

Analyse der Regulation der Retikulozyten-15-Lipoxygenase- mRNA-Translation durch den 3'UTR-DICE-Komplex

D i s s e r t a t i o n

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**



von

Christiane Harnisch

**Diplombiochemikerin
geboren am 2. Januar 1980 in Halle (Saale)**

Gutachter

- 1. PD Dr. Dirk H. Ostareck**
- 2. Prof. Knud H. Nierhaus**
- 3. Prof. Elmar Wahle**

Halle (Saale), 9. Juni 2010

INHALT

| | | |
|------|--|----|
| 1. | EINLEITUNG | |
| 1.1 | Die Translations-Initiation von eukaryotischen mRNAs | 1 |
| 1.2 | Die Regulation der Translation als Möglichkeit der Genregulation | 3 |
| 1.3. | Die Reifung roter Blutzellen | 6 |
| 1.4 | Die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation durch hnRNP K und hnRNP E1 | 7 |
| 1.5 | Die Struktur von hnRNP K und hnRNP E1 | 10 |
| 1.6 | Die Phosphorylierung von hnRNP K durch die Tyrosinkinase c-Src hat eine zentrale Funktion bei der Aktivierung der r15-LOX-mRNA-Translation | 12 |
| 1.7 | Zielstellung | 16 |
| 2. | MATERIAL UND METHODEN | |
| 2.1 | Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte | 18 |
| 2.2 | <i>E. coli</i> -Stämme: Transformation kompetenter Zellen | 22 |
| 2.3 | Plasmide und deren Klonierung | 22 |
| 2.4 | Identitätsprüfung von Plasmiden: Restriktionsanalyse, Mini-PCR und Sequenzierung | 25 |
| 2.5 | Nukleinsäurepräparation | 26 |
| 2.6 | Reinigung von in <i>E.coli</i> überexprimierten Proteinen | 28 |
| 2.7 | Methanol-Chloroform-Präzipitation von Proteinen | 34 |
| 2.8 | Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäure-Proben | 34 |
| 2.9 | Gelelektrophorese | 35 |
| 2.10 | Herstellung von hnRNP E1- und hnRNP E2-spezifischen Antikörpern | 35 |
| 2.11 | <i>Western blotting</i> | 36 |
| 2.12 | Immunopräzipitation | 37 |
| 2.13 | <i>North-Western-Blotting</i> | 38 |
| 2.14 | <i>In vitro</i> -Phosphorylierung | 38 |
| 2.15 | <i>UV-crosslinking</i> von RNA-Protein-Komplexen | 39 |
| 2.16 | <i>In vitro</i> -Translation in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat | 40 |
| 2.17 | <i>In vitro</i> -Transkription | 40 |
| 2.18 | Eukaryotische Zellkultur | 42 |
| 2.19 | Präparation cytoplasmatischer Extrakte aus eukaryotischen Zellen | 43 |
| 2.20 | Optimierung der <i>in vitro</i> -Translation in cytoplasmatischen Extrakten aus MEL- und K562-Zellen | 45 |
| 2.21 | <i>In vitro</i> -Translations-Initiation und Dichtegradienten-Zentrifugation | 50 |
| 2.22 | GRNA-Chromatographie | 51 |
| 2.23 | Tryptische <i>In-Gel</i> -Spaltung und Peptid-Isolation | 59 |
| 2.24 | Auswertung der massenspektrometrischen Daten | 60 |
| 2.25 | Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion: <i>GST-pulldown</i> | 62 |
| 2.26 | Fraktionierung von K562-Extrakten durch Dichtegradientenzentrifugation | 63 |
| 2.27 | RT-PCR zur Analyse der Gradientenfraktionen | 64 |
| 2.28 | RNA-Interferenz und Immunofluoreszenz-Mikroskopie | 65 |

| | | |
|-----|---|-----|
| 3. | ERGEBNISSE | |
| 3.1 | Die Phosphorylierung von Tyrosin 458 in hnRNP K durch c-Src beeinflusst die DICE-Bindung und die Translations-Inhibition | 67 |
| 3.2 | Initiale Experimente zur Induktion der erythroiden Reifung von MEL-Zellen | 72 |
| 3.3 | In cytoplasmatischen Extrakten aus MEL-Zellen wird die Translation einer 3'UTR-DICE enthaltenden mRNA inhibiert | 76 |
| 3.4 | In cytoplasmatischen Extrakten aus K562-Zellen wird die Translation einer 3'UTR-DICE enthaltenden mRNA inhibiert | 81 |
| 3.5 | GRNA-Chromatographie zur Isolierung des translations-inhibitorischen hnRNPK/E1-DICE-Komplexes aus K562-Extrakten und die Analyse seiner Zusammensetzung | 95 |
| 3.6 | Evaluierung der durch Massenspektrometrie identifizierten Protein-Kandidaten | 106 |
| 3.7 | Die Interaktion von DDX6 mit hnRNP K und hnRNP E1 und die Funktion von DDX6 in der r15-LOX-mRNA-Translations-Regulation | 114 |
| 4. | DISKUSSION UND AUSBLICK | |
| | Die Phosphorylierung von Y458 in hnRNP K durch c-Src beeinflusst die DICE-Bindung | 124 |
| | Cytoplasmatische MEL- und K562-Extrakte rekapitulieren die DICE-abhängige Translations-Inhibition | 126 |
| | Die induzierte K562-Reifung beeinflusst die DICE-abhängige Translations-Repression | 129 |
| | Die massenspektrometrische Analyse des durch GRNA und Immunopräzipitation aus K562-Extrakten isolierten DICE-enthaltenden mRNA-Protein-Komplexes | 130 |
| | Die Identifizierung und Untersuchung von DDX6 als ein mit dem hnRNP K/E1-DICE-Komplex interagierendes Protein | 134 |
| | Die Funktion von DDX6-Proteinen in der posttranskriptionalen Genregulation | 140 |
| | Ausblick | 143 |
| | Zusammenfassung | 146 |
| | Literaturverzeichnis | 147 |

1. EINLEITUNG

1.1 Die Translations-Initiation von eukaryotischen mRNAs

Die Translation von mRNAs dient der Übersetzung von Nukleinsäure-Sequenzen in die Aminosäure-Sequenzen der Proteine und ist ein komplexer zellulärer Prozeß, welcher die Interaktion einer Vielzahl von ribosomalen Proteinen, Translationsfaktoren und RNAs in einem mehrere Mega-Dalton großen Komplex voraussetzt. Die Peptidsynthese wird dabei durch das Ribosom katalysiert. Die kleine ribosomale (40S) Untereinheit eukaryotischer Zellen besteht aus etwa 33 Polypeptiden (Ribosomale Proteine rpS1-33) und der 18S-rRNA, die große ribosomale (60S) Untereinheit aus etwa 49 Polypeptiden (rpL1-49) und den 5S, 5,8S und 28S-rRNAs (Wool *et al.*, 1996).

Die Translation lässt sich in die Phasen Initiation, Elongation, Termination und Ribosomen-Dissoziation unterteilen. Die Proteinsynthese startet nach der Rekrutierung der 40S-Untereinheit an die zu translatierende mRNA, der korrekten Positionierung der 40S-Untereinheit zusammen mit der Initiator-Methionyl-tRNA ($tRNA_i^{Met}$) am Initiations-Kodon und der Bildung eines aktiven 80S Ribosoms durch die Assemblierung der 40S- mit der 60S-Untereinheit. Diese Translations-Initiationsphase wird durch die eukaryotischen Translations-Initiationsfaktoren (eIFs) vermittelt. Bei der regulären eukaryotischen Translations-Initiation wird die 5'Cap-Struktur der mRNA erkannt; es existieren allerdings auch alternative Translations-Initiations-Mechanismen, welche durch interne ribosomale Eintritts-Stellen (IRES) unabhängig vom 5'Ende der mRNA vermittelt werden und eine reduzierte Anzahl der kanonischen eIFs nutzen (Hellen und Sarnow, 2001). IRESes sind hochstrukturierte Regionen, die zunächst in mRNAs von Picorna-Viren identifiziert wurden (Jang *et al.*, 1988, Pelletier und Sonenberg, 1988).

Eine prozessierte eukaryotische mRNA besteht aus der kodierenden Sequenz (dem *open reading frame*, ORF), flankiert von 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR), und trägt am 5'-Ende ein 7-Methylguanosin-Cap und am 3'Ende einen poly(A)-Schwanz.

Der erste Schritt der Cap-abhängigen Translations-Initiation ist die Bildung des 43S-Präinitiations-Komplexes, bestehend aus dem ternären Komplex aus eIF2*GTP und der Initiator-Methionyl-tRNA ($eIF2*GTP:tRNA_i^{Met}$), der 40S-Untereinheit und den eIFs 1, 1A, 3 und 5 (vergl. Übersicht Abb. 1.1.1). Dieser 43S-Präinitiationskomplex assoziiert mit dem am Cap assemblierten heterotrimeren eIF4F-Komplex, bestehend aus dem Cap-bindenden eIF4E,

der ATP-abhängigen RNA-Helikase eIF4A (Rozen *et al.*, 1990, Rogers *et al.*, 1999) und eIF4G.

eIF4G interagiert dabei mit mehreren Proteinen, hat also eine zentrale Funktion als „Interaktionsplattform“ während der Ribosomenrekrutierung. eIF4G interagiert mit eIF4E (Altmann *et al.*, 1997), eIF4A (Imataka und Sonenberg, 1997, Pestova *et al.*, 1996b), eIF3 (Lamphear *et al.*, 1995) und dem poly(A)-bindenden Protein PABPC (Tarun und Sachs, 1996). Durch die resultierende 5'-3'-Interaktion kann eIF4G die Stimulation der Translation durch den poly(A)-Schwanz vermitteln (Tarun *et al.*, 1997).

Nach dem Beladen der mRNA mit dem 43S-Präinitiationskomplex erfolgt die Positionierung der kleinen ribosomalen Untereinheit am Initiationskodon. Das gegenwärtige Modell besagt, dass sich die 40S-Untereinheit auf der mRNA in 3'-Richtung bewegt, bis sie das Initiations-Kodon identifiziert. eIF1 ist dabei sowohl für das *Scannen* der 5'UTR als auch für die Auswahl des Initiations-Kodons wichtig (Pestova und Kolupaeva, 2002). Sowohl die Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit als auch das *Scannen* der 5'UTR sind ATP-abhängige Prozesse (Kozak, 1980).

Nach der Erkennung des Initiationskodons durch Basenpaarung mit der Initiator-tRNA (Kozak, 1978, Cigan *et al.*, 1988) wird die durch eIF2 katalysierte GTP-Hydrolyse ausgelöst (Huang *et al.*, 1997), welche durch das GTPase-aktivierende Protein (GAP) eIF5 unterstützt wird. Nach der GTP-Hydrolyse entlässt eIF2*GDP die Methionyl-tRNA in die P-Stelle der 40S-Untereinheit (Chakrabarti und Maitra, 1991) und die eIFs 1, 1A, 2, 3 und eventuell auch eIF5 dissoziieren. Etwa gleichzeitig assoziiert eIF5B*GTP, welcher die Assemblierung mit der 60S-Untereinheit katalysiert (Acker *et al.*, 2006). Die 60S-Untereinheit löst als GAP die GTP-Hydrolyse durch eIF5B aus, was wiederum dessen Affinität zum Ribosomen verringert und zur Dissoziation von eIF5B*GDP führt (Pestova *et al.*, 2000).

eIF3 vermittelt nach erfolgter Translations-Elongation und -Termination die Dissoziation der 80S-Ribosomen und verhindert zusammen mit eIF1 durch die Bindung der 40S-Untereinheit die Re-Assoziation (Merrik, 1992). Eine Funktion als Anti-Assoziations-Faktor wurde auch eIF6 zugeordnet (Si *et al.*, 1997; Ceci *et al.*, 2003), zusätzlich wird dessen Funktion auch in der Ribosomen-Biogenese gesehen (Pestova und Hellen, 2000).

Der Guanin-Nukleotid-Austausch-(*exchange*) Faktor (GEF) eIF2B ist für die Reaktivierung von eIF2*GDP zu eIF2*GTP verantwortlich (Trachsel, 1996).

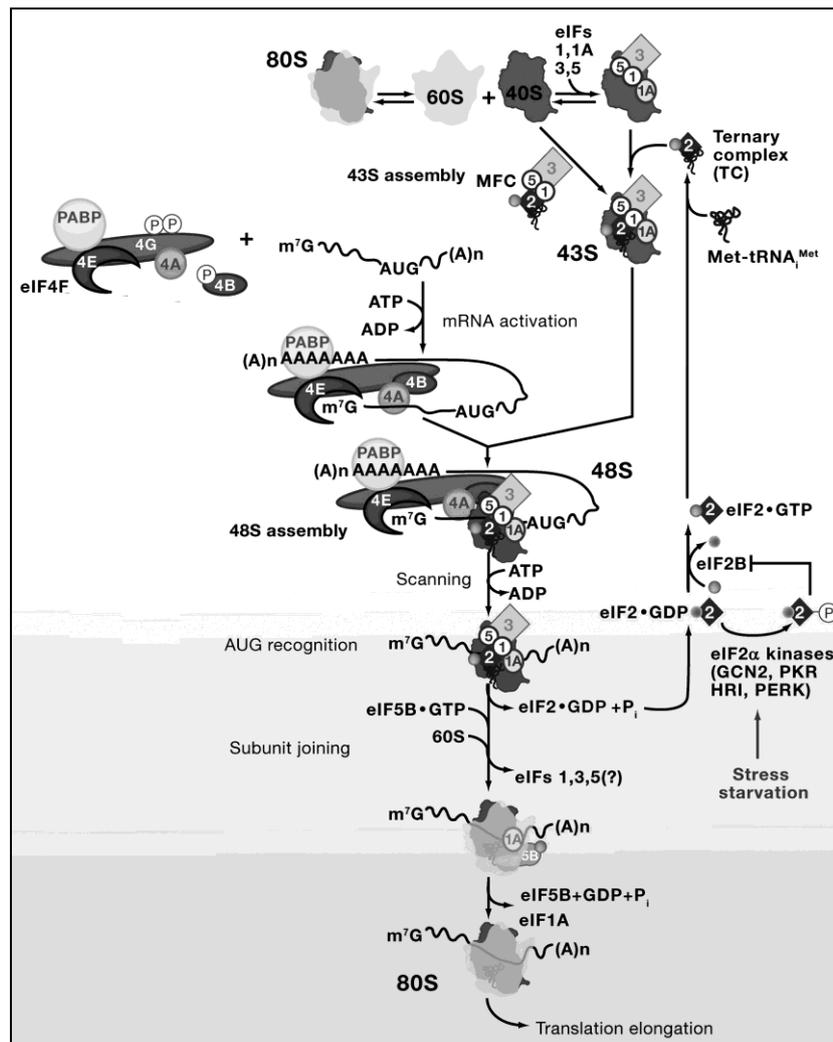


Abb. 1.1.1. Eukaryotische Cap-abhängige Translations-Initiation.

Die eIFs 1,1A und 3 vermitteln die Ribosomen-Dissoziation und zusammen mit eIF5 und dem ternären Komplex die 43S-Präinitiationskomplex-Bildung. Der 43S-Komplex bindet durch den Cap-bindenden Faktor eIF4F die mRNA und *scant* unter ATP-Hydrolyse die 5'UTR. Die Identifikation des Initiations-Kodons führt zur GTP-Hydrolyse durch eIF2 und zur Dissoziation von eIF1 (nicht gezeigt) und eIF2•GDP. Die Assoziation der 60S-Untereinheit mit gleichzeitiger Dissoziation der anderen eIFs wird durch eIF5B•GTP katalysiert. Nach GTP-Hydrolyse werden eIF5B•GDP und 1A entlassen und es resultiert das funktionale 80S-Ribosom. Die Regulation durch eIF2α-Phosphorylierung wird im nächsten Kapitel beschrieben. aus Sonenberg und Hinnebusch, 2009

1.2 Die Regulation der Translation als Möglichkeit der Genregulation

Die Kontrolle der Translation von mRNAs ist eine der Möglichkeiten, die Genexpression zu regulieren. Die Translationskontrolle ermöglicht im Vergleich zur Transkriptionskontrolle eine schnelle Reaktion auf veränderte zelluläre Bedingungen und ist während der Differenzierung und der Entwicklung eine wichtige Form der Regulation der Genexpression. Prinzipiell kann die Translation einer mRNA durch deren Stabilität, deren poly(A)-Schwanz-

Länge, deren Lokalisierung und durch allgemeine und mRNA-spezifische Mechanismen, welche die Translations-Initiation beeinflussen, reguliert werden.

Fast alle eukaryotischen mRNAs tragen einen poly(A)-Schwanz, an den das cytoplasmatische poly(A) bindende Protein (PABPC) bindet, was mindestens zwei Funktionen vermittelt: Translationskontrolle und die Stabilisierung der mRNA (Kühn und Wahle, 2004). Im regulären *Turn-Over* von mRNAs wird ihr Abbau durch die Entfernung des poly(A)-Schwanzes, die Deadenylierung, eingeleitet. In Säugerzellen ist die Deadenylierung der erste und geschwindigkeitsbestimmende Schritt des mRNA-Abbaus. Für die Translations-Initiation ist der poly(A)-Schwanz nicht unbedingt essentiell, dennoch wird eine polyadenylierte mRNA zumeist effizienter translatiert. Durch die Interaktion des PABPC mit eIF4G wird eIF4G stärker an der mRNA und am *Cap* gebunden und die Assoziation der kleinen ribosomalen Untereinheit wird unterstützt (Kühn und Wahle, 2004).

Während der meiotischen Reifung und der frühen Embryogenese liegt die Funktion des poly(A)-Schwanzes in der Translationsregulation. mRNAs, welche z.B. für *c-mos* oder *Cycline* kodieren, enthalten in der 3'UTR ein oder mehrere cytoplasmatische Polyadenylierungssignale (CPE), welche in der Nähe des nukleären Polyadenylierungssignals lokalisiert sind (Richter, 2000, Wickens *et al.*, 2000). Durch die 3'UTR-Signale wird im Oozytenstadium die Translationsrepression und im Ei die Polyadenylierung und die Translations-Aktivierung vermittelt (Minshall *et al.*, 1999, de Moor und Richter, 1999, Tray *et al.*, 2000). Die Funktion dieser CPEs wird durch die CPE-bindenden Proteine (CPEBs) vermittelt, z.B. CPEB in *Xenopus* (Hake *et al.*, 1998), clam82 in *Spisula* (Walker *et al.*, 1999) oder Orb in *Drosophila* (Lantz *et al.*, 1992, Benoit *et al.*, 2008).

Ein wichtiger Translations-Kontroll-Mechanismus während der Induktion von Stress beruht auf der Phosphorylierung von eIF2. Die Phosphorylierung findet an Ser51 in der α -Untereinheit von eIF2 statt (Hanks und Hunter, 1995, Sudhakar *et al.*, 2000). eIF2 α (P) interagiert als kompetitiver Inhibitor mit seinem GEF eIF2B und inhibiert den GTP-Austausch (Sudhakar *et al.*, 2000). Dies vermindert die Verfügbarkeit von eIF2*GTP zur Ausbildung des ternären Komplexes und reduziert global die Translations-Initiation (Sonenberg und Hinnebusch, 2009).

Es sind vier eIF2 α -Kinasen in Säugerzellen bekannt, die durch verschiedene Stress-Arten aktiviert werden: die durch doppelsträngige RNA aktivierte Kinase (*protein kinase, double stranded RNA-dependent*, PKR), die PKR-ähnliche Endoplasmatisches-Retikulum-Kinase (*PKR-like ER-Kinase*, PERK), der Häm-regulierte Inhibitor (HRI) und die durch Aminosäure-

Mangel induzierte Kinase *general control non-derepressible-2* (GCN2, Sonenberg und Hinnebusch, 2009).

Die Phosphorylierung von eIF2 α ist ursächlich für die Bildung von *Stress-Granules* (Kedersha *et al.*, 1999), durch Stress induzierte granuläre mRNA-haltige Strukturen, die erstmals in hitzegeschockten Tomatenzellen beschrieben wurden (Nover *et al.*, 1989). Bei der Bildung von *Stress-Granules* kommt es zu einer Rekrutierung von TIA-1 und TIAR (T-Zell-internes Antigen 1 und TIA-related) zum Präinitiationskomplex anstelle des ternären Komplexes, welcher sich durch die stress-induzierte Phosphorylierung von eIF2 α nicht mehr ausbilden kann. TIA-1 und TIAR sind typische *Stress-Granule-Marker* (Kedersha *et al.*, 1999) und enthalten zwei RNA-Recognition-Motive (Tian *et al.*, 1991, Kawakami *et al.*, 1992). An der Ausbildung von *Stress-Granules* ist auch das Ras-GAP-SH3-Domänen bindende Protein-1 (G3BP1) beteiligt (Tourriere *et al.*, 2003, Kedersha *et al.*, 2005). Die Rekrutierung spezifischer mRNAs in *Stress-Granules* dient der Regulation ihrer Stabilität und Translation (Anderson und Kedersha, 2002).

Ein zweiter Mechanismus der generellen Translations-Kontrolle wird durch eIF4E-bindende Proteine (4E-BPs) vermittelt. Sie konkurrieren mit eIF4G um dieselbe Interaktionsstelle an eIF4E (Marcotrigiano *et al.*, 1999) und können so die *Cap*-abhängige Translations-Initiation inhibieren. Die Interaktion mit eIF4E wird durch die 4E-BP-Phosphorylierung reguliert: Hypophosphoryliertes 4E-BP interagiert stark mit eIF4E und die Phosphorylierung schwächt die Interaktion (Raught und Gingras, 2007). mTOR (*mammalian target of rapamycin*) ist eine wichtige 4E-BP-Kinase, die durch extrazelluläre Signale wie die Verfügbarkeit von Aminosäuren und den Sauerstoff- und Energie-Status reguliert wird (Sonenberg und Hinnebusch, 2009).

Translation kann auch mRNA-spezifisch reguliert werden. Zum Beispiel wird während der *Drosophila*-Entwicklung das 4E-BP *Cup* durch die Interaktion mit dem Protein *Smaug* zur *nanos*-mRNA (Nelson *et al.*, 2004) und durch die Interaktion mit *Bruno* zur *oskar*-mRNA rekrutiert und verhindert dort durch die Konkurrenz mit eIF4G die Translations-Initiation (Chekulaeva *et al.*, 2006, Nakamura *et al.*, 2004).

Die Bindung des 43S-Präinitiations-Komplexes an eine mRNA kann auch über mRNA-spezifische Struktur- oder Sequenzelemente inhibiert werden. So bindet z.B. das eisenregulatorische Protein (*iron regulatory protein*) IRP1 bei niedriger zellulärer Eisenkonzentration das IRE (*iron response element*) in der 5'UTR der Ferritin-mRNAs. Ferritin ist ein multimeres Protein und dient der zellulären Eisenspeicherung (Torti und Torti, 2002). Die unmittelbare Nähe des IRE-stem loops im 5'UTR der Ferritin-mRNAs zum *Cap*

verhindert nach der Bindung des IRP durch eine sterische Blockierung die Assoziation mit dem 43S-Präinitiations-Komplex, selbst dann, wenn die mRNA einen aktiven eIF4F-Komplex trägt (Gray *et al.*, 1994; Muckenthaler *et al.*, 1998).

In *Drosophila*-Weibchen wird die Bildung des *Dosage-Compensation-Complexes* (DCC) durch das Fehlen einer Untereinheit des Proteins *male specific lethal* (msl) verhindert. Die msl-2-mRNA-Translation wird in weiblichen Fliegen durch das RNA-bindende Protein *Sex-Lethal* reguliert (Gebauer *et al.*, 1998). Dieses bindet Uridin-reiche Sequenzen in der 5' und der 3'UTR der msl-2-mRNA und inhibiert die Translation unabhängig vom *Cap* der mRNA (Gebauer *et al.*, 1999, 2003) durch einen dualen Mechanismus: Während die *Sex-Lethal*-Bindung an die 5'UTR-Elemente der msl-2-mRNA das *Scannen* gebundener Initiations-Komplexe blockiert, inhibiert der 3'UTR-Komplex unter Beteiligung des assoziierten *upstream of N-ras* (UNR)-Homologs die Bindung der 40S-Untereinheit (Beckmann *et al.*, 2005, Abaza *et al.*, 2006, Duncan *et al.*, 2006).

Es sind auch Translations-Inhibitions-Mechanismen bekannt, die die letzte Phase der Initiation, die Assoziation der 60S-Untereinheit zum 48S-Initiations-Komplex, betreffen: Das *Zipcode*-bindende Protein (ZBP1) bindet während der Lokalisierung der β -Actin-mRNA zum Wachstumskonus von Nervenzellen an die 3'UTR der mRNA und inhibiert die Translations-Initiation durch die Blockierung der 80S-Assemblierung (Hüttelmaier *et al.*, 2005).

Mit der Translations-Inhibition der Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX)-mRNA während der roten Blutzellereifung, auf die im folgenden Abschnitt eingegangen wird, wurde erstmalig ein die Assoziation der 60S-Untereinheit betreffender Mechanismus aufgeklärt (Ostareck *et al.*, 1997, 2001). Der Mechanismus der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation stellt die Grundlage der hier vorgelegten Dissertationsschrift dar und wird in Abschnitt 1.4 erläutert.

1.3. Die Reifung roter Blutzellen

Rote Blutzellen, Erythrozyten, sind hochspezialisierte Zellen, deren Aufgabe der Sauerstofftransport von der Lunge in die Gewebe ist. Der Anteil des sauerstoffbindenden Proteins Hämoglobin am Gesamt-Erythrozyten-Protein wird auf 95% geschätzt (Waggoner und Liebhaber, 2003). Zu den morphologischen Charakteristika der Reifung erythroider

Zellen, der Erythropoese, gehören bei Säugern die Ausschleusung des Zellkerns und der Abbau der Mitochondrien.

Die Erythropoese beginnt im Knochenmark, wo die Reifung erythroider Vorläuferzellen zu Proerythroblasten durch Erythropoietin und Interleukine induziert wird. Bereits im Proerythroblasten-Stadium kann Hämoglobinsynthese nachgewiesen werden. In dem darauffolgenden polychromatischen Normoblasten-Stadium kommt die Zellteilung zum Erliegen und es ist eine Kondensierung des Chromatins und die beginnende Transkriptionshemmung zu beobachten.

Der Zellkern wird beim Übergang zum orthochromatischen Normoblasten ausgeschleust (Zucker-Franklin *et al.*, 1988). Die kernlosen Zellen werden als junge Retikulozyten in das Blut entlassen und reifen dort weiter. Die Globin-Synthese kann für weitere 2-3 Tage beobachtet werden.

Im reifen Retikulozyten werden Organellen, zelluläre Membranen und RNAs abgebaut. Der Übergang vom Retikulozyten- zum Erythrozyten-Stadium ist unter anderem durch die Degradation der Mitochondrien charakterisiert, welche durch die in reifen Retikulozyten synthetisierte Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX) eingeleitet wird.

Die r15-LOX katalysiert spezifisch die Dioxygenierung von Phospholipiden der Mitochondrienmembran (Rapoport und Schewe, 1986; Van Leyen *et al.*, 1998; Grüllich *et al.*, 2001). Die bei der Lipoxygenasereaktion gebildeten Hydroxylradikale führen außerdem zur Oxygenierung von Proteinen in den Mitochondrienmembranen (Kühn und Borngräber, 1999; Schewe, 2002). Die r15-LOX-mRNA wird bereits im Knochenmark synthetisiert und in translationsinaktiver Form in *messenger* Ribonukleoprotein-Partikeln (mRNPs) gespeichert (Höhne *et al.*, 1988). Die Inhibition der r15-LOX-mRNA-Translation erfolgt durch die Ausbildung eines mRNA-Protein-Komplexes (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Die Synthese der r15-LOX im reifen Retikulozyten setzt die Aktivierung der Translation der in translationsinaktiven mRNPs gespeicherten r15-LOX-mRNA voraus.

1.4 Die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation durch hnRNP K und hnRNP E1

Die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation erfolgt über eine in der 3'UTR lokalisierte CU-reiche Sequenz, das *differentiation control element* (DICE, Sequenzschema in Abb.

Es wurde gezeigt, dass in einem *in-vitro*-Translationssystem zwei aufeinanderfolgende 19nt lange Sequenzelemente des DICE (2R) für die Inhibition der Translation durch hnRNP K und hnRNP E1 hinreichend sind (Ostareck *et al.*, 1997, 2001), während die Bindung von LOX-BP (Ostareck-Lederer, 1994) bzw. von hnRNP E1 (Reimann *et al.*, 2002) bereits an ein 19nt-Element erfolgt.

HnRNP K und hnRNP E1 inhibieren auch *in vivo*, nach Transfektion der cDNAs in HeLa-Zellen, spezifisch die Translation einer DICE-tragenden Luciferase-Reporter-mRNA, ohne deren Stabilität zu beeinflussen (Ostareck *et al.*, 1997). Die DICE-abhängige Inhibition durch LOX-BP erfolgt unabhängig von der *Cap*-Struktur und dem poly(A)-Schwanz (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994).

Der Mechanismus der DICE-abhängigen Translations-Inhibition konnte durch *in vitro*-Translations-Initiations-Experimente, durch Translations-Experimente mit mRNAs, welche IRESes tragen, und durch *Toe-Print*-Experimente weitgehend aufgeklärt werden.

In Translations-Initiations-Reaktionen in Kaninchenretikulozytenlysat wurde die 80S-Komplex-Bildung an einer mRNA, welche die funktionale 2R-Sequenz in der 3'UTR trug, unter Zugabe der rekombinanten Proteine hnRNP K und hnRNP E1 inhibiert (Ostareck, 1997). Unter Initiationsbedingungen, die die 80S-Bildung inhibieren, blieb die Bildung von 48S-Initiations-Komplexen an einer DICE-tragenden mRNA nahezu unbeeinflusst von hnRNP K und E1 (Ostareck *et al.*, 1997, 2001).

IRESes wurden zuerst als Elemente viraler mRNAs identifiziert, welche zumeist nicht alle während der eukaryotischen Translations-Initiation notwendigen Faktoren benötigen, um Translation zu initiieren (Hellen und Sarnow, 2001). Die Enzephalo-Myocarditis-Virus (EMCV)-IRES ermöglicht die Translations-Initiation unabhängig von eIF4E und dem N-Terminus von eIF4G (Kaminski *et al.*, 1990, Pestova *et al.*, 1996 a,b). Die durch die EMCV-IRES vermittelte Translations-Initiation wurde ebenso durch hnRNP K und hnRNP E1 inhibiert, wenn die Reporter-mRNA ein 3'UTR-DICE trug (Ostareck *et al.*, 1997). Auch die Translations-Initiation, welche durch die *Classical Swine Fever-Virus* (CSFV)-IRES vermittelt wird, konnte durch den 3'hnRNP K/E1-DICE-Komplex inhibiert werden (Ostareck *et al.*, 2001). Diese IRES rekrutiert die kleine ribosomale Untereinheit ohne die Beteiligung der eIFs 4E, 4G, 4A und 4B (Pestova *et al.*, 1998).

Bei Verwendung der *Cricket-Paralysis-Virus*-(CrPV)-IRES war die Translation einer DICE-tragenden mRNA nicht durch die Zugabe von hnRNP K und E1 inhibiert (Ostareck *et al.*, 2001). An dieser IRES erfolgt die Bildung von 80S-Ribosomen unabhängig von allen Initiations-Faktoren (Wilson *et al.*, 2000 a, b). In *Toe-Print*-Experimenten konnte bestätigt

werden, dass die Bildung von 48S-Initiationskomplexen durch den hnRNP K/E1-DICE-Komplex nicht beeinflusst wird. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass sich die ribosomale 40S-Untereinheit bis zum Initiationskodon bewegt (Ostareck *et al.*, 2001). Dort wird die Assoziation der 60S-Untereinheit mit der 40S-Untereinheit inhibiert.

In Gegenwart des an der 3'UTR der mRNA gebildeten hnRNP K/E1-Komplexes werden also weder die Bindung der ribosomalen 40S-Untereinheit an das *Cap*, noch das *Scannen* zum Initiations-Kodon inhibiert. Erst der Schritt der Assoziation der 60S-Untereinheit mit der bereits am Initiations-AUG lokalisierten 40S-Untereinheit wird blockiert (Ostareck *et al.*, 2001). Der an der mRNA-3'UTR gebildete hnRNP K/E1-DICE-Komplex verhindert die Bildung des 80S-Ribosoms unabhängig vom *Cap* oder dem Poly(A)-Schwanz der mRNA (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Die Funktion der eIFs 4E, 4G, 4A und 4B wird durch den Inhibitionsmechanismus nicht beeinflusst (Ostareck *et al.*, 2001). Der Angriffspunkt des Inhibitionsmechanismus konnte also auf den letzten Schritt der Translations-Initiation, der Assoziation der 60S-Untereinheit mit dem am Initiationskodon arretierten 48S-Initiations-Komplex, eingegrenzt werden und könnte die GTP-hydrolysierenden Faktoren eIF2 und eIF5B betreffen. Auch die Einbeziehung weiterer noch nicht identifizierter Faktoren, welche die 3'-5'-Interaktion vermitteln, ist nicht ausgeschlossen (Ostareck *et al.*, 2001; Gebauer *et al.*, 2001).

Die Isolation des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Komplexes aus einem erythroiden Zell-System und die Analyse seiner Komplex-Komponenten war eine zentrale Aufgabenstellung der vorgelegten Dissertationsschrift.

Dafür war die Etablierung eines induzierbaren erythroiden Zellsystems notwendig, welches die Expression von hnRNP K und hnRNP E1 während der roten Blutzellreifung (Abb. 1.7.1) und die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation rekapituliert. Aus diesen Zellen wurden Extrakte präpariert, in denen die DICE-abhängige Translations-Inhibition untersucht wurde.

1.5 Die Struktur von hnRNP K und hnRNP E1

hnRNP K und hnRNP E1 enthalten jeweils drei hnRNP-K-Homologie (KH)-Domänen. KH-Domänen wurden erstmals in hnRNP K als konservierte Region einer Länge von 45-55 Aminosäuren identifiziert, welche in diesem Protein dreimal vorliegt (Siomi *et al.*, 1993a; Gibson *et al.*, 1993). Später wurde die Länge aufgrund von Strukturanalysen und RNA-

Bindungsexperimenten auf 65-70 Aminosäuren festgelegt (Dejgaard und Leffers, 1996; Musco *et al.*, 1996).

Durch NMR-spektroskopische Untersuchungen der sechsten KH-Domäne von Vigilin, einem Protein mit 15 KH-Domänen, konnte die typische Struktur von KH-Domänen erstmals aufgeklärt werden (Musco *et al.*, 1996). Die dreidimensionale Struktur besteht aus drei α -Helices und drei β -Faltblättern in der Reihenfolge $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$. Typisch ist der GXXG-Loop, der die erste und die zweite α -Helix verbindet und von dem auf NMR- und Kristallstrukturdaten basierend angenommen wird, dass er ein spezifisches Erkennungsmotiv bildet. Die hydrophoben Aminosäuren der β -Faltblätter befinden sich im Inneren der Domäne und bilden zusammen mit Aminosäuren der α -Helices den hydrophoben Kern der KH-Domäne (Musco *et al.*, 1996; Backe *et al.*, 2004). In Abbildung 1.5.1 ist die auf Kristallstrukturanalysen basierende Struktur der dritten KH-Domäne von hnRNP K dargestellt (Backe *et al.*, 2004).

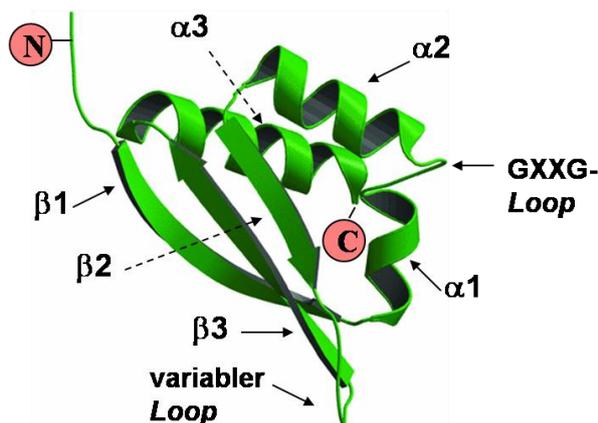


Abb. 1.5.1. Kristallstruktur der KH3 von hnRNP K (aus Backe *et al.*, 2004)

Typisch ist die $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ -Sekundärstruktur der KH-Domänen und der GXXG-Loop, der die Helices $\alpha 1$ und $\alpha 2$ miteinander verbindet.

Desweiteren besitzt hnRNP K ein N-terminal gelegenes *nuclear localisation signal* (NLS, Michael *et al.*, 1995) und ein hnRNP K-spezifisches *nuclear shuttling signal* (KNS) (vergl. Abb. 1.5.2), das den bidirektionalen Transport durch die Kernporen vermittelt (Michael *et al.*, 1997). Die Serin-Phosphorylierung von hnRNP K durch die extrazellulär regulierte Kinase (Erk) führt zur Akkumulation des Proteins im Cytoplasma (Habelhah *et al.*, 2001). Möglicherweise bindet hnRNP K im Zellkern an die r15-LOX-mRNA, die dann im Komplex mit hnRNP K ins Cytoplasma transportiert wird.

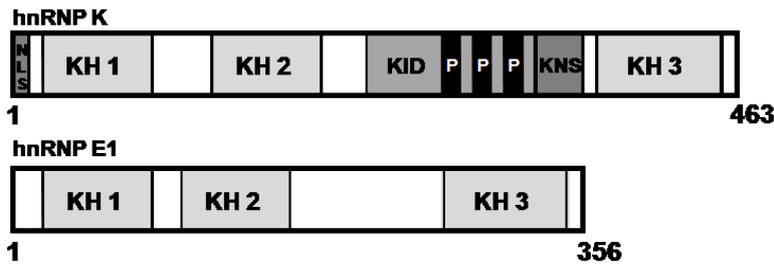


Abb. 1.5.2 Struktur der KH-Domänen-Proteine hnRNP K und hnRNP E1

HnRNP K und hnRNP E1 sind durch drei hnRNP-K-Homologie (KH)-Domänen gekennzeichnet. Zwei der KH-Domänen sind N-terminal, die dritte ist C-terminal lokalisiert. HnRNP K weist außerdem ein N-terminales *nuclear localisation signal* (NLS), sowie ein hnRNP K-spezifisches *nuclear shuttling signal* (KNS) auf. Für die Regulation der Funktion von hnRNP K ist insbesondere die *kinase interaction domain* (KID) von Bedeutung, in der sich drei Prolin-reiche Motive (P) befinden, durch die Interaktionen mit anderen Proteinen erfolgen.

Die Bindung der KH-Domänen von hnRNP K und hnRNP E1 an Polyribonukleotide wurde in *dot-blot*-Experimenten untersucht (Dejgaard und Leffers, 1996). Die *in-vitro*-poly(rC)-Bindungsaktivität von hnRNP K konnte der dritten KH-Domäne des Proteins zugeordnet werden, während die erste und die dritte KH-Domäne in hnRNP E1 poly(rC) binden. Die DICE-Bindung von hnRNP K konnte ebenso der dritten KH-Domäne von hnRNP K und der ersten und dritten KH-Domäne von hnRNP E1 zugeordnet werden (Harnisch, 2004; Messias *et al.*, 2006).

1.6 Die Phosphorylierung von hnRNP K durch die Tyrosinkinase c-Src hat eine zentrale Funktion bei der Aktivierung der r15-LOX-mRNA-Translation

Die r15-LOX initiiert als ein Schlüsselenzym der erythroiden Differenzierung den Mitochondrienabbau als einen der letzten Reifungsschritte. Für die Synthese der r15-LOX im reifen Retikulozyten ist eine Dissoziation des translations-inhibitorischen 3'UTR-Komplexes von der kodierenden mRNA die Voraussetzung. Es konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src in transfizierten HeLa-Zellen zu einer Derepression der Reporter-mRNA-Translation führt (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Mitglieder der Src-Familie sind Tyrosinkinasen, die die Übertragung des γ -Phosphates von ATP auf spezifische Tyrosine ihrer Substratpeptide katalysieren.

Enzymatisch aktives c-Src hat eine zentrale Funktion zum Beispiel bei der Stimulation von DNA-Synthese, bei der Zellzyklusregulation und bei Reifungs- und

Differenzierungsprozessen (Brown und Cooper, 1996; Burnham *et al.*, 2000; Thomas und Brugge, 1997). Src ist ein Protooncogen; konstitutiv aktives Src führt zu Zelltransformation (Kato *et al.*, 1986).

Die Src-Aktivität wird durch Konformationsänderungen in der Tertiärstruktur und über posttranslationale Modifikation reguliert. Das Protein besteht aus einer N-terminalen Src-Homologie (SH) 3-Domäne, gefolgt von einer SH2-Domäne und einer im C-terminalen Bereich gelegenen Kinase-Domäne. Das inaktive Enzym weist eine geschlossene Konformation auf, bei der die SH2-Domäne das phosphorylierte C-terminal gelegene Tyrosin (Y527) bindet (Roussel *et al.*, 1991, Xu *et al.*, 1999) und die SH3-Domäne mit der Polyprolin-Type II-Helix der Linkerregion zwischen SH2- und Kinase-Domäne interagiert (Xu *et al.*, 1997, 1999; Williams *et al.*, 1997). Die Störung dieser deaktivierenden intramolekularen Interaktionen führen zur Aktivierung der Kinase. Peptide bzw. Proteine mit Polyprolin-Typ-II-Helices wie zum Beispiel das virale Nef binden SH3-Domänen (Saksela *et al.*, 1995). Der stimulierende Effekt dieser Interaktion auf die Aktivität wurde u.a. für Hck, einen Vertreter der Src-Familie, demonstriert (Moarefi *et al.*, 1997). Auch die Verdrängung der regulierenden C-terminalen Phosphotyrosin-Bindung an die SH2-Domäne kann die Src-Aktivierung induzieren (Brown und Cooper, 1996). Für das Erlangen der vollständigen enzymatischen Aktivität ist die Transphosphorylierung des Tyrosins 416 in der Kinasedomäne wichtig (Johnson *et al.*, 1996).

HnRNP K enthält drei prolinreiche Domänen, die mit isolierten SH3-Domänen der Src-Familien-Kinasen c-Src, Fyn und Lyn interagieren können (van Seuning *et al.*, 1995; Weng *et al.*, 1994, Taylor und Shalloway, 1994) und wird *in vitro* durch Src und Lck phosphoryliert, was wiederum die Bindungseigenschaften von hnRNP K an poly(C) und die Wechselwirkung mit interagierenden Proteinen modifiziert (Ostrowski *et al.*, 2000). Die Bindung an ein natürliches Substrat, das DICE der r15-LOX-mRNA, ist durch die von c-Src katalysierte hnRNP K-Phosphorylierung drastisch reduziert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

HnRNP K aktiviert c-Src sowohl nach der Cotransfektion in HeLa-Zellen als auch als rekombinantes Protein *in vitro* (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Aktivierung von c-Src führt zur Phosphorylierung von hnRNP K und endogener HeLa-Proteine bzw. zur *in vitro*-Phosphorylierung des c-Src-Substrates Enolase (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Interaktion von hnRNP K und c-Src in Immunopräzipitations-Experimenten wird nicht durch Mutationen, die die c-Src-Aktivität betreffen, beeinflusst (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Nach Cotransfektion von c-Src mit einer hnRNP K-Variante, deren prolinreiche Domänen deletiert sind, aktiviert hnRNP K c-Src nicht mehr und die Phosphorylierung von hnRNP K

ist aufgehoben, jedoch interagiert c-Src weiterhin mit hnRNP K in der Immunopräzipitation (Adolph *et al.*, 2007). Dies zeigt die Bedeutung der prolinreichen Domänen in hnRNP K für die c-Src-Aktivierung. Allerdings ist diese aktivierungs-inaktive Variante von hnRNP K, deren prolinreichen Domänen mutiert sind, weiterhin Substrat einer konstitutiv aktiven Variante von c-Src (Adolph *et al.*, 2007).

hnRNP K und c-Src weisen also mehrere Interaktionsebenen auf: 1.) Die prolinreichen Domänen in hnRNP K können, auch als isoliertes Peptid (aa285-318), c-Src aktivieren. 2.) hnRNP K wird durch aktives c-Src unabhängig von den prolinreichen Domänen phosphoryliert, es findet also eine Interaktion von Substrat-Tyrosinen in hnRNP K mit der Kinase-Domäne statt. 3.) Auch nicht aktiviertes c-Src interagiert mit einem von den prolinreichen Domänen verschiedenen Bereich in hnRNP K, welcher auf die Aminosäuren 216-226 eingegrenzt werden konnte (Adolph *et al.*, 2007).

Die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K wird durch die Aktivität der Protein-Arginin-Methyl-Transferase 1 (PRMT1) kontrolliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). PRMT 1 katalysiert die asymmetrische Dimethylierung von Argininen.

Als PRMT1-Substrat-Arginine in hnRNP K wurden R256, R258, R268, R287, R296, R299 und R303 identifiziert, wobei die Arginine 256, 258, 268, 296 und 299 in massenspektrometrischen Analysen quantitativ asymmetrisch dimethyliert vorlagen. R303 war zu 33% asymmetrisch dimethyliert und R287 zu weniger als 10% monomethyliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Arginine befinden sich im Bereich der prolinreichen Domänen von hnRNP K. Die asymmetrische Dimethylierung dieser Arginine verhindert die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K und vermindert die Interaktion der beiden Proteine (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

Die *in vitro*-Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src reduziert die DICE-Bindung im *North-Western-Blot*-Experiment. Dieser Effekt ist durch Zugabe einer λ -Phosphatase reversibel (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K wurde durch Zugabe eines c-Src-spezifischen Inhibitors, PP2, inhibiert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Nach der Cotransfektion von hnRNP K, c-Src und einer Luciferase-Reporter-cDNA reduziert die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K und die resultierende Phosphorylierung von hnRNP K den inhibitorischen Effekt von hnRNP K auf die Expression der Luciferase (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K und die hnRNP K-Phosphorylierung durch aktiviertes c-Src haben einen direkten Effekt auf die DICE-Bindungsaktivität und damit auf

den translationsinhibitorischen Effekt von hnRNP K. Die *Western Blot*-Analyse von Erythroblasten, Retikulozyten und Erythrozyten zeigte, dass c-Src erst im Retikulozyten-Stadium nachweisbar ist (Abb. 1.7.1, Ostareck-Lederer und Ostareck, unpubliziert). Inzwischen konnte gezeigt werden, dass auch die Translation der c-Src-mRNA in nicht-differenzierten erythroiden Zellen reprimiert ist und durch hnRNP K reguliert wird (Naarmann *et al.*, 2008).

hnRNP E1 weder Aktivator noch Substrat von c-Src (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). In *yeast two hybrid*- und *GST-pulldown*-Experimenten wurde gezeigt, dass hnRNP K und hnRNP E2 miteinander und mit anderen hnRNPs oligomerisieren (Kim *et al.*, 2000). Es wird angenommen, dass die Aufhebung der DICE-Bindung von hnRNP K als Folge der Phosphorylierung durch c-Src bewirkt, dass auch hnRNP E1 vom DICE dissoziiert (Ostareck-Lederer und Ostareck, 2004).

HnRNP K enthält 17 Tyrosine, von denen durch massenspektrometrische Analysen sechs als Substrate einer *in vivo*-Phosphorylierung durch c-Src identifiziert wurden: Y72, Y225, Y230, Y234, Y236 und Y380 (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Diese Tyrosine sind jedoch nicht für die Regulation der DICE-Bindung, und damit der r15-LOX-Translation verantwortlich. In HeLa-Zell-Transfektions-Experimenten mit c-Src und einer Variante von hnRNP K, in welcher diese sechs Tyrosine gegen Phenylalanine ausgetauscht wurden, konnte weiterhin eine hnRNP K-Phosphorylierung detektiert werden. Dies weist auf mindestens ein weiteres Substrat-Tyrosine in hnRNP K hin. Der Austausch der sechs identifizierten Tyrosine in hnRNP K gegen Aspartat, der durch die Einführung der negativen Ladung als eine Pseudophosphorylierung fungieren kann, hatte keine funktionale Konsequenz auf die DICE-bindende und translations-inhibitorische Eigenschaft des Proteins (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Um dies erklären zu können, müsste mindestens ein weiteres Tyrosin in hnRNP K durch c-Src phosphoryliert werden, welches dann auch die funktionale Konsequenz der Translations-Derepression vermittelt.

Die DICE-bindende Aktivität von hnRNP K konnte in *UV-crosslink*-Experimenten der dritten KH-Domäne (KH3) des Proteins zugeordnet werden (Harnisch, 2004; Messias *et al.*, 2006). Innerhalb der KH-Domäne 3 von hnRNP K befinden sich zwei weitere Tyrosine: Y449 und Y458 (Abb. 1.6.1).

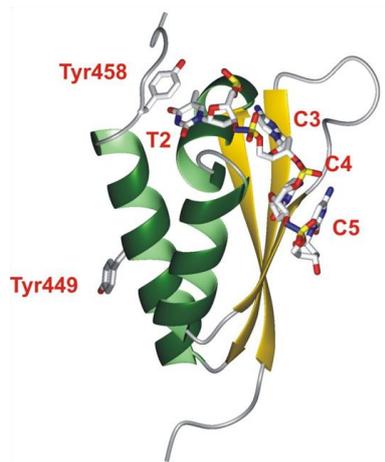


Abb. 1.6.1. Kristallstruktur der KH-Domäne3 von hnRNP K im Komplex mit einzelsträngiger DNA

(Backe *et al.*, 2005)

Gezeigt sind die Nukleotide TCCC der Promotorsequenz von c-myc. Die Seitenketten der beiden Tyrosine sind eingezeichnet.

Das nach Trypsin-Verdau von hnRNP K resultierende, diese Tyrosine enthaltende Peptid war in der massenspektrometrischen Analyse nicht identifizierbar. Es ist also nicht ausgeschlossen, dass auch eines der beiden nahe dem C-Terminus von hnRNP K liegenden Tyrosine ein weiteres c-Src-Substrat darstellt.

Die Kristallstruktur der KH-Domäne 3 von hnRNP K zeigt, dass Y458, nicht aber Y449 in der Nukleinsäure-bindenden Region liegt. Die Phosphorylierung dieses Tyrosins bedeutet die Einführung einer negativen Ladung und könnte die Interaktion mit Nukleinsäuren beeinflussen. Die möglichen Eigenschaften von Y449 und Y458 als c-Src-Substrate und die Konsequenz ihrer Phosphorylierung auf die DICE-bindende und translations-inhibitorische Eigenschaft von hnRNP K wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht. Dafür wurden die KH3-Domäne und Peptidvarianten hergestellt, bei denen beide Tyrosine durch Aspartat ausgetauscht vorlagen und der Einfluss des Phospho-*Mimiks* auf die DICE-Bindung untersucht. Der Einfluss dieser negativen Ladung im rekombinanten hnRNP K auf die DICE-Bindung und die Translations-Inhibition wurde ebenfalls getestet.

1.7 Zielstellung

Im Rahmen dieser Promotionsarbeit sollte analysiert werden, ob die beiden Tyrosine Y449 und Y458 in der für die DICE-Bindung verantwortliche KH3-Domäne in hnRNP K Substrat

der Tyrosin-Kinase c-Src sind und ob deren potentielle Phosphorylierung einen Einfluss auf die DICE-Bindung der KH3 und des Gesamtproteins hnRNP K hat.

Ein weiterer Schwerpunkt war die Etablierung eines induzierbaren erythroiden Zellsystems. Dafür wurden humane K562 und murine MEL (murine Erythro-Leukämie)-Zellen verwendet. Vergleichende *Western Blot*-Analysen von aus Knochenmark isolierten Erythroblasten, aus anämischen Kaninchen isolierten Retikulozyten und Erythrozyten zeigten, dass sich die Expression der für die r15-LOX-mRNA-Translationskontrolle relevanten Proteine hnRNP K, hnRNP E1, c-Src und PRMT1 während der Erythropoese verändert (Abb. 1.7.1, Ostareck-Lederer und Ostareck, unpubliziert).

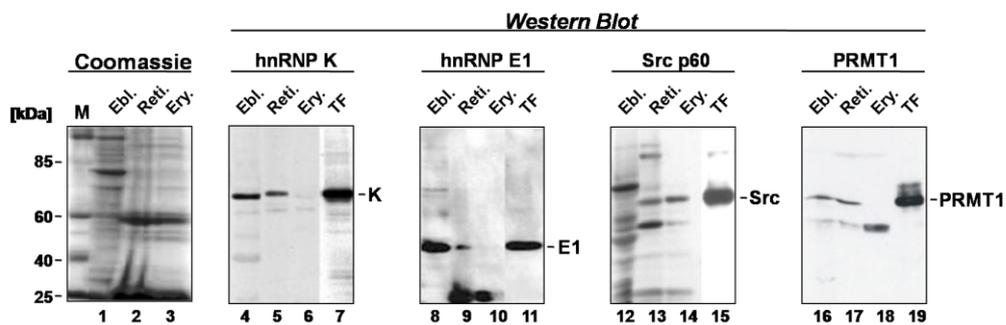


Abb. 1.7.1 Die Expression von hnRNP K (K), hnRNP E1 (E1), Src und PRMT1 während der Erythropoese. Vergleich von aus Knochenmark isolierten Erythroblasten (Ebl), aus anämischen Kaninchen isolierten Retikulozyten (Reti.) und Erythrozyten (Ery.) K=hnRNP K, E1=hnRNP E1; TF=HeLa-Zell-Lysat nach Transfektion mit hnRNP K, hnRNP E1, c-Src oder PRMT1, *Western Blot*

Die Induktion der erythroiden Reifung der MEL und K562-Zellen sollte diese Expressions-Muster rekapitulieren und durch dieses charakterisiert werden. Initiale Experimente zur induzierten erythroiden Reifung von MEL-Zellen wurden im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführt. Sowohl aus MEL-Zellen als auch aus nicht induzierten und gereiften K562-Zellen wurden cytoplasmatische Extrakte präpariert und zur Etablierung von *in vitro*-Translations-Systemen verwendet.

Ein wesentlicher Aspekt war die Charakterisierung dieser *in vitro*-Translations-Systeme hinsichtlich der DICE-abhängigen Translations-Regulation. Da festgestellt werden konnte, dass Extrakte aus den erythroiden Zell-Linien die DICE-abhängige Translations-Inhibition vollständig rekapitulieren, wurden sie zur Isolation und Analyse des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes verwendet. Dies sollte der Identifizierung weiterer Proteinfaktoren dienen, die mit dem translations-inhibitorischen Komplex interagieren und möglicherweise am Mechanismus der r15-LOX-mRNA-Translations-Regulation beteiligt sind.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien, Geräte

Chemikalien

| | |
|--|---------------------|
| [α - ³² P]-UTP (10 μ Ci/ μ l) | Amersham |
| Acetonitril | Merck |
| Acrylamid/Bisacrylamid | Roth |
| Agarose | Serva |
| Ameisensäure | Merck |
| Aminosäuren | Sigma |
| Ammoniumacetat | Merck |
| Ammoniumchlorid | Merck |
| Ammoniumperoxodisulfat | Merck |
| Ammoniumthiocyanat | Merck |
| Ampicillin, Natriumsalz | Roth |
| Antipain Protease-Inhibitor | Roche |
| Big-Dye Terminator- <i>cycle-sequencing</i> -Kit | Applied Biosystems |
| β -Mercaptoethanol | Fluka |
| Borsäure | Roth |
| Bradford-Reagenz | Bio-Rad |
| Bromphenolblau | Merck |
| Calciumchlorid | Merck |
| Cap-Analagon | Kedar |
| Casein, hydrolysiert | Life Technologies |
| Chloroform | Merck |
| Coomassie-Brillantblau | Serva |
| Cycloheximid | Sigma |
| Desoxyribonukleotide | Roche |
| DMEM (<i>dulbecco's modified eagle medium</i>) | Gibco |
| DMSO | Merck |
| DNA-Standard 50bp | New England BioLabs |
| DNA-Standard 1kb | Invitrogen |
| DTT | Gerbu |
| EDTA (TitriplexIII) | Merck |
| EGTA | Merck |
| Essigsäure | Roth |
| Ethanol | Roth |
| Ethidiumbromid | Roth |
| Formaldehyd | Merck |
| Formamid | Merck |
| [γ - ³² P]-ATP (10 μ Ci/ μ l) | Amersham |
| Glukose | Merck |

| | |
|---|--------------------------|
| Glutardialdehyd | Merck |
| Glutathion | Merck |
| Glycerin | Roth |
| Glycin | Merck |
| Glykogen | Roche |
| GMP-PNP | Sigma |
| Guanidinthiocyanant | Merck |
| Hämin (bovines) | Sigma |
| Heparin | Roche |
| HEPES | Gerbu |
| HRP-System | PIERCE/Thermo Scientific |
| Imidazol | Merck |
| IPTG | Peqlab |
| Isopropanol | Roth |
| Kaliumacetat | Merck |
| Kaliumchlorid | Roth |
| Kaliumdihydrogenphosphat | Merck |
| Kanamycin | Roth |
| Kreatinphosphat | Sigma |
| LB-Medium (Lauria Broth) | Roth |
| Leupeptin | Roche |
| Magnesiumacetat | Merck |
| Magnesiumchlorid | Merck |
| Magnesiumsulfat | Merck |
| MES | Roth |
| Methanol | Roth |
| Natriumacetat | Merck |
| Natriumchlorid | Roth |
| Natriumdodecylsulfat | Serva |
| Natriumhydrogenphosphat | Merck |
| Nonidet P40 <i>substitute</i> | Fluka |
| NuPAGE LDS Probenpuffer (4x) | Invitrogen |
| NuPAGE reduzierendes Agenz (10x) | Invitrogen |
| Oligonukleotide (Primer) | Invitrogen |
| Paraformaldehyd (Accustain) | Sigma |
| Pefabloc SC | Roche |
| Penicillin-Streptomycin-Mix | Gibco |
| Pepstatin | Roche |
| Phenol | Roth |
| PMSF | Roth |
| Poly-L-Lysin | Sigma |
| Prolong Gold (mit DAPI-Farbstoff) | Invitrogen |
| Proteinmarker PAGE RULER | Fermentas |
| Proteinmarker SDS-6H | Sigma |
| <i>Benchmark pre-stained protein ladder</i> | Invitrogen |

| | |
|--------------------------------------|-------------------|
| Ribonukleotide | Roche, Fermentas |
| RPMI-Medium | Gibco |
| Roti-Quant (Bradford-Lösung) | Roth |
| 23S-rRNA (<i>E.coli</i>) | Roche |
| ³⁵ S-Methionin (10μCi/μl) | Perkin Elmer |
| Saccharose | Merck |
| Salzsäure | Merck |
| Sephadex G50 | Amersham |
| Silbernitrat | Merck |
| siRNAs | MWG Biotech AG |
| Super Signal | Thermo scientific |
| TEMED | Merck |
| Tetracyclin | Merck |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | Merck |
| Triton X100 | Merck |
| tRNA (Hefe) | Roche |
| Tween 20 | Merck |

Sekundäre Antikörper

| | |
|-------------------------------|---------------|
| <i>α-chicken</i> -HRP | Promega |
| <i>α-goat</i> -HRP | Santa Cruz |
| <i>α-guinea pig</i> -Alexa488 | Invitrogen |
| <i>α-mouse</i> -HRP | GE healthcare |
| <i>α-rabbit</i> -Cy3 | Dianova |
| <i>α-rabbit</i> -HRP | GE healthcare |

Enzyme

| | |
|-------------------------------------|---------------------|
| Alkalische Phosphatase | Roche |
| c-Src | Biomol |
| GoTaq DNA Polymerase | Promega |
| Mikrokokkus-Nuclease | Fermentas |
| Kleenow-Fragment der DNA-Polymerase | New England BioLabs |
| Kreatinkinase | Sigma |
| Pfu-Turbo-DNA-Polymerase | Stratagene |
| Pfu-Polymerase | Fermentas |
| Restriktionsendonukleasen | New England BioLabs |
| Reverse Transkriptase M-MuLV | Promega |
| Ribolock RNase Inhibitor | Fermentas |
| RNase A | Roche |
| RNase T1 | Roche |
| RNasin RNase Inhibitor | Promega |
| RQ1-DNase | Promega |
| TEV-Protease | Invitrogen |
| T3-RNA-Polymerase | Stratagene |

| | |
|---|-------------------------|
| T4-DNA-Ligase | New England BioLabs |
| T4-Polynukleotid-Kinase | New England BioLabs |
| T7-RNA-Polymerase | Stratagene |
| <u>Plasmide</u> | |
| Plasmid pBSII-KS | Stratagene |
| Plasmid pBSII-SK | Stratagene |
| Plasmid pGEX-4T-1 | Promega |
| Plasmid pET-16b | Novagen |
| Plasmid pET-M11 | EMBL |
| <u>Verbrauchsmaterialien/Kits</u> | |
| Amicon Zentrifugationsfilter | Millipore |
| BCA | Thermo Scientific |
| Bio-Rad Säulchen | Bio-Rad |
| Chromatographie-Säulen | Bio-Rad |
| Dialyseschläuche | Serva |
| Chromaspin-100 | Takara Clontech |
| GSH-Sepharose 4B | GE healthcare |
| Megascript (T3/T7) | Ambion |
| MagneGST-Partikel | Promega |
| Nitrocellulose-Membran | Schleicher und Schüll |
| Ni-NTA-Agarose | Qiagen |
| NuPAGE Mini-Gel und Puffer | Invitrogen |
| Plasmid Midi Kit | Qiagen |
| Plasmid Mini Kit | peqlab |
| Plus One <i>silver staining Kit</i> | GE Healthcare/ Amersham |
| PP-Röhrchen, 12, 15 und 50 ml | Greiner |
| Protein-A-Sepharose | Amersham |
| PVDF-Transfermembran | Fisher Scientific |
| QIAprep [®] -Spin Miniprep Kit | Qiagen |
| QIAEX [®] -Gel Extraction Kit | Qiagen |
| QIAquick [®] -PCR-Purification-Kit | Qiagen |
| Röntgenfilm, Kodak | Sigma |
| Sephadex G50 | GE healthcare |
| TranscriptAid T7 | Fermentas |
| Zentrifugationsröhrchen Polyallomer | Beckmann |
| <u>Geräte</u> | |
| Axiovert 200M-Fluoreszenzmikroskop | Zeiss |
| ESI-Q-TOF-Massenspektrometer | Ultima |
| FPLC | Pharmacia |
| GenePulser II | Bio-Rad |
| <i>Liquid Scintillation Analyzer</i> | Packard |
| PCR-Gerät Trio-Thermoblock | Biometra |

| | |
|--|--------------------|
| Phosphoimager Storm 860 | Molecular Dynamics |
| Schüttler Unitron | Infors |
| SpeedVac | Heraeus |
| Thermomixer | Eppendorf |
| Thoma-Haemocytometer | Marienfeld |
| Ultrazentrifugations-Rotoren SW40Ti/SW41Ti | Beckmann |
| UV-Lampen (254nm, 312nm) | Intas |
| Vortex, Genie-2 | Fisher |
| Waagen | Omnilab |
| Zentrifugen Tischzentrifuge 5810R | Eppendorf |
| Biofuge pico | Heraeus |
| Avanti J-25 | Beckmann |
| Ultrazentrifuge | Beckmann |

2.2 *E. coli*-Stämme: Transformation kompetenter Zellen

Für gentechnische Arbeiten wurden die *E. coli*-Stämme XL1blue zur Plasmidvermehrung und BL21-DE3 zur Proteinexpression verwendet. Chemokompetente Zellen wurden nach Protokoll 25 in Kapitel 1 (Sambrook und Russel, 2001) hergestellt und transformiert. Anstelle von SOC-Medium wurde LB-Medium verwendet.

2.3 Plasmide und deren Klonierung

Plasmide für die *in vitro*-Transkription

Die cDNA der vollständigen r15-LOX-mRNA aus Kaninchen (2589nt, Kühn *et al.*, 1993) wurde bereits in pBSII KS kloniert (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994), ebenso die für ein verkürztes LOX-Protein kodierende Δ -LOX-mRNA (Aminosäuren 1-262) ohne 3'UTR (Reimann *et al.*, 2002).

Die für CAT (Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) kodierenden Plasmide pGEM-CAT-A₀, -CAT-A₇₂, -CAT-10R-A₀, -CAT-10R-A₇₂ wurden von Antje Ostareck-Lederer kloniert und lagen bereits vor. Die humane 3'UTR-Sequenz der r15-LOX-mRNA wurde für die Klonierung in pGEM-CAT-h3'UTR-A₇₂ (CAT-h3'-A₇₂) aus pBSII KS-h-LOX (Sigal *et al.*, 1988) durch PCR mit den hr15-LOX-3'UTR-Primern (Tab. 2.3.1) amplifiziert und als *NotI*-

XhoI-Fragment nach der entsprechenden Spaltung zur Entfernung der 10R-Sequenz in den Vektor für CAT-10R-A₇₂ ligiert. Weiterhin wurde die β -globin-5'leader-Sequenz aus dem Plasmid pBSII KS-globin (Hellen *et al.*, 1993) mit *XhoI* entfernt und nach Kleenow-Verdau in beiden Orientierungen in das Plasmid pGEM-CAT-A₀, welches nach *PstI*-Linearisierung ebenfalls mit dem Kleenow-Fragment (*New England BioLabs*) verdaut wurde, ligiert. Es entstanden pGEM-CAT- β 5'L-A₀ und pGEM-CAT- β 5'Lr-A₀.

Die für die *in vitro*-Translations-Initiations-Experimente und für die GRNA eingesetzten Plasmide wurden so konstruiert, dass die resultierenden mRNAs für ein artifizielles Peptid mit der Sequenz MDYKDDDDKPAVAAALELVDPGPEEGPAMAGPEEGP kodieren und innerhalb des ORFs zwei boxB-stem-loops tragen. Hierfür wurde zunächst oligo(dA)₃₄ mit oligo(dT)₃₄ hybridisiert und in die *HincII*-Stelle von pBSII KS ligiert. Dann wurde das *BamHI*-Fragment, welches für die beiden boxB-stem-loops kodiert, in die *BamHI*-Stelle ligiert. Auch hierfür wurden wieder zwei Oligonukleotide (Tab. 2.3.1) hybridisiert; es resultierte pBSII KS-boxB-A₃₄. Nachfolgend wurde die authentische 5'UTR der Kaninchen-r15-LOX-mRNA inklusive einer Kozak-Sequenz und dem FLAG-Peptid als Hybrid mit *SacII*-Überhängen in die *SacII*-Stelle von pBSII KS-boxB-A₃₄ kloniert, es resultierte pBSII KS-LOX5'UTR-boxB-A₃₄ (LBA). Dieses pBSII KS-LBA-Plasmid diente zur Transkription von sORF-ctrl für die *in vitro*-Translations-Initiations-Experimente. Es wurde auch verwendet, um in die *EcoRI*-Stelle bzw. die *EcoRV*-Stelle 3'UTR-Elemente zu klonieren. Die NR-Sequenz wurde als *EcoRI*-Fragment per PCR aus pBSII SK-NR (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) amplifiziert und nachfolgend in pBSII KS-LBA ligiert; es resultierte pBSII KS LBNA. Das DICE wurde aus SK 241 (pBSII SK-DICE, Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) durch *PstI* und *BamHI* ausgeschnitten und nach Kleenow-Verdau in die *EcoRV*-Stelle von LBA ligiert. Das resultierende pBSII KS-LBDA diente auch als Vektor zur *in vitro*-Synthese von sORF-DICE für die *in vitro*-Translations-Initiations-Studien.

Zur Klonierung weiterer vier boxB-Elemente wurden vier Oligonukleotide generiert, welche nach der Hybridisierung in zwei Fragmenten resultierten, die jeweils zwei boxB-Sequenzen enthielten. Das 5'-Fragment (*PstI*-boxB3-4) trug einen 5'-*PstI*-Überhang, das 3'-Fragment (boxB5-6-*PstI*) einen 3'-*PstI*-Überhang. Die jeweiligen anderen Überhänge enthielten keine Restriktions-Schnittstelle, konnten aber auch miteinander hybridisieren. Beide Fragmente wurden gemischt und nach der Ligation mit *PstI* verdaut. Das resultierende *PstI*-Fragment wurde in die *PstI*-Stelle der Plasmide pBSII KS LBA, pBSII KS LBDA und pBSII KS LBNA kloniert, es resultierten LBBBA, LBBBDA und LBBBNA. Zur Überprüfung der GRNA-Spezifität wurde noch eine RNA ohne boxB-stem-loops benötigt. Hierfür wurde aus dem

Plasmid pBSII KS LBDA die boxB-Sequenz durch *BamHI* entfernt, es resultierte pBSII KS LDA.

pBSII KS-globin (Hellen *et al.*, 1993), pBSII SK 241 (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) und pBSII SK- α 2-globin-3'UTR dienten der *in vitro*-Transkription des β -globin-5'leader, des DICE und der α 2-globin-mRNA-3'UTR. Zur Herstellung pBSII SK- α 2-globin-3'UTR wurde die 3'UTR aus pSP64- α -globin (Wang *et al.*, 1995) als *EcoRI*-Fragment per PCR amplifiziert (Tab. 2.3.1) und in pBSII SK kloniert.

Plasmide für die Expression in *E.coli*

Die Plasmide pET16b-hnRNP K, pET16b-hnRNP E1 und pET16b-hnRNP E2, welche für die heterologe Expression in *E.coli* zur Synthese von His-hnRNP K und His-hnRNP E1/-E2 verwendet wurden, lagen bereits vor. Die cDNAs von hnRNP K und hnRNP E1 wurden als *XhoI-CelIII*-Fragment aus einer HeLa-Zell-Bibliothek durch PCR amplifiziert und in pET16b ligiert (Ostareck *et al.*, 1997). Analog dazu wurde die cDNA von hnRNP E2 kloniert (Ostareck-Lederer). Die cDNA, welche für die Aminosäuren 385-463 und damit für die dritte KH-Domäne von hnRNP K kodiert, wurde als *NdeI-XhoI*-Fragment in pETM-11 kloniert (Backe *et al.*, 2005). Die Mutationen der Tyrosine Y449 und Y458 in der dritten KH-Domäne von hnRNP K wurden durch zielgerichtete Mutagenese von Dirk Ostareck und Nadine Flach mit den in Tabelle 2.3.1 angegebenen Mutagenese-Primern durchgeführt, um den jeweils einzelnen oder doppelten Aminosäureaustausch zu Phenylalanin bzw. Aspartat zu generieren. Zur rekombinanten Expression von GST wurde der Vektor pGEX 4T1 (Promega) verwendet. Die cDNAs von hnRNP K und hnRNP E1 wurden ebenfalls in diesen Vektor kloniert (Dejgaard und Leffers, 1996) und dienten der rekombinanten Expression von GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1. Die cDNA des λ -N-Peptids der Sequenz DAQTRRRERRAEKQAQWKAAN (Aminosäure 2-22 des λ -N-Proteins) befand sich in einem Vektor zusammen mit der GST-Fusion und einem Hexa-Histidin-Peptid (Czaplinski *et al.*, 2005) und wurde für die Expression von GST- λ N genutzt.

Die cDNA von DDX6 wurde zunächst durch RT-PCR unter Verwendung von aus K562-Zellen isolierter Gesamt-RNA gewonnen und durch *blunt end*-Ligation in die *HincII*-Stelle von pBSII KS kloniert. Hiervon wurde durch PCR die für das gesamte Protein kodierende cDNA mit *XhoI*-Überhängen gewonnen (Primer-Sequenzen in Tab. 2.3.1). Dieses PCR-Produkt wurde ebenso wie der Vektor pET-16b mit *XhoI* geschnitten und nach Dephosphorylierung des Vektors ligiert. Der gesamte Bereich der DDX6-cDNA wurde sequenziert. Hierbei stellte sich heraus, dass im Gegensatz zu Datenbankeinträgen

(gi|164664518, ref|NP_004388.2 oder gi|40675584, gb|AAH65007.1) in der cDNA aus K562-Zellen zwei zusätzliche Aminosäuren (Val167-Ser168) durch eine Hexanukleotid-"Insertion" kodiert waren. Die Überprüfung der DDX6-Gen-Sequenz ergab, dass sich dieses Hexanukleotid genau an einer Intron-Exon-Grenze auf Chromosom 11 befindet. Die Mutagenese-Primer (Tab. 2.3.1) wurden zur Synthese der Varianten DDX6 (E249Q) und (R426Q) durch zielgerichtete Mutagenese eingesetzt.

Tab. 2.3.1 Primer-Sequenzen für cDNA-Amplifikation und Mutagenese
Zielsequenzen von Restriktionsendonukleasen in Großbuchstaben

| Name | Zweck | Vorwärts-Primer | Revers-Primer |
|-----------------|--|---|---|
| hnRNP K (Y458D) | zielgerichtete | aacagtgtgaagcaggattctggaaagttttc | gaaaaactttccagaatcctgcttcacactgtt |
| hnRNP K (Y458F) | Mutagenese | aacagtgtgaagcagttttctggaaagttttc | gaaaaactttccagaaaactgcttcacactgtt |
| DDX6 | cDNA-Synthese | atgagcacggccagaacag | taaggtttctcatcttctacag |
| DDX6-XhoI | Klonierung in pET16b | ccgCTCGAGatgagcacggccagaacag | ccgCTCGAGttaaggtttctcatcttctacag |
| DDX6 (E249Q) | zielgerichtete | atgatagtattggatCaggcagataagttgc | gcaacttatctgcctGatccaatactatcat |
| DDX6 (R426Q) | Mutagenese | ctccatcgtattggaCAatcaggtcgctttgg | ccaagcgacctgatTGccaatacagatggag |
| hr15-LOX 3'UTR | Klonierung von CAT-h3'-A ₇₂ | ataagaatGCGGCCGCgcgtcgccaccctttggta | ccgCTCGAGccttgccaacattttatataaataag |
| BamHI-boxB | Insertion in BamHI-Stelle | GATCCgggcccctgaagaaggcccccctatg cgggcccctgaagaaggccctaG | GATCCtagggccccttctcaggggcccctatggc gggccccttctcaggggcccG |
| r15-LOX 5'UTR | Insertion in SacII-Stelle | ggacaaggcgtgcaacgacctgggcaagacc atggactacaaggacgacgacgacaagcccgc | gggcttgcgtgcgtcctttagtccatggtcttggcc agggtcgtgacgccttgcctgcg |
| NR-EcoRI | PCR, EcoRI-Stelle | gGAATTCaaagcgtgactaacg | gGAATTCctttgccaacattttat |
| α2-globin-3'UTR | PCR, EcoRI-Stelle | gGAATTCtaagctggagcctcg | gGAATTCgcccggcactcag |
| PstI-boxB3-4 | Insertion in PstI-Stelle | Gggggccctgaagaaggcccaaaaaaggcc ctgaagaaggcccaaa | gcccttctcaggggccctttttggcccttctcagggc ccCTGCA |
| boxB5-6-PstI | Insertion in PstI-Stelle | aaaaggggccctgaagaaggcccaaaaaagg gccctgaagggaaggcccCTGCA | Gggggcccttctcaggggccctttttggcccttctca gggcccctttttgg |

2.4 Identitätsprüfung von Plasmiden: Restriktionsanalyse, Mini-PCR und Sequenzierung

Restriktions-Endonukleasen

Anwendung in dieser Arbeit fanden die TypII-Restriktions-Endonukleasen *BamHI*, *DpnI*, *EcoRI*, *EcoRV*, *HincII*, *HindIII*, *KpnI*, *NotI*, *NsiI*, *PstI*, *SacI*, *SacII* und *XhoI*. Sie wurden zur Herstellung von DNA-Fragmenten für die Klonierung und zur Identifizierung und Linearisierung von Plasmiden verwendet. Dabei wurde nach Herstellerangaben (*New England BioLabs*) gearbeitet.

DNA-Sequenzierung

Zur Identitätsprüfung von Plasmiden wurden diese mit dem Kettenabbruchverfahren (Sanger *et al.*, 1977), auch Terminatorverfahren oder Didesoxyverfahren genannt, sequenziert. Verwendet wurden dafür der Sequenzier-Mix von *Applied Biosystems* (ABI) und *Primer*, welche mit der cDNA etwa 50nt vor der interessierenden Sequenz hybridisieren. Die verwendeten *Primer* und die nach der „4+2“-Methode ermittelten Schmelztemperaturen sind in Tab. 2.4.1 angegeben. Die während der Sequenzier-Reaktion und auch in der Mini-PCR (siehe unten) eingestellten *Annealing*-Temperaturen waren um 5°C niedriger. Anders als die Promotor-*Primer* hybridisierte CAT-X im 3'-Bereich vom CAT-ORF und DDX6-seq bei nt 428-445 des DDX6-ORFs.

Tabelle 2.4.1: Sequenzier-Primer

| Primer | Sequenz | Tm |
|---------------|----------------------|------|
| T7-Promotor | TAATACGACTCACTATAGGG | 56°C |
| T7-Terminator | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | 58°C |
| T3-Promotor | AATTAACCCTCACTAAAGGG | 56°C |
| SP6-Promotor | CGATTTAGGTGACACTATAG | 56°C |
| CAT-X | CATCATGCCGTTTGTGATGG | 60°C |
| DDX6-seq | GAACAGGCAAGAGCGGTG | 58°C |

Mini-PCR

Zur Überprüfung generierter Plasmide in *E.coli*-Mini-Kulturen (3ml LB-Flüssigmedium) vor der Plasmidpräparation wurde die Anwesenheit der gewünschten cDNA durch Mini-PCR nachgewiesen. Dafür wurde 1µL der Mini-Kultur mit 24µl eines PCR-Ansatzes (GoTaq-Polymerase, Zusammensetzung laut Herstellerprotokoll) vermischt, welcher die benötigten *Primer* (je 1µM) enthielt. Zumeist wurden hierfür die angegebenen Sequenzier-*Primer* (Tab. 2.4.1) oder die für die Generation des *inserts* der Klonierung benutzten PCR-*Primer* verwendet.

2.5 Nukleinsäurepräparation

Plasmid-DNA, PCR-Fragmente und RNA-Transkripte wurden nach verschiedenen Protokollen präpariert. Die verwendeten Nukleinsäure-Reinigungssysteme von Qiagen sind in Tabelle 2.5.1 aufgelistet. Die Präparation erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers.

Darüberhinaus erfolgte die DNA- bzw. RNA-Isolation auch durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-fällung A8.16 (Sambrook und Russel, 2001) oder durch die Trizol-Methode.

Tabelle 2.5.1: Kits von Qiagen zur Isolation von DNA

| |
|---|
| Plasmid Midi Kit |
| QIAprep [®] -Spin Miniprep Kit |
| QIAEX [®] -Gel Extraction Kit |
| QIAquick [®] -PCR-Purification-Kit |

Phenol-Chloroform-Extraktion

Nach Einstellung des Volumens der Nukleinsäure-Lösung wurde mit den gleichen Volumina Phenol, dann einer 1:1 Mischung Phenol:Chloroform, dann Chloroform ausgeschüttelt, wobei die Phasentrennung durch Zentrifugation beschleunigt wurde (je 3min, 13000rpm). Die Extraktion von RNA erfolgte mit in Wasser äquilibriertem, sogenanntem „sauren Phenol“, für DNA-Lösungen wurde mit TE (Tris-EDTA, pH=8) gesättigtes Phenol verwendet. Aus der oberen, wässrigen Phase wurde DNA bzw. RNA durch Zugabe von 0,3M Natriumacetat bzw. 4M Ammoniumacetat in 70% Ethanol ausgefällt.

RNA-Isolation nach der Trizol-Methode

Die unter dem Markennamen Trizol (Invitrogen) verkaufte Lösung wurde ursprünglich von Chomczynski und Sacchi (1987) zur *acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction* publiziert und dient der Einzelschritt-Isolation von RNA aus Geweben oder Lösungsgemischen.

Extraktionslösung (an Trizol angelehnt)

0,8M Guanidinthiocyanat
 0,4M Ammoniumthiocyanat
 5% Glycerol (m/V)
 38% Phenol (V/V)

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus K562 Zellen oder Saccharosegradientenfraktionen wurden 50µl des cytoplasmatischen Extraktes beziehungsweise 300µL der Fraktion mit 800µL Trizol-Lösung vermischt, nach 5min Inkubation bei Raumtemperatur zur Phasentrennung mit 160µL Chloroform versetzt und 5min bei 13000rpm zentrifugiert. Zur verbesserten Abtrennung des Phenols wurde die obere Phase erneut mit Chloroform ausgeschüttelt und aus dieser anschließend mit dem gleichen Volumen Isopropanol die RNA

gefällt. Das Protokoll von Invitrogen ermöglicht weiterhin die Isolation von DNA und Proteinen aus der Trizol-Phase. Nach Waschen des RNA-Pellets mit 70%igem Ethanol wurde die RNA resuspendiert und für analytische Zwecke (Gelelektrophorese, RT-PCR) weiterverwendet.

Reinigung von Nukleinsäuren mit Hilfe von Gelfiltration in Zentrifugations-Säulchen

Zur Abtrennung niedermolekularer Substanzen von Nukleinsäurepolymeren kann man Größenausschlußchromatographie mit Hilfe von Zentrifugation anwenden. So wurden nach einer Sequenzier-Reaktion nicht eingebaute Nukleotide über Sephadex G50 abgetrennt.

Nach der *in-vitro*-Synthese von mRNAs ist die Abtrennung von nicht eingebautem *Cap*-Analogons wichtig, da dieses in der Reaktion im Überschuss eingesetzt wird und in späteren Translations-Experimenten die Translations-Initiation hemmen könnte. Hierfür wurden Chromaspin-100 Säulen (Takara Clontech) eingesetzt. Zur Abtrennung des Wassers wurde 3min bei 2500rpm zentrifugiert. Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die RNA-Lösung auf das nun gepackte Material aufgetragen und 5min bei 2500rpm, 4°C zentrifugiert. Der Durchfluss enthält laut Herstellerangaben mindestens 50% der Nukleotide einer Länge größer als 100bp; kleinere Moleküle diffundieren in die Poren des Gelfiltrationsmaterials und werden dadurch zurückgehalten.

2.6 Reinigung von in *E.coli* überexprimierten Proteinen

Überexpression in *E.coli*

Je 100ng Plasmid-DNA, welche für das zu exprimierende Protein GST, GST-hnRNP E1, GST-hnRNP K oder GST- λ N bzw. His-hnRNP E1, -E2, His-hnRNP K bzw. His-hnRNP K(Y458D) oder die dritte KH-Domäne (KH3) von hnRNP K in der Wildtypsequenz und in den Tyr-Phe- bzw. Tyr-Asp-Varianten kodiert, wurden in kompetente *E.coli* BL21-DE3 transformiert. Die transformierten Bakterien wurden auf jeweils zwei LB-Agar-Platten, die entsprechend der im Expressionsplasmid kodierten Resistenz Ampicillin oder Kanamycin enthielten, ausplattiert. Nach 16-stündiger Inkubation bei 37°C wurden die Kolonien in 400ml LB-Medium (10g/l Trypton, 5g/l Hefeextrakt, 10g/l NaCl) mit Antibiotikum überführt. Diese Kultur wurde bei 37°C, 200rpm geschüttelt, bis die optische Dichte bei $\lambda=600\text{nm}$ den Wert 0,6 erreichte. Die Zellen wurden nun bei 4000g, 4°C zentrifugiert und in 500ml

Minimalmedium (48mM Na₂HPO₄, 22mM KH₂PO₄, 8,5mM NaCl, 19mM NH₄Cl, 1mM MgSO₄, 0,2% Glucose, 0,3mM CaCl₂, 0,4% Casein-Hydrolysat) resuspendiert. Nach Zugabe von 1mM IPTG zur Induktion der Genexpression wurde die Kultur bei 23°C, 200rpm geschüttelt.

Nach vierstündiger Induktion wurden die Zellen zentrifugiert (4000rpm, 4°C, 10min, Beckmann JLA 16.250), in 12ml Zentrifugations-Röhrchen überführt, in Lysispuffer gewaschen und aufgenommen (5ml pro Zellpellet aus 500ml Kultur), in Trockeneis eingefroren und bei -70°C gelagert. Der für die GST-Fusionsproteine verwendete Lysispuffer war gleichzeitig auch der Waschpuffer der Glutathion-Affinitätschromatographie. Für die Proteine mit His-Fusion wurde in Ni-NTA-Lysispuffer resuspendiert.

Zellaufschluss

Den Zellsuspensionen wurden nach dem Auftauen DTT (1mM) und die Protease-Inhibitoren PMSF (1mM) und Leupeptin (10µg/ml) zugesetzt. Danach wurden die Zellen mit Ultraschall aufgeschlossen (30s bei Ultraschallintervall 50). Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (6000rpm, 4°C, 10min) und der Überstand wurde mit NiNTA-Matrix bzw. mit GSH-Sepharose inkubiert.

Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Die Nickel-Nitrilotriessigsäure (Ni-NTA)-Affinitätschromatographie ist eine Metallchelate-Affinitätschromatographie, bei der Nickel-Ionen durch den chelatierenden Nitrilotriessigsäure-Liganden an der Agarosematrix immobilisiert vorliegen. Zwei Koordinationsstellen des Nickels stehen für die Interaktion mit dem Histidin-Affinitätspeptid zur Verfügung.

Die Elution erfolgte mit steigenden Imidazol-Konzentrationen. Das Imidazol konkurriert mit dem Histidin um die Koordinationsstelle am Nickel-Ion und verdrängt somit das Protein von der Matrix. Die Überstände der Zell-Lysate befanden sich im Lysispuffer (20mM Tris-HCl, pH=8,0, 1M KCl, 0,25% NP40, 1mM PMSF, 10µg/ml Leupeptin).

Die verwendete Ni-NTA-Agarose (250µl einer 50%igen Aufschwemmung pro Lysat aus einer 400ml-Kultur) wurde vor der Inkubation mit dem Lysat mit Waschpuffer (Puffer N) äquilibriert. Puffer N (1M KCl, 24mM Hepes, pH=7,4, 1,5mM MgCl₂, 5% Glycerol) mit steigenden Imidazol-Konzentrationen (5mM bis 1M Imidazol) diente der Elution des Proteins.

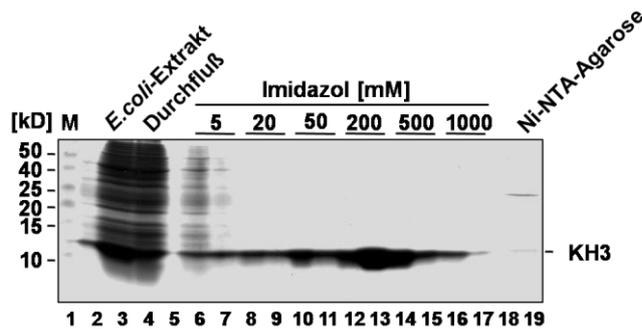


Abb. 2.6.1 Ni-NTA-Affinitätschromatographie

Elutionsprofil der rekombinanten dritten KH-Domäne von hnRNP K (KH3), Elution in Abhängigkeit der Imidazolkonzentration; 18% SDS-PAGE, Coomassiefärbung

Die Elution erfolgte in 12 Schritten: 2x 1ml 5mM Imidazol, 2x 1ml 20mM, 2x 1ml 50mM, 2x 0,5ml 200mM, 2x 1ml 500mM und 2x 1ml 1000mM Imidazol. Vom Lysat und dem Durchfluss wurden je 10µl, von jeder Fraktion 5µl verwendet, um durch SDS-PAGE die Proteinzusammensetzung zu analysieren. Die Abbildung 2.6.1 zeigt exemplarisch das Elutionsprofil der Reinigung von der dritten KH-Domäne von hnRNP K (KH3). Die das gereinigte Protein enthaltenden Fraktionen (Bahn 12-14) wurden vereinigt und zur Entfernung des Imidazols in zwei Schritten mit je 3mal 500ml dialysiert: Zunächst im Hochsalzpuffer (1M KCl, 20mM Hepes, pH=7,4, 5% Glycerol, 1mM EDTA, 1mM DTT) zur Entfernung des Imidazols, dann gegen Niedrigsalzpuffer (100mM KCl, 20mM Hepes, pH=7,4, 5% Glycerol, 1mM EDTA, 1mM DTT). Die Dialyse von DDX6 erfolgte gegen einen Niedrigsalzpuffer mit Kaliumacetat (150mM KCH₃COO, 20mM Hepes, pH=7,4, 5% Glycerol, 1mM DTT), entsprechend der Bedingungen der Isolation des Proteins aus K562-Extrakt durch die GRNA. Die Abspaltung des Hexahistidin-Peptids der KH-Domänen von hnRNP K erfolgte mit TEV-Protease (Invitrogen) für 4h bei 16°C.

Glutathion-Affinitätschromatographie

Die Expression rekombinanter Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine ermöglicht die Reinigung über Glutathion-Sepharose. Nach der Inkubation des Lysates (1h, 8°C) mit der mit Waschpuffer äquilibrierten GSH-Sepharose (20mM Tris-HCl, pH=7,4, 2mM EDTA, 1M KCl, 1mM PMSF, 1mM DTT, 10µg/ml Leupeptin; 350µl Aufschwemmung je 400ml Zellkultur) wurde dreimal mit 2,5ml Waschpuffer gespült, bevor in fünf 200µl-Fractionen eluiert (50mM GSH, 100mM Hepes, pH=8,0, 1mM DTT, 1M KCl) wurde. Je 5µl der Elutionsfraktionen wurden für die Analyse durch SDS-PAGE verwendet. Das Elutionsprofil von GST-hnRNP E1 ist exemplarisch abgebildet (Abb. 2.6.2). Die das gereinigte Protein enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und dialysiert.

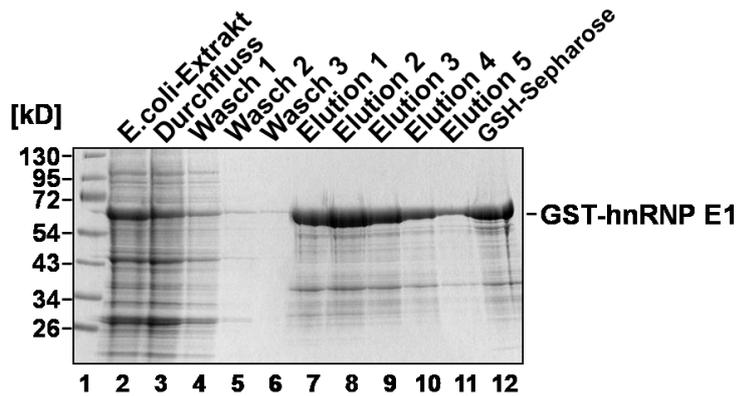


Abb. 2.6.2 Glutathion-Affinitätschromatographie von GST-hnRNP E1
Elution mit 50mM GSH, 200µl je Fraktion, je 5µl geladen, 12% SDS-PAGE, Coomassiefärbung

Dialysepuffer (GST und GST-λN): 50mM HEPES, pH=8,0, 20% Glycerol, 250mM NaCl

Dialysepuffer I (GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1): 1M KCl, 20M Tris pH 8,0, 5% Glycerol

Ionenaustauschchromatographie

Die MonoQ ist eine Ionenaustauschchromatographie. Die funktionelle Gruppe ist eine quartäre Trimethyl-aminomethylgruppe, ein starker, innerhalb eines breiten pH-Bereichs nicht protonierbarer, Anionenaustauscher. Die MonoQ wurde zur Reinigung von GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1 und zur Abtrennung von Nukleinsäuren angewendet.

Der Ionenaustausch beruht auf der kompetitiven Wechselwirkung geladener Probenmoleküle und Salz. Für das Beladen des Säulenmaterials mit einer Proteinprobe sind der pH-Wert und die Salzkonzentration von Bedeutung. Je nach isoelektrischem Punkt des Proteins (P_i), der im Wesentlichen aus dessen Aminosäurezusammensetzung resultiert, ist das Protein in Abhängigkeit vom pH-Wert verschieden stark geladen und kann dementsprechend stark oder schwach mit der Ionenaustauschmatrix interagieren. Schwach geladene Moleküle werden leicht bei niedrigen Salzkonzentrationen verdrängt, stark geladene Moleküle wie Nukleinsäuren binden gut an die Anionenaustauschmatrix und werden erst bei hohen Salzkonzentrationen eluiert.

Bei dem verwendeten pH-Wert von 8,0 tragen beide Proteine eine negative Nettoladung:

P_i (GST-hnRNP K)=5,52

P_i (GST-hnRNP E1)=6,75

Die Proteine wurden nach der GSH-Affinitätsreinigung zunächst dialysiert, um die Ionenstärke zu reduzieren.

Dialysepuffer hnRNP K: 500mM KCl, 20mM Tris, pH 8,0, 5% Glycerol

Dialysepuffer hnRNP E1: 100mM KCl, 20mM Tris, pH 8,0, 5% Glycerol

Vor dem Beladen der MonoQ wurde die GST-hnRNP K-Proteinlösung 1:5 auf 0,1M KCl, die GST-hnRNP E1-Lösung 1:2 auf 50mM KCl mit 20mM Tris, pH 8,0, 5% Glycerol verdünnt.

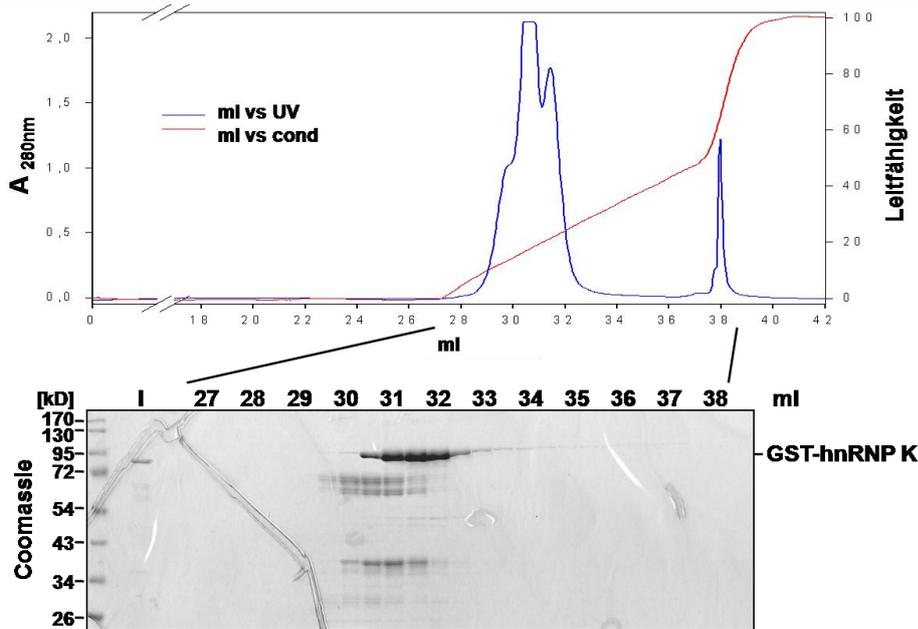


Abb. 2.6.3. MonoQ-Affinitätschromatographie von GST-hnRNP K
oben: Elutionsprofil bei 280nm, cond= Leitfähigkeit, Salzkonzentration von 100-500mM KCl.
Je Fraktion 500µl. Der Peak bei 38ml resultiert aus der Elution von Nukleinsäuren.
unten: Analyse der Fraktionen im SDS-Gel (12%), je 5µl geladen, Coomassiefärbung

Abbildung 2.6.3 zeigt exemplarisch die Reinigung von GST-hnRNP K, welches bei einer Salzkonzentration von 100 mM KCl gut an die Matrix bindet und, resultierend aus einem Gradienten von 100-500mM KCl (50%), bei etwa 250mM KCl eluiert. Die Nukleinsäuren eluieren erst bei etwa 660-700mM KCl, sie konnten also gut abgetrennt werden. Die GST-hnRNP K-haltigen Fraktionen bei 31,5 und 32mL wurden vereinigt, aliquotiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Auf die Dialyse in einem Niedrigsalzpuffer wurde aufgrund der Aggregationseigenschaften des Proteins verzichtet.

GST-hnRNP E1 eluiert bei pH=8,0 bereits bei etwa 100mM KCl, wurde daher in einem Niedrigsalzpuffer (50mMKCl) auf die Säule geladen und mit einem Gradienten von 50-300mM KCl eluiert (ohne Abb.). Da nach dieser Fraktionierung zwar Nukleinsäuren abgetrennt werden konnten, jedoch kein offensichtlicher Effekt auf die Proteinreinheit erzielt werden konnte, wurde anschließend noch eine MonoS-Chromatographie durchgeführt

(Abb.2.6.4). MonoS ist ein Kationen-Austausch-Material, bestehend aus Sulfomethylgruppen. Hierfür wurde hnRNP E1 in Puffer mit pH=6 dialysiert und anschließend wieder 1:2 auf 50mM KCl verdünnt. Die Elution erfolgte in einem Gradienten von 50-500mM KCl.

Dialysepuffer GST-hnRNP E1 vor MonoS: 20mM MES, pH=6, 100mM KCl, 5% Glycerin

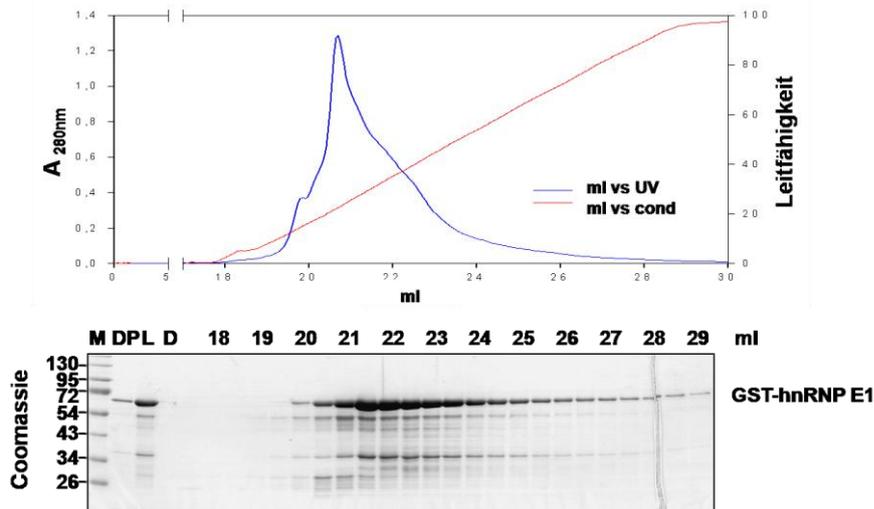


Abb. 2.6.4. MonoS von GST-hnRNP E1

oben: Elutionsprofil bei 280nm, cond=Leitfähigkeit, Salzkonzentration von 100-500mM KCl. Je Fraktion 500µl.
unten: Analyse der Fraktionen im SDS-Gel (12%), je 5µl geladen, Coomassiefärbung

Auch hier konnte nur wenig kontaminierendes Protein abgetrennt werden, jedoch ergab die quantitative Analyse eines Coomassie-gefärbten Gels (Abb. 2.6.5), dass die GST-hnRNP E1-Präparation zu über 90% sauber war, was als für GST-*pull-down*-Experimente ausreichend angenommen wurde.

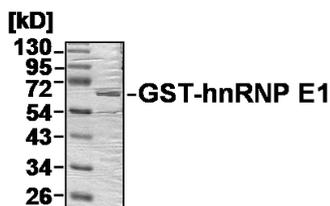


Abb. 2.6.5 GST-hnRNP E1 nach der Reinigung

1µg geladen, 12% SDS-PAGE, Coomassie-Färbung

Die zielproteinhaltigen Fraktionen (21-23ml) wurden vereinigt, dialysiert (20mM Tris, pH=8,0, 100mM KCl, 5% Glycerol), aliquotiert und eingefroren. Je ein Aliquot wurde im UV-*crosslink*-Experiment positiv auf die DICE-spezifische Bindung getestet (ohne Abb.). Von allen Proteinpräparationen wurde die Konzentration bestimmt. Das Vorliegen der GST-

Fusionsproteine in unterschiedlichen Puffern sollte zu vernachlässigen sein, da alle Proteine für die experimentelle Anwendung an GSH-Sepharose gekoppelt (GRNA oder GST-*pulldown*) und anschließend mit dem gleichen, dem Experiment entsprechenden, Puffern gewaschen wurden.

2.7 Methanol-Chloroform-Präzipitation von Proteinen

Anwendung fand die Methanol-Chloroform-Fällung (Wessel und Flügge, 1984) für die Präparation von Gradientenfraktionen zur *Western Blot*-Analyse und zur Vorbereitung der Massenspektrometrie. Die Methode ermöglicht die quantitative Präzipitation auch geringer Proteinmengen und wird nicht durch die Anwesenheit von Detergenzien, Lipiden oder hohen Salzkonzentrationen gestört. 200µl einer Saccharosegradientenfraktion oder der Elution nach Immunpräzipitation wurden mit 800µl Methanol gemischt, dann wurden 200µl Chloroform zugegeben. Nach Zugabe von 600µl Wasser wurden die Phasen durch Zentrifugation (2min, 13000rpm) getrennt. Die denaturierten Proteine sammelten sich in der Interphase. Nach Entfernen der oberen Methanol-Wasser-Phase wurde erneut mit 600µl Methanol gemischt und durch erneute Zentrifugation (5min) wurden die Proteine pelletiert. Die Zugabe von Glykogen (ca. 10µg/ml) erhöhte gerade bei größeren Proteinmengen die Festigkeit der Proteinpellets. Nach dem Trocknen wurde das Pellet direkt im SDS- oder NuPAGE-Probenpuffer aufgenommen.

2.8 Konzentrationsbestimmung von Protein- und Nukleinsäure-Proben

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurde mit Bradford (Bradford, 1976)-Reagenz (Bio-Rad) oder dem BCA-Assay (Pierce) nach Herstellerprotokoll durchgeführt, wobei BSA als Eichprotein verwendet wurde. Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgt durch die Messung der Absorption bei 260nm und wurde durch Agarosegel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung überprüft.

2.9 Gelelektrophorese

Anwendung fanden die Agarosegelelektrophorese (Protokoll 1, Kapitel 5 in Sambrock und Russel, 2001) von Nukleinsäuren mit anschließender Detektion durch Ethidiumbromid-Fluoreszenz. Neben TAE und TBE-Puffer wurde auch TTE-Puffer verwendet (50mM Tris-Base, 30mM Taurin, 1mM EDTA).

Nach der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (A8.40-44, Sambrock und Russel, 2001) wurden Proteinen durch anschließende Coomassie (A8.46-47, Sambrock und Russel, 2001)- oder Silber-Färbung (nach *PlusOne*-Kit, Amersham) angefärbt. Die Acrylamidkonzentration betrug im Sammelgel 5%, im Trenngel je nach zu erwartender Proteingröße 10% bis 18%; auch wurden Gradientengele mit besserer Trennkapazität verwendet. Andere Methoden zur Detektion der Proteine waren die Analyse durch *Western-Blotting*, *North-Western Blotting* oder durch Autoradiographie.

NuPAGE-Gele

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die durch GRNA und Immunopräzipitation isolierten Proteine in einem 4-12%igen NuPAGE-Minigel (Invitrogen) aufgetrennt. Die Proteinproben wurden dafür nach der Methanol-Chloroform-Präzipitation in NuPAGE-LDS Probenpuffer aufgenommen und im Labor von Dr. Henning Urlaub (MPI, Göttingen) analysiert.

2.10 Herstellung von hnRNP E1- und hnRNP E2-spezifischen Antikörpern

Die sehr homologen Proteine hnRNP E1 und hnRNP E2 (82% Sequenzidentität) sind im Bereich der Aminosäuren 174-250 weniger stark konserviert. Peptide aus diesem Bereich (Gamarnik und Andino, 1997) wurden von der Firma Eurogentec synthetisiert und zur Immunisierung von je zwei Kaninchen verwendet, um Antiseren zu gewinnen, die zwischen hnRNP E1 und E2 differenzieren können.

Peptid EP050836 repräsentiert die Aminosäuren 231-243 von hnRNP E1 (SPLDLAKLNQVAR), Peptid EP050837 die Aminosäuren 200-213 von hnRNP E2 (YSTGSDSASFPHTT). Die erhaltenen Antiseren SA4427 gegen das Peptid EP050836 in hnRNP E1 und SA4429 und SA4430 gegen das Peptid EP050837 in hnRNP E2 wurden im

Western Blot unter Verwendung von rekombinant in *E.coli* hergestellten Proteinen getestet (Abb.2.10.1).

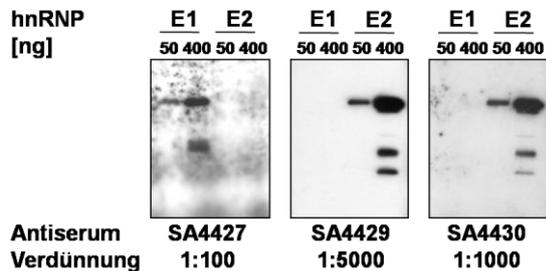


Abb.2.10.1 Die Antiseren SA4427, 4429 und 4430 binden hnRNP E1 und E2.

hnRNP E1 und hnRNP E2 mit Dekahistidinfusion wurden nach der Expression in *E.coli* über NiNTA gereinigt und zur Analyse der Spezifität der erhaltenen Antiseren im Western blot verwendet. Die angegebenen Mengen an rekombinanten Proteinen wurden geladen. 12% SDS-PAGE

Alle getesteten Antikörper reagierten nur mit dem gewünschten Zielprotein und zeigten keine Kreuzreaktion. Allerdings zeigt der Antikörper gegen hnRNP E1 eine geringere Affinität und verursacht eine hohe Hintergrundfärbung.

2.11 Western blotting

Tab.2.11.1: Verwendete Primärantikörper und Wirtsorganismen

| Antikörper | Quelle/ Firma | Organismus |
|-----------------|-------------------------------|-------------|
| hnRNP K | Santa Cruz | Maus |
| hnRNP K | Matritech | Kaninchen |
| hnRNP E1 | Thiele <i>et al.</i> , 1999 | Huhn |
| hnRNP E1 | Peptidantikörper, Eurogentec | Kaninchen |
| hnRNP E2 | Peptidantikörper, Eurogentec | Kaninchen |
| DDX6 | Novus biologicals | Kaninchen |
| eIF2 | Abnova | Maus |
| eIF3B | Abcam | Kaninchen |
| eIF3C | Santa Cruz | Kaninchen |
| eIF6 | BD Transduction Laboratories | Maus |
| G3BP1 | Santa Cruz | Maus |
| GAPDH | Abcam | Maus |
| hr15-LOX | Rapoport <i>et al.</i> , 1979 | Meerschwein |
| msi1 | Abcam | Kaninchen |
| Phospho-Tyrosin | Santa Cruz | Maus |
| rpS3 | Cell signaling | Kaninchen |
| rpS19 | Abcam | Ziege |
| c-Src | Abcam | Maus |
| Src-Phosph | Cell Signalling | Kaninchen |
| TIAR | Becton Dickinson | Maus |

Die zu untersuchenden Proteine wurden zunächst durch SDS-PAGE aufgetrennt und dann durch Elektrottransfer im Nassblotverfahren in Transferpuffer (25mM Tris-Base, 190mM

Glycin) auf einer PVDF-Membran immobilisiert. Anschließend wurde die Membran mit 5% Trockenmilchpulver in TBST (50mM Tris/HCl, pH=7,4, 150mM NaCl, 0,05% Tween) 1h blockiert und nach Waschen (3x5min) für 1h mit dem primären Antikörper (Tab. 2.11.1) inkubiert.

Nach erneutem Waschen und einstündiger Inkubation mit dem an Meerrettich-Peroxidase gekoppelten sekundären Antikörper, der mit dem Organismus-spezifischen Immunglobulin interagiert, erfolgte durch die Zugabe der Luminol-Peroxid-Lösung (ECL, Pierce) die Detektion der lumineszierenden, antigenhaltigen Banden durch Fluorographie.

2.12 Immunopräzipitation

In den durchgeführten Immunopräzipitationen wurde der anti-(α)-hnRNP K-Antikörper (Santa Cruz) und der α -DDX6-Antikörper (Novus biologicals) verwendet. Diese wurden zunächst an Protein-A-Sepharose gebunden. Die Inkubation der Sepharose erfolgte in verschließbaren Bio-Rad-Säulchen. 2 μ g des Antikörpers wurden in 200 μ l Kopplungspuffer (KP; 150mM KCH₃COO, 5mM MgCl₂, 20mM Hepes, pH=7,6, 0,05% NP40, 8,7% Glycerin) verdünnt, auf die äquilibrierte Protein-A-Sepharose (je 10 μ l) gegeben und 1h bei 6°C und 800rpm im Thermomixer im Kühlraum inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 100 μ l KP wurden entweder 20 μ l (400 μ g) K562-Extrakt in 180 μ l KP verdünnt bzw. das GSH-Eluat der GRNA zugegeben (vergl. 2.22). Nach erneuter Inkubation für 2h bei 800rpm und 6°C wurde dreimal mit 500 μ l für 5min bei 6°C und 800rpm gewaschen und anschließend in 200 μ l Hochsalz-Elutionspuffer (800mM NaCl, 20mM Hepes pH 7,6, 5mM MgCl₂, 1% Triton X100) für 10min bei 6°C, 800rpm eluiert.

Für die Immunopräzipitation in Kombination mit der GRNA wurde dieser Elutionsschritt noch einmal wiederholt. Die eluierten Proteine wurden durch die Methanol-Chloroform-Präzipitation (vergl. 2.7) pelletiert und anschließend in SDS-Probenpuffer bzw. NuPage-LDS-Pobenpuffer aufgenommen, um im *Western Blot* bzw. durch Massenspektrometrie analysiert zu werden.

2.13 North-Western-Blotting

Das *North-Western*-Experiment dient der RNA-Bindungs-Analyse und kombiniert die Methode des *Western-Blots* mit der des *Northern-Blots*. Durch *North-Western* wurde die DICE-Bindung der isolierten dritten KH-Domäne von hnRNP K, ihrer Peptid-Varianten und der durch c-Src phosphorylierten Formen untersucht. Hierfür wurden die rekombinant exprimierten Domänen ähnlich wie beim *Western-Blot* nach SDS-PAGE durch Elektrotransfer (Transferpuffer: 20% Methanol, 25mM Tris, 190mM Glycin) auf eine Nitrocellulose-Membran *geblottet*. Die Membran wurde anschließend für 10min in 100ml *North-Western*-Puffer (45mM NaCl, 2,7mM KCl, 25mM Tris, pH=7,4, 1mM DTT) mit 8M Harnstoff geschüttelt. Durch die schrittweise Verdünnung des Harnstoffs (je 40ml der harnstoffhaltigen Lösung, in welcher die Membran inkubierte, wurden mit 60ml Harnstoff-freiem *North-Western*-Puffer verdünnt) renaturierten die auf der Membran immobilisierten Peptide. Dieser Verdünnungsschritt wurde 10mal wiederholt und es wurde jeweils für 10min geschüttelt. Abschließend wurde die Membran noch 5min in Harnstoff-freiem *North-Western*-Puffer gewaschen und dann 30min im *North-Western*-Block-Puffer (25mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH=8,0, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 0,1% Tween 20) geblockt.

Beim *Northern-Blot* werden RNAs nach der Elektrophorese in denaturierenden Gelen auf Nitrocellulose- oder Nylon-Membranen *geblottet* und fixiert. Der Nachweis erfolgt über radioaktiv markierte RNA- oder DNA-Sonden, welche sequenzspezifisch mit der Ziel-RNA hybridisieren. Analog dazu wird die mit Proteinen beladene Membran beim *North-Western-Blot* ebenso mit radioaktiver RNA inkubiert, allerdings werden so nur diejenigen Proteine detektiert, welche die RNA binden können. Die Inkubation mit der *in vitro* transkribierten, ³²P-markierten DICE-RNA (100000cpm) erfolgte im *North-Western*-Bindungspuffer (50mM NaCl, 10mM MgCl₂, 10mM HEPES, pH=8,0, 0,1mM EDTA, 1mM DTT, 0,05% Tween 20) für 10min, dann wurde 6mal 5min mit *North-Western*-Bindungspuffer gewaschen. Die Detektion der Signale auf der Membran erfolgte über Autoradiographie.

2.14 In vitro-Phosphorylierung

Je 20pmol der KH-Domäne 3 von hnRNP K und Varianten, in welchen eines oder beide Tyrosine gegen Phenylalanin oder Aspartat ausgetauscht waren, wurden mit in durch

Baculoviren infizierten Insektenzellen exprimiertem c-Src (Biomol, spezifischen Aktivität $483\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$) für 2h bei 30°C im Kinase-Puffer (100mM Hepes, $\text{pH}=7,5$, 20mM MnCl_2 , 5mM DTT, 10% Glycerol, 0,02% Triton, $200\mu\text{M}$ ATP) inkubiert. Die konstante c-Src-Zugabe konnte im *Western-Blot* durch den α -src-Antikörper (Abcam) nachgewiesen werden. Der Phosphorylierungsstatus der KH-Domäne und ihrer Varianten wurde im *Western Blot* mit einem α -Phosphotyrosin-Antikörper (Santa Cruz) untersucht. Der Einfluss der Phosphorylierung auf die DICE-Bindung wurde im *North-Western-Blot* (vergl.2.13) analysiert.

2.15 UV-crosslinking von RNA-Protein-Komplexen

Zur Untersuchung der Bindung von Proteinen an spezifische RNA-Sequenzen wurden gereinigte rekombinante Proteine (His-hnRNP K, GST-hnRNP K, His-hnRNP E1, His-DDX6, Mengen jeweils in Abb. angegeben) mit ^{32}P -markiertem DICE der r15-LOX-mRNA-3'UTR oder Kontroll-RNA-Sequenzen (NR, $\alpha 2$ -globin-mRNA-3'UTR) 15min bei Raumtemperatur im 10 μl Bindungsansatz in 10mM Hepes, 3mM MgCl_2 , 5% Glycerol, 1mM DTT, 100mM KCl, 1U/ μl RNasin bzw. Ribolock (Promega/ Fermentas) mit 100000cpm der RNA inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden nach der Zugabe von 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Heparin auf Eis durch 10-minütige Bestrahlung mit UV-Licht der Wellenlänge $\lambda=254\text{nm}$ kovalent verknüpft. Anschließend wurden ungebundene RNA und Bereiche gebundener RNA-Moleküle, die nicht durch die Interaktion mit dem Protein bedeckt waren, durch 15-minütige Inkubation mit RNase T1 (0,8U/ μl) und RNase A (0,28 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) im RNaseT1-Puffer (Roche) bei 37°C abgebaut. Die mit der RNA interagierenden Proteine wurden so durch die kovalente Verknüpfung an die RNA radioaktiv markiert und nach SDS-PAGE und Trocknen des Gels durch Autoradiographie analysiert. Die Intensität der ^{32}P -markierten Proteinbanden wurde im *Phosphoimager* quantifiziert.

Für die RNA-Bindungsanalyse von DDX6 wurden jeweils 20pmol der Proteinpräparation eingesetzt, was einem Volumen von 7 μl entspricht. Da His-DDX6 in 150mM Kaliumacetat vorlag, wurde auf die Zugabe von Kaliumchlorid zum Bindungsansatz verzichtet. Im Fall der Kontroll-Ansätze ohne DDX6 wurde der Puffer zugeben, gegen welchen DDX6 dialysiert war. Analog zu UV-crosslink-Experimenten mit eIF4A (Pause und Sonenberg, 1992; Pause *et al.*, 1993) wurden dem Bindungsansatz 0,5mM ATP zugefügt.

2.16 *In vitro*-Translation in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat

Um den Effekt von hnRNP K und der Proteinvariante hnRNP K (Y458D) auf die DICE-abhängige r15-LOX-Synthese zu vergleichen, wurden *in vitro*-Translation-Reaktion in Mikrokokken-Nuklease behandeltem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat (Jackson und Hunt, 1983) (NTL-*nuclease treated lysate*) durchgeführt. Die Bedingungen der Nuklease-Behandlung zur Herstellung des NTL sind in Tab. 2.16.1 zusammengefasst.

Tab. 2.16.1: Bedingungen der Translation in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat

| Reagenz | Ausgangs-konzentration | Volumen | Konz. in NTL (82,5µl) | Konz. im Trans-lations-Mix (105µl) | Konz. in 12µl-Reaktion |
|-----------------------|------------------------|---------|-----------------------|------------------------------------|------------------------|
| RRL | | 1ml | 92% | 72% | 54% |
| Kreatinkinase | 5mg/ml | 10µl | 46µg/ml | 36µg/ml | 27µg/ml |
| Hämin | 1mM | 25µl | 23µM | 18µM | 13,5µM |
| Mikrokokken-Nuklease | 1mg/ml | 12,5µl | 11,4µg/ml | (9µg/ml) | (6,7µg/ml) |
| CaCl ₂ | 0,1M | 12,5µl | 1,15mM | 0,9mM | 0,68mM |
| EGTA | 0,1M | 25µl | 2,3mM | 1,8mM | 1,3mM |
| Kreatinphosphat | 400mM | 2,5 | | 9,5mM | 7,1mM |
| KCl/MgCl ₂ | 2M/10mM | | | 95mM/0,48mM | 71mM/0,36mM |
| Aminosäuren(-Met) | 2mM | 5µl | | 95µM | 71µM |
| ³⁵ S-Met | 10µCi/µl | 5µl | | 0,48µCi/ µl | 4,3µCi |
| RNasin | 40U/µl | 1µl | | 0,38U/µl | 3,4U |

82,5µl des NTL wurden nach dem Auftauen auf Eis in einem Gesamtvolumen von 105µl durch Zugabe von 12mM Kreatinphosphat, 95mM KCl, 0,48mM MgCl₂, 95µM aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, 50µCi ³⁵S-Methionin, 40U RNasin zu einem Translationsmix ergänzt (Ta. 2.16.1). Je 9µl dieses Mixes wurden in einer 12µl Reaktion 1h bei 30°C mit 50ng r15-LOX- oder 75ng Δ-LOX-mRNA in Gegenwart der angegeben Mengen an hnRNP K oder der Proteinvariante hnRNP K (Y458D) inkubiert. Um die Translations-Reaktion zu stoppen, wurden die zugebenen mRNAs und die endogenen tRNAs durch die Zugabe von je 0,5µg RNase A in Gegenwart von 4,5mM EDTA abgebaut.

2.17 *In vitro*-Transkription

Angewendet wurde die Methode der *in-vitro*-Transkription zur Synthese ³²P-markierter RNAs für *UVcrosslink*-, *North-Western*- und Translations-Initiations-Experimente, von leicht-markierten boxB enthaltenden Transkripten für die GRNA und von mRNAs für die *in-vitro*-Translationsexperimente (Tab. 2.17.1). Es wurden entweder die RNA-Polymerasen von

Stratagene verwendet oder Transkriptions-*Kits* (Fermentas, Ambion) zur Synthese größerer RNA-Mengen.

Die als *Template* verwendeten Plasmide (vergl. 2.3) wurden dafür durch die geeigneten Restriktionsendonukleasen (New England BioLabs) linearisiert (vergl. Tab. 2.17.1).

Die Synthese *gcappter* mRNA erfolgte entsprechend den Hersteller-Angaben des Ambion- bzw. Fermentas-Transkriptionskits mit auf ein Fünftel reduzierter GTP-Konzentration oder unter Verwendung von der T7-RNA-Polymerase von Stratagene nach folgendem Protokoll: Es wurden je 4µg der linearisierten Plasmide in einem 25µl-Ansatz im Stratagene-Puffer verwendet. Durch Zugabe von 7mM *Cap*-Analogon (m^7GpppG) zusammen mit ATP, CTP, UTP (je 1mM), 75U der Polymerase, 40U Ribolock (Fermentas) oder RNasin (Promega) und 30mM DTT wurde die Transkription mit dem Einbau des *Cap*-Analogons bei 37°C gestartet. Nach fünf Minuten wurde 1mM GTP zugesetzt und weitere zwei Stunden inkubiert.

Anschließend wurde die Plasmid-DNA durch 2U RQ1-DNase (Promega) abgebaut und die mRNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion isoliert (vergl. 2.5). Vor der Ethanolfällung wurde die wässrige Phase zusätzlich zweimal über Chromaspin-Zentrifugations-Säulen (Takara Clontech) gereinigt (5min bei 4°C, 2500rpm), um nicht-eingebautes *Cap*-Analogon zu entfernen.

Die mRNAs für die GRNA wurden durch Zugabe von je 5µCi [α - ^{32}P]-UTP zum Transkriptionsansatz radioaktiv markiert.

Zur Synthese von ^{32}P -markierten Transkripten für die UV-*crosslink*-Experimente mit T3-RNA-Polymerase (Stratagene) wurde 1µg der linearisierten Plasmid-DNA eingesetzt. Die Transkription erfolgte in Gegenwart von 25µCi [α - ^{32}P]-UTP, 0,1mM UTP und je 1mM ATP, CTP und GTP, 20U Ribolock oder RNasin, 5mM DTT und 25U der Polymerase in einem 10µl-Ansatz für 45min bei 37°C.

Die Synthese der sORF-ctrl- und sORF-DICE-mRNA für Translations-Initiationsstudien erfolgte im 12,5µl-Ansatz mit Stratagene-Puffer unter Verwendung von 50U T7-RNA-Polymerase und 2µg linearisierter Plasmid-DNA. Durch 5-minütige Vorinkubation in Anwesenheit von je 0,8mM ATP und CTP, 0,4mM UTP und 5,6mM *Cap*-Analog wurde zunächst das *Cap* eingebaut, dann wurde die Transkription durch Zugabe von 0,8mM GTP gestartet. Die radioaktive Markierung erfolgte durch die Zugabe von 15µCi [α - ^{32}P]-UTP. Nach 45min bei 37°C wurde die DNA durch Zugabe von 2U RQ1-DNase abgebaut und nach Phenol-Chloroform-Extraktion das nicht eingebaute *Cap*-Analog durch zweifaches Zentrifugieren in Chromaspin-Zentrifugations-Säulen entfernt (5min bei 4°C, 2500rpm).

Die RNA-Konzentration markierter Transkripte wurde durch Szintillationsmessung bestimmt.

Tabelle 2.17.1 fasst die verwendeten Plasmide und die resultierenden RNAs zusammen.

Tab. 2.17.1: *In vitro* synthetisierte RNAs und mRNAs

Die innerhalb der vorliegenden Dissertation verwendeten (m)RNAs und die Plasmide, welche für die Transkription eingesetzt wurden, nachdem sie mit den angegebenen Restriktionsendonukleasen linearisiert wurde

| RNA | Plasmid | Restriktions- Endonuklease | Polymerase | Cap | Anwendung |
|----------------------------|--|-------------------------------|------------|-----|-----------------------------------|
| DICE | pBSII SK 241 | EcoRI | T3 | - | NWB, UVcrosslink GST-pulldown |
| β -glo-5' leader | pBSII KS-globin | HindIII | T3 | - | GST-pulldown |
| α 2-globin 3'UTR | pBSII SK- α 2globin-3'UTR | HindIII | T3 | - | UVcrosslink |
| r15-LOX | pBSII KS LOX | HindIII | T7 | + | <i>in vitro</i> Translation |
| Δ -LOX | pBSII KS Δ -LOX | HindIII | T7 | + | |
| sORF-ctrl | pBSII KS LBA | XhoI | T7 | + | Translations- Initiation/ GRNA |
| sORF-DICE | pBSII KS LBDA | XhoI | T7 | + | |
| LBBBA | pBSII KS LBBBA | XhoI | T7 | + | GRNA |
| LBBBDA | pBSII KS LBBBDA | XhoI | T7 | + | |
| LBBBNA | pBSII KS LBBBNA | XhoI | T7 | + | |
| LDA | pBSII KS LDA | XhoI | T7 | + | |
| CAT | pGEM-CAT-A ₀ | PstI | T7 | + | <i>in vitro</i> Translation |
| CAT-A ₇₂ | pGEM-CAT-A ₇₂ | NsiI/ HindIII | T7 | + | |
| CAT-DICE | pGEM-CAT-10R -A ₀ | XhoI | T7 | + | |
| CAT-DICE-A ₇₂ | pGEM-CAT-10R-A ₇₂ | NsiI/ HindIII | T7 | + | |
| CAT-h3'UTR | pGEM-CAT-h3'-A ₇₂ | XhoI | T7 | + | |
| CAT-h3'UTR-A ₇₂ | pGEM-CAT-h3'-A ₇₂ | NsiI/ HindIII | T7 | + | |
| CAT- β 5' | pGEM-CAT- β 5' L-A ₀ | HindIII | T7 | + | |
| CAT- β 5' Lr | pGEM-CAT- β 5' Lr-A ₀ | HindIII | T7 | + | |

2.18 Eukaryotische Zellkultur

Die für diese Arbeit verwendeten eukaryotischen Zellen sind murine Erythro-Leukämiezellen (MEL) und die humanen myeloiden Leukämiezellen K562.

K562-Zellen wurden ursprünglich aus einer Patientin mit akuter myeloider Leukämie isoliert (Lozzio und Lozzio, 1975). Die Zellen tragen das sogenannte Philadelphia-Chromosom, welches durch eine Translokation zwischen Chromosom 22 und 9 entstanden ist (Lozzio und Lozzio, 1975, Lozzio *et al.*, 1981), was zur Expression einer Bcr:Abl-Fusion führte (Kurzrock *et al.*, 1988). In K562-Zellen kann die Hämoglobinsynthese mit 1mM Natriumbutyrat (Andersson *et al.*, 1979) oder mit 0,1mM Hämin (Rutherford *et al.*, 1979) induziert werden.

MEL-Zellen sind wahrscheinlich durch die Infektion von aus Milz isolierten erythroiden Vorläuferzellen mit dem Friend-Virus-Komplex entstanden (Friend *et al.*, 1966) und können durch Behandlung mit DMSO zur Hämoglobinsynthese angeregt werden (Friend *et al.*, 1971).

K562-Zellen und der MEL-Stamm 745A wachsen in Suspension, der MEL-Stamm F4-12B2 wächst adhärent. Zunächst wurden alle 3 Zelltypen in DMEM mit nicht-essentiellen Aminosäuren, *glutamax* (einer optimierten Glutaminquelle), Pyruvat, dem Zusatz von einem Penicillin-Streptomycin-Mix (1% PS) und 10% fetalem Kälberserum (FCS) kultiviert. Isabel Naarmann stellte im Rahmen der Diplomarbeit fest, dass K562-Zellen besser in RPMI-1640 wachsen, welches auch mit 1% PS und 10% FCS komplettiert wurde.

Zur Induktion der erythroiden Differenzierung wurden die MEL (F4-12B2)-Zellen 96h mit 5mM HMBA in DMEM inkubiert. Bei einem Experiment wurde dem Medium ³⁵S-Methionin zugesetzt, um die während der induzierten Reifung synthetisierten Proteine radioaktiv zu markieren und autoradiographisch nachweisen zu können. Die Zellzahlbestimmung erfolgte in einer Zählkammer (Thoma-Haemocytometer).

Isabel Naarmann konnte während ihrer Diplomarbeit die Induktion der erythroiden Reifung von K562-Zellen optimieren: nach 8 Tagen, wobei das Medium mit 1,5mM Natriumbutyrat alle 2 Tage gewechselt wurde, zeigten etwa 85% der Zellen eine positive Benzidin-Färbung, 29% verloren ihren Kern und von diesen enthielten 22% keine färbbaren Mitochondrien mehr (Naarmann *et al.*, 2008). Aus beiden MEL-Zell-Stämmen (F4-12B2 und 745A) und aus K562-Zellen wurden cytoplasmatische Extrakte generiert (vergl. 2.19), welche dann in *in vitro*-Translations-Experimenten eingesetzt wurden (vergl. 2.20).

2.19 Präparation cytoplasmatischer Extrakte aus eukaryotischen Zellen

Triton-Extraktion

Die durch Triton-Extraktion gewonnenen Extrakte wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit ausschließlich für eine Analyse im *Western Blot* verwendet.

Die adhärent wachsenden MEL(F4-12B2)-Zellen wurden zunächst vom Medium befreit, mit eiskaltem PBS (140mM NaCl, 2,7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, pH=7,4) gewaschen, in PBS mit einem Zell-Kratzer von der Kulturplatte abgelöst und durch Zentrifugation pelletiert. Die in Suspension wachsenden K562- und die MEL(745A)-Zellen wurden durch Zentrifugation (5min, 1000g, 4°C) geerntet.

Nach erneutem Waschen des Zellpellets (einmal bei adhärennten, zweimal bei Suspensionszellen) wurde PBS möglichst vollständig entfernt und das Zellpellet in eiskaltem Lysispuffer (~50µl per 5~10⁶ Zellen: 300mM NaCl, 20 mM Tris, pH=7,4, 1% Triton X 100, 1

mM DTT , 1 mM PMSF, 1 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin) aufgenommen, gründlich mit dem *Vortex* gemischt und für 30min auf Eis inkubiert. Nach erneutem *vortexen* wurden Zelltrümmer und unlösliche Bestandteile 5min bei 21000g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Translationskompetenter cytoplasmatischer Extrakt: Hypotonischer Aufschluss mit Dounce-Homogenisator

Zur Gewinnung cytoplasmatischer Extrakte aus MEL- und K562-Zellen wurden dem Kulturmedium 10min vor der Ernte 200mM KCl zur Dissoziation der Polysomen (Bader und Sarre, 1986) zugegeben. Nach der hypertonen Kaliumchloridvorbehandlung (HKV) wurde die Zellsuspension auf Eis gekühlt, die Zellen wurden bei 500g, 4°C 5min pelletiert und in eiskaltem MBSG (*MOPS buffered saline with glucose*: 20mM MOPS pH=7,2, 130mM NaCl, 5mM KCL, 7,5 mM MgAc₂, 5mM Glucose) 4 mal gewaschen. Bei den adhären wachsenden MEL(F4-12B2) wurden die Zellen von den Kulturplatten nach Abnahme des Mediums in eiskaltem MBSG mit einem Zellschaber abgelöst.

Nach Abnehmen des Waschpuffers wurden die Zellpellets gewogen und im Lysispuffer (1,5ml je 1g Zellpellet: 10mM MOPS pH=7,2 (KOH), 10mM KAc, 1,5mM Mg(Ac)₂, 2mM DTT, 1 µg/ml Pepstatin, 1 µg/ml Leupeptin, 24 µg/ml Antipain, 1 µg/µl Pefabloc SC) resuspendiert.

Die Kombination an verwendeten Protease-Inhibitoren inaktiviert sowohl Serin-, Thiol- als auch saure Proteasen, wie in Tabelle 2.19.1 zusammengefasst ist. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis im hypertonen Lysispuffer wurden die Zellsuspensionen in einen *Dounce*-Homogenisator überführt und Zellhomogenat durch 30fach wiederholtes Ziehen mit festem Pistill generiert. Zelltrümmer, Zellkerne und unlösliche Bestandteile wurden bei 10000g, 4°C 20min abzentrifugiert. Aliquots der cytoplasmatischen Extrakte wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und gelagert.

Tab.2.19.1: Protease-Inhibitoren

| Protease-Inhibitor | Konzentration | inhibierte Proteasen |
|---------------------------|----------------------|-----------------------------|
| Antipain | 1- 50 µg/ml | Thiolproteasen |
| Leupeptin | 0,5- 1 µg/ml | Serin/ Thiolproteasen |
| Pefabloc SC | 0,1-1 µg/ml | Serinproteasen |
| Pepstatin | 1 µg/ml | saure Proteasen |

2.20 Optimierung der *in vitro*-Translation in cytoplasmatischen Extrakten aus MEL- und K562-Zellen

Die *in vitro*-Translation in cytoplasmatischen Extrakten aus MEL(F4-12B2)- und K562-Zellen erfolgte nach Thoma *et al.* (2004) in Anwesenheit von ^{35}S -markiertem Methionin 1h bei 30°C unter optimierten Bedingungen (Tab. 2.20.1). Da die Extrakte nicht mit Nuklease behandelt wurden, wurden neben der exogen zugegebenen CAT-mRNA auch endogene mRNAs translatiert. Die Detektion der neu synthetisierten, mit ^{35}S markierten Proteine erfolgte nach der SDS-PAGE durch Autoradiographie.

Quantifizierung der CAT-Synthese

Nach *in vitro*-Translation und anschließender SDS-PAGE wurden die Gele getrocknet und die synthetisierten Proteine durch Autoradiographie mit Hilfe eines *Phosphoimage-Scanners* analysiert. Die Banden-Intensität wurde mit Hilfe von Image-Quant bestimmt. Zur Quantifizierung wurde die Intensität der CAT-Bande auf die Intensität endogener Proteine bezogen. Das Verhältnis der Intensität auf der Lauf-Höhe der CAT-Bande in der Kontroll-Bahn bezogen auf die endogenen Proteine wurde als Hintergrund von der CAT-Intensität jedes Translationsansatzes subtrahiert. Die Kontroll-mRNA-Translation wurde auf 100% gesetzt, die Intensität der CAT-Synthese in Abhängigkeit bestimmter 3'UTRs oder veränderter experimenteller Bedingungen sind in [%] angegeben. Alternativ wurden Quantifizierungs-Linien durch bestimmte Banden oder Bahnen im Autoradiogramm gelegt, deren Signal-Intensitäten als zweidimensionales Diagramm unterhalb des Gels angegeben sind.

In vitro-Translation in cytoplasmatischen MEL-Zell-Extrakten

Da die Effizienz der Protein-Synthese in unterschiedlichen Extrakten von den Salzbedingungen abhängig ist, wurden zunächst die Konzentrationen an Kalium- und Magnesiumacetat optimiert (Abb.2.20.1 und 2.20.2). Danach wurde die Translationseffizienz in Abhängigkeit der Inkubationszeit mit Hilfe einer Luciferase-Reporter-mRNA analysiert (ohne Abbildung). Die Zunahme an Luciferase-Aktivität war nach 40min nahezu abgeschlossen, die einstündige Inkubation wurde beibehalten.

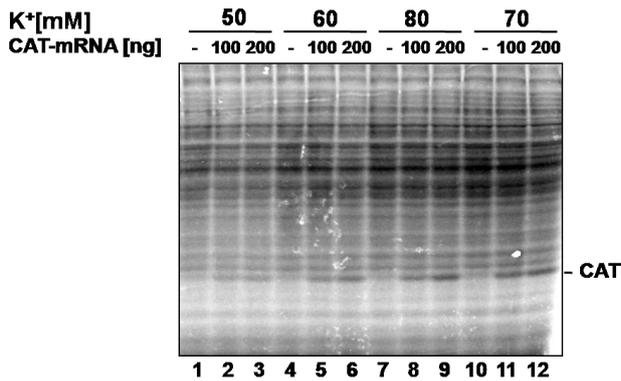


Abb.2.20.1. *in vitro*-Translation in MEL-Zell-Extrakten: Optimierung der Kalium-Konzentration

Je 100 und 200ng CAT-Reporter-mRNA wurden zusammen mit den endogenen mRNAs in Anwesenheit von 3mM Magnesiumacetat und variierenden Kaliumkonzentrationen translatiert. Einbau von ³⁵S-Methionin. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

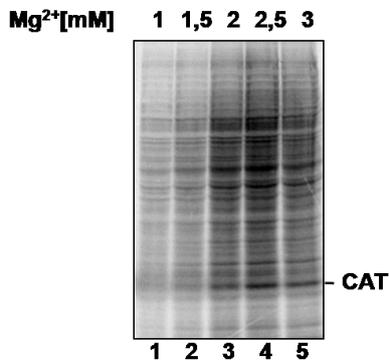


Abb. 2.20.2. *in vitro*-Translation in MEL-Zell-Extrakten: Optimierung der Magnesium-Konzentration

Je 100ng CAT-Reporter mRNA-wurden zusammen mit den endogenen mRNAs in Anwesenheit von 80mM Kaliumacetat und variierenden Magnesiumkonzentrationen translatiert. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Die Bedingungen der Translation in MEL-Zell-Extrakten wurden auf 80mM Kaliumacetat und 2,5mM Magnesiumacetat eingestellt. Die Zugabe von Kreatinphosphat, Kreatinkinase, ATP und GTP stellt ein ATP-/GTP-regenerierendes System dar, das als Energiequelle Kreatinphosphat nutzt. Die Kreatinkinase katalysiert die Übertragung eines Phosphates von Kreatinphosphat auf ADP, welches ebenso wie GDP in der Translationsreaktion aus den jeweiligen energiereicheren Nucleosidtriphosphaten generiert wird. Die Übertragung des Phosphates von ATP auf GDP zur Synthese von neuem GTP kann dann durch die endogene, im Extrakt enthaltene Nucleosiddiphosphokinase katalysiert werden.

Für die *in vitro*-Translation in MEL-Zellen wurde bereits der positive Effekt der Hämin-Zugabe für die *in vitro*-Proteinsynthese beschrieben (Bader und Sarre, 1986); dieser wurde hinsichtlich der CAT-Synthese überprüft und bestätigt (Abb. 2.20.3). Hämin wirkt als Inhibitor einer Hämin-abhängigen eIF2 α -Kinase, dem sogenannten Häm-regulierten Inhibitor (HRI) (Jackson, 1991; Chen und London, 1995). Auch für Kaninchenretikulozytenlysat

wurde der stimulierende Effekt auf die *in vitro*-Translation von Nicht-Globin-mRNAs beschrieben (Jackson, 1982).

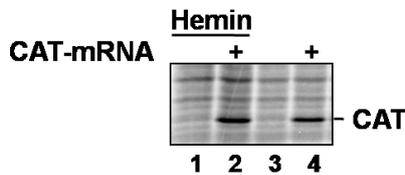


Abb.2.20.3. *in vitro*-Translation in MEL-Zell-Extrakten: der Einfluß von Hämin

Je 100 ng CAT-Reporter mRNA wurden in Abhängigkeit von 44µM Hämin im MEL-Extrakt translatiert. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Zusätzlich wurde beschrieben, dass eine hypertonische Kaliumvorbehandlung (HKV) unmittelbar vor der Generation cytoplasmatischer Extrakte (vergl. 2.19) zur schnellen und reversiblen Blockade der Translations-Initiation *in vivo* führt, was später im Extrakt die Vervollständigung bereits existierender Peptide verhindert und damit zur verbesserten Initiation der Translation einer exogenen mRNA im Extrakt *in vitro* beiträgt (Bader und Sarre, 1986).

Extrakte aus Zellen mit und ohne HKV wurden hinsichtlich der *in vitro*-Translation der exogenen CAT-mRNA verglichen (Abb.2.20.4). In nach HKV präparierten Extrakten ist der Einbau von ³⁵S-Methionin während der CAT-Synthese im Vergleich zu der Synthese endogener Proteine deutlich verbessert.

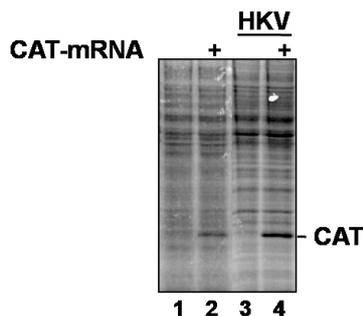


Abb. 2.20.4. Der Einfluß der hypertonischen Kaliumvorbehandlung auf die *in vitro*-Translation

Je 100ng CAT-Reporter mRNA wurden in den verschiedenen MEL-Extrakten translatiert. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

***In vitro*-Translation in cytoplasmatischen K562-Zell-Extrakten**

Für die *in vitro*-Translation in K562-Zell-Extrakten wurden Bedingungen der MEL-Zell-Extrakte übernommen und optimiert (Abb. 2.20.5 und 2.20.6).

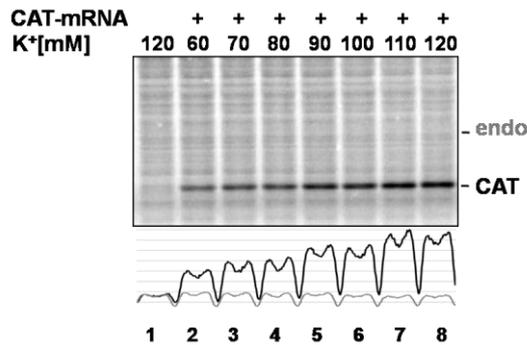


Abb. 2.20.5. *in vitro*-Translation in K562 Extrakten: Optimierung der Kaliumkonzentration

40ng CAT-Reporter mRNA wurden zusammen mit den endogenen mRNAs in Anwesenheit von 1mM Magnesiumacetat und variierenden Kaliumkonzentrationen translatiert. Grau: Intensität der Peptide von einer Beispielbande, resultierend aus der Translation beliebiger endogener mRNAs, Schwarz: CAT-Intensität 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

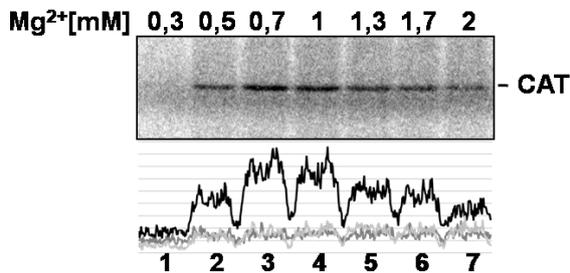


Abb. 2.20.6 *in vitro*-Translation in K562 Extrakten: Optimierung der Magnesium-Konzentration

40ng CAT-Reporter mRNA wurden zusammen mit den endogenen mRNAs in Anwesenheit von 120mM Kaliumacetat und variierenden Magnesiumkonzentrationen translatiert. Grau: Intensität der Peptide resultierend aus der Translation endogener mRNAs, Schwarz: CAT-Intensität, 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Während variierende Kalium- und Magnesium-Konzentrationen auf die Translation endogener mRNAs im untersuchten Konzentrationsbereich wenig Einfluss zeigen (grau in Abb. 2.20.5 und 2.20.6), steigt mit zunehmender Kaliumkonzentration und bei Erreichen der optimalen Magnesiumkonzentration die Menge an eingebautem radioaktivem Methionin in CAT. Zu beachten ist hier, dass bereits eine viel geringere CAT-mRNA-Menge (40ng im Gegensatz zu 100ng in MEL-Extrakten) ausreicht, um eine deutlich über der Hintergrundtranslation endogener mRNAs detektierbare Bande zu erreichen. Die Salzbedingungen wurden auf 120mM Kaliumacetat und 0,7mM Magnesiumacetat eingestellt. Darüberhinaus wurde auch die Extraktmenge im Translationsansatz überprüft. Bereits etablierte Protokolle anderer *in vitro*-Translations-Systeme verwenden Extraktkonzentrationen von 25-50%. Die Translation der exogen zugegebenen CAT-mRNA (schwarz) wurde im Vergleich mit einer endogenen mRNA (grau) untersucht (Abb. 2.20.7).

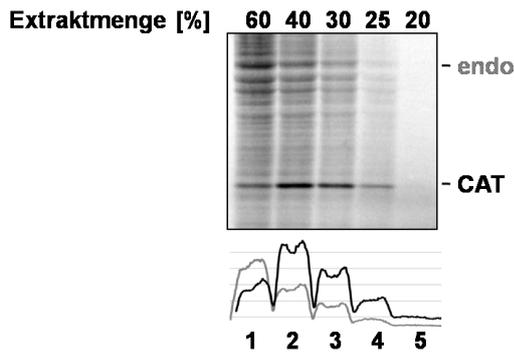


Abb. 2.20.7 Optimierung der K562-Extrakt-Konzentration für die *in vitro*-Translation

40ng CAT-Reporter mRNA wurden zusammen mit den endogenen mRNAs in variierenden Extraktmengen unter optimierten Salzbedingung translatiert. Grau: Intensität der Peptide resultierend aus der Translation endogener mRNAs, Schwarz: CAT-Intensität, 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Die *in vitro*-Synthese der endogenen Proteine steigt relativ zur eingesetzten Extraktmenge, da sowohl die mRNA-Konzentration als auch die Konzentration aller für die Proteinsynthese notwendigen Faktoren im Ansatz gleichermaßen steigt. Die Translation der konstanten CAT-mRNA-Menge variiert hingegen. Bei geringeren Extraktmengen limitieren wahrscheinlich zugegebene Faktoren aus dem Extrakt die Proteinsynthese. Bei erhöhten Extraktmengen steht die Translation der erhöhten Menge an endogenen mRNAs in direkter Konkurrenz zur CAT-Synthese. Als optimal für eine effiziente *in vitro*-CAT-Synthese konnte die Extraktkonzentration von 40% ermittelt bzw. bestätigt werden.

Tab. 2.20.1. Optimale Bedingungen für die *in vitro*-Translation in MEL- und K562-Extrakten

| Reagenzien | MEL | K562 |
|------------------------------|---------|-------|
| Kaliumacetat | 80mM | 120mM |
| Magnesiumacetat | 2,5mM | 0,7mM |
| Hepes, pH 7,6 | 10mM | |
| Kreatinphosphat | 30mM | |
| Kreatinkinase | 50ng/μL | |
| RNasin/Ribolock | 0,4U/μL | |
| ATP | 800μM | |
| GTP | 100μM | |
| Aminosäuren (ohne Methionin) | 100μM | |
| ³⁵ S-Methionin | 5μCi | |
| cytoplasmatischer Extrakt | 40% | |
| Hämin | 44μM | |

2.21 *In vitro*-Translations-Initiation und Dichtegradienten-Zentrifugation

Zur Analyse von Translations-Initiationskomplexen wurden ^{32}P -markierte mRNAs unter den für die *in vitro*-Translation als optimal ermittelten Bedingungen (vergl. 2.20) in Anwesenheit von Cycloheximid inkubiert. Cycloheximid (β -[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxy]ethylgutarimid) ist ein ursprünglich aus *Streptomyces* isoliertes Antibiotikum, welches die Peptidyl-Transferase-Reaktion inhibiert (Obrig *et al.*, 1971). Somit können 80S-Ribosomen am Startcodon einer mRNA stabilisiert werden.

Die Translations-Initiationsreaktionen wurden für 15min bei 30°C inkubiert, die verwendeten Extraktmengen und RNA-Konzentrationen variierten je nach Experiment und sind jeweils angegeben. Zur zeitlichen Auflösung von Translations-Reaktionen wurde in Abwesenheit von Cycloheximid für die jeweils angegebene Zeit bei 30°C inkubiert (vergl. 3.4, Abb. 3.4.9).

Die Translations-Initiations-Reaktionen wurden auf Eis abgekühlt und auf 5-25%ige Saccharose-Gradienten geladen. Diese wurden aus einer 5 und einer 25%igen (w/w) Lösung im Gradientenpuffer (150mM KCH_3COO , 20mM Hepes, pH=7,4, 5mM MgCl_2 , 1mM DTT) hergestellt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Die Gradienten wurden stets auf Eis gehalten, die Zentrifugation fand bei 4°C statt.

Da innerhalb der Promotionszeit zwei verschiedenen *Swing-Out*-Rotoren (SW40Ti und SW41Ti von Beckmann) verwendet wurden, variieren die Zentrifugationsbedingungen (Tab. 2.21.1). In jedem Fall wurden die Rotoren nach Ablauf der Zentrifugationszeit nicht abgebremst, sodass sich eine 30-50-minütige Auslaufzeit anschloss.

Tab. 2.21.1: Rotortyp und Zentrifugationsbedingungen

| Rotor | Gradienten-Volumen | Umdrehungen | mittlere Beschleunigung | Zeit | Tropfenzahl | Fraktionsgröße |
|--------|--------------------|-------------|-------------------------|------|-------------|-------------------|
| SW41Ti | 11ml | 32000rpm | 126000g | 3h | 17 | 550 μl |
| SW40Ti | 12ml | 40000rpm | 202000g | 2h | 19 | 600 μl |

Für die Translations-Initiations-Studien wurden ^{32}P -markierte sORF-DICE-mRNA und sORF-ctrl-mRNA verwendet (vergl. 2.17).

Durch die Zugabe von GMP-PNP (5'-Guanylylimidophosphate, 1mM bis 5mM, jeweils angegeben) wurden 48S-Initiations-Komplexe akkumuliert. GMP-PNP ist ein Analogon des für die 80S-Ribosomen-Assemblierung essentiellen GTPs, was aufgrund seiner γ -Imido-Bindung nicht hydrolysiert werden kann (Hershey und Monro, 1966; Anthony und Merrick, 1992).

Während des Zentrifugationslaufes sedimentieren Protein- und Protein-RNA-Komplexe je nach ihrer Dichte und Form unterschiedlich schnell und werden durch die zunehmende

Saccharose-Konzentration immer stärker abgebremst. Nach Ablauf der Zentrifugation wurde eine Kapillare auf dem Boden des Zentrifugations-Röhrchens aufgesetzt und der Gradient vom Boden (25% Saccharose) aus abgepumpt und fraktioniert. Die Bestimmung der Radioaktivität jeder einzelnen Fraktion ergab Rückschlüsse auf die mRNA-Verteilung innerhalb des Gradienten.

2.22 GRNA-Chromatographie

Zur Analyse der Zusammensetzung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Komplexes aus cytoplasmatischen K562-Extrakten wurde die GRNA-Chromatographie angewendet. Diese Methode beruht auf der Interaktion des boxB-RNA-*stem-loops* (Abb.2.22.1) mit dem N-Terminus (Aminosäure 2-22, Abb. 2.22.1) des Antiterminationsproteins N vom λ -Bacteriophagen (λ N) und wurde erstmals zur Identifizierung von 40LoVe als spezifisches Bindeprotein des *vegetal localisation elements* (VGL) der VG1-mRNA in *Xenopus* angewendet (Czaplinski *et al.*, 2005). Sie diente weiterhin der Identifizierung von UNR als Faktor, der neben SXL die Translationsregulation der msl-2-mRNA in *Drosophila* vermittelt (Duncan *et al.*, 2006). Die Interaktion des λ N-Proteins mit der *nut*-Stelle (*nut*= *N-utilization site*) seiner eigenen mRNA führt zur Bildung eines terminationsresistenten Komplexes, der im Lebenszyklus des Phagen eine koordinierende Funktion hat.

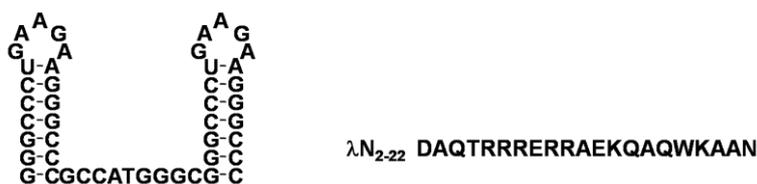


Abb. 2.22.1. Sequenz von 2 boxB-Elementen und des N-Terminus vom Protein N des λ -Bacteriophagen
Die GRNA-Chromatographie beruht auf der Wechselwirkung des N-Terminus vom Protein λ N mit der boxB-Haarnadelstruktur.

Die Affinität der Interaktion von λ N mit der boxB-RNA-Haarnadelstruktur wurde durch Fluoreszenztitrationen unter Verwendung von fluoreszenz-markierten RNAs bestimmt ($K_D=0,8nM$, Austin *et al.*, 2003) und im Co-Elektrophorese-Experiment auf etwa 5nM (Cilley und Williamson, 1997) geschätzt.

Die Herstellung des N-Terminus von λ N erfolgte rekombinant in *E.coli* als GST-Fusionsprotein (Czaplinski *et al.*, 2005). Nach der Reinigung über GSH-Affinitätschromatographie wurde das Protein dialysiert (vergl 2.6) und im GRNA-Experiment eingesetzt. Der ORF des Expressionsplasmides kodiert zusätzlich für einen C-terminalen Histidin-Tag. Die nach der Glutathion-Affinitätschromatographie erfolgte Reinigung über die Nickel-Affinitäts-Chromatographie führte allerdings nicht zu einer verbesserten Reinheit des Proteins und wurde für nachfolgende Präparationen nicht mehr durchgeführt.

Die Klonierung der für zunächst zwei *boxB-stem-loops* (Abb. 2.22.1) kodierenden DNA in pBSII KS erfolgte so, dass die durch *in vitro*-Transkription entstehenden mRNAs die beiden *boxB*-Elemente innerhalb des artifiziellen ORFs tragen (vergl. 2.3). Voruntersuchungen zur Spezifität der GRNA (siehe unten) zeigten jedoch, dass weitere *boxB*-Elemente notwendig waren, welche direkt hinter das Stop-Codon kloniert wurden.

Abbildung 3.5.1 zeigt schematisch den Aufbau der für die GRNA eingesetzten mRNAs. Diese enthalten den authentischen 5'UTR der Kaninchen-r15-LOX-mRNA und entweder das DICE, die nicht-repetitive Sequenz NR oder keine 3'UTR. Der artifizielle ORF kodiert das Peptid MDYKDDDDKPAVAAALELVDPGPEEGPAMAGPEEGP. Diese mRNAs mit und ohne 3'UTR-DICE kamen auch in den Translations-Initiationsstudien zur Anwendung.

Zunächst wurde die Bindung der die zwei *boxB*-Elemente enthaltenden, DICE-tragenden mRNA an das λ N-Peptid unter verschiedenen Pufferbedingungen (Tab. 2.22.1) überprüft und mit der Bindung einer vergleichbaren mRNA ohne *boxB* verglichen (Abb.2.22.2). Hierfür wurden je 10 μ l Magneto-GSH-Partikel, 20 μ g des GST- λ N-Proteins, 1pmol der RNA und 100 μ l des Puffers eingesetzt.

Tab. 2.22.1. Pufferbedingungen der Kopplungsreaktion in Abb. 2.22.2

Vergleich der publizierten (Czaplinski *et al.*, 2005, Duncan *et al.*, 2006) mit den in der *in vitro*-Translations-Initiation und der *in vitro*-Translation verwendeten für K562-Extrakte optimalen Bedingungen (vergl. 3.4).

| Czaplinski (C) | Duncan (D) | Gradientenpuffer (G) | Translationsbedingungen (T) |
|-------------------------|-------------------------|----------------------------|--|
| 50mM Tris, pH=7,5 | 20mM Tris, pH 7,5 | 20mM Hepes, pH=7,6 | 10mM Hepes, pH=7,6 |
| 50mM NaCl | 150mM NaCl | 150mM KCH ₃ COO | 120mM KCH ₃ COO |
| 1,5mM MgSO ₄ | 1,5mM MgCl ₂ | 5mM MgCl ₂ | 0,7mM Mg(CH ₃ COO) ₂ |
| 1 μ g/ml Heparin | 12 μ g/ml Heparin | | |
| 2mM DTT | 1mM DTT | | |
| 0,05% NP40 | 0,05% NP40 | | |
| 10% Glycerin | 8,7% Glycerin | | |

Dabei wurden zunächst alle Komponenten gleichzeitig zusammengegeben und für eine Stunde bei 5°C, 800rpm geschüttelt. Die eingesetzten mRNAs waren mit ³²P markiert und ihre Verteilung in verschiedenen Fraktionen der Reinigung konnte durch Szintillationsmessung überprüft werden. Die mRNAs wurden entweder direkt eingesetzt oder

jeweils 5min auf 55°C erhitzt und dann langsam abgekühlt, um eine korrekte Bildung der boxB-Haarnadelstrukturen zu gewährleisten. Gewaschen wurden die Partikel mit je 2x500µl des jeweiligen Kopplungspuffers. Die Elution der gebundenen RNA erfolgte durch die Zugabe von 100µg/ml RNase A in dem unter Czaplinski aufgelisteten Puffer. Auch die verbleibenden GSH-Partikel wurden der Szintillationsmessung unterzogen, um die Effizienz der Elution zu prüfen.

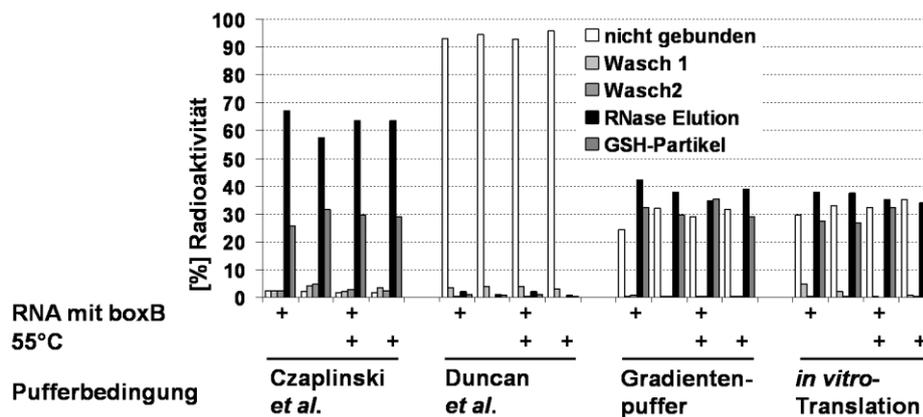


Abb. 2.22.2. Abhängigkeit der boxB-λN-Affinität von den Pufferbedingungen. 20µg GST-λN, 100µl Puffer, 1pmol RNA mit oder ohne boxB; 55°C=Renaturierung der mRNAs; Szintillationsmessung der radioaktiven RNA und Angabe in [%]

Die Glutathion-Sepharose wurde mit SDS-Probenpuffer abgekocht und das daran gebundene GST-λN im Coomassiegefärbten SDS-Gel analysiert (Abb. 2.22.3).

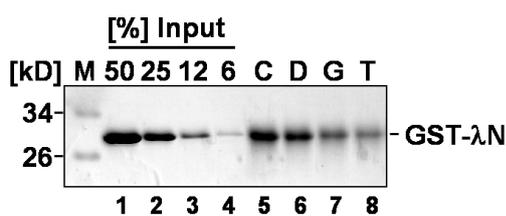


Abb. 2.22.3. Abhängigkeit der Bindung des λN-Peptides an die GSH-Partikel von den Pufferbedingungen
Coomassiefärbung der durch SDS-Probenpuffer von den Partikeln eluierten Proteine aus Abbildung 2.22.3. Pufferbedingungen: C=Czaplinski, D=Duncan, G= Gradientenpuffer, T=Translationsbedingungen; vergl. Tab. 2.22.1

In diesem initialen Experiment wurde deutlich, dass die Pufferbedingungen eine entscheidende Rolle spielen. Die Zugabe von höheren Konzentrationen an Salz und Heparin (Duncan) reduzierte die Interaktion der RNA mit dem λN-Peptid, während die Abwesenheit von Glycerin und NP40 unter Gradienten- bzw. Translationsbedingungen die Benetzbarkeit der Partikel unterdrückte und somit zu einer sehr ineffizienten Bindung des GST-

Fusionsproteins führte (Abb. 2.22.3). Ein offensichtliches Problem stellt die nicht vorhandene Spezifität der RNA-Bindung dar: sowohl die RNA ohne boxB-Struktur als auch mit boxB-Element wurde unter allen hier verwendeten Bedingungen vergleichbar gebunden. Deshalb wurde im nächsten Experiment K562-Zell-Extrakt und kompetitierende tRNA (je Ansatz 5µg) zugegeben (Abb. 2.22.4). Die Pufferbedingungen waren die von Czaplinski, als Kontrollen wurde zusätzlich ein Ansatz ohne ³²P-markiert RNA und einer ohne GST-λN mitgeführt, um die unspezifische Interaktion von Nukleinsäuren und Proteinen mit der Matrix in der SDS-PAGE zu überprüfen (Abb. 2.22.5).

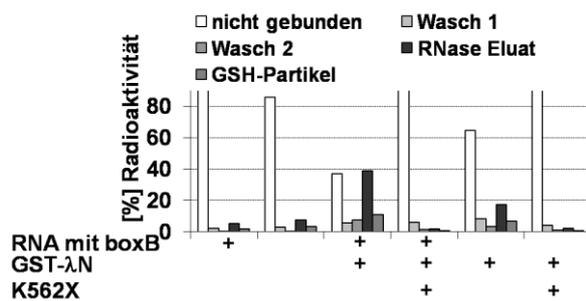


Abb. 2.22.4. GRNA-Chromatographie: ³²P-markierte RNAs (+/- boxB) wurden in K562-Extrakt inkubiert. je 1pmol ³²P-markierter boxB oder Kontroll-RNA, 5µg Kompetitor-RNA, 4mg K562-Extrakt und 20µg GST-λN; Szintillationsmessung

Die Zugabe der kompetitierenden RNA führte zur Spezifität der Interaktion der boxB-enthaltenden RNA mit dem λN, diese Interaktion wurde jedoch durch die Zugabe des Extraktes vollständig gestört. Die Analyse der durch SDS-Probenpuffer eluierten Proteine im Silbergel (Abb. 2.22.5) zeigte eine hohe Hintergrundinteraktion der Extraktproteine mit der Matrix und ließ keine Unterschiede zwischen der RNA mit und ohne boxB-Element erkennen.

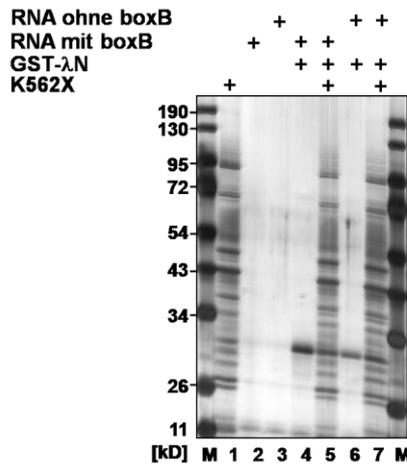


Abb. 2.22.5. Elution der immobilisierten Proteine (GRNA-Experiment Abb. 2.22.5)
8-12% Polyacrylamidgel, Silberfärbung

Zur Verbesserung der Bindungsspezifität wurden vier weitere *boxB-stem-loops* hinter den ORF kloniert und die Bindung der RNA im GRNA-Experiment mit Kontroll-RNAs verglichen (Abb. 2.22.6). Zunächst wurde die Interaktion mit dem λ N-Peptid in Abhängigkeit verschiedener Heparin-Konzentrationen überprüft.

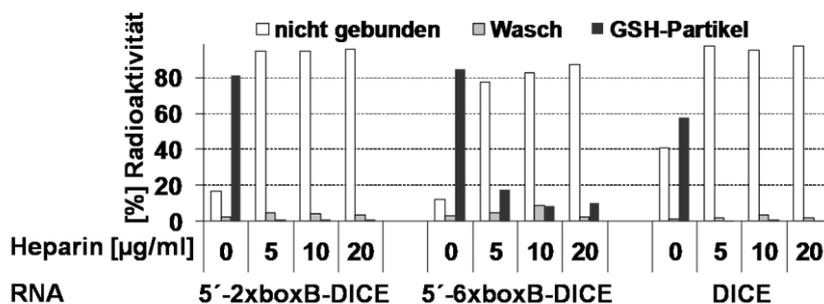


Abb. 2.22.6. GRNA-Spezifität in Abhängigkeit der *boxB*-Anzahl und der Heparinkonzentration.
Je 2µg radioaktive RNA mit oder ohne r15-LOX-5'UTR (5') und 2 oder 6 *boxB-stem-loops* wurden mit 20µg GST- λ N und 5µl Magneto-GSH-beads unter angegebenen Heparin-Konzentrationen inkubiert. Szintillationsmessung

Es stellte sich heraus, dass in Abwesenheit von Heparin unter den gewählten Salzbedingungen (nach Czaplinski) selbst das DICE ohne *boxB*-Element mit dem an die GSH-Partikel gekoppelten GST- λ N interagiert, jedoch bereits 5µg/ml Heparin zu einer für die 6 *boxB*-Elemente spezifischen Bindung führten.

Das Experiment wurde nun in Anwesenheit von 400µg K562-Extrakt und 12µg/ml Heparin (Duncan *et al.*, 2006) unter Translationsbedingungen wiederholt. 20µg GST- λ N wurden an 20µL GSH-Partikel vorgekoppelt und je 5 Translationsreaktionen (50µl) in 200µl Kopplungspuffer verdünnt eingesetzt (Abb. 2.22.7). Die verwendeten RNAs trugen 6 *boxB*-

Elemente und entweder keine 3'UTR (boxB-Δ), das DICE (boxB-DICE) oder die NR-Sequenz (boxB-NR, vergl. Abb. 3.5.1). Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurden je zwei Ansätze getestet. Als Spezifitätskontrolle wurde eine RNA ohne boxB-Element (DICE) eingesetzt. Nach der Elution der aus dem Extrakt gebundenen Proteine mit SDS-Probenpuffer wurden *Western-Blot* und Silberfärbung durchgeführt (Abb. 2.22.8).

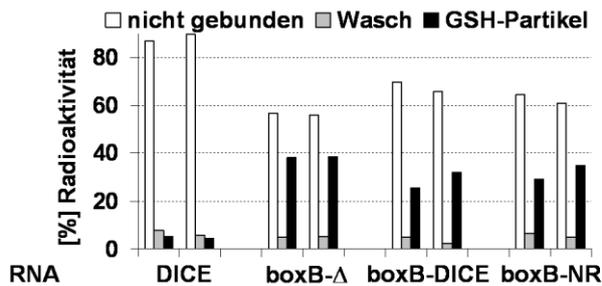


Abb. 2.22.7. GRNA aus K562-Extrakten

je 4µg RNA mit oder ohne 6 boxB-Elementen wurden in 400µg Extrakt für 15min im 50µl Translations-Ansatz bei 30°C inkubiert; 20µg GST-λN wurden an 20µl GSH-Partikel gebunden und dann mit dem Translationsansatz inkubiert. Verwendet wurde der Puffer nach Czaplinski mit 12µg/ml Heparin; Szintillationsmessung

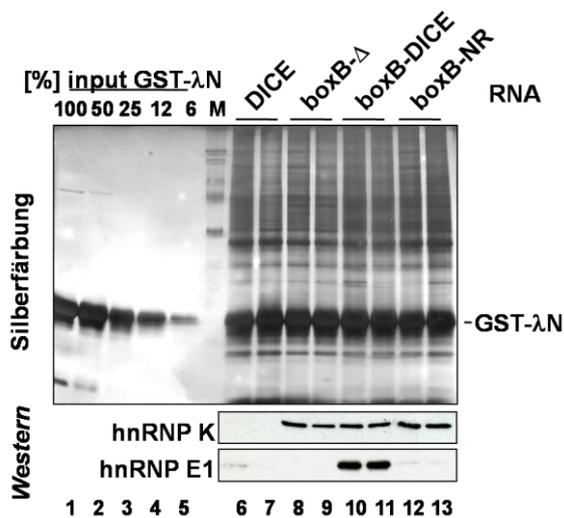


Abb. 2.22.8. Analyse der durch die GRNA immobilisierten Proteine aus Abb. 2.22.8.

Silberfärbung nach 12% SDS-PAGE und *Western Blot* mit für hnRNP K und hnRNP E1 spezifischen Antikörpern

Ein Vergleich von eingesetztem mit eluierten GST-λN zeigte, dass während der GRNA-Prozedur über 50% des Fusionspeptides mit der Matrix interagiert. Die Bindung des hnRNP E1 aus dem K562-Extrakt war spezifisch für die das DICE und 6 boxB-Elemente tragende RNA (Abb. 2.22.8, Bahn 10, 11), jedoch interagiert das endogene hnRNP K mit jeder der

verwendeten boxB-haltigen RNAs (Bahn 8-13), die durch das λ N-Peptid an die Matrix gekoppelt wurden. Eine Ursache dafür könnte die geringe Salzkonzentration (50mM NaCl) oder auch die Verwendung von NaCl statt Kaliumacetat sein. Im Translationsexperiment erfolgte die spezifische Bindung von hnRNP K an die DICE-enhaltende RNA bei 120mM Kaliumacetat (Vergleich Kapitel 3.4), für die Fraktionierung der RNA-Protein-Komplexe im Saccharosegradienten wurden 150mM Kaliumacetat verwendet. Deshalb wurden im nächsten GRNA-Experiment 120 und 150mM Kaliumacetat getestet (Abb. 2.22.9 und 2.22.10).

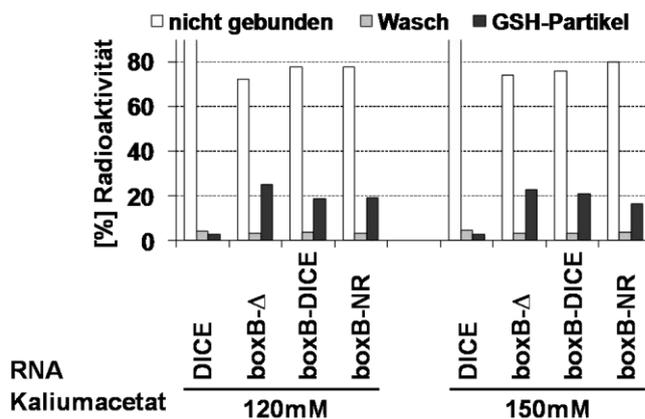


Abb. 2.22.9. GRNA: Abhängigkeit der Spezifität von der Kaliumacetat-Konzentration.

je 10pmol RNA mit oder ohne 6 boxB-Elementen wurden in 400 μ g Extrakt für 15min im 50 μ l Translations-Ansatz bei 30°C inkubiert; 20 μ g GST- λ N wurden an 10 μ l GSH-Partikel gebunden und anschließend mit dem Translationsansatz inkubiert. Verwendet wurde der Puffer nach Czaplinski mit 12 μ g/ml Heparin. Szintillationsmessung

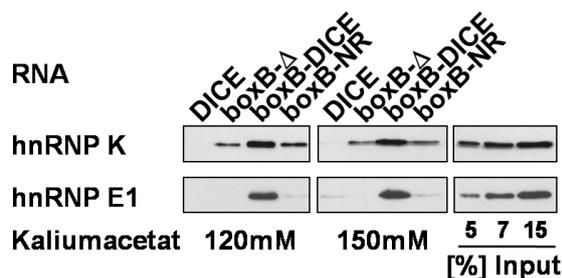


Abb. 2.22.10. Analyse der durch die GRNA immobilisierten Proteine aus Abb. 2.22.9.

Immunoblot nach 12% SDS-PAGE mit für hnRNP K und hnRNP E1 spezifischen Antikörpern

Die Analyse der immobilisierten Proteine im *Western Blot* zeigte nun die spezifische Anreicherung beider Proteine hnRNP K und hnRNP E1 bei Verwendung der boxB und DICE enthaltenden RNA (Abb. 2.22.10). Im Vergleich zum *Western-Blot*-Signal im eingesetzten Extrakt wurden etwa 10% des endogenen Proteins isoliert.

Nach Analyse der für den *Western Blot* in Abb. 2.22.10 verwendeten Proteinproben im Silbergel stellte sich heraus, dass die geringe Reinigungs-Effizienz der Methode die Kombination mit einem weiteren Reinigungsschritt nötig macht, z.B. die Immunopräzipitation. Dies erforderte eine effiziente und native Elution der RNA-Protein-Komplexe von den GSH-Partikeln, deshalb erfolgte die Elution mit 50mM Glutathion (Abb. 2.22.11). Die Partikel wurden 2-3 mal 5min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Prozedur wurde parallel im Kopplungspuffer ohne GSH getestet und zeigte nur zum geringen Anteil eine Freisetzung der Radioaktivität durch die Inkubation bei Raumtemperatur. Alle drei GSH-Elutionsfraktionen wurden vereinigt und die enthaltene RNA-Menge indirekt über Szintillationsmessung bestimmt. Zum Vergleich der Effizienz wurde die bereits oben angewendete Elution mit RNase A (vergl. Abb. 2.22.2 und 2.22.4) durchgeführt.

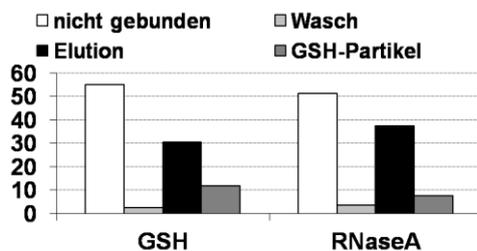


Abb. 2.22.11. GRNA und Elution der RNA

je 2 pmol RNA mit 6boxB-Elementen wurde im 20µl-Translations-Ansatz inkubiert. 20µg GST-λN wurden an 10µl GSH-Partikel gebunden und dann mit dem Translationsansatz inkubiert. Verwendet wurde der Puffer nach Czaplinski mit 12µg/ml Heparin, GSH=Elution mit 50mM GSH; RNaseA=Elution mit 100µg/ml RNase A; Szintillationsmessung

Zur Analyse der Stabilität von Initiationskomplexen während der GRNA wurden diese aus Sacchararose-Dichtegradienten-Fractionen immobilisiert und ebenso mit Glutathion eluiert. Dafür wurden die 48S-Fractionen (je etwa 600µl) mit 300µl GSH-Sepharose mit 500µg vorgekoppeltem GST-λN inkubiert (vergl. Abb. 3.5.4 und 3.5.5).

Zusammenfassend konnte die spezifische GRNA für die das DICE-tragende boxB-enthaltende mRNA etabliert werden: Für je 10pmol RNA wurden 10µl Sepharose-Partikel (20µl einer 1:1-Aufschwemmung) 4x mit 0,5ml GRNA-Puffer gewaschen, dann wurden jeweils 20µg GST-λN in 200µl GRNA-Puffer für 1h bei 800rpm im Kühlraum in Bio-Rad-Säulchen an die GSH-Matrix gebunden. Nach dreifachem Waschen mit 0,5ml GRNA-Puffer wurde die vorbehandelte Sepharose mit der Translationsreaktion beladen. Dafür wurden 10pmol mRNA in einem 10-fachen Translationsansatz (100µl) mit je 40µl Extrakt (entspricht etwa 800µg) 15min inkubiert, dann mit 100µl GRNA-Puffer (Tab. 2.22.2) verdünnt, auf die

GSH-Sepharose mit GST- λ N gegeben und 1h im Kühlraum bei 800rpm und 6°C im Thermoschüttler inkubiert.

Tab. 2.22.2: Optimale Pufferbedingungen der GRNA

| |
|--|
| GRNA-Puffer |
| 20mM Tris, pH=7,6 |
| 150mM KCH ₃ COO |
| 1,5mM Mg(CH ₃ COO) ₂ |
| 12 μ g/ml Heparin |
| 1mM DTT |
| 0,05% NP40 |
| 8,7% Glycerin |

Bei der GRNA-Reinigung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Komplexes, die mit der hnRNP K-Immunopräzipitation kombiniert wurde, erfolgt die Inkubation von je 100pmol RNA in einer 250 μ l-Translationsreaktion mit 100 μ l (2mg) K562-Extrakt. Verwendet wurden hier 100 μ l in GRNA-Puffer äquilibrierte GSH-Sepharose und 200 μ g GST- λ N in 500 μ l GRNA-Puffer. Nach dreifachem Waschen mit je 500 μ l GRNA-Puffer wurde der Translationsmix mit je 250 μ l verdünnt, auf die vorinkubierte Sepharose gegeben und für 1h im Kühlraum bei 6°C, 800rpm inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde mit 3x200 μ l 50mM GSH in GRNA-Puffer je 5min bei RT und 800rpm eluiert. Vom Eluat wurde eine Probe im Silbergel und im *Western Blot* analysiert (vergl. Abb. 3.5.8 und 3.5.9), der Rest wurde vollständig auf die vorbereitete Protein-A-Sepharose gegeben (vergl. 2.12).

2.23 Tryptische *In-Gel*-Spaltung und Peptid-Isolation

Die massenspektrometrische Untersuchung der durch die kombinierte GRNA-Immunopräzipitations-Reinigung (vergl. 2.22) aus dem K562-Extrakt isolierten Proteine erfolgte nach tryptischer *In-Gel*-Spaltung. Hierfür wurden die Proben in einem NuPAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und durch Coomassie angefärbt. Die gesamte Gel-Bahn wurde in 23 Stücke unterteilt und jedes einzelne Gel-Stück wurde im 0,5ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß nach Reduktion und Alkylierung der Spaltung durch Trypsin und der anschließenden Peptid-Isolation unterzogen. Die Inkubationsschritte wurden jeweils für die angegebenen Zeiten im Thermomixer bei 1050rpm vollzogen, die Flüssigkeit wurde nach kurzer Zentrifugation der Gelstücke möglichst vollständig entfernt.

Zunächst wurden die Gelstücke 5min bei 26°C in 150 μ l Wasser gewaschen. Nach Entfernen der Flüssigkeit wurden sie in 150 μ l Acetonitril 15min bei 26°C entfärbt, dann wurden die

Gelstücke 5min in der *SpeedVac* getrocknet. Zur Reduktion von Disulfidbrücken wurde 50min bei 56°C in 100µl 10mM DTT inkubiert, anschließend wurde die Flüssigkeit entfernt. Die Gelstücken wurden erneut in Acetonitril 15min bei 26°C gewaschen, um dann die Cystein-Reste durch die Inkubation in 100µl 55mM Jodacetamid/100mM NH₄HCO₃ für 20min bei 26°C zu alkylieren. Im Anschluss wurden die Gelstücke jeweils 15min bei 26°C in 100mM NH₄HCO₃ und nachfolgend erneut in 150µl Acetonitril gewaschen. Die Gelstücke wurden nach dem 5-minütigen Trocknen in der *SpeedVac* in Trypsin-haltigem (12,5µg/ml Trypsin) Protease-Puffer (42mM NH₄HCO₃, 4,2mM CaCl₂) rehydriert. Zunächst wurde nur ein kleines Volumen (etwa 5µl) zugegeben. Der Quellvorgang fand auf Eis statt und wurde alle 10min überprüft. War der Puffer bereits vollständig aufgesogen, wurde erneut ein kleines Volumen zugeben. Dieser Vorgang wurde wiederholt, bis die Gelstücke vollständig gequollen waren und war nach etwa 45min abgeschlossen. Dann wurden die Gelstücke mit 20µl Trypsin-freiem Protease-Puffer bedeckt und 16h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation erfolgte die Zugabe von 15µl Wasser. Das Gelstück wurde 15min bei 26°C inkubiert und dann mit etwa 70µl Acetonitril versetzt (hier sollte das resultierende Flüssigkeitsvolumen in etwa dem des Gelstückes entsprechen). Nach der 15-minütigen Inkubation bei 37°C wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt. Dann wurden 60µl Ameisensäure (5%) zum Gelstück gegeben und erneut 15min bei 26°C inkubiert, bevor erneut 65µl Acetonitril zugesetzt wurden. Nach weiteren 15min bei 26°C wurde das Gelstück zentrifugiert und der Überstand zum vorherigen gegeben. Diese Probe wurde vollständig in der *SpeedVac* eingedampft.

Alle weiteren Schritte, die die Resolvatisierung und HPLC-Reinigung der Peptide mit anschließender Massenanalyse betreffen, wurden in der Arbeitsgruppe von Dr. Henning Urlaub im Max-Planck-Institut Göttingen durchgeführt.

Die erhaltenen *Peak*-Listen der Peptid-Massen wurden dann mit Hilfe von Mascot (MASCOT MS/MS ions search unter <http://www.matrixscience.com>, siehe 2.24) analysiert.

2.24 Auswertung der massenspektrometrischen Daten

Die massenspektrometrische Analyse der generierten Peptide erfolgte im Max-Planck-Institut Göttingen in der Arbeitsgruppe von Dr. Henning Urlaub. Zur Anwendung kam die Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie (ESI-Q-TOF-Massenspektrometer Ultima,

Waters). Dabei wurden die aus dem Gel isolierten Peptide (vergl. 2.23) nach der Probenvorbereitung über *Reversed-Phase-HPLC* im elektrischen Feld ionisiert und desolvatisiert. Die resultierenden ESI-Spektren zeigten *Peaks* mit definierten Masse-Ladungs-Verhältnissen. Diese *Peak*-Listen wurden für jedes einzelne Gelstück erstellt und mit ihnen mit MASCOT eine Suchanfrage gestartet (MASCOT MS/MS ions search unter <http://www.matrixscience.com>, Abb. 2.24.1). Diese bedient sich der NCBI-Datenbank, um die ermittelten Peptidmassen bekannten Aminosäure-Sequenzen zuzuordnen und somit die vorhandenen Proteine zu identifizieren.

Mascot > MS/MS Ions Search

MASCOT MS/MS Ions Search

| | | | |
|---|---|---|--|
| Your name | <input type="text"/> | Email | <input type="text"/> |
| Search title | <input type="text"/> | | |
| Database | NCBIInr | | |
| Taxonomy | Homo sapiens (human) | | |
| Enzyme | Trypsin | Allow up to | 2 missed cleavages |
| Fixed modifications | <ul style="list-style-type: none"> Carbamidomethyl (C) Carbamyl (K) Carbamyl (N-term) Carboxymethyl (C) Cation:Na (C-term) | Variable modifications | <ul style="list-style-type: none"> NIPCAM (C) Oxidation (HW) Oxidation (M) Phospho (ST) Phospho (Y) |
| Quantitation | None | | |
| Peptide tol. ± | 0.6 Da | # ¹³ C | 0 |
| MS/MS tol. ± | 0.6 Da | | |
| Peptide charge | 2+ and 3+ | Monoisotopic | <input checked="" type="radio"/> Average <input type="radio"/> |
| Data file | <input type="text"/> <input type="button" value="Durchsuchen..."/> | | |
| Data format | Micromass (.PKL) | Precursor | <input type="text"/> m/z |
| Instrument | ESI-QUAD-TOF | Error tolerant | <input type="checkbox"/> |
| Decoy | <input type="checkbox"/> | Report top | AUTO hits |
| <input type="button" value="Start Search ..."/> | | <input type="button" value="Reset Form"/> | |

Abb. 2.24.1: Suchemaske für die MASCOT-Suche unter <http://www.matrixscience.com>

Die verwendete Datenbank war NCBI, es wurde nur in humanen Sequenzen gesucht. Die erlaubten Trypsin-Fehlsplattungen waren 2, d.h. dass identifizierte Peptide bis zu zwei weitere Trypsin-Zielsequenzen tragen durften. Acetylierung war die festgesetzte Modifizierung, während mögliche Oxidationen berücksichtigt wurden.

Die Einschränkung der bei der MASCOT-Anfrage zu verwendenden Datenmengen aufgrund der nicht vorhandenen Lizenz machte zunächst eine Partitionierung einzelner *Peak*-Listen notwendig. Die Anfrage wurde für jedes einzelne Gelstück vorgenommen und ermöglichte die Zuordnung von falsch-positiven Proteinen aufgrund eines Vergleichs der Gelstück-Nummer mit dem Molekulargewicht der aufgetragenen Marker-Proteine (Abb. 2.24.2).

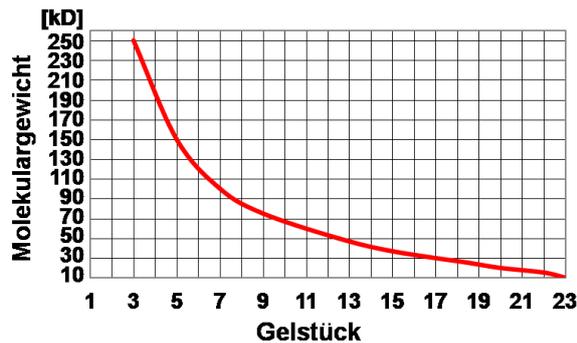


Abb. 2.24.2. Verhältnis der Gelstück-Nummer und der Protein-Molekulargewichte

Die Analyse des Gelstückes 16 aus der Gelbahn der DICE-spezifischen Reinigung (vergl. Abb.3.5.11) ist exemplarisch im Anhang gezeigt. Die *Peak*-Liste war auch hier zu groß, deshalb wurde in 16_1 bis 16_3 fragmentiert. Die Auswertung von 16_1 ergab die in Abbildung A1.A-D gezeigten MASCOT-Ergebnisse (Anhang). Die meisten der Peptide konnten poly(rC)-binding protein 1 (hnRNP E1) mit einem *Score* von 192 zugeordnet werden. Ein großer Teil dieser Peptide findet sich neben weiteren auch in poly(rC)-binding protein 2 (hnRNP E2), einem dem hnRNP E1 zu 82% homologen Protein. Die Peptide aus Keratin sind Verunreinigung, die wahrscheinlich während der Extrakt-Präparation, GRNA-Reinigung, Immunopräzipitation oder Proben-Aufbereitung aufgetreten sind und können vernachlässigt werden. Weitere Peptide konnten HuR, hnRNP A2/B1, SMN und rpS3 zugeordnet werden.

Zusätzlich zu den eindeutig identifizierten Proteinen konnten noch Peptide zugeordnet werden, die jedoch geringere *Scores* trugen. Alle Peptide mit *Scores* über 20 wurden ebenfalls beachtet. Durch die Partitionierung der *Peak*-Listen und die Verwendung mehrerer Gelstücke ist zu beachten, dass verschiedene Peptide eines Proteins in unterschiedlichen Macot-Ergebnis-Listen auftraten, was dann die Wahrscheinlichkeit der tatsächlichen Anwesenheit dieses Proteins in einer Probe erhöhte.

So waren Peptide von hnRNP E1 und hnRNP E2 nicht nur in 16_1 sondern in 16_2, 16_3, 15_1 und 15_2 vorhanden. Die entsprechenden *Scores* sind in Tabelle 3.5.2 zusammengefasst. Die Sequenzabdeckung der identifizierten Peptide innerhalb der Protein-Sequenz ließ sich ebenso überprüfen und ist für hnRNP E1 im Anhang gezeigt (Abb. A2). Die Analyse aller Peptide aus den einzelnen Gelstücken wurde für die DICE-spezifische Reinigung und die Kontrolle durchgeführt. Die Ergebnis-Listen wurden verglichen und Proteine, welche in beiden Gelbahnen vertreten waren, als nicht DICE-spezifisch angereichert interpretiert. Ein Vergleich der beiden Ergebnis-Listen ist in Tab. 3.5.1 zusammenfasst.

2.25 Untersuchungen zur Protein-Protein-Interaktion: GST-pulldown

Für den GST-pulldown wurden die Glutation-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1 oder GST an GSH-Matrix immobilisiert und mit K562-Extrakt inkubiert. Die Detektion eines potentiellen Interaktionspartners erfolgte durch spezifische Antikörper im *Western Blot* (vergl. 2.11). Zum Blockieren der Gluthationmatrix (GSH-Sepharose) wurden 1µg/µL BSA und 200ng/µL Glycogen verwendet.

Die in Bindungspuffer (150mM Kaliumacetat, 1mM Magnesiumacetat, 0,05% NP40, 20mM Hepes pH=7,4, 1mM DTT, 10% Glycerin) äquilibrierte Glutathion-Sepharose (je Ansatz 10µl) wurde mit je 100 oder 200pmol GST, GST-hnRNP E1 oder GST-hnRNP K durch 30-minütige Inkubation im Kühlraum im Thermomixer bei 6°C und 800rpm beladen. Nach erneutem Waschen wurde der im Bindungspuffer verdünnte cytoplasmatische K562-Extrakt (400µg, 20µl in 180µl Puffer) zugegeben. Nach halbstündigem Schütteln (800rpm, 4°C) wurde erneut zweimal gewaschen und in 50µL SDS-Probenpuffer eluiert. Die Inkubation der Sepharose erfolgte bei diesem Experiment in verschließbaren Bio-Rad-Säulchen. 1µl des Eluats wurde im silbergefärbten SDS-Gel analysiert, je 5µl wurden für die *Western Blots*-Analysen im Gradientengel (10-18% Acrylamid) aufgetrennt; nach dem *Blotten* auf PVDF wurde die Immunodetektion mit den angegebenen Antikörpern durchgeführt.

Zur Untersuchung der RNA-Abhängigkeit potentieller Protein-Protein-Interaktionen wurde der Extrakt (2mg für 5 Ansätze) im Bindungspuffer 1:1 verdünnt bei einer Calciumkonzentration von 1mM mit 1000U Mikrokokkus-Nuklease (Fermentas) behandelt. Die Zugabe von 2,5mM EGTA führte zur Inaktivierung der Nuklease. Dem Bindungsansatz konnte nun auch kompetitierende RNA zugesetzt werden. Dafür wurden unmittelbar vor dem GST-pulldown-Experiment zum Extrakt entweder 50pmol der *in vitro* synthetisierten DICE-RNA (etwa 20µg) oder als unspezifischer Kompetitor 20µg des α -globin 5'leader gegeben.

2.26 Fraktionierung von K562-Extrakten durch Dichtegradientenzentrifugation

Cytoplasmatische Extrakte aus K562-Zellen, die ohne hypertonische Kaliumchloridvorbehandlung gewonnen wurden, wurden zur Analyse der Verteilung endogener mRNAs und Proteine durch Dichtegradientenzentrifugation fraktioniert. Dafür

wurden je 100µl Gesamtextrakt (2mg), gewonnen sowohl aus nicht-induzierten als auch aus für 8 Tage induzierten Zellen, durch Zugabe von Kaliumacetat und Magnesiumchlorid auf Saccharosegradienten-Bedingungen (SG-Puffer; vergl. 2.21) eingestellt und auf einen 5-25%igen Saccharosegradienten (12ml) geladen. Durch Zentrifugation für 2h (ohne Bremse) in einem Beckmann SW40Ti-Rotor bei 4°C und 40000rpm sedimentierten vorhandene Komplexe entsprechend ihrer Dichte und Größe. Die Gradienten wurden vom Boden aus abgepumpt und fraktioniert (je 600µl). Mit Hilfe einer an die Pumpe angeschlossenen UV-Detektionseinheit wurde die Absorption bei 280nm aufgezeichnet.

Von jeder Fraktion wurden Proben mit SDS-Probenpuffer vermischt und für die *Western Blot*-Analysen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Antikörper gegen rpS3, eIF6 und eIF2 dienten als Marker für die Position von 80S, 60S und 43S, welche den *Peaks* des Elutionsprofils zugeordnet werden konnten (Abb. 2.26.1). Zur Detektion weniger abundanter Proteine oder bei weniger sensitiven Antikörpern wurden aus je 200µl jeder Fraktion mit Hilfe der Methanol-Chloroform-Präzipitation (vergl. 2.7) die Proteine ausgefällt und in Probenpuffer aufgenommen. Die RNA wurde aus je 300µl der Fraktionen mit Trizol (vergl. 2.5) extrahiert, um enthaltene mRNAs durch RT-PCR (vergl. 2.27) zu detektieren.

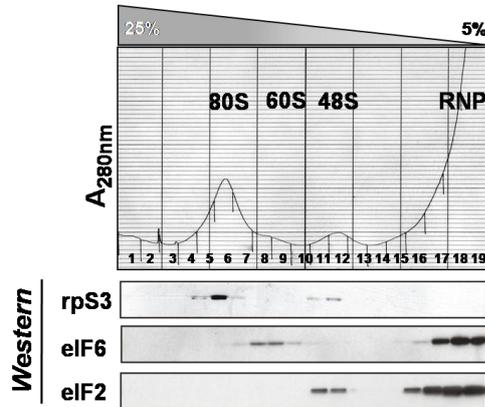


Abb.2.26.1 Elutionsprofil und *Western-Blot*-Analyse der Gradientenfraktionen

Absorptionsmessung bei 280nm; *Western-Blot*-Analyse der einzelnen Fraktionen mit Antikörpern gegen rpS3, eIF6 und eIF2 zur Markierung von 80S (Fraktionen 5-7), 60S (Fraktionen 8-9) und 48S (Fraktionen 11-13). Freie RNPs in Fraktionen 17-19. 5-25% Sacchararose; 12% SDS-PAGE; *Western blot*

2.27 RT-PCR zur Analyse der Gradientenfractionen

Für die Reverse-Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde zunächst RNA isoliert, die cDNA synthetisiert und dann der interessierende Sequenzabschnitt durch PCR amplifiziert.

Die verwendete RNA wurde mit Hilfe der Trizol-Methode aus 300µl je Gradientenfraction isoliert (vergl. 2.5) und nach Ethanol-Fällung in 25µl Wasser aufgenommen. Die cDNA-Synthese erfolgte nach dem Protokoll der M-MuLV-Reversen Transkriptase (Promega) nach der Zugabe von 10pmol (dT)₁₂.

Die sich anschließende PCR wurde mit je 1µl der cDNA-Lösung und 24µl Go-Taq-PCR-Mix (Promega) mit 0,2µM dNTPs, 1,5mM MgCl₂, 1µM der Primer für unterschiedliche Zyklenzahlen durchgeführt. Tabelle 2.27.1 fasst die verwendeten Primer zusammen, welche für die RT-PCR der humanen r15-LOX-mRNA, α-globin-mRNA und γ-globin-mRNA spezifisch sind. Die Primer waren stets so entworfen, dass sie Exon-Exon-Grenzen der prozessierten mRNA bzw. der resultierenden cDNA überspannten (Naarmann *et al.*, 2008).

Tab.2.27.1 Die für die RT-PCR verwendeten Primer
annealing 55°C

| mRNA | Vorwärts-Primer | Revers-Primer | Produkt |
|----------|------------------------|-----------------------|---------|
| α-globin | GAGAGGATGTTCTCCTGTCCTT | CAGTGGCTTAGGAGCTTGAA | 224 nt |
| γ-globin | AAACCCTGGGAAGGCTCCT | TTCCCAGGAGCTTGAAGTTC | 246 nt |
| hr15-LOX | TGAGCTGCAGTCTCATCTTC | CAGTGCTCATTATCTGGTCG | 197 nt |
| GAPDH | ACAGTCAGCCGCATCTTCTT | CTGGAAGATGGTGTATGGGAT | 290 nt |

Die Analyse der PCR-Produkte erfolgte im Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegel. Zur Gewinnung der DDX6-cDNA aus K562-Zellen wurde ebenfalls die RT-PCR angewendet (vergl. 2.3). Auch die Überprüfung des Nukleaseverdaus von K562-Extrakt wurde durch RT-PCR mit für GAPDH spezifischen Primern durchgeführt.

28 RNA-Interferenz und Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Zur Reduktion der DDX6-Proteinkonzentration in K562-Zellen wurden siRNAs transfiziert, die zur DDX6-mRNA-Sequenz komplementär sind (Tab. 2.28.1). Diese siRNAs wurden als RNA-Duplexe mit Di-Desoxy-Thymidin-Überhang (MWG Biotech) bestellt und in einer Konzentration von 100µM gelöst. Die Transfektion erfolgte durch Elektroporation im GenePulser (Bio-Rad) bei 0,36kV, 100µF für 1,5msec. Dabei wurden 1Mio K562-Zellen in

1ml serumfreiem RPMI mit je 500pmol der siRNA oder einer Mischung aus je 166pmol aller drei siRNAs transfiziert. Die Zellen wurden in 9ml serumhaltigem Medium mit Antibiotikum/Antimycotikum-Mix verdünnt und nach 48h wurden Triton-Lysate hergestellt. Zunächst wurde ein *Western Blot* durchgeführt (vergl. Abb. 3.7.1), um den DDX6-Gehalt zu überprüfen.

Die siRNA#1 (Chu und Rana, 2006) führte zu einer Reduktion des DDX6-*Western-Blot*-Signals. Sie wurde erneut transfiziert und der Effekt des *knock-down* durch Immunofluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Isabel Naarmann).

Tab. 2.28.1. Sequenzen der DDX6-spezifischen siRNAs

| siRNA | Sequenz |
|------------|---------------------------|
| DDX6#1 Chu | GCAGAAACCCUAUGAGAUU(dTdT) |
| DDX6#2 | ACACCAACACAAUCAAUAA(dTdT) |
| DDX6#3 | UCCUGGAUCUUUAUAAGAA(dTdT) |

Für die Immunfärbung der in Suspension wachsenden K562-Zellen wurden sie zunächst auf mit Poly-L-Lysin (Sigma) beschichteten Deckgläschen zentrifugiert (500g, 5min, RT) und die nach 30min bei 37°C angehefteten Zellen mit PBS gewaschen. Diese wurden mit 4% PFA (Paraformaldehyd: Accustain, Sigma) in PBS 30min bei Raumtemperatur fixiert, zweimal mit PBS gewaschen, in 0,2% Triton in PBS für 5min bei Raumtemperatur permeabilisiert und erneut 3mal in PBS gewaschen.

Geblockt wurde 25min mit 2% BSA in PBS. Der α -DDX6-Antikörper (*rabbit*, Santa Cruz) wurde 1:400 verdünnt eingesetzt, der α -r15-LOX-Antikörper (*guinea pig*, Rapoport *et al.*, 1979) 1:200. Die Inkubation erfolgte in 0,2% BSA in PBS 1h bei 37°C. Danach wurden die Zellen 5mal in PBS gewaschen und anschließend 1h bei 37°C mit den sekundären Antikörpern in 0,2% BSA/PBS inkubiert. Der α -*rabbit*-Antikörper (Dianova) war an Cy3 (566nm) gekoppelt, der α -*guinea pig*-Antikörper (Invitrogen) an Alexa488 (520nm). Die mikroskopische Untersuchung erfolgte nach 5maligem Waschen und Eindeckeln in Prolong Gold (Invitrogen) mit DAPI (460nm) zur Zellkernfärbung im Axiovert 200M (Zeiss) mit einem Objektiv mit 100facher Vergrößerung bei den benötigten Wellenlängen.

3. ERGEBNISSE

3.1 Die Phosphorylierung von Tyrosin 458 in hnRNP K durch c-Src beeinflusst die DICE-Bindung und die Translations-Inhibition

hnRNP K wirkt nach Co-Transfektion in HeLa-Zellen und auch *in vitro* als Aktivator der Tyrosin-Kinase c-Src und wird durch die Kinase phosphoryliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002, Adolph *et al.*, 2007). Diese Phosphorylierung reduziert den inhibitorischen Effekt von hnRNP K auf die DICE-abhängige Translation und gilt als der wesentliche regulierte Schritt der Translations-Aktivierung von der r15-LOX-mRNA (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Massenspektrometrische Untersuchungen identifizierten sechs Tyrosine in hnRNP K als Substrate von c-Src. Ihr Austausch gegen Phenylalanin führte jedoch nicht zu einer vollständigen Inhibition der Phosphorylierung durch c-Src und der Austausch gegen Aspartat konnte die Aufhebung der DICE-Bindung und die De-Repression der DICE-abhängigen Translations-Inhibition nicht reproduzieren, was auf mindestens ein weiteres c-Src-Substrat-Tyrosin in hnRNP K schließen lässt, welches in der initialen Analyse nicht identifiziert wurde (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Die dritte KH-Domäne (KH3) von hnRNP K wurde in UV-*crosslink*-Experimenten als die DICE-bindende Domäne identifiziert (Harnisch, 2004; Messias *et al.*, 2006). In dieser befinden sich zwei weitere Tyrosine: Y449 und Y458. Das diese Aminosäuren tragende durch Trypsinspaltung entstandene Peptid konnte in der massenspektrometrischen Untersuchung nicht nachgewiesen werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Daher wurde der Einfluss der beiden Tyrosine in KH3 von hnRNP K als mögliche Substrate von c-Src und regulatorische Elemente der Translations-Aktivierung näher untersucht.

Zur Analyse der Funktion von Y449 und Y458 in der KH3 von hnRNP K wurde diese als Hexa-Histidin-Fusions-Peptid heterolog in *E.coli* exprimiert und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Die Primärstruktur entsprach dem Wildtyp bzw. dem Aminosäure-Austausch Y449D, Y449F, Y458D oder Y458F. Der Austausch gegen Aspartat dient dem Einbringen einer negativen Ladung, wodurch eine Phosphorylierung simuliert wird. Phenylalanin ist eine dem Tyrosin strukturell ähnliche Aminosäure, welche jedoch nicht als Kinase-Substrat dient. Nach der Reinigung wurde das N-terminale His-Peptid durch die TEV-Protease abgespalten. Um die RNA-Bindung der isolierten dritten KH-Domäne und der generierten Varianten zu untersuchen, wurden sie im *North-Western-Blot* (NWB) mit ³²P-markiertem DICE inkubiert (Abb. 3.1.1).

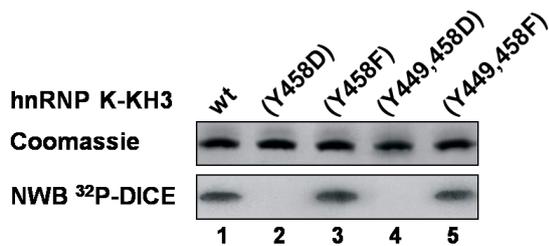


Abb. 3.1.1. Tyrosin 458 ist für die DICE-Bindung essentiell.

18% SDS-PAGE und Coomassiefärbung der rekombinant exprimierten KH-Domäne 3 von hnRNP K und ihrer Varianten nach der Reinigung über Ni-NTA. Je 20 pmol der KH3 oder ihrer Varianten wurden zur Analyse ihrer DICE-Bindungsaktivität im NWB mit ³²P-markierter DICE-RNA untersucht.

Die KH-Domäne mit der Wildtypsequenz (wt) interagiert mit der ³²P-markierten DICE-RNA (Abb. 3.1.1, Bahn 1), ebenso die beiden Tyrosin-zu-Phenylalanin-Varianten (Y458F und Y449,458F, Bahn 3 und 5). Die Einführung der negativen Ladung durch den Austausch Y458D reduzierte die DICE-Bindung in der Einzel- (Y458D, Bahn 2) und in der Doppelmutante (Y449,458D, Bahn 5) signifikant. Der alleinige Austausch von Y449 zu Aspartat oder Phenylalanin hatte keinen Einfluss auf die DICE-Bindung (ohne Abb., Messias *et al.*, 2006).

Die Ergebnisse der DICE-Bindungsanalyse identifizierten Y458 in der dritten KH-Domäne von hnRNP K als für die RNA-Bindung wichtig und zeigten, dass dessen „hypothetische Phosphorylierung“ durch das Einbringen einer negativen Ladung die Bindung an das DICE deutlich reduzierte. Im folgenden Phosphorylierungs-Experiment wurde die Funktion von Y449 und Y458 in der KH3 von hnRNP K als Substrat von c-Src untersucht. Dafür wurde die KH3 und ihre Varianten mit rekombinantem c-Src (Biomol) inkubiert und anschließend ihre Phosphorylierung im *Western Blot* mit einem Phospho-Tyrosin-spezifischen Antikörper untersucht. Außerdem wurde die DICE-Bindungsaktivität der *in vitro*-phosphorylierten Domänen im NWB analysiert (Abb. 3.1.2).

Die KH-Domäne mit der Wildtypsequenz wurde durch c-Src phosphoryliert (Abb. 3.1.2, Bahn 2), ebenso die Varianten KH3(Y449D) und (Y449F) (Bahn 4 und 6), während die Varianten, in denen Y458 gegen Aspartat oder Phenylalanin ausgetauscht war, nicht mehr als c-Src-Substrat fungierten (Bahnen 8,10,12,14). Die Phosphorylierung der Varianten, welche Y458 enthielten, reduzierte deren DICE-Bindung (Bahn 2,4,6) genauso wie der (Y458D)-Aminosäure-Austausch (Bahnen 7,11). Dagegen verhinderte der Austausch durch Phenylalanin die Phosphorylierung, ohne die DICE-Bindung zu beeinflussen (Bahnen 9,10,13,14).

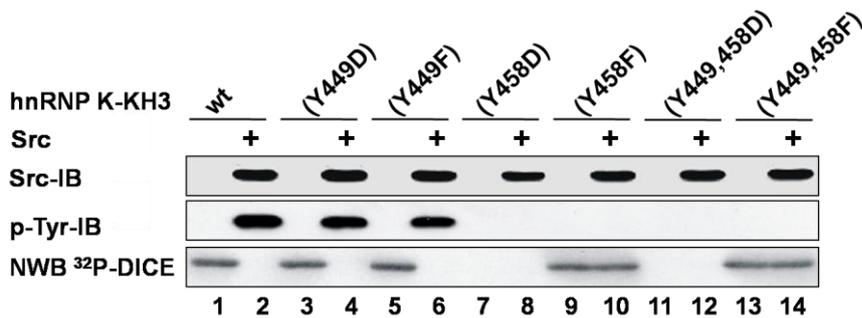


Abb. 3.1.2. Die Phosphorylierung des Tyrosins 458 in der dritten KH-Domäne von hnRNP K inhibiert die DICE-Bindung.

Je 20 pmol der KH-Domäne 3 und ihrer Varianten wurden mit oder ohne c-Src (Src-IB) im *in vitro*-Phosphorylierungsexperiment inkubiert und anschließend im Immunoblot hinsichtlich ihrer Phosphorylierung (p-Tyr-IB) und im *North-Western-Blot* (NWB) mit ³²P-markierter DICE-RNA auf ihre DICE-Bindungsaktivität untersucht.

Das Y458 in der dritten KH-Domäne von hnRNP K konnte eindeutig als Substrat von c-Src identifiziert werden und es wurde demonstriert, dass dessen Phosphorylierung ebenso wie der Austausch gegen Aspartat die DICE-Bindung deutlich reduziert. Die Funktion der Y458-Phosphorylierung auf die DICE-Bindung wurde nachfolgend im Kontext des rekombinanten hnRNP K untersucht. Dafür wurde das Y458 gegen Aspartat ausgetauscht und sowohl das Wildtypprotein als auch die Y458D-Variante als His-Fusionsprotein in *E.coli* exprimiert und über Ni-NTA gereinigt. Beide Proteinvarianten wurden in Zusammenarbeit mit Dr. R. Golbik auf die Integrität ihrer Sekundärstruktur CD-spektroskopisch untersucht (Abb. 3.1.3).

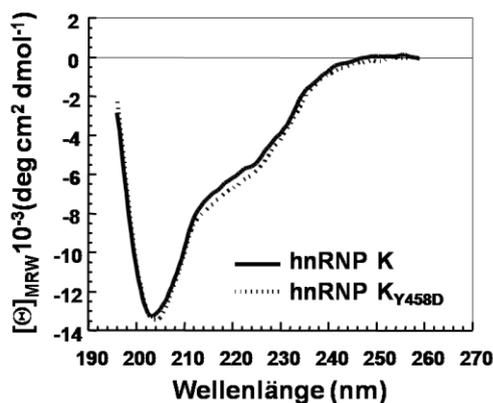


Abb. 3.1.3. Fern-UV Circular dichroismus von hnRNP K und hnRNP K(Y458D).

Proteinkonzentration: 0,04 mg/ml, Puffer: 50 mM KCl; 0,1 mM Kaliumphosphat, pH=7,4; 5% Glycerol, d=1mM, T=20°C, f =2305;126103

Es konnten keine signifikanten Abweichungen der beiden Spektren voneinander festgestellt werden. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Einführung des Aminosäureaustausches keinen Einfluss auf die Proteinstruktur hatte.

Die DICE-Bindung der Proteine hnRNP K und hnRNP K (Y458D) wurde im UV-*crosslink*-Experiment analysiert. Hierfür wurden verschiedene Proteinmengen (je 100ng und 200ng, entsprechend 0,18µM bzw. 0,36µM) mit ³²P-markierter DICE-RNA inkubiert. Die resultierenden RNA-Protein-Komplexe wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht (λ=254nm) vernetzt und durch SDS-PAGE und Autoradiographie untersucht (Abb. 3.1.4).

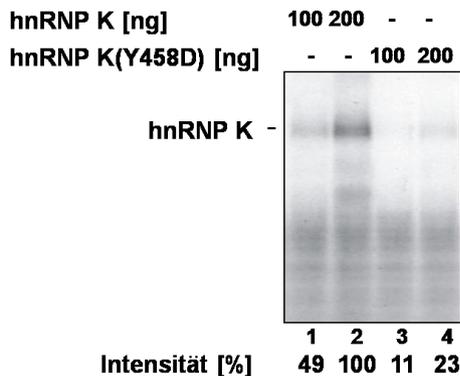


Abb. 3.1.4. Tyrosin 458 in hnRNP K ist für die DICE-Bindung wichtig

³²P-markierte DICE-RNA wurde durch Photo-*crosslink* mit je 100ng (1,8pmol) und 200ng (3,6pmol) hnRNP K oder der Variante hnRNP K(Y458D) kovalent verknüpft. Nicht gebundene RNA wurde nukleolytisch abgebaut. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Die RNA-Bindung der hnRNP K(Y458D)-Variante (Abb. 3.1.4, Bahnen 3, 4) war im Vergleich zum Wildtyp (Bahnen 1, 2) deutlich reduziert. Die funktionale Konsequenz dieser reduzierten RNA-Bindung auf die Aktivität von hnRNP K als Inhibitor der Translation wurde im *in vitro*-Translationsexperiment untersucht (Abb. 3.1.5).

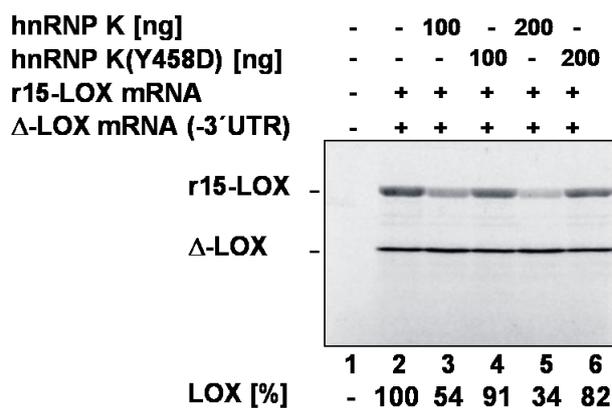


Abb. 3.1.5. Y458 in hnRNP K ist wichtig für die translations-inhibitorische Aktivität von hnRNP K.

50ng *in vitro* transkribierte r15-LOX-mRNA und eine Deletionsvariante, welcher die 3'UTR fehlte (75ng Δ-LOX), wurden in Gegenwart angegebener Mengen rekombinanten hnRNP K in Kaninchenretikulozytenlysat translatiert. Detektion neu synthetisierter Proteine durch Einbau von ³⁵S-markiertem Methionin. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Hierfür wurden die das DICE-enthaltende r15-LOX-mRNA und eine r15-LOX-mRNA mit verkürztem Leseraster und ohne 3'UTR (Δ -LOX-mRNA) im Kaninchen-Retikulozytenlysat in Anwesenheit von ^{35}S -markiertem Methionin und unterschiedlichen Mengen hnRNP K oder hnRNP K(Y458D) translatiert. Die Intensität des *in vitro* synthetisierten LOX-Proteins wurde auf das Signal von Δ -LOX normiert, die Synthese bei Abwesenheit von rekombinantem Protein auf 100% gesetzt. hnRNP K inhibierte die Translation der DICE-tragenden r15-LOX-mRNA signifikant (Abb. 5.1.5, Bahnen 3,5), während die Δ -LOX-Synthese kaum beeinflusst wurde. Die Proteinvariante hnRNP K(Y458D), welche im UV-*crosslink*-Experiment eine deutlich reduzierte DICE-Bindung zeigte, inhibierte die r15-LOX-mRNA-Translation nur geringfügig (Bahnen 4, 6).

Neben den bereits bekannten Tyrosinen Y72, Y225, Y230, Y234, Y236 und Y380 konnte Y458 als weiteres und funktional wichtiges c-Src-Substrat in hnRNP K identifiziert werden. Die Y458-Phosphorylierung führte zur Reduktion der DICE-Bindungsaktivität der isolierten KH3-Domäne, ebenso wie die Pseudo-Phosphorylierung durch den Y458D-Austausch sowohl in der KH3 als auch in hnRNP K. Die Einführung des Aspartats hatte keinen messbaren Einfluss auf die Integrität der Proteinstruktur. Die durch diesen Aminosäureaustausch verursachte Reduktion der DICE-Bindung des Gesamtproteins ist als Ursache der reduzierten Aktivität von hnRNP K als Inhibitor der Translation zu werten (Messias *et al.*, 2006).

3.2 Initiale Experimente zur Induktion der erythroiden Reifung von MEL-Zellen

Eine zentrale Zielstellung der vorgelegten Arbeit war die Etablierung eines induzierbaren erythroiden Zellsystems, welches die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation rekapituliert und zur Extrakt-Präparation für weitergehende *in vitro*-Studien geeignet ist. Initiale Studien zur Differenzierung von murinen Erythroleukämiezellen (MEL) wurden im Rahmen dieser Dissertationsarbeit durchgeführt, bevor dieser Teil von Isabel Naarmann innerhalb ihrer Diplomarbeit abgeschlossen wurde.

MEL-Zellen sind wahrscheinlich durch die Infektion von aus Milz isolierten erythroiden Vorläuferzellen mit dem Friend-Virus-Komplex entstanden (Friend *et al.*, 1966). Sie exprimieren eine endogene Hämin-kontrollierte eIF2 α -Kinase (Sarre, 1989). Ihre erythroide Differenzierung zu Hämoglobin-synthetisierenden Zellen durch DMSO wurde bereits 1971 beschrieben (Friend *et al.*, 1971). Auch wurden andere Induktoren verwendet, darunter auch Hexamethylenbisacetamid (HMBA), wobei sich die Charakterisierung der durch HMBA induzierten erythroiden Reifung vornehmlich auf die Induktion der endogenen Globine beschränkte (Singer *et al.*, 1974; Nudel *et al.*, 1977, Orkin *et al.*, 1975; Reuben *et al.*, 1976). Es wurden noch keine Untersuchungen zur Expression der Proteine durchgeführt, welche an der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation beteiligt sind.

Für die Analyse der erythroiden Reifung wurden MEL(F4-12B2)-Zellen über einen Zeitraum von 96h mit 5mM HMBA induziert, wobei sich die zu Beginn der HMBA-Behandlung farblosen Zellen rot verfärbten, was als deutlicher Hinweis auf die endogene Hämoglobinsynthese interpretiert werden kann (Abb. 3.2.1).

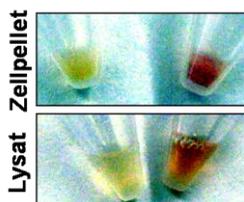


Abb. 3.2.1. HMBA induziert die Synthese von Hämoglobin in MEL-Zellen.

Fotographien des Zellpellets und des Triton-Lysates von nicht-induzierten MEL(F4-12B2)-Zellen (links) und 96h nach der Zugabe von HMBA (rechts).

Zur Detektion der Induktion der Globin-Synthese wurden die Zellen während der HMBA-Behandlung in Medium kultiviert, das ^{35}S -markiertes Methionin enthielt, so dass alle neu synthetisierten Proteine radioaktiv markiert wurden. Gleiche Mengen des Lysates, welches während der Induktion gewonnen wurde, wurden durch SDS-PAGE analysiert (Abb.3.2.2).

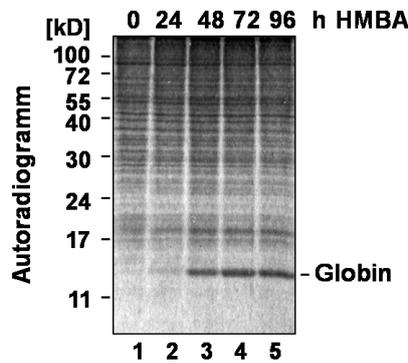


Abb. 3.2.2. HMBA induziert die Synthese von Globin in MEL-Zellen.

Während der Induktion der erythroiden Reifung neu synthetisierte Proteine wurden durch den Einbau von ^{35}S -Methionin markiert. Das für Globin zu erwartete Molekulargewicht ist gekennzeichnet. 18% SDS-PAGE, Autoradiographie

Das Autoradiogramm zeigt nach 48h deutlich das Auftreten einer Bande bei dem für Globine charakteristischen Molekulargewicht von 12-15kD (Abb. 3.2.2, Bahn 3).

Zur Analyse des Zellwachstums wurde die Zellzahl der MEL-Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Induktion bestimmt. Die erythroide Reifung scheint neben der Globin-Synthese einen Zellarrest zu induzieren, da das Zellwachstum durch die Zugabe von HMBA verlangsamt wird (Abb. 3.2.3).

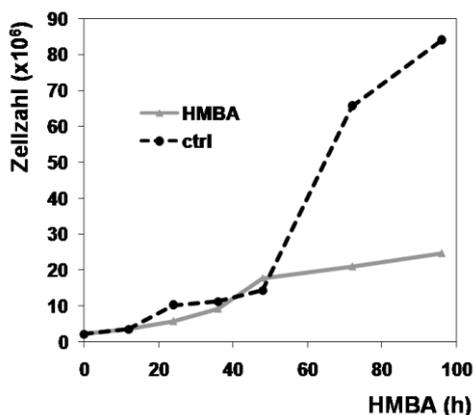


Abb. 3.2.3. HMBA verlangsamt das Zellwachstum von MEL-Zellen.

Die Gesamtzellzahl der MEL(F4-12B2)-Zellen wurde während der durch 5mM HMBA induzierten Reifung bestimmt. Als Kontrolle (ctrl) dienten unbehandelte MEL-Zellen.

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, konnte in früheren Analysen in Kaninchen-Erythroblasten, -Retikulozyten und -Erythrozyten gezeigt werden, dass die Konzentration an hnRNP K, hnRNP E1 und PRMT1, welche an der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation beteiligt sind, während der Reifung abnehmen (Abb. 1.7.1, Ostareck-Lederer und Ostareck, unpubliziert). Von induzierten MEL-Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Triton-Extrakte gewonnen und nach Bestimmung der Proteinkonzentration in *Western Blot*-Analysen mit Antikörpern gegen hnRNP K, hnRNP E1 und PRMT1 untersucht. Die Reduktion der Konzentration dieser Proteine während der induzierten Reifung konnte gezeigt werden (Abb. 3.2.4, vergl. Bahnen 10-13 mit Bahnen 3-6), was eine Voraussetzung für weitere Studien zur r15-LOX-Translations-Regulation in MEL-Zell-Extrakten war. Die Coomassiefärbung der endogenen Proteine diente hier als Ladekontrolle, da zu diesem Zeitpunkt noch nicht untersucht war, ob sich der Gehalt von Zytoskelett- oder Stoffwechsel-Marker-Proteinen, die typischerweise als Ladekontrolle dienen, während der erythroiden Reifung ändert.

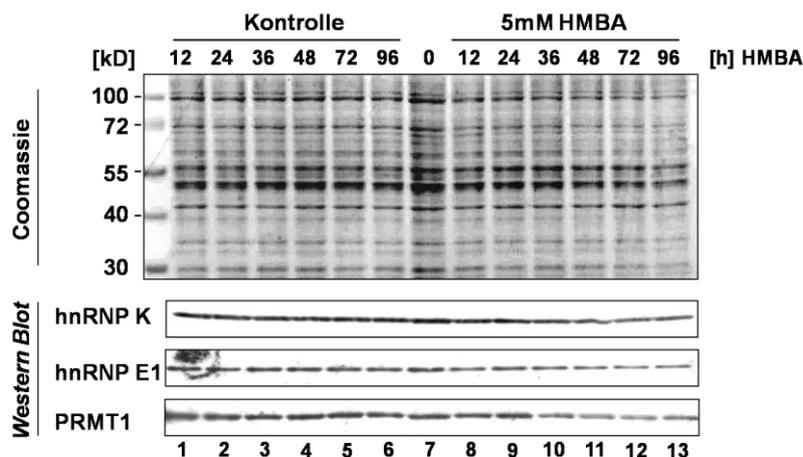


Abb. 3.2.4. Die durch HMBA induzierte Reifung der MEL(F4-12B2)-Zellen führt zu einer Abnahme der Proteinlevel von hnRNP K, hnRNP E1 und PRMT1.

Die Coomassiefärbung dient als Ladekontrolle. 12% SDS PAGE, Transfer auf PVDF, *Western Blot* mit α -hnRNP K-, α -hnRNP E1- und α -PRMT1-Antikörpern

Die erythroide Reifung von MEL(F4-12B2)-Zellen konnte durch die Zugabe von 1,5mM Natriumbutyrat in Hinsicht auf die Globin-Synthese und die Reduktion des hnRNP K- und hnRNP E1-Gehaltes effizienter induziert werden, als es bei der Induktion mit 4,5 oder 5mM HMBA der Fall war. Weiterhin wurde in Immunfluoreszenzfärbungen das Auftreten kernloser MEL(F4-12B2)-Zellen nach vier Tagen Inkubation mit Natriumbutyrat detektiert. Interessanterweise änderte sich auch die *steady state*-Lokalisation von hnRNP K. Das

vorwiegend nukleär lokalisierte Protein wurde im Cytoplasma angereichert (Naarmann, 2006).

Die in Suspension wachsenden MEL(745A)-Zellen wurden ebenso durch die Zugabe von DMSO, HMBA und Natriumbutyrat zur erythroiden Reifung induziert. Auch hier ließen sich Hämoglobin-Synthese, und bei der Verwendung von DMSO, die Reduktion des Proteingehaltes von hnRNP K und hnRNP E1 detektieren (Naarmann, 2006). Der Vorteil der Verwendung von in Suspension wachsenden Zellkulturen liegt in der Möglichkeit, schneller und mit geringerem Materialaufwand größere Mengen an Extrakten für *in vitro*-Experimente präparieren zu können.

Zur weiterführenden Analyse des regulatorischen Effektes des hnRNPK/E1-DICE-Komplexes in cytoplasmatischen Extrakten der verwendeten erythroiden Zellen ist die Kenntnis des endogenen Protein-Gehaltes der regulatorischen Proteine notwendig. Die *Western Blots* in Abbildung 3.2.5 zeigen einen Vergleich von hnRNP K und hnRNP E1 in MEL(745A)-Extrakten mit den rekombinanten Proteinen bekannter Konzentration.

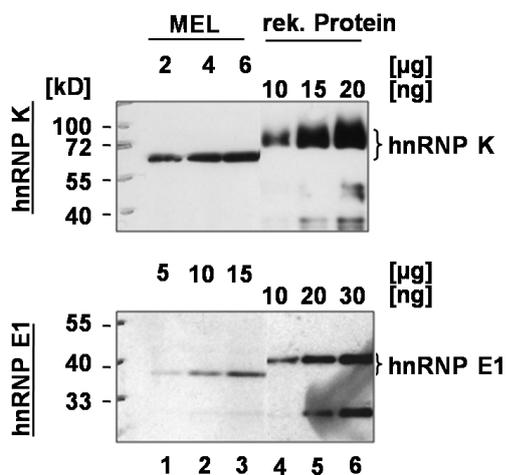


Abb. 3.2.5. Vergleich des Proteingehaltes von hnRNP K und hnRNP E1 in MEL(745A)-Zell-Extrakt mit dem entsprechenden rekombinanten Protein.

12% SDS PAGE, Transfer auf PVDF, *Western Blot* mit α -hnRNP K und α -hnRNP E1. Abschätzung des hnRNP K-Gehaltes auf etwa 0,5% und des hnRNP E1-Gehaltes auf 0,1%.

Unter der Voraussetzung einer vergleichbaren Detektion durch die verwendeten Antikörper wurde für hnRNP K in MEL-Zellen ein Anteil von 0,5% des Gesamtproteins abgeschätzt. Die hnRNP E1-Menge beträgt etwa 0,1%. Bezogen auf das Molekulargewicht von hnRNP K (51kD) und hnRNP E1 (37kD) ergibt sich ein molares Verhältnis von etwa 3:1 in den Zell-Extrakten.

3.3 In cytoplasmatischen Extrakten aus MEL-Zellen wird die Translation einer 3'UTR-DICE enthaltenden mRNA inhibiert

Nach der Präparation des cytoplasmatischen Extraktes aus MEL(F4-12B2)-Zellen wurden zunächst die Bedingungen für die *in vitro*-Translation optimiert (siehe Material und Methoden Abschnitt 2.20). Unterschiedliche Mengen an CAT-mRNA mit und ohne poly(A) und 3'UTR-DICE wurden im *in vitro*-Translationsexperiment mit cytoplasmatischem Extrakt aus MEL(F4-12B2)-Zellen eingesetzt (Abb. 3.3.1). Die resultierende CAT-Synthese wurde durch den Einbau von ^{35}S -markiertem Methionin durch Autoradiographie detektiert und quantifiziert.

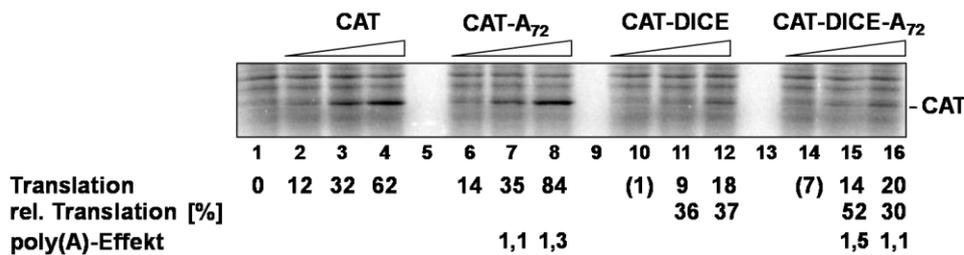


Abb. 3.3.1. Die Translations-Inhibition wird im MEL-Extrakt durch das 3'UTR-DICE vermittelt und ist unabhängig vom poly(A)-Schwanz der mRNA.

0,2; 0,4 und 0,6pmol CAT-mRNA wurden in der *in vitro*-Translation mit MEL(F4-12B2)-Extrakten eingesetzt. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Die Quantifizierung geringer CAT-Mengen bei der Translation von 0,2 pmol CAT-mRNA war aufgrund der geringen Bandenintensität nicht möglich (Abb. 3.3.1, Bahnen 2,6,10,14). Bei höheren CAT-mRNA-Konzentrationen konnte die relative Menge des synthetisierten CAT-Proteins quantifiziert werden: das 3'UTR-DICE inhibierte die CAT-Synthese etwa um den Faktor drei (Bahnen 11,12,15,16). Dabei verstärkte der poly(A)-Schwanz die CAT-Synthese leicht, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Translations-Repression. Diese poly(A)-Unabhängigkeit der DICE-abhängigen Translations-Repression wurde bereits im Kaninchen-Retikulozytenlysat beschrieben (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994).

Ausgehend von der Hypothese, dass sich am DICE ein 3'UTR-Komplex aus endogenen Proteinen bildet, der die Translation inhibiert, müsste es möglich sein, dass sich dieser Komplex auch an einem der Reaktion zugesetztem DICE-Transkript assembliert und die Translations-Inhibition einer DICE-tragenden CAT-mRNA kompetitiv aufhebt. Hierfür wurden 0,5pmol CAT- und CAT-DICE-mRNA in MEL-Zell-Extrakt translatiert und die angegebenen Mengen DICE zugegeben (Abb. 3.3.2).

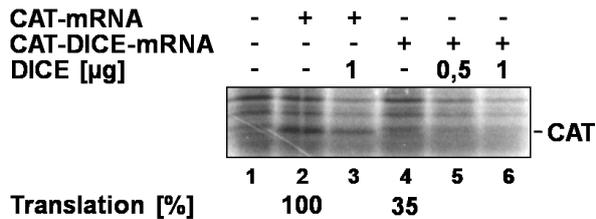


Abb. 3.3.2. Die Zugabe von freiem DICE inhibiert die Translation aller mRNAs.

0,5pmol CAT-mRNA wurden in der *in vitro*-Translation mit MEL(F4-12B2)-Extrakten eingesetzt und angegebene Mengen an freiem DICE zugesetzt. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Es stellte sich jedoch heraus, dass durch die Zugabe des DICE-Transkriptes die Translation sowohl der Kontroll-CAT-mRNA als auch die vieler endogener mRNAs inhibiert wurde (Abb. 3.3.2, Bahnen 3,5,6). Deshalb wurde zur Translations-Reaktion neben der CAT-DICE-mRNA freies DICE oder eine RNA mit reverser DICE-Sequenz (revDICE) zugegeben, um die Spezifität dieses Effektes der DICE-Zugabe zu analysieren (Abb. 3.3.3).

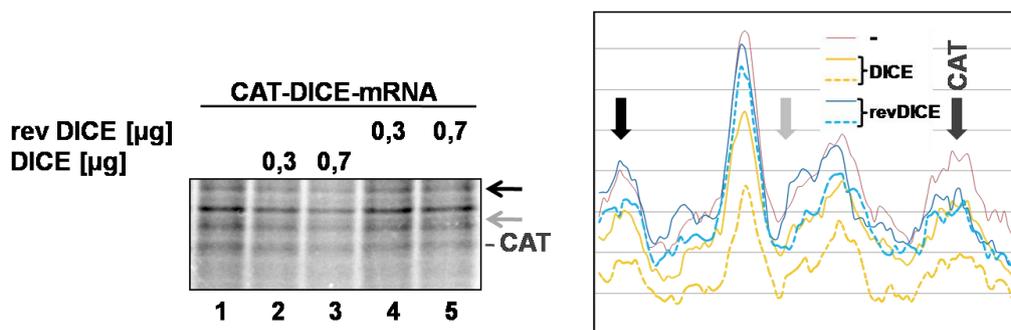


Abb. 3.3.3. Die Zugabe von freiem DICE-Transkript inhibiert die Translation aller mRNAs.

0,5pmol CAT-DICE-mRNA wurden in der *in vitro*-Translation mit MEL(F4-12B2)-Extrakten eingesetzt und angegebene Mengen an freiem DICE oder der reversen Sequenz zugesetzt. Die Quantifizierung der Banden erfolgte bahnenweise, die Pfeile geben die entsprechenden Laufhöhen an. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Während die Zugabe vom revDICE nur einen marginalen Effekt auf die Translation der endogenen mRNAs und der CAT-DICE-mRNA zeigte (Abb. 3.3.3, Bahnen 4, 5), inhibierte freies DICE die Translation aller mRNAs (Bahnen 2, 3). Die Kompetition des translationsinhibitorischen Effektes ist im MEL-Zell-*in vitro*-Translationssystem also nicht möglich, vielmehr scheint sich am freien DICE ein Komplex zu bilden, der global die *in vitro*-Translation inhibiert.

Die bisher gezeigten Experimente wurden mit Extrakten aus adhären wachsenden MEL(F4-12B2)-Zellen durchgeführt. Die in Suspension wachsenden MEL(745A)-Zellen eigneten sich besser zur Herstellung größerer Extraktmengen. Diese ebenso nach HKV (siehe Abschnitt 2.19 und 2.20) präparierten Extrakte wurden hinsichtlich ihrer Kompetenz der DICE-abhängigen Repression in der *in vitro*-Translation untersucht (Abb. 3.3.4).

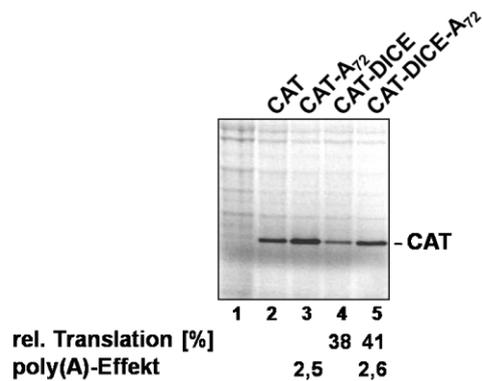


Abb. 3.3.4. In Extrakten aus MEL(745A)-Zellen ist die Translation einer 3'UTR-DICE-tragenden CAT-mRNA inhibiert.

0,5pmol CAT-DICE-mRNA wurden in der *in vitro*-Translation mit MEL(745A)-Extrakten eingesetzt. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Auch in diesen Extrakten konnte eine DICE-abhängige Translations-Repression um den Faktor 2,5- 3 nachgewiesen werden (Abb.3.3.4, Bahnen 4, 5). Die Anwesenheit eines poly(A)-Schwanzes aktivierte auch hier die Translation, hatte jedoch keinen signifikanten Einfluß auf die Repressionseffizienz (Bahn 5).

Zur Analyse des Mechanismus der DICE-abhängigen Translations-Inhibition in MEL-Zell-Extrakten wurden Translations-Initiationsreaktionen in 5-25%igen Saccharosegradienten fraktioniert und die Verteilung der radioaktiv markierten mRNAs in Fraktionen verschiedener Dichte analysiert. Verwendet wurden hier eine Kontroll-mRNA mit artifiziellem kurzen ORF (sORF-ctrl) und die sORF-mRNA mit dem 3'UTR-DICE (sORF-DICE). Alle Translations-Initiations-Experimente wurden in Anwesenheit von 1 mM Cycloheximid, das die Peptidyl-Transferase-Reaktion inhibiert und dadurch 80S-Komplexe am Initiations-Kodon von mRNAs stabilisiert (Obrig *et al.*, 1971), durchgeführt. Das erste Translations-Initiations-Experiment wurde mit 0,2pmol mRNA durchgeführt (Abb. 3.3.5), was den Bedingungen in früheren Experimenten in Kaninchen-Retikulozytenlysat entspricht (Ostareck *et al.*, 1997).

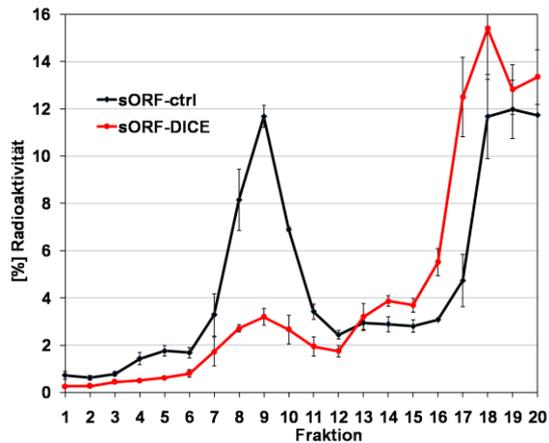


Abb. 3.3.5. *In vitro*-Translations-Initiation in MEL-Zell-Extrakten.

0,2pmol sORF-mRNA und sORF-DICE-mRNA wurden in der *in vitro*-Translations-Initiationsreaktion in MEL(745A)-Extrakten in Anwesenheit von 1mM Cycloheximid eingesetzt. Verteilung innerhalb des 5-25% Saccharose-Gradienten nach der Ultrazentrifugation, Fraktionierung des Gradienten und Bestimmung der Verteilung durch Szintillationsmessung. Je 3 Experimente.

Es wird deutlich, dass die verringerte *in vitro*-Translation der DICE-tragenden mRNA (Abb. 3.3.4) durch eine um etwa Faktor 3 verminderte 80S-Komplex-Bildung in den Translations-Initiations-Experimenten erklärt werden kann (Abb. 3.3.5). Dies war unabhängig von der verwendeten mRNA-Menge im Bereich von 0,2-1,2 pmol nachweisbar (ohne Abb.). Auch verschob sich das Maximum des RNP-Peaks von Fraktion 19 in der Kontrolle zu Fraktion 17 bzw. 18, wenn sich das DICE in der 3'UTR der mRNA befand, was zeigt, dass sich ein schwererer RNP-Komplex formierte.

Zusätzlich zur Reduktion der Bildung von 80S-Komplexen wurde an der sORF-DICE-mRNA die Bildung einer Schulter im Bereich der 48S-Initiations-Komplexe beobachtet. Zur Überprüfung der Position der 48S-Komplexe im Saccharosegradienten wurden die Translations-Initiationsreaktionen in Gegenwart von GMP-PNP durchgeführt (Abb. 3.3.6 und 3.3.7). Die GTP-Hydrolyse durch eIF2 ist ein für die 80S-Assemblierung essentieller Schritt während der Translations-Initiation (Chakrabarti und Maitra, 1991; Das und Maitra, 2000). Auch die GTP-Hydrolyse durch eIF5B ist für die Ausbildung funktionaler 80S-Ribosomen erforderlich (Pestova *et al.*, 2000). GMP-PNP als nicht hydrolysierbares GTP-Analog verhindert diesen Schritt und stabilisiert 48S-Initiations-Komplexe einer mRNA (Hershey und Monro, 1966; Anthony und Merrick, 1992). Im Elutionsprofil (Abb.3.3.6) konnte man nach Zugabe von GMP-PNP die Abnahme der endogenen 80S-Komplexe und eine Zunahme der *Peaks* im Bereich von 60S und 48S detektieren.

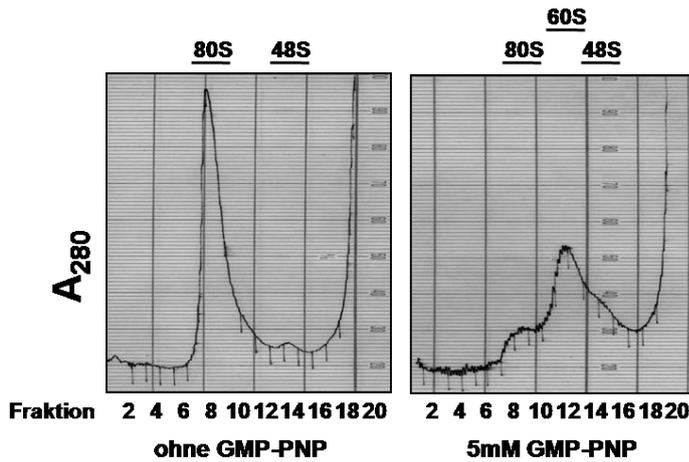


Abb. 3.3.6. Elutionsprofil der Fraktionierung von Translations-Initiationsreaktionen in Abhängigkeit von GMP-PNP.

0mM (links) oder 5mM GMP-PNP (rechts) wurden Translations-Initiationsreaktionen in MEL(745A)-Extrakten zugesetzt. Während der Fraktionierung wurde die Absorption bei 280nm aufgezeichnet.

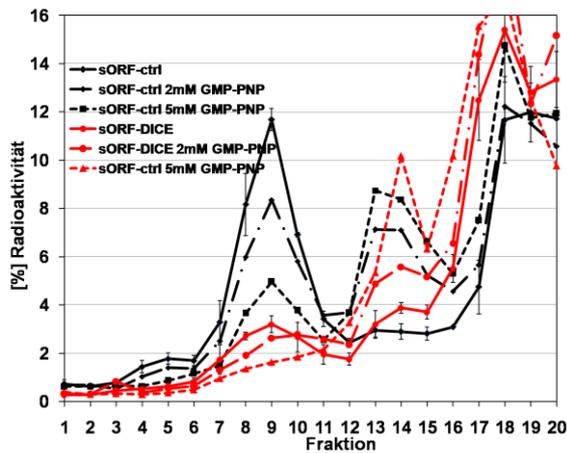


Abb. 3.3.7. *In vitro*-Translations-Initiationsreaktionen in Anwesenheit von GMP-PNP.

0,2pmol sORF-mRNA und sORF-DICE-mRNA wurden in der *in vitro*-Translations-Initiationsreaktion mit MEL(745A)-Extrakten in Gegenwart von 1mM Cycloheximid und 0mM, 2mM und 5mM GMP-PNP eingesetzt. Verteilung innerhalb des 5-25% Saccharose-Gradienten nach der Ultrazentrifugation, anschließend Fraktionierung des Gradienten und Bestimmung der mRNA-Verteilung durch Szintillationsmessung.

Die Analyse der mRNA-Verteilung des Experimentes in Abbildung 3.3.7 (Tab. 3.3.1) ergab, dass in Abwesenheit von GMP-PNP etwa 51% der sORF-ctrl-mRNA in den schweren ribosomalen und prä-ribosomalen Fraktionen 1-15 zu finden war, aber nur 28% der sORF-DICE-mRNA. In Gegenwart von 2mM GMP-PNP waren es 50 bzw. 32%, bei 5mM GMP-PNP 48 und 35%. In den 48S-Fraktionen 13-15 betrug der Anteil der sORF-ctrl-mRNA bei 5mM GMP-PNP 24% und der der sORF-DICE-mRNA 22%. Während also die Bildung des 80S-Komplexes durch das 3'UTR-DICE in den MEL-Extrakten gegenüber der KontrollmRNA inhibiert war, war die Assemblierung von 48S-Initiations-Komplexen nicht beeinflusst. Dies ist mit der beobachteten Akkumulation von 48S-Komplexen an einer DICE-

Sequenz enthaltenden mRNA in früheren Translations-Initiations- und *Toe print*-Experimenten konsistent (Ostareck *et al.*, 2001).

Tab. 3.3.1. Anteil der ^{32}P -markierten RNAs in ribosomalen Fraktionen während der Translations-Initiationsreaktion in MEL-Extrakt (Abb. 3.3.7)

| GMP-PNP | Fraktion | sORF-ctrl | sORF-DICE |
|---------|----------|-----------|-----------|
| - | 1-15 | 51% | 28% |
| 2 mM | | 50% | 32% |
| 5 mM | 13-15 | 48% | 35% |
| | | 24% | 22% |

3.4 In cytoplasmatischen Extrakten aus K562-Zellen wird die Translation einer 3'UTR-DICE enthaltenden mRNA inhibiert

Zusätzlich zu den MEL-Zellen wurden auch K562-Zellen als induzierbares erythroides Zell-System etabliert (Naarmann *et al.*, 2008). Im Gegensatz zu MEL-Zellen enthalten die humanen K562-Zellen eine r15-LOX-mRNA, welche ein dem DICE der Kaninchen-r15-LOX-mRNA ähnliches 3'UTR-Sequenz-Element enthält, das ebenso die Translations-Inhibition durch hnRNP K und hnRNP E1 vermitteln kann (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; Schewe, 2002; Naarmann *et al.*, 2008). Die Expression der endogenen humanen r15-LOX (hr15-LOX) kann direkt während der induzierten Reifung der K562-Zellen verfolgt werden und erfordert nicht die Transfektion von Reporter-mRNAs (Naarmann *et al.*, 2008).

Nach der Präparation des cytoplasmatischen Extraktes aus K562-Zellen wurden zunächst die Bedingungen für die *in vitro*-Translation optimiert (siehe Abschnitt 2.20). Unterschiedliche Mengen CAT-mRNA mit und ohne poly(A)-Schwanz und dem 3'UTR-DICE wurden im *in vitro*-Translationsexperiment mit cytoplasmatischen Extrakten aus MEL(745A)-Zellen und K562-Zellen eingesetzt und die CAT-Synthese wurde verglichen (Abb. 3.4.1). Zusätzlich wurde eine mRNA untersucht, welche die 3'UTR der humanen r15-LOX-mRNA trägt (CAT-hL3'-mRNA). Die humane r15-LOX-(hrLOX)-mRNA-3'UTR unterscheidet sich von der der Kaninchen-r15-LOX-mRNA: Während das Kaninchen-DICE aus 10 Wiederholungen des CU-reichen Sequenzelementes besteht (10 *Repeats*, 10R, Ostareck-Lederer *et al.*, 1994), besitzt die humane 3'UTR lediglich vier dieser *Repeats* (4R). In früheren Translations-Experimenten konnte bereits der inhibitorische Effekt dieser 3'UTR auf die Translation in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart der später identifizierten „LOX-Bindeproteine“

(LOX-BPs) hnRNP K und hnRNP E1 gezeigt werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; vergl. Einleitung). Es zeigte sich, dass bereits 2 der *Repeats* ausreichen, um die Translations-Repression zu vermitteln (Ostareck *et al.*, 1997).

Im *in vitro*-Translationsexperiment in MEL(745A)- und K562-Extrakten wurde der Effekt der humanen 3'UTR mit dem des DICE-Elementes verglichen (Abb.3.4.1). Die resultierende CAT-Synthese wurde durch den Einbau von ³⁵S-markiertem Methionin durch Autoradiographie detektiert und quantifiziert.

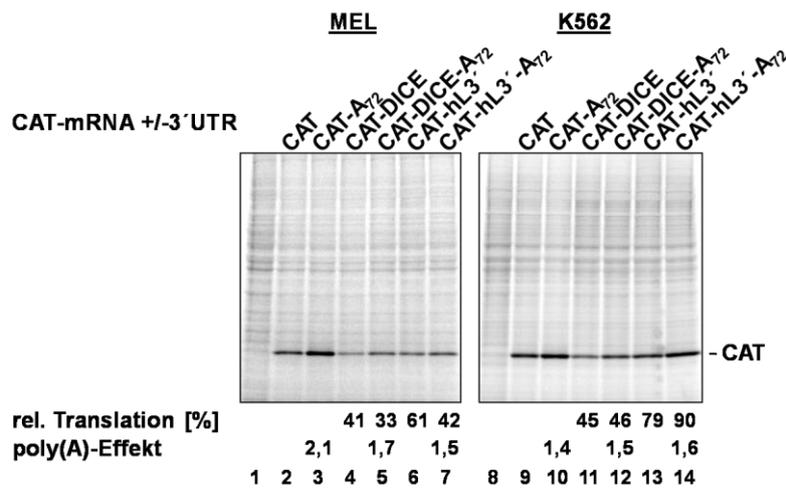


Abb. 3.4.1. *In vitro*-Translation von CAT-mRNAs in MEL- und K562-Extrakten.

Für die Translation in MEL-Extrakten wurden je 0,6 pmol mRNA, in K562-Extrakten je 0,4 pmol eingesetzt. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Auch im K562-Zell-Extrakt ließ sich die DICE-abhängige Translations-Repression rekapitulieren; dabei wirkte das Kaninchen-DICE (Abb. 3.4.1, Bahnen 11, 12) stärker inhibierend als die humane 3'UTR-Sequenz (Bahnen 13, 14). Der positive Effekt des poly(A)-Schwanzes auf die Translation der CAT-Reporter-mRNA zeigte auch im K562-Extrakt keinen Einfluss auf die Repression (Abb. 3.4.1). Diese poly(A)-Unabhängigkeit der DICE-abhängigen Translations-Repression wurde bereits im Kaninchen-Retikulozytenlysat beschrieben (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994).

Die geringere Repression durch die humane r15-LOX-mRNA-3'UTR könnte zum einen auf die geringere Anzahl an *Repeats* zurückzuführen sein, also auf einen weniger effizienten regulatorischen 3'UTR-Komplex, zum anderen auf die Konkurrenz mit der die identische 3'UTR tragenden endogenen humanen r15-LOX-mRNA um Komplex-Komponenten. Wäre die zweite Erklärung zutreffend, würde eine Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition zu erwarten sein. Deshalb wurden im nächsten Experiment verschiedene, geringere Mengen an

CAT-hL3'-mRNA eingesetzt und ihre Translation mit der der Kontroll-CAT-mRNA verglichen (Abb. 3.4.2).

Die Auswertung des Translations-Experimentes gestaltete sich schwierig: Die Intensität der CAT-Bande bei geringen mRNA-Konzentrationen (Abb. 3.4.2, Bahn 2) lag kaum über der Hintergrundtranslation endogener mRNAs und erschwerte somit die Quantifizierung. Abgesehen von diesem Phänomen führte eine Verringerung der CAT-hL3'-mRNA-Konzentration nicht zu einer verbesserten Translationsinhibition, was ausgehend von der obigen Hypothese die Konkurrenz mit der endogenen hr15-LOX-mRNA ausschließt. Es kann geschlussfolgert werden, dass sich ein weniger effizient inhibierender 3'UTR-Komplex bildete.

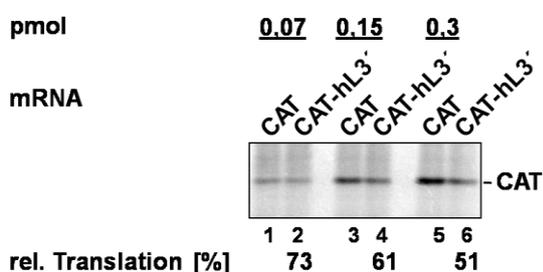


Abb. 3.4.2. *In vitro*-Translation von CAT-mRNAs in K562-Extrakten.

Vergleich der Translation verschiedener CAT-mRNA-Mengen in Abhängigkeit von der humanen r15-LOX-3'UTR. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Auch in K562-Extrakten wurde untersucht, ob die Zugabe von freiem DICE zu einer Konkurrenz der durch das 3'UTR-DICE vermittelten Translationsinhibition führt (ohne Abbildung). Es zeigte sich, vergleichbar mit den Ergebnissen in MEL-Extrakten, kein für die Translation der CAT-DICE-mRNA spezifischer Effekt; vielmehr wirkte die Zugabe von freiem DICE negativ auf die Translations-Ausbeute aller mRNAs (vergl. Abb. 3.3.2 und 3.3.3). Die Grafik in Abbildung 3.4.3 fasst eine in der Legende angegebene unterschiedliche Anzahl unabhängiger Translationsexperimente zusammen.

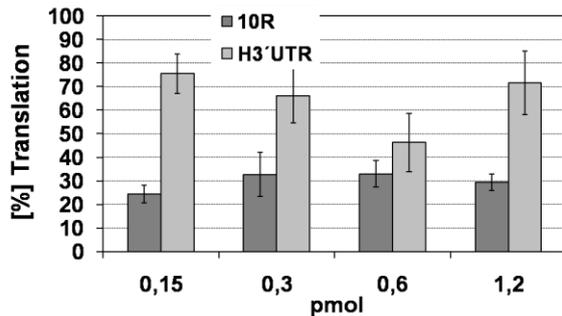


Abb. 3.4.3. Zusammenfassung der *in vitro*-Translation von CAT-mRNAs in K562-Extrakten.

Die Translation der r15-LOX-3'UTR-Element tragenden CAT-mRNAs im Vergleich mit der Kontroll-CAT-mRNA-Translation (100%) wurde in unterschiedlichen Experimenten analysiert. Anzahl der zusammengefassten Datensätze: **CAT-DICE**: 5 (0,15 pmol und 1,2 pmol); 4 (0,3 pmol); 3 (0,6 pmol); **CAT-hL3**: 4 (0,15 pmol); 3 (0,3 pmol); 2 (0,6 und 1,2 pmol)

Die DICE-abhängige Inhibition der Translation lag im gemessenen mRNA-Konzentrationsbereich bei 25-40%, die durch die humane r15-LOX-3'UTR vermittelte bei 50-80%. Die Effizienz der Inhibition war im gemessenen Konzentrationsbereich nicht linear von der eingesetzten mRNA-Konzentration abhängig. Dies ist ein Hinweis darauf, dass alle für die effiziente DICE-abhängige Translations-Inhibition erforderlichen Komponenten in ausreichend hohen Konzentrationen vorlagen. Zu beachten ist hier, dass die CAT-Synthese-Ausbeute im gezeigten Bereich (Abb. 3.4.3) nicht mehr linear zu der mRNA-Konzentration war. Durch vergleichende *Western-Blots* (Abb. 3.4.4) konnte abgeschätzt werden, dass die hnRNP K-Menge im Translationsansatz etwa 6pmol, die von hnRNP E1 etwa 2pmol betrug. Dies entspricht, vergleichbar mit dem Gehalt in MEL-Extrakten (Abb. 3.2.5), dem für Translations-Experimente in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat unter Verwendung der rekombinanten Proteine als für die DICE-abhängige Translations-Inhibition optimal ermittelten Verhältnis 3:1 (Ostareck *et al.*, 1997).

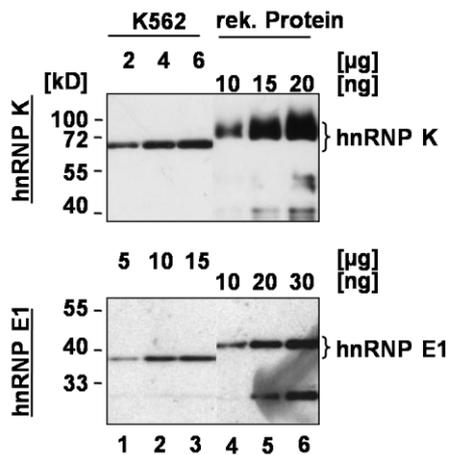


Abb. 3.4.4. Vergleich des Proteingehaltes von hnRNP K und hnRNP E1 in K562-Zell-Extrakt mit rekombinantem Protein.

12% SDS PAGE; Transfer auf PVDF, *Western Blot* mit α -hnRNP K und α -hnRNP E1-Antikörpern. Abschätzung des hnRNP K-Gehaltes auf etwa 0,3% und des hnRNP E1-Gehaltes auf 0,1%.

Neben der Translations-Kontrolle kann auch ein Unterschied der mRNA-Stabilität die Ursache einer reduzierten CAT-Synthese sein. Zur Überprüfung der mRNA-Stabilität während der Translation wurden ^{32}P -markierte CAT-mRNAs synthetisiert und im *in vitro*-Translationsexperiment eingesetzt (Abb. 3.4.5). Vor und nach der Inkubation bei 30°C wurden die mRNAs mit der Phenol-Chloroform-Extraktionsmethode aus den Translationsansätzen isoliert und im Agarosegel durch Autoradiographie analysiert.

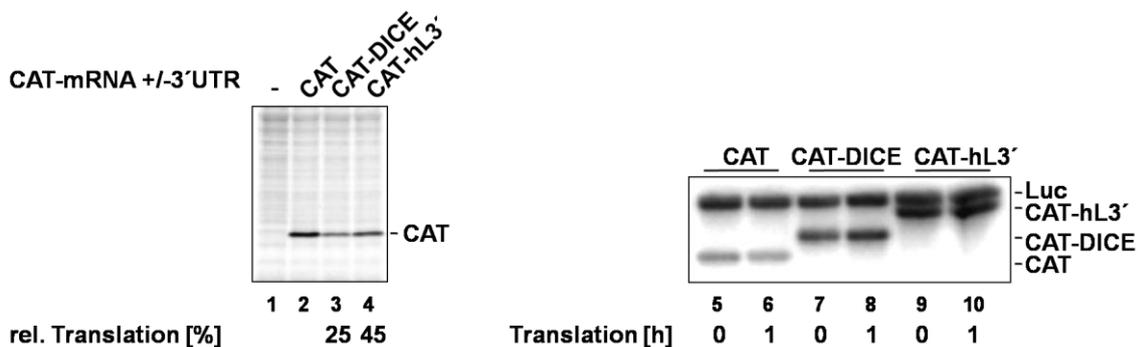


Abb. 3.4.5. Stabilität der CAT-mRNAs während der *in vitro*-Translation in K562-Extrakten.

links: Translation der ^{32}P -markierten r15-LOX-3'UTR-Element tragenden CAT-mRNAs im Vergleich mit der Kontroll-CAT-mRNA. Einbau von ^{35}S -Methionin; 12% SDS-PAGE; Autoradiographie
rechts: Vor und nach der einstündigen Inkubation wurden die mRNAs aus dem Translationsansatz isoliert und im 1%igen Agarosegel analysiert; Autoradiographie
0,6 pmol je mRNA; Luc=Extraktionskontrolle

Bei der hier verwendeten K562-Extrakt-Präparation wurde die CAT-Synthese DICE- bzw. hr15-LOX3'UTR-abhängig auf 25% bzw. 45% reduziert. Beide 3'UTR-Sequenzen der Kaninchen- und humanen r15-LOX-mRNA vermittelten *in vitro* keine Destabilisierung (Abb.

3.4.5), somit ist die verminderte CAT-Synthese auf die Inhibition der Translation zurückzuführen.

Um die Frage zu beantworten, ob die Verwendung einer CAT-mRNA ohne 3'UTR für den DICE-abhängigen Translations-Inhibitionseffekt im K562-Extrakt als Kontroll-mRNA repräsentativ ist, wurden hinter den CAT-ORF die nicht-strukturierte β -Globin-5'Leader-Sequenz (Hellen *et al.*, 1993) in 5'-3'-Richtung (CAT- β -5') und die reverse Sequenz (CAT- β -5'r) kloniert. Die resultierenden mRNAs mit den artifiziellen 3'UTRs wurden im *in vitro*-Translationsexperiment eingesetzt und mit der CAT-DICE-mRNA verglichen (Abb. 3.4.6).

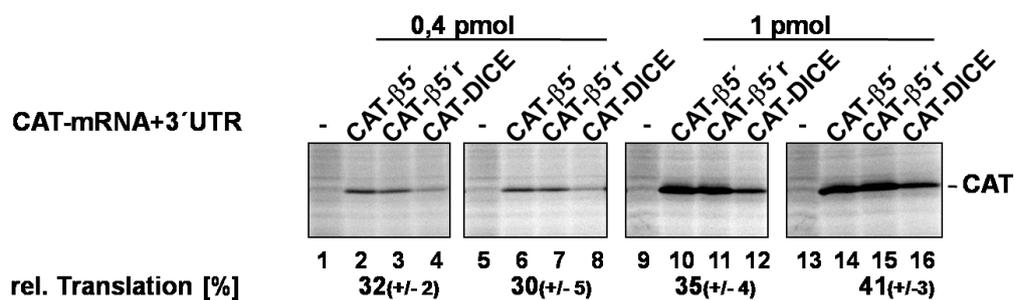


Abb. 3.4.6. Die Translation der CAT-DICE-mRNA ist auch im Vergleich mit anderen Kontroll-mRNAs in K562-Extrakten inhibiert.

Einbau von ^{35}S -Methionin, 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Im untersuchten Konzentrationsbereich lag die DICE-abhängige Inhibition im Vergleich zu den Kontroll-mRNAs auch hier bei 30-41% (Abb. 3.4.6). Daraus folgt, dass die DICE-abhängige Translations-Inhibition sowohl im Vergleich zur Kontroll-mRNA ohne 3'UTR als auch mit anderen 3'UTRs nachweisbar ist.

Zur Untersuchung des Mechanismus, der in den K562-Extrakten die Inhibition durch das 3'UTR-DICE vermittelt, wurden Translations-Initiations-Experimente mit radioaktiv markierter sORF- und sORF-DICE-mRNA in Anwesenheit von 1mM Cycloheximid durchgeführt und in 5-25%igen Saccharosegradienten fraktioniert (Abb. 3.4.7).

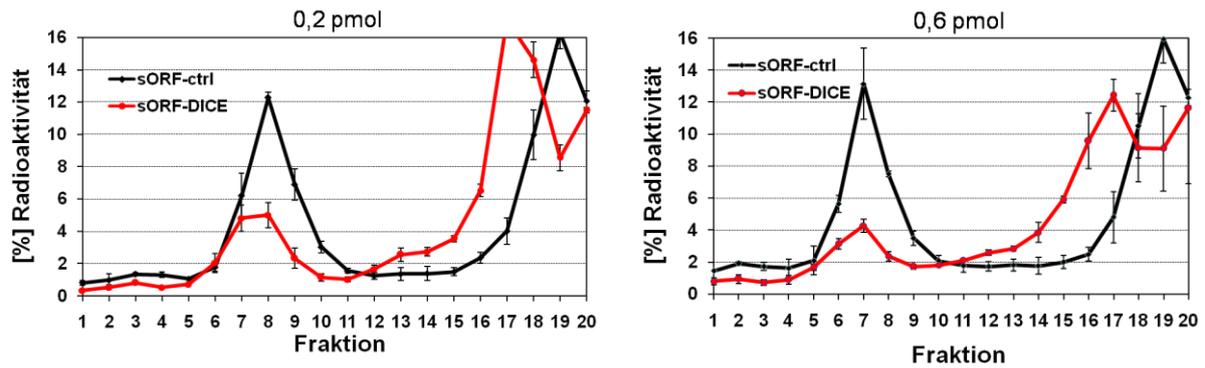


Abb. 3.4.7. Die Translations-Initiation im K562-Extrakt.

0,2 pmol (links) und 0,6pmol (rechts) sORF-mRNA und sORF-DICE-mRNA wurden in *in vitro*-Translations-Initiationsreaktionen mit K562-Extrakt in Anwesenheit von 1mM Cycloheximid eingesetzt. Verteilung innerhalb des 5-25% Saccharose-Gradienten während der Ultrazentrifugation, nachfolgend Fraktionierung des Gradienten und Bestimmung der mRNA-Verteilung durch Szintillationsmessung. Je 3 Experimente.

Vergleichbar mit den Translations-Initiations-Experimenten in MEL-Extrakten (vergl. Kapitel 3.3) war in K562-Extrakten die Bildung von 80S-Komplexen auch um den Faktor 3 inhibiert, wenn die mRNA ein 3'UTR-DICE enthielt, was als die Ursache der verminderten CAT-Translation interpretiert werden kann (Abb. 3.4.7). Ebenso war die Bildung einer leichten Schulter in den Fraktionen 11-13, welche die 48S-Komplexe enthielten, detektierbar. Die Translations-Initiations-Experimente wurden mit 0,2 pmol mRNA in einem 4fach-Ansatz, wie in früheren Experimente in Kaninchenretikulozytenlysat (Ostareck *et al.*, 1997; vergl. Kapitel 3.3), und 0,6pmol mRNA entsprechend der kleinsten im Translations-Experiment verwendeten Menge durchgeführt.

Zur Überprüfung der Bildung von 48S-Initiations-Komplexen und der detaillierteren Analyse der Translations-Inhibition wurde das Experiment in Abbildung 3.4.7 in Gegenwart verschiedener GMP-PNP-Konzentrationen wiederholt (Abb. 3.4.8).

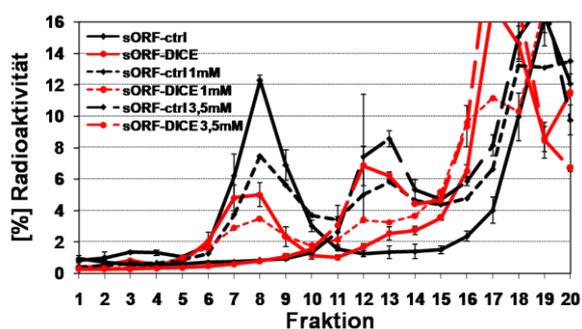


Abb. 3.4.8. *In vitro*-Translations-Initiation im K562-Extrakt.

0,2 pmol mRNA, je 3 Experimente ohne GMP-PNP; je 2 Experimente mit 1 mM und 3,5 mM GMP-PNP, 5-25% Saccharosegradient, Szintillationsmessung

Während ohne GMP-PNP 43% der Kontroll-mRNA und nur 30% der DICE-tragenden mRNA in den Fraktionen 1-15, welche ribosomale und Initiations-Komplexe enthalten, vorlagen, waren es in Anwesenheit von 3,5mM GMP-PNP 42% bzw. 40% (Abb. 3.4.8 und Tab. 3.4.1). Der Anteil in den 48S-Fraktionen 11-15 betrug bei 3,5mM GMP-PNP 29% bzw. 25%, bei 5mM GMP-PNP 34% bzw. 35%.

Tab. 3.4.1. Anteil der ³²P-markierten mRNAs in ribosomalen Fraktionen während der Translations-Initiations-Reaktion

| GMP-PNP | Fraktion | sORF-ctrl | sORF-DICE |
|---------|----------|-----------|-----------|
| - | 1-15 | 43% | 30% |
| 3,5mM | 1-15 | 42% | 40% |
| | 11-15 | 29% | 25% |
| 5mM | 11-15 | 34% | 33% |

Auch in den K562-Extrakten verhindert das 3'UTR-DICE die Assemblierung von translationsaktiven 80S-Ribosomen, während die Bildung von 48S-Komplexen in Anwesenheit von GMP-PNP nicht beeinflusst ist.

Durch Cycloheximid wurden 80S-Komplexe an einer mRNA stabilisiert, die Translation der CAT-mRNAs fand jedoch ohne Cycloheximid statt. Deshalb wurden die Translations-Initiations-Komplexe auch in Abwesenheit von Cycloheximid in Saccharose-Gradienten analysiert. Dafür wurden die Translations-Reaktionen zu den angegebenen Zeitpunkten durch Abkühlung auf Eis gestoppt (Abb. 3.4.9).

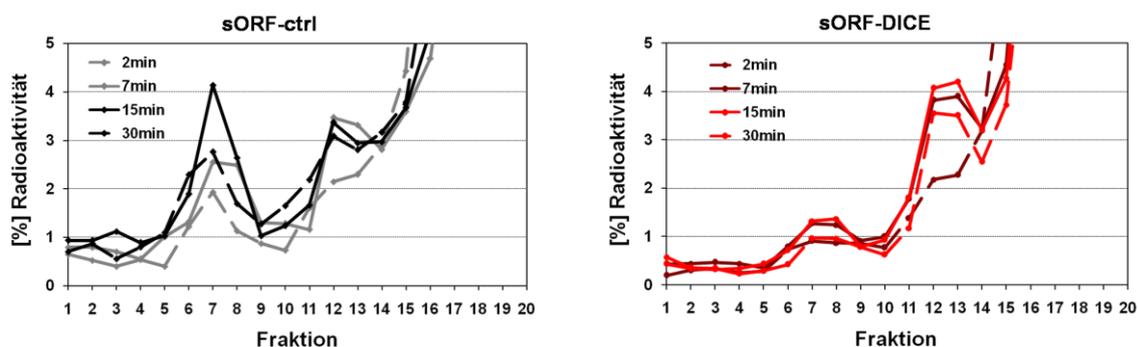


Abb. 3.4.9. Analyse von Translations-Initiations-Komplexen im K562-Extrakt in Abwesenheit von Cycloheximid.

Die *in vitro*-Translation von je 0,2pmol mRNA wurde nach den angegebenen Inkubationszeiten durch Abkühlung auf 0°C gestoppt, die gebildeten Komplexe im Saccharosegradienten fraktioniert.

Hier wurde nochmals die signifikante Inhibition der 80S-Komplexbildung und die Anreicherung einer DICE-tragenden mRNA in 48S-Komplexen verdeutlicht (Abb. 3.4.9). Während 80S-Komplexe an der sORF-ctrl-mRNA innerhalb von 15 Minuten zunahm, erfolgte dies nur geringfügig an der sORF-DICE-mRNA. 48S-Komplexe hingegen waren bei

der 3'UTR-DICE-tragenden mRNA über den untersuchten Zeitraum mit Ausnahme des 2-Minuten-Zeitpunktes stärker akkumuliert als bei der Kontrolle. Die 80S-Ribosomen-Bildung an der Kontroll-mRNA von nur 4% in der Hauptfraktion im Vergleich zu 12% in vorherigen Experimenten (Abb. 3.4.7 und 3.4.8) ist auf eine geringere Stabilität durch die Abwesenheit von Cycloheximid zurückzuführen. Ribosomen, die nun tatsächlich entlang der mRNA-ORFs translatieren konnten, dissoziierten wahrscheinlich bei Erreichen des Stop-Kodons.

In K562-Zellen konnte durch die Zugabe von Natriumbutyrat zum Medium die erythroide Reifung induziert werden (Naarmann *et al.*, 2008). Die Verdopplungszeit der Zellen erhöhte sich von 20 auf 60 Stunden (Naarmann, 2006). Am Tag 8 der induzierten Reifung ließen sich 85% der Zellen mit Benzidin, einem Farbstoff zur Detektion von Hämoglobin, färben. RT-PCR-Analysen zeigten eine Erhöhung der Globin-mRNA-Menge, in der SDS-PAGE war die deutliche Zunahme der Globin-Bande detektierbar (Naarmann *et al.*, 2008).

Darüber hinaus enthielten am achten Tag der induzierten Reifung 29% der Zellen keinen Kern mehr, weitere 6% besaßen einen fragmentierten Kern. In 22% der entkernten Zellen konnten keine Mitochondrien angefärbt werden, ein Indiz dafür, dass durch der Behandlung von K562-Zellen mit Natriumbutyrat ein signifikanter Anteil der Zellen terminal differenzierten (Naarmann *et al.*, 2008).

Es konnte gezeigt werden, dass die hr15-LOX-mRNA bereits in nicht induzierten K562-Zellen vorhanden ist und während der Induktion annähernd konstant bleibt. Das endogene hr15-LOX-Protein hingegen konnte erst am Tag 6 und 8 der erythroiden Reifung der K562-Zellen detektiert werden (Naarmann *et al.*, 2008). Durch Immunfluoreszenz-Färbungen und *Western Blot*-Analysen war die Abnahme der endogenen Proteinmengen von hnRNP K, hnRNP E1 und PRMT1 während der induzierten Reifung der K562-Zellen nachweisbar.

Nach der Präparation cytoplasmatischer Extrakte aus nicht-induzierten K562-Zellen und am Tag 8 der induzierten Reifung wurde die *in vitro*-Translation exogener CAT-mRNAs und endogener mRNAs verglichen. Zunächst wurden die Proteinkonzentrationen der Extrakte bestimmt und im Coomassie-gefärbten SDS-Gel überprüft (Abb. 3.4.10).

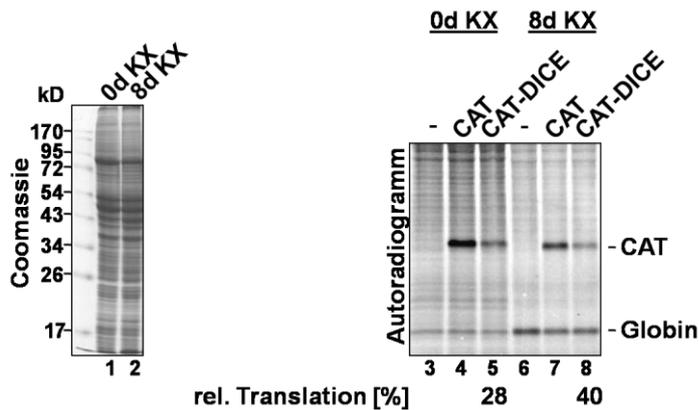


Abb. 3.4.10. Translation der CAT-mRNA in Abhängigkeit vom 3'UTR-DICE während der induzierten Reifung

links: Coomassiefärbung identischer Extraktmengen aus nicht induzierten und für acht Tage mit 1,5mM Natriumbutyrat induzierten K562-Zellen. 12% SDS-PAGE

rechts: Autoradiogramm der *in-vitro*-Translationsreaktion. 0,15pmol CAT-mRNA, 15% SDS-PAGE

Identische Extraktmengen wurden für die *in vitro*-Translation der CAT-mRNAs eingesetzt (Abb. 3.4.10, Bahnen 1, 2). Während die Translation der endogenen mRNAs und auch der zugebenen CAT-Reporter-mRNA im Extrakt aus für acht Tage induzierten K562-Zellen (8d KX) abnahm (Bahnen 6-8), zeigt sich eine verstärkte Globin-Synthese. Dies kann auf die starke Induktion der Globin-mRNAs während der induzierten Reifung zurückgeführt werden, die die Globin-mRNA-Konzentration im Extrakt stark erhöhte (vergl. Naarmann *et al.*, 2008). Neben der reduzierten Translationskompetenz des Extraktes aus induzierten K562-Zellen war eine De-Repression der DICE-abhängigen Translationsinhibition zu beobachten: während in den Extrakten aus nicht-induzierten K562-Zellen (0d KX) die Translation der DICE-tragenden mRNA auf 28% reduziert war, konnten im Extrakt aus induzierten Zellen nur 40% detektiert werden (Abb. 3.4.10). Dieser Effekt zeigte sich deutlicher im Translations-Initiations-Experiment (Abb. 3.4.12). Der Unterschied in der De-Repression kann auf die Art der Quantifizierung zurückzuführen sein: Während in den *in vitro*-Translation-Experimenten die CAT-Intensität gegenüber der Hintergrundsynthese endogener Proteine bestimmt wird, ermöglicht die Verwendung radioaktiv markierter mRNAs in *in vitro*-Translation-Initiations-Experimenten die direkte Analyse der Assoziation mit ribosomalen Untereinheiten und wird nicht durch die Anwesenheit der endogenen mRNAs beeinflusst. Zunächst galt jedoch zu klären, ob Natriumbutyrat, welches zur Induktion der K562-Reifung verwendet wurde, selber einen direkten Einfluss auf die Translation hat. Dafür wurde die *in vitro*-Synthese der endogenen mRNAs in An- und Abwesenheit von Natriumbutyrat durch den Einbau von ^{35}S -Methionin in die Translationsprodukte verglichen (Abb. 3.4.11).

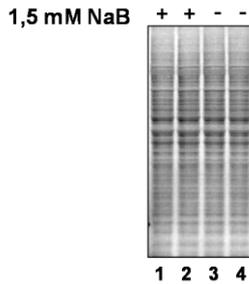


Abb. 3.4.11. *in vitro*-Translation in K562-Extrakt in Anwesenheit von Natriumbutyrat.
Detektion der *in vitro*-Synthese endogener mRNAs durch ^{35}S -Methionin. 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Ein direkter Effekt von Natriumbutyrat auf die globale *in vitro*-Proteinsynthese war nicht nachzuweisen. Die verminderte Translationskompetenz des K562-Extraktes ist möglicherweise durch die Auslösung zellulärer Regulationsmechanismen durch die Behandlung mit Natriumbutyrat zu erklären, die auch den Zellarrestes induzieren und zur erythroiden Reifung führen (vergl. Naarmann, 2006; Naarmann *et al.*, 2008).

Die Analyse der DICE-abhängigen Translations-Inhibition bei unterschiedlichen mRNA-Konzentrationen zeigte, dass die Inhibition auch bei 1,2pmol mRNA im Translationsansatz immer noch detektierbar war (Abb. 3.4.3). Für das nächste *in vitro*-Translations-Initiations-Experiment wurde ein 10facher Translationsansatz und je 10pmol mRNA verwendet. Die relativ zur Proteinkonzentration erhöhte mRNA-Menge ermöglichte die Detektion von Effekten des DICE auf die Komplexassoziation der regulatorischen Proteine hnRNP K und hnRNP E1 durch Analyse der Gradientenfractionen im *Western Blot*.

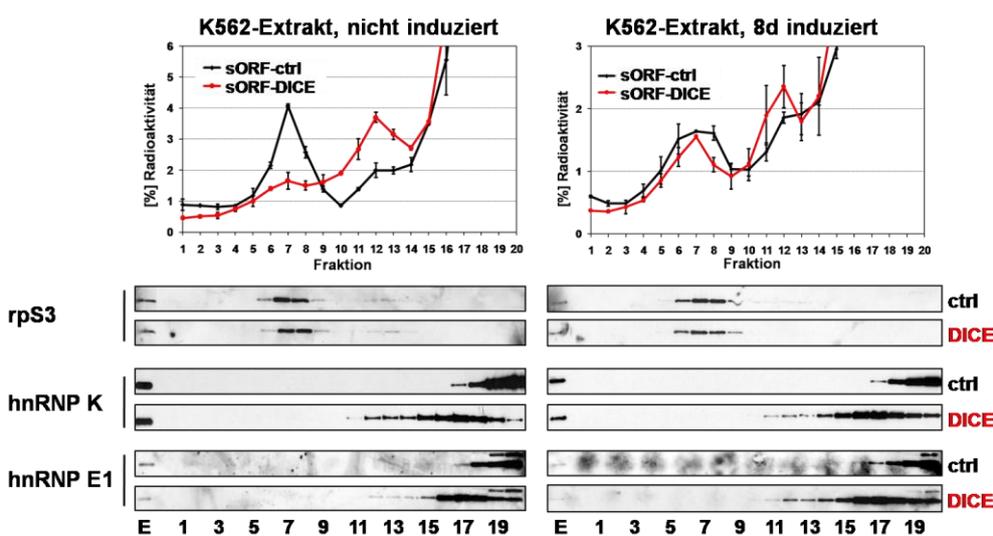


Abb. 3.4.12. Vergleich der Translations-Initiation in Extrakten aus nicht induzierten K562-Zellen und am Tag 8 der induzierten erythroiden Reifung und *Western Blot*-Analyse der Gradientenfractionen.
oben: Fraktionierung von Translations-Initiationsreaktionen. 10pmol mRNA, 5-25% Saccharose unten: 12% SDS-PAGE und *Western Blot* mit hnRNP K-, hnRNP E1 und rpS3-spezifischen Antikörpern. Eine Quantifizierung der Signale von hnRNP K und hnRNP E1 ist in Abbildung 3.4.13 dargestellt.

Das vergrößerte mRNA-Extrakt-Verhältnis erklärt die relative Verminderung der Bildung von 80S-Komplexen: während bei der Verwendung von 0,2 pmol mRNA je 4fach-Translationsansatz die 80S-*Peak*-Fraktion etwa 12% der Kontroll-mRNA enthielt, sind es hier nur noch etwa 4%, der größte Anteil der radioaktiven mRNAs fand sich in den RNP-Fraktionen. Wie bereits im Translations-Experiment mit CAT-mRNAs gezeigt (vergl. Abb. 3.4.10), nahm die Translationskompetenz des aus induzierten K562-Zellen gewonnenen Extraktes ab. Während im Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen etwa 11,4% der eingesetzten sORF-ctrl-mRNA und 7,2% der sORF-DICE-mRNA in den 80S-Fraktionen 5-9 vorlagen, waren es im Extrakt aus für acht Tage induzierten K562-Zellen nur noch 6,8 bzw. 5,7%, was eine De-Repression von etwa 63% auf 84% bedeutet. Die Bildung von 48S-Komplexen (Fraktionen 10-15) lag bei 8,4 bzw. 14,2% im Extrakt aus nicht-induzierten Zellen und bei 8,2 bzw. 9,4% in dem aus für 8 Tage induzierten K562-Zellen präparierten Extrakt (Abb. 3.4.12). Die De-Repression im CAT-Translations-Experiment nach der induzierten Reifung der K562-Zellen (vergl. Abb. 3.4.10) konnte also durch das Translations-Initiations-Experiment bestätigt werden (Abb. 3.4.12).

Die einzelnen Gradienten-Fraktionen wurden im *Western Blot* auf den Gehalt von hnRNP K und hnRNP E1 untersucht. Der Antikörper gegen das ribosomale Protein S3 (rpS3) diente als Standard für 80S- und 40- bzw. 48S-Komplexe. hnRNP K und hnRNP E1 waren bei Verwendung der Kontroll-mRNA, wie auch ohne Zugabe exogener mRNA (*Western Blot* nicht gezeigt) vorrangig in den Fraktionen 19 und 20 zu detektieren, während der Hauptteil beider Proteine nach der Zugabe der sORF-DICE-mRNA in den schwereren RNP-Fraktionen 15-18 nachgewiesen wurde, in welchen auch die RNP-*Peak*-Fraktionen dieser mRNA detektiert wurden (vergl. Abb. 3.4.7 und 3.4.8). In den 48S-Fraktionen fanden sich nur bei der Translations-Initiation der sORF-DICE-mRNA sowohl hnRNP K als auch hnRNP E1. In den 80S-Fraktionen konnten nur geringe Mengen der sORF-DICE-mRNA nachgewiesen werden, jedoch kein hnRNP K oder hnRNP E1.

Die Quantifizierung der *Western-Blot*-Signale der Gradienten-Analyse in Abb. 3.4.12 verdeutlicht die Verteilung von hnRNP K und hnRNP E1 während der Translations-Initiation der sORF-DICE-mRNA in K562-Zell-Extrakten am Tag 0 und Tag 8 der induzierten Reifung (Abb. 3.4.13), auch wenn sich die Signal-Intensitäten für hnRNP K und hnRNP E1 in den Fraktionen 16-18 nicht im linearen Bereich befinden.

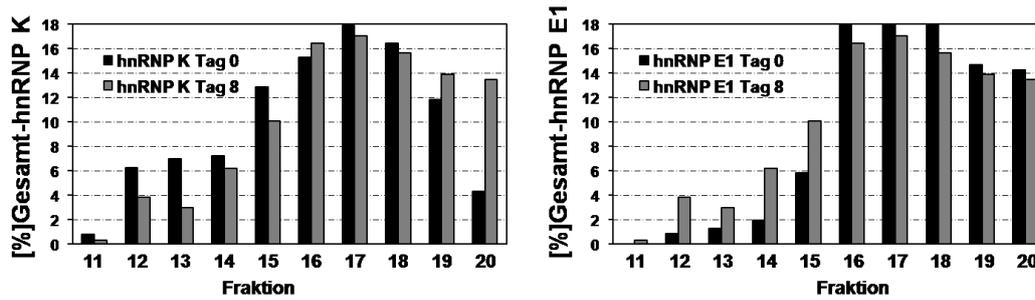


Abb. 3.4.13 Quantifizierung der *Western Blot*-Signale aus Abb. 3.4.12.

Gesamt-Intensität=100%; relative Intensitäten der Signale in den einzelnen Gradientenfractionen. Vergleich zwischen Extrakten aus nicht induzierten K562-Zellen und am Tag acht der Induktion.

Das hnRNP K-Signal im Bereich der 48S-Fractionen 11-14 war am Tag 8 reduziert, während das von hnRNP E1 relativ zur Gesamtverteilung zunahm. Das Gegenteil konnte im Bereich der Fractionen 19 und 20, also der freien Proteine, beobachtet werden. Demnach lag im Extrakt vom Tag 8 der Induktion weniger hnRNP K mit der sORF-DICE-mRNA assoziiert vor, während ein größerer Anteil hnRNP E1 binden konnte. Dies spricht gegen die Hypothese der gemeinsamen Dissoziation (vergl. Einleitung). Die verminderte Assoziation von hnRNP K mit der sORF-DICE-mRNA am Tag 8 kann durch die Phosphorylierung des Proteins im Verlauf der induzierten K562-Reifung erklärt werden (Naarmann *et al.* 2008).

Zu beachten ist hier die deutliche Abnahme der Konzentrationen beider Proteine in den Zellen und damit auch im Extrakt nach der Induktion der erythroiden Reifung von K562-Zellen (Abb. 3.4.14 und Naarmann *et al.*, 2008). Die Analyse verschiedener Proteine während der Reifung (GAPDH, Vinculin und Protein $\alpha 3$ des 20S-Proteasoms) zeigte keine signifikanten Änderungen. GAPDH ist also als Ladekontrolle im *Western Blot* geeignet (Naarmann, 2006; Naarmann *et al.*, 2008). Der Gehalt an hnRNP K und hnRNP E1 wurde auf unter 50% reduziert, nun lagen also weniger als 30pmol hnRNP K und 10pmol hnRNP E1 je Translations-Ansatz vor, was neben der hnRNP K-Phosphorylierung die detektierte De-Repression im Vergleich zur Kontroll-mRNA erklären kann.

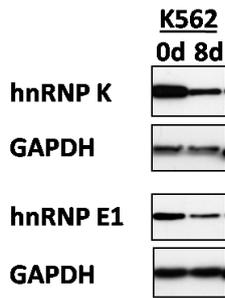


Abb. 3.4.14. Vergleich der Proteinlevel in nicht induzierten K562 Zellen und am Tag 8 der induzierten erythroiden Reifung.
gleiche Mengen an K562-Éxtrakt geladen; 12% SDS PAGE, *Western Blot* mit anti-hnRNP K, anti-hnRNP E1; GAPDH-Ladekontrolle

In den *in vitro*-Translations-und Translations-Initiations-Experimenten konnte gezeigt werden, dass eine das 3'UTR-DICE tragende mRNA in Extrakten aus K562-Zellen auf der Ebene der Translation reguliert wurde. Dabei war die Bildung von 80S-Ribosomen an der mRNA inhibiert, während die Bildung von 48S-Komplexen in Anwesenheit von GMP-PNP nicht beeinflusst war. Der regulatorische 3'UTR-Komplex bildet sich unter Translationsbedingungen an einer exogenen mRNA ohne die Zugabe weiterer Faktoren zum Extrakt. Der K562-Extrakt stellt deshalb ein geeignetes System zur Isolierung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitionskomplexes dar.

3.5 GRNA-Chromatographie zur Isolierung des translations-inhibitorischen hnRNPK/E1-DICE-Komplexes aus K562-Extrakten und die Analyse seiner Zusammensetzung

Nachdem gezeigt werden konnte, dass cytoplasmatische Extrakte aus K562-Zellen den Mechanismus der DICE-abhängigen Translationsregulation rekapitulieren (vergl. Kapitel 3.4) und ein *knock-down* der daran beteiligten Proteine hnRNP K und hnRNP E1 in den Zellen zur Translations-Aktivierung der endogenen humanen r15-LOX führt (Naarmann *et al.*, 2008), sollte der sich an einer exogen zugesetzten DICE-tragenden mRNA bildende regulatorische Komplex aus den Extrakten isoliert werden. Hierzu wurde die GRNA-Chromatographie angewendet, eine RNA-Affinitätsreinigung, die auf der hochaffinen Wechselwirkung der boxB-Haarnadelstruktur mit dem λ N-Peptid beruht (vergl. 2.22; Czaplinski *et al.*, 2005). Das λ N-Peptid wurde dafür über ein fusioniertes GST an GSH-Sepharose immobilisiert und nachfolgend mit der boxB-tragenden RNA inkubiert, so dass sich der boxB- λ N-Komplex bilden konnte (Abb. 3.5.1).

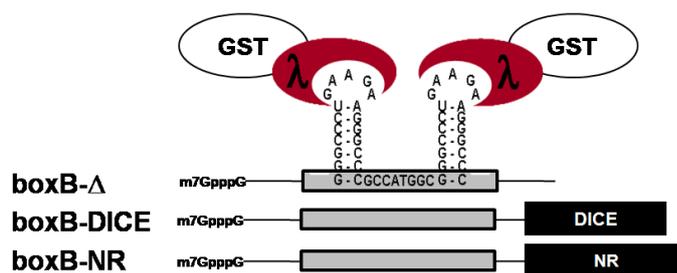


Abb. 3.5.1. Schematische Darstellung der GRNA

mRNAs mit und ohne 3'UTR-Element wurden im Extrakt inkubiert, so dass sich RNA-Protein-Komplexe bilden konnten. Diese wurden dann über die Interaktion der boxB-*stem-loop*-Struktur an das λ -Peptid gebunden, welches über seine GST-Fusion an GSH-Sepharose immobilisiert vorlag. Die zwei boxB-Elemente innerhalb des für das Peptid MDYKDDDDKPAVAAALELVDPGP EEGPAMAGPEEGP kodierende ORFs (hellgrau), sind repräsentativ für die verwendeten sechs *stem loops* schematisch dargestellt.

Die 6 boxB-Elemente und ein DICE tragende mRNA und die Kontroll-mRNA ohne DICE wurden unter Translations-Bedingungen in K562-Extrakt inkubiert. Um zu überprüfen, ob auch mit diesen mRNAs die DICE-abhängige Translations-Inhibition vermittelt wird, wurden Translations-Initiations-Experimente durchgeführt (Abb. 3.5.2).

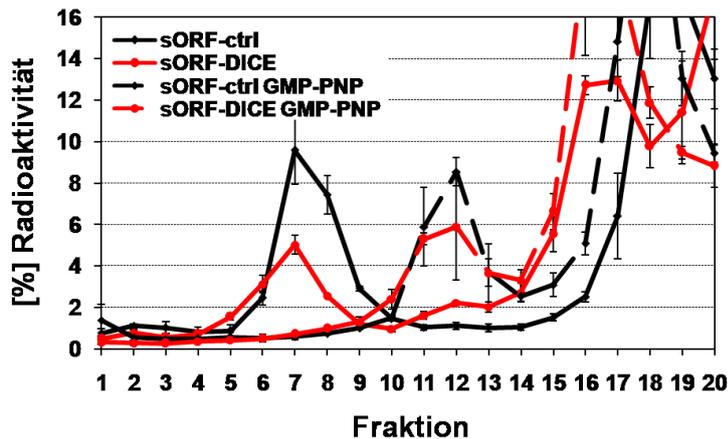


Abb. 3.5.2. Translationsinitiation von mRNAs mit 6 boxB-Elementen

Die Analyse von Translationsinitiationskomplexen, die sich an mRNAs mit sechs boxB-Elementen bilden. 0,5pmol mRNA je Translationsreaktion (4x), 1 mM Cycloheximid, +/- 3,5 mM GMP-PNP, 5-25% Saccharose, Bestimmung der mRNA-Verteilung durch Szintillationsmessung.

Hier zeigte sich bei der DICE-enthaltenden mRNA eine reduzierte Bildung von 80S-Komplexen in den Fraktionen 6-8 im Vergleich zur Kontroll-mRNA und die Ausprägung einer leichten Schulter in den 48S-Fraktionen 11-14. Der Anteil der Kontroll-mRNA in den schweren ribosomalen und prä-ribosomalen Fraktionen 1-14 betrug 33%, der der DICE-tragenden mRNA 25%. In Gegenwart von GMP-PNP konnten die 48S-Komplexe stabilisiert werden, und die Intensität ihrer Bildung wurde kaum vom DICE in der 3'UTR beeinflusst. Der Anteil der Kontroll-mRNA in Fraktionen 1-14 betrug nun 28%, der der DICE-tragenden mRNA 26%. Die Anwesenheit der 6 boxB-Elementen führte bei beiden mRNAs zu einer leichten Verminderung der Translations-Initiation, hatte aber keinen Einfluss auf die Effizienz der DICE-abhängige Inhibition.

Es konnte also gezeigt werden, dass sich unter Translations-Initiations-Bedingungen der regulatorische Komplex an der DICE-tragenden boxB-mRNA bildet (Abb. 3.5.2). Die in Abb. 3.5.1 schematisch repräsentierten mRNAs wurden nach Etablierung der optimalen Reaktions-Bedingungen (vergl. 2.22) im GRNA-Experiment eingesetzt. Sie enthielten ein 5'Cap, die 5'UTR der r15-LOX-mRNA, 6 boxB-Elemente, 2 davon innerhalb des ORFs, und verschiedene 3'UTRs. Verwendet wurden boxB-DICE oder boxB-NR als Kontrolle. NR repräsentiert die nicht-repetitive (NR)-Sequenz, welche in der 3'UTR der Kaninchen-r15-LOX-mRNA hinter dem DICE liegt und nicht mit hnRNP K und hnRNP E1 interagiert (Ostareck *et al.*, 1997). Als weitere Kontrolle diente eine mRNA ohne 3'UTR (boxB-Δ). Alle drei radioaktiv markierten mRNAs wurden unter Translations-Bedingungen im K562-Extrakt für 15min bei 30°C inkubiert, so dass sich der DICE-spezifische Komplex vergleichbar dem

im Translations-Initiations-Experiment (Abb. 3.5.2) bilden konnte. Der Komplex wurde anschließend über die Interaktion mit dem λ N-Peptid aus der Translationsreaktion isoliert (Abb. 3.5.3).

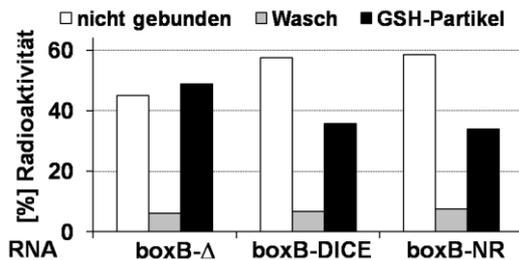


Abb. 3.5.3 GRNA mit drei verschiedenen mRNA-3'UTRs

je Ansatz 10 pmol RNA mit 6 boxB-Strukturen, 400 μ g K562-Extrakt; Elution mit SDS-Probenpuffer

Die Effizienz der RNA-Immobilisierung betrug etwa 30-45% (Abb. 3.5.3). Die durch die boxB- λ N-Interaktion mit den verwendeten mRNAs aus dem Extrakt immobilisierten Proteine wurden im *Western Blot* untersucht (Abb. 3.5.4).

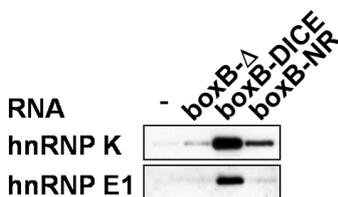


Abb. 3.5.4 Western Blot der Proteinproben aus der GRNA-Chromatographie in Abb. 3.5.3

12% SDS-PAGE,

Die Proteine hnRNP K und hnRNP E1 konnten DICE-spezifisch aus dem K562-Extrakt isoliert werden (Abb.3.5.4).

Obwohl die Bedingungen für eine spezifische Kopplung sehr genau ausgewählt wurden (vergl. 2.22), ergab die Gelfärbung der immobilisierten Proteine einen für die massenspektrometrische Analyse unzureichenden Reinheitsgrad. Deshalb wurde die GRNA zur weiteren Anreicherung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitionskomplexes mit einer hnRNP K-Immunopräzipitation kombiniert. Dies erforderte zunächst die Elution der durch GRNA gereinigten Komplexe mit GSH. Zur Überprüfung der Stabilität der eluierten boxB-mRNA-Protein-Komplexe wurden diese aus den 48S-Saccharose-Gradienten-Fractionen eines Translations-Initiationsexperimentes in Gegenwart von 5mM GMP-PNP durch die GRNA isoliert und erneut im Saccharose-Gradienten fraktioniert (Abb. 3.5.5-3.5.7).

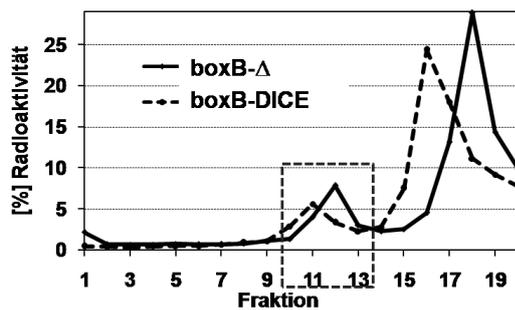


Abb. 3.5.5 Fraktionierung der Translationsinitiationskomplexe

10pmol je mRNA, 5mM GMP-PNP; 5-25%igen Saccharosegradient; Kästchen: 48S-Fractionen, welche der GRNA unterzogen wurden und nach der Elution mit GSH re-zentrifugiert werden sollten

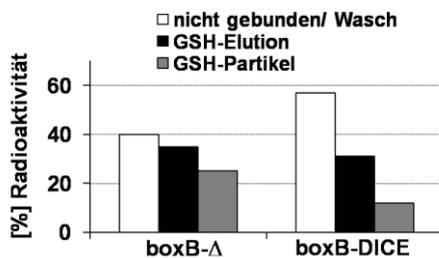


Abb. 3.5.6 GRNA der Komplexe aus den 48S-enthaltenen Fraktionen aus Abb. 3.5.4

Elution mit 50 mM GSH

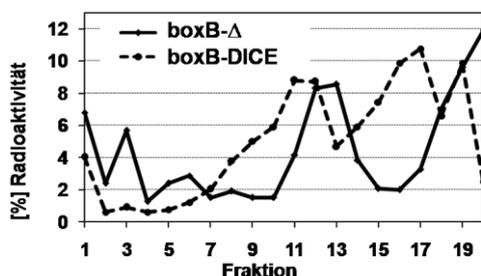


Abb. 3.5.7. Fraktionierung der aus den Saccharosegradientenfractionen isolierten RNA-Protein-Komplexe

5-25% Saccharose, Ultrazentrifugation

Es zeigte sich, dass der an der boxB-DICE-mRNA gebildete Komplex relativ stabil war: etwa 30% der radioaktiven mRNA befanden sich nach der zweiten Dichte-Gradienten-Zentrifugation noch in den 48S-Fractionen. Der größere Anteil der Komplexe war dissoziiert und befand sich nun in den RNP-Fractionen.

Für die eigentliche Reinigung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitionskomplexes aus K562-Extrakten wurden je 100 pmol mRNA, die neben sechs boxB-Strukturen die r15-LOX-5'UTR und das 3'UTR-DICE enthielt und als Kontrolle eine mRNA ohne DICE in 2 mg

Extrakt unter Translationsbedingungen inkubiert. Die gebildeten Komplexe wurden durch die GRNA-Chromatographie isoliert (Abb. 3.5.8) und mit GSH eluiert.

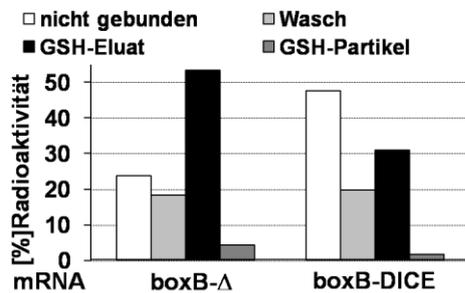


Abb. 3.5.8. GRNA zur Isolation des DICE-haltigen Komplexes aus K562-Extrakt

je 100pmol mRNA mit und ohne 3'UTR-DICE wurden unter Translationsbedingungen im K562-Extrakt inkubiert und an GST-λN gebunden; Elution: 3x200μl 50 mM GSH, Szintillationsmessung der radioaktiv [³²P] markierten mRNA

Eine Probe der eluierten Proteine (Abb. 3.5.8) wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt und in der Silberfärbung detektiert (Abb. 3.5.9).

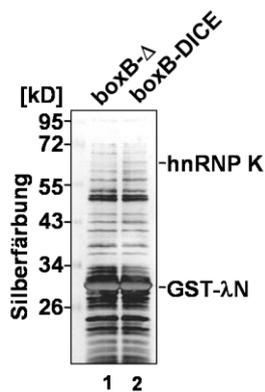


Abb. 3.5.9. Aus K562-Extrakt durch GRNA isolierte Proteine
8-18% SDS-PAGE, Silberfärbung

In dem DICE-spezifischen Eluat war eine Proteinbande mit dem Molekulargewicht von hnRNP K zu erkennen, die gegenüber der Kontrolle deutlich angereichert war. Die *Western Blot*-Analyse bestätigte die DICE-spezifische Anreicherung von hnRNP K und hnRNP E1 (Abb. 3.5.10, Bahn 5).

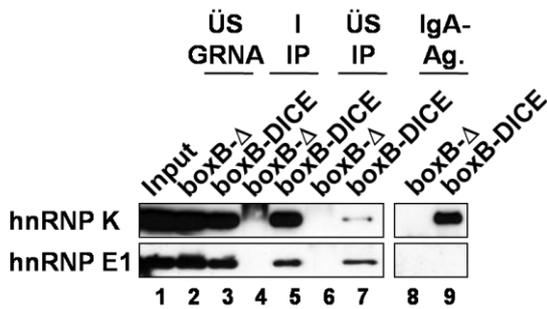


Abb. 3.5.10. Western Blot der aus K562-Extrakt durch GRNA isolierten Proteine und hnRNP K-Immunopräzipitation.

ÜS= Überstand, I= Input, IP=Immunopräzipitation, boxB-DICE=Komplex an der DICE-enhaltenden mRNA, boxB-ctrl=Kontroll-Reinigung mit der DICE-freien mRNA. IgA=Proteine an IgA-Sepharose-Partikeln, welche nach der Hochsalzelution mit SDS-Probenpuffer eluiert wurden. 12% SDS-PAGE

Die sich anschließende Immunopräzipitation mit dem hnRNP K-spezifischen Antikörper depletierte hnRNP K nahezu vollständig, während ein signifikanter Anteil an hnRNP E1 im Überstand verblieb (Abb. 3.5.10, Bahn 7).

Die durch Szintillationsmessung bestimmte Verteilung der Radioaktivität zeigte, dass nur etwa 6-7% der mRNA mit dem hnRNP K-spezifischen Antikörper präzipitiert werden konnte (Abb. 3.5.11), was verschiedene Ursachen haben kann. Entweder wurde die mRNA degradiert oder mRNA-Protein-Komplexe zum Teil dissoziiert, eventuell auch durch die Interaktion des Antikörpers mit hnRNP K.

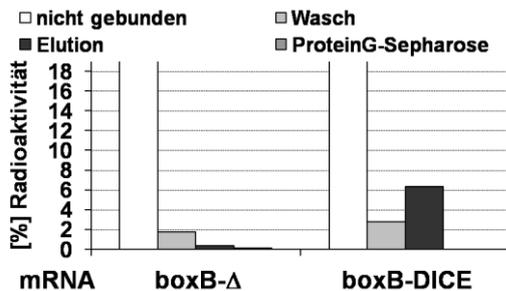


Abb.3.5.11. Szintillationsmessung der mRNA-Verteilung während der hnRNP K-Immunopräzipitation.

Nach der GRNA-Isolation aus K562-Extrakten wurden die durch GSH eluierten Proteine durch eine hnRNP K-Immunopräzipitation weiter aufgereinigt. Die relative RNA-Konzentration in den Fraktionen der Immunopräzipitation ist in [%] angegeben.

Die Abwesenheit radioaktiv markierter mRNA in der Kontrolle zeigte dennoch die Spezifität dieses Reinigungsschrittes; da hier durch die GRNA kein hnRNP K angereichert wurde, konnte auch kein RNA-Protein-Komplex durch den hnRNP K-spezifischen Antikörper präzipitiert werden. Die copräzipitierten Proteine und die mRNA wurden mit 800mM NaCl von hnRNP K dissoziiert, mit Methanol-Chloroform gefällt und in einem NuPAGE-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.5.12). Ein großer Anteil hnRNP K war nach der Salz-

Elution immer noch mit dem Antikörper assoziiert (Abb. 3.5.10, Bahn 9). Die Analyse der nach der Elution immer noch mit der Protein-A-Sepharose interagierenden Proteine im Silbergel zeigte, dass außer den erwarteten drei Proteinbanden auf Höhe des Molekulargewichtes von hnRNP K und der leichten und schweren Kette des IgA keine weiteren Proteine mehr zu detektieren waren (ohne Abb.), die Hochsalzelution also quantitativ stattgefunden hatte.

Der Vorteil der Kombination aus GRNA und hnRNP K-Immunopräzipitation lag darin, dass ausschließlich die Proteine mit hnRNP K aus dem K562-Extrakt immunopräzipitiert werden konnten, welche zuvor durch die Assoziation mit dem DICE isoliert wurden und damit in translations-inhibierenden Komplexen vorlagen. Die so erhaltenen Proteine wurden im NuPAGE-Gel elektrophoretisch getrennt (Abb. 3.5.12).

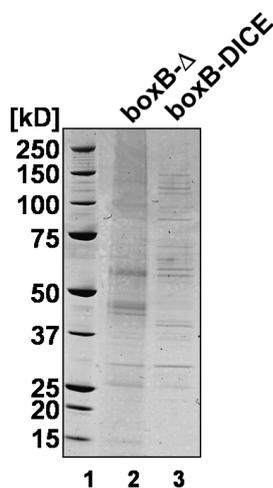


Abb. 3.5.12. Durch GRNA und hnRNP K-Immunopräzipitation isolierte Proteine.
5-18% NuPAGE-Gel, Coomassiefärbung

Die im Gel aufgetrennten Proteine (Abb. 3.5.12) zeigten deutliche Unterschiede zwischen der spezifischen Reinigung und der Kontrolle, in welcher sich nur Proteine befinden sollten, die unspezifisch durch den hnRNP K-Antikörper gebunden wurden oder mit der Protein-A-Sepharose-Matrix interagierten. Die beiden Gelbahnen (Abb. 3.5.12, Bahn 2, 3) wurden in je 23 Abschnitte geschnitten und die enthaltenen Proteine mit Trypsin im Gel gespalten. Die resultierenden Peptide wurden aus den einzelnen Gelstücken eluiert und durch Tandem-Massenspektrometrie analysiert. Diese Analyse wurde im Labor von Dr. Henning Urlaub am MPI in Göttingen durchgeführt. Die MASCOT-Suche der den erhaltenen Peptidmassen entsprechenden Proteine erfolgte dann für jeden der einzelnen Gelabschnitte getrennt (MATRIX Science, <http://www.matrixscience.com>). Die den in der Massenanalyse identifizierten Peptiden zuzuordnenden Proteine, die DICE- und hnRNP K-spezifisch aus

K562-Extrakten isoliert wurden, sind in Tabelle 3.5.1 aufgelistet. Dabei gibt die Nummer in Klammern das Gelstückes an, aus welchem das identifizierte Peptid isoliert wurde und die Nummer dahinter repräsentiert den jeweiligen Peptid-Score der MASCOT-Suche. Der Protein-Score ergibt sich aus den Ionen-Scores der einzelnen identifizierten Peptide eines Proteins, ist also abhängig von der Anzahl der Peptide und deren Einzel-Scores. Der Ionen-Score basiert auf der absoluten Wahrscheinlichkeit des zufälligen Ereignisses der Übereinstimmung einer experimentell ermittelten Masse und der Datenbank-Sequenz (www.matrixscience.com/help/interpretation_help.html). Es ist zu beachten, dass es sich hierbei nicht um eine quantitative Methode handelt, da keine internen Standards mitgeführt wurden. Die erhaltenen Scores sind daher kein Maß für die Abundanz der identifizierten Proteine.

Tab. 3.5.1. Die über die DICE-spezifische GRNA-Chromatographie und hnRNP K-Immunopräzipitation angereicherten Proteine, welche massenspektrometrisch identifiziert wurden.

Proteine, welche auch in der Kontrolle angereichert waren, sind nicht aufgeführt. Die Zahl in Klammer gibt die Gelstücke an, in welchen Peptide identifiziert worden, die Zahlen außerhalb der Klammern geben die erhaltenen Scores an.

| Protein | NCBI-Eintrag | alternative Bezeichnung/ alternative Zuordnung der Peptide | boxB-Δ | boxB-DICE | Anzahl der Peptide |
|--|--------------|--|------------|--------------------------|--------------------|
| BAT1 | gi 2739119 | DEADbox nucRNAHelicase | - | (14) 49 | 1 |
| BM-010 | gi 7582292 | eIF 4All, dnaJ homolog | - | (14) 55 | 1 |
| CDKN2A interacting protein | gi 8923040 | putative serine-rich protein | - | (11) 63 | 4 |
| cleavage stimulation factor | gi 4557495 | (dJ85M6.1) | - | (10,11) 37 52 31 | 3 |
| coactivator activator | gi 15022507 | RNA binding motif protein 14 | - | (10,11) 31,123, 39,81 | 7 |
| DEAD box polypeptide 6 | gi 164664518 | RCK | - | (13) 49, 24 | 7 |
| DEAD box polypeptide 17 | gi 62088770 | DDX17/ DEADbox protein p72 | - | (10,11) 54,59,70 | 8 |
| DEAH box polypeptide 9 | gi 100913206 | RNAHelicase A/ nucl DNAHelicase II | (5) 37,40 | (6,7) 31,133 110,135 | 14 |
| DEAH box polypeptide 30 | gi 20336290 | | (5) 42 | (7) 40,31,128 | 8 |
| dextrin isoform a | gi 5802966 | | (6) . | (20) 38 | 1 |
| DIS3 protein | gi 71296758 | Exosome complex exonuclease RRP44 | - | (8) 33,72 | 3 |
| dsRNA adenosine deaminase | gi 12711291 | IFI-4 | - | (7,8) 42,34,58 | 5 |
| dsRNA BP NFAR-2/MPP4 | gi 9081982 | DRBP76,NFAR1, NF90/110/ TCP 80/ DRBP76 | - | (7,8) 34,43 | 2 |
| env protein | gi 120431424 | mRNA transport regulator 3 | - | (18) 34 | 1 |
| EIF3B protein | gi 14603010 | Prt1-homolog | - | (8) 58,32 | 2 |
| eIF 2-alpha kinase 2 | gi 4506103 | dsRNA act kin./ interferon-induc ds RNA dep activator, HSD14 | - | (11,16,17) 37,44,38,38 | 3 |
| exosome component 2 | gi 19923403 | | (16) . | (17) 67 | 3 |
| Fam with sequ sim 98 A | gi 74715180 | hypoth LOC25940 | - | (12) 46, 143 | 5 |
| Gem associated protein 4 | gi 18042946 | gemin 4, HC 56 | - | (8) 42 | 2 |
| hnRNP A1 | gi 133252 | UP1 | | (16) 30 | 2 |
| hnRNP G | gi 542850 | RNA binding motif P, X linked | | (15) 34 | 1 |
| hnRNP K | gi 55958544 | transformation upregulated | (11) 57,46 | (12) 68,69,126 | 6 |
| hnRNP L | gi 133274 | | | (12) 47,49,31 | 4 |
| hnRNP L-like | gi 20149709 | BLOCK 24 | | (12) 77,35,52 | 7 |
| hnRNP Q1/2 | gi 15809590 | NSAP1, SYNCRIP, synaptogamin binding | (10) 38 | (11) 82 | 4 |
| hnRNP U | gi 32358 | scaffold attachment factor A | | (8) 37 | 1 |
| HSD14 | gi 37955186 | interferon-induced dsRNA depend activator | - | (16,17) 44,38,38 | 4 |
| lysozyme precursor | gi 307141 | | - | (18,22) 40,43 | 2 |
| matrin 3 | gi 21626466 | | - | (8) 64,58 | 6 |
| musashi isoforms | gi 20373175 | | - | (16) 58 | 2 |
| NF-kappaB repressin factor | gi 46250431 | transcription factor NRF, ITBA4 | - | (9) 35 | 4 |
| non-neuronal splice variant nPTB4 | gi 22218306 | | - | (12,13) 33,52 | 2 |
| nuclear cap BP subunit 1 | gi 4505343 | | - | (9) 40 | 1 |
| nuclear cap BP subunit 2 | gi 19923387 | NCBP interacting | - | (22) 61 | 2 |
| p30 DBC protein | gi 24432106 | | - | (6-8) 53 51,99,130,96 | 14 |
| polypyrimidine tract binding protein | gi 4506243 | | - | (12,13) 30 54,53,52 | 6 |
| polypyrimidine tract binding protein 2 | gi 10863997 | PTB like L | - | (12,13) 33,52 | 2 |
| poly(rC) binding protein 1 | gi 5453854 | hnRNP E1 | (14) 46 | (15,16) 68,192,68 | 12 |
| poly(rC)-binding protein 2 | gi 14141166 | hnRNP E2 | (14) 46 | (15,16) 46,67 153,106,61 | 15 |
| Ras-GAP SH3 binding protein 1 | gi 3098601 | G3BP1 | - | (12) 32,35 | 3 |
| 40S ribosomal protein S12 | gi 133742 | | - | (22) 30 | 3 |
| ribosomal protein S19 | gi 4506695 | | (20) 36,30 | (21) 70,46 | 3 |
| WD repeat domain 82 | gi 147904340 | | - | (17) 31 | 2 |
| XRN2 protein | gi 62913987 | 5 3 exoribonuclease, Dhml-like, DHP | (5) . | (8) 51 | 1 |
| YTH domain containing 2 | gi 38505213 | | | (6) 37 | 1 |
| ZC3HAV1 protein | gi 116283396 | zinc finger antiviral | - | (8) 33,55 | 2 |
| zinc finger RNA binding protein | gi 34101286 | | - | (7) 43 | 1 |
| Zinc finger protein 147 | gi 12585547 | Tripartite motif containing protein 25 | - | (11) 68 | 1 |

Trotz der hochaffinen Bindung des hnRNP K-spezifischen Antikörpers (vergl. Abb. 3.5.10, Bahn 9) konnten im Hochsalzluat Peptide aus hnRNP K massenspektrometrisch identifiziert werden. Einige wurden auch mit geringen *Scores* in der Kontroll-Reinigung identifiziert. Die Unterschiede in den *Scores* und die *Western Blot*-Analyse während der Reinigung bestätigten jedoch deutlich die DICE-spezifische Anreicherung von hnRNP K. hnRNP E1 war nur zum geringen Anteil mit hnRNP K präzipitiert worden (vergl. Abb. 3.5.10, Bahn 7). Die massenspektrometrische Analyse der gereinigten Proteine zeigte dagegen eindeutig die DICE-spezifische Anreicherung von hnRNP E1. Auch das dem hnRNP E1 zu 82% homologe hnRNP E2 konnte mit vergleichbaren *Scores* angereichert werden (Tab. 3.5.2).

Tab. 3.5.2: Vorkommen und Scores von hnRNP E1 und hnRNP E2 in der massenspektrometrischen Analyse einzelner Gelstücke aus Abb. 3.5.12

| Gelstück | 15_1 | 15_2 | 16_1 | 16_2 | 16_3 |
|----------|------|------|------|------|------|
| hnRNP E1 | 68 | | 192 | 68 | |
| hnRNP E2 | 46 | 67 | 153 | | 61 |

Die ursprüngliche Identifizierung von hnRNP E1 als DICE-bindendes Protein beruhte ebenso auf massenspektrometrischen Analysen (Ostareck *et al.*, 1997), wobei genau ein Peptid (IITLTGPTNAIFK, aa58-70) identifiziert wurde, welches eindeutig hnRNP E1 zugeordnet werden konnte. Dieses Peptid wurde bei der hier durchgeführten Analyse nicht gefunden, dafür aber sechs Peptide, die sowohl hnRNP E1 als auch hnRNP E2 zuzuordnen waren. Sechs weitere Peptide konnten eindeutig hnRNP E1 und neun Peptide eindeutig hnRNP E2 identifizieren. Basierend auf diesen Resultaten wurden die Eluate der GRNA-Chromatographie (Abb. 3.5.3) erneut im *Western Blot* untersucht, diesmal wurde der für hnRNP E2 spezifische Antiserum verwendet (Abb. 3.5.13). Die Spezifität des hnRNP E2-Antiserums konnte in *Western Blot*-Analysen unter der Verwendung rekombinanter Proteine bestätigt werden (vergl. Material und Methoden, Abb. 2.10.1). Die *Western Blots* für hnRNP E1 und hnRNP K sind zum Vergleich noch einmal dargestellt.

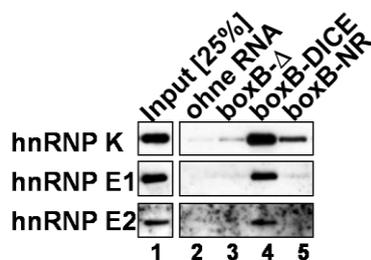


Abb. 3.5.13 *Western Blot* der Proteinproben aus der RNA-Chromatographie in Abb. 3.5.3
12% SDS-PAGE

Die spezifische DICE-Bindung von hnRNP E2 in der GRNA ist mit der von hnRNP E1 vergleichbar (Abb. 3.5.13, Bahn 4). Zur Analyse des hnRNP E2-Proteingehaltes in K562-Extrakt und dessen Änderung im Verlauf der induzierten Reifung der Zellen wurden *Western Blots* analog zu denen mit hnRNP K und hnRNP E1 in den Abbildungen 3.4.4 und 3.4.14 unter Verwendung des hnRNP E2-spezifischen Antikörpers durchgeführt (Abb. 3.5.14).

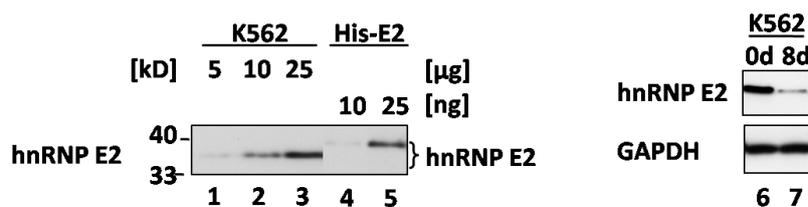


Abb. 3.5.14 *Western Blots*: Vergleich des Proteingehaltes von hnRNP E2 in K562-Zell-Extrakt mit rekombinantem Protein und dessen Abnahme während der induzierten Reifung.

links: Vergleich des hnRNP E2-Proteinlevels in nicht induzierten K562 Zellen mit rekombinantem Protein bekannter Konzentrationen

rechts: Vergleich des hnRNP E2-Gehaltes in K562-Extrakt aus nicht induzierten und für 8d induzierten Zellen. 12% SDS PAGE; Transfer auf PVDF, *Western Blot* mit α -hnRNP E2; GAPDH-Ladkontrolle

Der Proteingehalt an hnRNP E2 in K562-Extrakt konnte auf etwa 0,1% geschätzt werden (Abb. 3.5.14, Bahn 1-5) und ist somit ebenso hoch wie der von hnRNP E1. Durch den Vergleich der hnRNP E2-*Western Blot*-Signale in induzierten K562-Zellen (Bahnen 6,7) konnte gezeigt werden, dass auch der hnRNP E2-Proteingehalt im Verlauf der induzierten Reifung stark reduziert wird.

Die Identifizierung von hnRNP U und hnRNP L als Interaktionspartner des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes kann in Zusammenhang mit der Interaktion beider Proteine mit hnRNP K in *Two-Hybrid*-Experimenten (Kim *et al.*, 2000) erklärt werden und wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter untersucht. Im nächsten Kapitel wird auf eine eingeschränkte Auswahl von Proteinen näher eingegangen, welche in der kombinierten GRNA-Immunopräzipitations-Isolation der hnRNP K/E1-DICE-Komplexes identifiziert wurden.

3.6 Evaluierung der durch Massenspektrometrie identifizierten Protein-Kandidaten

Bei den durch Massenspektrometrie als Interaktionspartner des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes identifizierten Proteinen, welche in diesem Kapitel näher behandelt werden, handelt es sich um die DEAD-Box-Helikase DDX6, das Ras-GAP-SH3-interagierende Protein G3BP1, das ribosomale Protein rpS19, den Translations-Initiationsfaktor eIF3b, das humane Musashi-Homolog und die eIF2 α -Kinase PKR (vergl. Tab. 3.5.1).

Im humanen Genom sind zwei Musashi-Homologe kodiert: *msi1* und *msi2*. Musashi-1 (*msi1*) wurde bereits als ein Faktor beschrieben, der an der Translationsregulation von *numb* und *p21^{WAF}* während der Neuronalentwicklung beteiligt ist (Imai *et al.*, 2001; Battelli *et al.*, 2006). Die Translations-Inhibition wird durch die Kompetition der PABP-Bindung mit eIF4G vermittelt (Kawahara *et al.*, 2008). In *Drosophila* ist *msi1* für die asymmetrische Zellteilung von Vorläuferzellen der Sinnesorgane erforderlich. In *msi1*-defizienten Zellen führt die resultierende Dysfunktion in der asymmetrischen Zellteilung zum Doppelborsten-Phänotyp, welcher auch namensgebend für das Protein ist (Nakamura *et al.*, 1994, Okano *et al.*, 2002). Über das Musashi-Homolog 2 (*msi2*) ist wenig bekannt. Der kommerziell erhältliche Antikörper gegen *msi1* wurde im *Western Blot* verwendet (Abb. 3.6.1).

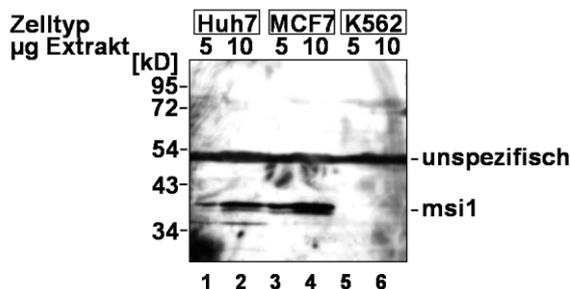


Abb. 3.6.1. Analyse der Expression von Musashi-Homolog 1 (*msi1*) in humanen Zelllinien.
je 5 und 10µg cytoplasmatischer Extrakt, 12% SDS-PAGE, *Western Blot*

Der Vergleich der K562-Extrakte mit zwei anderen humanen Zelllinien zeigte, dass *msi1* in K562-Zell-Extrakten nicht detektierbar war, also wahrscheinlich nicht exprimiert wird. Da für das humane *msi2*-Homolog zum Zeitpunkt dieser Untersuchungen kein Antikörper verfügbar war, wurden zunächst die anderen oben genannten Proteinkandidaten weiter untersucht.

Es ist bekannt, dass speziell in roten Blutzellen die Translationsregulation durch eine häminabhängige eIF2 α -Kinase, den sogenannten Häm-regulierten Inhibitor (HRI) (Jackson

1991; Chen und London, 1995) vermittelt wird. Eine andere eIF2 α -Kinase, die durch doppelsträngige RNA aktivierte Kinase (PKR), ist in Retikulozyten konstitutiv exprimiert (Proud, 1995) und wurde in den massenspektrometrischen Analysen als potentieller Interaktionspartner des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes identifiziert (vergl Tab. 3.5.1). Diese PKR enthält im Gegensatz zum HIR kein Häm-reguliertes Motiv innerhalb der katalytischen Domäne (Chen und London, 1995), ansonsten existieren deutliche Sequenz- und Struktur-Homologien innerhalb der bekannten eIF2 α -Kinasen, und die Phosphorylierung findet an Ser51 in der α -Untereinheit von eIF2 statt (Hanks und Hunter, 1995; Sudhakar *et al.*, 2000). Das resultierende eIF2 α (P) inhibiert den GEF von eIF2, eIF2B (Sudhakar *et al.*, 2000). GDP-tragendes eIF2 kann nicht mehr als Translations-Initiations-Faktor fungieren.

Die Beteiligung einer eIF2 α -Kinase an der DICE-spezifischen Translations-Regulation scheint unwahrscheinlich, da die eIF2 α -Phosphorylierung die globale Verfügbarkeit des ternären Komplexes reduzieren würde (Sonenberg und Hinnebusch, 2009). Da jedoch alle Untersuchungen zur Translations-Inhibition und die Komplexassemblierung für die GRNA in Gegenwart von Hämin durchgeführt wurden, welches als Inhibitor des HRI die *in vitro*-Synthese der CAT-mRNA verbesserte, wurde die DICE-abhängige Inhibition der *in vitro*-Translation von CAT-DICE- und CAT-Kontroll-mRNAs mit und ohne Hämin verglichen (Abb. 3.6.2).

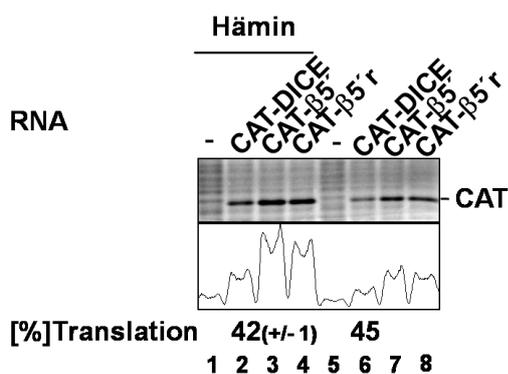


Abb. 3.6.2. Der Einfluss von Hämin auf die *in vitro*-Translation und die DICE-abhängige Translations-Inhibition in K562-Extrakt.

0,4pmol mRNA, Bahnen 1-4: 44 μ M Hämin, 12% SDS-PAGE, Autoradiographie

Die Translation der CAT-DICE-mRNA war im Vergleich zu beiden Kontroll-mRNAs CAT- β 5' und CAT- β 5'r inhibiert (Abb. 3.6.1, Bahn 2 und 6). Die Inhibition wurde durch Hämin nicht beeinflusst, jedoch war vor allem die Synthese des CAT-Proteins deutlich vermindert. Dies bestätigt den positiven Effekt der Verwendung von Hämin im Translations-Experiment

und schließt einen Einfluss von Hämin auf die Bildung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Komplexes aus.

Die Phosphorylierung von eIF2 α ist ursächlich mit der Bildung von *Stress-Granules* verknüpft (Kedersha *et al.*, 1999). G3BP1 ist ebenfalls ein *Stress-Granule*-Marker (Kedersha *et al.*, 2005). In *Stress-Granules* werden translations-inaktive mRNAs während der zellulären Stressantwort akkumuliert (vergl. Einleitung). G3BP1 wurde im Zusammenhang mit der Translations-Regulation der Tau-mRNA während der neuronalen Differenzierung beschrieben (Atlas *et al.*, 2007).

Da auch G3BP1 als potentieller Interaktionspartner des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes identifiziert wurde (vergl. Tab. 3.5.1), stellte sich die Frage, ob *Stress-Granule*-ähnliche Vorläufer-mRNPs gebildet werden. Bei der Bildung von *Stress-Granules* kommt es zu einer Rekrutierung von TIA-1 und TIAR (T-Zell-internes Antigen 1 und TIA-related) zum Prä-Initiationskomplex anstelle des ternären Komplexes, welcher sich durch die stress-induzierte Phosphorylierung von eIF2 α nicht mehr ausbildet. TIA-1 und TIAR sind *Stress-Granule-Marker* (Kedersha *et al.*, 1999) und enthalten zwei RRM's (Tian *et al.*, 1991, Kawakami *et al.*, 1992). Beide Proteine wurden weder in der DICE-spezifischen GRNA (Ta. 3.5.1) noch in hnRNP K-Immunopräzipitations-Experimenten identifiziert (Naarmann, unpubliziert). Eine Interaktion mit dem die Translation inhibierenden hnRNP K/E1-DICE-Komplex ist also unwahrscheinlich, was im GST-pulldown-Experiment bestätigt wurde (Abb. 3.6.4).

DDX6 ist eine postulierte RNA-abhängige ATPase, deren Helikase-Aktivität für das aus Oozyten gereinigte *Xenopus*-Homolog Xp54 bereits nachgewiesen wurde (Ladomery *et al.*, 1997). In Oozyten-Injektions-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das Xp54 die Translation nicht-polyadenylierter Reporter-mRNA inhibiert (Minshall *et al.*, 2001). In *Drosophila*-Oozyten ist das homologe Me31B ebenfalls bereits als Translations-Inhibitor beschrieben (Nakamura *et al.*, 2001).

Das ribosomale Protein rpS19 liegt als Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit mit rRNA und mRNA assoziiert vor. Mutationen im rpS19-Gen führen zur Diamond-*Blackfan*-Anämie, welche durch eine reduzierte Erythroblastenzahl charakterisiert ist (Flygare *et al.*, 2007). Es wurde eine extra-ribosomale Funktion postuliert (Morimoto *et al.*, 2007).

eIF3b ist eine Untereinheit von eIF3, einem Translations-Initiations-Faktor, welcher sowohl an der Bildung von 43S-Präinitiations-Komplexen als auch deren Rekrutierung an mRNAs beteiligt ist (Hershey und Merrick, 2000; Hinnebusch *et al.*, 2007). Eine weitere Funktion von eIF3 während der Translation liegt in der Dissoziation von 80S-Ribosomen und der

Verhinderung der Re-Assoziation der 60S mit der 40S-Untereinheit vor der Bildung von 48S-Initiations-Komplexen (Kolupaeva *et al.*, 2005).

Hier könnte die Interaktion mit einem translations-regulatorischen 3'UTR-Komplex die Aktivität des Initiationsfaktors modulieren. eIF3b ist die p116-Untereinheit von eIF3, welcher im Menschen aus 12 weiteren Untereinheiten (eIF3a-eIF3m) besteht, dient als eines der Gerüst-Proteine des Multi-Faktor-Komplexes eIF3 (Hinnebusch, 2006; ElAntak *et al.*, 2007) und interagiert mit eIF3a, eIF3g, eIF3i und eIF3j (Methot *et al.*, 1997; Fraser *et al.*, 2004). Eine direkte Interaktion mit hnRNP K oder hnRNP E1 könnte möglicherweise eine der anderen Untereinheiten verdrängen. Dennoch erscheint eIF3 als Zielprotein des DICE-abhängigen Inhibitions-Mechanismus unwahrscheinlich, da dann Schritte der Translations-Initiation vor dem Erkennen des Initiations-Kodons beeinflusst sein würden, was durch *Toe-Print*-Experimente ausgeschlossen wurde (Ostareck *et al.*, 2001).

Um zu klären, ob eine direkte Interaktion zwischen hnRNP K oder hnRNP E1 und den Proteinen DDX6, G3BP1, eIF3B oder rpS19 besteht, wurden zunächst *GST-pulldown*-Experimente durchgeführt. Dazu erfolgte die Expression der GST-Fusionsproteine GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1 in *E.coli* und deren Reinigung über Glutathion-Affinitätschromatographie sowie Ionenaustausch-Chromatographie (vergl. 2.6). Für die *GST-pulldown*-Experimente wurden äquimolare Konzentrationen beider Proteine mit GSH-Sepharose inkubiert. Als Kontrollen wurden GST und unbeladene Sepharose verwendet.

Da alle zu untersuchenden Proteine am RNA-Metabolismus beteiligt sind, galt es zu prüfen, ob die mögliche Interaktion im *GST-pulldown*-Experiment durch die Bindung derselben RNA vermittelt wurde. Dafür wurde dem Extrakt Kompetitor-RNA zugefügt oder er wurde mit Mikrokokken-Nuklease behandelt. Diese Nuklease ist Calcium-abhängig und lässt sich durch die Zugabe von EGTA inhibieren, was eine anschließende Zugabe der Kompetitor-RNA ermöglichte. Die Vollständigkeit des Nuklease-Verdaus wurde durch RT-PCR mit GAPDH-spezifischen Primern überprüft (Abb. 3.6.3). Dafür wurde der K562-Extrakt mit Mikrokokken-Nuklease inkubiert und die RNA zu den angegebenen Zeitpunkten mit Trizol isoliert. Die GAPDH-RT-PCR zeigte, dass diese mRNA bereits nach 5 min abgebaut war.

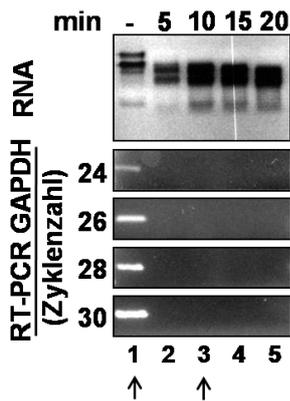


Abb. 3.6.3. Mikrokokken-Nuklease-Behandlung von K562-Extrakt.

1mg K562-Extrakt, 3 μ L Mikrokokkennuklease (Fermentas) in 100 μ l GST-*pull-down*-Puffer, 1mM CaCl₂
 oben: Zum angegebenen Zeitpunkt des Verdau aus dem Extrakt isolierte RNA, 1% Agarosegel/TTE;
 Ethidiumbromid-Färbung
 unten: PCR-Produkte der GAPDH-RT-PCR nach den rechts angegebenen Zyklen. 1,8% Agarosegel/TTE
 Pfeile: Unbehandelter und für 10 min verdauter K562-Extrakt wurde im GST-*pull-down* in Abb. 3.6.4 verwendet

Für das folgende GST-*pull-down*-Experiment wurde unbehandelter und für 10 min mit Mikrokokken-Nuklease verdauter K562-Extrakt (Pfeile in Abb. 3.6.3, Bahnen 1, 3) verwendet. Die Nuklease wurde durch Zugabe von 5mM EGTA inaktiviert. Beiden Extraktpräparationen wurde jeweils das DICE (Abb. 3.6.4, Bahn 5-8, 13-16) und dem Nuklease-behandelten Extrakt zusätzlich die β -globin-5'leader-Kontroll-RNA (ctrl, Abb. 3.6.4, Bahn 17-20) zugesetzt. Nach der Inkubation der mit GST, GST-hnRNP E1 oder GST-hnRNP K vorgekoppelten Glutathion-Sepharose mit den Extrakten wurde die Matrix gewaschen und die präzipitierten Protein nach Elution in SDS-Probenpuffer im *Western Blot* analysiert (Abb. 3.6.4).

Endogenes hnRNP K und hnRNP E1 konnte durch das DICE-Transkript an dem jeweiligen anderen rekombinanten Interaktionspartner angereichert werden (Bahnen 7, 8, 15, 16). Diese Interaktion diente als Positivkontrolle für eine durch die DICE-RNA vermittelte Interaktion. Auch endogenes hnRNP E2 wurde durch die Zugabe des DICE an beide rekombinanten Proteine rekrutiert (Bahnen 7, 8, 15, 16). Die Interaktion mit rpS19 (Bahnen 3, 4) wurde sowohl durch die Zugabe der DICE-RNA (Bahnen 7, 8) als auch durch die Degradation der Extrakt-mRNAs durch die Nuklease-Behandlung (Bahnen 11, 12) unterbunden. Es war nur eine schwache Interaktion mit eIF3b zu detektieren. Durch den Nuklease-Verdau wurde offensichtlich eine unspezifische Interaktion von eIF3B mit der Sepharose hervorgerufen (Bahn 9-16).

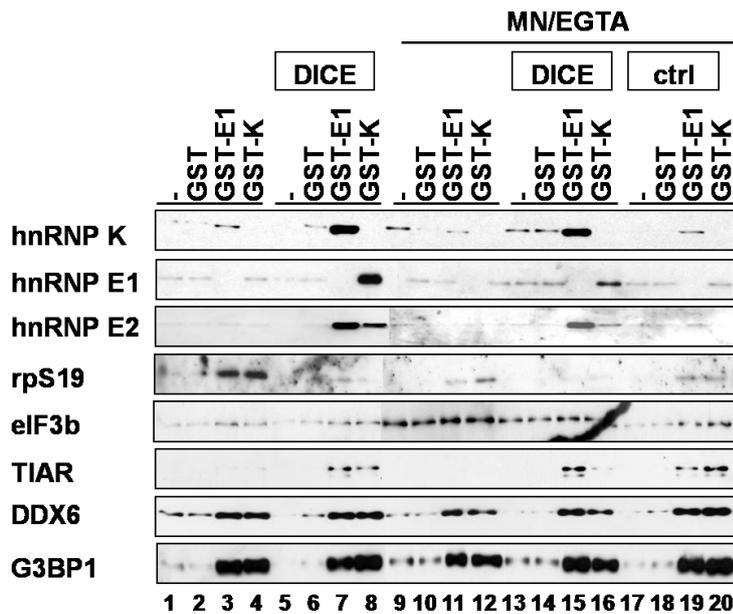


Abb. 3.6.4. RNA-Abhängigkeit der Protein-Protein-Interaktion im GST-pulldown-Experiment.

je 200pmol GST/-E1/-K; 400µg Extrakt; 50pmol Kompetitor-RNA, 8-18% SDS-PAGE und *Western Blot* unter Verwendung der links angegebenen Antikörper. MN= Mikrokokkus-Nuklease; GST-E1 bzw. -K = GST-hnRNP E1 bzw. -K; bei den *Western Blots* für hnRNP K und hnRNP E1 wurden die Proben aus dem *pulldown* mit GST-E1 bzw. -K weggelassen, um eine Überexposition durch die Anwesenheit des rekombinanten Proteins zu vermeiden.

TIAR diente als Negativkontrolle, da es weder durch die DICE-spezifische GRNA noch in hnRNP K-Immunopräzipitationen (Naarmann, unpubliziert) angereichert wurde. TIAR wurde jedoch in Gegenwart des DICE-Transkriptes und auch der Kontroll-RNA durch GST-hnRNP K und E1 rekrutiert (Bahnen 7, 8, 15, 16, 19, 20). Dieses Protein enthält 2 RRM, welche RNA-Bindung vermitteln können. Da davon auszugehen ist, dass eine größere Menge des zugegebenen DICE-Transkriptes als der Kontroll-RNA durch die rekombinanten Proteine GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1 gebunden wurde, was sich im *UV-crosslink*-Experiment (ohne Abbildung) bestätigte, und die TIAR-Signale in allen Ansätzen mit RNA-Zugabe (Abb. 3.6.4, Bahnen 7, 8, 15, 16, 19, 20) vergleichbar war, kann man schlussfolgern, dass die TIAR-Bindung an die Kontroll-RNA stärker war als die der DICE-RNA.

Die Interaktion von DDX6 und G3BP1 mit GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1 war weder durch den Einsatz der RNAs noch durch die Nuklease-Behandlung beeinflusst. Das weist auf eine direkte oder durch gemeinsame Proteinbindungspartner vermittelt Interaktion hin. In den *GST-pulldown*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass rpS19 und eIF3B, die nach GRNA und massenspektrometrischer Analyse mit dem hnRNP K/E1-DICE-Komplex assoziiert waren, nicht DICE-spezifisch mit hnRNP K oder hnRNP E1 interagierten. Ihre Bindung an die in der GRNA verwendeten boxB-DICE-mRNA (vergl. 3.5) kann dadurch erklärt werden,

dass die Komplexassoziation unter Translationsbedingungen durchgeführt wurde. In Translations-Initiationsstudien (Abb. 3.5.2) wurde bereits gezeigt, dass diese mRNA mit Ribosomen und ribosomalen Untereinheiten, und damit auch mit Initiationsfaktoren assoziierte.

Die weiteren Untersuchungen beschränken sich auf die Proteine DDX6 und G3BP1, da sie im GST-pulldown-Experiment eine RNA-unabhängige Interaktion mit hnRNP K und hnRNP E1 zeigten. Die Analyse ihrer Expression während der induzierten Reifung von K562-Zellen im *Western Blot* zeigte, dass der Gehalt beider Proteine ähnlich wie der von hnRNP K und hnRNP E1 abnahm (Abb. 3.6.5, vergl. Abb. 3.4.15 und Naarmann *et al.*, 2008).

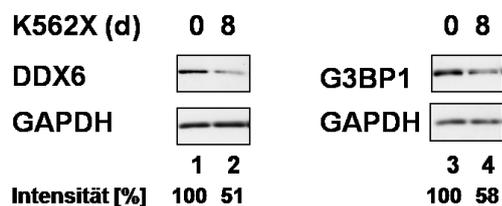


Abb. 3.6.5 *Western Blot* mit nicht induzierten K562-Extrakten und am Tag 8 der induzierten Reifung
0= Extrakt nicht induzierter K562-Zellen; 8= Extrakt an Tag acht der Induktion; 1µg Extrakt für G3BP1, 2µg für DDX6, GAPDH-Ladekontrolle

Zur Analyse der Assoziation von hnRNP K, hnRNP E1, DDX6 und G3BP1 in Komplexen unterschiedlicher Größe wurden cytoplasmatische Extrakte ohne Kaliumvorbehandlung aus nicht induzierten und für acht Tage induzierten K562-Zellen generiert. Die hypertensive Kaliumvorbehandlung diente der Erzeugung translationskompetenter Extrakte und führte, zumindest in MEL-Zellen, zur Dissoziation von Polysomen (Bader und Sarre, 1986). Um Komplexdissoziation zu verhindern, wurde der cytoplasmatische Extrakt unter Auslassung der hypertensiven Vorbehandlung präpariert und durch Saccharosegradienten-Zentrifugation fraktioniert. Die Fraktionen wurden im *Western Blot* und durch RT-PCR analysiert (Abb. 3.6.6).

Die Proteine rpS3, eIF6 und eIF2 dienten hierbei als Marker für die 80S-, 60S-, 48S und 43S-haltigen Fraktionen (Abb. 3.6.6). RpS3 ist als Protein der kleinen ribosomalen Untereinheit Bestandteil von 43-Präinitiations- und 48S-Intitiations-Komplexen und von 80S-Ribosomen. eIF6 bindet fest an 60S-Untereinheiten (Ceci *et al.*, 2003). eIF2 bindet als ternärer Komplex aus eIF2:GTP:tRNA_i^{Met} an 40S-Untereinheiten, dissoziiert während der Translations-Initiation vor der Bildung von 80S-Ribosomen (Chakrabarti und Maitra, 1991; Das und Maitra, 2000) und markiert somit wie rpS3 die Position von 43- und 48S-Komplexen.

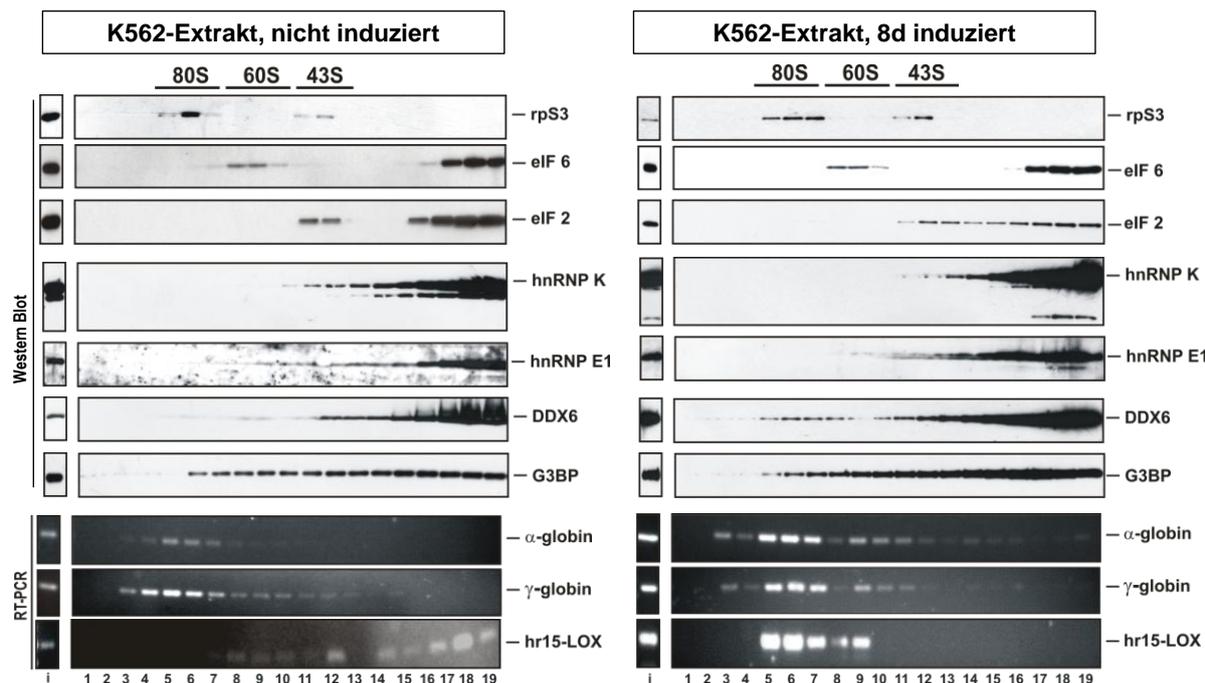


Abb. 3.6.6. Fraktionierung von cytoplasmatischen Extrakten nicht induzierter und für 8 Tage mit NaB induzierter K562-Zellen

je 2mg Extrakt geladen; 5-25% Saccharosegradient; ~550 μ l je Fraktion; *Western Blot*, RNA-Isolation aus 300 μ l; RT-PCR: 2% Agarosegel/TBE

hnRNP K und hnRNP E1 befanden sich ebenso wie DDX6 hauptsächlich in den leichten RNP-Fractionen, während G3BP1 in Komplexen unterschiedlicher Größe vorlag. Neben der Anreicherung der einzelnen Proteine in verschiedenen Fractionen befand sich jeweils auch ein signifikanter Anteil in den Fractionen, in welchen sich die endogene r15-LOX-mRNA detektieren ließ: Am Tag 0 waren die RT-PCR-Produkte der hr15-LOX-mRNA in den RNP-Fractionen 17-19 und in der 48S-Fraktion 12 detektierbar, jedoch nicht in den 80S-Fractionen, in denen sich die Kontroll-mRNAs α -Globin und γ -Globin nachweisen ließen. Am Tag 8 befand sich ein signifikanter Anteil der hr15-LOX-mRNA in den 80S-Fractionen.

Es ist also durchaus möglich, dass sich an der humanen r15-LOX-mRNA ein Komplex bildet, der hnRNP K, hnRNP E1, DDX6 und G3BP1 enthält und mit ribosomalen Prä-Initiations-Komplexen assoziiert, jedoch keine translations-aktiven Ribosomen bildet (Abb. 3.6.6). Die Abundanz von hnRNP K in 48S-haltigen Fractionen 11-13 ist verglichen mit den RNP-haltigen Fractionen 17-19 auch in diesem Experiment reduziert, wenn die K562-Zellen durch die Natriumbutyrat-Behandlung eine erythroide Reifung durchlaufen haben (vergl. Abb. 3.4.12). DDX6 migriert scheinbar am Tag 8 der Reifung zusammen mit der endogenen hr15-LOX-mRNA in die 80S-Fractionen. Deshalb wurde DDX6 hinsichtlich seiner Interaktion mit hnRNP K und hnRNP E1 und seiner Funktion im Zusammenhang mit der r15-LOX-

Translationsregulation näher untersucht. Die dazu durchgeführten Experimente werden im nächsten Kapitel dargestellt.

3.7 Die Interaktion von DDX6 mit hnRNP K und hnRNP E1 und die Funktion von DDX6 in der r15-LOX-mRNA-Translations-Regulation

Zur näheren Analyse eines funktionalen Zusammenhanges der Interaktion von DDX6 mit hnRNP K und hnRNP E1 in der GRNA und in GST-pulldown-Experimenten und der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation wurden zunächst RNA-Interferenz (RNAi)-Experimente in K562-Zellen durchgeführt. Dafür wurden drei zur mRNA-Sequenz von DDX6 komplementäre siRNAs (vergl. Material und Methoden) in K562-Zellen transfiziert. Durch RNAi mit der siRNA#1 wurde die DDX6-Proteinkonzentration in K562-Zellen 2 Tage nach der Transfektion signifikant gesenkt (Abb. 3.7.1, Bahn 2).



Abb. 3.7.1. RNAi gegen DDX6 in K562-Zellen

Die Zellen wurden mit 3 verschiedenen siRNAs komplementär zur DDX6-mRNA transfiziert und die DDX6-Proteinmenge nach 2, 3 und 4 Tagen im *Western Blot* untersucht. 12% SDS-PAGE, GAPDH=Ladekontrolle

Der Effekt des DDX6-*knock down* durch siRNA#1 (Abb. 3.7.1) wurde von Isabel Naarmann durch Immunofluoreszenz-Mikroskopie untersucht (Abb. 3.7.2). Dies ermöglichte die Unterscheidung von effizient transfizierten Zellen, die eine sehr starke Reduktion von DDX6 zeigten (Abb. 3.7.2, Pfeil), von weniger oder gar nicht transfizierten Zellen.

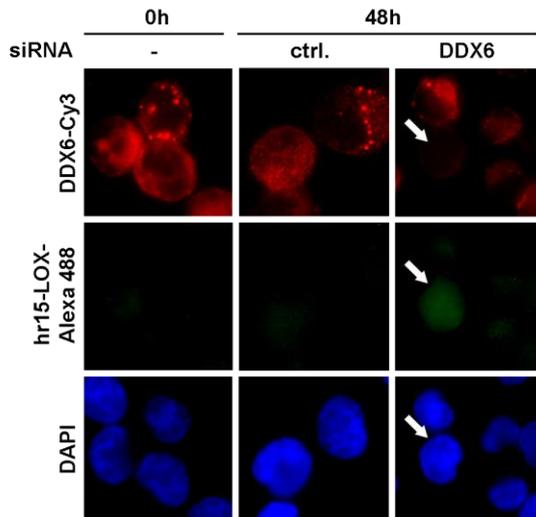


Abb. 3.7.2. Die Expression von hr15-LOX nach RNAi gegen DDX6 in K562-Zellen

Die Zellen wurden mit siRNA#1 transfiziert und nach 2 Tagen mit Antikörpern gegen DDX6, humane r15-LOX und mit DAPI gefärbt. Die Zelle mit dem Pfeil zeigte einen sehr effizienten *knock down* von DDX6 und ein starkes Signal der endogenen hr15-LOX.

Der Vergleich der Färbung der endogenen hr15-LOX in diesen Zellen mit den Nachbarzellen, welche noch DDX6 exprimierten, verdeutlicht, dass durch die Reduktion der DDX6-Expression die hr15-LOX detektiert werden konnte. Der gleiche Effekt ist bei einem Doppel-*knock-down* von hnRNP K und hnRNP E1 in K562-Zellen beobachtet worden (Naarmann *et al.*, 2008).

Weitere RNAi-Experimente bestätigten den spezifischen Effekt des DDX6-*knock-down* auf die hr15-LOX-Expression (Naarmann, unpubliziert). RNAi gegen hnRNP K, welches sowohl die 3'UTR der hr15-LOX-mRNA als auch der c-Src-mRNA bindet (Naarmann *et al.*, 2008) führte nicht zur Induktion der hr15-LOX-Synthese, aber zur Synthese von c-Src, während der hnRNP E1-*knock-down* keinen Einfluss auf die c-Src-Expression hatte (Naarmann *et al.*, 2008). RNAi gegen DDX6 in den K562-Zellen hatte ebenso keinen Einfluss auf die c-Src-Expression (Naarmann, unpubliziert), die Synthese der endogenen hr15-LOX erfolgt also spezifisch durch den DDX6-*knock down*.

Nachdem in GST-*pull-down*-Experimenten gezeigt wurde, dass endogenes DDX6 aus K562-Zellen RNA-unabhängig mit rekombinantem hnRNP K interagiert (vergl. Abb. 3.6.4), sollte die Interaktion beider endogener Proteine im Extrakt aus K562-Zellen analysiert werden. Dafür wurden hnRNP K und DDX6 aus K562-Extrakten immunopräzipitiert. Die Antikörper wurden kovalent gekoppelt (Abb. 3.7.3a).

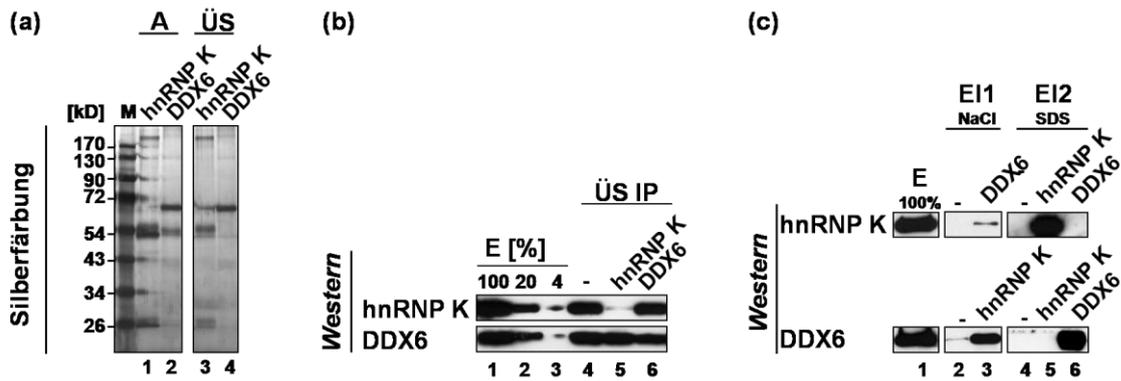


Abb. 3.7.3. Co-Immunopräzipitation von hnRNP K und DDX6 aus K562-Extrakt.

a) Antikörperkopplung an Protein-A-Sepharose. Je 2 µg Antikörper und 10 µl 50% Protein-A-Sepharose, 12% SDS-PAGE, Silberfärbung; A=verwendete Antikörper, ÜS=Überstand der Kopplung
 b und c) *Western Blot* nach 12% SDS-PAGE
 b) Analyse der Überstände (ÜS) nach der IP; Antigendepletion; E=eingesetzter Extrakt
 c) Analyse des gefällten Salz-Eluats und des SDS-Eluats; E=eingesetzter Extrakt, ÜS= Überstand, EI1= NaCl-Elution; EI2=SDS-Elution; - = Kontrolle ohne Antikörper

Die im Vergleich zum α -hnRNP K-Antikörper niedrigere Konzentration des α -DDX6-Antikörper (Abb. 3.7.3a; Bahn 2) kann die geringe Effizienz der Depletion von DDX6 (Abb. 3.7.3b, Bahn 6) im Vergleich zu hnRNP K (Abb. 3.7.3b, Bahn 5) erklären. Nach dem Waschen der Protein-A-Sepharose wurde erst mit Salz (500 mM NaCl) und dann mit SDS-Probenpuffer eluiert.

Die eluierten Proteine wurden im *Western Blot* (Abb. 3.7.3c) analysiert. Die Salz-Eluate der Immunopräzipitation wurden dafür zunächst mit Methanol-Chloroform gefällt. Die Co-Immunopräzipitation von DDX6 mit hnRNP K und die von hnRNP K mit DDX6 zeigte die von der Ionenstärke abhängige Interaktion beider endogener Proteine und bestätigte die Interaktion des endogenen DDX6 mit dem rekombinanten hnRNP K im *GST-pulldown*-Experiment. Demgegenüber ist im SDS-Eluat hnRNP K ausschließlich in der hnRNP K-Immunopräzipitation detektierbar, ebenso wie DDX6 nur in der DDX6-Immunopräzipitation. Die Analyse der Co-Immunopräzipitation von DDX6 mit hnRNP K in Anwesenheit von RNase (Naarmann, unpubliziert) konnte die RNA-unabhängige Wechselwirkung beider Proteine zunächst bestätigen, in späteren Experimenten verstärkte sich die Interaktion beider Proteine spezifisch nach der Zugabe der DICE-RNA (Naarmann, unpubliziert).

Da im *GST-pulldown*-Experiment die Interaktion von endogenem DDX6 mit rekombinanten hnRNP K und hnRNP E1 nicht durch die Zugabe der DICE-RNA verändert werden konnte (Abb. 3.6.5, Bahnen 7, 8, 15, 16), sollte in RNA-Bindungsexperimenten näher untersucht werden, ob eine Interaktion von DDX6 mit dem DICE möglich ist. Dafür erfolgte zunächst

die Expression von His-DDX6 in *E.coli*. Die cDNA von DDX6 wurde durch RT-PCR mit RNA aus K562-Zellen generiert. Die vollständige Sequenzierung dieser cDNA ergab zwei zusätzliche Basentriplets, die Val₁₆₇-Ser₁₆₈ kodieren, welche nicht in der NCBI-Datenbank erfasst sind (P26196 in UniProtKB, gi:116241327 und RefSeq accession: NM004397.4/NP_04388.2, gi:164664518).

Zusätzlich zur Klonierung der Wildtyp-cDNA in pET-16b wurde auch die gerichtete Mutagenese zur Herstellung der DDX6-Varianten (E249Q) und (R426Q) durchgeführt, analog zu Mutationen, die in anderen DEAD-Box-Helikasen zum Verlust der ATPase-Aktivität bzw. der RNA-Bindung führten (Pause und Sonenberg, 1992; Pause et al., 1993). Nach der Induktion der Überexpression in Minimalmedium konnte durch die Coomassiefärbung für alle drei Varianten keine spezifische Bande im *E.coli*-Lysat detektiert werden, die Reinigung über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie führte jedoch für alle drei Varianten zu einer vergleichbaren Anreicherung (Abb. 3.7.4).

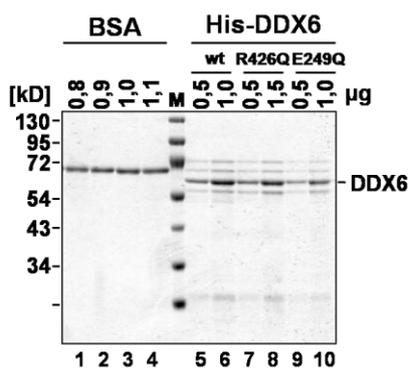


Abb. 3.7.4. Rekombinantes humanes DDX6 und die Proteinvarianten (E249Q) und (R426Q). Proteine nach Reinigung über NiNTA; 12% SDS-PAGE, Coomassiefärbung, Vergleich mit bekannten Mengen an BSA.

Das bei dem zu erwartenden Molekulargewicht für His-DDX6 von 57,5kD erscheinende Protein war durch weitere Proteine kontaminiert. Durch Quantifizierung der Bandenintensitäten konnte eine Anreicherung zu etwa 46% in der Protein-Präparation ermittelt werden.

Die Identität von DDX6 wurde im *Western Blot* überprüft, der gleichzeitig eine Abschätzung des DDX6-Levels in K562-Extrakten ermöglichte. Das endogene Wildtypprotein ohne His-Tag hat ein Molekulargewicht von 54kD (Abb. 3.7.5).

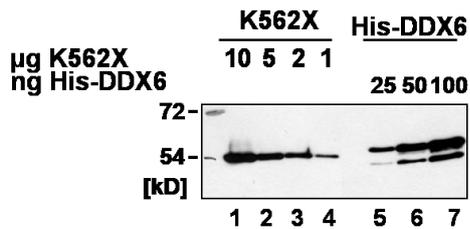


Abb. 3.7.5. Vergleich des rekombinanten His-DDX6 mit endogenem DDX6 aus K562-Extrakten
12% SDS-PAGE und *Western Blot*, Abschätzung der DDX6-Menge auf 0,5-1%.

Die DDX6-Menge in K562-Zellen wurde auf etwa 0,5-1% geschätzt, vorausgesetzt, die Affinität des DDX6-Antikörpers zu dem endogenen Protein wurde nicht durch posttranslationalen Modifikationen beeinflusst. Die etwas unterhalb His-DDX6 laufende Proteinbande konnte als Abbauprodukt des rekombinanten Proteins identifiziert werden. Die bei circa 70kD erscheinenden Banden (Abb. 3.7.4) sind wahrscheinlich *E.coli*-Proteine.

Die Präparation von DDX6 und der Varianten ermöglichte die Durchführung von UV-crosslink-Experimenten zur Untersuchung der RNA-Bindung des Proteins. Da es sich bei DDX6 um eine DEAD-box-Helikase handelt, wurden die Experimente in Anwesenheit von 0,5mM ATP durchgeführt. Zunächst wurde die DICE-Bindung des DDX6 und der Varianten im UV-crosslink überprüft und mit der von hnRNP K und eIF4A verglichen (Abb. 3.7.6). eIF4A ist ebenfalls eine DEAD-Box-Helikase, deren Bindung an RNA-Duplexe bereits gezeigt wurde. Die zu DDX6 (R426Q) äquivalente Mutation eIF4A (R362Q) verhindert die RNA-Bindung (Pause *et al.*, 1993). Als Kontrolle wurde die 3'UTR der erythroid-spezifischen $\alpha 2$ -Globin-mRNA eingesetzt. Diese 3'UTR wurde bereits in HeLa-Zell-Transfektions-Experimenten mit Luciferase-Reportern verwendet und führte im Gegensatz zur 3'UTR-Sequenz der Kaninchen-r15-LOX nicht zu einer verminderten Luciferase-Expression, wenn hnRNP K und hnRNP E1 cotransfiziert waren (Ostareck *et al.*, 1997). Die $\alpha 2$ -Globin-3'UTR ist, wie die r15-LOX-3'UTR sehr pyrimidin-reich und hnRNP E1/E2, jedoch nicht hnRNP K wurden als interagierende, regulatorische Proteine des sogenannten α -Komplexes beschrieben (Kiledjian *et al.*, 1995, Gebauer *et al.*, 2001).

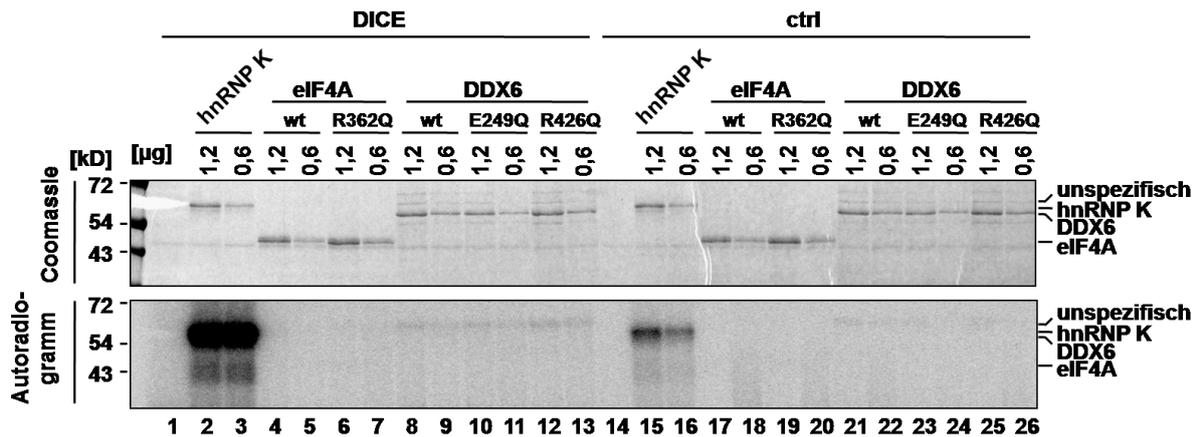


Abb. 3.7.6. UV-crosslink zu Überprüfung der DICE-Bindungsaktivität.

Je zwei Konzentrationen an hnRNP K, eIF4A, DDX6 und ihrer Proteinvarianten wurden mit je 200000cpm DICE oder Kontroll-RNA inkubiert und die gebildete RNA-Protein-Komplexe durch UV-Bestrahlung vernetzt. 12% SDS-PAGE, Colloidal-Coomassie-Färbung und Autoradiogramm

Die Bindung des eingesetzten hnRNP K an das DICE lag bereits im Sättigungsbereich (Abb. 3.7.6, Bahnen 2, 3) und durch die eingesetzten hohen Proteinkonzentrationen konnte auch die wenig spezifische Interaktion mit der $\alpha 2$ -Globin-mRNA-3'UTR detektiert werden (Bahnen 15, 16). Dennoch ließ sich weder für eIF4A (Bahnen 4-7) noch für DDX6 (Bahnen 8-13) eine RNA-Bindung nachweisen. Die Erklärung könnte in der einzelsträngigen Struktur der verwendeten RNA-Moleküle liegen. Bei 70kD bindet aus allen durch *E.coli*-Proteine verunreinigten DDX6-Präparationen ein Protein an das DICE und genauso an die Kontroll-RNA.

Ausgehend von der Hypothese, dass DDX6 durch die Interaktion mit hnRNP K oder hnRNP E1 zum DICE-abhängigen Translations-Regulations-Komplex rekrutiert wird, wurde im nächsten Experiment untersucht, ob die Anwesenheit von hnRNP K Einfluss auf den *crosslink* zwischen DDX6 und der DICE-RNA hat (Abb. 3.7.7). Dafür wurden dem Ansatz, der 1,2µg DDX6 enthielt, steigende Mengen an hnRNP K zugesetzt.

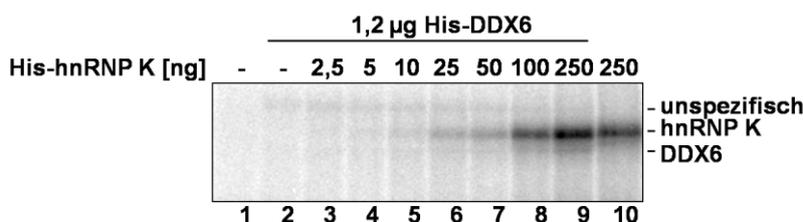


Abb. 3.7.7. UVcrosslink von DDX6 in Abhängigkeit von hnRNP K
je $2 \cdot 10^5$ cpm DICE-RNA; 8% SDS-PAGE, Autoradiographie

Die Intensität des unspezifischen *crosslink*-Produktes verringerte sich mit steigender hnRNP K-Konzentration (Abb. 3.7.7), während sich nach der Zugabe von 250ng hnRNP K auf Höhe von DDX6 ein Produkt detektieren ließ (Bahn 9), welches in Abwesenheit von DDX6 nicht nachzuweisen war (Bahn 10). Die eng benachbarten Signale von His-DDX6 und His-hnRNP K und die hohe Affinität von hnRNP K zum DICE, die in einer hohen Signal-Intensität resultierte, erschwerten die Interpretation. Die Intensität des hnRNP K-*crosslinks* erschien in Anwesenheit von DDX6 verstärkt (Abb. 3.7.7, vergl. Bahn 9 und 10).

Um zu prüfen, ob die Interaktion zwischen DDX6 und hnRNP K tatsächlich zu Vernetzung von DDX6 mit dem DICE führte und die DICE-Bindung von hnRNP K verstärkte, wurde das Experiment in Anwesenheit von GST-hnRNP K wiederholt (Abb. 3.7.8). Gleichzeitig wurden auch die DDX6-Varianten (E249Q) und (R426Q) eingesetzt.

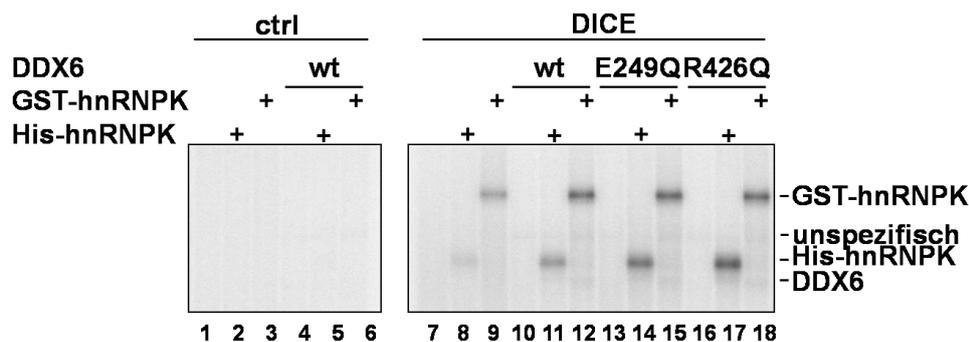


Abb. 3.7.8. UVcrosslink zur Analyse der DICE-Bindungsaktivität von hnRNP K in Anwesenheit von DDX6.

je 1,2µg DDX6 und 200ng His-hnRNP K bzw. 300ng GST-hnRNP K; $2 \cdot 10^5$ cpm DICE oder Kontroll (ctrl)-RNA; 10% SDS-PAGE, Autoradiographie

In diesem Experiment konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Anwesenheit von hnRNP K zur Bildung eines *crosslink*-Produktes auf Höhe von DDX6 führte, unabhängig vom Affinitäts-*tag* oder den eingeführten Mutation, die die Proteinvarianten trugen (Ab. 3.7.8, Bahnen 11, 12, 14, 15, 17, 18). Ebenso wenig wie auf die Bildung eines DDX6-*crosslink*-Produktes hatten die DDX6-Mutationen Einfluss auf die Stabilisierung der Interaktion von hnRNP K mit dem DICE, die erneut in Gegenwart von DDX6 detektiert wurde. Das unspezifische *crosslink*-Produkt bildete sich in allen DDX6-Präparationen unabhängig der verwendeten RNA.

Um den Effekt der Stabilisierung der DICE-Interaktion von hnRNP K durch DDX6 zu prüfen und die Höhe der Proteinkonzentration im Reaktionsansatz (1,2µg DDX6) als hnRNP K-

stabilisierende Ursache ausschließen zu können, sowie um den Effekt von hnRNP E1 auf die Bildung eines *crosslink*-Produktes zwischen dem DICE und DDX6 zu testen, wurde das nächste Experiment in An- und Abwesenheit von BSA, GST-hnRNP K, His-hnRNP K, His-hnRNP E1, einer Kombination von hnRNP K und hnRNP E1 im Verhältnis von 3:1 und DDX6 durchgeführt (Abb. 3.7.10). Alle vier Proteine sind im Coomassie-gefärbten SDS-Gel in Abbildung 3.7.9 dargestellt.

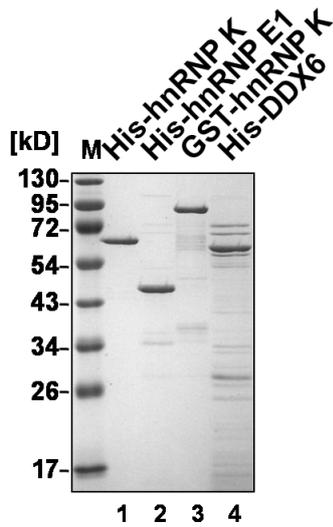


Abb. 3.7.9. Die im UV*crosslink* eingesetzten Proteine
12% SDS-PAGE, Coomassiefärbung

Das in Abbildung 3.7.10 dargestellte Experiment wurde als Parallelansatz durchgeführt. Nach der Inkubation der radioaktiven RNA mit den Proteinen wurde vor der UV-Bestrahlung Heparin zugefügt; die Reihenfolge, in der die Ansätze pipettiert wurden, ist hierbei gegenläufig, um auszuschließen, dass die Dauer der Heparin-Inkubation im Bindungsansatz einen Einfluss auf die detektierten Signal-Intensitäten hat.

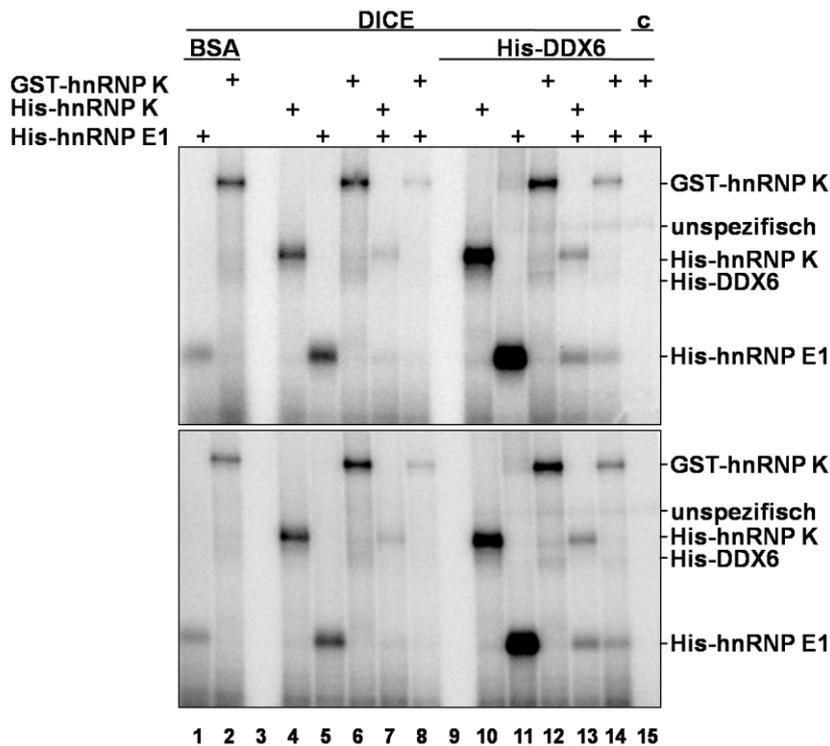


Abb. 3.7.10. UVcrosslink von hnRNP K, hnRNP E1 und DDX6.

je 3,7pmol hnRNP K bzw. hnRNP E1. Bahn1, 5, 11: 150ng His-hnRNP E1, Bahn 2, 6, 12: 300ng GST-hnRNP K, Bahn 4, 10: 200ng His-hnRNP K, Bahn 7, 13: 75ng His-hnRNP E1 und 100ng His-hnRNP K; Bahn 8 und 14, 15: 75ng His-hnRNP E1, 150ng GST-hnRNP K. 22pmol His-DDX6 (1,2µg)
10% SDS-PAGE. Autoradiographie: c= Kontroll-RNA

DDX6 hatte in allen Ansätzen einen positiven Einfluss auf die Interaktion von hnRNP K und hnRNP E1 mit der DICE-RNA (Abb. 3.7.10, Bahnen 10-14). Der Zusatz von BSA hatte diesen Einfluss nicht (Bahnen 1, 2). Bei Zugabe von hnRNP E1 ließ sich das Produkt auf Höhe von DDX6 nicht detektieren. Es kann demnach angenommen werden, dass durch die Interaktion von DDX6 mit hnRNP K die DICE-RNA derart in räumliche Nähe gebracht wurde, dass eine Quervernetzung zwischen DDX6 und der RNA ermöglicht war. Die Einführung der postulierten RNA-bindungsdefizienten Mutation (R426Q) sollte diese Quervernetzung verhindern, wenn es sich hierbei um eine klassische RNA-Protein-Interaktion handelte, was nicht der Falle war. Die eine Quervernetzung ermöglichende Konstellation wurde offensichtlich bei der Interaktion von DDX6 mit hnRNP E1 nicht erreicht, da sich auf der Höhe von DDX6 kein *crosslink*-Produkt detektieren ließ.

Das *DEAD-Box*-Protein DDX6, im humanen Organismus auch p54 oder Rck genannt, wurde durch eine Kombination aus GRNA-Chromatographie und Immunopräzipitation als Interaktionspartner des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes in K562-Zell-Extrakten identifiziert. Seine mögliche Funktion in der r15-LOX-Translation-Regulation wurde durch RNAi und

Immunofluoreszenz-Färbung gezeigt. Ob die in der massenspektrometrischen Analyse detektierte Interaktion von DDX6 mit dem hnRNP K/E1-DICE-Komplex auf einer direkten DICE-Bindung von DDX6 beruht, wird derzeit durch weiterführende Untersuchungen analysiert (Isabel Naarmann). Zumindest in UV-*crosslink*-Experimenten konnte in dieser Arbeit keine direkte DICE-Bindung detektiert werden. Die im GST-*pulldown* detektierte Wechselwirkung von DDX6 mit hnRNP K und hnRNP E1 hatte in UV-*crosslink*-Experimenten einen stabilisierenden Effekt auf die DICE-Bindung der rekombinanten Proteine hnRNP K und hnRNP E1.

4. DISKUSSION UND AUSBLICK

Die Regulation der Gen-Expression auf Ebene der mRNA-Translation ist in eukaryotischen Zellen von wesentlicher Bedeutung und besonders dann essentiell, wenn die Transkription inhibiert ist, wie es z.B. während der frühen Entwicklung der Fall ist. Während der erythroiden Reifung wird der Zellkern der Erythroblasten abgebaut bzw. ausgeschleust (Zucker-Franklin *et al.*, 1988), bevor der im Blut zirkulierende kernlose Retikulozyt weiterreift. Da auch hier Transkription nicht mehr stattfinden kann, wird die Synthese einiger Proteine auf der Ebene der Translation reguliert, so die der r15-LOX. Die KH-Domänen-Proteine hnRNP K und hnRNP E1 binden das DICE in der 3'UTR der r15-LOX-mRNA, was zur Translations-Inhibition führt (Ostareck *et al.*, 1997, 2001). Mit der vorliegenden Arbeit konnte ein Beitrag zur weiteren Aufklärung des Regulationsmechanismus der r15-LOX-Synthese geleistet werden.

Die Phosphorylierung von Y458 in hnRNP K durch c-Src beeinflusst die DICE-Bindung

Im reifen Retikulozyten wird die r15-LOX-mRNA-Translation aktiviert. Die r15-LOX initiiert durch die Dioxygenierung der Phospholipide den Mitochondrienabbau im reifen Retikulozyten (Schewe *et al.*, 1986; Rapoport und Schewe, 1986).

hnRNP K interagiert mit der Tyrosinkinase c-Src und aktiviert die Kinase über die prolinreichen Domänen. Aktives c-Src phosphoryliert hnRNP K und diese Phosphorylierung inhibiert die DICE-Bindung von hnRNP K (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Adolph *et al.*, 2007). hnRNP E1 ist weder Aktivator noch Substrat von c-Src und enthält im Vergleich zu hnRNP K keine prolinreichen Domänen zwischen der zweiten und dritten KH-Domäne. Sechs der in hnRNP K gelegenen 17 Tyrosine wurden in massenspektrometrischen Analysen als c-Src-Substrate identifiziert, doch das Tyrosin, dessen Phosphorylierung die DICE-Bindung reguliert, wurde bei dieser Analyse nicht identifiziert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die DICE-Bindung der isolierten KH-Domänen von hnRNP K konnte in UV-crosslink-Experimenten der KH3 zugeordnet werden (Harnisch, 2004; Messias *et al.*, 2006). In dieser befindet sich C-terminal gelegen das Tyrosin 458 (Y458). Der phospho-mimetische Austausch von Y458 zu Aspartat reduzierte die DICE-Bindung der isolierten KH3 in *North-Western-Blot*-Experimenten (Abb. 3.1.1) und des Gesamtproteins hnRNP K im UV-crosslink (Abb. 3.1.4). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Y458 ein Substrat von c-Src ist und dessen Phosphorylierung die DICE-Bindung im *North-Western-Blot* drastisch reduziert (Abb.

3.1.2). Dieser Effekt konnte ebenso in NMR-Studien unter Verwendung der KH3 und der Variante KH3(Y458) und kurzen RNA-Substraten (sDICE: ucccaaa) bestätigt werden (Messias *et al.*, 2006).

Der Vergleich der chemischen Verschiebungen im ^1H , ^{15}N -HSQC-Spektrum von KH3 und KH3(Y458D) in Ab- und Anwesenheit des kurzen sDICE-Substrates zeigte vor allem im C-terminalen Bereich der Aminosäuren 451-463 deutliche Unterschiede, aber auch im Bereich der Aminosäuren 399-410, welche der ersten und zweiten α -Helix und dem KH-Domänen-typischen GXXG-loop entsprechen. Die Unterschiede innerhalb des Peptidrückgrades sind in der auf Kristallstruktur-Analysen basierenden dreidimensionalen Struktur der KH-Domäne 3 dargestellt (Abb. 4.1b, Messias *et al.*, 2006). Die Mobilität des Peptidrückgrades der KH3 und KH3(Y458D) in freiem Zustand und in Gegenwart des kurzen sDICE-Substrates (ucccaaa) wurde zusätzliche im $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -heteronukleären NOE-NMR-Spektrum analysiert. Diese Spektren zeigten, dass gerade die dritte α -Helix der KH3 und der C-Terminus nach der RNA-Bindung weniger flexibel war, während bei der KH3(Y458D) die Flexibilität insgesamt erhöht schien und weniger durch die Anwesenheit des sDICE-Substrates beeinflusst war (Messias *et al.*, 2006). Auch hierfür sind die Bereiche der größten Unterschiede innerhalb des Peptidrückgrades dargestellt (Abb. 4.1c). Durch die Einführung der negativen Ladung in KH3(Y458D) zeigt der C-Terminus der KH-Domäne 3 eine erhöhte Flexibilität, worin die Ursache der verminderten DICE-Bindung liegen kann.

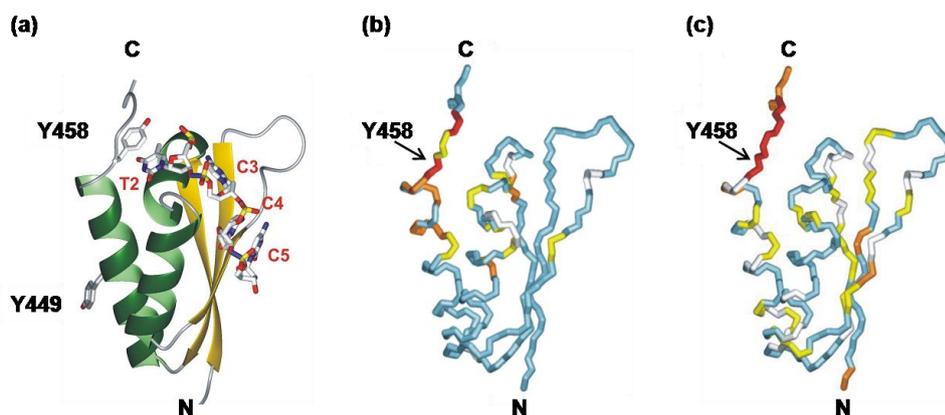


Abb. 4.1. Die KH3-Domäne von hnRNP K im Komplex mit Nukleinsäure

a) Kristall-Struktur der KH3 im Komplex mit einzelsträngiger DNA der Sequenz ctccc (aus Backe *et al.*, 2005); nur tccc sind gezeigt, Y449 und Y458 sind eingezeichnet.

b) Die absolute Differenzen der chemischen Verschiebungen zum Vergleich der KH3 und KH3(Y458D) im Komplex mit sDICE-RNA der Sequenz ucccaaa im ^1H , ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum sind als Farbdigramm dargestellt. weiß, blau, gelb, orange und rot repräsentieren die Unterschiede von 0 bis 0,4ppm

c) Die absolute Differenzen der heteronukleären NOE-Spektren zum Vergleich der KH3 und KH3(Y458D) im Komplex mit sDICE-RNA im $\{^1\text{H}\}$ - ^{15}N -HSQC-NMR-Spektrum sind als Farbdigramm dargestellt. weiß, blau, gelb, orange und rot repräsentieren die Unterschiede von 0 bis 0,5.

(aus Messias *et al.*, 2006)

In NMR-Titrations-Experimenten wurde der K_D -Wert der Interaktion der KH-Domäne 3 von hnRNP K mit dem sDICE auf $1,8\mu\text{M}$ bestimmt (Backe *et al.*, 2005). Die Einführung des (Y458D)-Aminosäureaustausches erhöhte diesen auf $5,7\mu\text{M}$ (Messias *et al.*, 2006). Die im *North-Western-Blot* detektierte drastische Reduktion der DICE-Bindung von KH3(Y458D) im Vergleich zu KH3 (Abb. 3.1.1 und 3.1.2) könnte in der Natur des Experimentes liegen. Die RNA-Bindung wird auf einer Membran detektiert, welche mehrfach gewaschen wird und stellt damit die Komplexbildung aus Protein und RNA außerhalb des Gleichgewichtes dar. Im *UV-crosslink*-Experiment hingegen findet die Komplexbildung in Lösung statt und es kann sich ein chemisches Gleichgewicht einstellen. Die Quantifizierung der Komplex-Signale aus hnRNP K bzw. hnRNP K(Y458D) und dem DICE (Abb.3.1.4) zeigt eine durch den Aminosäureaustausch verursachte Reduktion der DICE-Bindung um den Faktor 4.

Die durch NMR-Titration ermittelten K_D -Werte liegen im mikromolaren Bereich und damit weit über denen für das Gesamtprotein in Filterbindungs-Experimenten ermittelten, welche im Bereich von $0,1\text{nM}$ liegen (Moritz, unpubliziert). Dies könnte zum einen in der Verwendung des 7nt kurzen sDICE-Substrates begründet liegen, welches eine geringere Affinität als die translations-inhibitorisch aktiven Sequenzen 2R oder 10R besitzen sollte. Es ist zusätzlich möglich, dass im Gesamtprotein hnRNP K die DICE-Bindung der KH-Domäne 3 stabilisiert wird und dass auch die KH-Domänen 1 und 2 zur RNA-Bindung beitragen.

Trotz der Unterschiede der Methoden NMR-Titration und *UV-crosslink* reduziert der Aminosäure-Austausch (Y458D) in der KH3 von hnRNP K die DICE-Bindung in beiden Experimenten um etwa den gleichen Faktor. Dieser Effekt auf die RNA-Bindung bestätigt die wichtige Funktion der KH3 für die DICE-Bindung des Gesamtproteins und identifiziert Y458 als für die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation relevant. Die funktionale Relevanz des Y458 als das für die DICE-Bindung wichtige Substrat von c-Src konnte durch *in vitro*-Translations-Experimente in Retikulozytenlysat bestätigt werden (Abb. 3.1.5).

Cytoplasmatische MEL- und K562-Extrakte rekapitulieren die DICE-abhängige Translations-Inhibition

Zur Isolation von translations-inhibierten mRNPs, welche sich an einer DICE-enthaltenden mRNA bilden, waren zunächst die Etablierung eines erythroiden Zellsystems und die Charakterisierung daraus gewonnener cytoplasmatischer Extrakte in Translations- und Translations-Initiations-Experimenten notwendig. Murine Erythroleukämie (MEL)-Zellen

konnten durch die Zugabe von HMBA zur erythroiden Reifung angeregt werden und zeigten im Verlauf der Reifung reduzierte Proteinlevel von hnRNP K, hnRNP E1 und PRMT1 (Abb. 3.1.4). Diese Reduktion des Protein-Gehaltes war nicht im gleichen Ausmaß wie in aus Kaninchen isolierten Retikulozyten und Erythrozyten zu detektieren (vergl. Abb. 1.7.1). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass in den MEL-Zellen keine vollständige Reifung stattgefunden hat.

Extrakte aus MEL-Zellen wurden bezüglich der DICE-abhängigen Translations-Inhibition in *in vitro*-Translations-Experimenten untersucht und rekapitulieren die Daten aus früheren Translations-Experimenten in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat vollständig: Trägt eine Reporter-mRNA ein DICE in der 3'UTR, so wird ihre Translation inhibiert. Diese Inhibition ist auf die reduzierte Bildung von 80S-Komplexen zurückzuführen, da in Gegenwart steigender GMP-PNP-Konzentrationen in *in vitro*-Translations-Initiations-Experimenten die Bildung von 48S-Initiations-Komplexen nicht reduziert wurde (vergl. 3.3). Diese Translations-Daten bestätigen das Modell des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Mechanismus. In Translationsexperimenten unter der Verwendung von IRES-Elementen und Translations-Initiations-Experimenten in Retikulozyten-Lysat und durch *Toe-Print*-Experimente konnte gezeigt werden, dass die Translation DICE-tragender mRNAs durch die Blockierung der Assemblierung von 60S-ribosomalen Untereinheiten zum 48S-Initiations-Komplex inhibiert wird (vergl. Einleitung). Allerdings wurden hierfür die rekombinanten Proteine hnRNP K und hnRNP E1 zugegeben (Ostareck *et al.*, 1997, 2001). Nun war es möglich, den DICE-abhängigen translations-inhibitorischen mRNP-Komplex an zugebenen Reporter-mRNAs direkt in MEL-Extrakten zu bilden und zu detektieren. Der MEL-Extrakt-Gehalt an hnRNP K wurde auf 0,5% des Gesamtproteinmasse, der von hnRNP E1 auf 0,1% geschätzt. Für Erythroblasten bzw. Retikulozyten wurde er nicht bestimmt.

Humane K562-Zellen repräsentieren das Proerythroblasten-Stadium (Anderson *et al.*, 1979) und enthalten im Gegensatz zu den MEL-Zellen eine endogene hr15-LOX-mRNA. Die 3'UTR-Sequenz der humanen r15-LOX-mRNA enthält 4 DICE-*repeats* und konnte nach Zugabe von LOX-BP in Kaninchen-Retikulozyten-Lysat die Repression der Translation vermitteln (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Das hr15-LOX-Protein konnte im *Western Blot* und im enzymatischen Aktivitätstest erst an Tag sechs und acht der induzierten Reifung nachgewiesen werden und die hr15-LOX-Expression ist in K562-Zellen post-transkriptional reguliert (Naarmann *et al.*, 2008). Durch RNAi gegen hnRNP K und hnRNP E1 in K562-Zellen konnte die Synthese des engogenen hr15-LOX-Proteins induziert werden.

Aus K562-Extrakten wurden cytoplasmatische Extrakte generiert und bezüglich der Translation von CAT-Reporter-mRNAs untersucht. Hier zeigte sich, dass die Translation einer DICE-enthaltenden mRNA inhibiert wurde, ohne das hnRNP K oder hnRNP E1 zugegeben wurden. Die humane r15-LOX-3'UTR verursachte ebenso die Translations-Inhibition der Reporter-mRNA in K562-Extrakten, wenn auch nicht im gleichen Ausmaß wie das Kaninchen-DICE (Abb. 3.4.1). Hierfür könnten eine Reihe von Ursachen verantwortlich sein: Zum einen besteht das DICE aus Kaninchen auch 10 CU-reichen Sequenz-Elementen, die humane 3'UTR enthält nur vier dieser Elemente (vergl. Abb. 1.4.1). Weiterhin steht die zugegebene CAT-hL3'-mRNA in Konkurrenz mit der endogenen humanen r15-LOX-mRNA in den K562-Extrakten um Komplex-Komponenten. Zusätzlich enthalten K562-Zellen die c-Src-mRNA, deren 3'UTR von hnRNP K gebunden wird und translational inhibiert ist. Zur Induktion der hr15-LOX-Synthese in K562-Zellen war ein siRNA-vermittelter hnRNP K-hnRNP E1-Doppel-*knock-down* notwendig. Dahingegen führte der *knock down* von hnRNP K, nicht jedoch der von hnRNP E1 zur Synthese von c-Src, die Translation der c-Src-mRNA wird also auch durch hnRNP K reguliert (Naarmann *et al.*, 2008). Darüberhinaus enthalten K562-Zellen die α -Globin-mRNA, deren 3'UTR hnRNP E1 und hnRNP E2 binden (Kiledjian *et al.*, 1995). Die exogen zugebenen CAT-mRNAs konkurrieren also mit mehreren endogenen mRNAs um die regulatorischen Proteine. Da im gemessenen Konzentrations-Bereich keine Schwankungen der Repressions-Effizienz zu detektieren waren (Abb. 3.4.3), konnte geschlossen werden, dass sich am Kaninchen-DICE, welches mindestens zehn Bindestellen für hnRNP E1 bietet (Reimann *et al.*, 2002), ein effizienterer inhibitorischer Komplex bildet. Bestätigt wurden diese Schlussfolgerungen durch Untersuchungen zur Komplexzusammensetzung in Saccharose-Gradienten, welche zeigten, dass ein großer Anteil der endogenen Proteine hnRNP K und hnRNP E1 in den sehr leichten Fraktionen 19 und 20 und somit vermutlich frei verfügbar vorliegen (Abb. 3.4.12). Daher wurde für weitere Untersuchung und zur Isolation des Komplexes die Kaninchen-DICE-Sequenz verwendet. In Translations-Initiations-Experimenten mit K562-Extrakten konnte gezeigt werden, dass das DICE in der 3'UTR der verwendeten mRNA die Bildung von 80S-Ribosomen, nicht jedoch die von 48S-Initiations-Komplexen beeinträchtigt (Abb. 3.4.7-9). Die Analyse der Proteine in den einzelnen Gradientenfraktionen zeigten eindeutig, dass bei Zugabe der DICE-enthaltenden mRNA hnRNP K und hnRNP E1 so stabil mit der mRNA assoziieren, dass sie in die schweren Fraktionen sedimentieren, wobei die Proteine nun vorwiegend in den *Peak*-Fraktionen der RNPs und der 48S-Komplexe, welche sich mit der Reporter-mRNA bilden, nicht jedoch in den 80S-Fraktionen zu detektieren waren (Abb. 3.4.12).

Die vollständige Rekapitulation des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Mechanismus in K562-Extrakten, die stabile Assoziation von hnRNP K und hnRNP E1 mit DICE-enthaltenden mRNAs und der eindeutige Zusammenhang zwischen der Expression von hnRNP K und hnRNP E1 in den Zellen mit der Repression der endogenen r15-LOX-mRNA-Translation stellten die Voraussetzung für die Isolation des inhibitorischen Komplexes durch RNA-Affinitätsreinigung dar.

Die induzierte K562-Reifung beeinflusst die DICE-abhängige Translations-Repression

Die durch Natriumbutyrat induzierte erythroide Reifung von K562-Zellen führte zur Abnahme des Gehaltes von hnRNP K und hnRNP E1 im Extrakt auf unter 50% (Abb. 3.4.14 und Naarmann *et al.*, 2008). Am sechsten und achten Tag der induzierten Reifung konnte die endogene hr15-LOX nachgewiesen werden (Naarmann *et al.*, 2008), was mit dem Befund konsistent ist, dass die mRNA nun vorrangig in 80S-Fraktionen zu detektieren war (Abb. 3.6.6).

Ein Vergleich der *in vitro*-Translation in Extrakten aus nicht-induzierten K562-Zellen und am achten Tag der Induktion zeigte eine Derepression der DICE-abhängigen Translations-Inhibition (Abb. 3.4.10 und 3.4.12). Dafür lassen sich zwei Ursachen finden: zum einen die Abnahme der Konzentration von hnRNP K und hnRNP E1 (Abb. 3.4.14 und Naarmann *et al.*, 2008), zum anderen die Phosphorylierung von hnRNP K während der induzierten Reifung, die durch *Western Blot*-Analyse von immunpräzipitiertem hnRNP K nachgewiesen wurde. Es ist davon auszugehen, dass diese Phosphorylierung durch das in späten K562-Reifungsstadien exprimierte c-Src vermittelt wird (Naarmann *et al.*, 2008). hnRNP E1 ist weder Aktivator noch Substrat von c-Src (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Sequenz-Homologie zwischen hnRNP E1 und hnRNP E2 ist sehr hoch: 82% der Aminosäuren sind identisch. In *yeast two hybrid*- und *GST-pulldown*-Experimenten wurde gezeigt, dass hnRNP K und hnRNP E2 homo- und hetero-oligomerisieren (Kim *et al.*, 2000). Ausgehend davon wurde vermutet, dass eine direkte Interaktion von hnRNP E1/E2 mit hnRNP K bewirkt, dass die Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K auch die Dissoziation von hnRNP E1 vom DICE als Proteinkomplex verursacht und damit die r15-LOX-mRNA-Translation aktiviert wird (Ostareck-Lederer und Ostareck, 2004).

Einige Befunde sprechen gegen diese Hypothese: Die Interaktion zwischen hnRNP E1 und hnRNP K müsste eine sehr geringe Dissoziationskonstante aufweisen, um mit der hochaffinen DICE-Bindung von hnRNP E1 konkurrieren zu können. In Co-Präzipitations-Experimenten

konnten jedoch keine hochaffine direkte Interaktion beider Proteine detektiert werden: GST-hnRNP K präzipitierte weder endogenes hnRNP K oder hnRNP E1 aus K562-Extrakten, ebensowenig GST-hnRNP E1 (Abb.3.4.6, Bahnen 11 und 12). Eine Interaktion konnte erst nach DICE-Zugabe detektiert werden (Bahnen 7, 8, 15, 16). Auch in hnRNP K-Immunopräzipitationen konnte hnRNP E1 weder im *Western Blot* noch in massenspektrometrischen Analysen nachgewiesen werden (Naarmann, unpubliziert).

Bei einer direkten physikalischen Protein-Protein-Interaktion zwischen hnRNP K und hnRNP E1 bzw. einer Homooligomerisierung der Proteine würde man auch von einer Kooperativität der RNA-Bindung ausgehen können. In Fluoreszenztitrations-Experimenten mit rekombinanten gereinigten Proteinen und DNA-Oligonukleotiden die dem zweifach-repetitiven Elements des DICE entsprechen, konnte keine Kooperativität der DICE-Bindung detektiert werden (Moritz, unpubliziert).

Die Analyse der Verteilung von hnRNP K und hnRNP E1 in Gradientenfraktionen von Translations-Initiations-Experimenten unter Verwendung einer 3'UTR-DICE-enthaltenden mRNA zeigte, dass beide Proteine in den gleichen Fraktionen vorlagen wie die mRNA. Die relative Verteilung dieser Proteine veränderte sich bei Verwendung von Extrakten aus für acht Tage induzierten K562-Zellen (Abb. 3.4.12). Dies konnte noch durch die Quantifizierung der *Western-Blot*-Signale verdeutlicht werden (Abb. 3.4.13) und ist ein Hinweis darauf, dass die zu erwartende Dissoziation eines Anteils von hnRNP K vom DICE dazu führte, dass nun ein größerer Anteil an hnRNP E1 assoziieren konnte.

Die massenspektrometrische Analyse des durch GRNA und Immunpräzipitation aus K562-Extrakten isolierten DICE-enthaltenden mRNA-Protein-Komplexes

Zur massenspektrometrische Analyse der Zusammensetzung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Komplexes wurde die GRNA-Affinitäts-Reinigung angewendet und mit der Immunpräzipitation des angereicherten hnRNP K kombiniert. Die Anpassung der GRNA-Reinigung an das benötigte System führte zur DICE-spezifischen Anreicherung von hnRNP K und E1, und, wie sich in der Massenanalysen ergab, auch von hnRNP E2. Insgesamt wurden sechs Peptide identifiziert, die beiden Proteinen, hnRNP E1 und hnRNP E2, zuzuordnen sind, sechs weitere Peptide waren hnRNP E1-spezifisch und neun Peptide eindeutig hnRNP E2 zuzuordnen. Das ursprünglich bei der Analyse DICE-bindender Proteine gefundene, hnRNP E1-spezifische Peptid (IITLTGPTNAIFK, aa58-70, Ostareck *et al.*, 1997)

war nicht darunter. Für beide Proteine, hnRNP E1 und E2, waren die *Scores*, also die Wahrscheinlichkeit der Übereinstimmung der experimentell ermittelten Massen und der Datenbank-Sequenzen, vergleichbar. Das stellt jedoch noch kein direktes Maß für die Anreicherung der Proteine in den Proben dar. Die Überprüfung der DICE-spezifischen Anreicherung von hnRNP E2 durch die GRNA im *Western Blot* konnte zeigen, dass hnRNP E2 im gleichem Maße wie hnRNP E1 an der DICE-tragenden mRNA im K562-Extrakt angereichert wurde (Abb. 3.5.13). Rekombinantes hnRNP E2 war in der Lage, r15-LOX-mRNA-Translationsinhibition *in vitro* zu vermitteln (Ostareck-Lederer *et al.*, 1998).

Beide Proteine, hnRNP E1 und hnRNP E2 wurden als Komponenten des α -Komplexes beschrieben, welcher sich an der $\alpha 2$ -Globin-mRNA bildet. Die 109nt lange 3'UTR der $\alpha 2$ -globin-mRNA enthält einen pyrimidinreichen Sequenz-Abschnitt, an welchem sich durch die Bindung von hnRNP E1/E2 der sogenannte α -Komplex bildet (Kiledjian *et al.*, 1995). Die Assoziation von hnRNP K mit dem α -Komplex wurde aufgrund einer geringeren Anreicherung an poly(rC) ausgeschlossen (Kiledjian *et al.*, 1995). Die α -Komplex-Bindesequenz konnte durch ihre RNase-Resistenz spezifiziert werden: die 42nt lange sogenannte *protected region* (PR; nt 29-70, Holcik und Liebhaber, 1997) enthält die für die Bildung des α -Komplexes *in vitro* notwendige minimale Bindungssequenz und die Zielsequenz einer in erythroiden Zellen angereicherten Endonuklease (*erythroid-enriched endonuclease*, ErEN) (Wang und Kiledjian, 2000). Die Bildung des α -Komplexes verhindert die durch endonucleolytischen Angriff der ErEN verursachte Degradation der $\alpha 2$ -globin-mRNA.

Die direkte Interaktion der rekombinanten Proteine hnRNP E1 und hnRNP E2 mit der $\alpha 2$ -globin-mRNA-3'UTR wurden in Interaktions-Experimenten gezeigt (Chkheidze *et al.*, 1999). Der Effekt dieser 3'UTR auf die Expression von Reporter-Konstrukten wurde in HeLa-Zell-Transfektions-Experimenten mit dem DICE verglichen. Trotz der zu erwartenden Bindung von hnRNP E1 an diese 3'UTR konnte keine Inhibition der Reporter-Expression detektiert werden (Ostareck *et al.*, 1997).

In *Yeast-two-hybrid*- und *GST-pulldown*-Experimenten konnten AUF-1 (hnRNP D) und PABPC als Interaktionspartner von hnRNP E1 und E2 identifiziert werden (Kiledjian *et al.*, 1997; Wang *et al.*, 1999). AUF-1 konnte durch *Western-Blot*-Analysen als Bestandteil des aus einem nativen Gel gereinigten α -Komplexes nachgewiesen werden (Kiledjian *et al.*, 1997), jedoch bleibt seine Funktion als Bestandteil des α -Komplexes unklar. Die Interaktion von hnRNP E1/E2 mit PABPC erhöht die Affinität sowohl von hnRNP E1/E2 zur $\alpha 2$ -globin-3'UTR, als auch die von PABPC zum poly(A)-Schwanz der mRNA, was eine verminderte

Deadenylierung bewirken und zur Stabilisierung der mRNA führen sollte (zusammengefasst in Waggoner und Liebhaber, 2003).

Weder AUF-1 noch PABPC wurden in der DICE-spezifischen GRNA angereichert, obwohl hnRNP E1 und hnRNP E2 gleichermaßen gebunden hatten (Tab. 3.5.1).

Von den als potentielle Interaktionspartner des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Komplexes identifizierten Proteinen wurde nur ein Teil in sich anschließenden Experimenten näher untersucht. hnRNP U und hnRNP L wurden bereits als Interaktionspartner von hnRNP K beschrieben (Kim *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2002). Ihre Interaktion mit dem hnRNP K/E1-DICE-Komplex wurde im Rahmen dieser Dissertation nicht weiter untersucht.

Die Interaktion mit den identifizierten Untereinheiten des nukleären *Cap-binding*-Komplexes wurde nicht näher untersucht, da anzunehmen war, dass die Lokalisierung des translations-inhibierten r15-LOX-mRNPs cytoplasmatisch ist und die Anreicherung nukleärer Komponenten im cytoplasmatischen Extrakt als Kontamination eingestuft werden kann.

Komponenten des Exosoms oder die Exonuklease Xrn2 sind an mRNA-Abbauprozessen beteiligt. Xrn2 ist die wichtigste 5'-3' Exonuklease in humanen Zellen (Zhang *et al.*, 1999; Lejeune *et al.*, 2003). Sie sollten keine relevante Funktion in der r15-LOX-mRNA-Translationskontrolle aufweisen, da die Reporter-mRNAs aus Translations-Experimenten isoliert werden konnten, ohne dass man einen DICE- oder hnRNP K/E1-spezifischen Effekt auf die RNA-Stabilität bzw. deren Translatierbarkeit detektieren konnte (Abb. 3.4.5, Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; Ostareck *et al.*, 1997).

Zur Gewinnung der cDNA von eIF3B, eIF4AII, DDX6, DDX17, G3BP1, Musashi-homolog 2, rpL12, rpS19, p30DBC und Destrin aus K562-Zell-Gesamt-RNA durch RT-PCR wurden Oligonukleotidprimer genutzt. PCR-Produkte mit dem erwarteten Molekulargewicht konnten mit Ausnahme von p30DBC für alle aufgelisteten Kandidaten erhalten werden und die resultierenden cDNAs können nun für die Klonierung in *E.coli*-Expressions-Vektoren oder in Plasmide zur Transfektion eukaryontischer Zell-Linien genutzt werden. Die Klonierung der cDNAs war für DDX6, msi2 und G3BP1 erfolgreich

Die DICE-spezifischen Reinigung führte zur Identifizierung des Translations-Initiationsfaktors eIF3B. Seine Anreicherung ist wahrscheinlich auf die Reinigungsbedingungen zurückzuführen, da in *GST-pulldown*-Experimenten keine Interaktion mit den rekombinanten Proteinen zu detektieren war (Abb. 3.6.4). Es ist also anzunehmen, dass eIF3B nur unter Translationsbedingungen über die mRNA-Bindung während der Initiationsphase indirekt mit dem hnRNP K/E1-DICE-Komplex interagiert.

Die Interaktion von hnRNP K und hnRNP E1 mit rpS19 erfolgt im *GST-pulldown*-Experiment auch unter Bedingungen, die nicht die Translations-Initiation fördern. Allerdings war sie durch die Zugabe von Kompetitor-RNA oder durch RNase-Verdau aufgehoben. Dies deutet darauf hin, dass die Interaktion dieser Proteine durch die unspezifische Bindung von hnRNP K oder hnRNP E1 an endogene mRNAs vermittelt wurde, welche mit Ribosomen assoziiert im cytoplasmatischen Extrakt vorlagen (Abb. 3.6.4).

G3BP1 und DDX6 interagierten im *GST-pulldown*-Experiment RNA-unabhängig mit hnRNP K und hnRNP E1. G3BP1 ist in verschiedenen biologische Prozessen mit unterschiedlichen Funktionen beschrieben (Tab. 4.1; übernommen aus Irvine *et al.*, 2004).

Tab. 4.1: Zusammenfassung der biologischen Prozesse, an denen G3BP1 beteiligt ist.
aus Irvine *et al.*, 2004; modifiziert

| Biologie | Bemerkung | Organismus/Zell-Linie | Referenz |
|-------------------------------|---|---|--|
| RNA-Metabolismus | Interaktion von G3BP1 mit der c-myc-mRNA | Säuger-Zell-Linien | Gallouzi <i>et al.</i> , 1998 Tourriere <i>et al.</i> , 2001 |
| | Interaktion von G3BP1 mit der Tau-mRNA | P19-Zellen | Atlas <i>et al.</i> , 2004 |
| | Effekt von G3BP1, IMP1 und HuD auf die Tau-mRNA-Translation | HEK-293 | Atlas <i>et al.</i> , 2007 |
| | G3BP1-Aktivität als RNA- und DNA-Helikase | HeLa-Zellen | Costa <i>et al.</i> , 1999 |
| | Assoziation von G3BP1 mit <i>Stress-Granules</i> | Säuger-Zell-Linien | Tourriere <i>et al.</i> , 2003 |
| Signal-Transduktion | Interaktion mit dem RasGAP-Signalweg | Säuger-Zell-Linien, <i>Drosophila</i> | Parker <i>et al.</i> , 1996 Kennedy <i>et al.</i> , 2001 Pazman <i>et al.</i> , 2000 |
| | Interaktion mit dem HER2-Signalweg | Mensch | Barnes <i>et al.</i> , 2002 |
| Strukturelle Aspekte | RRM, SH3-Domänen-bindendes Motif, RGG Motive und saure Bereiche | Säuger | Kennedy <i>et al.</i> , 1997 Parker <i>et al.</i> , 1996 |
| | NTF2-Motif | Mensch, <i>C. Elegans</i> , <i>A. Thaliana</i> , <i>S. Cerevisiae</i> , <i>S. Pombe</i> | Suyama <i>et al.</i> , 2000 |
| Krebs | Überexpression von G3BP1 in Tumor-/Krebs-Proben gezeigt | Humanes Gewebe und humane Zell-Linien | Barnes <i>et al.</i> , 2002 Guitard <i>et al.</i> , 2001 |
| | Überexpression von G3BP1 in Brustkrebszellen gezeigt | Humanes Gewebe | French <i>et al.</i> , 2002 |
| Aspekte der Entwicklung | De-Differenzierung von Epithelzellen | humane retinale Pigment-Epithelzellen | Kociok <i>et al.</i> , 1999 |
| | Funktion bei der Polarisierung von Ommatidien der Facettenaugen | <i>Drosophila</i> | Pazman <i>et al.</i> , 2000 |
| | G3BP1 hat eventuell eine Funktion in der Neuronalentwicklung | P19-Zellen | Atlas <i>et al.</i> , 2004 |
| Zell-Zyklus | Proliferation von Epithelzellen korrelierte mit G3BP1 | humane retinale Pigment-Epithelzellen | Kociok <i>et al.</i> , 1999 |
| | G3BP1 korrelierte mit dem Eintritt in die S-Phase | Humane Krebszellen- und Humane Zellen | Guitard <i>et al.</i> , 2001 |
| | maximale G3BP1-Expression während der Mitose | HeLa Zellen | Whitfield <i>et al.</i> , 2002 |
| Subzelluläre Lokalisierung | G3BP2a hält I κ B α und I κ B α /NF κ B-Komplexe im Cytoplasma | HeLa Zellen | Prigent <i>et al.</i> , 2000 |
| | nucleäre Lokalisierung von G3BP1 in stimulierten Zellen | Mensch | Barnes <i>et al.</i> , 2002 |
| Gewebe-spezifische Expression | Characterisierung von G3BP1/2 in Maus-Gewebe | Maus | Kennedy <i>et al.</i> , 2001 |
| Protein-Stabilität | USP10/ Ubp3 werden durch G3BP1 moduliert | Mensch, <i>S. Cerevisiae</i> | Soncini <i>et al.</i> , 2001 Cohen <i>et al.</i> , 2003a Cohen <i>et al.</i> , 2003b |

G3BP1 ist zusammen mit IMP1 und HuD an der Translations-Regulation der tau-mRNA beteiligt (Atlas *et al.*, 2007). Obwohl das Protein keine bekannte Nuklease-Domäne aufweist,

wurde *in vitro* eine vom Phosphorylierungsstatus abhängige endoribonukleolytische Aktivität nachgewiesen (Gallouzi *et al.*, 1998; Tourriere *et al.*, 2001). Diese Nuklease-Aktivität sollte bei der Translationsregulation der r15-LOX-mRNA nicht relevant sein, da mehrfach gezeigt wurde, dass mRNA-Abbau nicht die Ursache der verminderten Reporter-mRNA-Translation sein kann (Abb. 3.4.5; Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; Ostareck *et al.*, 1997). Genaue Untersuchungen zur möglichen Beteiligung von G3BP1 an der r15-LOX-mRNA-Translations-Regulation sind noch nicht vorgenommen worden.

Die Identifizierung und Untersuchung von DDX6 als ein mit dem hnRNP K/E1-DICE-Komplex interagierendes Protein

In der GRNA-Affinitätsreinigung des DICE-abhängigen translations-inhibitorischen Komplexes wurde neben anderen Proteinen das DEAD-Box-Protein DDX6 als spezifisch assoziiert identifiziert und wird in Säugerzellen auch als Rck oder p54 bezeichnet. Die Homologen in *Saccharomyces*, *Xenopus*, *Spisula*, *Caenorhabditis* und *Drosophila* heißen Dhh1p, Xp54, clam47, CGH-1 bzw. Me31B. Das humane Rck/p54-Gen wurde an einer chromosomalen Bruchstelle in RC-K8-Zellen gefunden (Lu und Yunis, 1992) und als Proto-Oncogen-Kandidat beschrieben (Akao *et al.*, 1995). Die Proteinkonzentration im cytoplasmatischen K562-Extrakt ist mit 0,5-1% der Gesamtproteinmasse als abundant einzustufen (vergl. Abb. 3.7.5) und nimmt während der durch Natriumbutyrat induzierten erythroiden Reifung um den Faktor 2 ab (Abb. 3.6.6, Bahn 2).

Die Expression von Xp54 in verschiedenen Entwicklungsstadien von *Xenopus* wurde im *Western Blot* analysiert (Ladomery *et al.*, 1997). Die Proteinmenge ist während der Oogenese nahezu konstant. Auch nach der Befruchtung bis zum Blastula-Stadium bleibt die Xp54-Menge unverändert, nimmt aber ab dem Gastrula-Stadium stark ab und das Protein ist in der Kaulquappe nicht mehr zu detektieren. Das Homolog p54 wurde durch den gleichen Antikörper auch in Ratten-Ovarien detektiert und weist eine vergleichbare Konzentration auf (Ladomery *et al.*, 1997). Die konstante DDX6-Konzentration während der Oogenese wurde auch für das *Spisula*-Protein p47 (Minshall *et al.*, 2001) im *Western Blot* gezeigt und in *Xenopus* rekapituliert (Minshall und Standart, 2004). In *Drosophila*-Ovarien wurde in Immunofluoreszenz-Studien Me31B im Cytoplasma von Nährzellen und Oozyten detektiert.

Im synzytialen Blastoderm des Embryos war Me31b gleichmäßig verteilt, und später, im zellulären Blastoderm nicht mehr zu detektieren (Nakamura *et al.*, 2001).

Die Expression von p54 in der Gametogenese und der frühen Embryogenese von Mäusen wurde ebenfalls untersucht. Auch hier zeigte sich, dass das in Oozyten zunächst abundante Protein eine verminderte Konzentration im Morula- und Blastocysten-Stadium aufweist (Matsumoto *et al.*, 2005). In humanen colorectalen Tumorzellen wurde die Überexpression von Rck/p54 festgestellt (Nakagawa *et al.*, 1999). Die durch RNAi induzierte Reduktion der Expression von DDX6 inhibierte die Proliferation der LoVo-Zellen, einer humaner colorectaler Darmkrebs-Zelllinie (Lin *et al.*, 2008).

Die Überexpression von Rck/p54 in COS-7-Zellen führte zur Erhöhung der *c-myc*-Konzentration (Hashimoto *et al.*, 2001). Untersuchungen zur Funktion von DDX6 in somatischen Säuger-Zellen existieren wenige. In *Western-Blot*-Analysen von humanen und murinen Gewebeproben wurden unterschiedliche DDX6-Mengen gefunden. DDX6 konnte z.B. in Leber und Milz, jedoch nicht in Lungen- und Lendenmuskelgewebe von Maus und Mensch detektiert werden (Akao *et al.*, 1995). Die DDX6-Konzentration in hämatopoietischen Zell-Linien wurde ebenfalls untersucht. Hier wurden die myeloiden K562-Zellen mit Raji-(B-Zell-Linie) und MOLT-3-(T-Zell-Linie) Zellen verglichen. Die DDX6-Konzentration in den B- und T-Zell-Linien war etwa vergleichbar mit der in RC-K8-Zellen und höher als die in den K562-Zellen detektierte. Die Expression von DDX6 in den Lungenkrebs-Zelllinien Lu99A und Lu99B und seine Abwesenheit in gesundem Lungengewebe führten zu der Annahme, dass das Protein im Zusammenhang mit Tumorgenese steht (Akao *et al.*, 1995). Allerdings weist DDX6 eine differenzierte, gewebsabhängige Expression in Säugetieren auf und es bleibt zu klären, ob die DDX6-Expression auch in haematopoietischen Zellen nachgewiesen werden kann und ob die Konzentration an DDX6 in heranreifenden roten Blutzellen von Säugern mit der in K562-Zellen vergleichbar ist.

Durch RNAi gegen das endogene DDX6 konnte die Synthese der endogenen r15-LOX in den K562-Zellen induziert werden, die eine effiziente Reduktion von DDX6 aufwiesen (Abb. 3.7.2). Dies beweist, zumindest in K562-Zellen, einen direkten Zusammenhang der Funktion von DDX6 mit der Regulation der Expression der r15-LOX. Die endogene humane r15-LOX-mRNA liegt bereits in nicht induzierten K562-Zellen vor, die hr15-LOX selber ist weder im *Western Blot* noch im Aktivitätstest nachzuweisen (Naarmann *et al.*, 2008). RNA-Interferenz der für hnRNP K und hnRNP E1 kodierenden mRNAs zusammen induzierte die hr15-LOX-

Synthese. Einen vergleichbaren Effekt auf die hr15-LOX-Synthese induzierte auch das effiziente Ausschalten von DDX6 in K562-Zellen.

In *GST-pulldown*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass endogenes DDX6 sowohl mit rekombinantem hnRNP K als auch hnRNP E1 interagiert (Abb. 3.6.4). Durch die Degradation der endogenen RNAs mit Mikrokokus-Nuklease konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion RNA-unabhängig ist. Durch die Zugabe der DICE-RNA wurde das DDX6-*Western-Blot*-Signal nicht verstärkt, was ein erster Hinweis sein könnte, dass DDX6 nicht direkt oder nur mit geringer Affinität mit dem DICE interagiert.

Die direkte RNA-Bindung von DDX6 an das DICE wurde in *UV-crosslink*-Experimenten näher untersucht. Hierfür war es zunächst notwendig, aus K562-Zellen die DDX6-cDNA zu gewinnen und diese in einen *E.coli*-Expressionsvektor zu klonieren. Die vollständige Sequenzierung zeigte eine Insertion von sechs Nukleotiden auf, die in der NCBI-Datenbank (P26196 in UniProtKB; gi:116241327 bzw. RefSeq accession: NM004397.4/NP_04388.2; gi:164664518) nicht aufgeführt ist und für Val(167) und Ser(168) kodiert. Diese sechs Nukleotide sind direkt an einer Exon-Intron-Grenze lokalisiert. Detailliertere cDNA-Analysen von K562-Zellen, Retikulozyten und anderen Zelltypen könnten Aufschluss über das statistische Vorkommen dieser DDX6-Variante geben.

In den durchgeführten *UV-crosslink*-Experimenten konnten selbst hohe Konzentrationen an DDX6 nicht die DICE-RNA binden, jedoch konnte in Anwesenheit von hnRNP K ein *crosslink*-Produkt auf Höhe von DDX6 detektiert werden, welches eine Rekrutierung von DDX6 durch hnRNP K an die DICE-RNA vermuten lässt (Abb. 3.7.7, 3.7.8 und 3.7.10). Dieser Effekt konnte mit hnRNP E1 nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.7.10). Auffällig war die Intensivierung des *crosslink*-Signals der DICE-Bindung von hnRNP K und hnRNP E1 nach der Zugabe von DDX6. Diese könnte für eine Stabilisierung von beiden Proteinen sprechen, jedoch ebenso durch die Anwesenheit der Helikase verursacht werden, wenn diese die Zugänglichkeit der RNA erhöhen würde. Das im *UV-crosslink* verwendeten radioaktiv markierte DICE sollte jedoch unstrukturiert vorliegen (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) und eine Helikase daher keinen Einfluss auf die Zugänglichkeit der RNA haben.

Zur näheren Untersuchung des stabilisierenden Effektes von DDX6 auf die DICE-Bindung von rekombinantem hnRNP K wurden neben dem rekombinanten Wildtyp-DDX6 auch zwei Varianten getestet, die theoretisch keine Helikase-Aktivität aufweisen dürften: DDX6(E249Q) und DDX6(R426Q). Die Einführung dieser Aminosäure-Substitutionen beruht auf Studien zu eIF4A (Pause und Sonenberg, 1992, Pause *et al.*, 1993). Dieses für die Translations-Initiation notwendige Protein (Trachsel *et al.*, 1977; Benne und Hershey, 1978)

gehört ebenso wie DDX6 zur Familie der DEAD-Box-Proteine, welche zunächst durch Sequenz-Alignment verschiedener putativer RNA-Helikasen identifiziert wurde (Gorbalenya *et al.*, 1989) und basierend auf dem charakteristischen DEAD-Element ihren Namen erhielt (Linder *et al.*, 1989). Die DEAD-Familie enthält neun hochkonservierte Sequenzmotive (Abb 4.2, Pause und Sonenberg, 1992; Weston und Sommerville, 2006; Tanner *et al.*, 2003).

In Mutationsanalysen von eIF4A wurden die Varianten eIF4A(E183Q) und (R362Q) verwendet (Pause und Sonenberg, 1992; Pause *et al.*, 1993). Der erste Aminosäureaustausch im DEAD-Motif, welches auch als ATPase B- oder Walker B-Motiv (Walker *et al.*, 1982) bezeichnet wird, erhöhte die Interaktion des Proteins mit ATP im UV-crosslink-Experiment (Pause und Sonenberg, 1992). Diese Interaktion wurde jedoch nicht mehr durch RNA-Zugabe stimuliert, sondern nun inhibiert. Trotz der erhaltenen Fähigkeit des Proteins, ATP zu binden, war die ATPase-Aktivität vollständig aufgehoben, ebenso wie die Helikase-Aktivität (Pause und Sonenberg, 1992). Der zweite Aminosäureaustausch in eIF4A(R362Q) erhöhte den K_m -Wert des ATPase-Aktivitäts-Experimentes lediglich um den Faktor 1,06 (Pause *et al.*, 1993), jedoch war die ATP-Bindung im UV-crosslink-Experiment deutlich reduziert. Die Bindung an RNA im UV-crosslink-Experiment war vollständig aufgehoben, ebenso die RNA-Helikase-Aktivität (Pause *et al.*, 1993).

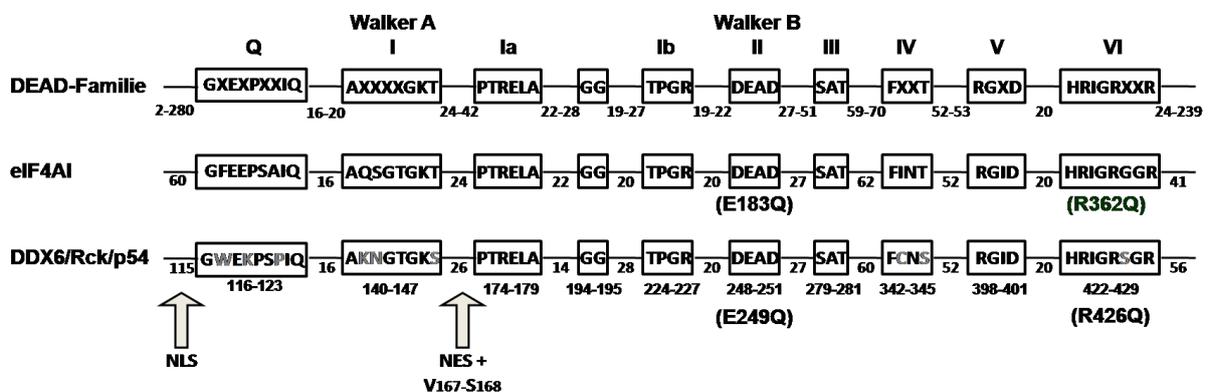


Abb. 4.2. Schematischer Aufbau von Proteinen der DEAD-Familie

aus Pause *et al.*, 1993; modifiziert. Die konservierten Regionen sind in den Kästchen dargestellt, die Zahlen dazwischen geben die Abstände in Aminosäuren an. Das Schema von DDX6 enthält die Position des NLS und NES, die in K562-Zellen gefundene Insertion. Die verwendeten Mutationen in Motiv II und VI sind angegeben.

Aufgrund der hohen Sequenzhomologie innerhalb der DEAD-Familie kann man davon ausgehen, dass DDX6-Varianten mit homologen Aminosäure-Substitutionen, wie sie in den UV-crosslink-Experimenten zur Anwendung kamen (Abb. 3.7.6 und 3.7.8), keine Helikase-Aktivität aufweisen. Diese Annahme wird durch Strukturanalysen verschiedener DEAD/H-Familien-Proteine unterstützt. Hier zeigt sich, dass die Kernstruktur des NS3-Proteins aus

Hepatitis-C-Virus, des mjDEAD-Proteins aus dem Archaeobakterium *Methanococcus* und von eIF4A aus *Saccharomyces* größtenteils identisch ist. Deshalb sollte es möglich sein, von Funktionsstudien von eIF4A als Vertreter der DEAD-Familie auch Rückschlüsse auf andere DEAD-Box-Proteine zu ziehen (Tanner und Linder, 2001).

Im UV-*crosslink*-Experiment zeigte die Zugabe dieser Varianten DDX6(E249Q) und DDX6(R426Q) den gleichen stabilisierenden Effekt auf die DICE-Bindung von hnRNP K wie der Wildtyp. Da beide rekombinanten Proteine GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1 in der Lage waren, endogenes DDX6 aus K562-Extrakt im GST-*pulldown* RNA-unabhängig zu binden, kann man auf eine direkte Interaktion der rekombinanten Proteine schließen, die die Bildung des hnRNP K-DICE-, des hnRNP E1-DICE und des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes, zumindest im UV-*crosslink*-Experimentes unterstützt oder stabilisiert.

Ein stabilisierender Effekt von DEAD-Box-Helikasen auf mRNPs, die Y-Box-Proteine mit *cold-shock*-Domänen (CSD) enthalten, wurde bereits postuliert (Weston und Sommerville, 2006). CSD-Proteine binden einzelsträngige RNA und sind an translationsregulatorischen Prozessen beteiligt (Sommerville, 1999). Zum Beispiel wurde das CSD-Protein FRGY2 zusammen mit Xp54 in nicht-translatierten mRNPs in *Xenopus*-Oozyten gefunden (Ladomery *et al.*, 1997) und die Interaktion von Me31b mit dem Protein Ypsilon-Schachtel durch Co-Lokalisierung in der Immunofluoreszenz und Co-Immunopräzipitation detektiert (Nakamura *et al.*, 2001). Auch in Maus-Oozyten wurden mRNPs beschrieben, welche neben p54 CSD-Proteine enthalten (Paynton, 1998; Matsumoto *et al.*, 2005). Dies ist ein Hinweis darauf, dass ein enger Zusammenhang zwischen DEAD-Box-Helikasen und CSD-Proteinen in verschiedenen Organismen wie *Xenopus*, *Drosophila*, *Caenorhabditis* und Säugern besteht und läßt vermuten, dass die Helikase für die Stabilisierung der Interaktion vom CSD-Protein mit der einzelsträngigen RNA benötigt wird (Weston und Sommerville, 2006).

Prinzipiell tragen alle Mitglieder der DEAD-Familie die notwendigen Aminosäuresequenzen, die ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung und RNA-Entwindung ermöglichen (Abb. 4.2). Die RNA-Bindung des DDX6-Proteins Dhh1p aus Hefe wurde in *dot-blot*-Experimenten gezeigt (Cheng *et al.*, 2005). Auch die Bindung der *c-myc*-mRNA durch das humane Rck/p54 wurde untersucht (Akao *et al.*, 2003). Ebenso konnte gezeigt werden, dass die ATPase-Aktivität, welche das rekombinante humane Rck/p54 auch in Abwesenheit von RNA aufwies, durch *c-myc*-RNA stimuliert wurde (Matsui *et al.*, 2006).

Wie bereits oben erwähnt, ist ein Zusammenhang zwischen der Überexpression von Rck/p54 in COS-7-Zellen und einer erhöhten *c-myc*-Konzentration beschrieben (Hashimoto *et al.*,

2001). Die *c-myc*-mRNA-Konzentration war dabei nicht beeinflusst, weshalb die Beteiligung von DDX6 an der Regulation der *c-myc*-mRNA-Translationseffizienz in Erwägung gezogen wurde (Akao *et al.*, 2003). Gezeigt wurde die molekulare Assoziation des rekombinant exprimierten, human DDX6 (mit His-Fusion) mit der *c-myc*-mRNA in Elektronen-Mikroskopie-Experimenten in An- und Abwesenheit von ATP und es wurde auf eine ATP-abhängige Entwindungs-Aktivität von Rck/p54 gegenüber der strukturierten *c-myc*-mRNA geschlossen. Weiterhin wurde in Oberflächen-Plasmonresonanz-Experimenten ein K_D -Wert für die Assoziation von DDX6 mit der *c-myc*-mRNA in Anwesenheit von ATP von 18nM bestimmt.

Die *in vitro*-Helikase-Aktivität von aus Oozyten gereinigtem Xp54 wurde in einem „echten“ RNA-Helikase-Experiment gezeigt (Ladomery *et al.*, 1997).

Die DICE-Bindung des humanen DDX6 wurde im Filterbindungs-Experiment untersucht. Hier konnte ein K_D -Wert von 70nM bestimmt werden (Moritz, unpubliziert). Demnach weist DDX6 selber eine RNA-Bindungsaktivität auf, die im Gegensatz zur DICE-Bindung von hnRNP K und hnRNP E1 ($K_D=0,1nM$; Moritz, unpubliziert) als schwach einzustufen ist, und im UV-*crosslink*-Experiment nicht nachzuweisen ist. Die hochaffine DICE-Bindung von hnRNP K und hnRNP E1 sollte die Bindung von DDX6 an das DICE nahezu vollständig verdrängen.

Es ist anzunehmen, dass auch das in den UV-*crosslink*-Experimenten verwendete humane DDX6 eine RNA-abhängige ATPase- bzw. Helikase-Aktivität besitzt. Offen bleibt, welchen Einfluss die neu identifizierte Interaktion mit hnRNP K oder hnRNP E1 auf DDX6 hat. Für eIF4A ist bekannt, dass die eigentliche Helikase-Aktivität schwach ist, jedoch durch eIF4B deutlich verstärkt wird (Rozen *et al.*, 1990). Die experimentelle Beantwortung der Frage, ob die Anwesenheit von hnRNP K, hnRNP E1 oder des hnRNP K/E1-DICE-Komplexes einen stimulierenden Einfluss auf die ATPase oder Helikase-Aktivität von DDX6 haben, steht aus.

Die DDX6-Homologen der unterschiedlichen Spezies enthalten die oben erwähnten typischen Sequenz-Motive und unterscheiden sich vor allem in ihren N- und C-terminalen Ausdehnungen. Diese sind häufig glutaminreich. Das humane und das *Xenopus* DDX6 weisen eine lange N-terminale Peptidsequenz auf, in Hefe ist der C-terminus stärker verlängert und in *Spisula*, *Drosophila* und *C.elegans* existieren kürzere N- und C-Termini. Die Funktion dieser N- und C-terminalen Peptide wird in der Vermittlung von unterschiedlichen Protein-Protein-Interaktionen vermutet (Weston und Sommerville, 2006). So enthält der N-Terminus von Xp54 ein NLS (Smillie und Sommerville, 2002). Die identische Aminosäuresequenz

kann auch in Vertebraten (Mensch und Maus) gefunden werden, nicht aber in *Spisula*, *Drosophila*, *Caenorhabditis* oder *Saccharomyces*. Dennoch wurde auch in *Spisula* im Kern früher Embryonen das DDX6-Protein p47 detektiert (Minshall, 2001).

Ebenso wurde ein NES in DDX6-Homologen postuliert und ein *Shutteln* zwischen Kern und Cytoplasma in *Xenopus* detektiert. Die Assemblierung von DDX6-haltigen mRNPs im Kern wurde beschrieben (Smillie und Sommerville, 2002). Auch hnRNP K trägt ein NLS und ein KNS (vergl. Einleitung). Also ist es denkbar, dass der DICE-abhängige translations-inhibitorische Komplex im Kern zusammen mit DDX6 gebildet wird und das cytoplasmatisch lokalisierte hnRNP E1 erst im Cytoplasma assoziiert.

Die Funktion von DDX6-Proteinen in der posttranskriptionalen Genregulation

Dhh1p wirkt als Aktivator des *Decapping*-Mechanismus in Hefe (Coller *et al.*, 2001) und ist als Protein beschrieben, welches in *P-bodies* lokalisiert (Sheth und Parker, 2003). *P-bodies* sind dynamische RNA-Protein-Aggregate, welche nicht-translatierte mRNAs, die *Decapping*-Maschinerie und Nukleasen wie Xrn1 enthalten (Bashkirov *et al.*, 1997; Ingelfinger *et al.*, 2002, Lykke-Andersen, 2002; Van Dijk *et al.*, 2002; Teixeira *et al.*, 2005).

In Hefe- und Retikulozyten-Lysaten konnte gezeigt werden, dass Dhh1p und das humane DDX6-Homolog die Translation von Luciferase-Reporter-mRNAs inhibieren (Coller und Parker, 2005). Der translations-inhibitorische Effekt war nicht von einer *Cap*-Struktur abhängig und konnte auch für EMCV, HCV und CrPV-IRES-enhaltende mRNAs gezeigt werden. Auch die DICE-abhängige Translations-Inhibition konnte IRES-abhängige Initiierung regulieren, nicht jedoch die durch die CrPV-IRES vermittelte, welche unabhängig von Translations-Initiations-Faktoren das Ribosom rekrutiert (Ostareck *et al.*, 2001, vergl. Einleitung).

In *Drosophila*-Oozyten ist Me31B ebenfalls als Translations-Inhibitor beschrieben (Nakamura *et al.*, 2001). In Nährzellen, die kein Me31B synthetisieren, werden die maternalen mRNAs, welche für die Proteine Oskar und Bicoid kodieren und während des Transportes in die Eizelle translationsinaktiv sind, vorzeitig translatiert. Die Co-Lokalisierung von Me31B mit diesen mRNAs in *Drosophila*-Oozyten wurde durch Immunfluoreszenz-Experimente gezeigt (Nakamura *et al.*, 2001).

Das *Spisula*-DDX6-Homolog p47 wurde als Interaktionspartner des Cytoplasmatischen Polyadenylierungs-Element-bindenden Proteins (*cytoplasmic polyadenylation element*

binding, CPEB) identifiziert (Minshall *et al.*, 2001). Diese Interaktion konnte für die *Xenopus*-Homologen rekapituliert werden (Minshall *et al.*, 2001; Minshall und Standart, 2004). In Oozyten-Injektions-Experimenten konnte weiterhin gezeigt werden, dass das *Xenopus*-DDX6-Homolog Xp54 die Translation nicht-polyadenylierter Reporter-mRNA inhibiert und bei Verwendung der zu eIF4A (E183Q) und (R362Q) bzw. DDX6 (E249Q) und (R426Q) äquivalenten Helikase-inaktiven Varianten (DQAD) und (HRIGQ) die Translation aktiviert wird. Die Rekrutierung von Xp54 erfolgte in diesen Experimenten über die Fusion mit dem MS2-bindenden Protein und die Platzierung von MS2-Bindestellen in der 3'UTR der Reporter-mRNAs. Der translations-inhibitorische Effekt trat nicht auf, wenn polyadenylierte Reporter-mRNAs verwendet wurde (Minshall *et al.*, 2001). Die Rekrutierung von Enzymen des mRNA-Abbaus ist in diesen Experimenten als translations-inhibitorische Ursache auszuschließen: Die Reporter-mRNAs waren innerhalb von 18 Stunden stabil. Die Stabilität nicht-polyadenylierter mRNAs in der frühen *Xenopus*-Entwicklung (Voeltz und Steitz, 1998) könnte allein durch die nicht vorhandene *Decapping*-Aktivität (Zhang *et al.*, 1999) erklärt werden (Minshall *et al.*, 2004), zeigt jedoch, dass die Assoziation von DDX6 mit mRNPs nicht unbedingt zum Abbau der mRNA führen muss, wie es bei der Ausbildung von P-bodies in Hefe beschrieben ist.

CPEB, ein wichtiger Translationsregulator während der frühen Entwicklung, bindet spezifisch an das cytoplasmatische Polyadenylierungselement (*cytoplasmic polyadenylation element*, CPE) in der 3'UTR von z.B. der Cyclin-B1-mRNA und vermittelt das sogenannte *Masking* durch die Interaktion mit Maskin (de Moor und Richter, 1999; Stebbins-Boaz *et al.*, 1999). Maskin ist ein eIF4E-bindendes Protein und verhindert die Assoziation des Cap-Bindeproteins eIF4E mit eIF4G (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999). Während der frühen *Xenopus*-Oogenese, in der Maskin nicht exprimiert wird, interagiert CPEB über 4E-T (eIF4E-Transporter) mit dem eIF4E-Homolog eIF4E1b (Minshall *et al.*, 2007).

Nähere Untersuchungen der Zusammensetzung von CPEB- und Xp54-haltigen mRNPs in *Xenopus*-Oozyten konnten die RNA-unabhängige Assoziation von eIF4E identifizieren und zeigten, dass Xp54 oligomerisiert (Minshall und Standart, 2004). Diese Oligomerisierung ist RNA-abhängig und korreliert mit der Fähigkeit zur Translationsrepression. Die Helikase-inaktivierenden Mutationen (DQAD) und (HRIGQ) traten nicht als Oligomere auf. Es wird postuliert, dass Xp54 im oligomerisierten Zustand als Translations-Repressor aktiv ist (Minshall und Standart, 2004). Vorläufige Untersuchungen zum Sedimentationsverhalten von rekombinantem humanen DDX6 in Ultrazentrifugations-Experimenten rekapitulieren die Fähigkeit des Proteins zur Hexamer-Bildung (Moritz, unpubliziert).

Das Regulationssubstrat von Xp54 in Oocyten-Injektions-Experimenten scheint also bei nicht-adenylierter mRNA über die Interaktion mit CPEB die 5'Cap-Struktur der mRNA zu sein, müßte also die Assemblierung von 48S-Translations-Initiations-Komplexen beeinflussen. Es wurde kein Effekt von DDX6 auf poly(A)-tragende mRNA in *Xenopus*-Oozyten detektiert (Minshall *et al.*, 2001). Allerdings konnte DDX6 im Komplex mit FRGY2 über poly(A)-Affinität aus *Xenopus* isoliert werden (Ladomery *et al.*, 1997). Die Abhängigkeit von einer Cap-Struktur und der Effekt auf die Ausbildung von 48S-Initiations-Komplexen konnte für die DICE-abhängige Translations-Repression ausgeschlossen werden (Ostareck *et al.*, 1997, 2001; vergl. Einleitung) und die Translationsrepression konnte unabhängig vom poly(A)-Status in Extrakten aus MEL- und K562-Zellen rekapituliert werden (Abb. 3.4.1). Allerdings wurde eine Analyse des poly(A)-Status der r15-LOX-mRNA im Verlauf der Erythropoese nicht vorgenommen.

Die vom DICE unbeeinflusste Bildung von 48S-Initiationskomplexen in Gegenwart von GMP-PNP in Retikulozytenlysat (Ostareck *et al.*, 2001) und im K562-Extrakt (Abb. 3.4.8; 3.5.2) sowie die Inhibition der vollständigen Bildung von 80S-Ribosomen unter GTP-Hydrolyse-Bedingungen ließen den Schluß zu, dass ein Schritt der Translations-Initiation inhibiert ist, welcher GTP-Hydrolyse benötigt. In *Toe-Print*-Analysen konnte dies bestätigt werden: Die kleine ribosomale Untereinheit war direkt am Start-Kodon positioniert (Ostareck *et al.*, 2001). Der durch den hnRNP K/E1-DICE-Komplex hervorgerufene inhibitorische Effekt auf die Translations-Initiation betrifft also möglicherweise eIF2 oder eIF5B. RNA-Helikasen, welche die Funktion von eIF5B modifizieren, sind bereits beschrieben:

Die DEAD-Box-Helikase Vasa wird während der *Drosophila*-Oogenese am posterioren Ende lokalisiert und bindet eIF5B (Carrera *et al.*, 2000). Die Deletion von Vasa und eine in der eIF5B-Interaktion gestörte Variante von Vasa verursachten eine stark reduzierte Translation der *grk*-mRNA (Johnstone und Lasko, 2004), was zu der Hypothese führte, dass eIF5B durch die Interaktion mit Vasa zur *grk*-mRNA rekrutiert wird und dadurch die Translations-Initiation stimuliert (Sonenberg und Hinnebusch, 2009).

PABPC kann auch die 60S-Assemblierung stimulieren (Kahvejian *et al.*, 2005), und in Hefe wird der poly(A)-Schwanz benötigt, um den inhibitorischen Effekt der RNA-Helikasen Ski2p und Slh1p auf eIF5B zu verhindern (Searfoss *et al.*, 2001).

Die Interaktion von Mitgliedern der Sdc6p-Familie (Anantharaman und Aravin, 2004), zu der RapA/B aus *Xenopus*, Tral aus *Drosophila*-Oozyten und CAR-1 aus *Caenorhabditis* gehören, mit den jeweiligen DDX6/p54-Homologen wurde durch Interaktionsstudien oder Co-Lokalisierung gezeigt (Wilhelm *et al.*, 2005, Boag *et al.*, 2005). Diese Sdc6p-Proteine

enthalten unterschiedlich viele RGG-Boxen (Weston und Sommerville, 2006), welche ebenso in hnRNP K (Matunis *et al.*, 1992), nicht jedoch in hnRNP E1 vorliegen, und desweiteren eine FNF-Domäne, die wahrscheinlich an der Interaktion mit Nukleinsäuren oder stark geladenen Peptiden beteiligt ist (Anantharaman und Aravin, 2004).

Die Interaktion von hnRNP K mit der weiteren DEAD-Box-Helikase, DDX1, wurde bereits untersucht. Die Interaktion von DDX1 fand im Bereich der Aminosäuren 1-279 von hnRNP K statt, also innerhalb der KH-Domänen 1 und 2, und wurde durch die Zugabe von RNA geschwächt (Chen *et al.*, 2002).

Ausblick

Nachdem in dieser Dissertationsarbeit die Interaktion von DDX6 mit dem regulatorischen hnRNP K/E1-DICE-Komplexes identifiziert wurde, sollten sich Experimente anschließen, die zum einen die Interaktion von DDX6 mit hnRNP K und hnRNP E1 näher charakterisieren und zum anderen die direkte Beteiligung an der Translations-Regulation der r15-LOX-mRNA während der Erythropoese untersuchen.

Zunächst wäre der DDX6-Protein-Gehalt und seine Veränderung in Erythroblasten, Retikulozyten und Erythrozyten zu analysieren, um festzustellen, ob dieser dem in induzierten und nicht induzierten K562-Zellen entspricht.

Die *in vitro* ATPase-Aktivität des verwendeten rekombinanten DDX6 konnte gezeigt werden (Moritz, unpubliziert). Interessant wäre die Fragestellung, ob diese Enzymaktivität in Anwesenheit von hnRNP K, hnRNP E1, hnRNP E2 oder dem DICE verändert wird.

Die detektierte Stabilisierung der DICE-Bindung von hnRNP K und hnRNP E1 im UV-*crosslink*-Experiment wurde sowohl durch DDX6 (wt) als auch die Variante DDX6 (E249Q) verursacht. Es wurde aufgrund der Sequenz-Homologien zu anderen DEAD-box-Helikasen angenommen, dass diese Variante keine ATPase-Aktivität mehr besitzt (siehe oben), was noch zu überprüfen wäre. Die durchgeführten UV-*crosslink*-Experimente wurden in Anwesenheit von ATP durchgeführt. Ob der stabilisierende Effekt auf die DICE-Bindung ATP-abhängig ist, sollte in Abwesenheit von ATP geklärt werden.

Die rekombinanten Proteine hnRNP K und DDX6 mit Deka-Histidin-Tag haben das gleiche Molekulargewicht von 54kD und zeigen in der SDS-PAGE ein ähnliches Laufverhalten. Dies erschwerte im UV-*crosslink* die Unterscheidung der Signale. Ein Abspalten des Affinitäts-Tags von DDX6 während der Präparation könnte dieses Problem lösen. Die heterologe

Expression von His-DDX6 in *E.coli* wurde analog dem Protokoll für hnRNP K durchgeführt und zeigte keine deutliche Überexpression. Die Anreicherung von His-DDX6 nach der Ni-NTA-Reinigung betrug lediglich 46%. Auf die Optimierung der Präparationsbedingungen musste aufgrund der limitierten Zeit verzichtet werden, jedoch sollte diese für weitergehende Studien durchgeführt werden.

Die Interaktion von rekombinantem GST-hnRNP K und GST-hnRNP E1 mit DDX6 aus K562-Extrakt könnte unter Verwendung von His-DDX6 im GST-*pulldown*-Experiment bestätigt werden. Interessant wäre auch die biophysikalische Charakterisierung dieser Interaktion durch Fluoreszenz-Titration, Plasmonresonanz und Ultrazentrifugation, um die Affinität von DDX6 zu hnRNP K bzw. hnRNP E1 zu quantifizieren und Informationen über die Stöchiometrie des hier postulierten hnRNP K/E1-DICE-:DDX6-Komplexes zu erlangen.

Die Verwendung verkürzter Varianten von hnRNP K, hnRNP E1 und DDX6 im GST-*pulldown* kann der Identifizierung der Interaktionsfläche zwischen den Proteinen dienen.

Um die Beteiligung von DDX6 an der Translations-Regulation der r15-LOX-mRNA zu klären, können zunächst *in vitro*-Translations-Studien in K562-Extrakt durchgeführt werden, um zu testen, welchen Effekt die DDX6-Konzentrations-Erhöhung durch Zugabe des rekombinanten Proteins auf die Synthese von Reporter-mRNAs in Abhängigkeit vom 3'UTR-DICE hat. Hierfür wäre jedoch nötig, sauberere und konzentriertere Protein-Präparationen zu erlangen. Die Zugabe der wahrscheinlich inaktiven Varianten von DDX6 (D249Q) und (R426Q) sollten den Effekt des endogenen Proteins ausgleichen können, wenn sie in höherer Konzentration vorliegen würden. Die endogene DDX6-Menge im K562-Translations-Experiment beträgt etwa 0,4-0,8µg (8-16pmol), die von hnRNP K etwa 0,24µg (5pmol), die von hnRNP E1 etwa 0,08µg (2pmol). Die innerhalb der Dissertationsarbeit verwendeten DDX6-Präparationen hatten eine Konzentration von etwa 0,17µg/µl und eine Reinheit von etwa 46%. Die Zugabe von etwa 1µg rekombinantem DDX6 zum 10µl-Translations-Ansatz würde gleichzeitig die Zugabe von mindesten 1µg kontaminierendem *E.coli*-Protein unbekannter Effekte bedeuten und ist aufgrund des erforderlichen Volumens nicht möglich. Auch hier zeigt sich die Notwendigkeit der Entwicklung eines optimalen Protokolls zur Präparation von rekombinantem DDX6.

Die Anwendung von RNA-Interferenz gegen DDX6 in K562-Zellen vor der Extraktpräparation für *in vitro*-Translations-Experimente ist nicht zu empfehlen: Durch Immunofluoreszenz-Färbung konnte gezeigt werden, dass nur ein Teil der verwendeten Zellen einen effektiven DDX6-*knock-down* zeigten. Die Extrakte würden dann aus einem Gemisch

aus Zellen mit weniger und stärker reduziertem DDX6-Level präpariert werden. Effekte auf die DICE-abhängige Translations-Inhibition sind bei durchschnittlich leichter Reduktion der DDX6-Konzentration nicht zu erwarten, zumal der Gehalt der regulatorischen Proteine hnRNP K und hnRNP E1 im Extrakt deutlich unter dem von DDX6 liegt.

Weiterhin wäre interessant zu analysieren, ob DDX6 *in vivo* mit hnRNP K, hnRNP E1 und der r15-LOX-mRNA in einem stabilen Komplex vorliegt. Angewendet werden könnte hierfür die bi-oder trimolekulare Fluoreszenz-Komplementation (Hu *et al.*, 2002; Rackham und Brown, 2004).

Zusammenfassung

Die Reifung roter Blutzellen ist durch den Verlust des Zellkerns im Normoblasten-Stadium und den Abbau der Mitochondrien im reifen Retikulozyten unmittelbar vor der Ausbildung von funktionalen Erythrozyten gekennzeichnet. Durch den frühen Verlust des Zellkerns ist die Möglichkeit zur Transkription zeitlich begrenzt, und die Biosynthese bestimmter Proteine, welche erst in späten Reifungsstadien Funktionen übernehmen, wird auf der Ebene der Translation reguliert.

Die Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX) katalysiert als ein Schlüsselenzym der roten Blutzellreifung die Dioxygenierung von Phospholipiden der Mitochondrienmembranen und initiiert dadurch den Mitochondrienabbau im reifen Retikulozyten. Die r15-LOX-mRNA wird bereits im Erythroblasten synthetisiert, doch ihre Translation ist auf das späte Retikulozyten-Stadium beschränkt.

Die r15-LOX-mRNA-Translations-Kontrolle wird durch den hnRNP K/E1-DICE-Komplex vermittelt, welcher sich in der 3'UTR der mRNA ausbildet. Dieser 3'UTR-Komplex verhindert die Translations-Initiation durch die Inhibition der Assoziation der großen ribosomalen (60S) Untereinheit mit dem 48S-Initiationskomplex.

Um die Zusammensetzung des DICE-abhängigen Translations-Inhibitions-Komplexes näher zu analysieren, wurde ein auf K562-Zellen beruhendes induzierbares erythroides Zellsystem entwickelt, aus welchem translationskompetente Extrakte generiert wurden. Diese cytoplasmatischen K562-Extrakte können in der *in vitro*-Translation den durch das DICE vermittelte Regulations-Mechanismus vollständig rekapitulieren. Durch die kombinierte Anwendung von RNA-Affinitäts-Chromatographie und Immunopräzipitation wurde der DICE-abhängige translations-regulatorische Komplex aus diesen Extrakten isoliert und seine Zusammensetzung massenspektrometrisch analysiert.

Die für die DICE-abhängige Translations-Regulation funktionale Relevanz der Identifizierung von DDX6 als ein spezifisch mit dem hnRNP K/E1-DICE-Komplex interagierender Faktor konnte *in vivo* durch *knock-down*-Experimente abgesichert werden. Vorläufige Interaktionsstudien der rekombinanten Proteine deuten auf eine direkte Protein-Protein-Interaktion hin, die einen stabilisierenden Effekt von DDX6 auf die DICE-Bindung von hnRNP K und hnRNP E1 ausübt. Diese Arbeit bildet den Ausgangspunkt für weitere Analysen der Interaktion von DDX6 mit dem hnRNPK/E1-DICE-Komplex.

- Abaza I, Coll O, Patalano S, Gebauer F (2006) *Drosophila* UNR is required for translational repression of *male-specific lethal 2* mRNA during regulation of X-chromosome dosage compensation. *Genes Dev.* 20: 380-389.
- Acker MG, Shin BS, Dever TE, Lorsch JR (2006): Interaction between eukaryotic initiation factor 1A and 5B is required for efficient ribosomal subunit joining. *J Biol Chem.* 281: 8469-8475.
- Adolph D, Flach N, Mueller K, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2007): Deciphering the crosstalk between hnRNP K and c-Src: The c-src activation domain is distinct from a second interaction site. *Mol Cell Biol.* 27:1758-1770.
- Akao Y, Marukawa O, Morikawa H, Nakao, K, Kamei M, Hachiya T, Tsujimoto Y (1995): The rck/p54 candidate proto-oncogene product is a 54-kilodalton D-E-A-D box protein differentially expressed in human and mouse tissues. *Cancer Res.* 55: 3444-3449.
- Akao Y, Yoshida H, Matsumoto, K, Matsui T, Hogetu K, Tanaka, N, Usukura J (2003): A tumour-associated DEAD-box protein, rck/p54 exhibits RNA unwinding activity toward c-myc RNAs *in vitro*. *Genes to cells* 8:671-676.
- Altmann M, Schmitz N, Berset C, Trachsel H (1997): A novel inhibitor of cap-dependent translation initiation in yeast - p20 competes with eIF4G for binding to eIF4E. *EMBO J.* 16:1114-1121.
- Anantharaman V, Aravin L (2004): Novel conserved domains in proteins with predicted roles in eukaryotic cell-cycle regulation, decapping and RNA-stability. *BMC Genomics* 5:45.
- Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg, CG (1979): Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature* 278:364-365.
- Anderson P, Kedersha N (2002): Stressful initiations. *J. Cell Sci.* 115: 3227-3234
- Anthony DD, Merrick WC (1992): Analysis of 40S and 80S complexes with mRNA as measured by sucrose density gradients and primer extension inhibition. *J Biol Chem.* 267:1554-1562.
- Atlas R, Behar L, Elliott E, Ginzburg I (2004): The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *J Neurochem.* 89:613-626.
- Atlas R, Behar S, Ginzburg I (2007): Dynamic association with polysomes during p19 neuronal differentiation and an untranslated region dependent translation regulation of the tau mRNA by the tau mRNA associated proteins IMP1, HuD and G3BP1. *J Neurosci Res.* 85:173-183.
- Austin RJ, Tianbing X, Ren J, Takahashi TT, Roberts RW (2003): Differential modes of recognition in N peptide-boxB complexes. *Biochemistry* 42:14957-14967.
- Backe P, Messias AC, Ravelli RBG, Sattler M, Cusack S (2005): X-ray crystallographic and NMR-studies of the third KH-domain of hnRNP K in complex with single stranded nucleic acids. *Structure* 13:1055-1067.

Backe P, Ravelli RBG, Garman E, Cusack S (2004): Crystallization, microPIXE and preliminary crystallographic analysis of the complex between the third KH domain of hnRNP K and single-stranded DNA. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 60:784-787.

Bader M, Sarre TF (1986): A (re)initiation-dependent cell-free protein-synthesis system from mouse erythroleukemia cells. *Eur J Biochem.* 161:103-109.

Barnes CJ, Li F, Mandal M, Yang Z, Sahin AA, Kumar R (2002): Heregulin induces expression, ATPase activity, and nuclear localization of G3BP, a Ras signaling component, in human breast tumors. *Cancer Res.* 62:1251-1255.

Bashkirov VI, Scherthan H, Solinger JA, Buerstedde JM, Heyer WD (1997): A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J Cell Biol.* 136:761-773.

Battelli C, Nikopoulos GN, Mitchell JG, Verdi JM (2006): The RNA-binding protein Musashi-1 regulates neural development through the translational repression of p21WAF-1. *Mol Cell Neurosci.* 31:85-96.

Beckmann K, Grskovic M, Gebauer F, Hentze MW (2005): A dual inhibitory mechanism for ribosomal 43S complex recruitment and scanning restricts msl-2 mRNA translation for dosage compensation in *Drosophila*. *Cell* 122:529-540.

Benne R, Hershey JWB (1978): The mechanism of action of protein synthesis initiation factors from rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 253:3078-3087.

Benoit P, Papin C, Kwak JE, Wickens M, Simonelig M (2008): PAP- and GLD-2-type poly(A) polymerases are required sequentially in cytoplasmic polyadenylation and oogenesis in *Drosophila*. *Development.* 135:1969-1979.

Boag PR, Nakamura A, Blackwell TK (2005): A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. *Development.* 132:4975-4986.

Bradford MM (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-354.

Brown MT, Cooper JA (1996): Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta* 1287:121-149.

Burnham MR, Bruce-Staskal PJ, Harte MT, Weidow CL, Ma A, Weed SA, Bouton AH (2000). Regulation of c-SRC activity and function by the adapter protein CAS. *Mol Cell Biol.* 20:5865-5878.

Carrera P, Johnstone O, Nakamura A, Casanova J, Jackle H, Lasko P (2000): VASA mediates translation through interaction with a *Drosophila* yIF2 homolog. *Mol Cell* 5:181-187.

Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhäuser N, Marchisio PC, Biffo S (2003): Release of eIF6 (p27^{BBP}) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature* 426:579-584.

- Chakrabarti A, Maitra U (1991): Function of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of an 80S ribosomal polypeptide chain initiation complex. *J Biol Chem.* 266: 14038-14045.
- Chekulaeva M, Hentze MW, Ephrussi A (2006): Bruno acts as a dual repressor of oskar translation, promoting mRNA oligomerization and formation of silencing particles. *Cell* 124:521-533.
- Cheng Z, Collier J, Parker R, Song H (2005): Crystal structure and functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p. *RNA* 11:1258-1270.
- Chen JJ, London IM (1995): Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem Sci.* 20:105-108.
- Chen HC, Lin WC, Tsay YG, Lee SC, Chang CJ (2002): An RNA helicase, DDX1, interacting with poly(A) RNA and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K. *J Biol Chem.* 277:40403-40409.
- Chkheidze AN, Lyakhov DL, Makeyev AV, Morales J, Kong J, Liebhaber SA, (1999): Assembly of the α -globin mRNA stability complex reflects binary interaction between the pyrimidin-rich 3'-untranslated region determinant and poly(C) binding protein α CP. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4572-4581.
- Chomczynski P, Sacchi N (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-159.
- Chu C, Rana TM (2006): Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *Plos biology* 4:1122-1136.
- Cigan AM, Feng L, Donahue TF (1988): tRNA_i^{Met} functions in directing the scanning ribosome to the start site of translation. *Science* 242:93-97.
- Cilley CD, Williamson JR (1997): Analysis of bacteriophage N protein and peptide binding to boxB RNA using polyacrylamid gel coelectrophoresis (PACE). *RNA* 3:57-67.
- Cohen M, Stutz F, Belgareh N, Haguenaer-Tsapis R, Dargemont C. (2003a): Ubp3 requires a cofactor, Bre5, to specifically de-ubiquitinate the COPII protein, Sec23. *Nat Cell Biol.* 5:661-667.
- Cohen M, Stutz F, Dargemont C (2003b): Deubiquitination, a new player in Golgi to endoplasmic reticulum retrograde transport. *J Biol Chem.* 278:51989-92.
- Collier JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001): The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA.* 7:1717-1727.
- Collier JM, Parker R (2005): General translational repression by activators of mRNA Decapping. *Cell.* 122: 875-886.
- Costa M, Ochem A, Staub A, Falaschi A (1999): Human DNA helicase VIII: a DNA and RNA helicase corresponding to the G3BP protein, an element of the ras transduction pathway. *Nucleic Acids Res.* 27:817-821.

Czaplinski K, Köcher T, Schelder M, Segref A, Wilm M, Mattaj IW (2005): Identification of 40LoVe, a *Xenopus* hnRNP D family protein involved in localizing a TGF- β -related mRNA during oogenesis. *Developmental cell* 8:505-515.

Das S, Maitra U (2000): Mutational analysis of mammalian initiation factor 5 (eIF5): role of interaction between the beta subunit of eIF2 and eIF5 in eIF5 function *in vitro* and *in vivo*. *Mol Cell Biol.* 20:3942-3050.

Dejgaard K, Leffers, H (1996): Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur J Biochem.* 241:425-431.

de Moor C, Richter JD (1999): Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *EMBO J.* 18:2294-2303.

Duncan K, Grskovic M, Strein C, Beckmann K, Niggeweg R, Abaza I, Gebauer F, Wilm M, Hentze MW (2006): Sex-Lethal imparts a sex-specific function to UNR by recruiting it to the msl-2 mRNA 3'UTR: Translation repression for dosage compensation. *Genes Dev.* 20:368-379.

ElAntak L, Tzakos AG, Locker N, Lukavsky PJ (2007): Structure of eIF3b RNA recognition motif and its interaction with eIF3j: structural insights into the recruitment of eIF3b to the 40S ribosomal subunit. *J Biol Chem.* 282: 8165-8174.

Fleming J, Thiele, BJ, Chester J, O'Prey J, Janetzky S, Aitken A, Anton, IA, Rapoport SM, Harrison PR (1989): The complete sequence of rabbit erythroid cell-specific 15-lipoxygenase mRNA: comparison of the predicted amino acid sequence of the erythroid lipoxygenase with other lipoxygenases. *Gene* 79: 181-188.

Flygare J, Aspesi A, Bailey JC, Miyake K, Caffrey JM, Karlsson S, Ellis SR (2007): Human RPS19, the gene mutated in Diamond-Blackfan anemia, encodes a ribosomal protein required for the maturation of 40S ribosomal subunits. *Blood* 109: 980-986.

Fraser CS, Lee JY, Mayeur GL, Bushell M, Doudna JA, Hershey JW (2004): The j-subunit of human translation initiation factor eIF3 is required for the stable binding of eIF3 and its subcomplexes to 40 S ribosomal subunits *in vitro*. *J Biol Chem.* 279: 8946-8956.

French J, Stirling R, Walsh M, Kennedy HD (2002): The expression of Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding proteins, G3BPs, in human breast cancers. *Histochem J.* 34:223-231.

Friend C, Patuleia MC, De Harven E (1966): Erythrocytic maturation *in vitro* of murine (Friend) virus-induced leukemic cells. *Natl Cancer Inst Monogr.* 22:505-22

Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T (1971): Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells *in vitro*: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA* 68(2):378-82.

Gallouzi IE, Parker F, Chebli K, Maurier F, Labourier E, Barlat I, Capony JP, Tocque B, Tazi J (1998): A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol Cell Biol.*18:3956-3965.

- Gamarnik AV und Andino P (1997): Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* 3:882-892.
- Gebauer F, Merendino L, Hentze M, Valcarcel J (1998): The *Drosophila* splicing inhibitor sex-lethal directly inhibits translation of *male-specific-lethal 2* mRNA. *RNA* 4:142-150.
- Gebauer F, Corona D, Preiss T, Becker P, Hentze MW (1999): Translation control of dosage compensation in *Drosophila* by Sex-lethal: Cooperativ silencing via the 5' and 3' UTRs of *msl-2* mRNA is independent of the poly(A). *EMBO J.* 18:6146-6154.
- Gebauer F, Ostareck DH, Grskovic M, Hentze MW (2001): Translational control of 15-lipoxygenase and *msl-2* mRNAs: Single regulators or corepressor assemblies? In *The Ribosome* (ed. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB) *Cold Spring Harbour Symposia on Quantitative Biology* LXVI:329-336.
- Gibson TJ, Tompson JD, Heringa J (1993): The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett.* 324: 361-366.
- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM (1989): Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination and expression of DNA and RNA genomes. *Nucl Acid Res.* 17:4713-4730.
- Gray NK, Hentze MW (1994): Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J.* 13: 3882-3891.
- Grüllich C, Duvoisin RM, Wiedmann M, van Leyen K (2001): Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte. *FEBS Lett.* 489: 51-54.
- Guitard E, Parker F, Millon R, Abecassis J, Tocqué B (2001): G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Lett.* 162:213-221.
- Habelhah H, Shokat K, Huang L, Ostareck-Lederer A, Burlingame AL, Hentze MW, Ronai Z (2001): Erk phosphorylation is required for nuclear export of hnRNP K and subsequent inhibition of mRNA translation. *Nature Cell Biology* 3: 325-330.
- Hake LE, Mendez R, Richter JD (1998): Specificity of RNA binding by CPEB: requirement for RNA recognition motifs and a novel zinc finger. *Mol Cell Biol.* 18: 685-693.
- Hanks SK, Hunter T (1995): Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J.* 9:576-596
- Harnisch C (2004): Analyse der Struktur des hnRNP K/ E1-DICE-Komplexes: Bedeutung der KH-Domänen in hnRNP K und hnRNP E1 für die Interaktion mit dem differentiation control element (DICE) der r15-LOX-mRNA, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Hashimoto K, Nakagawa Y, Morikawa H (2001): Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. *Carcinogenesis* 22:1965-1979.

Hellen CUT, Witherell GW, Schmid M, Shin SH, Pestova TV, Gil A, Wimmer E (1993): A cytoplasmic 57-kDa protein that is required for translation of picornavirus RNA by internal ribosomal entry is identical to the nuclear pyrimidine tract-binding protein. *Proc Natl Acad Sci* 15: 7642-7646.

Hellen CUT, Sarnow P (2001): Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Gen and Dev*. 15:1593-1612.

Hentze MW, Gebauer F, Preiss T (2007): cis-regulatory sequences and trans-acting factors in translation control. In *Translation Control in Biology and Medicine* (ed. Mathews N, Sonenberg N, Hershey JWB) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour NY.

Hershey JW, Monro RE (1966): A competitive inhibitor of the GTP reaction in protein synthesis. *J Mol Biol*. 18:68-76.

Hershey JWB, Merrick, WC (2000): Pathway and mechanism of initiation of protein synthesis. In *Translational Control of gene expression* (ed. Sonenberg N, Hershey JWB, Mathews MB) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour NY, pp33-88.

Hinnebusch AG (2006): eIF3: a versatile scaffold for translation initiation complexes. *Trends Biochem Sci*. 31: 553-562.

Hinnebusch AG, Dever TE, Asano K (2007): Mechanism of translation initiation in the yeast *Saccaromyces cerevisiae*. In *Translational Control in Biology and Medicine* (ed. Mathews M, Soneneberg N, Hershey JWB) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour NY pp225-268.

Höhne M, Thiele BJ, Prehn S, Giessmann B, Nack B, Rapoport SM (1988). Activation of translationally inactive lipoxxygenase mRNP particles from rabbit reticulocytes. *Biomed Biochem. Acta* 47: 75-78.

Holcik M, Liebhaber SA (1997): Four highly stable eukaryotic mRNAs assemble 3'-untranslated region RNA-protein complexes sharing cis and trans components. *Proc Natl Acad Sci. USA* 94: 2410-2414

Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002): Visualization of interaction among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* 9:789-798.

Huang H-K, Yoon H, Hanning EM, Donahue TF (1997): GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev*. 11: 2396-2413.

Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassel GJ, Condeelis J, Singer RH (2005): Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature* 438:512-515.

- Imai T, Tokunaga A, Yoshida T, Hashimoto M, Mikoshiba K, Weinmaster G, Nakafuku M, Okano H (2001): The neural RNA-binding protein Musashi1 translationally regulates mammalian numb gene expression by interacting with its mRNA. *Mol Cell Biol.* 21:3888-3900.
- Imataka H, Sonenberg N (1997): Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol.* 17:6940-6947.
- Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Lührmann R, Achsel T (2002): The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA* 8:1489-501.
- Irvine K, Stirling R, Hume D, Kennedy D (2004): Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. *Int J Dev Biol.* 48: 1065-1077.
- Jackson RJ (1982): The cytoplasmic control of protein synthesis. In *Protein biosynthesis in eukaryotes* (ed Perez-Bercoff R) 363-418, Plenum press, New York.
- Jackson RR, Hunt T (1983): Preparation and use of nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate for the translation of eukaryotic messenger RNA. *Methods Enzymol.* 96: 50-74.
- Jackson RJ (1991): Binding of Met-tRNA. In *Translation in Eukaryotes* (ed Trachsel H) CRC press Inc, Boca Raton FL 193-229.
- Jang SK, Krausslich HG, Nicklin MJ, Duke GM, Palmenberg AC, Wimmer E (1988): A segment of the 5' nontranslated region of encephalomyocarditis virus RNA directs internal entry of ribosomes during in vitro translation. *J Virol.* 62: 2636-2643.
- Johnson LN, Noble ME, Owen DJ (1996): Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell.* 85:149-158.
- Johnstone O, Lasko P (2004): Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. *Development* 131: 4167-4178.
- Kahvejian A, Svitkin YV, Sukarieh R, M'Boutschou MN, Sonenberg N (2005): Mammalian poly(A) binding protein is a eukaryotic translation initiation factor, which acts via multiple mechanisms. *Genes Dev.* 19:104-113.
- Kaminski A, Howell MT, Jackson RJ (1990): Initiation of encephalomyocarditis virus RNA translation: The authentic initiation site is not selected by a scanning mechanism. *EMBO J.* 9: 3753-3759.
- Kato JY, Takeya T, Grandori C, Iba H, Levy JB, Hanafusa H (1986): Amino acid substitutions sufficient to convert the nontransforming p60c-src protein to a transforming protein. *Mol Cell Biol.* 6: 4155-4160.
- Kawahara H, Imai T, Imataka H, Tsujimoto M, Matsumoto K, Okano H (2008): Neural RNA-binding protein Musashi1 inhibits translation initiation by competing with eIF4G for PABP. *J Cell Biol.* 181: 639-653.

Kawakami A, Tian Q, Duan X, Strueli M, Schlossmann SF, Anderson P (1992): Identification and functional characterization of a TIA-1-related nucleolysin. *Proc Natl Acad Sci. USA* 89:8681-8685.

Kedersha N, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999): RNA binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF2 alpha to the assembly of stress granules. *J Cell Biol.* 147:1431-1442.

Kedersha N, Stoecklin G, Ayodele M, Yacono P, Lykke-Andersen J, Fritzler MJ, Scheuner D, Kaufman RJ, Golan DE, Anderson P (2005): Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol.* 169:871-884.

Kennedy D, Wood S, Ramsdale T, Tam P, Steiner K, Mattick J (1997): Identification of a mouse homolog of the human ras-gap-sh3-domain binding protein and structural confirmation that these protein contain an rna recongition motif. *Biomed Pept Prot & Nucl Acids* 2-3:93-99.

Kennedy D, French J, Guitard E, Ru K, Tocque B, Mattick J (2001): Characterization of G3BPs: tissue specific expression, chromosomal localisation and rasGAP(120) binding studies. *J Cell Biochem.* 84:173-187.

Kiledjian M, Wang X, Liebhaber SA (1995): Identification oft two KH domain proteins in the α -globin mRNP stability complex. *EMBO* 14:4357-4364.

Kiledjian M, DeMaria CT, Brewer G, Novick K (1997): Identification of AUF-1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D) as a component of the α -globin mRNA stability complex. *Mol Cell Biol.* 17: 4870-4876.

Kim JH, Hahm B, Kim YK, Choi M, Jang SK (2000): Protein-protein interactions among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J. Mol. Biol.* 298: 395-405.

Kociok N, Esser P, Unfried K, Parker F, Schraermeyer U, Grisanti S, Toqué B, Heimann K (1999): Upregulation of the RAS-GTPase activating protein (GAP)-binding protein (G3BP) in proliferating RPE cells. *J Cell Biochem.* 74:194-201.

Kolupaeva, VG, Unbehaun A, Lomakin IB, Hellen CUT, Pestova TV (2005): Binding of eukaryotic initiation factor 3 to ribosomal 40S subunits and its role in ribosomal dissociation and anti-association. *RNA* 11: 470-486.

Kozak M (1978): How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell* 15: 1109

Kozak M (1980): Role of ATP in binding and migration of 40S ribosomal subunits. *Cell* 15: 1109-1123.

Kühn H, Tiele BJ, Ostareck-Lederer A, Stender H, Suzuki H, Yoshimoto T, Yamamoto S (1993): Bacterial expression, purification and partial characterization of recombinant rabbit reticulocyte 15-lipoxygenase. *Biochim Biophys Acta* 1168:73-78.

Kühn H, Borngräber S (1999): Mammalian 15-lipoxygenases. Enzymatic properties and biological implications. *Adv. Exp. Med. Biol.* 447: 5-28.

- Kühn U, Wahle E (2004): Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1678: 67-84.
- Kurzrock R, Gutterman JU, Talpaz M (1988): The molecular genetics of Philadelphia chromosome-positive leukemias. *N Engl J Med*. 319: 990-998.
- Ladomery M, Wade E, Sommerville J (1997): Xp54, the *Xenopus* homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. *Nucleic Acids Res*. 25:965-973.
- Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (1995): Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor eG (eIF4G) with picornaviral proteases: implications for cap-dependent translational initiation. *J Biol Chem*. 270:21975-21983.
- Lantz V, Amrosio L, Schedl P (1992): The *Drosophila orb* gene is predicted to encode sex-specific germline RNA-binding proteins and has localised transcripts in ovaries and early embryos. *Development* 115:75-88.
- Lejeune F, Li X, Maquat LE (2003): Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating and exonucleolytic activities. *Mol Cell* 12: 675-687
- Lin F, Wang R, Shen JJ, Wang X, Gao P, Dong K, Zhang HZ (2008): Knockdown of RCK/p54 expression by RNAi inhibits proliferation of human colorectal cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Biol Ther*. 7:1669-76.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi, K, Schnier J, Slonimski PP (1989): Birth of the D-E-A-D box. *Nature* 337: 121-122
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975): Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* 45:321-34.
- Lozzio BB, Lozzio CB, Bamberger EG, Feliu AS (1981): A multipotential leukemia cell line (K-562) of human origin. *Proc Soc Exp Biol Med*. 166:546-50
- Lu D, Yunis JJ (1992): Cloning, expression and localization of an RNA helicase gene from a human lymphoid cell line with chromosomal breakpoint 11q23.3. *Nucleic Acids Res*. 20:1967-1972
- Lykke-Andersen J. (2002): Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol*. 22:8114-8121.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg, N, Burley, SK (1999): Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell* 3: 707-716
- Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G (1992): Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogenous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol Cell Biol*. 12: 164-171.
- Matsui T, Hogetsu K, Usukura J, Sato T, Kumasaka T, Akao Y, Tanaka N (2006): Structural insight of human DEAD-box protein rck/p54 into its substrate recognition with conformational changes. *Genes to cells* 11: 439-452.

- Matsumoto K, Oh-Yong K, Hyungtae K, Akao, Y (2005): Expression of rck/p54, a DEAD-box RNA helicase in gametogenesis and early embryogenesis of mice. *Dev Dyn.* 233: 1149-1156.
- Merrick WC (1992): Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol. Rev.* 56: 291-315.
- Messias AC, Harnisch C, Ostareck-Lederer A, Sattler M, Ostareck, DH (2006): The DICE-binding activity of KH-domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosin phosphorylation. *J. Mol. Biol.* 361: 470-481.
- Methot N, Rom E, Olsen H, Sonenberg N (1997): The human homologue of the yeast Prt1 protein is an integral part of the eukaryotic initiation factor 3 complex and interacts with p170. *J Biol Chem.* 272: 1110-1116.
- Michael WM, Choi M, Dreyfuss G (1995): A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell* 83: 415-422.
- Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G (1997): The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* 16: 3587-3598.
- Minshall N, Walker J, Dale M, Standart N (1999): Dual roles of p82, the clam CPEB homolog, in cytoplasmic polyadenylation and translation masking. *RNA* 5:27-38.
- Minshall N, Thom G, Standart, N (2001): A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA* 7: 1728-1742.
- Minshall N, Standart, N (2004): The active form of Xp54 RNA helicase in translational repression is an RNA-mediated oligomer. *Nucleic Acids res.* 32:1325-1334.
- Minshall N, Reiter M-H, Weil D, Standart, N (2007): CPEB interacts with an ovary-specific eIF4E and 4E-T in early *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem.* 282:37389-37401.
- Moarefi I, LaFevre-Bernt M, Sicheri F, Huse M, Lee CH, Kuriyan J, Miller WT (1997). Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385:650-653.
- Morimoto K, Lin S, Sakamoto K (2007): The functions of RPS19 and their relationship to Diamond-Blackfan anemia: a review. *Mol Genet Metab* 90: 358-362.
- Muckenthaler M, Gray NK, Hentze MW (1998): IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol. Cell* 2: 383-388.
- Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione Morelli MA, Nilges M, Gibson TJ, Pastore A (1996): Three-dimensional structure and stability of the KH-domain: Molecular insights into the fragile X syndrome: *Cell* 85: 237-245.

- Naarmann IS (2006): Untersuchungen zur Stabilität von hnRNP K und hnRNP E1 während der erythroiden Reifung von MEL- und K562-Zellen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Naarmann IS, Harnisch C, Flach N, Kremmer E, Kühn H, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2008): mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem.* 283:18461-18472.
- Nakagawa Y, Morikawa H, Hirata I, Shiozaki M, Matsumoto A, Maemura K, Nishikawa T, Niki M, Tanigawa N, Ikegami M, Katsu K, Akao Y (1999): Overexpression of rck/p54, a DEAD-box protein, in human colorectal tumor. *Br J Cancer* 80:914-917.
- Nakamura A, Amikura R, Hanyu K, Kobayashi S (2001): Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development* 128: 3233-3242.
- Nakamura A, Sato K, Hanyu-Nakamura K (2004): *Drosophila* cup is an eIF4E-binding protein that associates with Bruno and regulates oskar mRNA translation in oogenesis. *Dev. Cell* 6:69-78.
- Nakamura M, Okano H, Blendy J, Montell C (1994): MUSASHI, a neural RNA-binding protein required for *Drosophila* adult external sensory organ development. *Neuron* 13: 67–81.
- Nelson MR, Leidal AM, Smibert CA (2004): *Drosophila* Cup is an eIF4E-binding protein that functions in Smaug-mediated translation repression. *EMBO J.* 23:150-159.
- Nover L, Scharf KD, Neumann D (1989): Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 9:1298-1308
- Nudel U, Salmon J, Fibach E, Terada M, Rifkind RA, Marks PA, Bank A (1977): Accumulation of α and β globin messenger RNAs in mouse erythroleukemia cells. *Cell* 12:463-469.
- Obrig TG, Culp WJ, McKeehan, WL, Hardestry B (1971): The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes. *J Biol Chem.* 246: 171-181.
- Okano H, Imai T, Okabe M (2002): Musashi: a translational regulator of cell fates. *J Cell Sci.* 115: 1355–1359.
- Orkin SH, Swan D, Leder P (1975): Differential expression of α and β globin genes during differentiation of cultured erythroleukemia cells. *J Biol Chem.* 250:8753-8760.
- Ostareck-Lederer A (1995): Zur Regulation der Translation der Retikulozyten-15-Lipoxygenase während der Entwicklung erythroider Zellen. Dissertation, Humboldt-Universität zu Berlin.

Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Standart N, Thiele BJ (1994): Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO* 13:1476-1481.

Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm W, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW (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 DH, Hentze MW (1998): Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2. *Trends Biochem. Sci.* 275: 409-411.

Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Shatsky IN, Hentze MW (2001): Silencing in erythroid differentiation: the 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104:281-290.

Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superi-Fuga G, Hentze MW (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 DH (2004): Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: The function of hnRNPs K and E1/E2. *Biol. Cell.* 96: 407-411.

Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Ruecknagel KP, Schierhorn A, Moritz B, Hüttelmaier S, Flach N, Handoko L, Wahle E (2006): Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J. Biol. Chem.* 281: 11115-11125.

Ostrowski J, Schullery DS, Denisenko ON, Higaki Y, Watts J, Aebersold R, Stempka L, Gschwendt M, Bomsztyk K (2000): Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *J Biol Chem.* 275: 3619-3628.

Parker F, Maurier F, Delumeau I, Duchesne M, Faucher D, Debussche L, Dugue A, Schweighoffer F, Tocque B (1996): A Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein. *Mol Cell Biol.* 16:2561-2569.

Pazman C, Mayes CA, Fanto M, Haynes SR, Mlodzik M (2000): Rasputin, the *Drosophila* homologue of the RasGAP SH3 binding protein, functions in ras- and Rho-mediated signaling. *Development.* 127:1715-1725.

Pause A, Sonenberg N (1992): Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J.* 11: 2643-2654.

Pause A, Méthot N, Sonenberg N (1993): The HRIGRXXR region of the DEAD box helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol.* 13: 6789-6798.

Paynton BV (1998): RNA-binding proteins in mouse oocytes and embryos: expression of genes encoding Y-box-protein, DEAD-box RNA helicase and poly(A)-binding proteins. *Dev Genet.* 23:285-298.

- Pelletier J, Sonenberg N (1988): Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature* 344: 320-325
- Pestova TV, Hellen CUT, Shatsky IN (1996a): Canonical eukaryotic initiation factors determine initiation of translation by internal ribosome entry. *Mol Cell Biol.* 16: 6859-6869.
- Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CUT (1996b): Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol.* 16: 6870-6878.
- Pestova TV, Shatsky IN, Fletcher SP, Jackson RJ, Hellen CUT (1998): A prokaryotic-like mode of cytoplasmic eukaryotic ribosome binding to the initiation codon during internal translation initiation of hepatitis C and classical swine fever virus RNA. *Genes Dev.* 12:67-83.
- Pestova TV, Hellen CUT (2000): The structure and function of initiation factors in eukaryotic protein synthesis. *Cell Mol Life Sci.* 57:651-67.
- Pestova TV, Lomakin I, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CUT (2000): The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403:332-335.
- Pestova TV, Kolupaeva VG (2002): The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 16: 2906-2922.
- Prigent M, Barlat I, Langen H, Dargemont C (2000): IkappaBalpha and IkappaBalpha/NF-kappa B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. *J Biol Chem.* 275:36441-36449.
- Proud CG (1995): PKR: a new name and new roles. *Trends Biochem Sci.* 20:241-246.
- Rackham O, Brown CM (2004): Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *EMBO J.* 23:3346-3355.
- Rapoport SM, Schewe T, Wiesner R, Halangk W, Ludwig P, Janicke-Höhne M, Tannert C, Hiebsch C, Klatt D (1979): The lipoxygenase of reticulocytes. Purification, characterization and biological dynamics of the lipoxygenase; its identity with the respiratory inhibitors of the reticulocyte. *Eur J Biochem.* 96:545-561.
- Rapoport SM, Schewe T (1986): The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 864: 471-495.
- Raught B, Gingras AC (2007): Signaling to translation initiation. In *translational Control in Biology and Medicine*. Mathews M, Sonenberg N, Dershey, (eds) Cold Spring Harbour Laboratory press, Cold Spring Harbour, NY
- Reimann I, Huth A, Thiele H, Thiele BJ (2002): Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'UTR control element DICE. *J Mol Biol.* 315:965-974.

Reuben RC, Wife RL, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1976): A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73(3):862-866.

Richter JD (2000): Influence of Polyadenylation-induced Translation on Metazoan Development and Neuronal Synaptic Function. In Translation control of gene expression (ed. Sonenberg N, Hershey J, Mathews M) *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour NY, pp785-806.

Rogers GW Jr, Richter NJ, Merrick WC (1999): Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem.* 274: 12236-12244.

Roussel RR, Brodeur SR, Shalloway D, Laudano AP (1991): Selective binding of activated pp60c-src by an immobilized synthetic phosphopeptide modeled on the carboxyl terminus of pp60c-src. *Biochemistry* 88:10696-10700.

Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N (1990): Bidirectional RNA helicase activity of eukaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol. Cell. Biol.* 10: 1134-1144.

Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ (1979): K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature.* 280:164-165.

Saksela K, Cheng G, Baltimore D (1995): Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *EMBO J.* 14:484-91.

Sambrook J, Russel DW (2001). *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74:5463-5467.

Sarre TF (1989): Presence of haemin-controlled eIF-2 alpha kinases in both undifferentiated and differentiating mouse erythroleukaemia cells. *Biochem J.* 262:569-74.

Schewe T, Rapoport S, Kühn H (1986): Enzymology and physiology of reticulocyte-15-lipoxygenase: comparison with other lipoxygenases. *Advan. Enzymol.* 58: 191-272.

Schewe T (2002): 15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol. Chem.* 383: 365-374.

Searfoss A, Dever TE, Wickner R (2001): Linking the 3' poly(A) tail to the subunit joining step of translation initiation: relations of Pab1p, eukaryotic translation initiation factor 5b (Fun12p), and Ski2p-Slh1p. *Mol Cell Biol.* 21:4900-4908.

Sheth U, Parker R (2003): Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 300:805-808.

Si K, Chaudhuri J, Chevesich J, Maitra U (1997): Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding translation initiation factor 6. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:14285-14290.

- Sigal E, Craik CS, Highland E, Grunberger D, Costello LL, Dixon RAF, Nadel JA (1988): Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157:457-464.
- Singer D, Cooper M, Maniatis GM, Marks PA, Rifkind RA (1974): Erythropoietic differentiation in colonies of cells transformed by Friend virus. *Proc Nat Acad Sci. USA* 71:2668-2670.
- Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G (1993a): The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif: *Nucl Acid Res.* 21: 1193-1198.
- Smillie DA, Sommerville J (2002): RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles. *J Cell Sci.* 115: 395-407.
- Sommerville J (1999): Activities of cold-shock domain proteins in translation control. *Bioessays* 21: 281-297.
- Soncini C, Berdo I, Draetta G (2001): Ras-GAP SH3 domain binding protein (G3BP) is a modulator of USP10, a novel human ubiquitin specific protease. *Oncogene.* 20:3869-3879.
- Sonenberg N, Hinnebusch AG (2009): Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell* 136:731-745.
- Stebbins-Boaz B, Cao Q, de Moor CH, Mendez R, Richter JD (1999): Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF4E. *Mol. Cell* 4:1017-1027.
- Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufmann RJ, Ramaiah KVA (2000): Phosphorylation of serine 51 in Initiation factor 2 α (eIF2 α) promotes complex formation between eIF2 α (P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry* 39:12929-12938.
- Suyama M, Doerks T, Braun IC, Sattler M, Izaurralde E, Bork P (2000): Prediction of structural domains of TAP reveals details of its interaction with p15 and nucleoporins. *EMBO Rep.* 1:53-58
- Tanner NK, Linder P (2001): DEXD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* 8:251-262.
- Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doere M, Linder P (2003): The Q-motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol. Cell* 11:127-138.
- Tarun SZ, Sachs AB (1996): Association of the yeast poly(A) binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO* 15:7168-7177.
- Tarun SZ, Wells SE, Deardoff JA, Sachs AB (1997): Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9046-9051.
- Taylor SJ, Shalloway D (1994): An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* 368: 867-871.

Teixeira D, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Brengues M, Parker R (2005): Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA*. 11:371-382.

Thiele BJ, Berger M, Huth A, Reimann I, Schwarz K, Thiele H (1999): Tissue-specific translational regulation of alternative rabbit 15-lipoxygenase mRNAs differing in their 3'-untranslated regions. *Nucleic Acids Res* 27(8):1828-36.

Thoma C, Ostareck-Lederer A, Hentze MW (2004): A poly(A) tail-responsive in vitro system for cap- or IRES-driven translation from HeLa cells. In: *mRNA processing and metabolism* (Schoenberg DR, ed) *Methods in Molecular Biology* 257:171-180, Humana press

Thomas SM, Brugge JS (1997): Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 13: 513-609.

Tian Q, Streuli M, Saito H, Schlossmann SF, Anderson P (1991): A polyadenylated binding protein localized to the granules of cytolytic lymphocytes induces DNA fragmentation in target cell. *Cell* 67:629-639.

Torti FM, Torti SV (2002): Regulation of ferritin genes and protein. *Blood* 99: 3505-3516.

Tourriere H, Gallouzi IE, Chebli K, Capony JP, Mouaikel J, van der Geer P, Tazi J (2001): RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol Cell Biol*. 21:7747-7760.

Tourriere H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003): The rasgap-associated endoribonuclease g3bp assembles stress granules. *J Cell Biol*. 160:823-831.

Trachsel H, Erni E, Schreier MH, Staehelin T (1977): Initiation of mammalian protein synthesis. II. The assembly of the initiation complex with purified initiation factors. *J. Mol. Biol.* 116:755-763.

Trachsel H (1996): Binding of initiator methionyl-tRNA to ribosomes. In *Translation Control*.pp113-138, Hershey JWB, Mathews MB, Sonenberg N (eds) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY

Tray J, Hodgman R, Richter JD (2000): The control of cyclin B1 mRNA translation during mouse oocyte maturation. *Dev Biol*. 221:1-9

van Dijk E, Cougot N, Meyer S, Babajko S, Wahle E, Séraphin B (2002): Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J*. 21:6915-6924.

Van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedemann M (1998). A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* 395: 392-395.

van Seuning I, Ostrowski J, Bustelo XR, Sleath PR, Bomsztyk K (1995): The K protein domain that recruits the interleukin 1- responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3- binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J. Biol Chem*. 270: 26976-26985.

- Voeltz GK, Steitz JA (1998): AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development. *Mol Cell Biol.* 18:7537-7545.
- Waggoner SA, Liebhaber SA (2003): Regulation of α -globin mRNA stability. *Exp. Biol. Med.* 228: 387-395.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982): Distantly related sequences in the α and β subunit of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1: 945-951.
- Walker J, Minshall N, Hake L, Richter J, Standart N (1999): The clam 3'UTR masking element-binding protein p82 is a member of the CPEB family. *RNA* 5:14-26.
- Wang X, Kiledjian M, Weiss IM, Liebhaber SA (1995): Detection and characterization of a 3' untranslated region ribonucleoprotein complex associated with human alpha-globin mRNA stability. *Mol Cell Biol.* 15:1769-1777. Erratum (1995) *Mol Cell Biol* 15: 2331.
- Wang Z, Day N, Trifillis P, Keledjian M (1999): An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 19: 4552-4560.
- Wang Z, Kiledjian M (2000): Identification of an erythroid-enriched endoribonuclease activity involved in specific mRNA cleavage. *EMBO J.* 19: 295-305.
- Weng Z, Thomas SM, Rickles RJ, Taylor JA, Brauer AW, Seidel-Dugan C, Michael WM, Dreyfuss G, Brugge JS (1994): Identification of Src, Fyn and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3-domains. *Mol. Cell. Biol.* 14: 4509-4521.
- Wessel D, Flügge UI (1984): A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 138:141-143.
- Weston A, Sommerville J (2006): Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucl Acid Res.* 34: 3082-3094.
- Whitfield ML, Sherlock G, Saldanha AJ, Murray JI, Ball CA, Alexander KE, Matese JC, Perou CM, Hurt MM, Brown PO, Botstein D (2002): Identification of genes periodically expressed in the human cell cycle and their expression in tumors. *Mol Biol Cell.* 13:1977-2000.
- Wickens M, Goodwin E, Kimble J, Strickland S, Hentze MW (2000): Translational Control of Developmental Decisions. In Translation control of gene expression (ed. Sonenberg N, Hershey J, Mathews M) *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, Cold Spring Harbour NY, pp 295-370.
- Wilhelm JE, Buszcak M, Sayles S (2005): Efficient protein trafficking requires Trailer Hitch, a component of a ribonucleoprotein complex located to the ER in *Drosophila*. *Dev Cell.* 5:675-685.
- Williams JC, Weijland A, Gonfloni S, Thompson A, Courtneidge SA, Superti-Furga G, Wierenga RK (1997) The 2.35 Å crystal structure of the inactivated form of chicken Src: a dynamic molecule with multiple regulatory interactions. *J Mol Biol.* 274:757-75.

Wilson JE, Pestova TV, Hellen CU, Sarnow P (2000 a): Initiation of protein synthesis from the A site of the ribosome. *Cell* 102: 511-520.

Wilson JE, Powell MJ; Hoover SE, Sarnow P (2000 b): Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol Cell Biol.* 20:4990-4999.

Wool I, Chan YL, Glück A (1996): Mammalian ribosomes: the structure and the evolution of proteins. In Translation Control, pp.685-732 (ed. Hershey JwB, Mathews MB, Sonenberg N) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY

Xu W, Harrison SC, Eck MJ (1997): Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature.* 385: 595-602.

Xu W, Doshi A, Lei M, Eck MJ, Harrison SC (1999): Crystal structures of c-Src reveal features of its auto-inhibitory mechanism. *Mol Cell* 3:629-638.

Zhang S, Williams CJ, Wormington M, Stevens A, Peltz SW (1999): Monitoring mRNA decapping activity. *Methods.* 17: 46-51.

Zucker-Franklin D, Graeves MF, Grossi C, Marmont AM (1988): Atlas of blood cells, Edi-Ernes, Milano, Lea & Febiger, Philadelphia.

ANHANG

| | |
|-----------------------------|----|
| Abkürzungsverzeichnis | II |
| Ergebnisse der Mascot-Suche | VI |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------|---|
| α - | anti-(Antikörper) |
| aa | Aminosäure |
| Abb | Abbildung |
| ADP | Adenosindiphosphat |
| Arg | Arginin |
| ATP | Adenosintriphosphat |
| AU | <i>absorbance unit</i> (Absorptionseinheit) |
| BCA | <i>bicinchoninic acid</i> (Bicinchoninsäure) |
| β 5' L | β -Globin-5' <i>leader</i> -Sequenz |
| bp | Basenpaar(e) |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| c-myc | zelluläres myc |
| c-src | zelluläres src |
| CAT | Chloramphenicol-Acetyl-Transferase |
| CD | Circulardichroismus |
| Ci | Curie |
| CPE | <i>cytoplasmic polyadenylation signal</i> , zytoplasmatisches Polyadenylierungssignal |
| CPEB | CPE-bindendes Protein |
| CrPV | <i>Cricket paralysis</i> - Virus |
| CSFV | <i>classical swine fever</i> -Virus |
| CTP | Cytidintriphosphat |
| ctrl. | <i>control</i> (Kontrolle) |
| d | Schichtdicke einer Küvette |
| DCC | <i>dosage compensation complex</i> |
| ddNTP | Didesoxynukleosidtriphosphat |
| DDX | DEAD-(Asp-Glu-Ala-Asp)-box-Polypeptid |
| DICE | <i>differentiation control element</i> |
| DMEM | <i>dulbecco's modified eagle medium</i> |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| dNTP | Desoxynukleotidtriphosphat |
| dsDNA | doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| 4E-BP | eIF4E-bindendes Protein |
| <i>E.coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| eIF | eukaryotischer Translationsinitiationfaktor |
| EMCV | Enzephalo-Myocarditis-Virus |
| EMSA | <i>electrophoretic mobility shift assay</i> |
| <i>et al.</i> | <i>et altera</i> |
| Erk | extrazellulär regulierte Kinase |
| ESI-MS | Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie |
| FCS | fetales Kälberserum |
| G3BP1 | Ras-GAP-SH3-Domänen bindendes Protein-1 |
| GAP | GTPase-aktivierendes Protein |

| | |
|----------------|--|
| GAPDH | Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase |
| GCN2 | <i>general control non-derepressible-2</i> |
| GDP | Guanosindiphosphat |
| GEF | <i>Guanosin nucleotid exchange factor</i> |
| Gly | Glycin |
| GMP-PNP | Guanosin-5'(β,γ -imido)-triphosphat |
| GRNA | RNA-Affinitätsreinigung durch GST- λ N |
| GSH | reduziertes Glutathion |
| GST | Glutathion-S-Transferase |
| GTP | Guanosintriphosphat |
| HeLa | Henrietta Lacks/ Helen Lane |
| His | Histidin |
| HKV | hypertonische Kaliumvorbehandlung |
| HMBA | Hexamethylenbisacetamid |
| hnRNP | <i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i> |
| hr15-LOX | humane Retikulozyten-15-Lipoxygenase |
| HRI | Häm-regulierter Inhibitor |
| HRP | <i>horse radish peroxidase</i> |
| HSQC | <i>heteronuclear single quantum coherence</i> |
| IB | Immunblot ("Western Blot") |
| Ile, I | Isoleucin |
| IMP1 | <i>insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 1</i> |
| IPTG | Isopropyl- β -D-thiogalactosid |
| IRE | <i>Iron response element</i> |
| IRES | interne ribosomale Eintritts-Stelle |
| IRP | <i>Iron regulatory protein</i> |
| kD | kilo-Dalton |
| K _D | Dissoziationskonstante |
| KH | hnRNP K-Homologie |
| KID | <i>kinase interaction domain</i> |
| KNS | <i>hnRNP K-specific nuclear shuttling signal</i> |
| Konz. | Konzentration |
| KP | Kopplungspuffer (GRNA/GST-pulldown) |
| λ | <i>lambda</i> (Wellenlänge oder Phage) |
| LB | Lauria Broth |
| Lck | <i>leukocyte/lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i> |
| LOX | Lipoxygenase |
| LOX-BP | LOX-mRNA bindende Proteine |
| MBSG | <i>MOPS buffered saline with glucose</i> |
| MEL | murine Erythro-Leukämie |
| Met | Methionin/ Methionyl- |
| min | Minute(n) |
| MOPS | 3-(N-Morpholino) propansulfonsäure |
| mRNA | <i>messenger ribonucleic acid</i> |
| mRNP | <i>messenger ribonucleoprotein particle</i> |
| msl | <i>male specific lethal</i> |

| | |
|---------------------|---|
| mTOR | <i>mammalian target of rapamycin</i> |
| myc | <i>myelocytomatosis viral oncogene</i> |
| Ni-NTA | Nickel-Nitrilotriessigsäure |
| NLS | <i>nuclear localisation signal</i> |
| NMR | Nuklear-Magnet-Resonanz |
| NOE | nuklearer Overhauser-Effekt |
| NP40 | Nonidet P 40 |
| NR | nicht-repetitive Sequenz der r15-LOX-mRNA-3'UTR |
| nt | Nukleotid |
| NTL | <i>nuclease treated lysate</i> (Nuclease-behandeltes Kaninchen-Retikulozyten-Lysat) |
| nut | <i>N-utilization site</i> |
| NWB | <i>North-Western-Blot</i> |
| ORF | <i>open reading frame</i> (offenes Leseraster) |
| PABPC | poly(A)-bindendes protein, <i>cytoplasmic</i> |
| PBS | <i>phosphat buffered saline</i> |
| PCR | Polymerase-Ketten-Reaktion |
| PERK | <i>PKR-like ER kinase</i> |
| pET | <i>plasmid for expression with T7-polymerase</i> |
| PKR | <i>protein kinase, double-stranded RNA-dependent</i> |
| PMSF | Phenyl-methyl-sulfonylfluorid |
| PRMT | Protein-Arginin-Methyl-Transferase |
| PS | Penicillin-Streptomycin-Mix |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| r15-LOX | Retikulozyten-15-Lipoxygenase |
| rr15-LOX | <i>rabbit</i> (Kaninchen)-Retikulozyten-15-Lipoxygenase |
| RNA | <i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure |
| RNAi | RNA-Interferenz |
| rpm | <i>rounds per minute</i> , Zentrifugationsgeschwindigkeit oder Schüttlergeschwindigkeit |
| rpL | ribosomales Protein der großen (<i>large</i>) UE |
| rpS | ribosomales Protein der kleinn (<i>small</i>) UE |
| RRL | <i>rabbit reticulocyte lysate</i> (Kaninchen-Retikulozyten-Lysat) |
| RRM | <i>RNA recognition motif</i> |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Reverse Transkriptase |
| ³⁵ S-Met | Methionin, Schwefel-35-markiert |
| S | Svedberg-Einheit |
| sDICE | <i>short DICE</i> -Sequenz (uccaa) |
| SDS-PAGE | Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese |
| sec | Sekunde |
| Ser | Serin |
| SG | Saccharose-Gradienten-Puffer |
| SH | src-Homologie |
| siRNA | <i>small interfering RNA</i> |
| src | <i>Rous sarcoma virus tyrosin kinase</i> |

| | |
|--------|--|
| ssDNA | einzelsträngige Desoxyribonukleinsäure |
| Tab | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TBE | Tris-Borat-EDTA |
| TE | Tris-EDTA (pH8) |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| TEV | <i>tobacco edge virus</i> |
| TIA-1 | T-Zell-internes Antigen-1 |
| TIAR | TIA-1 <i>related</i> |
| tRNA | Transfer-RNA |
| TTE | Tris-Taurin-EDTA |
| U | <i>unit</i> (Maß für die Enzymaktivität, herstellerabhängig) |
| UE | Untereinheit |
| UNR | <i>upstream of N-ras</i> |
| UTP | Uridintriphosphat |
| UTR | untranslatierte Region |
| UV | ultraviolett |
| VGL | <i>vegetal localisation element</i> |
| vergl. | vergleiche |
| wt | Wildtyp |
| Y | Tyrosin (Tyr) |
| z.B. | zum Beispiel |
| ZBP1 | <i>Zipcode</i> -bindendes Protein (= IMP1-Homologes) |

Ergebnisse der Mascot-Suche

Peptide Summary Report (./data/20080201/FurOxaEm.dat)

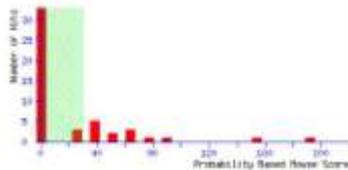
http://www.matrixscience.com/cgi/master_results.pl?file=./data/2008...

Mascot Search Results

Name : Hamisch
Email : chamsch@biochemtech.uni-halle.de
Search title :
MS data file : B-Ray_400-Dez_07-071207-C_Hamisch_151107_071207_R1_9_16_1.mgf
Database : MCR01c_20080125 (1877070 sequences; 262486256 residues)
Username : Hmsc_experts (Hmsc) (19952 sequences)
Timestamp : 1 Feb 2008 at 14:43:00 GMT
Protein hits : [q11365384](#) poly(rC) binding protein 1 [Homo sapiens]
[q113431146](#) poly(rC)-binding protein 2 isoform b [Homo sapiens]
[q11561734](#) Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal (Cytokeratin-24) (K24) (CK 24) (keratin-2)
[q11322943](#) Hsp 90A binding protein
[q11124143](#) Keratin, type II cytoskeletal 1 (Cytokeratin-1) (CK-1) (Keratin-1) (K1) (57 kDa cytokeratin) (Hair alpha protein)
[q113611429](#) keratin 4A [Homo sapiens]
[q11758111](#) putative open reading frame: duplication of the functional signal sequence stop codon, cDNA clone BC214, Scaffold Access
[q1145387438](#) keratin 77 [Homo sapiens]
[q11903881](#) keratin type II
[q11354345](#) keratin type II
[q114351447](#) heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform A2 [Homo sapiens]
[q113555839](#) keratin 9 [Homo sapiens]
[q1126111](#) unnamed protein product [Homo sapiens]
[q117587478](#) 23 ribosomal protein [Homo sapiens]
[q1127168877](#) basic helix-loop-helix domain containing, class B, 5 [Homo sapiens]

Probability Based Mowse Score

Ion score is $-10^4 \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event.
 Individual ion scores > 30 indicate identity or extensive homology (p<0.05).
 X-axis scores are derived from ion scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

[Help](#)
 Significance threshold p <= Max. number of hits
 Standard scoring Modified scoring Ion score or expert rat-off Show sub-sets
 Show pop-ups Suggest pop-ups Sort unassigned Deconvolve Require bold red
 Select All Select None Search Selected Error tolerant

1. [q11552682](#) Name: 77502 Score: 162 Queryes matched: 10 eMFL: 1.14
 poly(rC) binding protein 1 [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | Hr(expt) | Hr(calc) | Delta Miss Score | Expect | Rank | Peptide |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|------------------|--------|------|--|
| 1 | 230.7088 | 409.4010 | 409.4024 | 0.0005 | 0 | 44 | R.LNFGAR-S |
| 11 | 541.7790 | 1065.5432 | 1065.5455 | -0.0003 | 0 | 37 | R.LANFVSSGL-Q |
| 25 | 444.0010 | 1287.5074 | 1287.5077 | -0.0003 | 0 | 38 | R.INDSRQPER.L + Carbamidomethyl (C) |
| 26 | 444.0014 | 1287.5083 | 1287.5077 | 0.0005 | 0 | 44 | R.INDSRQPER.L + Carbamidomethyl (C) |
| 44 | 484.4213 | 1480.8421 | 1480.8424 | -0.0003 | 1 | 38 | R.LLMDKRVGIIIG-K |
| 45 | 741.4374 | 1480.8443 | 1480.8424 | 0.0017 | 1 | 37 | R.LLMDKRVGIIIG-K |
| 46 | 371.2188 | 1480.8461 | 1480.8424 | 0.0025 | 1 | 131 | R.LLMDKRVGIIIG-K |
| 142 | 499.9834 | 1480.8384 | 1480.8385 | -0.0001 | 1 | 40 | R.LLMDKRVGIIIG-K + Oxidation (O) |
| 143 | 757.4245 | 1512.4944 | 1512.4934 | 0.0011 | 1 | 46 | R.LLMDKRVGIIIG-K + Oxidation (O) |
| 144 | 675.3233 | 1672.5401 | 1672.5474 | 0.0065 | 1 | 75 | R.GIARIRGIVGIIIG-K.I + Oxidation (O) |
| 145 | 702.6636 | 1684.6036 | 1684.6055 | 0.0001 | 0 | 59 | R.KTSAQPPNAGQ.PFSTER.A + Oxidation (O) |
| 146 | 1051.4940 | 2184.9734 | 2184.9495 | 0.0029 | 0 | 41 | R.KTSAQPPNAGQ.PFSTER.A + Oxidation (O) |
| 147 | 426.0439 | 2175.1971 | 2175.1979 | 0.0005 | 2 | 14 | R.LIGDQKRVGIIIG-K + Oxidation (O) |
| 148 | 547.3709 | 2186.0517 | 2186.0490 | 0.0019 | 2 | 6 | R.INDSRQPER.L + Carbamidomethyl (C) |
| 149 | 871.4044 | 2981.1974 | 2981.1973 | 0.0001 | 1 | 31 | R.KLSDTADVQVAGQ.PFSTER.A + Oxidation (O) |
| 150 | 880.0613 | 3637.1027 | 3637.1040 | 0.0019 | 0 | 37 | R.QDQFARIGVQVAGQ.PFSTER.A + Oxidation (O) |
| 151 | 644.2948 | 3633.1381 | 3633.1337 | 0.0044 | 0 | 31 | R.QDQFARIGVQVAGQ.PFSTER.A + Oxidation (O) |
| 152 | 687.1010 | 3744.3791 | 3744.3763 | 0.0018 | 2 | 4 | R.LKREKTVGQVQVAGQ.PFSTER.A + Oxidation (O) |

Proteins matching the same set of peptides:
[q116748284](#) Name: 77474 Score: 162 Queryes matched: 10
 poly(rC) binding protein 1 [Homo sapiens]

2. [q113431146](#) Name: 38197 Score: 150 Queryes matched: 10 eMFL: 0.52
 poly(rC)-binding protein 2 isoform b [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | Hr(expt) | Hr(calc) | Delta Miss Score | Expect | Rank | Peptide |
|--------------------|----------|-----------|-----------|------------------|--------|------|-------------------------------------|
| 25 | 444.0010 | 1287.5074 | 1287.5077 | -0.0003 | 0 | 38 | R.INDSRQPER.L + Carbamidomethyl (C) |
| 26 | 444.0014 | 1287.5083 | 1287.5077 | 0.0005 | 0 | 44 | R.INDSRQPER.L + Carbamidomethyl (C) |
| 44 | 484.4213 | 1480.8421 | 1480.8424 | -0.0003 | 1 | 38 | R.LLMDKRVGIIIG-K |
| 45 | 741.4374 | 1480.8443 | 1480.8424 | 0.0007 | 1 | 37 | R.LLMDKRVGIIIG-K |
| 46 | 371.2188 | 1480.8461 | 1480.8424 | 0.0025 | 1 | 131 | R.LLMDKRVGIIIG-K |

Abb. A1.A: Ergebnisse der MASCOT-Suche der Peak-Liste 16_1

| Query | Observed | M (exp1) | M (calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|----------|-----------|-----------|---------|------|-------|--------|------|----------------------|
| 10 | 507.2753 | 1312.4360 | 1312.4363 | -0.0002 | 0 | 35 | 0.0973 | 1 | N.SCHNIGWYQDNR.G |
| 11 | 457.3628 | 1312.5930 | 1312.5969 | 0.0042 | 1 | (3) | 23 | 6 | N.SCHNIGWYQDNR.G |
| 12 | 438.5339 | 1312.5930 | 1312.5969 | 0.0030 | 1 | 17 | 7.0 | 1 | N.SCHNIGWYQDNR.G |
| 13 | 488.3189 | 1376.6732 | 1376.6772 | 0.0043 | 0 | 15 | 3.9 | 1 | N.SCHNIGWYQDNR.G |
| 14 | 502.7088 | 2007.0581 | 2007.0538 | -0.0043 | 2 | 6 | 19 | 1 | N.SLTVGQIEEIRHDELR.G |

Proteins matching the same set of peptides:
 gi114043872 Mass: 37407 Score: 35 Queries matched: 1
 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform B1 [Homo sapiens]
 gi117979124 Mass: 32467 Score: 35 Queries matched: 1
 PRECIPED: similar to heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 isoform 2 isoform B1 [Canis familiaris]
 gi113791474 Mass: 33144 Score: 35 Queries matched: 1
 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1, isoform CSA_2 [Homo sapiens]

17. gi155958899 Mass: 62027 Score: 34 Queries matched: 1 eMFL: 0.11
 keratin 9 [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | M (exp1) | M (calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|----------|-----------|-----------|---------|------|-------|--------|------|--|
| 11 | 458.9809 | 1249.0880 | 1249.0880 | 0.0000 | 1 | 12 | 4.3 | 1 | E.YGSGRGGKQVYR.G |
| 12 | 468.9714 | 1704.7424 | 1704.7481 | -0.0057 | 1 | 9 | 32 | 1 | N.FSDGKYLKGGKGGK.G + Carbamidomethyl (C) |
| 13 | 404.9381 | 1811.8123 | 1811.8111 | 0.0014 | 1 | 23 | 0.238 | 1 | N.SGSGKYLKGGKGGK.F |
| 14 | 158.6588 | 2197.9399 | 2197.9393 | 0.0006 | 1 | 18 | 0.32 | 1 | N.FSDGKYLKGGKGGK.F |
| 15 | 504.1167 | 3679.4557 | 3679.4554 | 0.0003 | 1 | 18 | 0.19 | 1 | N.LGSGRGGKQVYR.G + Oxidation (M) |

18. gi128017 Mass: 17492 Score: 34 Queries matched: 4 eMFL: 1.06
 unnamed protein product [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | M (exp1) | M (calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|----------|-----------|-----------|---------|------|-------|--------|------|---------------|
| 10 | 354.5418 | 1063.6036 | 1063.6076 | 0.0040 | 1 | 7 | 74 | 7 | N.LMVLQWYR.A |
| 11 | 583.2968 | 1164.7734 | 1164.7775 | -0.0040 | 0 | 34 | 0.234 | 1 | N.LMVLQWYR.A |
| 12 | 418.2919 | 1793.6781 | 1793.6757 | 0.0024 | 1 | 27 | 0.12 | 1 | N.LMVLQWYR.A |
| 13 | 498.5827 | 1492.7248 | 1492.7270 | -0.0022 | 1 | 2 | 58 | 8 | N.SYQQLGKGR.R |

Proteins matching the same set of peptides:
 gi11317080 Mass: 40259 Score: 34 Queries matched: 4
 keratin-13
 gi114073412 Mass: 50792 Score: 34 Queries matched: 4
 keratin 13 [Homo sapiens]
 gi1113581895 Mass: 63398 Score: 34 Queries matched: 4
 keratin 13 lipidolytic hyperkeratosis keratosis palmaris et plantaris, isoform CSA_b [Homo sapiens]
 gi1147744568 Mass: 53475 Score: 34 Queries matched: 4
 Keratin, type 2 cytoskeletal 10 (Cyokeratin-10) (K2-10) (Keratin-10) (K10)

14. gi17765076 Mass: 26099 Score: 32 Queries matched: 2 eMFL: 0.26
 83 ribosomal protein [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | M (exp1) | M (calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|----------|-----------|-----------|---------|------|-------|--------|------|--------------------------------------|
| 11 | 486.9439 | 1457.8219 | 1457.8242 | -0.0023 | 0 | 39 | 0.457 | 1 | N.SLTVGQIEEIRHDELR.G |
| 12 | 795.4887 | 1588.7938 | 1588.7939 | 0.0001 | 0 | 28 | 0.45 | 1 | N.SLTVGQIEEIRHDELR.G + Oxidation (M) |

Proteins matching the same set of peptides:
 gi19026433 Mass: 17099 Score: 32 Queries matched: 2
 ribosomal protein S31 (RPS3) [Homo sapiens]
 gi113077192 Mass: 20540 Score: 32 Queries matched: 2
 Tdknox (protein for ZMAD13544292) [Homo sapiens]
 gi115718087 Mass: 26671 Score: 32 Queries matched: 2
 ribosomal protein S3 [Homo sapiens]
 gi111304432 Mass: 18006 Score: 32 Queries matched: 2
 ZMO-90 ribosomal protein S3 [Homo sapiens]
 gi179061180 Mass: 29672 Score: 32 Queries matched: 2
 49B ribosomal protein S3

19. gi113749877 Score: 32 Queries matched: 1
 basic helix-loop-helix domain containing, class 3, 5 [Homo sapiens]
 Check to include this hit in error tolerant search

| Query | Observed | M (exp1) | M (calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|----------|----------|----------|--------|------|-------|--------|------|------------|
| 1 | 314.7088 | 699.4332 | 699.4327 | 0.0005 | 0 | 32 | 0.821 | 2 | N.SMDRIR.E |

Proteins matching the same set of peptides:
 gi113607286 Score: 32 Queries matched: 1

Peptide matches not assigned to protein hits: (no details shown so watch)

| Query | Observed | M (exp1) | M (calc) | Delta | Miss | Score | Expect | Rank | Peptide |
|-------|----------|-----------|-----------|---------|------|-------|--------|------|---|
| 1 | 392.2294 | 782.4328 | 782.4327 | -0.0001 | 0 | 27 | 0.12 | 1 | FVDFYR |
| 10 | 673.3225 | 1344.6404 | 1344.6400 | -0.0004 | 0 | 27 | 0.21 | 1 | NQIQLKGGK + Carbamidomethyl (C) / 3 Oxidation (M) |
| 11 | 683.4941 | 1485.7774 | 1485.7747 | 0.0027 | 1 | 22 | 0.36 | 1 | ADKRIIVGGGGK |
| 12 | 380.7881 | 719.3976 | 719.3966 | 0.0010 | 0 | 18 | 1.4 | 1 | FVDFYR |
| 13 | 418.4943 | 1254.4817 | 1254.4815 | -0.0002 | 1 | 18 | 1.1 | 1 | YDQDQVILLR |
| 14 | 275.5858 | 1173.4988 | 1173.4989 | 0.0001 | 0 | 14 | 1.7 | 1 | RKGGK + 2 Oxidation (M) / Oxidation (M) |
| 15 | 544.8885 | 1087.3844 | 1087.3838 | -0.0006 | 1 | 14 | 1.7 | 1 | ADKRIIVR |

Abb. A1.D: Ergebnisse der MASCOT-Suche der Peak-Liste 16_1, Fortsetzung

{MATRIX}
{SCIENCE} Mascot Search Results

Protein View

Match to: [gi|5453854](#) Score: 192
poly(rC) binding protein 1 [Homo sapiens]
 Found in search of D~~Raw_data~Dez_07~071207~C_Harnisch_191107_071207_KX_D_16_1.mgf

Nominal mass (M_r): 37502; Calculated pI value: 6.66
 NCBI BLAST search of [gi|5453854](#) against nr
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Homo sapiens](#)
 Links to retrieve other entries containing this sequence from NCBI Entrez:
[gi|460771](#) from [Homo sapiens](#)

Variable modifications: Carbamidomethyl (C), Oxidation (HW), Oxidation (M)
 Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
 Sequence Coverage: 34%

Matched peptides shown in **Bold Red**

```

1 MDAGVTESGL NVLTIRLLM HGKEVGSIIG KKGESVKRIR EESGARINIS
51 EGNCPERIIT LTGPTNAIFK AFAMIIDKLE EDINSSMTNS TAASRPPVTL
101 RLVVPATQCG SLIGKGGCKI KEIRESTGAQ VQVAGDMLPN STERAITIAG
151 VPQSVTECVK QICLVHLETL SQSPQGRVHT IPYQMPASS PVICAGGQDR
201 CSDAVGYPHA THDLEGPLD AYSIQGQHTI SPLDLAKLNQ VARQQSHFAM
251 MHGGTGFAGI DSSSPEVKGY WASLDASTQT THELTIPNNL IGCIIGRQGA
301 NINEIRQMSG AQIKIANPVE GSSGRQVTIT GSAASISLAQ YLINARLSSE
351 KMGCS
  
```

Abb. A2: Sequenzabdeckung der identifizierten Peptide aus 16_1, die hnRNP E1 zugeordnet wurden

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Harnisch, Christiane
Geburtsdatum 2. Januar 1980
Geburtsort Halle (Saale)
Familienstand ledig

Schulbildung

1986-1991 POS Paul Herrmann, Hettstedt
1991-1998 Gymnasium am Markt, Hettstedt
Abschluss: Abitur

Studium und wissenschaftliche Ausbildung

10/1998-07/2004 Martin-Luther-Universität (MLU) Halle-Wittenberg
Studiengang Biochemie, Diplom
Abschluss: Diplom

11/2003-7/2004 Diplomarbeit an der Martin Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Institut für Biochemie, bei PD. Dr. Ostareck zum Thema „Analyse
der Struktur des hnRNP K/ E1-DICE-Komplexes: Bedeutung der
KH-Domänen in hnRNP K und hnRNP E1 für die Interaktion mit
dem differentiation control element (DICE) der r15-LOX-mRNA.“

9/2004-12/2004 wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Biochemie und
Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1/2005-3/2009 Doktorandin am Institut für Biochemie und Biotechnologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abteilung Allgemeine Biochemie (Prof. Dr. E. Wahle)
Arbeitsgruppe Ostareck (PD Dr. Dirk Ostareck und PD Dr. Antje
Ostareck-Lederer)

1/2005-3/2009 Mitglied des Graduiertenkollegs GRK 1026 „Conformational
Changes in macromolecular Interactions“

1/2005-03/2008 Stipendiatin des GRK 1026

1/2005-12/2007 stellvertr. Doktoranden-Sprecherin des GRK 1026

seit 8/2009 wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und
Biotechnologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Publikationen

Harnisch C (2004): Analyse der Struktur des hnRNP K/ E1-DICE-Komplexes: Bedeutung der KH-Domänen in hnRNP K und hnRNP E1 für die Interaktion mit dem *differentiation control element* (DICE) der r15-LOX-mRNA. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Messias AC, Harnisch C, Ostareck-Lederer A, Sattler M, Ostareck, DH (2006): The DICE-binding activity of KH-domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosin phosphorylation. *J Mol Biol.* 361: 470-481.

Naarmann IS, Harnisch C, Flach N, Kremmer E, Kühn H, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2008): mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem.* 283: 18461-18472.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig verfasst und keine anderen außer den angegebenen Hilfsmitteln verwendet habe. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde.

Halle (Saale),

Ich danke

meinen Betreuern und Mentoren PD Dr. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk H. Ostareck für die Überlassung des interessanten Themas und die jahrelange Unterstützung

Isabel S. Naarmann für die gute Zusammenarbeit und die Durchführung der immunofluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen

Bodo Moritz für seine hilfreichen Tipps, besonders bei der Reinigung rekombinanter Proteine

Nadine Flach für die hervorragende technische Assistenz

allen Mitgliedern der Abteilung Allgemeine Biochemie für die angenehme Arbeitsatmosphäre

dem GRK 1026 für die Finanzierung und seinen Mitgliedern für die schöne und lehrreiche Zeit

Dr. Henning Urlaub und seinen Mitarbeitern für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen

allen freundlichen Korrektur-Lesern

und

meinen lieben Eltern.