

**Identifizierung und Charakterisierung von VEGF-mRNA-  
bindenden Proteinen und ihr Einfluss auf die Translation der  
VEGF-mRNA in MCF-7-Zellen unter Hypoxie**

**Dissertation**

zur Erlangung des  
Doktorgrades der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

**Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften -**

**der Martin-Luther-Universität**

**Halle-Wittenberg,**

vorgelegt

**von Herrn Sebastian de Vries**

**geboren am 13.02.1981 in Norden**

Gutachter

Prof. Dr. Antje Ostareck-Lederer

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Peter Sarnow

Halle (Saale), den 27.10.2014

# Inhaltsverzeichnis

	Seite
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Die Bedeutung von Hypoxie in der Tumorangiogenese	1
1.1.1. Hypoxie	1
1.1.2. MCF-7-Zellen als Brustkrebs-Modellsystem	2
1.1.3. Modulatoren der Angiogenese	3
1.2. Die Biologie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF)	4
1.2.1. Funktionen von VEGF im Organismus	4
1.2.2. Struktur des VEGF-Gens und Eigenschaften der VEGF-Isoformen	6
1.2.3. VEGF-Rezeptoren	7
1.3. Mechanismen der Translationsregulation unter Hypoxie	9
1.3.1. Die 5'Cap-abhängige Initiation der Translation	9
1.3.2. Die 5'Cap-unabhängige Initiation der Translation	10
1.3.3. Mechanismen der Translationsregulation unter Hypoxie	12
1.4. VEGF-Expression unter Hypoxie	13
1.4.1. Die HIF-1-abhängige Transkription von VEGF	13
1.4.2. Die Stabilisierung der VEGF-mRNA unter Hypoxie	14
1.4.3. Die Translation der VEGF-mRNA	16
1.5. Zielstellung	19
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>20</b>
2.1. Klonierung	20
2.2. Zellkultur	20
2.2.1. Kultivierung und Kryokonservierung von MCF-7-Zellen	20
2.2.2. Hypoxie-Behandlung von MCF-7-Zellen	21
2.2.3. SiRNA-Transfektion von MCF-7-Zellen	21
2.2.4. <i>Tube formation assay</i>	22
2.3. Herstellung von Lysaten und cytoplasmatischen Extrakten	22
2.3.1. Präparation von Gesamtzelllysat	22
2.3.2. Nukleus-Cytoplasma-Fraktionierung	23
2.3.3. Herstellung translations-kompetenter, cytoplasmatischer Extrakte	23
2.3.4. Herstellung von Lysaten für die Polysomen-Fraktionierung	24
2.4. Bestimmung von Protein- und Nukleinsäurekonzentrationen	25
2.4.1. Quantifizierung von Gesamtprotein	25

2.4.2. Quantifizierung von Nukleinsäuren	25
2.5. Gelelektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren	26
2.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
2.5.2. Silberfärbung von SDS-Gelen	26
2.5.3. Agarose-Gelelektrophorese	27
2.6. Immunologische Methoden	28
2.6.1. Western blot	28
2.6.2. Immunfluoreszenz und Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung ( <i>FISH</i> )	29
2.6.3. ELISA ( <i>enzym-linked immuno-sorbent assay</i> )	29
2.6.4. Immunopräzipitation	30
2.7. RNA-basierte Methoden	31
2.7.1. RNA-Präparation und DNase-Behandlung	31
2.7.2. Reverse Transkription	32
2.7.3. RT-PCR	33
2.7.4. qRT-PCR	33
2.7.5. Stabilitäts-Bestimmung endogener mRNAs	36
2.8. <i>in vitro</i> -Transkription	36
2.9. <i>in vitro</i> -Translation	38
2.9.1. <i>Micrococcus</i> Nuklease-Behandlung von cytoplasmatischen Extrakten	39
2.9.2. Bestimmung der Reporter-RNA-Stabilität	39
2.10. RNA-Affinitäts-Reinigung (Tobramycin-Reinigung)	40
2.10.1. Herstellung der Tobramycin-Matrix	40
2.10.2. Durchführung der RNA-Affinitäts-Reinigung	41
2.10.3. Massenspektrometrische Analyse	41
2.11. Tobramycin-basierter Protein-RNA-Interaktions-Assay	42
2.12. Polysomen-Analyse	43
2.12.1. RNA-Präparation aus Fraktionen der Polysomen-Analyse	43
2.12.2. Reverse Transkription, RT-PCR und qRT-PCR für die mRNA- Verteilungsanalyse im Polysomengradienten	44
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>45</b>
3.1. Die zelluläre Antwort von MCF-7-Zellen auf hypoxische Bedingungen	45
3.2. Etablierung eines MCF-7-Zell-basierten <i>in vitro</i> -Translationssystems	48

3.2.1. VEGF-5'UTR-vermittelte Translation in cytoplasmatischem MCF-7-Zell-Extrakt	49
3.2.2. Der Einfluss der VEGF-3'UTR auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation <i>in vitro</i>	51
3.3. Einsatz der Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie zur Identifizierung VEGF-mRNA-interagierender Proteine	53
3.4. Die Rolle von DDX6 in der VEGF-Expression	59
3.4.1. DDX6 interagiert direkt mit der VEGF-5'UTR	65
3.4.2. DDX6 reprimiert spezifisch die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation der VEGF-mRNA	66
3.4.3. Die Stabilität der VEGF-mRNA bleibt unter Hypoxie von der Reduktion der DDX6-Menge unbeeinflusst	67
3.4.4. DDX6 beeinflusst die VEGF-mRNA-Translation <i>in vivo</i>	68
3.4.5. Der <i>knock down</i> von DDX6 erhöht die VEGF-Produktion <i>in vivo</i>	72
3.4.6. Die durch DDX6-knock down vermittelte Steigerung der VEGF-Mengen hat einen physiologischen Effekt im <i>Tube formation assay</i>	73
<b>4. Zusammenfassung und Diskussion</b>	<b>74</b>
4.1. Zur zellulären Antwort von MCF-7-Zellen auf hypoxische Bedingungen	74
4.2. Zur Etablierung eines MCF-7-basierten <i>in vitro</i> -Translationssystems	76
4.2.1. Zum Nachweis der VEGF-5'UTR-vermittelten Translation <i>in vitro</i>	77
4.2.2. Zum Einfluss der VEGF-3'UTR auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation	78
4.3. Zur Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie	79
4.4. Zur Rolle von DDX6 in der VEGF-Expression	85
4.4.1. Zur Interaktion von DDX6 mit der VEGF-5'UTR	87
4.4.2. Zum Einfluss von DDX6 auf die VEGF-IRES-vermittelte Translation <i>in vitro</i>	89
4.4.3. Zur VEGF-mRNA-Stabilität unter Hypoxie	89
4.4.4. Zur VEGF-mRNA-Translation <i>in vivo</i>	90
4.4.5. Zum Einfluss von DDX6 auf die VEGF-Produktion <i>in vivo</i>	91
4.5. Zusammenfassung und Ausblick	93

<b>5. Referenzen</b>	<b>95</b>
<b>6. Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>118</b>

## **7. Anhang**

**Tabelle A.1:** Übersicht über die verwendeten Plasmide und deren Klonierung

**Tabelle A.2:** DNA-Oligonukleotide zur Klonierung

**Tabelle A.3:** DNA-Oligonukleotide zur DNA-Sequenzierung

**Tabelle A.4:** Antikörper für Western blot-Analysen und ELISA

**Tabelle A.5:** DNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

**Tabelle A.6:** Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen in MCF-7-Zellen

**Tabelle A.7:** Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen

**Abbildung A.1:** His-hnRNP K interagiert direkt mit der VEGF-mRNA-3'UTR

**Abbildung A.2:** Nachweis von hnRNP K- und AUF-1-*knock down* mittels  
Western blot

**Abbildung A.3:** Nachweis des DDX6-*knock downs* mittels Western blot

**Abbildung A.4:** Etablierung der *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung von  
translations-kompetenten, cytoplasmatischen MCF-7-Zell-  
Extrakten

**Abbildung A.5:** Einfluss der 5'Cap-Struktur auf die *in vitro*-Translation von Reporter-  
RNAs in *Micrococcus*-Nuklease-behandeltem, cytoplasmatischen  
MCF-7-Zellextrakt

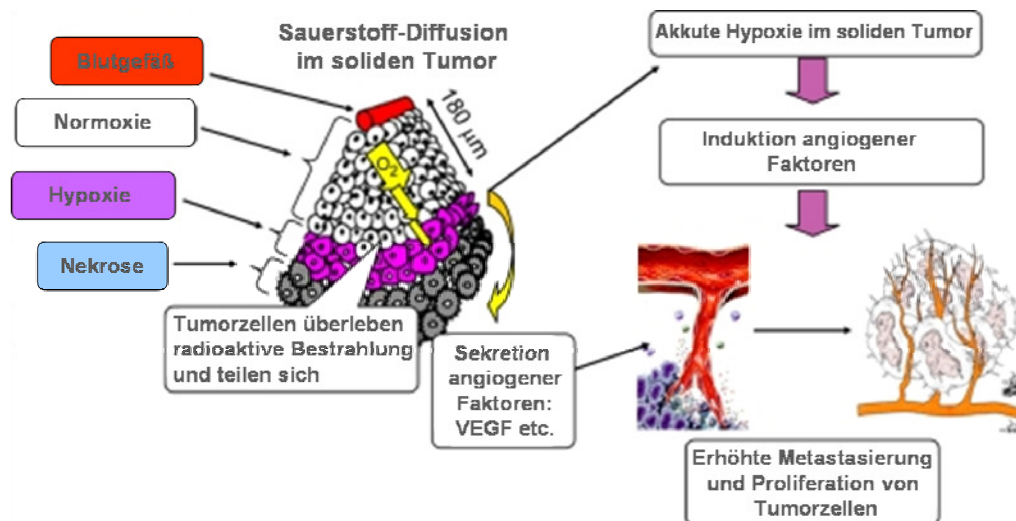
# 1. Einleitung

## 1.1 Die Bedeutung von Hypoxie in der Tumorangiogenese

### 1.1.1 Hypoxie

In tierischen Zellen dient Sauerstoff als terminaler Elektronen-Akzeptor der mitochondrialen Elektronentransportkette. Damit ist Sauerstoff für die zelluläre Energie-Konservierung von entscheidender Bedeutung. Als Hypoxie wird die unzureichende Sauerstoffversorgung von Zellen und Geweben bezeichnet (Wheaton und Chandel 2010). Bei isolierten Zellen findet eine Hypoxie-Antwort bei einer Umgebung-Sauerstoffkonzentration von <1 bis 3% statt (Schumacker *et al.* 1993, Budinger *et al.* 1996). Stark ATP-verbrauchende Prozesse, wie die mRNA-Translation oder die Aktivität ATP-abhängiger Ionen-Kanäle, werden hierbei herabgesetzt (Pettersen *et al.* 1986).

*In vivo* weisen Tumorgewebe häufig geringere Sauerstoff-Konzentrationen auf als die entsprechenden nicht-entarteten Gewebe. Die Ursache hierfür wird in der meist unzureichenden Vaskularisierung der Tumore gesehen (Vaupel *et al.* 1989, Knowles und Harris 2001, van den Beucken *et al.* 2006, Gardner und Corn 2008, Bennewith und Dedhar 2011). Nicht vollständig ausgereifte Blutgefäße, eine zu große Entfernung zum Blutgefäß, aber auch Änderungen im Tumorstoffwechsel können zu temporären oder anhaltenden hypoxischen Arealen im Tumor führen (Furuya *et al.* 2009). Bereits bei einer Entfernung von >180µm zwischen Blutgefäß und Tumorzelle kommt es zu einer akuten Hypoxie-Antwort (Abbildung 1.1). Im Rahmen einer Anpassung erfolgen die Umstellung des Energie-Stoffwechsels auf eine sauerstoffunabhängige Umsetzung von Nährstoffen und die Wiederherstellung einer ausreichenden Sauerstoffversorgung durch Angiogenese parallel (Chen *et al.* 2009).



**Abbildung 1.1: Unzureichende Tumor-Vaskularisierung führt zu Hypoxie im Tumorgewebe**

Hypoxische Tumorzellen zeigen eine Induktion angiogener Faktoren. Die verbesserte Vaskularisierung erhöht die Proliferation der Tumorzellen sowie die Möglichkeit des Tumors zur Metastasierung. Abbildung modifiziert nach Chen *et al.* 2009.

### 1.1.2 MCF-7-Zellen als Brustkrebs-Modellsystem

Brustkrebs (Mamakarzinom) ist in Deutschland die häufigste Krebserkrankung bei Frauen. Hierbei handelt es sich um einen bösartigen Tumor der Brustdrüse. Die Zahl der Neuerkrankungen betrug im Jahr 2008 mehr als 70.000 (Robert Koch-Institut 2012). Aufgrund der großen Heterogenität der Tumore gibt es keine einheitlich wirksame Therapieform. Es gibt unterschiedliche Ansätze, die Brustkrebsarten zu klassifizieren und somit eine bestmögliche Therapie zu ermöglichen. Hierzu zählen die Eigenschaft zur Bildung von Lymphknotenmetastasen, die Histologie des Tumorgewebes, Mutationen in bestimmten Genen, sowie die Expression von Protoonkogenen, östrogen-induzierbaren Genen und Steroid- und Wachstumshormon-Rezeptoren (Sørli *et al.* 2001). Die bedeutendsten molekularen Marker sind der Östrogen-Rezeptor (ER), der Progesteron-Rezeptor (PgR) und der humane epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor 2 (HER2) (Geyer *et al.* 2012).

Neben HER2 wird der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) als Ziel einer gerichteten Anti-Tumor-Therapie in vielen Studien untersucht (Wicki und Rochlitz 2012). VEGF ist in verschiedenen Brustkrebsarten höher exprimiert als in entsprechenden nicht entarteten Geweben (Brown *et al.* 1995). Die produzierte VEGF-Menge wurde in mehreren Studien als prognostischer Marker für die Schwere einer Brustkrebserkrankung herangezogen (Price *et al.* 2001). Das Voranschreiten der Erkrankung konnte in diesen

Studien zum Teil durch die Verabreichung eines monoklonalen VEGF-Antikörpers (Bevazizumab) gehemmt werden (Wicki und Rochlitz 2012). Vergleichende Untersuchungen zwischen Brustkrebsbiopsien und benachbartem nicht-entarteten Gewebe ergab eine ca. 7-fach höhere VEGF-mRNA-Menge und eine stärker ausgeprägte immunhistologische VEGF-Färbung des Tumorgewebes (Yoshiji *et al.* 1996).

Aufgrund der großen Heterogenität von Brustkrebserkrankungen gibt es auch eine Vielzahl an Zellsystemen, um diese Erkrankungen molekularbiologisch zu untersuchen. Zu den am häufigsten verwendeten Zelllinien gehören die MCF-7-Zellen (Neve *et al.* 2006). MCF-7-Zellen entstammen der pleuralen Effusion einer 69-jährigen Patientin mit metastasierendem Adenokarzinom (Soule *et al.* 1973). Sie zeigen ein epithelartiges, einschichtiges Wachstum mit einer Verdopplungszeit von *circa* 50 Stunden (DSMZ). MCF-7-Tumorzellen sind nach heutiger Nomenklatur klassifiziert als invasive Ductus-Karzinom (IDC)-Zellen (Lacroix und Leclercq 2004). Sie exprimieren den Östrogenrezeptor (Brooks *et al.* 1973) und ihr Wachstum wird durch Tamoxifen, einem Antiöstrogen inhibiert (Lippmann *et al.* 1975). Außerdem werden die Progesteron- und Androgen-Rezeptoren sowie die VEGF-Rezeptoren 1 und 2 von MCF-7-Zellen exprimiert (Horwitz *et al.* 1975, Lee *et al.* 2007). HER2 ist in Wildtyp-MCF-7-Zellen nicht überexprimiert (Benz *et al.* 1992).

Eine konstitutive Überexpression von VEGF in der Brustkrebszelllinie MCF-7 korrelierte mit einer verstärkten Vaskularisierung des Tumors im Nacktmausmodell verglichen mit Wildtyp- Zellen (Zhang *et al.* 1995). Zudem reagieren MCF-7-Zellen auf Hypoxie mit erhöhter VEGF-Produktion (Maity *et al.* 2001).

### **1.1.3 Modulatoren der Angiogenese**

Bei der Bildung neuer Blutgefäße unterscheidet man die Vaskulogenese, die Differenzierung und Proliferation von (Vorläufer-) Endothelzellen zu einem tubulären Netzwerk, von der Angiogenese, bei der durch Verzweigung bestehender Blutgefäße neue Gefäße gebildet werden (Yancopoulos *et al.* 2000). Die Angiogenese ist insbesondere in der Embryogenese von Bedeutung. Im adulten Organismus spielt sie unter anderem in der Wundheilung eine Rolle.

Die Angiogenese ist ein diffizil regulierter Prozess, in dem eine Vielzahl von angiogenen Signalen koordiniert werden. Zunächst werden bestehende Blutgefäße durch die Tie2-



vermittelte Wirkung von Angiotensin 2 (Ang2) destabilisiert. Während TGF- $\beta$  an der Umstrukturierung der extrazellulären Matrix beteiligt ist, trägt VEGF zur Permeabilisierung der Blutgefäße bei. Des Weiteren stimuliert VEGF die Proliferation und Migration der freigesetzten Endothel-Zellen. Weiterhin wird die Proliferation der Endothel-Zellen durch FGFs (*fibroblastic growth factor*) und EGF (*epidermal growth factor*) gefördert. Die verstärkte Expression von Cadherinen und den Ephrinen B2 und B4 führt zu verstärkten Zell-Zell-Kontakten. Die konzertierte Aktion von FGF, PDGFs (*platelet-derived growth factor*), TNF- $\alpha$  und Ephrin 2A fördert dann die Ausbildung von tubulären Strukturen, die in der Folge reifen und stabilisiert werden (Papetti und Herman 2002).

Die Tumor-Vaskulatur zeichnet sich gegenüber einer physiologischen Vaskulatur durch stetige Umstrukturierungen und unreife Blutgefäße aus. Es erfolgt keine Differenzierung zu Venen, Arterien oder Kapillaren. Die Gefäße weisen häufig keine intakte Basalmembran sowie interzelluläre Lücken auf, die den Austritt von Flüssigkeit erlauben, oder sind verengt (Papetti und Herman 2002). Die daraus resultierende (temporäre) Hypoxie des Tumors führt zu einer erhöhten Produktion von VEGF (Carmeliet 2005). Vermutlich geht die hohe Dynamik der Tumolvaskulatur auch auf die Überproduktion von VEGF und die Dysregulation weiterer pro- und anti-angiogener Faktoren zurück (Bergers und Benjamin 2003).

## **1.2 Die Biologie des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors (VEGF)**

VEGF gehört zu einer Familie von Wachstumsfaktoren, die Funktionen in der Bildung und Aufrechterhaltung von Blut- und Lymphgefäßen besitzen. VEGF wurde ursprünglich als von Tumorzellen sezernierter „vaskulärer Permeabilitäts-Faktor“ (VPF) beschrieben (Senger *et al.* 1983). Neben VEGF-A (im Folgenden als VEGF bezeichnet), sind die weiteren Mitglieder dieser Genfamilie VEGF-B bis -F sowie PlGF (plazentaler Wachstumsfaktor).

### **1.2.1 Funktionen von VEGF im Organismus**

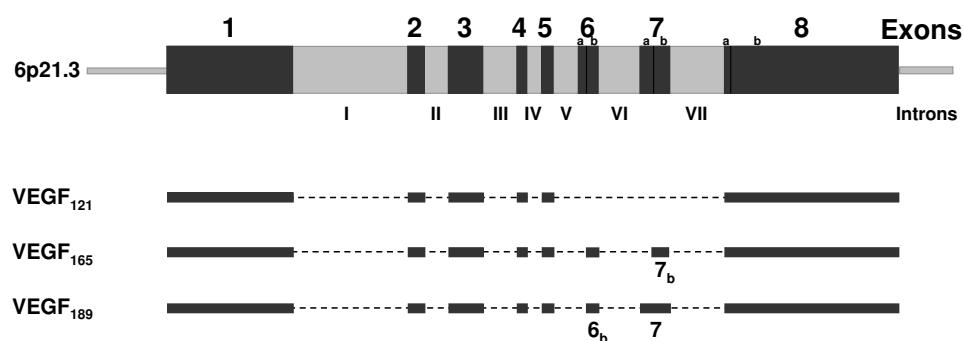
VEGF wird als homodimeres Glykoprotein von einer Vielzahl von Zelltypen sezerniert. Der homozygote *knock out* von VEGF führt bei Mäusen zu einem Absterben der Embryonen an Tag E8-E9 aufgrund schwerer Defekte in der Bildung von Blutgefäßen und

der Entwicklung von Endothelzellen (ECs) (Ferrara 2003). Die Deletion eines VEGF-Allels führt in der Maus zwischen den Tagen 11 und 12 der embryonalen Entwicklung zum Tod. Man findet Defekte in der Organ-Vaskularisierung und eine reduzierte Zahl kernhaltiger roter Blutzellen in den Blutinseln (Carmeliet *et al.* 1996, Ferrara *et al.* 1996). Eine Neutralisierung von VEGF in den ersten Tagen (Tag 1-8) nach der Geburt führt zu einem Wachstumsstillstand, zu Nierenversagen und letztlich zum Tod (Gerber *et al.* 1999a). Funktionen in der Regulation des Knochenwachstums wurde bei 24 Tage alten Mäusen gezeigt. Die Neutralisierung von VEGF führte hier zu einer fast vollständig unterdrückten Vaskularisierung der Epiphysenfuge (Gerber *et al.* 1999b). Des Weiteren gibt es Hinweise auf Funktionen von VEGF beim Follikel-Wachstum und der Entwicklung des Gelbkörpers, bei der Regeneration von Geweben, als Überlebenssignal für hämatopoetische Stammzellen und bei der Regulation der Erythropoetin-Produktion (Yamamoto *et al.* 1997, Brown *et al.* 1992, Katoh *et al.* 1995, Tam *et al.* 2006). Aber auch bei einer Vielzahl pathologischer Prozesse wurde eine Beteiligung von VEGF festgestellt. So zeigen beispielsweise einige Tumore eine erhöhte VEGF-Expression und Sensitivität gegenüber einer Anti-VEGF-Therapie. Entzündungsprozesse und unterschiedliche Erkrankungen werden ebenfalls mit erhöhter VEGF-Produktion in Verbindung gebracht (Ho und Kuo 2007). Des Weiteren spielt VEGF aber auch eine Rolle im Wachstum von Brustkrebszellen (Yoshiji *et al.* 1997, Liang *et al.* 2006) und in der Unterdrückung der Apoptose (Pidgeon *et al.* 2001, Barr *et al.* 2008).

Während VEGF seine Hauptfunktionen in der Bildung und Aufrechterhaltung des Blutgefäßsystems besitzt, ist die Funktion von VEGF-B nicht geklärt (Li *et al.* 2012). Die rekombinante Expression von VEGF-B im Ratten-Herzen führte jedoch unter anderem zu einer verstärkten Ausbildung der Koronar-Arterie und zu einer Änderung des myocardialen Stoffwechsels von Fettsäure- hin zur Glucose-Verwertung (Kivelä *et al.* 2014, Bry *et al.* 2010). VEGF-C und -D spielen vor allem in der Lymphangiogenese eine Rolle (Karatzanis *et al.* 2012). PlGF wurde zunächst in der Plazenta, später jedoch auch im Herzen und der Lunge, nachgewiesen. Bisherige Erkenntnisse deuten darauf hin, dass PlGF vor allem unter pathologischen Bedingungen einen Effekt auf Endothelzellen besitzt (Otrock *et al.* 2007). Bei VEGF-E und VEGF-F handelt es sich um Vertreter der VEGF-Familie, die im Genom des Parapoxvirus ORF-Virus (Lyttle *et al.* 1994) beziehungsweise in Schlangengift (Yamazaki *et al.* 2005) entdeckt wurden.

### 1.2.2 Struktur des VEGF-Gens und Eigenschaften der VEGF-Isoformen

Das VEGF-Gen ist beim Menschen auf dem chromosomalen Locus 6p21.3 lokalisiert (Vincenti *et al.* 1996). Die VEGF-prä-mRNA ist ca. 14kb lang und setzt sich aus 8 Exons und 7 Introns zusammen. Durch alternatives *Splicing* entstehen verschiedene mRNA-Varianten (Tischer *et al.* 1991). Abbildung 1.2 zeigt die Intron-Exon-Struktur des humanen VEGF-Gens und die drei in MCF-7-Zellen quantitativ bedeutsamsten mRNA-Splice-Varianten VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub>. Weitere nachweisbare VEGF-mRNA-Isoformen sind VEGF<sub>145</sub> und VEGF<sub>183</sub>. VEGF<sub>206</sub> ist in MCF-7-Zellen nicht nachweisbar (Stimpfl *et al.* 2002).



**Abbildung 1.2: Struktur des humanen VEGF-Gens und der drei häufigsten Transkripte in MCF-7-Zellen.**

Oben: das VEGF-Gen; 6p21.3 bezeichnet den chromosomalen Locus; dunkelgrau: Exons (1-8); hellgrau: Introns (I-VII). Unten: die häufigsten mRNA-Splice-Varianten in MCF-7-Zellen sind VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub>; die tiefgestellten Zahlen bezeichnen die Anzahl der durch die mRNA kodierten Aminosäuren (nach der Spaltung des Signalpeptids).

Die Exons 1 bis 5 und das Exon 8 kommen in allen VEGF-mRNA-Isoformen vor. Das Exon 1 kodiert hauptsächlich für die 5'untranslatierte Region (5'UTR) der reifen VEGF-mRNA und das Signal-Peptid. In den Exons 2 bis 5 sind die Regionen des VEGF-Proteins kodiert, die mit den VEGF-Rezeptoren interagieren. Die Exons 6 und 7 kodieren für 2 separate Heparin-bindende Domänen, wobei beide Exons in selteneren Isoformen auch verkürzt vorkommen können. Der 3'untranslatierte Bereich (3'UTR) der VEGF-mRNA ist ausschließlich im Exon 8 lokalisiert (Tischer *et al.* 1991). Neuere Untersuchungen deuten auf eine noch komplexere Intron-Exon-Struktur hin. Hiernach sind in den Exons 6, 7 und 8 zusätzliche alternative Stellen für *Splicing* enthalten (Woolard *et al.* 2009).

Die aus der Translation der VEGF-mRNA-Varianten resultierenden Proteine unterscheiden sich sowohl in ihrem angiogenen Potential, das sie bei der Bindung an die VEGF-Rezeptoren entfalten, als auch in ihrer Affinität zu Heparin und Heparan-Sulfat der extrazellulären Matrix (EZM). VEGF<sub>121</sub>, dem die Exons 6 und 7 fehlen, bindet nicht an die

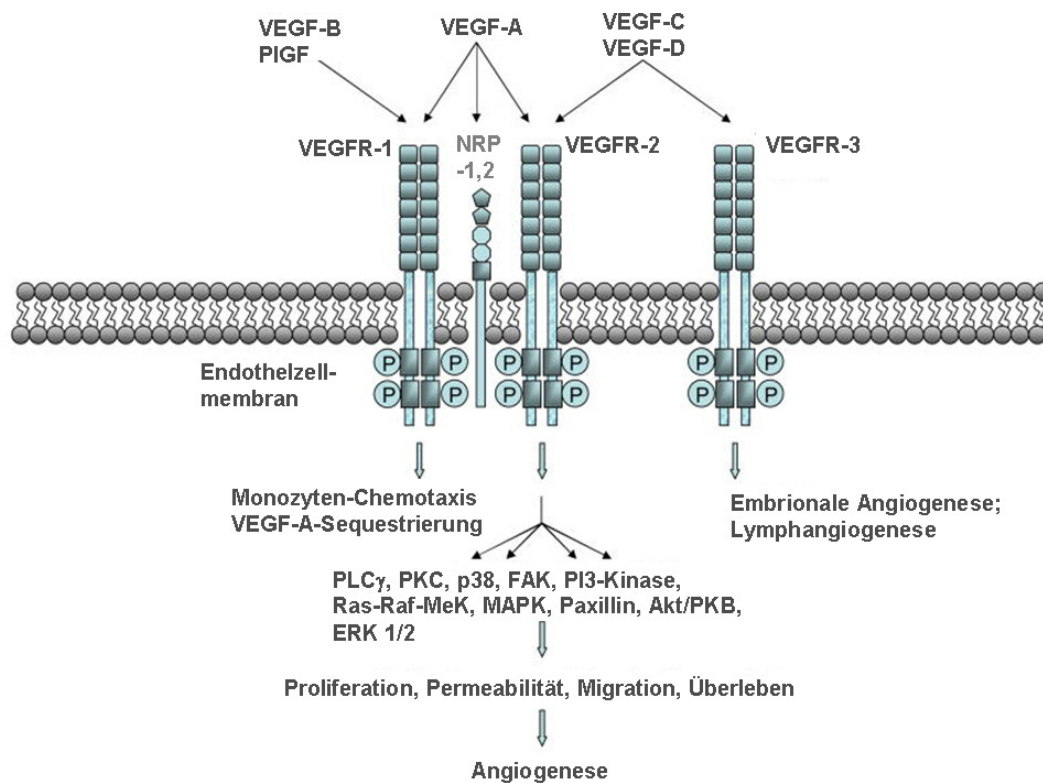
EZM (Houck *et al.* 1992). VEGF<sub>165</sub> enthält die Exons 6b und 7b. Die hierin kodierte Heparin-bindende Domäne bewirkt eine 50-70%-ige Lokalisierung an Zelloberflächen und der EZM (Houck *et al.* 1992, Park *et al.* 1993). VEGF<sub>189</sub> zeigt, durch die wiederum zusätzliche in Exon 7a kodierte Heparin-Bindestelle, eine sehr hohe Affinität zu Heparin und Heparan-Sulfat und ist daher fast ausschließlich an der EZM zu finden (Houck *et al.* 1992).

Neben diesen VEGF-Isoformen, die bei der Bindung an die entsprechenden VEGF-Rezeptoren einen pro-angiogenen Effekt besitzen, sind außerdem auch b-Isoformen bekannt (z.B. VEGF<sub>165b</sub>). Diese resultieren aus der Verwendung einer weiteren Splice-Stelle (*distal splice site, DSS*) im Exon 8 und zeichnen sich durch eine anti-angiogene Wirkung aus, die auf 6 alternative Aminosäuren am C-Terminus des Proteins zurückgeht. (Harper und Bates 2008).

Die unterschiedlichen Heparin-Affinitäten legen eine mögliche physiologische Bedeutung für die gerichtete Ausbildung von Blutgefäßen nahe. Neben Unterschieden in der Affinität zur EZM besitzen die VEGF-Isoformen aber auch unterschiedlich starkes mitogenes Potential, welches vom C-Terminus des VEGF-Proteins maßgeblich beeinflusst wird (Keyt *et al.* 1996). Der Grund hierfür liegt in den Affinitäten der VEGF-Isoformen zu den VEGF-Rezeptoren. Die mitogene Wirkung von VEGF ist spezifisch für Endothelzellen (Leung *et al.* 1989). VEGF stimuliert hierbei die Migration von ECs (Koch *et al.* 1994), stellt ein Überlebenssignal für ECs unreifer Blutgefäße dar (Alon *et al.* 1995), stimuliert ECs zur Sekretion und Aktivierung extrazellulärer Proteasen (Mandriota *et al.* 1995; Unemori *et al.* 1992) und erhöht die vaskuläre Permeabilität (Senger *et al.* 1983).

### 1.2.3 VEGF-Rezeptoren

Die Expression der VEGF-Rezeptoren ist auf wenige Zelltypen beschränkt. Hierzu zählen vor allem ECs aber auch Monocyten und Makrophagen (Ferrara und Davis-Smith 1997). Ihre biologische Wirkung erzielen die Vertreter der VEGF-Familie über die Bindung der VEGF-Rezeptoren (VEGFR) VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3 und die Neurophiline 1 und 2 (NRP-1 und NRP-2), die bisher auf ECs und Neuronen nachgewiesen wurden (Otrock *et al.* 2007). Abbildung 1.3 fasst die Spezifitäten dieser Rezeptoren für die Vertreter der VEGF-Familie und die vermittelten biologischen Effekte zusammen.



**Abbildung 1.3: Mitglieder der VEGF-Familie und ihre Rezeptoren.**

Abkürzungen: PLC $\gamma$  (Phospholipase C  $\gamma$ ), PKC (Protein-Kinase C), FAK (*focal adhesion kinase*), Ras-Raf-MeK (Ras-Raf-(Mitogen-aktiviertes Protein)-Kinase-Kinase), MAPK (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase), Akt/PKB (Protein-Kinase B), ERK 1/2 (*extracellular signal-regulated kinase*).  
Modifiziert nach Ho und Kuo 2007.

Während die Bindung von VEGF an VEGFR-1 lediglich in einer schwachen Aktivierung der nachgeschalteten Signalkaskade resultiert, zeigt die Heterodimerisierung von VEGFR-1 und -2 in Folge der Interaktion mit VEGF, starke mitogene Effekte (Huang *et al.* 2001). Die Effekte von VEGF auf die Proliferation, die Migration und das Überleben von ECs sowie auf die Permeabilität des Endothels werden durch VEGFR-2 vermittelt (Ferrara *et al.* 2003). Die Bindung von VEGF an VEGFR-2 führt zu dessen Homodimerisierung und Phosphorylierung. In der Folge werden einige Signalproteine, darunter Phospholipase C  $\gamma$ , PI-3-Kinase, das Ras-GTPase-aktivierende Protein und Proteine der Src-Familie aktiviert. Zudem aktiviert VEGF den Ras-Raf-Erk-Weg, der das Wachstum von ECs induziert (Takahashi *et al.* 1999). VEGFR-3 wird nicht durch VEGF gebunden. Die Neurophilin-Rezeptoren werden durch VEGF<sub>165</sub> nicht aber durch VEGF<sub>121</sub> gebunden (Neufeld *et al.* 2002). NRP-1 scheint vor allem die VEGF-VEGFR-2-Interaktion zu verstärken, indem NRP-1 zunächst VEGF<sub>165</sub> bindet und anschließend dem VEGFR-2 präsentiert (Soker *et al.* 1998). Hinweise, dass NRP-1 und -2 nach VEGF-Bindung selbst eine Signalkaskade auslösen, gibt es nicht (Neufeld *et al.* 2002 und Ferrara *et al.* 2003).

### 1.3 Mechanismen der Translationsregulation unter Hypoxie

Die Regulation der mRNA-Translation spielt eine wichtige Rolle in unterschiedlichen physiologischen und pathologischen Prozessen. Andauernde hypoxische Bedingungen führen zu einer generellen Verringerung der Translation in der Zelle (Pettersen *et al.* 1986). Die selektive Translation spezifischer mRNAs trägt zur Anpassung des hypoxischen Proteoms, und somit einer Hypoxie-Antwort, bei (Blais *et al.* 2004, Koritzinsky *et al.* 2005, Thomas und Johannes 2007). Die Rolle der Hypoxie in der Translations-Initiation war und ist Gegenstand einer Vielzahl von Untersuchungen (van den Beucken *et al.* 2006).

#### 1.3.1 Die 5'-Cap-abhängige Initiation der Translation

In eukaryotischen Zellen wird die Initiation der mRNA-Translation durch die Erkennung einer m<sup>7</sup>GpppN-Struktur am 5'-Ende der mRNA, das sogenannte 5'Cap, durch den 5'Cap-bindenden Komplex eIF4F eingeleitet (Gebauer und Hentze 2004, Pestova *et al.* 2001, Muthukrishnan *et al.* 1979). EIF4F setzt sich aus der 5'Cap-bindenden Untereinheit eIF4E (Sonenberg *et al.* 1979, Tahara *et al.* 1981), der RNA-Helikase eIF4A (Lawson *et al.* 1989, Rozen *et al.* 1990) und dem Gerüstprotein eIF4G zusammen (Grifo *et al.* 1983, Lamphear *et al.* 1995). Dieser 5'Cap-bindende Komplex rekrutiert die kleine ribosomale Untereinheit im Komplex mit weiteren eIFs als 43S-Prä-Initiations-Komplex an die mRNA. Der 43S-Prä-Initiations-Komplex setzt sich aus der 40S Untereinheit des Ribosoms, eIF3, eIF1, eIF1A, eIF5 und dem ternären Komplex, bestehend aus Initiator-Met-tRNA und eIF2:GTP, zusammen (Jackson *et al.* 2010). Es wird angenommen, dass sich der 43S-Prä-Initiations-Komplex in einem als *scanning* bezeichneten Prozess entlang der 5'UTR bewegt, beziehungsweise die mRNA durch den Komplex hindurchführt (Kozak 1978, Hinnebusch 2011). EIF4B und eIF4G besitzen einen kooperativ stimulierenden Einfluss auf die Helikase-Aktivität von eIF4A (Rogers *et al.* 1999, Özeş *et al.* 2011), welche für die Translation von mRNAs mit strukturierten 5'-UTRs von Bedeutung ist (Pestova und Kolupaeva 2002). Es gibt Hinweise, dass der Kontakt zwischen 43S-Komplex und eIF4F während des *scannings* erhalten bleibt und dieses dadurch stimuliert wird (Pestova und Kolupaeva 2002). Die Erkennung des Start-Codons durch den 43S-Komplex geht mit Konformationsänderungen im 43S-Komplex und der Verdrängung von eIF1 einher (Maag *et al.* 2005). Man spricht nun von einem 48S-Initiations-Komplex (Jackson *et al.* 2010).

EIF1A und eIF5 sind für die Auswahl des korrekten Initiations-Codons von Bedeutung (Maag *et al.* 2006).

Die  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren eIF2 stabilisiert die Codon-Anti-Codon-Wechselwirkung zwischen dem AUG-Start-Codon und der Initiator-tRNA durch Interaktion mit den Nukleotiden -3 und +4 (Pisarev *et al.* 2006, Nanda *et al.* 2013). Die  $\beta$ -Untereinheit interagiert mit eIF5, welches die durch die  $\gamma$ -Untereinheit-katalysierte GTP-Hydrolyse erst bei Erreichen des AUG-Codons ausreichend stimuliert (Majumdar und Maitra 2005). Ein Großteil des eIF2:GDP-Komplexes wird daraufhin freigesetzt und das GDP unter Stimulation von eIF2B durch GTP ersetzt (Unbehaun *et al.* 2004, Panniers und Henshaw 1983). EIF2:GTP ist nach Bindung einer beladenen Initiator-tRNA dann erneut in der Lage in einen Translationszyklus einzutreten (Gross *et al.* 1991). Die Bindung der großen ribosomalen Untereinheit geht mit der Dissoziation von eIF1, eIF1A, eIF3, eIF4F und verbliebenem eIF2:GDP einher (Chakrabarti und Maitra 1992, Unbehaun *et al.* 2004). Dieser Prozess wird von eIF5B stimuliert. Der resultierende Initiationskomplex (80S-Komplex) stimuliert die GTPase-Aktivität von eIF5B und damit die Hydrolyse des eIF5B-gebundenen GTP, was die Freisetzung von eIF5B aus dem 80S-Komplex katalysiert und den Übergang der Translation von der Initiations- in die Elongationsphase einleitet (Pestova *et al.* 2000, Jackson *et al.* 2010, Gebauer und Hentze 2004).

### 1.3.2 Die 5'Cap-unabhängige Initiation der Translation

Neben der 5'Cap-abhängigen Translation sind auch Mechanismen der 5'Cap-unabhängigen Translation bekannt. Die Translationsinitiation einiger zellulärer mRNAs und viraler RNAs findet hierbei nicht an der 5'Cap-Struktur, sondern innerhalb der 5'UTR-Sequenz statt. 5'UTR-Elemente, die eine 5'Cap-unabhängige Translationsinitiation vermitteln, werden als interne Ribosomen-Eintrittstellen (*internal ribosome entry site*, IRES) bezeichnet (Stoneley und Willis 2004). Die ausgebildeten Sekundärstrukturen in viralen 5'-UTRs sind für die Translation von großer Bedeutung. Hierdurch können, je nach Virus, sowohl Translations-Initiationsfaktoren als auch direkt ribosomale Untereinheiten rekrutiert werden.

Bei der 5'Cap-unabhängigen Translationsinitiation sind einzelne oder mehrere Translationsinitiationsfaktoren nicht beteiligt. Der eindeutige Nachweis, dass die 5'Cap-Struktur für die Translationsinitiation in einzelnen Fällen verzichtbar ist, konnte am

Beispiel des Encephalomyocarditis-Virus (EMCV)-IRES mit Hilfe von zirkulären RNAs gezeigt werden (Chen und Sarnow 1995). Neben eIF4E, dem Cap-bindenden Protein, sind weder eIF1 noch eIF1A für die EMCV-IRES-vermittelte mRNA-Translation erforderlich (Pestova *et al.* 1998). Der 43S-Komplex wird direkt durch Interaktion der EMCV-5'UTR mit eIF4G rekrutiert (Pestova *et al.* 1996). Mit Hilfe von *TOE-Print*-Experimenten konnte gezeigt werden, dass das HCV-IRES direkt mit der ribosomalen 40S-Untereinheit und eIF3 interagiert (Sizova *et al.* 1998). Im Fall der CrPV- (*Cricket paralysis virus*) IRG- (*intergenic region*) IRES-vermittelten Translation ist kein Initiationsfaktor erforderlich, wie mit Hilfe von gereinigten 40S-Untereinheiten aus HeLa-Zellen nachgewiesen wurde (Jan und Sarnow 2002).

Die 5'Cap-unabhängige Translation einer zellulären mRNA wurde erstmals am Beispiel der BiP-mRNA (*Immunoglobulin heavy chain binding protein*) gezeigt (Sarnow 1989). Weitere Beispiele für die IRES-vermittelte Translation zellulärer mRNAs sind unter anderem die c-Myc- und eIF4G- (Johannes und Sarnow 1998), ATF4- (Chan *et al.* 2013), XIAP- (Holcik und Korneluk 2000) sowie die HIF-1 $\alpha$ - und die VEGF-mRNA (Lang *et al.* 2002; Stein *et al.* 1998). Die Mechanismen der Translations-Initiation an zellulären IRESs sind nicht vollständig aufgeklärt. Sowohl Sekundärstrukturen als auch Sequenz-Elemente sind hieran beteiligt. Bei der *in silico*-Struktur-Kalkulation von mehreren zellulären IRES-Elementen, darunter auch die des BiP-mRNA-IRES, wurde eine gemeinsame Y-förmige Struktur, gefolgt von einer weiteren Haarnadelstruktur, ermittelt (Le und Maizel 1997). Faltungsdaten zur VEGF-5'UTR zeigen, wenn auch nicht identisch zur BiP-IRES-Struktur, ausgeprägte Sekundärstrukturen (Huez *et al.* 1998).

Auch Sequenzelemente, wie zum Beispiel die neun Nukleotide lange Sequenz in der 5'UTR der Gtx-mRNA, können die Initiation der Translation ermöglichen. Das Motiv in der humanen Gtx-mRNA ist zu einem Abschnitt der 18S-rRNA komplementär, was so zur Rekrutierung der 40S-Untereinheit des Ribosoms beitragen könnte (Chappel *et al.* 1999). In der VEGF-5'UTR von *Rattus norvegicus* und *Mus musculus* findet man ein acht Nukleotide langes Element, welches zur 18S-rRNA-komplementär ist. In der humanen VEGF-5'UTR ist dieser Bereich sieben Nukleotide lang (NCBI-Datenbankeinträge zu VEGF-mRNAs: *R. norvegicus*: NM\_001287107.1, *M. musculus*: NM\_001287056.1, *H. sapiens*: NM\_001171623.1).

Neben den *cis*-Elementen in 5'UTRs spielen auch IRES-*trans*-agierende Faktoren (ITAFs) eine Rolle bei der 5'Cap-unabhängigen Translation unterschiedlicher zellulärer mRNAs.



Beispiele hierfür sind die Aktivierung der alternativen FGF-2-mRNA-Translation durch hnRNP A1 (Bonnal *et al.* 2005) oder auch die CoCl<sub>2</sub>-induzierte Bindung der HIF-1 $\alpha$ -5'UTR durch HuR (Galbán *et al.* 2007). Die Zahl der charakterisierten ITAFs für zelluläre IRESs ist bisher jedoch gering.

### 1.3.3 Mechanismen der Translations-Regulation unter Hypoxie

Es sind zwei generelle Mechanismen der hypoxischen Translations-Repression beschrieben (Koritzinsky *et al.* 2005, Liu *et al.* 2006).

Im Rahmen einer schnellen Hypoxie-Antwort wird die Translations-Initiation durch Phosphorylierung von eIF2- $\alpha$  gehemmt (Koumenis *et al.* 2002). Die Affinität von eIF2 für GDP ist ca. 400-fach höher als für GTP (Panniers *et al.* 1988). Die Phosphorylierung von eIF2- $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ -P) am Ser51 inhibiert die eIF2B-katalysierte Austausch-Reaktion von eIF2:GDP zu eIF2:GTP. Dies ist die Folge einer Herabsetzung der effektiven eIF2B-Mengen, die auf eine höhere Affinität von eIF2B für eIF2 $\alpha$ -P:GDP gegenüber nicht-phosphoryliertem eIF2 $\alpha$ :GDP zurückgehen (Rowlands *et al.* 1988, Sudakhar *et al.* 2000).

In Säugerzellen sind 4 Kinasen bekannt, die eIF2- $\alpha$  am Ser51 phosphorylieren. Hierzu zählen die Retikulozyten-spezifische Kinase HRI (Häm-regulierter Inhibitor, Levin *et al.* 1975, Kramer *et al.* 1976), die dsRNA-aktivierte Protein-Kinase PKR (Roberts *et al.* 1976, García *et al.* 2006), GCN2 (*general control non-derepressible 2*; Sood *et al.* 2000a, Dever *et al.* 1992) und PERK (*pancreatic ER eIF2 $\alpha$  kinase*; Sood *et al.* 2000b, Harding *et al.* 2000). Die eIF2- $\alpha$ -vermittelte Reduzierung der mRNA-Translation unter Hypoxie geht vermutlich weitestgehend auf die Aktivität von PERK und GCN2 zurück (Koumenis *et al.* 2002, Liu *et al.* 2010).

Während bei akuter Hypoxie die Regulation der Translation über die eIF2- $\alpha$ -Phosphorylierung erfolgt, findet bei länger andauernder Hypoxie eine Regulation über die Verfügbarkeit an aktivem 5'Cap-bindenden Protein eIF4E statt (Koritzinsky *et al.* 2005, Liu *et al.* 2006, Arsham *et al.* 2003). Sogenannte eIF4E-bindende Proteine (4E-BP) interagieren mit eIF4E und beeinflussen die mRNA-Translation. Bisher sind 3 4E-BP in Säugerzellen bekannt: 4E-BP1, 4E-BP2 und 4E-BP3 (Pause *et al.* 1994, Lin *et al.* 1994, Poulin *et al.* 1998). Maßgeblich für die Stärke der eIF4E- 4E-BP-Interaktion ist der Phosphorylierungsgrad der 4E-BPs. Unter Hypoxie oder durch Einfluss von Hormonen

oder Wachstumsfaktoren, kann die Kinase mTOR (*mammalian target of rapamycin*) inhibiert werden (Arsham *et al.* 2003, Hay und Sonenberg 2004). Dies führt zu einer Anreicherung von hypophosphoryliertem gegenüber hyperphosphoryliertem 4E-BP1. Hypophosphoryliertes 4E-BP1 interagiert stärker mit eIF4E als dessen hyperphosphorylierte Form. Die Interaktion von 4E-BP1 mit eIF4E stört dessen Bindung an eIF4G und setzt so die Affinität von eIF4E für die 5'Cap-Struktur herab. Die Folge ist eine Verringerung der 5'Cap-vermittelten Translations-Initiation (Haghighat *et al.* 1995, Haghighat und Sonenberg 1997).

Das Modell der IRES-vermittelten Translation stellt eine Möglichkeit der Zelle dar, ausgewählte mRNAs auch unter translations-reprimierenden Bedingungen weiterhin zu translatieren.

#### **1.4 VEGF-Expression unter Hypoxie**

Die VEGF-Expression wird von verschiedenen Stimuli beeinflusst. Hierzu gehören Hypoxie, onkogene Transformationen (zum Beispiel Mutationen oder Amplifikationen der Kinase Ras) sowie Wachstumsfaktoren (unter anderem EGF, TGF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , FGF und PDGF) und Cytokine (IL-1 $\alpha$  und IL-6) (Shweiki *et al.* 1992, Rak *et al.* 1995, Ferrara 2004). Eine Steigerung der zellulären VEGF-Expression erfolgt unter hypoxischen Bedingungen durch verstärkte Transkription des VEGF-Gens, die Stabilisierung der VEGF-mRNA und Änderungen im Mechanismus der mRNA-Translation.

##### **1.4.1 Die HIF-1-abhängige Transkription von VEGF**

Im Rahmen der Anpassung an hypoxische Bedingungen spielt der Transkriptionsfaktor HIF-1 (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1) eine entscheidende Rolle. HIF-1 ist in Säugerzellen an der Transkriptions-Regulation zahlreicher Gene beteiligt (Semenza 2007, Manalo *et al.* 2005, Maxwell *et al.* 1993). Hierzu zählen unter anderem Transkriptionsfaktoren, Enzyme des Glukose-Stoffwechsels und Wachstumsfaktoren wie VEGF (Ratcliff 2006, Forsythe *et al.* 1996).

Unter normoxischen Bedingungen wird die  $\alpha$ -Untereinheit (HIF-1 $\alpha$ ) des Heterodimers HIF-1 zwar gebildet, aber sehr schnell wieder über das 26S-Proteasom abgebaut (Salceda und Caro 1997, Huang 1998). Die  $\beta$ -Untereinheit (HIF-1 $\beta$ , ARNT) wird konstitutiv

exprimiert (Wang *et al.* 1995). Die Initiation des Sauerstoff-abhängigen Abbaus von HIF-1 $\alpha$  erfolgt durch dessen Hydroxylierung an 2 Prolin-Resten (Pro<sub>402</sub> und Pro<sub>564</sub>) durch Prolyl-Hydroxylase-Domänen-enthaltende Proteine (PHD) (Ivan *et al.* 2001, Jaakkola *et al.* 2001). PHDs nutzen, neben 2-Ketoglutarat, molekularen Sauerstoff als Substrat und fungieren somit als „Sauerstoff-Sensoren“ (Semenza 2003, Epstein *et al.* 2001). Hydroxyliertes HIF-1 $\alpha$  interagiert mit dem von Hippel-Lindau-Protein (VHL), welches als Untereinheit eines E3-Ubiquitin-Ligase-Komplexes die Ubiquitinylierung vermittelt. Unter Hypoxie wird dieser Abbau verlangsamt. Nach der Dimerisierung von HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$  kommt es zur Translokation des Heterodimers in den Nukleus, wo es an das *hypoxia responsive element* (HRE) des Zielgens bindet und dessen Transkription verstärkt.

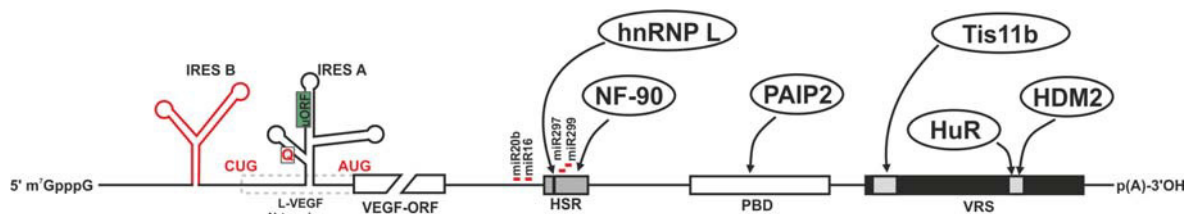
Die alleinige Bindung von HIF-1 an das HRE des Zielgens ist in vielen Fällen für eine effiziente Aktivierung der Transkription nicht ausreichend. So ist unter anderem p300/CBP als Transkriptions-Koaktivator beteiligt (Ruas *et al.* 2002, Arany *et al.* 1996). Für die optimale HIF-1-abhängige Induktion der VEGF-Transkription ist zusätzlich das Protein Smad3 erforderlich (Liu und Simon 2004).

#### 1.4.2 Die Stabilisierung der VEGF-mRNA unter Hypoxie

Die Zunahme der VEGF-mRNA-Menge unter Hypoxie geht maßgeblich auf deren mRNA-Stabilisierung zurück (Ikeda *et al.* 1995, Levy *et al.* 1996a). Levy *et al.* konnten 1995 in Ratten-PC12-Zellen mittels *run off-transcription-assays* zeigen, dass die Transkription des VEGF-Gens unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub>) um den Faktor  $3,1 \pm 0,6$  zunimmt. Die Zunahme der *steady state*-mRNA-Menge um den Faktor  $12 \pm 0,6$  konnte damit allerdings nicht erklärt werden, sondern legt nahe, dass auch die mRNA stabilisiert wird.

Mehrere Beispiele für die Interaktion von mRNAs mit RNA-bindenden Proteinen (RBPs) im Rahmen einer Hypoxie-Antwort sind bereits beschrieben. Diese mRNA-RBP-Interaktionen werden als bedeutsam für die Translation, die sub-zelluläre Lokalisierung und den Abbau von mRNAs betrachtet (Mignone *et al.* 2002, Masuda *et al.* 2009). Hinweise auf RBPs, die die Stabilität der VEGF-mRNA unter Hypoxie beeinflussen könnten, wurden, gemeinsam mit der Identifizierung von *cis*-Elementen in der VEGF-3'UTR, insbesondere von AREs (AU-reichen Elementen), mittels *electro-mobility-shift assays* (EMSA) geliefert (Levy *et al.* 1996a, Levy *et al.* 1996b, Claffey *et al.* 1998). AREs können sowohl stabilisierenden, als auch destabilisierenden Einfluss auf eine mRNA haben

(Myer *et al.* 1997, Fan und Steitz 1998). In murinen BALB/c3T3-Fibroblasten konnten RNAs mit lediglich der VEGF-3'UTR, aber auch der VEGF-Protein-kodierenden Region oder der -5'UTR, unter Hypoxie allerdings keine Stabilisierung der individuellen Transkripte vermitteln (Dibbens *et al.* 1999). Abbildung 1.4 fasst beschriebene Sequenz-Elemente und Protein-Interaktionsstellen der VEGF-3'UTR zusammen.



**Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der VEGF-mRNA sowie bekannter cis- und transregulatorischer Elemente der VEGF-mRNA-Translation und -Stabilität.**

Die humane VEGF-5'UTR umfasst 1038 Nukleotide, die VEGF-3'UTR 1923 Nukleotide. Die Lokalisierung der Bindung von PAIP2 und Tis11b basiert auf Homologie-Abgleich der publizierten Bindungsbereiche in der VEGF-3'UTR von *R. norvegicus* und der humanen VEGF-3'UTR (vorliegende Arbeit). Abkürzungen: IRES (Interne Ribosomen-Eintrittsstelle), uORF (*upstream* ORF), ORF (offener Leserahmen), Q (Quadruplex-Struktur), CUG (alternatives Translations-Initiationscodon), AUG (Startcodon der Translation), miR (Micro-RNA), hnRNP L (heterogenes, nukleäres Ribonukleo-Protein), Tis11b (Protein der Tristetraprolin-Protein-Familie 11b), NF-90 (Nukleärer Faktor 90), PAIP2 (Poly(A) Binding Protein Interacting Protein 2), HuR (humanes Antigen R), HDM2/MDM2 (*human/murine double minute* 2), L-VEGF (N-terminale Verlängerung des VEGF-Proteins), HSR (Hypoxie-stabilisierende Region), PBD (PAIP2-bindende Domäne), VRS (VEGF-regulatorische Sequenz), p(A) (poly(A)-Schwanz). Lokalisierung der *cis*- und *trans*-Elemente (Nukleotide): IRES B (5'UTR 379-483), CUG (5'UTR 499), IRES A (5'UTR 739-1038), Q (5'UTR 774-790), uORF (5'UTR 852-863), miR20b (3'UTR ~180), miR16 (3'UTR ~260), HSR (3'UTR 332-457), hnRNP L (3'UTR 337-357), miR297/299 (3'UTR 337-357), PBD (3'UTR ~713-1105), VRS (3'UTR 1251-1877), Tis11b-Bindestelle (grau, 3'UTR ~1264-1337), HuR-Bindestelle (grau, 3'UTR 1682-1726).

Die Interaktion von HuR mit einem ca. 40 Nukleotide (nt) langen Abschnitt des VRS (*VEGF regulatory segment*), welches am 3'-Ende der VEGF-3'UTR lokalisiert ist (Nukleotide 1682-1726), stabilisiert die VEGF-mRNA unter Hypoxie (Levy *et al.* 1998, Goldberg-Cohen *et al.* 2002).

Auch die Bindung von hnRNP L an eine 21 nt lange Sequenz innerhalb der 126 nt langen HSR (*hypoxia stability region*) trägt zur Stabilisierung der VEGF-mRNA unter Hypoxie (Shih und Claffey 1999) bei. Weitere potentielle VEGF-mRNA-stabilisierende Proteine sind PAIP2 (Onesto *et al.* 2004), NF-90 (Vumbaca *et al.* 2008) und MDM2 (Zhou *et al.* 2011). AUF-1 interagiert direkt mit der VEGF-RNA in Nierenkarzinom-Zellen (RCC-Zellen). Die Co-Immupräzipitation der E3 Ubiquitin-Ligase pVHL (von Hippel-Lindau-Protein) mit AUF-1 und HuR unter Normoxie deutet auf eine Beteiligung von pVHL bei der Regulation der VEGF-mRNA-Stabilität hin (Xin *et al.* 2012).

Die Menge vieler Proteine, die an der Regulation der VEGF-Expression beteiligt sind, ändert sich unter Hypoxie nicht oder lediglich geringfügig. Dies legt nahe, dass ihre Funktion durch post-translationale Modifikationen moduliert wird oder, dass weitere Faktoren beteiligt sind (Xin *et al.* 2012). Als VEGF-mRNA-destabilisierendes Protein wurde bisher lediglich das Zink-Finger-Protein Tis11b beschrieben, welches an die VEGF-3'UTR aus *R. norvegicus* bindet (Ciais *et al.* 2004). Die 75 Nukleotide umfassende Bindungssequenz ist zu einem Abschnitt der VRS in der humanen VEGF-3'UTR homolog (siehe unten).

### 1.4.3 Die Translation der VEGF-mRNA

Die humane VEGF-mRNA besitzt an ihrem 5'Ende eine 1038-Nukleotide lange, hochstrukturierte 5'UTR. Mit Hilfe von *in vitro*-Translation-Experimenten unter Verwendung monocistronischer und bicistronischer Reporter-RNAs wurde gezeigt, dass die VEGF-5'UTR eine 5'Cap-unabhängige Translation vermitteln kann (Stein *et al.* 1998, Akiri *et al.* 1998, Miller *et al.* 1998).

Nähere Untersuchungen zeigten, dass die VEGF-5'UTR zwei separate IRES-Elemente, IRES A und IRES B, besitzt (Huez *et al.* 1998). Das zunächst identifizierte IRES A konnte auf die Nukleotide 745-1038 eingegrenzt werden. Das 5'-Ende der VEGF-5'UTR zeigt ebenfalls IRES-Aktivität (IRES B). Die Nukleotide 91-475 sind hierfür essentiell (Huez *et al.* 2001). Im Sequenzbereich zwischen den IRES-Elementen befinden sich drei CUG-Codons, die im Leserahmen mit dem Protein-kodierenden Bereich sind. Sie stellen alternative Translations-Initiations-Codons dar. Das erste dieser CUG-Codons (Nukleotide 499-501 der VEGF-5'UTR, CUG<sub>499</sub>) scheint für die nicht-AUG-vermittelte Translations-Initiation die größte Bedeutung zu besitzen. Die Initiation am CUG<sub>499</sub> führt zu einer N-terminal verlängerten VEGF-Variante (L-VEGF). Diese um 206 Aminosäuren verlängerte VEGF-Isoform wird proteolytisch gespalten. Das N-terminale Fragment ist intrazellulär nachweisbar, während das C-terminale Fragment sezerniert wird (Huez *et al.* 2001).

Untersuchungen von Bornes *et al.* (2004) konnten zeigen, dass die Splice-Varianten, Einfluss auf die Auswahl des Start-Codons besitzen. Hiernach wird für VEGF<sub>121</sub> stets das CUG-Codon (Nukleotid 499) genutzt, was in der Bildung von L-VEGF resultiert. Das AUG-Codon wird hingegen nur in den mRNA-Isoformen VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub> als

Translations-Initiations-Codon verwendet. Weder hypoxische Bedingungen, noch die Anwesenheit der VEGF-3'UTR hatten Einfluss auf das beobachtete Initiationsmuster.

Eine von Morris *et al.* (2010) beschriebene „flexible“ RNA-Quadruplex-Struktur in der humanen VEGF-5'UTR soll Einfluss auf deren IRES-Aktivität besitzen. Bei der Quadruplex-Struktur handelt es sich um eine planare Ausrichtung von Guanin-Basen (G-Quadruplex) um ein monovalentes Kation wie Na<sup>+</sup> oder K<sup>+</sup>. Obwohl eine einzelne G-Quadruplex einen translations-inhibierenden Effekt haben soll, zeigen Morris *et al.* hier, dass diese Struktur in einem längeren G-reichen Bereich des IRES A (Nukleotide 774-790) einen stimulierenden Einfluss auf die 5'Cap-unabhängige Translations-Initiation hat.

Innerhalb von IRES A ist ein hoch konservierter uORF lokalisiert, der für ein Tripeptid kodiert. Im Fall der VEGF-mRNA hat dieser uORF einen reprimierenden Einfluss auf die Translation der VEGF<sub>121</sub> *splice*-Variante, nicht aber auf die Varianten VEGF<sub>165</sub> und VEGF<sub>189</sub> (Bastide *et al.* 2008).

Karaa *et al.* (2009) konnten in HeLa-Zellen zeigen, wie *trans*-regulatorische Faktoren die Auswahl der IRES-Elemente für die Translationsinitiation beeinflussen können. Die microRNA 16 (miR16) interagiert mit dem *microRNA responsive element* (MRE) der VEGF-3'UTR, einem 24 Nukleotide langen RNA-Motiv *ca.* 260 Nukleotide strangabwärts der Protein-kodierenden Sequenz. Sie inhibiert die IRES B-vermittelte Translationsinitiation während die IRES A-vermittelte Initiation nicht beeinflusst ist. Dies legt eine Funktion in der Generierung der L-VEGF-Variante, ausgehend vom CUG<sub>499</sub> der VEGF-5'UTR, nahe.

Eine weitere VEGF-3'UTR-bindende miRNA ist miR20b. Ihre Konzentration nimmt in mehreren Tumorzelllinien unter Hypoxie stark ab. Die Inhibierung der miR20b in H22-Zellen unter Normoxie führt zu einer Erhöhung von VEGF und von HIF-1 $\alpha$  ohne Veränderung der mRNA-Mengen, während die Zugabe von miR20b unter Hypoxie das VEGF-Signal reduziert (Lei *et al.* 2009). Cascio *et al.* (2010) konnten diesen Effekt der miR20b in MCF-7-Zellen bestätigen. Weitere miRNAs, die einen Einfluss auf die VEGF-Expression unter Hypoxie haben könnten, sind miR15b sowie miR20a (Hua *et al.* 2006). In Monozyten wurde ein Mechanismus der miRNA-vermittelten Translationsregulation aufgeklärt, bei der miR297 und miR299 mit hnRNP L um die Bindung an die VEGF-3'UTR konkurrieren. Die Bindungsregionen der miRNAs und von hnRNP L überlappen. Unter Hypoxie verhindert die Bindung von hnRNP L die miRNA-vermittelte Translationsrepression (Jafarifar *et al.* 2011). Abbildung 1.4 fasst bekannte *cis*-Elemente der VEGF-mRNA und *trans*-interagierende Faktoren schematisch zusammen.

Der Einfluss von *in trans*-regulierenden Proteinen auf die Translation der VEGF-mRNA ist nur in wenigen Fällen beschrieben. Die meisten VEGF-mRNA-bindenden Proteine haben vor allem einen Einfluss auf die VEGF-mRNA-Stabilität (siehe Abschnitt 1.4.2). Zu den Proteinen, die die Translation der VEGF-mRNA modulieren, zählt insbesondere hnRNP L, das mit den miRNAs 297 und 299 um ein 21 Nukleotide langes CA-reiches Element (CARE) in der HSR der VEGF-3'UTR konkurriert (Jafarifar *et al.* 2011). Diese Interaktion lässt jedoch die Frage nach der funktionellen Verknüpfung zum Translationsapparat offen. NF-90 bindet, ebenso wie HuR und hnRNP L, unter Hypoxie an das HSR. Die shRNA-vermittelte Reduzierung der NF-90-Menge führt unter Hypoxie zu einem deutlichen Rückgang der VEGF-mRNA in den polysomalen Fraktionen eines Saccharose-Dichtegradienten. Neben der Stabilisierung der VEGF-mRNA hat NF-90 somit auch einen Einfluss auf deren Translation (Vumbaca *et al.* 2008).

## 1.5 Zielstellung

Die Verteilung von Sauerstoff und Metaboliten im tierischen Organismus erfolgt über das Blutgefäßsystem (Vaskulatur). Sind Organe oder Gewebe nicht ausreichend vaskularisiert, kann die Unterversorgung mit Sauerstoff (Hypoxie) und Nährstoffen in den betroffenen Geweben die Folge sein. Die Bildung neuer Blutgefäße aus bereits bestehenden bezeichnet man als Angiogenese. Unter Hypoxie findet eine erhöhte Produktion angiogener Faktoren statt, welche die Bildung neuer Blutgefäße fördern. Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor A (VEGF) ist ein bedeutender Faktor bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Vaskulatur im tierischen Organismus. Das Wachstum solider Tumore, zum Beispiel bei Brustkrebs, kann durch die schnelle Proliferation der Zellen und aufgrund von Besonderheiten der Tumolvaskulatur zu Hypoxie im Tumorgewebe führen, die in einer erhöhten Bildung von VEGF resultiert.

Unter hypoxischen Bedingungen werden stark Energie-verbrauchende Prozesse wie die Translation von mRNAs reduziert. Die Aufrechterhaltung und Steigerung der Produktion angiogener Faktoren, um diese Bedingungen aufzulösen, erfordert die selektive Expression von Genen. Diese wird vor allem auf Ebene der Transkription, der mRNA-Stabilität und der mRNA-Translation reguliert.

Unter Hypoxie findet eine verstärkte Transkription sowie eine Stabilisierung der VEGF-mRNA statt. Trotz der generellen Verringerung der Translation in der Zelle wird die VEGF-mRNA dennoch weiterhin translatiert. Die zugrundeliegenden Mechanismen und beteiligten *trans*-stimulierenden Faktoren sind bislang nicht vollständig aufgeklärt.

Das Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von zellulären Regulatoren der VEGF-mRNA-Translation. Hierzu sollte ein *in vitro*-Translationssystem aus MCF-7-Zellen etabliert werden, die zuvor unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Mittels Tobramycin-RNA-Affinitäts-Reinigung und Massenspektrometrie sollten hieraus VEGF-mRNA-bindende Proteine identifiziert und in Folgeexperimenten als potentielle Modulatoren der VEGF-mRNA-Translation verifiziert werden. Das Verständnis der molekularen Mechanismen der VEGF-Expression kann zukünftig zur Entwicklung gerichteter Tumor-Therapien beitragen.



## 2. Materialien und Methoden

### 2.1 Klonierung

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Plasmide wurden nach molekularbiologischen Standardmethoden (Sambrook und Russel, 2001) generiert. DNA-Fragmente zur Klonierung wurden mittels Pfu-DNA-Polymerase (Fermentas) generiert. Die Verwendung der eingesetzten Enzyme erfolgte nach Angaben der jeweiligen Hersteller. Restriktionsenzyme, Klenow-Fragment (exo-), T4 DNA-Polymerase und T4 Polynukleotid-Kinase wurden von *New England Biolabs* (NEB), die alkalische Phosphatase (*calf intestine*) von Roche bezogen. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten, linearisierten Vektoren und Restriktionsfragmenten wurde das High Pure PCR purification Kit (Roche) verwendet. Die Tabelle A.2 (siehe Anhang) fasst die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sowie Informationen zu deren Klonierung zusammen.

Für Klonierungen und zur Vervielfältigung von Plasmid-DNA wurden die *Escherichia coli*- Stämme XL-1blue und XL-10gold (Agilent Technologies) verwendet. Plasmid-DNA wurde im kleinen (ng/μl) und mittleren (μg/μl) Maßstab mit dem peqGold Plasmid Miniprep Kit (Peqlab) beziehungsweise mit dem Plasmid Midi Kit (Qiagen) präpariert.

Für die Klonierung und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide sind in den Tabellen A.3 und A.4 (siehe Anhang) aufgelistet. Sequenzierungen wurden durch die Dienstleister Eurofins-MWG Operon (Ebersberg) und GATC Biotech AG (Konstanz) durchgeführt.

### 2.2 Zellkultur

#### 2.2.1 Kultivierung und Kryokonservierung von MCF-7-Zellen

Bei der verwendeten humanen Zelllinie MCF-7 handelt es sich um Zellen aus der pleuralen Effusion einer 69-jährigen Patientin mit metastasierendem Brustkrebs (Soule *et al.* 1973) (DSMZ-Nummer ACC-115). Die Kultivierung erfolgte in MCF-7-Medium bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. MCF-7-Medium basiert auf *Dulbecco's modified eagle medium (DMEM high Glucose)* (Life Technologies) versetzt mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem (20 min, 56°C) fötalem Rinderserum (Biochrom AG), 1x Penicillin/Streptomycin (Life Technologies) und 1x MEM nicht-essentielle Aminosäuren (Life Technologies). Bei einer Zelldichte von 80-90% (0,75-0,85 x 10<sup>5</sup> Zellen/cm<sup>2</sup>) wurden die adhärenenten MCF-7-Zellen zunächst mit 1x PBS pH 7,4 gewaschen und anschließend 3 min bei Raumtemperatur mit 0,05% Trypsin-EDTA (Life Technologies) (37°C) inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml MCF-7-

Medium wurden die Zellen in ein steriles Reaktionsgefäß überführt und 2 min mit 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in MCF-7-Medium resuspendiert und mit einer Zelldichte von  $0,2 \times 10^5/\text{cm}^2$  ausgesät. Die Kryokonservierung der MCF-7-Zellen erfolgte mit MCF-7-Kryo-Medium (5% DMSO, 95% MCF-7-Medium) in einer Stickstoffatmosphäre.

### 2.2.2 Hypoxie-Behandlung von MCF-7-Zellen

Die Hypoxie-Behandlung der 70-80% konfluenten MCF-7-Zellen ( $0,5-0,6 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$ ) erfolgte, nach vorherigem Mediumwechsel, in einem M5 Multigas-Inkubator (Sanyo) für 24 h bei 37°C und 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>, 94% N<sub>2</sub>.

### 2.2.3 siRNA-Transfektion von MCF-7-Zellen

Zur Transfektion von MCF-7-Zellen wurden diese zunächst wie unter 2.2.1 beschrieben trypsinisiert und nach Zentrifugation (2 min, 300 x g) *ad*  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in DMEM (ohne Zusätze) resuspendiert. Die Transfektion der siRNAs (500 pmol pro  $1 \times 10^6$  Zellen) erfolgte mittels Elektroporation im GenePulser II (Biorad, exponentieller Puls, 360 V, 500 µF). Transfizierte Zellen wurden mit einer Zelldichte von  $0,8 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$  (bezüglich der für die Elektroporation eingesetzten MCF-7-Zellen) in MCF-7-Medium ausgesät und wie oben beschrieben kultiviert. Nicht-transfizierte Zellen als Kontrolle wurden *ad*  $0,2 \times 10^5$  Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgesät. 48 h nach der Transfektion wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen in hypoxische Bedingungen überführt beziehungsweise als Kontrollansatz bei Normoxie weiterkultiviert. Tabelle 2.1 fasst die in dieser Arbeit eingesetzten siRNAs zusammen.

Name	Sequenz	Referenz
si-AUF-1 #1	5'-GAUUGACGCCAGUAAGAAC(dTdT)-3'	diese Arbeit
si-AUF-1 #2	5'-GAUCCUAUCACAGGGCGAU(dTdT)-3'	diese Arbeit
si-DDX6 #1	5'-CUGUGAAUGUGGUAUAAA(dTdT)-3'	Naarmann <i>et al.</i> 2008
si-DDX6 #2	5'-GCAGAAACCCUAUGAGAUU(dTdT)-3'	Naarmann <i>et al.</i> 2008
si-hnRNP K #1	5'-AGACUACAAUGCCAGUGUU(dTdT)-3'	Naarmann <i>et al.</i> 2010
si-hnRNP K #2	5'-CUGUGGAAUGCUUAAAUUA(dTdT)-3'	Naarmann <i>et al.</i> 2010
si-hnRNP K #3	5'-GGAACAAGCAUUUAAAAG(dTdT)-3'	Naarmann <i>et al.</i> 2010
Kontrolle (ctrl.)	5'-AGGUAGUGUAAUCGCCUUG(dTdT)-3'	Naarmann <i>et al.</i> 2010

**Tabelle 2.1: Übersicht der verwendeten siRNAs.**

Sequenzen für die gegen DDX6 und hnRNP K gerichteten siRNAs entstammen den genannten Publikationen.

### 2.2.4 Tube formation assay

Bei einem *Tube formation assay* kann das angiogene Potential von zellulären Faktoren untersucht werden (Saito *et al.* 2003). Hierbei werden humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) auf einer Matrix (Matrigel, BD Bioscience) ausgesät und gereinigten zellulären Faktoren oder Kulturüberständen ausgesetzt. Die in der Folge gegebenenfalls stattfindende Zu- oder Abnahme der Anordnung von HUVEC zu 2-dimensionalen zirkulären Strukturen, sogenannten *Tubes*, wird lichtmikroskopisch erfasst und quantifiziert.

Die gezeigten *Tube formation assays* wurden von Dr. med. Hongqi Lue (Institut und Lehrstuhl für Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Uniklinik RWTH Aachen) nach Coleman *et al.* 2008 durchgeführt. 96-well-Platten wurden mit 40 µl Matrigel pro *well* für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden HUVEC mit  $3 \times 10^5$  Zellen pro *well* in 100 µl Medium ausgesät und für 16 h bei 37°C inkubiert. Das Medium setzte sich aus 25% HUVEC-Medium (Promocell) und 75% konditioniertem MCF-7-Zellmedium zusammen. Die Neutralisierung von VEGF im MCF-7-Medium erfolgte durch Zugabe von 500 ng/ml VEGF-Antikörper (R&D Systems, 20 min, Raumtemperatur) nach Saito *et al.* 2003.

## 2.3 Herstellung von Lysaten und cytoplasmatischen Extrakten

### 2.3.1 Präparation von Gesamtzell-Lysaten (Triton-Lysat)

Zur Generierung von Triton-Lysaten wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS direkt auf der Platte lysiert (60 µl Triton-Lysepuffer pro *well* einer 6-well-Platte). Die anschließende 30-minütige Inkubation erfolgte in 1,5 ml-Reagiergefäßen auf Eis. Nach Zentrifugation (10 min, 4°C, 20.000 x g) wurden die Überstände in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

#### Triton-Lysepuffer

20 mM Tris-HCl pH 7,4

300 mM NaCl

1% Triton-X-100

2 µg/ml Pepstatin A

1 µg/ml Leupeptin

1 mM PMSF

1 mM DTT

#### PBS pH 7,4

137 mM NaCl

2,7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 2.3.2 Nukleus-Cytoplasma-Fraktionierung

Das Protokoll ist eine Abwandlung der Methode von in Pei *et al.* 2008. Normoxische und hypoxische MCF-7-Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in PBS abgekratzt. Die Zellsuspension wurde 2 min bei 4°C mit 250 x g zentrifugiert und in Puffer A resuspendiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat zentrifugiert (10 min, 4°C, 6500 x g). Der Überstand (die cytoplasmatische Fraktion) wurde abgenommen und durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 20.000 x g) geklärt. Das Pellet, vor allem bestehend aus Zellkernen und -trümmern, wurde nach zweimaligem Waschen mit Puffer A (Zentrifugation: 2 min, 4°C, 12.000 x g) in Puffer B aufgenommen. Nach einer 10-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat zentrifugiert (10 min, 4°C, 20.000 x g) und der Überstand (die nukleäre Fraktion) für weitere Analysen eingesetzt.

#### Puffer A

0,2% NP-40

50 mM Kaliumchlorid

20 mM Hepes pH 7,6

1,5 mM Magnesiumchlorid

1 mM DTT

1x Proteaseinhibitor-Mix (Roche)

(Mini; ohne EDTA)

#### Puffer B

20 mM Hepes pH 7,6

400 mM Natriumchlorid

25% (v/v) Glycerin

1,5 mM Magnesiumchlorid

1 mM DTT

1x Proteaseinhibitor-Mix

### 2.3.3 Herstellung translations-kompetenter, cytoplasmatischer Extrakte

Die Präparation von normoxischen translationskompetenten Extrakten aus MCF-7-Zellen erfolgte bei einer Zelldichte von 70-80% ( $0,5-0,6 \times 10^5$  Zellen/cm<sup>2</sup>, 24 15 cm-Platten). 24 h vor der Extraktpräparation wurde ein Mediumwechsel durchgeführt. Für die Gewinnung hypoxischer translationskompetenter Extrakte wurden die MCF-7-Zellen (6 Platten á 150 cm<sup>2</sup>) nach dem Mediumwechsel für 24 h in hypoxische Wachstumsbedingungen überführt. Zum Ablösen der normoxischen bzw. hypoxischen Zellen von der Kulturschale wurde zunächst mit raumtemperiertem PBS gewaschen und mit 3 ml Trypsin-EDTA für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem Medium auf Eis durch Auf- und Abpipettieren von der Platte abgelöst und in sterile Reaktionsröhrchen überführt. Die Zellen wurden dreimal mit 45 ml eiskaltem isotonischem Puffer

gewaschen. Die Zentrifugationen erfolgten für 2 min (4°C, 300 x g). Das Zellpellet wurde 1:1 (w/v) in hypotonischem Puffer resuspendiert und zum Quellen der Zellen 10 min auf Eis inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch 10-maliges Aufziehen und wieder Ausstoßen mit einer 2 ml-Spritze durch eine 26G-Kanüle (Braun). Zelltrümmer und Nuklei wurden durch Zentrifugation (10 min, 4°C, 20.000 x g) entfernt. Die Überstände wurden bei -80°C gelagert.

Isotonischer Puffer

35 mM Hepes pH 7,6

146 mM NaCl

11 mM Glucose

Hypotonischer Puffer

10 mM Hepes pH 7,6

10 mM Kaliumacetat

0,5 mM Magnesiumacetat

5 mM DTT

1x Protease-Inhibitor-Mix (Roche)

(ohne EDTA)

### 2.3.4 Herstellung von Lysaten für die Polysomen-Fraktionierung

Für die Analyse der Ribosomen-Beladung endogener mRNAs wurden die MCF-7-Zellen (eine 15 cm-Platte pro Bedingung, 70-80% konfluent) vor der Ernte für 10 min mit Cycloheximid-haltigem (100 µg/ml) MCF-7-Medium bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit eiskaltem PBS (inkl. 100 µg/ml Cycloheximid) wurden die Zellen in PBS (inkl. 100 µg/ml Cycloheximid) mittels Zellschaber von der Platte gelöst. Die Zellen wurden abzentrifugiert (2 min, 4°C, 300 x g) und der Überstand entfernt. Das Zellpellet wurde in eiskaltem CHX-Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Die Lyse erfolgte durch 10 Stöße mit dem Dounce-Homogenisator. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 min, 4°C, 20.000 x g) und der Überstand nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

CHX-Lysepuffer

150 mM KCl

20 mM Hepes pH 7,6

6,5 mM MgCl<sub>2</sub>

1 mM DTT

100 µg/ml Cycloheximid

0,5% NP-40

1x Protease-Inhibitor-Mix

200 U/ml Ribolock (Fermentas)

## **2.4 Bestimmung von Protein- und Nukleinsäurekonzentrationen**

### **2.4.1 Quantifizierung von Gesamtprotein**

Zur Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration in unterschiedlichen Lysaten wurde der kolorimetrische Nachweis nach Bradford (Bradford, 1976) durchgeführt. Abhängig von der Proteinkonzentration wurden die Proben unverdünnt oder in entsprechendem Lysepuffer bis zu 10-fach verdünnt. Für die Messung wurden 1-2 µl Probe mit 1 ml Bradford-Verdünnung (Bradford Rotiquant, Carl Roth) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Absorptionsmessung erfolgte bei 595 nm im Wertebereich 0,1-0,3 AU. Die Umrechnung der Absorptionswerte erfolgte anhand einer BSA-Eichreihe.

### **2.4.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren**

Die Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgte unverdünnt mit einem NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific). Hierbei erfolgt die Umrechnung der RNA- oder DNA-Konzentration in ng/µl aus der Absorption bei 260 nm.

## 2.5 Gelelektrophorese von Proteinen und Nukleinsäuren

### 2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine in Lysaten und Extrakten wurden nach ihrer Größe mittels diskontinuierlicher SDS-PAGE (Laemmli 1970) unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen getrennt. Hierzu wurden die Proben zunächst in 2x Probenpuffer aufgenommen und anschließend 5-10 min bei 95°C inkubiert. Als Größenstandard wurde PageRuler (prestained protein ladder, Thermo-Fisher) verwendet.

#### Sammelgel

5% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)  
125 mM Tris-HCl pH 6,8  
0,1% APS  
0,04% TEMED

#### Trenngel

10-12% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)  
375 mM Tris-HCl pH 6,8  
0,1% APS  
0,04% TEMED

#### Laufpuffer

250 mM Glycin  
25 mM Tris (Base)  
3,5 mM SDS

#### 2x Probenpuffer

250 mM Tris-HCl pH 6,8  
4% SDS  
20% Glycerin  
10%  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,02% Bromphenolblau

### 2.5.2 Silberfärbung von SDS-Gelen

Die Visualisierung von Proteinen im SDS-Gel erfolgte mittels Silberfärbung nach Nesterenko *et al.* 1994:

1. 5 min in Lösung A fixieren
2. Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (3 x 5 s, 1 x 5 min, 3 x 5 s)
3. 5 min vorbehandeln mit 50% Aceton ddH<sub>2</sub>O
4. Sensibilisierung für 1 min in 60 ml Lösung B
5. Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (3 x 5 s)
6. 8 min imprägnieren in Lösung C
7. Waschen mit ddH<sub>2</sub>O (2 x 5 s)
8. 10-60 s entwickeln in Lösung D
9. Stoppen in 1% Essigsäure, anschließend mit ddH<sub>2</sub>O waschen

Lösung A

60 ml Aceton (50%)  
 1,5 ml TCA (50% w/v)  
 25 µl Formaldehyd (37%)

Lösung B

60 ml ddH<sub>2</sub>O  
 100 µl Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20% w/v)

Lösung C

60 ml ddH<sub>2</sub>O  
 0,8 ml AgNO<sub>3</sub> (14% w/v)  
 25 µl Formaldehyd (37%)

Lösung D

60 ml ddH<sub>2</sub>O  
 1,2 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
 25 µl Formaldehyd (37%)  
 25 µl Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (20% w/v)

**2.5.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Nukleinsäuren wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese nach ihrer Größe aufgetrennt und durch GelRed (Biotium) unter UV-Licht im LAS-4000 *Imaging System* (Fuji) visualisiert. GelRed ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der, wie Ethidiumbromid, mit Nukleinsäuren interagiert und durch UV-Licht anregbar ist.

*In vitro*-Transkripte und Gesamt-RNA wurden in einem 1%-igem Agarosegel in TAE-Puffer (mit 1 µl GelRed pro 10 ml Gellösung) aufgetrennt (1 h, 48 V). Die Denaturierung der RNA erfolgte nach Zugabe von 6 µl RNA-Ladepuffer pro 2 µl Probe für 5 min bei 95°C. Anschließend wurden die Proben 5 min auf Eis inkubiert, um die erneute Ausbildung von Sekundärstrukturen zu verhindern. Als Größenstandard diente Riboruler HR (Fermentas) in RNA-Ladepuffer.

TAE-Puffer

40 mM Tris (Base)  
 20 mM Essigsäure  
 1 mM EDTA

RNA-Lade-Puffer

48% Formamid  
 6,4% Formaldehyd  
 40 mM MOPS-NaOH pH 7,0  
 10 mM Natriumacetat  
 1 mM EDTA  
 5,4% Glycerin  
 0,2% Bromphenolblau



Für die Auftrennung von DNA wurden 0,8-1,8%-ige Agarose-Gele in TBE-Puffer verwendet (mit 1 µl GelRed pro 20 ml Gellösung). Restriktionsansätze und unbehandelte Plasmide wurden mit 4x DNA-Ladepuffer gemischt und anschließend elektrophoretisch getrennt (1 h, 100 V). RT-PCR-Ansätze konnten aufgrund des integrierten Ladepuffers (siehe Abschnitt 2.7.3) direkt auf das Gel aufgetragen werden.

Abhängig von den erwarteten Produktgrößen wurde als Größenstandard eine 1 kb- (Invitrogen) oder eine 50 bp-DNA-Leiter (NEB) verwendet.

TBE-Puffer

90 mM Tris (Base)

90 mM Borsäure

2 mM EDTA

4x DNA-Ladepuffer

20% Glycerin

0,2% Bromphenolblau

0,2% Xylen-Cyanol FF

## 2.6 Immunologische Methoden

### 2.6.1 Western blot

Der Western blot diente dem spezifischen Nachweis von Proteinen, die zuvor mittels SDS-PAGE entsprechend ihrer Größe aufgetrennt wurden (siehe Abschnitt 2.5.1). Der Elektrotransfer der Proteine auf PVDF-Membran (Merck, Millipore) wurde in einer Nass-Blot-Apparatur (BioRad Laboratories) über Nacht bei 25 V in Transfer-Puffer im Eisbad durchgeführt.

Anschließend wurde die Membran mit 5% Milchpulver (Sucofin) in TBST-Puffer geblockt (1 h, Raumtemperatur). Nach Inkubation mit primärem Antikörper (1 h, Raumtemperatur) wurde mit TBST-Puffer gewaschen (5 x 5 min, Raumtemperatur). Nach der Inkubation mit HRP (Meerrettich-Peroxidase, *horse raddish peroxidase*)-gekoppeltem, sekundärem Antikörper wurde erneut gewaschen. Das Lumineszenz-Signal der HRP wurde mit Substrat-Lösung (Supersignal WestPicoPlus, Thermo Fisher) im LAS-4000 detektiert. Die Verdünnungen der primären und sekundären Antikörper sind in Tabelle A.5 angegeben.

TBST-Puffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

0,05% Tween-20

Transfer-Puffer

25 mM Tris

200 mM Glycin

Inkubations- und Waschschrte für einzelne Antikörper, die von der oben genannten Prozedur abweichen, sind ebenfalls in Tabelle A.5 zusammengefasst.

### **2.6.2 Immunfluoreszenz und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH)**

Immunfluoreszenzen und Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierungen wurden von Dr. rer. nat. Isabel S. Naarmann-de Vries (Experimentelle Arbeitsgruppe Intensivmedizin, Uniklinik RWTH Aachen) durchgeführt. Die hierbei verwendeten Methoden sind in Naarmann *et al.* 2008 und Naarmann *et al.* 2010 beschrieben. Abweichend von der Prozedur in Naarmann *et al.* 2010 wurde die Hybridisierung der FISH-Sonden (Tabelle A.6) vor den Immunfluoreszenz-Färbungen durchgeführt. Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder erfolgte an einem Axio Observer-Mikroskop mit ApoTome.2. Sie wurden mit Axio-Vision-Software verarbeitet und Intensitätsprofile mittels ImageJ berechnet. Die verwendeten Antikörper sind in den Tabellen A.7 und A.8 zusammengefasst.

### **2.6.3 ELISA (enzyme-linked immuno-sorbent assay)**

Der Nachweis von löslichem VEGF-Protein in Zellkulturüberständen und Gesamt-Zellysaten von MCF-7-Zellen erfolgte als Triplikat mittels anti-hVEGF DuoSet (R&D-Systems). Nach Zugabe eines Substrates wurde der durch die Streptavidin-gekoppelte HRP bewirkte Farbumschlag in einem Tecan Infinite 200 PRO NanoQuant bei 450 nm quantifiziert (Referenz-Wellenlänge 570 nm).

Der *Capture*-Antikörper (1:500-Verdünnung in PBS) wurde über Nacht unter Schütteln bei Raumtemperatur mit 100 µl pro well in 96-well-Platten (Corning, High binding) immobilisiert. Nach dreimaligem Waschen mit ELISA-Waschpuffer (300 µl pro well) wurde für mindestens 1 h bei Raumtemperatur geblockt (1% BSA und 5% Saccharose in PBS). Anschließend wurden Überstände (100 µl/well) appliziert und über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur späteren Quantifizierung wurde eine Verdünnungsreihe mit rekombinantem VEGF<sub>165</sub> (R&D Systems) in MCF-7-Medium (siehe Abschnitt 2.2.1) auf jeder Platte mitgeführt (in 1:1-Verdünnungsschritten von 2 ng/ml bis 31,25 pg/ml).

Anschließend wurde gewaschen (siehe oben). Nach Zugabe eines biotinylierten Detektions-Antikörpers (1:500 in Diluent, 100 µl pro well) wurde 2 h inkubiert (Raumtemperatur). Nach erneutem Waschen wurde 30 min mit Streptavidin-HRP (1:200 in

Diluent) inkubiert (Raumtemperatur). Nach einem weiteren Waschschrift wurde 100 µl/well Substrat (2,2'-Azino-Bis/3-Ethylbenzthiazoline-6-Sulfonsäure) zugegeben. Die einsetzende Blaufärbung wurde verfolgt bis eine leichte Färbung der mittleren Verdünnungsstufen sichtbar war. Dann wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1 M) gestoppt (die Farbe wechselt dabei von blau nach gelb).

Diluent

1% BSA in PBS pH 7,4

Waschpuffer

PBS pH 7,4

0,05% Tween 20

#### 2.6.4 Immunopräzipitation

Die Immunopräzipitation von hnRNP K basiert auf der Methode von Naarmann *et al.* (2008).

Für die spezifische Präzipitation von hnRNP K wurde der hnRNP K-Antikörper (0,05 µl/µg cytoplasmatischer Extrakt) mit 40 µl einer Protein-A-Sepharose-Suspension (1:1 v/v in PBS) in 500 µl PBS für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit je 1 ml Natrium-Borat-HCl (0,2 M, pH 9,0) wurden Antikörper und Protein-A-Sepharose in Anwesenheit von 20 mM Dimethylpimelimidat (Sigma-Aldrich) in 0,1 M Natrium-Borat-HCl für 30 min bei Raumtemperatur kovalent gekoppelt. Anschließend wurde mit 1 ml Ethanolamin (0,2 M, pH 8) gewaschen und 2 h in 0,2 M Ethanolamin bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen in PBS wurde die mit hnRNP K-Antikörper gekoppelte Protein-A-Sepharose in PBS resuspendiert. Ein Kontroll-Antikörper (Anti-Luciferase) wurde identisch behandelt.

Zum Nachweis co-immunopräzipitierender Proteine wurden 100 µg (Gesamt-Protein) cytoplasmatischer Extrakt pro Ansatz verwendet; die Analyse co-immunopräzipitierender RNAs erfolgte aus 300 µg Extrakt pro Ansatz.

Für die Immunopräzipitation wurde der cytoplasmatische Extrakt mit 40 µl Antikörpergekoppelter Protein-A-Sepharose-Suspension und 500 µl IPP-Bindepuffer versetzt und 1,5 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit IPP-Waschpuffer gewaschen (Zentrifugationsschritte: 2 min, 5000 x g, 4°C). Die Immunopräzipitationsansätze wurden für die Western blot-Analytik in SDS-Probenpuffer beziehungsweise für den Nachweis co-immunopräzipitierter RNAs in Trizol aufgenommen.

Die RNA-Abhängigkeit der Co-Immunopräzipitation von Proteinen mit hnRNP K wurde mit Hilfe einer *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung geprüft. Hierzu wurde der cytoplasmatische Extrakt vor der Immunopräzipitation mit 2x IPP-Puffer (f.c. 1x IPP-Puffer), CaCl<sub>2</sub> (f.c. 1,2 mM) und *Micrococcus*-Nuklease (Roche) (15 U / 200 µg cytoplasmatischer Extrakt) für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Verdau wurde durch Zugabe von EGTA (f.c. 2,5 mM) gestoppt und für die Immunopräzipitation eingesetzt.

<u>IPP-Bindepuffer</u>	<u>IPP-Waschpuffer</u>	<u>2x IPP-Puffer</u>
20 mM Hepes pH 7,4	20 mM Hepes pH 7,4	40 mM Hepes pH 7,4
100 mM KCl	100 mM KCl	200 mM KCl
5 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	5 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>	10 mM Mg(Ac) <sub>2</sub>
0,025% Triton X-100	1 mM DTT	0,05% Triton X-100
1 mM DTT	5 mM PMSF	2 mM DTT
5 mM PMSF	20 µg/ml Leupeptin	10 mM PMSF
20 µg/ml Leupeptin		40 µg/ml Leupeptin

## 2.7 RNA-basierte Methoden

### 2.7.1 RNA-Präparation und DNase-Behandlung

Für die Bestimmung von RNA-Stabilitäten aus *in vitro*-Translations-Reaktionen, der Verteilung von mRNAs in Polysomen-Gradienten und die Bestimmung von mRNA-Mengen in cytoplasmatischem Extrakt nach *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung (Roche) erfolgte die Präparation der RNA mittels Trizol nach Herstellerangaben in Gegenwart von 20 µg Glycogen pro Ansatz.

Als Extraktionskontrolle wurden, wo für die Verwendung als Referenz-RNA erforderlich, 0,5 – 5 ng *in vitro*-transkribierte Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)-mRNA zugegeben.

Die DNase-Behandlung von Gesamt-RNA erfolgte mittels RQ1-DNase (RNase-frei, Promega). Der RQ1-DNase-Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend mit 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O auf 100 µl Gesamt-Volumen aufgefüllt. Nach Extraktion mit gleichen Volumen Phenol(H<sub>2</sub>O)/Chloroform (1:1) und Chloroform erfolgte die Fällung mit 25 µl Ammonium-Acetat (4 M), 1 µl Glycogen (20 mg/ml) und 320 µl Ethanol. Die RNA wurde

in 10 µl DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst (10 min, 55°C, 1400 rpm) und die Konzentration bestimmt. RNA-Präparationen von *in vitro*-Translations-Reaktionen und aus Polysomen-Gradienten wurden nicht RQ1-DNase-behandelt.

RQ1-DNase-Reaktion

2-10 µg Gesamt-RNA

0,3 U RQ1.DNase pro 1 µg RNA

1x RQ1-Puffer

DEPC-H<sub>2</sub>O *ad* 50 µl

### 2.7.2 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription (RT) von Gesamt-RNA nach RQ1-DNase-Behandlung und RNA aus *in vitro*-Translationsreaktionen wurden gleiche Mengen Gesamt-RNA (1-2 µg) eingesetzt. Die aus Polysomen-Gradienten-Fractionen präparierte RNA wurde nach dem Lösen in 8 µl DEPC-H<sub>2</sub>O vollständig für die RT eingesetzt (siehe Abschnitt 2.11.1).

Die RNA wurde zunächst mit 20 pmol random-R<sub>6</sub>-Primer versetzt und in einem Volumen von 10 µl inkubiert (5 min, 70°C). Nach Zugabe von 15 µl RT-Mix erfolgte die reverse Transkription der RNA für 1 h bei 42°C. Hiernach wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert (70°C, 20 min).

RT-Mix (1x)

1x RT-Puffer

0,5 mM dNTPs

150 U M-MLV-RT (RNase H)

(Promega)

DEPC-H<sub>2</sub>O *ad* 15 µl

### 2.7.3 RT-PCR

Der Nachweis von mRNAs in *Micrococcus*-Nuklease-behandelten cytoplasmatischen Extrakten und in Polysomen-Fractionen erfolgte mittels RT-PCR. Hierzu wurden die RNAs zunächst, wie unter 2.7.2 beschrieben, in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Nach Ablauf des PCR-Programms wurden 5 µl des RT-PCR-Ansatzes mittels Agarosegel-Elektrophorese analysiert (siehe Abschnitt 2.5.3). Die verwendeten Primer sowie die Größen der PCR-Produkte sind in Tabelle 2.5 zusammengefasst.

<u>RT-PCR-Ansatz</u>	<u>PCR-Programm</u>	
1x Taq-Puffer, grün	3 min 95°C	
1,5 mM Magnesiumchlorid	30 s 95°C	} x Zyklen
0,2 mM dNTP-Mix	30 s 55°C	
0,4 µM hin-Primer	30 s 72°C	
0,4 µM rück-Primer	2 min 72°C	
1 U GoTaq-DNA-Polymerase (Promega)		
2 µl RT-Reaktion		
DEPC-H <sub>2</sub> O ad 25 µl		

### 2.7.4 qRT-PCR

Die Analyse von RNA-Mengen zur Bestimmung der Stabilitäten endogener mRNA in Actinomycin D-Zeitreihen (siehe Abschnitt 2.7.5) und von Reporter-mRNAs aus *in vitro*-Translations-Reaktionen (siehe Abschnitt 2.9.2) sowie in Polysomengradienten (siehe Abschnitt 2.12.1) erfolgte mittels qRT-PCR in einem 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, USA).

Reporter-mRNAs aus *in vitro*-Translations-Reaktionen wurden nach der reversen Transkription für die qRT-PCR 1:20 in DEPC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Amplifikation erfolgte in 96-well-Platten mit einem Reaktionsvolumen von 15 µl pro well in Dreifachbestimmung. Als Polymerase-Mix wurde der 2x PCR-Master-Mix (Promega) verwendet. Für die Quantifizierung endogener mRNAs aus Polysomengradienten-Fractionen und Actinomycin D-Zeitreihen wurde die RNA 1:5 oder 1:10 verdünnt.

Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{(-\Delta \Delta Ct)}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Die Kalkulation der Amplifikations- Schwellenzyklen (Ct-Werte) erfolgte mit Hilfe der Geräte-Software.

<u>Reaktionsansatz</u>	<u>qRT-PCR-Programm</u>	
1x PCR-Mix	3 min 95°C	
3x SYBR-Green1	30 s 95°C	} 40 - 45 Zyklen
15x ROX	30 s 55°C	
0,2 µM hin-Primer	30 s 72°C	
0,2 µM rück-Primer	30 s 95°C	
5 µl cDNA-Verdünnung	Schmelzkurve: 55°C → 95°C	
DEPC-H <sub>2</sub> O ad 15 µl		

Die Normalisierung der Ct-Werte erfolgte für die RNAs aus Gradienten-Fractionen und aus *in vitro*-Translations-Reaktionen auf die, als Extraktionskontrolle zugegebene, CAT-RNA. Bei der Quantifizierung der RNA-Stabilität endogener VEGF-mRNA erfolgte die Normalisierung auf RPLP0. Hier gezeigt am Beispiel der VEGF-mRNA nach siRNA-vermittelter Reduzierung der DDX6-Menge (*DDX6-knock down*) unter Normoxie, 60 min nach Actinomycin D-Zugabe:

$$\Delta Ct_{0\text{min, VEGF}} = Ct_{0\text{min, VEGF}} - Ct_{0\text{min, RPLP0}} = 23,316 - 15,992 = 7,324$$

$$\Delta Ct_{60\text{min, VEGF}} = Ct_{60\text{min, VEGF}} - Ct_{60\text{min, RPLP0}} = 23,194 - 15,376 = 7,818$$

$$\Delta \Delta Ct_{60\text{min, VEGF}} = \Delta Ct_{60\text{min, VEGF}} - \Delta Ct_{0\text{min, VEGF}} = 0,494$$

$$2^{(-\Delta \Delta Ct)_{60\text{min, VEGF}}} = 0,70981 = \underline{71\%}$$

Name	Orientierung	Sequenz	Produkt (bp)
Firefly-Luciferase ORF	hin	5'-CCTTCCGCATAGAACTGCCT-3'	244
	rück	5'-GGTTGGTACTAGCAACGCAC-3'	
CAT	hin	5'-GGAATTCCGTATGGCAATGA-3'	233
	rück	5'-GATTGGCTGAGACGAAAAAC-3'	
VEGF <sub>total</sub> (1)	hin	5'-CGAGGGCCTGGAGTGTGT-3'	77
	rück	5'-GGCCTTGGTGAGGTTTGATC-3'	
VEGF <sub>121</sub> (2)	hin	5'-CCCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3'	245
	rück	5'-GCCTCGGCTTGTCACATTTT-3'	
VEGF <sub>165</sub> (2)	hin	5'-CCCTGATGAGATCGAGTACATCTT-3'	245
	rück	5'-AGCAAGGCCACAGGGATTT-3'	
β-Aktin (3)	hin	5'-TCCCTGGAGAAGAGCTACG-3'	131
	rück	5'-GTAGTTTCGTGGATGCCACA-3'	
RPLP0 (3)	Hin	5'-GGCGACCTGGAAGTCCAAC-3'	149
	rück	5'-CCATCAGCACCACAGCCTTC-3'	
Myosin 10	Hin	5'-CGACAACCAGTGCATCCTCAT-3'	98
	rück	5'-ACTGTTGACTGATGACTGACAG-3'	
GAPDH (4)	Hin	5'-ACAGTCAGCCGCATCTTCTT-3'	280
	rück	5'-CTGGAAGATGGTGATGGGAT-3'	

**Tabelle 2.5: Oligodesoxyribonukleotide (Primer) für die RT-PCR und qRT-PCR.**

Wo angegeben wurde auf zuvor veröffentlichte Sequenzen zurückgegriffen: (1) Gutschner (2008), (2) Wellmann *et al.* (2001), (3) Stöhr *et al.* 2006, (4) Naarmann *et al.* (2008).



### 2.7.5 Bestimmung von Stabilitäten endogener mRNAs

Für die Bestimmung von RNA-Stabilitäten nach siRNA-vermittelter Reduzierung der DDX6-Menge wurde der Transkriptioninhibitor Actinomycin D (Sigma-Aldrich) verwendet.

MCF-7-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit Kontroll-siRNAs oder mit siRNAs gegen DDX6 (siehe Abschnitt 2.2.3) für weitere 24 h in einer sterilen, hypoxischen Arbeitsbank bei 37°C mit 1% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub> und 94% N<sub>2</sub> kultiviert.

Actinomycin D (5 mg/ml in DMSO) wurde frisch vor Zugabe zu den Zellen in komplettiertem Kultivierungs-Medium *ad* 55 µg/ml verdünnt. Pro 6-well wurden 200 µl dieser Verdünnung zu den mit 2 ml MCF-7-Medium kultivierten Zellen hinzugegeben (*f.c.* 5 µg/ml). Die RNA-Präparation wurde direkt nach der Zugabe von Actinomycin D (entspricht dem Zeitpunkt 0 h) beziehungsweise nach 1 h und 2 h durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen in den 6-well-Platten auf Eis überführt, zweimal mit 2 ml eiskaltem PBS gewaschen, mit 750 µl Trizol versetzt und nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Nach der Behandlung mit RQ1-DNase erfolgte die reverse Transkription. Die Stabilität der VEGF-mRNA wurde mittels qRT-PCR analysiert. Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ -Methode (Livak und Schmittgen 2001). Hierzu wurde zunächst auf RPLP0 ( $\Delta Ct$ ) und anschließend auf die jeweiligen 0h-Zeitpunkte ( $\Delta\Delta Ct$ ) normalisiert.

### 2.8 *in vitro*-Transkription

Informationen zu Plasmiden für die *run off in vitro*-Transkription, zu Restriktionsenzymen, die zu deren Linearisierung verwendet wurden und Transkriptlängen sind in Tabelle 2.6 zusammengefasst. Die *in vitro*-Transkription von *pFF* sowie *pRen-VEGF-FF-p(A)*, *pSL-Ren-VEGF-FF-p(A)*, *pRen-FF-p(A)* und *pSL-Ren-FF-p(A)* erfolgte in Anwesenheit von 6 mM m7GpppG (KEDAR). Alle weiteren *in vitro*-Transkripte wurden co-transkriptional am 5'-Ende mit dem nicht-funktionalen Cap-Analogon ApppG (KEDAR) versehen. Als RNA-Polymerase wurde das T3-RNA-Polymerase Megascript Kit (Ambion) verwendet. Die Linearisierung wurde mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft. Die vollständig linearisierte DNA wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert, anschließend präzipitiert, in DEPC-H<sub>2</sub>O aufgenommen und *ad* 0,5 – 1 µg/µl verdünnt. Die *in vitro*-Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers in einer 20 µl Reaktion für 2 h bei 37°C.

Bezeichnung	Enzym zur Plasmid-Linearisierung	RNA-Länge(kb)
<i>pVEGF-FF</i>	<i>NotI</i>	2,9
<i>pVEGF<sub>inv</sub>-FF</i>	<i>NotI</i>	2,9
<i>pFF</i>	<i>BamHI</i>	1,9
<i>pVEGF-FF-p(A)</i>	<i>NotI</i>	3
<i>pVEGF-FF-Kontrolle</i>	<i>NotI</i>	3,5
<i>pVEGF-FF-3'UTR(fl)</i>	<i>NotI</i>	4,9
<i>pVEGF-FF-3'1</i>	<i>NotI</i>	3,6
<i>pVEGF-FF-3'2</i>	<i>NotI</i>	3,6
<i>pVEGF-FF-3'3</i>	<i>NotI</i>	3,8
<i>pVEGF-FF-Kontrolle-p(A)</i>	<i>HindIII</i>	3,6
<i>pVEGF-FF-3'UTR(fl)-p(A)</i>	<i>HindIII</i>	5,0
<i>pVEGF-FF-3'1-p(A)</i>	<i>HindIII</i>	3,7
<i>pVEGF-FF-3'2-p(A)</i>	<i>HindIII</i>	3,7
<i>pVEGF-FF-3'3-p(A)</i>	<i>HindIII</i>	3,9
<i>pRen-VEGF-FF-p(A)</i>	<i>NotI</i>	4,0
<i>pSL-Ren-VEGF-FF-p(A)</i>	<i>NotI</i>	4,0
<i>pRen-FF-p(A)</i>	<i>NotI</i>	2,9
<i>pSL-Ren-FF-p(A)</i>	<i>NotI</i>	2,9
<i>pTob-VEGF-5'UTR</i>	<i>NotI</i>	1,2
<i>pTob-VEGF-3'UTR</i>	<i>NotI</i>	2,1
<i>pTob-Kontrolle (ctrl.)</i>	<i>NotI</i>	0,4
<i>pTob-VEGF-sORF-3'UTR(fl)</i>	<i>NotI</i>	3,2

**Tabelle 2.6 Plasmide für die *in vitro*-Transkription und die zu ihrer Linearisierung eingesetzten Restriktionsenzyme.**

Die angegebenen RNA-Längen beziehen sich auf die Transkripte, wie sie aus einer *run off-in vitro*-Transkription mittels T3-RNA-Polymerase vom linearisierten Plasmid erhalten wurden.

Zur Aufreinigung der *in vitro*-Transkripte wurde zunächst mit Phenol(H<sub>2</sub>O)/Chloroform (1:1) und anschließend mit Chloroform extrahiert. Die wässrige Phase wurde über 2 Chromaspin-Gelfiltrationssäulen nach Angaben des Hersteller gereinigt und nach Zugabe von 5 µl 3 M Natriumacetat und 250 µl 100% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Die Ausbeute wurde absorptionsspektroskopisch ermittelt und die Integrität der RNA mittels Agarosegel-Elektrophorese überprüft.

Transkriptions-Reaktion

7,5 mM ATP

7,5 mM CTP

7,5 mM UTP

1,5 mM GTP

6 mM ApppG oder m<sup>7</sup>GpppG (KEDAR)

je 1x Enzym- und Puffer-Mix

1 µg linearisierte DNA

H<sub>2</sub>O ad 20 µl**2.9 *in vitro*-Translation**

Die Zusammensetzung der *in vitro*-Translations-Reaktionen basiert auf der Publikation von Bergamini *et al.* 2000. Für *in vitro*-Translationsreaktionen wurden die eingesetzten cytoplasmatischen Extrakte zuvor mit *Micrococcus*-Nuklease (Roche) behandelt (siehe Abschnitt 2.9.1). Die für die *in vitro*-Translation eingesetzten monocistronischen Reporter-RNAs kodieren für die Glühwürmchen-Luciferase (*Firefly*, FF) und, im Fall der bicistronischen Transkripte, zusätzlich der *Renilla reniformis*-Luciferase (*Renilla*, Ren). Die Quantifizierung der Translation für die jeweiligen RNAs wurde luminometrisch mit Substraten für *Firefly*-Luciferase (LAR I bzw. LAR II) und *Renilla*-Luciferase (StopGlo) (Promega) ermittelt (Messzeit 10s). Für die 5′m<sup>7</sup>GpppG-Cap-abhängige Translation monocistronischer *Firefly*-Reporter-RNAs wurden 50 fmol RNA pro Reaktion eingesetzt. Die Translation bicistronischer Reporter-Transkripte wurde mit 100 fmol pro Reaktion durchgeführt. Für 5′Cap-unabhängige *in vitro*-Translationsreaktion monocistronischer RNAs wurden 200 fmol pro Reaktion verwendet. Die Inkubation der Reaktionsansätze erfolgte 30 min bei 37°C.

*in vitro*-Translations-Reaktionen

60 µg *Micrococcus*-Nuklease-behandelter cytoplasmatischer MCF-7-Extrakt

16 mM Hepes pH 7,6

100 µM Aminosäure-Mix

2,5 mM Magnesiumacetat

60 mM Kaliumacetat

80 µg/ml bovine tRNA

0,8 mM ATP

0,1 mM GTP

40 µg/ml Kreatin-Kinase (Roche)

20 mM Kreatin-Phosphat

50 – 200 fmol Reporter-RNA

DEPC-H<sub>2</sub>O *ad* 10 µl

**2.9.1 *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung von cytoplasmatischen Extrakten**

Um den Anteil endogener mRNAs in den cytoplasmatischen Extrakten zu verringern und so die Translation exogener Reporter-RNAs zu begünstigen, wurde ein limitierter Verdau mit *Micrococcus*-Nuklease (Roche) durchgeführt.

60 µg cytoplasmatischer Extrakt wurde in Gegenwart von 0,2 mM Calciumacetat mit 0,4 U *Micrococcus*-Nuklease für 8 min bei Raumtemperatur verdaut. Das Abstoppen erfolgte durch Zugabe von EGTA (*f.c.* 0,4 mM) und Inkubation auf Eis. Der *Micrococcus*-Nuklease-behandelte Extrakt wurde unmittelbar für die *in vitro*-Translation eingesetzt.

**2.9.2 Bestimmung der Reporter-RNA-Stabilität**

Für die Stabilitäts-Bestimmung der Reporter-RNAs aus *in vitro*-Translations-Reaktionen wurde die RNA aus Ansätzen präpariert, die entweder 30 min bei 37°C (30'), oder auf Eis (0') inkubiert waren. Für die jeweiligen Werte-Paare wurden die Hälfte der Translationsreaktionen jeweils bei 37°C inkubiert oder auf Eis gehalten. Die RNA-Präparation (siehe Abschnitt 2.7.1) und die reverse Transkription (siehe Abschnitt 2.7.2) erfolgten wie oben beschrieben. Für die Auswertung der qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.7.4) wurde zunächst auf die CAT-RNA normalisiert ( $\Delta C_t$ ) und anschließend der 30'- mit dem 0'-Wert verrechnet ( $\Delta\Delta C_t$ ), ausgedrückt als relative RNA-Stabilität (%).

## 2.10 RNA-Affinitäts-Reinigung (Tobramycin-Reinigung)

Viele Aminoglycosid-Antibiotika interagieren mit der bakteriellen 16S-rRNA und führen so zu Fehlern bei der mRNA-Translation und letztlich zum Absterben der Bakterien (Noller, 1991). Im Rahmen der näheren Charakterisierung dieser RNA-Aminoglycosid-Interaktion wurden kurze RNA-Moleküle (Aptamere), die spezifisch mit Tobramycin, einem Aminoglycosid-Antibiotikum, interagieren, untersucht (Wang und Rando 1995). Das 40 Nukleotide lange Aptamer J6f1 besitzt eine hohe Bindungsaffinität zu Tobramycin ( $K_D$  ca. 5 nM) (Hamasaki *et al.* 1998).

Bei der Analyse von pre-Splicosom-Komplexen (Harthmuth *et al.* 2002) wurde das J6f1-Aptamer eingesetzt, um *in vitro*-transkribierte RNAs zu immobilisieren und bindende Proteine zu identifizieren.

Nach Inkubation der Tobramycin-RNA mit MCF-7-Extrakten unter Translations-Initiations-Bedingungen wurden die RNA-Protein-Komplexe mit Hilfe einer Tobramycin-Matrix angereichert und die Eluate mittels Massenspektrometrie analysiert.

### 2.10.1 Herstellung der Tobramycin-Matrix

2 ml einer NHS-aktivierten Sepharose (Matrix) wurden zunächst viermal mit 9 ml 1 mM HCl gewaschen (Zentrifugation: 1000 x g, 1 min, 4°C). Die Kopplung der Matrix erfolgte über Nacht auf einem rotierenden Rad bei 4°C in 1 ml Kopplungspuffer. Nach 5-minütiger Zentrifugation wurde der Überstand entfernt und die Matrix in 8 ml Sättigungspuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 2 h bei 4°C unter Rotation wurde erneut 5 min zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit 9 ml PBS pH 8,0 wurde 2 weitere Male mit PBS pH 8,0 (0,05% Natriumazid) gewaschen (Zentrifugation: 1000 x g, 2 min, 4°C). Abschließend wurde die Matrix in 2 ml PBS pH 8,0 (0,05% Natriumazid) resuspendiert und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

#### Kopplungspuffer

50 mM HEPES/NaOH pH 7,9 (22°C)  
100 mM NaCl  
5 mM Tobramycin  
pH 8,3 (NaOH)

#### Sättigungspuffer

100 mM HEPES/NaOH pH 7,9 (22°C)  
100 mM NaCl  
62,5 mM Ethanolamin  
pH 8,0 (HCl)

### 2.10.2 Durchführung der RNA-Affinitäts-Reinigung

Die Tobramycin-Matrix wurde über Nacht unter Rotation in 500 µl Block-Puffer bei 4°C inkubiert. Die Inkubation von 4 pmol Tob-VEGF-RNA mit 600 µg cytoplasmatischem Extrakt erfolgte unter Translationsinitiations-Bedingungen (Translations-Bedingungen in Gegenwart von 1,5 mM Cycloheximid, 5 min, 37°C). Anschließend wurden die Ansätze mit 200 µl Bindepuffer versetzt. Die Tobramycin-Matrix wurde 1 min mit 250 x g bei 4°C zentrifugiert und nach Versetzen mit den Translationsinitiations-Reaktionen für eine weitere Stunde unter Rotation bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte in 2x SDS-Probenpuffer.

<u>Block-Puffer</u>	<u>Binde-Puffer</u>	<u>Wasch-Puffer</u>
20 mM Tris-HCl pH 8	20 mM Tris-HCl pH 8	20 mM Tris-HCl pH 8
300 mM KCl	60 mM KCl	60 mM KCl
1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>
1 mM MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM MgCl <sub>2</sub>	6 mM MgCl <sub>2</sub>
0,2 mM DTT	0,2 mM DTT	0,2 mM DTT
0,1 mg/ml <i>E.coli</i> tRNA	0,05% NP-40	0,05% NP-40
0,5 mg/ml BSA		
0,01% NP-40		

### 2.10.3 Massenspektrometrische Analyse

Für die massenspektrometrische Analyse wurden die Proteine von der Tobramycin-Matrix mit NuPAGE-Probenpuffer (Invitrogen) eluiert. Die Auftrennung der Eluate erfolgte auf NuPAGE 4-12% Bis-Tris-Gelen (Invitrogen). Die gesamte Spur wurde in 23 gleichgroße Stücke zerteilt. Die Proteine wurden im Gel mit Trypsin verdaut und anschließend extrahiert (Shevchenko *et al.* 1996). Die Peptide wurden mit einem Kapillar-HPLC-gekoppelten Elektronenspray- Ionisations- Quadrupol- *time- of- flight*-Massenspektrometer (ESI-Q-TOF, Ultima, Waters) analysiert. Die Identifizierung der Proteine erfolgte durch Datenbankabgleich mit der humanen NCBI-Datenbank über den Mascot-Server. Alle genannten Schritte zur massenspektrometrischen Analyse wurden von der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Henning Urlaub (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abteilung Bioanalytische Massenspektrometrie, Göttingen) durchgeführt.

Die Auswertung für die weitere Analyse erfolgte mittels Scaffold-Software. Verglichen wurde die Anzahl spezifischer Peptide von Kontroll-Experimenten (ohne Tobramycin-RNA) mit Ansätzen mit Tobramycin-VEGF-RNA.

### 2.11 Tobramycin-basierter Protein-RNA-Interaktions-Assay

Die Analyse der *in vitro*-Bindung von rekombinanten, affinitäts-gereinigten Proteinen erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Tobramycin-basierten Protein-RNA-Interaktions-Assays.

His-DDX6 und His-hnRNP K wurden heterolog in *E.coli* BL21(DE3) exprimiert und mit von Nickel-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Harnisch 2010). Pro Ansatz wurden 20 pmol der rekombinanten Proteine mit 2 pmol *in vitro*-transkribierten Tobramycin-RNAs in Bindepuffer für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert (Gesamtvolumen 100 µl). Nach Zugabe von 400 µl Bindepuffer und 40 µl Tobramycin-Matrix (über Nacht mit Blockpuffer vorbehandelt) erfolgte die Inkubation für 1,5 h bei 4°C. Abschließend wurde dreimal 2 min mit 500 µl Waschpuffer gewaschen und mit 25 µl SDS-Probenpuffer eluiert.

<u>Blockpuffer</u>	<u>Bindepuffer</u>	<u>Waschpuffer</u>
20 mM Tris-HCl pH 8	20 mM Tris-HCl pH 8	20 mM Tris-HCl pH 8
1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>	1 mM CaCl <sub>2</sub>
300 mM KCl	60 mM KCl	60 mM KCl
3,5 mM MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM MgCl <sub>2</sub>
0,5 mg/ml BSA	0,5 mg/ml BSA	0,025% NP-40
0,1 mg/ml tRNA	0,05% NP-40	0,2 mM DTT
0,01% NP-40	0,2 mM DTT	
0,2 mM DTT		

## 2.12 Polysomen-Analyse

Zur Separierung translations-aktiver und -inaktiver Komplexe und anschließender Analyse der Verteilung spezifischer endogener mRNAs wurde eine Polysomen-Analyse durchgeführt. Ein kontinuierlicher Saccharose-Gradient (Gesamt-Volumen 12 ml, 15-45% w/v Saccharose in UZ-Puffer, 100 µg/ml Cycloheximid, 1 mM DTT) wurde mit 600 µg (Gesamtproteinmenge) Lysat (siehe Abschnitt 2.3.4) überschichtet und anschließend zentrifugiert (2 h, 35.000 rpm ohne Bremse, 4°C, SW-41Ti-Rotor) (Beckmann). Die Fraktionierung erfolgte mittels peristaltischer Pumpe und Fraktionssammler beginnend am Boden des Ultrazentrifugationsröhrchens in 20 Fraktionen á 600 µl. Die Aufzeichnung der Absorptionsprofile bei 254 nm erfolgte mittels Detektor (Empfindlichkeit 0,5 AU) und Schreiber (Papiergeschwindigkeit 5 mm/min, Empfindlichkeit 0,5 V/mV).

### UZ-Puffer

150 mM KCl

20 mM Hepes pH 7,6

6,5 mM MgCl<sub>2</sub>

### 2.12.1 RNA-Präparation aus Fraktionen der Polysomen-Analyse

Zum Nachweis der rRNA- und mRNA-Verteilung im Saccharose-Gradienten wurde die Gesamt-RNA aus den Fraktionen der Polysomen-Analyse isoliert. Es wurden 300 µl pro Gradienten-Fraktion mit 750 µl Trizol-Reagenz versetzt und nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

Für den Nachweis der ribosomalen RNA im Agarosegel wurde das RNA-Pellet 10 min bei 55°C unter Schütteln in 10 µl RNA-Lade-Puffer (siehe Abschnitt 2.5.3) gelöst. Für die Analyse der mRNA-Verteilung wurde die RNA in 8 µl DEPC-H<sub>2</sub>O bei 55°C für 10 min gelöst.

Exogene CAT-RNA (5 ng), die den Fraktionen vor der Extraktion zugegeben wurde, diente beim Nachweis endogener mRNAs mittels RT-PCR und qRT-PCR als Lade- und Extraktionskontrolle.



### **2.12.2 Reverse Transkription, RT-PCR und qRT-PCR für die mRNA-Verteilungsanalyse im Polysomengradienten**

Die reverse Transkription für die Gesamt-RNA aus den Gradienten-Fractionen wurde wie oben beschrieben durchgeführt (siehe Abschnitt 2.7.2). Abweichend wurde jedoch, unabhängig von der RNA-Konzentration, die in 8 µl gelöste RNA vollständig eingesetzt.

Für die RT-PCR wurden 2 µl cDNA pro Fraktion eingesetzt. Die verwendeten Primer zum Nachweis von VEGF- und β-Aktin-mRNA sowie der CAT-RNA sind in Tabelle 2.5 aufgeführt.

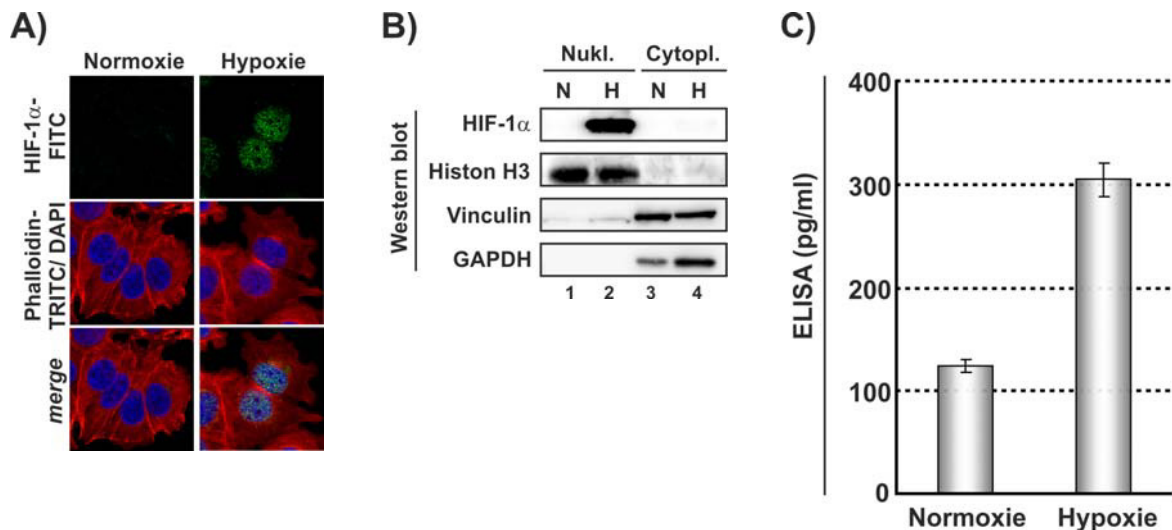
Die quantitative Bestimmung der mRNA-Verteilung erfolgte mittels qRT-PCR (siehe Abschnitt 2.7.4). Die cDNA wurde 1:5-verdünnt. Die Bestimmung erfolgte pro nachgewiesener RNA und Messpunkt in Duplikaten.

### 3. Ergebnisse

Die Mechanismen der VEGF-5'UTR-vermittelten Translationsregulation unter Hypoxie sind noch nicht vollständig erforscht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung von VEGF-mRNA-interagierenden Proteinen in der Brustkrebszelllinie MCF-7. Hierzu wurde eine Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie mit cytoplasmatischen Extrakten von MCF-7-Zellen, die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen MCF-7-Zellextrakten kultiviert wurden, durchgeführt. Die neu identifizierten Proteine wurden hinsichtlich ihrer Funktion für die VEGF-mRNA-Translation unter Hypoxie charakterisiert.

#### 3.1 Die zelluläre Antwort von MCF-7-Zellen auf hypoxische Bedingungen

Eukaryotische Zellen reagieren auf Sauerstoffmangel (Hypoxie) auf transkriptionaler und post-transkriptionaler Ebene (Masuda *et al.* 2009). Unter Hypoxie wird die  $\alpha$ -Untereinheit des heterodimeren Transkriptionsfaktors HIF-1 stabilisiert, wodurch nach Translokation des  $\alpha\beta$ -Heterodimers vom Cytoplasma in den Nukleus die Transkription einer Vielzahl von Genen erhöht wird (siehe Abschnitt 1.3.1; Manalo *et al.* 2005). Unter normoxischen Bedingungen ist HIF-1 $\alpha$  in der Immunfluoreszenzfärbung weder im Cytoplasma noch im Nukleus der MCF-7-Zellen detektierbar. Nach Hypoxiebehandlung co-lokalisiert das HIF-1 $\alpha$ -Signal mit der DAPI-Färbung des Nukleus (Abbildung 3.1A). Die Western blot-Analyse nukleärer und cytosolischer Lysate zeigt ein HIF-1 $\alpha$ -Signal ausschließlich in der hypoxischen Kernfraktion (Abbildung 3.1B). Unter Hypoxie kann des Weiteren die bekannte Zunahme des glykolytischen Enzyms Glycerin-Aldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH; Graven *et al.* 1994) detektiert werden (Abbildung 3.1B). Sowohl das nukleäre Protein Histon H3 (Abbildung 3.1B, Spuren 1 und 2) als auch das Cytoskelettprotein Vinculin (Abbildung 3.1B, Spuren 3 und 4) sind unter Normoxie und Hypoxie vergleichbar detektierbar.



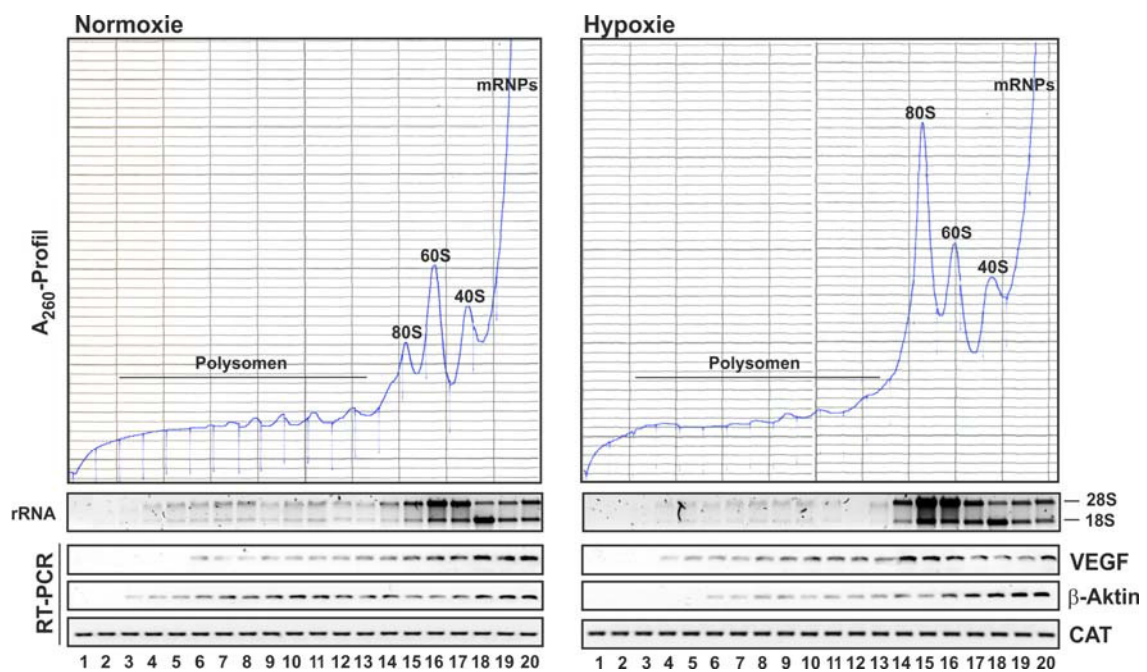
**Abbildung 3.1: Charakterisierung der Hypoxie-Antwort von MCF-7-Zellen.**

MCF-7-Zellen wurden für die Hypoxiebehandlung 24h bei 1% Sauerstoff inkubiert. A) Immunfluoreszenz-Färbung von HIF-1 $\alpha$  in MCF-7-Zellen; Kernfärbung mittels DAPI; Aktin-Cytoskelettfärbung mit Phalloidin-TRITC; *merge*: Überlagerung der drei verwendeten Kanäle. B) Western blot von MCF-7-Zellen aus Normoxie (N) oder Hypoxie (H). Nukleäre (Nukl.) und cytoplasmatische (Cytopl.) Fraktionen wurden mittels 12% SDS-PAGE aufgetrennt. Für den proteinspezifischen Nachweis mittels Western blot wurden 10 $\mu$ g Gesamtprotein pro Probe eingesetzt. C) ELISA von MCF-7-Zellkulturüberständen nach Inkubation unter Normoxie und Hypoxie (de Vries *et al.* 2013).

Der Wachstumsfaktor VEGF wird unter Hypoxie verstärkt sezerniert (Iizuka *et al.* 1994). Auch MCF-7-Zellen geben VEGF unter Hypoxie verstärkt in das Kulturmedium ab. Die Quantifizierung des sezernierten VEGF erfolgte mit Hilfe eines Antikörper-basierten *enzyme linked immunosorbent assays* (ELISA) aus Kulturüberständen von MCF-7-Zellen, die unter normoxischen beziehungsweise hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden. Der VEGF-ELISA zeigt einen Anstieg von *circa* 120 pg/ml auf *circa* 300 pg/ml (Abbildung 3.1C).

Die Generierung von ATP über die Atmungskette mit O<sub>2</sub> als terminalem Elektronen-Akzeptor ist unter Hypoxie herabgesetzt (Alberti, 1977). Zelluläre Reaktionen auf Hypoxie sind unter anderem die Verminderung der Translation (Wouters *et al.* 2005; Liu *et al.* 2006) sowie ein Wechsel von der 5'Cap-abhängigen hin zur 5'Cap-unabhängigen Translation (Braunstein *et al.* 2007). Um den Effekt der Hypoxiebehandlung von MCF-7-Zellen auf die Translation zu analysieren, wurden die polysomalen von sub-polysomalen Fraktionen mittels Saccharose-Gradienten-Ultrazentrifugation getrennt und die Verteilung der 5'Cap-abhängig translatierten  $\beta$ -Aktin-mRNA sowie der unter Hypoxie 5'Cap-unabhängig translatierten VEGF-mRNA mittels RT-PCR untersucht (Abbildung 3.2).

Unter Hypoxie nimmt die Ausprägung der Polysomen-Fraktion ab, während das Absorptionssignal der 80S-Fraktion deutlich zunimmt. Die  $\beta$ -Aktin-mRNA ist in der RT-PCR-Analyse unter Normoxie bis Fraktion 3 der Polysomenfraktionen höherer Dichte nachzuweisen, unter Hypoxie jedoch lediglich bis Fraktion 6. Die Verteilung der VEGF-mRNA zeigt hingegen einen gegenläufigen Effekt. Unter Hypoxie kann die VEGF-mRNA gegenüber der Normoxie, in Fraktionen höherer Dichte detektiert werden, obwohl die Gesamtmenge schwerer Polysomen abnimmt. Die 5'Cap-abhängige Translation der  $\beta$ -Aktin-mRNA ist somit in MCF-7-Zellen unter Hypoxie herabgesetzt während die Translation der 5'Cap-unabhängig translatierten VEGF-mRNA erhalten bleibt oder sogar zunimmt. Die gesteigerte VEGF-Sekretion von MCF-7-Zellen unter hypoxischen Bedingungen (Abbildung 3.1C) geht unter anderem auf die Aufrechterhaltung der VEGF-mRNA-Translation unter Hypoxie zurück (Abbildung 3.2).



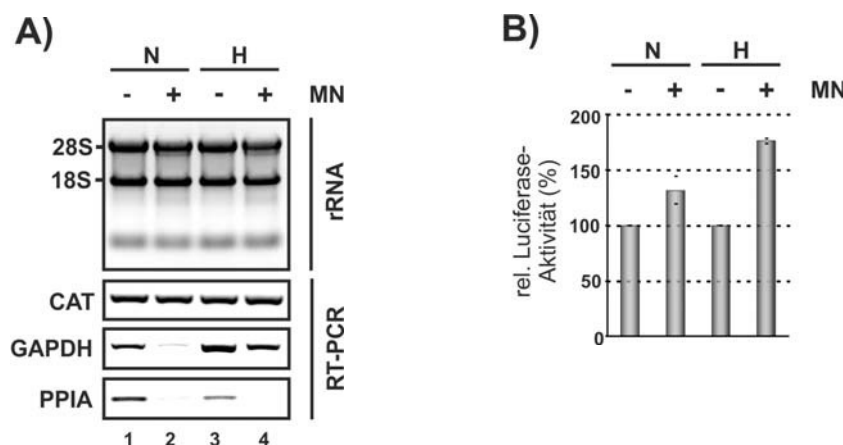
**Abbildung 3.2: Analyse der Translation endogener mRNAs mittels Polysomen-Analyse.**

Cytoplasmatische Extrakte von cycloheximid-behandelten MCF-7-Zellen wurden mittels Ultrazentrifugation durch einen Saccharose-Gradienten (15 - 45%) separiert. Die Gradienten wurden anschließend, beginnend am Boden des Zentrifugations-Röhrchens (Fraktion 1 mit 45 % Saccharose), abgepumpt. Das Absorptionsprofil bei 260nm wurde kontinuierlich aufgezeichnet. Die Verteilung der rRNA wurde durch GelRed-Färbung im 1% Agarosegel analysiert. Die Verteilung der VEGF- und der  $\beta$ -Aktin-mRNA im Gradienten wurde mittels RT-PCR erfasst. Als Extraktions- und Ladekontrolle wurde vor der RNA-Isolierung die exogene, *in vitro*-transkribierte CAT-RNA zugegeben; Polysomen-, 80S- (Monosomen), 60S- und 40S-enthaltende Fraktionen (große und kleine ribosomale Untereinheiten) sowie mRNA-Protein-Komplexe (mRNPs) geringerer Dichte sind markiert (de Vries *et al.* 2013).

### 3.2 Etablierung eines MCF-7-Zell-basierten *in vitro*-Translationssystems

Das MCF-7-Zellsystem sollte zur Affinitätschromatographischen Reinigung von Faktoren genutzt werden, welche die VEGF-mRNA-Translation modulieren. Da die Affinitätsreinigung aus cytoplasmatischen Extrakten erfolgen sollte, wurde zunächst untersucht, ob diese den Einfluss der Hypoxie auf die VEGF-mRNA-Translation rekapitulieren. Hierzu wurde ein MCF-7-basiertes *in vitro*-Translationssystem etabliert.

*In vitro*-Translationsexperimente erlauben, durch die Möglichkeit der Zugabe exogener Reporter-RNAs und rekombinant hergestellter Proteine, Aussagen über den Einfluss von *cis*-Elementen oder *trans*-interagierenden Faktoren auf die Translation. Um die Translation exogener mRNAs zu begünstigen und die Verfügbarkeit endogener, in *trans*-wirkender Faktoren, zu erhöhen, wurde der Anteil endogener mRNAs im cytoplasmatischen Extrakt mittels *Micrococcus*-Nuklease-Verdau verringert. Die 28S-rRNA wird durch die *Micrococcus*-Nuklease (MN) partiell degradiert (Abbildung 3.3A). Der überwiegende Teil der rRNA bleibt jedoch intakt. Die Menge endogener mRNAs, hier gezeigt am Beispiel der GAPDH- und PPIA-mRNA, ist durch die MN-Behandlung deutlich herabgesetzt (Abbildung 3.3A). Die Translationskompetenz des MN-behandelten Extraktes wurde durch Translation einer m<sup>7</sup>GpppG-gecappten Reporter-RNA überprüft. Die Translation exogener Reporter-RNAs nimmt in diesen Extrakten durch die definierte Behandlung mit *Micrococcus*-Nuklease zu (Abbildung 3.3B).



**Abbildung 3.3: *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung von cytoplasmatischem Extrakt.**

A) Für die Analyse der rRNA wurde nach Abstoppen der *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung exogene CAT-RNA als Extraktionskontrolle zugegeben, die Gesamt-RNA präpariert und 1 µg Gesamt-RNA pro Spur mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Nachweis der exogenen CAT-RNA sowie der endogenen mRNAs GAPDH und PPIA erfolgte mittels RT-PCR. B) Die Bestimmung der Translationsaktivität erfolgte mit m<sup>7</sup>GpppG-Luc-pA-RNA in Doppelbestimmung. Die Luciferase-Aktivität wurde auf die jeweils unbehandelten cytoplasmatischen Extrakte normalisiert.

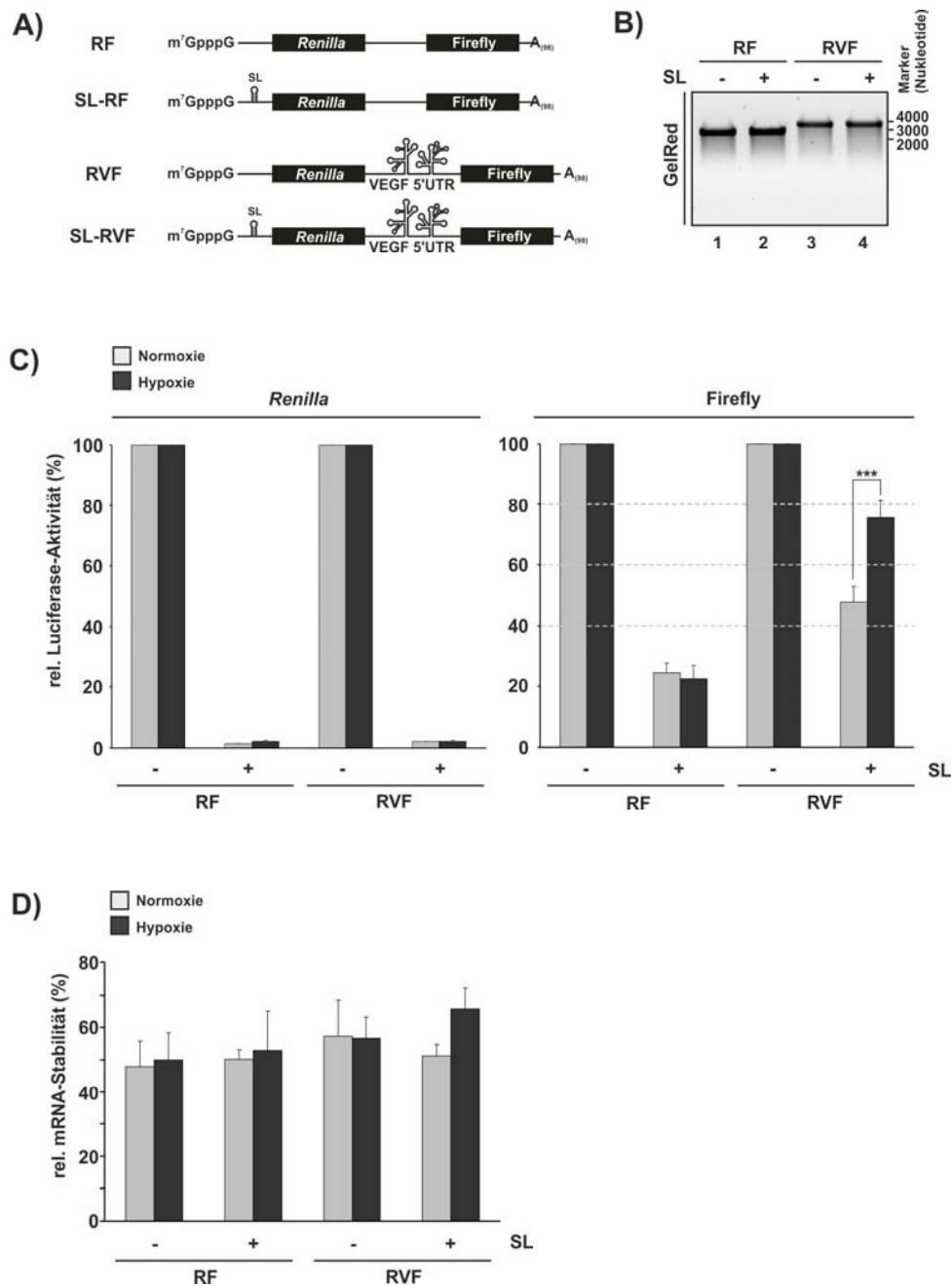
### 3.2.1 VEGF-5'UTR-vermittelte Translation in cytoplasmatischem MCF-7-Zell-Extrakt

Um den Einfluss der VEGF-5'UTR auf die 5'Cap-unabhängige Translation zu untersuchen, wurden bicistronische Reporter-RNAs generiert (Abbildung 3.4A). Alle vier mRNAs tragen eine m<sup>7</sup>GpppG-Cap-Struktur am 5'- und eine poly(A)-Sequenz am 3'-Ende sowie offene Leserahmen (ORFs), welche für die *Renilla reniformis*- (R) und die Firefly- (F) Luciferase kodieren. Im Gegensatz zur Kontroll-mRNA (RF) ist in der RVF-mRNA die VEGF-5'UTR im intercistronischen Bereich inseriert.

Um den Einfluss der 5'm<sup>7</sup>GpppG-vermittelten Translation zu analysieren, wurde sowohl für RF als auch RVF je eine Variante mit und ohne Haarnadelstruktur (SL) erzeugt. Diese Haarnadelstruktur soll die Translokation des Translations-Initiationskomplexes stören und so die Translation des *Renilla*-ORFs herabsetzen. Die Translation des 3'-terminalen Luciferase-ORFs hängt unter diesen Voraussetzungen primär von der intercistronischen Sequenz ab.

Abbildung 3.4B zeigt die Integrität der eingesetzten *in vitro*-Transkripte. Die Translation der mRNA ohne Haarnadelstruktur wurde jeweils für die normoxischen und hypoxischen Extrakte auf 100% festgelegt. In Anwesenheit der Haarnadelstruktur beträgt die Translation des *Renilla*-ORF, sowohl für die RF- als auch die RVF-Reporter-RNA weniger als 10% der Translation ohne Haarnadelstruktur. Die RVF-mRNA zeigt eine gegenüber der RF-mRNA zweifach bessere Translation des Firefly-ORF unter Normoxie. Unter Hypoxie ist eine annähernd vierfach bessere Translation von RVF gegenüber der Kontrolle (RF) messbar (Abbildung 3.4C). Diese Translationsergebnisse gehen nicht auf unterschiedliche Stabilitäten der untersuchten Reporter-RNAs zurück (Abbildung 3.4D).

In dem MCF-7-Zell-basierten *in vitro*-Translationssystem konnte somit sowohl der translations-vermittelnde Einfluss der VEGF-5'UTR als auch die Steigerung dieses Effektes unter Hypoxie gezeigt werden.



**Abbildung 3.4: Hypoxie verstärkt die VEGF-5'UTR-vermittelte Translationsinitiation *in vitro*.**

Translationskompetente cytoplasmatische Extrakte von MCF-7-Zellen, die unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, wurden mit bicistronischen Reporter-RNAs inkubiert. A) Schematische Darstellung der eingesetzten Reporter-RNAs; 5'Cap-Struktur ( $m^7GpppG$ ), Haarnadelstruktur (SL), RF (*Renilla*-ORF und *Firefly*-ORF), RVF (*Renilla*-ORF, VEGF-5'UTR und *Firefly*-ORF). B) Agarose-Gelelektrophorese der verwendeten Reporter-RNAs; pro Transkript wurde  $1\mu g$  mRNA analysiert. C) *In vitro*-Translation; zunächst wurde in einem luminometrischen Test die relative Translation des *Firefly*-ORF, anschließend die des *Renilla*-ORF bestimmt. Die Werte für die Reporter-RNAs ohne Haarnadelstruktur wurden als 100% definiert. D) Mittels qRT-PCR ermittelte RNA-Stabilitäten der Reporter-RNAs in normoxischen und hypoxischen cytoplasmatischen Extrakten unter Translationsbedingungen. Die Signifikanz-Berechnung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t*-Test; \*\*\*:  $p < 0,005$  (de Vries *et al.* 2013).

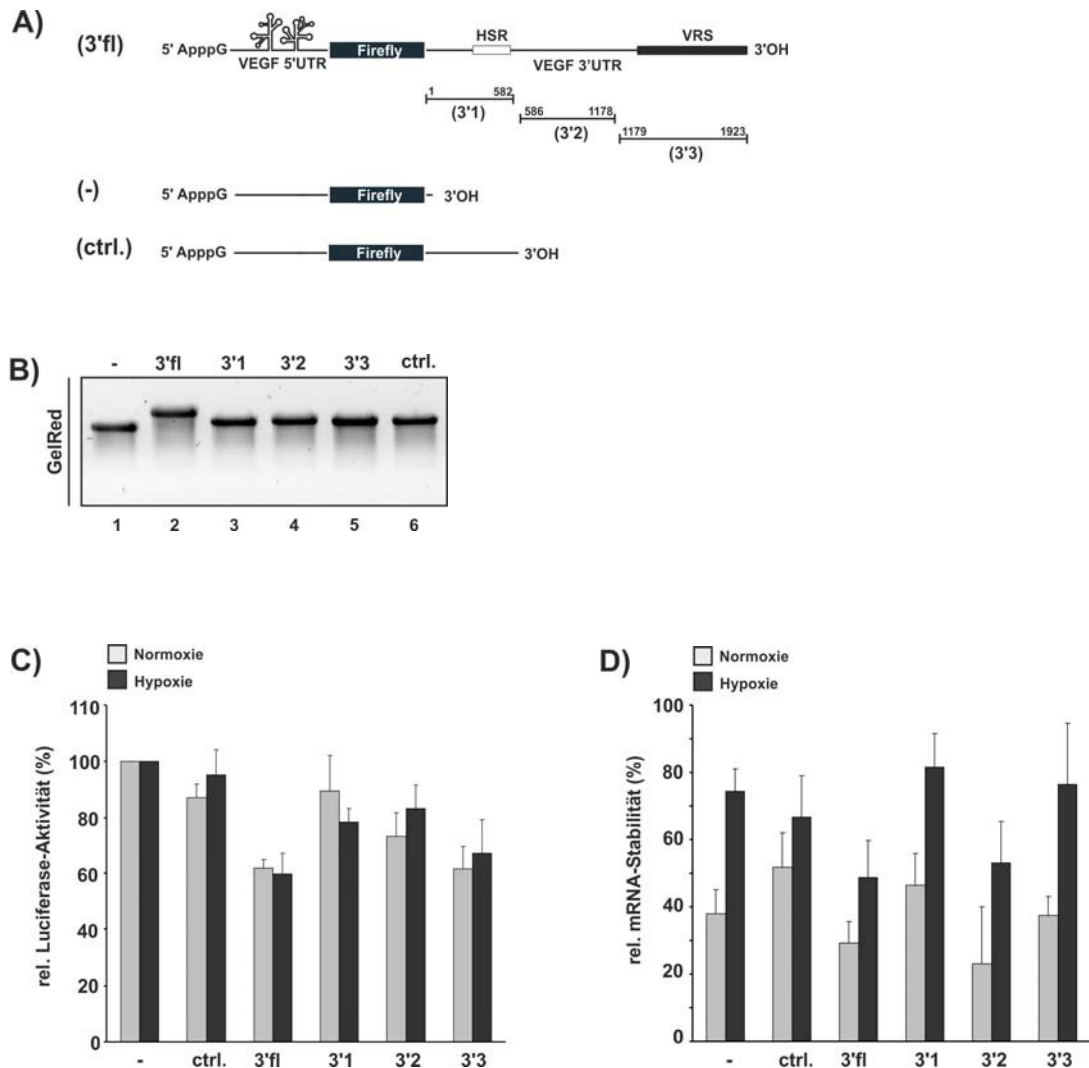
### 3.2.2 Der VEGF-3'UTR-Einfluss auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation *in vitro*

Für die Untersuchung eines Einflusses der VEGF-3'UTR auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation einer Reporter-RNA wurden fünf Konstrukte generiert, die sich lediglich in der 3'UTR-Region unterscheiden (Abb. 3.5A). Als Referenz wurde eine RNA ohne 3'UTR (-) verwendet. Die VEGF-3'UTR wurde sowohl in gesamter Länge (3'fl) als auch unterteilt in die drei Fragmente 3'1, 3'2 und 3'3 eingesetzt. Das Fragment 3'1 der VEGF-3'UTR beinhaltet die VEGF-mRNA-stabilisierende *hypoxia stability region* (HSR) (Shih und Claffey 1999), das Fragment 3'3 die, ebenfalls mRNA-Stabilität-vermittelnde, *VEGF regulatory sequence* (VRS) (Levy *et al.* 1998). Als Kontroll-3'UTR (ctrl.) diente ein Fragment der c-Src-mRNA-3'UTR (Nukleotide 1-600). Die Integrität der *in vitro*-Transkripte wurde durch Analyse im Agarosegel nachgewiesen (Abbildung 3.5B).

Die *in vitro*-Translations-Reaktionen wurden in cytoplasmatischen Extrakten von MCF-7-Zellen, die zuvor unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, durchgeführt. Die Translations-Ergebnisse wurden auf die Reporter-RNA ohne 3'UTR (-) normalisiert (Abbildung 3.5C).

Die normalisierten *in vitro*-Translations-Werte für alle gezeigten Reporter-RNAs waren in Extrakten aus normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zellen vergleichbar (Abbildung 3.5C). Die RNA-Stabilitäten sind jedoch für alle *in vitro*-Transkripte im hypoxischen Extrakt um *circa* 15-30% erhöht (Abbildung 3.5D). Die *in vitro*-Translations-Werte der Reporter-RNA mit VEGF-3'UTR (3'fl) waren gegenüber der Kontrolle ohne 3'UTR (-) und der Kontroll-3'UTR (ctrl.) 30-40% geringer. Dies korreliert mit der ebenfalls herabgesetzten RNA-Stabilität für die 3'fl-RNA. Die 3'1-RNA wird vergleichbar mit der ctrl.-RNA translatiert und zeigt einen ebenfalls vergleichbaren RNA-stabilisierenden Effekt im hypoxischen Extrakt. Die Stabilität der 3'2-RNA ist mit der 3'fl-RNA vergleichbar. Die Translation dieser RNA ist jedoch gegenüber der 3'fl-RNA *circa* 10% (Normoxie) bis *circa* 20% (Hypoxie) erhöht. Die 3'3-RNA ist in den *in vitro*-Translationsreaktionen ähnlich stabil wie die 3'1-RNA. Die Translation-Werte der 3'3-RNA sind jedoch mit *circa* 60-70% der Kontrolle lediglich im Bereich der 3'fl-RNA.





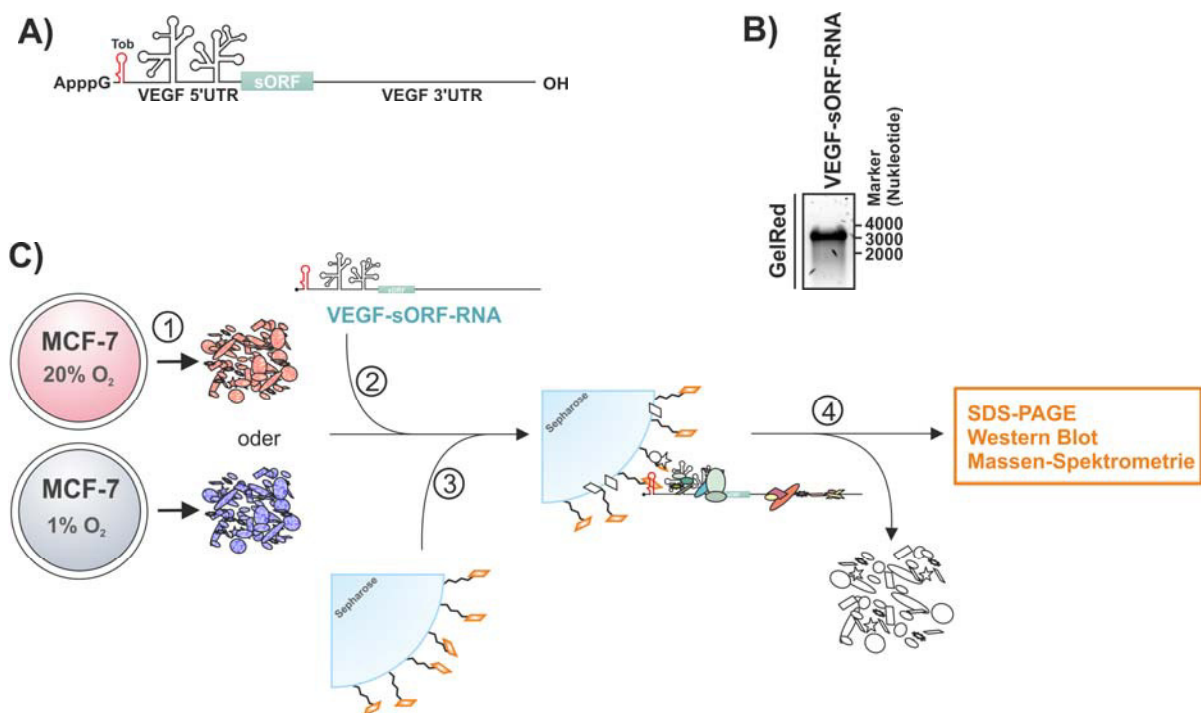
**Abbildung 3.5: Der Einfluss der VEGF-3'UTR auf die VEGF-IRES-vermittelte Translation.**

A) Schematische Darstellung der Reporter RNAs. Elemente der eingesetzten RNAs (von 5' nach 3'): ApppG-Cap-VEGF-5'UTR-Firefly-ORF. Fragmente der VEGF3'UTR (3'fl) wurden subkloniert. Die Zahlen an den Fragmenten 3'1, 3'2 und 3'3 geben die Nukleotide der VEGF-3'UTR an; (3'fl) enthält die vollständige VEGF-3'UTR, (3'1) beinhaltet die Nukleotide 1-582, (3'2) die Nukleotide 586-1178 und (3'3) die Nukleotide 1179-1923 der VEGF-3'UTR; (-) bezeichnet eine VEGF-5'UTR-Firefly-RNA ohne zusätzliche 3'UTR; als Kontroll-3'UTR (ctrl.) wurden die Nukleotide 1-600 der c-*Src*-mRNA-3'UTR verwendet. B) Bestimmung der RNA-Integrität nach *in vitro*-Transkription mittels Agarose-Gelelektrophorese; pro Spur wurde 1 µg der jeweiligen RNA geladen. C) Relative Luciferase-Aktivitäten nach 30-minütiger Inkubation der *in vitro*-Translations-Reaktionen in normoxischem oder hypoxischem Extrakt bei 37°C, normalisiert auf die Translation der VEGF-5'UTR-Firefly-RNA ohne 3'UTR (-). D) Bestimmung relativer mRNA-Stabilitäten der eingesetzten Reporter-RNAs mittels qRT-PCR-Analyse.

### 3.3 Einsatz der Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie zur Identifizierung VEGF-mRNA-interagierender Proteine

Neben anderen wurden hnRNP K (Sataranatarajan *et al.* 2008), AUF-1 (Fellows *et al.* 2012), HuR (Lewy *et al.* 1998) und hnRNP L (Shih und Claffey 1999) als VEGF-mRNA-interagierende Proteine beschrieben. Die Mechanismen, die zur Regulation der VEGF-Expression unter Hypoxie beitragen, sind jedoch weiterhin nicht vollständig aufgeklärt. Die Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie bietet, in Kombination mit modernen massenspektrometrischen Methoden, die Möglichkeit zur Identifizierung bisher nicht beschriebener VEGF-mRNA-bindender Proteine. Dieser methodische Ansatz wurde unter anderem erfolgreich bei der Aufklärung von spliceosomalen Prozessen (Harthmuth *et al.* 2002) und der Identifizierung von IGF2BP1 als bedeutenden Faktor der Hepatitis-C-Virus-mRNA-Translation (Weinlich *et al.* 2009) eingesetzt.

Die für die RNA-Affinitäts-Reinigung eingesetzte VEGF-sORF-RNA beinhaltet sowohl die vollständige 5'- als auch 3'-UTR der humanen VEGF-mRNA (Abbildung 3.6A).

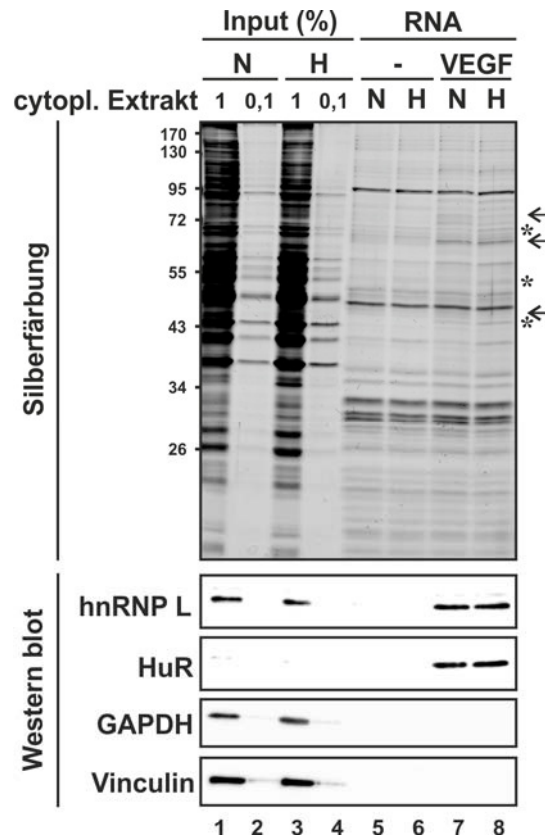


**Abbildung 3.6: Ablauf der Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie.**

A) Die VEGF-sORF-RNA besteht aus folgenden Elementen: Cap-Analogen ApppG, Tobramycin-Aptamer J6f1 (Tob), VEGF-5'UTR, kurzer offener Leserahmen (sORF), VEGF-3'UTR. B) Agarose-Gel von 1 µg der VEGF-sORF-RNA zum Nachweis der RNA-Integrität. C) Ablauf der Tobramycin-Reinigung: nach Inkubation der MCF-7-Zellen unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen erfolgte die Präparation der translationskompetenten cytoplasmatischen Extrakte ①. Die Extrakte wurden unter Translationsinitiationsbedingungen mit der VEGF-sORF-RNA inkubiert ②. Nach der Immobilisierung der VEGF-sORF-RNA-Proteinkomplexe an der Tobramycin-Matrix (Sepharose) ③ wurde gewaschen ④ und die Eluate mittels SDS-PAGE, Western blot und Massenspektrometrie analysiert.

Diese UTRs flankieren einen kurzen offenen Leserahmen (sORF), der die Ausbildung von Translationsinitiationskomplexen ermöglicht. Am 5'Ende der RNA befindet sich das Cap-Analogon ApppG, welches die RNA stabilisieren und zusätzlich (verglichen mit der physiologischen Cap-Struktur m<sup>7</sup>GpppG) den Anteil der 5'Cap-vermittelten Translations-Initiation reduzieren soll. Die Immobilisierung der VEGF-sORF-RNA wird durch das Tobramycin-interagierende RNA-Aptamer J6f1 (Tob), lokalisiert zwischen ApppG-Cap und VEGF-5'UTR, vermittelt. Ein exemplarisches Agarosegel einer VEGF-sORF-RNA-Präparation ist in Abbildung 3.6B gezeigt. Die Abbildung 3.6C fasst den Ablauf der Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie schematisch zusammen.

Die Tobramycin-Reinigung zur Identifizierung von Proteinen, welche die Translation der VEGF-mRNA beeinflussen, basiert auf dem in dieser Arbeit etablierten MCF-7-*in vitro*-Translationssystem. Das Resultat einer Tobramycin-Reinigung mit normoxischen und hypoxischen MCF-7-Extrakten ist in Abbildung 3.7 dargestellt. Die cytoplasmatischen Extrakte wurden mit VEGF-sORF-RNA (VEGF) oder ohne RNA (-) unter Translationsinitiationsbedingungen inkubiert. Anschließend wurde die Tobramycin-Matrix zugegeben und nach Immobilisierung der RNA-Proteinkomplexe, für die Auswertung mittels SDS-PAGE und Western blot, in SDS-Probenpuffer eluiert. Die Silberfärbung des SDS-Polyacrylamid-Gels zeigt eine hohe Übereinstimmung des Bandenmusters für die Elutionsfraktionen (Spuren 5 bis 8). Dennoch sind sowohl im Vergleich der Kontroll-Reaktion mit der VEGF-sORF-RNA (Spuren 5 und 7), als auch im Vergleich Normoxie mit Hypoxie (Spuren 7 und 8) weitere Banden detektierbar. Die bekannten VEGF-mRNA-interagierenden Proteine hnRNP L und HuR werden spezifisch durch die VEGF-sORF-RNA angereichert. Die Negativ-Kontrollen GAPDH und Vinculin sind zwar in den Inputs nachweisbar, nicht jedoch in den Elutionsfraktionen nach Tobramycin-Reinigung (Abbildung 3.7).



**Abbildung 3.7: Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie.**

Normoxische (N) und hypoxische (H) cytoplasmatische Extrakte wurden als Kontrolle geladen (Input, Spuren 1-4); nach Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie wurden die gebundenen Proteine der Kontroll-Reaktionen ohne Tobramycin-RNA (Spuren 5 und 6) und der VEGF-sORF-RNA (Spuren 7 und 8) in SDS-Probenpuffer eluiert. 50 % der Eluate wurden jeweils für SDS-PAGE beziehungsweise Western blot eingesetzt. Oben: Silberfärbung einer 12%-igen SDS-PAGE;  $\leftarrow$  (VEGF-sORF-spezifische Signale), \* (Unterschiede zwischen Normoxie und Hypoxie); unten: Western blot zum spezifischen Nachweis der Proteine hnRNP L, HuR, GAPDH und Vinculin.

Zur Identifizierung bisher nicht beschriebener VEGF-mRNA-bindender Proteine kann die Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie mit der massenspektrometrischen Analyse der angereicherten Peptide kombiniert werden (Weinlich *et al.* 2009). Für die massenspektrometrische Analyse erfolgte die Elution der RNA-Protein-Komplexe in NuPAGE-Probenpuffer. Nach anschließender Auftrennung der Proteine mittels NuPAGE®-Bis/Tris-Gelelektrophorese wurden Gel-Bereiche separat tryptisch verdaut, aufgearbeitet und *via* Elektronenspray-Ionisierungs-Quadrupol-*time of flight*-Massenspektrometrie (ESI-Q-TOF-MS) analysiert. Die erhaltenen Peptide wurden mittels MASCOT-Datenbanksuche gegen die humane NCBI-Datenbank abgeglichen. Die NuPAGE-Protein-Auftrennung, die Probenaufbereitung sowie die massenspektrometrische Analytik und der Datenbankabgleich wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Henning Urlaub am Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen durchgeführt. Tabelle 3.1 fasst einige der identifizierten, spezifisch mit der VEGF-sORF-RNA angereicherten Proteine zusammen.

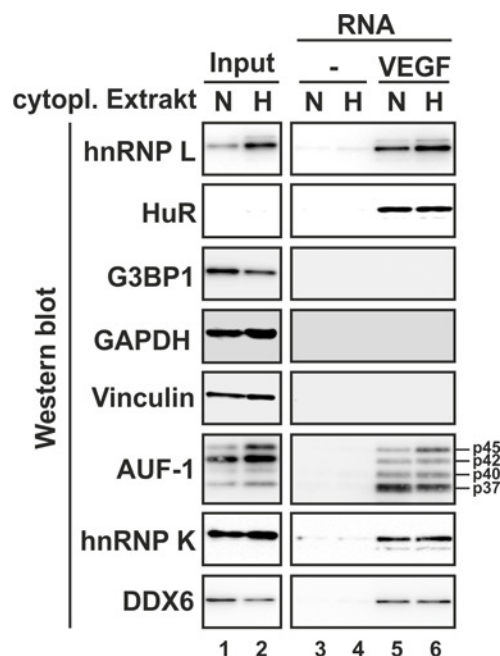
Protein	Gen-Bezeichnung	Referenz-Nummer	Synonym	MW (kDa)	Detektierte Peptide		Sequenz-Abdeckung (%)	
					N	H	N	H
DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box Helikase 6	DDX6	NP_001244120.1	RCK	54,4	21	18	52	41
Heteronukleäres Ribonukleoprotein A3	HNRNPA3	NP_919223.1		39,6	10	11	27	32
Heteronukleäres Ribonukleoprotein K	HNRNPK	NP_002131.2	TUNP	51	16	11	41	30
Autoantigen La	LA	NP_003133.1		46,8	7	11	19	35
Eukaryotic translation elongation factor 1 epsilon-1	EEF1E1	NP_004271.1	AIMP3	19,8	4	5	24	38
Heteronukleäres Ribonukleoprotein D	HNRNPD	NP_112738.1	AUF-1	38,4	6	3	23	14
Heteronukleäres Ribonukleoprotein L	HNRNPL	NP_001524.2		61,9	4	4	10	11
Heteronukleäres Ribonukleoprotein A0	HNRNPA0	NP_006796.1		30,8	4	4	17	21
Zelluläres Nukleinsäure-bindendes Protein, Isoform 3	CNBP	NP_003409.1	ZNF9	18,4	2	4	15	32
Embryo-lethal, abnormal vision-like 1	ELAVL1	NP_001410.2	HUR	36,1	5	4	20	14
Eukaryotischer Translations-Initiations-Factor 2 Untereinheit 2	EIF2S2	NP_003899.2	EIF2B	38,4	3	3	13	13
Humanes Pumilio-Homolog 2	PUMH2	NP_056132.1	PUML2	114,2	3	3	4,3	3,7

**Tabelle 3.1: Mittels Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie aus cytoplasmatischen Extrakten von normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zellen angereicherte Proteine.**

Die Tabelle fasst die Bezeichnungen der mit Hilfe von LC-MS/MS identifizierten Proteine sowie deren Gen-Bezeichnung, Referenznummer (NCBI-Datenbank) und gängiges Synonym zusammen. Für die unter Normoxie (N) oder Hypoxie (H) identifizierten Proteine sind die Zahlen der jeweils detektierten Peptide und die damit erzielte Sequenz-Abdeckung angegeben (de Vries *et al.* 2013).

Neben den bekannten VEGF-mRNA-bindenden Proteinen HuR (ELAV1) und hnRNP L, welche in den folgenden Experimenten als Positiv-Kontrollen dienten, wurden die Proteine AUF-1 (HNRNPD), DDX6 und hnRNP K weitergehend analysiert.

Eine erste Verifizierung der massenspektrometrischen Ergebnisse erfolgte mittels Western blot-Analyse einer Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie (Abbildung 3.8). Sowohl die Positiv-Kontrollen als auch die neu identifizierten Proteine AUF-1, DDX6 und hnRNP K konnten in den Elutionsfraktionen der VEGF-sORF-RNA-Ansätze (Spuren 5 und 6), nicht jedoch in den Kontroll-Reaktionen (Spuren 3 und 4), nachgewiesen werden. Das RNA-bindende Protein G3BP1, welches nicht in der Liste der VEGF-sORF-RNA-angereicherten Proteine enthalten ist, wurde, ebenso wie GAPDH und Vinculin, weder durch die Tobramycin-Matrix, noch durch die VEGF-sORF-RNA angereichert.

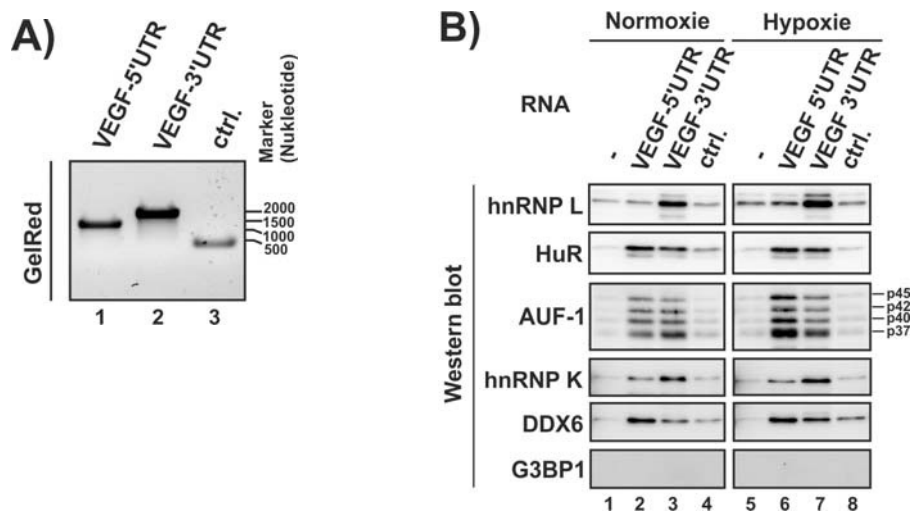


**Abbildung 3.8: AUF-1, DDX6 und hnRNP K werden mittels Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie angereichert.**

Western blot zum Nachweis VEGF-sORF-RNA angereicherter Proteine. Als Input wurden, abhängig von den jeweiligen Proteinen, 5 bis 10µg Gesamtprotein geladen. Die Isoformen von AUF-1 sind entsprechend ihres apparenten Molekulargewichtes benannt (p37, p40, p42 und p45) (de Vries *et al.* 2013).

Um die Bindungsregion der VEGF-sORF-RNA bindenden Proteine AUF-1, DDX6, hnRNP K, hnRNP L und HuR einzugrenzen, wurde die Tobramycin-RNA-Affinitätsreinigung mit separater VEGF-5' und -3'UTR und einer Kontroll-RNA (ctrl.) durchgeführt. Abbildung 3.9A zeigt die Integrität der verwendeten Tobramycin-RNAs.

Diese wurden mit cytoplasmatischen Extrakten von normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zellen inkubiert (Abbildung 3.9B). HnRNPL ist unter Hypoxie an der Stabilisierung der VEGF-mRNA beteiligt (Shih und Claffey 1999) und wird vor allem durch die VEGF-3'UTR angereichert (Spuren 3 und 7). Sowohl die VEGF-5'UTR (Spuren 2 und 6) als auch die Kontrollen (Spuren 1, 4, 5 und 8) zeigen lediglich Hintergrundintensität. HuR wurde ebenfalls als VEGF-3'UTR-interagierendes Protein beschrieben (Levy *et al.* 1998). Die Tobramycin-RNA-Affinitätsreinigung zeigt, neben der Anreicherung durch die VEGF-3'UTR auch ein deutliches Signal mit der VEGF-5'UTR. Eine vergleichbare Spezifität ist auch für AUF-1 zu beobachten. Unter Hypoxie nimmt die Bindung von AUF-1 an die VEGF-5'UTR gegenüber Normoxie deutlich zu. HnRNP K wird, wie hnRNP L, vor allem durch die VEGF-3'UTR angereichert. DDX6 ist in normoxischem Extrakt vor allem in der VEGF-5'UTR-Fraktion zu finden. Unter Hypoxie bindet DDX6 neben der VEGF-5'UTR, auch die VEGF-3'UTR und die Kontroll-RNA. G3BP1 wurde als nicht-VEGF-sORF-RNA-bindendes Protein ausschließlich in den Inputs (nicht gezeigt) nachgewiesen.



**Abbildung 3.9: Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie aus cytoplasmatischen MCF-7-Zell-Extrakten mit separater VEGF-5'- und 3'UTR.**

A) Agarose-Gelelektrophorese der eingesetzten Tobramycin-RNAs; es wurde 1 µg RNA pro Spur geladen. B) Western blot der Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie; Ansätze ohne RNA (-) mit Tob-VEGF-5'UTR (VEGF-5'UTR), Tob-VEGF-3'UTR (VEGF-3'UTR) und einer Kontroll-Tob-RNA (ctrl.) wurden sowohl mit normoxischem als auch hypoxischem Extrakt inkubiert; die Elution der Tob-RNA-Protein-Komplexe erfolgte in SDS-Probenpuffer.

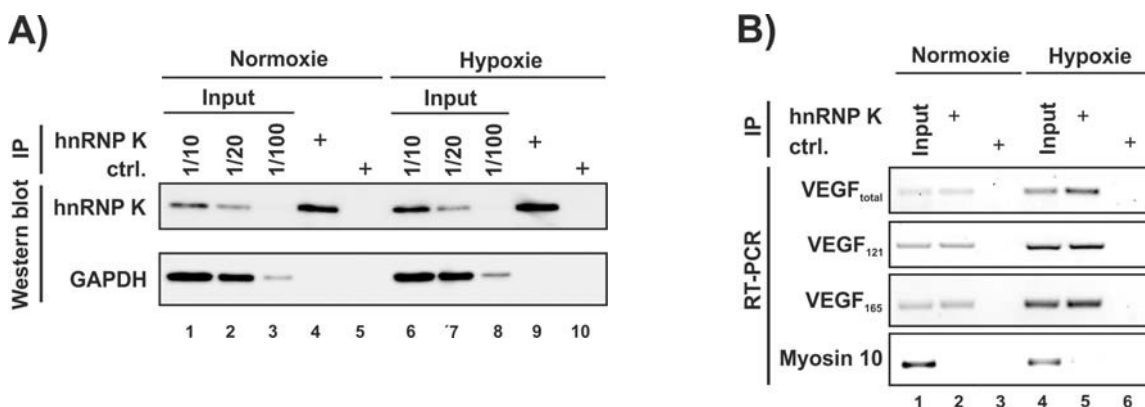
### 3.4 Die Rolle von DDX6 in der VEGF-Expression

AUF-1, DDX6 und hnRNP K wurden mittels Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie als Faktoren identifiziert, die entweder direkt oder indirekt mit der VEGF-mRNA interagieren. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich um eine indirekte Interaktion handelt, die durch weitere RNAs und/oder Proteine vermittelt wird.

HnRNP K hat eine bedeutende Funktion in der 3'UTR-vermittelten Translationsregulation der r15-LOX-mRNA (Ostareck *et al.* 1997) und wurde daher zunächst weiter untersucht. Die spezifische, direkte Interaktion von hnRNP K mit der VEGF-3'UTR konnte mit Hilfe von rekombinantem, gereinigtem His-hnRNP K und *in vitro*-transkribierter VEGF-3'UTR in UV-crosslink-Experimenten nachgewiesen werden (siehe Anhang Abbildung A.1).

Um diese Interaktion mit endogenen Komponenten zu bestätigen, wurde hnRNP K aus cytoplasmatischen MCF-7-Zell-Extrakten immunopräzipitiert (Abbildung 3.10A). Die Kontroll-Immunopräzipitation mit Antikörper gegen die Firefly-Luciferase zeigt kein Signal für hnRNP K oder die Spezifitätskontrolle GAPDH.

Die Co-Immunopräzipitation endogener mRNAs wurde mittels RT-PCR analysiert (Abbildung 3.10B). Während die VEGF-mRNA mit hnRNP K co-immunopräzipitiert, ist die Myosin 10-mRNA kaum detektierbar (Abbildung 3.10B, Spur 2 und 6). Die Co-Immunopräzipitation kann sowohl mit VEGF-Primern, die alle Isoformen erkennen (VEGF<sub>total</sub>) detektiert werden, als auch mit isoform-spezifischen Primern für die VEGF-Isoformen VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub>. Unterschiede im Ausmaß der VEGF-mRNA-Co-Immunopräzipitation sind zwischen Normoxie und Hypoxie nicht detektierbar.

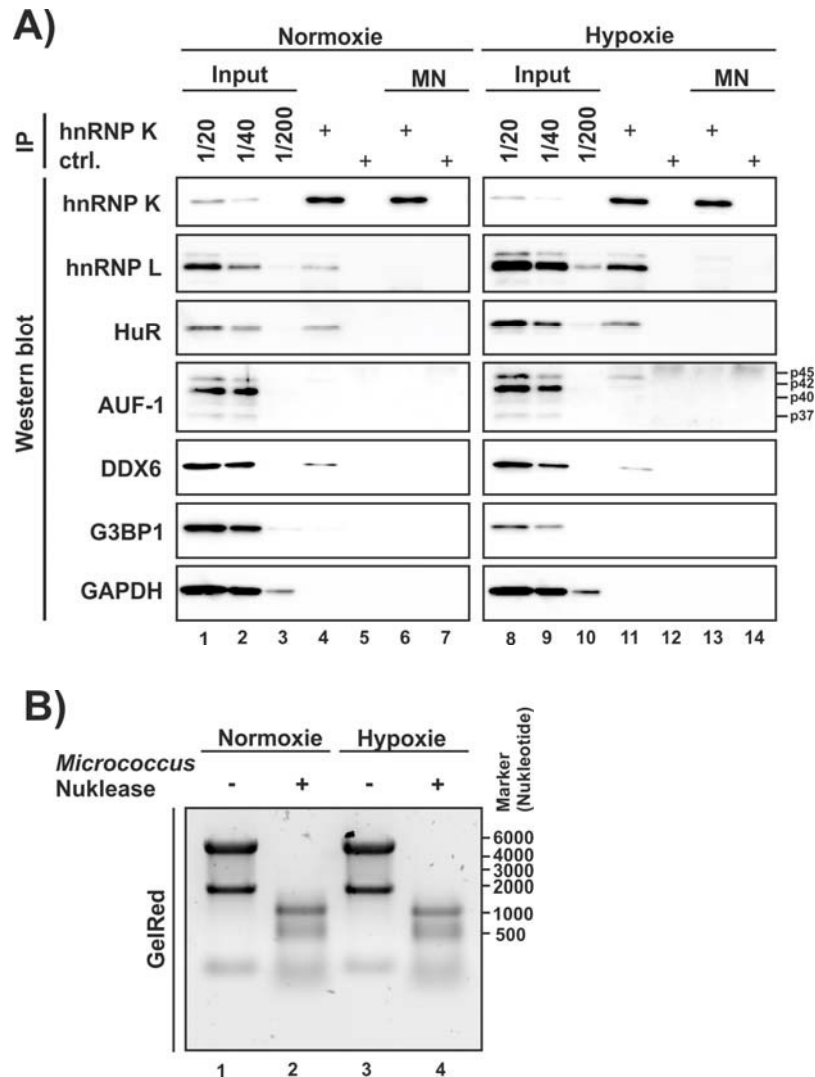


**Abbildung 3.10: Die VEGF-mRNA co-immunopräzipitiert mit hnRNP K.**

A) Western blot einer hnRNP K-Immunopräzipitation aus normoxischen und hypoxischen, cytoplasmatischen MCF-7-Zell-Extrakten. B) RT-PCR-Produkte von co-immunopräzipitierten mRNAs im Agarose-Gel.



Um zu überprüfen, ob auch AUF-1 und DDX6 mit hnRNP K co-immunopräzipitieren, wurde eine Immunopräzipitation von hnRNP K mittels Western blot (Abbildung 3.11A) analysiert.



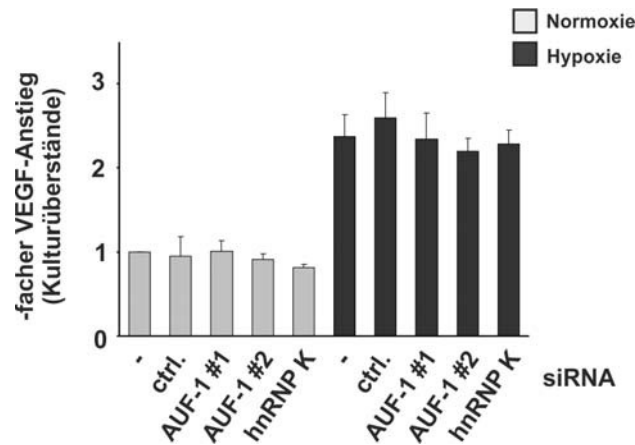
**Abbildung 3.11: Die Co-Immunopräzipitation bekannter und neu identifizierter VEGF-mRNA-bindender Proteine mit hnRNP K ist RNase-sensitiv.**

A) Western blot der hnRNP K-Immunopräzipitation; als Input wurden unterschiedliche Verdünnungen des normoxischen (Spuren 1-3) und hypoxischen (Spuren 8-10) Extraktes geladen; die Immunopräzipitationsreaktionen (IP) mit hnRNP K- bzw. Kontroll-Antikörper (ctrl.) wurden unbehandelt (Spuren 4, 5, 11 und 12) und nach *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung (MN) (Spuren 6, 7, 13 und 14) geladen. B) Nachweis des *Micrococcus*-Nuklease-Verdau; die Auftrennung der ribosomalen RNA erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese; geladen wurde 1 µg Gesamt-RNA pro Spur.

Die VEGF-mRNA-bindenden Proteine HuR und hnRNP L co-immunopräzipitieren, ebenso wie DDX6, mit hnRNP K (Spur 4 und 11). GAPDH und das RNA-bindende Protein G3BP1 sind ausschließlich in den Ladekontrollen (Input) nachweisbar. Von den vier AUF-1-Isoformen ist lediglich im hypoxischen Extrakt für die p45-Isoform eine Interaktion mit hnRNP K detektierbar.

Die Co-Immunopräzipitation von Proteinen kann durch Protein-Protein-Interaktion (direkt) oder RNA-vermittelt (indirekt) erfolgen. Um RNA-vermittelte Interaktionen auszuschließen, wurden die cytoplasmatischen MCF-7-Zellextrakte vor der Immunopräzipitation mit *Micrococcus*-Nuklease (MN) behandelt. Um eine möglichst vollständige Degradation sämtlicher RNA-Spezies in der Zelle zu erzielen, darunter rRNAs, tRNAs und mRNAs, wurde die MN im Überschuss eingesetzt (Abbildung 3.11B). Nach der MN-Behandlung ist weder 28S- noch 18S-rRNA in der ursprünglichen Länge detektierbar (Abbildung 3.11B, Spuren 2 und 4). Aufgrund der verglichen mit mRNA höheren Stabilität von rRNA gegenüber MN ist auch ein hinreichender Abbau der endogenen mRNA zu erwarten. RNA-vermittelte Protein-Co-Immunopräzipitationen sollten in den so behandelten Extrakten demnach verloren gehen. Die Spuren 6 und 15 in Abbildung 3.11A deuten darauf hin, dass die Interaktionen zwischen hnRNP K und HuR, hnRNP L, DDX6 sowie der AUF-1-p45-Isoform RNA-vermittelt sind.

Der Einfluss von hnRNP K und AUF-1 auf die VEGF-Expression wurde mit Hilfe von siRNA-vermittelten *knock downs* dieser Proteine untersucht (siehe Anhang, Abbildung A.2). Die Inkubation der unbehandelten MCF-7-Zellen (-) unter Hypoxie führt zu einer Steigerung der VEGF-Mengen im Kulturüberstand um *circa* 100% (Abbildung 3.12). Die Transfektion mit Kontroll-siRNAs (ctrl.) hat keinen Einfluss auf die VEGF-Mengen. Zudem wurden weder für hnRNP K- noch für AUF-1-siRNA-transfizierte Zellen eine signifikante Änderung der VEGF-Mengen im Kulturüberstand unter Normoxie oder Hypoxie detektiert.

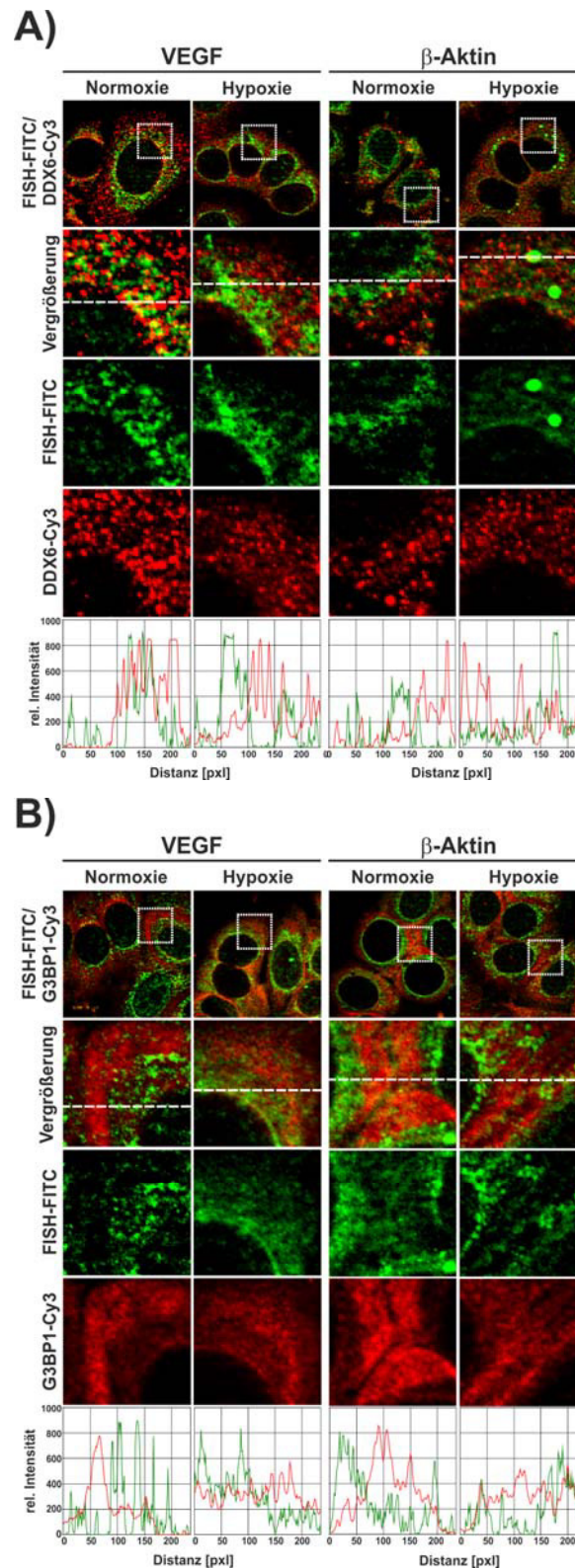


**Abbildung 3.12: Die siRNA-vermittelte Reduktion der hnRNP K- oder AUF-1-Menge hat keinen Einfluss auf die VEGF-Mengen im MCF-7-Zell-Kulturüberstand.**

MCF-7-Zellen wurden 48 Stunden vor der Hypoxie-Behandlung mit zwei verschiedenen siRNAs gegen AUF-1 (AUF-1 #1 oder #2), einem hnRNP K-siRNA-Mix oder einer Kontroll-siRNA (ctrl.) transfiziert. Die VEGF-Mengen in den unverdünnten Kulturüberständen wurden mittels ELISA quantifiziert und auf die nicht-transfizierte, normoxische Kontrolle (-) normalisiert.

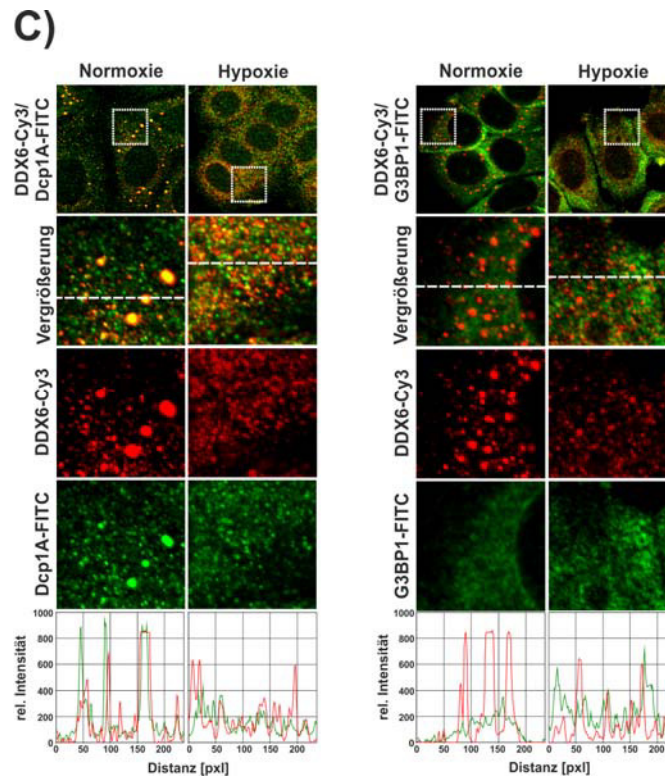
Die in der Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie angereicherte RNA-Helikase DDX6 wird mit unterschiedlichen Prozessen der post-transkriptionellen Genregulation in Verbindung gebracht. Hierzu zählen die Speicherung von mRNAs in cytoplasmatischen, granulären Strukturen, der mRNA-Abbau und die Translationskontrolle (Ostareck *et al.* 2014). Die DDX6-Menge ist in hypoxischen Extrakten geringer als in normoxischen (Abbildung 3.8). Zudem scheint unter Hypoxie die Bindungsspezifität von DDX6 für die VEGF-5'UTR abzunehmen, was zu einer Verringerung der effektiven, VEGF-5'UTR-bindenden DDX6-Menge führt (Abbildung 3.9).

DDX6 ist in unterschiedlichen Zelltypen an der Ausbildung granulärer Strukturen beteiligt (Weston und Sommerville 2006). Diese sind mit Hilfe der Immunfluoreszenz-Mikroskopie auch in MCF-7-Zellen visualisierbar (Abbildung 3.13). Während unter Normoxie eher größere, distinkte Strukturen auffällig sind, ist DDX6 unter Hypoxie in kleineren und diffuseren, granulären Strukturen lokalisiert. In Übereinstimmung mit den Western blot-Analysen (Abbildung 3.9) scheint die Gesamtsignal-Intensität für die Immunfluoreszenzfärbung von DDX6 unter Hypoxie abzunehmen (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13: DDX6 co-lokalisiert mit der VEGF-mRNA unter Normoxie.**

Kombination von Immunfluoreszenz und IF-FISH-Färbung normoxischer und hypoxischer MCF-7-Zellen; Detektion von DDX6 (A) beziehungsweise G3BP1 (B) über den Cy3-Kanal (rot); Detektion der VEGF- und  $\beta$ -Aktin-mRNA über FITC-markierte DNA-Sonden (grün); die Vergrößerung zeigt die überlagerten Cy3- und FITC-Signale. Entlang der gestrichelten Linie wurden Intensitätssignale berechnet und als Intensitätsprofil dargestellt (unten) (de Vries *et al.* 2013).



**Abbildung 3.13 (Fortsetzung):**

C) Immunfluoreszenz-Färbung von MCF-7-Zellen nach Normoxie und Hypoxie; Detektion von DDX6 über den Cy3-Kanal (rot); Detektion von Dcp1A beziehungsweise G3BP1 über den FITC-Kanal (grün); die Vergrößerung zeigt die überlagerten Cy3- und FITC-Signale. Entlang der gestrichelten Linie wurden Intensitätssignale berechnet und als Intensitätsprofil dargestellt (unten) (de Vries *et al.* 2013).

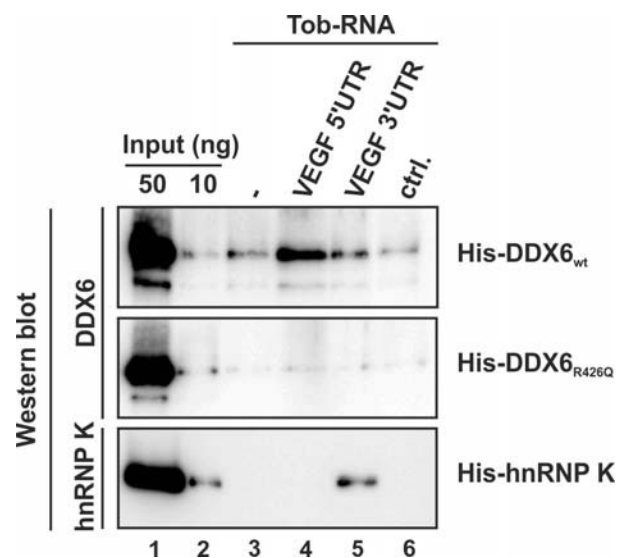
Eine Co-Färbung von DDX6 mit der VEGF-mRNA in kombinierter Immunfluoreszenz-Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (IF-FISH)-Färbung zeigt die Co-Lokalisierung der VEGF-mRNA mit DDX6 unter Normoxie (Abbildung 3.13A). Unter Hypoxie nimmt diese Co-Lokalisierung deutlich ab. Die IF-FISH-Färbung von DDX6 und der  $\beta$ -Aktin-mRNA zeigt hingegen keine Co-Lokalisierung, weder unter Normoxie noch unter Hypoxie. Das als Kontrolle eingesetzte, RNA-bindende Protein G3BP1 co-lokalisiert weder mit der VEGF- noch mit der  $\beta$ -Aktin-mRNA (Abbildung 3.13B).

Zu den häufig beschriebenen cytoplasmatischen, granulären Strukturen gehören *Stress granules* und *p-Bodies* (Anderson und Kedersha 2006, Balagopal und Parker 2009). *Stress granules* werden beispielsweise unter oxidativem Stress gebildet. Auch Hypoxie stellt eine Stresssituation dar. Da eine Rolle für DDX6 in der post-transkriptionellen Regulation der Genexpression unter unterschiedlichen Stressbedingungen gezeigt wurde (Buchan und Parker 2009), wurde eine Co-Färbung von DDX6 mit dem *Stress granule marker* G3BP1 (Tourriere *et al.* 2003) durchgeführt.

Eine Co-Lokalisierung von DDX6 und G3BP1 ist weder unter Normoxie noch unter Hypoxie detektierbar. Die Co-Färbung von DDX6 mit dem *p-Body marker* Dcp1A (Ingelfinger *et al.* 2002, Lall *et al.* 2005) zeigt hingegen sowohl Strukturen, die beide Proteine enthielten, als auch welche, die nur das eine oder das andere Protein enthielten (Abbildung 3.13C). Dies deutet darauf hin, dass DDX6 in MCF-7-Zellen sowohl in *p-Bodies*, als auch in weiteren cytoplasmatischen, granulären Strukturen lokalisiert ist.

### 3.4.1 DDX6 interagiert direkt mit der VEGF-5'UTR

In der Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie mit cytoplasmatischen Extrakten konnte eine Interaktion von DDX6 mit der VEGF-sORF-RNA gezeigt werden (Abbildung 3.8). Um zu analysieren, ob es sich um hierbei um eine direkte oder indirekte Interaktion handelt, wurde eine Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie mit rekombinanten, gereinigtem His-DDX6 durchgeführt (Abbildung 3.14).



**Abbildung 3.14: Rekombinantes His-DDX6 interagiert direkt mit der VEGF-mRNA.**

Western blot einer Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie mit rekombinanten Proteinen. Die gereinigten Proteine His-DDX6<sub>wt</sub> (Wildtyp-DDX6), His-DDX6<sub>R426Q</sub> und His-hnRNP K wurden ohne Tob-RNA (-) beziehungsweise mit Tob-VEGF-5'UTR, Tob-VEGF-3'UTR oder einer Tob-Kontroll-RNA (Ctrl., Nukleotide 129-405 der HIF-1 $\alpha$ -5'UTR) inkubiert; die Elution der Tob-RNA-Protein-Komplexe erfolgte in SDS-Probenpuffer (de Vries *et al.* 2013, modifiziert).

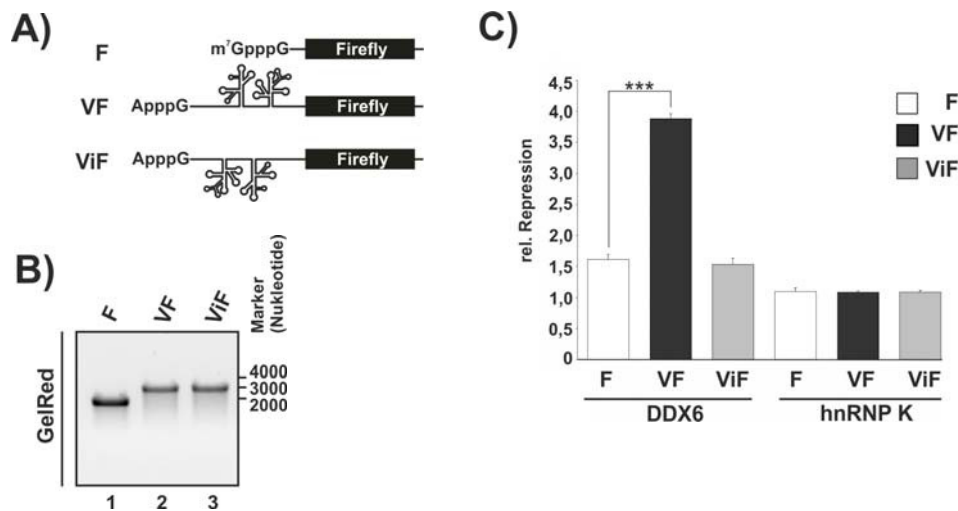
Die Tobramycin-RNAs wurden für 10 min bei Raumtemperatur mit dem Wildtyp-Protein (His-DDX6), einer DDX6-Variante mit verringerter RNA-Bindungsfähigkeit (His-DDX6<sub>R426Q</sub>) oder mit His-hnRNP K als Kontrolle inkubiert. Anschließend erfolgte die RNP-Immobilisierung an der Tobramycin-Matrix. Die Bindung des angereicherten, rekombinanten DDX6 an die VEGF-5'UTR spiegelt das Bindungsverhalten von endogenem DDX6 in normoxischen MCF-7-Zell-Extrakten wider (Abbildung 3.9B). Die RNA-bindungsdefiziente Variante DDX6<sub>R426Q</sub> zeigt keine spezifische Interaktion mit den eingesetzten Tobramycin-RNAs. In einer Kontroll-Reaktion wurde die, bereits mit Hilfe von UV-crosslink-Experimenten gezeigte, ausgeprägte Bindungspräferenz von hnRNP K für die VEGF-3'UTR, mit rekombinantem His-hnRNP K bestätigt.

#### **3.4.2 DDX6 reprimiert spezifisch die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation der VEGF-mRNA**

Aufgrund ihrer Funktion in der post-transkriptionalen Regulation unterschiedlicher mRNAs legt die direkte Interaktion der RNA-Helikase DDX6 mit der VEGF-5'UTR auch einen Einfluss auf die VEGF-Expression nahe.

Die Durchführung von *in vitro*-Translationsreaktionen bietet die Möglichkeit zur Zugabe von sowohl exogenen mRNAs als auch Proteinen. So können unter definierten Bedingungen Einflüsse von mRNA-Elementen oder Proteinen untersucht werden. In cytoplasmatischen, *Micrococcus*-Nuklease-behandelten Extrakten von MCF-7-Zellen wurde die Translation von Reporter-mRNAs in Anwesenheit von rekombinantem, gereinigtem DDX6 untersucht (Abbildung 3.15).

Verglichen wurde die Translation einer m<sup>7</sup>GpppG-Cap-Reporter-mRNA (F), mit der Translation einer mRNA mit ApppG-Cap und VEGF-5'UTR in physiologischer (VF) oder invertierter Orientierung (ViF). Alle Reporter-RNAs kodieren für die Firefly-Luciferase (Abbildung 3.15A). Die Integrität der eingesetzten *in vitro*-Transkripte wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (Abbildung 3.15B). Den Translations-Reaktionen wurde rekombinantes His-DDX6, His-hnRNP K oder BSA als Kontrolle zugegeben. Die Zugabe von hnRNP K hat, verglichen mit der BSA-Kontrolle, auf die Translation der drei Reporter-mRNAs keinen Einfluss. Die Zugabe von His-DDX6 führt hingegen zu einer *circa* 1,5-fachen Repression der F- und ViF-mRNA-Translation. Die Translation der VF-mRNA wird spezifisch durch die Zugabe von His-DDX6 annähernd vierfach gegenüber zugegebenem BSA reprimiert (Abbildung 3.15C).



**Abbildung 3.15: DDX6 reprimiert die spezifisch VEGF-5'UTR-vermittelte Translation *in vitro*.**

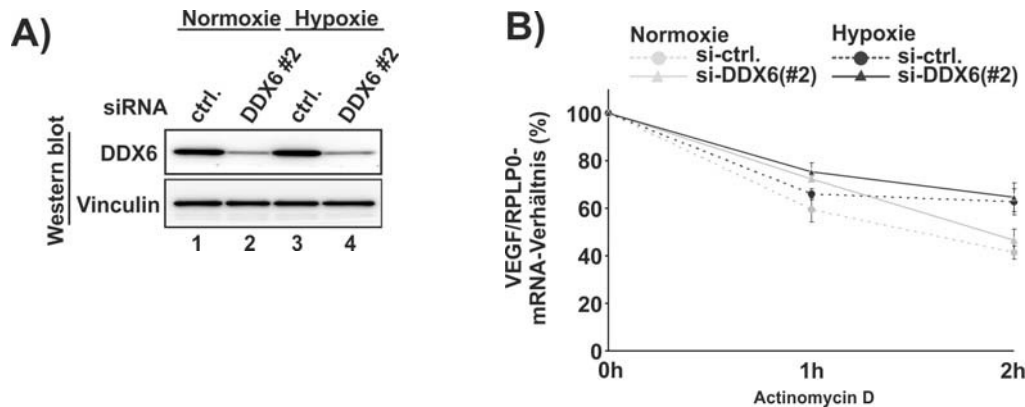
A) Schematische Darstellung der eingesetzten Reporter-mRNAs: m<sup>7</sup>GpppG-Firefly (F), ApppG-VEGF-5'UTR-Firefly (VF), ApppG-VEGF-5'UTR<sub>invertiert</sub>-Firefly (ViF). B) Agarose-Gelelektrophorese der *in vitro*-transkribierten Reporter-mRNAs; es wurde 1 µg pro RNA geladen und mit Hilfe von GelRed im UV-Licht visualisiert. C) Ergebnisse der *in vitro*-Translation von F, VF und ViF in normoxischem, cytoplasmatischem MCF-7-Extrakt; die relative Repression wurde aus den ermittelten Luciferase-Aktivitäten einer Reaktion mit und ohne exogenem DDX6 beziehungsweise hnRNP K berechnet. Die Signifikanz-Berechnung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t*-Test; \*\*\*: p < 0,005 (de Vries *et al.* 2013).

### 3.4.3 Die Stabilität der VEGF-mRNA bleibt unter Hypoxie von der Reduktion der DDX6-Menge unbeeinflusst

DDX6 ist ein Bestandteil von *processing bodies* (*p*-Bodies), cytoplasmatischen, granulären Strukturen, in denen translational reprimierte mRNAs sowohl degradiert, als auch gespeichert werden können (Ostareck *et al.* 2014). Um einen möglichen Einfluss von DDX6 auf die Stabilität der VEGF-mRNA auszuschließen, wurde nach siRNA-vermitteltem *knock down* von DDX6 eine Hypoxie-Behandlung der transfizierten MCF-7-Zellen durchgeführt (Abbildung 3.16A) und anschließend die Stabilität der VEGF-mRNA ermittelt. 48 h nach Transfektion der MCF-7-Zellen mit siRNAs erfolgte die 24-stündige Inkubation unter Hypoxie beziehungsweise unter Normoxie. Im Anschluss hieran wurden die Zellen mit Actinomycin D versetzt und weiter unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen kultiviert. Die relativen mRNA-Mengen wurden zu den Zeitpunkten 0, 1 und 2 h mittels quantitativer RT-PCR bestimmt (Abbildung 3.16B).



Nach zweistündiger Actinomycin D-Behandlung sind zwischen den Kontroll-Zellen und den MCF-7-Zellen mit verringerter DDX6-Konzentration keine Unterschiede in den mRNA-Verhältnissen detektierbar. Die Inkubation unter Hypoxie stabilisiert, wie bereits beschrieben, die VEGF-mRNA (Shima *et al.* 1995).



**Abbildung 3.16: Verringerung der DDX6-Mengen haben keinen Einfluss auf die Stabilität der VEGF-mRNA unter Normoxie oder Hypoxie.**

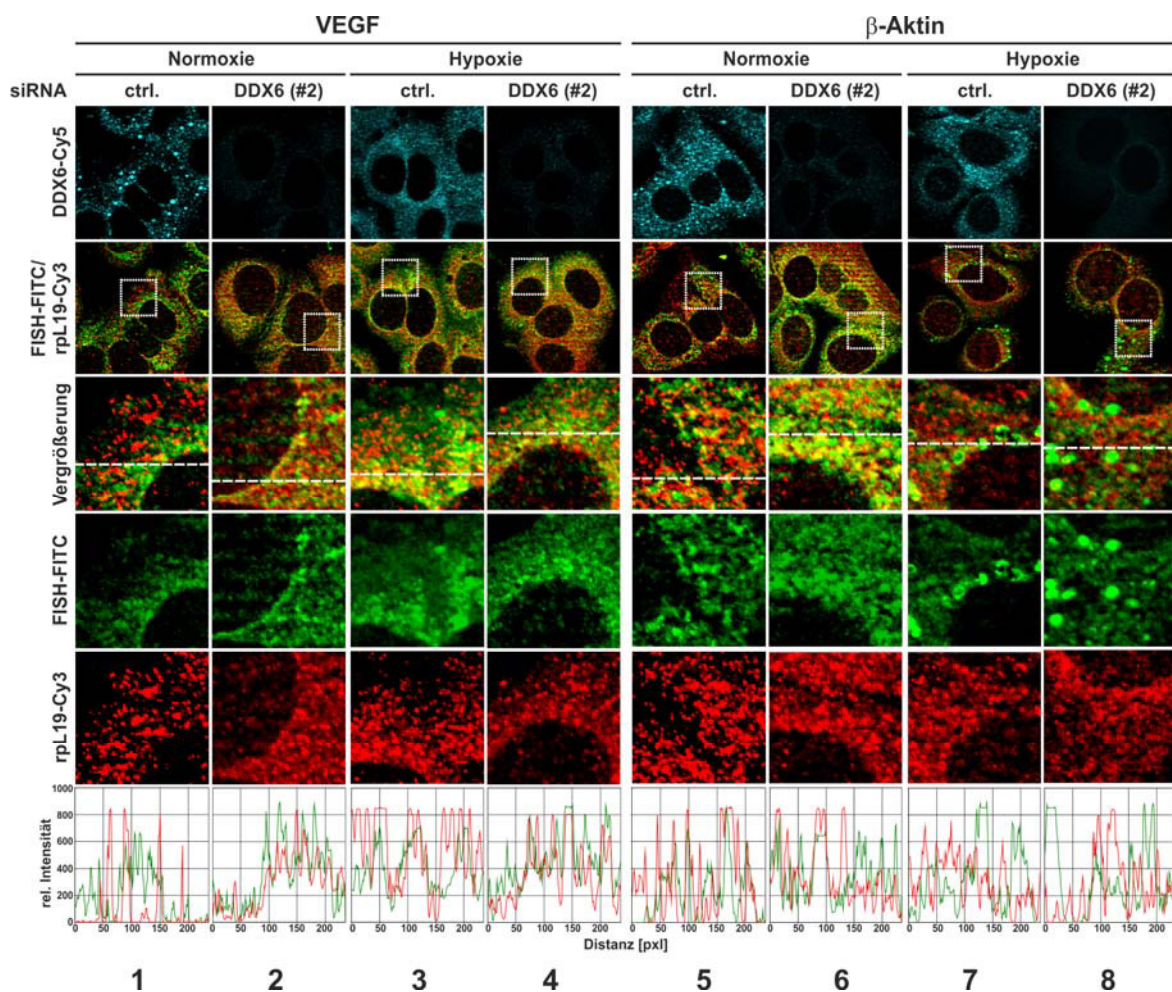
A) Nachweis von DDX6 mittels Western blot nach siRNA-vermitteltem DDX6-knock down in normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zellen. B) Relative VEGF-mRNA-Stabilitäten nach DDX6-knock down unter Normoxie und Hypoxie; die Bestimmung erfolgte mittels quantitativer RT-PCR; die Normalisierung der Ct-Werte für die VEGF-mRNA erfolgte auf die RPLP0-mRNA; als Referenz dienten die mRNA-Mengen zum Zeitpunkt 0h (de Vries *et al.* 2013).

#### 3.4.4 DDX6 beeinflusst die VEGF-mRNA-Translation *in vivo*

Der reprimierende Einfluss von DDX6 auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation konnte bereits *in vitro* gezeigt werden (Abbildung 3.15C). Die Zugabe von exogenem, rekombinantem His-DDX6 führte zu einer spezifischen Repression der VEGF-5'UTR-vermittelten Translation *in vitro*. Eine Verringerung der DDX6-Menge in MCF-7-Zellen sollte demnach zu einer verstärkten Translation der VEGF-mRNA *in vivo* führen.

Nach siRNA-vermittelter Verringerung der DDX6-Menge in MCF-7-Zellen wurde die Co-Lokalisierung des ribosomalen Proteins rpL19 mit der VEGF-mRNA unter Normoxie und Hypoxie untersucht. RpL19 ist ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit. Eine Co-Lokalisierung von rpL19 mit einer mRNA gibt einen Hinweis auf die aktive Translation der betreffenden mRNA. Unterstützend zu den Vergrößerungen, sind in der unteren Zeile der Abbildung 3.17 Intensitätsprofile für die Fluoreszenz-Signale des Cy3- und des FITC-Signals dargestellt. Die VEGF-mRNA zeigt in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen unter normoxischen Bedingungen nur eine geringe Co-Lokalisierung mit rpL19. Die siRNA-

vermittelte Verringerung der DDX6-Menge führt bereits unter Normoxie zu einer deutlich verstärkten Co-Lokalisierung. Dies deutet auf eine bessere Translation der VEGF-mRNA unter diesen Bedingungen hin. Unter Hypoxie ist die Co-Lokalisierung der VEGF-mRNA mit rpL19 in den Kontrollzellen vergleichbar mit den DDX6-*knock down*-Zellen unter Normoxie. Diese Ergebnisse legen nahe, dass Hypoxie-Behandlung zu einer Aktivierung der VEGF-mRNA-Translation führt, die durch den DDX6-*knock down* noch verstärkt wird.

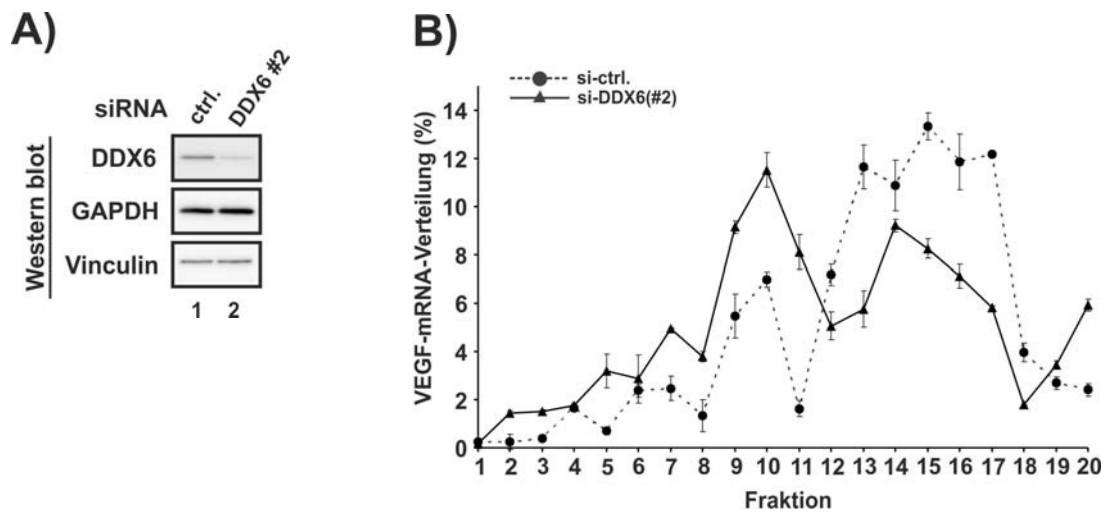


**Abbildung 3.17:** Der siRNA-vermittelte *knock down* von DDX6 hat einen hypoxie-ähnlichen Effekt auf die Co-Lokalisierung von VEGF-mRNA und rpL19.

Kombination von Immunfluoreszenz-Färbung und Fluoreszenz *in situ*-Hybridisierung (IF-FISH-Färbung) normoxischer und hypoxischer MCF-7-Zellen nach *knock down* von DDX6; die Detektion von DDX6 erfolgte über den Cy5-Kanal (cyan), die von rpL19 über den Cy3-Kanal (rot); VEGF- und  $\beta$ -Aktin-mRNA wurden über FITC-markierte DNA-Sonden nachgewiesen (grün); die Vergrößerung zeigt den in der Überlagerung markierten Ausschnitt der kombinierten Cy3- und FITC-Signale. Entlang der gestrichelten Linie wurden Intensitätssignale berechnet und als Profil der relativen Signal-Intensität dargestellt (unten) (de Vries *et al.* 2013).

Die  $\beta$ -Aktin-mRNA zeigt in den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen unter Normoxie eine deutliche Co-Lokalisierung mit rpL19. Die siRNA-vermittelte Reduzierung der DDX6-Menge hat keinen Einfluss auf diese Co-Lokalisierung. Wie bereits in der Polysomengradienten-Analyse gezeigt (Abbildung 3.2), ist die Translation der  $\beta$ -Aktin-mRNA unter Hypoxie herabgesetzt. Dies spiegelt sich auch in der verringerten Co-Lokalisierung von rpL19 und der  $\beta$ -Aktin-mRNA, sowohl nach Kontroll- als auch nach DDX6-siRNA-Transfektion, wider. Diese Ergebnisse zeigen einen spezifischen Einfluss von DDX6 auf die Co-Lokalisierung der VEGF-mRNA mit der 60S-Untereinheit des Ribosoms.

Für den Nachweis, dass die siRNA-vermittelte Verringerung der DDX6-Menge unter Hypoxie zu einer entsprechenden, weiteren Verstärkung der VEGF-mRNA-Translation führt, wurde eine Polysomen-Analyse mittels Saccharose-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation durchgeführt (Abbildung 3.18).



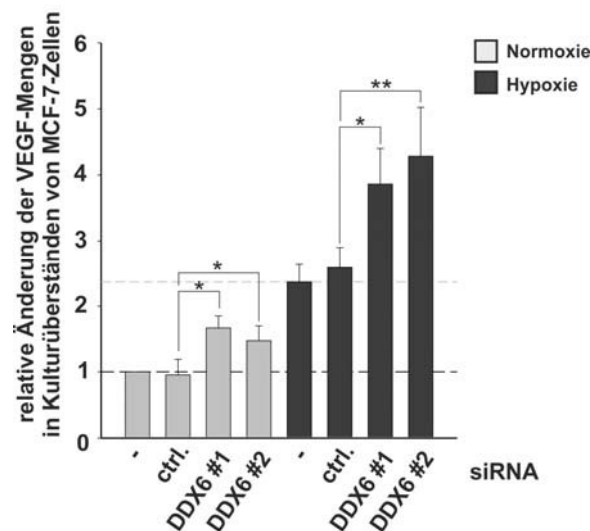
**Abbildung 3.18: DDX6-knock down verstärkt die VEGF-mRNA-Translation *in vivo*.**

MCF-7-Zellen wurden mit siRNAs gegen DDX6 (si-DDX6 #2) oder mit ungerichteten siRNAs (si-ctrl.) transfiziert. Nach 48 h erfolgte die 24-stündige Hypoxie-Behandlung. Vor der Präparation der Lysate wurden die MCF-7-Zellen mit Cycloheximid behandelt, um eine Translokation der Ribosomen zu inhibieren. A) Western blot von siRNA-transfizierten MCF-7-Zell-Lysaten nach Normoxie oder Hypoxie; geladen wurden 10 µg Gesamtprotein pro Spur. B) Verteilung der VEGF-mRNA im Polysomengradienten; die Auftrennung der Lysate erfolgte durch Ultrazentrifugation in einem 15-45% Saccharose-Gradienten. Für die Berechnung der VEGF-mRNA-Verteilung wurde die RNA aus den einzelnen Fraktionen isoliert die mittels quantitativer RT-PCR bestimmten Ct-Werte zunächst auf die exogene CAT-RNA und anschließend auf die β-Aktin-mRNA-Ct-Werte normalisiert. Die VEGF-mRNA-Verteilung (%) stellt die Änderung der mRNA-Verteilung nach DDX6- (gestrichelte Linie) beziehungsweise Kontroll- *knock down* (durchgehende Linie) dar (de Vries *et al.* 2013).

48 h nach siRNA-Transfektion wurden die MCF-7-Zellen in hypoxische Bedingungen überführt. Die Verringerung der DDX6-Protein-Menge wurde mittels Western blot nachgewiesen (Abbildung 3.18A). Die Verteilung der VEGF-mRNA im Polysomen-Gradienten wurde mit Hilfe von quantitativer RT-PCR bestimmt. Abbildung 3.18B zeigt die Änderung der VEGF-mRNA-Verteilung unter Hypoxie, normalisiert auf die β-Aktin-mRNA. In den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (si-ctrl.) ist die VEGF-mRNA neben den polysomalen Fraktionen (Fraktionen 5-12) zu einem bedeutenden Teil auch in den Fraktionen geringerer Dichte (Fraktionen 13-20) lokalisiert. Die Transfektion der MCF-7-Zellen mit gegen DDX6 gerichteten siRNAs resultiert, verglichen mit den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen (si-ctrl.), in einer deutlichen Zunahme der VEGF-mRNA-Menge in den Fraktionen höherer Dichte des Gradienten, bei einer gleichzeitigen Abnahme in den Fraktionen geringerer Dichte. Dies deutet auf einen reprimierenden Einfluss von DDX6 auf die VEGF-mRNA-Translation *in vivo* hin.

### 3.4.5 Der siRNA-vermittelte DDX6-knock down erhöht die VEGF-Produktion in vivo

Unter Hypoxie findet eine verstärkte Produktion von VEGF statt. VEGF wird von MCF-7-Zellen in den Kulturüberstand sezerniert (Abbildung 3.1C). Mittels *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) sollte überprüft werden, ob auch der DDX6-knock down zu einer verstärkten VEGF-Sekretion führt. Der siRNA-vermittelte DDX6-knock down mit zwei verschiedenen siRNAs (siehe Anhang, Abbildung A.3) führt unter Normoxie zu einer Steigerung der VEGF-Konzentration im Überstand um *circa* 50% verglichen mit der Kontrolle (Abbildung 3.19). Unter Hypoxie zeigen nicht-transfizierte (-) und mit Kontroll-siRNA-transfizierte MCF-7-Zellen (ctrl.) gegenüber Normoxie *circa* 2,5-fach gesteigerte VEGF-Mengen im Kulturüberstand. Der siRNA-vermittelte *knock down* von DDX6 (DDX6 #1 und #2) bewirkt unter Hypoxie hingegen eine Steigerung um das *circa* 4,5-Fache.

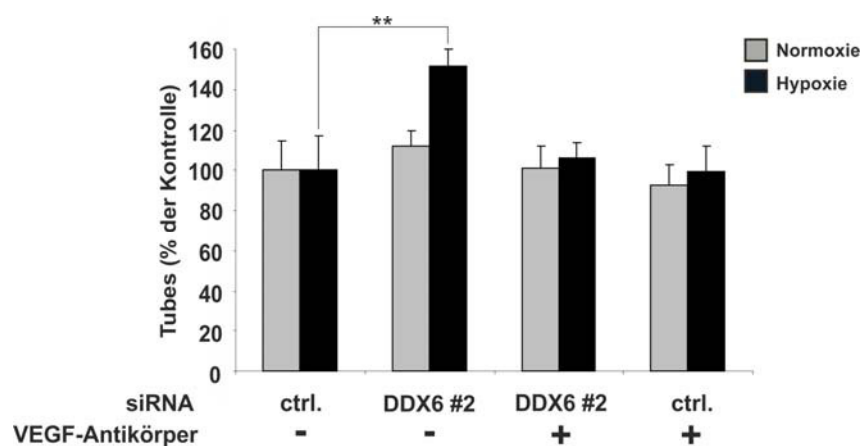


**Abbildung 3.19: VEGF-Sekretion von MCF-7 Zellen nach DDX6-knock down unter Normoxie und Hypoxie.**

MCF-7-Zellen wurden 48 h vor der Hypoxie-Behandlung mit zwei verschiedenen siRNAs gegen DDX6 (DDX6 #1 und #2) und einer Kontroll-siRNA (ctrl.) transfiziert. Die VEGF-Mengen in den unverdünnten Kulturüberständen wurden mittels ELISA quantifiziert und auf die nicht-transfizierte, normoxische Kontrolle normalisiert. Die Signifikanz-Berechnung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t-Test*; \*:  $p < 0,05$  (de Vries *et al.* 2013).

### 3.4.6 Die durch DDX6-knock down vermittelte Steigerung der VEGF-Mengen hat einen physiologischen Effekt im Tube formation assay

VEGF ist in Geweben maßgeblich an deren Vaskularisierung beteiligt indem es unter anderem die Migration von Endothelzellen stimuliert (Koch *et al.* 1994). Ein Modellsystem zur Untersuchung des angiogenen Potentials unterschiedlicher Wachstumsfaktoren stellen humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) dar. Abhängig von der Konzentration angiogener Faktoren wie VEGF bilden die HUVEC geschlossene, zirkuläre Strukturen, sogenannte *Tubes*, aus. Für diesen *Tube formation assay* wurden HUVEC mit Überständen von normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zellen nach DDX6-knock down inkubiert (Abbildung 3.20). Lediglich die hypoxischen Überstände von DDX6-knock down-Zellen führen zu einer signifikanten Steigerung der *Tube*-Ausbildung um *circa* 40% verglichen mit Überständen hypoxischer Kontroll-Zellen. Die Zugabe von anti-VEGF-Antikörper neutralisiert diesen Effekt vollständig.



**Abbildung 3.20: Kulturüberstände von hypoxischen DDX6-knock down-Zellen stimulieren HUVECs zur Ausbildung tubulärer Strukturen (*Tubes*).** Kulturüberstände normoxischer und hypoxischer MCF-7-Zellen nach Transfektion mit siRNAs gegen DDX6 oder mit Kontroll-siRNAs wurden im *Tube formation assay* auf ihr angiogenes Potential untersucht. Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (*human umbilical vein endothelial cells*, HUVEC) wurden 16 h bei 37°C inkubiert. Die Auswertung erfolgte lichtmikroskopisch durch Auszählen der tubulären Strukturen (*Tubes*). Die Anzahl der *Tubes* ist als prozentualer Anteil der Kontrolle (ohne VEGF-Antikörper) angegeben. Die Signifikanz-Berechnung erfolgte mittels zweiseitigem *Student's t*-Test; \*\*:  $p < 0,01$  (de Vries *et al.* 2013).

## 4. Zusammenfassung und Diskussion

Unter Hypoxie findet eine Herabsetzung der Translations-Initiation statt. Bestimmte mRNAs können aufgrund von Sequenz- und/oder Sekundärstrukturelementen dennoch translatiert werden. Zu den auch unter Hypoxie effektiv translatierten mRNAs gehört die VEGF-mRNA. VEGF ist, neben seinen Funktionen im gesunden Organismus, auch in der Tumor-Angiogenese bedeutsam. In der Brustkrebs-Therapie ist VEGF daher als Ziel einer gerichteten Therapie von großem Interesse.

Die VEGF-mRNA besitzt eine überdurchschnittlich lange 5'UTR, die 2 unabhängige IRES-Elemente birgt. Diese können eine 5'Cap-unabhängige Translations-Initiation vermitteln. Über die Faktoren, die an der selektiven mRNA-Translation unter Hypoxie beteiligt sind, ist bisher nur wenig bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein MCF-7-Brustkrebs-Zell-basiertes *in vitro*-Translationssystem entwickelt, welches die VEGF-IRES-vermittelte Translations-Initiation unter Hypoxie rekapituliert. Mit Hilfe des zellfreien MCF-7-Translationssystems konnte *via* Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie DDX6 als VEGF-mRNA-interagierendes Protein identifiziert werden, welches einen Einfluss auf die VEGF-mRNA-Translation unter Hypoxie besitzt.

### 4.1 Zur zellulären Antwort von MCF-7-Zellen auf hypoxische Bedingungen

Säugerzellen reagieren auf Sauerstoffmangel (Hypoxie) mit einer Umstellung ihres Genexpressionsprofils und ihres Energie-Stoffwechsels (Liu und Simon 2004). Die Transkriptionsregulation Hypoxie-induzierbarer Gene erfolgt über HIF-, NF- $\kappa$ B- und AP-1 (Übersichtsartikel Shih und Claffey 1998). Diese umfassen unter anderem Gene der Glykolyse (Semenza *et al.* 1994), aber auch Wachstumsfaktoren wie Erythropoetin (Blanchard *et al.* 1992) sowie VEGF (Iizuka *et al.* 1994). Auch MCF-7-Zellen reagieren auf Hypoxie mit einer erhöhten VEGF-Produktion (Larsen *et al.* 2008). Die Regulation der VEGF-Produktion unter Hypoxie basiert auf der gesteigerten Transkription des VEGF-Gens, der VEGF-mRNA-Stabilisierung und der Steigerung beziehungsweise Aufrechterhaltung der Translation (siehe Abschnitt 1.4). Die Aktivierung der Transkription des VEGF-Gens erfolgt über den Transkriptionsfaktor HIF-1 (Forsythe *et al.* 1996). Nach 24-stündiger Kultivierung von MCF-7-Zellen unter hypoxischen Bedingungen konnte die

sauerstofflabile Untereinheit HIF-1 $\alpha$  des HIF-Heterodimers mittels Immunfluoreszenz-Färbung im Nukleus nachgewiesen werden (Abbildung 3.1A). Die Lokalisierung von HIF-1 $\alpha$  im Nukleus ermöglicht die Dimerisierung mit HIF-1 $\beta$ , welche für die Aktivierung von HIF-1 als Transkriptionsfaktor erforderlich ist (Chilov *et al.* 1999). Im Cytoplasma, wo der Prolin-Hydroxylase-vermittelte Abbau von HIF-1 $\alpha$  stattfindet (Kallio *et al.* 1999), ist HIF-1 $\alpha$  weder unter Normoxie noch unter Hypoxie detektierbar (Abbildung 3.1A und B).

Die Menge an VEGF-Protein im Kulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt (Abbildung 3.1C). Die Hypoxie-Behandlung der MCF-7-Zellen führt zu einem Anstieg von VEGF von 120 pg/ml auf 300 pg/ml. Der relative Anstieg der VEGF-Konzentration im MCF-7-Kulturüberstand (Faktor 2,5) wurde ähnlich auch von Larsen *et al.* 2008 gezeigt (zwei- bis vierfacher Anstieg).

Neben der Aktivierung der Transkription und der mRNA-Stabilisierung findet eine Regulation der VEGF-Expression unter Hypoxie insbesondere auch auf Ebene der Translation statt (siehe Abschnitt 1.4.3). Die Effizienz der Translation einer endogenen mRNA zu einem gegebenen Zeitpunkt kann mittels Polysomen-Analyse ermittelt werden. Hierbei dient die Assoziation von endogenen mRNAs mit Ribosomen als Indikator für eine effizientere oder weniger effiziente Translation (Mašek *et al.* 2011). Während die HIF-1 $\alpha$  - mRNA-Menge in polysomalen Fraktionen unter Hypoxie leicht ansteigt, nimmt der Anteil der aktiv translatierten  $\beta$ -Aktin-mRNA in PC-3-Zellen unter Hypoxie um *circa* 50% ab (Thomas und Johannes 2007). Das Absorptionsprofil der Polysomen-Gradienten von MCF-7-Zellen, die unter Normoxie bzw. Hypoxie inkubiert wurden, zeigt Polysomen-Fraktionen, die 80S-Fraktion, 60S- und 40S-Untereinheit sowie die mRNP-Fraktion (Abbildung 3.2). Die Polysomen-Fraktion ist hierbei, verglichen mit Ergebnissen zum Beispiel aus HeLa-Zellen, nur schwach ausgeprägt (Koritzinsky *et al.* 2005). Dies kann sowohl auf eine geringe Translationsaktivität der sich nur *circa* alle 24 Stunden teilenden Zellen zurückzuführen sein als auch auf eine Dissoziation von Polysomen während der Durchführung des Experimentes. Auffällig ist insbesondere das Signal für die 80S-Fraktion, welches unter Hypoxie stark zunimmt. Die gelelektrophoretische Analyse der aus den Fraktionen präparierten Gesamt-RNA spiegelt dies wider. Die Zunahme der 80S-Fraktion unter Hypoxie wurde unter anderem bereits in hypoxischen HeLa-Zellen beobachtet und deutet auf eine erhöhte Anzahl freier Ribosomen aufgrund einer reduzierten Bildung des 5'Cap-bindenden Komplexes hin (Koritzinsky *et al.* 2005). Dies



stimmt mit Beobachtungen zur allgemeinen Translationsrepression unter Hypoxie überein (Koritzinsky *et al.* 2005). Die VEGF-mRNA ist insbesondere unter Hypoxie auch in den Polysomen-Fraktionen höherer Dichte zu finden. Die Assoziation der VEGF-mRNA mit Polysomen unter Hypoxie wurde auch in primären Astrozyten gezeigt (Stein *et al.* 1998). Die  $\beta$ -Aktin-mRNA findet man vor allem unter normoxischen Bedingungen in den schweren Fraktionen, während sie unter Hypoxie vor allem in den mRNP- und Monosomen-Fraktionen detektierbar ist. Dies bestätigt die in PC-3-Zellen gezeigte Herabsetzung der  $\beta$ -Aktin-mRNA-Translation unter Hypoxie auch in MCF-7-Zellen (Thomas und Johannes 2007).

Diese Ergebnisse belegen, dass MCF-7-Zellen die für die VEGF-mRNA beschriebene Translationsregulation unter Hypoxie zeigen. Somit konnte dieses Zellsystem für die weitere Aufklärung der zugrunde liegenden Regulationsmechanismen verwendet werden.

#### **4.2 Zur Etablierung eines MCF-7-basierten *in vitro*-Translationssystems**

Es existieren kommerzielle Systeme für die zell-freie Translation. Hierzu gehören unter anderem Kaninchen-Retikulocyten-Lysat, Weizenkeimextrakt und *E. coli*-Lysat. Diese Systeme eignen sich nicht für die Identifizierung VEGF-mRNA-translations-regulierender Proteine, da hier keine Hypoxie-Antwort untersucht werden kann. Für die Identifizierung von VEGF-mRNA-interagierenden Proteinen sollte daher zunächst ein zellfreies-Translationssystem etabliert werden. Die Hauptanforderung an dieses war die Rekapitulation der VEGF-IRES-vermittelten Translation unter Hypoxie *in vitro*.

Translationskompetente, cytoplasmatische Extrakte wurden aus normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zellen präpariert (Abschnitt 2.3.3). Die Behandlung derartiger Extrakte mit *Micrococcus*-Nuklease (MN) erlaubt die effizientere Translation exogener Reporter-RNAs (Rakotondrafara und Hentze 2011). Hierbei müssen die Inkubationsbedingungen exakt austitriert werden, um einen bestmöglichen Abbau endogener RNAs bei gleichzeitiger Erhaltung der Translationsaktivität zu gewährleisten (siehe Anhang, Abbildung A.4). Abbildung 3.3 zeigt die Auswertung einer MN-Behandlung cytoplasmatischer Extrakte von MCF-7-Zellen, die unter Normoxie beziehungsweise Hypoxie kultiviert wurden. Die Integrität der 18S- und 28S-rRNA (Abbildung 3.3A) ist Voraussetzung für einen translations-aktiven Extrakt. In Anwesenheit von MN konnten die Mengen endogener GAPDH- und PPIA-mRNA reduziert werden. Die

MN-Behandlung zeigt Unterschiede bezüglich der GAPDH-mRNA-Mengen unter Normoxie und Hypoxie (Abbildung 3.3A). Der Grund hierfür ist die Zunahme der GAPDH-mRNA-Menge unter Hypoxie. Diese Zunahme führt dazu, dass die MN-Behandlung für die GAPDH-mRNA unter Normoxie effizienter erscheint als unter Hypoxie. Die exogene CAT-RNA wurde nach Abstoppen der Nuklease-Behandlung als Extraktionskontrolle zugegeben. Die *in vitro*-Translations-Daten mit einer Reporter-mRNA zeigen, dass die Translationsaktivität des Extraktes für die Reporter-RNA durch die MN-Behandlung zugenommen hat.

Die *in vitro*-Translation bietet die Möglichkeit zur Analyse von Reporter-RNAs sowie die Untersuchung von direkten Einflüssen zugegebener rekombinanter, gereinigter Proteine (Abbildung 3.16). Die MN-Behandlung bietet zusätzlich die Vorteile, dass exogene Reporter-Transkripte effizienter translatiert werden können sowie andernfalls potentiell RNA-gebundene regulatorische Proteine für die exogene RNA zugänglich werden.

#### **4.2.1 Zum Nachweis der VEGF-5'UTR-vermittelten Translation *in vitro***

Zum Nachweis einer IRES-vermittelten Translations-Initiation ist die Verwendung zirkulärer (Chen und Sarnow 1995), bicistronischer (Stoneley *et al.* 1998) oder monocistronischer Reporter-RNAs (Thoma *et al.* 2004) in Kombination mit dem direkten Proteinnachweis oder dessen Aktivität (z.B. Luciferase-Aktivität) gebräuchlich.

In der vorliegenden Arbeit wurde ein bereits für die VEGF-5'UTR erfolgreich eingesetztes bicistronisches System verwendet (Huez *et al.* 1998). In Abbildung 3.4C ist der translations-vermittelnde Einfluss der VEGF-5'UTR gegenüber einer Reporter-mRNA ohne 5'UTR gezeigt. Die 5'Cap-vermittelte Translation des *Renilla*-Luciferase-ORF wird durch das Einbringen einer Haarnadelstruktur (SL) am 5'Ende der Reporter-RNA effizient reprimiert. Das VEGF-5'UTR enthaltende Konstrukt zeigt gegenüber der Kontrolle in normoxischen Extrakten eine 2-fach höhere, und in hypoxischen Extrakten sogar eine bis zu 4-fach bessere Translation bezüglich der *Firefly*-Luciferase-Aktivität. Diese Effekte gehen nicht auf Unterschiede in der RNA-Stabilität zurück (Abbildung 3.4D).

Ein häufiger Kritikpunkt bei der Verwendung bicistronischer Reporter-Systeme ist die Möglichkeit einer kryptischen Promoter-Aktivität (Kozak 2005). Insbesondere für die VEGF-5'UTR ist dieser Punkt von Interesse, da für diese, neben der IRES-Aktivität, auch

eine alternative Initiation der Transkription gezeigt wurde (Akiri *et al.* 1998). Durch den Einsatz von Reporter-RNAs kann diese Möglichkeit jedoch ausgeschlossen werden. Der hypoxische MCF-7-Zellextrakt besitzt somit nicht nur *in vitro*-Translations-Aktivität, sondern rekapituliert auch die Hypoxie-induzierte VEGF-IRES-vermittelte Translation.

#### 4.2.2 Zum Einfluss der VEGF-3'UTR auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation

Für die Untersuchung des Effektes der VEGF-3'UTR auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation in cytoplasmatischen MCF-7-Zellextrakten wurden monoclonale Reporter-RNAs verwendet (Abbildung 3.5).

Zur Stabilisierung der Reporter-RNAs erfolgte die *run off-in vitro*-Transkription in Anwesenheit des Cap-Analogs ApppG. In HeLa-Zellextrakten konnte gezeigt werden, dass dieses einen mit dem m<sup>7</sup>GpppG-Cap vergleichbaren RNA-stabilisierenden Einfluss hat, jedoch deutlich geringer die Translationsinitiation vermittelt (Bergamini *et al.* 2000). Eigene Experimente konnten den Einfluss des ApppG auf die Translationsinitiation in MCF-7-Zellextrakten bestätigen (siehe Anhang, Abbildung A.5).

Eine Unterscheidung zwischen dem Einfluss der VEGF-3'UTR auf die Translation sowie die Stabilisierung der Reporter-RNAs in normoxischen und hypoxischen Extrakten ist mit den vorliegenden Daten nur bedingt möglich (Abbildung 3.5C und 3.5D). Die Stabilisierung der Reporter-RNAs 3'1 und 3'3 unter Hypoxie korreliert jedoch mit der Bindung der VEGF-mRNA-stabilisierenden Proteine hnRNP L an die HSR-Sequenz (3'1) beziehungsweise HuR an das VRS im Fragment 3'3 (Shih und Claffey 1999, Levy *et al.* 1998). Die geringere Stabilität der Reporter-RNA mit der VEGF-3'UTR (3'fl) wird nahezu identisch auch mit dem Fragment 3'2 der VEGF-3'UTR beobachtet (Abbildung 3.5D). Neben den stabilisierenden Elementen in den Fragmenten 3'1 und 3'3 sind somit auch nicht-stabilisierende beziehungsweise destabilisierende Elemente enthalten, deren Einfluss unter diesen Bedingungen zu dominieren scheint. Die Bindung des doppelsträngige RNA-bindenden Proteins NF90 an das HSR-Element im Fragment 3'1 führte in MDA-MB-435S-Zellen zu einer Stabilisierung der VEGF-mRNA und einer verstärkten Assoziierung mit Polysomen (Vumbaca *et al.* 2008). Eine gesteigerte Translation für die 3'1-RNA ist aus den in dieser Arbeit gezeigten Daten (Abbildung 3.5.C) nicht ersichtlich.

Ein Einfluss der VEGF-3'UTR auf die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation ist nicht eindeutig nachweisbar. Dies ist, zumindest partiell, in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Bornes *et al.* (2004) in COS-7-Zellen. Hier wurde kein Einfluss der 3'UTR auf die

Auswahl des Initiationscodons gezeigt. Sowohl in Makrophagen (Jafarifar *et al.* 2011) als auch in HeLa-Zellen (Karaa *et al.* 2009) war die VEGF-3'UTR in Verbindung mit miRNAs hingegen für die VEGF-5'UTR-vermittelte Translation von Bedeutung. Durch die MN-Behandlung des cytoplasmatischen Extraktes könnte dieser Regulations-Mechanismus jedoch eliminiert worden sein. Alle untersuchten Reporter-RNAs besaßen in hypoxischen Extrakten eine höhere Stabilität als in Extrakten von normoxischen Zellen (Abbildung 3.5D). Informationen zur Stabilität von mRNAs unter Hypoxie in Eukaryoten im Allgemeinen sind derzeit kaum verfügbar. Der Focus von Untersuchungen hierzu liegt meist auf der Stabilisierung oder Destabilisierung einzelner mRNAs durch (spezifische) trans-bindende Faktoren. Eine mögliche Erklärung für die erhöhte Stabilität der Transkripte im hypoxischen Extrakt ist die Herabsetzung des *nonsense-mediated decay* (NMD) (Gardner und Corn 2008). Bei NMD handelt es sich um einen Mechanismus, der mRNAs mit vorzeitigem Stop-Codon degradieren soll. Unter Hypoxie ist eIF2 $\alpha$  phosphoryliert, was den NMD verringert (Gardner und Corn 2008). Im Fall der Reporter-RNAs könnte die VEGF-5'UTR durch den enthaltenen uORF dem NMD verstärkt ausgesetzt sein, was unter hypoxischen Bedingungen weniger ausgeprägt wäre. Die ausbleibende Stabilisierung der Reporter-RNA mit der vollständigen VEGF-3'UTR erklärt dies jedoch nicht. Eine weitere mögliche Erklärung ist der Abbau von regulatorischen RNAs durch die *Micrococcus*-Nuklease-(MN) Behandlung der cytoplasmatischen Extrakte, wodurch eine Stabilisierung der Reporter-RNAs unter Hypoxie ausbleiben könnte. Translationsexperimente von nicht-MN-behandelten Extrakten ergaben abweichende Ergebnisse für den Einfluss der VEGF-3'UTR auf die VEGF-IRES-vermittelte Translation *in vitro* (Daten nicht gezeigt). Um einen möglichen Einfluss der 3'UTR auf die VEGF-mRNA-Translation zu analysieren, sind weitere Experimente notwendig. Diese könnten unter anderem kleinere Fragmente der VEGF-3'UTR umfassen sowie den Vergleich zwischen MN-behandeltem und unbehandeltem Extrakt.

#### **4.3 Zur Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie**

Für die Identifizierung von RNA-bindenden Proteinen gibt es unterschiedliche Ansätze. Hierzu zählen unter anderem die GRNA-Chromatographie (Czaplinski *et al.* 2005, Duncan *et al.* 2006) die Streptavidin-Interaktion biotinylierter RNAs (Jeske *et al.* 2011) und die hier verwendete Tobramycin-Aptamer-Technik (Weinlich *et al.* 2009). Allen Methoden ist

die Immobilisierung der Ziel-RNA gemein. RNA-bindende Proteine werden mit Hilfe massenspektrometrischer Analyse identifiziert.

Abbildung 3.7 zeigt das Ergebnis der Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie mit einer immobilisierten VEGF-sORF-RNA, die neben dem Tobramycin-Aptamer die VEGF-5'UTR, einen kurzen artifiziellen Leserahmen und die VEGF-3'UTR umfasst. Die RNA wurde mit normoxischen und hypoxischen translationskompetenten MCF-7-Zellextrakten inkubiert. Obwohl Unterschiede zwischen Ansätzen mit und ohne VEGF-sORF-RNA im silbergefärbten SDS-Gel vorhanden sind, erscheinen die meisten Banden identisch. Mittels Western blot konnte die Spezifität der Reinigung bestätigt werden. Zwei bekannte VEGF-3'UTR bindende Proteine, HuR und hnRNP L dienten als Positiv-Kontrollen (Levy *et al.* 1998, Shih und Claffey 1999). Die Interaktion beider Proteine mit der VEGF-sORF-RNA war sowohl in normoxischem als auch in hypoxischem Extrakt mittels Western blot detektierbar. Das glykolytische Protein GAPDH und das Strukturprotein Vinculin waren hingegen nur in den cytoplasmatischen Extrakten (*Input*) nachweisbar.

Die Eluate wurden mittels Massenspektrometrie analysiert (Prof. Dr. Henning Urlaub, Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Abteilung Bioanalytische Massenspektrometrie, Göttingen). Tabelle 3.1 fasst die Zahlen, der detektierten Peptide von 12 identifizierten Proteinen zusammen. Die Auswahl wurde anhand der verfügbaren Literatur eingegrenzt.

DDX6 (rck/p54) ist ein Protein der DEAD-Box-Helikase-Familie mit Funktionen in der Speicherung, dem Abbau und der Translationsmodulation von mRNAs (Ostareck *et al.* 2014, siehe unten).

Mitglieder der heteronukleären Ribonukleoproteinfamilie (hnRNP) wurden in einer Vielzahl mRNA-assoziiierter Prozesse beschrieben. Hierzu zählen prä-mRNA-Splicing, mRNA-Export, -Stabilität und -Translation (Han *et al.* 2010). Es wurden 5 hnRNP-Proteine identifiziert, die spezifisch an der VEGF-sORF-RNA angereichert werden konnten. HnRNP A3 ist ein mRNA-bindendes Protein, das in mehreren Isoformen vorkommt. Es interagiert mit dem hnRNP A3-*responsive element* und besitzt möglicherweise eine Funktion im mRNA-Export (Ma *et al.* 2002). In Lipopolysaccharid-induzierten murinen RAW 264.7-Zellen interagiert hnRNP A3 mit der COX2-mRNA (Cok *et al.* 2004). Unter den in diesem Komplex gefundenen Proteinen war auch HuR. In humanen Lungen-Karzinomzellen war die Co-Immunopräzipitation von HuR, hnRNP L und hnRNP A3 mit hnRNP A1 RNase-sensitiv (Papadopoulou *et al.* 2010). Aufgrund der

Bedeutung von HuR und hnRNP L für die Stabilisierung der VEGF-mRNA unter Hypoxie ist somit auch hnRNP A3 als mögliche Komponente eines VEGF-mRNA-bindenden Komplexes von Interesse.

Das heteronukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP K) wurde bereits als Repressor der r15-LOX-mRNA-Translation in der Erythropoese beschrieben. Die Interaktion mit dem *differentiation control element* (DICE) in der r15-LOX-3'UTR inhibiert die Bindung der 60S-Untereinheit an die am Translationsinitiations-Codon lokalisierte 40S-Untereinheit (Ostareck *et al.* 1997, Ostareck *et al.* 2001). Die Bindung von hnRNP K an das DICE wird durch die Phosphorylierung am Tyrosin 458 in der DICE-bindenden KH-Domäne 3 reguliert (Ostareck-Lederer *et al.* 2002, Messias *et al.* 2002, Naarmann *et al.* 2008). Ein Einfluss von hnRNP K auf die Angiotensin II-induzierte Stimulation der VEGF-mRNA-Translation wurde zwar gezeigt, eine direkte Interaktion zwischen hnRNP K und VEGF-mRNA wurde jedoch nicht nachgewiesen (Feliars *et al.* 2007).

HnRNP D (AUF-1) ist ein mRNA-interagierendes Protein, welches mit AU-reichen Elementen (ARE) interagiert (Kajita *et al.* 1995). AUF-1 kann sowohl die Stabilität spezifischer mRNAs als auch deren Translation beeinflussen. Es interagiert mit einem ARE in der 3'UTR der c-Myc-mRNA. Der siRNA-vermittelte *knock down* von AUF-1 resultiert, eventuell auf der Grundlage einer Konkurrenz von AUF-1 und TIAR um die c-Myc-mRNA-Bindung, in einer Umverteilung der c-Myc-mRNA in die besser translatierten Fraktionen eines Polysomen-Gradienten (Liao *et al.* 2007). Andererseits führte der *knock down* von AUF-1 zu einem Rückgang der HCV-IRES-vermittelte Translation (Paek *et al.* 2008). Des Weiteren wurde auch ein Zusammenhang zwischen HuR und AUF-1 in der Stabilitätskontrolle von mRNAs gezeigt. Lediglich bei einem spezifischem *knock down* der AUF-1-Isoformen p40 und p45 konnte die Stabilisierung einer ARE-Reporter-RNA beobachtet werden. Die Verringerung der Menge aller vier Isoformen hatte hingegen keinen Einfluss auf die Reporter-RNA-Stabilität (Raineri *et al.* 2004).

Das Protein La (*Sjoergren syndrome type B antigen*, SSB) ist vor allem in die Reifung von tRNAs und die Stabilisierung kurzer RNAs involviert. Es gibt aber auch Beispiele für eine Funktion in der IRES-vermittelten Translation zellulärer mRNAs (Wolin und Cedervall 2002). Die Translation der XIAP (*X-linked inhibitor of apoptosis*)-mRNA kann 5'Cap-unabhängig erfolgen. Eine 162 Nukleotide lange IRES-Sequenz in der XIAP-5'UTR erlaubt die Translationsinitiation auch unter Bedingungen, in denen die generelle Translation reduziert ist. Das La-Protein bindet an die XIAP-5'UTR. Steigende Mengen

La-Protein führten zu einer Repression der XIAP-IRES-vermittelten Translation (Holcik und Korneluk 2000).

HnRNP L und HuR sind die ersten beschriebenen VEGF-mRNA-bindenden Proteine. Ihre Interaktion mit Elementen der VEGF-3'UTR wird durch hypoxische Bedingungen induziert beziehungsweise verstärkt. Die Bindungsregion von hnRNP L wurde auf 21 Nukleotide innerhalb der *hypoxia stabilizing region* (HSR) eingegrenzt. HuR interagiert vor allem mit einem 40 Nukleotide langen Abschnitt innerhalb des VEGF-regulatorischen Sequenz (VRS) (Abbildung 1.4). Hypoxische Bedingungen führen zu einer verstärkten Interaktion zwischen HuR beziehungsweise hnRNPL und der VEGF-3'UTR. Diese resultiert in einer Erhöhung der Halbwertszeit der VEGF-mRNA unter Hypoxie (Shih und Claffey 1999; Levy *et al.* 1998).

HnRNP A0 ist ein bisher kaum beschriebenes Protein. Es wurde erstmals 1995 von Myer und Steitz beschrieben. Später wurde für hnRNP A0 eine Rolle in der LPS-induzierten Bindung von AREs in der TNF- $\alpha$ -, der COX-2- und der *macrophage inflammatory protein-2* (MIP-2)-mRNA gezeigt. Die Autoren schlugen die Bindung von hnRNP A0 an AU-reiche Elemente (ARE) als mögliche Erklärung für die Stabilisierung der MIP-2-mRNA in LPS-induzierten Macrophagen vor (Rousseau *et al.* 2002).

ZNF9 (CNBP) ist bislang nicht sehr gut charakterisiert, wurde jedoch als IRES *trans*-agierender Faktor (ITAF) an der 5'Cap-unabhängigen Translation der Ornithin-Decarboxylase-mRNA (ODC-mRNA) in 293T-Zellen beschrieben. Die Bindung von ZNF9 an das IRES der ODC-mRNA verstärkt deren IRES-abhängige Translation (Gerbasi und Link 2007).

EIF2S2 (eIF2B) ist eine Komponente des Translationsinitiationsfaktors eIF2. EIF2B interagiert mit der Met-tRNA und stimuliert die Ausbildung des ternären Komplexes eIF2:Met-tRNA:GTP (Nygård *et al.* 1980; Siekierka *et al.* 1981). Aufgrund des translations-reprimierenden Effektes der eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung unter Hypoxie und der anhaltenden Translation der VEGF-mRNA unter diesen Bedingungen ist eIF2B in diesem Zusammenhang von Interesse. Zudem interagiert eIF2B mit der Mengovirus-RNA, die unabhängig von einer eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung ist (Rosen *et al.* 1982).

PUMH2 (PUM12) gehört zur Familie der Pumilio/FBF (Puf)-Proteine. Diese Proteine haben Einfluss auf das mRNA-Splicing, die Lokalisierung, die Translation und den Abbau von mRNAs (Lu und Hall 2011). Die P2P-R-mRNA co-immunopräzipitiert mit PUM2, vermutlich aufgrund der Interaktion mit PUM2-Bindungsmotiven in der 3'UTR der P2P-

R-mRNA. Es wird vermutet, dass PUM2 so die Translation der P2P-R-mRNA reprimiert (Scott *et al.* 2005).

Die Identifizierung der Proteine hnRNP K, AUF-1 und DDX6 sowie HuR und hnRNP L mittels Massenspektrometrie wurde im Western blot bestätigt (Abbildung 3.8). Das RNA-bindende Protein G3BP1 wurde nicht in der massenspektrometrischen Analyse identifiziert. Daher wurde es, zusätzlich zu Vinculin und GAPDH, als Negativkontrolle im Western blot mitgeführt. G3BP1 konnte im Western blot lediglich in den Extrakten (Inputs) nachgewiesen werden.

Die VEGF-mRNA-bindenden Proteine HuR und hnRNP L dienten als Positiv-Kontrollen. Die hnRNP L-Menge scheint unter Hypoxie zuzunehmen (Spuren 1 und 2). Diese Zunahme spiegelt sich auch in einem stärkeren Signal für hnRNP L in der VEGF-sORF-Affinitäts-Chromatographie wider (Spuren 5 und 6). Diese Beobachtungen entsprechen dem Modell einer Hypoxie-induzierten Bindung von hnRNP L an die VEGF-3'UTR (Shih und Claffey 1999). HuR ist nicht in cytoplasmatischen Extrakten normoxischer und hypoxischer MCF-7-Zellen, jedoch in der VEGF- Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie detektierbar. Es findet somit eine Anreicherung des Proteins durch die Affinitätsreinigung statt. Die Mengen an gebundenem Protein sind unter Normoxie und Hypoxie vergleichbar.

Der Western blot zum Nachweis von AUF-1 zeigt 4 Signale, die mit den Molekulargewichten der bekannten Isoformen übereinstimmen (Wagner *et al.* 1998). Die beobachtete Zunahme der Signalintensität unter Hypoxie wurde auch in 293T-Zellen nach Hypoxie-Behandlung beobachtet. Allerdings unterscheidet sich die relative Zunahme der verschiedenen Isoformen (Xin *et al.* 2012). In den Elutionsfraktionen der Tobramycin-Reinigung mit der VEGF-sORF-RNA fällt insbesondere die Anreicherung der p37-Isoform auf. Diese scheint bei normoxischen Extrakten stärker ausgeprägt als bei hypoxischen, obwohl die Signalintensität in hypoxischen Extrakten größer ist. Die p37-Isoform ist als die AUF-1-Isoform mit der höchsten RNA-Affinität beschrieben (Wagner *et al.* 1998). Das stärkere Signal für p45-Isoform aus der Affinitäts-Reinigung mit hypoxischen Extrakten geht womöglich auf den Anstieg an p45 unter Hypoxie zurück (Spuren 1 und 2). Die prominenteste Isoform p42 ist, ähnlich wie die p40-Isoform, in den Elutionsfraktionen nur schwach detektierbar. Trotz des stärksten Signals für diese Isoform in den Extrakten scheint die Interaktion mit der VEGF-mRNA geringer zu sein. Dies kann auf die



Kompetition der p42-Isoform mit HuR um AU-reiche Elemente im VRS der VEGF-3'UTR zurückzuführen sein, wie sie für die eIF4E-mRNA beschrieben wurde (Topisirovic *et al.* 2009). Das DDX6-Signal nimmt in den cytoplasmatischen Extrakten von MCF-7-Zellen unter Hypoxie leicht ab. Die Signal-Intensitäten in den Elutionsfraktionen sind für Normoxie und Hypoxie vergleichbar.

Die mittels Massenspektrometrie identifizierten Proteine konnten im Western blot einer Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie bestätigt werden. Um zu ermitteln, welche UTR der VEGF-mRNA für die Anreicherung der jeweiligen Proteine von größerer Bedeutung ist, wurde eine weitere Affinitäts-Reinigung mit getrennter VEGF-5'- und 3'UTR in cytoplasmatischen Extrakten von MCF-7-Zellen, die unter Normoxie bzw. Hypoxie kultiviert wurden, durchgeführt (Abbildung 3.9). Das Western blot-Signal von hnRNP L ist, wie in der Literatur beschrieben, bei Verwendung der VEGF-3'UTR am stärksten (Shih und Claffey 1999). Die Zunahme der Signal-Intensitäten in hypoxischen Extrakten für alle eingesetzten RNAs kann auf eine generell erhöhte RNA-Affinität oder die Zunahme der Proteinmenge unter Hypoxie (Abbildung 3.8) zurückzuführen sein.

Die Spezifität der HuR-Anreicherung bezüglich der Kontroll-Ansätze erscheint, verglichen mit hnRNP L, höher, da für HuR in den Ansätzen ohne exogene RNA bzw. mit Kontroll-RNA nahezu keine Signale erkennbar sind. Neben der erwarteten Anreicherung durch die VEGF-3'UTR (Levy *et al.* 1998) wird HuR auch in den VEGF-5'UTR-Ansätzen detektiert. Unter anderem am Beispiel des *insulin-like growth factor receptor* (IGF-IR) wurde bereits gezeigt, dass HuR auch als ITAF mit 5'UTRs interagieren kann (Meng *et al.* 2008).

Das Bindungsmuster von AUF-1 an die VEGF-5'UTR und -3'UTR ist unter Normoxie ähnlich. Unter Hypoxie scheint die VEGF-5'UTR präferiert gebunden zu werden. Das Bindungsverhalten der AUF-1-Isoformen weicht für die getrennten VEGF-5'- und 3'UTRs jedoch von dem Muster der VEGF-sORF-RNA ab (Abbildung 3.8). Lediglich die p37-Isoform scheint auch hier die stärkste Anreicherung zu zeigen. Die Interaktion von AUF-1-p40 und -p45 aus hypoxischen Extrakten mit der VEGF-3'UTR ist herabgesetzt. Ein Grund für die abweichenden Muster der Isoform-RNA-Interaktion zwischen Abbildung 3.8 und 3.9 kann das fehlende Zusammenspiel von VEGF-5'UTR und -3'UTR sein.

HnRNP K interagiert vor allem mit der VEGF-3'UTR. Die Interaktion mit der VEGF-5'UTR ist vergleichbar mit der Hintergrundbindung von hnRNP K an die Tobramycin-

Matrix (Spuren 2 und 7). Sataranatarajan und Kollegen (2008) identifizierten hnRNP K aufgrund seiner poly(C)-Bindung als VEGF-mRNA-bindendes Protein. Die direkte Interaktion wurde jedoch nicht gezeigt. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde rekombinantes, gereinigtes His-hnRNP K mit <sup>32</sup>P-markierten VEGF-5'UTR- und -3'UTR-Fragmenten in UV-Crosslink-Experimenten eingesetzt (siehe Anhang, Abbildung A.1). His-hnRNP K interagiert direkt mit der VEGF-3'UTR, nicht jedoch mit der VEGF-5'UTR. Die Konkurrenz <sup>32</sup>P-markierter VEGF-3'UTR mit nicht-markierten RNAs zeigt die effiziente Konkurrenz der hnRNP K-VEGF-3'UTR-Interaktion nur mit DICE- und VEGF-3'UTR-RNA. Die Bindungsstellen von hnRNP K an die VEGF-3'UTR konnten auf die Nukleotide 1-582 und 1179-1923 eingegrenzt werden. Im Fall von hnRNP K korrelieren die mittels Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie gewonnenen Daten mit den UV-Crosslink-Ergebnissen.

Die DEAD-Box-RNA-Helikase DDX6 interagiert unter Normoxie bevorzugt mit der VEGF-5'UTR. Eine schwache Interaktion ist auch mit der VEGF-3'UTR detektierbar. Unter Hypoxie wird DDX6 weiter durch die VEGF-5'UTR angereichert. Das Signal in den Ansätzen mit VEGF-3'UTR und Kontroll-RNA (ctrl.) nimmt allerdings auch zu. Dies spiegelt die vergleichsweise unspezifische RNA-Bindung von DDX6 wider (Ernoul-Lange *et al.* 2012).

#### **4.4. Zur Rolle von DDX6 in der VEGF-Expression**

Die Immunopräzipitation von hnRNP K aus normoxischen und hypoxischen cytoplasmatischen MCF-7-Zell-Extrakten zeigte neben der Co-Immunopräzipitation der VEGF-mRNA (Abbildung 3.10) auch die RNA-abhängige Co-Immunopräzipitation von DDX6 sowie der VEGF-mRNA-bindenden Proteine HuR und hnRNP L (Abbildung 3.11). Die Co-Immunopräzipitation von AUF-1 war unter Hypoxie nur sehr schwach, unter Normoxie nicht detektierbar.

Der siRNA-vermittelte *knock down* von hnRNP K und AUF-1 in MCF-7-Zellen führte zu keiner signifikanten Änderung der VEGF-Mengen im Kulturüberstand (Abbildung 3.12 und A.2), während der DDX6-*knock down* einen deutlichen Einfluss auf die VEGF-Mengen hatte (siehe unten und Abbildung 3.19). Aus diesem Grund wurde im Weiteren die Funktion von DDX6 für die VEGF-Expression analysiert.

Bei der RNA-Helikase DDX6 handelt es sich um eine in Eukaryoten weit verbreitete DEAD-Box-Helikase. Zu den am besten charakterisierten Orthologen zählen Xp54 (*Xenopus laevis*), Me31B (*Drosophila melanogaster*), CGH-1 (*Caenorhabditis elegans*), Dhh1p (*Saccharomyces cerevisiae*) und Rck/p54 (*Homo sapiens*). DDX6 besitzt Funktionen in der Lagerung, dem Transport, dem Abbau und der Translation von mRNAs (Weston und Sommerville 2006, Ostareck *et al.* 2014). Das Hefe-Ortholog Dhh1p wurde zudem als genereller Repressor der Translation beschrieben (Coller und Parker 2005, siehe unten).

DDX6 lokalisiert intrazellulär in cytoplasmatischen, granulären Strukturen, die Einfluss auf die Stabilität von mRNAs und deren Translation besitzen (*P-bodies*). *P-bodies* enthalten mRNAs, mRNA-degradierende Enzyme sowie weitere RNA-bindende Proteine (Fenger-Grøn *et al.* 2005). Das DDX6-Hefe-Ortholog Dhh1p interagiert direkt mit dem *decapping enzyme* Dcp1p sowie Pop2, einer Komponente des Deadenylase-Komplexes (Weston und Sommerville 2006, Coller *et al.* 2001, Ostareck *et al.* 2014). MRNAs können in *P-bodies* jedoch auch gespeichert und zu einem späteren Zeitpunkt wieder aktiv translatiert werden (Bregues *et al.* 2005, Arribere *et al.* 2011). DDX6 ist von zentraler Bedeutung für die *P-body*-Formierung (Serman *et al.* 2007, Minshall *et al.* 2009). Nach Ernoult-Lange *et al.* (2012) könnten mRNAs vor ihrer Rekrutierung in *P-bodies* zunächst von spezifischen Faktoren erkannt und anschließend durch die Bindung von DDX6 für die Lokalisierung der mRNAs in *P-bodies* gekennzeichnet werden.

DDX6 ist in normoxischen MCF-7-Zellen in auffälligen cytoplasmatischen Strukturen lokalisiert (*DDX6-Foci*). Unter Hypoxie ist DDX6 deutlich stärker im Cytoplasma verteilt (Abbildung 3.13). Die VEGF-mRNA zeigt unter Normoxie eine deutlich stärkere Co-Lokalisierung mit DDX6 als unter Hypoxie. Nicht alle *DDX6-Foci* co-lokalisieren auch mit VEGF-mRNA. Um die Natur der granulären Strukturen näher zu charakterisieren, wurden Co-Immunfluoreszenz-Färbungen von DDX6 und Dcp1 durchgeführt (Abbildung 3.13C). Es wurden hierbei sowohl Dcp1-positive als auch Dcp1-freie *DDX6-Foci* detektiert. Die Zusammensetzung der VEGF-mRNA-positiven *DDX6-Foci* bezüglich der Anwesenheit von Dcp1 konnte aus technischen Gründen nicht untersucht werden. Bei der Annahme von VEGF-mRNA-speichernden *DDX6-Foci* wäre ein Ausschluss von Dcp1 aus diesen Strukturen vorstellbar. Die  $\beta$ -Aktin-mRNA zeigt weder unter Normoxie noch unter Hypoxie eine Co-Lokalisierung mit DDX6 (Abbildung 3.13A).

Unter Stress-Bedingungen wie oxidativem Stress oder Translations-inhibierenden Bedingungen werden von unterschiedlichen Zelltypen *Stress granules* (SG) gebildet, die Lagerorte für translational reprimierte mRNAs darstellen. Auch aus SG können gespeicherte mRNAs sowohl dem mRNA-Abbau als auch dem Translations-Apparat zugeführt werden (Stoecklin und Kedersha 2013, Buchan und Parker 2009). Ein entscheidender Faktor bei der Bildung von SG ist G3BP1 (Tourrière *et al.* 2003). Eine Co-Lokalisierung von DDX6 und G3BP1 ist in MCF-7-Zellen unter den verwendeten hypoxischen Bedingungen nicht zu beobachten. Somit kann hier die Bildung von *Stress granules* ausgeschlossen werden (Abbildung 3.13C). Zudem zeigt G3BP1 weder unter Normoxie noch unter Hypoxie Co-Lokalisierung mit der VEGF- oder  $\beta$ -Aktin-mRNA (Abbildung 3.13B).

#### 4.4.1 Zur Interaktion von DDX6 mit der VEGF-5'UTR

Die Tobramycin-RNA-Affinitäts-Chromatographie mit separater VEGF-5'UTR und -3'UTR mit normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zell-Extrakten zeigte eine verstärkte Interaktion von DDX6 mit der VEGF-5'UTR unter Normoxie (Abbildung 3.9). Bei diesem Nachweis kann zwischen einer direkten Protein-RNA-Bindung und einer indirekten, zum Beispiel RNA-vermittelten Bindung, nicht unterschieden werden. Um diese Limitation zu umgehen, wurde die Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie mit rekombinanten, gereinigten Proteinen anstelle von Zell-Extrakten durchgeführt. Aufgrund der Abwesenheit weiterer Faktoren kann eine indirekte Interaktion ausgeschlossen werden. Auch mit gereinigtem His-DDX6 wurde eine bevorzugte Bindung der VEGF-5'UTR festgestellt (Abbildung 3.14).

Ein Beispiel für die Interaktion von DDX6 mit einer 5'UTR ist das IRES der c-Myc-mRNA. Hier deuten elektronenmikroskopische Aufnahmen darauf hin, dass DDX6 eine entwindende Aktivität für das c-Myc-IRES-Element besitzt. Die ATPase-Aktivität von DDX6 war in Anwesenheit des c-Myc-IRES größer als für die gesamte c-Myc-5'UTR (Matsui *et al.* 2006). Diese Daten deuten darauf hin, dass DDX6 die strukturierte 5'UTR der c-Myc-mRNA ATP-abhängig entwindet. Dies setzt möglicherweise die c-Myc-IRES-Aktivität herab. Im Fall der VEGF-mRNA ist eine ähnliche Funktion vorstellbar (siehe 4.4.2).

Die Bindung von DDX6 an die VEGF-5'UTR ist nicht exklusiv. Es ist außerdem eine Interaktion mit der VEGF-3'UTR sowie mit den Ansätzen ohne RNA (-) und Kontroll-RNA (ctrl.) detektierbar (Abbildung 3.14). Diese kann auf eine geringe Bindungsspezifität von gereinigtem DDX6 *in vitro* zurückzuführen sein, welche bereits postuliert wurde (Ernault-Lange *et al.* 2012). Es gibt jedoch auch Hinweise, dass DDX6 in der Tristetraprolin (TTP)-vermittelten Translationsrepression ARE-haltiger 3'UTRs von Bedeutung ist. TTP ist in der ARE-vermittelten Regulation der mRNA-Translation und Stabilität involviert und ist zudem, wie DDX6, in *P-bodies* zu finden (Chang und Tarn 2009). In 293T-Zellen wurde nach DDX6-*knock down* eine Aufhebung der TTP-vermittelten Translations-Repression eines Reporter-Konstruktes beobachtet. Durch die Überexpression von DDX6 konnte die Repression wieder hergestellt werden (Qi *et al.* 2012). Effekte von TTP sowie Tis11b, einem Mitglied der TTP-Familie, auf die VEGF-Expression wurden bereits gezeigt (Lee *et al.* 2010; Ciaia *et al.* 2004).

Ebenso wie die eIF4A-Variante R362Q, ist auch für die äquivalente DDX6-Variante R426Q (DDX6<sub>R426Q</sub>) eine verringerte RNA-Bindungsaktivität zu erwarten (Pause und Sonenberg 1992, Pause *et al.* 1993, Harnisch 2010). Der Einsatz von His-DDX6<sub>R426Q</sub> im Tobramycin-Interaktions-Experiment zeigte wie erwartet keine Bindung an die getesteten RNAs. Hierbei kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass die Sekundärstruktur von DDX6<sub>R426Q</sub> von der nativen Faltung des Wildtyp-DDX6 (DDX6<sub>wt</sub>) abweicht. Mögliche Änderungen in der Sekundärstruktur der Proteinvarianten könnten durch die Aufnahme von Entfaltungskinetiken in Anwesenheit steigender Denaturantskonzentrationen (z.B. mittels Circular dichroismus), Oligomerisierungsstudien mittels nativer Gelelektrophorese oder analytischer Ultrazentrifugation aber auch die Aufklärung der Protein-Struktur mittels biophysikalischer Methoden wie Röntgenkristallographie detektiert werden. Des Weiteren könnten auch die Inkubations-Bedingungen Einfluss auf die Bindung von DDX6<sub>wt</sub> und DDX6<sub>R426Q</sub> haben.

HnRNP K bindet in diesem Tobramycin-RNA-Interaktions-Assay ausschließlich an die VEGF-3'UTR. Die Bindung von hnRNP K an die VEGF-3'UTR wurde in UV-Crosslink-Experimenten mit <sup>32</sup>P-markierten Transkripten bestätigt (siehe Anhang, Abbildung 3.1).

#### 4.4.2 Zum Einfluss von DDX6 auf die VEGF-IRES-vermittelte Translation *in vitro*

Rekombinantes, gereinigtes His-DDX6 reprimiert spezifisch die VEGF-IRES-vermittelte Translation einer *Firefly*-Luciferase-Reporter-RNA in normoxischen MCF-7-Zell-Extrakten (Abbildung 3.15). Im hier gezeigten Experiment hat DDX6 einen stark reprimierenden Einfluss auf die Reporter-RNA mit korrekt orientierter VEGF-IRES. Weder die 5'Cap-RNA noch die Reporter-RNA mit invertierter VEGF-IRES, welches keine effiziente Translationsinitiation vermitteln sollte, werden von DDX6 ähnlich reprimiert. In *in vitro*-Translations-Reaktionen mit rekombinatem DDX6 wurde auch die Translation einer c-Myc-IRES-enthaltenden mRNA gegenüber einer Kontroll-mRNA DDX6-Konzentrations-abhängig inhibiert (Matsui *et al.* 2006). Eine mögliche Erklärung ist die Auflösung der IRES-Sekundärstrukturen durch die Helikase-Aktivität von DDX6. Die Bedeutung der DDX6-Helikase-Aktivität für die 5'Cap-unabhängige VEGF-mRNA-Translation könnte zum Beispiel mit der Zugabe einer DDX6-Variante mit verringerter Helikase-Aktivität und/oder ATP-Bindungs-Aktivität untersucht werden (Minshall *et al.* 2009).

Die von hnRNP K gebundene VEGF-3'UTR (siehe Anhang, Abbildung A.1) fehlt in den verwendeten Reporter-RNAs. Die Zugabe von His-hnRNP K zeigt erwartungsgemäß keinen reprimierenden Effekt auf die Translation dieser Transkripte. Allerdings führt die His-hnRNP K-Zugabe auch nicht zu unspezifischen Effekten.

#### 4.4.3 Zur VEGF-mRNA-Stabilität unter Hypoxie

Unter Hypoxie wird die VEGF-mRNA stabilisiert (Ikeda *et al.* 1995, Levy *et al.* 1996a). Dies geht unter anderem auf die Bindung von HuR und hnRNP L an die VEGF-3'UTR zurück (Levy *et al.* 1998; Shih und Claffey 1999). Die RNA-Stabilität der VEGF-mRNA nach DDX6-*knock down* wurde mittels qRT-PCR in Actinomycin D-behandelten normoxischen und hypoxischen MCF-7-Zellen ermittelt (Abbildung 3.16). Die Stabilität der VEGF-mRNA in Zellen mit siRNA-vermittelt verringerter DDX6-Menge ist hierbei mit der Stabilität in den Kontroll-transfizierten Zellen vergleichbar. Unter Hypoxie erfolgt eine Stabilisierung der VEGF-mRNA. Die Stabilität der VEGF-mRNA unter Normoxie erscheint jedoch höher als in anderen Zelltypen beschrieben (Vumbaca *et al.* 2008; Xin *et al.* 2012). Eine mögliche Erklärung ist die Interaktion des VEGF-mRNA-stabilisierenden Proteins HuR mit der VEGF-mRNA unter sowohl hypoxischen als auch normoxischen

Bedingungen (Abbildung 3.8). Aber auch weitere Proteine oder miRNAs, die die mRNA-Stabilität beeinflussen, können hierbei eine Rolle spielen. Der siRNA-vermittelte *knock down* von DDX6 hat bei den genannten Bedingungen weder unter Normoxie noch unter Hypoxie einen Einfluss auf die VEGF-mRNA-Stabilität in MCF-7-Zellen.

Bei Naarmann *et al.* 2010 wurden die hr15-LOX-mRNA-Mengen nach DDX6-*knock down* in Natrium-Butyrat-induzierten K562-Zellen mittels RT-PCR erfasst. Eine Änderung der Transkriptmenge war hier nicht erkennbar.

#### 4.4.4 Zur VEGF-mRNA-Translation *in vivo*

Zur Beurteilung des Einflusses von DDX6 auf die VEGF-mRNA-Translation in MCF-7-Zellen unter Hypoxie *in vivo*, wurde die Co-Lokalisierung der VEGF-mRNA mit einem Protein der 60S-Untereinheit des Ribosoms, rpL19, in DDX6-*knock down*-Zellen untersucht (Abbildung 3.17). Die siRNA-vermittelte Verringerung der DDX6-Menge führt unter Normoxie zu einer deutlich verstärkten Co-Lokalisierung der VEGF-mRNA mit rpL19. Dies deutet auf eine bessere Translation der VEGF-mRNA auch unter Normoxie hin, wenn die Menge an zu Verfügung stehendem, reprimierendem DDX6 herabgesetzt wird. Unter Hypoxie ist die Co-Lokalisierung der VEGF-mRNA mit rpL19 in den Kontroll-Zellen mit der Situation in DDX6-*knock down*-Zellen unter Normoxie vergleichbar. Die Hypoxie-Behandlung könnte somit zu einer Aktivierung der VEGF-mRNA-Translation führen, die durch den DDX6-*knock down* noch verstärkt wird.

Die  $\beta$ -Aktin-mRNA zeigt ein DDX6-unabhängiges Co-Lokalisierungs-Verhalten mit rpL19 unter Normoxie. Unter Hypoxie ist die Co-Lokalisierung mit rpL19, DDX6-unabhängig, verringert.

Um den Einfluss von DDX6 auf die Translation der VEGF-mRNA zu bestätigen, wurde von hypoxischen MCF-7-Zellen nach DDX6-*knock down* eine Polysomen-Gradienten-Analyse durchgeführt (Abbildung 3.18). Die qRT-PCR-Quantifizierung der VEGF-mRNA-Verteilung in den Fraktionen des Polysomen-Gradienten der MCF-7-Zellen, die nach siRNA-vermittelter Verringerung der DDX6-Menge unter Hypoxie inkubiert wurden, bestätigt die Ergebnisse aus den Co-Lokalisierungs-Studien (Abbildung 3.17). Bereits in Kontroll-Zellen ist die VEGF-mRNA gegenüber der  $\beta$ -Aktin-mRNA in Fraktionen höherer Dichte verschoben. Die verringerte DDX6-Menge führt zu einer weiteren Steigerung der

VEGF-mRNA-Menge in diesen Fraktionen, was auf eine bevorzugte Translation der VEGF-mRNA unter diesen Bedingungen hindeutet.

Glucose-Depletion in *S. cerevisiae* resultierte, ähnlich den hypoxischen Bedingungen in MCF-7-Zellen, in einer Inhibition der Translation sowie in einer Akkumulation freier 80S-Ribosomen in Polysomen-Gradienten. In einem Hefestamm mit *Dhh1p-knock out*, dem DDX6-Ortholog in der Bäckerhefe, war diese 80S-Akkumulation weniger stark ausgeprägt (Abbildung 3.2; Coller und Parker 2005). Die Galaktose-induzierte Überexpression von *Dhh1p* führte umgekehrt zu mehr freien 80S-Ribosomen, was in vermindertem Wachstum der verwendeten Hefe-Zellen resultierte. Am Beispiel der PGK1- und RPL41a-mRNA wurde gezeigt, dass diese mRNAs bei *Dhh1p*-Überexpression in die untranslatierten RNP-Fractionen bzw. in die Polysomen-Fractionen geringerer Dichte verschoben wurden. Die Zugabe von rekombinantem GST-*Dhh1p* zu translationskompetenten Extrakten führt zur Inhibition der Translation einer Luciferase-Reporter-RNA (Coller und Parker 2005).

In murinen Hippocampus-Zellen co-immunopräzipitiert die HIF-1 $\alpha$ -mRNA unter Normoxie deutlich stärker mit DDX6 als unter Hypoxie. Diese Co-Immunopräzipitation wird vermutlich maßgeblich durch die direkte Interaktion von DDX6 mit der HIF-1 $\alpha$ -5'UTR vermittelt. Die HIF-1 $\alpha$ -IRES vermittelte Translation einer bicistronischen Reporter-RNA nimmt nach siRNA-vermittelter Verringerung der DDX6-Menge um das circa 2,5-fache zu (Saito *et al.* 2011, siehe unten). Dies deutet darauf hin, dass DDX6 auch an der Translation weiterer mRNAs unter hypoxischen Bedingungen beteiligt ist.

#### 4.4.5 Zum Einfluss von DDX6 auf die VEGF-Produktion *in vivo*

Die Abnahme der DDX6-Menge nach siRNA-Transfektion führt sowohl unter Normoxie als auch unter Hypoxie zu einer erhöhten VEGF-Konzentration in MCF-7-Zellüberständen. Die Zunahme entspricht *circa* 100% gegenüber den Kontrollen (Abbildung 3.19). In der Brustkrebszelllinie MDA-MB-435S konnte für den siRNA-vermittelten *knock down* des VEGF-3'UTR-bindenden Faktors NF-90 ein ähnlicher Anstieg ermittelt werden (Vumbaca *et al.* 2008). Die Tetrazyklin-induzierte Überexpression von PAIP2 führte zu einem VEGF-Anstieg von *circa* 50% (Onesto *et al.* 2004).

Um zu prüfen, ob die Veränderungen in den VEGF-Konzentrationen einen Einfluss auf den Vaskularisierungsprozess haben, wurden humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) in einem *Tube formation assay* eingesetzt. Es wurde bereits



zuvor gezeigt, dass VEGF HUVEC zur Ausbildung zirkulärer Strukturen (*Tubes*) stimulieren kann. Diese Ausbildung der *Tubes* wird vor allem durch den VEGF-Rezeptor 2 vermittelt (Saito *et al.* 2003; Yang *et al.* 2001). Die Inkubation von MCF-7-Zellen unter Hypoxie führt ausschließlich in Kulturüberständen von DDX6-*knock down*-Zellen zu einer Zunahme an VEGF, die ausreichend ist, um die Anzahl von *Tubes* zu erhöhen. Die *Tubes*-Zunahme beträgt *circa* 40%. Die Neutralisierung durch VEGF-spezifische Antikörper zeigt, dass dieser Effekt auf die Wirkung von VEGF und nicht auf weitere Faktoren zurückzuführen ist (Abbildung 3.20). Diese Experimente geben einen ersten Hinweis darauf, dass die Reduktion der DDX6-Menge unter länger anhaltender Hypoxie zu einer Aktivierung der VEGF-Expression führen könnte. Die VEGF-Mengen in Geweben sind sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen von großer Bedeutung für eine koordinierte Ausbildung der Vaskulatur.

#### 4.5 Zusammenfassung und Ausblick

VEGF wird unter Normoxie nur gering exprimiert. Hypoxie induziert die VEGF-Transkription, erhöht die mRNA-Stabilität und verbessert die Translation. Die hierzu führenden regulatorischen Mechanismen sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

Nach Etablierung eines *in vitro*-Translationssystems aus MCF-7-Zellen, die unter normoxischen oder hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, konnte mit Hilfe eines Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie-Ansatzes die RNA-Helikase DDX6 als VEGF-mRNA-bindendes Protein identifiziert werden.

Es konnte gezeigt werden, dass es sich hierbei um eine direkte Interaktion von DDX6 mit insbesondere der VEGF-5'UTR handelt. Während die VEGF-mRNA-Menge unter Hypoxie zunimmt, nimmt die Menge an DDX6 ab. Die unter Normoxie beobachtete Co-Lokalisierung von DDX6 mit der VEGF-mRNA ist unter Hypoxie deutlich herabgesetzt. Rekombinantes, gereinigtes His-DDX6 reprimiert *in vitro* spezifisch die VEGF-mRNA-Translation. Die siRNA-vermittelte Verringerung der DDX6-Menge in MCF-7-Zellen erhöht hingegen die Translation der VEGF-mRNA unter Hypoxie, was in einem Anstieg der VEGF-Menge im Kulturüberstand resultiert. Die Stabilität der VEGF-mRNA wird hierbei durch den DDX6-*knock down* nicht beeinflusst.

Neben DDX6 wurden in der vorliegenden Arbeit noch weitere VEGF-mRNA bindende Proteine mittels Tobramycin-RNA-Affinitätschromatographie identifiziert. Diese können in späteren Studien analog zu den gezeigten Experimenten verifiziert werden.

Darüber hinaus ist der Mechanismus der DDX6-vermittelten Repression der Translation für die VEGF-mRNA nicht aufgeklärt. Daten zu weiteren beteiligten Proteinen könnten dazu beitragen, das Verständnis der Translations-Regulation unter Hypoxie zu verbessern. Zur Identifizierung von DDX6-interagierenden Proteinen könnte beispielsweise eine Immunopräzipitation von DDX6 aus RNase-behandelten Zellextrakten erfolgen. Alternativ ist auch eine Immobilisierung von rekombinantem DDX6 mit diesen Zellextrakten vorstellbar. Interagierende Proteine können anschließend massenspektrometrisch identifiziert werden.

DDX6 interagiert direkt mit der VEGF-mRNA. Die Immunopräzipitation von DDX6 aus z.B. MCF-7-Zellen, die unter Normoxie und Hypoxie kultiviert wurden, könnte über weitere, von DDX6 gebundene mRNAs Aufschluss geben. Hierzu ließen sich die co-immunopräzipitierten mRNAs zunächst isolieren und anschließend mittels *Deep*

*Sequencing (RNA-Seq)* identifizieren (Sephton *et al.* 2011). Wie für das VEGF-3'UTR-bindende Protein hnRNP L kürzlich angewendet, kann auch eine kovalente Verknüpfung (*crosslinking*) von Protein und mRNA mit Immunopräzipitation und Deep Sequencing kombiniert werden (Rossbach *et al.* 2014). Mit Hilfe dieser Ansätze können Informationen zu eventuell umfangreicheren, regulatorischen Funktionen von DDX6 in der Translationsregulation unter Hypoxie gewonnen werden.

Unabhängig von DDX6 ist auch die Identifizierung komplexer regulatorischer mRNA-Motive durch sogenanntes *Occupancy profiling* möglich. Hierbei kann das Protein-mRNA-Interaktom ebenso aufgeklärt werden, wie transkriptom-weite *cis*-regulatorische Elemente (Baltz *et al.* 2012). Die Anwendbarkeit für MCF-7-Zellen wurde bereits in einer vergleichenden Studie mit HEK293-Zellen gezeigt (Schueler *et al.* 2014). So ließe sich mittels differentiellem *occupancy profiling* beispielsweise der Unterschied im Protein-mRNA-Interaktom und zugrunde liegende *cis*-regulatorische Elemente zwischen Normoxie und Hypoxie in MCF-7-Zellen identifizieren.

Neben DDX6-interagierenden Proteinen oder mRNAs ist die Regulation der DDX6-Menge unter Hypoxie in MCF-7-Zellen selbst noch nicht aufgeklärt. In HEK293-Zellen, die unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, steigt die miRNA130a/b-Menge um etwa das zweifache an (Saito *et al.* 2011). Nach pre-miRNA130a/b-Transfektion nimmt die DDX6-Menge hingegen deutlich ab. Mit Hilfe von *in vitro*-Translationsexperimenten wurde gezeigt, dass die Translation einer DDX6-3'UTR-enthaltenden Reporter-RNA in miRNA130a/b-transfizierten HEK293-Zellen herabgesetzt ist (Saito *et al.* 2011). In MCF-7-Zellen ist die miRNA130b allerdings nicht Hypoxie-sensitiv, was abweichende Regulationsmechanismen in MCF-7-Zellen erwarten lässt (Kulshreshtha *et al.* 2007). Bei einer post-transkriptionellen Regulation der DDX6-Expression ließen sich Studien, analog zu den in dieser Arbeit für die VEGF-mRNA gezeigten, durchführen.

## 5. Referenzen

- Akiri G, Nahari D, Finkelstein Y, Le SY, Elroy-Stein O und Levi BZ (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
- Alberti KG (1977) The biochemical consequences of hypoxia. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*. 11:14-20
- Alon T, Hemo I, Itin A, Pe'er J, Stone J, Keshet E (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat Med*. 1(10):1024-8
- Anderson P, Kedersha N (2006) RNA granules. *J Cell Biol*. 172(6):803-8.
- Arany Z, Huang LE, Eckner R, Bhattacharya S, Jiang C, Goldberg MA, Bunn HF, Livingston DM (1996) An essential role for p300/CBP in the cellular response to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93(23):12969-73
- Arribere JA, Doudna JA, Gilbert WV (2011) Reconsidering movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and P bodies. *Mol Cell*. 44(5):745-58
- Arsham AM, Howell JJ, Simon MC (2003) A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem*. 278(32):29655-60
- Balagopal V, Parker R (2009). Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. *Curr Opin Cell Biol*. 21(3):403-8
- Baltz AG, Munschauer M, Schwanhäusser B, Vasile A, Murakawa Y, Schueler M, Youngs N, Penfold-Brown D, Drew K, Milek M, Wyler E, Bonneau R, Selbach M, Dieterich C, Landthaler M (2012) The mRNA-bound proteome and its global occupancy profile on protein-coding transcripts. *Mol Cell*. 46(5):674-90
- Barr MP, Bouchier-Hayes DJ, Harmey JJ (2008) Vascular endothelial growth factor is an autocrine survival factor for breast tumour cells under hypoxia. *Int J Oncol*. 32(1):41-8
- Bastide A, Karaa Z, Bornes S, Hieblot C, Lacazette E, Prats H, Touriol C (2008) An upstream open reading frame within an IRES controls expression of a specific VEGF-A isoform. *Nucleic Acids Res*. 36(7):2434-45
- Bennewith KL, Dedhar S (2011) Targeting hypoxic tumour cells to overcome metastasis. *BMC Cancer*. 11:504
- Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK (1992) Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat*. 24(2):85-95

- Bergamini G, Preiss T, Hentze MW (2000) Picornavirus IRESes and the poly(A) tail jointly promote cap-independent translation in a mammalian cell-free system. *RNA*. 6:1781-1790
- Bergers G, Benjamin LE (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat Rev Cancer*. 3(6):401-10
- Blais JD, Filipenko V, Bi M, Harding HP, Ron D, Koumenis C, Wouters BG, Bell JC (2004) Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress. *Mol Cell Biol*. 24(17):7469-82
- Blanchard KL, Acquaviva AM, Galson DL, Bunn HF (1992) Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Mol Cell Biol*. 12(12):5373-85
- Bornes S, Boulard M, Hieblot C, Zanibellato C, Iacovoni JS, Prats H, Touriol C (2004) Control of the vascular endothelial growth factor internal ribosome entry site (IRES) activity and translation initiation by alternatively spliced coding sequences. *J Biol Chem*. 279(18):18717-26
- van den Beucken T, Koritzinsky M, Wouters BG (2006). Translational control of gene expression during hypoxia. *Cancer Biol Ther*. 5(7):749-55
- Bonnal S, Pileur F, Orsini C, Parker F, Pujol F, Prats AC, Vagner S (2005) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 is a novel internal ribosome entry site trans-acting factor that modulates alternative initiation of translation of the fibroblast growth factor 2 mRNA. *J Biol Chem*. 280(6):4144-53
- Bradford MM (1976). Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 72:248-25
- Braunstein S, Karpisheva K, Pola C, Goldberg J, Hochman T, Yee H, Cangiarella J, Arju R, Formenti SC, Schneider RJ (2007) A hypoxia-controlled cap-dependent to cap-independent translation switch in breast cancer. *Mol Cell*. 28(3):501-12
- Bregues M, Teixeira D, Parker R (2005) Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*. 310(5747):486-9
- Brooks SC, Locke ER, Soule HD (1973) Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma. *J Biol Chem*. 248(17):6251-3
- Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Guidi AJ, Dvorak HF, Senger DR, Connolly JL, Schnitt SJ (1995) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in breast cancer. *Hum Pathol*. 26(1):86-91
- Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L (1992) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med*. 176(5):1375-9

- Bry M, Kivelä R, Holopainen T, Anisimov A, Tammela T, Soronen J, Silvola J, Saraste A, Jeltsch M, Korpisalo P, Carmeliet P, Lemström KB, Shibuya M, Ylä-Herttuala S, Alhonen L, Mervaala E, Andersson LC, Knuuti J, Alitalo K (2010) Vascular endothelial growth factor-B acts as a coronary growth factor in transgenic rats without inducing angiogenesis, vascular leak, or inflammation. *Circulation*. 122(17):1725-33
- Buchan JR, Parker R (2009) Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Outs of Translation. *Molecular Cell*. 36: 932-941
- Budinger GR, Chandel N, Shao ZH, Li CQ, Melmed A, Becker LB, Schumacker PT (1996) Cellular energy utilization and supply during hypoxia in embryonic cardiac myocytes. *Am J Physiol*. 270(1 Pt 1):L44-53
- Carmeliet P (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*. 69 Suppl 3:4-10
- Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*. 380(6573):435-9
- Cascio S, D'Andrea A, Ferla R, Surmacz E, Gulotta E, Amodeo V, Bazan V, Gebbia N, Russo A (2010) miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 alpha and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells. *J Cell Physiol*. 224(1):242-9
- Chakrabarti A, Maitra U (1992) Release and recycling of eukaryotic initiation factor 2 in the formation of an 80 S ribosomal polypeptide chain initiation complex. *J Biol Chem*. 267(18):12964-72
- Chan CP, Kok KH, Tang HM, Wong CM, Jin DY (2013) Internal ribosome entry site-mediated translational regulation of ATF4 splice variant in mammalian unfolded protein response. *Biochim Biophys Acta*. 1833(10):2165-75
- Chang WL, Tarn WY (2009) A role for transportin in deposition of TTP to cytoplasmic RNA granules and mRNA decay. *Nucleic Acids Res*. 37(19):6600-12
- Chappell SA, Edelman GM, Mauro VP (1999) Biochemical and functional analysis of a 9-nt RNA sequence that affects translation efficiency in eukaryotic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(26):9590-4
- Chen CY, Sarnow P (1995) Initiation of protein synthesis by the eukaryotic translational apparatus on circular RNAs. *Science*. 268(5209):415-7
- Chen L, Endler A, Shibasaki F (2009) Hypoxia and angiogenesis: regulation of hypoxia-inducible factors via novel binding factors. *Exp. Mol. Med*. 41(12):849-57

- Chilov D, Camenisch G, Kvietikova I, Ziegler U, Gassmann M, Wenger RH (1999) Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1 $\alpha$ . *J Cell Sci.* 112 (Pt 8):1203-12
- Ciais D, Cherradi N, Bailly S, Grenier E, Berra E, Pouyssegur J, Lamarre J, Feige JJ (2004) Destabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the zinc-finger protein TIS11b. *Oncogene.* 23(53):8673-80
- Claffey KP, Shih SC, Mullen A, Dziennis S, Cusick JL, Abrams KR, Lee SW, Detmar M (1998) Identification of a human VPF/VEGF 3' untranslated region mediating hypoxia-induced mRNA stability. *Mol Biol Cell.* 9(2):469-81
- Cok SJ, Acton SJ, Sexton AE, Morrison AR (2004) Identification of RNA-binding proteins in RAW 264.7 cells that recognize a lipopolysaccharide-responsive element in the 3'-untranslated region of the murine cyclooxygenase-2 mRNA. *J Biol Chem.* 279(9):8196-205
- Coleman AM, Rendon BE, Zhao M, Qian MW, Bucala R, Xin D, Mitchell RA (2008) Cooperative regulation of non-small cell lung carcinoma angiogenic potential by macrophage migration inhibitory factor and its homolog, D-dopachrome tautomerase. *J Immunol.* 181(4):2330-7
- Coller J, Parker R (2005) General translational repression by activators of mRNA decapping. *Cell.* 122(6):875-86
- Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA.* 7(12):1717-27
- Czaplinski K, Köcher T, Schelder M, Segref A, Wilm M, Mattaj IW (2005) Identification of 40LoVe, a *Xenopus* hnRNP D family protein involved in localizing a TGF- $\beta$ -related mRNA during oogenesis. *Dev Cell.* 8: 505–515
- Dever TE, Feng L, Wek RC, Cigan AM, Donahue TF, Hinnebusch AG (1992) Phosphorylation of initiation factor 2 alpha by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast. *Cell.* 68(3):585-96
- Dibbens JA, Miller DL, Damert A, Risau W, Vadas MA, Goodall GJ (1999) Hypoxic regulation of vascular endothelial growth factor mRNA stability requires the cooperation of multiple RNA elements. *Mol Biol Cell.* 10(4):907-19
- Duncan K, Grskovic M, Strein C, Beckmann K, Niggeweg R, Abaza I, Gebauer F, Wilm M, Hentze MW (2006) Sex-Lethal imparts a sex-specific function to UNR by recruiting it to the msl-2 mRNA 3'UTR: Translation repression for dosage compensation. *Genes Dev* 20: 368–379

- Ernoul-Lange M, Bacconnais S, Harper M, Minshall N, Souquere S, Boudier T, Bénard M, Andrey P, Pierron G, Kress M, Standart N, le Cam E, Weil D (2012) Multiple binding of repressed mRNAs by the P-body protein Rck/p54. *RNA*. 18(9):1702-15
- Epstein AC, Gleadle JM, McNeill LA, Hewitson KS, O'Rourke J, Mole DR, Mukherji M, Metzen E, Wilson MI, Dhanda A, Tian YM, Masson N, Hamilton DL, Jaakkola P, Barstead R, Hodgkin J, Maxwell PH, Pugh CW, Schofield CJ, Ratcliffe PJ (2001) *C. elegans* EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation. *Cell*. 107(1):43-54
- Fan XC, Steitz JA (1998) Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J*. 17(12):3448-60
- Feliers D, Lee MJ, Ghosh-Choudhury G, Bomszyk K, Kasinath BS (2007) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K contributes to angiotensin II stimulation of vascular endothelial growth factor mRNA translation. *Am J Physiol Renal Physiol*. 293(2):F607-15
- Fellows A, Griffin ME, Petrella BL, Zhong L, Parvin-Nejad FP, Fava R, Morganelli P, Robey RB, Nichols RC (2012) AUF1/hnRNP D represses expression of **VEGF** in macrophages. *Mol Biol Cell*. 23(8):1414-22
- Fenger-Grøn M, Fillman C, Norrild B, Lykke-Andersen J (2005) Multiple processing body factors and the ARE binding protein TTP activate mRNA decapping. *Mol Cell*. 20(6):905-15
- Ferrara N (2004) Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr. Rev.* 25:581-611
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*. 380(6573):439-42
- Ferrara N und Davis-Smith T (1997) The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr. Rev.* 18:4-25
- Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med*. 9(6):669-76
- Forsythe JA, Jiang B-H, Iyer NV, Agani F, Leung SW, Koos RD, Semenza GL (1996) Activation of vascular endothelial growth factor gene transcription by hypoxia-inducible factor 1. *Mol. Cell. Biol.* 16:4604-4613
- Furuya M, Yonemitsu Y, Aoki I (2009) III. Angiogenesis: complexity of tumor vasculature and microenvironment. *Curr Pharm Des.* 15(16):1854-67



- Galbán S, Kuwano Y, Pullmann R Jr, Martindale JL, Kim HH, Lal A, Abdelmohsen K, Yang X, Dang Y, Liu JO, Lewis SM, Holcik M, Gorospe M (2007) RNA-binding proteins HuR and PTB promote the translation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell Biol.* 28(1):93-107
- García MA, Gil J, Ventoso I, Guerra S, Domingo E, Rivas C, Esteban M (2006) Impact of protein kinase PKR in cell biology: from antiviral to antiproliferative action. *Microbiol Mol Biol Rev.* 70(4):1032-60
- Gardner LB, Corn PG (2008) Hypoxic regulation of mRNA expression. *Cell Cycle.* 7(13):1916-24
- Gebauer F, Hentze MW (2004) Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(10):827-35
- Gerbasi VR, Link AJ (2007) The myotonic dystrophy type 2 protein ZNF9 is part of an ITAF complex that promotes cap-independent translation. *Mol Cell Proteomics.* 6(6):1049-58
- Gerber HP, Hillan KJ, Ryan AM, Kowalski J, Keller GA, Rangell L, Wright BD, Radtke F, Aguet M, Ferrara N. (1999a) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development.* 126(6):1149-59
- Gerber HP, Vu TH, Ryan AM, Kowalski J, Werb Z, Ferrara N (1999b) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med.* 5(6):623-8
- Geyer FC, Rodrigues DN, Weigelt B, Reis-Filho JS (2012) Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. *Adv Anat Pathol.* 19(1):39-53
- Goldberg-Cohen I, Furneaux H, Levy AP (2002) A 40-bp RNA element that mediates stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by HuR. *J Biol Chem.* 277(16):13635-40
- Graven KK, Troxler RF, Kornfeld H, Panchenko MV, Farber HW (1994) Regulation of endothelial cell glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase expression by hypoxia. *J Biol Chem.* 269(39):24446-53
- Grifo JA, Tahara SM, Morgan MA, Shatkin AJ, Merrick WC (1983) New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J Biol Chem.* 258(9):5804-10
- Gross M, Rubino MS, Hessefort SM (1991) The conversion of eIF-2.GDP to eIF-2.GTP by eIF-2B requires Met-tRNA(fMet). *Biochem Biophys Res Commun.* 181(3):1500-7
- Gutschner T (2008) Analyse der Expression von Faktoren, welche die Translation in Tumorzelllinien beeinflussen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N (1995) Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* 14(22):5701-9
- Haghighat A, Sonenberg N (1997) eIF4G dramatically enhances the binding of eIF4E to the mRNA 5'-cap structure. *J Biol Chem.* 272(35):21677-80
- Hamasaki K, Kllian J, Cho J, Rando RR (1998) Minimal RNA constructs that specifically bind aminoglycoside antibiotics with high affinities. *Biochemistry.* 37(2):656-663
- Han SP, Tang YH, Smith R (2010) Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochem J.* 430(3):379-92
- Harding HP, Novoa I, Zhang Y, Zeng H, Wek R, Schapira M, Ron D (2000) Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 6(5):1099-108
- Harnisch C (2010) Analyse der Regulation der Retikulozyten-15-Lipoxygenase-mRNA-Translation durch den 3'UTR-DICE-Komplex. Dissertation. Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Harper SJ, Bates DO (2008) VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat Rev Cancer.* 8(11):880-7
- Hartmuth K, Urlaub H, Vornlocher HP, Will CL, Gentzel M, Wilm M, Lührmann R (2002) Protein composition of human prespliceosomes isolated by a tobramycin affinity-selection method. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(26):16719-24
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev.* 18(16):1926-45
- Hinnebusch AG (2011) Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev.* 75(3):434-67
- Ho QT und Kuo CJ (2007) Vascular endothelial growth factor: Biology and therapeutiv applications. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39(7-8):1349-1357
- Holcik M, Korneluk RG (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(13):4648-57
- Horwitz KB, Costlow ME, McGuire WL (1975) MCF-7; a human breast cancer cell line with estrogen, androgen, progesterone, and glucocorticoid receptors. *Steroids.* 26(6):785-95
- Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem.* 267(36):26031-7

- Hua Z, Lv Q, Ye W, Wong CK, Cai G, Gu D, Ji Y, Zhao C, Wang J, Yang BB, Zhang Y (2006) MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One*. 1:e116
- Huang K, Andersson C, Roomans GM, Ito N, Claesson-Welsh L (2001) Signaling properties of VEGF receptor-1 and -2 homo- and heterodimers. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 33:315-324
- Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O<sub>2</sub>-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 95(14):7987-92
- Huez I, Bornes S, Bresson D, Créancier L, Prats H (2001) New vascular endothelial growth factor isoform generated by internal ribosome entry site-driven CUG translation initiation. *Mol Endocrinol.* 15(12):2197-210
- Huez I, Créancier L, Audigier S, Gensac MC, Prats AC, Prats H (1998) Two independent internal ribosome entry sites are involved in translation initiation of vascular endothelial growth factor mRNA. *Mol Cell Biol.* 18(11):6178-90
- Iizuka M, Yamauchi M, Ando K, Hori N, Furusawa Y, Itsukaichi H, Fukutsu K, Moriya H. (1994) Quantitative RT-PCR assay detecting the transcriptional induction of vascular endothelial growth factor under hypoxia. *Biochem Biophys Res Commun.* 205(2):1474-80
- Ikeda E, Achen MG, Breier G, Risau W (1995) Hypoxia-induced transcriptional activation and increased mRNA stability of vascular endothelial growth factor in C6 glioma cells. *J Biol Chem.* 270(34):19761-6
- Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Lührmann R, Achsel T (2002) The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA.* 8(12):1489-501.
- Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr (2001) HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science.* 292(5516):464-8
- Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, von Kriegsheim A, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (2001) Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science.* 292(5516):468-72
- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(2):113-27
- Jafarifar F, Yao P, Eswarappa SM, Fox PL (2011) Repression of VEGFA by CA-rich element-binding microRNAs is modulated by hnRNP L. *EMBO J.* 30(7):1324-34

- Jan E, Sarnow P (2002) Factorless ribosome assembly on the internal ribosome entry site of cricket paralysis virus. *J Mol Biol.* 324(5):889-902
- Jeske M, Moritz B, Anders A, Wahle E (2011) Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels. *EMBO J.* 30(1):90-103
- Johannes G, Sarnow P (1998) Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites. *RNA.* 4(12):1500-13
- Kajita Y, Nakayama J, Aizawa M, Ishikawa F (1995) The UUAG-specific RNA binding protein, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0. Common modular structure and binding properties of the 2xRBD-Gly family. *J Biol Chem.* 270(38):22167-75
- Kallio PJ, Wilson WJ, O'Brien S, Makino Y, Poellinger L (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J Biol Chem.* 274(10):6519-25
- Karaa ZS, Iacovoni JS, Bastide A, Lacazette E, Touriol C, Prats H (2009) The VEGF IREs are differentially susceptible to translation inhibition by miR-16. *RNA.* 15(2):249-54
- Karatzanis AD, Koudounarakis E, Papadakis I, Velegarakis E (2012) Molecular pathways of lymphangiogenesis and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 269(3):731-7
- Katoh O, Tauchi H, Kawaishi K, Kimura A, Satow Y (1995) Expression of the vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor gene, KDR, in hematopoietic cells and inhibitory effect of VEGF on apoptotic cell death caused by ionizing radiation. *Cancer Res.* 55(23):5687-92
- Keyt BA, Berleau LT, Nguyen HV, Chen H, Heinsohn H, Vandlen R, Ferrara N (1996) The carboxyl-terminal domain (111-165) of vascular endothelial growth factor is critical for its mitogenic potency. *J. Biol. Chem.* 271(13):7788-95
- Kivelä R, Bry M, Robciuc MR, Räsänen M, Taavitsainen M, Silvola JM, Saraste A, Hulmi JJ, Anisimov A, Mäyränpää MI, Lindeman JH, Eklund L, Hellberg S, Hlushchuk R, Zhuang ZW, Simons M, Djonov V, Knuuti J, Mervaala E, Alitalo K (2014) VEGF-B-induced vascular growth leads to metabolic reprogramming and ischemia resistance in the heart. *EMBO Mol Med.* 6(3):307-21
- Koch AE, Harlow LA, Haines GK, Amento EP, Unemori EN, Wong WL, Pope RM, Ferrara N (1994) Vascular endothelial growth factor. A cytokine modulating endothelial function in rheumatoid arthritis. *J Immunol.* 152(8):4149-56
- Koritzinsky M, Seigneuric R, Magagnin MG, van den Beucken T, Lambin P, Wouters BG (2005) The hypoxic proteome is influenced by gene-specific changes in mRNA translation. *Radiother Oncol.* 76(2):177-86

- Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG (2002) Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha. *Mol Cell Biol.* 22(21):7405-16
- Kozak M (1978) How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell.* 15(4):1109-23
- Kozak M (1980) Role of ATP in binding and migration of 40S ribosomal subunits. *Cell.* 22(2 Pt 2):459-67
- Kozak M (2005) A second look at cellular mRNA sequences said to function as internal ribosome entry sites. *Nucleic Acids Res.* 33(20):6593-602
- Knowles HJ, Harris AL (2001) Hypoxia and oxidative stress in breast cancer. Hypoxia and tumourigenesis. *Breast Cancer Res.* 3(5):318-22
- Kramer G, Cimadevilla JM, Hardesty B (1976) Specificity of the protein kinase activity associated with the hemin-controlled repressor of rabbit reticulocyte. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 73(9):3078-82
- Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M (2007) A microRNA signature of hypoxia. *Mol Cell Biol.* 27(5):1859-67
- Lacroix M, Leclercq G (2004) Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update. *Breast Cancer Res Treat.* 83(3):249-89
- Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227(5259):680-685
- Lall S, Piano F, Davis RE (2005) Caenorhabditis elegans decapping proteins: localization and functional analysis of Dcp1, Dcp2, and DcpS during embryogenesis. *Mol Biol Cell.* 16(12):5880-90
- Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (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(37):21975-83
- Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ (2002) Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell.* 13(5):1792-801
- Larsen M, Tazzyman S, Lund EL, Junker N, Lewis CE, Kristjansen PE, Murdoch C (2008) Hypoxia-induced secretion of macrophage migration-inhibitory factor from MCF-7 breast cancer cells is regulated in a hypoxia-inducible factor-independent manner. *Cancer Lett.* 265(2):239-49

- Lawson TG, Lee KA, Maimone MM, Abramson RD, Dever TE, Merrick WC, Thach RE (1989) Dissociation of double-stranded polynucleotide helical structures by eukaryotic initiation factors, as revealed by a novel assay. *Biochemistry*. 28(11):4729-34
- Le SY, Maizel JV Jr (1997) A common RNA structural motif involved in the internal initiation of translation of cellular mRNAs. *Nucleic Acids Res*. 25(2):362-69
- Lee TH, Seng S, Sekine M, Hinton C, Fu Y, Avraham HK, Avraham S (2007) Vascular endothelial growth factor mediates intracrine survival in human breast carcinoma cells through internally expressed VEGFR1/FLT1. *PLoS Med*. 4(6):e186
- Lee HH, Son YJ, Lee WH, Park YW, Chae SW, Cho WJ, Kim YM, Choi HJ, Choi DH, Jung SW, Min YJ, Park SE, Lee BJ, Cha HJ, Park JW (2010) Tristetraprolin regulates expression of VEGF and tumorigenesis in human colon cancer. *Int J Cancer*. 126(8):1817-27
- Lei Z, Li B, Yang Z, Fang H, Zhang GM, Feng ZH, Huang B (2009) Regulation of HIF-1alpha and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration. *PLoS One*. 4(10):e7629
- Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*. 246:1306-1309
- Levin DH, Ranu RS, Ernst V, Fifer MA, London LM (1975) Association of a cyclic AMP-dependent protein kinase with a purified translational inhibitor isolated from hemin-deficient rabbit reticulocyte lysates. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 72(12):4849-53
- Levy AP, Levy NS, Wegner S, Goldberg MA (1995) Transcriptional regulation of the rat vascular endothelial growth factor gene by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 270(22):13333-40
- Levy AP, Levy NS, Goldberg MA (1996a) Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.* 271(5):2746-53
- Levy AP, Levy NS, Goldberg MA (1996b) Hypoxia-inducible protein binding to vascular endothelial growth factor mRNA and its modulation by the von Hippel-Lindau protein. *J Biol Chem*. 271(41):25492-7
- Levy NS, Chung S, Furneaux H, Levy AP (1998) Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J Biol Chem*. 273(11):6417-23
- Li X, Kumar A, Zhang F, Lee C, Tang Z (2012) Complicated life, complicated VEGF-B. *Trends Mol. Med*. 18(2):119-27
- Liang Y, Brekken RA, Hyder SM (2006) Vascular endothelial growth factor induces proliferation of breast cancer cells and inhibits the anti-proliferative activity of anti-hormones. *Endocr Relat Cancer*. 13(3):905-19

- Liao B, Hu Y, Brewer G (2007) Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nat Struct Mol Biol.* 14(6):511-8
- Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC Jr (1994) PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science.* 266(5185):653-6
- Lippman ME, Bolan G (1975) Oestrogen-responsive human breast cancer in long term tissue culture. *Nature.* 256(5518):592-3
- Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC (2006) Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell.* 21(4):521-31
- Liu L, Simon MC (2004) Regulation of transcription and translation by hypoxia. *Cancer Biol. Ther.* 3(6):492-7
- Liu Y, László C, Liu Y, Liu W, Chen X, Evans SC, Wu S (2010) Regulation of G(1) arrest and apoptosis in hypoxia by PERK and GCN2-mediated eIF2alpha phosphorylation. *Neoplasia.* 12(1):61-8
- Livak KJ und Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  Method. *Methods.* 25(4):402-408
- Lu G, Hall TM (2001) Alternate modes of cognate RNA recognition by human PUMILIO proteins. *Structure.* 19(3):361-7
- Lyttle DJ, Fraser KM, Fleming SB, Mercer AA, Robinson AJ (1994) Homologs of vascular endothelial growth factor are encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol.* 68(1):84-92
- Ma AS, Moran-Jones K, Shan J, Munro TP, Snee MJ, Hoek KS, Smith R (2002) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3, a novel RNA trafficking response element-binding protein. *J Biol Chem.* 277(20):18010-20
- Maag D, Fekete CA, Gryczynski Z, Lorsch JR (2005) A conformational change in the eukaryotic translation preinitiation complex and release of eIF1 signal recognition of the start codon. *Mol Cell.* 17(2):265-75
- Maag D, Algire MA, Lorsch JR (2006) Communication between eukaryotic translation initiation factors 5 and 1A within the ribosomal pre-initiation complex plays a role in start site selection. *J Mol Biol.* 356(3):724-37
- Maity A, Sall W, Koch CJ, Oprysko PR, Evans SM (2001) Low pO<sub>2</sub> and beta-estradiol induce VEGF in MCF-7 and MCF-7-5C cells: relationship to in vivo hypoxia. *Breast Cancer Res Treat.* 67(1):51-60
- Majumdar R, Maitra U (2005) Regulation of GTP hydrolysis prior to ribosomal AUG selection during eukaryotic translation initiation. *EMBO J.* 24(21):3737-46

- Manalo DJ, Rowan A, Lavoie T, Natarajan L, Kelly BD, Ye SQ, Garcia JG, Semenza GL (2005) Transcriptional regulation of vascular endothelial cell responses to hypoxia by HIF-1. *Blood*. 105(2):659-69
- Mandriota SJ, Seghezzi G, Vassalli JD, Ferrara N, Wasi S, Mazziere R, Mignatti P, Pepper MS (1995) Vascular endothelial growth factor increases urokinase receptor expression in vascular endothelial cells. *J Biol Chem*. 270(17):9709-16
- Mašek T, Valášek L, Pospíšek M (2011) Polysome analysis and RNA purification from sucrose gradients. *Methods Mol Biol*. 703:293-309
- Masuda K, Abdelmohsen K, Gorospe M (2009) RNA-binding proteins implicated in the hypoxic response. *J Cell Mol Med*. 13(9A):2759-69
- Matsui T, Hogetsu K, Usukura J, Sato T, Kumasaka T, Akao Y, Tanaka N (2006) Structural insight of human DEAD-box protein rck/p54 into its substrate recognition with conformational changes. *Genes Cells*. 11(4):439-52
- Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ (1993) Inducible operation of the erythropoietin 3' enhancer in multiple cell lines: evidence for a widespread oxygen-sensing mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 90(6):2423-7
- Meng Z, Jackson NL, Choi H, King PH, Emanuel PD, Blume SW (2008) Alterations in RNA-binding activities of IRES-regulatory proteins as a mechanism for physiological variability and pathological dysregulation of IGF-IR translational control in human breast tumor cells. *J Cell Physiol*. 217(1):172-83
- Messias AC, Harnisch C, Ostareck-Lederer A, Sattler M, Ostareck DH (2006) The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Mol Biol*. 361(3):470-81
- Mignone F, Gissi C, Liuni S, Pesole G (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol*. 3(3): REVIEWS0004.1-0004.10
- Miller DL, Dibbens JA, Damert A, Risau W, Vadas MA, Goodall GJ (1998) The vascular endothelial growth factor mRNA contains an internal ribosome entry site. *FEBS Lett*. 434(3):417-20
- Minshall N, Kress M, Weil D, Standart N (2009) Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly. *Mol Biol Cell*. 20(9):2464-72.
- Morris MJ, Negishi Y, Pazsint C, Schonhoff JD, Basu S (2010) An RNA G-quadruplex is essential for cap-independent translation initiation in human VEGF IRES. *J Am Chem Soc*. 132(50):17831-9
- Muthukrishnan S, Both GW, Furuichi Y, Shatkin AJ (1975) 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature*. 255(5503):33-7



- Myer VE, Fan XC, Steitz JA (1997) Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J.* 16(8):2130-9
- Myer VE, Steitz JA (1995) Isolation and characterization of a novel, low abundance hnRNP protein: A0. *RNA.* 1(2):171-82
- Naarmann IS, Harnisch C, Flach N, Kremmer E, Kühn H, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2008). mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem.* 283(26):18461-18472
- Naarmann IS, Harnisch C, Müller-Newen G, Urlaub H, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH (2010) DDX6 recruits translational silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA.* 16(11):2189-2204
- Nanda JS, Saini AK, Munoz AM, Hinnebusch AG, Lorsch JR (2013) Coordinated Movements of Eukaryotic Translation Initiation Factors eIF1, eIF1A and eIF5 Trigger Phosphate Release from eIF2 in response to Start Codon Recognition by the Ribosomal Pre-initiation Complex. *J Biol Chem.* 2013 Jan 4. [Epub ahead of print]
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ (1994) A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamid gels. *Biophys Methods.* 28(3):239-242
- Neufeld G, Kessler O, Herzog Y (2002) The interaction of Neuropilin-1 and Neuropilin-2 with tyrosine-kinase receptors for VEGF. *Adv Exp Med Biol.* 515:81-90
- Neve RM, Chin K, Fridlyand J, Yeh J, Baehner FL, Fevr T, Clark L, Bayani N, Coppe JP, Tong F, Speed T, Spellman PT, DeVries S, Lapuk A, Wang NJ, Kuo WL, Stilwell JL, Pinkel D, Albertson DG, Waldman FM, McCormick F, Dickson RB, Johnson MD, Lippman M, Ethier S, Gazdar A, Gray JW (2006) A collection of breast cancer cell lines for the study of functionally distinct cancer subtypes. *Cancer Cell* 10(6):515-27
- Noller HF (1991) Ribosomal RNA and Translation. *Annu Rev Biochem.* 60:191-227
- Nygård O, Westermann P, Hultin T (1980) Met-tRNA-Met-f is located in close proximity to the beta subunit of eIF-2 in the eukaryotic initiation complex, eIF-2 . Met-tRNA-Met-f . GDPCP. *FEBS Lett.* 113(1):125-8
- Onesto C, Berra E, Grépin R, Pagès G (2004) Poly(A)-binding protein-interacting protein 2, a strong regulator of vascular endothelial growth factor mRNA. *J Biol Chem.* 279(33):34217-26
- Ostareck DH, Naarmann-de Vries IS, Ostareck-Lederer A (2014) DDX6 and its orthologs as modulators of cellular and viral RNA expression. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2014 Apr 30. doi: 10.1002/wrna.1237. [Epub ahead of print]

- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*. 89(4):597-606
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Shatsky IN, Hentze MW (2001) Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*. 104(2):281-90
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze MW (2002) c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol*. 22(13):4535-43
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Standart N, Thiele BJ (1994) Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J*. 13(6):1476-81
- Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI (2007) Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: Review. *Blood Cells Mol. Dis*. 38(3): 258-268
- Özeş AR, Feoktistova K, Avanzino BC, Fraser CS (2011) Duplex unwinding and ATPase activities of the DEAD-box helicase eIF4A are coupled by eIF4G and eIF4B. *J Mol Biol*. 412(4):674-87
- Panniers R, Henshaw EC (1983) A GDP/GTP exchange factor essential for eukaryotic initiation factor 2 cycling in Ehrlich ascites tumor cells and its regulation by eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation. *J Biol Chem*. 258(13):7928-34
- Panniers R, Rowlands AG, Henshaw EC (1988) The effect of Mg<sup>2+</sup> and guanine nucleotide exchange factor on the binding of guanine nucleotides to eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem*. 263(12):5519-25
- Papadopoulou C, Patrino-Georgoula M, Guialis A (2010) Extensive association of HuR with hnRNP proteins within immunoselected hnRNP and mRNP complexes. *Biochim Biophys Acta*. 1804(4):692-703
- Paek KY, Kim CS, Park SM, Kim JH, Jang SK (2008) RNA-binding protein hnRNP D modulates internal ribosome entry site-dependent translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol*. 82(24):12082-93
- Papetti und Herman (2002) Mechanism of normal and tumor-derived angiogenesis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 282: C947-C970
- Park JE, Keller GA, Ferrara N (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*. 4(12):1317-26
- Pause A, Sonenberg N (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J*. 11(7):2643-54

- Pause A, Méthot N, Sonenberg N (1993) The HRIGRXXXR region of the DEAD box RNA helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol.* 13(11):6789-98
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC Jr, Sonenberg N (1994) Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature.* 371(6500):762-7
- Pei Y, Zhu P, Dang Y, Wu J, Yang X, Wan B, Liu JO, Yi Q, Yu L (2008). Nuclear export of NF90 to stabilize IL-2 mRNA is mediated by AKT-dependent phosphorylation at Ser<sup>647</sup> in response to CD28 costimulation. *J Immunol.* 180(1):222-229
- Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU (1996) Functional dissection of eukaryotic initiation factor 4F: the 4A subunit and the central domain of the 4G subunit are sufficient to mediate internal entry of 43S preinitiation complexes. *Mol Cell Biol.* 16(12):6870-8
- Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU (1998) Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature.* 394(6696):854-9
- Pestova TV, Kolupaeva VG (2002) The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 2002 Nov 15;16(22):2906-22
- Pestova TV, Kolupaeva VG, Lomakin IB, Pilipenko EV, Shatsky IN, Agol VI, Hellen CU (2001) Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98(13):7029-36
- Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature.* 403(6767):332-5
- Pettersen EO, Juul NO, Rønning OW (1986) Regulation of protein metabolism of human cells during and after acute hypoxia. *Cancer Res.* 46(9):4346-51
- Pidgeon GP, Barr MP, Harmeý JH, Foley DA, Bouchier-Hayes DJ (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF) upregulates BCL-2 and inhibits apoptosis in human and murine mammary adenocarcinoma cells. *Br J Cancer.* 85(2):273-8
- Pisarev AV, Kolupaeva VG, Pisareva VP, Merrick WC, Hellen CU, Pestova TV (2006) Specific functional interactions of nucleotides at key -3 and +4 positions flanking the initiation codon with components of the mammalian 48S translation initiation complex. *Genes Dev.* 20(5):624-36
- Poulin F, Gingras AC, Olsen H, Chevalier S, Sonenberg N (1998) 4E-BP3, a new member of the eukaryotic initiation factor 4E-binding protein family. *J Biol Chem.* 273(22):14002-7
- Price DJ, Miralem T, Jiang S, Steinberg R, Avraham H (2001) Role of vascular endothelial growth factor in the stimulation of cellular invasion and signaling of breast cancer cells. *Cell Growth Differ.* 12(3):129-35

- Qi MY, Wang ZZ, Zhang Z, Shao Q, Zeng A, Li XQ, Li WQ, Wang C, Tian FJ, Li Q, Zou J, Qin YW, Brewer G, Huang S, Jing Q (2012) AU-rich-element-dependent translation repression requires the cooperation of tristetraprolin and RCK/P54. *Mol Cell Biol.* 32(5):913-28
- Raineri I, Wegmueller D, Gross B, Certa U, Moroni C (2004) Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 32(4):1279-88
- Rak J, Mitsuhashi Y, Bayko L, Filmus J, Shirasawa S, Sasazuki T, Kerbel RS (1995) Mutant ras oncogenes upregulate VEGF/VPF expression: implications for induction and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Res.* 55(20):4575-80
- Rakotondrafara AM, Hentze MW (2011) An efficient factor-depleted mammalian in vitro translation system. *Nat Protoc.* 6(5):563-71
- Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg) (2012) Krebs in Deutschland 2007/2008. 8. Ausgabe. Berlin.
- Roberts WK, Hovanessian A, Brown RE, Clemens MJ, Kerr IM (1976) Interferon-mediated protein kinase and low-molecular-weight inhibitor of protein synthesis. *Nature.* 264(5585):477-80
- Rogers GW Jr, Richter NJ, Merrick WC (1999) Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *J Biol Chem.* 274(18):12236-44
- Rosen H, Di Segni G, Kaempfer R (1982) Translational control by messenger RNA competition for eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem.* 257(2):946-52
- Rossbach O, Hung LH, Khrameeva E, Schreiner S, König J, Curk T, Zupan B, Ule J, Gelfand MS, Bindereif A (2014) Crosslinking-immunoprecipitation (iCLIP) analysis reveals global regulatory roles of hnRNP L. *RNA Biol.* 11(2):146-55
- Rousseau S, Morrice N, Peggie M, Campbell DG, Gaestel M, Cohen P (2002) Inhibition of SAPK2a/p38 prevents hnRNP A0 phosphorylation by MAPKAP-K2 and its interaction with cytokine mRNAs. *EMBO J.* 21(23):6505-14
- Rowlands AG, Panniers R, Henshaw EC (1988) The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem.* 263(12):5526-33
- Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N (1990) Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol.* 10(3):1134-44

- Ruas JL, Poellinger L, Pereira T (2002) Functional analysis of hypoxia-inducible factor-1 alpha-mediated transactivation. Identification of amino acid residues critical for transcriptional activation and/or interaction with CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 277(41):38723-30
- Saito M, Hamasaki M, Shibuya M (2003) Induction of tube formation by angiopoietin-1 in endothelial cell/fibroblast co-culture is dependent on endogenous VEGF. *Cancer Sci.* 94(9):782-790
- Saito K, Kondo E, Matsushita M (2011) MicroRNA 130 family regulates the hypoxia response signal through the P-body protein DDX6. *Nucleic Acids Res.* 39(14):6086-99
- Salceda S, Caro J (1997) Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J. Biol. Chem.* 272(36):22642-7
- Sambrook J und Russell DW (2001) Molecular Cloning - A laboratory manual. *CSHL Press.* New York
- 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(15):5795-9
- Sataranatarajan K, Lee MJ, Mariappan MM, Feliers D (2008) PKCdelta regulates the stimulation of vascular endothelial factor mRNA translation by angiotensin II through hnRNP K. *Cell Signal.* 20(5):969-77
- Schueler M, Munschauer M, Gregersen LH, Finzel A, Loewer A, Chen W, Landthaler M, Dieterich C (2014) Differential protein occupancy profiling of the mRNA transcriptome. *Genome Biol.* 15(1):R15 [Epub ahead of print]
- Schumacker PT, Chandel N, Agusti AG (1993) Oxygen conformance of cellular respiration in hepatocytes. *Am. J. Physiol.* 265(4 Pt 1):L395-402.
- Scott RE, White-Grindley E, Ruley HE, Chesler EJ, Williams RW (2005) P2P-R expression is genetically coregulated with components of the translation machinery and with PUM2, a translational repressor that associates with the P2P-R mRNA. *J Cell Physiol.* 204(1):99-105
- Semenza GL, Roth PH, Fang HM, Wang GL (1994) Transcriptional regulation of genes encoding glycolytic enzymes by hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem.* 269(38):23757-63
- Semenza GL (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer.* 3(10):721-32
- Semenza GL (2007) Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE.* (407):cm8

- Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM, Perruzzi CA, Harvey VS, Dvorak HF (1983) Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. *Science*. 219(4587):983-5
- Sephton CF, Cenik C, Kucukural A, Dammer EB, Cenik B, Han Y, Dewey CM, Roth FP, Herz J, Peng J, Moore MJ, Yu G (2011) Identification of neuronal RNA targets of TDP-43-containing ribonucleoprotein complexes. *J Biol Chem*. 286(2):1204-15
- Serman A, Le Roy F, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2007) GW body disassembly triggered by siRNAs independently of their silencing activity. *Nucleic Acids Res*. 35(14):4715-27
- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996) Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem*. 68(5):850-858
- Shih SC, Claffey KP (1998) Hypoxia-mediated regulation of gene expression in mammalian cells. *Int J Exp Pathol*. 79(6):347-57
- Shih SC, Claffey KP (1999) Regulation of human vascular endothelial growth factor mRNA stability in hypoxia by heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L. *J Biol Chem*. 274(3):1359-65
- Shima DT, Deutsch U, D'Amore PA (1995) Hypoxic induction of vascular endothelial growth factor (VEGF) in human epithelial cells is mediated by increases in mRNA stability. *FEBS Lett*. 370(3):203-8
- Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 359(6398):843-5
- Siekierka J, Mitsui KI, Ochoa S (1981) Mode of action of the heme-controlled translational inhibitor: relationship of eukaryotic initiation factor 2-stimulating protein to translation restoring factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78(1):220-3
- Sizova DV, Kolupaeva VG, Pestova TV, Shatsky IN, Hellen CU (1998) Specific interaction of eukaryotic translation initiation factor 3 with the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and classical swine fever virus RNAs. *J Virol*. 72(6):4775-82
- Soker S, Takashima S, Miao HQ, Neufeld G, Klagsbrun M (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*. 92(6):735-45
- Sood R, Porter AC, Olsen DA, Cavener DR, Wek RC (2000a) A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. *Genetics*. 154(2):787-801
- Sood R, Porter AC, Ma K, Quilliam LA, Wek RC (2000b) Pancreatic eukaryotic initiation factor-2alpha kinase (PEK) homologues in humans, *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* that mediate translational control in response to endoplasmic reticulum stress. *Biochem J*. 346 Pt 2:281-93

- Sonenberg N, Rupprecht KM, Hecht SM, Shatkin AJ (1979) Eukaryotic mRNA cap binding protein: purification by affinity chromatography on sepharose-coupled m7GDP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4345-9
- Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lønning PE, Børresen-Dale AL (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98(19):10869-74
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M (1973) A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 51(5):1409-16
- Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E (1998) Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia. *Mol Cell Biol*. 18(6):3112-9
- Stimpfl M, Tong D, Fasching B, Schuster E, Obermair A, Leodolter S, Zeillinger R (2002) Vascular endothelial growth factor splice variants and their prognostic value in breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 8(7):2253-9
- Stoecklin G, Kedersha N (2013) Relationship of GW/P-bodies with stress granules. *Adv Exp Med Biol*. 768:197-211
- Stöhr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH and Hüttelmaier S (2006) ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J. Cell Biol*. 175: 527–534
- Stoneley M, Paulin FE, Le Quesne JP, Chappell SA, Willis AE (1998) C-Myc 5' untranslated region contains an internal ribosome entry segment. *Oncogene*. 16(3):423-8
- Stoneley M, Willis AE (2004) Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression. *Oncogene*. 23(18):3200-7
- Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, Ramaiah KV (2000) Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry*. 39(42):12929-38
- Tahara SM, Morgan MA, Shatkin AJ (1981) Two forms of purified m7G-cap binding protein with different effects on capped mRNA translation in extracts of uninfected and poliovirus-infected HeLa cells. *J Biol Chem*. 256(15):7691-4
- Takahashi T, Ueno H, Shibuya M (1999) VEGF activates protein kinase C-dependent, but Ras-independent Raf-MEK-MAP kinase pathway for DNA synthesis in primary endothelial cells. *Oncogene*. 18(13):2221-30

- Tam BY, Wei K, Rudge JS, Hoffman J, Holash J, Park SK, Yuan J, Hefner C, Chartier C, Lee JS, Jiang S, Nayak NR, Kuypers FA, Ma L, Sundram U, Wu G, Garcia JA, Schrier SL, Maher JJ, Johnson RS, Yancopoulos GD, Mulligan RC, Kuo CJ (2006) VEGF modulates erythropoiesis through regulation of adult hepatic erythropoietin synthesis. *Nat Med.* 2006 Jul;12(7):793-800
- Thoma C, Bergamini G, Galy B, Hundsdoerfer P, Hentze MW.(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(6):925-35
- Thomas JD, Johannes GJ (2007) Identification of mRNAs that continue to associate with polysomes during hypoxia. *RNA.* 13(7):1116-31
- Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA (1991) The human gene for vascular endothelial growth factor. Multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem.* 266(18):11947-54
- Topisirovic I, Siddiqui N, Orolicki S, Skrabanek LA, Tremblay M, Hoang T, Borden KL (2009) Stability of eukaryotic translation initiation factor 4E mRNA is regulated by HuR, and this activity is dysregulated in cancer. *Mol Cell Biol.* 29(5):1152-62
- Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003) The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol.* 160(6):823-31
- Unbehauen A, Borukhov SI, Hellen CU, Pestova TV (2004) Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. *Genes Dev.* 18(24):3078-93
- Unemori EN, Ferrara N, Bauer EA, Amento EP (1992) Vascular endothelial growth factor induces interstitial collagenase expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* 153(3):557-62
- Vaupel P, Kallinowski F, Okunieff P (1989) Blood flow, oxygen and nutrient supply, and metabolic microenvironment of human tumors: a review. *Cancer Res.* 49(23):6449-65
- Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G (1996). Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation.* 93(8):1493-5
- de Vries S, Naarmann-de Vries IS, Urlaub H, Lue H, Bernhagen J, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2013) Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *J Biol Chem.* 288(8):5815-27
- Vumbaca F, Phoenix KN, Rodriguez-Pinto D, Han DK, Claffey KP (2008) Double-stranded RNA-binding protein regulates vascular endothelial growth factor mRNA stability, translation, and breast cancer angiogenesis. *Mol Cell Biol.* 28(2):772-83



- Wagner BJ, DeMaria CT, Sun Y, Wilson GM, Brewer G (1998) Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms. *Genomics*. 48(2):195-202
- Wang Y, Rando RR (1995) Specific interaction of aminoglycoside antibiotics to RNA. *Chem Biol*. 2(5):281-290
- Wang GL, Jiang BH, Rue EA, and Semenza GL(1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92(12): 5510–5514
- Weinlich S, Hüttelmaier S, Schierhorn A, Behrens SE, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH (2009) IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA*. 15(8):1528-42
- Wellmann S, Taube T, Paal K, Graf V, Einsiedel H, Geilen W, Seifert G, Eckert C, Henze G, Seeger K (2001) Specific reverse transcription-PCR quantification of vascular endothelial growth factor (VEGF) splice variants by LightCycler technology. *Clin Chem*. 47(4):654-60
- Weston A, Sommerville J (2006) Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Res*. 34(10):3082-94
- Wheaton WW, Chandel NS (2011) Hypoxia. 2. Hypoxia regulates cellular metabolism. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol*. 300(3):C385-93
- Wicki A, Rochlitz C (2012) Targeted therapies in breast cancer. *Swiss Med Wkly*. 142:w13550
- Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schütz F, Goldstein DR, Piccart M, Delorenzi M (2008) Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res*. 10(4):R65
- Wolin SL, Cedervall T (2002) The La protein. *Annu Rev Biochem*.71:375-403
- Woolard J, Bevan HS, Harper SJ, Bates DO (2009) Molecular diversity of VEGF-A as a regulator of its biological activity. *Microcirculation*. 16:572-59
- Wouters BG, van den Beucken T, Magagnin MG, Koritzinsky M, Fels D, Koumenis C (2005) Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation. *Semin Cell Dev Biol*. 16(4-5):487-501
- Xin H, Brown JA, Gong C, Fan H, Brewer G, Gnarr JR (2012) Association of the von Hippel-Lindau protein with AUF1 and posttranscriptional regulation of VEGFA mRNA. *Mol Cancer Res*. 10(1):108-20

- Yamamoto S, Konishi I, Tsuruta Y, Nanbu K, Mandai M, Kuroda H, Matsushita K, Hamid AA, Yura Y, Mori T (1997) Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) during folliculogenesis and corpus luteum formation in the human ovary. *Gynecol Endocrinol.* 11(6):371-81
- Yamazaki Y, Tokunaga Y, Takani K, Morita T (2005) C-terminal heparin-binding peptide of snake venom VEGF specifically blocks VEGF-stimulated endothelial cell proliferation. *Pathophysiol Haemost Thromb.* 34(4-5):197-9
- Yancopoulos GD, Davis S, Gale NW, Rudge JS, Wiegand SJ, Holash J (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature.* 407(6801):242-8
- Yang S, Xin X, Zlot C, Ingle G, Fuh G, Li B, Moffat B, de Vos AM, Gerritsen ME (2001) Vascular endothelial cell growth factor-driven endothelial tube formation is mediated by vascular endothelial cell growth factor receptor-2, a kinase insert domain-containing receptor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 21(12):1934-40
- Yoshiji H, Gomez DE, Shibuya M, Thorgeirsson UP (1996) Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.* 56(9):2013-6
- Yoshiji H, Harris SR, Thorgeirsson UP (1997) Vascular endothelial growth factor is essential for initial but not continued in vivo growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* 1997 Sep 15;57(18):3924-8
- Zhang HT, Craft P, Scott PA, Ziche M, Weich HA, Harris AL, Bicknell R. (1995) Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 87(3):213-9
- Zhou S, Gu L, He J, Zhang H, Zhou M (2011) MDM2 regulates vascular endothelial growth factor mRNA stabilization in hypoxia. *Mol Cell Biol.* 31(24):4928-37

## 6. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	eIF4E-bindendes Protein
Ang	Angiotensin
APS	Ammoniumpersulfat
ARE	AU-reiches Element ( <i>AU-rich element</i> )
ATP	Adenosintriphosphat
AU	Absorptions-Einheiten ( <i>absorbance units</i> )
AUF1	<i>AU-rich element RNA binding protein 1</i>
bp	Basenpaar
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
cDNA	komplementäre DNA
ctrl.	Kontrolle ( <i>control</i> )
DAPI	4,6-Diamino-2-phenylindol
dd	doppelt destilliert
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DICE	<i>Differentiation control element</i>
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC	Endothelzellen
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
ELISA	<i>enzym-linked immuno-sorbent assay</i>
ER	Östrogen-Rezeptor
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
EZM	extrazelluläre Matrix
FBS	Fötales bovines Serum
<i>f.c.</i>	<i>final concentration</i>
FGF	<i>fibroblastic growth factor</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
fl	Volllänge ( <i>full length</i> )
G3BP1	Ras-GAP-SH3-Domänen-bindendes Protein 1
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor

GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde(n)
H	Hypoxie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HER	humaner epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HRE	<i>hypoxia responsive element</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>horse raddish peroxidase</i> )
HSR	Hypoxie-stabilisierende Region ( <i>hypoxia stabilizing region</i> )
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IDC	invasives Ductus-Karzinom
IL	Interleukin
IRES	<i>internal ribosome entry site</i>
ITAF	IRES-trans-agierender Faktor ( <i>IRES trans acting factor</i> )
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilo-Dalton
KH	hnRNP K-Homologie
Luc	Luciferase
MCF	<i>Michigan cancer foundation</i>
MDM	<i>mouse double minute</i>
Met	Methionin
min	Minute(n)
miR	micro-RNA
MN	<i>Micrococcus</i> Nuklease
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
MRE	<i>microRNA responsive element</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
N	Normoxie
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NF	<i>nuclear factcor</i>
NRP	Neurophilin
nt	Nukleotid
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
pA	poly-Adeninsequenz
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAIP2	Poly(A)-bindendes Protein-interagierendes Protein 2
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCR	Poymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PERK	<i>pancreatic ER eIF2<math>\alpha</math> kinase</i>

PHD	Prolyl-Hydroxylase-Domänen-enthaltendes Protein
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
PKR	dsRNA-aktivierte Protein-Kinase
PIGF	plazentaler Wachstumsfaktor
PPIA	Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase A
PVDF	Polyvinylidendifluorid
qRT-PCR	quantitative RT-PCR
r15-LOX	Retikulocyten-15-Lipoxygenase
RBP	RNA-bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkription-Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat
siRNA	<i>small interfering</i> RNA
SL	Haarnadel-Struktur ( <i>stem loop</i> )
sORF	<i>short</i> ORF
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	<i>Tris-buffered saline with Tween-20</i>
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
Tob	Tobramycin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	<i>transfer</i> RNA
uORF	<i>upstream ORF</i>
UTR	untranslatierter Bereich ( <i>untranslated region</i> )
UV	Ultraviolett
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VEGFR	VEGF-Rezeptor
VHL	von Hippel-Lindau-Protein
VRS	VEGF-regulatorisches Segment ( <i>VEGF regulatory segment</i> )

## Anhang

**Tabelle A.1: Übersicht über die verwendeten Plasmide und deren Klonierung**

Nr.	Bezeichnung	Klonierungsstrategie
1	pVEGF-5'UTR	Die VEGF-5'UTR wurde mit den Oligonukleotiden VEGF-5'UTR vor und VEGF-5'UTR rück mittels PCR aus humaner, genomischer HEK 293 DNA amplifiziert. An den durch die verwendeten Oligonukleotide angefügten Restriktionsstellen wurden mit Hilfe der Restriktions-Enzyme <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i> Überhänge generiert, über die das Amplifikat mit einem ebenfalls <i>KpnI-XhoI</i> -behandeltem pBluescript KS II (+) ligiert wurde.
2	pVEGF-3'UTR	Die VEGF-3'UTR wurde mit den Oligonukleotiden VEGF-3'UTR vor und VEGF-3'UTR rück mittels PCR aus humaner image-Klon-DNA BC065522 amplifiziert. Über die mit Hilfe der Oligonukleotide angefügten <i>PstI</i> -Schnittstellen wurde die humane VEGF-3'UTR in den pBluescript KS II (+) eingebracht.
3	pVEGF-FF	Der Luciferase-ORF aus pT3-Luc (Iizuka <i>et al.</i> 1994) mittels <i>XhoI/BamHI</i> präpariert. pVEGF-5'UTR wurde mit <i>XhoI/PstI</i> verdaut. Vektor und Luciferase-ORF wurden nach Entfernung der Überhänge mittels Klenow-Fragment ligiert. <i>XhoI</i> - und <i>PstI</i> -Schnittstelle blieben erhalten.
4	pVEGF <sub>inv</sub> -FF	Die VEGF-5'UTR wurde via <i>KpnI</i> und <i>XhoI</i> aus pVEGF-5'UTR präpariert und, nach der Entfernung der Überhänge mittels T4-DNA-Polymerase, mit dem identisch behandelten Vektor pT3-Luc (Iizuka <i>et al.</i> 1994) ligiert.
5	pVEGF-FF-p(A)	Der Vektor pVEGF-5'UTR und der Luciferase-ORF inklusive einer A98-Sequenz aus pT3-Luc-p(A) (Iizuka <i>et al.</i> 1994) wurden, wie unter pVEGF-FF beschrieben, präpariert und ligiert. Die <i>PstI</i> -Schnittstelle wurde hierbei zerstört.
6)	pVEGF-3'1	pVEGF-3'UTR wurde mit den Restriktionsenzymen <i>PstI</i> und <i>DraIII</i> sequentiell verdaut. Die Nukleotide 1-582 der VEGF-3'UTR wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt. Die entstandenen Überhänge wurde enzymatisch mittels T4-DNA-Polymerase entfernt und mit dem <i>SmaI</i> -geschnittenen Vektor pBluescript KS II (+) ligiert.
7	pVEGF-3'2	pVEGF-3'UTR wurde mit den Restriktionsenzymen <i>DraIII</i> und <i>BamHI</i> sequentiell verdaut. Die Nukleotide 586-1178 der VEGF-3'UTR wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt. Die entstandenen Überhänge wurde enzymatisch mittels T4-DNA-Polymerase entfernt und mit dem <i>SmaI</i> -geschnittenen Vektor pBluescript KS II (+) ligiert.
8	pVEGF-3'3	pVEGF-3'UTR wurde mit den Restriktionsenzymen <i>BamHI</i> und <i>PstI</i> sequentiell verdaut. Die Nukleotide 1179-1923 der VEGF-3'UTR wurden mittels Gelextraktion aufgereinigt. Das Fragment wurde mit dem <i>BamHI/PstI</i> -geschnittenen Vektor pBluescript KS II (+) ligiert.
9	pVEGF-FF-Kontrolle	Als Kontrolle wurden die Nukleotide 1-600 der humanen c- <i>Src</i> mRNA-3'UTR eingesetzt (Naarmann <i>et al.</i> 2008). Das Fragment wurde nach dem enzymatischen Entfernen der Überhänge mittels T4-DNA-Polymerase in die <i>PstI</i> -Schnittstelle von pVEGF-FF kloniert.
10	pVEGF-FF-3'UTR(fl)	Die VEGF-3'UTR wurde mittels <i>PstI</i> und Gelextraktion aus pVEGF-3'UTR generiert und in die <i>PstI</i> -Schnittstelle von pVEGF-FF ligiert.

Fortsetzung Tabelle A.1

11	pVEGF-FF-3'1	Das Fragment 3'1 wurde mittels <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Behandlung aus pVEGF-3'1 präpariert und nach Beseitigung der Überhänge in die T4-DNA-Polymerase-behandelte <i>Pst</i> I-Schnittstelle von pVEGF-FF ligiert.
12	pVEGF-FF-3'2	Das Fragment 3'2 wurde mittels <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Behandlung aus pVEGF-3'2 präpariert und, nach Beseitigung der Überhänge mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase, mit dem Vektor pVEGF-FF, behandelt wie bei pVEGF-FF-3'1 beschrieben, ligiert.
13	pVEGF-FF-3'3	Das Fragment 3'3 wurde mittels <i>Bam</i> HI/ <i>Pst</i> I-Behandlung aus pVEGF-3'3 präpariert und, nach Beseitigung der Überhänge mit Hilfe der T4-DNA-Polymerase, mit dem Vektor pVEGF-FF, behandelt wie bei pVEGF-FF-3'1 beschrieben, ligiert.
14	pVEGF-FF-3'UTR(fl)-p(A)	In die <i>Not</i> I-Schnittstelle von pVEGF-FF-3'UTR(fl) wurden die Schnittstellen <i>Nco</i> I und <i>Hind</i> III mit Hilfe von DNA-Oligonukleotiden inseriert. Der so generierte Vektor wurde mit <i>Nco</i> I geschnitten und die Überhänge mit Klenow-Fragment entfernt. Ein A98-haltiges DNA-Fragment wurde via <i>Eco</i> RI/ <i>Bam</i> HI präpariert, die Überhänge entfernt und mit dem Vektor ligiert.
15	pVEGF-FF-Kontrolle-p(A)	Die VEGF-3'UTR wurde aus pVEGF-FF-3'UTR via <i>Pst</i> I entfernt. Die Überhänge am Vektor wurden mittels Klenow-Fragment entfernt und der Vektor mit den Nukleotiden 1-600 der humanen c-Src-mRNA-3'UTR ligiert.
16	pVEGF-FF-3'1-p(A)	Der Vektor wurde, wie in pVEGF-FF-Kontrolle-p(A) beschrieben, präpariert. Das VEGF-3'UTR-Fragment 3'1 wurde, wie für pVEGF-FF-3'1 beschrieben, behandelt und mit dem Vektor ligiert.
17	pVEGF-FF-3'2-p(A)	Der Vektor wurde, wie in pVEGF-FF-Kontrolle-p(A) beschrieben, präpariert. Das VEGF-3'UTR-Fragment 3'2 wurde, wie für pVEGF-FF-3'2 beschrieben, behandelt und mit dem Vektor ligiert.
18	pVEGF-FF-3'3-p(A)	Der Vektor wurde, wie in pVEGF-FF-Kontrolle-p(A) beschrieben, präpariert. Das VEGF-3'UTR-Fragment 3'3 wurde, wie für pVEGF-FF-3'3 beschrieben, behandelt und mit dem Vektor ligiert.
19	pRen-VEGF-FF-p(A)	In die <i>Kpn</i> I-Schnittstelle von pVEGF-FF-p(A) wurden je eine <i>Pst</i> I- und <i>Hind</i> III- Restriktionsschnittstellen eingeführt. In diese wurde der PCR-amplifizierte <i>Renilla reniformis</i> -Luciferase-ORF integriert.
20	pSL-Ren-VEGF-FF-p(A)	Basierend auf pRen-VEGF-FF-p(A) wurde in die <i>Pst</i> I-Schnittstelle mittels DNA-Oligonukleotiden eine Haarnadelstruktursequenz (Thoma <i>et al.</i> 2004) eingebracht.
21	pRen-FF-p(A)	Der <i>Renilla reniformis</i> -Luciferase-ORF wurde via <i>Kpn</i> I-Verdau aus pRen-VEGF-FF-p(A) präpariert und mit dem <i>Kpn</i> I-geschnittenen pT3-Luc-p(A)-Vektor ligiert.
22	pSL-Ren -FF-p(A)	Die Haarnadelstruktursequenz und der <i>Renilla reniformis</i> -Luciferase-ORF wurden via <i>Kpn</i> I-Verdau aus pSL-Ren-VEGF-FF-p(A) präpariert und mit dem <i>Kpn</i> I-geschnittenen pT3-Luc-p(A)-Vektor ligiert.
23	pTob-VEGF-5'UTR	Das Tobramycin-Aptamer (J6f1, Hartmuth <i>et al.</i> 2002, Jiang <i>et al.</i> 1998) wurde mittels DNA-Oligonukleotiden in den <i>Kpn</i> I-geschnittenen Vektor pVEGF ligiert.

## Fortsetzung Tabelle A.1

24	pTob-VEGF-3'UTR	Die VEGF-5'UTR wurde mittels <i>XhoI/SpeI</i> -Verdau und Gelextraktion aus pTob-VEGF-5'UTR entfernt. Die VEGF-3'UTR wurde via <i>PstI</i> -Verdau aus pVEGF-3'UTR präpariert. Nach Beseitigung der Überhänge mittels T4-DNA-Polymerase wurde die VEGF-3'UTR mit dem Vektor ligiert.
25	pTob-Kontrolle	Der Vektor wurde wie für pTob-VEGF-3'UTR beschrieben vorbereitet. Das <i>XhoI</i> -Fragment aus pKS-Glob (Naarmann <i>et al.</i> 2013) wurde, nach Beseitigung der Überhänge mittels T4-DNA-Polymerase, mit dem Vektor ligiert.
26	pTob-Kontrolle 2	Die Nukleotide 129 bis 405 der HIF-1 $\alpha$ -5'UTR-Fragment wurden mit den Primern HIF1 $\alpha$ -5'UTR-Fragment hin/rück von MCF-7-cDNA amplifiziert und wie für pTob-VEGF-3'UTR mit dem Vektor ligiert.
27	pTob-VEGF-sORF	In den Vektor pVEGF-5'UTR wurde sukzessive mit Hilfe von synthetisierten DNA-Oligonukleotiden zunächst der kurze ORF (sORF) in <i>XhoI/HindIII</i> und anschließend das Tobramycin-Aptamer (J6f1) in die <i>KpnI</i> -Schnittstelle eingebracht. Die via <i>PstI</i> aus pVEGF-3'UTR präparierte VEGF-3'UTR wurde abschließend in die <i>PstI</i> -Schnittstelle des Vektors integriert.

Zusammengefasst sind die Bezeichnung der Plasmide und die angewandte Klonierungsstrategie. Verwendete Abkürzungen: p (Plasmid), KS (pBluescript KS II +), FF (Glühwürmchen/*Firefly*-Luciferase), p(A) ((A)<sub>98</sub>-Sequenz), CAT (Chloramphenicol-Acetyltransferase), Ren (*Renilla reniformis*-Luciferase), SL (Haarnadelstruktur), sORF (kurzer, artifizieller offener Leserahmen), Tob (Tobramycin-Aptamer, J6f1)



**Tabelle A.2: DNA-Oligonukleotide zur Klonierung**

Name	Orientierung	Sequenz
VEGF-5' UTR	hin	5'-CGGGGTACCAGCGCAGAGGCTTGGGGC-3'
	rück	5'-CGGCTCGAGGGTTTCGGAGGCCCGACCGGG-3'
VEGF-3' UTR	hin	5'-AAAACCTGCAGCAGATGTGACAAGCCGAG-3'
	rück	5'-TTTTCTGCAGAACCAAGAGGAGCTTTGAGAT-3'
<i>Renilla reniformis</i> Luciferase ORF	hin	5'-CGGCTGCAGATGGCTTCGAAAGTTTATGA-3'
	rück	5'-CGGAAGCTTCTAGATAGATCTTTGTTTCATTTT-3'T
Tobramycin- Aptamer	hin	5'-GGTACCGGCTTAGTATAGCGAGGTTTAGCTACACT CGTGCTGAGCCACTGGGCCAGTCTCGAGGGTACC-3'
	rück	5'-CCTCGAGACTGGCCAGTGGCTCAGCACGAGTG TAGCTAAACCTCGCTATACTAAGCCGGTAC-3'
Haarnadelstruktur (SL) mit <i>Pst</i> I- Überhängen	hin	5'-GGGAGCGCCCAGATCTGGGCGCTCCGGCTGCA-3'
	rück	5'-GCCGGAGCGCCCAGATCTGGGCGCTCCCTGCA-3'
sORF	hin	5'-GCTTATGGATTACAAGGATGACGACGATAAGATG ATGATGATGATGTGAA-3'
	rück	5'-GCTTTCACATCATCATCATCATCTTATCGTCC TCATCCTTGTAATCCATA-3'
HIF1 $\alpha$ -5' UTR- Fragment (Galbán <i>et al.</i> 2008)	hin	5'-TCGTCTGAGGGGACAGGA-3'
	rück	5'GGTGAATCGGTCCCCGCTATGT-3'

**Tabelle A.3: DNA-Oligonukleotide zur DNA-Sequenzierung**

Name	Sequenz
T3 -Promoter	5'-AATTAACCCTCACTAAAGGG-3'
T7-Promoter	5'-GTAATACGACTCACTATAGGGCG-3'
Firefly read out seq	5'-GAGGACCTATGATTATGTCCG-3'
Firefly go up seq	5'-CCATCCTCTAGAGGATAGAATGG-3'
VEGF-3'UTR seq 1	5'-ACTCTGGCATGATCTTTT-3'
VEGF-3'UTR seq 2	5'-ACTGCCTGGAAGATTCAG-3'
VEGF-3'UTR seq 3	5'-ATTGTGGAGGCAGCGAAA-3'
VEGF-3'UTR seq 4	5'-CATTCCTTTGAAATAAGG-3'
VEGF-3'UTR seq 5	5'-ATTGGTGCTACTGTTTAT-3'
VEGF-3'UTR read out seq	5'-CACGTCTTTGTCTCTAGTGCAG-3'
Ren read out seq	5'-GCTCGAACTTTACTCTGTC-3'
VEGF-5'UTR read out seq	5'-GCGAGAAGTGCTAGCTCGG-3'
IRES B read out seq	5'-GGCAAAGTGAGTGACCTGCTTTTGGG-3'

**Tabelle A.4: Antikörper für Western blot-Analysen und ELISA**

Antikörper	Spezies	Verdünnung (Diluent)	Hersteller (Ort) Produktnummer
GAPDH	Maus	1/5000 (TBST, 5% Milch)	Abcam (Cambridge UK) 6C5/8245-100
hnRNP K	Maus	1/5000 (TBST, 5% Milch)	Santa Cruz (Heidelberg) Klon D6 – sc28380
hnRNP L	Maus	1/200 (TBST, 5% Milch)	Santa Cruz (Heidelberg) Klon 4D11 – sc32317
HuR	Maus	1/200 (TBST, 5% Milch)	Santa Cruz (Heidelberg) Klon 3A2 – sc5261
AUF-1	Kaninchen	1/1000 (PBST, 5% BSA)	Merck Millipore (USA) 07-260
Vinculin	Maus	1/3000 (TBST, 5% Milch)	Sigma-Aldrich (USA) V9131
HIF-1 $\alpha$	Maus	1/1000 (TBS 0,1% Tween, 5 % BSA)	BD bioscience (Heidelberg) 54/HIF-1 $\alpha$ /610958
Histon H3	Kaninchen	1/2000 (TBST, 5% Milch)	Abcam (Cambridge UK) ab1791
DDX6	Kaninchen	1/5000 (TBST, 5% Milch)	Novus biologicals NB200-191
G3BP1	Maus	1/5000 (TBST, 5% Milch)	Santa Cruz sc-81940
DuoSet-Humanes VEGF	siehe Material und Methoden		R&D Systems (USA) DY293B
Anti-Maus, Sekundär-Antikörper	Schaf	1/5000 (TBST, 5% Milch)	GE Healthcare (USA) NXA931
Anti-Kaninchen, Sekundär-Antikörper	Esel	1/2000 (TBST, 5% Milch)	GE Healthcare (USA) NA934

GAPDH (Glycerin-Aldehyd-3-Phosphatdehydrogenase), hnRNP (heterogenes, nukleäres Ribonukleoprotein), HuR (ELAVL1), AUF-1 (hnRNP D), HIF-1 $\alpha$  (Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 a), DDX6 (DEAD-Box-Helikase 6), G3BP1 (Ras-GTPase-aktivierendes Protein SH3 Domänen-bindendes Protein (G3BP), TBST (Tris-gepufferte Saline mit 0,05% Tween-20), PBST (Phosphat-gepufferte Saline mit 0,05% Tween-20), BSA (Bovines Serumalbumin)

**Tabelle A.5: DNA-Sonden für die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung**

Name	Sequenz
VEGF-mRNA	5' * - TGTAGGAAGCTCATCTCTCCTATGTGCTGG - * 3'
$\beta$ -Aktin-mRNA	5' * - TTTCTCCATGTCGTCGCCAGTTGGTGACGAT - * 3'

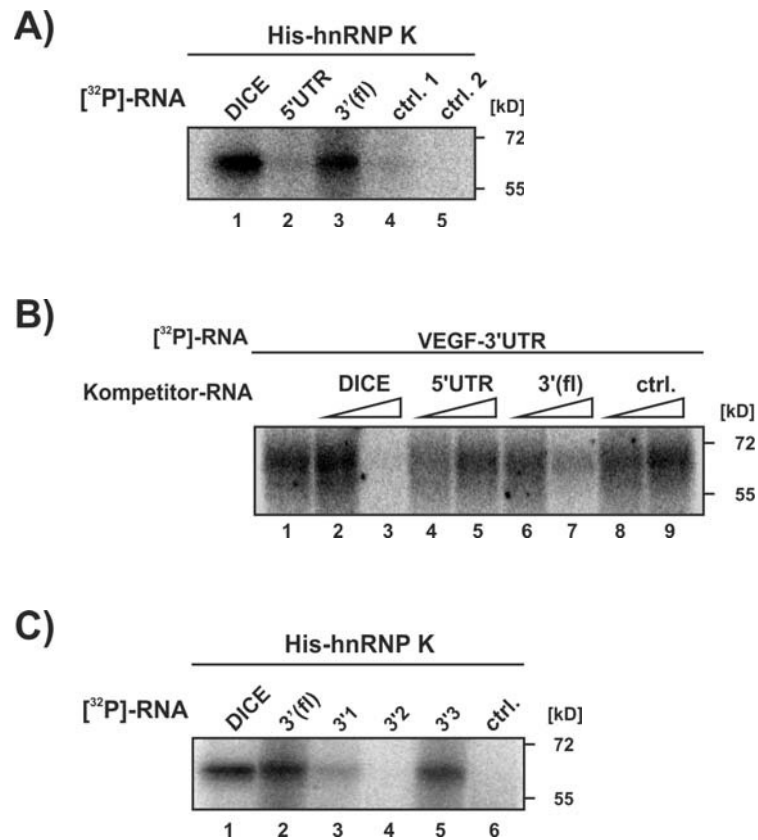
Die am 5'- und 3'-Ende biotinylierten (\*) Desoxyribonukleotide sind komplementär zu Bereichen der VEGF-mRNA (Nukleotide 1380 - 1409) beziehungsweise  $\beta$ -Aktin-mRNA (Nukleotide 307 - 336)

**Tabelle A.6: Antikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen in MCF-7-Zellen.**

Antikörper	Spezies	Verdünnung	Hersteller (Ort)
		(0,2% BSA in PBS)	Produktnummer
rpL19	Ziege	1/400	Santa Cruz (Heidelberg) sc-131342
HIF-1 $\alpha$	Maus	1/50	BD bioscience (Heidelberg) 54/HIF-1 $\alpha$ /610958
Dcp1A	Maus	1/400	Abnova (Taiwan) M06, Klon 3G4
DDX6	Kaninchen	1/400	Novus biologicals (USA) NB200-191
G3BP1	Maus	1/400	Santa Cruz (Heidelberg) sc-81940

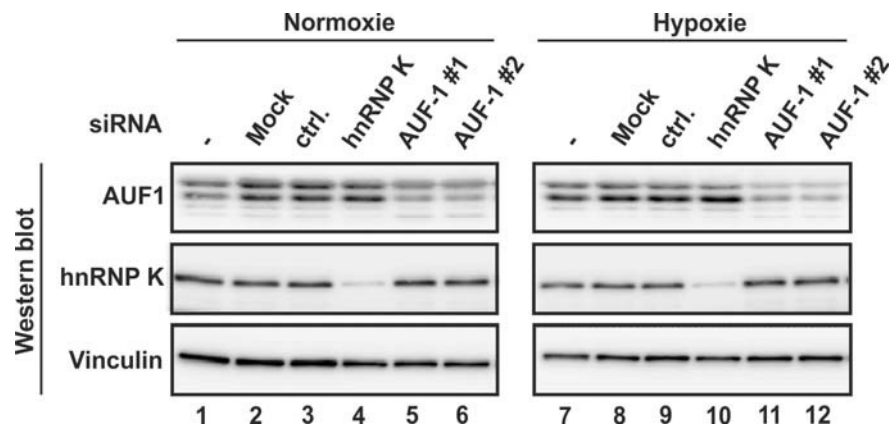
**Tabelle A.7: Sekundärantikörper für Immunfluoreszenz-Färbungen**

Antikörper	Spezies	Fluoreszenz-Markierung	Verdünnung	Hersteller (Ort)
			(0,2% BSA in PBS)	
Anti-Maus	Ziege	FITC	1/200	Dianova (Hamburg)
Anti-Maus	Esel	Cy3	1/800	Dianova (Hamburg)
Anti-Kaninchen	Maus	Cy3	1/400	Dianova (Hamburg)
Anti-Ziege	Esel	Cy5	1/400	Dianova (Hamburg)



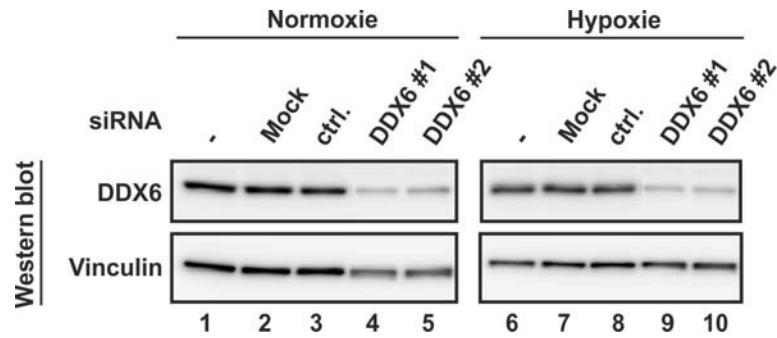
**Abbildung A.1: His-hnRNP K interagiert direkt mit der VEGF-mRNA-3'UTR.**

UV-crosslink-Experimente mit rekombinantem, gereinigtem His-hnRNP K an <sup>32</sup>P-markierten, *in vitro*-transkribierten RNAs. Die Ansätze wurden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach UV-induzierter Verknüpfung der RNA-Protein-Komplexe wurden die RNAs mit Hilfe von RNasen degradiert. Anschließend wurden die Ansätze mittels SDS-PAGE getrennt und autoradiographisch ausgewertet. A) UV-crosslink-Experimente mit rekombinantem, gereinigtem His-hnRNP K an <sup>32</sup>P-markierten, *in vitro*-transkribierten RNAs. B) <sup>32</sup>P-markierte VEGF-3'UTR wurde mit His-hnRNP K in Anwesenheit von unmarkierten RNAs inkubiert. C) <sup>32</sup>P-markierte Fragmente der VEGF-3'UTR wurden mit His-hnRNP K inkubiert. DICE (differentiation control element der r15-Lox-mRNA-3'UTR), 5'UTR (VEGF-5'UTR), 3'(fl) (VEGF-3'UTR), ctrl.1 (c-Src-3'UTR, Nukleotide 1-600), ctrl.2 (Globin 5'UTR-Fragment), 3'1 (Nukleotide 1-582), 3'2 (Nukleotide 586-1178), 3'3 (Nukleotide 1179-1923)



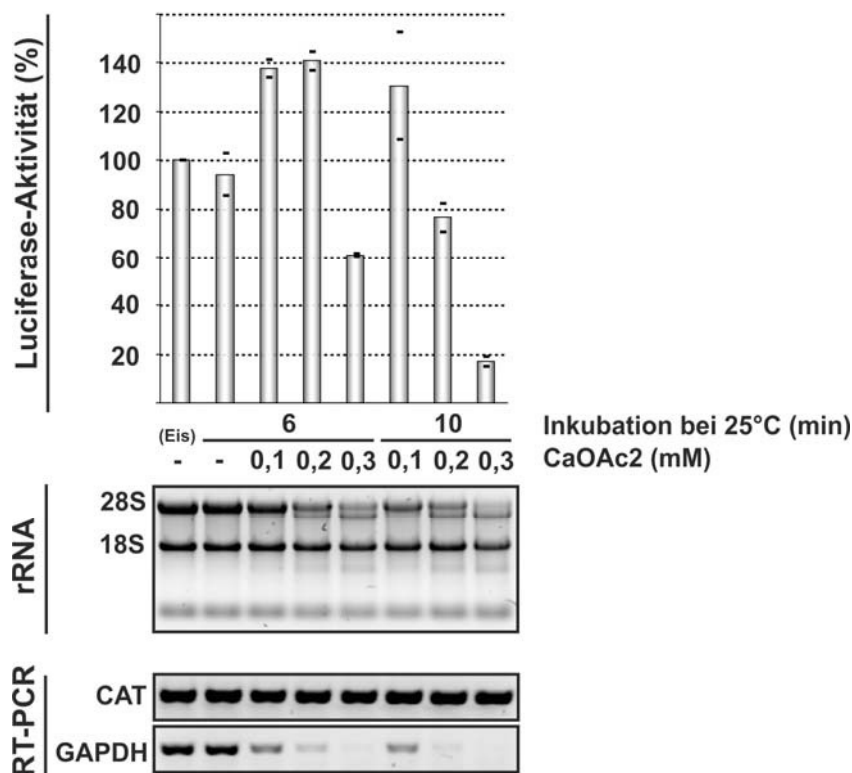
**Abbildung A.2: Nachweis von hnRNP K- und AUF-1 knock down mittels Western blot.**

Der siRNA-vermittelte knock down von hnRNP K und AUF-1 wurde mittels Western blot aus normoxischen und hypoxischen Tritonlysaten 72h nach Transfektion erfasst (10µg/Spur). – (nicht-transfiziert), Mock (Transfektion ohne siRNA), ctrl. (Transfektion mit einer Kontroll-siRNA), hnRNP K (Transfektion mit einem siRNA-Mix bestehend aus 3 siRNAs gegen hnRNP K), AUF-1 #1/#2 (Transfektion mit siRNAs 1 und 2 gegen AUF-1). Nachweis von Vinculin als Ladekontrolle.



**Abbildung A.3: Nachweis des DDX6-knock downs mittels Western blot.**

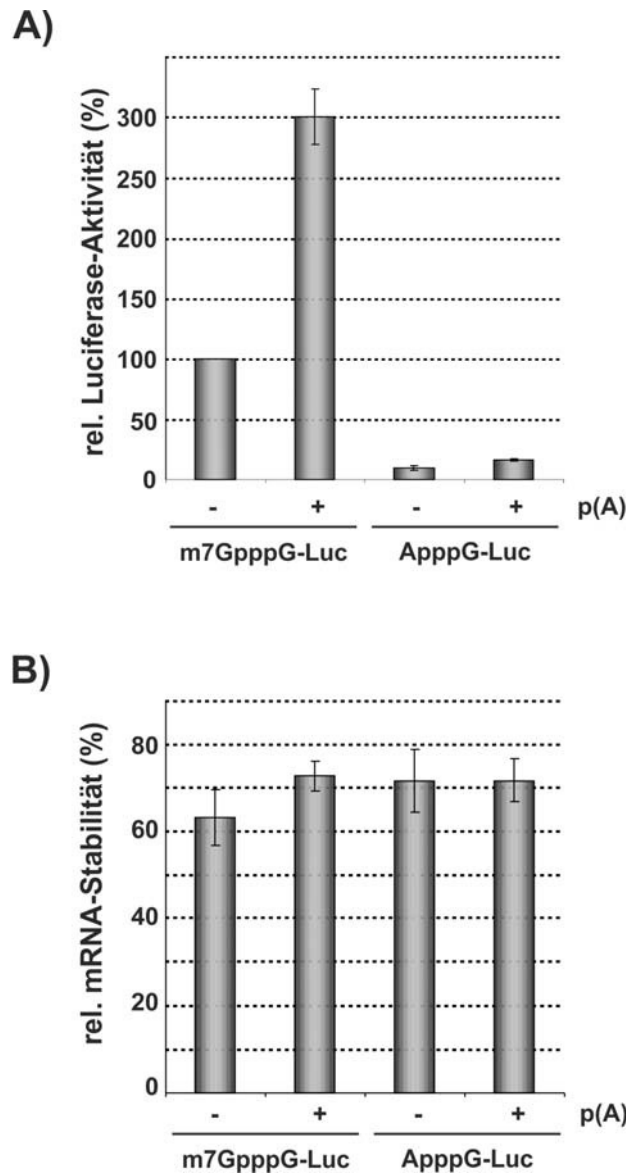
Der siRNA-vermittelte knock down von DDX6 wurde mittels Western blot aus normoxischen und hypoxischen Tritonlysaten 72h nach Transfektion erfasst (10µg/Spur). - (nicht-transfiziert), Mock (Transfektion ohne siRNA), ctrl. (Transfektion mit einer Kontroll-siRNA), DDX6 #1/#2 (Transfektion mit siRNAs 1 und 2 gegen DDX6). Nachweis von Vinculin als Ladekontrolle.



**Abbildung A.4: Etablierung der *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung von translationskompetenten, cytoplasmatischen MCF-7-Zell-Extrakten.**

Cytoplasmatische MCF-7-Zell-Extrakte wurden für 6 beziehungsweise 10 Minuten mit 0,4U *Micrococcus*-Nuklease (MN) pro 60 $\mu$ g (bezüglich Gesamtprotein) Zellextrakt mit ansteigenden Calcium-Acetat-Konzentrationen bei 25°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von EGTA (Endkonzentration war die jeweilige zweifache Calcium-Acetat-Konzentration) und Überführen auf Eis gestoppt. Die MN-behandelten Extrakte wurden anschließend für die *in vitro*-Translation einer 5'Cap-FF-Luciferase-p(A)-Reporter-RNA verwendet (siehe Material und Methoden, Abschnitt 2.9) beziehungsweise mittels Agarosegelelektrophorese die zuvor präparierte Gesamt-RNA (28S und 18S-rRNA) analysiert. Die Darstellung der Translationsaktivität erfolgte relativ zum unbehandelten Extrakt (Eis). Die Stabilität der GAPDH-mRNA wurde mittels RT-PCR erfasst. Vor der RNA-Extraktion wurde *in vitro*-transkribierte CAT-RNA als exogene Kontrolle zugegeben.





**Abbildung A.5: Einfluss der 5'Cap-Struktur auf die *in vitro*-Translation von Reporter-RNAs in *Micrococcus*-Nuklease-behandeltem, cytoplasmatischem MCF-7-Zellextrakt**

*Micrococcus*-Nuklease (MN)-Behandlung, *in vitro*-Translation und qRT-PCR erfolgten wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben. A) Die *in vitro*-Translation von 5'-m<sup>7</sup>GpppG- beziehungsweise ApppG-gecappten Reporter-RNAs mit und ohne poly(A)-Schwanz in MN-behandelten MCF-7-Zellextrakten wurde verglichen. Die Darstellung der Translations-Daten erfolgte relativ zu m<sup>7</sup>GpppG-gecappten Reporter-RNA ohne p(A)-Schwanz. B) Bestimmung der relativen RNA-Stabilitäten (%) aus den in A) gezeigten *in vitro*-Translationsreaktionen. Die Normalisierung erfolgte auf die exogene Kontroll-RNA CAT, welche unmittelbar vor der RNA-Extraktion zugegeben wurde. Die *in vitro*-Transkription erfolgte von den Plasmiden pT3-Luc und pT3-Luc-pA (Iizuka *et al.* 1994) nach Linearisierung mit *Bam*HI wie im Abschnitt Material und Methoden beschrieben.

# Lebenslauf

## Persönliche Daten

Name: Sebastian de Vries  
Geburtsdatum: 13.02.1981  
Geburtsort: Norden  
Familienstand: Verheiratet, 2 Kinder

## Werdegang

bis 06/2000 Niedersächsisches Internatsgymnasium Esens  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

09/2001 - 08/2007 Biochemie-Studium an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,  
Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Biotechnologie,  
Abteilung Mikrobielle Biotechnologie, Prof. Dr. S.-E. Behrens  
„Renaturierung der humanen RNA-Helikase A aus *inclusion bodies*“  
Abschluss: Diplom-Biochemiker

09/2007 - 06/2012 Doktorand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. A. Ostareck-Lederer  
und PD Dr. D.H. Ostareck

09/2007 - 06/2009 Institut für Biochemie und Biotechnologie an der  
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

07/2009 - 06/2012 Experimentelle Arbeitsgruppe Intensivmedizin  
der Klinik für Operative Intensivmedizin und  
Intermediate Care der Uniklinik RWTH Aachen

06/2011 - 07/2011 Elternzeit

06/2012 – 01/2013 Arbeitssuchend

seit 02/2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Fraunhofer Institut für  
Molekularbiologie und Angewandte Ökologie in Aachen,  
Abteilung Industrielle Biotechnologie, Dr. S. Jennewein

# **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe und keine anderen außer den angegebenen Quellen und Hilfsmitteln verwendet habe. Textstellen, die wörtlich oder inhaltlich aus veröffentlichten Schriften entnommen wurden, sind als solche gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt wurde und ich mich zu keinem anderen Zeitpunkt an dieser Universität oder einer anderen Einrichtung um die Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Sebastian de Vries

Herzogenrath, den 27.06.2014

## **Publikationen**

de Vries S (2007) Renaturierung der humanen RNA-Helikase A aus *inclusion bodies*. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

de Vries S, Naarmann-de Vries IS, Urlaub H, Lue H, Bernhagen J, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2013) Identification of DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) as a cellular modulator of vascular endothelial growth factor expression under hypoxia. *J Biol Chem.* 288(8):5815-27.

# Danksagung

Bei Prof. Dr. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk Ostareck möchte ich mich für die Möglichkeit zur Bearbeitung dieser spannenden Thematik bedanken. Des Weiteren bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Bewältigung des Projektes sowie der Förderung meiner persönlichen und wissenschaftlichen Kompetenzen.

Weiterhin bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern der Experimentellen Arbeitsgruppe Intensivmedizin an der Uniklinik der RWHT Aachen für die stets freundschaftliche Arbeitsatmosphäre und Zusammenarbeit. Prof. Dr. Gernot Marx danke ich für die freundliche Aufnahme in sein Team und die Unterstützung. Mein Dank gilt zudem Nadine Simons für die technische Unterstützung.

Der Abteilung Allgemeine Biochemie (Institut für Biochemie und Biotechnologie, MLU Halle-Wittenberg) danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die konstruktiven Diskussionen. Nadine Flach danke ich für die technische Unterstützung.

Bei Prof. Dr. Henning Urlaub und seiner Arbeitsgruppe am MPI für Biophysikalische Chemie in Göttingen bedanke ich mich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse.

Dr. Hongqi Lue danke ich für die Durchführung der *Tube formation assays*.

Bei Dr. Mersedeh Tohidnezhad bedanke ich mich für die Hilfsbereitschaft bei den VEGF-ELISA-Messungen.

Dr. Isabel Naarmann-de Vries danke ich für die Erstellung der immunfluoreszenz-mikroskopischen Aufnahmen. Von Herzen dankbar bin ich für ihre Geduld und für die aufmunternden und manchmal antreibenden Worte.

Meinen Jungs Lukas und Philipp danke ich für die moralische Unterstützung.

Meiner Familie bin ich dankbar für die Unterstützung während meines Studiums, der Promotion und darüber hinaus.

## Identification of DEAD-box RNA Helicase 6 (DDX6) as a Cellular Modulator of Vascular Endothelial Growth Factor Expression under Hypoxia

Sebastian de Vries, Isabel S. Naarmann-de Vries, Henning Urlaub, Hongqi Lue, Jürgen Bernhagen, Dirk H. Ostareck, and Antje Ostareck-Lederer

Vascular endothelial growth factor A (VEGF) is a crucial proangiogenic factor, which regulates blood vessel supply under physiologic and pathologic conditions. The VEGF mRNA 5'-untranslated region (5'-UTR) bears internal ribosome entry sites (IRES), which confer sustained VEGF mRNA translation under hypoxia when 5'-cap-dependent mRNA translation is inhibited. VEGF IRES-mediated initiation of translation requires the modulated interaction of *trans*-acting factors. To identify *trans*-acting factors that control VEGF mRNA translation under hypoxic conditions we established an *in vitro* translation system based on human adenocarcinoma cells (MCF-7). Cytoplasmic extracts of MCF-7 cells grown under hypoxia (1% oxygen) recapitulate VEGF IRES-mediated reporter mRNA translation. Employing the VEGF mRNA 5'-UTR and 3'-UTR in an RNA affinity approach we isolated interacting proteins from translational active MCF-7 extract prepared from cells grown under normoxia or hypoxia. Interestingly, mass spectrometry analysis identified the DEAD-box RNA helicase 6 (DDX6) that interacts with the VEGF mRNA 5'-UTR. Recombinant DDX6 inhibits VEGF IRES-mediated translation in normoxic MCF-7 extract. Under hypoxia the level of DDX6 declines, and its interaction with VEGF mRNA is diminished *in vivo*. Depletion of DDX6 by RNAi further promotes VEGF expression in MCF-7 cells. Increased secretion of VEGF from DDX6 knockdown cells positively affects vascular tube formation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) *in vitro*. Our results indicate that the decrease of DDX6 under hypoxia contributes to the activation of VEGF expression and promotes its proangiogenic function.

"This research was originally published in The Journal of Biological Chemistry.

Sebastian de Vries, Isabel S. Naarmann-de Vries, Henning Urlaub, Hongqi Lue, Jürgen Bernhagen, Dirk H. Ostareck, and Antje Ostareck-Lederer. Identification of DEAD-box RNA Helicase 6 (DDX6) as a Cellular Modulator of Vascular Endothelial Growth Factor Expression under Hypoxia. *J Biol Chem.* 2013; 288(8):5815-27. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology."

<http://www.jbc.org/content/288/8/5815.full.pdf>