

# **Die Translationsregulation des Transkriptionsfaktors NRF**

Der Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktor der Naturwissenschaften  
Dr. rer. nat.  
genehmigte Dissertation  
von

Dipl.-Biochemiker  
Marc René Reboll  
geboren am 25.01.1980 in Münster

**2008**

**Referentin:** PD Dr. Mahtab Nourbakhsh  
Institut für Pharmakologie  
Medizinische Hochschule Hannover

**Korreferent:** PD Dr. Ralf Gerhard  
Institut für Toxikologie  
Medizinische Hochschule Hannover

**Tag der Promotion:** 06.03.2008

## Zusammenfassung

Die Translation ist eine wichtige Instanz, um die Expression von regulatorischen Proteinen wie Transkriptionsfaktoren oder Wachstumsfaktoren an verschiedene zelluläre Zustände anzupassen. Der Transkriptionsfaktor NRF (NFκB reprimierender Faktor) reprimiert konstitutiv die Expression von proinflammatorischen Cytokinen. Die Expression von NRF wird über zwei Transkripte gewährleistet. Sie unterscheiden sich in der Länge der 3′untranslatierten Regionen. Beide Transkripte enthalten eine ausgeprägt strukturierte 5′UTR, die als Interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES) fungiert. Die letzten 150 Basen der 5′UTR bilden ein minimales IRES-Element.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung beider untranslatierten Regionen (UTRs) bei der Translationsregulation von NRF untersucht. Dazu wurden zunächst regulatorische Motive in der 5′ und 3′UTR charakterisiert. Im minimalen NRF-IRES-Element wurden verschiedene Strukturelemente, die die IRES-Aktivität vermitteln, identifiziert. Um die Regulation der NRF-IRES durch zelluläre Proteine besser zu verstehen, wurden IRES-bindende Proteine über dieses Element aufgereinigt. Dabei konnte das RNA-bindende Protein JKTBP1 identifiziert werden. Durch RNA-EMSA-Experimente wurde die direkte und spezifische Interaktion mit einem Strukturelement des minimalen IRES-Elements nachgewiesen. In bicistronischen Reporter-Experimenten konnte JKTBP1 schließlich als IRES trans-agierender Faktor (ITAF) am NRF-IRES-Element charakterisiert werden. Gleichzeitig wurde *in vitro* gezeigt, dass JKTBP1 das längere der beiden NRF-Transkripte im Bereich eines AU-reichen Elements (ARE) bindet.

Um den Einfluss von JKTBP1 an der 3′UTR von NRF untersuchen zu können, wurde ein monocistronisches Reporter-System etabliert. Das System erlaubte die Validierung der regulatorischen Einflüsse der einzelnen UTRs sowie die gemeinsame Betrachtung der 5′ und 3′UTR. Diese monocistronischen Reporter-Experimente zeigten zusammen mit Northern Blot Daten, dass JKTBP1 nicht nur als ITAF fungieren kann, sondern auch als ARE-bindendes Protein die Stabilität des längeren NRF-Transkripts erhöht. Darüber hinaus wurde die Möglichkeit, dass JKTBP1 eine Wechselwirkung zwischen 5′ und 3′UTR vermittelt, überprüft.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich das minimale NRF-IRES-Element aus verschiedenen Strukturmodulen zusammensetzt. Die Daten weisen JKTBP1 erstmalig eine konkrete Funktion als ITAF und ARE-BP zu und bestätigen die Bedeutung der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine bei der Regulation der Translation. Gleichzeitig wurde gezeigt, dass die Expression von NRF durch mehrere regulatorische Mechanismen auf mRNA-Ebene gesteuert wird. Dadurch wird eine stets konstante Expression von NRF und somit die kontinuierliche Repression von proinflammatorischen Cytokinen erreicht.

**Schlagwörter:** NRF (NFκB reprimierender Faktor), Interne Ribosomen Eintrittsstelle, mRNA-Stabilität

## Abstract

The control of translation is a powerful means for adapting the expression of proteins involved in gene control and cell growth to different cellular conditions. The transcription factor NRF (NF $\kappa$ B repressing factor) constitutively represses expression of proinflammatory cytokines. Expression of NRF is ensured by two mRNAs which differ in length of their 3' untranslated region (UTR). Both transcripts contain a strongly structured 5' UTR, which functions as an internal ribosome entry site (IRES). It was shown that the last 150 bases of the 5' UTR constitute a minimal IRES element.

This work deals with the role of both UTRs in translational control of NRF expression. Therefore, regulatory motifs in the 5' and 3' UTR were characterized. Several structural elements which contribute to IRES activity were identified in minimal NRF IRES element. To gain a better understanding of involvement of cellular proteins in NRF IRES function, NRF IRES binding proteins were purified and identified by peptide sequencing. One of the purified proteins was JKTBP1.

Electrophoretic mobility shift assays showed that JKTBP1 interacts in a direct and specific way with a structural element of the NRF IRES. Using bicistronic reporter assays, JKTBP1 was identified as an IRES trans-acting factor (ITAF) at the minimal NRF IRES element. Simultaneously, further *in vitro* data revealed that JKTBP1 is also able to bind the larger NRF transcript at its 3' UTR. The binding site was isolated to a region containing class II AU-rich elements (AREs).

To determine the effect of JKTBP1 binding to the 3' UTR of NRF, a new monocistronic reporter assay was established. This reporter system allows to study and evaluate the regulatory effects of 5' and 3' UTRs. Additionally, these reporter assays and a further northern blot analysis prove that JKTBP1 acts not only as an ITAF. It also increases RNA stability of the larger NRF transcript as an ARE binding protein. Finally, it was tested whether JKTBP1 is able to moderate an interaction between the 5' and the 3' UTR of NRF.

This study shows that the minimal IRES element is composed of several structural modules. For the first time in research, a distinct cellular function of JKTBP1 is presented. JKTBP1 acts as an ITAF and ARE-binding protein and confirms the regulatory role of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins in translational control.

Additionally, this work presents several regulatory mechanisms which control NRF expression on mRNA level. Thus, a continuous expression of NRF is achieved, and as a consequence the repression of proinflammatory cytokines is ensured.

**Key words:** NRF (NF $\kappa$ B repressing factor), Internal ribosome entry site, mRNA stability

---

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Die Translationsregulation bei Eukaryonten</b>	<b>1</b>
<b>1.2 Der Aufbau der mRNA</b>	<b>1</b>
1.2.1 Die Reifung der mRNA	1
1.2.2 Die untranslatierten Regionen der mRNA	3
<b>1.3 Die Translationsinitiation von Eukaryonten</b>	<b>5</b>
1.3.1 Der Mechanismus der cap-abhängigen Translationsinitiation	5
1.3.2 Weitere cap-abhängigen Translationsmechanismen	7
1.3.3 Die Regulation der Translationsinitiation	8
<b>1.4 Interne Ribosomen Eintrittsstellen (IRES)</b>	<b>9</b>
1.4.1 Virale IRES	9
1.4.2 Zelluläre IRES	10
1.4.3 Die Sekundärstruktur von IRES-Elementen	12
1.4.4 Die Translationsinitiation an IRES-Elementen	14
<b>1.5 Die Stabilität der mRNA</b>	<b>16</b>
1.5.1 Die Steuerung der mRNA-Stabilität durch AU-reiche Elemente	16
1.5.2 Der Abbau der mRNA	18
<b>1.6 Der NFκB reprimierende Faktor (NRF)</b>	<b>19</b>
1.6.1 Der Transkriptionsfaktor NFκB	19
1.6.2 Der NFκB reprimierende Faktor und seine duale Funktion	20
1.6.3 Die untranslatierten Regionen von NRF	20
1.6.3.1 Das minimale IRES-Element	20
1.6.3.2 Die 3'untranslatierten Regionen von NRF	21
<b>1.7 Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNP)</b>	<b>22</b>
1.7.1 Die hnRNP-Proteinfamilie	22
1.7.2 Die Strukturmerkmale von hnRNPs	23
1.7.3 hnRNPs als IRES trans-agierende Faktoren	24
<b>1.8 Das hnRNP-ähnliche Protein JKTBP1</b>	<b>25</b>
1.8.1 Die Strukturmerkmale von JKTBP1	25
1.8.2 Die Expression und Lokalisation von JKTBP1	26
1.8.3 Die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1	26
<b>1.9 Ziel der Arbeit</b>	<b>27</b>

---

<b>2. Ergebnisse</b>	<b>28</b>
<b>2.1 Charakterisierung von regulatorischen Elementen in der 5' UTR von NRF</b>	<b>28</b>
2.1.1 Die Herstellung von <i>in vitro</i> IRES-Plasmiden	28
2.1.2 Die Sekundärstruktur des minimalen NRF-IRES-Elements	30
2.1.3 Die Identifikation von JKTBP1 als NRF-IRES bindendes Protein	33
2.1.3.1 Der Nachweis von Protein-Komplexen am minimalen NRF-IRES-Element	33
2.1.3.2 Die Aufreinigung von Proteinen am minimalen NRF-IRES-Element	34
2.1.3.3 Die Expression von Glutathion-S-Transferase(GST)-Fusionsproteinen	36
2.1.3.4 Die Eingrenzung der JKTBP1-Bindungsstelle	37
2.1.3.5 Die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1	42
<b>2.2 Charakterisierung von regulatorischen Elementen in der 3' UTR von NRF</b>	<b>43</b>
2.2.1 Die Herstellung von <i>in vitro</i> 3'UTR-Plasmiden	43
2.2.2 JKTBP1-Bindungsstudien an der 3'UTR von NRF	45
2.2.3 Der Einfluss eines AU-reichen Elements auf die JKTBP1-Bindung	46
2.2.4 Die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1 an der 3'UTR	47
<b>2.3 Der Einfluss von regulatorischen Elementen der 5'UTR auf die Aktivität des NRF-IRES-Elements</b>	<b>48</b>
2.3.1 Das Reportersystem	49
2.3.2 Die Herstellung von bicistronischen Reportergenplasmiden	49
2.3.3 Die Kontrolle der bicistronischen RNA	51
2.3.4 Die Auswirkung der Struktur auf die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements	53
2.3.5 JKTBP1 als NRF-IRES aktivierender Faktor	56
2.3.5.1 Die Herstellung von JKTBP1-Expressionsplasmiden	57
2.3.5.2 Der Einfluss der Überexpression von JKTBP1 auf die NRF-IRES-Aktivität	58
2.3.5.3 Die Spezifität von JKTBP1	61
2.3.5.4 Die Vermittlung der JKTBP1-Wirkung durch RNA-Bindung	62
2.3.5.5 Der Einfluss des Knockdowns von JKTBP1 auf die NRF-IRES-Aktivität	64

---

<b>2.4 Die Funktion von regulatorischen Elementen der 5´ und 3´UTR im Reportergensystem</b>	<b>66</b>
2.4.1 Das monocistronische Reportergensystem	67
2.4.2 Die Herstellung von monocistronischen Reportergenplasmiden	67
2.4.3 Die Reportergen-Expression nach DNA-Transfektion	68
2.4.4 Die Reportergen-Expression nach RNA-Transfektion	69
2.4.5 Der Einfluss der regulatorischen 5´ und 3´ Motive bei der JKTBP1-Überexpression	73
2.4.6 Die Vermittlung der JKTBP1-Wirkung an der 5´UTR	77
2.4.7 Die Auswirkung des JKTBP1 Knockdowns auf die 5´ und 3´UTR	78
<b>2.5 Die Wirkung von JKTBP1 <i>in vivo</i></b>	<b>81</b>
2.5.1 Der Einfluss von JKTBP1 auf die NRF-mRNA-Spezies	81
2.5.2 Der Einfluss von JKTBP1 auf die NRF-mRNA-Stabilität	83
2.5.3 Der Einfluss von JKTBP1 auf den endogenen NRF-Level	85
<b>2.6 Die Auswirkung verschiedener Stimuli auf JKTBP1</b>	<b>86</b>
2.6.1 Die JKTBP1-Expression und -Lokalisation nach IL-1 Stimulation	86
2.6.2 Die JKTBP1-Expression und -Lokalisation nach Hitzeschock	89
<b>3. Diskussion</b>	<b>91</b>
<b>3.1 Die regulatorischen Motive in der 5´UTR von NRF</b>	<b>91</b>
3.1.1 Die Struktur motive im minimalen IRES-Element	91
3.1.2 Die Funktion der Haarnadel I des minimalen IRES-Elements	92
3.1.3 Die Funktion der Haarnadel II des minimalen IRES-Elements	93
3.1.4 Die regulatorische Funktion der 5´ UTR von NRF	94
3.1.5 Die Funktion der regulatorischen Motive in der 5´UTR von NRF	96
<b>3.2 Die regulatorischen Motive in der 3´UTR von NRF</b>	<b>97</b>
3.2.1 Die Funktion der 3´ UTR von NRF	97
3.2.2 Die Funktion der regulatorischen Motive in der 3´UTRs von NRF	99
<b>3.3 Die Rolle von JKTBP1 bei der Translationsregulation von NRF</b>	<b>99</b>
3.3.1 JKTBP1 als IRES trans-agierender Faktor (ITAF)	99
3.3.2 JKTBP1 als ARE-bindendes Protein	101
3.3.3 Der Einfluss von JKTBP1 auf den Proteinlevel von NRF	103
<b>3.4 Der JKTBP1-Level in Abhängigkeit von zellulären Stimuli</b>	<b>103</b>
<b>3.5 Mögliche Wechselwirkungen zwischen untranslatierten Regionen</b>	<b>104</b>
<b>3.6 Das Modell der Translationsregulation von NRF</b>	<b>106</b>

---

<b>4. Material und Methoden</b>	<b>108</b>
<b>4.1. Material</b>	<b>108</b>
4.1.1 Chemikalien	108
4.1.2 Puffer und Lösungen	110
4.1.3 Antikörper und Enzyme	114
4.1.4 DNA- und Proteinstandards	115
4.1.5 Primer und siRNA-Oligonukleotide	116
4.1.6 Verwendete Plasmide	118
4.1.7 Kulturmedien und Kulturagar	119
4.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme	120
4.1.9 Verbrauchsmaterialien	120
4.1.10 Geräte	120
4.1.11 Kits	122
4.1.12 Sonstiges	122
<b>4.2. Methoden</b>	<b>123</b>
4.2.1. Arbeiten mit <i>Escherichia coli</i>	123
4.2.1.1 Herstellung hitzekompetenter <i>E.coli</i>	123
4.2.1.2 Kultivierung von <i>E.coli</i>	123
4.2.1.3 Anlage von Stammkulturen	123
4.2.1.4 Transformation	123
4.2.1.5 Plasmidpräparationen	124
4.2.1.6 Präparation von GST- Fusionsproteinen	124
4.2.2. Molekularbiologische Arbeiten	125
4.2.2.1 in vitro Transkription	125
4.2.2.2 Aufreinigung von in vitro transkribierter RNA	126
4.2.2.3 Polyadenylierung von in vitro transkribierter RNA	127
4.2.2.4 Radioaktive 5´ End- Markierung von in vitro transkribierter RNA	127
4.2.2.5 RNA-Sequenzierung und RNA-Strukturanalyse	128
4.2.2.6 In vitro Translation	130
4.2.2.7 Mutagenese	130
4.2.2.8 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	131
4.2.2.9 Gelextraktion	131
4.2.2.10 Restriktionsschnitte	132
4.2.2.11 Ligation	133
4.2.2.12 Agarosegelelektrophorese von DNA	133

4.2.2.13 Gelelektrophorese von RNA	133
4.2.2.13.1 Native Agarosegelelektrophorese	133
4.2.2.13.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese	133
4.2.2.13.3 Denaturierende Acrylamidgel	134
4.2.2.14 Phenol/Chloroform Aufreinigung von DNA	134
4.2.2.15 Elektrophoretische Auftrennung von RNA und RNA-Proteinkomplexen (RNA-EMSA)	134
4.2.2.16 DNA-Sequenzierung	135
4.2.2.17 Polymerase Kettenreaktion (PCR)	136
4.2.2.18 Klenow-Reaktion	137
4.2.2.19 Isolierung von polyA-RNA aus Gesamt-RNA	137
4.2.2.20 Spezifische Detektion von endogener RNA	138
4.2.2.20.1 Transfer von RNA auf Nylonmembran (Northern Blot)	138
4.2.2.20.2 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden	138
4.2.2.20.3 Hybridisierung und Stringenzwäsche	139
4.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten	139
4.2.3.1 Aufreinigung von RNA-bindenden Proteinen	139
4.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford	139
4.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese	140
4.2.3.4 Coomassie-Färbung von Acrylamidgelen	140
4.2.3.5 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran (Western Blot) und Detektion durch Antikörper	140
4.2.4 Arbeiten mit eukaryontischen Zellen	142
4.2.4.1 Kultivierung von Zellen	142
4.2.4.2 Lagerung von Zellen	142
4.2.4.3 Transfektion von HeLa B-Zellen	142
4.2.4.3.1 Transfektion von HeLa B-Zellen mit DNA	142
4.2.4.3.2 Transfektion von HeLa B-Zellen mit RNA	143
4.2.4.3.3 Transfektion von HeLa B-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden	143
4.2.4.3.4 Nukleofektion von HeLa B-Zellen RNA	144
4.2.4.4 IL-1 Stimulation von HeLa B-Zellen	144
4.2.4.5 Zelllyse	144
4.2.4.5.1 Herstellung von Cytosol- und Kernextrakten	144
4.2.4.5.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten	145

4.2.4.5.3 Zellyse für Reporterexperimente	145
4.2.4.6 RNA Präparation aus HeLa B-Zellen	145
4.2.4.7 Luziferase-Messung	145
4.2.4.8 Behandlung von Zellen mit Actinomycin D	146
4.2.4.9 Hitzeschock von HeLa B-Zellen	146
4.2.4.10 Fluoreszenzmikroskopie	146
<b>5. Anhang</b>	<b>147</b>
<b>5.1 Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>5.2 Sequenzen</b>	<b>159</b>
5.2.1 Untranslatierte Regionen von NRF	159
5.2.2 Sequenz von NRF	160
5.2.3 Sequenz von JKTBP1	161
<b>5.3 Strukturvorhersagen</b>	<b>162</b>
5.3.1 Strukturvorhersage des vollständigen und minimalen NRF-IRES-Elements	162
5.3.2 Strukturvorhersage der Basen 568-653 des minimalen NRF-IRES-Elements	163
5.3.3 Strukturvorhersage der 3'UTR von NRF	164
Lebenslauf	
Liste der Publikationen	
Selbstständigkeitserklärung	
Danksagungen	

## Abkürzungsverzeichnis

% (w/v)	weight/volume: die vorangegangene Prozentangabe meint, der Zahlenwert der Masse des eingewogenen Stoffes in g beträgt den angegebenen Prozentsatz des Volumens des Lösungsmittels
% (v/v)	volume/volume: die vorangegangene Prozentangabe meint, der Zahlenwert des Volumens des betreffenden Stoffes beträgt den angegebenen Prozentsatz des Volumens des Lösungsmittels
3'UTR	3' untranslatierte Region
4E-BP	eIF4E-Bindeproteine
5'UTR	5' untranslatierte Region
A	Adenin
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AMP	Ampicillin
AP-1	Aktivierendes Protein 1
Apaf1	Apoptischer Peptidase aktivierender Faktor 1
ARE	AU-reiches Element
ARE-BP	ARE-bindendes Protein
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
AUF1/ hnRNP D	AU-Sequenzen bindendes Protein 1/heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein D
BiP	Immunoglobulin schwere Kette bindendes Protein
bp	Basenpaare
BSA	(bovine serum albumine) Rinderserumalbumin
C	Cytosin
Cat1	Cationischer Aminosäure Transporter-1
CD	Circulardichroismus
c-DNA	Komplementäre DNA
CPE	Cytoplasmatisches Polyadenylierungselement
cpm	Erfasste Zerfälle pro Minute ( counts per minute)
CPSF	Spaltungs- und Polyadenylierungsfaktor (Cleavage and polyadenylation factor)
CrPV	Cricket paralysis Virus
CstF	Spaltung stimulierender Faktor (Cleavage stimulation factor)
CTP	Cytidintriphosphat
DAP	Apoptose assoziiertes Protein 5 (Death associated protein 5)
DcpS	Cap-Struktur spaltendes Enzym (Scavenger decapping enzyme)
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	die Desoxynukleotide ATP, CTP, TTP, GTP
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
eIF	Eukaryontischer Initiationsfaktor
EMCV	Encephalomyocarditis Virus
ESE	Exon Spleiß-Verstärker (Exon Splicing Enhancer)
ESS	Exon Spleiß-Repressor (Exon Splicing Silencer)

FBP	Formin bindendes Protein
FGF-2	Fibroblasen Wachstumsfaktor 2
FL	Firefly-Luziferase
FMDV	Maul- und Klauenseuche Virus
G	Guanin
GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HAV	Hepatitis A Virus
HCV	Hepatitis C Virus
hnRNP	Heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein
HRI	Häm-regulierter Inhibitor der Translation
HRV	Humanes Rhinovirus
IFN- $\beta$	Interferon $\beta$
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
iNOS	Induzierbare NO-Synthase
IPS	Ionisationen pro Sekunde (Ionisation per second)
IRES	Interne Ribosomen Eintrittsstelle
ISE	Intron Spleiß-Verstärker (Intron Splicing Enhancer)
ISS	Intron Spleiß-Repressor (Intron Splicing Silencer)
ITAF	IRES trans-agierender Faktor
JKTBP	hnRNP D ähnliches Protein, JKT-Bindeprotein
Kan	Kanamycin
kb	“Kilobasen”, 1000 bp
Luc	Luziferase
m7G	7-Methylguanosid (Cap-Struktur)
mIRES	Minimales IRES-Element
mRNA	Boten-RNA (Messenger RNA)
NDV	New Castle Disease Virus
NES	Nukleäres Export-Signal
NF- $\kappa$ B	Nukleärer Factor $\kappa$ B
NLS	Kernlokalisierungssignal (Nuclear Localisation Signal)
NRE	Negativ regulatorisches Element (Negative Regulatory Element)
NRF	NF- $\kappa$ B reprimierender Faktor
nt	Nukleotide
OD <sub>x</sub>	Optische Dichte bei x nm
ORF	Offenes Leseraster (Open Reading Frame)
PABP	Poly(A)-Binding Protein
PAN	PABP-abhängige Nuklease
PAP	Poly(A)-Polymerase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKR	Durch doppelsträngige RNA aktivierte Proteinkinase R
Poly A	Polyadenylierungssignal
PTB / hnRNP I	Polypyrimidin-Sequenzen bindendes Protein (Polypyrimidine Tract-Binding Protein)

PV	Poliovirus
RBD	RNA-bindende Domäne
RHD	Rel-Homologie Domäne
RL	Renilla Luziferase
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
RRM	RNA-erkennendes Motiv (RNA recognition motif)
SF 1	Spleiß-Faktor 1
SV 40	Simian Virus 40
T	Thymin
TNF $\alpha$	Tumor Necrosis Factor $\alpha$
t-RNA	Transfer RNA
TTP	Thymidintriphosphat
U	Uracil
U2AF	U2 notwendiger Faktor (U2 auxiliary factor)
Unr	Upstream of N-ras
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
VEGF	Vaskulärer Endothel Wachstumsfaktor
VPg	Viruscodierendes Protein
X	eine beliebige Aminosäure
XIAP	x-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein

Verwendete Einheiten, sofern sie nicht zu den SI-Basiseinheiten gehören:

°C	Grad Celsius, $x \text{ °C} = (x + 273,15) \text{ K}$
Ci	Curie ( $1 \text{ Ci} = 3,7 \cdot 10^7 \text{ kBq}$ )
Da	Dalton, $1 \text{ Da} = 1,66 \cdot 10^{-27} \text{ kg}$
g	Gramm, $1 \text{ g} = 10^{-3} \text{ kg}$
g	Beschleunigung eines fallenden Körpers, $1 \text{ g} = 9,81 \text{ m/s}^2$
h	Stunde, 3600 s
l	Liter, $1 \text{ l} = 10^{-3} \text{ m}^3$
M	Molar, $1 \text{ mol/l} = 10^3 \text{ mol/m}^3$
min	Minute, 60 s
rpm	Rotationen pro Minute, $1 \text{ rpm} = 1/60 \text{ s}^{-1}$
S	Svedberg, $1 \text{ S} = 10^{-13} \text{ s}$
V	Volt, $1 \text{ V} = 1 \text{ kg m}^2 / (\text{s}^3 \text{ A})$
U	unit; Einheit, die die Aktivität eines Enzyms beschreibt; die Definition je nach Enzym unterschiedlich

## 1. Einleitung

### 1.1 Die Translationsregulation von Eukaryonten

Die Expression der 35.000 Gene des humanen Genoms wird auf vielen Ebenen kontrolliert. Angefangen mit der Freilegung der DNA aus der kompakten Chromatin-Struktur werden Transkription und Translation streng reguliert. Während die primäre Regulation auf Ebene der Transkription stattfindet, dient die Regulation der Translation vor allem als schnelle und selektive Reaktion auf zelluläre Stresszustände oder Veränderungen der physiologischen Bedingungen. Die Regulation auf mRNA-Ebene überbrückt die Zeit, die für die Anpassung des Genexpressionsmusters auf veränderte äußere Bedingungen benötigt wird (Holcik & Sonenberg, 2005).

Auch der Vergleich von Genom- und Proteom-Analysen unterstreicht die Bedeutung der Translationsregulation: die mRNA-Levels korrelieren häufig nicht mit den zugehörigen Proteinmengen (Celis et al., 2000; Ideker et al., 2001), die Proteinexpression muss daher auf mRNA-Ebene moduliert werden.

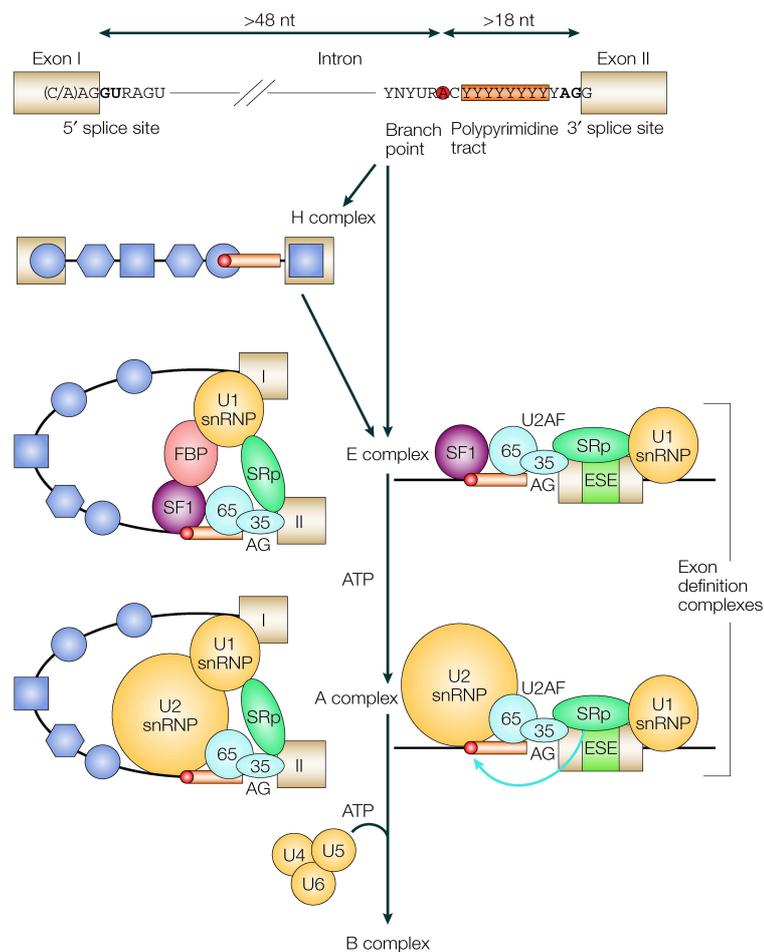
In dieser Arbeit soll insbesondere die Translationsregulation des NFκB-reprimierenden Faktors (NRF siehe 1.6) untersucht werden. Zunächst wird der allgemeine Aufbau von eukaryontischen mRNAs beschrieben (1.2). Die Translation selbst kann dann in die Abschnitte Initiation, Elongation und Termination (Mathews et al., 2000) unterteilt werden. Vor allem die Translationsinitiation als geschwindigkeitsbestimmender Schritt wird stark reguliert. Neben der cap-abhängigen Translationsinitiation, die bei der überwiegenden Mehrheit der mRNAs stattfindet, besitzen rund 3-5% der mRNAs - darunter auch die mRNA von NRF - die Möglichkeit, über einen cap-unabhängigen Mechanismus translatiert zu werden (Johannes et al, 1999). Beide Mechanismen werden in den folgenden Abschnitten betrachtet (1.3 und 1.4). Abgesehen von der Translationsaktivität beeinflusst ebenso die Stabilität der mRNA die Expression von Proteinen. Die mRNA-Stabilität wird über regulatorische Elemente in der 3' untranslateden Region vermittelt, eine Gruppe von Elementen wird hier vorgestellt (1.5). Sowohl die Aktivität der cap-unabhängigen Translation als auch die Funktion der 3'UTR-Elemente wird durch Proteine moduliert. Auch diese werden hier beschrieben (1.7 und 1.8).

### 1.2 Der Aufbau der mRNA

#### 1.2.1 Die Reifung der mRNA

Nach der Transkription reift die prä-mRNA im Kern in mehreren Reaktionen zur mRNA. Schon während der Transkription wird die prä-mRNA modifiziert. Am 5' Ende wird die Cap-Struktur, ein 7-Methylguanosid (m7G), über eine 5'-5'Triphosphatbrücke gebunden (Sachs et al., 1997). Diese Struktur ist für das darauf folgende RNA-Spleißen, den mRNA-Kernexport (Lewis & Izaurralde, 1997) sowie für die Translationsinitiation im Cytosol von

Bedeutung. Nach der Transkription wird die prä-mRNA am 3'Ende polyadenyliert, die poly(A)-Sequenz trägt maßgeblich zur Stabilität und zur Translationseffizienz der mRNA bei (Jacobson, 1996). Neben diesen Modifikationen werden beim RNA-Spleißen nicht-codierende Bereiche, die Introns, aus der RNA entfernt und die codierenden Exons zusammengefügt. Dieser Prozess wird vom Spleißosom organisiert, einem makromolekularen Ribonukleokomplex, der sich während des Spleißens dynamisch verändert (Jurica & Moore, 2003). Die Bildung der Komplexe wird durch Konsensus-Sequenzen an den Enden der Introns vermittelt.



**Abb. 1.1: Die Bildung des Spleißosoms**

Die Abbildung zeigt die Anordnung der Spleißosom-Komponenten an den 5' und 3' Spleißstellen. Die linke Seite der Abbildung bezieht sich auf die Ausbildung einer Brücke zwischen den Intron-Enden, die rechte Seite zeigt die Bildung des Proteinkomplexes zur Erkennung des Exons.

Im E-Komplex bindet der snRNP U1 an die 5'Spleißstelle, der splicing factor 1 (SF1) bindet den Verzweigungspunkt (Branchpoint) und der U2 auxiliary factor (U2AF), ein Dimer aus 65 und 35 kD Untereinheiten, interagiert mit der Polypyrimidin-Sequenz und der 3'Spleißstelle. Zusätzlich ist die Bindung eines SF-Proteins an einen Exon-Splicing-Enhancer (ESE) gezeigt. Zur Bildung einer Brücke zwischen den Intron-Enden tritt ein weiteres Protein – FBP (formin binding protein) hinzu. Durch den Austausch der Proteine SF 1 und FBP durch snRNP U2 formiert sich der A-Komplex. Auch dieser muss in der „Brückenform“ vorliegen, damit der weitere Spleiß-Prozess unter Verwendung der snRNP U4, U5 und U6

stattfinden kann (B-Komplex). Die Bindung von Proteinen an die Intron-Sequenz ist im H-Komplex gezeigt, sie verhindert oder fördert die Verwendung von alternativen Spleißstellen in der Intron-Sequenz (Die Abbildung stammt aus Matlin et al., 2005).

Der Spleiß-Prozess ist in **Abb. 1.1** (Matlin et al., 2005) gezeigt. Das Intron wird von der 5' (Donor-) und 3' (Akzeptor-) Spleißstelle eingegrenzt, im Intron befindet sich ein Verzweigungspunkt (Branchpoint) und eine Polypyrimidin-Sequenz. Das Spleißosom besteht aus fünf nukleären Ribonukleoprotein-Partikeln (snRNPs U1, U2, U4, U5, U6) sowie weiteren Proteinen. Ein Teil dieser Faktoren lagert sich an die Konsensus-Sequenz der 3' Spleißstelle an (**E-Komplex**). Durch den Austausch zweier Proteine lagert sich dieser Komplex in den **A-Komplex** um. Während dieser Phase wird das Exon erst als solches definiert, beide Komplexe werden daher auch als Exon-Definitions-Komplexe bezeichnet (Berget, 1995; Lim & Hertel, 2004). Nach der Erkennung des Exons verändert sich die Anordnung der Faktoren im Komplex, um das Intron zu überbrücken (linke Seite der Abbildung); danach treten weitere snRNPs hinzu und vermitteln das Herausschneiden des Introns (B-Komplex).

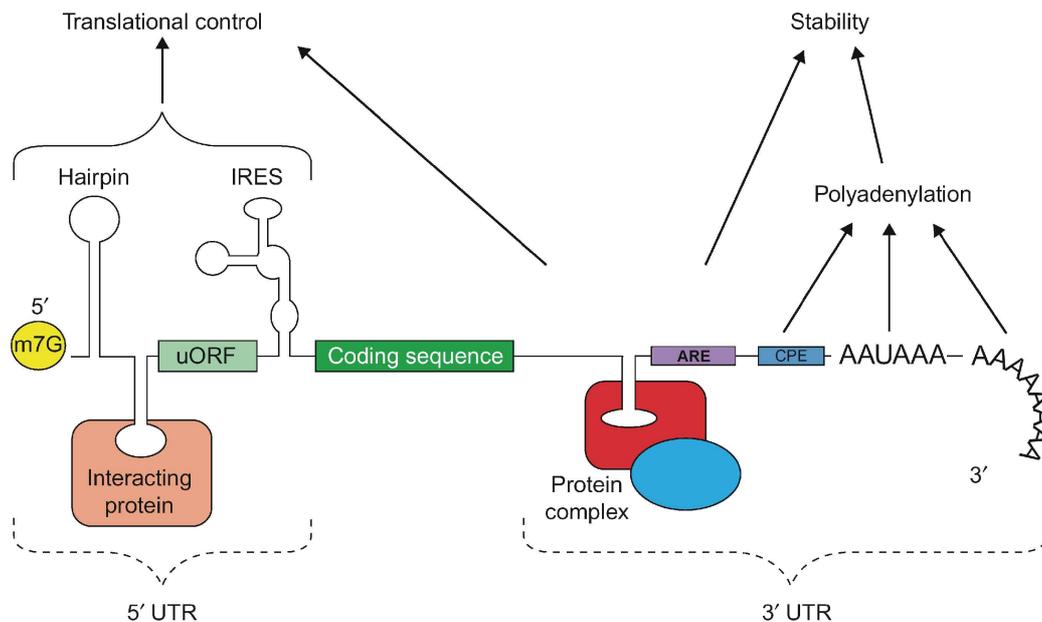
Ein weiterer wichtiger Prozess, der eng mit dem klassischen Spleißen verbunden ist, ist das alternative Spleißen. Durch die Kombination verschiedener Spleißstellen entstehen unterschiedliche Spleißprodukte. Sowohl in Exons als auch in Introns finden sich Sequenzen, die ein Spleißen an einer bestimmten Spleißstelle fördern oder unterdrücken. Enhancer-Sequenzen [Exon splicing Enhancer (ESE) und Intron splicing Enhancer (ISE)] werden häufig von SR(Serin-Arginin)-Proteinen (Graveley, 2000) gebunden. Diese fördern die Verwendung dieser Spleißstelle, als Beispiel ist in **Abb. 1.1** die Bindung eines SR-Proteins an ein ESE gezeigt. Im Gegenzug existieren Silencer-Sequenzen (ESS in Exons und ISS in Introns), an die häufig heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs) binden. Diese verhindern die Benutzung der Spleißstelle. Die Bindung von mehreren Proteinen, die den Kontakt von Spleißkomponenten an alternative Spleißstellen behindern oder fördern, ist hier als **H-Komplex** gezeigt.

Nach dem Spleißprozess wird die reife mRNA mit Cap-Struktur und poly(A)-Sequenz aus dem Kern ins Cytosol transportiert, dort findet die Translation statt.

### 1.2.2 Die untranslatierten Regionen der mRNA

Eukaryontische mRNAs enthalten neben der Cap-Struktur (m7G), der codierenden Sequenz und dem poly(A)-Ende zwei untranslatierte Regionen (UTR), die 5' und 3' zur codierenden Sequenz liegen. Regulatorische Motive in der 5' und 3'UTR kontrollieren unter anderem die Translationseffizienz der mRNA (van der Velden & Thomas, 1999), die mRNA-Lokalisation (Jansen, 2001) und die Stabilität der mRNA (Garneau et al., 2007). Einige Motive sind in **Abb. 1.2** zusammengefasst: So senken stabile Sekundärstrukturen und offene Leseraster (uORF) in der 5'UTR die Translationseffizienz der mRNA (Pelletier & Sonenberg, 1985;

Kozak, 1989). Ein Teil solcher mRNAs wird über einen cap-unabhängigen Mechanismus translatiert (Hellen & Sarnow, 2001). Dabei binden die Ribosomen direkt in der Nähe des Startcodons die mRNA. Das dafür notwendige Strukturelement in der 5'UTR ist die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES), die häufig durch eine Reihe von Haarnadel- und Y-Stammstrukturen gebildet wird (siehe 1.4). Die Aktivität dieser Strukturelemente kann durch die Bindung verschiedene Proteine moduliert werden (Stoneley & Willis, 2004).



**Abb. 1.2: Regulatorische Motive in den untranslatierten Regionen**

Exemplarisch sind mögliche regulatorische Motive der 5' und 3' UTR dargestellt (Die Abbildung stammt aus Mignone et al., 2002, und wurde hier modifiziert).

Auch die 3' UTR enthält regulatorische Motive: Fast alle mRNAs besitzen ein Polyadenylierungssignal, welches die Herstellung des poly(A)-Endes vermittelt (Colgan & Manley, 1997; Wickens, 1990). Das Polyadenylierungssignal wird dabei von den Faktoren CstF (cleavage stimulation factor) sowie CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) erkannt und gebunden. Beide Faktoren vermitteln die Spaltung der prä-mRNA 20-40 Nukleotide nach dem Poly(A)-Signal im Bereich eines GU-reichen Elements. Dort beginnt die Polyadenylierung durch die Poly(A)-Polymerase.

Außer dem klassischen Poly(A)-Signal tragen einige mRNAs cytoplasmatische Polyadenylierungs-Elemente (CPE) in ihrer 3' UTR. Diese ermöglichen die spätere Verlängerung der poly(A)-Sequenz im Cytosol (Mendez & Richter, 2001). Des Weiteren kontrollieren AU-reiche Elemente (AREs) die Stabilität der mRNA (Barreau et al., 2005). Die Wirkung der AREs kann ebenfalls durch die Bindung von Proteinen beeinflusst werden (siehe 1.5).

Die große regulatorische Bedeutung untranslatierter Regionen kann anhand von Erkrankungen, die durch Mutationen in den UTRs ausgelöst werden, demonstriert werden: So ist die erhöhte Anzahl von CTG-Tripletts in der 3'UTR der cAMP-abhängigen Proteinkinase-mRNA die Ursache der Myotonen Dystrophie (Conne et al., 2000).

### 1.3 Die Translationsinitiation bei Eukaryonten

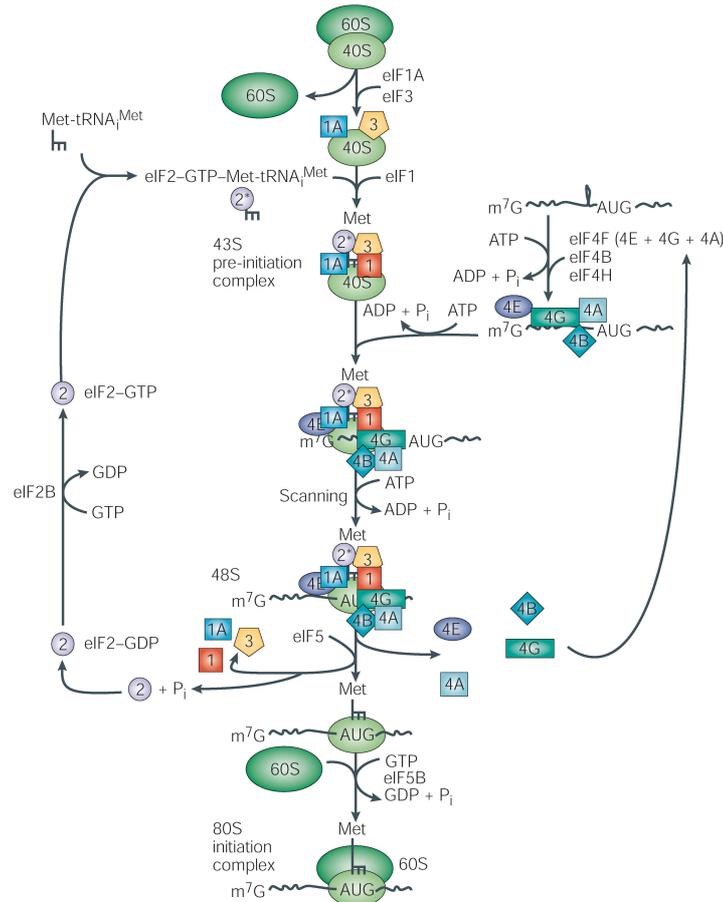
Die Translation bei Eukaryonten lässt sich in die Phasen Initiation, Elongation und Termination einteilen (Mathews et al., 2000). Die Initiation ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, der einer strengen Regulation unterliegt. Die Mehrzahl der eukaryontischen mRNAs wird über einen cap-abhängigen Mechanismus translatiert. Die 5'Cap-Struktur (m7G) ist dabei von zentraler Bedeutung, sie dient als Plattform für eine Reihe von eukaryontischen Initiationsfaktoren (eIFs).

#### 1.3.1 Der Mechanismus der cap-abhängigen Translationsinitiation

An der Formation des Translationsinitiationskomplexes sind insgesamt elf eukaryontische Initiationsfaktoren beteiligt (Merrick & Hershey, 2000). Die cap-abhängige Translationsinitiation unterteilt sich in drei Schritte: Cap-Bindung, „Scanning“ und die Organisation des gesamten Ribosoms am Translationsstart. Der hier vorgestellte Mechanismus (**Abb. 1.3**) wird auch als „Scanning“-Mechanismus bezeichnet.

Zu Beginn des mehrstufigen Prozesses binden die Initiationsfaktoren eIF1A und eIF3 an die 40 S-Ribosomen-Untereinheit. Durch die Bindung wird eine verfrühte Assoziation mit der 60 S Untereinheit verhindert. An diese ribosomale Untereinheit bindet der ternäre Komplex aus dem Initiationsfaktor eIF2, der Initiator t-RNA und GTP. Dies führt zur Bildung des 43 S prä-Initiationskomplexes (Hershey & Merrick, 2000).

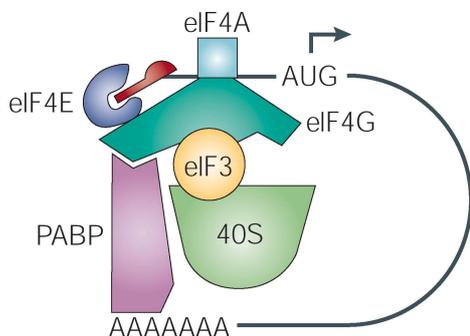
Die Erkennung der 5'Cap-Struktur der mRNA erfolgt durch das cap-bindende Protein eIF4E. Es liegt im cap-bindenden Komplex eIF4F mit den Proteinen eIF4G und eIF4A vor (Gingras et al., 1999). eIF4G ist ein Gerüstprotein, das gleichzeitig mit seiner N-terminalen Domäne an eIF4E bindet und mit dem C-Terminus eine Bindung zu eIF3 vermittelt (Lamphear et al., 1995; Ohlmann et al., 1996). Das Protein eIF4A ist eine RNA-Helicase, deren Aktivität durch die Faktoren eIF4B und eIF4H gesteigert wird (Richter-Cook et al., 1998; Rogers et al., 1999). Die Helicase kann Sekundärstrukturen in der mRNA unter ATP-Verbrauch lösen. Die mRNA samt der genannten Faktoren und der 43 S prä-Initiationskomplex treten zum 48 S Komplex zusammen. Unter ATP-Verbrauch wandert dieser zum Startcodon (Pestova & Hellen, 1999). Dort zerfällt der Initiationskomplex mit Hilfe des Faktors eIF5, die 60 S ribosomale Untereinheit tritt unter GTP-Verbrauch (eIF5B) hinzu und bildet den 80 S Initiationskomplex. Dieser kann in die Elongationsphase eintreten.



**Abb. 1.3: Die cap-abhängige Translationsinitiation**

Ein Schema der Translationsinitiation bei Eukaryonten ist gezeigt (Die Abbildung stammt aus Holcik et al., 2000c).

Während der Translation konnte eine Interaktion der 5'Cap-Struktur mit dem poly(A)-Ende der mRNA, das vielfach vom poly(A)-bindenden Protein (PABP) gebunden wird, gezeigt



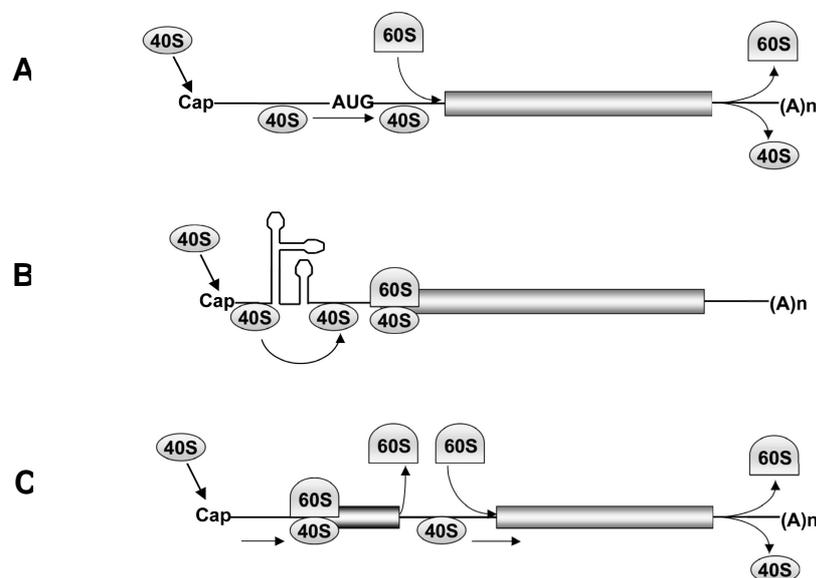
**Abb. 1.4: Die Zirkularisierung der mRNA**

Die Initiationsfaktoren eIF4E, eIF4G und das PABP vermitteln die Zirkularisierung der mRNA (Die Abbildung stammt aus Holcik et al., 2000c).

werden. Diese Wechselwirkung wird über die Faktoren eIF4E und eIF4G sowie über das PABP vermittelt. Die Interaktion führt zu einer erhöhten Translationrate (Borman et al., 2000; Gallie, 1991; Preiss & Hentze, 1998). Zum einen können somit ausschließlich intakte mRNAs translatiert werden, die über eine Cap-Struktur und ein poly(A)-Ende verfügen. Zum anderen scheint die Zirkularisierung der mRNA (**Abb.1.4**) den Wiedereinstieg der Ribosomen zu erleichtern (Jacobson, 1996; Kahvejian et al., 2001).

### 1.3.2 Weitere cap-abhängige Translationsmechanismen

Außer dem klassischen „Scanning“-Mechanismus gibt es drei weitere cap-abhängige Translationsmechanismen (**Abb. 1.5**). Diese wurden bislang vor allem in viralen mRNAs beschrieben. Der „Scanning“-Mechanismus geht davon aus, dass die 40 S ribosomale Untereinheit nach der Bindung an die Cap-Struktur zum ersten AUG wandert und dort die Translation startet. Wenn sich das Startcodon jedoch in einem ungeeigneten Kontext befindet und von Basensequenzen, die einen Translationsstart erschweren, eingerahmt wird, kann ein Startcodon übersprungen werden. In diesem als „Leaky-Scanning“ bezeichneten Prozess findet der Translationsstart erst an einem Startcodon weiter stromabwärts statt (Kozak, 1995). Dieser Mechanismus wurde unter anderem im Hepatitis B Virus (HBV, Lin & Lo, 1992) und beim Simian Virus 40 (SV40, Sedman et al., 1989) beschrieben (**Abb. 1.5 A**). Befinden sich Haarnadelstrukturen in der 5'UTR zwischen Cap-Struktur und Startcodon, postuliert der „Scanning“-Mechanismus, dass die Strukturen von der RNA-Helicase eIF4A auf dem Weg zum AUG gelöst werden (Kozak, 1986; Pelletier & Sonenberg, 1987). Sehr stabile Sekundärstrukturen ( $\Delta G < -50$  kcal/mol) würden den „Scanning“-Mechanismus jedoch blockieren. So wurde unter anderem für adenovirale mRNAs (Yueh & Schneider, 1996) gezeigt, dass die 40 S Untereinheit solch stabile Haarnadelstrukturen überspringt und danach weiter in Richtung des AUG wandert. Dieser Mechanismus wird als „Ribosomales-Shunting“ bezeichnet (**Abb. 1.5 B**).



**Abb.1.5: Drei weitere Cap-abhängige Translationsmechanismen**

Die 40 S Untereinheit bindet am Cap und wandert zum Startcodon. Dort tritt die 60 S Untereinheit hinzu und die Translation beginnt. **A.** Leaky-Scanning: die 40 S Untereinheit überlässt Startcodons. **B.** „Ribosomales-Shunting“: Die 40 S Untereinheit überspringt stabile Sekundärstrukturen auf dem Weg zum Startcodon. **C.** Reinitiation: Die 40 S Untereinheit bleibt auch nach der Translation an die mRNA assoziiert und translatiert mit einer neuen 60 S Untereinheit ein weiteres Cistron (aus Lopez-Lastra et al., 2005).

Wenn zwei codierende Sequenzen auf einer mRNA liegen - wie bei der GCN4-mRNA von Hefen - können die 40 S Untereinheiten nach der Translation des ersten Cistrons an der mRNA assoziiert bleiben und mit einer neuen 60 S Untereinheit das zweite Cistron translatieren. Dieser Reinitiations-Mechanismus (**Abb. 1.5 C**) reguliert in Abhängigkeit des Aminosäure-Levels die Translation der GCN4-mRNA. Die Frequenz der Reinitiation richtet sich dabei nach besonderen Sequenzen am Stoppcodon des ersten Cistrons sowie nach dem Abstand zum nächsten Startcodon (Hinnebusch, 1990).

### 1.3.3 Die Regulation der Translationsinitiation

Die Translationsinitiation bei Eukaryonten unterliegt einer strengen Regulation: Die Erkennung der Cap-Struktur wird durch den Faktor eIF4E vermittelt. Der Proteinlevel und der Phosphorylierungs-Status von eIF4E haben großen Einfluss auf die Translationsinitiation (Rousseau et al., 1996; Manzella et al., 1991). Durch die Phosphorylierung von eIF4E werden die RNA-Bindungsseigenschaften verbessert (Minich et al., 1994); ebenso korreliert der Phosphorylierungs-Status mit der Translationsrate (Proud, 1992). Damit konnte gezeigt werden, dass wachstumshemmende Bedingungen wie Hitzeschock (Duncan et al., 1987), Mitose (Bonneau & Sonenberg, 1987) oder Poliovirus-Infektionen (Kleijn et al., 1995) zur Dephosphorylierung von eIF4E und zur Reduktion der cap-abhängigen Proteinsynthese führen.

Weiterhin gibt es eine kleine Familie an inhibitorischen Proteinen: die 4E-Bindeproteine (4E-BPs) (Pause et al., 1994). Sie enthalten ein Aminosäure-Motiv, das auch im N-Terminus von eIF4G vorliegt. So sind sie in der Lage, die Bindung zwischen eIF4E und eIF4G und damit die Bildung des eIF4F-Komplexes zu inhibieren. Die Inhibition wird durch die Unterphosphorylierung der 4E-BPs ausgelöst, als Folge wird die cap-abhängige Translation reduziert. Die Unterphosphorylierung wird bei zellulärem Stress wie einer Virusinfektion beobachtet (Gingras et al., 1996). Die 4E-BPs modulieren demzufolge durch die Bindung an eIF4E die Aktivität dieses Faktors.

Mit eIF2 wird ein weiterer Initiationsfaktor unter Stressbedingungen reguliert. eIF2 besteht aus drei Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) und ist Teil des ternären Komplexes. Der Faktor trägt GTP, welches beim Aufeinandertreffen der 40 S und 60 S ribosomalen Untereinheit zu GDP hydrolysiert wird (Sachs et al., 1997). Der Nukleotid-Austauschfaktor eIF2B ersetzt das GDP an eIF2 wieder durch GTP. eIF2 kann dann erneut einen ternären Komplex bilden. Die Untereinheit eIF2 $\alpha$  wird durch verschiedene Kinasen, die alle durch zellulären Stress aktiviert werden, phosphoryliert. Die Kinase HRI (Härm-regulierter Inhibitor der Translation) phosphoryliert eIF2 $\alpha$  nach Hitzeschock (Chen & London, 1995), die PKR (durch doppelsträngige RNA aktivierte Proteinkinase) in Folge einer Virusinfektion (Schmedt et al., 1995). Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  führt zu einer Inhibition von eIF2B durch eIF2.

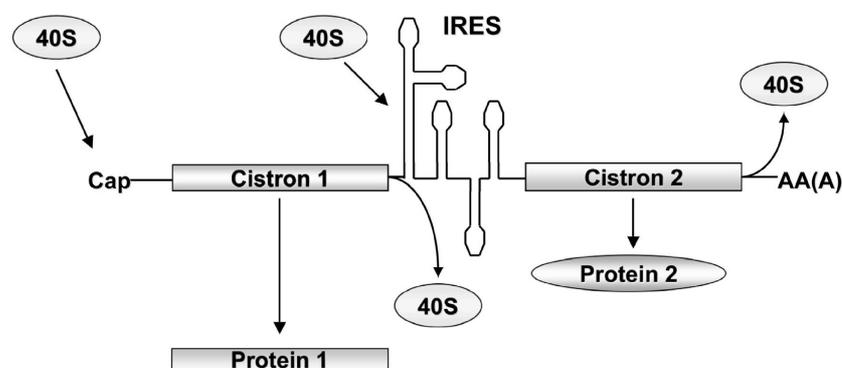
Dadurch kann GDP nicht mehr gegen GTP ausgetauscht werden, und eIF2 kann keine neuen ternären Komplexe bilden (Clemens & Bommer, 1999). Auch in diesem Fall führt zellulärer Stress also zu einer Inhibition der cap-abhängigen Translation.

## 1.4 Interne Ribosomen-Eintrittsstellen (IRES)

Interne Ribosomen-Eintrittsstellen sind stark strukturierte Regionen in der 5'UTR, die einen direkten Einstieg der Ribosomen an diesem Strukturelement ermöglichen. Die Translation ist daher unabhängig von der 5'Cap-Struktur.

### 1.4.1 Virale IRES

Die ersten internen Ribosomen-Eintrittsstellen wurden in den 5'UTRs der Poliovirus(PV)-RNA (Pelletier & Sonenberg, 1988) und in der Encephalomyocarditis Virus (EMCV)-RNA (Jang et al., 1988) entdeckt. Beide Viren gehören zu den Picornaviren. Ihr Genom befindet sich auf einem RNA(+)-Strang von rund 7500 b Länge. Alle Picornaviren besitzen ein lange 5'UTR (610-1500 b), die zu stabilen Sekundärstrukturen gefaltet ist. Eine Cap-Struktur (m7G) ist nicht vorhanden, die Viren besitzen stattdessen einen 5'pUp Terminus, der von dem Viruscodierenden Protein (VPg) kovalent gebunden wird (Nomoto et al., 1977). Das Fehlen der Cap-Struktur und die ausgeprägten Sekundärstrukturen in der 5'UTR zeigen, dass die viralen RNA-Stränge über einen anderen Mechanismus translatiert werden müssen. Der Nachweis, dass dies der Fall ist, wurde durch bicistronische Reporter-genkonstrukte erbracht (Pelletier & Sonenberg, 1988; Jang et al., 1988). Die virale 5'UTR, und damit auch die IRES, wurde zwischen zwei Reporter-genen platziert. Das erste Reporter-gen konnte über einen cap-abhängigen Mechanismus translatiert werden. Nach dem ersten Cistron springen die Ribosomen ab. Die Translation des zweiten Cistrons kann nur durch die IRES vermittelt werden. Der Test zeigt, dass die Translation der viralen RNAs keine Cap-Struktur benötigt (Jackson et al., 1995).



**Abb.1.6: Die Identifikation von IRES-Elementen durch bicistronische Reporter-RNAs**

Die Abbildung zeigt ein Schema des bicistronischen Testsystems. Wird das zweite Cistron translatiert, fungiert die insertierte Sequenz als IRES-Element (Die Abbildung stammt aus Lopez-Lastra et al., 2005).

Anhand dieses Reportersystems wurde eine Reihe weiterer viraler IRES-Elemente, unter anderem in der RNA des Rhinovirus (Borman & Jackson, 1992), im Hepatitis C Virus (HCV) (Tsukiyama-Kohara et al., 1992) und im Cricket Paralysis Virus (CrPV) (Wilson et al., 2000) identifiziert.

Die IRES-Elemente der Picornaviren unterschieden sich allerdings in Sequenz und Struktur deutlich von einander (Jackson et al., 1990). Auch bestehen Unterschiede darin, welche eukaryontischen Translationsinitiationsfaktoren (siehe **1.3**) für die IRES-abhängige Translation benötigt werden: Die Translation durch das HCV-IRES erfordert den Einsatz aller Initiationsfaktoren, abgesehen von den Faktoren der eIF4F-Familie (Pestova et al., 1998). Währenddessen benötigt das IRES-Element in der CrPV-RNA keinen der eukaryontischen Initiationsfaktoren (Wilson et al., 2000; Pestova et al., 2004).

Trotz ihrer Diversität wurden die picornaviralen IRES-Elemente in drei Klassen eingeteilt. Vergleiche der Sequenzen und Sekundärstrukturvorhersagen sowie Anforderungen an eine effiziente Translation waren dabei ausschlaggebend (Sachs et al., 1997): Bei TypI-IRES-Elementen (Entero- und Rhinovirus-Gruppe) wie zum Beispiel dem Poliovirus-IRES befindet sich das IRES-Element 50 bis 100 Nukleotide vor dem Startcodon. Bei TypII-(Cardio- und Aphthovirus-Gruppe, z.B. EMCV) und TypIII-(Hepadnaviren)IRES-Elementen bindet die 40 S Untereinheit direkt im Bereich des Startcodons. Bei TypIII-Elementen erstrecken sich die RNA-Strukturen des IRES-Elements noch über das Startcodon hinaus in die codierende Sequenz (Reynolds et al., 1995). Innerhalb der drei Gruppen sind die Sekundärstrukturen der IRES-Elemente stärker konserviert als die Sequenzen (Sachs et al., 1997).

### 1.4.2 Zelluläre IRES

Ungefähr 3-5% der eukaryontischen mRNAs besitzen das Potential über einen cap-unabhängigen Mechanismus translatiert zu werden (Johannes et al., 1999). Zu den Merkmalen, die auf ein IRES-Element hindeuten, gehören eine ungewöhnlich lange und stark strukturierte 5'UTR sowie mehrere offene Leseraster. Als weiteres wichtiges Kriterium erwies sich die Tatsache, dass solche mRNAs auch in Poliovirus-infizierten Zellen weiterhin an Polysomen (Poly-Ribosomen) assoziiert waren und translatiert werden konnten (Sarnow, 1989; Macejak & Sarnow, 1991). Eine Poliovirus-Infektion inhibiert die cap-abhängige Translation in eukaryontischen Zellen, indem beide Isoformen des Translationsinitiationsfaktors eIF4G durch virale Proteasen gespalten werden (Lamphear et al., 1993, 1995; Gradi et al., 1998). Das erste zelluläre IRES-Element wies diese Charakteristika auf und wurde in der mRNA des Immunoglobulin Schwere Kette Bindeprotein (BiP) nachgewiesen (Macejak & Sarnow, 1991). Die Funktion als IRES-Element wurde in einem bicistronischen Reportersystem gezeigt. Seitdem wurden ungefähr 50 weitere

zelluläre IRES-Elemente identifiziert (Bonnal et al., 2003). Die **Tabelle 1.1** zeigt einige Beispiele:

IRES-Element	Proteinfunktion	Beschrieben von:
Apaf-1	Apoptose-Aktivator	Coldwell et al., 2000
Bcl2	Apoptose-Inhibitor	Sherrill et al., 2004
cat-1	Transporter	Fernandez et al., 2001
c-myc	Proto-Onkogen	Nanbru et al., 1997 & Stoneley et al., 1998
DAP5	Initiationsfaktor	Henis-Korenblit et al., 2000
FGF-2	Wachstumsfaktor	Vagner et al., 1995
Gtx	Transkriptionsfaktor	Chappell et al., 2000a
human Sp3	Transkriptionsfaktor	Hernandez et al., 2004
NRF	Transkriptionsfaktor	Oumard et al., 2000
VEGF	Wachstumsfaktor	Akiri et al., 1998
XIAP	Apoptose-Inhibitor	Holcik et al., 1999

**Tab.1.1: Zelluläre IRES-Elemente**

Die Beispiele stammen aus der „IRESdatabase“ (<http://ifr31w3.toulouse.inserm.fr/IRESdatabase/>) und aus Komar & Hatzoglou, 2005, die Literaturangaben beziehen sich auf die erste Beschreibung.

Anders als bei viralen IRES-Elementen ist die Funktion von zellulären IRES-Elementen noch nicht geklärt. Die Ähnlichkeit zu viralen IRES führt zu der Annahme, dass mRNAs auch unter Bedingungen translatiert werden können, bei denen die allgemeine cap-abhängige Proteinsynthese in den Zellen beeinträchtigt ist. Dies ist der Fall bei der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzykluses, bei Apoptose und zellulärem Stress wie Serumentzug, Hitzeschock, UV-Bestrahlung oder Virusinfektion. In solchen Situationen wird die Aktivität des cap-bindenden Proteins (eIF4E, siehe 1.3) reduziert (Gingras et al., 1999). Dies bevorzugt die IRES-abhängige Translation (Hellen & Sarnow, 2001; Stoneley & Willis, 2004). Demnach können zelluläre IRES-Elemente die Translation bestimmter Proteine bei zellulärem Stress sicherstellen bzw. erhöhen oder verringern.

Das IRES-Element in der mRNA des kationischen Aminosäuretransporters 1 (cat-1) wird zum Beispiel durch Aminosäureentzug aktiviert; dies führt zu einer erhöhten cat-1-Proteinsynthese (Fernandez et al., 2001). Im Gegensatz dazu ist die cap-abhängige Proteinsynthese bei Aminosäuremangel reduziert (Pain, 1994).

Auch während der Apoptose ist eine Inhibition der cap-abhängigen Proteinsynthese zu beobachten (Clemens et al., 2000). Die Synthese bestimmter Proteine wie XIAP (X-chromosome linked inhibitor of apoptosis protein) und DAP5 (death associated protein 5) ist davon jedoch nicht betroffen. Die Expression beider Proteine wird durch IRES-abhängige Translation aufrechterhalten (Henis-Korenblit et al., 2000; Holcik et al., 2000b).

Viele der IRES-regulierten Proteine sind an Vorgängen wie Zellwachstum, Proliferation und Apoptose beteiligt: Eine Deregulation der IRES-abhängigen Translation könnte daher zur Tumorgenese beitragen. Tatsächlich wurde in neoplastischen Melanom-Zellen ein erhöhter Level an dem Proto-Onkogen c-myc nachgewiesen, der auf eine vermehrte Translationsinitiation zurückgeführt werden konnte. So steigert eine einzelne Mutation von C zu U in der 5'UTR der c-myc-mRNA die Aktivität des IRES-Elements (Paulin et al., 1996, 1998; Chappell et al., 2000b) und damit den c-myc-Level in den Melanom-Zellen.

Folglich regulieren IRES-Elemente die Genexpression unter verschiedenen physiologischen Zuständen und versetzen Zellen in die Lage, unabhängig von der cap-abhängigen Translation auf solche Stimuli zu reagieren.

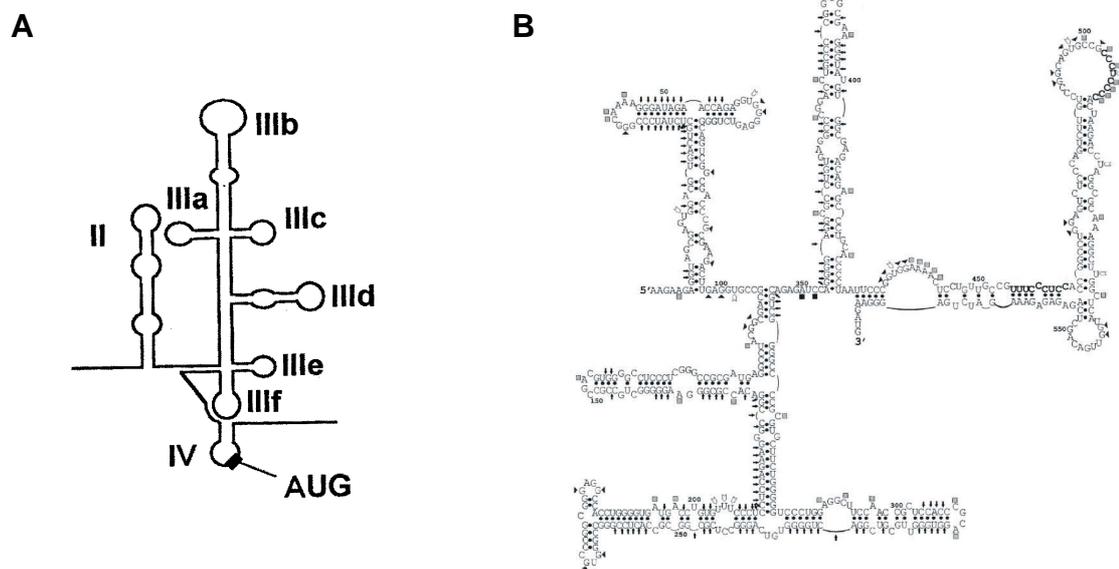
### 1.4.3 Die Sekundärstruktur von IRES-Elementen

Sowohl virale als auch zelluläre IRES-Elemente verfügen über ausgeprägte Sekundärstrukturen. Dass die Struktur eine entscheidende Bedeutung für die Funktion von IRES-Elementen hat, zeigen Studien an den sehr variablen RNAs des FMDV (Maul- und Klauenseuche Virus) und des HCV (Hepatitis C Virus). Sequenz-Substitutionen zwischen den 5'UTRs dieser Viren sind kompensatorische Mutationen, die dem Erhalt der RNA-Sekundärstruktur dienen (Martinez-Salas et al., 2001). Essentielle Sequenzen für die Funktion der viralen IRES-Elemente sind in doppelsträngigen Regionen, Schleifen oder Haarnadel-Strukturen enthalten (Martinez-Salas et al., 1996; Honda et al., 1996; Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 1997, **Abb. 1.7 A**). Kleine Deletionen oder Punktmutationen haben bei viralen IRES-Elementen einen starken Effekt auf die Translation. Die Integrität der gesamten RNA-Struktur ist demnach wichtig für die Formierung des Initiationskomplexes (Stoneley & Willis, 2004).

Die strukturelle Organisation von zellulären IRES-Elementen ist bislang weitgehend unklar. Wie bei viralen IRES werden die komplexen Sekundärstrukturen von Haarnadeln, Pseudoknoten, doppelsträngigen Bereichen und Schleifen gebildet (**Abb. 1.7 B**). Strukturanalysen von mehreren zellulären IRES-Elementen (z.B. FGF-2: Bonnal et al., 2003 oder Apaf-1: Mitchell et al., 2003) zeigen jedoch nur wenige strukturelle Gemeinsamkeiten. Häufig werden dazu computergestützte Strukturvorhersagen (wie MFOLD, Zucker, 2003) durch Daten aus enzymatischen RNA-Strukturanalysen modifiziert. Die Vorhersage von generellen Strukturmerkmalen ist schwierig. Le und Maizel (Le & Maizel, 1997) haben als generelle Strukturmerkmale eine Y-förmige Haarnadelstruktur, gefolgt von einer kleinen Haarnadel, vorhergesagt. Die funktionelle Bedeutung dieses Motivs konnte jedoch bisher nicht gezeigt werden.

Im Gegensatz zu den viralen IRES ist der Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion bei zellulären IRES nicht so strikt. Mutationen in der IRES-Sequenz führen nur selten zum

kompletten Verlust der IRES-Aktivität. Vielmehr können einzelne Abschnitte oder Strukturelemente getrennt voneinander eine interne Initiation vermitteln; wenn auch nicht so effizient wie das gesamte IRES-Element (Stoneley et al, 1998; Coldwell et al, 2000; Jopling et al., 2004). Zelluläre IRES scheinen demzufolge als Kombination von Strukturmodulen zu wirken. Sie sind jedoch durchaus auf Wechselwirkungen untereinander angewiesen: Das Cat-1 IRES ist nach der Zerstörung einer RNA-RNA-Wechselwirkung zwischen dem 3' und dem 5' Ende des IRES-Elements inaktiv. Erst durch die Wiederherstellung der Wechselwirkung wird das IRES-Element wieder aktiviert (Yaman et al., 2003).



**Abb. 1.7: Die Struktur von viralen und zellulären IRES-Elementen**

**A:** Eine schematische Darstellung des HCV-IRES-Elements (383 b) (Die Abbildung stammt aus Martinez-Salas et al, 2001); **B:** Das Strukturmodell des Apaf-1-IRES-Elements (578 b) (Die Abbildung stammt aus Mitchell et al, 2003).

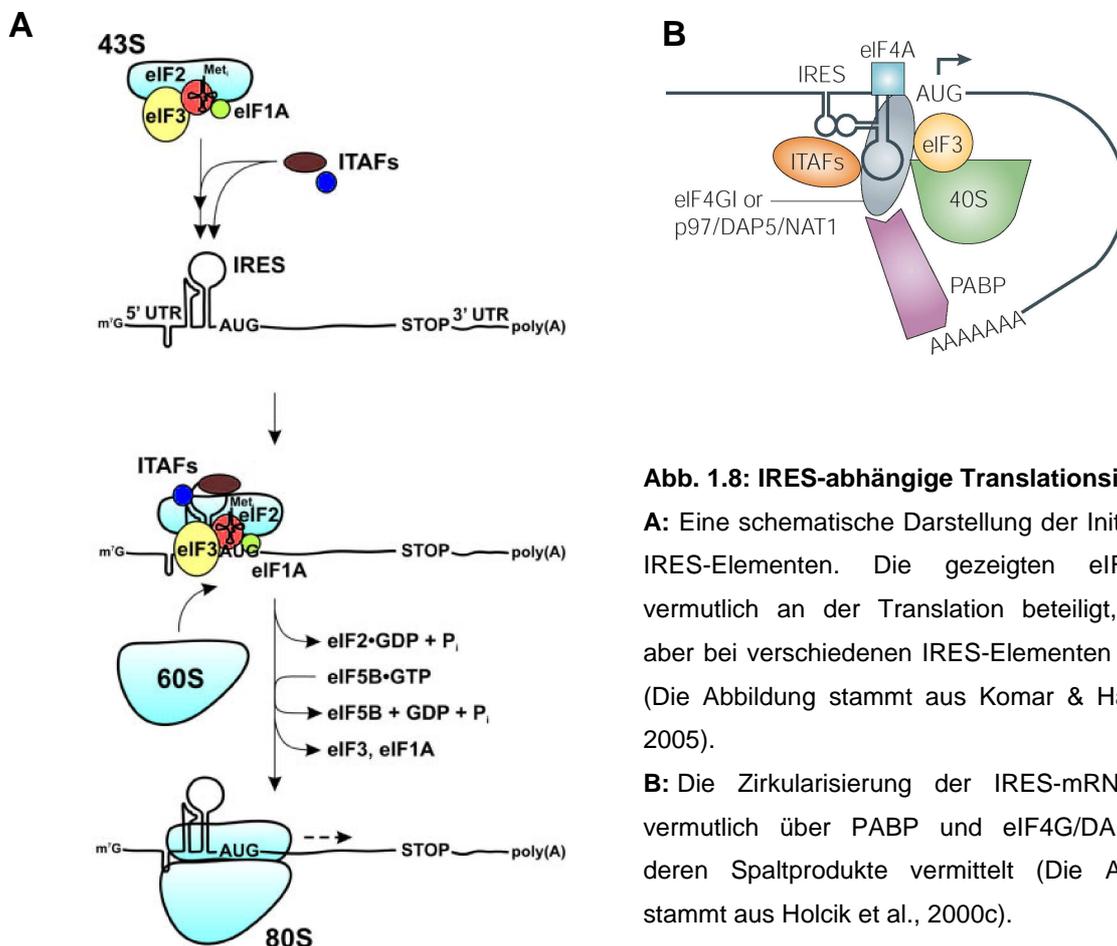
Neben den genannten Sekundärstrukturmerkmalen gibt es auch Sequenz-Elemente, die bei der Vermittlung der IRES-Funktion von Bedeutung sein könnten. Das Gtx-IRES-Element enthält eine 9 nt lange Basensequenz, die komplementär zur 18 S rRNA in der 40 S ribosomalen Untereinheit ist. Dies ermöglicht die direkte Bindung der ribosomalen Untereinheit an das IRES-Element und bewirkt eine Steigerung der IRES-Aktivität (Chappell et al., 2000a). Es ist jedoch unklar, wie das Sequenz-Element im gesamten Gtx-IRES-Element funktioniert. Im FGF2-IRES wurde die identische Sequenz gefunden; dort konnte jedoch keine IRES-aktivierende Wirkung nachgewiesen werden (Bonnal et al., 2003).

### 1.4.4 Die Translationsinitiation an IRES-Elementen

Bei der internen Translationsinitiation bindet die 40 S ribosomale Untereinheit direkt an das IRES-Element in der Nähe des Startcodons. Die Cap-Struktur ist nicht notwendig, und ein „Scanning“ wie beim cap-abhängigen Mechanismus entfällt. Die Translationsinitiation erfolgt daher generell in einem Schritt. Eine Ausnahme sind Typl-IRES-Elemente; dort befinden sich die IRES-Strukturen 50-100 Basen stromaufwärts vom Startcodon. Die Translation verläuft daher in zwei Schritten: zuerst bindet das Ribosom an die IRES-Strukturen, dann wandert das Ribosom zum Startcodon. Die Bindung der 40 S Untereinheit wird teilweise über Wechselwirkungen mit der RNA-Sekundärstruktur erreicht. Die meisten viralen und zellulären IRES-Elemente benötigen jedoch weitere Faktoren für die Initiation.

Beim IRES-abhängigen Mechanismus (**Abb. 1.8 A**) ist die 40 S ribosomale Untereinheit an eIF3, eIF1 und an den ternären Komplex (eIF2, GTP und Initiator-t-RNA) assoziiert. Der so gebildete 43 S Komplex bindet dann direkt an das IRES-Element. Für diese Wechselwirkung sind zusätzliche Proteine, die IRES trans-aktivierende Faktoren (ITAF), erforderlich.

Bei Typl-IRES-Elementen wandert dieser Komplex noch vom IRES zum Startcodon. Dort tritt die 60 S Untereinheit hinzu; alle Faktoren verlassen den Initiationskomplex, und die Translation startet. Bei allen anderen IRES startet die Translation direkt am Bindungsplatz der 40 S Untereinheit.



**Abb. 1.8: IRES-abhängige Translationsinitiation**

**A:** Eine schematische Darstellung der Initiation an IRES-Elementen. Die gezeigten eIFs sind vermutlich an der Translation beteiligt, können aber bei verschiedenen IRES-Elementen variieren (Die Abbildung stammt aus Komar & Hatzoglou, 2005).

**B:** Die Zirkularisierung der IRES-mRNAs wird vermutlich über PABP und eIF4G/DAP5 oder deren Spaltprodukte vermittelt (Die Abbildung stammt aus Holcik et al., 2000c).

Die angegebenen Proteine (**Abb. 1.8**) sind vermutlich an der Initiation beteiligt, die Kombination an eukaryontischen Initiationsfaktoren kann aber je nach IRES-Element stark variieren.

So inaktivieren Picornaviren bei einer Infektion den eIF4F-Komplex durch die proteolytische Spaltung beider eIF4G-Isoformen I und II (Lamphear et al., 1995; Gradi et al., 1998). Es entstehen zwei Fragmente von eIF4G, wobei das C-terminale Fragment für die Initiation an z.B. Aphthovirus-IRES-Elementen wie dem FMDV-IRES ausreicht (Lopez de Quinto & Martinez-Salas, 2000). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Faktoren eIF3 und eIF4B für die Translationsinitiation am FMDV-IRES benötigt werden (Lopez de Quinto et al., 2001), während die Translation unabhängig von eIF4E ist.

Bei zellulären IRES-Elementen ist die Kombination von eukaryontischen Initiationsfaktoren ebenfalls unklar. Für einzelne IRES-Elemente konnten jedoch verschiedene Faktoren identifiziert werden: So benötigen das c-myc- und das BiP-IRES-Element den Faktor eIF4A. Auch konnte gezeigt werden, dass eIF4G essentiell für die Translation beider IRES-Elemente ist und dass die proteolytische Spaltung von eIF4G sogar aktivierend auf die Translationsinitiation wirkt (Thoma et al., 2004). Ein weiteren Hinweis darauf, dass IRES-Elemente auch mit Spaltprodukten von Initiationsfaktoren translatiert werden könnten, liefern Studien in apoptotischen Zellen: Während der Apoptose wird die Proteinsynthese durch die caspase-abhängige Spaltung der Faktoren eIF4G, eIF4B, eIF2 $\alpha$  und eIF3 reduziert (Clemens et al., 2000). Die Translation von z.B. c-myc, XIAP und Apaf-1 (apoptotischer protease-aktivierender Faktor 1) wird aber unter diesen Bedingungen nicht eingeschränkt (Stoneley et al., 1998; Holcik et al., 1999; Coldwell et al., 2000).

Ein Faktor, der sowohl die IRES-abhängige als auch die cap-abhängige Translation steigert, ist das poly(A)-bindende Protein (PABP). Bei viralen (Svitkin et al., 2001) und bei zellulären IRES (Thoma et al., 2004) vermittelt PABP eine Steigerung der IRES-Aktivität. Diese ist dabei auf die Zirkularisierung der mRNA zurückzuführen. Der Kontakt von IRES-Element und poly(A)-Ende wird vermutlich über PABP und eIF4GI, DAP5 oder ein Spaltprodukt dieser Faktoren vermittelt (**Abb. 1.8 B**).

Zur Erkennung der RNA-Strukturen (Belsham & Sonenberg, 2000) und zur Modulation der IRES-Aktivität (Lopez-Lastra et al., 2005) erfordert die interne Initiation außer den eukaryontischen Initiationsfaktoren auch zelluläre RNA-bindende Proteine (IRES transagierende Faktoren - ITAFs). Die meisten ITAFs sind RNA-bindende Proteine, die zur Proteinfamilie der heterogenen nukleären Ribonukleo-proteine (hnRNPs) gehören (siehe **1.8**).

Der ITAF PTB (pyrimidin-tract binding protein) bindet an mehrere picornavirale IRES-Elemente und steigert deren Translation (Kaminski & Jackson, 1998). Auch bei zellulären IRES-Elementen wurden RNA-Protein-Interaktionen mit ITAFs gezeigt (Holcik & Korneluk,

2000a; Mitchell et al., 2001; Evans et al., 2003). Häufig treten Kombinationen von mehreren ITAFs auf. Somit wurden große RNA-Protein-Komplexe mit vielen verschiedenen Proteinkomponenten an mehreren zellulären IRES nachgewiesen (Yang & Sarnow, 1998; Paulin et al., 1998; Chappell & Mauro, 2003). Das c-myc IRES-Element wird z.B. von den Proteinen hnRNP C1/C2, hnRNP E1/E2 und hnRNP K gebunden. Die **Tabelle 1.2** zeigt eine Reihe weiterer ITAFs, die mit verschiedenen viralen und zellulären IRES-Elementen interagieren.

ITAF	Interagierende IRES-Elemente
PTB (hnRNP I)	EMCV, FMDV, PV, HCV, HAV, Apaf-1
La Autoantigen	EMCV, HCV, XIAP
UNR	HRV, Apaf-1
hnRNP C1/C2	XIAP, c-myc
hnRNP E1/E2	PV1, c-myc
hnRNP L	HCV
hnRNP K	c-myc

**Tab.1.2: ITAFs und zugehörige IRES-Elemente**

Die Beispiele stammen aus der „IRESdatabase“ (<http://ifr31w3.toulouse.inserm.fr/IRESdatabase/>) und aus Stoneley & Willis, 2004.

Bisher ist nicht geklärt, wie ITAFs ihre Wirkung vermitteln. Eine Hypothese sieht ITAFs als RNA-Chaperone, die durch die Bindung der RNA eine aktive Konformation der RNA-Struktur schaffen oder erhalten. An diese können anschließend weitere Komponenten des Initiationskomplexes binden (Kaminski & Jackson, 1998; Hellen & Sarnow, 2001). Eine Studie am Apaf-1 IRES-Element stützt diese Hypothese: In einem RNA-Proteinkomplex liegen zwei ITAFs, UNR (upstream of N-ras) und PTB, vor. Beide zusammen erhöhen die Apaf-1- IRES-Aktivität (Mitchell et al., 2001). Dabei bewirkt die Bindung von UNR die Bildung einer distalen Struktur, an die PTB dann bindet. Dort findet ebenso die Bindung der 40 S ribosomalen Untereinheit statt (Mitchell et al., 2003; Pickering et al., 2003, 2004).

### 1.5 Die Stabilität der mRNA

Neben der Regulation der Translation ist die Kontrolle der mRNA-Stabilität ein wichtiges Instrument zur Anpassung des Genexpressionsmusters an zelluläre Signale. Laut Microarray-Studien erfolgen 40-50% der Genexpressions-Änderung durch die Variation der mRNA-Stabilität (Fan et al., 2002; Cheadle et al., 2005). Diese wird überwiegend durch regulatorische Motive in der 3'UTR vermittelt.

### 1.5.1 Die Steuerung der mRNA-Stabilität durch AU-reiche Elemente

Eine Reihe von Motiven in der 3'UTR steuert die Stabilität und damit die Halbwertszeit von mRNAs. Einige Sequenz-Motive, die aufgrund ihres hohen A/U-Gehalts als AU-reiche Elemente (AREs) bezeichnet werden, wurden erstmals wegen ihrer destabilisierenden Wirkung auf mRNAs beschrieben (Shaw & Kamen, 1986). Ungefähr 5-8% der menschlichen Gene codieren für mRNAs, die AREs enthalten (Bakheet et al, 2001, 2006). Die dazugehörigen Proteine vermitteln häufig Zellwachstumsprozesse oder die Antwort auf äußere Stimuli, darunter Cytokine und Transkriptionsfaktoren (Khabar, 2005).

AU-reiche Elemente (ARE) können sich über 50-150 b erstrecken; die Bezeichnung ARE gilt für AU-reiche Sequenzen, die das Sequenz-Motiv AUUUA enthalten. Basierend auf der Anzahl und der Verteilung des Pentamers AUUUA in AU-reichen Regionen wurden AREs in drei verschiedene Klassen eingeteilt (Chen & Shyu, 1995):

Klasse I AREs enthalten mehrere AUUUA-Motive in U-reichen Regionen und sind häufig in mRNAs, die für Transkriptionsfaktoren codieren, zu finden – wie z.B. in der c-myc 3'UTR (Brewer, 1991). Bei Klasse II AREs überlappen mindestens zwei Pentamere zu dem Nonamer UUUAUUA(U/A)(U/A), es sind mehrere Wiederholungen dieses Motivs möglich. Klasse II AREs befinden sich unter anderem in der 3'UTR von TNF- $\alpha$  (Kontoyiannis et al., 1999). Klasse III AREs sind U-reich, enthalten aber keine AUUUA-Motive. Ein Beispiel ist das Klasse III ARE in der c-jun-mRNA (Peng et al., 1996).

Die Regulation der mRNA-Stabilität wird über zelluläre Proteine, die an verschiedene AREs binden (ARE-Bindeproteine- ARE-BP), erreicht. Die meisten ARE-Bindeproteine können an mehrere AREs binden. Als erstes ARE-BP wurde AUF1 (AU-rich binding factor 1), auch hnRNP D genannt, beschrieben (Brewer, 1991; Zhang et al., 1993). AUF1 gehört zur Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine, bindet an Klasse I sowie II AREs und beeinflusst die Stabilität der gebundenen RNAs. Die Bindung von AUF1 an AREs in den mRNAs von c-myc, c-fos und TNF- $\alpha$  (Xu et al., 2001) führt zu einer erhöhten Stabilität dieser RNAs. AUF1 hat jedoch eine destabilisierende Wirkung bei der Bindung von AREs in der Cyclin D1- und p21-mRNA (Lal et al., 2004).

Ein weiteres ARE-BP ist das Protein HuR, das ebenfalls zur Familie der hnRNPs zählt. Es bindet AREs aller drei Klassen, unter anderem in den mRNAs von TNF- $\alpha$  (Dean et al., 2001) und von Cyclin D1 (Lal et al., 2004). Dadurch bewirkt es eine Stabilisierung der mRNAs.

Die Faktoren AUF1 und HuR fungieren bei der Cyclin D1-mRNA als Antagonisten. AUF1 destabilisiert die mRNA, während HuR stabilisierend wirkt. Der Mechanismus der Wirkung ist noch nicht geklärt: AUF1 und HuR können entweder die mRNA gleichzeitig binden, oder sie konkurrieren um die Bindung. Abhängig von bestimmten Bedingungen wie der Expression, der Lokalisation oder dem Phosphorylierungs-Status der beiden Faktoren wird die Bindung

eines Faktors bevorzugt. Die Cyclin D1-mRNA wird demzufolge entweder stabilisiert oder abgebaut (Lal et al., 2004; Blaxall et al., 2002).

Es ist noch ungeklärt, wie nach der Bindung eines ARE-BP die Stabilisierung oder Destabilisierung der mRNA vermittelt wird. Bei der Destabilisierung von mRNAs wird vermutet, dass die ARE-BPs die Komponenten für den Abbau der RNA rekrutieren. So konnte eine Wechselwirkung zwischen der 37 kD-Isoform von AUF1 und dem Exosom nachgewiesen werden (Chen et al., 2001). Doch auch das Exosom selbst zeigt mit seiner RNase-PH-Domäne eine Affinität zu AREs (Anderson et al., 2006). Daher könnte der stabilisierende Effekt von ARE-BPs auf die Maskierung der AREs zurückzuführen sein. Durch die Bindung wird eine Wechselwirkung mit Komponenten des Exosoms oder anderen destabilisierenden ARE-BPs verhindert (Garneau et al., 2007; Barreau et al., 2005).

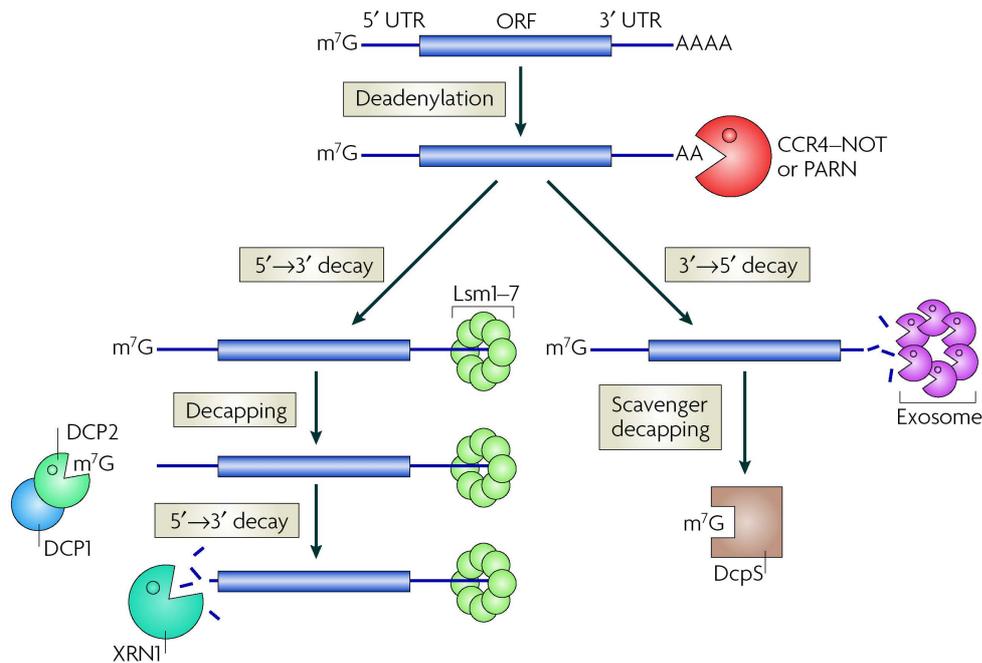
### 1.5.2 Der Abbau der mRNA

Die mRNA wird durch die Bindung von destabilisierenden Faktoren an den AREs für den Abbau „markiert“. Der Bindung solcher Faktoren folgt die Lokalisation an granulären Strukturen im Cytosol, den so genannten P-bodies (mRNA processing bodies) (Eulalio et al., 2006). Dort findet der RNA-Abbau statt (Sheth & Parker, 2003).

Eukaryontische mRNAs werden durch die 5'Cap-Struktur und das 3'poly(A)-Ende vor dem vorzeitigen Abbau geschützt. Zum Start des RNA-Abbaus muss eine der beiden Strukturen entfernt werden. Der am weitesten verbreitete RNA-Abbauweg (**Abb. 1.9**) beginnt mit der Verkürzung des poly(A)-Endes; dieser Schritt ist jedoch reversibel. Durch die Bindung von stabilisierenden Faktoren wie HuR können die mRNAs auch erneut an Polysomen assoziieren und weiter translatiert werden (Bhattacharyya et al., 2006).

Die Deadenylierung erfolgt durch die PABP-abhängige Nuklease PAN2-PAN3, die das poly(A)-Ende von 200 auf rund 80 Nukleotide verkürzt. Die restlichen Nukleotide werden von der Deadenylase CCR4-NOT oder der poly(A) spezifischen Ribonuklease PARN entfernt (Yamashita et al., 2005; Balatsos et al., 2006). Anschließend gibt es zwei mögliche Abbauewege: Beim 3'-5'Abbau wird die mRNA vom 3'Ende aus durch das Exosom abgebaut. Das Exosom ist ein großer Proteinkomplex aus 10-12 Untereinheiten; rund die Hälfte der Proteine besitzt eine 3'-5'Exoribonuklease-Aktivität. Nach dem Abbau wird die 5'Cap-Struktur von dem Enzym DcpS (scavenger decapping enzyme) abgespalten (Liu et al., 2002).

Beim 5'-3'Abbau wird zunächst die Cap-Struktur entfernt. Das geschieht durch einen Komplex aus den Decapping-Enzymen Dcp1 und Dcp2. Als Co-Faktor bindet ein heptamerer Proteinkomplex (Lsm1-7) an das 3'Ende der deadenylierten RNA und unterstützt die Entfernung der Cap-Struktur (Tharun & Parker, 2001). Nach der Abspaltung der Cap-Struktur baut die Exoribonuklease Xrn1 die RNA in 5'-3'Richtung ab.



**Abb.1.9: Der mRNA-Abbau nach Deadenylierung**

Ein Schema des RNA-Abbauweges in Folge der Deadenylierung der poly(A)-Sequenz. Nach der Deadenylierung erfolgt der 5'-3'-Abbau (Decapping) oder der 3'-5'-Abbau durch das Exosom (Die Abbildung stammt aus Garneau et al., 2007).

## 1.6 Der NFκB-reprimierende Faktor (NRF)

### 1.6.1 Der Transkriptionsfaktor NFκB

Die Gruppe der NFκB-Transkriptionsfaktoren gehört zur Rel-Familie und besteht aus fünf Mitgliedern: p65 (RelA), c-Rel, RelB, p50 und p52. Die Proteine bilden Hetero- und Homodimere; das häufigste ist p65/p50 (Moynagh, 2005). Alle Mitglieder der Proteinfamilie besitzen eine N-terminale Rel-Homologie-Domäne (RHD), die die DNA-Bindung, den zellulären Transport und die Dimerisierung vermittelt (Hayden & Ghosh, 2004).

Die NFκB-Faktoren regulieren die Genexpression des Immunsystems. Sie vermitteln unter anderem die Expression von Cytokinen und Wachstumsfaktoren als Antwort auf verschiedene Stimuli. Dabei wirken die verschiedenen Mitglieder der NFκB-Familie als Aktivatoren (p65, RelB, c-Rel), aber auch als Repressoren (Homodimere von p50 und p52) der Transkription (Ghosh et al., 1998).

In unstimulierten Zellen liegen die NFκB-Proteine als Monomere überwiegend im Cytosol vor. Dort sind sie durch die Bindung an Inhibitorproteine, die IκBs, arretiert. Ein Teil der NFκB-Proteine liegt aber auch im unstimulierten Zustand im Zellkern vor (Johnson et al., 1999; Huang et al., 2000).

Signale, die zur Aktivierung von NFκB-Faktoren führen, sind unter anderem der Tumornekrosefaktor α (TNFα) (Osborn et al., 1989) oder das Interleukin -1 (IL-1) (Kida et al., 2005). Als Folge lösen sich die NFκB-Faktoren von den Inhibitorproteinen und translozieren

vom Cytosol in den Kern. Die Dimer-Konzentration im Kern wird erhöht. Dort binden die NFκB-Dimere an bestimmte NFκB-Konsensus-Sequenzen der Ziel promotoren (Chen & Greene, 2004). Die Bindung und die Kooperation mit weiteren Faktoren führen anschließend zur Expression der Zielgene.

### **1.6.2 Der NFκB-reprimierende Faktor (NRF) und seine duale Funktion**

Der NFκB-reprimierende Faktor (NRF) wurde erstmals durch seine Bindung an den Interferon-β (IFN-β) Promotor beschrieben (Nourbakhsh & Hauser, 1997). NRF ist ein nukleärer und konstitutiv exprimierter Transkriptionsfaktor (Nourbakhsh & Hauser, 1999) mit einem Molekulargewicht von 77,5 kD und 690 Aminosäuren. Das Protein trägt ein Kernlokalisierungssignal (NLS) im N-Terminus (aa 31-46) und verfügt über eine Repressor- (aa 1-296) sowie über eine DNA-bindende- Domäne (aa 296-388) (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Im C-Terminus liegen potentielle Nukleinsäure-Bindungsstellen (Niedick et al., 2004). NRF bindet Promotoren, die die Konsensussequenz AATCCTCTGA, das Negative regulatorische Element (NRE), enthalten. Darunter auch die Promotoren von IFN-β, Interleukin 8 (IL-8) und iNOS (induzierbare NO-Synthase) (Nourbakhsh et al., 2000). In nicht stimulierten Zellen fungiert NRF als Repressor der Genexpression.

Der IFN-β-Promotor enthält mehrere positiv regulatorische Domänen (PRD), die von aktivierenden Transkriptionsfaktoren, darunter auch von NFκB-Dimeren, gebunden werden. Ebenso gibt es eine negativ regulierende Domäne (NRD), die das NRE enthält. Es wurde gezeigt, dass NRF durch die Bindung an das NRE und durch eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit NFκB die Transkription des Promotors inhibiert (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Für den IL-8 Promotor konnte eine duale Funktion von NRF nachgewiesen werden: Im basalen Zustand reprimiert NRF die IL-8 Expression. Wird der IL-8 Promotor durch verschiedene Stimuli wie IL-1 und TNF-α (Kasahara et al., 1993; Brasier et al., 1998) induziert, wirkt NRF mit NFκB-Proteinen koaktivierend auf den IL-8 Promotor (Nourbakhsh et al., 2001). Beide Funktionen werden unter anderem durch die direkte Wechselwirkung von NRF und NFκB-p65 vermittelt (Bartels et al., 2007).

### **1.6.3 Die untranslatierten Regionen von NRF**

NRF wird über zwei verschiedene mRNAs, ein 3,7 kb und ein 2,8 kb Transkript, translatiert (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Beide mRNA-Spezies enthalten eine 653 b lange 5'UTR, aber unterscheiden sich in der Länge der 3'UTR.

#### **1.6.3.1 Das minimale NRF-IRES-Element**

Die 5'UTR ist mit 653 b verhältnismäßig lang für zelluläre mRNAs. Sie enthält elf offene Leseraster und bildet laut einer Sekundärstrukturvorhersage mit MFOLD (Zucker, 2003)

stabile Sekundärstrukturen, bestehend aus einer Reihe von Haarnadeln, aus ( $\Delta G = -128$  kcal/mol). Diese beiden Charakteristika sind nicht kompatibel mit dem cap-abhängigen „Scanning“-Mechanismus, bei dem die ribosomale 40 S Untereinheit von der 5' Cap-Struktur zum Startcodon wandert. Weiterhin blieb die NRF-mRNA auch in Poliovirus-infizierten Zellen, in denen die cap-abhängige Translation stark reduziert ist, an Polysomen assoziiert (persönliche Mitteilung von M. Nourbakhsh). Schließlich konnte in bicistronischen Reporter-Experimenten gezeigt werden, dass die 5'UTR von NRF als IRES-Element fungiert (Oumard et al., 2000). Ferner wurde das NRF-IRES-Element als Typl-Element klassifiziert. Es wirkt distanz-unabhängig im Bezug zum Startcodon und besitzt nur eine sehr geringe Aktivität *in vitro* (Oumard et al., 2000). Ein Sequenzvergleich zwischen der humanen und murinen NRF 5'UTR zeigte vier homologe Regionen über die gesamte Sequenz, die letzten 183 b jeder UTR zeigten den höchsten Grad an Homologie (Reboll et al., 2007).

In Trunkierungsexperimenten wurde die Bedeutung dieser Region bestätigt: Die schrittweise Deletion von jeweils 50 b vom 5' Ende aus hatte bei den Basen 1-500 der 5'UTR nur geringe Effekte. Die Deletion der letzten 50 Basen führte allerdings zum kompletten Verlust der IRES-Aktivität (Oumard, 2002; Reboll et al., 2007). Die letzten 150 Basen der NRF 5'UTR, direkt stromaufwärts vom Startcodon, fungieren als minimales IRES-Element. Strukturvorhersagen der gesamten 5'UTR und des minimalen IRES-Elements zeigten die Faltung einer großen und einer kleinen Haarnadelstruktur direkt vor dem Startcodon.

### 1.6.3.2 Die 3'untranslatierten Regionen von NRF

Es existieren zwei unterschiedlich lange NRF-mRNA-Spezies (3,7 kb und 2,8 kb) (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Der Unterschied basiert auf zwei verschiedenen langen 3'UTRs. Das 3,7 kb Transkript besitzt eine 1007 b lange 3'UTR, die 3'UTR der 2,8 kb mRNA ist 940 b kürzer. Da NRF nur von einem Gen codiert wird, sind die 3'UTRs auf unterschiedliche Polyadenylierungen zurückzuführen (persönliche Mitteilung von M. Nourbakhsh). So enthält die lange 3'UTR zwei Polyadenylierungssignale (2774 b: AUUAAA und 3712 b: AAUAAA). Wird das erste verwendet, resultiert daraus eine 67 b lange 3'UTR, die Polyadenylierung nach dem zweiten Signal führt zur 1007 b 3'UTR und zum 3,7 kb Transkript. Wie es zur Auswahl des jeweiligen Polyadenylierungssignals kommt, ist jedoch unbekannt.

Die 3'UTRs regulieren die Stabilität von mRNAs. Zu den regulatorischen Motiven, die die Kontrolle der Stabilität vermitteln, gehören unter anderem AU-reiche Elemente. Auch die 3'UTRs von NRF enthält ein solches ARE. Die 67 b lange 3'UTR besitzt ein AUUUA-Pentamer kurz hinter dem Stoppcodon. Bei der 1007 b 3'UTR existieren drei weitere AUUUA-Pentamere sowie ein Nonamer (UUUUUUUAUA). Aufgrund des Nonamers, das durch zwei überlappende Pentamere gebildet wird, wird das ARE als Klasse II ARE definiert (ARE-

Database, <http://rc.kfshrc.edu.sa/ARED/>: Accession number NM\_017544; Bakheet et al., 2001, 2003, 2006).

## **1.7 Heterogene nukleäre Ribonukleoproteine (hnRNPs)**

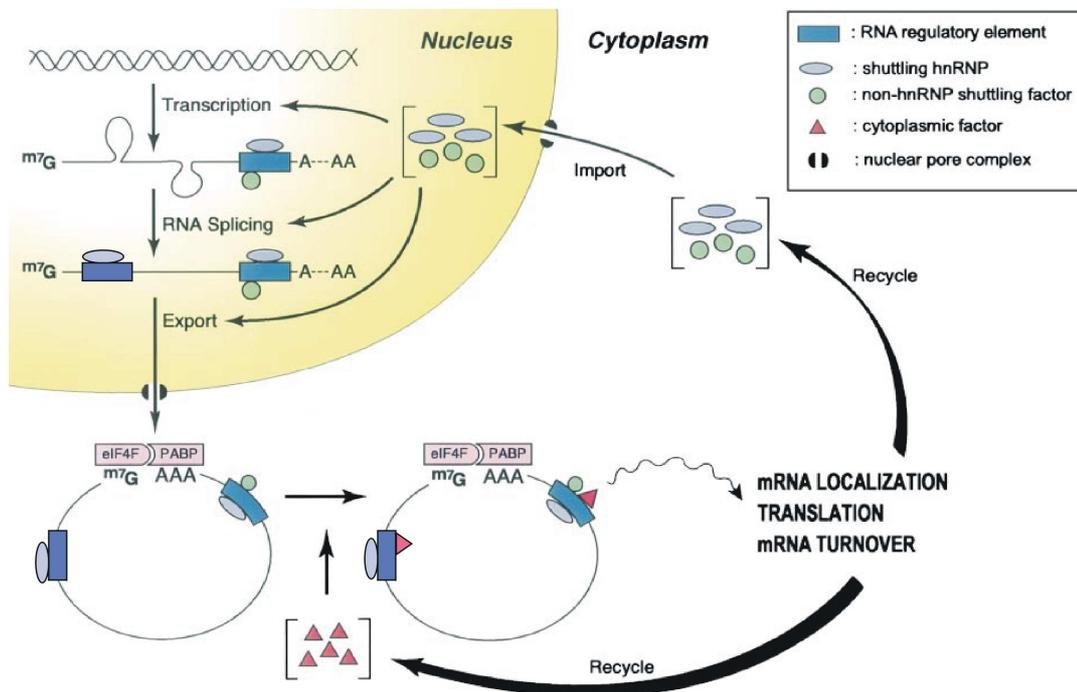
### **1.7.1 Die hnRNP-Proteinfamilie**

Die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs) bilden eine Familie von RNA-bindenden Proteinen. In ihr werden prä-mRNA-bindende Proteine, die keinem festen Proteinkomplex wie z.B. snRNPs zugeordnet werden können, zusammengefasst (Dreyfuss et al., 1993) Diese Einteilung berücksichtigt nicht die Struktur, Funktion oder Lokalisation der unterschiedlichen Proteine. Bisher wurden ungefähr 20 verschiedene Proteine identifiziert und mit A1 bis U benannt (Pinol-Roma et al., 1988). Bei vielen Proteinen existieren mehrere Isoformen: so gibt es die vier Isoformen p37, p40, p42 und p45 beim hnRNP D (auch als AUF1 benannt) (Wagner et al., 1998). Obwohl es überwiegend kernständige Proteine sind, konnte für viele hnRNPs (u.a. hnRNP D und A1) ein andauernder Kern-Cytosol-Transport gezeigt werden (Dreyfuss et al., 2002). Die hnRNPs liegen häufig in Proteinkomplexen vor, die Zusammensetzung dieser Komplexe ist sehr dynamisch. Sie ändert sich in Abhängigkeit der zu bindenden mRNAs, und des Angebotes der hnRNPs.

Für die verschiedenen hnRNPs konnte eine Reihe von Funktionen gezeigt werden: Sie sind in Kernprozesse wie Transkriptionsregulation (Tomonaga & Levans, 1995; Michelotti et al., 1996) und alternatives Spleißen (Mayeda & Krainer, 1992; Van der Houven van Oordt et al., 2000) involviert. Ebenso sind hnRNPs am mRNA-Transport (Izaurrealde et al., 1997; Gallouzi & Steitz et al., 2001), an der Translationsregulation (Habelhah et al., 2001; Holcik et al., 2003) und an der Regulation der mRNA-Stabilität (Xu et al., 2001) beteiligt. Folglich begleiten die Komplexe aus hnRNPs die mRNAs von der Transkription bis zur Translation. Auf diesem Weg ändert sich die Zusammensetzung der hnRNP-Komplexe, die die mRNA binden. Beispielweise verlassen hnRNPs, die an Introns binden, nach dem Spleißen die Komplexe, während Exon-bindende hnRNPs bis ins Cytosol an die mRNA gebunden bleiben (Caceres et al., 1998).

Viele der vorwiegend nukleären hnRNPs pendeln zwischen Kern und Cytosol (z.B. hnRNPs A, D, E, I, K). Die Proteine hnRNP A1 und I enthalten ein Kern-Import/Export-Signal aus 38 Aminosäuren im C-Terminus. Es wird als M9-Signal bezeichnet (Nakielny et al., 1999). Das M9-Signal steuert den Export und den Import. Folglich wirkt es als NLS und NES (Izaurrealde et al., 1997). Der Transportweg des M9-vermittelten Kernimportes ist unabhängig vom klassischen NLS-Weg und benötigt nicht die Rezeptoren Importin  $\alpha$  oder  $\beta$ . Stattdessen wird der Transport über den Rezeptor Transportin-1 vermittelt (Pollard et al., 1996; Iijima et al., 2006). Der Export der hnRNPs ist eng mit dem mRNA-Export verknüpft. So binden hnRNPs im Kern an mRNAs und werden zusammen mit ihnen exportiert (Daneshmandi, 1997).

Dass der Kernaufenthalt der hnRNPs notwendig für ihre Funktion im Cytosol ist, wurde für hnRNP D (p37) gezeigt (Chen et al., 2004).



**Abb. 1.10: hnRNPs regulieren mRNA-Prozesse in Kern und Cytosol**

Viele der hnRNPs unterliegen einem ständigen Kern-Cytosol-Transport. Das versetzt die hnRNPs in die Lage, viele mRNA-Prozesse im Kern (Transkription, Spleißen) und im Cytosol (mRNA-Export, mRNA-Stabilität, Translation) zu regulieren (Die Abbildung stammt aus Shyu & Wilkinson, 2000 und wurde hier modifiziert).

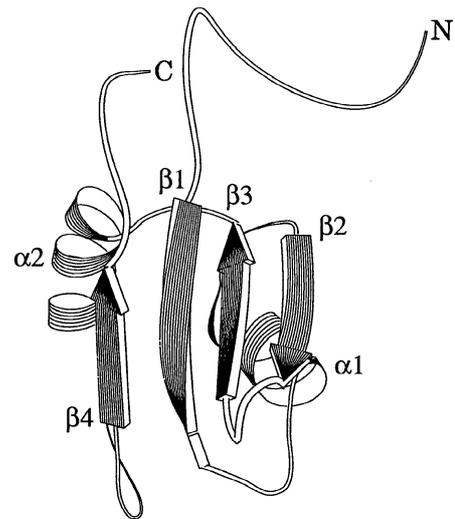
### 1.7.2 Die Strukturmerkmale von hnRNPs

Alle heterogenen nukleären Ribonukleoproteine sind RNA-bindende Proteine. Sie sind in der Lage, RNA spezifisch zu binden. Häufig binden sie jedoch mit geringerer Affinität auch unspezifisch an RNA-Sequenzen (Dreyfuss et al., 2002). Für einige hnRNPs wurde darüber hinaus auch die Bindung an DNA gezeigt (Tsuchiya et al., 1998; Eversole et al., 2000).

hnRNPs besitzen mindestens eine RNA-bindende Domäne (RBD). Diese Domänen zeigen eine hohe Homologie unter den verschiedenen hnRNPs. Die am höchsten konservierten Motive in RNA-bindenden Domänen sind die RNA-Erkennungs-Motive (RRM: RNA Recognition Motif) (Query et al., 1989). Jede RBD enthält das Oktapeptid (L/R-G-F/Y-G/A-F-V-X-F/Y) (RRM 1) und das Hexapeptid RRM 2, das vor allem aromatische und aliphatische Aminosäuren enthält (Dreyfuss et al., 1988). Die RNA-bindenden Domänen bilden eine hoch-konservierte Tertiär-Struktur mit dem Strukturmotiv  $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$  (Shamoo et al., 1997; Vitali et al., 2002). Die RNA-Bindung wird durch die vier antiparallelen  $\beta$ -Faltblätter vermittelt (Abb. 1.11). Sie bilden eine Art Plattform, die die RNA bindet. Durch diese Form der

Wechselwirkung bleibt auch die gebundene RNA für andere Faktoren zugänglich (Dreyfuss et al., 1993). Es ist noch unklar, ob die RBDs mit einzel- oder doppelsträngigen RNA-Bereichen interagieren. Darüber hinaus ist wenig über die Struktur der RNA während der Bindung bekannt. Circular dichroismus-Messungen haben gezeigt, dass doppelsträngige RNA-Bereiche gelöst werden könnten (Cobianchi et al., 1988).

Anders als die RBDs variieren die N- und C-Termini der hnRNPs stark. Im C-Terminus von vielen hnRNPs befinden sich mehrere RGG-Motive. Die Funktion dieser Sequenzen ist noch ungeklärt. Sie könnten an der RNA-Bindung beteiligt sein, Protein-Protein-Interaktionen vermitteln oder die RNA-Bindungsaktivität über die Methylierungen von Argininen (Christensen & Fuxa, 1988) regulieren.



**Abb. 1.11: Schema der Tertiärstruktur der RBD 1 (aa 2-94) von hnRNP C**  
(Die Abbildung stammt aus Dreyfuss et al., 1993)

### 1.7.3 hnRNPs als IRES trans-agierende Faktoren

Bisher wurde eine Reihe von hnRNPs als IRES trans-agierende-Faktoren (ITAFs) identifiziert (siehe **Tab. 1.2**). Obwohl der genaue Wirkungsmechanismus von ITAFs an IRES-Elementen nicht geklärt ist, sind hnRNPs aufgrund ihrer Eigenschaften potenzielle Regulatoren der IRES-Aktivität.

Die hnRNPs sind hauptsächlich im Kern lokalisiert, sie unterliegen aber einem ständigen Kern-Cytosol-Transport. Sie binden im Zellkern an mRNAs, die IRES-Elemente enthalten, und begleiten sie vom Zellkern bis ins Cytosol. Die IRES enthaltenden mRNAs benötigen diesen Kernaufenthalt, um effizient translatiert werden zu können (Stoneley et al., 2000; Vagner et al., 2001). Im Cytosol vermitteln die hnRNPs ihre Wirkung als ITAFs und kehren im Anschluss wieder in den Kern zurück. Die relativen hnRNP-Level im Cytosol könnten die Aktivität von IRES-Elementen als Reaktion auf Stress oder andere äußere Reize regulieren (Stoneley & Willis, 2004).

Als Wirkungsmechanismus der ITAFs wurde bereits die Funktion als RNA-Chaperone (**1.4.4**) erwähnt. Die RNA-Bindungseigenschaften der hnRNPs unterstützen diese Hypothese: Die RNA bleibt während der Bindung für weitere Proteine, wie eukaryontische Initiationsfaktoren, zugänglich, ebenso besteht die Möglichkeit, dass die Bindung die RNA-Struktur verändert (Dreyfuss et al., 1993; Cobianchi et al., 1988). Zusätzlich könnten hnRNPs auch als Adapterproteine zwischen der RNA und der 40 S ribosomalen Untereinheit sowie den eukaryontischen Initiationsfaktoren fungieren (Komar & Hatzoglou, 2005). Die RNA-Bindung

wird über die RBDs vermittelt, die Interaktion mit weiteren Faktoren möglicherweise über Motive im C-Terminus der hnRNPs.

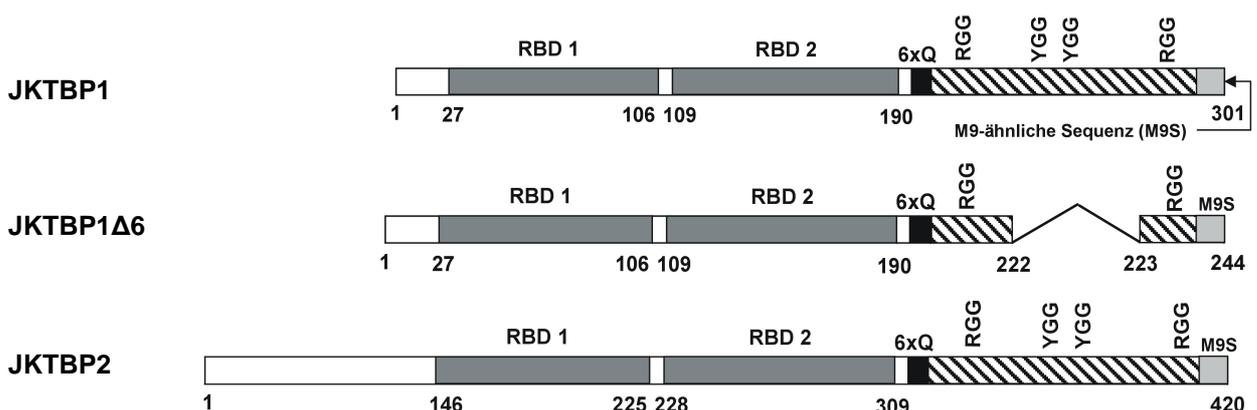
Zudem bilden meist mehrere ITAFs einen Komplex am jeweiligen IRES-Element. Für die Proteine hnRNP C1/C2 und La Autoantigen wurde eine funktionelle Wechselwirkung mit dem XIAP-IRES gezeigt. Sie alle scheinen Teil eines großen RNA-Protein-Komplexes zu sein (Holcik et al., 2000b, 2003).

## 1.8 Das hnRNP D-ähnliche Protein JKTBP1

### 1.8.1 Die Strukturmerkmale von JKTBP1

Das Protein JKTBP1 (JKT-Bindeprotein 1) wurde über die Bindung an das Intron-9-Element JKT41 des Myeloperoxidase(MPO)-Gens identifiziert (Tsuchiya et al., 1998). Es hat DNA- sowie RNA-bindende Eigenschaften und besitzt mit zwei RNA-bindenden Domänen (RBDs) ein wichtiges Strukturmerkmal der hnRNPs. Aufgrund der Homologie der beiden RBDs mit den RBDs des hnRNP D (74% und 70%) und einer sehr ähnlichen Exon-Intron Organisation der Gene wird es auch als hnRNP D ähnliches Protein bezeichnet (Kamei et al., 1999).

JKTBP1 hat eine Molasse von 38 kD und besteht aus 301 Aminosäuren. Das Protein verfügt neben den beiden RNA-bindenden Domänen über eine glutamin-reiche Sequenz (6xQ-Stretch), die vermutlich an der RNA-Bindung beteiligt ist (Kamei & Yamada, 2002). Der C-Terminus ist glycin- und tyrosin-reich und enthält YGG- und RGG-Motive (Kamei et al., 1999). Ebenfalls im C-Terminus ist eine M9-ähnliche Shuttle-Sequenz von 25 Aminosäuren (aa 276-301) lokalisiert, sie besitzt NLS- und NES-Aktivität (Kawamura et al., 2002).



**Abb. 1.12: Aufbau der drei verschiedenen JKTBP-Isoformen**

Alle drei Isoformen verfügen über zwei RNA-bindende Domänen. JKTBP2 hat einen verlängerten N-Terminus (+119 AS), bei JKTBP1Δ6 fehlt das Exon 6 im C-Terminus.

Es existieren zwei weitere Isoformen von JKTBP1: JKTBP2 und JKTBP1Δ6. Das Protein JKTBP2 besitzt 420 Aminosäuren ( $M_r = 53$  kD). Es unterscheidet sich nur im N-Terminus von JKTBP1, dieser ist bei JKTBP2 um 119 Aminosäuren länger (Kamei et al., 1999). Die

Isoform JKTBP1 $\Delta$ 6 (244 Aminosäuren,  $M_r$ = 36 kD) entsteht durch alternatives Spleißen des Exons 6, dem Protein fehlen im Vergleich zu JKTBP1 57 Aminosäuren im C-Terminus (Kawamura et al., 2002).

### 1.8.2 Die Expression und Lokalisation von JKTBP1

Alle drei Isoformen von JKTBP werden in vielen Zelllinien konstitutiv exprimiert. JKTBP1 ist die dominanteste der drei Isoformen. Die Untersuchung der gewebsspezifischen Expression von murinem JKTBP1, das zu 99,7% identisch mit dem humanen Protein ist, zeigte, dass es in vielen murinen Geweben exprimiert wird (Akagi et al., 2000).

Stimuli, die die Expression von JKTBP1 beeinflussen, sind hingegen kaum bekannt. Mit einer Proteom-Analyse wurde gezeigt, dass JKTBP1 in DLD-1 Colonepithelzellen nach einer Interleukin-1 (IL-1) Stimulation stark induziert wird (Barcelo-Batllori et al., 2002).

In der Zelle sind alle JKTBP-Isoformen überwiegend im Kern lokalisiert. Für JKTBP1 und JKTBP1 $\Delta$ 6 konnte neben der Kernlokalisierung ein steter Kern-Cytosol-Transport gezeigt werden. Daher sind diese Isoformen auch im Cytosol zu detektieren. JKTBP2 hingegen liegt ausschließlich im Kern vor (Kawamura et al., 2002). JKTBP1 verfügt über eine M9-ähnliche Shuttle-Sequenz. Sie dient als Kernlokalisierungssignal (NLS) und Kernexportsignal (NES) in einem. Der Kernimport über die M9-Sequenz ist unabhängig vom Importin  $\beta$ -Transportweg und verläuft direkt über Transportin-1 (Pollard et al., 1996). Für JKTBP1 und hnRNP D konnte die direkte Interaktion mit Transportin-1 gezeigt werden (Imasaki et al., 2007).

### 1.8.3 Die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1

JKTBP1 besitzt sowohl DNA- als auch RNA-bindende Eigenschaften. Es interagiert mit einzelsträngiger und doppelsträngiger DNA, die Bindung ist jedoch nicht sequenzspezifisch (Tsuchiya et al., 1998). Eine Bindung an den CytochromC-Oxidase-Promotor konnte jedoch nachgewiesen werden (Boopathi et al., 2004).

Die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1 sind ebenfalls noch nicht verstanden. In einem Versuchsansatz wurde in Selektions-/Amplifikations-Experimenten (SELEX nach Tuerk & Gold, 1990) die RNA-Bindung von JKTBP1 an zufällige 20 b-RNA-Fragmente untersucht. Auf diesem Wege wurde für JKTBP1 die Konsensussequenz GGACUAGCC identifiziert (Kamei & Yamada, 2002). Anhand der Konsensussequenz wurde mit mehreren Deletionsmutanten gezeigt, dass beide RNA-bindenden Domänen, das Glutamin-Hexamer (Q-Stretch) sowie ein Teil des C-Terminus für eine sequenzspezifische RNA-Bindung benötigt werden. Die Bindungsaffinitäten sind jedoch im Vergleich zum vollständigen Protein deutlich reduziert. Daher müssen noch weitere Bereiche des C-Terminus an der Bindung beteiligt sein. Unabhängig von diesen Daten wurde in einem anderen experimentellen Ansatz die Bindung von JKTBP1 an die 3'UTRs von TNF- $\alpha$  gezeigt (Dean et al., 2002). Das

Protein wurde über die Bindung an Klasse II AREs aufgereinigt. Jedoch enthält diese 3'UTRs nicht die von Kamei und Yamada ermittelte Konsensussequenz.

### 1.9 Ziel der Arbeit

Das Hauptziel dieser Arbeit ist die Untersuchung der Rolle der untranslatierten Regionen bei der Translationsregulation von NRF. Es wurde gezeigt, dass die 5'UTR von NRF als IRES-Element fungiert und die letzten 150 Basen ein minimales IRES-Element bilden. Zudem existieren zwei unterschiedlich lange 3'UTRs von NRF.

Als erstes Ziel dieser Arbeit sollen regulatorische Motive im minimalen IRES Element und deren Effekte auf die Translation von NRF detektiert werden. Bei der Aufreinigung von zellulären Proteinen am minimalen NRF-IRES-Element wurde JKTBP1 als NRF-IRES-bindendes Protein identifiziert. Hier soll zunächst die Bindungsstelle von JKTBP1 im minimalen IRES-Element durch RNA-EMSA-Experimente eingegrenzt werden.

Begleitend zu diesen *in vitro* Bindungsstudien soll *in vivo* die Wirkung der regulatorischen Motive auf die Translationsaktivität des IRES-Elements analysiert werden. Mit Hilfe von bicistronischen Reportergenkonstrukten sollen der Einfluss von Strukturelementen und die Wirkung der JKTBP1-Bindung auf die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements bestimmt werden.

Das zweite Ziel dieser Arbeit ist die Betrachtung von regulatorischen Motiven in den 3'UTRs von NRF. So soll eine Interaktion von JKTBP1 mit den 3'UTRs *in vitro* geprüft werden. Um die Wirkung der 3'UTR-Motive sowie der möglichen Bindung von JKTBP1 *in vivo* testen zu können, ist ein weiteres Reportersystem erforderlich. Es soll ein monocistronisches Reportersystem etabliert werden, bei dem die Translation des Firefly-Reportergens entweder von der 5'UTR, von der 3'UTR oder von beiden UTRs zusammen beeinflusst wird. Das System ermöglicht die Detektion von regulatorischen Effekten beider UTRs. So können die Erkenntnisse aus den bicistronischen Reporter-Experimenten auf die gesamte NRF 5'UTR übertragen werden. Die Wirkung der 3'UTR auf die Translation kann ebenso erfasst werden wie das Zusammenspiel von 5' und 3'UTR.

Weiterführend soll der Einfluss von JKTBP1 auf die Translation der NRF-mRNAs betrachtet werden. Dazu werden die mRNA- und Proteinlevels von NRF in Abhängigkeit von JKTBP1 untersucht. Um die Regulation der NRF-Translation in einen physiologischen Zusammenhang bringen zu können, soll schließlich der Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression und Lokalisation von JKTBP1 sowie die Aktivität des NRF-IRES-Elements getestet werden.

## 2. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden die untranslatierten Regionen von NRF mit Hilfe von unterschiedlichen experimentellen Ansätzen, *in vivo* und *in vitro*, charakterisiert. Sehr häufig wurden diese Experimente jedoch zeitlich parallel durchgeführt, damit die erzielten Ergebnisse zur weiteren Planung herangezogen werden konnten. Um hier eine häufige Wiederholung der Versuchsbeschreibung zu vermeiden, wird bewusst auf eine chronologische Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Sie sind stattdessen methodisch zusammengefasst: Gezeigt werden hier zunächst die Ergebnisse aus *in vitro* Struktur- und Bindungsstudien (2.1 und 2.2). Später sind die *in vivo* Effekte von regulatorischen Elementen in den untranslatierten Regionen dargestellt (2.3 und 2.4). Schließlich wird der Einfluss von JKTBP1 auf das endogene System gezeigt (2.5), und es werden mögliche Stimuli untersucht (2.6).

### 2.1 Charakterisierung von regulatorischen Elementen in der 5'UTR von NRF

Die mRNA von NRF besitzt eine 653 Basen lange 5' untranslatierte Region (5'UTR) mit ausgeprägten Sekundärstrukturen. Die gesamte 5'UTR fungiert als Interne Ribosomen Eintrittsstelle (IRES). Die letzten 150 Basen der 5'UTR konnten bereits als minimales IRES-Element identifiziert werden (Reboll et al., 2007). In den folgenden Experimenten wurde die Struktur des minimalen NRF-IRES-Elements bestimmt sowie Proteinbindungsstudien an diesem Element durchgeführt.

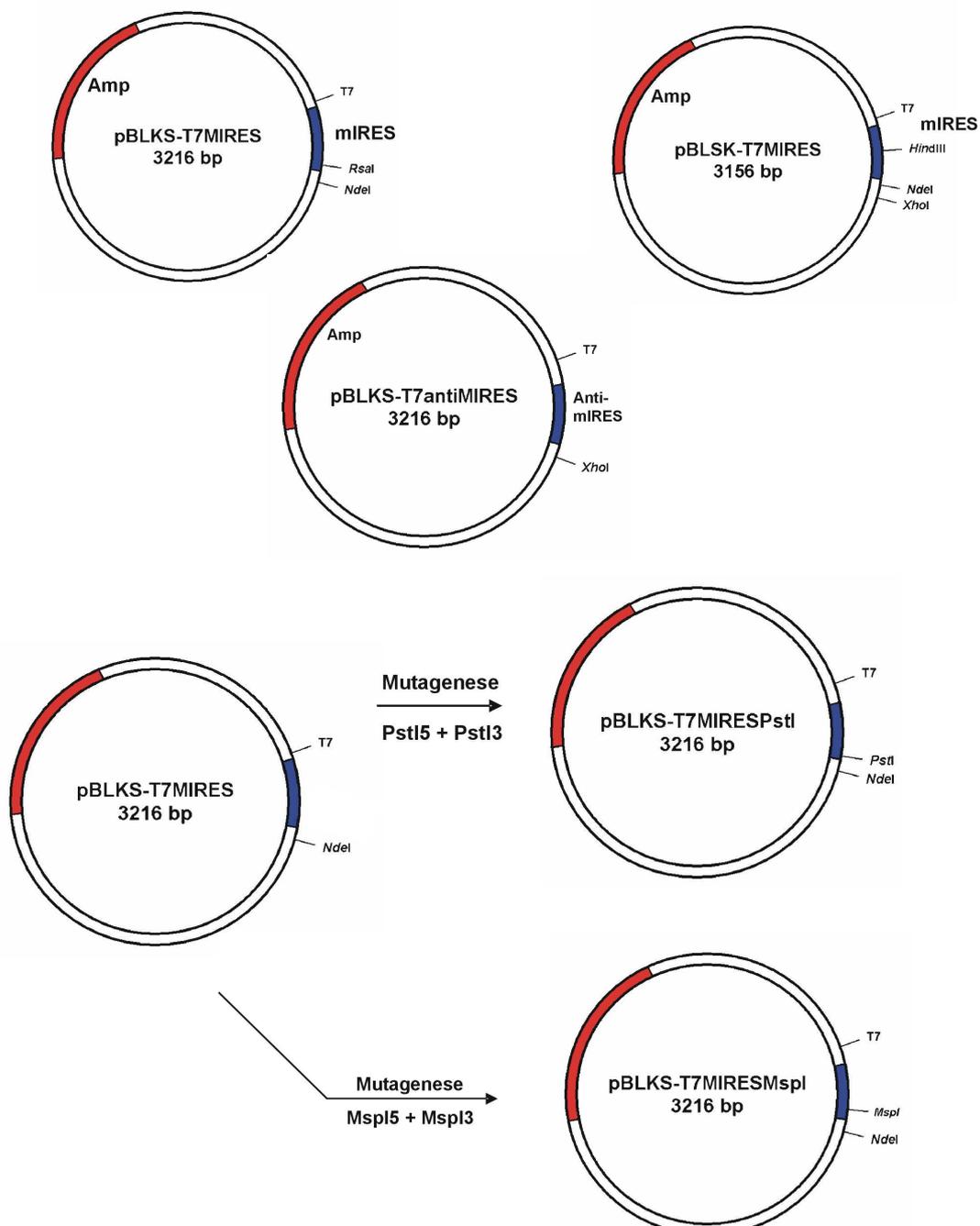
#### 2.1.1 Die Herstellung von *in vitro* IRES-Plasmiden

Für RNA-Strukturanalysen, Proteinbindungsstudien sowie die Aufreinigung von NRF-IRES-bindenden Proteinen wurde *in vitro* transkribierte RNA (4.2.2.1A) eingesetzt. Als Matrizen für die *in vitro* Transkription dienten verschiedene T7-Vektoren. Die Vektoren pBLKS und pBLSK waren die Basis aller hier verwendeten Konstrukte.

Die Plasmide pBLKS-T7MIREs und pBLSK-T7MIREs enthielten jeweils die Sequenz des minimalen NRF-IRES-Elements, die Basen 507 bis 653. Zwischen dem T7-Promotor und dem minimalen IRES-Element befand sich eine Linker-Sequenz (98 Basen), die multiple Klonierungsstelle (MCS) des Vektors. Das Plasmid pBLKS-T7MIREs verfügte darüber hinaus über eine kurze polyA-Sequenz am 3' Ende des IRES-Elements. Als Kontrolle für die Aufreinigung von NRF-IRES-bindenden Proteinen wurde die IRES-Sequenz in pBLKS-T7antiMIREs invertiert.

Um regulatorische Elemente im minimalen IRES-Element zu identifizieren, wurden die *in vitro* Vektoren mit den in **Abb. 2.1** angezeigten Restriktionsenzymen linearisiert (4.2.2.10 A). Das IRES-Element wurde zum einen am 5' Ende verkürzt, zum anderen wurden mehrere Punktmutationen eingeführt. Für die Verkürzung des minimalen IRES-

Elements wurde der Vektor pBLKS-T7MIREs mit dem Restriktionsenzym *Hind*III geschnitten, das entstehende Fragment entfernt und der Vektor zu pBLKS-T7Hind ligiert (4.2.2.11). Die Punktmutationen wurden durch Mutagenese-Reaktionen (4.2.2.7) in pBLKS-T7MIREs eingeführt. In zwei Fällen wurden vier Punktmutationen gesetzt, durch die geänderte Sequenz des minimalen IRES-Elements entstand jeweils eine neue Restriktionsschnittstelle. Die erste Mutagenese (GCTT → tgca) wurde mit dem Primer-Set ivPstI5 und ivPstI3 (4.1.5) durchgeführt. Der hergestellte Vektor wurde nach der eingeführten Schnittstelle pBLKS-T7MIREsPstI benannt. Bei der zweiten Mutagenese (TTAA → ccgg) wurde mit Hilfe der Primer MspI5 und MspI3 (4.1.5) eine weitere *Msp*I-Schnittstelle in pBLKS-T7MIREs geschaffen, der Zielvektor hieß pBLKS-T7MIREsMspI.



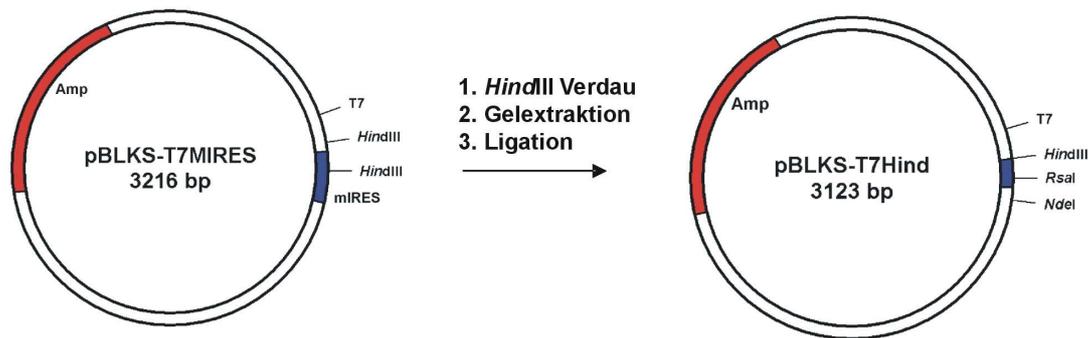


Abb. 2.1: Übersicht der *in vitro* IRES-Plasmide und Klonierungsschemata

### 2.1.2 Die Sekundärstruktur des minimalen NRF-IRES-Elements

IRES-Elemente bilden ausgeprägte und stabile Sekundärstrukturen (Le Quesne et al., 2001; Bonnal et al., 2003). Diese Strukturen sind von entscheidender Bedeutung für die Vermittlung der IRES-Funktion. Eine Strukturvorhersage des minimalen NRF-IRES-Elements mit dem Programm MFOLD (Zucker, 2003) zeigte die Ausbildung mehrerer Haarnadelschleifen (Strukturvorhersage im Anhang, 5.3.1). Frühere Experimente haben ergeben, dass eine Deletion der letzten 50 Basen des minimalen IRES-Elements zum fast vollständigen Verlust der IRES-Aktivität führt (Oumard, 2002). Gleichzeitig befindet sich am 3' Ende des IRES-Elements, unmittelbar vor dem Translationsstart, eine stabile Haarnadelschleife (640-653). Um die Rolle dieser Haarnadelstruktur zu untersuchen, wurden vier Punktmutationen im Bereich 649-652 eingeführt (GCUU → ugca), die diese Struktur verändern sollten (pBLKS-T7MIRESPstl).

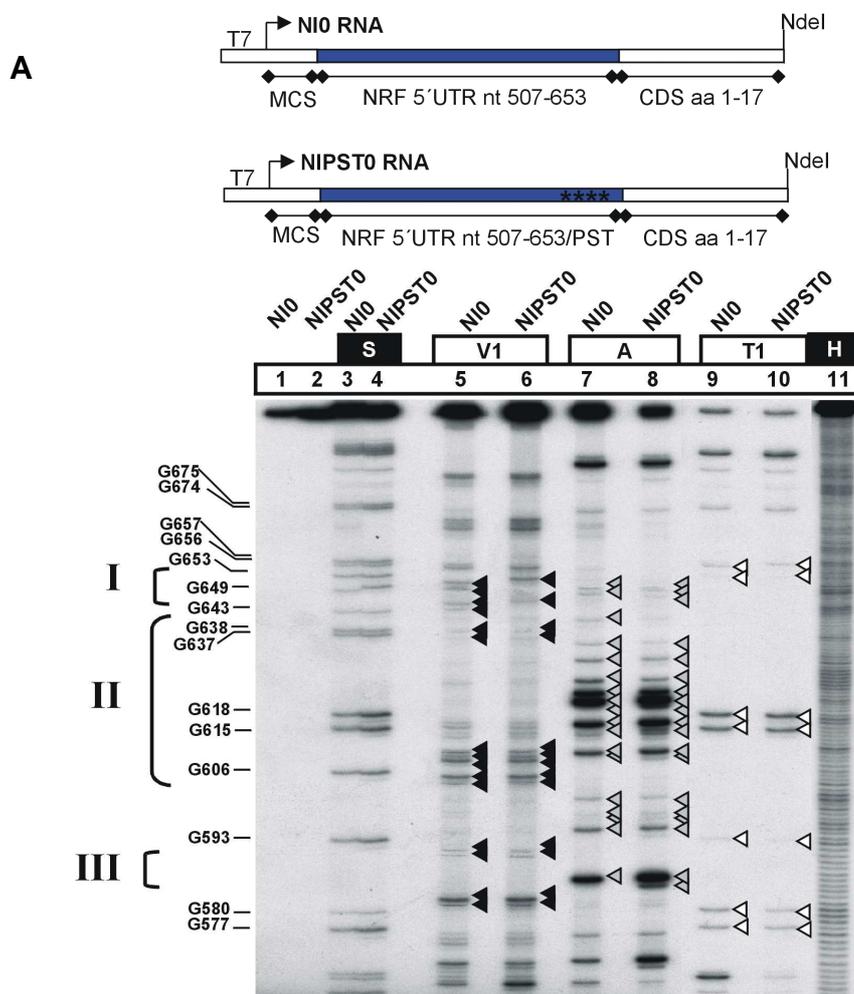
Um ein experimentelles Strukturmodell des minimalen IRES-Elements zu erstellen und die Veränderung der Sekundärstruktur durch die Mutationen zu überprüfen, wurde eine enzymatische RNA-Strukturanalyse (4.2.2.5) durchgeführt. Die Plasmide pBLKS-T7MIREs und pBLKS-T7MIRESPstl wurden dazu mit *NdeI* linearisiert (4.2.2.10 A), *in vitro* in N10 und N1Pst0-RNA transkribiert (4.2.2.1 B) und am 5' Ende radioaktiv markiert (4.2.2.4).

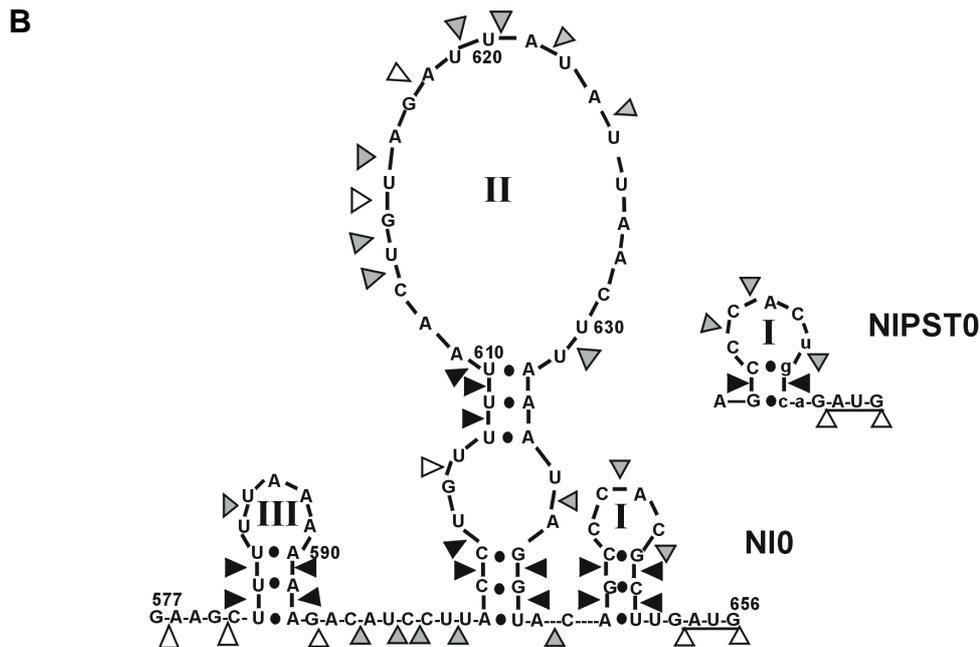
Diese RNA wurde dann mit verschiedenen Ribonukleasen (RNasen) behandelt und die RNA-Fragmente über ein denaturierendes Acrylamidgel aufgetrennt. Aufgrund der verschiedenen Spezifitäten der RNasen A, V1 und T1 konnte anhand des Bandenmusters eine Sekundärstruktur ermittelt werden. So erkennt die RNase A die Basen Cytosin und Uracil in einzelsträngigen RNA-Abschnitten und spaltet die Phosphodiesterbindung 3' zur erkannten Base. Die RNase T1 schneidet die RNA 3' von Guaninen in einzelsträngigen Bereichen, während RNase V1 nur doppelsträngige RNA spaltet. Ob die RNA bei dieser Methode an allen möglichen Schnittstellen tatsächlich gespalten wird, hängt stark davon ab, wie gut zugänglich diese für die RNasen sind. Es wurde jedoch eine Reihe von Fragmenten detektiert (Abb. 2.2 A, Spuren 5-10). Eine RNA-Sequenzierung wurde zusätzlich

durchgeführt. Dabei entstand eine Leiter an RNA-Fragmenten (**S**, Spuren 3 und 4), die jeweils mit einem Guanosin enden. Diese erlaubte zusammen mit der vollständigen Basenleiter nach der alkalischen Hydrolyse der N10-RNA (**H**, Spur 11) die Auswertung des Bandenmusters.

Die Strukturvorhersage von MFOLD wurde mit den hier erhaltenen Informationen modifiziert und ergab die in **Abb. 2.2 B** gezeigte Struktur. Das minimale NRF-IRES-Element bildet somit drei Haarnadelstrukturen aus. Während die Haarnadel I schon in der Vorhersage in dieser Form angegeben wurde, konnten nicht alle Basenpaarungen der Struktur II experimentell bestätigt werden. Die Haarnadelstruktur III hingegen wurde erst durch die enzymatische RNA-Strukturanalyse gezeigt und war in dieser Form nicht in der Vorhersage enthalten (**5.3.2 A**).

Des Weiteren unterscheidet sich die Sekundärstruktur des minimalen IRES-Elements N10 nur am 3' Ende von der Struktur der NIPst0-RNA. Dort wurde die Haarnadelschleife I durch die Einführung der Punktmutationen verändert: Der Stamm der Haarnadel besteht bei der NIPst0-RNA nur noch aus zwei Basenpaaren (Spuren 5 und 6), die Zahl der freien Basen in der Schleife hat von vier auf fünf zugenommen (Spuren 7 und 8). Die Auswirkungen dieser Sekundärstrukturänderung werden bei den folgenden Proteinbindungsstudien und im Reportersystem (**2.3.5**) betrachtet.





**Abb. 2.2: Das minimale NRF-IRES-Element bildet drei Haarnadelstrukturen aus**

**A:** Die Plasmide pBLKS-T7MIREs und pBLKS-T7MIREsPst wurden jeweils mit *Nde*I linearisiert. Je 10 µg dieser Matrizen wurden in einer *in vitro* Transkription eingesetzt. Anschließend wurden 3 µg RNA dephosphoryliert und in einer Kinase-Reaktion mit  $\gamma$ -[<sup>32</sup>P]-dATP am 5'Ende radioaktiv markiert. Die so markierte RNA wurde für die RNA-Sequenzierung, RNA-Strukturanalyse und die alkalische Hydrolyse eingesetzt (4.2.2.5). Nach diesen Reaktionen wurden je 3 µl der Ansätze über ein denaturierendes Sequenziergel aufgetrennt. Das Exponat dieses Gels ist hier gezeigt. Die Spuren 1 und 2 zeigen die unverdauten RNAs NIO und NIPst0. Die Fragmente nach der RNA-Sequenzierung der beiden RNAs (S) sind auf den Spuren 3 und 4 aufgetrennt. Vor dem Verdau mit 0,1 U/µl T1 RNase wurde die RNA denaturiert und zeigt daher eine Leiter von Fragmenten, die alle auf G enden. Diese Reaktion dient neben der Alkalischen Hydrolyse (H, Spur 11), die eine vollständige Basenleiter ergibt, als Bezugspunkt für die Auswertung des Gels. Die Sequenz des minimalen NRF-IRES-Elements beginnt bei G 653, alle größeren Fragmente stammen aus der codierenden NRF-Sequenz (CDS aa 1-17).

Die Spuren 5 und 6 zeigen das Ergebnis nach RNase V1 Verdau (0,01 U/µl), die schwarzen Dreiecke bezeichnen die ausgewerteten Banden an. Ebenso gezeigt sind der RNase A (1 ng/µl, Spuren 7 und 8, graue Dreiecke) und der RNase T1 Verdau (0,1 U/µl, Spuren 9 und 10, weiße Dreiecke).

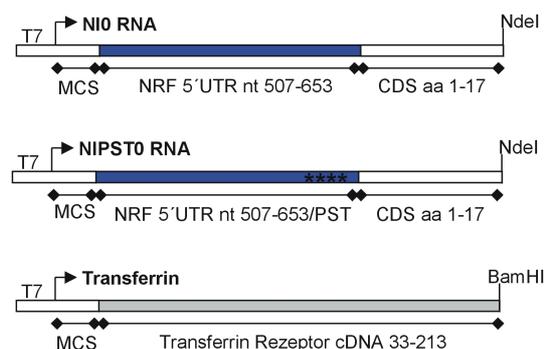
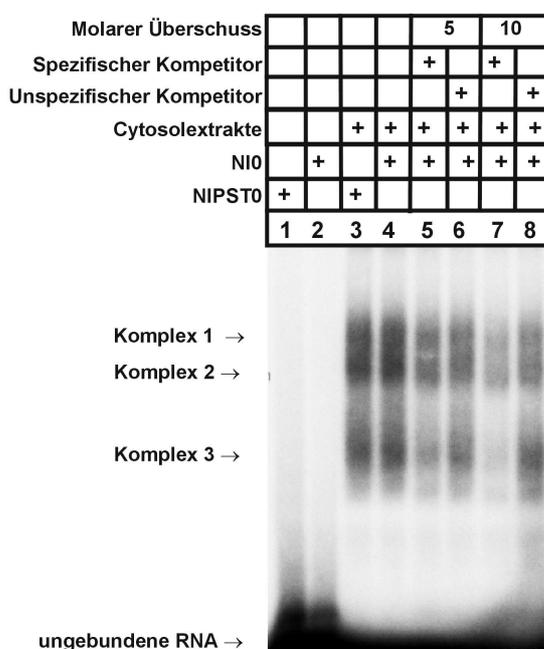
**B:** Das Ergebnis der RNA-Strukturanalyse ist in dieser Abbildung zusammengefasst: Ausgehend von der Strukturvorhersage durch MFOLD (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/mfold/old/rna>) mit Standard-Parametern (37°C, 1M NaCl, 5% suboptimality) wurde die Struktur durch die Aussagen der enzymatischen Strukturanalyse modifiziert. Doppelsträngige Bereiche wurden nur zugelassen, wenn diese durch den RNase V1 Verdau eindeutig bestätigt wurden. So wurden einige mögliche Basenpaarungen wie z.B. (A (611) – U (631)) nicht als solche ins Modell übernommen, wenn sich die Aussagen aus den verschiedenen Verdauen widersprachen. Das Strukturmodell zeigt, dass das minimale NRF-IRES-Element drei Haarnadelstrukturen ausbildet. Die Mutation von vier Basen (GCUU → ugca) in der Haarnadel I hat eine Strukturänderung in der NIPst0-RNA zur Folge, die mutierten Basen werden durch Kleinbuchstaben symbolisiert.

### 2.1.3 Die Identifikation von JKTBP1 als NRF-IRES bindendes Protein

IRES-Elemente sind zur Vermittlung ihrer Funktion nicht nur auf die RNA-Sekundärstruktur angewiesen, sondern benötigen ebenso Proteine, die an diese Struktur binden. Neben eukaryontischen Initiationsfaktoren (Thoma et al., 2004) gibt es weitere IRES-bindende Proteine, die IRES trans-agierende Faktoren (ITAF). Diese ermöglichen oder unterstützen die Funktion der IRES-Elemente (Stoneley & Willis, 2004). Im Rahmen dieser Arbeit sollten, angefangen mit der Suche nach Proteinkomplexen, Proteine identifiziert werden, die das minimale NRF-IRES-Element binden.

#### 2.1.3.1 Der Nachweis von Protein-Komplexen am minimalen NRF-IRES-Element

Um IRES-bindende Proteine zu identifizieren, wurden zunächst *in vitro* Proteinbindungsstudien mit Cytosolextrakten aus HeLa B-Zellen durchgeführt. Die Bindung von Proteinen an das minimale NRF-IRES-Element wurde mit Hilfe von RNA-EMSA-Experimenten (4.2.2.15) gezeigt. Hierfür wurden *in vitro* transkribierte und radioaktiv markierte RNA (4.2.2.1 A) wurden zusammen mit Cytosolextrakten inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann mit RNase verdaut und die entstandenen Komplexe über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Experimente beruhen auf einer verlangsamten Migration der Protein-RNA-Komplexe im Vergleich zur ungebundenen RNA während der Elektrophorese. Nach einer autoradiographischen Auswertung lässt sich die Retardierung der Protein-RNA-Komplexe zeigen, die ungebundene RNA läuft am unteren Gelrand, die Komplexe in der Mitte des Gels.



**Abb. 2.3: Drei Protein-Komplexe binden spezifisch an das minimale NRF-IRES-Element**

Die Plasmide pBLKS-T7MIREs und pBLKS-T7MIREsPst wurden mit *NdeI*, pT7AsTFR mit *BamHI* linearisiert und zur *in vitro* Transkription eingesetzt (4.2.2.1 A). Pro Ansatz wurden

500.000 cpm der *in vitro* transkribierten und radioaktiv markierten RNA verwendet. Die RNA wurde mit 15 µg Cytosolextrakten und 4 µg t-RNA als unspezifischen Kompetitor für 10 min bei 30°C inkubiert. Zum Verdau der RNA wurden anschließend 60 U RNase T1 zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA

und die Protein-RNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Spuren **1** und **2** zeigen die verdauten RNAs NI0 und NI0Pst als Kontrolle. Durch Zusatz von Cytosolextrakten bildeten sich in beiden Fällen drei Protein-RNA-Komplexe (Spuren **3** und **4**). Die Konkurrenz mit spezifischer RNA schwächt die Signal-Intensität der Komplexe (**5** und **7**), die Zugabe von unspezifischem Kompetitor (**6** und **8**) hat einen viel geringeren Effekt, der durch steigende Mengen an Transferrin-RNA nicht verstärkt wird.

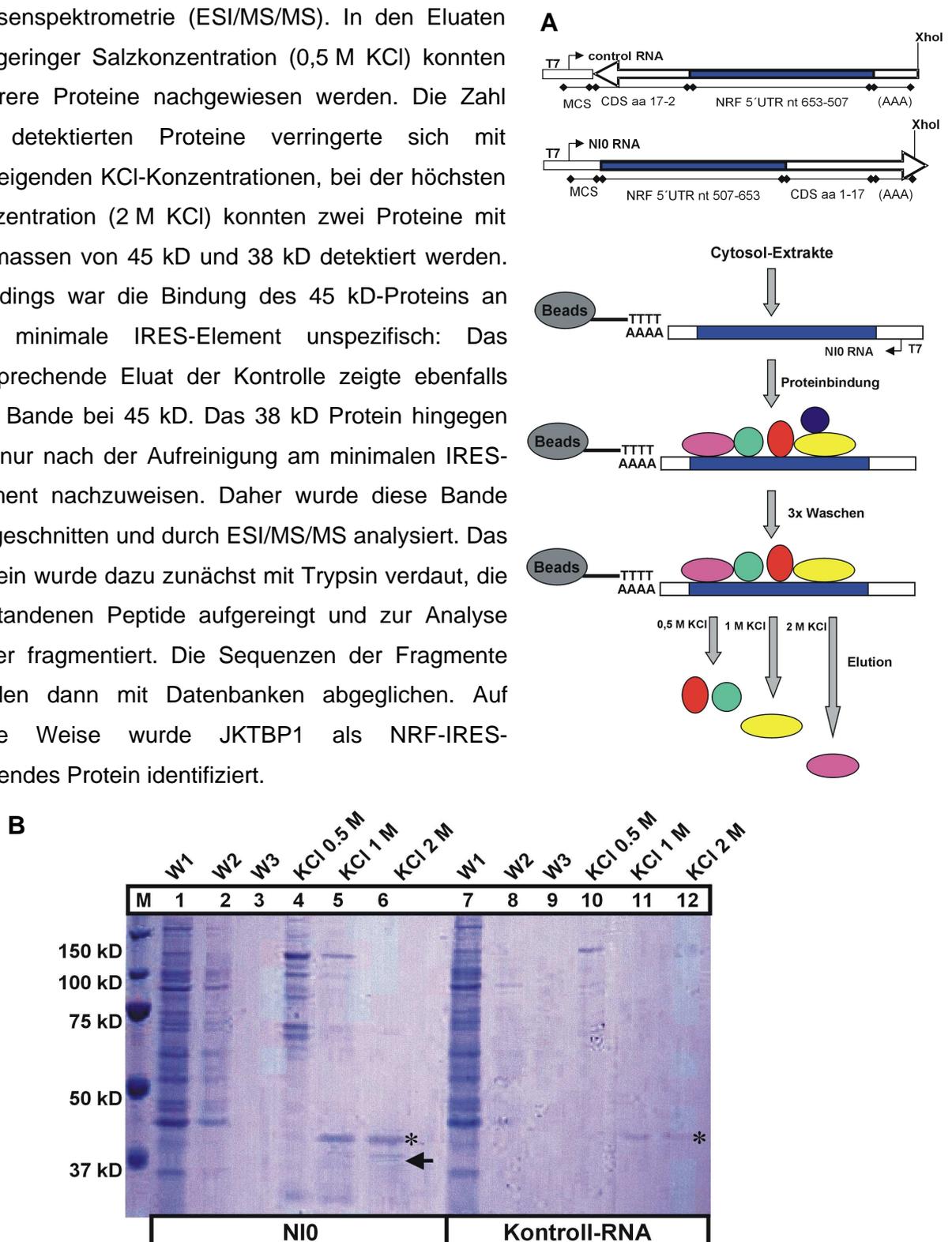
Nach der Inkubation des minimalen NRF-IRES-Elements (NI0-RNA) mit Cytosolextrakten konnten drei Protein-RNA-Komplexe nachgewiesen werden (**Abb. 2.3**, Spur 4). Aufgrund des nativen Polyacrylamidgels ließ sich keine Aussage bezüglich der Molmassen der Komplexe treffen; ebenso war nicht klar, ob die Komplexe aus einem oder mehreren Proteinen bestanden. Neben der Wildtyp-Sequenz (NI0-RNA) wurde auch die Pst-Mutante NIPst0-RNA untersucht. Die Mutation hatte aber keine Auswirkungen auf das Bindungsverhalten der Proteine: Die Positionen und Intensitäten der Signale blieben unverändert (Spur 3). Demnach binden die Proteine nicht im Bereich der Haarnadel I oder die veränderte Sekundärstruktur beeinflusst nicht die Bindung der Proteine.

Um zu überprüfen, ob die Bindung der Proteine an die NI0-RNA spezifisch ist, wurde eine Konkurrenz durchgeführt. Steigende Mengen an nicht-radioaktiver RNA wurden zu den Ansätzen gegeben. Der spezifische Kompetitor NI0-RNA schwächte das Signal aller drei Protein-RNA-Komplexe mit steigendem Einsatz (Spuren 5 und 7). Der unspezifische Kompetitor Transferrin-RNA verursachte eine viel geringere Abnahme des Signals. Daher binden die Protein-RNA-Komplexe 1-3 spezifisch an das minimale NRF-IRES-Element.

### 2.1.3.2 Die Aufreinigung von Proteinen am minimalen NRF-IRES-Element

Nach der Detektion mehrerer Proteinkomplexe, die in RNA-Shift-Experimenten an das minimale NRF-IRES-Element gebunden haben, sollten die beteiligten Proteine aufgereinigt und identifiziert werden. Dazu wurde NI0-RNA *in vitro* transkribiert (4.2.2.1A). Nach der Linearisierung mit *Xho*I befand sich am 3' Ende der RNA eine kurze poly(A)-Sequenz. Durch diese Sequenz konnten die RNAs an oligo(dT)Beads gekoppelt werden und die Proteinaufreinigung mit den so modifizierten Beads durchgeführt werden (**Abb. 2.4 A**). Als Kontrolle wurde eine RNA mit der invertierten IRES-Sequenz verwendet (antiMIREs). Die Aufreinigung wurde, wie in 4.2.3.1 beschrieben, durchgeführt. Alle Waschfraktionen und Eluate wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt (**Abb. 2.4 B**). Obwohl die Coomassie-Färbung keine sensitive Nachweismethode für Proteine ist, hat sie sich bei einer weiteren Sequenzierung der Proteinproben bewährt. Andere Färbemethoden wie beispielsweise eine Silberfärbung stören die nachfolgende Analyse durch Elektronenspray-Ionisierung mit anschließender Tandem

Massenspektrometrie (ESI/MS/MS). In den Eluaten mit geringer Salzkonzentration (0,5 M KCl) konnten mehrere Proteine nachgewiesen werden. Die Zahl der detektierten Proteine verringerte sich mit ansteigenden KCl-Konzentrationen, bei der höchsten Konzentration (2 M KCl) konnten zwei Proteine mit Molmassen von 45 kD und 38 kD detektiert werden. Allerdings war die Bindung des 45 kD-Proteins an das minimale IRES-Element unspezifisch: Das entsprechende Eluat der Kontrolle zeigte ebenfalls eine Bande bei 45 kD. Das 38 kD Protein hingegen war nur nach der Aufreinigung am minimalen IRES-Element nachzuweisen. Daher wurde diese Bande ausgeschnitten und durch ESI/MS/MS analysiert. Das Protein wurde dazu zunächst mit Trypsin verdaut, die entstandenen Peptide aufgereinigt und zur Analyse weiter fragmentiert. Die Sequenzen der Fragmente wurden dann mit Datenbanken abgeglichen. Auf diese Weise wurde JKTBP1 als NRF-IRES-bindendes Protein identifiziert.



**Abb. 2.4: Die Aufreinigung von JKTBP1 am minimalen NRF-IRES-Element**

**A:** Die Plasmide pBLKS-T7MIREs und pBLKS-T7antiMIREs wurden mit *XhoI* linearisiert, und *in vitro* zu RNA transkribiert. Über die kurze poly(A)-Sequenz wurden beide RNAs an oligo(dT)-Beads gekoppelt. Nach der Bindung der RNA wurden Cytosolextrakte mit einer Gesamtproteinmenge von 2,5 mg zugegeben. Nach 15 min Inkubation bei 30°C wurden die Beads dreimal mit Waschpuffer gewaschen, um alle ungebundenen Proteine zu entfernen. Anschließend wurde mit steigenden KCl-Konzentrationen eluiert. Die Mehrzahl der Proteine hatte eine schwache Bindung zur RNA und ließ sich schon mit 0,5 M KCl eluieren.

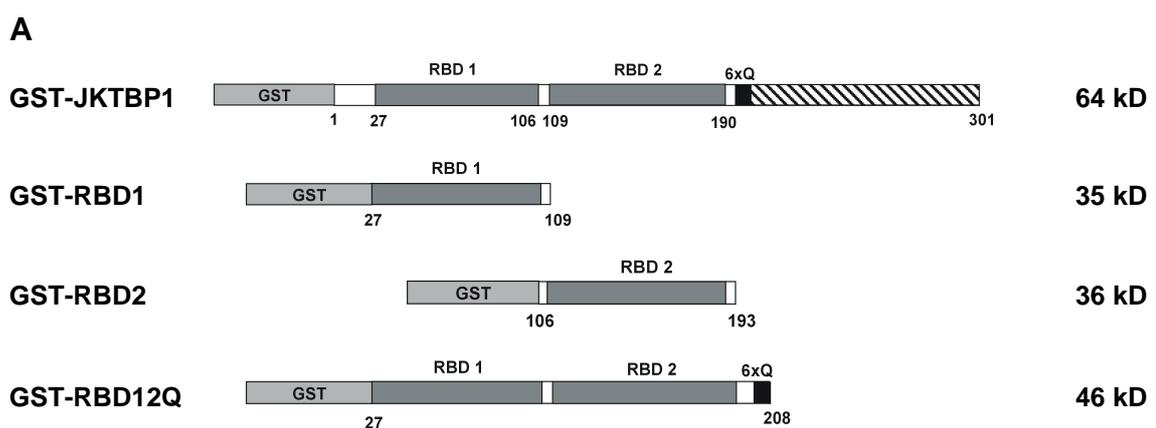
Proteine mit einer starken Bindung an das minimale NRF-IRES-Element konnten erst mit 2 M KCl von der RNA gelöst werden.

**B:** Die drei Waschfraktionen (**1-3** und **7-9**) sowie alle drei Eluate (**4-6** und **10-12**) wurden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Coomassie-Lösung gefärbt. Die Spuren **1** bis **6** zeigen die Aufreinigung am minimalen IRES-Element, **7** bis **12** die Aufreinigung mit Kontroll-RNA. Die Elution mit 2 M KCl zeigte bei der NI0-RNA zwei Banden; die obere Bande mit 45 kD (Stern) war unspezifisch, sie wurde auch bei der Kontrolle detektiert. Die 38 kD Bande (Pfeil) hingegen konnte nur am minimalen IRES-Element nachgewiesen werden; diese spezifische Bande wurde ausgeschnitten und durch die Firma Eurogentec mit ESI/MS/MS analysiert.

### 2.1.3.3 Die Expression von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

In den folgenden RNA-EMSA-Experimenten wurden JKTBP1 und weitere Deletionsmutanten von JKTBP1 als GST-Fusionsproteine exprimiert und in RNA-EMSA-Experimenten eingesetzt (**Abb. 2.5 A**). Neben dem vollständigen Protein wurden die Bindungseigenschaften der RNA-bindenden Domänen 1 (RBD1) und 2 (RBD2) sowie beider Domänen zusammen (RBD12Q) untersucht (**2.1.3.5**).

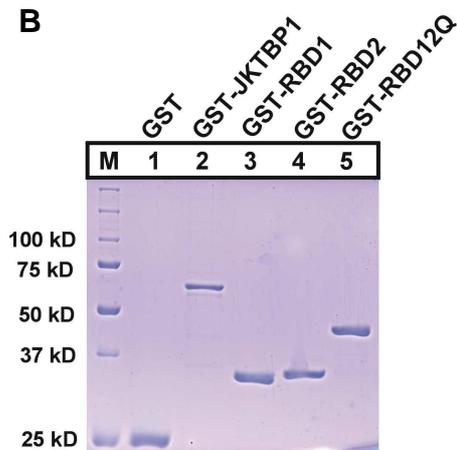
Bei den verwendeten pGEX-Vektoren (Kamei & Yamada, 2002) befindet sich die GST-Domäne ( $M_r = 25$  kD) N-terminal zur codierenden Sequenz der Proteine. Die Expression der Fusionsproteine wird von einem tac-Promotor reguliert, der durch das Lactose-Analogen Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactosid (IPTG) induzierbar ist. Nach der Lyse der Bakterien wurden die GST-Fusionsproteine durch Affinitätschromatographie aufgereinigt. Analysiert wurden die Eluate auf einem SDS-Polyacrylamidgel (**Abb. 2.5 B**). Die Fusionsproteine und die GST-Domäne konnten in guter Qualität in *E.coli* BL21 exprimiert und aufgereinigt werden (4.2.1.6).



**Abb. 2.5: Die Expression von GST-Fusionsproteinen**

**A:** Hier sind alle verwendeten GST-JKTBP1-Konstrukte schematisch dargestellt, wobei die Zahlen die Aminosäuren von JKTBP1 bezeichnen. Neben dem vollständigen Protein wurden die RNA-bindenden Domänen 1 und 2 einzeln und beide zusammen als GST-Fusionen in RNA-EMSA-Experimenten überprüft. Die GST-Domäne ist nicht maßstabsgetreu abgebildet, die Domäne besitzt 242 As bei einer Molmasse von

25 kD. Die Molmassen der GST-Fusionsproteine sind angegeben. **B:** Die Vektoren pGEX-6P2, pGEX-6P2-JKTBP1, pGEX-4T-JKTBP1-RBD1, pGEX-4T-JKTBP1-RBD2 und pGEX-4T-JKTBP1-RBD12Q wurden in



BL21 transformiert (4.2.1.4). Eine 100 ml Kultur wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,8 mit 0,1 mM IPTG für 12 h bei 22°C induziert. Die Bakterien wurden sonifiziert und die GST-Proteine über GST-Sepharose aufgereinigt (4.2.1.6). Je 3 µg der Eluate wurden zur Kontrolle auf ein SDS-Gel geladen, aufgetrennt und die Banden mit Coomassie-Lösung visualisiert. Das Gel zeigt die exprimierten GST-Fusionsproteine GST-JKTBP1 (2), GST-JKTBP1-RBD1 (3), GST-JKTBP1-RBD2 (4), GST-JKTBP1-RBD12Q (5) und die GST-Domäne allein (1). Alle Proteine konnten in guter Qualität aufgereinigt werden, es wurden kaum Abbauprodukte oder Fremdproteine detektiert.

#### 2.1.3.4 Die Eingrenzung der JKTBP1-Bindungsstelle

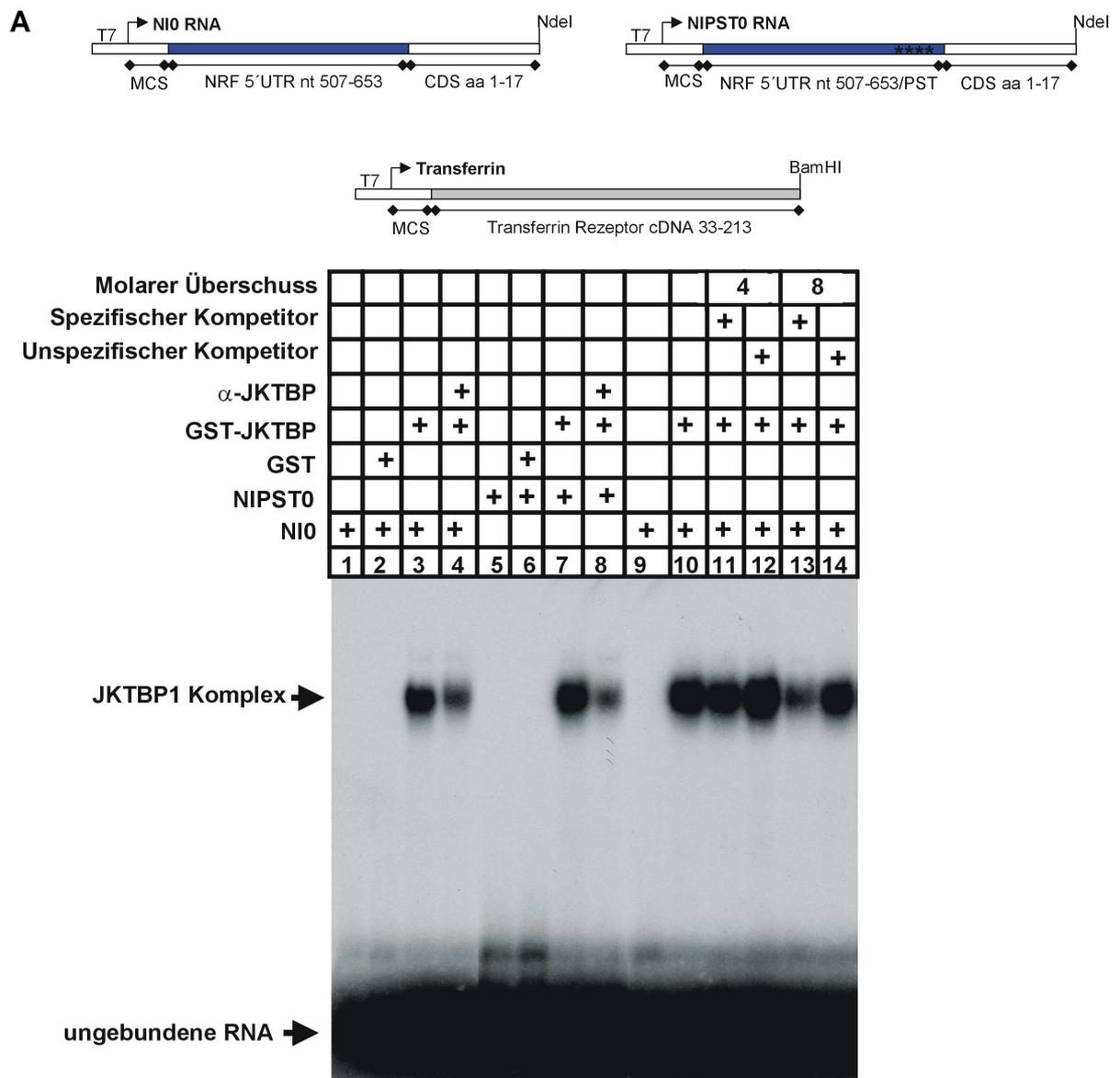
Das Protein JKTBP1 wurde durch die vorhergehende Aufreinigung als NRF-IRES-bindendes Protein identifiziert. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, sollten weitere RNA-EMSA-Experimente durchgeführt werden. Dabei wurde JKTBP1 als GST-Fusionsprotein eingesetzt und dessen Bindung an das minimale NRF-IRES-Element untersucht.

Die radioaktiv markierten RNAs NI0 und NIPst0 wurden jeweils mit dem Fusionsprotein inkubiert und über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das RNA-EMSA-Experiment in **Abb. 2.6 A** zeigt, dass GST-JKTBP1 an das minimale NRF-IRES-Element bindet (Spur 3). Als Kontrolle wurde die Bindung der GST-Domäne allein ausgeschlossen (Spur 2). Ebenso wurde überprüft, ob GST-JKTBP1 nach der Zugabe eines Antikörpers gegen JKTBP1 (polykloner Antikörper in Kaninchenserum) im Gel noch stärker retardiert als der Komplex aus GST-Fusionsprotein und NI0-RNA. Doch statt eines Supershifts war eine Schwächung der Bindung zu erkennen (Spur 4). Das zeigt, dass die Bindung von GST-JKTBP1 an das minimale IRES-Element behindert wird. Weitere Versuche (Daten nicht gezeigt) haben ergeben, dass dieser Effekt nicht auf den Antikörper direkt zurückzuführen ist. Ein Kaninchen-Serum ohne JKTBP1-Antikörper hat den gleichen Effekt. Die Bindung wird also unspezifisch geschwächt.

Neben der NI0-RNA wurde auch die NIPst0-RNA eingesetzt. Doch die Veränderung der Haarnadelstruktur I hat keine Auswirkung auf die Bindung von GST-JKTBP1 an die RNA (Spur 7). Dieses Ergebnis bestätigt die Beobachtungen aus den RNA-EMSA-Experimenten mit Cytosolextrakten (**Abb. 2.3**): Auch dort hatte die Veränderung der Haarnadel I keinen Einfluss auf die Bildung der Komplexe. Somit binden sowohl die drei Protein-Komplexe als auch GST-JKTBP1 an einen anderen Bereich im minimalen IRES-Element.

Um die Spezifität der Bindung von GST-JKTBP1 an das minimale IRES-Element zu zeigen, wurde zusätzlich eine Kompetition durchgeführt. Durch die Zugabe von steigenden Mengen

an nicht radioaktivem, spezifischen Kompetitor NIO wurde die Bindung bei achtfachem molarem Überschuss deutlich geschwächt (Spur 13). Der unspezifische Kompetitor, Transferrin-RNA, führte bei achtfachem molarem Überschuss zu keiner Abnahme des Signals (Spuren 12 und 14). Das Fusionsprotein GST-JKTBP1 bindet also spezifisch an das minimale NRF-IRES-Element. Die Veränderung der Sekundärstruktur im Bereich der Haarnadel I hat keine Auswirkung auf die Bindung des Fusionsproteins (Spuren 3 und 7).

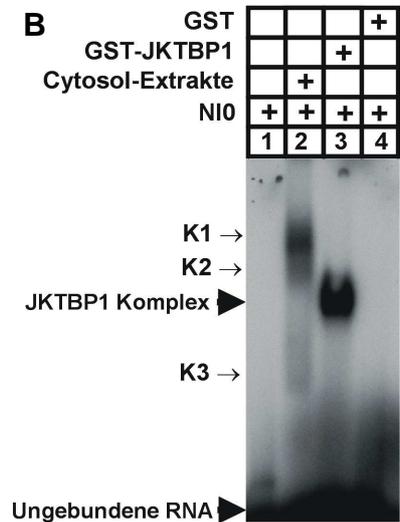


**Abb. 2.6: Das Fusionsprotein GST-JKTBP1 bindet spezifisch an das minimale NRF-IRES-Element**

**A:** Die Plasmide pBLKS-T7MIREs und pBLKS-T7MIREsPst wurden mit *Nde*I, pT7AsTFR wurde mit *Bam*HI linearisiert und zur *in vitro* Transkription eingesetzt (4.2.2.1A). Pro Ansatz wurden 500.000 cpm der *in vitro* transkribierten und radioaktiv markierten RNA verwendet. Die RNA wurde mit 1  $\mu$ g GST-Fusionsprotein und 4  $\mu$ g t-RNA als unspezifischen Kompetitor für 10 min bei 30°C inkubiert. Zum Verdau der RNA wurden anschließend 60 U RNase T1 zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA und die Protein-RNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Bei den Spuren 1-4 wurde jeweils NIO-RNA verwendet, neben der verdauten RNA (1) wurde als Kontrolle auch

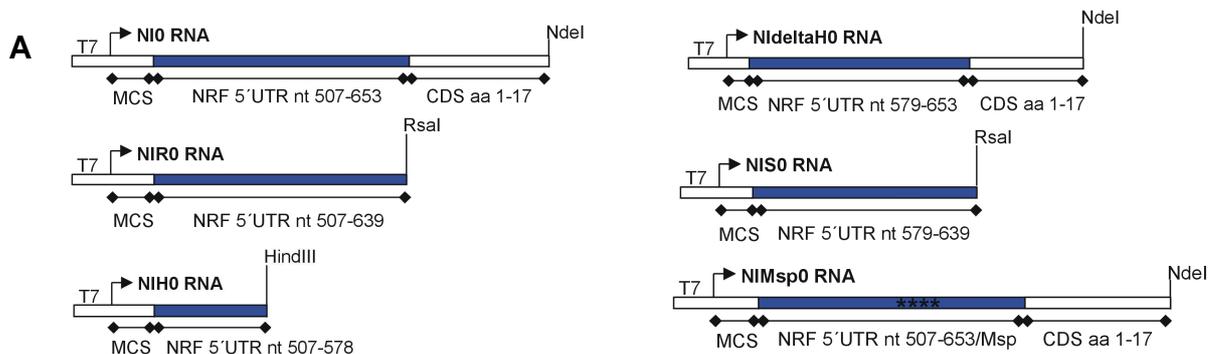
die GST-Domäne (1 µg) getestet (2). Nach Zugabe von GST-JKTBP1 wurde ein Protein-RNA-Komplex detektiert (3, 10), der Einsatz eines Antikörpers gegen JKTBP1 führte nicht zu einem Supershift, sondern zu einer Schwächung der Bindung (4). Die Ansätze mit NIPst0-RNA (5-8) zeigten die gleichen Ergebnisse. Bei der Konkurrenz wurde spezifischer und unspezifischer Kompetitor 5 min vor der radioaktiv markierten RNA zugegeben. Der Zusatz von kalter, spezifischer NI0-RNA senkt mit steigender Menge die Signalintensität deutlich (11 und 13), beim unspezifischen Kompetitor Transferrin-RNA ist hingegen nur ein geringer Effekt zu beobachten (12 und 14). Die schwache Bande (Stern) oberhalb des JKTBP1-Komplexes ist unspezifisch und wird durch ein bakterielles Protein verursacht. Die Intensität dieser Bande schwankt in Abhängigkeit der verwendeten Protein-Präparationen.

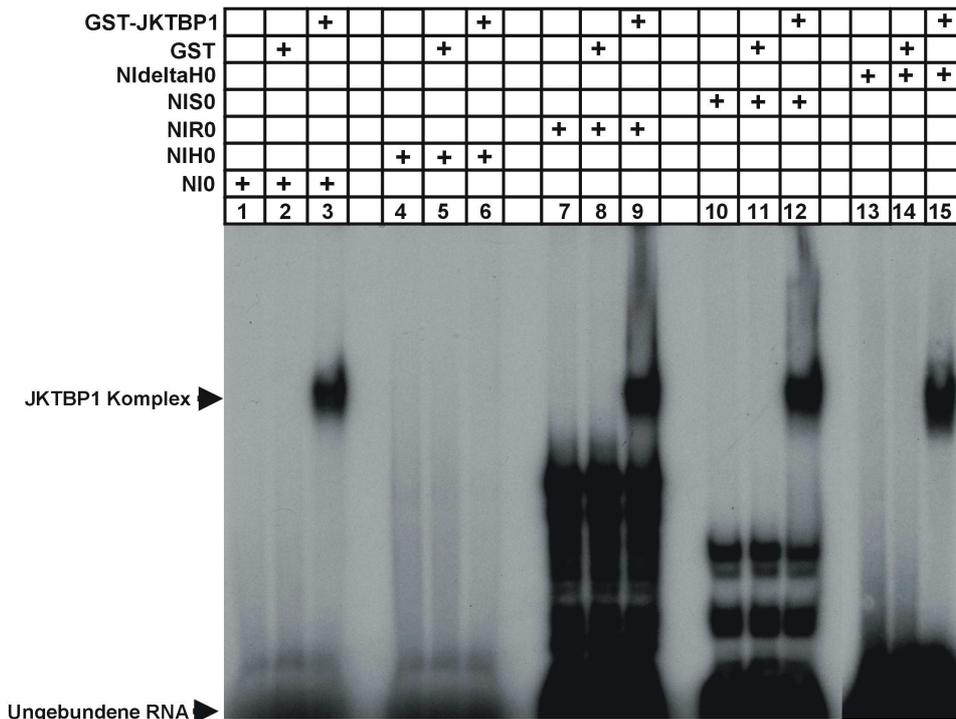
**B:** Das Experiment wurde wie unter **A** beschrieben durchgeführt. Es wurden je 500.000 cpm NI0-RNA mit 1 µg GST-JKTPB1 (3) oder 15 µg Cytosol-Extrakt (2) inkubiert. Als Kontrollen wurden die verdauete NI0-RNA (1) und ein Ansatz mit 1µg GST-Domäne (4) aufgetragen. Durch die Zugabe der Cytosolextrakte bilden sich drei Komplexe (K 1, 2, 3), der GST-JKTBP1-Komplex läuft unterhalb der Komplexe 1 und 2.



GST-JKTBP1 bindet daher direkt und spezifisch an das minimale NRF-IRES-Element. Ein direkter Vergleich mit den Cytosol-Komplexen 1-3 zeigt, dass der JKTBP1-Komplex nicht so stark retardiert ist wie die Komplexe 1 und 2 (**Abb. 2.6 B**). Obwohl das native Gel keine Rückschlüsse auf die Massen der Komplexe erlaubt, lässt sich daraus schließen, dass JKTBP1 nicht allein in diesen Komplexen vorliegt.

In weiteren Bindungsstudien sollte untersucht werden, wo GST-JKTBP1 an das minimale NRF-IRES-Element bindet (**Abb. 2.7**). Zur Eingrenzung der Bindestelle wurden RNA-EMSA-Experimente mit verschiedenen RNA-Konstrukten durchgeführt. Die Wildtyp NI0-RNA entstand aus dem mit *NdeI* linearisierten Vektor pBLKS-T7MIREs und enthält die Basen 507-653 der NRF 5'UTR sowie einen Teil der MCS und der codierenden NRF-Sequenz (Basen 1-51). Die Bindung von GST-JKTBP1 an diese RNA wurde bereits gezeigt.

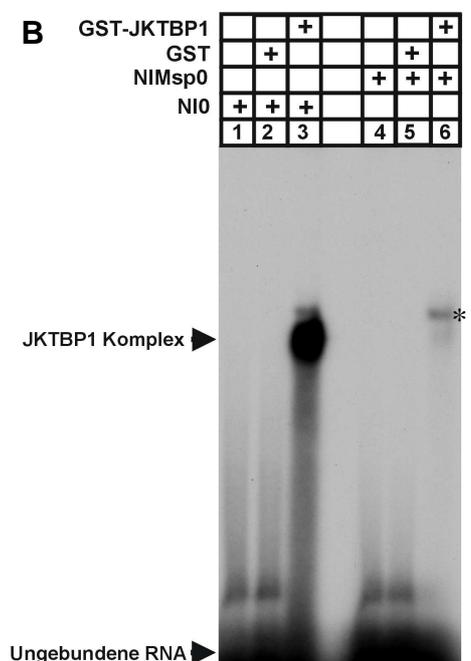




**Abb. 2.7: GST-JKTBP1 bindet das minimale IRES-Element im Bereich nt 579-639**

**A:** Die sechs gezeigten IRES-Konstrukte wurden *in vitro* transkribiert und radioaktiv markiert. Für jeden Ansatz wurden 500.000 cpm RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µg GST-Fusionsprotein und 4 µg t-RNA für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 60 U RNase T1 zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA und die Protein-RNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Für jedes Konstrukt sind die verdaute RNA (1, 4, 7, 10, 13), eine Kontrolle mit 1 µg der GST-Domäne (2, 5, 8, 11, 14) und ein Ansatz mit GST-JKTBP1 gezeigt. Das Fusionsprotein bindet an die Wildtyp-RNA (NI0) (3). Nach dem Entfernen aller drei Haarnadelstrukturen enthält die NIH0-RNA die Basen 507-578 der NRF 5'UTR und bildet zusammen mit GST-JKTBP1 keinen Protein-RNA-Komplex (6). Alle anderen RNAs bilden zusammen mit GST-JKTBP1 einen Komplex. Das Fusionsprotein bindet an die NIR0- (9), NIS0- (12) und NdeltaH0-RNA (15) und benötigt demnach die Basen 579-639 NRF 5'UTR für eine Bindung. Bei den RNAs NIR0 und NIS0 laufen weitere Banden unterhalb des GST-JKTBP1-Komplexes. Diese sind jeweils in allen drei Ansätzen zu erkennen und daher auf die Ausbildung von verschiedenen Sekundärstrukturen der RNAs zurückzuführen.

**B:** Das Experiment wurde wie unter **A** beschrieben durchgeführt. Die RNAs NI0 und NIMsp0 wurden direkt miteinander verglichen. Als Kontrolle wurden die unverdaute RNA (1, 4) und ein Ansatz mit 1 µg GST-Domäne (2, 5) aufgetragen. Durch die Einführung mehrerer Punktmutationen in die Wildtyp RNA NI0 entstand die NIMsp0-RNA. Im Gegensatz zur NI0-RNA (3) ist bei der NIMsp0-RNA kaum noch eine Proteinbindung zu erkennen (6). Die unspezifische Bande (Stern) oberhalb des JKTBP1-Komplexes bleibt hingegen in ihrer Intensität unverändert.



Durch die Linearisierung des pBLKS-T7MIREs Vektors mit *HindIII* und nachfolgender *in vitro* Transkription entstand die NIH0-RNA. Sie enthielt die 5'UTR-Basen 507-578, der Rest des minimalen NRF-IRES-Elements und damit die Haarnadelstrukturen I, II und III wurden deletiert. Bei diesem Konstrukt konnte keine Bindung von GST-JKTBP1 gezeigt werden (**Abb. 2.7 A**, Spur 6). Zur Bestätigung dieser Aussage wurde der Vektor pBLKS-T7Hind mit *NdeI* geschnitten und in RNA transkribiert. Die so hergestellte NdeltaH0-RNA enthielt neben einer verkürzten MCS die Basen 579-653 der NRF 5'UTR sowie den Anfang der codierenden Sequenz. Zusammen mit GST-JKTBP1 konnte hier eine Bindung nachgewiesen werden (**Abb.2.7 A**, Spur 15). Die Aussagen aus den Experimenten mit NIH0-RNA und NdeltaH0-RNA zeigen, dass das Fusionsprotein im Bereich 579-653 der NRF-5'UTR bindet. Eine Bindung an die codierende Sequenz von NRF kann aber nicht ausgeschlossen werden.

Daher wurde im nächsten Schritt das Plasmid pBLKS-T7MIREs mit *RsaI* linearisiert. Die daraus resultierende NIR0-RNA enthielt nur noch die NRF-Sequenz 507-639, die Haarnadelstruktur I und die codierende NRF-Sequenz waren somit entfernt. Im RNA-EMSA konnte eine Bindung von GST-JKTBP1 an diese RNA gezeigt werden (Spur 9).

Aus diesem Ergebnis können mehrere Schlüsse gezogen werden: Zunächst bindet GST-JKTBP1 nicht an die codierende Sequenz von NRF. Ebenso spielt die Haarnadelstruktur I keine Rolle bei der Bindung von GST-JKTBP1 an das minimale IRES-Element. Das bestätigt die vorherigen Daten (**Abb. 2.3** und **Abb. 2.6**), bei denen die Veränderung der Struktur der Haarnadel I keinen Effekt auf die Bindung des Fusionsproteins zeigte. Da der Bereich 507-578 der NRF 5'UTR nicht notwendig für eine Bindung des Proteins war, waren die Basen 579-639, welche die Haarnadelstrukturen II und III bildeten, scheinbar ausreichend für die Bindung. Zur Bestätigung dieser Aussage wurde genau dieser Bereich (Linearisierung von pBLKS-T7Hind mit *RsaI*) in RNA (NIS0) transkribiert und im RNA-EMSA analysiert. Tatsächlich konnte eine Bindung von GST-JKTBP1 an die NIS0-RNA nachgewiesen werden (Spur 12). Die Haarnadelstrukturen II und III sind demnach notwendig für eine Bindung des Proteins. Die Bindungsstelle von JKTBP1 konnte somit auf die Basen 579-639 eingegrenzt werden.

Weiterhin sollte geprüft werden, ob für die Bindung beide Haarnadelstrukturen oder nur bestimmte Bereiche der Basen 579-653 notwendig sind. Dazu wurden vier Punktmutationen in die Sequenz des NRF-IRES-Elements eingeführt: Die Basen 625-628 (UUAA → ccgg) befinden sich im offenen Bereich der Haarnadelstruktur II. Neben der veränderten Sequenz hatte diese Mutation laut MFOLD ebenso eine Änderung der Struktur zur Folge. Diese war jedoch auf die offene Schlaufe der Haarnadel II begrenzt (Strukturvorhersage in **5.3.2 D**). Ein RNA-EMSA-Experiment mit der so veränderten NIMsp0-RNA zeigte, dass die Bindung von

GST-JKTBP1 fast vollständig inhibiert wurde (**Abb. 2.7 B**, Spur 6). Ob die Veränderung der Sequenz oder die der Struktur zu diesem Effekt geführt hat, ist unklar. Dennoch hat dieses Experiment gezeigt, dass GST-JKTBP1 das minimale NRF-IRES-Element im Bereich der Haarnadelstruktur II bindet. Die Bindung erfolgt vermutlich im einzelsträngigen Abschnitt dieses Strukturelements.

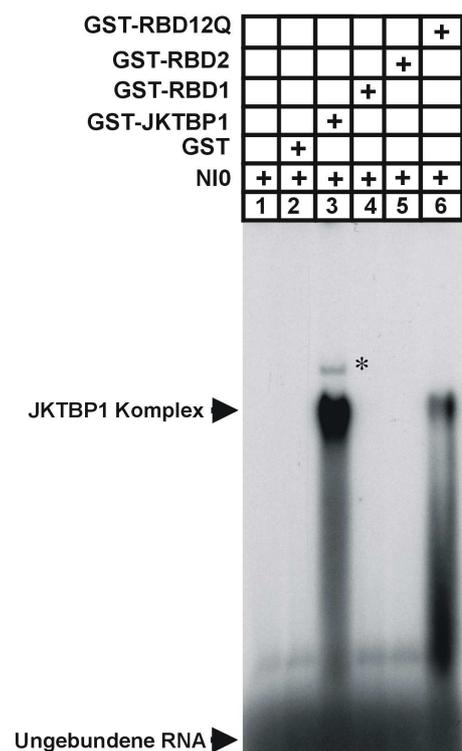
### 2.1.3.5 Die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1

Das Protein JKTBP1 verfügt als RNA-bindendes Protein über zwei RNA-bindende Domänen (RBD1 und RBD2). In der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs) besitzen die meisten Proteine mehrere RBDs. Manche sind damit in der Lage, mehrere RNA-Segmente gleichzeitig zu binden (Dreyfuss et al., 1993). Um zu untersuchen, wie JKTBP1 an das minimale NRF-IRES-Element bindet, wurden verschiedene Deletionsmutanten in RNA-EMSA-Experimenten eingesetzt. Untersucht wurde, ob die RNA-bindenden Domänen RBD1 und RBD2 allein in der Lage sind, an die NI0-RNA zu binden. Ebenso wurde ein Konstrukt mit beiden RBDs verwendet. Die unter 2.1.3.3 beschriebenen GST-Proteine wurden dazu mit radioaktiv markierter NI0-RNA inkubiert und über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die **Abb. 2.8** zeigt, dass GST-JKTBP1 beide RNA-bindenden Domänen benötigt, um das minimale IRES-Element zu binden. Die RBD1 und RBD2 allein sind nicht in der Lage, die NI0-RNA zu binden (Spuren 4 und 5), erst beide zusammen bilden einen Komplex (Spur 6). Dieser ist jedoch schwächer als der des vollständigen Proteins (Spur 3). Es sind daher weitere Bereiche des Proteins für die Interaktion mit RNA erforderlich.

#### Abb. 2.8: JKTBP1 benötigt beide RBDs für die Bindung an das minimale NRF-IRES-Element

Die NI0-RNA wurde *in vitro* transkribiert und radioaktiv markiert. Für jeden Ansatz wurden 500.000 cpm RNA mit 1 µg der verschiedenen GST-Proteine und 4 µg t-RNA für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 60 U RNase T1 zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA und die Protein-RNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert.

Die Kontrollen (1,2) zeigen keine Komplexe, GST-JKTBP1 bindet an die NI0-RNA (3). Die Bande oberhalb des Komplexes ist unspezifisch (Stern). Die Proteine GST-RBD1 (4) und GST-RBD2 (5) zeigen keine Bindung. Erst beide RNA-bindenden Domänen zusammen (6) bilden einen Komplex mit der RNA, dieser ist jedoch schwächer als der des vollständigen Proteins.



## 2.2 Charakterisierung von regulatorischen Elementen in der 3'UTR von NRF

Neben der 5'untranslatierten Region besitzt eine der beiden NRF-mRNA-Spezies eine 1007 b lange 3'untranslatierte Region. Die zweite 3'UTR ist 940 b kürzer. 3'UTRs können ebenfalls eine Reihe von regulatorischen Motiven enthalten, die vor allem die Stabilität und damit die Halbwertszeit der mRNA bestimmen. Weiterhin können Proteine an diese Motive binden und zusätzlich die Regulation modulieren.

So zeigen die Proteine aus der Familie der heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNPs) vielfältige RNA-Bindungseigenschaften: Einige, wie hnRNP C1/C2 (Holcik & Korneluk, 2000; Holcik et al., 2003) und hnRNP I (PTB) (Mitchell et al., 2001), wurden als IRES-bindende Proteine beschrieben, von anderen wurde gezeigt, dass sie an 3'UTRs binden können. Auch für JKTBP1 wurde schon die Bindung an ein AU-reiches Element in der 3'UTR von TNF- $\alpha$  gezeigt (Dean et al., 2002). Daher sollte hier untersucht werden, ob JKTBP1 neben dem minimalen IRES-Element auch an die 3'UTR von NRF binden kann. Dazu wurden RNA-EMSA-Experimente durchgeführt. Die vollständige 3'UTR war jedoch aufgrund ihrer Länge ungeeignet für die folgenden Experimente. Daher wurde sie in drei Abschnitte unterteilt und getrennt in Bindungsstudien analysiert.

### 2.2.1 Die Herstellung von *in vitro* 3'UTR-Plasmiden

Bei den folgenden Proteinbindungsstudien wurde *in vitro* transkribierte und radioaktiv markierte RNA (4.2.2.1A) verwendet. Die Matrizen für die *in vitro* Transkription waren verschiedene T7-Vektoren auf Basis des pBLKS-Vektors.

Der Ausgangsvektor pBLKS-T7-3UTR enthielt die komplette 3'UTR von NRF. Um diese in mehrere Abschnitte aufzuteilen, wurden die Plasmide pBLKS-T7-3UTREco und pBLKS-T7-3UTRDel kloniert (**Abb. 2.9**). Zur Herstellung von pBLKS-T7-3UTREco wurden der Ausgangsvektor pBLKS-T7-3UTR und pBLKS mit *EcoRI/Scal* geschnitten (4.2.2.10A). Das Fragment aus pBLKS enthielt den T7-Promotor und wurde mit dem Fragment aus pBLKS-T7-3UTR ligiert, welches den Großteil der 3'UTR besaß. Dadurch wurde der Anfang der 3'UTR aus dem Vektor entfernt. Das mittlere Segment der UTR konnte mit diesem Konstrukt untersucht werden. Um das Ende der 3'UTR betrachten zu können, wurde ein Teil der Sequenz in pBLKS-T7-3UTREco deletiert. Dazu wurde das Plasmid pBLKS-T7-3UTREco *EcoRI/BbsI* geschnitten (4.2.2.10A), die Enden wurden durch eine Klenow-Reaktion (4.2.2.18) aufgefüllt und nach Gelextraktion (4.2.2.9) des Vektors zu pBLKS-T7-3UTRDel ligiert (4.2.2.11).

Zur weiteren Eingrenzung einer JKTBP1-Bindestelle wurde der mittlere UTR-Abschnitt aus pBLKS-T7-3UTREco weiter unterteilt. Um ein noch weiter verkürztes Fragment zu erhalten, wurde der Vektor *PstI/Bsp1407I* (4.2.2.10A) verdaut. Die Enden wurden in einer Klenow-Reaktion (4.2.2.18) aufgefüllt und der Vektor nach Gelextraktion (4.2.2.9) zu pBLKS-T7-

3UTRDelEco ligiert (4.2.2.11). In diesen Vektor wurden anschließend sechs Punktmutationen eingeführt: In einer Mutagenese-Reaktion mit dem Primer-Set 5'P\_3uMutneu und 3'P\_3uMutneu (4.1.5) wurde ein AT-reiches Motiv mutiert (TTATTTATA→ TcgcTcgAg) und eine neue *PstI* Schnittstelle hergestellt. Der neue Vektor hieß pBLKS-T7-3UTRDelEcoMut.

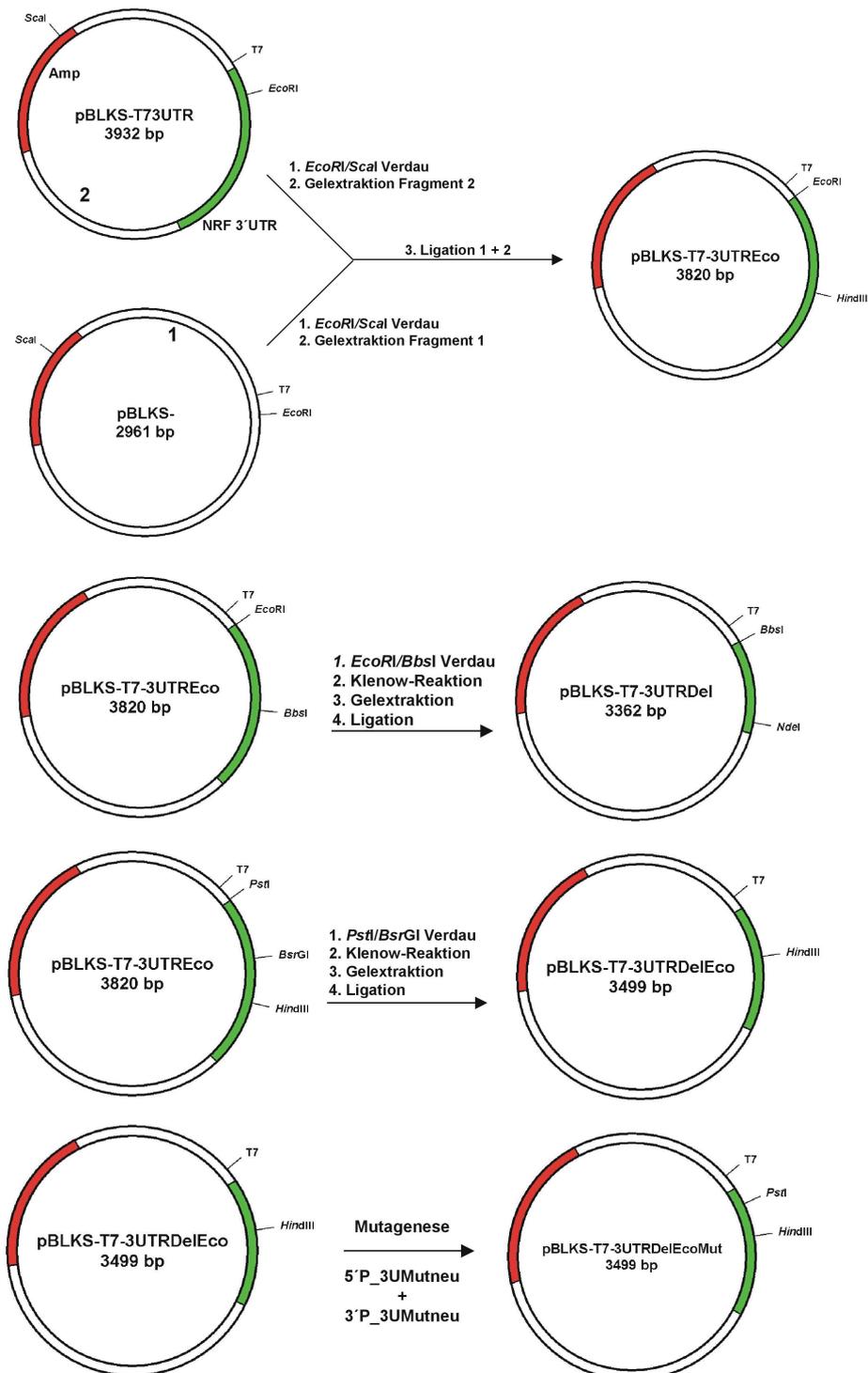
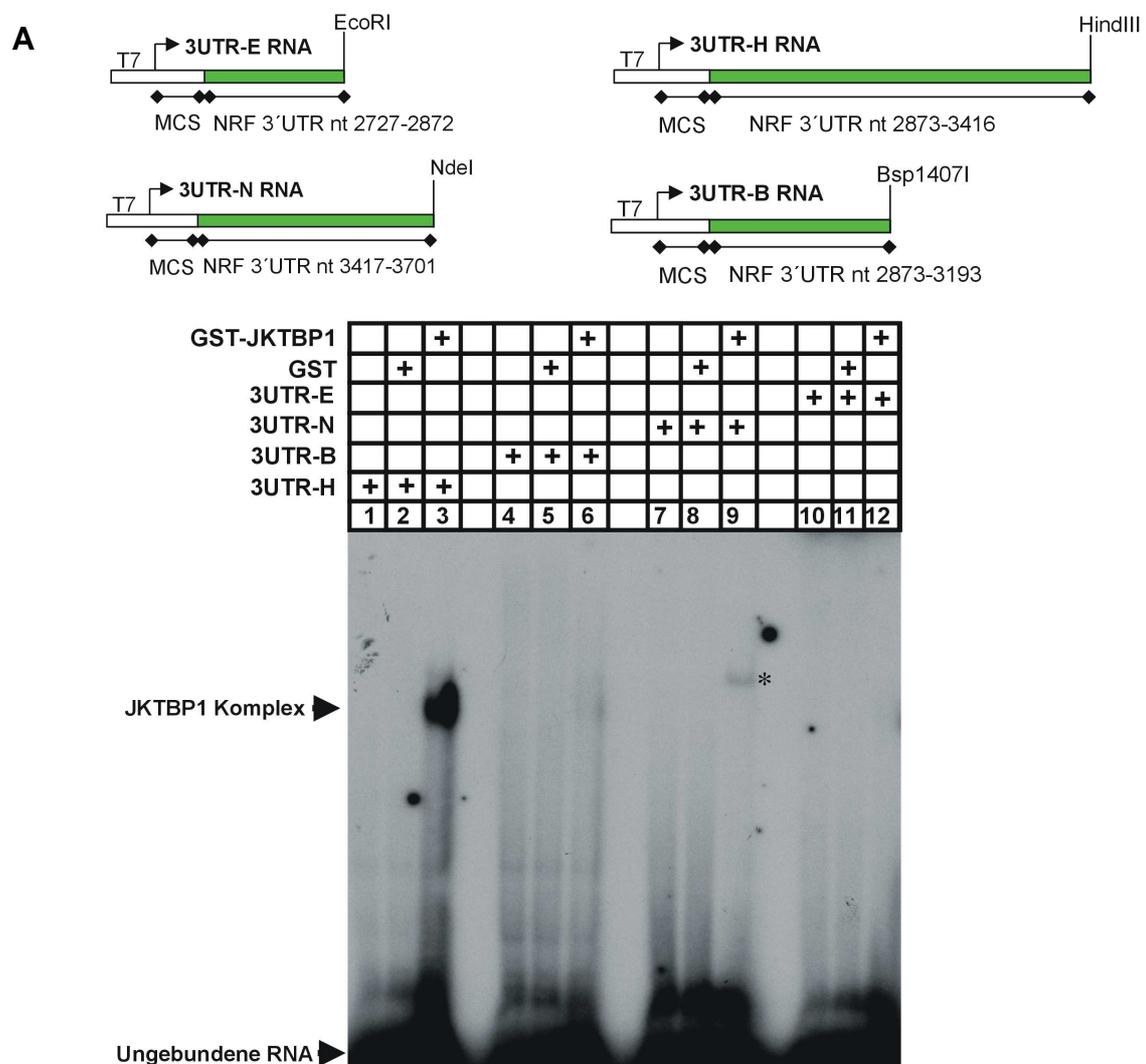


Abb. 2.9: Übersicht über die verwendeten *in vitro* 3'UTR-Plasmide

### 2.2.2 JKTBP1-Bindungsstudien an der 3'UTR von NRF

Um die 3'UTR von NRF in RNA-EMSA-Experimenten (4.2.2.15) einsetzen zu können, wurde sie zunächst in drei Abschnitte unterteilt. Dazu wurden verschiedene Plasmide mit Restriktionsenzymen linearisiert (4.2.2.10A) und *in vitro* transkribiert (4.2.2.1A).

Der Vektor pBLKS-T7-3UTR wurde mit *EcoRI* geschnitten, die daraus resultierende 3UTR-E-RNA enthielt die ersten 145 Basen (2727-2872) der NRF 3'UTR. Durch die Linearisierung von pBLKS-T7-3UTREco mit *HindIII* und nachfolgender *in vitro* Transkription erhielt man die 3UTR-H-RNA. Sie besaß die 3'UTR-Basen 2873 – 3416 (543 b) und bildete damit den mittleren Abschnitt der 3'UTR. Die letzten 284 Basen der UTR (3417-3701) befanden sich in der 3UTR-N-RNA. Diese entstand aus dem mit *NdeI* linearisierten Vektor pBLKS-T7-3UTRDel. Alle drei RNAs wurden im RNA-EMSA mit GST-JKTBP1 inkubiert und über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt.

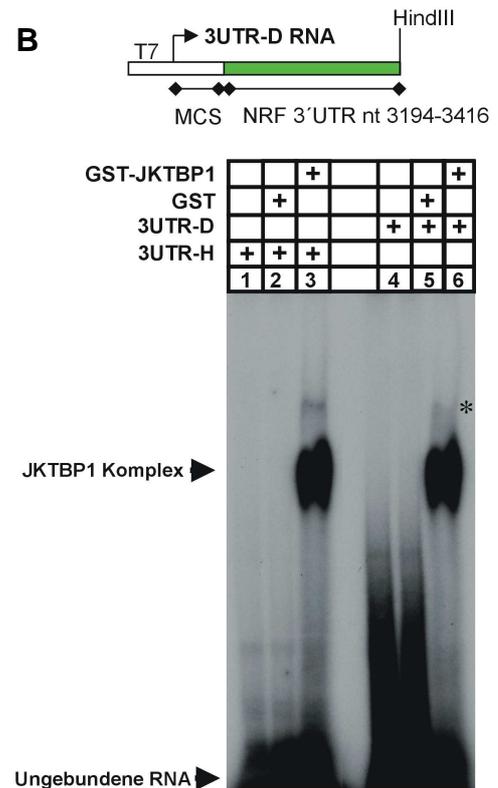


**Abb. 2.10: JKTBP1 bindet im Bereich nt 3194-3416 an die 3'UTR von NRF**

**A:** Die gezeigten 3'UTR-Konstrukte wurden *in vitro* transkribiert und radioaktiv markiert. In jedem Ansatz wurden 500.000 cpm RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 1 µg GST-Fusionsprotein und 4 µg t-RNA für

10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 60 U RNase T1 zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA und die Protein-RNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Für jedes Konstrukt sind die verdauten RNA (1, 4, 7, 10), eine Kontrolle mit der GST-Domäne allein (2, 5, 8, 11) und ein Ansatz mit GST-JKTBP1 aufgetragen. Der Ansatz mit 3UTR-H-RNA zeigt als einziger die Bildung eines JKTBP1-Komplexes (3). Bei der RNA 3UTR-B ist eine sehr schwache Bindung zu erkennen. (6) Sowohl in diesem Ansatz als auch bei der 3UTR-N- (9) und 3UTR-H-RNA (3) ist eine schwache, unspezifische Bande oberhalb der Position des JKTBP1-Komplexes zu sehen (Stern). Die 3UTR-E-RNA (12) zeigt gar keine Bindung.

**B:** Das Experiment wurde ebenfalls wie in **A** beschrieben durchgeführt. Der Film zeigt den Vergleich der beiden RNAs 3UTR-H und 3UTR-D. Neben den Kontrollen, der verdauten RNAs (1, 4) und den Ansätzen mit GST-Domäne (2, 5), wurde jede RNA mit GST-JKTBP1 inkubiert. In beiden Fällen bildet sich ein JKTBP1-Komplex (3, 6), beide Signale sind gleich stark. Oberhalb des Komplexes läuft in beiden Ansätzen eine unspezifische Bande (Stern).

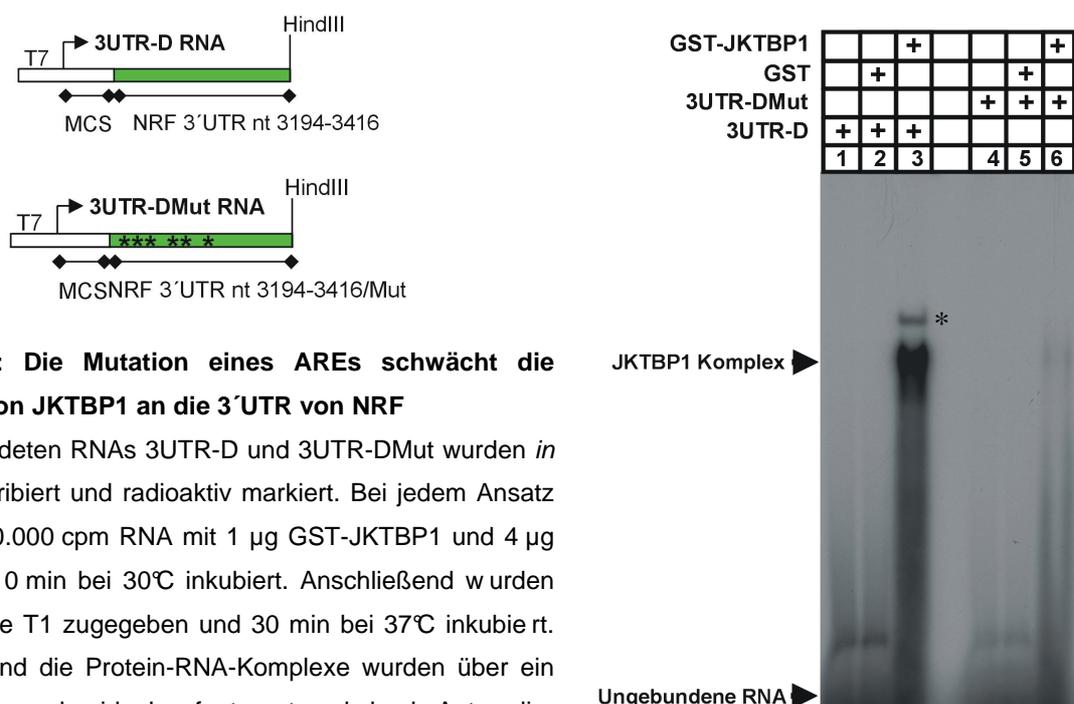


Die **Abb. 2.10 A** zeigt, dass GST-JKTBP1 nur an den UTR-Abschnitt 2873-3416 (3UTR-H) bindet (Spur 3). Bei den anderen beiden Bereichen war keine Bindung zu beobachten (Spuren 9 und 12). Der Abschnitt 2783-3416 war mit 543 Basen noch sehr lang, daher wurde dieser nochmals unterteilt. Durch die Linearisierung von pBLKS-T7-3UTREco mit *Bsp14071* (auch *BsrGI*) konnte die erste Hälfte dieses Abschnitts analysiert werden. Die zugehörige 3UTR-B-RNA enthielt die Sequenz 2783-3193 (321 b). Für die zweite Hälfte des Abschnitts wurde der Vektor pBLKS-T7-3UTRDelEco mit *HindIII* geschnitten. Die *in vitro* transkribierte 3UTR-D-RNA besaß die NRF 3'UTR-Sequenz 3194-3416 (222 b). Während auch bei der 3UTR-B-RNA keine bzw. nur eine sehr schwache Bindung nachzuweisen war (**Abb. 2.10 A**, Spur 6), bildete sich beim Einsatz der 3UTR-D-RNA ein JKTBP1-Komplex, der sich von der Signalstärke nicht vom Komplex an der 3UTR-H-RNA unterschied (**Abb. 2.10 B**, Spuren 3 und 6). Somit konnte die Bindungsstelle von GST-JKTBP1 an der 3'UTR von NRF auf den Bereich 3194-3416 eingegrenzt werden.

### 2.2.3 Der Einfluss eines AU-reichen Elements auf die JKTBP1-Bindung

Die 3'untranslatierten Regionen enthalten häufig AU-reiche Elemente (AREs) als regulatorische Motive. Die Bindung von Proteinen an diese Bereiche führt meist zu einem verstärkten Abbau der mRNA, sie kann aber auch stabilisierend wirken und die Halbwertszeit der mRNA verlängern (Barreau et al., 2005). Die 3'UTR von NRF enthält eine Klasse II ARE.

Das zentrale Motiv des AREs ist ein AU-Nonamer (UUAUUUAUA). Die 3'UTR-Bindungsstelle von JKTBP1 (3194-3416) enthält zwei AU-reiche Sequenz-Elemente: ein AUUUUA-Pentamer und das Nonamer. Für JKTBP1 wurde die Bindung an ein AU-reiches Element in der TNF- $\alpha$  3'UTR gezeigt, dieses enthält mehrere Nonamere (Dean et al., 2001). Daher wurde das Nonamer in der NRF 3'UTR mutiert (3256-3264: UUAUUUAUA  $\rightarrow$  UcgUcgAg). Zur Untersuchung der Auswirkung dieser Mutation auf die JKTBP1-Bindung wurde der Vektor pBLKS-T7-3UTRDeIEcoMut mit *Hind*III linearisiert. Die damit *in vitro* transkribierte 3UTR-DMut-RNA wurde im RNA-EMSA (4.2.2.15) mit der 3UTR-D-RNA verglichen. In **Abb. 2.11** ist gezeigt, dass die Bildung des JKTBP1-Komplexes durch die Mutation des AU-reichen Elements erschwert wird. So ist nur noch ein schwacher Komplex zu erkennen (Spur 6). Die Bindung von JKTBP1 an die 3'UTR findet also im Bereich des AU-reichen-Elements statt, sie konnte aber durch die Mutation nicht komplett inhibiert werden. Demnach sind weitere Bereiche in der Umgebung des AU-reichen-Elements an der Bindung von JKTBP1 beteiligt.



**Abb. 2.11: Die Mutation eines AREs schwächt die Bindung von JKTBP1 an die 3'UTR von NRF**

Die verwendeten RNAs 3UTR-D und 3UTR-DMut wurden *in vitro* transkribiert und radioaktiv markiert. Bei jedem Ansatz wurden 500.000 cpm RNA mit 1  $\mu$ g GST-JKTBP1 und 4  $\mu$ g t-RNA für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 60 U RNase T1 zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA und die Protein-RNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Bei den Kontrollen mit verdauter RNA (1, 4) und 1  $\mu$ g GST-Domäne (2, 5) bilden sich keine Protein-RNA-Komplexe. GST-JKTBP1 bindet an die 3UTR-D-RNA (3), durch die Mutation des AU-reichen Motivs in der 3UTR-DMut-RNA nimmt das Signal des JKTBP1-Komplexes stark ab, es ist aber immer noch eine Bindung zu erkennen (6). Oberhalb des JKTBP1-Komplexes läuft eine unspezifische Bande (Stern).

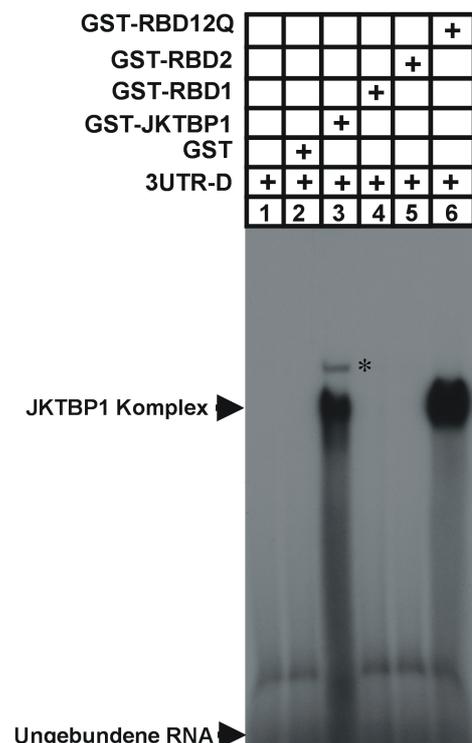
#### 2.2.4 Die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1 an der 3'UTR

Für das minimale IRES-Element von NRF wurde bereits gezeigt, dass beide RNA-bindenden Domänen von JKTBP1 für die Bindung der RNA notwendig sind. Um dies auch für die 3'UTR

zu klären, wurden die unter **2.1.3.3** beschriebenen GST-Fusionsproteine zusammen mit radioaktiv markierter 3'UTR-D-RNA inkubiert und über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt (**Abb. 2.12**). Auch für die Bindung an die 3'UTR werden beide RNA-bindenden Domänen von JKTBP1 benötigt. Die RBD1 und RBD2 allein sind nicht in der Lage, die 3'UTR-D-RNA zu binden (Spuren 4 und 5); beide RBDs zusammen bilden hingegen einen Protein-RNA-Komplex (Spur 6). Anders als bei der 5'UTR (**2.1.3.5**) ist die Bindung des GST-RBD12Q-Proteins an die RNA stärker als die des vollständigen Proteins. Hier scheinen also bestimmte Bereiche des Proteins eine stärkere Bindung zu behindern.

**Abb. 2.12: JKTBP1 benötigt beide RBDs für die Bindung an die 3'UTR von NRF**

Die 3'UTR-D-RNA wurde *in vitro* transkribiert und radioaktiv markiert. Für jeden Ansatz wurden 500.000 cpm RNA mit 1 µg der verschiedenen GST-Proteine und 4 µg t-RNA für 10 min bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden 60 U RNase T1 zugegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die RNA und die Protein-RNA-Komplexe wurden über ein natives Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Autoradiographie detektiert. Die Kontrollen mit verdauter RNA (1) und 1 µg GST-Domäne (2) zeigen keine Komplexe, GST-JKTBP1 bindet an die 3'UTR-D-RNA (3). Die Bande oberhalb des Komplexes ist unspezifisch (Stern). Die Proteine GST-RBD1 (4) und GST-RBD2 (5) zeigen keine Bindung. Erst beide RNA-bindenden Domänen zusammen (6) bilden einen Komplex mit der RNA, der eine stärkere Bindung als das vollständige Protein aufweist.



### 2.3 Der Einfluss von regulatorischen Elementen der 5'UTR auf die Aktivität des NRF-IRES-Elements

In Abschnitt **2.1** wurden regulatorische Elemente in der 5'UTR von NRF beschrieben. Das minimale NRF-IRES-Element besitzt drei Haarnadelstrukturen (**2.1.2**). Die Haarnadel I direkt vor dem Startcodon wurde in ihrer Struktur verändert. Dies hatte jedoch keinen Einfluss auf die Bindung von JKTBP1 *in vitro*. Parallel zu den Bindungsstudien wurde diese Struktur-Veränderung in einem Reportersystem analysiert. Es wurde gezeigt, dass JKTBP1 *in vitro* an die Haarnadelstruktur II bindet. Welche Wirkung die Haarnadelstruktur II auf die IRES-Aktivität hat und wie die Bindung von JKTBP1 diese beeinflusst, wurde hier ebenfalls untersucht.

### 2.3.1 Das Reportergensystem

Um die Aktivität von IRES-Elementen *in vivo* bestimmen zu können, wird ein besonderes Testsystem benötigt. Das Standard-Testsystem für die Messung von IRES-Aktivitäten sind Reporter-Gen-Experimente mit bicistronischen Plasmiden (Sachs, 2000). Die Plasmide tragen zwei Reportergene: das Gen der Renilla-Luziferase (aus *Renilla Muelleri*) und das der Firefly-Luziferase (aus *Photinus pyralis*). Dieses System wird auch hier verwendet. Dabei befindet sich die Sequenz des zu testenden IRES-Elements zwischen den Luziferase-Genen. Die Plasmide werden in Zellen transfiziert (4.2.4.3.1) und dort über einen SV40 Promotor in RNA transkribiert. Die entstandene RNA ist bicistronisch, sie enthält die vollständigen, codierenden Sequenzen von Renilla- und Firefly-Luziferase. Die RNA wird in den Zellen mit einer Cap-Struktur versehen und aufgrund des SV40-poly(A)-Signals im Vektor polyadenyliert. Das erste Cistron, die Renilla-Luziferase, wird cap-abhängig translatiert. Das zweite Cistron, die Firefly-Luziferase, kann nur über einen internen Ribosomeneintritt, also cap-unabhängig, translatiert werden. Zum Nachweis der IRES-Aktivität wird dann die Proteinmenge der beiden Luziferasen in Zellysaten (4.2.4.5.3, 4.2.4.7) bestimmt.

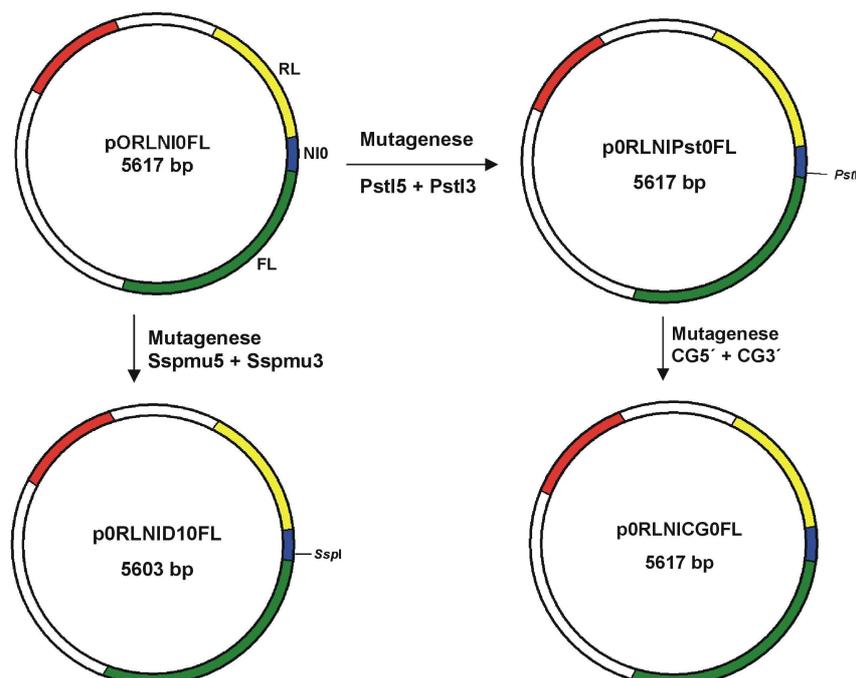
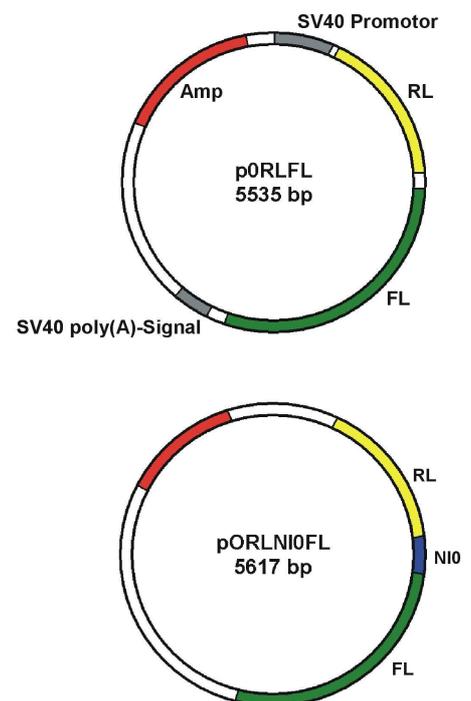
Die Messgröße ist dabei die Enzymaktivität der beiden Luziferasen. Die Renilla-Luziferase ermöglicht die Umsetzung von Coelenterazin und O<sub>2</sub> zu Coelenteramid und CO<sub>2</sub>. Während der Reaktion wird Licht emittiert. Die Lichtintensität ist proportional zur Enzymkonzentration. Das System ist sehr sensitiv, und der Zusammenhang zwischen Lumineszenz und Enzymkonzentration ist über einen großen Bereich linear. Die Renilla-Lumineszenz ist ein Maß für Transkriptionsrate und Lebensdauer der bicistronischen RNA, sie zeigt den Grundlevel der cap-abhängigen Translation in den Zellen an. Als interner Standard dient sie dazu, solche Effekte sowie Unterschiede in der Transfektionseffizienz zu berücksichtigen. Die Firefly-Luziferase katalysiert die Reaktion von D-Luziferin, Mg<sup>2+</sup>, ATP und O<sub>2</sub> zu Oxyluziferin und CO<sub>2</sub>. Während dieser Reaktion wird Licht einer Wellenlänge von 562 nm emittiert. Auch hier ist die gemessene Lumineszenz proportional zur Enzymkonzentration. Die Firefly-Lumineszenz ist ein Maß für die IRES-Aktivität. Für die Auswertung wird die Firefly-Lumineszenz stets auf die Renilla-Lumineszenz bezogen.

### 2.3.2 Die Herstellung von bicistronischen Reporter-Gen-Plasmiden

Zur Messung der NRF-IRES Aktivität wurden bicistronische Reporter-Gen-Plasmide verwendet. Als Basisvektor diente p0RLFL. Neben den Genen der Renilla(RL)- und Firefly(FL)-Luziferase enthielt der Vektor einen SV40 Promotor und ein SV40 poly(A)-Signal. Die „0“ im Vektornamen zeigt an, dass eine Donor-Akzeptor-Spleißstelle von 57 Basen entfernt wurde. In diesen Basisvektor wurde die Sequenz des minimalen NRF-IRES-Elements (507-653) zwischen die Luziferase-Gene inseriert (Sall/SacI-Fragment), der

Zielvektor hieß p0RLNIOFL. Um die Bedeutung der Haarnadelstruktur I für die Aktivität des NRF-IRES-Elements zu untersuchen, wurde das Plasmid p0RLNIOFL durch mehrere Mutagenese-Reaktionen (4.2.2.7) verändert (**Abb. 2.13**): Zur Veränderung der Haarnadelstruktur I wurden mit dem Primer-Set PstI5 und PstI3 (4.1.5) vier Punktmutationen (649–652: GCTT → tgca) gesetzt, dies führte zu einer neuen *PstI*-Schnittstelle und zur Veränderung der Haarnadelstruktur (p0RLNIOFLPst). Ausgehend von p0RLNIOFLPst wurden durch die Primer CG5' und CG3' (4.1.5) weitere Basen mutiert (641-643: AGC → gca). Der Zielvektor p0RLNIOFLCG enthielt die ursprüngliche Struktur der Haarnadel I, allerdings eine veränderte Sequenz. Außerdem wurde die Haarnadel I (637-650) in p0RLNID10FL vollständig deletiert. Dazu wurde eine Mutagenese mit den Primern Sspmu5 und Sspmu3 durchgeführt. Neben der Deletion der 14 Basen wurde eine neue *SspI*-Schnittstelle eingeführt.

Ein weiteres Experiment sollte klären, welchen Einfluss die Haarnadel II auf die IRES-Aktivität hat. Daher wurde zum einen die Haarnadel II (579-639) deletiert. Ausgehend vom p0RLNIOFL-Vektor wurde die Deletion durch eine Mutagenese mit den Primern 5'p0RLNIOFL-del und 3'p0RLNIOFL-del (4.1.5) erreicht. Der Zielvektor war p0RLNIH0FL. Zum anderen wurden vier Punktmutationen in p0RLNIOFL (625-628: TTA → ccg) gesetzt. Durch die Mutagenese mit MspI5 und MspI3 (4.1.5) entstand in eine neue *MspI*-Schnittstelle. Der Vektor hieß dementsprechend p0RLNIMsp0FL.



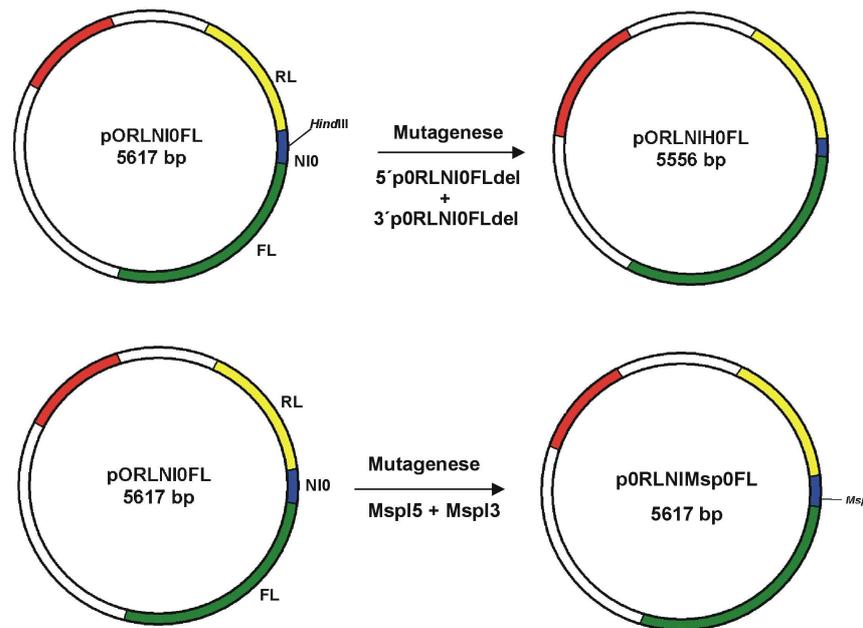


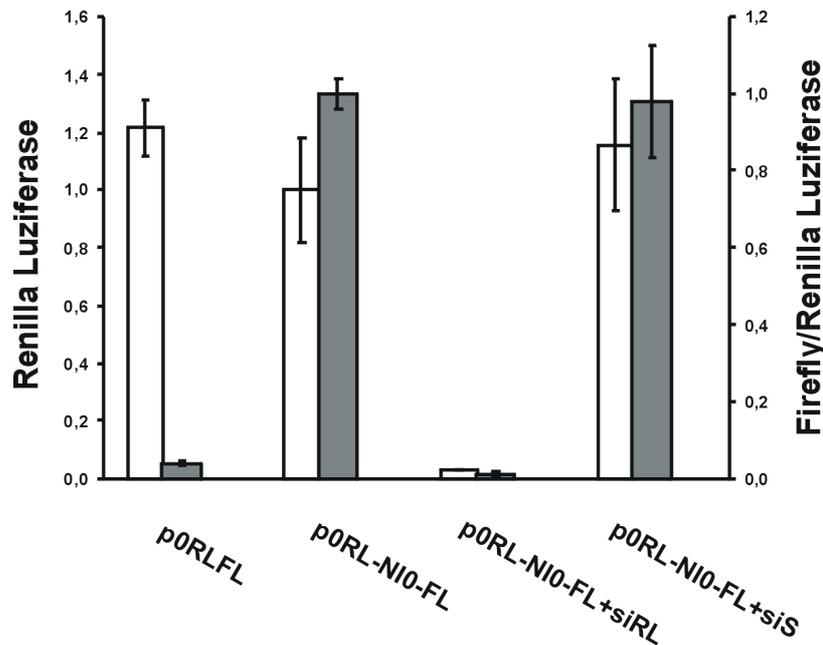
Abb. 2.13: Die bicistronischen Reporterplasmide

### 2.3.3 Die Kontrolle der bicistronischen RNA

Das bicistronische Reportergensystem hat einige Nachteile, die berücksichtigt werden müssen. So ist die Integrität der bicistronischen RNA die wichtigste Voraussetzung für eine korrekte Messung. Um das nachzuweisen, sind verschiedene Kontrollen notwendig.

Eine mögliche Fehlerquelle ist ein kryptischer Promotor in der IRES-Sequenz. Eine solche Sequenz könnte die Transkription des Firefly-Gens unabhängig von der Transkription des gesamten bicistronischen Konstruktes ermöglichen. Die gemessene Firefly-Luziferase-Aktivität wäre nicht auf die Aktivität des IRES-Elements zurückzuführen. Für das NRF-IRES-Element konnte aber gezeigt werden, dass dieses keinen kryptischen Promotor enthält (Reboll et al., 2007): Nach der Deletion des SV40 Promotors sowie des gesamten Renilla-Luziferase-Gens wurden nur noch sehr geringe Enzymaktivitäten detektiert.

Eine weitere Fehlerquelle ist alternatives Spleißen. Fast alle Expressionsvektoren enthalten eine künstliche Donor-Akzeptor-Spleißstelle. Sie erhöht die Expression der Gene auf den transfizierten Plasmiden. Es ist jedoch möglich, dass sich in der IRES-Sequenz ebenfalls Spleißstellen befinden. Werden diese aus Vektor und IRES-Element kombiniert, kann eine RNA entstehen, die kein Renilla-Luziferase Gen mehr trägt und den Großteil des IRES-Elements verloren hat. Das Firefly-Luziferase-Gen könnte somit cap-abhängig translatiert werden. Bei dem hier verwendeten Testsystem wurden aus diesem Grund bei allen bicistronischen Reporterplasmiden die Vektor-Spleißstellen entfernt. Um weiterhin zeigen zu können, dass die bicistronischen RNAs intakt sind, wurden diese in Northern Blots detektiert (4.2.2.20). Diese Kontrollen sind bei den verwendeten Konstrukten in **Abb. 2.15** gezeigt.



**Abb. 2.14: Der Renilla-Knockdown senkt auch die Aktivität der Firefly-Luziferase**

HeLa B-Zellen wurden mit 3 µg Reporterplasmid pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivität beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Für jeden Reporter wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter p0RLN10FL auf 1 gesetzt worden. In allen Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen den Quotient aus Firefly- und Renilla-Aktivität und damit die IRES-Aktivität. Auch dieser Faktor, der im Mittel einen Wert von 13 aufwies, wurde für p0RLN10FL gleich 1 gesetzt. Der Basisvektor p0RLFL zeigt nur eine geringe Aktivität, nach der Insertion des minimalen NRF-IRES-Elements steigt die IRES-Aktivität auf ein Vielfaches. Die Ko-Transfektion von Kontroll-siRNA (siS) hat keine Wirkung auf die Aktivität der Renilla-Luziferase und den Quotienten. Die Zugabe von spezifischer siRNA (siRL) senkt die Aktivität beider Luziferasen ungefähr auf den Grundlevel von p0RLFL, beide codierenden Sequenzen liegen demnach auf einer intakten mRNA.

Da aber im Northern Blot geringe Mengen an Fragmenten nicht nachweisbar sind, wurde eine weitere Kontrolle durchgeführt. Dazu wurden Zellen mit dem Reporterplasmid p0RLN10FL transfiziert. Durch den Einsatz von siRNA gegen das Renilla-Luziferase-Gen sollte nicht nur die Aktivität der Renilla-Luziferase stark reduziert werden. Auch die Aktivität der Firefly-Luziferase muss abnehmen, wenn beide Proteine von einer intakten bicistronischen RNA translatiert werden. Das Ergebnis dieses Experiments ist in **Abb. 2.14** gezeigt: Der Basisvektor p0RLFL zeigt eine geringe Grundaktivität. Durch die Insertion des minimalen IRES-Elements (N10) in diesen Vektor steigt der Quotient aus Renilla-/Firefly-Lumineszenz stark an. Dieser ist ein Maß für die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements. Die Ko-Transfektion von Kontroll-siRNA (siS) zum p0RLN10FL-Reporter beeinflusst die Aktivität der beiden Luziferasen nicht. Durch den Renilla-Knockdown (siRL) hingegen nimmt die Aktivität beider Luziferasen stark ab. In beiden Fällen ist kaum noch

Lumineszenz zu messen. Beide Luziferase-Gene liegen also auf einer intakten bicistronischen RNA.

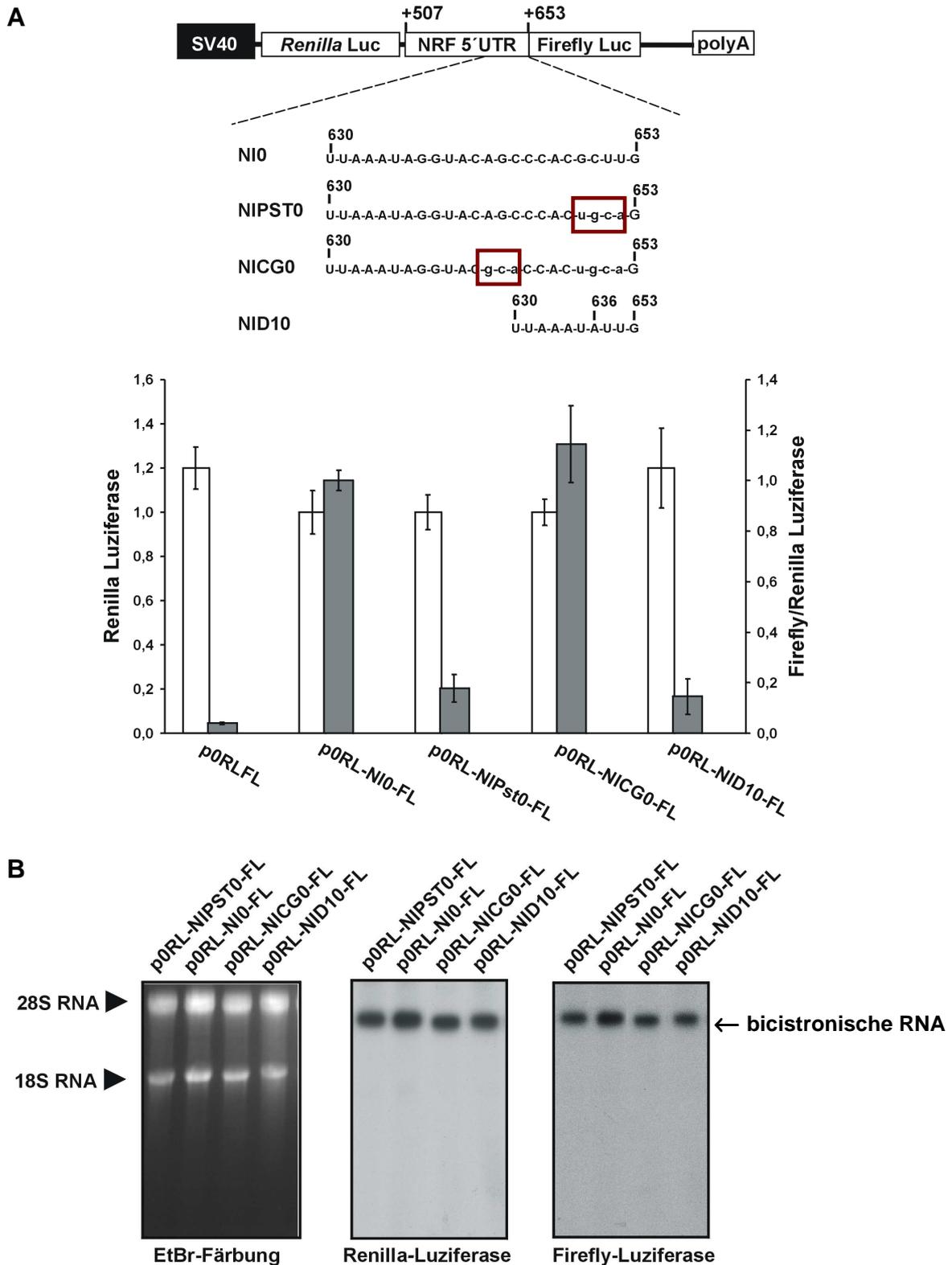
### 2.3.4 Die Auswirkung der Struktur auf die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements

Die Struktur des minimalen NRF-IRES-Elements wurde in 2.1.2 mittels MFOLD vorhergesagt und experimentell modifiziert. Demnach bilden die letzten 150 Basen der NRF 5'UTR drei Haarnadelstrukturen aus. Zunächst soll die Bedeutung der Haarnadel I (640-653) für die IRES-Aktivität geklärt werden. Dazu wurde die Sequenz des minimalen Elements (NI0) verändert (649–652: GCUU → ugca in NIPst0). Dies führte zu einer Strukturveränderung in der Haarnadel I (**Abb. 2.2 B**).

Um den Effekt der Strukturveränderung auf die IRES-Aktivität zu bestimmen, wurden beide Sequenzen (NI0 und NIPst0) in bicistronischen Reporterplasmiden analysiert. HeLa B-Zellen wurden dazu mit diesen Plasmiden und der Negativkontrolle p0RLFL transfiziert und die Aktivität beider Luziferasen in Zelllysaten bestimmt. Die Messung (**Abb. 2.15**) hat gezeigt, dass die IRES-Aktivität nach der Strukturveränderung (NIPst0) auf ungefähr 20% der Aktivität des Wildtyps sinkt. Um zu überprüfen, ob dieser Effekt auf die Sequenz- oder die Strukturveränderung zurückzuführen ist, wurden zunächst weitere Mutationen (641-643: AGC → gca in NICG0) in NIPst0 eingefügt. Diese stellten die ursprüngliche Sekundärstruktur wieder her, allerdings mit einer anderen Sequenz (NICG0, Strukturvorhersage in 5.3.2 C). Im Reporter-Experiment konnte ein Anstieg der IRES-Aktivität auf den Level des Wildtyps beobachtet werden. Die Abnahme der IRES-Aktivität durch die Einführung der Punktmutationen in NI0Pst ist demnach auf die Veränderung der Struktur zurückzuführen. Die Deletion der gesamten Haarnadelstruktur I (Deletion der Basen 637-650 in NID10) zeigte den gleichen Effekt wie die Punktmutationen in NIPst0. Die veränderte Haarnadel I hat also keinen inhibitorischen Effekt.

Diesen Daten zufolge, ist die Haarnadelstruktur I von großer Bedeutung für die interne Translationsinitiation am minimalen NRF-IRES-Element. Schon eine geringe Veränderung der Sekundärstruktur senkt die IRES-Aktivität deutlich. Da aber noch rund 20% der Aktivität erhalten bleiben, sind weitere Elemente an der Vermittlung der IRES-Aktivität beteiligt.

Zur Kontrolle der Integrität der bicistronischen RNAs wurden Northern Blots (4.2.2.20) durchgeführt. Bei allen verwendeten Reporterplasmiden wurde sowohl mit der Renilla-Sonde als auch mit der Firefly-Sonde lediglich eine intakte bicistronische RNA gezeigt (**Abb. 2.15 B**). Beide Gene befinden sich demnach auf einer RNA. Es wurden keine weiteren kleineren Fragmente detektiert, die die Messung der Luziferase-Aktivitäten verfälschen könnten.



**Abb. 2.15: Die Haarnadelstruktur I ist von großer Bedeutung für die Funktion des minimalen NRF-IRES-Elements**

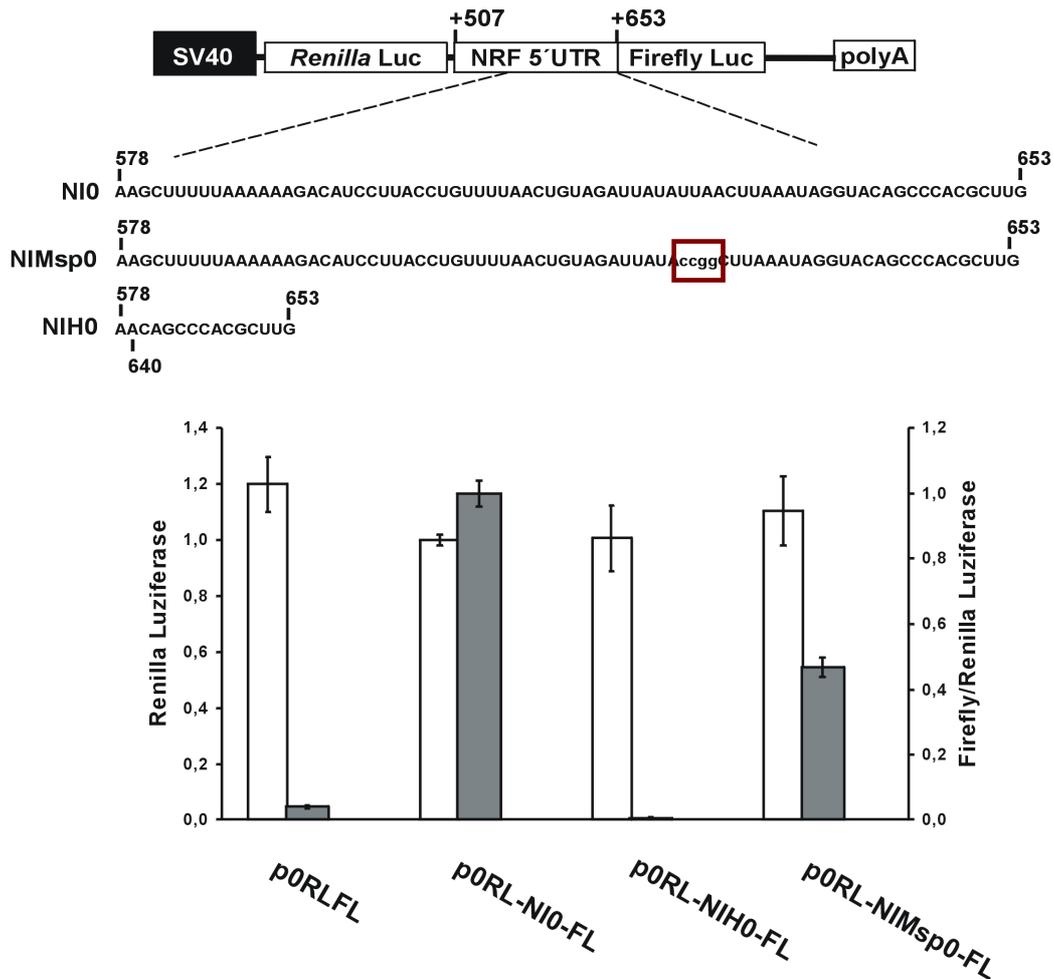
**A:** HeLa B-Zellen wurden mit 8 µg Reporterplasmid pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Pro Reporter wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Standardabweichung ist angegeben. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-

Luziferase, diese ist für den Reporter p0RLNI0FL auf 1 gesetzt worden. In allen Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen die IRES-Aktivität. Auch diese wurde für p0RLNI0FL gleich 1 gesetzt. Durch die Einführung von vier Punktmutationen in NIPst0 wird die Sekundärstruktur verändert und die Aktivität sinkt auf 20% der Wildtyp-Aktivität. Das Setzen drei weiterer Mutationen in NICG0 stellt die volle IRES-Aktivität wieder her. Die Deletion der gesamten Haarnadel I (NID10) senkt die Aktivität wieder auf den Level des p0RLNIPst0FL-Reporters. Die Struktur der Haarnadel I ist somit von Bedeutung für die Vermittlung der NRF-IRES-Aktivität.

**B:** HeLa B-Zellen wurden mit 8 µg Reporterplasmid pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert, und die RNA wurde aus den Zellen präpariert (4.2.4.6). 10 µg der Gesamt-RNA wurden über ein denaturierendes Agarosegel (4.2.2.13.2) aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert (4.2.2.20.1). Zur Detektion wurden spezifische, radioaktiv markierte DNA-Sonden (4.2.2.20.2) verwendet: Die Renilla-Sonde enthielt die komplette Sequenz der Renilla-Luziferase (936 b), die Firefly-Sonde einen Großteil der codierenden Sequenz der Firefly-Luziferase (1289 b). Die Membran wurde mit beiden Sonden hybridisiert. In beiden Fällen konnte die intakte bicistronische RNA (2,3 kb) für alle verwendeten Reporter detektiert werden. Die EtBr-Färbung zeigt anhand der 28S- und 18S-RNA-Banden, dass vergleichbare RNA-Mengen aufgetragen wurden.

Das GST-Fusionsprotein GST-JKTBP1 hat in RNA-EMSA-Experimenten (2.1.3.4) an die Haarnadelschleife II des minimalen NRF-IRES-Elements gebunden. Diese Bindung ist unabhängig von der Haarnadel I. Die Deletion der gesamten Haarnadelstruktur II (NIH0) sowie die Mutation von vier Basen im einzelsträngigen Bereich der Struktur (625-628: UUAA → ccgg) (NIMsp0) verhinderten die Bindung von JKTBP1 an das IRES-Element (**Abb. 2.7**). Hier sollten nun die Auswirkungen dieser Deletion bzw. Mutation auf die IRES-Aktivität im Reportergensystem bestimmt werden.

Dazu wurden HeLa B-Zellen mit den Plasmiden p0RLNIH0FL und p0RLNIMsp0FL sowie mit dem Wildtyp p0RLNI0FL und der Negativkontrolle p0RLFL transfiziert und jeweils die Aktivitäten der beiden Luziferasen in Zelllysaten bestimmt (**Abb. 2.16**). Das Reportergen-Experiment mit dem NIH0-Konstrukt zeigt den fast vollständigen Verlust der IRES-Aktivität. Die Struktur ist also essenziell für die Vermittlung der IRES-Aktivität. Die Einführung von vier Punktmutationen in die Haarnadel II (NIMsp0) senkt die IRES-Aktivität auf 50% des Wildtyp-Elements. Die Rest-Aktivität von 50 % könnte auf weitere Proteine, die an das NRF-IRES-Element binden, zurückzuführen sein (**Abb. 2.6 B**). So wird zwar die JKTBP1-Bindung durch die Mutationen verhindert, andere Proteine (Protein-RNA-Komplexe in **Abb.2.3**) könnten jedoch weiterhin an das IRES-Element binden und zur Rest-Aktivität beitragen. Ebenso könnte die Haarnadelstruktur I zur Restaktivität beitragen. Die Daten zeigen, dass die Inhibition der JKTBP1-Bindung die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements senkt. JKTBP1 scheint demnach eine IRES-aktivierende Wirkung zu besitzen. Diese soll im nächsten Abschnitt näher untersucht werden.



**Abb. 2.16: Die Haarnadelstruktur II ist essenziell für die Funktion des minimalen NRF-IRES-Elements**  
 HeLa B-Zellen wurden mit 3 µg Reporterplasmid pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Pro Reporter wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter p0RLNIOFL auf 1 gesetzt worden. In allen Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen die IRES-Aktivität. Auch diese wurde für p0RLNIOFL gleich 1 gesetzt. Die Deletion der Haarnadel II des minimalen NRF-IRES-Elements führt zum fast vollständigen Verlust der IRES-Aktivität. Durch die Einführung von vier Punktmutationen in NIO entsteht NIMsp0. Durch diese Mutation sinkt die IRES-Aktivität auf 50% der Wildtyp-Aktivität.

### 2.3.5 JKTBP1 als NRF-IRES aktivierender Faktor

Bisher konnte gezeigt werden, dass JKTBP1 *in vitro* an das minimale NRF-IRES-Element bindet (2.1.3.4). Die Ergebnisse der Reporter-Experimente (2.3.4) lassen eine aktivierende Wirkung auf das IRES-Element vermuten. Um dies zu überprüfen, wurde JKTBP1 in HeLa B-Zellen überexprimiert und die Wirkung auf die IRES-Aktivität bestimmt. Im Gegenzug wurde der endogene JKTBP1-Level durch RNA-Interferenz gesenkt und wiederum die IRES-Aktivität gemessen.

### 2.3.5.1 Die Herstellung von JKTBP1-Expressionsplasmiden

Für die Überexpression von JKTBP1 in HeLa B-Zellen wurden verschiedene Expressionsplasmide (**Abb. 2.17**) verwendet. Der Ausgangsvektor pEGFP-JKTBP1 (Kawamura et al., 2002) wurde für die ersten Überexpressionen eingesetzt. Um einen Einfluss des EGFP-Tags auf die JKTBP1-Funktion ausschließen zu können, wurde die codierende Sequenz von JKTBP1 in den pcDNA<sub>3</sub>-Vektor kloniert. pEGFP-JKTBP1 wurde dazu *EcoRI/SmaI* geschnitten (4.2.2.10), das Fragment durch Gelextraktion isoliert (4.2.2.9) und in den *EcoRI/EcoRV*-geschnittenen Vektor pcDNA<sub>3</sub> inseriert. Der Zielvektor pcDNA<sub>3</sub>-JKTBP1 wird in folgenden Abschnitten als pJKTBP1 abgekürzt. Die Überexpression von JKTBP1 mit Hilfe dieses Plasmids konnte jedoch nur schlecht im Western Blot nachgewiesen werden. Daher wurde für spätere Versuche ein Strep-Tag am N-Terminus platziert. Die JKTBP1-Sequenz wurde dazu mit einer PCR-Reaktion (4.2.2.17) aus dem pEGFP-JKTBP1 Vektor amplifiziert. Das Fragment verfügte über *Eco31I*-Enden und wurde in den *Eco31I*-geschnittenen pEXPR-IBA105 Vektor eingefügt. Der Zielvektor pEXPR-JKTBP1 codierte für das Fusionsprotein Strep-JKTBP1, welches über den Strep-Tag im Western Blot detektiert werden konnte.

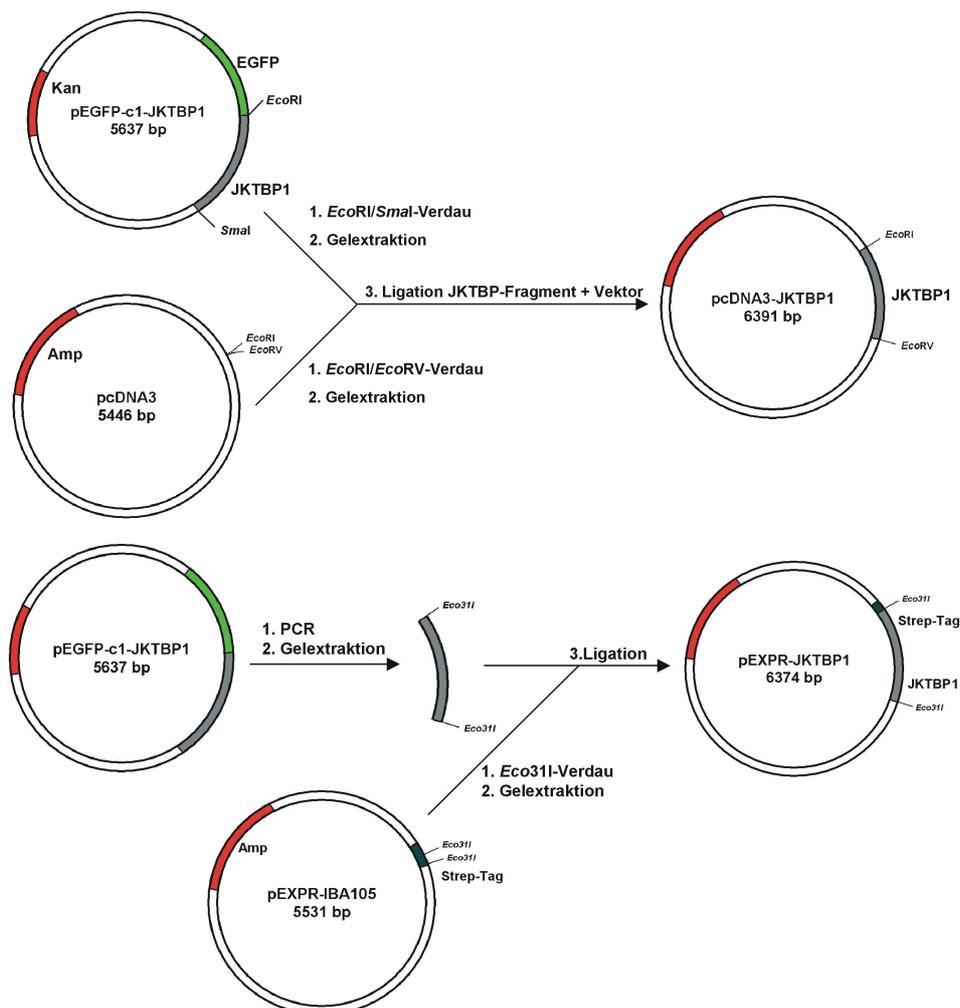
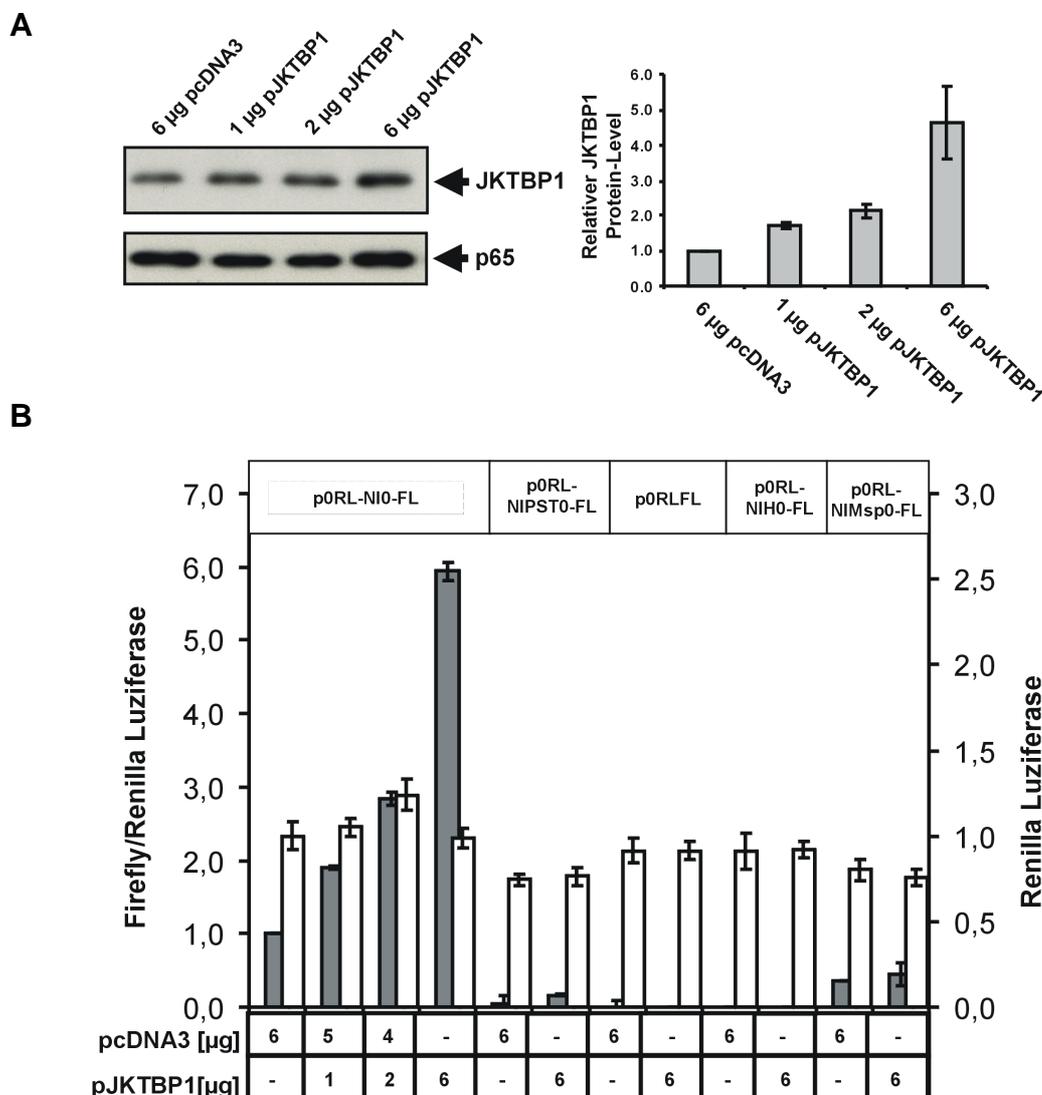


Abb. 2.17: Die JKTBP1-Expressionsplasmide

### 2.3.5.2 Der Einfluss der Überexpression von JKTBP1 auf die NRF-IRES Aktivität

Um den Einfluss von JKTBP1 auf die NRF-IRES-abhängige Translation zu untersuchen, wurden HeLa B-Zellen mit bicistronischen Reporterplasmiden transfiziert (4.2.4.3.1) und die Luziferase-Aktivitäten in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.5.3, 4.2.4.7). Neben den verschiedenen Reportern wurden steigende Mengen an pJKTBP1-Expressionsplasmid und dem Kontrollvektor pcDNA<sub>3</sub> ko-transfiziert. Zum Nachweis der Überexpression wurden die Zellen lysiert (4.2.4.5.2), und JKTBP1 wurde im Western Blot (4.2.3.5) detektiert. Die Kontrolle, die ausschließlich mit dem Vektor pcDNA<sub>3</sub> transfiziert wurde, zeigte den endogenen JKTBP1-Gehalt. Durch die Transfektion steigender Mengen an pJKTBP1 nahm das Signal im Western Blot ebenfalls zu. Diese Korrelation war schlecht zu detektieren, konnte jedoch durch die Auswertung mehrerer Blots gezeigt werden (**Abb. 2.18 A**).



**Abb. 2.18: JKTBP1 steigert die Aktivität des minimalen NRF-IRES Elements**

**A:** HeLa B-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen pJKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Zur Kontrolle wurden 6 µg pcDNA<sub>3</sub>-Vektor eingesetzt. Bei den weiteren Ansätzen wurde die Plasmidmenge mit pcDNA<sub>3</sub> auf 6 µg aufgefüllt. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert

(4.2.4.5.2) und die Lysate im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5). Die angezeigten Proteine wurden mit den Antikörpern  $\alpha$ -JKTBP1 und  $\alpha$ -p65 detektiert. Bei der densitometrischen Auswertung wurden die Intensitäten der JKTBP1-Banden auf die der p65-Banden bezogen. Die Kontrolle mit 6  $\mu$ g pcDNA<sub>3</sub> wurde gleich 1 gesetzt, es wurden drei unabhängige Experimente ausgewertet, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

**B:** HeLa B-Zellen wurden mit 3  $\mu$ g der verschiedenen Reporterplasmiden (oben) und den angegebenen Mengen an pJKTBP1 und pcDNA<sub>3</sub> pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Daten stammen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten, die Standardabweichung ist angegeben. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter p0RLNI0FL auf 1 gesetzt worden. In allen Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen die IRES-Aktivität. Auch diese wurde für p0RLNI0FL gleich 1 gesetzt. JKTBP1 steigert dosisabhängig die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements, die Veränderung der Haarnadel I (NIPst0) senkt die IRES-Aktivität, das IRES-Element bleibt aber durch JKTBP1 aktivierbar. Die Kontrolle mit p0RLFL und der Reporter mit der deletierten Haarnadelschleife II (NIH0) zeigen keine IRES-Aktivität und werden nicht aktiviert. Die IRES-Aktivität des Reporters p0RLNIMsp0FL nimmt durch die Überexpression kaum zu.

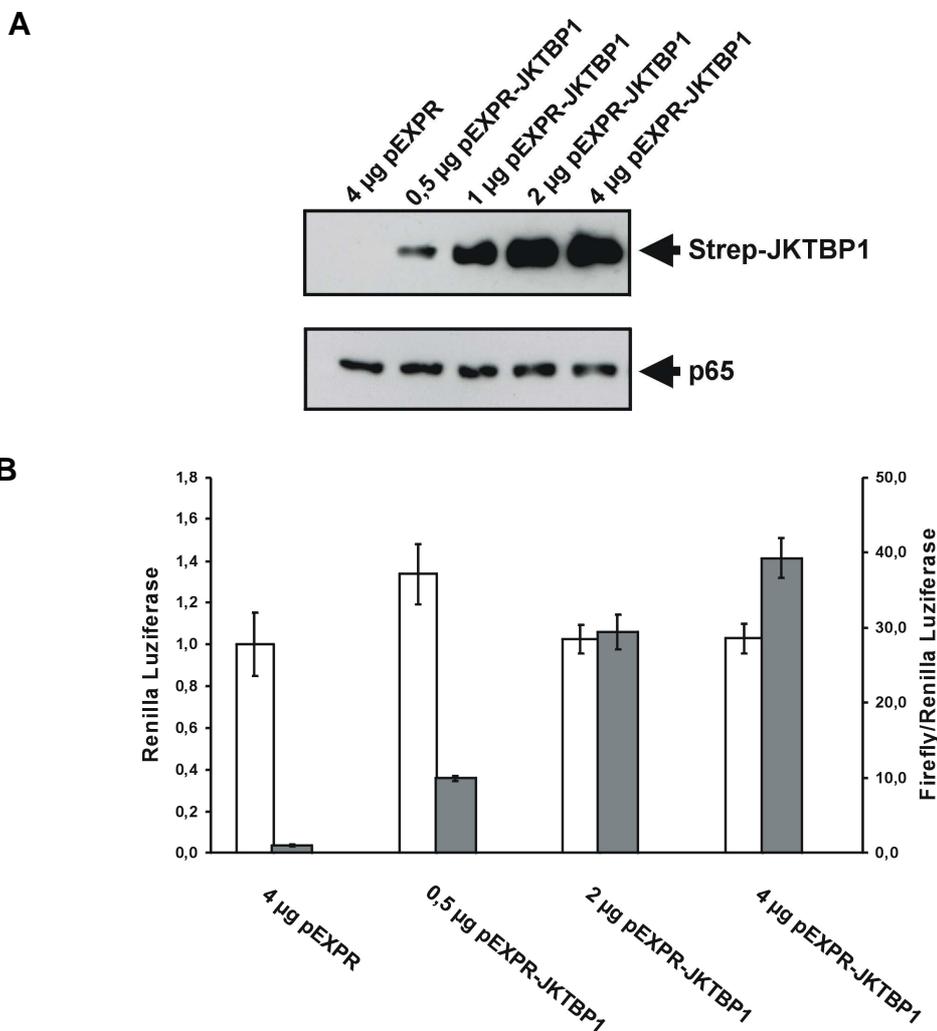
Die Reporter-Experimente zeigen, dass die Überexpression von JKTBP1 die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements erhöht (p0RLNI0FL). Die aktivierende Wirkung ist dosisabhängig und nimmt mit steigenden JKTBP1-Mengen zu. Der Test des p0RLNIPst0FL-Reporters (veränderte Haarnadelstruktur I) bestätigt die Daten aus **Abb. 2.15**. Bei der Kontrolle (6  $\mu$ g pcDNA<sub>3</sub>) wird nur ein Bruchteil der IRES-Aktivität des Wildtyps detektiert, die Überexpression von JKTBP1 führt jedoch auch in diesem Fall zu einer Erhöhung der IRES-Aktivität. Trotz des Verlustes eines Großteils der IRES-Aktivität hat JKTBP1 also immer noch eine aktivierende Wirkung auf das veränderte IRES-Element, wenn auch eine schwächere als beim Wildtyp (Steigerung um Faktor 4 statt 6). Zusammen mit den Aussagen aus Bindungsstudien und Strukturanalysen lässt sich sagen, dass die Bindung und auch die Wirkung von JKTBP1 unabhängig von der Haarnadelstruktur I vermittelt werden.

Wird hingegen die Haarnadelstruktur II im Reporter p0RLNIH0FL deletiert, führt dies zum vollständigen Verlust der IRES-Aktivität. Die Überexpression von JKTBP1 hat keinen Einfluss auf die Aktivität dieses Reporters. Auch die Mutation in der Haarnadelstruktur II (NIMsp0) senkt die IRES-Aktivität auf rund 45% (siehe auch **Abb. 2.16**), die Überexpression von JKTBP1 steigert diese nur wenig. JKTBP1 scheint seinen aktivierenden Einfluss auf die IRES-Aktivität demnach über die Bindung an die Haarnadelstruktur II zu vermitteln. Wird die Bindung durch eine Mutation stark eingeschränkt, ist kaum noch ein aktivierender Effekt von JKTBP1 messbar.

Neben dem pJKTBP1-Plasmid wurden auch weitere JKTBP1-Expressionsplasmide überprüft. Ausgehend von dem vorliegenden pEGFP-JKTBP1-Vektor wurde eine Strep-

JKTBP1-Fusion (pEXPR-JKTBP1) kloniert (2.3.5.1). Das Strep-System eignet sich aufgrund der festen Bindung zwischen Strep-Tag und Streptavidin besonders für Protein-Aufreinigungen. Der Strep-Tag erlaubt jedoch auch den Nachweis des Fusionsproteins über Strep-Antikörper. Hier diente der Tag vor allem der besseren Detektion von überexprimiertem JKTBP1 im Western Blot.

Sowohl das Fusionsprotein EGFP-JKTBP1 (Daten nicht gezeigt) als auch Strep-JKTBP1 ( $M_r = 42$  kD) zeigten nach Überexpression einen IRES-aktivierenden Effekt (Abb. 2.19). Ein N-terminaler Protein-Tag hat somit keinen entscheidenden Einfluss auf die Vermittlung der JKTBP1-Wirkung. Da die Überexpression von Strep-JKTBP1 durch die Detektion mit Strep-MAB-HRP-Konjugat leichter nachzuweisen war, wurden die folgenden Überexpressionen (2.4) mit dem Fusionsprotein Strep-JKTBP1 durchgeführt.



**Abb. 2.19: Das Fusionsprotein Strep-JKTBP1 steigert die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements**

**A:** HeLa B-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen pEXPR-JKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Zur Kontrolle wurden 4 µg pEXPR-Vektor eingesetzt. Bei den weiteren Ansätzen wurde die Plasmidmenge mit pEXPR auf 4 µg aufgefüllt. Die Zellen wurden zwei Tage nach der

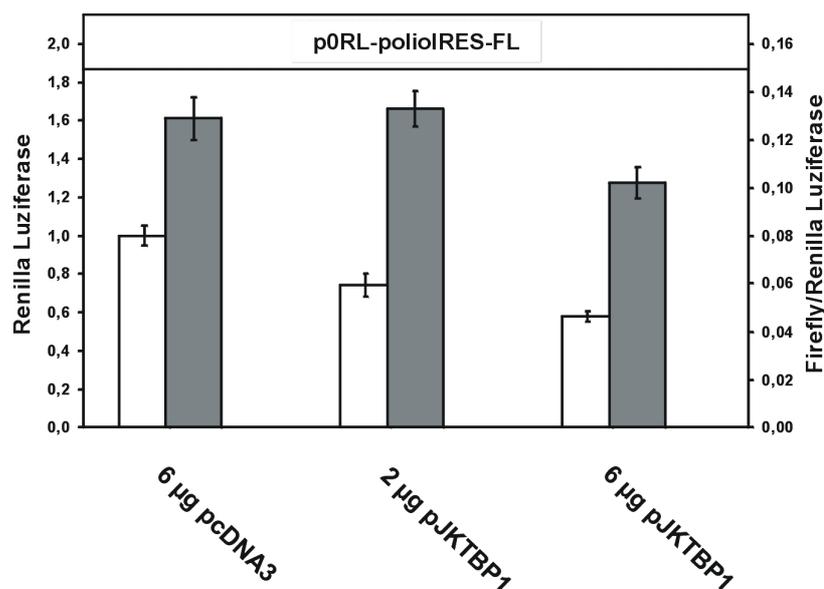
Transfektion lysiert (4.2.4.5.2) und die Lysate im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5). Die angezeigten Proteine wurden mit den Antikörpern Strep-MAB-Classic-HRP und  $\alpha$ -p65 detektiert.

**B:** HeLa B-Zellen wurden mit 3  $\mu$ g p0RLNI0FL und den angegebenen Mengen an pEXPR-JKTBP1 (mit pEXPR jeweils auf 4  $\mu$ g Plasmidmenge aufgefüllt) pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Für jeden Wert wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter p0RLNI0FL auf 1 gesetzt worden. In allen Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen die IRES-Aktivität. Auch diese wurde für p0RLNI0FL gleich 1 gesetzt. Auch Strep-JKTBP1 steigert dosisabhängig die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements.

### 2.3.5.3 Die Spezifität von JKTBP1

Um die Spezifität der NRF-IRES-aktivierenden Wirkung von JKTBP1 zu überprüfen, wurde ein weiteres IRES-Element in bicistronischen Reporter-Experimenten eingesetzt. Es wurde untersucht, ob JKTBP1 auch das IRES-Element des Polio-Virus aktivieren kann.

Zur Herstellung des notwendigen Reporter-Plasmids wurde die Sequenz des NRF-IRES-Elements im Vektor p0RLNI0FL durch die Sequenz des Polio-IRES ersetzt. Die 628 b lange Polio-IRES-Sequenz wurde dazu mit einer PCR-Reaktion (4.2.2.17) aus dem Vektor pBSLucPRLuc amplifiziert. Das Fragment verfügte nach der PCR an beiden Enden über eine Restriktionsschnittstelle: Am 5' Ende befand sich eine *SalI*-Schnittstelle, am 3' Ende eine *AscI*-Schnittstelle. Dieses Fragment wurde durch Gelextraktion (4.2.2.9) isoliert, in den *SalI/AscI*-geschnittenen p0RLNI0FL-Vektor inseriert und zum Zielvektor p0RL-poliolIRES-FL ligiert (4.2.2.11).



**Abb. 2.20: Das Polio-IRES-Element wird nicht durch JKTBP1 aktiviert**

HeLa B-Zellen wurden mit 3  $\mu$ g p0RL-poliolIRES-FL und den angegebenen Mengen an pJKTBP1 und pcDNA<sub>3</sub> pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der

Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Ansatz mit 6 µg pcDNA<sub>3</sub>-Vektor auf 1 gesetzt worden. Die grauen Balken zeigen die IRES-Aktivität. Steigende Mengen an JKTBP1 erhöhen nicht die Aktivität des polio-IRES-Elements. Der Quotient der Kontrolle (6 µg pcDNA<sub>3</sub>) liegt bei 0,13, der Quotient von p0RL-polioIRES-FL allein wurde auf 1 gesetzt (Daten nicht gezeigt).

Das Reporterplasmid p0RLpolioIRESFL wurde zusammen mit steigenden Mengen an pJKTBP1 in HeLa B-Zellen transfiziert. Die Zellen wurden nach zwei Tagen lysiert und die Luziferase-Aktivitäten in den Lysaten bestimmt. Die Luziferase-Daten in **Abb. 2.20** zeigen, dass steigende Mengen an JKTBP1 nicht die Aktivität des Polio-IRES-Elements erhöht. Der IRES-aktivierende Effekt von JKTBP1 ist also nicht an einem viralen Typl IRES-Element zu beobachten.

### 2.3.5.4 Die Vermittlung der JKTBP1-Wirkung durch RNA-Bindung

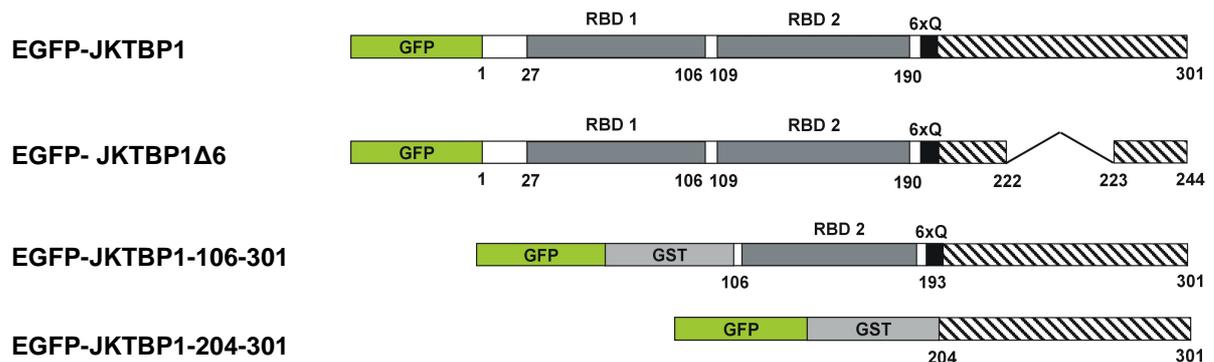
Es wurde gezeigt, dass JKTBP1 die Aktivität des minimalen NRF-IRES Elements erhöht. Um zu bestimmen, ob dieser Effekt tatsächlich durch die Bindung und die direkte Wirkung von JKTBP1 vermittelt wird, wurden verschiedene Deletionsmutanten des Proteins in bicistronischen Reporter-Experimenten analysiert. RNA-EMSA-Experimente haben gezeigt, dass beide RNA-bindende Domänen von JKTBP1 für die Bindung an das minimale IRES-Element notwendig sind (**Abb. 2.8**). In diesem Experiment wurden verschiedene EGFP-JKTBP1-Proteine verwendet. Die EGFP-Fusionen durften hier eingesetzt werden, da auch für EGFP-JKTBP1 eine IRES-aktivierende Wirkung gezeigt werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Neben dem vollständigen Protein EGFP-JKTBP1 wurden zwei Deletionsmutanten verwendet. Bei EGFP-JKTBP1-106-301 wurden der N-Terminus und die erste RNA-bindende Domäne (RBD1) deletiert, während dem Fusionsprotein EGFP-JKTBP1-204-301 der N-Terminus und beide RBDs fehlten. Zudem wurde die Spleiß-Variante von JKTBP1 – EGFP-JKTBP1Δ6- auf seine IRES-aktivierende Wirkung geprüft. Dieser Variante fehlen 58 Aminosäuren im C-Terminus (aa 222-280 von JKTBP1). Die Proteine EGFP-JKTBP1-106-301 und EGFP-JKTBP1-204-301 tragen C-terminal zum EGFP-Tag noch eine GST-Domäne. Alle genannten Plasmide stellte M. Yamada zur Verfügung, sie sind in Kawamura et al. (2002) beschrieben.

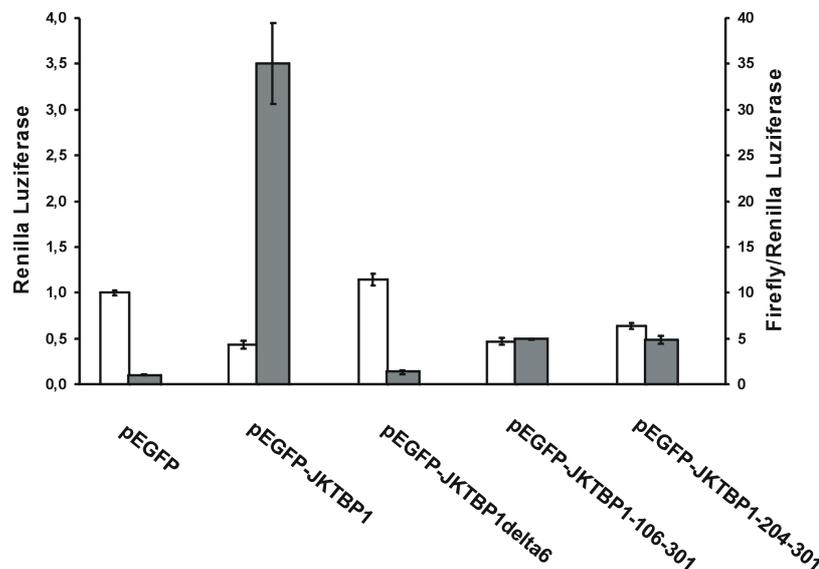
Die verschiedenen Vektoren wurden zusammen mit dem bicistronischen Reporter p0RLNI0FL in HeLa B-Zellen transfiziert (4.2.4.3.1), nach zwei Tagen lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten der beiden Luziferasen in Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Messung zeigt, dass nur das vollständige Protein JKTBP1 in der Lage ist, die IRES-Aktivität zu erhöhen (**Abb. 2.21**). Alle anderen Deletionsmutanten zeigen eine sehr geringe Steigerung im

Vergleich zur Kontrolle. JKTBP1 vermittelt demnach die IRES-aktivierende Wirkung durch die Bindung an die Haarnadelstruktur II. Weiterhin fällt auf, dass die Spleißvariante JKTBP1Δ6 zwar über beide RNA-bindende Domänen verfügt, aber die IRES-Aktivität nicht erhöht. Die fehlenden 58 Aminosäuren im C-Terminus scheinen daher notwendig für die Vermittlung der IRES-aktivierenden Wirkung. Entweder sind auch sie an der RNA-Bindung beteiligt oder sie dienen der Interaktion mit anderen Proteinen (siehe Diskussion).

## A



## B



**Abb. 2.21: Die IRES-aktivierende Wirkung von JKTBP1 wird durch die direkte Bindung an das minimale NRF-IRES-Element vermittelt**

**A:** Die verwendeten Fusionsproteine sind hier vorgestellt. Alle tragen eine N-terminale GFP-Domäne; die Proteine EGFP-JKTBP1-106-301 und EGFP-JKTBP1-204-301 verfügen zusätzlich über eine GST-Domäne. Die Deletionsmutanten tragen in Kawamura et al. die Namen EGFP-JKTBP1-226-420 und EGFP-JKTBP1-323-420. Die Aminosäuren der JKTBP1-Sequenz sind hier angegeben, die Aminosäuren der GFP- und GST-Domäne sind nicht berücksichtigt.

**B:** HeLa B-Zellen wurden mit 3 µg pORLN10FL und je 4 µg der angezeigten Plasmide pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Ergebnisse stammen aus drei

unabhängigen Experimenten, die Standardabweichung ist angegeben. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für die Kontrolle pEGFP auf 1 gesetzt worden. Die Renilla-Luziferase- Aktivitäten zeigen Schwankungen um den Faktor 2. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly/Renilla-Luziferase und somit die IRES-Aktivität. Auch diese wurde für pEGFP gleich 1 gesetzt. Nur die Überexpression von EGFP-JKTBP1 steigert die IRES-Aktivität, alle anderen Deletionsmutanten zeigen nur geringe Aktivitätsanstiege.

### 2.3.5.5 Der Einfluss des Knockdowns von JKTBP1 auf die NRF-IRES Aktivität

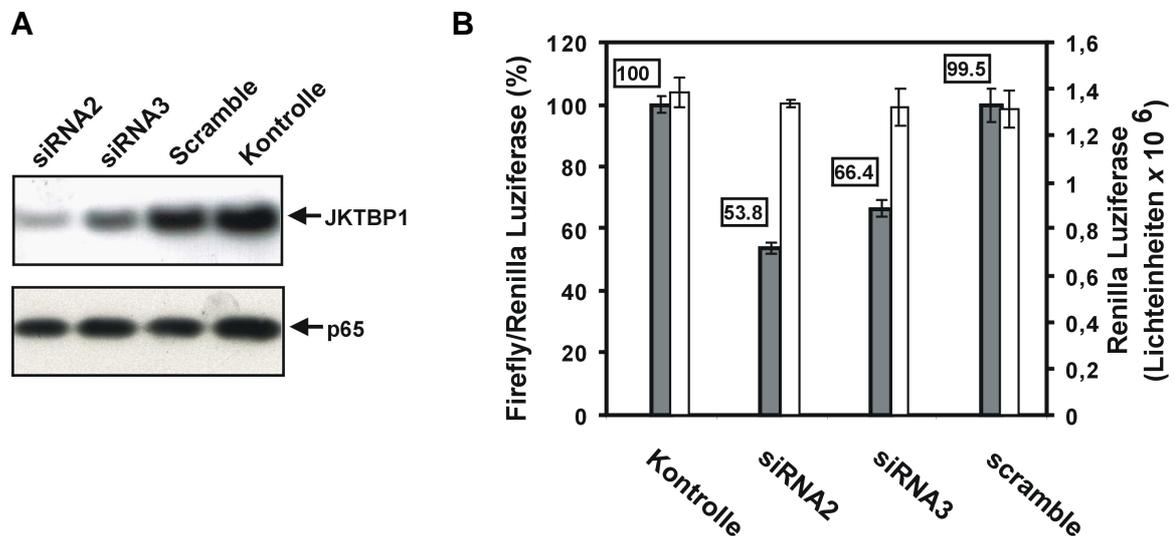
Ergänzend zur Überexpression von JKTBP1 wurde der endogene Protein-Level gesenkt und die Wirkung auf bicistronische Reportergenplasmide untersucht. Das Absenken des endogenen JKTBP1-Levels (Knockdown) wurde durch RNA-Interferenz erreicht. Dabei wird die Expression des Proteins auf RNA-Ebene inhibiert. Doppelsträngige RNA wird in Zellen von bestimmten RNasen (Dicer) erkannt und in kurze RNA-Fragmente [small interfering (si) RNAs] von rund 22 b Länge zerteilt. Diese binden an einen Proteinkomplex namens RISC (RNA-induced silencing complex) und dienen als Vorlage auf der Suche nach komplementären Sequenzen. RNAs, die solche Sequenzen enthalten, werden von diesem RNA-Nuklease-Komplex abgebaut (Hannon, 2002).

Verschiedene siRNA-Oligonukleotide mit Sequenzen, die komplementär zu unterschiedlichen Bereichen der codierenden Sequenz von JKTBP1 sind, kamen hier zum Einsatz. Neben zwei spezifischen siRNA-Oligonukleotiden (siRNA 2 und siRNA 3) wurde eine Kontroll-siRNA (Scramble) verwendet. Alle drei wurden zusammen mit bicistronischen Reportergenplasmiden in HeLa B Zellen transfiziert (4.2.4.3.3) und die Luziferase-Aktivitäten in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.5.3, 4.2.4.7). Um die Effizienz des Knockdowns zu bestimmen, wurden die Zellen lysiert (4.2.4.5.2), und JKTBP1 im Western Blot (4.2.3.5) detektiert. Die **Abb. 2.22 A** zeigt, dass die siRNA 2 den endogenen JKTBP1-Level am wirksamsten senkt. Die siRNA 3 zeigt eine etwas geringere Hemmung, während die Kontroll-siRNA (Scramble) kaum einen Effekt auf den endogenen JKTBP1-Spiegel (Kontrolle) hat. Der Effekt des Knockdowns auf die IRES-Aktivität ist in **Abb. 2.22 B** gezeigt. Die siRNA 2 reduziert die NRF-IRES-Aktivität auf rund 53% der Ausgangsaktivität (Kontrolle), die siRNA 3 auf 66%. Die Kontroll-siRNA (Scramble) hat kaum einen Effekt auf die IRES-Aktivität. Diese Daten bestätigen die Aussagen der JKTBP1-Überexpression. JKTBP1 hat eine aktivierende Wirkung auf die Translationsinitiation am minimalen NRF-IRES-Element. Wird das Protein überexprimiert, steigert dies die IRES-Aktivität. Das Absenken des endogenen JKTBP1-Levels führt zu einer Abnahme der IRES-abhängigen Translation.

Die siRNA 2 senkt den endogenen JKTBP1-Level stark ab, die ermittelte Abnahme der IRES-Aktivität durch diese siRNA ist jedoch geringer (**Abb. 2.22**). Diese Tatsache zeigt die Beteiligung weiterer Faktoren an der Translationsinitiation im NRF-IRES-Element. Demnach ist JKTBP1 nur einer der Faktoren, die die IRES-Aktivität beeinflussen. Weitere Proteine aus

den *in vitro* detektierten Protein-RNA-Komplexen (**Abb. 2.3**) oder Sekundärstrukturen im IRES-Element wie die Haarnadelschleife I können beteiligt sein.

Um zeigen zu können, dass die Haarnadelstruktur I einen Teil der verbliebenen IRES-Aktivität vermittelt, wurde die Auswirkung der siRNA 2 auf das veränderte IRES-Element (NIPst0) untersucht.



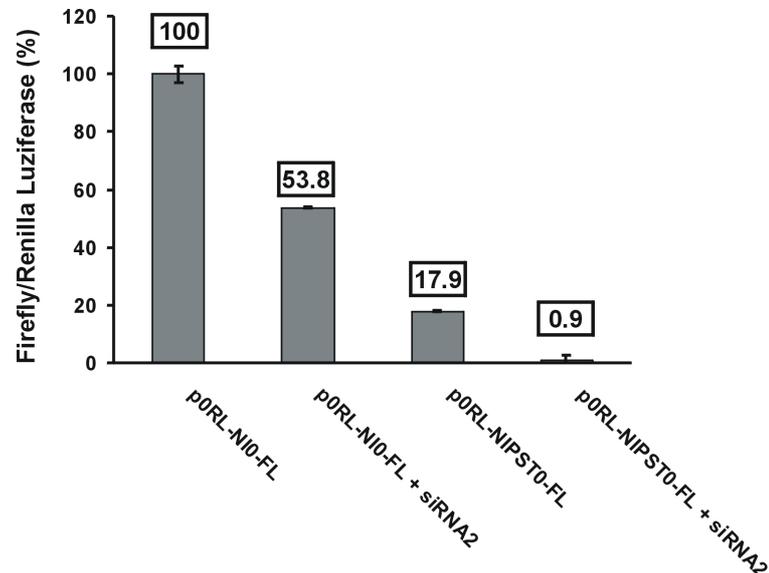
**Abb. 2.22: Der Knockdown von JKTBP1 senkt die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements**

**A:** HeLa B-Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden mit einer finalen Konzentration von 113 nM im Zellkulturmedium transfiziert (4.2.4.3.3). Bei der Kontrolle blieben die Zellen untransfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.2) und die Lysate im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5). Die angezeigten Proteine wurden mit den Antikörpern  $\alpha$ -JKTBP1 und  $\alpha$ -p65 detektiert. Die siRNA 2 senkt den endogenen JKTBP1-Level am wirksamsten.

**B:** HeLa B-Zellen wurden gleichzeitig mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden (113 nM final) und 3  $\mu$ g p0RLNIOFL pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.3). Die Kontrolle wurde nur mit dem Reportergenplasmid transfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Es wurden je drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, angegeben sind die gemessenen Lichteinheiten. In allen Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen die IRES-Aktivität. Diese wurde für die Kontrolle auf 100% gesetzt. Die Kontroll-siRNA (Scramble) hat keinen Effekt auf den Reporter. Durch den Einsatz von siRNA2 wird die IRES-Aktivität auf 53 % gesenkt, der Effekt der siRNA3 ist - passend zu den Western Blot Daten - weniger stark (66,4%) ausgeprägt.

Die **Abb. 2.23** zeigt den Effekt des JKTBP1-Knockdowns auf die IRES-Aktivität des Wildtyps und des mutierten Elements. Die siRNA 2 allein senkt die IRES-Aktivität auf 53%. Das IRES-Element mit der veränderten Haarnadel I zeigt eine viel geringere Grundaktivität (18%), doch auch diese wird durch den JKTBP1-Knockdown nochmals stark reduziert. Somit sind die JKTBP1-Bindung und die Haarnadel I zusammen notwendig zur Steuerung der Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements. Doch sie wirken unabhängig voneinander: JKTBP1 bindet

an die Haarnadel II und vermittelt dadurch die IRES-aktivierende Wirkung. Eine Veränderung der Haarnadel I senkt die IRES-Aktivität um 80%, sie beeinflusst aber weder die Bindung von JKTBP1 (**Abb. 2.6**) noch die IRES-aktivierende Wirkung des Proteins (**Abb. 2.18**).



**Abb. 2.23: JKTBP1 und die Haarnadelstruktur I beeinflussen unabhängig voneinander die NRF-IRES-Aktivität**

HeLa B-Zellen wurden mit siRNA 2 (113 nM final) und je 3 µg p0RLNI0FL oder p0RLNIPst0FL pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.3). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivität beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die IRES-Aktivität von p0RLNI0FL wurde auf 100% gesetzt. Der Einsatz von siRNA 2 senkt sowohl die IRES-Aktivität des Wildtyp-Elements NI0 als auch der Mutante NIPst0.

## 2.4 Die Funktion von regulatorischen Elementen der 5' und 3'UTR im Reportergensystem

Im Abschnitt 2.3 wurden der Einfluss regulatorischer 5'UTR-Elemente des minimalen NRF-IRES-Elements sowie die IRES-aktivierende Wirkung von JKTBP1 im bicistronischen Reportergensystem analysiert. Hier sollen die Einflüsse von regulatorischen Motiven aus 3' und 5'UTR auf die Expression eines Reportergens untersucht werden. Die Analyse der gesamten 5'UTR von NRF und das Einbeziehen von 3'UTR-Effekten machte die Etablierung eines monocistronischen Reportergensystems notwendig. Dabei wurde die codierende Sequenz eines Luziferase-Reportergens unter die Regulation der 5' und 3'UTR von NRF gestellt. Die Einflüsse der UTRs und des ITAFs JKTBP1 konnten somit spezifisch durch eine Lumineszenz-Messung detektiert werden.

### 2.4.1 Das monocistronische Reportergensystem

Bisher wurde bei den Reportergenversuchen nur das minimale NRF-IRES-Element betrachtet. Um den Einfluss der gesamten 5'UTR und zusätzlich den der 3'UTR zu untersuchen, wurden monocistronische Reportergenplasmide verwendet, die die codierende Sequenz der Firefly-Luziferase beinhalteten.

Die Konstrukte enthielten die vollständige 5'UTR von NRF (653 b), die lange 3'UTR (1007 b) oder beide zusammen. Als Kontrolle wurde ein Reporter ohne UTRs verwendet. Alle Konstrukte wurden über einen SV40-Promotor transkribiert, die Konstrukte ohne die 3'UTR von NRF enthielten ein SV40-polyA-Signal. Die Reporter wurden in HeLa B-Zellen transfiziert und die Aktivität der Firefly-Luziferase wurde in den Zelllysaten bestimmt. Die Firefly-Luziferase-Aktivität ist nun ein Maß für die Expression des Reportergens. Auch Transkriptionsraten und Stabilität der RNA beeinflussen die gemessene Firefly-Aktivität. Als Bezugspunkt wurde weiterhin die Aktivität der Renilla-Luziferase bestimmt. Das Renilla-Luziferase-Gen befand sich auf einem separaten Plasmid unter Kontrolle eines Tk-Promotors und wurde zusammen mit den Firefly-Reportergenkonstrukten ko-transfiziert. Die Renilla-Luziferase diente wiederum als Transfektionskontrolle und zeigte in den Reportergen-Experimenten teils starke Schwankungen. Um diese mit zu berücksichtigen, wurde auch hier der Quotient aus Firefly-/Renilla-Luziferase gebildet.

### 2.4.2 Die Herstellung von monocistronischen Reportergenplasmiden

Die monocistronischen Reportergenplasmide enthielten als Reportergen die Firefly-Luziferase (FL). Das Gen steht in allen Konstrukten unter der Kontrolle eines SV-40-Promotors. Die Kontrolle pFL enthält nur das Firefly-Gen sowie ein SV-40-polyA-Signal. Bei p5UFL befindet sich die 5'UTR von NRF vor dem Firefly-Gen, das Plasmid verfügt ebenfalls über ein SV-40-polyA-Signal. Dieses wurde bei pFL3U durch die 3'UTR von NRF ersetzt. Bei p5UFL3U wird die Firefly-Luziferase von beiden NRF-UTRs umrahmt. Alle Konstrukte wurden zusätzlich zum SV-40-Promotor mit einem T7-Promotor ausgestattet. Durch diesen konnten RNAs *in vitro* transkribiert und direkt in Zellen transfiziert werden (2.4.4). Der Promotor wurde über eine Mutagenese-Reaktion (4.2.2.7) mit Hilfe des Primer-Sets 5'PinserionT7/ 3'PinserionT7 in alle Plasmide inseriert. Die Kontrolle der Klonierung erfolgte jeweils durch eine Sequenzierung (4.2.2.16). Dabei wurden der 3'FLPrimer zur Überprüfung der Insertion in pT7FL und pT7FL3U verwendet. Die Vektoren pT75UFL und pT75UFL3U wurden mit den Primern 6463 und 6539 sequenziert. Als Transfektionskontrolle wurde zu jedem FL-Reporterplasmid ein monocistronischer Kontrollvektor transfiziert. Dieser enthält das Gen der Renilla-Luziferase (RL) und heißt phRL-Tk. Der Vektor verfügt neben dem TK- ebenfalls über einen T7-Promotor sowie ein SV40-polyA-Signal.

Alle monocistronischen Reporterplasmide enthielten somit einen eukaryontischen- und einen T7-Promotor. Für die *in vitro* Transkription (2.4.4) wurden die Vektoren mit den angegebenen Restriktionsenzymen linearisiert (4.2.2.10 A).

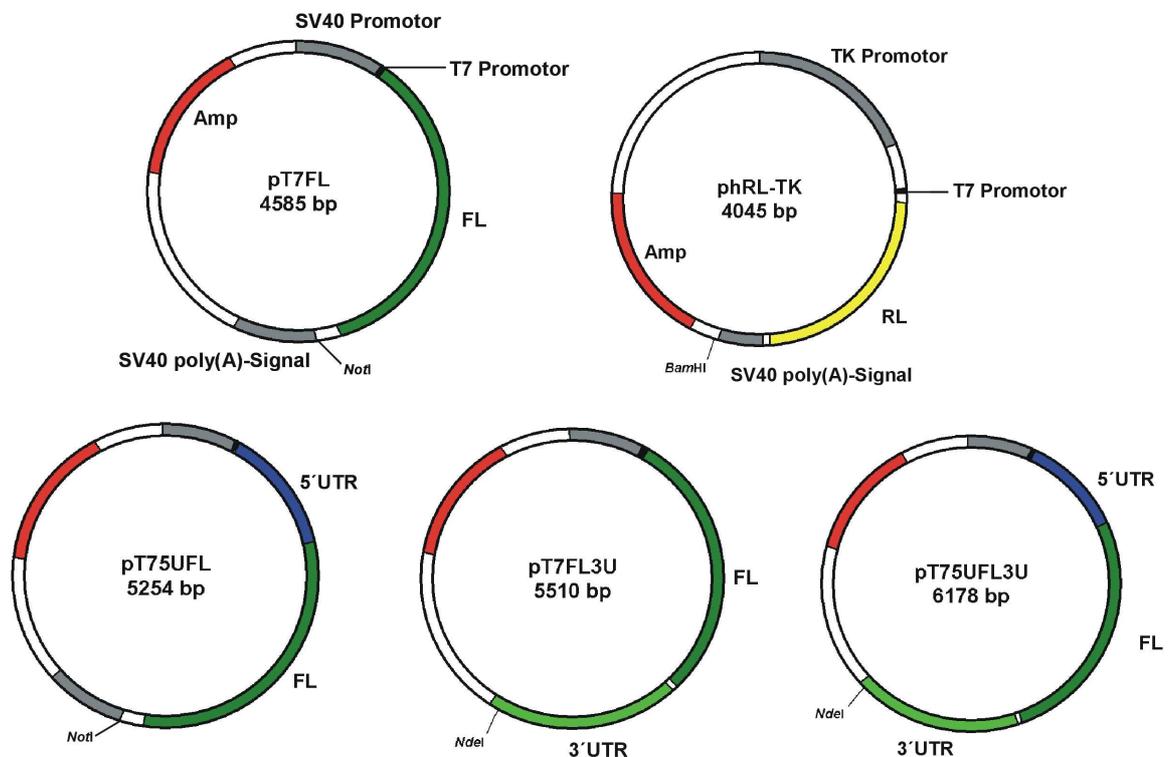
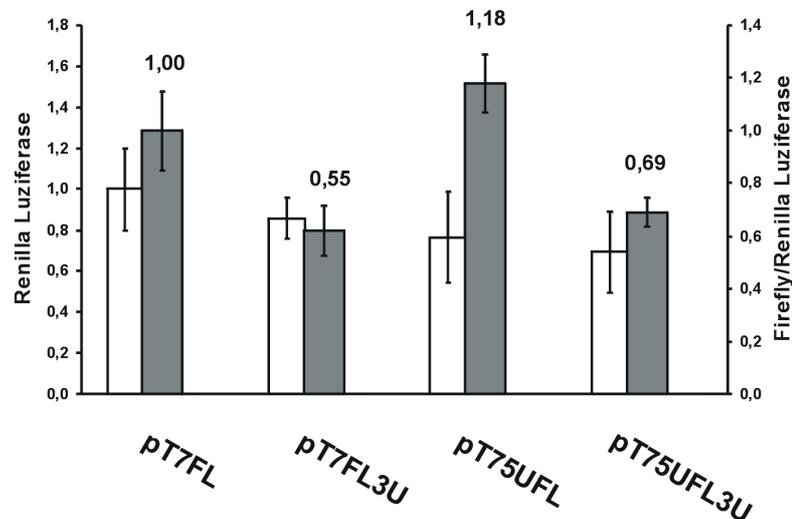


Abb. 2.24: Die monocistronischen Reporterplasmide

### 2.4.3 Die Reporter-Expression nach DNA-Transfektion

Als erstes sollte der Einfluss der vollständigen 5' und 3' UTR von NRF auf die Expression des Reportergens untersucht werden. Dazu wurden HeLa B-Zellen mit den vier verschiedenen FL-Reporterkonstrukten und dem RL-Kontrollplasmid transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert, und die Aktivitäten der Luziferasen im Zelllysate (4.2.4.7) bestimmt (Abb. 2.25). Der Vektor pT7FL zeigt die Expression des Reportergens ohne Einfluss der UTRs von NRF. Durch das Ersetzen des SV40-polyA-Signals mit der 3' UTR von NRF (pT7FL3U) nimmt die Expression des Reportergens um rund 50% ab. Das Konstrukt pT75UFL enthält die vollständige 5' UTR von NRF. Die Expression des Reportergens ändert sich durch die Einführung der 5' UTR von NRF kaum (Faktor 1,18). Die IRES-abhängige Translation ist damit von der Effizienz mit der cap-abhängigen vergleichbar. Die in den Zellen gebildete 5UFL-RNA verfügt wie jede mRNA über eine Cap-Struktur. Es wäre also möglich, dass auch dieses Konstrukt cap-abhängig translatiert wird. Allerdings machen die ausgeprägten und stabilen Sekundärstrukturen sowie die elf offenen Leseraster in der 5' UTR von NRF (Oumard, et al., 2000) eine solche Translation sehr ineffizient (Hellen & Sarnow, 2001). Sie kann aber hier nicht ausgeschlossen werden. Wird

im pT75UFL-Konstrukt das SV40-polyA-Signal wiederum durch die 3'UTR von NRF ersetzt, nimmt die Expression deutlich ab. Die reduzierende Wirkung ist ähnlich ausgeprägt wie bei den Konstrukten pT7FL und pT7FL3U.



**Abb. 2.25: Die NRF 3'UTR senkt die Expression der Reportergene, die 5'UTR bewirkt keine Veränderung der Expression**

HeLa B-Zellen wurden mit 3 µg der verschiedenen FL-Reporterplasmide und 0,3 µg phRL-TK-Vektor pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Daten stammen aus neun unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter pT7FL auf 1 gesetzt worden. In allen Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase-Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Expression des FL-Reportergens. Auch der Quotient wurde für pT7FL gleich 1 gesetzt. Die 3'UTR von NRF senkt die FL-Reporterexpression von pT7FL und pT75UFL. Die 5'UTR von NRF erhöht die Expression hingegen leicht (bei pT7FL und pT7FL3U).

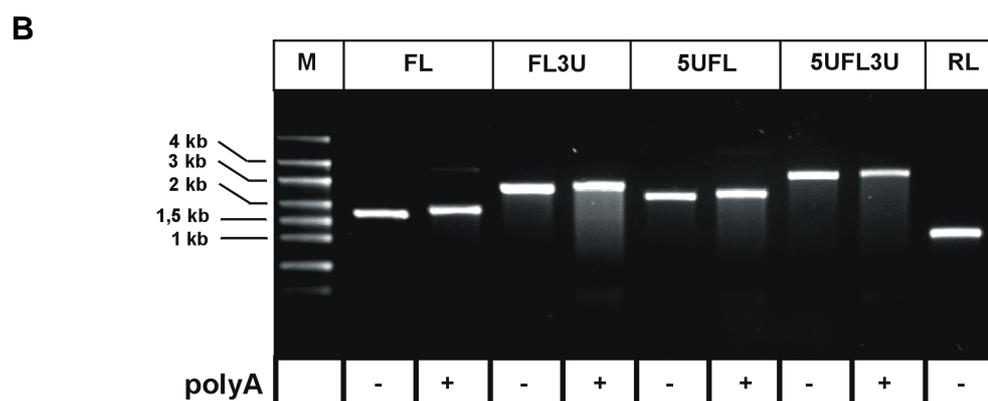
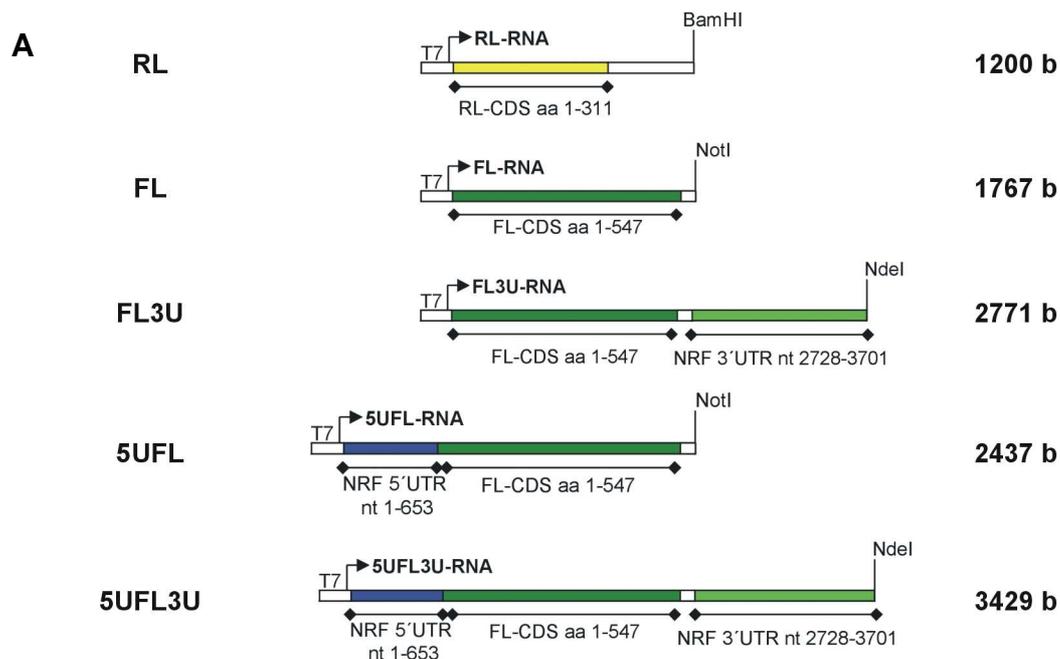
Die hier gezeigten Effekte der beiden UTRs können nicht allein auf Unterschiede in der Translationsregulation zurückzuführen sein. Variierende Transkriptionsraten oder verschiedene RNA-Stabilitäten der Konstrukte können ebenfalls die Expression der Reportergene beeinflussen.

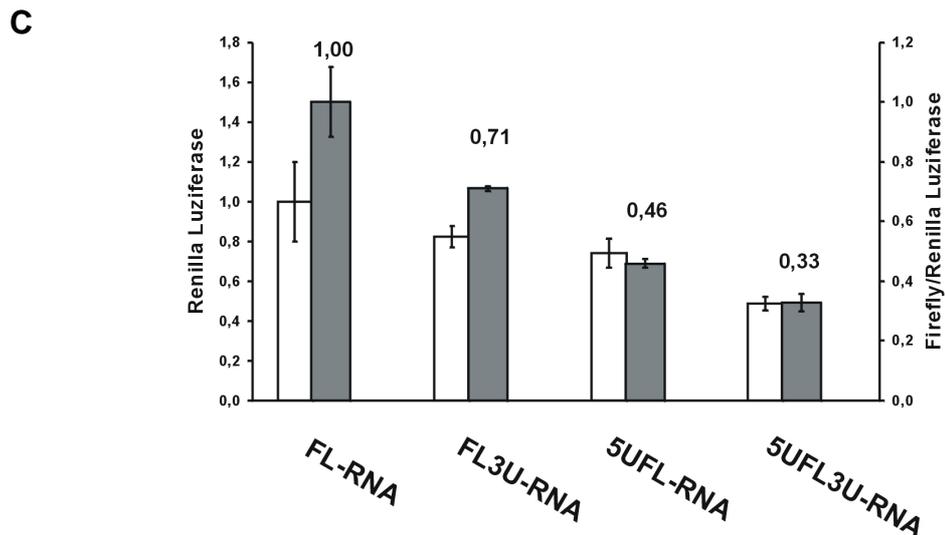
#### 2.4.4 Die Reportergen-Expression nach RNA-Transfektion

Die in 2.3.4 gezeigten Effekte der UTRs auf die Reportergen-Expression können auch auf verschiedene Transkriptionsraten zurückzuführen sein. Um Transkriptionseffekte abschätzen zu können, wurden die monocistronischen Reportergenplasmide *in vitro* transkribiert, und die RNA wurde direkt in die Zellen transfiziert (4.2.4.3.2): Dazu wurden die Reportergenplasmide wie in **Abb. 2.26 A** gezeigt linearisiert (4.2.2.10 A). Bei der *in vitro* Transkription (4.2.2.1 B) wurden die RNAs durch Zugabe eines Cap-Analogons (4.1.1) mit einer Cap-Struktur

versehen. Im Anschluss wurden die FL-RNAs *in vitro* polyadenyliert (**Abb. 2.26 B**). Die aufgereinigten RNAs (4.2.2.2 B) wurden dann transfiziert, die Zellen 24 h nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Luziferase-Aktivitäten in den Zelllysaten gemessen (4.2.4.7).

Die Transfektion der verschiedenen RNAs ergibt ein leicht anderes Bild als die DNA-Transfektion der Konstrukte: Der Quotient aus Firefly-/Renilla-Luziferase-Aktivität ist nun ein Maß für die Translationsaktivität und Stabilität der verschiedenen Konstrukte und wurde für die FL-RNA auf 1 gesetzt. Da die Stabilität von mRNAs vor allem durch AU-reiche Elemente in der 3'UTR vermittelt wird (Kuersten & Goodwin, 2003), sollten sich die Konstrukte, die über die gleiche 3'UTR verfügen (FL und 5UFL sowie FL3U und 5UFL3U), nur durch verschiedene Translationsaktivitäten unterscheiden. Wird das SV-40-polyA-Signal im FL-Konstrukt durch die 3'UTR von NRF ersetzt, zeigt die FL3U-RNA wie bei den DNA-Daten einen geringeren Quotienten. Dieser entspricht im Rahmen der Fehlerbalken dem Wert aus der DNA-Transfektion. Die 3'UTR destabilisiert demnach auch hier die mRNA stärker als das SV-40-polyA-Signal.





**Abb. 2.26: Die Translationsaktivität der 5'UTR hat nach RNA-Transfektion deutlich abgenommen**

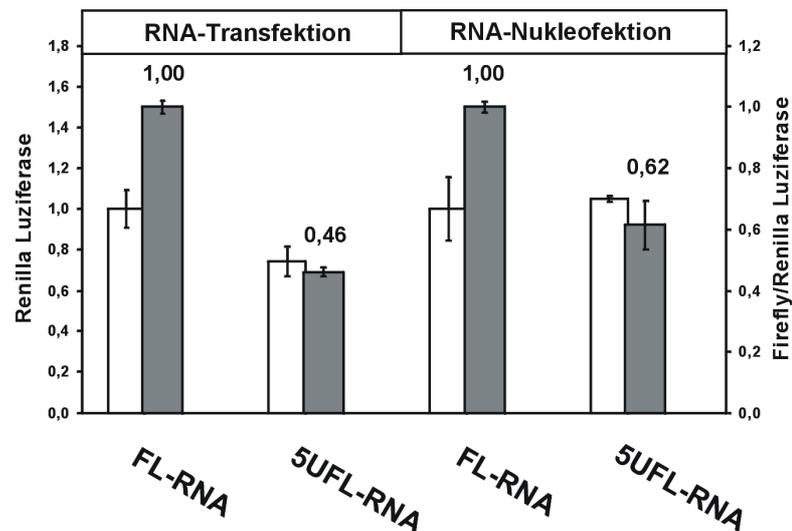
**A:** Die Abbildung zeigt alle verwendeten RNAs, die zugehörigen Plasmide wurden mit den angezeigten Restriktionsenzymen linearisiert (4.2.2.10 A). Zwischen der Firefly-CDS und der 3'UTR von NRF befindet sich ein kurzes Stück Vektorsequenz (80 b). Die Längen der verschiedenen RNAs sind angegeben, die Polyadenylierung ist nicht berücksichtigt.

**B:** Je 4 µg der linearisierten Vektoren wurden für die *in vitro* Transkription eingesetzt (4.2.2.1 B). Im Anschluss wurden die FL-RNAs polyadenyliert (4.2.2.5). Nach der Aufreinigung (4.2.2.2 B) der RNAs wurden sie zur Kontrolle auf einem 1%igen Agarosegel analysiert. Pro RNA wurden 200 ng eingesetzt. Das Gel zeigt, dass alle RNAs in guter Qualität hergestellt worden sind. Durch die Polyadenylierung zeigen die RNAs einen kleinen Massenshift, der Schmier unterhalb der Banden taucht erst nach der Polyadenylierung auf und ist daher auf unterschiedlich lange PolyA-Enden zurückzuführen.

**C:** HeLa B-Zellen wurden mit je 2 µg der verschiedenen FL-RNAs und 0,5 µg RL-RNA pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.2). Die Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Daten zeigen neun unabhängige Experimente, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für die Reporter-RNA FL auf 1 gesetzt worden. Die Renilla-Luziferase-Aktivitäten schwankten um den Faktor 2. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Translationsaktivität des FL-Reportergens. Auch der Quotient wurde für die FL-RNA gleich 1 gesetzt. Die 3'UTR destabilisiert die FL3U-mRNA, die Reporteraktivität der 5UFL-mRNA ist im Vergleich zur DNA-Transfektion reduziert.

Ein größerer Unterschied ist bei der 5UFL-RNA zu beobachten. Während sich nach der DNA-Transfektion der Quotient auf dem Niveau des FL-Konstruktes befand, liegt er hier bei 46% der FL-RNA. Das pT5U7FL-Konstrukt scheint demnach besser transkribiert zu werden als die Kontrolle pT7FL. Dennoch zeigt das Experiment deutlich, dass die 5UFL-RNA translatiert wird. Das ist bei dieser Effizienz nur über einen IRES-abhängigen Mechanismus möglich. Bei der 5UFL3U-RNA lässt sich wiederum die Addition der 5U- und 3U-Effekte beobachten. Durch das Ersetzen des SV40-polyA-Signals durch die 3'UTR von NRF in 5UFL wird der Quotient in 5UFL3U noch weiter reduziert.

Die niedrigere Translationsaktivität der 5UFL-RNA könnte jedoch auch einen anderen Grund haben. Zum Beispiel könnte der Kernexport oder der Kernaufenthalt der mRNA von Bedeutung für die Translationseffizienz sein. Um zu untersuchen, ob auch dieser Effekt hier eine Rolle spielt, wurden die FL- und 5UFL-RNA in HeLa B-Zellen nukleofektiert (4.2.4.3.4). Durch diese spezielle Elektroporationsmethode sollen die RNAs direkt in den Kern gebracht werden. Der Vergleich mit den Daten der RNA-Transfektion zeigt, dass die Translationsaktivität der 5UFL-RNA durch die RNA-Nukleofektion leicht zunimmt. Die Daten zeigen die erwartete Tendenz, der Effekt ist jedoch zu gering, um die Hypothese vollends zu bestätigen (siehe Diskussion).



**Abb. 2.27: Die Nukleofektion von 5UFL-RNA erhöht die Translationsaktivität nur gering**

HeLa B-Zellen wurden mit je 2 µg der verschiedenen FL-RNAs und 0,5 µg RL-RNA pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.2) oder nukleofektiert (4.2.4.3.4). Die Zellen wurden einen Tag nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivität beider Luziferasen in den Zellysaten bestimmt (4.2.4.7). Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für die Reporter-RNA FL auf 1 gesetzt worden. Die Renilla-Luziferase-Aktivitäten vergleichbare Werte. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Translationsaktivität des FL-Reportergens. Auch der Quotient wurde für die FL-RNA gleich 1 gesetzt. Die 5UFL-Translationsaktivität nimmt durch die Nukleofektion der RNA von Faktor 0,46 auf 0,62 zu.

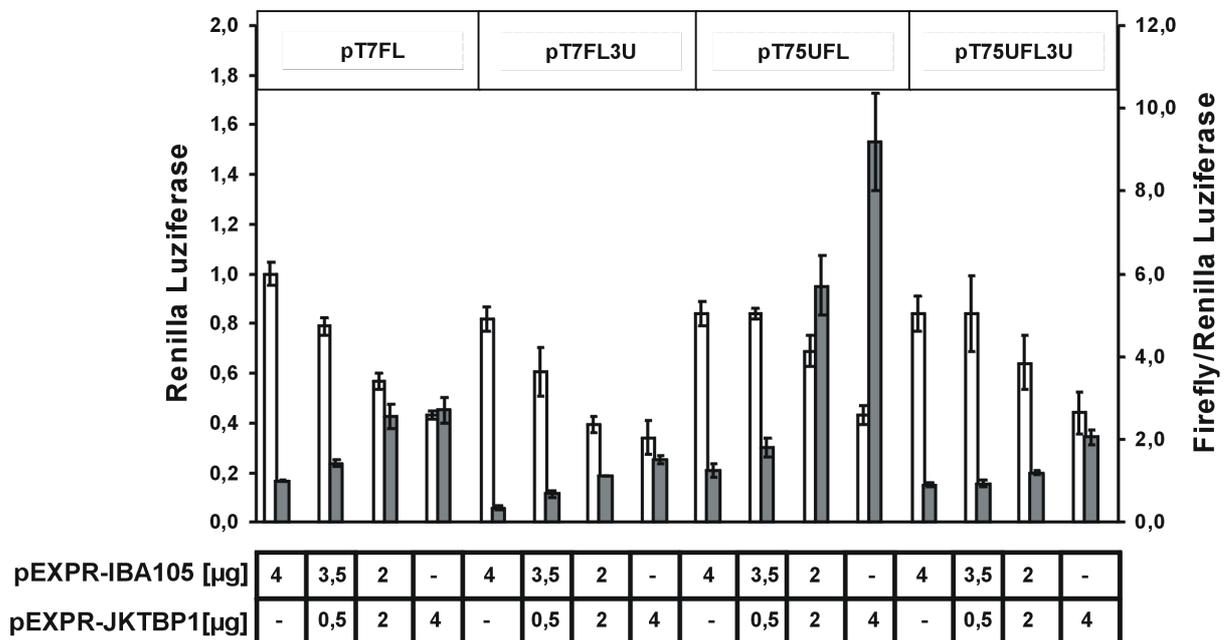
### 2.4.5 Der Einfluss der regulatorischen 5' und 3'UTR -Motive bei der JKTBP1-Überexpression

Das Augenmerk galt im bisherigen Abschnitt der Wirkung der vollständigen UTRs von NRF auf die Reporter-Expression. Nun soll die Wirkung von JKTBP1 auf die monocistronischen Reporter-Plasmide untersucht werden. Dazu wurde Strep-JKTBP1 in HeLa B-Zellen überexprimiert. Für diese Experimente wurden DNA-Konstrukte verwendet. Diese konnten zusammen mit dem JKTBP1-Expressionsplasmid (pEXPR-JKTBP1) in Zellen transfiziert werden. Durch die Verwendung der RNA-Konstrukte könnten zwar Transkriptionseffekte ausgeschlossen werden, die Methode hat jedoch auch gravierende Nachteile: So müssten die Zellen zweimal mit unterschiedlichen Methoden transfiziert werden. Zuerst mit dem JKTBP1-Expressionsplasmid, um JKTBP1 in den Zellen zu exprimieren. Anschließend müssten die Reporter-RNAs zeitlich versetzt in die Zellen gebracht werden, um den Effekt von JKTBP1 auf die UTRs zu detektieren. Zudem haben beide Transfektionsmethoden unterschiedliche Anforderungen an den Grad der Konfluenz der Zellen. Aus diesen Gründen wurden hier die DNA-Konstrukte verwendet.

Die vier verschiedenen Vektoren pT7FL, pT7FL3U, pT75UFL und pT75UFL3U wurden zusammen mit dem RL-Kontrollplasmid pRL-Tk und steigenden Mengen an JKTBP1-Expressionsplasmid in HeLa B-Zellen transfiziert (4.2.4.3.1). Die Luziferase-Aktivitäten wurden in den Zelllysaten gemessen (**Abb. 2.28**). Die Aktivität der Renilla-Luziferase wies Schwankungen um den Faktor 2-3 auf. Die Bildung des Quotienten aus Firefly- und Renilla-Aktivität berücksichtigte jedoch diese Schwankungen. Die FL-Konstrukte zeigen bei der Transfektion mit Kontrollvektor pEXPR die gleichen Werte wie in **Abb. 2.25**. Die Überexpression von Strep-JKTBP1 erhöht die Reporterexpression bei allen Konstrukten dosisabhängig, aber in verschiedenem Ausmaß. Die Kontrolle pT7FL zeigt bei der höchsten JKTBP1-Konzentration eine Zunahme um den Faktor 2,7. Das entsprechende Konstrukt mit der 5'UTR von NRF nimmt um den Faktor 7,3 zu. Die Konstrukte pT7FL3U und pT75UFL3U zeigen jeweils eine Steigerung um den Faktor 4 bzw. 3. Die Steigerung der Expression beim 5UFL-Reporter bestätigt die Daten mit den bicistronischen Reportern (**Abb. 2.18**). JKTBP1 hat aber ebenfalls einen aktivierenden Effekt auf die 3'UTR. So könnte die Bindung im Bereich des Klasse II AREs die Stabilität der mRNA erhöhen und zu einem Anstieg der Reporteraktivität führen. Auch das 5UFL3U-Konstrukt zeigt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Reporteraktivität, jedoch nicht in dem Ausmaß wie der 5'UTR-Reporter allein.

Das Experiment bestätigt die IRES-aktivierende Wirkung von JKTBP1. Die Auswirkung von JKTBP1 auf die 3'UTR kann hier aber nur schlecht detektiert werden. Die Aktivierung der 3'UTR durch JKTBP1 ist nur wenig stärker ausgeprägt als die Aktivierung von pT7FL. Die Aktivierung der Kontrolle könnte über unspezifische Wechselwirkungen von JKTBP1 mit Vektorsequenzen vermittelt werden. Daher sind diese Überexpressionsexperimente nur

bedingt geeignet, um eine Aussage über die Wirkung von JKTBP1 auf die 3' untranslatierten Regionen zu treffen (siehe Diskussion).

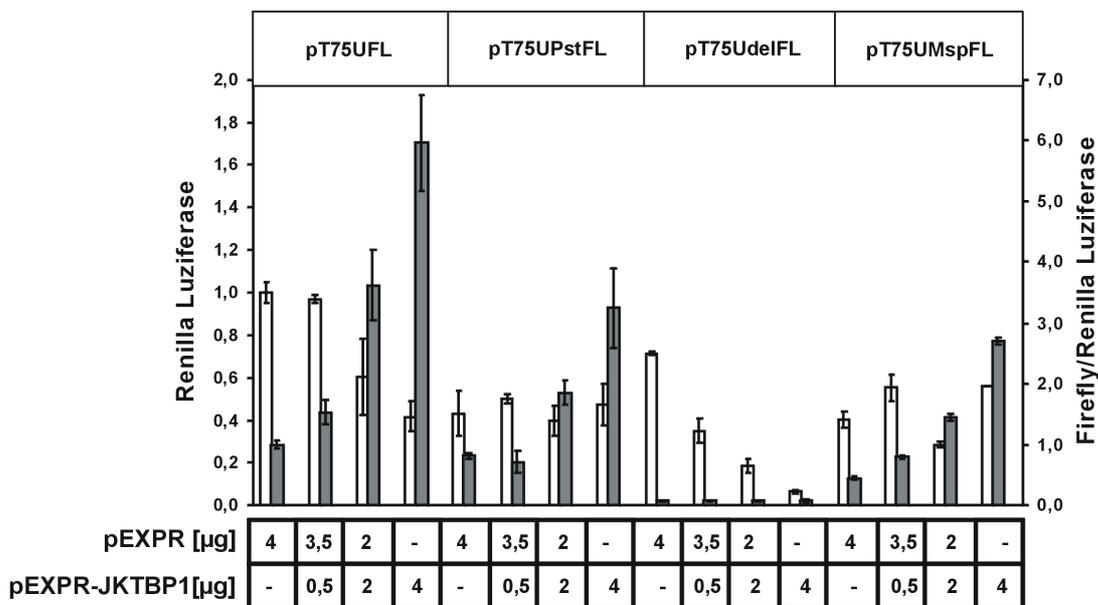


**Abb. 2.28: JKTBP1 wirkt aktivierend auf alle Reportergerkonstrukte**

HeLa B-Zellen wurden mit 3 µg der verschiedenen FL-Reporterplasmide und 0,3 µg phRL-TK-Vektor sowie zusätzlich mit den angegebenen Mengen an Kontrollvektor pEXPR und pEXPR-JKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Es wurden je sechs unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter pT7FL auf 1 gesetzt worden. Die Renilla-Luziferase-Aktivitäten schwankten um den Faktor 2-3. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Expression des FL-Reportergens. Auch der Quotient wurde für pT7FL gleich 1 gesetzt. Das transfizierte Strep-JKTBP1 erhöht die Reportergergen-Expression aller Konstrukte. Der Kontrollvektor pT7FL zeigt ebenfalls eine unspezifische Steigerung. Die Steigerung der Aktivitäten basiert entweder auf die JKTBP1-Bindung am minimalen NRF-IRES-Element (pT75UFL) oder der Bindung an das Klasse II ARE in der 3'UTR (pT7FL3U und pT75UFL3U). Letzteres lässt sich durch dieses Experiment jedoch nicht belegen, die Aktivierungen sind ähnlich stark ausgeprägt wie die der Kontrolle pT7FL.

Neben den Wildtyp-Sequenzen der 5' und 3'UTR wurden auch verschiedene Mutanten in monocistronischen Reportergergen-Experimenten betrachtet. Die 5'UTR-Mutanten von NRF wurden bereits mit bicistronischen Reportern untersucht (**Abb. 2.18**) und sollen hier auf die monocistronischen Reporterplasmide übertragen werden. Die Mutationen in der Haarnadel I (649-652: GCTT → tgca) und II (625-628: TTAA → ccgg) sowie die Deletion der Haarnadelstruktur II (579-639) wurden ebenfalls durch Mutagenese-Reaktionen (4.2.2.7)

erreicht. Die Mutagenese der Haarnadel I erforderte den Einsatz anderer Primer (5'PT7Pst und 3'PT7Pst), ansonsten wurden die Reaktionen, wie in 2.3.2 beschreiben, durchgeführt. Die so entstandenen Plasmide pT75UPstFL, pT75UMspFL und pT75UdelFL wurden im direkten Vergleich mit pT75UFL betrachtet. Wie zuvor wurden alle Konstrukte mit steigenden Mengen an JKTBP1-Expressionsplasmid in HeLa B-Zellen transfiziert. Die Luziferase-Aktivitäten wurden in den Zelllysaten bestimmt (**Abb. 2.29**).



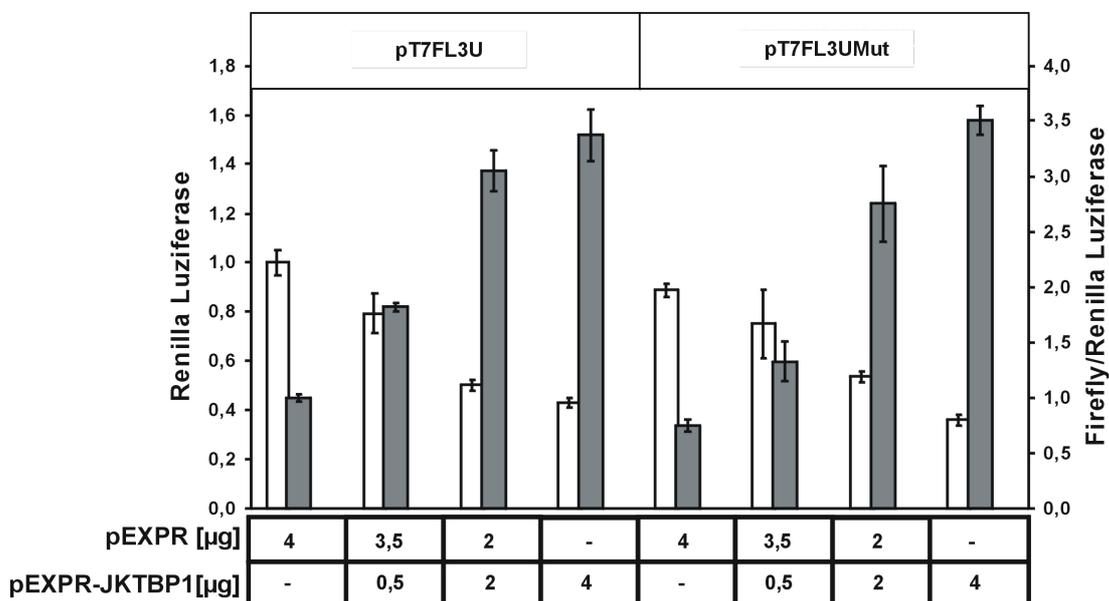
**Abb. 2.29: JKTBP1 erhöht die Reporteraktivität der mutierten pT75UFL-Konstrukte**

HeLa B-Zellen wurden mit 3 µg der verschiedenen FL-Reporterplasmide und 0,3 µg phRL-TK-Vektor sowie zusätzlich mit den angegebenen Mengen an Kontrollvektor pEXPR und pEXPR-JKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivität beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Es wurden mindestens drei unabhängige Experimente ausgewertet, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter pT75UFL auf 1 gesetzt worden. Die Renilla-Luziferase-Aktivitäten schwankten stark. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Expression des FL-Reportergens. Auch der Quotient wurde für pT75UFL gleich 1 gesetzt. JKTBP1 steigert die Reporterexpression von pT75UFL, pT75UPstFL und pT75UMspFL dosisabhängig, die Deletion der Haarnadel II (pT75UdelFL) verhindert eine Aktivierung.

Die Daten zeigen die bereits in **Abb. 2.28** gesehene Abhängigkeit des pT75UFL-Konstruktes von der JKTBP1-Konzentration. Auch die Mutante 5UPstFL zeigt eine dosisabhängige Steigerung der Reporteraktivität. Allerdings liegt die Grundaktivität des 5UPstFL-Reporters nicht bei 20% der 5UFL-Aktivität (bicistronische Reporter **Abb. 2.15**), sondern deutlich höher. Die Veränderung der Struktur der Haarnadel I hat im monocistronischen Reporter einen geringeren Effekt, so bleiben rund 80% der 5UFL-Aktivität erhalten.

Wird die Haarnadelschleife II aus der 5'UTR von NRF entfernt (5UdeIFL), ist wie beim bicistronischen Reporter-Experiment (**Abb. 2.16** und **2.18**) nur noch wenig Reporteraktivität messbar. Die verbliebene Aktivität (7%) lässt sich durch steigende Mengen an JKTBP1 nicht erhöhen. Die Haarnadel II ist demnach essenziell für die Vermittlung der IRES-aktivierenden Wirkung von JKTBP1. Die Mutation in der Haarnadel II (5UMspFL) reduziert, ebenso wie im bicistronischen Reporter-Experiment, die Reporteraktivität (**Abb. 2.16** und **2.18**) auf ca. 45% des Vergleichskonstruktes 5UFL. Ein dosisabhängiger Anstieg der IRES-Aktivität kann trotz der Mutation in der Haarnadel II, die eine Bindung von JKTBP1 *in vitro* inhibiert, beobachtet werden.

In der 3'UTR wurde das AU-Nonamer im Klasse II ARE (3256-3264:UUUUUUUAUA → UcgUcgAg) mutiert. Dazu wurden die gleichen Primer wie bei den *in vitro* 3'UTR-Plasmiden verwendet (**2.2.1**). Der so hergestellte Vektor pT7FL3UMut erlaubte die Untersuchung der Auswirkung der Mutation im Reporter-Experiment. Bisher wurde nur *in vitro* gezeigt, dass die JKTBP1-Bindung durch diese Mutation geschwächt wird. Hier wurden die Plasmide pT7FL3U und pT7FL3UMut zusammen mit steigenden Mengen an pEXPR-JKTBP1-Vektor in HeLa B-Zellen transfiziert. Die Messung der Luziferase-Aktivitäten in den Zelllysaten hatte folgendes Ergebnis:



**Abb. 2.30: Die Mutation des Klasse II AREs reduziert die Reporteraktivität nur wenig**

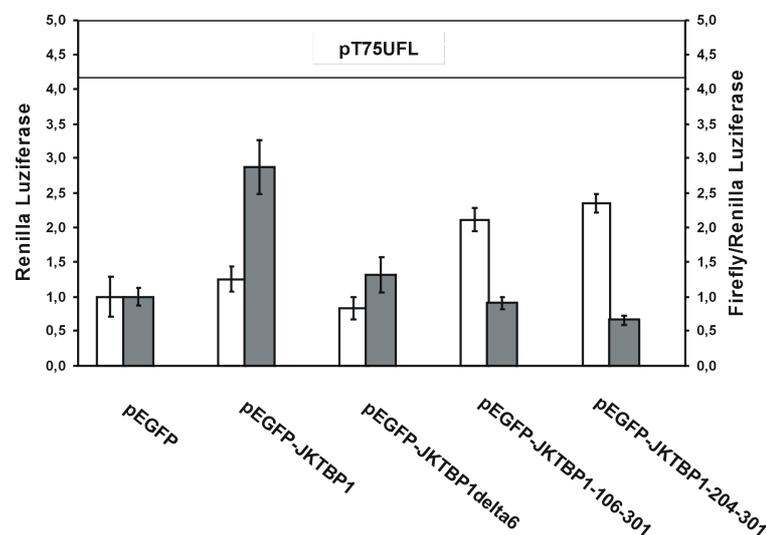
HeLa B-Zellen wurden mit je 3 µg pT7FL3U und pT7FL3UMut, 0,3 µg phRL-TK-Vektor sowie den angegebenen Mengen an Kontrollvektor pEXPR und pEXPR-JKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken

zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter pT7FL3U auf 1 gesetzt worden. Die Renilla-Luziferase-Aktivitäten schwankten um den Faktor 2. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität und sind ein Maß für die Expression des FL-Reportergens. Der Quotient von pT7FL3U wurde gleich 1 gesetzt. Die Grundaktivität des FL-Reporters wird durch die Mutation auf 75% gesenkt. Das transfizierte Strep-JKTBP1 erhöht die Reporterexpression beider Konstrukte aber in gleichem Maße.

Die Reporterexpression des FL3UMut-Konstruktes ist geringer als beim Vergleichsvektor pT7FL3U (0,74 statt 1,00, **Abb. 2.30**). Dies könnte auf eine schlechtere Bindung von JKTBP1 an die 3'UTR zurückzuführen sein. Entweder ist die schwächere Bindung von JKTBP1 immer noch ausreichend zur Vermittlung der aktivierenden Funktion oder JKTBP1 bindet an weitere Motive des eingegrenzten Bindungsbereichs der 3'UTR (Basen 3194-3416).

#### 2.4.5 Die Vermittlung der JKTBP1-Wirkung an der 5'UTR

In Abschnitt 2.3.5.3 konnte bereits gezeigt werden, dass die JKTBP1-Wirkung über die RNA-Bindung vermittelt wird. Dies soll hier ebenfalls für die Bindung an die vollständige 5'UTR von NRF untersucht werden. Die in **Abb. 2.21** vorgestellten EGFP-Fusionsproteine wurden zusammen mit den Reportern pT75UFL und pT7FL3U in HeLa B-Zellen transfiziert (4.2.4.3.1) und die Luziferase-Aktivitäten in Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7).



**Abb. 2.31: Die JKTBP1-Wirkung wird über beide RNA-bindenden Domänen und einen Teil des C-Terminus vermittelt**

HeLa B-Zellen wurden mit 3 µg pT75UFL-Reporterplasmid und 0,3 µg phRL-TK-Vektor sowie je 4 µg der angegebenen Expressionsplasmide pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Es wurden drei unabhängige Experimente ausgewertet, die Fehlerbalken geben die

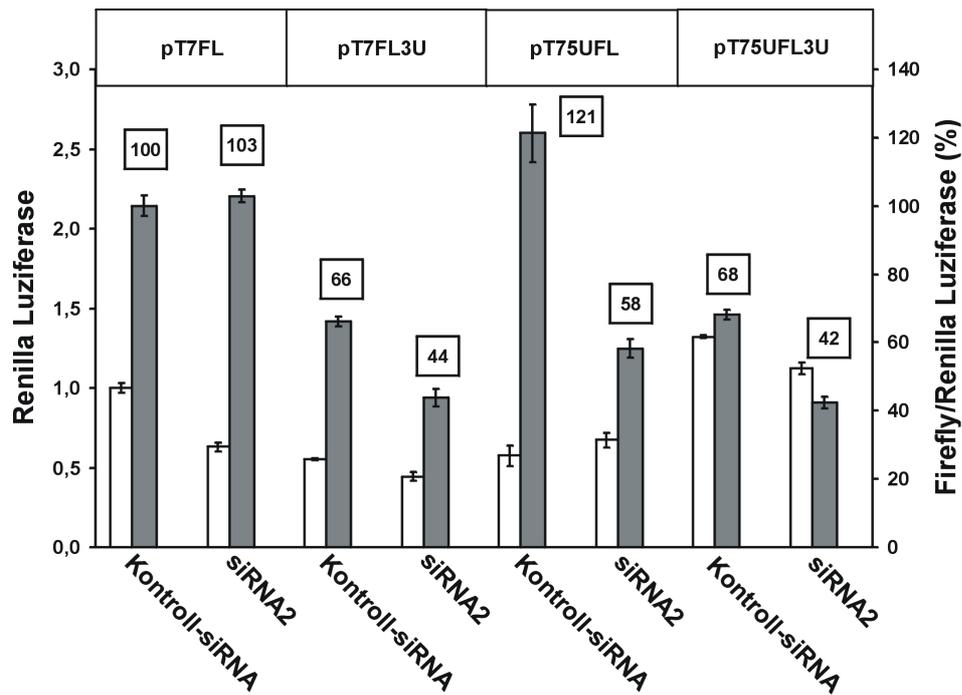
Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Ansatz pEGFP auf 1 gesetzt worden. Die Renilla-Luziferase-Aktivitäten schwankten um den Faktor 2-3. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Expression des FL-Reportergens. Auch der Quotient wurde für pEGFP gleich 1 gesetzt. Nur das transfizierte EGFP-JKTBP1 erhöht die Reporter-Expression um den Faktor 3, alle anderen Fusionsproteine verhalten sich wie die Kontrolle (pEGFP).

Die Messungen zeigen (**Abb. 2.31**), dass nur das Protein EGFP-JKTBP1 die Reporteraktivität steigert. Die Wirkung von JKTBP1 wird demnach auch an der gesamten 5'UTR durch die direkte Bindung an die RNA vermittelt. Die Spleißvariante EGFP-JKTBP1 $\Delta$ 6 sowie die Deletionsmutanten EGFP-JKTBP1-106-301 (RBD 1 fehlt) und EGFP-JKTBP1-204-301 (beide RBDs fehlen) steigern die Reporter-Aktivität nicht und liegen im Bereich der Kontrolle (pEGFP). Auch hier sind beide RNA-bindenden Domänen sowie ein Teil des C-Terminus für die Vermittlung der JKTBP1-Wirkung notwendig.

### 2.4.6 Die Auswirkung des JKTBP1-Knockdowns auf die 5' und 3'UTR

Die Experimente mit monocistronischen Reporterplasmiden haben gezeigt, dass die Aktivität aller Konstrukte durch die Überexpression von JKTBP1 ansteigt. Um die Wirkung von JKTBP1 auf beide UTRs besser bestimmen zu können, wurde ein JKTBP1-Knockdown durchgeführt. Dabei ist eine Abnahme der Reporteraktivitäten zu erwarten, wenn der endogene JKTBP1-Level reduziert wird. Wie im Abschnitt **2.3.5.4** beschrieben, wurden dazu siRNA-Oligonukleotide verwendet. Neben den spezifischen siRNA-Oligonukleotiden, die die Sequenz der JKTBP1-RNA trugen, wurden die Zellen mit einer Kontroll-siRNA (Negativkontrolle) transfiziert (4.2.4.3.3). Die Luziferase-Aktivitäten wurden nach zwei Tagen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Anders als bei der Überexpression von JKTBP1 (**Abb. 2.28**) zeigt hier der Kontroll-Reporter pT7FL keine Reaktion auf die spezifische siRNA2. Der Knockdown von JKTBP1 beeinflusst also nicht die Expression des Firefly-Gens. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass die bei der Überexpression detektierte Aktivitätszunahme eine unspezifische Reaktion ist. Der Reporter pT75UFL bestätigt die Daten der Überexpression: Die siRNA2 reduziert die Aktivität dieses Reporter auf 50%. Darüber hinaus konnte bei diesem Experiment die Wirkung von JKTBP1 auf die 3'UTR besser detektiert werden: die Konstrukte FL3U und 5UFL3U zeigen durch den Knockdown von JKTBP1 eine Abnahme auf 60% der Ausgangsaktivität.

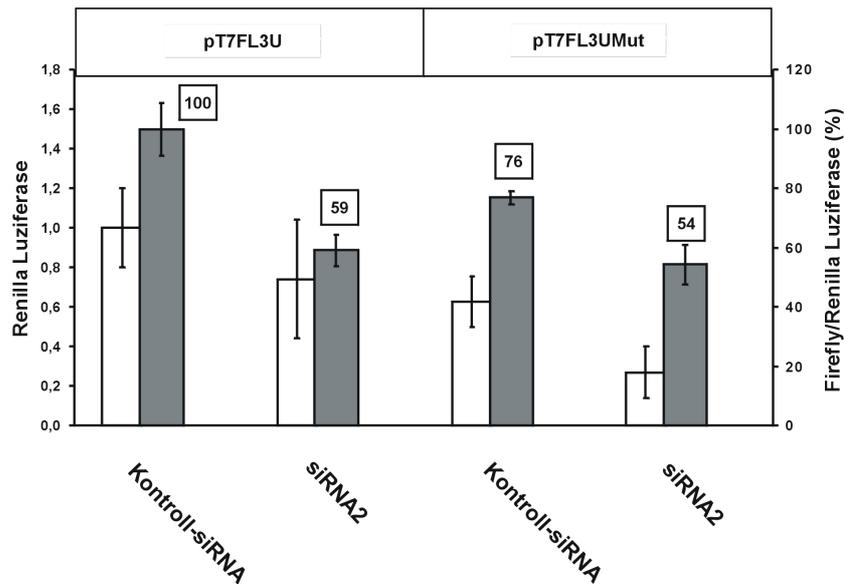
JKTBP1 steigert demnach die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements (**2.3**) und die der gesamten 5'UTR. Ebenso bewirkt eine Bindung von JKTBP1 an die 3'UTR einen Anstieg der Reporteraktivität.



**Abb. 2.32: Der Knockdown von JKTBP1 senkt die Aktivitäten aller Reporter-Gen-Konstrukte außer die der Kontrolle pT7FL**

HeLa B-Zellen wurden gleichzeitig mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden (150 nM final), 3 µg der jeweiligen monocistronischen Reporter-Gen-Plasmide sowie 0,3 µg phRL-Tk pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.3). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luciferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Daten stammen aus drei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luciferase, sie wurde für den Ansatz pT7FL mit Kontroll-siRNA auf 1 gesetzt. In den Ansätzen schwankten die Renilla-Luciferase-Aktivitäten um den Faktor 2. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Expression des FL-Reporter-Genes. Dieser Quotient wurde für pT7FL auf 100% gesetzt. Alle anderen Werte sind darauf bezogen. Die Ansätze mit Kontroll-siRNA verhalten sich wie schon in Abb. 2.25 gezeigt. Die siRNA 2 hat keinen Effekt auf die Kontrolle pT7FL, aber reduziert alle anderen Reporteraktivitäten im Vergleich zum jeweiligen Kontroll-siRNA-Ansatz. Die Reporteraktivität von pT7FL3U sinkt auf 67%, die von pT75UFL auf 48% und die von pT75UFL3U auf 62%.

Die Bindung im Bereich des Klasse II AREs bewirkt vermutlich eine Stabilisierung der Reporter-RNA. Durch die Mutation des AREs wurde eine Abnahme der Aktivität gemessen (**Abb. 2.30**). Das Konstrukt pT7FL3UMut blieb aber durch JKTBP1 dosisabhängig aktivierbar. Um zu prüfen, in welchem Maß die Mutation die JKTBP1-Wirkung einschränkt, wurde der endogene JKTBP1-Level gesenkt und die Reporter pT7FL3U und pT7FL3UMut miteinander verglichen (**Abb. 2.33**).



**Abb. 2.33: Der Knockdown von JKTBP1 senkt die Reporter-Aktivität von pT7FL3UMut**

HeLa B-Zellen wurden gleichzeitig mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden (150 nM final) und je 3  $\mu$ g Reporter-genplasmide pT7FL3U und pT7FL3UMut sowie 0,3  $\mu$ g phRL-Tk pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.3). Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.3) und die Aktivitäten beider Luziferasen in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Daten stammen aus sechs unabhängigen Experimenten, die Standardabweichung ist angegeben. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, sie wurde für den Ansatz pT7FL3U mit Kontroll-siRNA auf 1 gesetzt. In den Ansätzen schwankten die Renilla-Luziferase-Aktivitäten um den Faktor 3. Die grauen Balken zeigen die Quotienten aus Firefly-/Renilla-Aktivität. Sie sind ein Maß für die Expression des FL-Reportergens. Dieser Quotient wurde für pT7FL3U auf 100% gesetzt. Die Mutation des AREs senkt die Aktivität auf 76%, ein zusätzlicher JKTBP1-Knockdown reduziert diese weiter auf 54% der Bezugsaktivität. Damit wird die Aktivität des pT7FL3U-Konstruktes bei JKTBP1-Knockdown erreicht.

Das Experiment zeigt, dass der Knockdown von JKTBP1 die Aktivität des Reporters stärker senkt als die Mutation des AREs. Die Aktivität von pT7FL3UMut liegt bei 76% der Aktivität von pT7FL3U. Erst durch den Knockdown von JKTBP1 wird die gleiche Aktivität (54%) erreicht wie beim pT7FL3U-Konstrukt (59%). Das heißt, dass die Mutation des AREs die Wirkung von JKTBP1 nicht vollständig verhindert, sondern nur einschränkt. Ein Teil des Proteins bindet also noch an die 3'UTR-Mutante (siehe auch **Abb. 2.11**) und vermittelt damit immer noch die aktivierende Wirkung.

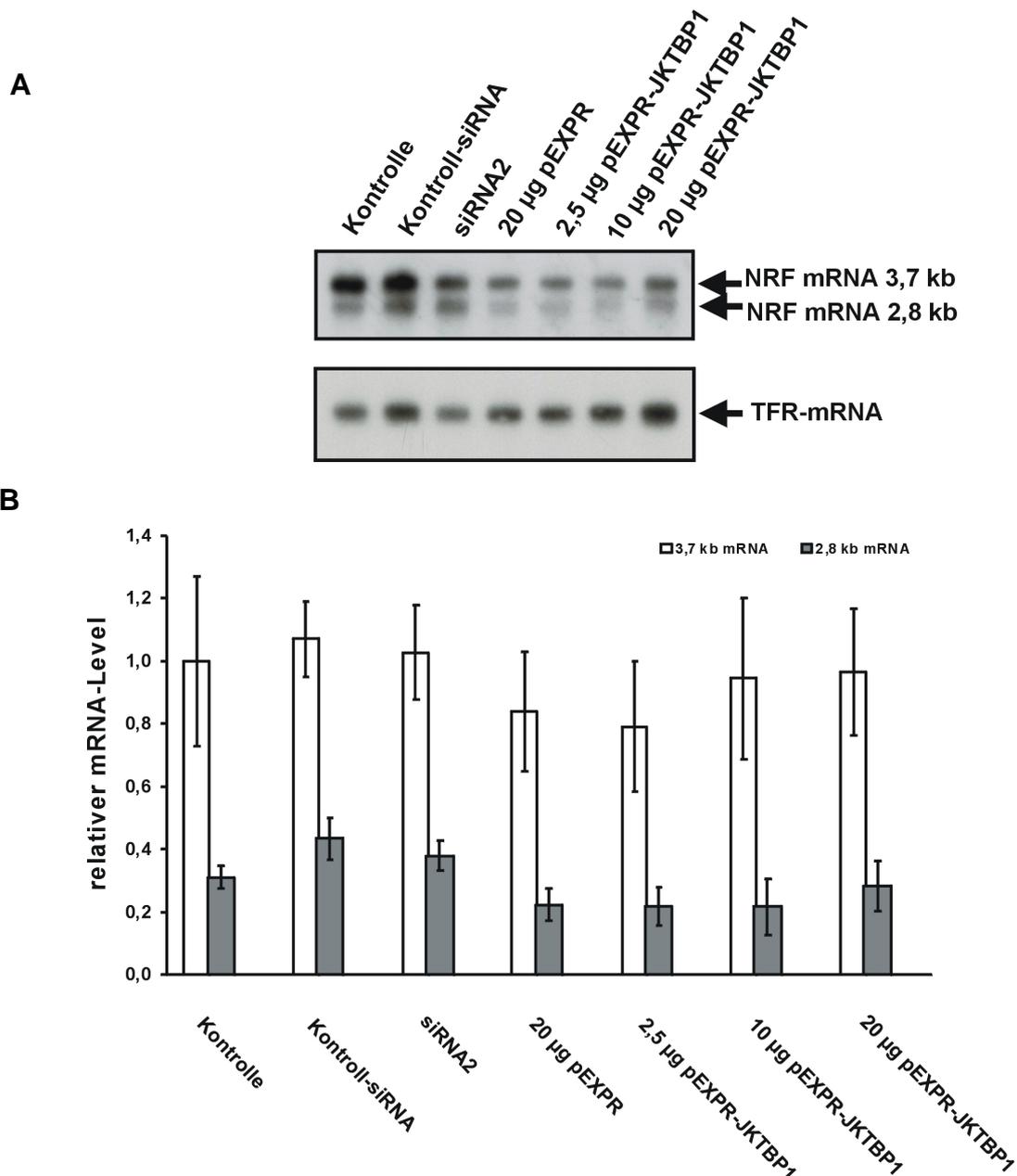
## 2.5 Die Wirkung von JKTBP1 *in vivo*

Bisher wurde der Effekt von JKTBP1 auf die 5' und 3'UTR von NRF immer anhand von Reporter-Experimenten gezeigt. Hier soll nun der Effekt von JKTBP1 an endogenen NRF-mRNAs überprüft werden. Mit Hilfe von Northern Blot Experimenten wird der Einfluss von JKTBP1 auf die mRNA-Level und die Stabilität gezeigt. Western Blot Analysen zeigen die Veränderung der Expression von NRF nach JKTBP1-Überexpression und -Knockdown.

### 2.5.1 Der Einfluss von JKTBP1 auf die NRF-mRNA-Spezies

Die Experimente mit monocistronischen Reporterplasmiden haben gezeigt, dass JKTBP1 aktivierend auf die Reporter FL3U, 5UFL und 5UFL3U wirkt. Das Reportersystem erlaubt keine Aussage darüber, ob diese Effekte ausschließlich auf der Wirkung von JKTBP1 auf Translationsebene beruhen. So könnte JKTBP1 auch die Transkription der Plasmide und damit die gemessenen Reporteraktivitäten beeinflussen. Um die Frage zu beantworten, ob JKTBP1 einen Einfluss auf die Transkription beider NRF-mRNA-Spezies hat, wurden Northern Blot Experimente durchgeführt. Dazu wurden HeLa B-Zellen sowohl mit steigenden Mengen an pEXPR-JKTBP1 (4.2.4.3.1) als auch mit siRNA-Oligonukleotiden (4.2.4.3.3) transfiziert. Aus diesen Zellen wurde Gesamt-RNA präpariert (4.2.4.6) und daraus anschließend poly(A)-RNA isoliert (4.2.2.19). Diese wurde für die Northern Blot Experimente eingesetzt. Zur Detektion beider NRF mRNA-Spezies (3,7 kb und 2,8 kb) wurde eine Sonde verwendet, die 1008 b der codierenden Sequenz von NRF enthielt. Zum Abgleich der RNA-Mengen wurde eine Sonde eingesetzt, die die gesamte codierende Sequenz des Transferrin-Rezeptors (500 b) umfasste (TFR-Sonde) (**Abb. 2.34 A**).

In den Northern Blot Experimenten konnten beide NRF-mRNA Spezies (3,7 kb und 2,8 kb) detektiert werden. Die 3,7 kb mRNA-Bande ist dabei viel intensiver als die 2,8 kb Bande. Eine densitometrische Auswertung zeigt, dass die mRNA mit 5' und 3'UTR (3,7 kb) in den Zellen ungefähr dreimal höher konzentriert ist als die kürzere mRNA (2,8 kb, kurze 3'UTR). Die Unterschiede in den Bandenintensitäten sind auf variierende RNA-Mengen zurückzuführen, wie die TFR-mRNA-Banden zeigen. Werden die NRF-Banden jeweils auf die TFR-Banden bezogen, können die relativen NRF-mRNA-Levels verglichen werden. Bei allen Ansätzen sind ähnliche mRNA-Levels detektiert worden. Die Mengen beider NRF-mRNA-Spezies zeigen bei den JKTBP1-Überexpressionsansätzen nur leichte Schwankungen, auch hier ist kein Einfluss von JKTBP1 detektierbar. Die Daten zeigen demnach, dass JKTBP1 keinen Einfluss auf die Transkription beider NRF-mRNAs hat.



**Abb. 2.34: JKTBP1 hat keinen Einfluss auf die Transkription beider NRF-mRNA-Spezies**

**A:** HeLa B-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen an Expressionsplasmiden oder den siRNA-Oligonukleotiden siRNA2 und Kontroll-siRNA (je 150 nM final) transfiziert (4.2.4.3.1, 4.2.4.3.3). Die Mengen an pEXPR-JKTBP1 wurden mit pEXPR jeweils auf eine Gesamt-DNA-Menge von 20 µg aufgefüllt. Die Angaben beziehen sich auf 9 cm Zellkulturschalen, die Kontrolle bezeichnet untransfizierte Zellen. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert und die Gesamt-RNA aus den Zellen präpariert (4.2.4.6). Je 75 µg Gesamt-RNA wurden für die Präparation von poly(A)-RNA eingesetzt (4.2.2.19). Die Hälfte der isolierten poly(A)-RNA wurde für den Northern Blot eingesetzt (4.2.2.20). Die Sonden zur Detektion der NRF-mRNA-Spezies und der TFR-mRNA wurden, wie in 4.2.2.20.2 beschrieben, hergestellt. Die Matrize für die NRF-Sonde wurde aus dem Vektor pNRF2722Tap mit *EcoRI* herausgeschnitten (4.2.2.10 A) und ein 1008 b großes Fragment durch Gelextraktion (4.2.2.9) mit anschließender Aufreinigung (4.2.2.14) isoliert. Zur Herstellung des TFR-Sonden-Templates wurde der Vektor pT7AS-TFR *XbaI/HindIII* geschnitten. Nach der Detektion beider NRF-mRNAs wurde die radioaktiv markierte Sonde von der Membran entfernt und die Membran mit der TFR-Sonde hybridisiert.

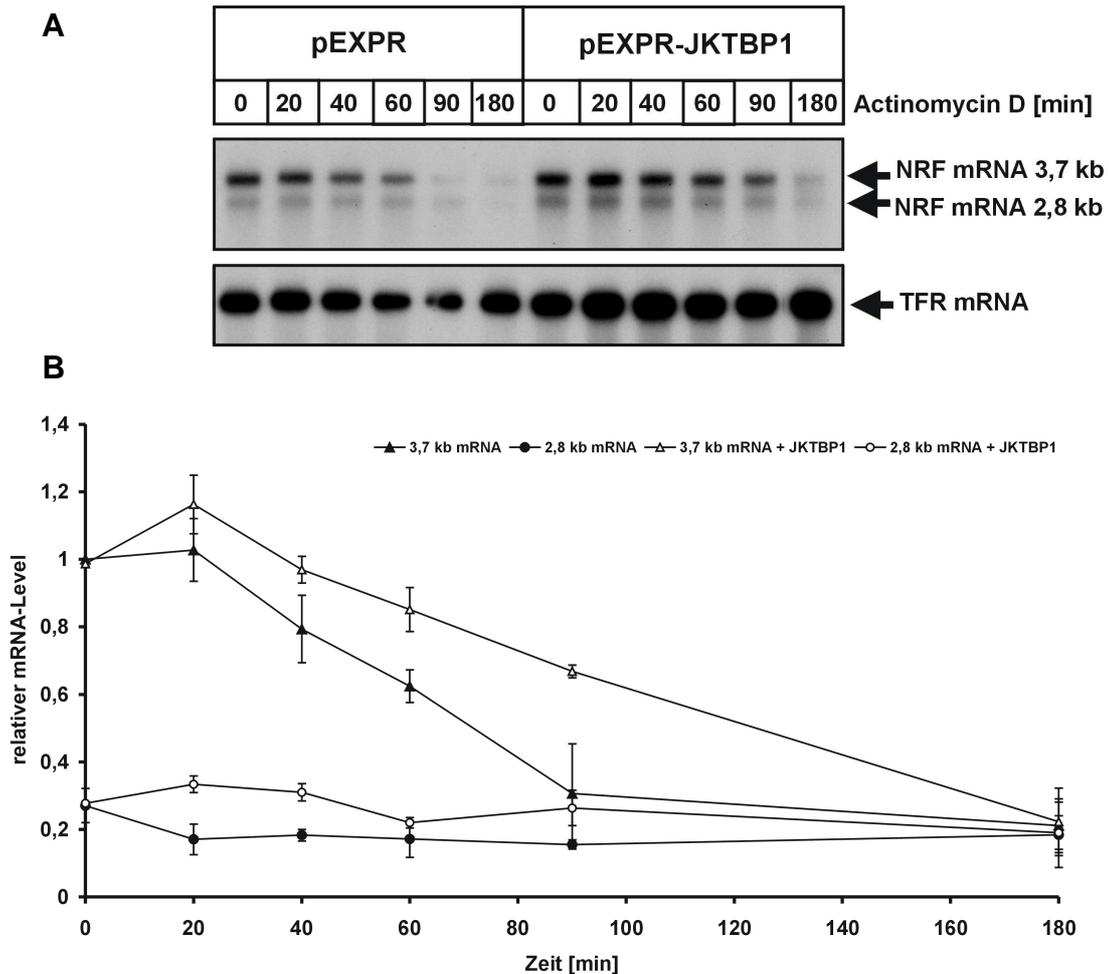
**B:** Es wurden drei Experimente wie unter **A** beschrieben durchgeführt. Jedes Experiment wurde densitometrisch ausgewertet (Biometra Biodoc Analyze). Dabei wurden beide NRF-Banden auf die TFR-Banden bezogen. Der relative mRNA-Level der 3,7 kb NRF-Bande wurde für jedes Experiment gleich 1 gesetzt. Das Diagramm zeigt die Daten dieser drei Experimente. Die weißen Balken zeigen die relativen mRNA-Levels der 3,7 kb mRNA, die grauen Balken die der 2,8 kb mRNA. Die mRNA-Levels der 3,7 kb und 2,8 kb mRNA-Spezies zeigen leichte Schwankungen, lassen aber keine Tendenzen erkennen.

### 2.5.2 Der Einfluss von JKTBP1 auf die NRF-mRNA-Stabilität

Die monocistronischen Reporter-Experimente (**Abb. 2.27**) haben gezeigt, dass die Überexpression von JKTBP1 die Reporter-Expression des pT7FL3U-Plasmids erhöht. Da 3'UTRs häufig die Stabilität von mRNAs beeinflussen, wird vermutet, dass JKTBP1 durch die Bindung an die 3'UTR auch die Stabilität der Reporter-RNA erhöht. Um das experimentell zu belegen, wurde die Wirkung von JKTBP1 auf die Stabilität der endogenen mRNA-Spezies untersucht. Zellen wurden dazu mit dem Expressionsvektor pEXPR-JKTBP1 oder dem Kontrollvektor pEXPR transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen für die in **Abb. 2.35** angegebenen Zeiten mit Actinomycin D behandelt (4.2.4.8) und anschließend lysiert (4.2.4.6). Actinomycin D stoppt durch Interkalierung in die DNA die Transkription. Somit wird keine neue mRNA gebildet, und die vor der Actinomycin D-Behandlung transkribierte mRNA kann zu verschiedenen Zeiten im Northern Blot detektiert werden. Die Abnahme der mRNA-Menge über die Zeit erlaubt eine Aussage über die Stabilität der mRNA.

Für die Northern Blot Experimente (4.2.2.20) wurde wiederum poly(A)-RNA eingesetzt. Die in **Abb. 2.34** beschriebene NRF-Sonde diente zur Detektion beider NRF-mRNA-Spezies, als RNA-Abgleich wurde wiederum die TFR-Sonde verwendet. Bei diesem Experiment konnten beide NRF-mRNA Spezies im Northern Blot nachgewiesen werden (**Abb. 2.35 A**). Die Levels beider mRNA-Spezies wurden über eine Gesamtzeit von 3 h beobachtet. Die TFR-mRNA ist weitaus stabiler als die NRF-mRNAs. Sie zeigt in der beobachteten Zeitspanne keinen Abbau. Daher wurden bei der densitometrischen Auswertung beide NRF-Banden einzeln auf die TFR-Banden bezogen.

Die Auswertung des Northern Blots zeigt, dass die verschiedenen mRNA-Spezies von NRF unterschiedlich stabil sind. Während die 3,7 kb mRNA eine Halbwertszeit von rund 70 min hat, ist die Halbwertszeit der 2,8 kb mRNA mit ca. 160 min deutlich länger. Die Überexpression von JKTBP1 führt zu einer Stabilisierung der 3,7kb mRNA. Der mRNA-Level nimmt langsamer ab, die Halbwertszeit verlängert sich auf ungefähr 110 min. Die kürzere 2,8 kb mRNA hingegen bleibt von der JKTBP1-Überexpression unbeeinflusst. Der RNA-Level nach der Überexpression ist leicht erhöht im Vergleich zur Kontrolle (pEXPR). Es lässt sich jedoch keine Veränderung in der Stabilität erkennen.



**Abb. 2.35: JKTBP1 stabilisiert die 3,7 kb mRNA von NRF**

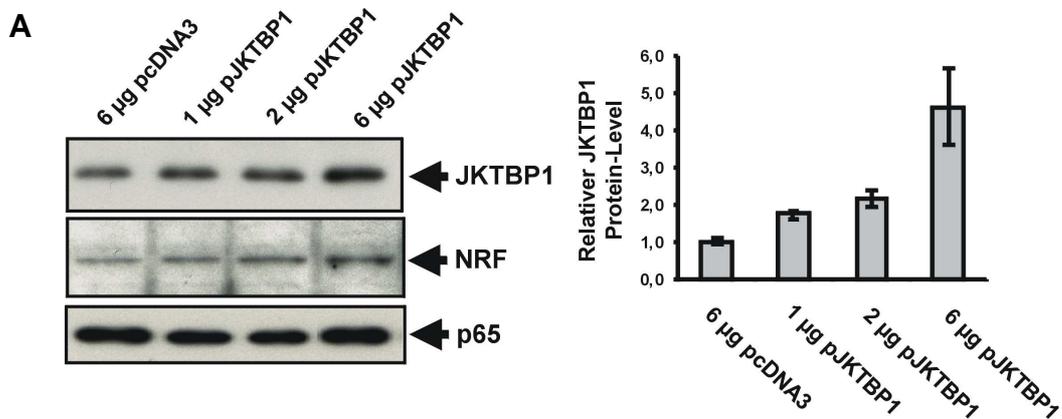
**A:** HeLa B-Zellen wurden mit 20  $\mu\text{g}$  pEXPR-JKTBP1 oder 20  $\mu\text{g}$  pEXPR als Kontrolle transfiziert (4.2.4.3.1). Die Angaben beziehen sich auf 9 cm Zellkulturschalen. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit Actinomycin D (final 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) inkubiert (4.2.4.8), und anschließend die Gesamt-RNA aus den Zellen isoliert (4.2.4.6). Je 75  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden für die Präparation von poly(A)-RNA eingesetzt (4.2.2.19). Die Hälfte der isolierten poly(A)-RNA wurde für den Northern Blot verwendet (4.2.2.20). Die Sonden zur Detektion der NRF-mRNA-Spezies und der TFR-mRNA wurde wie in 4.2.2.20.2 beschrieben hergestellt. Nach der Detektion der beiden NRF-mRNAs wurde die radioaktiv markierte Sonde von der Membran entfernt und die Membran mit der TFR-Sonde hybridisiert.

**B:** Die in A gezeigten Banden wurden densitometrisch ausgewertet. Dabei wurden beide NRF-mRNA-Banden jeweils auf die zugehörige TFR-Bande bezogen. Die Daten stammen aus zwei unabhängigen Experimenten, die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung an. Die relative Bandenintensität der oberen NRF-Bande des pEXPR-Ansatzes zum Zeitpunkt „0“ wurde gleich 1 gesetzt. Alle anderen Banden wurden auf diese bezogen. Die schwarzen Dreiecke zeigen die relative RNA-Menge der 3,7 kb mRNA, die schwarzen Kreise die der 2,8 kb mRNA. Die Ansätze mit überexprimiertem JKTBP1 sind durch weiße Dreiecke (3,7 kb) und weiße Kreise (2,8 kb) gekennzeichnet. Die Zeitpunkte wurden für eine bessere Übersicht miteinander verbunden.

Dieses Experiment weist nach, dass JKTBP1 eine Wirkung auf eine der beiden NRF-mRNAs hat. Die 3,7 kb mRNA mit beiden UTRs wird durch JKTBP1 stabilisiert. Die Stabilität der kürzeren 2,8 kb mRNA, die über die 5'UTR und die kurze 3'UTR verfügt, verändert sich durch JKTBP1 nicht. Der aktivierende Einfluss von JKTBP1 auf monocistronische Reportergerkonstrukte, die die 1007 b lange 3'UTR von NRF enthalten (pT73UFL **Abb. 2.28** und **2.30**), wird also durch die Stabilisierung der mRNA vermittelt.

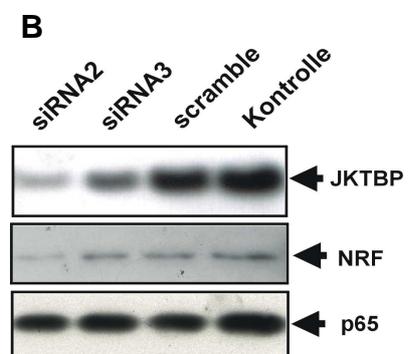
### 2.5.3 Der Einfluss von JKTBP1 auf den endogenen NRF-Level

Die durchgeführten Reporterger-Experimente haben den aktivierenden Einfluss von JKTBP1 auf das IRES-Element und die 3'UTR von NRF gezeigt. Hier soll nun die Wirkung von JKTBP1 auf das endogene NRF-Protein betrachtet werden. Dazu wurde JKTBP1 in HeLa B-Zellen zum einen überexprimiert, zum anderen wurde der JKTBP1-Level durch RNA-Interferenz reduziert. Die Zellen wurden sowohl mit steigenden Mengen an pJKTBP1 (4.2.4.3.3) als auch mit verschiedenen siRNA-Oligonukleotiden (4.2.4.3.1) transfiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen lysiert (4.2.4.5.2) und die Lysate im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5). Mit entsprechenden Antikörpern wurden die Protein JKTBP1, p65 und das endogene NRF detektiert.



**Abb. 2.36: JKTBP1 beeinflusst den endogenen NRF-Protein-Level**

**A:** HeLa B-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen pJKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Zur Kontrolle wurden 6 µg pcDNA<sub>3</sub>-Vektor eingesetzt. Bei den weiteren Ansätzen wurde die Plasmidmenge mit pcDNA<sub>3</sub> auf 6 µg aufgefüllt. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.2) und die Lysate im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5). Die angezeigten Proteine wurden mit den Antikörpern α-JKTBP1, α-p65 und α-NRF (Peptid 25-45) detektiert. Bei der densitometrischen Auswertung wurden die Intensitäten der JKTBP1-Banden auf die der p65-Banden bezogen. Die Kontrolle mit 6 µg pcDNA<sub>3</sub> wurde gleich 1 gesetzt, es wurden drei unabhängige Experimente ausgewertet. Die endogene NRF-Protein-Konzentration steigt mit der Überexpression von JKTBP1 an.



**B:** HeLa B-Zellen wurden mit den angegebenen siRNA-Oligonukleotiden mit einer finalen Konzentration von 113 nM im Zellkulturmedium transfiziert (4.2.4.3.3). Bei der Kontrolle blieben die Zellen untransfiziert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert (4.2.4.5.2) und die Lysate im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5). Die angezeigten Proteine wurden mit den Antikörpern  $\alpha$ -JKTBP1,  $\alpha$ -p65 und  $\alpha$ -NRF (Peptid 25-45) detektiert. Die siRNA 2 senkt sowohl den endogenen JKTBP1- als auch den NRF-Level am wirksamsten.

Die Überexpression von JKTBP1 (**Abb. 2.36 A**) führt dabei zu einem leichten Anstieg der endogenen NRF-Konzentration. Bei diesem Experiment wurde noch der Vektor pJKTBP1 zur Überexpression verwendet. Der Anstieg der JKTBP1-Konzentration war daher im Western Blot schlecht zu detektieren, konnte aber durch eine densitometrische Auswertung besser gezeigt werden. Durch die Transfektion der spezifischen siRNA-Oligonukleotide siRNA2 und siRNA3 konnte der JKTBP1-Level reduziert werden (**Abb. 2.36 B**). Auch hier korreliert der endogene NRF-Level mit dem JKTBP1-Level. Besonders durch den Einsatz von siRNA2 konnten die Levels von JKTBP1 und NRF gesenkt werden. Diese Daten bestätigen die Aussagen der Reporter-Experimente und belegen einen endogenen Zusammenhang zwischen JKTBP1 und NRF.

### 2.6 Die Auswirkung verschiedener Stimuli auf JKTBP1

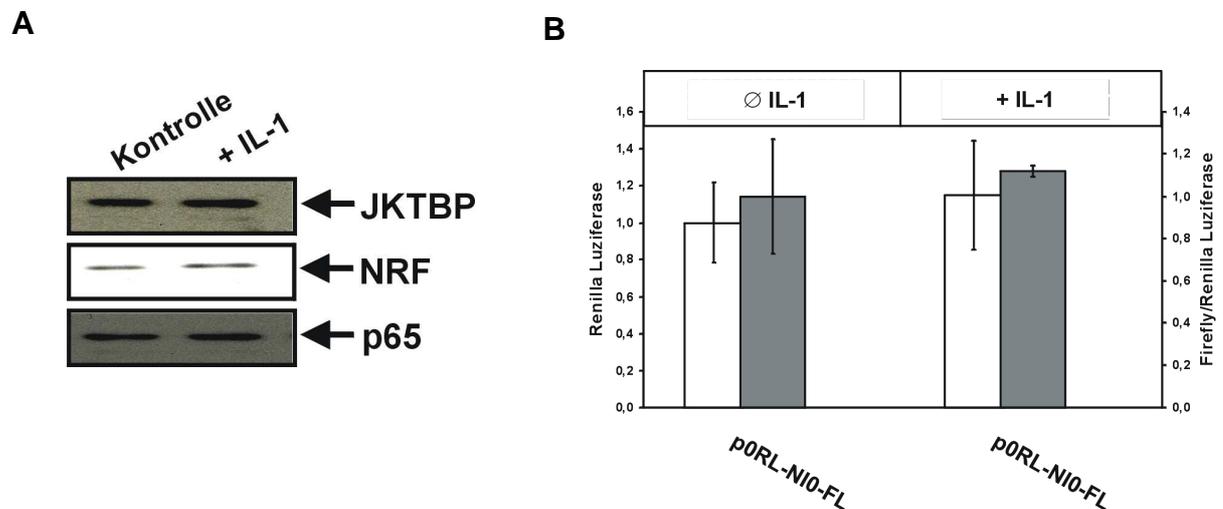
Es wurde gezeigt, dass der endogene JKTBP1-Level mit der NRF-Protein-Menge korreliert. Nun soll geklärt werden, in welchem Maße JKTBP1 von äußeren Stimuli abhängig ist und wie es auf diese reagiert. Es wurden zwei Stimuli untersucht und jeweils die Expression und die zelluläre Verteilung von JKTBP1 beobachtet.

#### 2.6.1 JKTBP1-Expression und -Lokalisation nach IL-1 Stimulation

In einer Proteom-Analyse konnte gezeigt werden, dass JKTBP1 durch eine Interleukin-1 (IL-1) Stimulation in Colonepithelzellen stark induziert wurde (Barcelo-Batllori et al., 2002). Daher soll der Einfluss von IL-1 auf die Expression von JKTBP1 für das hier verwendete Zellkultursystem untersucht werden.

Dazu wurden HeLa B-Zellen 8 h mit IL-1 stimuliert (4.2.4.4) und anschließend lysiert (4.2.4.5.2). Die Lysate wurden dann im Western Blot analysiert (4.2.3.5). Um ebenfalls die IRES-aktivierende Wirkung von JKTBP1 zu detektieren, wurden Zellen einen Tag vor der Stimulation mit dem Reporter p0RLN10FL transfiziert (4.2.4.3.1). Nach 24 h IL-1 Stimulation wurden auch diese Zellen lysiert (4.2.4.5.3) und die Luziferase-Aktivitäten in den Lysaten bestimmt (4.2.4.7). Die Detektion von endogenem JKTBP1 (**Abb. 2.37 A**) zeigt, dass sich die Proteinmenge durch die IL-1 Stimulation nicht verändert hat. Auch der NRF-Protein-Level wird durch IL-1 Stimulation nicht beeinflusst. Passend zu dieser Beobachtung zeigen die

Luziferase-Aktivitäten des bicistronischen Reporters p0RLN10FL keinen Unterschied zwischen IL-1 stimulierten und unstimulierten Zellen (**Abb. 2.37 B**).



**Abb. 2.37: IL-1 induziert nicht die JKTBP1-Expression in HeLa B-Zellen**

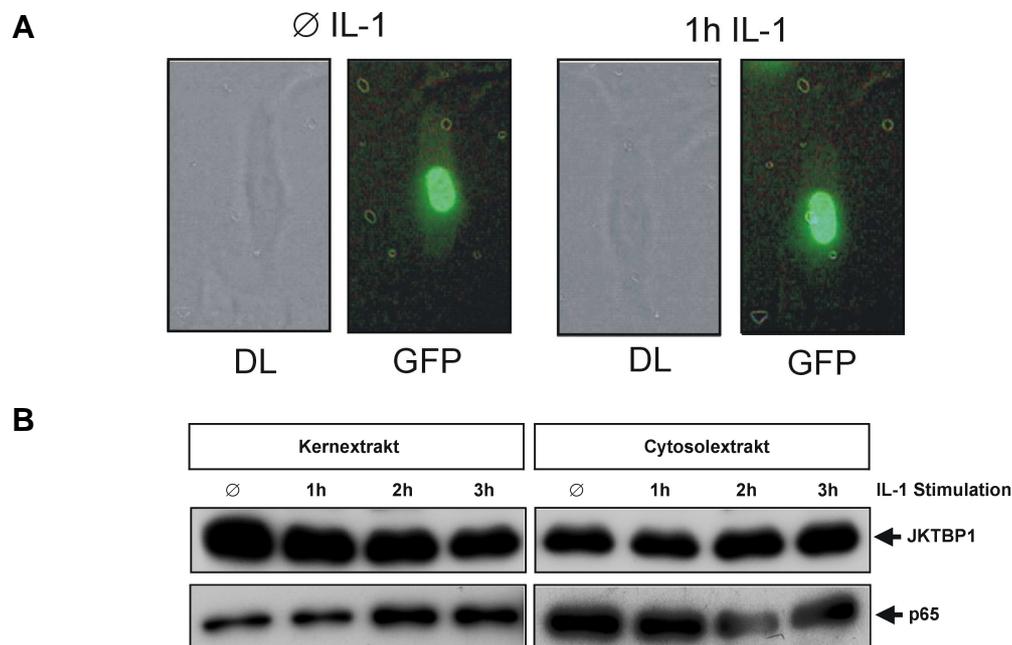
**A:** HeLa B-Zellen wurden zwei Tage nach dem Aussähen für 8 h mit IL-1 stimuliert (4.2.4.4) und anschließend lysiert (4.2.4.5.3). Die Lysate wurden im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5) und die angezeigten Proteine mit den Antikörpern  $\alpha$ -JKTBP1,  $\alpha$ -p65 und  $\alpha$ -NRF (Peptid 25-45) detektiert. Das p65 Signal zeigt gleiche Proteinmengen an. Weder die endogene JKTBP1-Protein-Konzentration noch der NRF-Level verändern sich nach IL-1 Stimulation.

**B:** HeLa B-Zellen wurden mit 3  $\mu$ g p0RLN10FL pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden einem Tag nach der Transfektion für 24 h mit IL-1 stimuliert (4.2.4.4) und anschließend lysiert (4.2.4.5.3). Die Aktivitäten beider Luziferasen wurden in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter p0RLN10FL im unstimulierten Zustand auf 1 gesetzt worden. In beiden Ansätzen wurden vergleichbare Renilla-Luziferase Aktivitäten gemessen. Die grauen Balken zeigen die IRES-Aktivität. Auch diese wurde für p0RLN10FL in unstimulierten Zellen gleich 1 gesetzt. Die IL-1 Stimulation führt nicht zu einer Zunahme der IRES-Aktivität.

JKTBP1 ist im Kern und im Cytosol lokalisiert, die Konzentration im Kern ist jedoch deutlich höher (Kawamura et al., 2002). Darüber hinaus wurde bereits ein Kern-Cytosol-Transport gezeigt. Dieser wird über eine Kernlokalisationssequenz im C-Terminus des Proteins vermittelt (Kawamura et al., 2002). Hier wurde überprüft, inwiefern eine IL-1-Stimulation die Lokalisation von JKTBP1 beeinflusst. Dazu wurden HeLa B-Zellen für mehrere Stunden mit IL-1 stimuliert. Zum einen wurde das Fusionsprotein EGFP-JKTBP1 zuvor in diese Zellen transfiziert, um die Lokalisation anhand der GFP-Fluoreszenz beobachten zu können. Zum anderen wurden Zellen nach der Stimulation lysiert und Kern- und Cytosolextrakte hergestellt (4.2.4.5.1). Diese wurden dann im Western Blot analysiert (4.2.3.5).

Die Fluoreszenzaufnahmen der transfizierten Zellen (**Abb. 2.38 A**) zeigten, dass die Verteilung von EGFP-JKTBP1 durch die Stimulation mit IL-1 nicht verändert wurde. Das

Fusionsprotein ist fast ausschließlich im Kern lokalisiert, die GFP-Fluoreszenz im Cytosol ist nur schlecht zu detektieren.



**Abb. 2.38: IL-1 beeinflusst nicht die Lokalisation von JKTBP1 in HeLa B-Zellen**

**A:** HeLa B-Zellen wurden mit je 3 µg EGFP-JKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.3). Die Zellen wurden nach zwei Tagen für 6 h mit IL-1 stimuliert (4.2.4.4) und während dieser Zeit im Fluoreszenzmikroskop (4.2.4.10) beobachtet. Für zwei Zeitpunkte sind Durchlicht- (DL) und Fluoreszenz-Aufnahmen (GFP) in 400-facher Vergrößerung gezeigt.

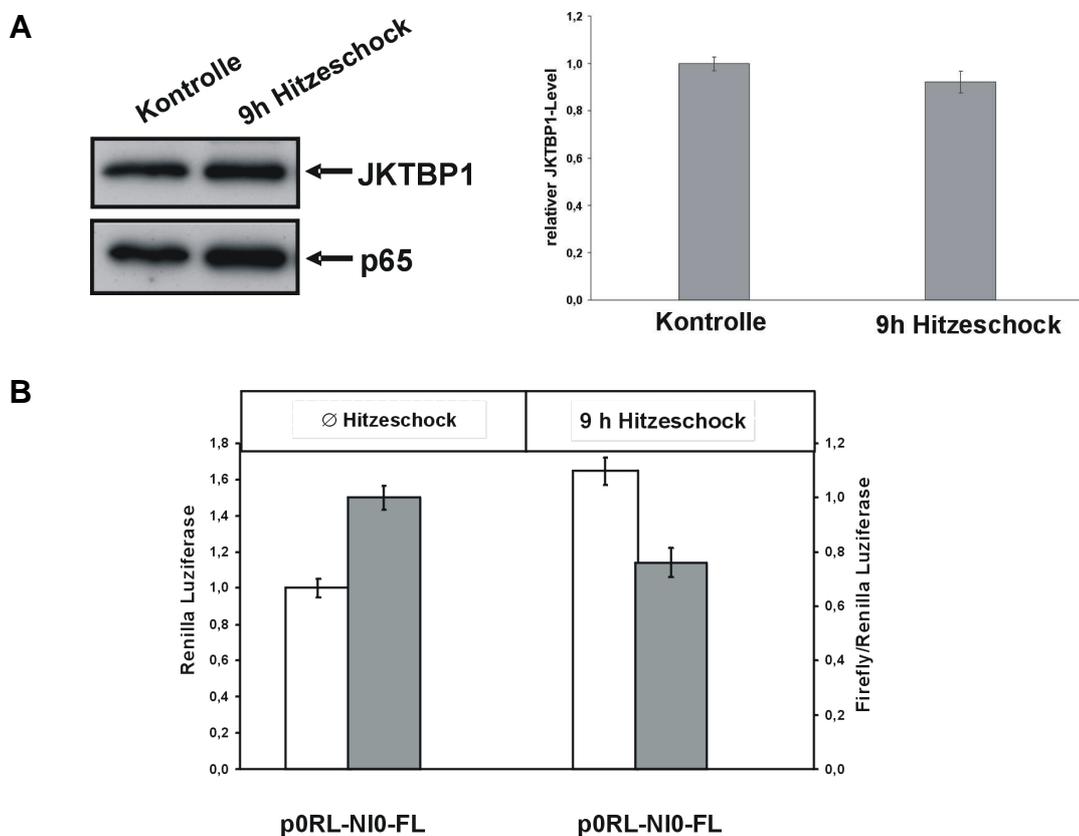
**B:** HeLa B-Zellen wurden ausgesät und nach zwei Tagen für verschiedene Zeiten mit IL-1 stimuliert (4.2.4.4). Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate in Kern- und Cytosolextrakte fraktioniert (4.2.4.5.1). Die beiden Extrakte wurden im Western Blot (4.2.3.5) eingesetzt und die Proteine JKTBP1 (α-JKTBP1 Serum) und p65 (α-NFκBp65) detektiert. Die Proteinmengen beziehen sich auf 10<sup>5</sup> Zellen pro Spur.

Die **Abb. 2.38 A** demonstriert exemplarisch die JKTBP1-Lokalisation vor und während der IL-1 Stimulation. Die gezeigte Verteilung nach 1h IL-1-Stimulation entspricht derjenigen vor Beginn der Stimulation. Die Zellen wurden bis zu 6h mit IL-1 stimuliert. Die Lokalisation von EGFP-JKTBP1 änderte sich auch zu einem späteren Zeitpunkt nicht (Daten nicht gezeigt). Diese Daten wurden durch die Western Blot Analyse der Kern- und Cytosolextrakte bestätigt. Die **Abb. 2.38 B** zeigt, dass die JKTBP1 Menge im Kern nahezu konstant bleibt, auch der JKTBP1-Gehalt im Cytosol nimmt nicht zu. Der Antikörper-Nachweis von p65 zeigt, dass eine IL-1 Stimulation stattgefunden hat. Das Protein transloziert nach IL-1 Stimulation vom Cytosol in den Kern (Kida et al., 2005). Die Western Blot Daten belegen, dass p65 nach 2-3 h vermehrt im Kern lokalisiert ist, gleichzeitig nimmt die p65-Menge im Cytosol leicht ab. Doch anders als bei p65 wird die Lokalisation von JKTBP1 nicht von IL-1 beeinflusst. In den

hier getesteten HeLa B-Zellen wurde JKTBP1 durch IL-1-Stimulation also weder induziert, noch wurde die Lokalisation verändert.

### 2.6.2 JKTBP1-Expression und -Lokalisation nach Hitzeschock

Ein Hitzeschock ist für Zellen eine Form von Stress, die cap-abhängige Proteinsynthese wird währenddessen reduziert (Chen & London, 1995; Hussain & Ramaiah, 2007). Daher wurde angenommen, dass unter diesen Bedingungen das NRF-IRES-Element die Expression von NRF weiterhin gewährleisten könnte. Für das JKTBP1-homologe Protein hnRNP D (oder AUF1) wurde eine Veränderung der zellulären Lokalisation durch Hitzeschock gezeigt (Lariola et al., 1999).



**Abb. 2.39: Die Expression von JKTBP1 wird nicht durch Hitzeschock beeinflusst**

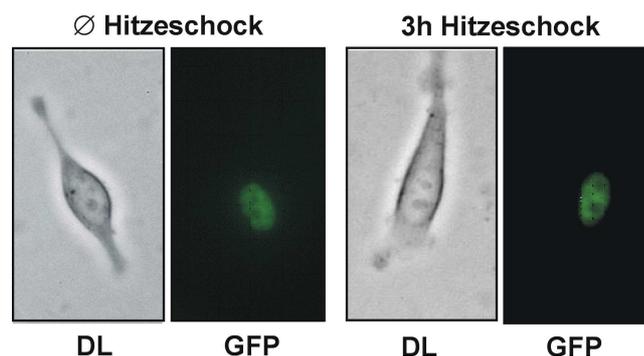
**A:** HeLa B-Zellen wurden zwei Tage nach dem Aussähen für 8 h einem Hitzeschock (4.2.4.9) ausgesetzt und anschließend lysiert (4.2.4.5.2). Die Lysate wurden im Western Blot eingesetzt (4.2.3.5) und die angezeigten Proteine mit den Antikörpern  $\alpha$ -JKTBP1 und  $\alpha$ -p65 detektiert. Drei unabhängige Experimente wurden densitometrisch ausgewertet. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

**B:** HeLa B-Zellen wurden mit 3  $\mu$ g p0RLN10FL pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.1). Die Zellen wurden einem Tag nach der Transfektion für 9 h bei 42°C, weiterhin 6 h bei 37°C inkubiert (4.2.4.9) und anschließend lysiert (4.2.4.5.3). Die Aktivitäten beider Luziferasen wurden in den Zelllysaten bestimmt (4.2.4.7). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. Die weißen Balken zeigen die Aktivität der Renilla-Luziferase, diese ist für den Reporter p0RLN10FL im unstimulierten Zustand auf 1 gesetzt worden. Die grauen Balken zeigen die IRES-

Aktivität. Auch diese wurde für p0RLNI0FL in unstimulierten Zellen gleich 1 gesetzt. Die Aktivität beider Luziferasen nimmt unter Hitzeschock leicht zu. Der Hitzeschock hat aber keinen Effekt auf die NRF-IRES-Aktivität.

Hier soll überprüft werden, ob auch JKTBP1 durch Veränderung von Expression oder Lokalisation auf einen Hitzeschock reagiert. Zur Detektion der Expression von JKTBP1 wurden die Zellen 9 h bei 42°C inkubiert (4.2.4.9). Der Hitzeschock wurde durch die Lyse der Zellen (4.2.4.5.3) beendet. Die Lysate wurden dann im Western Blot analysiert (4.2.3.5). Um die Auswirkung des Hitzeschocks auf die IRES-Aktivität zu detektieren, wurden die Zellen zwei Tage vor dem Hitzeschock mit dem Reporter p0RLNI0FL transfiziert (4.2.4.3.1). Nach 9 h Hitzeschock und weiteren 6 h bei 37°C wurden die Zellen lysiert (4.2.4.5.3) und die Luziferase-Aktivitäten (4.2.4.7) bestimmt.

Das Experiment zeigt, dass sich die Menge an endogenem JKTBP1 durch den Hitzeschock nicht verändert (**Abb.2.39 A**). Dementsprechend ist auch bei der Luziferase-Messung kein Effekt des Hitzeschocks auf die Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements zu detektieren (**Abb.2.39 B**).



**Abb. 2.40: Die Lokalisation von EGFP-JKTBP1 verändert sich nicht durch Hitzeschock**

HeLa B-Zellen wurden mit je 3µg EGFP-JKTBP1 pro Well einer 6-Well-Platte transfiziert (4.2.4.3.3). Die Zellen wurden nach zwei Tagen für 6 h einem Hitzeschock unterzogen (4.2.4.9) und während dieser Zeit im Fluoreszenzmikroskop (4.2.4.10) beobachtet. Für zwei Zeitpunkte sind Durchlicht- (DL) und Fluoreszenzaufnahme (GFP) in 400-facher Vergrößerung gezeigt.

Zur Beobachtung der Lokalisation wurden die Zellen mit pEGFP-JKTBP1 transfiziert (4.2.4.3.1) und zwei Tage nach der Transfektion für verschiedene Zeiten einem Hitzeschock ausgesetzt (4.2.4.9). Für insgesamt 6 h wurde die Lokalisation von EGFP-JKTBP1 verfolgt. Die Fluoreszenzaufnahmen zeigen die ausgeprägte Kernlokalisierung von JKTBP1, der Anteil an cytosol-ständigem EGFP-JKTBP1 konnte hier nicht detektiert werden (**Abb. 2.40**). Die Verteilung von EGFP-JKTBP1 verändert sich über den untersuchten Zeitraum von 6 h nicht und ist demnach nicht Hitzeschock-abhängig. Somit hat auch die Stimulation von HeLa B-Zellen durch einen Hitzeschock keinen Effekt auf die Expression und Lokalisation von JKTBP1.

### 3. Diskussion

Hauptziele dieser Arbeit waren die Charakterisierung von regulatorischen Motiven in den untranslatierten Regionen von NRF und die Untersuchung des Beitrags dieser Motive zur Translationsregulation. Im Gegensatz zum Ergebnisteil (2.) werden die Daten hier nicht methodisch, sondern inhaltlich zusammengefasst, und die regulatorischen Motive unter Einbezug der *in vitro* und *in vivo* Ergebnisse diskutiert.

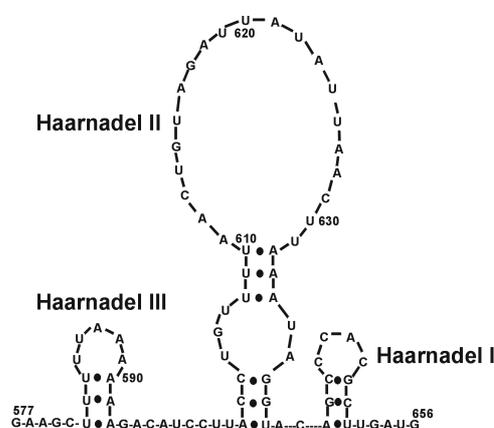
Zu Beginn wird die Struktur des minimalen NRF-IRES-Elements beschrieben (3.1.1). Einzelne Motive aus dem minimalen IRES-Element werden darauf aufbauend betrachtet (3.1.2, 3.1.3). Anschließend werden die Motive im Kontext der gesamten NRF 5'UTR diskutiert (3.1.4, 3.1.5). Neben dem Beitrag der Haarnadelstrukturen I und II zur IRES-Aktivität wird jeweils der Einfluss von JKTBP1 auf diese Elemente erläutert. Auf die gleiche Weise werden ein regulatorisches Motiv in der 3'UTR von NRF sowie die Wirkung von JKTBP1 auf dieses Motiv behandelt (3.2).

Die Betrachtung von JKTBP1 als ITAF und als ARE-bindendes Protein erfolgt dann im Abschnitt 3.3. Nach der Diskussion der physiologischen Bedeutung von JKTBP1 (3.4) wird eine mögliche Zirkularisierung der NRF-mRNA, die über die untranslatierten Regionen und JKTBP1 vermittelt wird, betrachtet (3.5).

### 3.1 Die regulatorischen Motive in der 5'UTR von NRF

#### 3.1.1 Die Struktur motive im minimalen IRES-Element

Die NRF 5'UTR fungiert als IRES-Element. Dabei bilden die 153 b am 3'Ende ein minimales IRES-Element (Oumard, 2002; Reboll et al., 2007). Die Struktur der gesamten NRF 5'UTR und des minimalen IRES-Elements wurden mit dem Programm MFOLD vorhergesagt (5.3.1). MFOLD berechnet die RNA-Struktur anhand von thermodynamischen Algorithmen. Die stabilste Struktur – diejenige mit der minimalen freien Energie - wird als wahrscheinlichste Struktur angenommen (Zucker, 2003). Die stabilsten Strukturen für die gesamte 5'UTR und für das minimale IRES-Element enthalten zwei Haarnadelstrukturen 5' vom Startcodon. Die Vorhersage des minimalen NRF-IRES-Elements wurde in Abschnitt 2.1.2 durch eine enzymatische RNA-Strukturanalyse modifiziert. Das Ergebnis (Abb. 2.2) zeigt die Ausbildung von drei Haarnadelstrukturen im Bereich 577-653 der NRF 5'UTR. Haarnadel I wurde ebenfalls von MFOLD vorhergesagt, während bei Haarnadel II nicht alle Basenpaarungen bestätigt werden konnten.



**Abb. 3.1: Die Struktur des minimalen NRF-IRES-Elements**

Haarnadel III existiert nicht in der MFOLD-Vorhersage. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden folglich nur die Haarnadelstrukturen I und II weiter untersucht. Auch bei anderen IRES-Elementen wie dem minimalen XIAP-IRES konnte die Kombination aus einer großen Haarnadel, gefolgt von einer kleineren gezeigt werden (Baird et al., 2007).

Sowohl die Strukturvorhersage als auch die enzymatische Analyse hat jedoch nur eine geringe Aussagekraft. Die Vorhersage basiert auf thermodynamischen Überlegungen. Die enzymatische Analyse ist ein reines *in vitro* Experiment und stark abhängig von der Zugänglichkeit der RNase-Schnittstellen. Daher kann die hier vorgestellte Struktur (**Abb. 3.1**) lediglich als Modell dienen.

In der Zelle werden untranslatierte Regionen von vielen Proteinen gebunden, die die Struktur der gesamten RNA beeinflussen (Baird et al., 2006). Auch die Tertiärstruktur der RNA ist in der hier verwendeten Vorhersage nicht berücksichtigt. Die chemische Modifikation von RNAs *in vivo* ist bisher die einzige Möglichkeit, freie Basen in einer RNA-Struktur zu detektieren und RNA-Strukturvorhersagen durch *in vivo* Daten zu modifizieren. Solche Experimente wurden bislang nur für abundante RNAs wie rRNAs (Mathews et al., 2004) durchgeführt. Sie könnten auf IRES-Elemente übertragen werden.

#### 3.1.2 Die Funktion der Haarnadel I des minimalen IRES-Elements

Um die Bedeutung der Haarnadelstruktur I für die interne Initiation am minimalen NRF-IRES-Element zu untersuchen, wurde diese in einer Mutagenese-Reaktion verändert. Die Mutation der Sequenz (649-653: GCUU → ugca) hatte eine Veränderung der Sekundärstruktur zur Folge. Dies wurde *in vitro* durch die RNA-Strukturanalyse belegt (**Abb. 2.2, NIPst0**). Die Mutation hatte aber keinen Einfluss auf die restliche Struktur des minimalen IRES-Elements. Der Beitrag der Haarnadel I zur IRES-Aktivität wurde anschließend in bicistronischen Reporter-Experimenten bestimmt (**Abb. 2.15**): Die Mutation (NIPst0) führte zu einer starken Reduktion der IRES-Aktivität auf rund 20% der Wildtyp-Aktivität. Um zeigen zu können, dass die Abnahme der Aktivität auf die Strukturveränderung zurückzuführen ist, wurde eine kompensatorische Mutation durchgeführt (NICG0). Die Struktur der Haarnadel I wurde wiederhergestellt, allerdings mit einer anderen Sequenz als der Wildtyp. In diesem Fall war auch die vollständige Wiederherstellung der IRES-Aktivität zu beobachten. Die Haarnadelstruktur I ist demnach ein wichtiges Modul zur Vermittlung der IRES-Aktivität. Schon in anderen zellulären IRES-Elementen wurde eine stabile Haarnadel direkt vor dem Startcodon als Strukturelement identifiziert (Bonnal et al., 2003; Baird et al., 2007; Le & Maizel, 1997).

Darüber hinaus wurde untersucht, welchen Einfluss JKTBP1 auf die Haarnadelstruktur I hat und ob dies die IRES-Aktivität beeinflusst. JKTBP1 wurde am minimalen NRF-IRES-Element

aus Cytosolextrakten aufgereinigt (**Abb. 2.4**). RNA-EMSA-Experimente mit dem Fusionsprotein GST-JKTBP1 haben gezeigt, dass GST-JKTBP1 spezifisch und direkt an das minimale IRES-Element bindet (**Abb. 2.6**). *In vitro* Bindungsstudien mit der Wildtyp-Struktur und der veränderten Haarnadel I (NIPst0) wiesen keine Unterschiede in den Bindungsaffinitäten auf: JKTBP1 interagiert mit beiden RNAs in gleichem Maße. Die Haarnadelstruktur I beeinflusst demnach nicht die Bindung von JKTBP1 an das minimale NRF-IRES-Element. In weiteren RNA-EMSA-Experimenten konnte die JKTBP1-Bindungsstelle tatsächlich auf einen Bereich in der Haarnadel II eingegrenzt werden (**Abb. 2.7**).

Passend zu den *in vitro* Daten hat JKTBP1 in bicistronischen Reporter-Experimenten den gleichen Effekt auf das Wildtyp-IRES-Element (NI0) und das veränderte IRES-Element (NIPst0). In beiden Fällen steigert JKTBP1 die NRF-IRES-Aktivität dosisabhängig (**Abb. 2.18**).

Diese Daten zeigen, dass JKTBP1 keine Wirkung auf Haarnadelstruktur I hat, und umgekehrt. Beide beeinflussen die Aktivität des minimalen IRES-Elements, jedoch unabhängig voneinander. Dies konnte auch durch einen JKTBP1-Knockdown gezeigt werden: Die Restaktivität des veränderten IRES-Elements (NIPst0) von rund 20% konnte durch die Reduzierung des endogenen JKTBP1-Levels weiter auf 1% der Ausgangsaktivität gesenkt werden (**Abb. 2.23**).

In anderen zellulären IRES-Elementen führten Punktmutationen und kleinere Deletionen auch nicht zur vollständigen Inhibition der IRES-Aktivität (Stoneley et al., 1998; Jopling et al., 2004). Vielmehr scheinen einzelne Module unabhängig voneinander einen Teil der IRES-Aktivität zu vermitteln. Die Kombination der Module erzeugt die Gesamt-IRES-Aktivität (Stoneley & Willis, 2004). Auch im NRF-IRES trägt eine Kombination von mehreren Strukturelementen zur IRES-Aktivität bei. Ein Teil der Aktivität wird durch die Haarnadel I gesteuert. Ein anderer wird von der Haarnadel II vermittelt, die abhängig von JKTBP1 ist.

#### 3.1.3 Die Funktion der Haarnadel II des minimalen IRES-Elements

Neben der kleinen Haarnadel I wurde im RNA-Strukturmodell eine weitere, größere Haarnadelstruktur vorhergesagt. Diese Haarnadel II zeigt eine ausgeprägte Schlaufe. In dieser befinden sich Basen, die prinzipiell paaren könnten. Da aber die vorhergesagten Basenpaarungen (**5.3.2 A**) nicht in der enzymatischen Analyse nachzuweisen waren, wurden sie nicht in das Modell übernommen (**Abb. 2.2**).

Um den Einfluss der Haarnadelstruktur II zur gesamten IRES-Aktivität zu bestimmen, wurde dieses Strukturelement in bicistronischen Reporter-Konstrukten untersucht (**Abb. 2.16**). Die Deletion dieser Struktur (NIH0) führte zum vollständigen Verlust der IRES-Aktivität. Die Haarnadel hat demnach eine zentrale Bedeutung für die gesamte IRES-Struktur, und ist

essenziell für die Vermittlung der internen Initiation. Die Einführung von vier Punktmutationen in den offenen Bereich der Haarnadel II (625-628: UAAA → ccgg; NIMsp0) hatte laut einer Strukturvorhersage nur geringe Auswirkungen auf die gesamte IRES-Struktur (**5.3.2 D**). Dementsprechend war auch der gemessene Effekt geringer: Die Mutation führte zu einer Abnahme der IRES-Aktivität auf 45% der Wildtyp-Aktivität. Es ist jedoch nicht geklärt, ob die Änderung der Sequenz oder der Struktur für diesen Effekt verantwortlich ist. Um diese Frage zu beantworten, müsste eine weitere kompensatorische Mutation durchgeführt werden, die die ursprüngliche Struktur mit einer veränderten Sequenz wiederherstellt.

Auch bei der Haarnadel II wurde geprüft, welchen Einfluss JKTBP1 auf diese Struktur hat. Bei *in vitro* Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass JKTBP1 das minimale IRES-Element im Bereich dieser Struktur bindet (**Abb. 2.7 A**). Die Mutation dieses Strukturelements (NIMsp0) reichte aus, um die Bindung von JKTBP1 an die Haarnadel II zu inhibieren (**Abb. 2.7 B**). Da die Inhibition der Bindung zur Reduzierung der IRES-Aktivität führt, muss JKTBP1 über die Bindung an die Haarnadelstruktur II die IRES-Aktivität beeinflussen.

Die *in vivo* Daten aus Reporter-Experimenten unterstützen diese Aussage (**Abb. 2.18**). Wird die Haarnadel II im minimalen IRES-Element deletiert (NIH0), hat die Überexpression von JKTBP1 keinen Einfluss mehr auf die IRES-Aktivität. Auch bei der Mutation der Haarnadel II (NIMsp0) ist nur eine geringe Abhängigkeit der IRES-Aktivität von JKTBP1-Menge zu beobachten.

Die Mutation der Haarnadel II unterstreicht die Existenz von Modulen, die die IRES-Aktivität vermitteln (Stoneley & Willis, 2004). Trotz der Inhibition der JKTBP1-Bindung ist noch immer eine Restaktivität von 45% vorhanden. Diese wird zum einen durch die Haarnadel I verursacht. Zum anderen könnten auch weitere Bereiche wie der Stamm der Haarnadel II zur IRES-Aktivität beitragen.

#### **3.1.4 Die regulatorische Funktion der 5' UTR von NRF**

Um die Funktion der vollständigen 5'UTR von NRF bei der Translationsregulation zu untersuchen, wurde die 5'UTR in einen monocistronischen Reporter inseriert (**2.4**).

Die Expression des Firefly-Reportergens änderte sich durch die Einführung der 5'UTR nicht (**Abb. 2.25**, pT75UFL). Die Effizienz der cap-abhängigen und der IRES-abhängigen Translation war nach der DNA-Transfektion mit Reporter-Genplasmiden vergleichbar. Allerdings kann es experimentell nicht ausgeschlossen werden, dass das Reporter-Gen mit der NRF-5'UTR cap-abhängig translatiert werden kann. Eine Translation über die Cap-Struktur ist durch die stabilen Sekundärstrukturen, die das „Scannen“ der 5'UTR stark behindern, sehr unwahrscheinlich (Hellen & Sarnow, 2001). Ein cap-abhängiger Mechanismus wie „Ribosomales Shunting“ (Yueh & Schneider, 1996) könnte die Strukturen

theoretisch überwinden, ist jedoch nicht in der Lage die elf offenen Leseraster in der 5'UTR zu umgehen.

Um den Einfluss von Transkriptionseffekten bei diesen Reporter-genplasmiden abschätzen zu können, wurden die Plasmide *in vitro* transkribiert und die Reporter-RNAs FL und 5UFL in Zellen transfiziert (**Abb. 2.26**). Die Reporterexpression war in diesem Fall nur von der Translationseffizienz und der Stabilität der Reporter-RNAs abhängig. Die 5UFL-RNA zeigte eine geringere Reporter-gen-Expression als bei der DNA-Transfektion. Dennoch wurde sie effizient translatiert. Die 5'UTR von NRF fungiert also auch in monocistronischen Reporterplasmiden als IRES.

Des Weiteren wurde überprüft, ob die geringere Reporter-gen-Expression nach der RNA-Transfektion im Zusammenhang mit der Lokalisation der Reporter-RNA 5UFL in der Zelle steht. Bei der RNA-Transfektion werden intakte mRNAs in das Cytosol der Zellen gebracht und dort translatiert. Für das c-myc-IRES wurde eine sehr geringe IRES-Aktivität nach RNA-Transfektion gezeigt (Stoneley et al., 2000). Daher scheinen mRNAs, die ein IRES-Element enthalten, einen Kernaufenthalt zu benötigen (Vagner et al., 2001). Im Kern werden die notwendigen ITAFs an die RNA gebunden, die eine effiziente Translation im Cytosol vermitteln.

Um die Reporter-RNA vermehrt in den Zellkern zu lokalisieren, wurden Zellen mit RNA nukleofektiert. Im Vergleich zur herkömmlichen RNA-Transfektion nahm die Reporteraktivität jedoch kaum zu (**Abb. 2.27**). Die Hypothese, dass mRNAs mit IRES-Elementen einen Kernaufenthalt benötigen, konnte hier nicht bestätigt werden. Allerdings wird bei der Nukleofektion von Zellen die RNA nicht ausschließlich in den Kern gebracht. Vielmehr ist die Reporter-RNA über die ganze Zelle verteilt (Amaya Produktinformationen; [www.amaya.com](http://www.amaya.com)). Dies könnte den geringen Effekt auf die Reporter-gen-Expression erklären.

Wie bei den bicistronischen Reporter-gen-Experimenten wurde auch bei den monocistronischen Reportern der Effekt von JKTBP1 auf die Aktivität der gesamten 5'UTR untersucht. Die Daten zeigen, dass die Überexpression von JKTBP1 die Expression des Reporter-gen-Konstruktes pT75UFL um den Faktor 7 dosisabhängig steigert (**Abb. 2.28**). Es wurde jedoch auch bei der Kontrolle pT7FL ein Anstieg der Reporter-gen-Expression um den Faktor 3 in Abhängigkeit von JKTBP1 detektiert. Dieser Effekt trägt demnach auch zur Steigerung der Reporter-gen-Expression des 5UFL-Reporters bei. Die tatsächliche Aktivierung ist weniger stark ausgeprägt als die gemessene. Dass es sich bei der Aktivierung des pT7FL-Reporters um einen unspezifischen Effekt handelt, konnte durch den Knockdown von JKTBP1 gezeigt werden (**Abb. 2.32**). Die Reduktion des endogenen JKTBP1-Levels

führt beim pT75UFL-Reporter zur Abnahme der Reporter-Expression; bei der Kontrolle ist kein Effekt zu beobachten (weitere Diskussion unter **3.2.1**).

Auch für die 5'UTR von NRF konnte an dieser Stelle die Funktion als IRES-Element nachgewiesen werden. Ebenso wurde die Rolle von JKTBP1 als IRES trans-agierender Faktor bestätigt (weitere Diskussion unter **3.3**).

#### **3.1.5 Die Funktion der regulatorischen Motive in der 5'UTR von NRF**

Nach der Charakterisierung der Haarnadeln I und II als regulatorische Motive des minimalen IRES-Elements wurden diese Motive auch in der gesamten 5'UTR untersucht. Die Deletion (5UdelFL) und die Mutation (5UMspFL) der Haarnadel II bestätigen die Daten aus den bicistronischen Reporter-Experimenten (**Abb. 2.29**): Die Deletion der Haarnadel II führte zum fast vollständigen Verlust der IRES-Aktivität. Die Mutation in der Haarnadel II reduzierte, wie schon im bicistronischen Experiment, die Reporter-Expression auf 45% der Ausgangsaktivität.

Bei der Mutation der Haarnadel I (5UPstFL) ist die Reduzierung der Reporter-Expression deutlich schwächer als beim minimalen IRES-Element (**Abb. 2.29**). Versuche mit der gesamten 5'UTR in bicistronischen Reporter-Konstrukten haben gezeigt, dass auch dort der Effekt dieser Mutation ähnlich schwach ausgeprägt ist (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise wird die Haarnadel I in der vollständigen 5'UTR nicht stark genug durch die Mutation verändert. So könnte die Haarnadel I im Kontext der gesamten UTR durch Wechselwirkungen mit anderen Bereichen stabilisiert werden.

Die Haarnadelstruktur I konnte auch in der gesamten 5'UTR mit MFOLD vorhergesagt werden. Das Programm ist allerdings nicht in der Lage, Basenpaarungen zwischen Schlaufen oder Pseudoknoten zu berechnen (Zucker, 2003). Solche Interaktionen könnten jedoch die Haarnadel I zusätzlich stabilisieren. Zur Klärung dieses Widerspruchs müsste zunächst die gesamte Haarnadel I in den monocistronischen Reporterplasmiden deletiert werden. Wird dadurch die Reporter-Expression im gleichen Maße gesenkt wie bei den bicistronischen Konstrukten, spricht das für die zusätzliche Stabilisierung dieser Struktur. Weitere Mutationen müssten zeigen, wie weit die Haarnadel I verändert werden muss, um eine Reduzierung der IRES-Aktivität zu erreichen.

Neben dem Einfluss von JKTBP1 auf die Wildtyp 5'UTR wurde die Wirkung auf die einzelnen regulatorischen Motive in der 5'UTR überprüft (**Abb. 2.29**). Die Expression der Firefly-Luziferase konnte auch nach der Mutation in der Haarnadel I (5UPstFL) durch JKTBP1 gesteigert werden. Dies entspricht den Daten aus den bicistronischen Reporterplasmiden (**Abb. 2.18**). Die Deletion der Haarnadel II (5UdelFL) führt zum fast vollständigen Verlust der Reporter-Expression. Die Überexpression von JKTBP1 hat keinen

Effekt. Allerdings ist bei der Mutation (5UMspFL) der Haarnadel II immer noch eine aktivierende Wirkung von JKTBP1 zu detektieren. JKTBP1 könnte *in vivo* stärker an die Haarnadel II binden als im *in vitro* Experiment gezeigt (**Abb. 2.7**). So könnte die Bindung von JKTBP1 durch die Mutation der Haarnadel II stark, aber nicht vollständig inhibiert werden.

Die Haarnadelstrukturen I und II wurden als wichtige Module zur Vermittlung der Aktivität des minimalen IRES-Elements identifiziert. Hier konnte nur die Bedeutung der Haarnadelstruktur II als JKTBP1-Bindungsstelle in der vollständigen 5'UTR bestätigt werden. Der Beitrag der Haarnadel I zur IRES-Aktivität wurde in diesen Experimenten nicht detektiert und muss weiter untersucht werden.

## 3.2 Die regulatorischen Motive in der 3'UTR von NRF

### 3.2.1 Die Funktion der 3' UTR von NRF

Der NFκB-reprimierende Faktor NRF wird über zwei verschiedene mRNAs (3,7 kb und 2,8 kb) translatiert (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Diese mRNAs besitzen zwei unterschiedlich lange 3'UTRs. Die 3'UTR der 2,8 kb mRNA hat eine Länge von 67 Basen, die 3'UTR der 3,7 kb mRNA eine Länge von 1007 Basen. Beide mRNAs konnten *in vivo* durch Northern Blot Experimente detektiert werden (**Abb. 2.34**).

Die zwei verschiedenen mRNAs wurden in den monocistronischen Reporterexperimenten durch die Konstrukte 5UFL und 5UFL3U repräsentiert (**Abb. 2.25**). Um den Einfluss der 1007 Basen langen 3'UTR allein zu untersuchen, wurde das Konstrukt FL3U verwendet. Die Kontrolle pT7FL und das Konstrukt 5UFL trugen statt der NRF 3'UTR die SV40 3'UTR.

Die Einführung der 3'UTR in den FL-Reporter führt zur Reduktion der Reporter-Gen-Aktivität auf rund 55% der Ausgangsaktivität. Die 3'UTR von NRF scheint folglich die Reporter-mRNA im Vergleich zur SV40 3'UTR zu destabilisieren. Ein solcher Effekt ist bei vielen 3'UTRs zu beobachten (Shaw & Kamen, 1986; Dormoy-Raclet et al., 2005). Auch der Vergleich der Reporter 5UFL und 5UFL3U (**Abb. 2.25**) zeigt, dass die Einführung der 3'UTR die Reporter-Gen-Aktivität auf rund 55% senkt.

Dass die Abnahme der Reporter-Gen-Aktivität durch die Destabilisierung der Reporter-mRNA verursacht wurde, konnte durch zwei weitere Experimente gezeigt werden: Zunächst wurden Unterschiede in der Transkription der Reporter durch RNA-Transfektionen ausgeschlossen. Das Verhältnis der Expression von FL3U-Reporter zu FL-Reporter blieb nach DNA- und RNA-Transfektion im Rahmen der Fehlerbalken unverändert (**Abb. 2.26**). Die Abweichung beim 5UFL3U-Reporter ist auf die oben diskutierte 5'UTR zurückzuführen (**3.1.4**). Der direkte Nachweis, dass die 3'UTR von NRF die mRNA destabilisiert, wurde durch Northern Blot Experimente erbracht (**Abb. 2.35**). Die 3,7 kb NRF-mRNA enthält die im Reporter-Gen-Experiment untersuchte 3'UTR. In HeLa B-Zellen ist die Menge dieser mRNA um den

Faktor 3 größer als die Menge der kürzeren 2,8 kb mRNA. Gleichzeitig ist die 3,7 kb mRNA instabiler und weist eine kürzere Halbwertszeit (70 min statt 160 min) als die 2,8 kb mRNA auf. Die Halbwertszeit von 70 min ist vergleichbar mit den Halbwertszeiten von anderen regulatorischen Proteinen wie dem Transkriptionsfaktor JunD (Li et al., 2002) oder dem Interleukin-6 (IL-6) (Nakazato et al., 1998).

Es konnte sowohl im Reporter-Gen-Experiment als auch *in vivo* gezeigt werden, dass die 1007 b lange 3'UTR von NRF destabilisierend wirkt. Dabei könnte die kürzere NRF mRNA (2,8 kb) durch ihre hohe Stabilität die basale Expression von NRF sichern, während die 3,7 kb mRNA durch die lange 3'UTR über weitere regulatorische Motive verfügt. Über die lange 3'UTR könnte die Expression von NRF besser moduliert und an veränderte zelluläre Gegebenheiten angepasst werden.

*In vitro* Bindungsstudien mit der 1007 Basen langen 3'UTR von NRF haben ergeben, dass JKTBP1 auch an diese bindet (**Abb. 2.10**). Bei der Unterteilung der 3'UTR in drei Abschnitte konnte keine Bindung an die 67 Basen lange 3'UTR nachgewiesen werden (**Abb. 2.10**, 3UTR-E RNA). JKTBP1 bindet stattdessen die längere der beiden 3'UTRs im Bereich des Klasse II AREs (**Abb. 2.11**).

Der Einfluss dieser JKTBP1-Bindung auf die 3'UTR von NRF wurde anschließend in monocistronischen Reporter-Gen-Experimenten überprüft. Bei der Überexpression von JKTBP1 konnte sowohl bei der 3'UTR (FL3U) allein als auch zusammen mit der 5'UTR (5UFL3U) eine dosisabhängige Steigerung der Reporter-Gen-Aktivität um den Faktor 3 bis 4 beobachtet werden (**Abb. 2.28**). Die Aktivierung der 3'UTR ist jedoch ähnlich ausgeprägt wie die der Kontrolle pT7FL. Durch den Knockdown von JKTBP1 konnte gezeigt werden, dass dieser Effekt unspezifisch ist (**Abb. 2.32**). Dort führt der Knockdown von JKTBP1 beim FL3U- und 5UFL3U-Konstrukt zu einer Reduktion der Reporter-Aktivität, hat aber keinen Effekt auf die Kontrolle pT7FL. JKTBP1 vermittelt also über die 3'UTR von NRF einen aktivierenden Effekt auf die Reporter-Gen-Expression.

Ein Nachteil der gezeigten JKTBP1-Überexpression (**Abb. 2.28**) ist die Verwendung von drei Vektoren gleichzeitig. Steigende Mengen an JKTBP1-Expressionsplasmid reduzieren dabei die Renilla-Expression. Diese Reaktion könnte durch die Konkurrenz der Promotoren um Transkriptionsfaktoren verursacht werden. Solche Effekte sind sowohl für eukaryontische (Conte et al., 2002) wie auch für virale Promotoren gezeigt worden (Adam et al., 1989).

Die Überexpressionsexperimente (**Abb. 2.28**, **Abb. 2.30**) haben daher nur eine begrenzte Aussagekraft bezüglich des Einflusses von JKTBP1 auf die 3'UTR. Die Ergebnisse der Knockdown-Experimente sind dagegen zuverlässiger und daher höher zu bewerten.

### 3.2.2 Die Funktion der regulatorischen Motive in der 3'UTRs von NRF

Die 3'UTR von NRF enthält ein Klasse II ARE mit dem charakteristischen Nonamer UUAUUUAUA (3256-3264 b). Es wurde gezeigt, dass JKTBP1 die 3'UTR von NRF im Bereich dieses Motivs bindet (**Abb. 2.10, Abb. 2.11**). Durch die Mutation des Nonamers konnte die Bindung von JKTBP1 jedoch nicht vollständig inhibiert werden (**Abb. 2.11**).

Dieses Experiment wurde durch die Untersuchungen in monocistronischen Reporter-Genplasmiden bestätigt (FL3UMut). Die Einführung der Mutation in die 3'UTR senkt die Aktivität der Firefly-Luziferase nur um 25% (**Abb. 2.30, Abb. 2.33**). Der Knockdown von JKTBP1 hat gezeigt, dass die Aktivität des FL3Umut-Reporters durch die Senkung des endogenen JKTBP1-Levels noch weiter zu reduzieren war (**Abb. 2.33**). Die Mutation inhibiert demnach nicht die Wirkung von JKTBP1, sie schränkt sie lediglich ein. Es müssen folglich weitere Bereiche in der Umgebung des Nonamers an der Bindung von JKTBP1 beteiligt sein. Diese müssen ebenfalls mutiert werden, um die Bindungsstelle von JKTBP1 in der 3'UTR noch weiter einzugrenzen.

Die 3'UTR bildet genau wie die 5'UTR Sekundärstrukturen aus. Somit hat die Mutation der Sequenz laut Sekundärstrukturvorhersagen eine Veränderung der Struktur zur Folge (MFOLD, Zucker, 2003; siehe Anhang **5.3.3 E**). Damit stellt sich die Frage, ob die Bindung von JKTBP1 durch die Erkennung der Sequenz oder der Struktur vermittelt wird. Zur Beantwortung dieser Fragestellung muss auch hier, nachdem die vollständige Inhibition der JKTBP1-Bindung erreicht wurde, eine kompensatorische Mutation durchgeführt werden.

Die Daten zeigen, dass die Stabilität der Reporter-RNA FL3U nur zum Teil durch JKTBP1 und das Klasse II ARE beeinflusst wird. So senkt der Knockdown von JKTBP1 die Reporteraktivität um rund 55% (**Abb. 2.33**). Die Stabilität muss demnach von weiteren Motiven in der 3'UTR abhängen. Neben vier weiteren AUUUA-Pentameren existieren UG-reiche Sequenzen, die das Nonamer flankieren. Es wurde gezeigt, dass diese Sequenzen mit CUG-bindenden Proteinen interagieren und die Funktion von AREs und damit die Stabilität der mRNA modulieren können (Moraes et al., 2006; Ueno & Sagata, 2002).

### 3.3 Die Rolle von JKTBP1 bei der Translationsregulation von NRF

#### 3.3.1 JKTBP1 als IRES trans-agierender Faktor (ITAF)

In dieser Arbeit wurde JKTBP1 als IRES trans-agierender Faktor am NRF-IRES-Element identifiziert. Zunächst wurde *in vitro* gezeigt, dass JKTBP1 spezifisch und direkt an das minimale NRF-IRES-Element bindet (**Abb. 2.6**). Anschließend konnte die Bindungsstelle auf die offene Schlaufe der Haarnadel II eingegrenzt werden (**Abb. 2.7**). Bicistronische Reporter-Gen-Experimente zeigten die IRES-aktivierende Wirkung von JKTBP1 (**Abb. 2.18**). Im Gegenzug sank die IRES-Aktivität nach dem Knockdown von JKTBP1 (**Abb. 2.22**). Die

letzten beiden Aussagen konnten in monocistronischen Reporter-Experimenten auch für die gesamte NRF 5'UTR bestätigt werden (**Abb. 2.28, Abb. 2.32**). JKTBP1 wirkt demnach als ITAF am NRF-IRES-Element und hat eine zentrale Funktion für die Vermittlung der IRES-Aktivität. Auch andere hnRNPs, wie hnRNPC1/C2 (Holcik et al., 2003) oder PTB und Unr (Mitchell et al., 2001), wurden auf diese Weise als ITAFs identifiziert. Weiterhin konnte die Spezifität von JKTBP1 eingegrenzt werden. Es hat keine Wirkung an einem viralen IRES-Element wie dem Poliovirus-IRES-Element gezeigt (**Abb. 2.20**). Damit unterscheidet sich JKTBP1 von hnRNPs wie PTB, die sowohl an zellulären wie auch viralen IRES-Elementen als ITAF fungieren (Stoneley & Willis, 2004).

Häufig binden ITAFs nicht allein an IRES-Elementen, sondern liegen in Proteinkomplexen vor (Holcik et al., 2000b, 2003). Das ist vermutlich auch beim NRF-IRES der Fall. Zwei der drei RNA-Protein-Komplexe aus zellulären Extrakten zeigen einen größeren Massenshift im RNA-EMSA als JKTBP1 allein (**Abb. 2.6 B**). Aufgrund des nativen Gels lassen sich keine genauen Aussagen zur Masse der Komplexe machen. Dennoch lässt sich festhalten, dass wahrscheinlich mehrere Proteine in den Komplexen vorliegen.

Darüber hinaus wurden die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1 untersucht. In RNA-Bindungsstudien konnte gezeigt werden, dass JKTBP1 beide RNA-bindenden Domänen (RBDs) für die Interaktion mit dem minimalen IRES-Element benötigt (**Abb. 2.8**). Diese Daten bestätigen die Experimente von Kamei und Yamada (Kamei & Yamada, 2002). Dort wurde in Filter-Bindungsexperimenten gezeigt, dass beide RBDs von JKTBP1 für die Bindung eines RNA-Oligonukleotids notwendig sind. Es müssen jedoch noch weitere Bereiche des Proteins, wie zum Beispiel der C-Terminus, an der RNA-Bindung beteiligt sein: Die Bindung an das minimale IRES-Element durch beide RBDs ist immer noch schwächer als die Bindung des vollständigen Proteins (**Abb. 2.8**).

Um zeigen zu können, dass der Einfluss von JKTBP1 durch die RNA-Bindung vermittelt wird, wurden verschiedene Deletionsmutanten in bicistronischen Reporter-Experimenten untersucht (**Abb. 2.21**). Bei der Transfektion verschiedener Expressionsplasmide war lediglich das vollständige Protein (EGFP-JKTBP1) in der Lage die IRES-Aktivität effizient zu erhöhen. Fehlten eine oder beide RNA-bindenden Domänen, war kaum eine Aktivierung zu detektieren. Interessanterweise war die Isoform JKTBP1 $\Delta$ 6 nicht in der Lage, die IRES-Aktivität zu steigern, obwohl das Protein über beide RNA-bindenden Domänen verfügt. Die fehlenden Aminosäuren im C-Terminus müssen also entscheidende Funktion bei der Vermittlung der IRES-Aktivität haben. Der fehlende Teil des C-Terminus enthält zwei YGG-Motive. Es ist jedoch unklar, welche Funktion diese Motive haben. Sie könnten an der RNA-Bindung beteiligt sein oder Interaktionen zu anderen Proteinen vermitteln. Da *in vitro* eine RNA-Bindung auch ohne diesen Teil des C-Terminus nachgewiesen werden konnte (**Abb. 2.8**), erscheint die Funktion dieser Aminosäuresequenz als Vermittler von Protein-

Protein-Interaktionen wahrscheinlicher. Das würde bedeuten, dass JKTBP1 als Adapter zwischen RNA und anderen Proteinen fungiert. Protein-Protein-Interaktionen könnten über die Aminosäuren des Exons 6 vermittelt werden.

Da JKTBP1 $\Delta$ 6 und JKTBP1 die gleiche zelluläre Verteilung aufweisen (Kawamura et al., 2002), könnte JKTBP1 $\Delta$ 6 einen Kompetitor von JKTBP1 darstellen. Beide Proteine erkennen und binden die NRF 5'UTR. Jedoch kann nur JKTBP1 als Adapterprotein bei der internen Initiation dienen. JKTBP1 $\Delta$ 6 bindet zwar die RNA, fungiert aber nicht als Adapter. Das Verhältnis von JKTBP1 zu JKTBP1 $\Delta$ 6 könnte dann die Aktivität des NRF-IRES-Elements modulieren.

Eine weitere Fragestellung ist, ob JKTBP1 sequenz- oder strukturspezifisch an RNA bindet. Hier konnte gezeigt werden, dass mehrere Punktmutationen in der Haarnadel II die Bindung von JKTBP1 inhibieren (**Abb. 2.7 B**). Eine kompensatorische Mutation, bei der die Struktur mit einer anderen Sequenz wiederhergestellt wird, könnte diese Frage für das minimale NRF-IRES-Element klären.

Durch ein SELEX-Verfahren wurde bereits für JKTBP1 eine RNA-Konsensussequenz ermittelt (Kamei & Yamada, 2002). Diese Sequenz (GGACUAGCC) ist aber nicht in der 5'UTR von NRF enthalten.

Da die Struktur von IRES-Elementen essenziell für ihre Funktion ist (Komar & Hatzoglou, 2005), könnten ITAFs Sekundärstrukturen erkennen und binden. Auch die erwähnte Konsensussequenz (Kamei & Yamada, 2002) bildet eine Haarnadelstruktur aus, bei der die Basen ACUAG ungepaart vorliegen. Eine ähnliche Haarnadel konnte zwar in der Strukturvorhersage des minimalen NRF-IRES-Elements gezeigt werden (siehe **5.3.2 D**), die experimentellen Daten haben diese aber nicht bestätigt (**Abb. 2.2**). Bisher lässt sich demnach nur festhalten, dass JKTBP1 AU-reiche Regionen in der 5'UTR und 3'UTR (siehe **3.3.2**) von NRF bindet. Es gibt keine Beweise dafür, dass diese Bindungen strukturspezifisch erfolgen.

#### 3.3.2 JKTBP1 als ARE-bindendes Protein

Neben der Bindung von JKTBP1 an das minimale NRF-IRES-Element wurde *in vitro* eine Bindung an die 3'UTR von NRF gezeigt (**Abb. 2.10**). JKTBP1 bindet die 1007 b lange 3'UTR im Bereich eines AU-reichen Nonamers (**Abb. 2.11**), das charakteristisch für Klasse II AREs ist (Chen & Shyu, 1995). Durch die Mutation des Nonamers wurde die Bindung von JKTBP1 geschwächt, jedoch nicht vollständig inhibiert (**Abb. 2.11**).

In monocistronischen Reporter-Experimenten wurde gezeigt, dass der Knockdown von JKTBP1 die Aktivität des Reportergens, das über die NRF 3'UTR verfügt, senkt (**Abb. 2.31**). Dass JKTBP1 über die 1007 b lange 3'UTR einen stabilisierenden Effekt auf die NRF-mRNA

hat, konnte schließlich in Northern Blot Experimenten gezeigt werden (**Abb. 2.35**). Die Überexpression von JKTBP1 führt dabei zu einer Stabilisierung der 3,7 kb NRF-mRNA. Die Halbwertszeit dieser mRNA-Spezies wird von rund 70 min auf ungefähr 110 min erhöht (**Abb. 2.35 B**). Die 2,8 kb mRNA, die über die 67 b lange 3'UTR verfügt, zeigt keine messbare Stabilisierung durch JKTBP1.

Wie bei der Bindung an das minimale IRES-Element wurden auch hier die RNA-Bindungseigenschaften von JKTBP1 überprüft. *In vitro* Bindungsstudien haben ergeben, dass JKTBP1 beide RNA-bindenden Domänen für die Bindung an die 3'UTR benötigt (**Abb. 2.12**).

Diese Daten zeigen, dass JKTBP1 als ARE-bindendes Protein (ARE-BP) fungiert und eine stabilisierende Wirkung auf die 3,7 kb NRF-mRNA vermittelt. Eine Bindung an regulatorische Motive in 3'UTRs wurde bereits durch die Aufreinigung von JKTBP1 am ARE von TNF $\alpha$  (Dean et al., 2002) nachgewiesen. Auch dieses AU-reiche Element enthält mehrere charakteristische Nonamere (UUAUUUAUA) (Dean et al., 2001). Hier konnte jedoch erstmalig die Auswirkung der JKTBP1-Bindung an einer 3'UTR beschrieben werden.

Die Bindung von ARE-BPs an 3'UTRs kann die Stabilisierung oder Destabilisierung der mRNA bewirken (Barreau et al., 2005). Eine RNA-stabilisierende Wirkung wurde auch für andere hnRNPs wie das Protein HuR gezeigt (Dean et al., 2001; Lal et al., 2004). Wie diese Proteine die Stabilisierung der mRNA erreichen ist unbekannt. Eine Hypothese geht davon aus, dass stabilisierende Proteine AREs maskieren und damit den Kontakt zu Komponenten des Exosoms verhindern (Garneau et al., 2007). Sie konkurrieren mit destabilisierenden Faktoren um die Bindung an ein ARE. Bei HuR konnte die Konkurrenz mit dem destabilisierenden Faktor AUF1/hnRNP D gezeigt werden (Lal et al., 2004). In dieser Arbeit wurde durch RNA-Bindungsstudien ebenfalls eine Bindung von AUF1/hnRNP D (p40) an die 3'UTR von NRF nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Daher wäre auch für die Proteine JKTBP1 und hnRNP D eine Konkurrenz um AU-reiche Elemente in der NRF 3'UTR möglich.

Die 3' untranslatierten Regionen bilden genau wie zelluläre IRES-Elemente Sekundärstrukturen aus. Die Strukturvorhersage der NRF 3'UTR (**5.3.3 E**) zeigt die Faltung einer Reihe von Haarnadeln. Die Mutation des Nonamers hat demnach auch in diesem Fall eine Änderung der Sekundärstruktur zur Folge (**5.3.3 F, G**). Dass Sekundärstrukturen bei der Modulation der mRNA-Stabilität eine Rolle spielen können, wurde für die IL-6 3'UTR gezeigt. Die Zerstörung einer Haarnadelstruktur führt dabei zum schnellen Abbau der IL-6 mRNA (Paschoud et al., 2006). In wie fern die Sekundärstrukturänderung die Bindung von JKTBP1 an die NRF 3'UTR beeinflusst, konnte jedoch noch nicht gezeigt werden.

### 3.3.3 Der Einfluss von JKTBP1 auf den Proteinlevel von NRF

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass JKTBP1 als IRES trans-agierender Faktor an der 5'UTR (3.3.1) und als ARE-bindendes Protein an der 3'UTR (3.3.2) von NRF wirkt. Neben dem Einfluss von JKTBP1 auf Reporter-Gen-Konstrukte wurde die Summe beider Effekte durch die Detektion des endogenen NRF-Proteinlevels bestimmt (Abb. 2.36). Die Überexpression von JKTBP1 führt dabei zu einem Anstieg des endogenen NRF-Level. Entsprechend hatte der Knockdown von JKTBP1 eine Reduzierung des NRF Proteinlevels zur Folge. Diese Daten belegen, dass JKTBP1 eine wichtige Funktion bei der Regulation der NRF-Expression erfüllt.

Es wurde bisher jedoch nicht gezeigt, dass dieser Effekt ausschließlich auf die Wirkung von JKTBP1 auf Translationsebene zurückzuführen ist. Daher musste überprüft werden, ob JKTBP1 auch einen Einfluss auf die Transkription von NRF hat.

So konnten für JKTBP1 bereits DNA-bindende Eigenschaften nachgewiesen werden: Das Protein wurde durch die Bindung an ein DNA-Element identifiziert (Tsuchiya et al., 1998). Zudem wurde eine Bindung an den CytochromC-Oxidase-Promotor (Boopathi et al., 2004) gezeigt. Um auszuschließen, dass die hier detektierten Effekte auf die NRF-Expression auf Transkriptionsebene vermittelt werden, wurde der Einfluss von JKTBP1 auf die mRNA-Level von NRF in Northern Blot Experimenten bestimmt. Die Daten zeigen, dass weder ein Knockdown, noch eine Überexpression von JKTBP1 die mRNA-Mengen von NRF beeinflussen (Abb. 2.34). JKTBP1 reguliert die Expression von NRF demnach auf der Ebene der Translation.

### 3.4 Der JKTBP1-Level in Abhängigkeit von zellulären Stimuli

NRF wird konstitutiv in vielen Geweben exprimiert (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Die Aufgabe als Genrepressor an inflammatorischen Promotoren verlangt eine möglichst konstante Expression. Diese stete Expression kann durch ein IRES-Element gewährleistet werden, da die Translation an IRES-Elementen unabhängiger von zellulären Stimuli ist als die cap-abhängige Translation (Hellen & Sarnow, 2001; Stoneley & Willis, 2004).

Bisher ist nicht bekannt, dass die Expression von NRF unter bestimmten physiologischen Zuständen gesteigert oder reduziert wird. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob sich der JKTBP1-Level in Abhängigkeit von zwei verschiedenen zellulären Stimuli ändert und wie dies die Initiation am minimalen IRES-Element beeinflusst.

Zunächst wurde überprüft, wie sich der JKTBP1-Level nach Stimulation mit IL-1 verhält. In einer Proteom-Analyse wurde gezeigt, dass JKTBP1 in primären Epithelzellen durch IL-1 stark induziert wird (Barcelo-Batllori et al., 2002). Zudem ist IL-1 ein wichtiger Stimulus für NRF: In IL-1 stimulierten Zellen wird NRF vom Repressor zum Koaktivator der IL-8 Expression (Nourbakhsh et al., 2001).

Im hier verwendeten Zellsystem konnte jedoch keine Induktion von JKTBP1 nach IL-1 Stimulation gezeigt werden. Es wurde kein Effekt auf die IRES-abhängige Translation detektiert. Der NRF-Proteinlevel blieb ebenfalls konstant (**Abb. 2.37**). Der Wechsel vom Repressor zum Koaktivator der IL-8 Expression wird demnach nicht durch einen Anstieg des NRF-Proteinlevels verstärkt.

Da JKTBP1 wie viele hnRNPs einem ständigen Kern-Cytosol-Transport unterliegt (Kawamura et al., 2002), wurde kontrolliert, ob die IL-1 Stimulation diesen Transport beeinflussen kann. Durch verstärkten Transport von JKTBP1 und NRF-mRNA vom Kern ins Cytosol, könnte die Expression von NRF ebenfalls erhöht werden. Doch auch die Lokalisation von JKTBP1 wurde durch die IL-1 Stimulation nicht beeinflusst (**Abb. 2.38**).

In den hier verwendeten HeLa B-Zellen konnte keine Abhängigkeit der JKTBP1-Expression und seiner Lokalisation von IL-1 gezeigt werden. Die Daten aus der Proteom-Analyse (Barcelo-Batllori et al., 2002) sowie die Bindung an die 3'UTR von TNF $\alpha$  (Dean et al., 2002) lassen jedoch eine regulatorische Funktion von JKTBP1 bei der Expression von Cytokinen vermuten. Der regulatorische Zusammenhang zwischen NRF, JKTBP1 und der Expression von Cytokinen müsste daher durch Experimente in primären Epithelzellen näher untersucht werden.

Des Weiteren wurde überprüft, ob ein Hitzeschock als zellulärer Stimulus die Expression von JKTBP1 beeinflusst. Bei einem Hitzeschock wird die cap-abhängige Translation durch die Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  reduziert (Chen & London, 1995; Hussain & Ramaiah, 2007). Für andere IRES-Elemente wie für das BiP-IRES wurde gezeigt, dass die IRES-Aktivität und damit die Proteinexpression durch einen Hitzeschock gesteigert wird (Kim & Jang, 2002; Cho et al., 2007). Wird der JKTBP1-Level in Relation zu anderen zellulären Proteinen durch einen Hitzeschock nicht gesenkt, könnte dies zu einer gleichbleibenden NRF-Translation führen, während die cap-abhängige Translation reduziert wird.

Hier konnte jedoch kein Effekt des Hitzeschocks auf die Expression und Lokalisation von JKTBP1 gezeigt werden (**Abb. 2.39**, **Abb. 2.40**). Nach neunstündigem Hitzeschock wurde keine Veränderung der Aktivität des minimalen NRF-IRES-Elements detektiert. Zu einem späteren Zeitpunkt (24 h Hitzeschock) wurde die Abnahme aller detektierten Proteine und der NRF-IRES-Aktivität beobachtet (persönliche Mitteilung S. Mehrrens). Folglich ist ein Hitzeschock kein Stimulus, bei dem das NRF-IRES-Element die Expression von NRF sichert. Ein zellulärer Stimulus, der über JKTBP1 die Aktivität des NRF-IRES-Elements und damit die Expression von NRF beeinflusst, konnte somit in dieser Arbeit nicht beschrieben werden.

#### 3.5 Mögliche Wechselwirkungen zwischen untranslatierten Regionen

Beide untranslatierten Regionen von NRF enthalten regulatorische Motive. Die Translation von NRF wird durch das RNA-bindende Protein JKTBP1 über diese Motive reguliert. Darüber

hinaus besteht die Möglichkeit, dass die untranslatierten Regionen miteinander interagieren. Bei der cap-abhängigen Translation wurde eine Interaktion zwischen der Cap-Struktur und dem polyA-Ende nachgewiesen. Die dadurch vermittelte Zirkularisierung der mRNA erleichtert den Wiedereinstieg der Ribosomen und erhöht die Translationseffizienz (Jacobson, 1996; Borman et al., 2000). Auch bei IRES-Elementen konnte diese Wechselwirkung zwischen der IRES-Struktur und dem polyA-Ende gezeigt werden (Thoma et al., 2004).

Dass auch ein Kontakt zwischen einem IRES-Element und der 3'UTR der mRNA erfolgen kann, wurde beim viralen HCV-IRES-Element demonstriert. Die 3'UTR erhöht dabei die Translationsrate. In diesem Fall ist der Effekt auf eine effektivere Termination der Ribosomen zurückzuführen, die dann schneller eine neue Translationsrunde beginnen können (Bradrick et al., 2006).

Bisher ist noch nicht geklärt, wie eine Wechselwirkung zwischen der 5' und 3'UTR vermittelt werden kann. Allerdings sind hnRNPs aufgrund ihrer RNA-bindenden Eigenschaften und durch mögliche Protein-Protein-Wechselwirkungen untereinander potentielle Vermittler dieser Interaktion (Martinez-Salas et al., 2001).

Daher wurde hier die Funktion von JKTBP1 als potenzielle „Brücke“ zwischen dem minimalen IRES-Element und der 3'UTR von NRF untersucht. Durch die Bindung von JKTBP1 an beide untranslatierten Regionen von NRF war die erste Voraussetzung zur Vermittlung der Interaktion erfüllt (**Abb. 2.7, Abb. 2.10**). Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass ein Proteinmolekül JKTBP1 nicht beide UTRs gleichzeitig binden kann. Das Protein benötigt für die RNA-Bindung beide RNA-bindenden Domänen (**Abb. 2.8, Abb. 2.12**). Eine Interaktion könnte dann nur durch eine Dimerisierung von JKTBP1-Molekülen erfolgen. Solche Protein-Protein-Wechselwirkungen konnten bereits für einige hnRNPs gezeigt werden (Kim et al., 2000). Die hnRNPs E, I, K und L bilden homomere Wechselwirkungen sowie Interaktionen untereinander aus.

In monocistronischen Reporter-Gen-Experimenten konnten beide UTRs zusammen analysiert werden. Die Translationsaktivität wurde jedoch durch die Anwesenheit beider UTRs nicht erhöht (**Abb. 2.25**). Stattdessen wurde beobachtet, dass die Wirkung von JKTBP1 auf die Translationsaktivität dieses Konstruktes (5UFL3U) allein der Wirkung an der 3'UTR entsprach (FL3U). Sobald die 3'UTR von NRF in einem Reporter-Gen-Konstrukt vorlag, wurde die Reporter-Gen-Expression stärker durch diese bestimmt (**Abb. 2.32**). In diesem Fall ist die Regulation über die 3'UTR und damit über die Stabilität dominanter. Fehlt die 3'UTR, wie bei der kürzeren 2,8 kb NRF-mRNA, wird die Translation stark durch die 5'UTR bestimmt. Diese Daten sind nicht kompatibel mit der angenommenen Zirkularisierung der NRF-mRNA. Es konnte kein synergistischer Effekt von 5' und 3'UTR nachgewiesen werden.

### 3.6 Das Modell der Translationsregulation von NRF

In dieser Arbeit wurden regulatorische Motive in der 5'UTR und 3'UTR von NRF charakterisiert. Die Translation von NRF wird sowohl über diese Motive selbst als auch über die Bindung von JKTBP1 an die regulatorischen Motive moduliert. Die bis zu diesem Zeitpunkt gewonnenen Daten sind in einem Schema über die Regulation der NRF-Translation zusammengefasst (**Abb. 3.2**).

Es existieren zwei unterschiedlich lange mRNAs von NRF, die sich durch die Länge der 3'UTRs unterscheiden (Nourbakhsh & Hauser, 1999). Im Schema ist nur die längere der beiden mRNAs gezeigt.

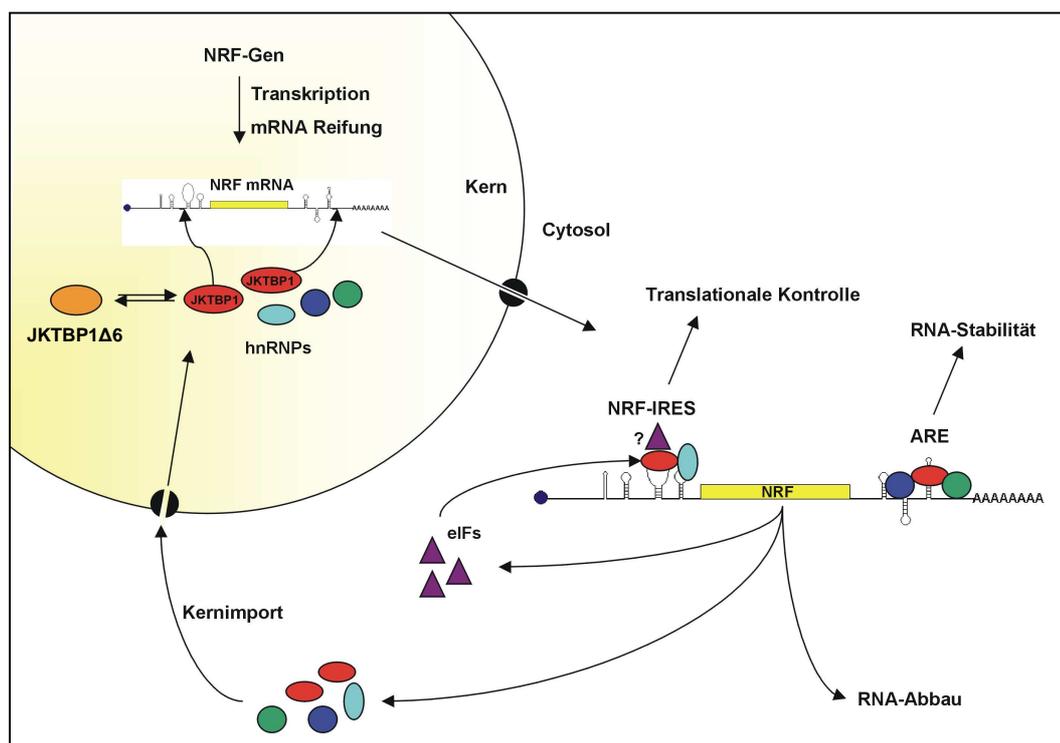
Die hnRNPs, darunter auch JKTBP1, sind hauptsächlich im Zellkern lokalisiert (Kawamura et al., 2002). Die NRF-mRNA wird vermutlich schon im Zellkern von JKTBP1 und weiteren noch unbekannt Proteinen gebunden (**Abb. 2.3**) sowie zusammen aus dem Kern ausgeschleust (Daneholt, 1997). Es ist noch unbekannt, welche Bedeutung die Isoform JKTBP1 $\Delta$ 6 bei der Translationsregulation von NRF spielt. Da das Protein keine IRES-aktivierende Wirkung aufweist (**Abb. 2.21**), müssen weitere RNA-Bindungsstudien durchgeführt werden. Ist JKTBP1 $\Delta$ 6 in der Lage, das minimale NRF-IRES-Element zu binden, kann seine Rolle als Kompetitor von JKTBP1 weiter betrachtet werden.

JKTBP1 bindet über die Haarnadel II an das minimale NRF-IRES-Element (**Abb. 2.7**). Ebenso konnte eine Bindung an das AU-reiche Element der 3'UTR im Bereich des AU-Nonamers (**Abb. 2.11**) gezeigt werden.

Im Cytosol vermittelt JKTBP1 als ITAF die IRES-abhängige Translation von NRF (**Abb. 2.18**). Dabei liegt JKTBP1 vermutlich in einem Komplex mit anderen hnRNPs und eukaryontischen Initiationsfaktoren (eIFs) vor. Welche anderen Proteine in diesem Komplex (**Abb. 2.3**) vorliegen muss noch untersucht werden. Wenn JKTBP1 als Adapter zwischen der RNA und eukaryontischen Initiationsfaktoren dient, könnten solche Protein-Protein Wechselwirkungen durch Western Blot Analysen mit käuflichen Antikörpern gegen Initiationsfaktoren wie eIF4G oder eIF2 identifiziert werden. Zudem könnten potenzielle Bindungspartner mit JKTBP1 quervernetzt und über Co-Immunopräzipitation aufgereinigt sowie anschließend identifiziert werden.

Neben seiner Rolle als ITAF fungiert JKTBP1 als ARE-bindendes Protein (**Abb. 2.28**, **Abb. 2.35**). Es stabilisiert die 3,7 kb NRF mRNA durch die Bindung an das AU-reiche Element. Ein Effekt von JKTBP1 auf die Stabilität der 2,8 kb mRNA wurde nicht detektiert.

JKTBP1 bindet bevorzugt an AU-reiche Sequenzen in der 5' und 3'UTR von NRF. Es konnte jedoch keine gemeinsame Sequenz ermittelt werden. Ebenso ist nicht klar, ob JKTBP1 gleichzeitig an die 5' und 3'UTR bindet und ob einer der Bindungsplätze bevorzugt wird. Die Frage, an welche UTR JKTBP1 bevorzugt bindet, könnte durch ein Konkurrenzexperiment im RNA-EMSA beantwortet werden.



**Abb. 3.2: Hypothetisches Modell der NRF-Translationsregulation**

Die NRF-mRNA wird im Kern von JKTBP1 gebunden und vermutlich zusammen aus dem Kern ins Cytosol gebracht. Dort wirkt JKTBP1 als ITAF und ARE-BP. Interaktionen mit eukaryontischen Initiationsfaktoren (eIFs) sind nicht bekannt. Nach dem Abbau der mRNA wird JKTBP1 über Transportin-1 (Imasaki et al., 2007) in den Kern transportiert.

Weiterhin muss gezeigt werden, inwiefern JKTBP1 diese Funktionen auch an anderen zellulären IRES-Elementen vermitteln kann. Darüber hinaus müssten andere ITAFs auf ihre Bindungseigenschaften und Funktionen an den zugehörigen 3'UTRs überprüft werden. Damit könnte bestimmt werden, ob sich hinter den hier gezeigten Daten ein generelles Prinzip der Translationsregulation verbirgt oder ob die Regulation der NRF-Translation eine Ausnahme darstellt.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Acrylamidlösung Rotiphorese Gel 30 (37,5:1)	Carl Roth GmbH & Co.
Actinomycin D	Sigma
Adenosintriphosphat (ATP)	Sigma
Agarose NEEO Ultra-Qualität Roti-Garose	Carl Roth GmbH & Co.
$\gamma$ - [ $^{32}$ P] Adenosintriphosphat (ATP) 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l	Amersham
TopVision™ LE GQ Agarose	Fermentas
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol (Tris)	Sigma
2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol-Puffer (Tris)	Carl Roth GmbH & Co.
Ammoniumpersulfat (APS)	Bio-Rad
Ampicillin	Sigma
Aqua Spüllösung DeltaSelect (Wasser)	DeltaSelect GmbH
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Sigma
CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	Sigma
Coenzym A	Fluka
Chloroform	J.T. Baker
Coomassie	Serva
Cytosintriphosphat (CTP)	Sigma
$\alpha$ - [ $^{32}$ P ]- Cytosintriphosphat (CTP) 10 $\mu$ Ci/ $\mu$ l	Amersham
Dextransulfat	Sigma
Dimethylsulfoxid	Fluka
Dithiothreitol (DTT)	Sigma
DMRIE-C Reagent	Invitrogen
DNA aus Fischsperma	Roche
trans-Epoxysuccinyl-L-Leucylamido-(4-Guanidino)-Butan (E64)	Sigma
Essigsäure	J.T.Baker
Ethanol	J.T. Baker
Ethidiumbromid 10 mg/ml	Invitrogen
Ethylendiaminotetraessigsäure (EDTA)	Merck
Ficoll	Biochrom AG
Formaldehyd	Merck

Formamid	Fluka
L-Glutamat	Gibco
Glutathion	Aldrich
Glycerin	Serva
Glycerol	Serva
Glycerol-2-phosphat	Sigma
Glycin	Carl Roth GmbH & Co.
Guanosintriphosphat (GTP)	Sigma
Harnstoff	Sigma
HCl, konzentriert (38%)	J.T. Baker
Hefeextrakt	Roth
Hefe-RNA	Roche
4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure (HEPES)	Sigma
Imidazol	Merck
Isoamylalkohol	Roth
Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma
Kanamycin	Sigma
KCl	Sigma
KOH	Merck
N-Lauroyl-Sarcosinat	Serva
Leupeptin	Sigma
Lithiumchlorid-Lösung (8 M)	Sigma
D-Luciferin	Applichem
Magermilchpulver	Sucofin
Magnesiumacetat	Fluka
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma
Methanol	J.T. Baker
2-Methylpropan-2-ol (Isobutylalkohol)	Merck
MgCl <sub>2</sub>	Sigma
(MgCO <sub>3</sub> )Mg(OH) <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	Sigma
MgSO <sub>4</sub>	Applichem
Micro-O-Protect	Roche
Mineralöl	Sigma
4-Morpholinpropansulfonsäure (MOPS)	Sigma
NaF	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Riedel de Haen
Na <sub>3</sub> VO <sub>3</sub>	Sigma

Natriumacetat (NaAc)	Merck
Natriumcitrat-dihydrat	Merck
NaCl	J.T. Baker
NaOH	Merck
Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfat, SDS)	ICN Biomedicals Inc.
Natriumpyrophosphat ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$ )	Sigma
Nonidet P40	Fluka
Okadainsäure	Alexis
Optiphase 'Hisafe'	Wallac
Mineralöl	Sigma
Pepstatin A	Sigma
Phenylethansulfonylfluorid (PMSF)	Sigma
Polyethylenglykol 8000	Sigma
2-Propanol	J.T. Baker
Ribo m <sup>7</sup> G Cap Analog	Promega
Roti <sup>®</sup> -Blot A	Carl Roth GmbH & Co.
Roti <sup>®</sup> -Blot K	Carl Roth GmbH & Co.
Roti <sup>®</sup> -Load1 4xKonzentrat (Laemmli-Auftragspuffer)	Carl Roth GmbH & Co.
N, N, N', N'-Tetra-methyl-ethylendiamin (Temed)	Bio-Rad
Thymidintriphosphat (TTP)	Sigma
Tricin	Applichem
Tris (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol)	Roth
Triton-X100	Serva
t-RNA 2 µg/µl	Sigma
Trypton/Pepton	Roth
Tween 20	Sigma
α- [ <sup>32</sup> P] Uridintriphosphat (UTP) 10 µCi/µl	Amersham
Xylencyanol FF	Sigma

#### 4.1.2 Puffer und Lösungen

Anodenpuffer	50 ml Roti <sup>®</sup> -Blot A, 350 ml H <sub>2</sub> O dest., 100 ml Methanol
Bindungspuffer A (2x) (polyA Präparation)	20 mM Tris/HCL pH 7,5, 1 M LiCl, 2 mM EDTA
Bindungspuffer B (2x) (Proteinaufreinigung)	40mM Hepes pH7,5, 300mM KCl
CaCl <sub>2</sub> -Lösung	2,5 M CaCl <sub>2</sub>

Coomassie Färbelösung	0,1% (w/v) Coomassie, 4% (v/v) Methanol, 8% (v/v) Eisessig
DNA-Auftragspuffer (6x)	0,25% (w/v) Bromphenolblau, 0,25% (w/v) Xylencyanol FF, 15% (w/v) Ficoll, 0,1 M EDTA
Elutionpuffer	50 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM Glutathion, 1 M NaCl, 5 mM DTT, 10% (v/v) Glycerol
Formamid-Auftragspuffer	80% (v/v) Formamid, 1 mg/ml Bromphenolblau, 9 mM Tris, 9 mM Borsäure, 40 mM EDTA pH 8,0
GST-Lysepuffer	1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5 mM EDTA, 3% (v/v) Triton-X100, 1,5% (v/v) N-Lauroyl-Sarcosinat, 5 mM DTT, 1 mM PMSF, 200 µg/ml Lysozym
HEBS-Puffer (HEPES-gepufferte Salzlösung), 2x	0,28 M NaCl, 0,05 M HEPES, 1,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , mit HCl pH 7,1 eingestellt
Hybridisierungslösung (Northern Blot)	90 mM NaCl, 9% (w/v) Dextransulfat, 0,9% (w/v) SDS, 0,05 mg/ml Heringssperma-DNA, 0,05% Hefe-RNA
Kathodenpuffer	50 ml Roti <sup>®</sup> -Blot K, 350 ml H <sub>2</sub> O dest., 100 ml Methanol
Ligationspuffer (10 x)	Roche
Luciferase-Messpuffer <i>Photinus Pyralis</i> (Firefly)	200 mM Tricin, 0,2 mg/ml Coenzym 10,7 mM (MgCO <sub>3</sub> )Mg(OH) <sub>2</sub> x 5 H <sub>2</sub> O, 26,7 mM MgSO <sub>4</sub> , 333 mM DTT, 5,3 mM ATP, 472 µM D-Luciferin, pH 7,8
MOPS (10x)	200 mM MOPS, 80 mM NaAc, 10 mM EDTA pH 8,0
Mutagenese Reaktionpuffer (10x)	Stratagene
NB-Puffer A	300 mM NaCl, 30 mM Natriumcitrat-dihydrat

NB-Puffer B	150 mM NaCl, 15 mM Natriumcitrat-dihydrat, 0,1% (w/v) SDS
NB-Puffer C	30 mM NaCl, 3 mM Natriumcitrat-dihydrat, 0,1% (w/v) SDS
PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung- phosphate buffered saline) (10x)	PAA Laboratories GmbH
Phenol (mit Citrat-Puffer extrahiert) pH 4,7/ Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)	AppliChem
Phenol / Chloroform/ Isoamylalkohol (25:24:1)	Roth
Proteingel-Laufpuffer	250 mM Tris, 2 M Glycin, 1% (w/v) SDS
Puffer A	10 mM Hepes pH 7,9, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aproptinin, 1 µg/ml Pepstatin, 0,5 mM PMSF
Resuspensionspuffer	150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 5mM EDTA, 1 mM PMSF
RNA-Auftragspuffer	40% (v/v) Formaldehyd, 40 µg/ml Ethidiumbromid, 120 mM MOPS, 50 mM NaAc, 6 mM EDTA pH 8,0, 30% (v/v) Stop-Puffer
RNA-Auftragspuffer (Fred Hutchinson)	1x MOPS, 6,85% (v/v) Formaldehyd ,50% (v/v) Formamid, 4% (w/v) Ficoll 400, 0,4% (w/v) Bromphenolblau, 0,4% (w/v) Xylen-Cyanol
Shift-Auftragspuffer (5x)	20% Glycerol, 0,1% (w/v) Bromphenolblau

Shift-Puffer (5x)	100 mM Hepes pH 7,9, 50 mM KCl, 5 mM CaCl <sub>2</sub> , 10 mM MgCl <sub>2</sub> , 10% (w/v) Ficoll, 2,5 mM PMSF, 2,5 mM DTT, 2,5 µg/ml Pepstatin, 2,5 µg/ml Leupeptin
Speziallysepuffer (1x)	10 mM Tris, 30 mM Na <sub>4</sub> O <sub>7</sub> P <sub>2</sub> x10H <sub>2</sub> O, 50 mM NaCl, 1 % (v/v) Triton-X 100, 2 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>3</sub> , 50 mM NaF, 20 mM Glycerolphosphat, 100 µM PMSF, 100 nM Okadainsäure, 1 µM E64, 1 µM Pepstatin, 500 µM DTT, mit HCl auf pH 7,5 eingestellt
SSC (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat-dihydrat
STE-Puffer	100 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM EDTA
Stop-Puffer	50% (v/v) Glycerol, 1mM EDTA pH 8,0, 0,4% (w/v) Bromphenolblau
Storage-Buffer	250 mM Tris/HCl pH 7,5, 20 mM EDTA, 0,1% (v/v) Tween-20, 0,02% (w/v) Natrium-Azid
Stripping Buffer	1% (w/v) SDS, 25 mM Glycin, mit HCl auf pH 2 einstellen
TAE (Tris Acetat EDTA) (50x)	2 M Tris, 0,05 % (v/v) Essigsäure, 0,05 M EDTA
TBE (Tris Borat EDTA) (10x)	90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 400 mM EDTA pH 8,0
TBS (Tris buffered saline)	100 mM Tris, 1,5 M NaCl, mit HCl auf pH 7,5
TBS-Tween	TBS, 5% (v/v) Tween 20
Tris EDTA Buffer Solution pH 8,0	Fluka
TE (Tris EDTA) (10x)	100 mM Tris, 10 mM EDTA, pH 7,4
Tris Puffer pH 7,0 - 8,0	Sigma

TSS-Puffer	10 % (w/v) PEG, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 5% (v/v) DMSO in LB Medium, pH 6,6
Waschpuffer	20 mM Hepes pH7,5, 150 mM KCl, 2 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,5 mM DTT, 0,5 mM PMSF, 5% (v/v) Glycerol, 0,1% (v/v) NP-40
Waschpuffer B (polyA RNA Präparation)	10 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM LiCl, 1mM EDTA
Zelllysepuffer A	10 mM HEPES, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,3 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>3</sub> , 20 mM Glycerol-2-phosphat, 10 µM E64, 2,5 µg/ml Leupeptin, 0,3 mM PMSF, 1 µM Pepstatin, 5 mM DTT, 400 nM Okadasäure, pH 7,9
Zelllysepuffer A + Nonidet P40	(siehe oben) + 0,1 % Nonidet P40
Zelllysepuffer B	20 mM HEPES, 0,42 mM NaCl, 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> , 0,3 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>3</sub> , 20 mM Glycerol-2-phosphat, 0,2 mM EDTA, 25 % (v/v) Glycerin, 10 µM E64, 2,5 µg/ml Leupeptin, 0,3 mM PMSF, 1 µM Pepstatin, 5 mM DTT, 400 nM Okadasäure, pH 7,9

### 4.1.3 Antikörper und Enzyme

#### Antikörper

anti-JKTBP1 (rabbit)	M.Yamada, Graduate School of Integrated Science, Yokohama City Univ.
anti NFκB p65 (F-6) mouse monoclonal IgG <sub>1</sub>	Santa Cruz
anti-NRF(Peptide 25-45)-Serum (rabbit)	M. Nourbakhsh
Goat anti-rabbit, Immunglobulins/HRP	Dako Cytomation
Kaninchenserum	Eurogentec
Rabbit anti-mouse, Immunglobulins/HRP	Dako Cytomation
Strep MAB Classic-HRP conjugate	IBA
Strep MAB Classic antibody	IBA

**Restriktionsenzyme (Fermentas)**

Restriktionsenzym	Puffer	Restriktionsenzym	Puffer
<i>Ascl</i>	Puffer Tango	<i>NotI</i>	Puffer O
<i>BamHI</i>	Bam HI-Puffer	<i>PstI</i>	Puffer O
<i>BpI</i>	Puffer G	<i>PvuI</i>	Puffer R
<i>Bsp1407I</i>	Puffer Tango	<i>PvuII</i>	Puffer G
<i>ClaI</i>	EcoRI-Puffer	<i>RsaI</i>	Puffer Tango
<i>Eco31I</i>	Puffer Tango	<i>SaI</i>	Puffer O
<i>EcoRI</i>	EcoRI-Puffer	<i>ScaI</i>	Scal-Puffer
<i>HindIII</i>	Puffer R	<i>SmaI</i>	Puffer Tango
<i>MspI</i>	Puffer Tango	<i>SspI</i>	Puffer G
<i>NcoI</i>	Puffer Tango	<i>XbaI</i>	Puffer Tango
<i>NdeI</i>	Puffer R	<i>XhoI</i>	Puffer R

**Weitere Enzyme**

RQ1 DNase	Promega
Klenow Fragment	Fermentas
Lysozym	Sigma
RNase T1	Roche
RNase A	Ambion
RNase V <sub>1</sub>	Ambion
T4-DNA Ligase	Roche
T7 Polymerase	Promega/Stratagene
Taq-DNA-Polymerase + Puffer	NEB

**4.1.4 DNA- und Protein-Standards**

Smart ladder [bp]: 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3000, 2500, 2000, 1500, 1000, 800, 600, 400, 200 Eurogentec

ΦX 174 DNA/*BsuRI* [bp]: 1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 144, 118, 72 Fermentas

Precision Plus Protein™ Dual Color Standard/Unstained Biorad  
[kDa]: 250, 150, 100, 75, 50, 37, 25, 20, 15, 10

RiboRuler™ RNA Ladder High Range Fermentas  
[bp]: 6000, 4000, 3000, 2000, 1500, 1000, 500, 200

#### 4.1.5 Primer und siRNA-Oligonucleotide

##### Mutagenese-Primer

Name	Herkunft	Sequenz (5´ - 3´)
Salmut 5	MWG	GGG TAA ATA TTT TAG GGT CGA CTC TTT GGT TTT ATA GC
Salmut 3	MWG	GCT ATA AAA CCA AAG AGT CGA CCC TAA AAT ATT TAC CC
PstI5	MWG	CTT AAA TAG GTA CAG CCC ACT GCA GGG CGC GAA TTC GAG C
PstI3	MWG	GCT CGA ATT CGG GCC CTG CAG TGG GCT GTA CCT ATT TAA G
ivPST5	MWG	CTT AAA TAG GTA CAG CCC ACT GCA GTT GAT GGA AAA AAT TCT CC
ivPST3	MWG	GGA GAA TTT TTT CCA TCA ACT GCA GTG GGC TGT ACC TAT TTA AG
CG5´	MWG	CTT AAA TAG GTA CAC GCC ACC GCA GGG CGC GCC GAA TTC GAG C
CG3´	MWG	GCT CGA ATT CGG CGC GCC CTG CGG TGG CGT GTA CCT ATT TAA G
MspI5	MWG	CTG TTT TAA CTG TAG ATT ATA CCG GCT TAA ATA GGT ACA GCC C
MspI3	MWG	GGG CTG TAC CTA TTT AAG CCG GTA TAA TCT ACA GTT AAA ACA G
5´p0RLNI0FLdel	Operon	ATA AGA CGT GCT TAT TTT GAA CAG CCC ACG CTT GGG CAC G
3´p0RLNI0FLdel	Operon	CGC GCC CAA GAG TGG GCT GTT CAA AAT AAG CCA GTC TTA T
5´PinsertionT7	Operon	GCT CTG GGG TTG TAA ATA CGA CTC ACT ATA GGG AGA CCC ACC CCA GAG GC
5´PinsertionT7	Operon	GCC TCT GGG GTG GGT CTC CCT ATA GTG AGT CGT ATT TAC AAC CCC AGA GC
5´T7Pst	Eurogentec	CTT AAA TAG GTA CAG CCC ACT GCA GGG CGC GCC GAA TTC G
3´T7Pst	Eurogentec	CGA ATT CGG CGC GCC CTG CAG TGG GCT GTA CCT ATT TAA G
5´P3UmutNeu	Eurogentec	GTA ATT TTA GTG TTC ATC GCT GCA GAA CTT CTA CCA TGT G
3´P3UmutNeu	Eurogentec	CAC ATG GTA GAA GTT CTG CAG CGA TGA ACA CTA AAA TTA C
Sspmu5	Operon	GTA GAT TAT ATT AAC TTA AAT ATT GGG CGC GCC GAA TTC G
Sspmu3	Operon	CGA ATT CGG CGC GCC CAA TAT TTA AGT TAA TAT AAT CTA C

**PCR-Primer**

Name	Herkunft	Sequenz (5' - 3')
5'JKTBP1Eco31	Operon	CCA GGC GCC GAG ACC ATG GAG GAT ATG AAC GAG
3'JKTBP1Eco31	Operon	GAG ATA TCA GAG ACC GGG TAT GGC TGG TAA TTG
SalPolio	Operon	CAA TAA GTC GAC AAG CTT AAA ACA GCT CTG G
ASCPolio	Operon	CTC GAA TTC GGC GCG CCA TCC AAT TCG CTT TAT G

**Sequenzierungsprimer**

Name	Herkunft	Sequenz (5' - 3')
CMV	MWG	AAT CAA CGG GAC TTT CC
T7Seq	MWG	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG
P55	M.Nourbakhsh	GCC TTT GCA GGG CGT GCA AG
jktbp1	Operon	CCA TCA AAT TGG TTC TGG GA
seq-jktbp2	Operon	TCA GAA GTA TCC GGG CTC AAT
3'FL-Primer	Operon	TCT CTT CAT AGC CTT ATG CAG TTG C
6463	M.Nourbakhsh	GGT GTT GTG TCA ATG GCT CAG AAG CC
6539	M.Nourbakhsh	GAA TAA TTA TGT TAC TAA TTA GG
3'RESeq	Operon	CCA AAC AAG CAC CCC AAT CAT GGC C

**siRNA-Oligonukleotide**

Name	Herkunft	Sequenz (5' - 3')
siRNA-JKTBP1	Eurogentec	5`-GUG GCU AUG GCG GAU AUG AdTdT-3` 3`-dTdTCAAC CGA UAC CGC CUA UAC U-5`
siRNA-JKTBP2	Eurogentec	5`-GUU GUA GAC UGC ACA AUU AdTdT-3` 3`-dTdTCAA CAU CUG ACG UGU UAA U-5`
siRNA-JKTBP3	Eurogentec	5`-CAC AAA CUG GAU GGC AAA UdTdT-3` 3`-dTdTGUG UUU GAC CUA CCG UUU A-5`
siRNA-Scramble	Eurogentec	5`-CAA CCC UAG AUG AAU GUU UdTdT-3` 3`-dTdTGUU GGG AUC UAC UUA CAA A-5`
siRNA – neg. Control	Eurogentec	5`-GUC UGG UAA UGG UUC CUA U dTdT -3` 3`-dTdTTCAG ACC AUU ACC AAG GAU A -5`
siRNA-Renilla Luziferase	Eurogentec	5`-GUC UGG UAA UGG UUC CUA UdTdT-3` 3`-dTdTTCAG ACC AUU ACC AAG GAU A -5`

### 4.1.6 Verwendete Plasmide

#### in vitro Plasmide

pBLKS+	erhalten von M. Nourbakhsh
pBLSK+	erhalten von M. Nourbakhsh
pBLSK-T7-MIRES	hergestellt von M. Reboll
pBLKS-T7-MIRES	hergestellt von M. Reboll
pBLKS-T7Hind	erhalten von B. Ritter
pBLKS-T7antiMIRES	erhalten von B. Ritter
pBLKS-T7MIRESMspl	erhalten von D. Omnus
pBLKS-T7MIRESPstI	hergestellt von M. Reboll
pBLKS-T7-3UTR	erhalten von A. Gadzag
pBLKS-T7-3UTREco	erhalten von A. Gadzag
pBLKS-T7-3UTREcoDel	hergestellt von M. Reboll
pBLKS-T7-3UTREcoDelMut	hergestellt von M. Reboll
pBLKS-T7-3UTRDel	hergestellt von M. Reboll
pT7AsTFR	erhalten von M. Nourbakhsh

#### Expressionsplasmide

##### Expression in Eukaryonten

pcDNA3	Invitrogen
pcDNA3-JKTBP1	hergestellt von M. Reboll
pEGFP-c1	Qiagen
pEGFP-c1-JKTBP1	erhalten von M. Yamada
pEGFP-JKTBP1Δ6	erhalten von M. Yamada
pEGFP-JKTBP1 – 226-420	erhalten von M. Yamada
pEGFP-JKTBP1 – 323-420	erhalten von M. Yamada
pEXPR-IBA105	IBA
pEXPR-JKTBP1	hergestellt von M. Reboll
pNRF2722Tap	erhalten von A. Gadzag

##### Expression in Prokaryonten

pGEX-6P2	Amersham
pGEX-6P2-JKTBP1	erhalten von M. Yamada
pGEX-JKTBP1-RBD1	erhalten von M. Yamada
pGEX-JKTBP1-RBD2	erhalten von M. Yamada
pGEX-JKTBP1-RBD12Q	erhalten von M. Yamada

**Reportergenplasmide**

p0RLNI0FL	erhalten von I. Renger
p0RLNI0FLMspI	hergestellt von M. Reboll
p0RLNI0FLPst	erhalten von I. Renger
p0RLNI0FLCG	erhalten von I. Renger
p0RLNI0FLD1	erhalten von I. Renger
p0RLNH0FL	hergestellt von M. Reboll
p0RLpolioIRESFL	erhalten von I. Renger
p0RLFL	erhalten von I. Renger
pT7FL	hergestellt von M. Reboll
pT75UFL	hergestellt von M. Reboll
pT7FL3U	hergestellt von M. Reboll
pT75UFL3U	hergestellt von M. Reboll
pT75UdeIFL	erhalten von S. Klaus
pT75UPstFL	erhalten von S. Klaus
pT75UMspFL	hergestellt von M. Reboll
pT7FL3UMut	erhalten von S. Klaus

**4.1.7 Kulturmedien und Kulturagar**

Fetales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories GmbH
Luria-Bertani-Agar (LB-Agar)	Standard I – Nähragar (Merck)
Luria-Bertani-Medium (LB-Medium)	Difco™ Luria Bertani Broth (Miller Becton Dickinson & Company)
Penicillin/Streptomycin-Lösung (10.000 IU/ml Penicillin, 10.000 UG/ml Streptomycin)	Gibco
Trypsin/EDTA-Lösung	Gibco/Merk, 2,5% Trypsin, 0,01% EDTA in PBS
2x YT Medium	16% (w/v) Trypton/Pepton, 10% (w/v) Hefeextrakt, 85 mM NaCl
Zellkulturmedium	DMEM High Glucose (PAA Laboratories GmbH) mit 100 IU/ml Penicillin, 100 UG/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamat

**4.1.8 Zelllinien und Bakterienstämme**

Escherichia coli XL-1-blue	Stratagene
Escherichia coli BL21	Stratagene
Hela B.	H. Bujard, Universität Heidelberg

**4.1.9 Verbrauchsmaterialien**

Bakterienkulturschalen 92 mm	Sarstedt
Einwegküvetten	Sarstedt
Einwegpipetten 25, 10, 2 ml	Sarstedt
Filme	Kodak
Kulturflaschen 250 ml	Greiner bio-one Cellstar
Kulturschalen 94 mm, 145 mm	Greiner bio-one Cellstar
Kulturschalen, 6-Well	Nunc
Kunststoffklarsichtröhrchen 5 ml	Sarstedt, Elkay Laboratories
Kunststoffröhrchen 10 ml	Greiner
Kunststoffröhrchen 15 ml	Nunc
Kunststoffröhrchen 50 ml	Greiner
NucTrap Probe Purification Columns	Stratagene
Nylonmembran Hybond-N	Amersham
Pipettenspitzen 0,5 – 20 µl	Eppendorf epTIPS standard
Pipettenspitzen 10 – 200 µl, 100 – 1000 µl	Sarstedt
Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran	Millipore Immobilon
Reaktionsgefäße 0,5 ml	Landgraf
Reaktionsgefäße 2 ml, 1 ml	Eppendorf
S-200 HR Spin-Säule	Amersham
Skalpell	Feather
UV-Küvetten	Hellma

**4.1.10 Geräte**

Agarosegeldokumentation	BioDoc Analyze + Software (Biometra)
Bakterien Inkubator	B5050E (Heraeus)
Elektrophoresekammer	semidry elektroblotter HEP-1/HEP-3 (Panther)
Eismaschine	(Ziegler)
Filmentwickler	Optimax (Protec)
Fluoreszenzmikroskop mit Zubehör	Axiovert 200M (Zeiss)
	KameraAxioCam HRc (Zeiss)
	Software AxioVision 3.1 (Zeiss)

Geltrockner	Pherotemp 40
Hand-βZähler	LB 122 (Berthold)
Heizblock	Test Tube Thermostat TCR100 (Roth)
Kühlschrank 4°C	(Liebherr)
Kühlschrank –80°C	VIP Series (Sanyo)
Kühlzentrifugen	J2-21 (Beckman)
	6K10 (Sigma)
	RT 6000B (Sorvall)
	2K15 (Sigma)
Lumineszenzmessgerät	Lumat LB 9507 (Berthold)
Mikroskop	950405 (Olympus)
Netzgerät	EPS 301 (Amersham pharmacia biotech)
Neubauer Zählkammer	Assistent
Nukleofektionsgerät	Nukleofector I (Amaya biosystems)
Photometer	UV160A (Shimadzu)
	Elisa Reader Sunrise Remote (Tecan)
pH Meter	Lab 850 (Schott Instruments)
Pipetten 0,5-10 µl/10-100 µl/100-1000 µl	(Eppendorf Research)
Pipettierhilfe	Pipetboy (Integra Biosciences)
RNA-Gelkammer	(Biorad)
Schüttler	The Belly Dancer (Stovall)
	intelli mixer (Neolab)
	REAX top (Heildorph)
Schüttel-Inkubator GVO	Certomat H + R (B. Braun)
Szintillationsmessgerät	(Perkin)
Sterilwerkbank	Instruments Hera Safe (Heraeus)
Thermozykler	Thermocycler (Landgraf)
Tischzentrifugen	Biofuge pico (Heraeus)
	Biofuge 13 (Heraeus)
Ultraschallhomogenisator	Sonifier 250 (Branson)
UV-Tisch	(Bachhofer)
Vakuumtrockner	Speed Vac SVC 100 (Savant)
Wasserbäder	42°C(VWR), 37°C(Köttermann)
Wasserfiltrationsanlage	Milli Q <sub>UF</sub> Plus (Millipore)
Zellinkubator	CO <sub>2</sub> Auto Zero (Heraeus)

**4.1.11 Kits**

A-Plus Poly(A) Polymerase Tailing Kit	Epicentre Biotechnologies
Big Dye <sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
Cell Line Nukleofektor Kit R	Amaxa biosystems
Dynabeads Oligo(dT)	Dynal Biotech
GFX <sup>™</sup> DNA and Gel Band Purification Kit	Amersham Biosciences
GFX <sup>™</sup> Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences
KinaseMax Kit	Ambion
Plasmid dna-OLS	OMNI Life Science
Nucleobond PC 500	Macherey Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey Nagel
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Rediprime II Random Prime Labelling System	Amersham
Renilla Luciferase Assay System	Promega
RiboMAX Large Scale RNA Production System T7	Promega
Riboprobe System T7	Promega
RNase V1 Grade Nuclease Kit	Ambion
SuperSignal <sup>®</sup> West femto / pico	Pierce
Maximum Sensitivity Substrate Antibodys	
TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems	Promega

**4.1.12 Sonstiges**

pDRAW32	AcaClone software
Windows2000 professional	Microsoft
Office XP Professional	Microsoft
Abi Prism <sup>™</sup> Sequencing Analysis 3.7. und	Applied Biosystems
Abi Prism <sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer Data Collection 3.0	Applied Biosystems

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Arbeiten mit *Escherichia coli*

#### 4.2.1.1 Herstellung hitzekompetenter *E.coli*

Kompetente *E.coli* (XL1-Blue, BL21) Bakterien wurden mit der TSS-Methode hergestellt. Dazu wurden 3 ml *E.coli* über Nacht in LB bei 37°C schüttelnd inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 100 ml einer LB-Kultur angesetzt und bei 37°C und 160 rpm so lange inkubiert, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 bis 0,4 erreicht war. Nach Zentrifugation für 10 min bei 2000 x g wurden die Bakterien in 1/10 des Ausgangsvolumens 1x TSS resuspendiert. Nach 2 min Inkubation auf Eis wurde die Bakteriensuspension aliquotiert und bei –80°C eingefroren.

#### 4.2.1.2 Kultivierung von *E.coli*

*E.coli* Bakterien (XL1-Blue, BL21) wurden in Flüssigmedien (LB oder 2xYT) bei 37°C unter Schütteln angezogen. 5 ml Flüssigkulturen wurden mit einem Klon von einer Agarplatte angeimpft; mit 50 µl dieser Kultur wurde eine 200 ml Kultur angeimpft. Die Flüssigmedien und Agarplatten (LB oder 2xYT) enthielten, wenn nicht anders angegeben, 100 µg/ml Ampicillin. Auf Agarplatten ausgestrichene Bakterien wurden über Nacht bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

#### 4.2.1.3 Anlegen von Stammkulturen

Für eine langfristige Lagerung wurden 800 µl einer 200ml-Kultur mit 200 µl 100% Glycerol vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Glycerol-Stocklösung wurde bei –80°C gelagert.

#### 4.2.1.4 Transformation

Zu 200 µl kompetenter *E.coli* (XL1-Blue oder BL21) wurden, wenn nicht anders angegeben, 200 ng Plasmid-DNA (4.2.1.5-A, 4.2.1.5-B) oder die Hälfte des Ligationsansatzes (4.2.2.11) gegeben. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurde das Röhrchen im Wasserbad für 60 s auf 42°C erwärmt. Nach dem Hitzeschock wurde für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit 800 µl Medium ohne Antibiotikum versetzt. Nach 1 h Inkubation bei 37°C und 200 rpm wurden die Ansätze in Eppendorfgefäße überführt. 100 µl dieser Kultur wurden auf einer Agarplatte ausgestrichen. Um eine Konzentrierung der restlichen Bakteriensuspension zu erreichen, wurde die Bakteriensuspension 10 min bei 2000 x g zentrifugiert. Es wurden 750 µl des Überstandes abgenommen und das Pellet in der restlichen Flüssigkeit resuspendiert. Diese Suspension wurde wiederum auf einer Agarplatte ausgestrichen. Am nächsten Tag wurden einzelne Kolonien in 5 ml Flüssigmedium überführt (4.2.1.2).

### 4.2.1.5 Plasmidpräparationen

#### A. Plasmidpräparation von 5 ml Kulturen (Mini Präparation)

Für die Plasmidpräparation wurde das GFX Micro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham biosciences verwendet. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei maximaler Geschwindigkeit durchgeführt. Von einer 5 ml Flüssigkultur (4.2.1.2) wurden 1,5 ml in Eppendorfgefäße überführt. Nach 30 s Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 150 µl Solution 1 resuspendiert. Die Suspension wurde mit 150 µl Solution 2 versetzt und durch mehrmaliges Invertieren des Röhrchens gemischt. Im Anschluss wurden 300 µl Solution 3 zugegeben, wiederum durch Invertieren gemischt und 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine GFX Säule gegeben, diese wurde für 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 30 s zentrifugiert. Das Eluat wurde verworfen, es wurden 300 µl Solution 3 auf die Säule gegeben und nochmals 30 s zentrifugiert. Anschließend wurde die Säule mit 400 µl Wash Buffer gewaschen. Zur Elution wurde die Säule mit 40 µl 10 mM Tris pH 7,6 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und 1 min zentrifugiert.

#### B. Plasmidpräparation von 200 ml Kulturen (Maxi Präparation)

Die Plasmidpräparation wurde mit Hilfe des Kits Nucleobond der Firma Machery-Nagel durchgeführt. Die Bakterien einer 200 ml Kultur (4.2.1.2) wurden 20 min bei 2500 x g und Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 12 ml Puffer S1 (mit RNase A) resuspendiert. Zu der Suspension wurden 12 ml Lysepuffer S2 gegeben. Die Lösung wurde nach mehrmaligem Invertieren 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 12 ml Puffer S3 zugesetzt, die Lösung gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Lösung wurde filtriert und im Anschluss auf die NucleoBond Säule gegeben. Diese wurde zuvor mit 6 ml Puffer N2 äquilibriert.

Nach der Bindung der DNA wurde die Säule zweimal mit 16 ml Puffer N3 gewaschen. Die DNA wurde dann mit 15 ml Puffer N5 eluiert. Nach Zugabe von 11 ml 2-Propanol wurde zur Fällung der DNA 30 min bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml Ethanol gewaschen, 10 min bei 15000 x g und 4°C zentrifugiert und schließlich bei 37°C getrocknet. Es wurde in 100-300 µl 10mM Tris-HCl pH 7,0 aufgenommen.

### 4.2.1.6 Präparation von GST- Fusionsproteinen

(nach Tsuchiya et al., 1998 und Suzuki et al., 2005)

Mit einer Vorkultur (4.2.1.2) in 2xYT Medium wurde eine 100 ml Kultur im Verhältnis 1:100 angeimpft. Diese wurde bis zu einer  $OD_{600}$  von 0,8 bei 37°C inkubiert und die Proteinexpression 12 h bei 22°C mit 0,1 mM IPTG induziert. Die Bakterien wurden dann 20 min bei 2500 x g abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml Resuspensionspuffer (4.1.2)

gelöst. Die Bakterien wurden anschließend in GST-Lysepuffer (4.1.2) 15x 10 s sonifiziert und 30 min bei 12000 x g und 4°C zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 50 µl GST-Sepharose 4B über Nacht bei 4°C inkubiert. Die GST-Sepharose wurde zuvor dreimal mit dem dreifachen Volumen Resuspensionspuffer (ohne PMSF) gewaschen. Nach der Bindung der Proteine an die GST-Sepharose wurde der Überstand abgenommen und die GST-Sepharose dreimal mit 500 µl Resuspensionspuffer (ohne PMSF) gewaschen. Zu der GST-Sepharose wurde dann das gleiche Volumen Elutionspuffer (4.1.2) gegeben und das Protein über Nacht bei 4°C und 850 rpm eluiert.

## 4.2.2 Molekularbiologische Arbeiten

### 4.2.2.1 *in vitro* Transkription

#### A. *in vitro* Transkription zur Herstellung von RNA-Sonden

Mit Hilfe dieser *in vitro* Reaktion wurde aus *in vitro* Plasmiden (4.1.6) RNA hergestellt, die für Shift Experimente eingesetzt wurde. Die RNA konnte mit dieser Methode gleichzeitig radioaktiv markiert werden. Für die *in vitro* Transkription wurde das Riboprobe System-T7 Kit der Firma Promega verwendet. Der Vektor wurde zuvor durch einen Restriktionsschnitt linearisiert (4.2.2.10-A) und anschließend aufgereinigt. (4.2.2.14)

Ein typischer Ansatz:

radioaktive Markierung	„kalte“ Transkription
4 µl 5x Puffer	4 µl 5x Puffer
2 µl 100mM DTT	2 µl 100mM DTT
1 µg linearisiertes DNA-template	1 µg linearisiertes DNA-template
je 1 µl 10 mM rATP, rGTP, rCTP	je 1 µl 10 mM rATP, rGTP, rCTP, rUTP
0,5 µl 0,5 mM rUTP (1:20 aus Stamm)	
50 µCi [ $\alpha$ - <sup>32</sup> P] rUTP	
1 µl Rnasin Ribonuclease Inhibitor (40 U)	1 µl Rnasin Ribonuclease Inhibitor (40 U)
1 µl T7 RNA Polymerase (20 U)	1 µl T7 RNA Polymerase (20 U)
auf 20 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt	auf 20 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Dieser Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert und nach Zugabe von 1 U RQ1 DNase für weitere 15 min inkubiert.

**B. *in vitro* Transkription zur Herstellung größerer RNA-Mengen**

Zur Herstellung größerer Mengen RNA für eine spätere RNA-Transfektion (4.2.4.3.2) oder RNA-Strukturanalyse (4.2.2.5) wurde das RiboMAX™ Large Scale RNA Production System-T7 Kit von Promega verwendet.

Für die RNA-Transfektion wurde die RNA durch Zugabe von Ribo m<sup>7</sup>G Cap Analog zur Transkriptionsreaktion mit einer Cap-analogen Struktur versehen. Die Herstellung von RNA mit Cap-Struktur war für die RNA-Sequenzierung und RNA-Strukturanalyse (4.2.2.5) nicht notwendig. Das verwendete DNA-template wurde in beiden Fällen zuvor linearisiert (4.2.2.10-A) und anschließend aufgereinigt (4.2.2.14). Folgender Ansatz wurde verwendet:

Transkriptionsansatz mit Cap	Transkriptionsansatz ohne Cap
10 µl 5x T7 Transcription Buffer	20 µl 5x T7 Transcription Buffer
4 µg linearisiertes DNA-template	10 µg linearisiertes DNA-template
15 µl rNTPs (je 25 mM rATP, rUTP, rCTP, 6mM rGTP)	30 µl rNTPs (je 25 mM rATP, rUTP, rCTP, rGTP)
2,25 µl Ribo m <sup>7</sup> G Cap Analog (40 mM)	
5 µl Enzym Mix	10 µl Enzym Mix
auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt	auf 100 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Dieser Ansatz wurde 2,5 h bei 37°C inkubiert, und nach Zugabe von 1 U RQ1 DNase pro 1µg eingesetzter DNA für weitere 15 min inkubiert.

**4.2.2.2 Aufreinigung von *in vitro* transkribierter RNA****A. Aufreinigung von radioaktiv markierter RNA**

Radioaktiv markierte RNA (4.2.2.1-A) wurde über NucTrap Probe Purification Columns der Firma Stratagene aufgereinigt. Die Säulen wurden zunächst dreimal mit 70 µl STE-Puffer äquilibriert. Der *in vitro* Transkriptionsansatz wurde mit 50 µl STE-Puffer versetzt, auf die Säulen gegeben und mit einer Spritze hindurch gepresst. Anschließend wurde die Säule noch zweimal mit je 70 µl STE Puffer eluiert. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurde vor und nach der Aufreinigung je eine 2 µl Probe entnommen. In dieser wurde durch einen Szintillationszähler die Zahl der Zerfälle detektiert (Messprogramm 60). Die RNA-Lösungen wurden anschließend bei -80°C gelagert.

**B. Phenol/Chloroform Aufreinigung von RNA**

Die RNA-Lösung (4.2.2.1-B, 4.2.2.3) wurde mit Wasser auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt. Zu dieser Lösung wurde das gleiche Volumen eines Phenol (Citrat gesättigt, pH 4,7)/Chloroform/ Isoamylalkohol Gemisches (25:24:1) gegeben. Die Lösung wurde 1 min

gemischt und 2 min zentrifugiert (13000 rpm in der Tischzentrifuge), anschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen. Zum Überstand wurde das gleiche Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gegeben, wiederum 1 min gemischt und 2 min zentrifugiert. Der chloroformfreie Überstand wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt. Das gleiche Volumen an kaltem Isopropanol wurde zugesetzt. Die RNA wurde dann für 10 min auf Eis gefällt und für 10 min bei 13000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Danach wurde das Pellet in 50 µl Wasser aufgenommen und zum Lösen 15 min bei 65°C inkubiert. Die RNA-Lösungen wurden anschließend bei -80°C gelagert.

#### 4.2.2.3 Polyadenylierung von *in vitro* transkribierter RNA

Die RNA (4.2.2.1-B) wurde im Anschluss an die *in vitro* Transkription polyadenyliert. Dazu wurde das A-Plus™ Poly(A) Polymerase Tailing Kit von Epicentre Biotechnologies eingesetzt. Ein typischer Ansatz:

Poly(A) Ansatz
5 µl 10x Puffer
5 µl 10 mM ATP
25 µg RNA (4.2.2.1-B)
2,5 µl Poly(A)-Polymerase
auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Reaktion wurde 20 min bei 37°C inkubiert.

#### 4.2.2.4 Radioaktive 5' End- Markierung von *in vitro* transkribierter RNA

Nach der Transkription von RNA *in vitro* (4.2.2.1-B) sowie anschließender Aufreinigung (4.2.2.2-B) wurde diese am 5'Ende mit Hilfe des KinaseMax™ Kits der Firma Ambion radioaktiv markiert. Zunächst wurde die 5' Phosphatgruppe der RNA in einer alkalischen Phosphatase Reaktion abgespalten, dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

Phosphatase-Reaktion
3 µg RNA
3 µl Dephosphorylation Buffer
3 µl Calf Intestine Alkaline Phosphatase
auf 30 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Reaktion wurde 1 h bei 37°C inkubiert und mit 30 µl Phosphatase Removal Reagent (PRR) versetzt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Probe kurz abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die anschließende Kinase-Reaktion hatte folgende Zusammensetzung:

<b>Kinase-Reaktion</b>
6 µl 10x Kinase Buffer
45 µg RNA
60 µCi [ $\gamma$ -32P] ATP
3 µl T4 Polynucleotide Kinase
auf 60 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Der Ansatz wurde 1,5 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 4.2.2.5 RNA-Sequenzierung und RNA-Strukturanalyse

Die am 5´Ende radioaktiv markierte RNA (4.2.2.4) wurde zur Bestimmung der Sekundärstruktur in einer RNA-Sequenzierung sowie in einem RNase-Verdau eingesetzt. Diese Experimente wurden mit dem RNase V1 Grade Nuclease Kit von Ambion durchgeführt. Für die RNA-Sequenzierung wurde der Ansatz aus RNA und Sequencing Buffer nach dem Mischen gleichmäßig auf drei Reaktionsgefäße (1-3) verteilt. Jeder Ansatz wurde 5 min bei 50°C inkubiert, auf Raumtemperatur abgekühlt und mit T1-RNase versetzt:

<b>RNA-Sequenzierung</b>		
0,05 µg 5´radioaktiv markierte RNA		
3 µg RNA aus Hefe		
auf 27 µl mit Sequencing Buffer auffüllen		
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>T1</b>	<b>10% T1</b>
-	1 U T1 RNase	-
-	-	1 µl aus Ansatz 2

Alle Ansätze wurden dann 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und mit je 20 µl Inactivation/Precipitation Buffer versetzt. Zur Fällung wurden sie 15 min bei -20°C inkubiert und anschließend 15 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 30 µl 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Schließlich wurde es in 7 µl Acrylamide Gel Loading Buffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert.

Für die RNA-Strukturanalyse wurde die 5´radioaktiv markierte RNA (4.2.2.4) mit den RNasen V1, A1 und T1 spezifisch geschnitten. Der Reaktionsansatz wurde nach dem Mischen von RNA und Structure Buffer gleichmäßig auf vier Reaktionsgefäße (1-4) verteilt. Der folgende Ansatz wurde für den Verdau mit RNase V1 verwendet:

<b>RNA-Strukturanalyse mit RNase V1</b>			
0,5 µg 5´radioaktiv markierte RNA 4 µg RNA aus Hefe 4 µl Structure Buffer auf 36 µl mit H <sub>2</sub> O auffüllen			
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>Kontrolle</b>	<b>V1</b>	<b>10% V1</b>	<b>1% V1</b>
-	1 U RNase V1	-	-
-	-	1 µl aus Ansatz 2	-
-	-	-	1 µl aus Ansatz 3

Die weiteren Reaktionen mit RNase T1 und A1 wurden nach dem gleichen Schema pipettiert. Nach dem Aufteilen der Reaktion und der Zugabe der RNase wurden alle Reaktionsgefäße 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zu jedem der vier Ansätze wurden je 20 µl Inactivation/Precipitation Buffer gegeben und die RNA 15 min bei -20°C gefällt. Anschließend wurde 15 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 20 µl 70% Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Schließlich wurde es in 7 µl Acrylamide Gel Loading Buffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert.

Zudem wurde die 5´radioaktiv markierte RNA (4.2.2.4) einer alkalischen Hydrolyse unterzogen, um eine Leiter von RNA-Fragmenten zu erhalten. Diese diente als Marker auf den späteren Sequenziergelen. Die Reaktion mit RNA und Puffer wurde nach dem Mischen gleichmäßig auf drei Reaktionsgefäße (1-3) verteilt, kurz auf 95°C erhitzt, dann auf Eis inkubiert

<b>Alkalische Hydrolyse</b>		
0,2 µg 5´radioaktiv markierte RNA 3 µg t-RNA auf 15 µl mit 1x Alkaline Hydrolysis Buffer aufgefüllt		
<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
2 min bei 0°C	5 min bei 0°C	15 min bei 0°C
Je 10 µl Acrylamide Gel Loading Buffer zugeben		

Von allen Ansätzen – RNA-Sequenzierung, RNA-Strukturanalyse und Alkalischer Hydrolyse - wurden jeweils 3 µl über ein 6%iges Acrylamid-Sequenziergel mit 8 M Harnstoff in 1x TBE aufgetrennt. Dazu wurde der Harnstoff unter Erwärmen in TBE und Wasser gelöst, später wurde Acrylamid-Lösung zugegeben und die gesamte Lösung steril filtriert. Das Gel wurde anschließend in der Waagerechten gegossen. Nach einem Vorlauf von 2h bei 50 W wurden die Taschen des Gels mit 3 µl der RNA-Probe beladen und für 3 h bei 55 W aufgetrennt. Das Gel wurde 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und ein Röntgenfilm bei –80°C exponiert.

#### 4.2.2.6 *In vitro* Translation

Die Translation von *in vitro* transkribierter RNA (4.2.2.2-B) wurde mit dem TNT® Coupled Reticulocyte Lysate Systems Kit von Promega durchgeführt. Für diese nicht-radioaktive Anwendung wurden zwei Aminosäuremische (Ø Met und Ø Leu) zu gleichen Teilen gemischt. Die Reaktion lief in Kaninchen Retikulozyten Lysaten (RRL) ab. Der verwendete Ansatz lautete:

<b><i>In vitro</i> Translationsansatz</b>
1,5 µg RNA (4.2.2.2-B)
12,5 µl RRL
1 µ TNT Puffer
2,5 µl Aminosäuremix
0,5 µl Rnasin
auf 25 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Ansätze wurden für 2h bei 30°C inkubiert und anschließend bei -80°C gelagert.

#### 4.2.2.7 Mutagenese

Die Mutagenese-Reaktion wurde mit dem QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene durchgeführt. Der verwendete Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

<b>Mutageneseansatz</b>
5 µl 10x Mutagenese Reaktionspuffer
180-200 ng Plasmid DNA
125 ng der spezifischen 3` und 5` Primer
1 µl dNTP-Mix
1 µl Pfu Polymerase (2,5 U)
auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Mit den Proben wurde eine PCR durchgeführt, dafür wurden die Ansätze mit Mineralöl überschichtet. Folgendes Programm wurde verwendet:

Segment	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	95	30
2	20	95	30
		Annealing-Temperatur 68	60 Elongationszeit

Folgende Annealing-Temperaturen (AT) und Elongationszeiten (EZ) wurden verwendet:

Primer	AT [°C]	EZ [s]
Salmut 5 / Salmut 3	55	480
PstI5 / PstI3	60	720
ivPST5/ ivPST3	60	400
CG5' / CG3'	59	720
MspI5 / MspI3	56	400
5'p0RLNI0FIdel / 3'p0RLNI0FLdel	60	720
5'PinsertionT7/ 3'PinsertionT7	60	420
5'T7Pst / 3'T7Pst	59	720
5'P3UmutNeu / 3'P3UmutNeu	55	720
Sspmu5/ Sspmu3	55	720

Nach der PCR wurden 10 U *DpnI* zugesetzt und 1 h bei 37°C inkubiert.

#### 4.2.2.8 DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Lösung (4.2.1.5, 4.2.2.14) wurde mit Wasser 1:200, RNA-Lösungen (4.2.2.2-B, 4.2.2.18, 4.2.4.6) 1:250 verdünnt. Anschließend wurde die Extinktion der Lösung im Photometer bei 260 nm bestimmt. Zur Umrechnung in die Konzentration wurde ein Extinktionskoeffizient von  $\epsilon = 50\text{g/l cm}$  für DNA und ein Koeffizient von  $\epsilon = 40\text{g/l cm}$  für RNA verwendet ( $c = E / \epsilon d$ ).

#### 4.2.2.9 Gelextraktion

Nach der Auftrennung der Fragmente im Agarosegel (4.2.2.12) wurde die DNA im UV-Licht detektiert und ausgeschnitten. Die Fragmente wurden mit Hilfe des Gelextraktions-Kits der Firma Amersham aus dem Gel extrahiert. Alle Zentrifugationsschritte wurden bei maximaler Geschwindigkeit mit einer Tischzentrifuge durchgeführt. Zunächst wurde das Gelstück mit

10 µl Capture Buffer pro 10 µg Gel versetzt. Der Ansatz wurde gut gemischt und so lange bei 60°C inkubiert, bis die Agarose vollständig gelöst war. Nach kurzem Abzentrifugieren wurde die Lösung auf eine GFX Säule gegeben, 1 min bei Raumtemperatur inkubiert und im Anschluss 30 s zentrifugiert. Auf die Säule wurden 500 µl Wash Buffer gegeben und 30 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Die Säule wurde mit 40 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 1 min bei Raumtemperatur inkubiert. Abschließend wurde die Säule für 1 min zentrifugiert und das Eluat gegebenenfalls bei -20°C gelagert

### 4.2.2.10 Restriktionsschnitte

#### A. Präparativer Restriktionsschnitt

Wenn nicht anders angegeben, wurde folgender Ansatz verwendet:

<b>Präparativer Restriktionsschnitt</b>
5 µg Plasmid DNA 30 U Restriktionsenzym 5 µl 10x Puffer (4.1.3.2) auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Ansätze wurden 2 bis 3 h bei 37°C inkubiert. Um Plasmide zu linearisieren, wurde folgender Ansatz pipettiert und mindestens 4 h, meist aber über Nacht, bei 37°C inkubiert.:

<b>Linearisierung</b>
30 µg Plasmid DNA 40 U Restriktionsenzym 20 µl 10x Puffer (4.1.3.2) auf 200 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

#### B. Analytischer Restriktionsschnitt

Als typischer Ansatz wurde verwendet:

<b>Analytischer Restriktionsschnitt</b>
300 ng DNA 10 U Restriktionsenzym 2 µl 10x Puffer (4.1.3) auf 20 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Ansätze wurden in der Regel bei 37°C 1h inkubiert.

#### 4.2.2.11 Ligation

Bei der Ligation wurden, wenn nicht anders angegeben, insgesamt 100 ng DNA (4.2.2.10, 4.2.2.9) eingesetzt, wobei das Fragment/Vektor Verhältnis 4:1 betrug. Ein typischer Ansatz lautete:

<b>Ligationsansatz</b>
100 ng DNA
1 µl 10x Ligationpuffer
1 µl T4-DNA-Ligase (1 U)
auf 10 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Ansätze wurden 16 h bei 16°C inkubiert.

#### 4.2.2.12 Agarosegelelektrophorese von DNA

Die verwendeten Agarose-Gele hatten eine Zusammensetzung von 1, 1,2, 1,5 und 2% (w/v) Agarose in TAE. Die entsprechende Menge an Agarose wurde eingewogen und in 125 ml 1x TAE Puffer aufgeköcht. Zum Gel wurden 2,5 µl Ethidiumbromid gegeben. Die Proben (4.2.1.5, 4.2.2.10, 4.2.2.14, 4.2.2.18) wurden mit 6x-DNA Auftragspuffer (4.1.2) versetzt und, wenn nicht anders angegeben, 1 h lang eine Spannung von 80 V angelegt.

#### 4.2.2.13 Gelelektrophorese von RNA

##### 4.2.2.13.1 Native Agarosegelelektrophorese

*In vitro* transkribierte RNA (4.2.2.1-A, 4.2.2.2-B) wurde zur Analyse auf einem 1% TAE-Agarosegel aufgetrennt. Es wurde 1 µg RNA mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt und mit je 4,63 µl RNA-Auftragspuffer (4.1.2) versetzt. Die Proben wurden für 15 min bei 65°C inkubiert, anzentrifugiert und aufs Gel aufgetragen. Es wurde 1h lang eine Spannung von 80 V angelegt.

##### 4.2.2.13.2 Denaturierende Agarosegelelektrophorese

Die RNA (4.2.2.18, 4.2.4.6) wurde auf einem 1% Agarosegel (TopVision LE GQ Agarose, Fermentas) mit 6,7% Formaldehyd in 1x MOPS (4.1.2) aufgetrennt. Zuerst wurde die Agarose in Wasser aufgeköcht, dann wurden 10x MOPS und Formaldehyd zugesetzt. Die RNA-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen an RNA-Auftragspuffer (Fred Hutchinson) (4.1.2) und 0,5 µl Ethidiumbromid (0,5 µg/µl) versetzt. Die Ansätze wurden 5 min bei 90°C inkubiert, anzentrifugiert und bis zum Auftrag auf Eis belassen. Nach 10 min Gelvorlauf bei 55 V wurde für 4 h eine Spannung von 55 V angelegt.

#### 4.2.2.13.3 Denaturierendes Acrylamidgel

Zur Qualitätsanalyse von radioaktiv markierter RNA (4.2.2.2-A) wurde diese über ein 5%iges Acrylamidgel mit 8 M Harnstoff in 1x TBE aufgetrennt. Dabei wurde der Harnstoff zunächst unter Erwärmen in TBE und Wasser gelöst, später wurde Acrylamid-Lösung zugesetzt und anschließend das Gel gegossen. Ein Teil der RNA wurde mit Wasser auf 5 µl aufgefüllt und mit dem gleichen Volumen an Formamid-Auftragspuffer versetzt. Die Probe wurde 5 min bei 95°C inkubiert und nach Anzentrifugieren aufgetragen. Nach einem Gelvorlauf für 1 h bei 150 V wurde für 2 h eine Spannung von 100 V angelegt. Anschließend wurde das Gel 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und ein Röntgenfilm bei –80°C für 18 h exponiert.

#### 4.2.2.14 Phenol/Chloroform Aufreinigung von DNA

Zu einer DNA-Lösung von 200 µl (4.2.2.10-A) wurde das gleiche Volumen an Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol Gemisch (25:24:1) gegeben. Die Lösung wurde 1 min gemischt und 2 min zentrifugiert (13000 rpm in der Tischzentrifuge), anschließend wurde der wässrige Überstand abgenommen. Dieser Arbeitsschritt wurde mit 200 µl Wasser wiederholt, der wässrige Überstand wurde mit dem Überstand aus der ersten Extraktion vereinigt. Zu dieser Lösung wurde das gleiche Volumen Chloroform gegeben, wiederum wurde 1 min gemischt und 2 min zentrifugiert.

Der chloroformfreie Überstand wurde mit 1/10 des Volumens an 3 M Natriumacetat pH 5,2 versetzt. Das gleiche Volumen an kaltem Isopropanol wurde zugesetzt. Die DNA wurde für mindestens 1 h bei –20°C gefällt. Dann wurde für 30 min bei mindestens 13000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 1 ml 70% Ethanol gewaschen und 10 min bei 13000 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und in 20 µl 10 mM Tris/HCl pH 8,0 aufgenommen.

#### 4.2.2.15 Elektrophoretische Auftrennung von RNA und RNA-Proteinkomplexen (RNA-EMSA)

Für den Shift wurde ein natives 6 %iges Acrylamid Gel mit 0,5x TBE verwendet. Ein typischer Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Shift mit Zellextrakten
4 µl 5x Shift-Puffer (4.1.2)
2 µl t-RNA (2µg/µl)
25 µg Cytosolextrakt (4.2.4.5.1)
500.000 cpm RNA
auf 20 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Shift mit GST-Fusionsproteinen
4 µl 5x Shift-Puffer (4.1.2)
2 µl t-RNA (2µg/µl)
1 µg GST-Fusionsprotein (4.2.1.6)
500.000 cpm RNA
auf 20 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Nach 10 min Inkubation bei 30°C wurden die Proben jeweils mit 30 U RNase T1 (in 1x Shift-Puffer) versetzt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Bei den Kontrollen mit und ohne T1-RNase wurde statt dem Cytosolextrakt das gleiche Volumen 1x Shift-Puffer eingesetzt. Nach der Inkubation wurde zentrifugiert und 5x Shift-Auftragspuffer (4.1.2) zugesetzt. Vor dem Auftragen der Proben wurde für 2 h eine Spannung von 100 V angelegt. Nach dem Auftragen wurde die Spannung für 2,5 h auf 120 V erhöht. Anschließend wurde das Gel 1 h bei 80°C unter Vakuum getrocknet und ein Röntgenfilm bei –80°C für 18 h exponiert.

Bei einer Kompetition wurden neben der radioaktiv markierten RNA verschiedene Mengen an nicht-markierter RNA als Kompetitor zugegeben. Die nichtmarkierte RNA wurde 5 min vor der markierten RNA zugegeben. Es wurde Cytosolextrakt mit einem Proteingehalt von 15 µg oder 1 µg GST-Fusionsprotein verwendet.

Bei einem Supershift wurden die Ansätze mit verschiedenen Mengen Antikörper versetzt. Die Antikörper (4.1.3) wurden 15 min nach Beginn des T1-RNase Verdauung zugesetzt. Die Proben wurden dann weitere 20 min bei 37°C inkubiert.

#### 4.2.2.16 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung erfolgte mit dem Big Dye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems und wurde anhand der Herstellerangaben durchgeführt. Dazu wurde folgender Ansatz verwendet:

Sequenzierungs-PCR	
200 ng DNA	
1 µl 5x Sequencing Buffer	
10 pmol Primer	
6 µl RR-Mix	
auf 20 µl mit HPLC-H <sub>2</sub> O aufgefüllt	

Die Reaktion wurde mit Öl überschichtet und die PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

Segment	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	25	95	30
		Annealing-Temperatur	15
		60	240

Für die verschiedenen Primer wurden folgende Annealing-Temperaturen (AT) verwendet:

Primer	AT [°C]	Primer	AT [°C]
CMV	47	3'FL-Primer	55
T7Seq	47	6463	57
P55	50	6539	48
jktbp1	55	3'RESeq	58
seq-jktbp2	55		

Die Aufarbeitung der Probe erfolgte bei Raumtemperatur. Die Probe wurde in eine neues Reaktionsgefäß überführt und mit 80 µl HPLC-Wasser und 10 µl 10 mM Natriumacetat pH 4,6 versetzt und gemischt. Durch Zugabe von 250 µl 100% Ethanol wurde die DNA gefällt und für 15 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend abgenommen und die DNA mit 250 µl 70% Ethanol gewaschen und erneut für 15 Minuten bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die DNA bei 37°C getrocknet. Nach Zugabe von 25 µl Formamid wurde die Probe geschüttelt, anzentrifugiert und anschließend für 2 min auf 95°C erhitzt. Nach erneu tem Mischen wurde die Probe bis zur Sequenzierung auf Eis gelagert. Die Sequenzierung erfolgte mit dem Gerät *Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer* (Perkin Elmer) mit dem Programm *Abi Prism™ 310 Genetic Analyzer Data Collection Version 3.0.0*. Zur Sequenzierung wurde das Polymer POP 6 sowie die voreingestellten Standardbedingung verwendet. Die Auswertung erfolgte über das Programm *Abi Prism™ Sequenzing Analysis 3.7*.

#### 4.2.2.17 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion diente der Amplifizierung verschiedener Vektorsequenzen. Die codierende Sequenz von JKTBP1 und die Sequenz des Polio-IRES-Elements wurden amplifiziert, und jeweils in neue Vektoren inseriert. In beiden Fällen wurde folgende Reaktion pipettiert:

PCR-Ansatz
10 ng Plasmid-DNA
25 pmol 5'Primer
25 pmol 3'Primer
5 µl 10x PCR-Puffer
1,5 µl 50 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl dNTPs (je 10 mM)
2,5 U Taq-Polymerase
auf 50 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Reaktion wurde mit Öl überschichtet und die PCR mit folgendem Programm durchgeführt:

Segment	Zyklen	Temperatur [°C]	Zeit [s]
1	1	95	180
2	30	95	60
		Annealing-Temperatur 72	120
3	1	60	420

Für die beiden Primer-Sets wurden folgende Annealing-Temperaturen (AT) verwendet:

Primer	AT [°C]
5'JKTBP1Eco31/3'JKTBP1Eco31	55
SalPolio/ ASCPolio	60

#### 4.2.2.18 Klenow-Reaktion

Nach einem Restriktionsschnitt (4.2.2.10A) wurden die 3'überhängenden Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments aufgefüllt. Folgender Ansatz wurde verwendet:

Klenow-Reaktion
15 µg verdaute Plasmid-DNA
3,6 µl 10x Klenow-Puffer
1,5 µl 2 mM dNTPs
9 U Klenow-Fragment
auf 60 µl mit H <sub>2</sub> O aufgefüllt

Die Reaktion wurde 20 min bei 37°C inkubiert und anschließend 10 min bei 70°C inaktiviert.

#### 4.2.2.19 Isolierung von polyA-RNA aus Gesamt-RNA

Die Präparation von Poly(A)-RNA aus Gesamt-RNA (4.2.4.6) erfolgte mit magnetischen Dynabeads Oligo (dT)25 von Dynal Biotech. Es wurden je 75 µg Gesamt-RNA mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt und anschließend für 2 min bei 65°C inkubiert. Währenddessen wurden je 200 µl Oligo (dT)- Dynabeads mit 100 µl 2x Bindungspuffer A (4.1.2) gewaschen und dann in 100 µl 2x Bindungspuffer A aufgenommen. Nach Zugabe der RNA-Lösung wurden die Ansätze 5 min bei Raumtemperatur leicht geschüttelt. Nach der Bindung an die Beads wurden diese anschließend zweimal mit je 200 µl Waschpuffer B gewaschen. Danach wurde

der Überstand vollständig abgenommen und zur Elution der Poly(A)-RNA jeweils 15-20 µl Tris/HCl-Lösung (10 mM, pH 7,5) auf die Beads gegeben. Nach 2 min Inkubation bei 80°C wurden die Eluate abgenommen und bei -80°C gelagert. Die Beads wurden zur Regeneration in 200 µl 0,1 M NaOH aufgenommen und für 2 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden sie noch zweimal mit je 200 µl 0,1 M NaOH und dreimal mit je 200 µl Storage Buffer gewaschen. Die Beads wurden schließlich in 200 µl Storage Buffer aufgenommen und bei 4°C gelagert

### **4.2.2.20 Spezifische Detektion von endogener RNA**

#### **4.2.2.20.1 Transfer von RNA auf Nylonmembran (Northern Blot)**

Poly(A)-RNA (4.2.2.18) wurde über ein denaturierendes Agarosegel (4.2.2.13.2) aufgetrennt. Anschließend wurde das Agarosegel zweimal für 20 min und nochmals für 5 min in Wasser inkubiert und schließlich für 10 min in 10x SSC geschüttelt. Für den Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde das Gel auf eine mit 10x SSC befeuchtete Filterpapierbrücke gelegt. Auf das Gel wurden luftblasenfrei nacheinander die Nylonmembran (vorbehandelt in Wasser und 10x SSC), zwei in 10x SSC getränkte Filterpapiere und drei Windeln geschichtet. Der Blot wurde schließlich mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgte über Nacht für etwa 18 h.

Danach wurde die Membran zweimal für 10 min in Wasser gewaschen und für 30 min im Trockenschrank bei 80°C getrocknet. Danach wurde die RNA für 1 min 15 s durch UV-Strahlung dauerhaft an die Membran gebunden.

#### **4.2.2.20.2 Herstellung von radioaktiv markierten DNA-Sonden**

Die radioaktiv markierten DNA-Sonden zur Detektion der RNA wurden mit dem Rediprime Random prime labelling system von Amersham hergestellt.

Dazu wurden 25-50 ng DNA-template (4.2.2.10) mit TE-Puffer (4.1.2) auf 45 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Lösung wurde bei 95-100°C im Wasserbad für 5 min inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Die DNA-Lösung wurde dann zum Reaktionsansatz aus dem Kit gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden 50 µCi  $\alpha$ -<sup>32</sup>P dCTP zugegeben und der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zugabe von 5 µl 0,2 M EDTA stoppte die Reaktion.

Der Ansatz wurde zur Aufreinigung auf eine S-200 HR Spin-Säule von Amersham gegeben. Diese wurde anschließend 2 min bei 735g und 4°C zentrifugiert. Die Säule wurde nach der Elution verworfen. Zur Bestimmung der Markierungseffizienz wurden vor dem Auftrag auf die Säule und aus dem Eluat je eine 2 µl Probe entnommen. In diesen wurde durch eine Szintillationsmessung die Zahl der Zerfälle detektiert (Messprogramm 61). Die Sonden wurden kurzzeitig auf Eis gelagert oder längerfristig bei -20°C.

### 4.2.2.20.3 Hybridisierung und Stringenzwäsche

Die Nylon-Membran wurde kurz in Wasser geschwenkt und dann in eine Hybridisierungsröhre gerollt. Nach Zugabe der Hybridisierungslösung (4.1.2) wurde sie für mindestens 1 h bei 60°C vorhybridisiert. Die radioaktive Sonde (4.2.2. 19.2) wurde 5 min bei 95°C denaturiert, dann 5 min auf Eis inkubiert und anschließend in die Hybridisierungslösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte für 18-24 Stunden bei 60°C.

Nach dem Entfernen der Hybridisierungslösung wurde die Nylon-Membran in eine Schale überführt und 5 min in NB-Puffer A inkubiert. Anschließend wurde die Membran 15 min in NB-Puffer B gewaschen und so lange in 70°C heißem NB-Puffer C geschüttelt, bis eine IPS-Zahl von ungefähr 50 erreicht war. Schließlich wurde zur Detektion ein Röntgenfilm bei -80°C exponiert.

Um eine bereits hybridisierte Membran nochmals mit einer anderen Sonde zu hybridisieren, wurde die Membran bei 95-100°C in 0,1 % SDS für 20 Minuten gekocht und dann in 2x SSC gewaschen.

### 4.2.3 Proteinbiochemische Arbeiten

#### 4.2.3.1 Aufreinigung von RNA-bindenden Proteinen

Die RNA-Lösung aus der kalten *in vitro* Transkription (4.2.2.1-A) wurde mit Wasser auf ein Volumen von 50 µl Volumen gebracht und anschließend 2 min bei 65°C inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit dem gleichem Volumen an 2x Bindungspuffer B (4.1.2) versetzt. Die verwendeten Dynabeads oligo(dT)<sub>25</sub> (100 µl pro Ansatz) wurden zunächst zweimal mit 100 µl 1x Bindungspuffer B äquilibriert. Auf die gewaschenen Beads wurde die RNA-Lösung gegeben, sie wurden 5 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Die RNA-Lösung wurde abgenommen und Hela B. Cytosolextrakt (insgesamt 2,5 mg Protein) in 1x Bindungspuffer hinzugegeben. Dieser Ansatz wurde für 15 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Proteinbindung wurde dreimal mit Waschpuffer (4.1.2) gewaschen. Daraufhin wurde mit steigenden Konzentrationen an KCl, (0,5M, 1M, 2 M), und zum Schluss mit 10mM Tris-HCl pH 7,5 eluiert. Die KCl-Eluate wurden nach der Elution 5 min auf Eis inkubiert. Das Tris-HCl pH 7,5-Eluat wurde statt auf Eis 5 min bei 65°C inkubiert. Für jede eingesetzte RNA wurden Proben der Waschschrte I, II und III sowie die verschiedenen Eluate auf ein SDS-Polyacrylamidgel (4.2.3.3) geladen.

#### 4.2.3.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit BSA-Standardlösungen kalibriert und eine Eichgerade berechnet. Die zu messende Lösung (4.2.1.6, 4.2.4.5.1) wurde 1:100, 1:300 und 1:900 mit PBS verdünnt. Von jeder BSA-Standardlösung und jeder Probenverdünnung

wurden 100 µl in ein Loch einer 96-Well-Platte vorgelegt, 100 µl 40% Bradfordreagenz zugegeben und die Extinktion der Proben im Elisa Reader bei 595 nm gemessen. Alle Werte wurden doppelt bestimmt, der Proteingehalt der Proben durch Vergleich der Probenextinktion mit der Eichgeraden ermittelt.

#### 4.2.3.3 SDS-Gelelektrophorese

Das verwendete Gel hatte folgende Zusammensetzung:

Trenngel	Sammelgel
10% Acrylamid	4,5% Acrylamid
375 mM Tris-HCl pH 8,6	125 mM Tris-HCl pH 6,8
4,5% Glycerol	0,1% SDS
0,1% SDS	0,4% Temed
0,17% Temed	0,07% APS
0,07% APS	

Das Trenngel wurde während der Polymerisation mit Iso-Butanol überschichtet. Anschließend wurde das Iso-Butanol vollständig entfernt und das Sammelgel gegossen. Die Proben (4.2.1.7, 4.2.2.10, 4.2.2.12.6) wurden mit 4x Auftragspuffer (4.1.2) versetzt und 10 min bei 95°C inkubiert. Es wurde eine Stromstärke von 25 mA angelegt, bis die Proteine das Trenngel erreicht hatten, danach die Stromstärke auf 50 mA erhöht. Die Elektrophorese wurde nach etwa 2,5 h gestoppt.

#### 4.2.3.4 Coomassie-Färbung von Acrylamidgelen

Ein Acrylamidgel (4.2.3.3) wurde 1 h mit Coomassie-Brilliant-Blue-Lösung gefärbt und anschließend 2 h mit 10% Essigsäure entfärbt.

#### 4.2.3.5 Elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran (Western Blot) und Detektion durch Antikörper

Nach der SDS-Gelelektrophorese (4.2.3.3) wurde das Gel 5 min in Anodenpuffer äquilibriert. Die PVDF-Membran wurde in Methanol geschwenkt, 2 min mit Wasser gewaschen und dann in Anodenpuffer inkubiert. Für den Transfer wurden sechs Filterpapiere mit Kathodenpuffer getränkt und auf die Kathode der Semidry Blotkammer platziert. Darauf wurden luftblasenfrei das Gel und die PVDF-Membran sowie sechs weitere Filterpapiere, die mit Anodenpuffer getränkt wurden, gelegt. Auf dieses Blot-Sandwich wurde die Anode aufgelegt. Die Proteine wurden 1 h und 15 min bei 1 mA/cm<sup>2</sup> Fläche auf die Membran transferiert. Anschließend

wurde die PVDF-Membran dreimal 5 min in TBS-Tween und einmal 5 min in TBS gewaschen.

Für die Detektion von endogenem JKTBP1 oder NF $\kappa$ B p65 wurde die Membran 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 5% (w/v) Magermilchpulver/TBS inkubiert. Der 1:500 mit 5% (w/v) Magermilchpulver/TBS verdünnte Primärantikörper wurde auf die Membran gegeben und 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween (4.1.2) und einmaligem Waschen mit TBS (4.1.2) wurde der jeweilige Sekundärantikörper (1:2000 in 5% (w/v) Magermilchpulver/TBS) zugesetzt und wiederum 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

Die Membran wurde anschließend dreimal 5 min mit TBS-Tween und einmal 5 min mit TBS gewaschen und anschließend mit Hilfe des SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate Kits entwickelt. Zur Detektion wurde ein Röntgenfilm aufgelegt.

Zum Nachweis von endogenem NRF wurde das anti-NRF(Peptid 25-45)-Serum 1:1000 in 5% (w/v) Magermilchpulver/TBS verdünnt. Die Membran wurde 4 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C mit diesem Primärantikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-Tween (4.1.2) und einmaligem Waschen mit TBS (4.1.2) wurde der entsprechende Sekundärantikörper (1:4000 in 5% (w/v) Magermilchpulver/TBS) zugesetzt und 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Detektion erfolgte über das SuperSignal® West femto Chemoluminescent Substrate Kit.

Zur Detektion von Strep-getagtem JKTBP1 wurde die Membran nach dem Transfer 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C in 3% (w/v) BSA in PBS-0,5% (v/v) Tween inkubiert. Danach wurde die Membran 3x 5 min bei Raumtemperatur in PBS-0,1% (v/v) Tween gewaschen. Der HRP-konjugierte Antikörper strepMAB-classic-HRP wurde 1:4000 in PBS-0,1% Tween verdünnt und für 2 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Anschließend wurde die Membran zweimal für je 1 min in PBS-0,1% Tween sowie zweimal je 1 min mit PBS gewaschen. Die Membran wurde ebenfalls mit Hilfe des SuperSignal® West pico Chemoluminescent Substrate Kits entwickelt.

Für die mehrfache Verwendung der PVDF-Membranen mussten die zuvor eingesetzten Antikörper von der Membran entfernt werden. Gegebenenfalls wurde eine ausgetrocknete Membran mit 100 % Methanol für einige Sekunden aktiviert. Nach dem Waschen mit 3 x TBS-Tween und 1 x TBS wurde die Membran in Stripping-Buffer (4.1.2) 30 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut gewaschen (3 x mit TBS-T und 1 x mit TBS) und in 5% (w/v) Magermilchpulver/TBS inkubiert. Anschließend erfolgte die Inkubation mit speziellen Antikörperlösungen.

## 4.2.4 Arbeiten mit Eukaryontischen Zellen

### 4.2.4.1 Kultivierung von Zellen

Bei allen Zellkulturarbeiten wurden die benötigten Lösungen vor Arbeitsbeginn auf 37°C erwärmt. Die Zellen wurden in 250 ml Kulturflaschen in 12 ml Zellkulturmedium mit 5% FCS und bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> sowie unter Wasserdampfsättigung kultiviert. Alle drei bis fünf Tage wurden die Zellen im Verhältnis 1:8 bzw. 1:12 verdünnt. Das Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden mit 1 ml Trypsin/EDTA Lösung versetzt und nach 2 min Inkubation bei 37°C vom Boden gelöst. 9 ml frisches Zellkulturmedium mit 5% FCS wurden zugegeben und die Zellzahl der Suspension bestimmt (Neubauerzählkammer).

### 4.2.4.2 Lagerung von Zellen

Um die Zellen zu lagern, wurde die Zellsuspension 7 min bei 200 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, die Zellen in FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann auf -70°C abgekühlt und schließlich in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden die Zellen zunächst auf Eis aufgetaut. Nachdem 1 ml FCS zugesetzt worden war, wurde die Lösung mit 7 ml Zellkulturmedium (15% FCS) versetzt. Die Zellen wurden 7 min bei 200 g und Raumtemperatur abzentrifugiert und anschließend erneut in Zellkulturmedium mit 15% FCS aufgenommen und ausgesät.

### 4.2.4.3 Transfektion von HeLa B-Zellen

#### 4.2.4.3.1 Transfektion von HeLa B-Zellen mit DNA

Während der durchgeführten Arbeiten wurde DNA mit der Calciumphosphat-Methode transfiziert. Hierfür wurden am Tag vor der Transfektion Zellen in Zellkulturmedium mit 5 % FCS ausgesät. Je nach Größe der Kulturschalen wurden folgende Zellzahlen ausgesät:

Durchmesser der Kulturschale [cm]	Zellzahl
14,5	5 x 10 <sup>6</sup>
9	2 x 10 <sup>6</sup>
3,5 (6-well)	4 x 10 <sup>5</sup>

Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und Zellkulturmedium mit 10% FCS auf die Zellen gegeben. Die zu transfizierende Plasmid-DNA wurde mit einer vorgelegten 250 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt. Dazu wurde langsam das gleiche Volumen 2x

HEBS getropft. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz durch Invertieren gemischt, die Lösung in das Medium der Kulturschale getropft und 16 bis 18 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium zu Zellkulturmedium mit 10% FCS gewechselt und die Zellen einen weiteren Tag kultiviert. Zwei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert.

#### 4.2.4.3.2 Transfektion von HeLa B-Zellen mit RNA

Zur Transfektion von HeLa B. Zellen mit RNA (4.2.2.2-B) wurde das Transfektionsreagenz DMRIE-C von Invitrogen verwendet. Für die RNA-Transfektion wurden ausschließlich 6-Well-Platten verwendet (3,5 cm Durchmesser pro Well). Am Tag vor der Transfektion wurden  $4 \times 10^5$  Zellen/ Well in Zellkulturmedium mit 10% FCS und ohne Antibiotika ausgesät. Dieses wurde direkt vor der Transfektion abgenommen und die Zellen einmal mit Zellkulturmedium ohne FCS und ohne Antibiotika gewaschen. Pro Well wurde folgender Ansatz verwendet:

RNA-Transfektion
1 ml Zellkulturmedium (Ø FCS, Ø Antibiotika)
3 µl DMRIE-C
2,5 µg RNA

Der Ansatz wurde vor und nach Zugabe der RNA gut gemischt und vollständig auf die Zellen gegeben. Nach 4 h wurde das Transfektionsmedium von den Zellen abgenommen und durch 2 ml Zellkulturmedium mit 10% FCS und ohne Antibiotika ersetzt. Die Zellen wurden nach 6h oder am nächsten Tag lysiert.

#### 4.2.4.3.3 Transfektion von HeLa B-Zellen mit siRNA-Oligonukleotiden

Wie bei der Transfektion von Plasmid-DNA wurde auch für siRNA-Oligonukleotide die Calciumphosphat-Methode verwendet. HeLa B-Zellen wurden mit siRNA-Oligonukleotiden allein oder zusammen mit Plasmid-DNA transfiziert. In beiden Fällen wurden die siRNAs mit einer finalen Konzentration von 113 nM oder 150 nM eingesetzt.

Am Tag vor der Transfektion wurden  $2 \times 10^5$  Zellen pro Well einer 6-Well Platte bzw.  $1 \times 10^6$  Zellen auf einer 9-cm Kulturschale in Zellkulturmedium mit 5 % FCS ausgesät. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch das Zellkulturmedium mit 10% FCS ersetzt. Die siRNA-Oligonukleotide und gegebenenfalls die Plasmide wurden mit einer vorgelegten 250 mM  $\text{CaCl}_2$ -Lösung gemischt. Zu dieser Lösung wurde langsam das gleiche Volumen 2x HEBS getropft. Nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Ansatz durch Invertieren gemischt. Die Lösung wurde in das Medium der Kulturschale

getropft und 16 bis 18 h inkubiert. Anschließend wurde das Medium zu Zellkulturmedium mit 10% FCS gewechselt und die Zellen einen weiteren Tag kultiviert. Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion lysiert.

### **4.2.4.3.4 Nukleofektion von HeLa B-Zellen mit RNA**

HeLa B-Zellen wurden, wie in 4.2.4.1 beschrieben, kultiviert und je  $1 \times 10^6$  Zellen pro Versuchsansatz mit dem Cell Line Nukleofektor Kit R von Amaxa biosystems nukleofektiert. Eine Stunde vor der Nukleofektion wurden die Zellen in Zellkulturmedium mit 10 % FCS überführt, dann mit Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturflaschen gelöst und in einem kleinen Volumen Zellkulturmedium mit 10 % FCS aufgenommen. Die Zellen wurden 10 min bei 200g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 100  $\mu$ l Nukleofektionspuffer Solution R resuspendiert und mit der entsprechenden RNA (4.2.2.2-B) gemischt. Die Zellsuspension wurde in eine Nukleofektionsküvette (Amaxa biosystems) überführt und im Nukleofektionsgerät mit dem Programm I-13 elektroporiert. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Zellkulturmedium mit 10% FCS gegeben, in 6-Well-Platten ausgesät und 6 h nach der Nukleofektion lysiert.

### **4.2.4.4 IL-1 Stimulation von HeLa B-Zellen**

Für die Untersuchungen wurden HeLa B-Zellen mit Interleukin-1 (IL-1) stimuliert. Die Induktion erfolgte direkt vor der Lyse der Zellen. IL-1 wurde in Zellkulturmedium mit 10 % FCS mit einer finalen Konzentration von 10 ng/ml eingesetzt. Die verwendeten HeLa B-Zellen wurden während der Stimulation bei Standardbedingungen inkubiert. Die Induktion wurde durch mehrmaliges Waschen der Zellen mit PBS beendet.

### **4.2.4.5 Zellyse**

#### **4.2.4.5.1 Herstellung von Cytosol- und Kernextrakten**

Die hier aufgeführten Mengenangaben beziehen sich auf 9 cm-Kulturschalen. Zwei Tage nach der Transfektion (4.2.4.3.1) wurden die Zellen dreimal mit kaltem PBS gewaschen, von der Schale gelöst und in 6 ml kaltem PBS aufgenommen. Die Zellen wurden anschließend 5 min bei 5000 g und 4°C abzentrifugiert und in 150  $\mu$ l Zellysepuffer A resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und die Zellen in 120  $\mu$ l Zellysepuffer A mit 0,1% NP-40 resuspendiert. Nach 10 min auf Eis wurden die Lysate erneut zentrifugiert (5 min, 10000 g, 4°C) und der Überstand, die Cytosolfraktion, abgenommen und bei -20 °C gelagert. Das Pellet wurde in 40  $\mu$ l Zellysepuffer B resuspendiert und für 60 Minuten auf Eis inkubiert, wobei die Zellsuspension regelmäßig geschüttelt wurde. Nach 5 min Zentrifugation bei 10000 g und 4°C wurde der Überstand, die Kernfraktion, abgenommen und bei -20 °C gelagert.

### 4.2.4.5.2 Herstellung von Gesamtzellextrakten

Zwei Tage nach der Transfektion (4.2.4.3.1) wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in PBS abgeschabt. Die Zellen wurden bei 300 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet in 50 µl pro  $3 \cdot 10^6$  Zellen 1x Speziallysepuffer resuspendiert. Nach 15 min Inkubation bei 4°C auf dem Überkopftierer wurde 10 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert, der Überstand bei -80°C gelagert.

### 4.2.4.5.3 Zellyse für Reporterexperimente

Die Zellen wurden am zweiten Tag nach der Transfektion (4.2.4.3.1, 4.2.4.3.3) lysiert. Alle Arbeitsschritte wurden auf Eis durchgeführt. Die 6-Well-Platten wurden zweimal mit 1 ml eiskaltem PBS pro Well gewaschen. Pro Well wurden 500µl 1x Renilla Luciferase Assay Buffer (Promega Kit) auf die Zellen gegeben. Diese wurden von der Platte gelöst und in ein Eppendorfgefäß überführt. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Zellen 10 min bei 4°C und 13000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei -80°C gelagert.

### 4.2.4.6 RNA Präparation aus HeLa B-Zellen

Die Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion (4.2.4.3.1) zweimal mit PBS gewaschen, in PBS abgeschabt und 10 min bei 300 g und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml TRIzol<sup>®</sup>-Reagenz (Invitrogen) resuspendiert. Nach 5 min Inkubation im Schüttelinkubator (800 rpm) bei Raumtemperatur wurden 200 µl Chloroform zugegeben und 15 s kräftig geschüttelt. Es wurde erneut 3 min bei Raumtemperatur schüttelnd (1150 rpm) inkubiert und anschließend 15 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert.

Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl 96%iges Isopropanol zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde 10 min bei 12000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen sowie 5 min bei 7500g und 4°C zentrifugiert. Das RNA-Pellet wurde bei Raumtemperatur 5-10 min getrocknet und dann in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Zum vollständigen Lösen der RNA wurde abschließend 10 min bei 60°C inkubiert.

### 4.2.4.7 Luziferase-Messung

Die Messung erfolgte am Lumat LB 9507 und mit dem Luciferase Assay Kit der Firma Promega. Für eine Messung wurden 16 µl oder 30 µl Zellysat (4.2.4.5.3) eingesetzt. Zur Bestimmung der Renilla-Luziferase Lumineszenz wurden 100 µl des Renilla-Luciferase-Assay-Buffer (Luciferase-Assay-Substrat 1:100 mit Luciferase-Assay-Buffer verdünnt) zum Zellysat gegeben. Anschließend wurde für 10 s die Lumineszenz der Probe bestimmt. Jeder Wert wurde doppelt bestimmt und dann gemittelt. Für die Messung der Firefly Luziferase-Lumineszenz wurden 100 µl Luciferase-Messpuffer (4.1.2) eingesetzt. Für die Auswertung

wurden die Messwerte für die Firefly-Lumineszenz auf die Werte der Renilla-Lumineszenz bezogen.

### **4.2.4.8 Behandlung von Zellen mit Actinomycin D**

HeLa B-Zellen wurden zwei Tage nach der Transfektion (4.2.4.3.1) für unterschiedliche Zeiträume mit Actinomycin D behandelt. Die Actinomycin D Konzentration im Zellkulturmedium mit 10% FCS betrug 5 µg/ml. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten mit Actinomycin D versetzt und alle Ansätze zur gleichen Zeit lysiert (4.2.4.6).

### **4.2.4.9 Hitzeschock von HeLa B-Zellen**

Für einen Hitzeschock wurden HeLa B-Zellen zu den in 2.6.2 angegebenen Zeiten in 6-Well-Platten mit 2 ml Zellkulturmedium (10% FCS) und bei 42°C, 5% CO<sub>2</sub> sowie unter Wasserdampfsättigung kultiviert.

### **4.2.4.10 Fluoreszenzmikroskopie**

Am Fluoreszenzmikroskop wurde die Fluoreszenz von EGFP-JKTBP1 betrachtet. Dazu wurde das Medium von den Zellen genommen und durch PBS ersetzt. Die EGFP-Fluoreszenz wurde durch UV-Licht und die Emission durch das Filter Set 09 betrachtet. Dieser ist für Licht unterhalb einer Wellenlänge von 515 nm undurchlässig.

## 5. Anhang

### 5.1 Literaturverzeichnis

- Adam, G.I., Miller, S.J., Ulleras, E., and Franklin, G.C. (1996). Cell-type-specific modulation of PDGF-B regulatory elements via viral enhancer competition: a caveat for the use of reference plasmids in transient transfection assays. *Gene*, **178**, 25-29.
- Akagi, T., Kamei, D., Tsuchiya, N., Nishina, Y., Horiguchi, H., Matsui, M., Kamma, H., and Yamada, M. (2000). Molecular characterization of a mouse heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its tissue-specific expression. *Gene*, **245**, 267-273.
- Akiri, G., Nahari, D., Finkelstein, Y., Le, S.Y., Elroy-Stein, O., and Levi, B.Z. (1998). Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression is mediated by internal initiation of translation and alternative initiation of transcription. *Oncogene*, **17**, 227-236.
- Anderson, J.R., Mukherjee, D., Muthukumaraswamy, K., Moraes, K.C., Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2006). Sequence-specific RNA binding mediated by the RNase PH domain of components of the exosome. *RNA*, **12**, 1810-1816.#
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K. Current Protocols in Molecular Biology; Wiley, Vol 1-5
- Baird, S.D., Turcotte, M., Korneluk, R.G., and Holcik, M. (2006). Searching for IRES. *RNA*, **12**, 1755-1785.
- Baird, S.D., Lewis, S.M., Turcotte, M., and Holcik, M. (2007). A search for structurally similar cellular internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 4664-4677.
- Bakheet, T., Frevel, M., Williams, B.R., Greer, W., and Khabar, K.S. (2001). ARED: human AU-rich element-containing mRNA database reveals an unexpectedly diverse functional repertoire of encoded proteins. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 246-254.
- Bakheet, T., Williams, B.R., and Khabar, K.S. (2003). ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 421-423.
- Bakheet, T., Williams, B.R., and Khabar, K.S. (2006). ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Res.*, **34**, D111-D114.
- Balatsos, N.A., Nilsson, P., Mazza, C., Cusack, S., and Virtanen, A. (2006). Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J. Biol. Chem.*, **281**, 4517-4522.
- Barcelo-Batllori, S., Andre, M., Servis, C., Levy, N., Takikawa, O., Michetti, P., Reymond, M., and Felley-Bosco, E. (2002). Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics*, **2**, 551-560.
- Barreau, C., Paillard, L., and Osborne, H.B. (2005). AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.*, **33**, 7138-7150.
- Bartels, M., Schweda, A.T., Dreikhausen, U., Frank, R., Resch, K., Beil, W., and Nourbakhsh, M. (2007). Peptide-Mediated Disruption of NF $\kappa$ B/NRF Interaction Inhibits IL-8 Gene Activation by IL-1 or Helicobacter pylori. *J. Immunol.*, **179**, 7605-7613.
- Belsham, G.J. and Sonenberg, N. (2000). Picornavirus RNA translation: roles for cellular proteins. *Trends Microbiol.*, **8**, 330-335.
- Berget, S.M. (1995). Exon recognition in vertebrate splicing. *J. Biol. Chem.*, **270**, 2411-2414.

- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, **125**, 1111-1124.
- Blaxall, B.C., Pende, A., Wu, S.C., and Port, J.D. (2002). Correlation between intrinsic mRNA stability and the affinity of AUF1 (hnRNP D) and HuR for A+U-rich mRNAs. *Mol. Cell Biochem.*, **232**, 1-11.
- Bonnal, S., Schaeffer, C., Creancier, L., Clamens, S., Moine, H., Prats, A.C., and Vagner, S. (2003). A single internal ribosome entry site containing a G quartet RNA structure drives fibroblast growth factor 2 gene expression at four alternative translation initiation codons. *J. Biol. Chem.*, **278**, 39330-39336.
- Bonnal, S., Boutonnet, C., Prado-Lourenco, L., and Vagner, S. (2003). IRESdb: the Internal Ribosome Entry Site database. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 427-428.
- Bonneau, A.M. and Sonenberg, N. (1987). Involvement of the 24-kDa cap-binding protein in regulation of protein synthesis in mitosis. *J. Biol. Chem.*, **262**, 11134-11139.
- Boopathi, E., Lenka, N., Prabu, S.K., Fang, J.K., Wilkinson, F., Atchison, M., Giallongo, A., and Avadhani, N.G. (2004). Regulation of murine cytochrome c oxidase Vb gene expression during myogenesis: YY-1 and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein (JKTBP1) reciprocally regulate transcription activity by physical interaction with the BERF-1/ZBP-89 factor. *J. Biol. Chem.*, **279**, 35242-35254.
- Borman, A. and Jackson, R.J. (1992). Initiation of translation of human rhinovirus RNA: mapping the internal ribosome entry site. *Virology*, **188**, 685-696.
- Borman, A.M., Michel, Y.M., and Kean, K.M. (2000). Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4068-4075.
- Brewer, G. (1991). An A + U-rich element RNA-binding factor regulates c-myc mRNA stability in vitro. *Mol. Cell Biol.*, **11**, 2460-2466.
- Caceres, J.F., Sreaton, G.R., and Krainer, A.R. (1998). A specific subset of SR proteins shuttles continuously between the nucleus and the cytoplasm. *Genes Dev.*, **12**, 55-66.
- Celis, J.E., Kruhoffer, M., Gromova, I., Frederiksen, C., Ostergaard, M., Thykjaer, T., Gromov, P., Yu, J., Palsdottir, H., Magnusson, N., and Orntoft, T.F. (2000). Gene expression profiling: monitoring transcription and translation products using DNA microarrays and proteomics. *FEBS Lett.*, **480**, 2-16.
- Chappell, S.A., Edelman, G.M., and Mauro, V.P. (2000). A 9-nt segment of a cellular mRNA can function as an internal ribosome entry site (IRES) and when present in linked multiple copies greatly enhances IRES activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1536-1541.
- Chappell, S.A., LeQuesne, J.P., Paulin, F.E., deSchoolmeester, M.L., Stoneley, M., Soutar, R.L., Ralston, S.H., Helfrich, M.H., and Willis, A.E. (2000). A mutation in the c-myc-IRES leads to enhanced internal ribosome entry in multiple myeloma: a novel mechanism of oncogene de-regulation. *Oncogene*, **19**, 4437-4440.
- Chappell, S.A. and Mauro, V.P. (2003). The internal ribosome entry site (IRES) contained within the RNA-binding motif protein 3 (Rbm3) mRNA is composed of functionally distinct elements. *J. Biol. Chem.*, **278**, 33793-33800.
- Chen, C.Y. and Shyu, A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 465-470.
- Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Rajimakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., and Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, **107**, 451-464.

Chen,C.Y., Xu,N., Zhu,W., and Shyu,A.B. (2004). Functional dissection of hnRNP D suggests that nuclear import is required before hnRNP D can modulate mRNA turnover in the cytoplasm. *RNA*, **10**, 669-680.

Chen,J.J. and London,I.M. (1995). Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 105-108.

Chen,L.F. and Greene,W.C. (2004). Shaping the nuclear action of NF-kappaB. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 392-401.

Cho,S., Park,S.M., Kim,T.D., Kim,J.H., Kim,K.T., and Jang,S.K. (2007). BiP internal ribosomal entry site activity is controlled by heat-induced interaction of NSAP1. *Mol. Cell Biol.*, **27**, 368-383.

Christensen,M.E. and Fuxa,K.P. (1988). The nucleolar protein, B-36, contains a glycine and dimethylarginine-rich sequence conserved in several other nuclear RNA-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **155**, 1278-1283.

Clemens,M.J. and Bommer,U.A. (1999). Translational control: the cancer connection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 1-23.

Clemens,M.J., Bushell,M., Jeffrey,I.W., Pain,V.M., and Morley,S.J. (2000). Translation initiation factor modifications and the regulation of protein synthesis in apoptotic cells. *Cell Death Differ.*, **7**, 603-615.

Cobianchi,F., Karpel,R.L., Williams,K.R., Notario,V., and Wilson,S.H. (1988). Mammalian heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex protein A1. Large-scale overproduction in *Escherichia coli* and cooperative binding to single-stranded nucleic acids. *J. Biol. Chem.*, **263**, 1063-1071.

Coldwell,M.J., Mitchell,S.A., Stoneley,M., MacFarlane,M., and Willis,A.E. (2000). Initiation of Apaf-1 translation by internal ribosome entry. *Oncogene*, **19**, 899-905.

Colgan,D.F. and Manley,J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.*, **11**, 2755-2766.

Conne,B., Stutz,A., and Vassalli,J.D. (2000). The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology? *Nat. Med.*, **6**, 637-641.

Conte,C., Dastugue,B., and Vaury,C. (2002). Promoter competition as a mechanism of transcriptional interference mediated by retrotransposons. *EMBO J.*, **21**, 3908-3916.

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

Dean,J.L., Wait,R., Mahtani,K.R., Sully,G., Clark,A.R., and Saklatvala,J. (2001). The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 721-730.

Dean,J.L., Sully,G., Wait,R., Rawlinson,L., Clark,A.R., and Saklatvala,J. (2002). Identification of a novel AU-rich-element-binding protein which is related to AUF1. *Biochem. J.*, **366**, 709-719.

Dormoy-Raclet,V., Markovits,J., Jacquemin-Sablon,A., and Jacquemin-Sablon,H. (2005). Regulation of Unr Expression by 5'- and 3'-Untranslated Regions of its mRNA through Modulation of Stability and IRES Mediated Translation. *RNA Biol.*, **2**.

Dreyfuss,G., Swanson,M.S., and Pinol-Roma,S. (1988). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem. Sci.*, **13**, 86-91.

Dreyfuss,G., Matunis,M.J., Pinol-Roma,S., and Burd,C.G. (1993). hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**, 289-321.

Dreyfuss,G., Kim,V.N., and Kataoka,N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **3**, 195-205.

Duncan,R., Milburn,S.C., and Hershey,J.W. (1987). Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J. Biol. Chem.*, **262**, 380-388.

Eulalio,A., Behm-Ansmant,I., and Izaurralde,E. (2007). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 9-22.

Evans,J.R., Mitchell,S.A., Spriggs,K.A., Ostrowski,J., Bomsztyk,K., Ostarek,D., and Willis,A.E. (2003). Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene*, **22**, 8012-8020.

Eversole,A. and Maizels,N. (2000). In vitro properties of the conserved mammalian protein hnRNP D suggest a role in telomere maintenance. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 5425-5432.

Fernandez,J., Yaman,I., Mishra,R., Merrick,W.C., Snider,M.D., Lamers,W.H., and Hatzoglou,M. (2001). Internal ribosome entry site-mediated translation of a mammalian mRNA is regulated by amino acid availability. *J. Biol. Chem.*, **276**, 12285-12291.

Gallie,D.R. (1991). The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev.*, **5**, 2108-2116.

Gallouzi,I.E. and Steitz,J.A. (2001). Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science*, **294**, 1895-1901.

Garneau,N.L., Wilusz,J., and Wilusz,C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **8**, 113-126.

Ghosh,S., May,M.J., and Kopp,E.B. (1998). NF-kappa B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, **16**, 225-260.

Gingras,A.C., Svitkin,Y., Belsham,G.J., Pause,A., and Sonenberg,N. (1996). Activation of the translational suppressor 4E-BP1 following infection with encephalomyocarditis virus and poliovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 5578-5583.

Gingras,A.C., Gygi,S.P., Raught,B., Polakiewicz,R.D., Abraham,R.T., Hoekstra,M.F., Aebersold,R., and Sonenberg,N. (1999). Regulation of 4E-BP1 phosphorylation: a novel two-step mechanism. *Genes Dev.*, **13**, 1422-1437.

Gingras,A.C., Raught,B., and Sonenberg,N. (1999). eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.*, **68**, 913-963.

Gradi,A., Svitkin,Y.V., Imataka,H., and Sonenberg,N. (1998). Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **95**, 11089-11094.

Graveley,B.R. (2000). Sorting out the complexity of SR protein functions. *RNA*, **6**, 1197-1211.

Habelhah,H., Shah,K., Huang,L., Ostareck-Lederer,A., Burlingame,A.L., Shokat,K.M., Hentze,M.W., and Ronai,Z. (2001). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat. Cell Biol.*, **3**, 325-330.

Hannon,G.J. (2002). RNA interference  
32. *Nature*, **418**, 244-251.

Hayden,M.S. and Ghosh,S. (2004). Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.*, **18**, 2195-2224.

Hellen,C.U. and Sarnow,P. (2001). Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. *Genes Dev.*, **15**, 1593-1612.

- Henis-Korenblit, S., Strumpf, N.L., Goldstaub, D., and Kimchi, A. (2000). A novel form of DAP5 protein accumulates in apoptotic cells as a result of caspase cleavage and internal ribosome entry site-mediated translation. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 496-506.
- Hernandez, E.M., Chan, C.H., Xu, B., Notario, V., and Richert, J.R. (2004). Role of an internal ribosome entry site in the translational control of the human transcription factor Sp3. *Int. J. Oncol.*, **24**, 719-724.
- Hershey, J.W.B. & Merrick, W.C. in *Translational Control of Gene Expression* (eds Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.) 33-38 (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2000)
- Hinnebusch, A.G. (1990). Transcriptional and translational regulation of gene expression in the general control of amino-acid biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, **38**, 195-240.
- Holcik, M., Lefebvre, C., Yeh, C., Chow, T., and Korneluk, R.G. (1999). A new internal-ribosome-entry-site motif potentiates XIAP-mediated cytoprotection. *Nat. Cell Biol.*, **1**, 190-192.
- Holcik, M. and Korneluk, R.G. (2000). Functional characterization of the X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) internal ribosome entry site element: role of La autoantigen in XIAP translation. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 4648-4657.
- Holcik, M., Yeh, C., Korneluk, R.G., and Chow, T. (2000). Translational upregulation of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) increases resistance to radiation induced cell death. *Oncogene*, **19**, 4174-4177.
- Holcik, M., Sonenberg, N., and Korneluk, R.G. (2000). Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet.*, **16**, 469-473.
- Holcik, M., Gordon, B.W., and Korneluk, R.G. (2003). The internal ribosome entry site-mediated translation of antiapoptotic protein XIAP is modulated by the heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1 and C2. *Mol. Cell Biol.*, **23**, 280-288.
- Holcik, M. and Sonenberg, N. (2005). Translational control in stress and apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 318-327.
- Honda, M., Brown, E.A., and Lemon, S.M. (1996). Stability of a stem-loop involving the initiator AUG controls the efficiency of internal initiation of translation on hepatitis C virus RNA. *RNA*, **2**, 955-968.
- Honda, M., Beard, M.R., Ping, L.H., and Lemon, S.M. (1999). A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation. *J. Virol.*, **73**, 1165-1174.
- Huang, T.T., Kudo, N., Yoshida, M., and Miyamoto, S. (2000). A nuclear export signal in the N-terminal regulatory domain of I $\kappa$ B $\alpha$  controls cytoplasmic localization of inactive NF- $\kappa$ B/I $\kappa$ B $\alpha$  complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **97**, 1014-1019.
- Hui, J. and Bindereif, A. (2005). Alternative pre-mRNA splicing in the human system: unexpected role of repetitive sequences as regulatory elements. *Biol. Chem.*, **386**, 1265-1271.
- Hussain, S.G. and Ramaiah, K.V. (2007). Reduced eIF2 $\alpha$  phosphorylation and increased proapoptotic proteins in aging. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 365-370.
- Ideker, T., Thorsson, V., Ranish, J.A., Christmas, R., Buhler, J., Eng, J.K., Bumgarner, R., Goodlett, D.R., Aebersold, R., and Hood, L. (2001). Integrated genomic and proteomic analyses of a systematically perturbed metabolic network. *Science*, **292**, 929-934.
- Iijima, M., Suzuki, M., Tanabe, A., Nishimura, A., and Yamada, M. (2006). Two motifs essential for nuclear import of the hnRNP A1 nucleocytoplasmic shuttling sequence M9 core. *FEBS Lett.*, **580**, 1365-1370.

- Imasaki, T., Shimizu, T., Hashimoto, H., Hidaka, Y., Kose, S., Imamoto, N., Yamada, M., and Sato, M. (2007). Structural basis for substrate recognition and dissociation by human transportin 1. *Mol. Cell*, **28**, 57-67.
- Izaurralde, E., Jarmolowski, A., Beisel, C., Mattaj, I.W., Dreyfuss, G., and Fischer, U. (1997). A role for the M9 transport signal of hnRNP A1 in mRNA nuclear export. *J. Cell Biol.*, **137**, 27-35.
- Jackson, R.J., Howell, M.T., and Kaminski, A. (1990). The novel mechanism of initiation of picornavirus RNA translation. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 477-483.
- Jackson, R.J., Hunt, S.L., Reynolds, J.E., and Kaminski, A. (1995). Cap-dependent and cap-independent translation: operational distinctions and mechanistic interpretations. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **203**, 1-29.
- Jacobson, A. (1996) Poly(A) metabolism and translation: The closed loop model. in *Translational Control of Gene Expression* (eds Sonenberg, N., Hershey, J.W.B. & Mathews, M.B.) **451-479** (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1996)
- Jang, S.K., Krausslich, H.G., Nicklin, M.J., Duke, G.M., Palmenberg, A.C., and 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.
- Jansen, R.P. (2001). mRNA localization: message on the move. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 247-256.
- Johannes, G., Carter, M.S., Eisen, M.B., Brown, P.O., and Sarnow, P. (1999). Identification of eukaryotic mRNAs that are translated at reduced cap binding complex eIF4F concentrations using a cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **96**, 13118-13123.
- Jopling, C.L., Spriggs, K.A., Mitchell, S.A., Stoneley, M., and Willis, A.E. (2004). L-Myc protein synthesis is initiated by internal ribosome entry. *RNA*, **10**, 287-298.
- Jurica, M.S. and Moore, M.J. (2003). Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell*, **12**, 5-14.
- Kahvejian, A., Roy, G., and Sonenberg, N. (2001). The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, **66**, 293-300.
- Kamei, D., Tsuchiya, N., Yamazaki, M., Meguro, H., and Yamada, M. (1999). Two forms of expression and genomic structure of the human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like JKTBP gene (HNRPDL). *Gene*, **228**, 13-22.
- Kamei, D. and Yamada, M. (2002). Interactions of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its domains with high-affinity binding sites. *Gene*, **298**, 49-57.
- Kaminski, A. and Jackson, R.J. (1998). The polypyrimidine tract binding protein (PTB) requirement for internal initiation of translation of cardiovirus RNAs is conditional rather than absolute. *RNA*, **4**, 626-638.
- Kawamura, H., Tomozoe, Y., Akagi, T., Kamei, D., Ochiai, M., and Yamada, M. (2002). Identification of the nucleocytoplasmic shuttling sequence of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like protein JKTBP and its interaction with mRNA. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2732-2739.
- Khabar, K.S. (2005). The AU-rich transcriptome: more than interferons and cytokines, and its role in disease. *J. Interferon Cytokine Res.*, **25**, 1-10.
- Kida, Y., Kobayashi, M., Suzuki, T., Takeshita, A., Okamoto, Y., Hanazawa, S., Yasui, T., and Hasegawa, K. (2005). Interleukin-1 stimulates cytokines, prostaglandin E2 and matrix metalloproteinase-1 production via activation of MAPK/AP-1 and NF-kappaB in human gingival fibroblasts. *Cytokine*, **29**, 159-168.

- Kim, J.H., Hahm, B., Kim, Y.K., Choi, M., and Jang, S.K. (2000). Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J. Mol. Biol.*, **298**, 395-405.
- Kim, Y.K. and Jang, S.K. (2002). Continuous heat shock enhances translational initiation directed by internal ribosomal entry site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **297**, 224-231.
- Kleijn, M., Voorma, H.O., and Thomas, A.A. (1995). Phosphorylation of eIF-4E and initiation of protein synthesis in P19 embryonal carcinoma cells. *J. Cell Biochem.*, **59**, 443-452.
- Komar, A.A. and Hatzoglou, M. (2005). Internal ribosome entry sites in cellular mRNAs: mystery of their existence. *J. Biol. Chem.*, **280**, 23425-23428.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T.T., Cominelli, F., and Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*, **10**, 387-398.
- Kozak, M. (1986). Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **83**, 2850-2854.
- Kozak, M. (1989). Circumstances and mechanisms of inhibition of translation by secondary structure in eucaryotic mRNAs. *Mol. Cell Biol.*, **9**, 5134-5142.
- Kozak, M. (1995). Adherence to the first-AUG rule when a second AUG codon follows closely upon the first. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **92**, 7134.
- Kuersten, S. and Goodwin, E.B. (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat. Rev. Genet.*, **4**, 626-637.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J.*, **23**, 3092-3102.
- Lamphear, B.J., Yan, R., Yang, F., Waters, D., Liebig, H.D., Klump, H., Kuechler, E., Skern, T., and Rhoads, R.E. (1993). Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus. *J. Biol. Chem.*, **268**, 19200-19203.
- Lamphear, B.J., Kirchweger, R., Skern, T., and Rhoads, R.E. (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J. Biol. Chem.*, **270**, 21975-21983.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G., and Schneider, R.J. (1999). Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **284**, 499-502.
- Le Quesne, J.P., Stoneley, M., Fraser, G.A., and Willis, A.E. (2001). Derivation of a structural model for the c-myc IRES. *J. Mol. Biol.*, **310**, 111-126.
- Le, S.Y. and Maizel, J.V., Jr. (1997). A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 362-369.
- Lewis, J.D. and Izaurralde, E. (1997). The role of the cap structure in RNA processing and nuclear export. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 461-469.
- Li, L., Liu, L., Rao, J.N., Esmaili, A., Strauch, E.D., Bass, B.L., and Wang, J.Y. (2002). JunD stabilization results in inhibition of normal intestinal epithelial cell growth through P21 after polyamine depletion. *Gastroenterology*, **123**, 764-779.
- Lim, S.R. and Hertel, K.J. (2004). Commitment to splice site pairing coincides with A complex formation. *Mol. Cell*, **15**, 477-483.
- Lin, C.G. and Lo, S.J. (1992). Evidence for involvement of a ribosomal leaky scanning mechanism in the translation of the hepatitis B virus pol gene from the viral pregenome RNA. *Virology*, **188**, 342-352.

- Liu,H., Rodgers,N.D., Jiao,X., and Kiledjian,M. (2002). The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.*, **21**, 4699-4708.
- Lopez-Lastra,M., Rivas,A., and Barria,M.I. (2005). Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol. Res.*, **38**, 121-146.
- Lopez,d.Q. and Martinez-Salas,E. (1997). Conserved structural motifs located in distal loops of aphthovirus internal ribosome entry site domain 3 are required for internal initiation of translation. *J. Virol.*, **71**, 4171-4175.
- Lopez,d.Q. and Martinez-Salas,E. (2000). Interaction of the eIF4G initiation factor with the aphthovirus IRES is essential for internal translation initiation in vivo. *RNA*, **6**, 1380-1392.
- Lopez,d.Q., Lafuente,E., and Martinez-Salas,E. (2001). IRES interaction with translation initiation factors: functional characterization of novel RNA contacts with eIF3, eIF4B, and eIF4GII. *RNA*, **7**, 1213-1226.
- Macejak,D.G. and Sarnow,P. (1991). Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*, **353**, 90-94.
- Maniatis,T., Fritsch,E.F., Sambrook,J. (1989) *Molecular Cloning Manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Second Edition, Vol. 1-3
- Manzella,J.M., Rychlik,W., Rhoads,R.E., Hershey,J.W., and Blackshear,P.J. (1991). Insulin induction of ornithine decarboxylase. Importance of mRNA secondary structure and phosphorylation of eucaryotic initiation factors eIF-4B and eIF-4E. *J. Biol. Chem.*, **266**, 2383-2389.
- Martinez-Salas,E., Regalado,M.P., and Domingo,E. (1996). Identification of an essential region for internal initiation of translation in the aphthovirus internal ribosome entry site and implications for viral evolution. *J. Virol.*, **70**, 992-998.
- Martinez-Salas,E., Ramos,R., Lafuente,E., and Lopez,d.Q. (2001). Functional interactions in internal translation initiation directed by viral and cellular IRES elements. *J. Gen. Virol.*, **82**, 973-984.
- Mathews,D.H., Disney,M.D., Childs,J.L., Schroeder,S.J., Zuker,M., and Turner,D.H. (2004). Incorporating chemical modification constraints into a dynamic programming algorithm for prediction of RNA secondary structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **101**, 7287-7292.
- Matlin,A.J., Clark,F., and Smith,C.W. (2005). Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **6**, 386-398.
- Mayeda,A. and Krainer,A.R. (1992). Regulation of alternative pre-mRNA splicing by hnRNP A1 and splicing factor SF2. *Cell*, **68**, 365-375.
- Michelotti,E.F., Michelotti,G.A., Aronsohn,A.I., and Levens,D. (1996). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 2350-2360.
- Mignone,F., Gissi,C., Liuni,S., and Pesole,G. (2002). Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.*, **3**, REVIEWS0004.
- Minich,W.B., Balasta,M.L., Goss,D.J., and Rhoads,R.E. (1994). Chromatographic resolution of in vivo phosphorylated and nonphosphorylated eukaryotic translation initiation factor eIF-4E: increased cap affinity of the phosphorylated form. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*, **91**, 7668-7672.
- Mitchell,S.A., Brown,E.C., Coldwell,M.J., Jackson,R.J., and Willis,A.E. (2001). Protein factor requirements of the Apaf-1 internal ribosome entry segment: roles of polypyrimidine tract binding protein and upstream of N-ras. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 3364-3374.
- Mitchell,S.A., Spriggs,K.A., Coldwell,M.J., Jackson,R.J., and Willis,A.E. (2003). The Apaf-1 internal ribosome entry segment attains the correct structural conformation for function via interactions with PTB and unr. *Mol. Cell*, **11**, 757-771.

- Moraes,K.C., Wilusz,C.J., and Wilusz,J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA*, **12**, 1084-1091.
- Moynagh,P.N. (2005). The NF-kappaB pathway. *J. Cell Sci.*, **118**, 4589-4592.
- Nakazato,Y., Hayashida,T., Kanno,Y., Sasamura,H., Okada,H., Suzuki,H., and Saruta,T. (1998). Interleukin (IL)-1 and IL-4 synergistically stimulate NF-IL6 activity and IL-6 production in human mesangial cells. *Kidney Int.*, **54**, 71-79.
- Nakielny,S., Shaikh,S., Burke,B., and Dreyfuss,G. (1999). Nup153 is an M9-containing mobile nucleoporin with a novel Ran-binding domain. *EMBO J.*, **18**, 1982-1995.
- Nanbru,C., Lafon,I., Audigier,S., Gensac,M.C., Vagner,S., Huez,G., and Prats,A.C. (1997). Alternative translation of the proto-oncogene c-myc by an internal ribosome entry site. *J. Biol. Chem.*, **272**, 32061-32066.
- Niedick,I., Froese,N., Oumard,A., Mueller,P.P., Nourbakhsh,M., Hauser,H., and Koster,M. (2004). Nucleolar localization and mobility analysis of the NF-kappaB repressing factor NRF. *J. Cell Sci.*, **117**, 3447-3458.
- Nomoto,A., Kitamura,N., Golini,F., and Wimmer,E. (1977). The 5'-terminal structures of poliovirus RNA and poliovirus mRNA differ only in the genome-linked protein VPg. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **74**, 5345-5349.
- Nourbakhsh,M. and Hauser,H. (1997). The transcriptional silencer protein NRF: a repressor of NF-kappa B enhancers. *Immunobiology*, **198**, 65-72.
- Nourbakhsh,M. and Hauser,H. (1999). Constitutive silencing of IFN-beta promoter is mediated by NRF (NF-kappaB-repressing factor), a nuclear inhibitor of NF-kappaB. *EMBO J.*, **18**, 6415-6425.
- Nourbakhsh,M., Oumard,A., Schwarzer,M., and Hauser,H. (2000). NRF, a nuclear inhibitor of NF-kappaB proteins silencing interferon-beta promoter. *Eur. Cytokine Netw.*, **11**, 500-501.
- Nourbakhsh,M., Kalble,S., Dorrie,A., Hauser,H., Resch,K., and Kracht,M. (2001). The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. *J. Biol. Chem.*, **276**, 4501-4508.
- Ohlmann,T., Rau,M., Pain,V.M., and Morley,S.J. (1996). The C-terminal domain of eukaryotic protein synthesis initiation factor (eIF) 4G is sufficient to support cap-independent translation in the absence of eIF4E. *EMBO J.*, **15**, 1371-1382.
- Osborn,L., Kunkel,S., and Nabel,G.J. (1989). Tumor necrosis factor alpha and interleukin 1 stimulate the human immunodeficiency virus enhancer by activation of the nuclear factor kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 2336-2340.
- Oumard,A., Hennecke,M., Hauser,H., and Nourbakhsh,M. (2000). Translation of NRF mRNA is mediated by highly efficient internal ribosome entry. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 2755-2759.
- Pain,V.M. (1994). Translational control during amino acid starvation. *Biochimie*, **76**, 718-728.
- Paschoud,S., Dogar,A.M., Kuntz,C., Grisoni-Neupert,B., Richman,L., and Kuhn,L.C. (2006). Destabilization of interleukin-6 mRNA requires a putative RNA stem-loop structure, an AU-rich element, and the RNA-binding protein AUF1. *Mol. Cell Biol.*, **26**, 8228-8241.
- Paulin,F.E., West,M.J., Sullivan,N.F., Whitney,R.L., Lyne,L., and Willis,A.E. (1996). Aberrant translational control of the c-myc gene in multiple myeloma. *Oncogene*, **13**, 505-513.
- Paulin,F.E., Chappell,S.A., and Willis,A.E. (1998). A single nucleotide change in the c-myc internal ribosome entry segment leads to enhanced binding of a group of protein factors. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3097-3103.

- Pause,A., Belsham,G.J., Gingras,A.C., Donze,O., Lin,T.A., Lawrence,J.C., Jr., and Sonenberg,N. (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*, **371**, 762-767.
- Pelletier,J. and Sonenberg,N. (1985). Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of a eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell*, **40**, 515-526.
- Pelletier,J. and Sonenberg,N. (1987). The involvement of mRNA secondary structure in protein synthesis. *Biochem. Cell Biol.*, **65**, 576-581.
- Pelletier,J. and Sonenberg,N. (1988). Internal initiation of translation of eukaryotic mRNA directed by a sequence derived from poliovirus RNA. *Nature*, **334**, 320-325.
- Peng,S.S., Chen,C.Y., and Shyu,A.B. (1996). Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol. Cell Biol.*, **16**, 1490-1499.
- Pestova,T.V., Shatsky,I.N., Fletcher,S.P., Jackson,R.J., and Hellen,C.U. (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 RNAs. *Genes Dev.*, **12**, 67-83.
- Pestova,T.V. and Hellen,C.U. (1999). Ribosome recruitment and scanning: what's new? *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 85-87.
- Pestova,T.V., Lomakin,I.B., and Hellen,C.U. (2004). Position of the CrPV IRES on the 40S subunit and factor dependence of IRES/80S ribosome assembly. *EMBO Rep.*, **5**, 906-913.
- Pickering,B.M., Mitchell,S.A., Evans,J.R., and Willis,A.E. (2003). Polypyrimidine tract binding protein and poly r(C) binding protein 1 interact with the BAG-1 IRES and stimulate its activity in vitro and in vivo. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 639-646.
- Pickering,B.M., Mitchell,S.A., Spriggs,K.A., Stoneley,M., and Willis,A.E. (2004). Bag-1 internal ribosome entry segment activity is promoted by structural changes mediated by poly(rC) binding protein 1 and recruitment of polypyrimidine tract binding protein 1. *Mol. Cell Biol.*, **24**, 5595-5605.
- Pinol-Roma,S., Choi,Y.D., Matunis,M.J., and Dreyfuss,G. (1988). Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev.*, **2**, 215-227.
- Pinol-Roma,S. and Dreyfuss,G. (1991). Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science*, **253**, 312-314.
- Pollard,V.W., Michael,W.M., Nakielnny,S., Siomi,M.C., Wang,F., and Dreyfuss,G. (1996). A novel receptor-mediated nuclear protein import pathway. *Cell*, **86**, 985-994.
- Preiss,T., Muckenthaler,M., and Hentze,M.W. (1998). Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control. *RNA*, **4**, 1321-1331.
- Proud,C.G. (1992). Protein phosphorylation in translational control. *Curr. Top. Cell Regul.*, **32**, 243-369.
- Query,C.C., Bentley,R.C., and Keene,J.D. (1989). A common RNA recognition motif identified within a defined U1 RNA binding domain of the 70K U1 snRNP protein. *Cell*, **57**, 89-101.
- Reboll,M.R., Oumard,A., Gazdag,A.C., Renger,I., Ritter,B., Schwarzer,M., Hauser,H., Wood,M., Yamada,M., Resch,K., and Nourbakhsh,M. (2007). NRF IRES activity is mediated by RNA binding protein JKTBP1 and a 14-nt RNA element. *RNA*, **13**, 1328-1340.
- Reynolds,J.E., Kaminski,A., Kettinen,H.J., Grace,K., Clarke,B.E., Carroll,A.R., Rowlands,D.J., and Jackson,R.J. (1995). Unique features of internal initiation of hepatitis C virus RNA translation. *EMBO J.*, **14**, 6010-6020.

- Richter-Cook, N.J., Dever, T.E., Hensold, J.O., and Merrick, W.C. (1998). Purification and characterization of a new eukaryotic protein translation factor. Eukaryotic initiation factor 4H. *J. Biol. Chem.*, **273**, 7579-7587.
- Rogers, G.W., Jr., Richter, N.J., and Merrick, W.C. (1999). Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J. Biol. Chem.*, **274**, 12236-12244.
- Rousseau, D., Kaspar, R., Rosenwald, I., Gehrke, L., and Sonenberg, N. (1996). Translation initiation of ornithine decarboxylase and nucleocytoplasmic transport of cyclin D1 mRNA are increased in cells overexpressing eukaryotic initiation factor 4E. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **93**, 1065-1070.
- Sachs, A.B., Sarnow, P., and Hentze, M.W. (1997). Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, **89**, 831-838.
- Sachs, A.B. (2000). Cell cycle-dependent translation initiation: IRES elements prevail. *Cell*, **101**, 243-245.
- Sarnow, P. (1989). Translation of glucose-regulated protein 78/immunoglobulin heavy-chain binding protein mRNA is increased in poliovirus-infected cells at a time when cap-dependent translation of cellular mRNAs is inhibited. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 5795-5799.
- Schmedt, C., Green, S.R., Manche, L., Taylor, D.R., Ma, Y., and Mathews, M.B. (1995). Functional characterization of the RNA-binding domain and motif of the double-stranded RNA-dependent protein kinase DAI (PKR). *J. Mol. Biol.*, **249**, 29-44.
- Sedman, S.A., Good, P.J., and Mertz, J.E. (1989). Leader-encoded open reading frames modulate both the absolute and relative rates of synthesis of the virion proteins of simian virus 40. *J. Virol.*, **63**, 3884-3893.
- Shamoo, Y., Krueger, U., Rice, L.M., Williams, K.R., and Steitz, T.A. (1997). Crystal structure of the two RNA binding domains of human hnRNP A1 at 1.75 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 215-222.
- Shaw, G. and Kamen, R. (1986). A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*, **46**, 659-667.
- Sherrill, K.W., Byrd, M.P., Van Eden, M.E., and Lloyd, R.E. (2004). BCL-2 translation is mediated via internal ribosome entry during cell stress. *J. Biol. Chem.*, **279**, 29066-29074.
- Sheth, U. and Parker, R. (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, **300**, 805-808.
- Shyu, A.B. and Wilkinson, M.F. (2000). The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell*, **102**, 135-138.
- Stoneley, M., Paulin, F.E., Le Quesne, J.P., Chappell, S.A., and Willis, A.E. (1998). C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*, **16**, 423-428.
- Stoneley, M., Subkhankulova, T., Le Quesne, J.P., Coldwell, M.J., Jopling, C.L., Belsham, G.J., and Willis, A.E. (2000). Analysis of the c-myc IRES; a potential role for cell-type specific trans-acting factors and the nuclear compartment. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 687-694.
- Stoneley, M. and Willis, A.E. (2004). Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene*, **23**, 3200-3207.
- Svitkin, Y.V., Imataka, H., Khaleghpour, K., Kahvejian, A., Liebig, H.D., and Sonenberg, N. (2001). Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA*, **7**, 1743-1752.
- Tharun, S. and Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell*, **8**, 1075-1083.

- Thoma,C., Bergamini,G., Galy,B., Hundsdoerfer,P., and Hentze,M.W. (2004). Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP. *Mol. Cell*, **15**, 925-935.
- Tomonaga,T. and Levens,D. (1995). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a DNA-binding transactivator. *J. Biol. Chem.*, **270**, 4875-4881.
- Tsuchiya,N., Kamei,D., Takano,A., Matsui,T., and Yamada,M. (1998). Cloning and characterization of a cDNA encoding a novel heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-like protein and its expression in myeloid leukemia cells. *J. Biochem. (Tokyo)*, **123**, 499-507.
- Tsukiyama-Kohara,K., Iizuka,N., Kohara,M., and Nomoto,A. (1992). Internal ribosome entry site within hepatitis C virus RNA. *J. Virol.*, **66**, 1476-1483.
- Tuerk,C. and Gold,L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, **249**, 505-510.
- Ueno,S. and Sagata,N. (2002). Requirement for both EDEN and AUUUA motifs in translational arrest of Mos mRNA upon fertilization of *Xenopus* eggs. *Dev. Biol.*, **250**, 156-167.
- Vagner,S., Gensac,M.C., Maret,A., Bayard,F., Amalric,F., Prats,H., and Prats,A.C. (1995). Alternative translation of human fibroblast growth factor 2 mRNA occurs by internal entry of ribosomes. *Mol. Cell Biol.*, **15**, 35-44.
- Vagner,S., Galy,B., and Pyronnet,S. (2001). Irresistible IRES. Attracting the translation machinery to internal ribosome entry sites. *EMBO Rep.*, **2**, 893-898.
- van der Houven van Oordt, Diaz-Meco,M.T., Lozano,J., Krainer,A.R., Moscat,J., and Caceres,J.F. (2000). The MKK(3/6)-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. *J. Cell Biol.*, **149**, 307-316.
- van der Velden,A.W. and Thomas,A.A. (1999). The role of the 5' untranslated region of an mRNA in translation regulation during development. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **31**, 87-106.
- Vitali,J., Ding,J., Jiang,J., Zhang,Y., Krainer,A.R., and Xu,R.M. (2002). Correlated alternative side chain conformations in the RNA-recognition motif of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 1531-1538.
- Wagner,B.J., DeMaria,C.T., Sun,Y., Wilson,G.M., and Brewer,G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics*, **48**, 195-202.
- Wickens,M. (1990). How the messenger got its tail: addition of poly(A) in the nucleus. *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 277-281.
- Wilson,J.E., Powell,M.J., Hoover,S.E., and Sarnow,P. (2000). Naturally occurring dicistronic cricket paralysis virus RNA is regulated by two internal ribosome entry sites. *Mol. Cell Biol.*, **20**, 4990-4999.
- Xu,N., Chen,C.Y., and Shyu,A.B. (2001). Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 6960-6971.
- Yaman,I., Fernandez,J., Liu,H., Caprara,M., Komar,A.A., Koromilas,A.E., Zhou,L., Snider,M.D., Scheuner,D., Kaufman,R.J., and Hatzoglou,M. (2003). The zipper model of translational control: a small upstream ORF is the switch that controls structural remodeling of an mRNA leader. *Cell*, **113**, 519-531.
- Yamashita,A., Chang,T.C., Yamashita,Y., Zhu,W., Zhong,Z., Chen,C.Y., and Shyu,A.B. (2005). Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **12**, 1054-1063.

Yang,Q. and Sarnow,P. (1997). Location of the internal ribosome entry site in the 5' non-coding region of the immunoglobulin heavy-chain binding protein (BiP) mRNA: evidence for specific RNA-protein interactions. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 2800-2807.

Yueh,A. and Schneider,R.J. (1996). Selective translation initiation by ribosome jumping in adenovirus-infected and heat-shocked cells. *Genes Dev.*, **10**, 1557-1567.

Zhang,W., Wagner,B.J., Ehrenman,K., Schaefer,A.W., DeMaria,C.T., Crater,D., DeHaven,K., Long,L., and Brewer,G. (1993). Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 7652-7665.

Zuker,M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406-3415.

## 5.2 Sequenzen

### 5.2.1 Untranslatierte Regionen von NRF

Die vollständige 5'UTR von NRF enthält 653 Basen, das minimale IRES-Element wird von den Basen 507 bis 653 gebildet. Die 11 offenen Leseraster sind gezeigt.

```

1      CAGAGTAATG ACATGGTTCC TTCCATCCTC CAAAGGTGAC CAATAATAGT
51     TTGTAAGTAT CATTATGAAC TAATGAATTT TCAACATATT TGATATATTT
101    CAATCCATTG CCATCATTGT TCTTATCGAT ATTTGAGTTG GCTCACTTTG
151    CCAGTAAGAG TCTATTCAAA TTGGCTTCTG AGTCCATTTG ACACAACACC
201    TTTGATCTTT GACAGTTTCC TTGGTTTTAG GTGCTAGATG ATTTCTCAGG
251    CTCACCTTAG ACATTTCTCTG CCACAGACTT AGAATCAGCC ATTTCTCTAA
301    GGACCCTGAT TCCATTTCAT GAGAAATGAT AGAGACCACA ATCAAAACAA
351    GTCATGAAATT TATACTGATA TTTTCAATTC AAATTAAAGA TGAGGTTTTT
401    GCTAAATTTT TTGAGTTTA TATTTGATG TCTTATGCTG AAAAACTTG
451    TTTCCTAAATT AGTAACATAA TTATTCATTT GATGGGTAAA TATTTAGGG
501    CCGATTCTTT GGTTTTATAG CCAAGATACC CTGTTGATAA AGTCTTGTTG
551    GAGCAATTAT AAGACTGGCT TATTTGAAG CTTTTTAAAA AAGACATCCT
601    TACCTGTTTT AACTGTAGAT TATATTAACT TAAATAGGTA CAGCCACGC
651    TTGATG

```

Die 3'UTR von NRF ist 1003 Basen lang (2727-3730 b). Die AU-reichen Motive sind unterlegt, das Polyadenylierungssignal ist dick gedruckt. Die kurze NRF mRNA (2,8 kb) verfügt über eine sehr kurze 3'UTR mit 52 Basen (2727-2779):

```

2727                                     GATC TTACTAATTT ATTTTGTAAA
2751 TGCCTAATGA GGCAGATTTT TGAATTAAAG AAATGCTACA TGTTCGGTT
2801 GCAGAGTATA TTCATAAGAT GTCTCACCTT GTTCATTTCA CATAGTGGTT
2851 TATTAGATAT TGGAACCTAA AGAATTCTGT CCACTTGTAT TAGCTTAATC
2901 CAGCAGATGA TATTGTGCAG TTACTGTTTG TGTCTTTGAT ATTGCTGTGT
2951 CCCTCAGATT TTAGTAGTTT GACAAGCAAG AACACATATC CAAATGGAAT
3001 TTTACCCTGA GAAATTATCA TTTTAAAGGG CATAGCACAG CAATCTGCAA
3051 CAATATGTAA AGTTGATATT GACTACAATA AAAATCCAGT CTTAATTCCA
3101 GATTTACTGA AAATGTCAGA TCATTTTGTA TTAATCTAT TTTCACTTTG
3151 TGTGAAGCCA GTTATAGAAT GTTTGACAAT AAATGTGCT GTACACGTAA
3201 ATGTCCTTAC CAACTAAATG ATGTAAAACT TTCTTAAAGT AATTTTAGTG
3251 TTCATTTATT TATAACTTCT ACCATGTGAT TTCCAGACTA TTGGAAGTCA
3301 TTTACTGTAT CTTGTGATAT ATGGGTTTTA ACAAATTCTA GTCTTCACGC
3351 TGAGAGAGCA CTACTTGAGA GAGCAGTTGA AAGTTTCAA AACTTTGGTT
3401 CAATCTGAAG AAAGGAAGCT TGAACTGTTT GTTCTTGGTG CCTTGCAGAG
3451 AGACTCACAG CAACTCTCCA TTATAGCTTT CACACGGTTT GGATGTGCAG
3501 CACATCCAAG GCAACCACAG CTGTGGTAGA GCTTGGTAAA AGACTGAAGA
3551 TACATTGGTG CTTTGATGAA AAGGTCAGTT GGCTGGTCCC TCTCTCAAAA
3601 AGCTTATTAA GCCTGAAAAG CCAACTTTGT AACATATTTA AAACTGCTAT
3651 TTTCGCTTAT TTCTGGAATG TAAAAAAAAA ATGTATAAAA AGAATTAGTG
3701 TATGCTTCCT GAATAAAAAAAG GAGCCAAAGT

```

## 5.2.2 Sequenz von NRF

Codierende Sequenz von NRF (in der RNA 653-2726):

```

1 ATGGAAAAA TTCTCAAAT GGCTGAAGGT ATTGATATTG GGGAGATGCC TTCATATGAT
61 CTGGTGCTGT CCAAACCTTC CAAAGGTCAA AAACGCCACC TCTCAACATG TGATGGTCAA
121 AATCCTCCTA AAAAGCAAGC CGGTTCCAAA TTCCATGCGA GACCTCGTTT TGAGCCTGTA
181 CATTTTGTAG CTAGTAGTTC AAAAGATGAA AGACAGGAAG ATCCTTATGG CCCTCAAACA
241 AAAGAGGTAA ATGAACAAAC ACATTTTGCC AGCATGCCAA GAGACATCTA CCAAGATTAT
301 ACTCAAGACT CTTTCAGTAT ACAAGATGGG AATTCTCAGT ATTGTGATTC ATCAGGATTC
361 ATTCTCACAA AAGACCAGCC TGTAACAGCC AACATGTATT TTGACAGTGG GAACCTGCCC
421 CCAAGCACCA CATCACAGCA GGCAAACTCT CAGTCAACTC CTGAGCCTTC ACCATCACAG
481 ACATTTCCCG AGTCTGTGGT AGCCGAGAAG CAGTATTTTA TTGAAAAATT AACGGCGACA
541 ATCTGGAAGA ACCTTCTTAA TCCAGAAATG ACTTCTGGAT CTGATAAAAT TAATTATACA
601 TATATGTTAA CTCGTTGTAT TCAGGCGTGT AAGACAAATC CTGAGTATAT ATATGCTCCT
661 TTAAAGGAAA TTCCTCCTGC CGACATCCCC AAAAATAAAA AACTTCTAAC TGATGGCTAT
721 GCTTGTGAAG TTAGATGCCA AAATATCTAC TTAACTACAG GTTATGCTGG CAGCAAGAAT
781 GGGTCCAGGG ATCGAGCTAC AGAGCTAGCT GTAAACTCT TGCAGAAACG TATTGAAGTT

```

```

841 AGAGTTGTCC GGC GGAAATT CAAGCATACA TTGGAGAGG ACCTCGTGGT GTGTCAGATT
901 GGCATGTCCT CCTATGAATT TCCTCCAGCT CTGAAGCCAC CAGAAGACCT GGTGGTGCTG
961 GGTAAAGATG CTTCGGGCA GCCAATTTTT AATGCTTCTG CCAAACACTG GACCAATTTT
1021 GTCATTACAG AAAATGCAAA TGATGCAATT GGTATCCTTA ACAATTCTGC CTCATTCAAC
1081 AAGATGTCAA TTGAATACAA ATATGAGATG ATGCCAAATC GCACATGGCG TTGTCGAGTG
1141 TTTTACAAAG ATCACTGCTT AGCTGAAGGT TATGGAACCA AGAAAACAAG TAAACATGCA
1201 GCTGCCGACG AGGCTTTGAA AATTCTTCAA AAAACACAGC CCACTTATCC ATCTGTCAAA
1261 AGTTCACAAT GCCATACAGG CTCTTCACCC AGAGGATCTG GAAAGAAGAA AGATATAAAG
1321 GATCTGTAG TTTATGAGAA TTCTTCAAAT CCCGTGTGCA CGCTGAACGA CACAGCTCAG
1381 TTTAACCGAA TGACAGTTGA GTATGTCTAT GAAAGGATGA CAGGCCTCCG CTGGAAATGC
1441 AAAGTGATTC TAGAGAGTGA AGTAATTGCA GAAGCAGTTG GGGTGAAGAA AACTGTCAAA
1501 TATGAAGCTG CTGGGAAGC TGTGAAAACC CTCAAAAAGA CCCAGCCAAC TGTCATTAAC
1561 AACTGAAGA AAGGAGCTGT TGAAGATGTG ATTTCAAGAA ATGAAATCA GGGCCGCTCA
1621 GCAGAGGAGG CTTACAAACA GCAATCAAA GAAGATAATA TTGGAATCA GCTGCTGAGA
1681 AAGATGGGTT GGACTGGTGG TGGTTTAGGT AAATCTGGTG AGGCATACG GGAGCCTATC
1741 TCAGTGAAAG AGCAGCATAA GCGGAAGGG CTGGTCTGG ATGTAGAGAG GGTGAATAAA
1801 ATTGCCAAGA GAGATATTGA ACAGATCATC AGAAACTACG CCCGCTCCGA GAGCCACACA
1861 GATTTGACTT TCTCTAGAGA GCTGACTAAT GATGAACGGA AGCAAATACA TCAGATTGCC
1921 CAGAAGTATG GTCTTAAGAG TAAGTCTCAT GGGGTGGGCC ATGATAGGTA CCTAGTGGTA
1981 GGTAGAAAAA GACGAAGGA AGACCTACTA GATCAGCTCA AACAGGAAG CCAAGTGGG
2041 CATTACGAGC TTGTTATGCC TCAAGCAAAT TGA

```

### Proteinsequenz von NRF:

```

1 MEKILQMAEG IDIGEMPSYD LVLSKPSKGQ KRHLSTCDGQ NPPKKQAGSK FHARPRFEPV
61 HFVASSSKDE RQEDPYGPQT KEVNEQTHFA SMPRDIYQDY TQDSFSIQDG NSQYCDSSGF
121 ILTKDQPVTA NMYFDSGNPA PSTTSQQANS QSTPEPSPSQ TFPESVVAEK QYFIEKLTAT
181 IWKNLSNPEM TSGSDKINYT YMLTRCIQAC KTNPEYIYAP LKEIPPADIP KNKKLLTDGY
241 ACEVRCQNIY LTTGYAGSKN GSRDRATELA VKLLQKRIEV RVVRRKFKHT FGEDLVVCQI
301 GMSSYEFPPA LKPPEDLVVL GKDASGQPIF NASAKHWNF VITENANDAI GILNNSASFN
361 KMSIEYKYEM MPNRTWRCRV FLQDHCLAEG YGTTKTSKHA AADEALKILQ KTQPTYPSVK
421 SSQCHTSSP RSGGKKKDIK DLVVYENSSN PVCTLNDTAQ FNRMTVEYVY ERMTGLRWKC
481 KVILESEVIA EAVGVKKTVK YEAAAGEAVKT LKKTQPTVIN NLKKGAVEDV ISRNEIQGRS
541 AEEAYKQQIK EDNIGNQLLR KMGWTGGGLG KSGEGIREPI SVKEQHKREG LGLDVERVNK
601 IAKRDIEQII RNYARSESHT DLTFSSRELTN DERKQIHQIA QKYGLKSKSH GVGHDYRLV
661 GRKRRKEDLL DQLKQEGQVG HYELVMPQAN

```

### 5.2.3 Sequenz von JKTBP1

#### Codierende Sequenz von JKTBP1:

```

1 ATGGAGGATA TGAACGAGTA CAGCAATATA GAGGAATTCG CAGAGGGATC CAAGATCAAC
61 GCGAGCAAGA ATCAGCAGGA TGACGGTAAA ATGTTTATTG GAGGCTTGAG CTGGGATACA
121 AGCAAAAAAG ATCTGACAGA GTACTTGTCT CGATTTGGGG AAGTTGTAGA CTGCACAATT
181 AAAACAGATC CAGTCACTGG GAGATCAAGA GGATTTGGAT TTGTGCTTTT CAAAGATGCT
241 GCTAGTGTG ATAAGTTTTT GGAAGTAAA GAACACAAAC TGGATGGCAA ATTGATAGAT
301 CCCAAAAGGG CCAAAGCTTT AAAAGGGAAA GAACCTCCCA AAAAGGTTTT TGTGGGTGGA
361 TTGAGCCCG ATACTTCTGA AGAACAATTT AAAGAATATT TTGGAGCCTT TGAGAGATT
421 GAAAATATTG AACTTCCCAT GGATACAAA ACAATGAAA GAAGAGGATT TTGTTTTATC
481 ACATATACTG ATGAAGAGCC AGTAAAAAAA TTGTTAGAAA GCAGATACCA TCAAATGGT
541 TCTGGGAGT GTGAAATCAA AGTGCACAA CCCAAAGAGG TATATAGGCA GCAACAGCAA

```

```

601 CAACAAAAG GTGGAAGAGG TGCTGCAGCT GGTGGACGAG GTGGTACGAG GGGTCGTGGC
661 CGAGGTCAGG GCCAAAAGTGA GAACCAAGGA TTTAATAACT ATTATGATCA AGGATATGGA
721 AATTACAATA GTGCCTATGG TGGTGATCAA AACTATAGTG GCTATGGCGG ATATGATTAT
781 ACTGGGTATA ACTATGGGAA CTATGGATAT GGACAGGGAT ATGCAGACTA CAGTGGCCAA
841 CAGAGCACTT ATGGCAAGGC ATCTCGAGGG GGTGGCAATC ACCAAAACAA TTACCAGCCA
901 TACTAA

```

### Proteinsequenz von JKTBP1:

```

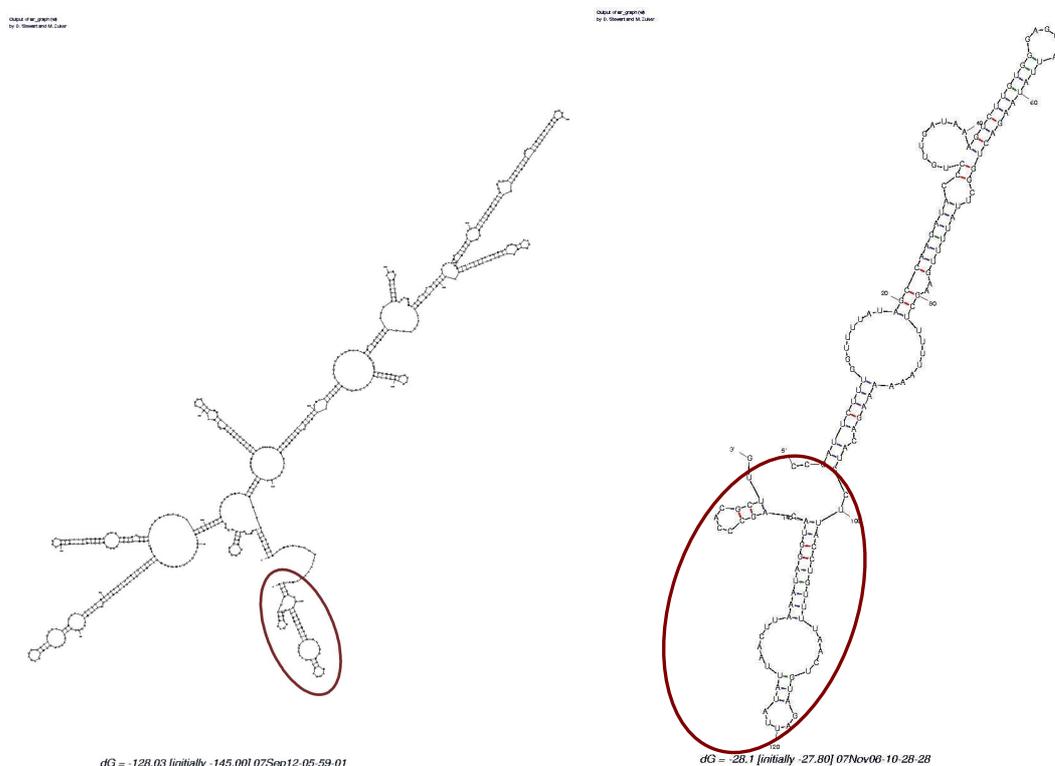
1  MEDMNEYSNI EEFAEGSKIN ASKNQDDGK MFIGGLSWDT SKKDLTEYLS RFGEVVDCTI
61  KTDPTVGRSR GFGFVLFKDA ASVDKVLLEK EHKLDGKLID PKRAKALKGK EPPKKVAVGG
121 LSPDTSEEQI KEYFGAFGEI ENIELPMDTK TNERRGFCFI TYTDEEPVKK LLESRYHQIG
181 SGKCEIKVAQ PKEVYRQQQQ QQKGGRGAAA GGRGGTRGRG RGQGQWNQOG FNNYDQGYG
241 NYSAYGGDQ NYSYGGYDY TGYNYGNYGY GQYADYSQO QSTYKASRG GGNHQNNYQP
301 Y

```

## 5.3 Strukturvorhersagen

### 5.3.1 Strukturvorhersage des vollständigen und minimalen NRF-IRES-Elements

Die Struktur der vollständigen 5'UTR von NRF (links) und des minimalen IRES-Element (rechts, Basen 501-653) wurde mit MFOLD vorhergesagt, in beiden Strukturen sind die stabilen Haarnadeln am 3'Ende der UTR umkreist.

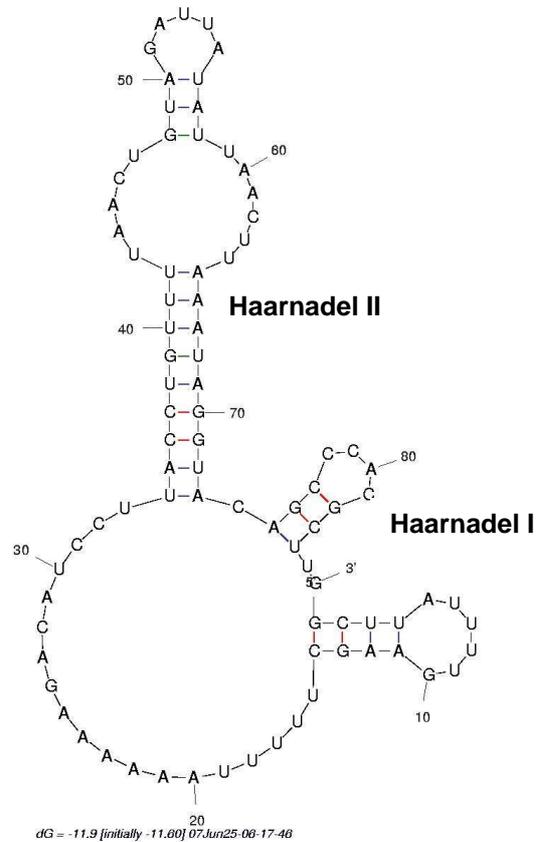


### 5.3.2 Strukturvorhersage der Basen 568-653 des minimalen NRF-IRES-Elements

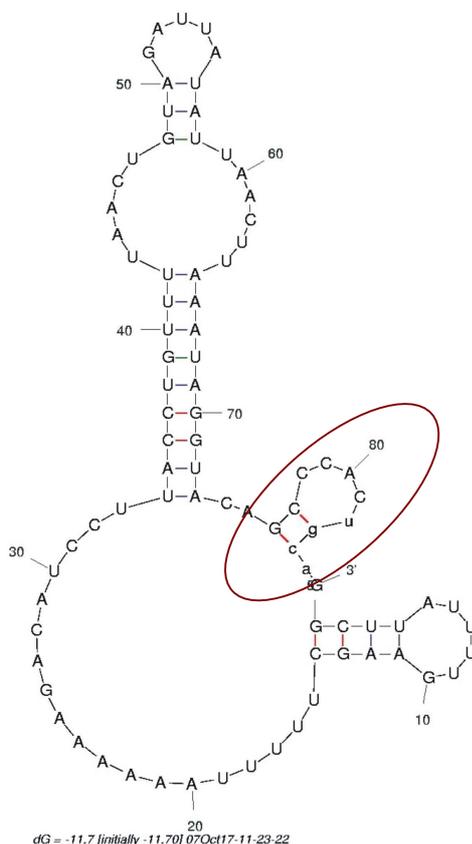
Hier ist die Strukturvorhersage der Basen 568 bis 653 des minimalen NRF-IRES-Elements durch MFOLD dargestellt, die Haarnadeln I und II wurden vorhergesagt, die Haarnadel III liegt in dieser Vorhersage nicht vor (**A**).

Die Einführung der Punktmutationen 649-652 (GCUU in ugca) führt auch in der Vorhersage zur Veränderung der Haarnadel I (Pst, **Abb. 2.15**) (**B**), diese Vorhersage konnte experimentell bestätigt werden (**Abb. 2.2**). Durch eine weitere Mutation wurde die Haarnadel I wieder hergestellt (AGC in gca), jedoch mit anderer Sequenz (CG, **Abb. 2.15**) (**C**).

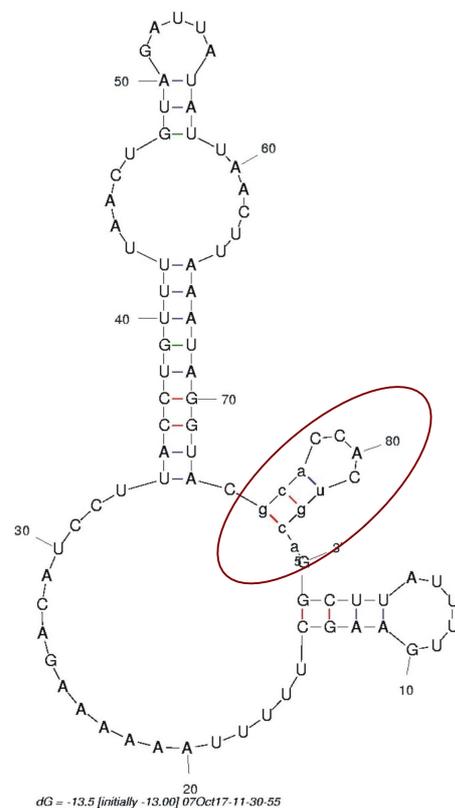
**A**



**B**

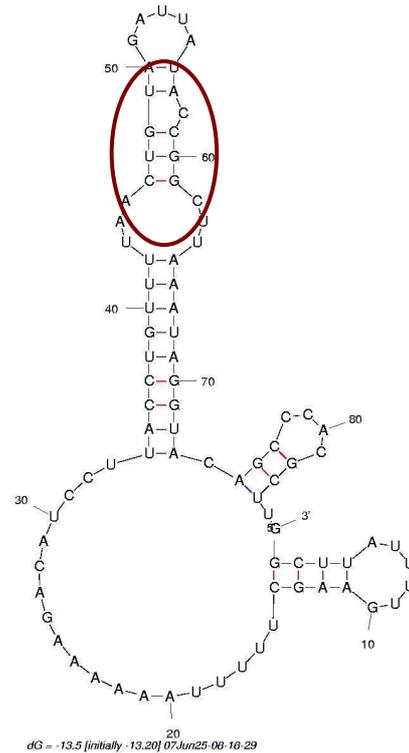


**C**



Die Einführung von vier Punktmutationen in die Haarnadel II (Msp, 625-628, UUAA in ccgg) verändert die Sekundärstruktur in diesem Bereich (D).

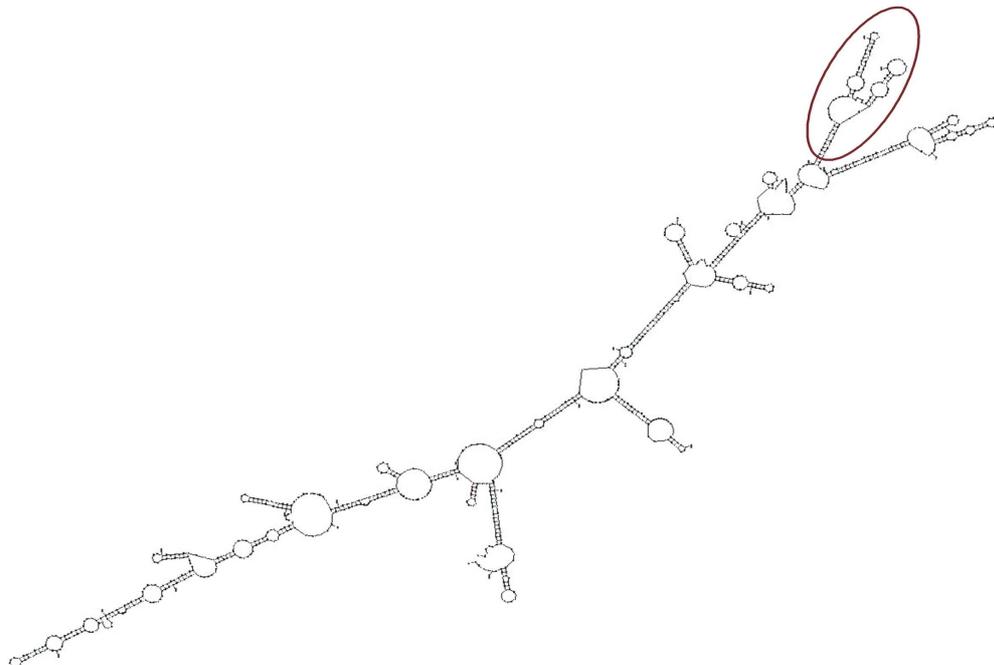
D

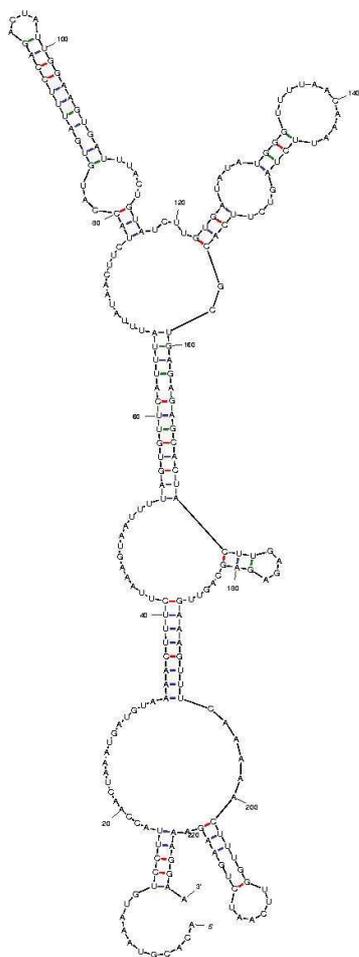
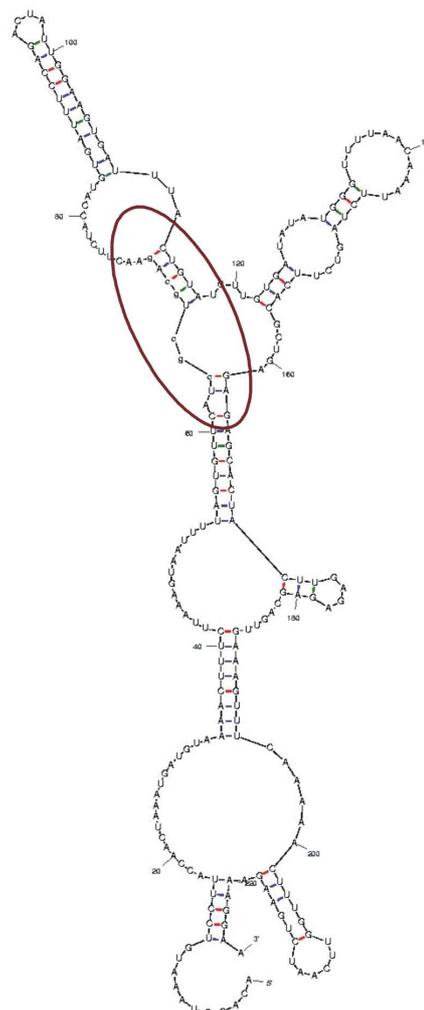


### 5.3.3 Strukturvorhersage der 3'UTR von NRF

Die gesamte 3'UTR von NRF bildet ein Reihe von Sekundärstrukturen aus (E), der Abschnitt, an den eine Bindung von JKTBP1 gezeigt wurde (3194-3416) (Abb. 2.10), ist umkreist.

E



**F** $dG = -37.23$  [initially -43.10] 07Sep12-05-53-59**G** $dG = -38.57$  [initially -45.20] 07Oct17-03-14-39

Die Strukturvorhersage dieses 3'UTR-Abschnitts (3194-3416) führt zur gleichen Struktur wie in der gesamten UTR (**F**). Die Mutation des AU-reichen Elements Klasse II (TTATTTATA in TcgcTcgAg) in diesem Abschnitt führt auch zur Veränderung der Sekundärstruktur in einem begrenzten Bereich (**G**).

---

## LEBENS LAUF

### **Persönliche Angaben:**

Name: Marc Reboll  
Geburtstag/-ort: 25. Januar 1980 in Münster  
Staatsangehörigkeit: deutsch

### **Schulbildung:**

06/1999: Abitur am Gymnasium Arnoldinum in Steinfurt

### **Zivildienst:**

07/1999 – 07/2000: Betreuer in den Behindertenwerkstätten Steinfurt

### **Hochschulausbildung:**

10/2000 – 08/2002: Universität Hannover: Grundstudium Biochemie (Diplom)

09/2002: Vordiplom

Seit 10/2002: Hauptstudium Biochemie

04/2005: Diplomprüfungen Biochemie

04/2005 – 10/2005: Diplomarbeit am Institut für Pharmakologie (MHH) in der Gruppe von Frau Dr. Mahtab Nourbakhsh

seit 03/2006: Promotion am Institut für Pharmakologie (MHH) in der Gruppe von Frau Dr. Mahtab Nourbakhsh

Titel der Dissertation: Die Translationsregulation des Transkriptionsfaktors NRF

### **Zusatzqualifikationen:**

10/2004 – 07/2005: Qualifikationsprogramm „Mit Leibniz zu Bahlsen“ an der Universität Hannover

Hannover, 13.12.2007

## Liste der Publikationen

**Reboll, M.R., Oumard, A., Gazdag, A.C., Renger, I., Ritter, B., Schwarzer, M., Hauser, H., Wood, M., Yamada, M., Resch, K., and Nourbakhsh, M.** (2007). NRF IRES activity is mediated by RNA binding protein JKTBP1 and a 14-nt RNA element. *RNA*, **13**, 1328-1340.

**Reboll, M. R., Renger, I., Ritter B., Schwarzer, M., Resch, K., Nourbakhsh, M.** NRF IRES activity is mediated by RNA binding protein JKTBP1 and a 14 nt RNA element  
10th Joint Meeting of the Signal Transduction Society (STS), November 2-4, 2006 - Weimar  
(poster presentation)

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Dissertation selbstständig angefertigt und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet zu haben. Diese Arbeit wurde bisher nicht an einer anderen Universität oder einem anderen Fachbereich als Dissertation eingereicht. Weiterhin erkläre ich, dass die Dissertation nicht als Diplomarbeit oder ähnliche Prüfungsarbeit benutzt wurde.

Hannover, den 13.12.2007

(Marc Reboll)

## Danksagungen

Mein erster Dank gilt meiner Betreuerin PD Dr. Mahtab Nourbakhsh: Liebe Mahtab, ich danke Dir für Deine hervorragende Betreuung während der vergangenen Jahre. Deine vielen Anregungen und Deine tolle Unterstützung haben mir sehr geholfen und wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bei Herrn PD Dr. Ralf Gerhard bedanke ich mich für die freundliche und sofortige Übernahme des Koreferats. Herzlichen Dank auch an Herrn Prof. Klaus Resch für die Finanzierung dieser Arbeit und die Chance, am Institut für Pharmakologie promovieren zu können.

Die Atmosphäre in der gesamten Arbeitsgruppe war einfach toll und sehr entspannt: Birgit und Regina, vielen Dank für die gute Labor-Organisation und die Beantwortung all meiner Fragen – Birgit, ich weiß, ich habe Dich damit traktiert!

Meinen Mitstreitern Sascha und Myriam danke ich für die schöne Doktoranden-Zeit – für die fachliche Diskussion meiner Daten und für die Gespräche über Gott und die Welt.

Ein großes Dankeschön geht an Deike für die Etablierung der RNA-Transfektion, die Durchführung der Northern Blot Experimente und vor allem für das ausgesprochen gute Teamwork – gleiches gilt für Isabelle und ihre bicistronischen Reportergergen-Experimente.

Ich bedanke mich bei Aniko für die Herstellung der monocistronischen Reportergergenplasmide, ihre nette Art und ihren wirklich leckeren Kuchen. Ein herzliches Danke an Sarah für die Durchführung der monocistronischen Reportergergen-Experimente, für gute Laune und flache Witze.

Nicht vergessen möchte ich unsere Zivis Julian und Johannes – Ihr habt mich sehr unterstützt, vor allem in GVO-Angelegenheiten. Vielen Dank auch an Anke fürs Treppensteigen nach der Mensa sowie an Sabrina und Manuela für ihre Hilfe im Labor.

Ich hatte mit allen von Euch eine schöne Zeit!