum/ -ort	11.10.1981, Riesa
Nationalität	deutsch
Geschlecht:	weiblich
Familienstand:	ledig 2 Kinder, geb. im November 2009 und November 2013
Seit Oktober 2014	<b>Koordinatorin des GRK1591</b>
10/2007-09/2013	<b>Doktorandin</b> in der Arbeitsgruppe von Prof. Stefan Hüttelmaier, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Molekulare Medizin, Abteilung für Molekulare Zellbiologie
10/2013-10/2014	<b>2. Erziehungsjahr</b>
10/2009-10/2010	<b>1. Erziehungsjahr</b>
05/2007-09/2007	<b>Wissenschaftliche Mitarbeiterin</b> in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Elisabeth Schwarz an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Petra Seemann am Max-Planck-Institut in Berlin.
08/2006 –05/2007:	<b>Abschluss Diplom-Biochemiker</b> Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Elisabeth Schwarz an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in Zusammenarbeit mit Frau Prof. Dr. Petra Seemann am Max-Planck-Institut in Berlin.
10/2001- 07/2006	<b>Studiengang Biochemie</b> an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
06/2001	<b>Abitur</b> am Sarte-Gymnasium in Berlin (12629 Berlin)

***Publikationsliste***

Weidensdorfer, D., Stöhr, N., **Baude, A.**, Lederer, M., Köhn, M., Schierhorn, A., Buchmeier, S., Wahle, E., and Hüttelmaier, S. (2009). Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *Rna* 15, 104-115.

***Eidesstattliche Erklärung***

Hiermit erkläre ich, dass ich meine Dissertationsschrift selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Ich habe keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen habe ich als solche kenntlich gemacht. Mit der vorliegenden Arbeit bewerbe ich mich erstmals um die Erlangung des Doktorgrades.

Halle (Saale), Dezember 2018

Anne Baude