

Argininmethyliertes hnRNP K - Synthese und kombinatorische Multidomänen-Nukleinsäure-Assoziation

Dissertation

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

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Herrn Bodo Moritz

geb. am 10.09.1980 in Freiberg

Gutachter

1. Prof. Dr. Antje Ostareck-Lederer
2. PD. Dr. Hauke Lilie
3. Prof. Dr. Michael Sattler

Halle (Saale), 19. Dezember 2014

Für meine Oma Jutta Moritz.

1	Einleitung	4
1.1	Vorwort.....	4
1.2	Die Entdeckung von hnRNP K.....	5
1.2.1	Strukturdeterminanten von hnRNP K.....	6
1.3	Zelluläre Bedeutungen von hnRNP K.....	8
1.3.1	Nukleäre Funktionen - hnRNP K als Regulator der Transkription.....	8
1.3.2	HnRNP K als Protoonkogen in der p53-vermittelten Stressantwort.....	9
1.3.3	Nukleäre Funktionen - hnRNP K als Regulator von kodierenden und nichtkodierenden Primärtranskripten.....	10
1.3.4	Zytoplasmatische Funktionen.....	11
1.3.5	Zytoplasmatische Funktionen - Translationsregulation der r15-LOX-mRNA.....	11
1.3.6	Posttranskriptionelle Regulation von Zytoskelett-mRNAs in <i>Xenopus laevis</i>	13
1.4	Posttranslationale Modifikationen von hnRNP K.....	14
1.4.1	Serin-Phosphorylierung durch MAP-Kinasen.....	14
1.4.2	Die Tyrosinkinase c-Src - von der Tertiärstruktur zum Mechanismus der Regulation.....	14
1.4.3	Die c-Src katalysierte Tyrosinphosphorylierung von hnRNP K mindert dessen RNA-Affinität...	17
1.5	Argininmethylierung von hnRNP K.....	18
1.5.1	Protein-Arginin-Methyltransferasen - determinierte Produkte in promiskuitiven Substraten.....	18
1.6	Die funktionale Bedeutung der Argininmethylierung.....	20
1.6.1	PRMT-Substratsequenzen und die putative Nukleinsäureinteraktion.....	21
1.6.2	Argininmethylierung verändert die Lokalisation einiger hnRNPs.....	21
1.6.3	Methylierte Arginine in prolinreichen Interaktionssequenzen.....	23
1.6.4	Symmetrische Argininmethylierung fördert die Wechselwirkung mit der Tudor-Domäne.....	24
1.7	Transkriptionelle Regulation durch Argininmethylierung.....	25
1.8	Ziel.....	25
2	Ergebnisse	26
2.1	Intrazelluläre Lokalisation von hnRNP K in Abhängigkeit der Argininmethylierung.....	26
2.1.1	Lokalisation von hnRNP K in ES-Zellen.....	26
2.1.2	Lokalisation von hnRNP K in HeLa-Zellen.....	28
2.1.3	Argininmethylierung und Serinphosphorylierung von hnRNP K in HEK-Zellen.....	30
2.2	Reinigung endogenen hnRNP Ks aus ES ^{+/+} und ES ^{-/-} Zellextrakten.....	31
2.2.1	Bindungsstudien mit den aus ES-Zellen gereinigten hnRNP K-Fractionen.....	33
2.3	Präparation von rekombinatem und methyliertem hnRNP K.....	35
2.3.1	Analyse des Methylierungsstatus des rekombinanten hnRNP K.....	38
2.3.2	Reinigung von hnRNP K aus <i>E. coli</i>	39
2.3.3	Ultrazentrifugation zur Bestimmung der nativen Molmasse.....	45
2.4	Interaktionsstudien.....	47
2.4.1	Interaktion des hnRNP K mit Nukleinsäuren.....	47
2.4.2	Bindung mehrerer Proteine an das 2R-Sequenzelement.....	51
2.4.3	Die Sequenzabhängigkeit der Assoziation von hnRNP K mit Oligo-Tetracytidylat- Substraten ..	53
2.4.4	Interpretation der hnRNP K-Oligo(C ₄)-Liganden-Interaktion: der <i>K-combination mode</i>	58
2.4.5	Kinetische Untersuchung der Nukleinsäurebindung.....	61
2.5	Proteininteraktionen.....	63
2.5.1	Interaktion von hnRNP K und hnRNP E1.....	63
2.5.2	Autoaktivierung von c-Src.....	65
2.5.3	Identifizierung methylierungsspezifischer hnRNP K-Interaktionspartner.....	75
3	Zusammenfassung und Diskussion	78
3.1	Die Argininmethylierung von hnRNP K hat keinen Einfluss auf dessen Lokalisation	78
3.2	Präparation und physiko-chemische Eigenschaften von hnRNP K.....	79

3.2.1	Herstellung von Arginin-methyliertem hnRNP K in <i>E. coli</i>	79
3.2.2	Reinigung und physiko-chemische Charakterisierung von hnRNP K.....	81
3.3	Wechselwirkung von hnRNP K mit cytidylatreichen RNAs	83
3.3.1	Sequenzabhängigkeit der hnRNP K-Nukleinsäure-Wechselwirkung und der <i>K-combination mode</i>	86
3.4	Die Autoaktivierung von c-Src - vom Modell zur Beobachtung.....	89
3.4.1	Wechselwirkung von hnRNP K und c-Src	90
3.5	Putative Wechselwirkungspartner	92
3.6	Ausblick	93
4	Material und Methoden.....	94
4.1	Zellbiologische Methoden.....	94
4.2	Molekularbiologische Methoden	95
4.2.1	PCR	96
4.2.2	Klonierung und Herkunft der verwendeten Plasmide.....	96
4.2.3	RNA-chemische Methoden	98
4.3	Proteinchemische Methoden.....	98
4.3.1	Western Blot.....	98
4.3.2	Selektion von Methylarginin-spezifischen Antikörpern	99
4.3.3	Präparation von Zell-Lysaten	100
4.3.4	Extraktpräparation aus K562-Zellen.....	100
4.3.5	Filter-Bindungsexperiment	101
4.3.6	In-vitro-Methylierungstest	101
4.3.7	In-vitro-Phosphorylierungstest mit Δ_{83} c-Src.....	101
4.3.8	Analyse des Phosphorylierungsstatus von Δ_{83} c-Src ^{PY527} und Δ_{83} c-Src ^{PTPN2}	102
4.4	Proteinreinigung	103
4.4.1	Reinigung von hnRNP K aus ES-Extrakten	104
4.4.2	Expression im Erlenmeyerkolben.....	106
4.4.3	Fermentation.....	107
4.4.4	Präparation von rekombinantem hnRNP K und Met ^h hnRNP K.....	108
4.4.5	Präparation von hnRNP E1	109
4.4.6	SUMO-Spaltung	111
4.4.7	Präparation von Ulp1p; Sumo-Protease.....	111
4.4.8	Präparation der WW ^{FBP21} -Domäne	111
4.4.9	Präparation der KH3-Domäne	112
4.4.10	Präparation der SH3 ^{p85} -Domäne	113
4.4.11	Präparation von Δ_{83} c-Src ^{PY527}	113
4.4.12	Präparation von Δ_{83} c-Src ^{PTPN2}	114
4.4.13	Präparation von PTPN2	114
4.5	Ultrazentrifugation	115
4.6	Fluorometrische Methoden.....	116
4.6.1	Lichtstreuexperimente	116
4.6.2	Intrinsische Proteinfluoreszenz.....	116
4.6.3	Fluoreszenzmessungen mit Fluorophor-gekoppelten Nukleinsäuren	117
4.6.4	Kompetitionsexperimente.....	117
4.7	Modell einer einfachen Autokatalyse	117
4.8	Sequenzielle Gleichgewichtsreaktion	120
4.9	Kombinatorik.....	125
4.10	Abkürzungen.....	128
5	Literatur	131
6	Anhang.....	147

1 Einleitung

1.1 Vorwort

Proteine sind in jedem lebenden Organismus die entscheidenden Funktionsträger sowohl für die Ausprägung der genetischen Information als auch für die Aufrechterhaltung der metabolischen Homöostase. Keine 60 Jahre nach der Entdeckung der DNA-Struktur ist es gelungen, das humane Genom zu entschlüsseln (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001) und die Gesamtheit der proteinkodierenden Sequenzen (*open reading frame*, ORF) vorherzusagen. So ist die Anzahl der humanen ORFs mit nur ca. 20 000 in etwa so groß wie die Anzahl ORFs deutlich einfacher aufgebauter Organismen wie dem Fadenwurm (~19 000 ORFs) oder dem Seeigel (~23 000 ORFs) (Pheasant und Mattick, 2007). Das bedeutet, die Art und die Anzahl der exprimierten Proteine gibt kaum Aufschluss über die ontogenetische Entwicklung eines Organismus. Darüber hinaus ist die Polypeptidsequenz allein nicht ausreichend, um hinreichende Vorhersagen zu der Funktion eines Proteins zu treffen. Darum wird für ein nachhaltiges, fundiertes Verständnis biologischer Prozesse und der daran ursächlich beteiligten Proteine nur das Alternieren zwischen globaler und molekularer Analyse den angestrebten Zuwachs an Einsicht in funktionale Zusammenhänge ermöglichen.

Neben den proteinkodierenden Transkripten wird eine Vielzahl weiterer RNAs synthetisiert. Nur ein geringer Teil davon ist selbst katalytisch aktiv oder für sich genommen funktional, wie zB. selbst spleißende Introns (Zaug und Cech, 1986), die Proteinsynthese katalysierende rRNA (Nissen *et al.*, 2000) oder Aptamer-RNAs, die auf veränderte Metabolitkonzentrationen reagieren können (Serganov und Nudler, 2013; Winkler *et al.*, 2002). Der überwiegende Teil des Transkriptoms, der nicht unmittelbar an der Translation beteiligt ist (weit mehr als 50% (Cheng *et al.*, 2005)), prägt erst durch die Assoziation mit Proteinen seinen funktionalen Zweck aus. So werden micro- oder siRNAs erst durch die Assoziation an Argonaut-Proteine zu Regulatoren der Genexpression (Fire *et al.*, 1998); (Huntzinger und Izaurralde, 2011) oder *small nucleolar RNAs* (snoRNAs) erst innerhalb eines Ribonukleo-Proteinkomplexes zu wichtigen Funktionsträgern in der Ribosomenbiosynthese (Watkins und Bohnsack, 2012). Die Assoziation von Proteinen mit RNA kann entweder durch die Struktur der RNA determiniert werden oder sequenzabhängig stattfinden.

Die Wechselwirkung von sequenzspezifisch bindenden Proteinen mit RNA wird häufig durch spezielle Strukturelemente innerhalb des Proteins, so genannter RNA-Bindemotive, vermittelt (Clery *et al.*, 2008). Nicht selten beinhaltet ein typisches RNA-Bindeprotein mehrere RNA-Bindemotive, die die Spezifität und Affinität des Proteins zur RNA erhöhen (Lunde *et al.*, 2007). Weil die Erkennung von wenigen Nukleotiden bereits eine moderate Affinität für die meisten RNA-bindende Proteine vermittelt, können oft mehrere Proteine mit einem RNA-Molekül assoziieren. Die große Anzahl an

verschiedenen RNA-bindenden Proteinen ermöglicht eine komplexe Regulation der Genexpression und stellt damit RNA bindende Proteine ins Zentrum der Regelkreisläufe biochemischer und zellbiologischer Prozesse.

Die vorgelegte Arbeit hat das Ziel, das Wissen um das RNA-bindende Protein hnRNP K zu vertiefen und vorhandene Befunde durch neue Erkenntnisse und experimentelle Ansätze zu überprüfen. Im Zentrum der Arbeit stand dabei, die Bedeutung der Argininmethylierung von hnRNP K zu untersuchen und deren mögliche physiologische Notwendigkeit zu identifizieren.

1.2 Die Entdeckung von hnRNP K

HnRNP K wurde als heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (hnRNP) zusammen mit mindestens 20 anderen hnRNA bindenden hnRNPs bei der Fraktionierung von Nukleoplasma identifiziert (Pinol-Roma *et al.*, 1988; Swanson und Dreyfuss, 1988). Die Assoziation von hnRNPs mit hnRNA führt zur Ausbildung von sequenzabhängig unterschiedlich zusammengesetzten hnRNP-Komplexen, die vermutlich frühe Vorstufen der Spleißing-Machinerie darstellen (Bennett *et al.*, 1992). Allen hnRNPs ist die intrinsische Eigenschaft der Nukleinsäurebindung gemeinsam. Die meisten hnRNPs besitzen eine oder mehrere klassische Nukleinsäure-Bindemotive, wie z. B. das *RNA recognition motif* (RRM) (Daubner *et al.*, 2013), die sequenzabhängige Assoziationen mit Nukleinsäuren ermöglichen (Swanson und Dreyfuss, 1988). Die Untersuchung der Sequenzspezifität von hnRNP K mittels Homo-DNA-Oligonukleotiden zeigte eine starke Präferenz für Poly-(dC) (Matunis *et al.*, 1992). Der Aminosäure-Sequenzvergleich von hnRNP K aus *H. sapiens* mit dem aus *X. laevis* führte zur Identifizierung der hnRNP K-Homologie-Domäne (KH-Domäne) (Siomi *et al.*, 1993). KH-Domänen sind stark konservierte Domänen, die sich in nahezu allen Eukaryoten, und leicht verändert auch in Prokaryonten, vor allem in RNA-bindenden Proteinen nachweisen lassen (Valverde *et al.*, 2008). In hnRNP K sind drei KH-Domänen mit unterschiedlichem Sequenzabstand enthalten (Abb. 1-1). Die strukturverwandten Tripel-KH-Domänen-Proteine hnRNP E1 und hnRNP E2, welche auch zu den Poly(C)-bindenden Proteinen gehören, unterscheiden sich hauptsächlich in der Proteinsequenz zwischen den KH-Domänen von hnRNP K. Tripel-KH-Domänen-Proteine sind konserviert und lassen sich auch in Hefe finden (Valverde *et al.*, 2008). Die Unterscheidung zwischen hnRNP K und E1 ist nur in höheren Eukaryoten möglich (Tabelle 1-1). HnRNP K wird durch alternatives Spleißen in drei verschiedenen Transkriptvarianten exprimiert, die zu zwei verschiedenen Proteinen translatiert werden und sich am äußersten C-Terminus unterscheiden (Isoform a: ⁴⁵⁷QYADVEGF.; Isoform b: ⁴⁵⁷QYSGKFF.). Die Proteine weisen vergleichbare Nukleinsäureaffinitäten auf (Dejgaard *et al.*, 1994)(Gene ID: 3190, HNRNPK).

Tabelle 1-1 Sequenz-Vergleiche mittels BLAST®-Algorithmus der National Library of Medicine

Die mittlere Spalte zeigt die Identität/Homologie von humanem hnRNP K mit dem nächst verwandten Protein in den links aufgeführten Spezies. Die Spalten unter hnRNP E1/2 zeigten die Identität/Homologie zwischen hnRNP K und hnRNP E der jeweiligen Spezies. < 30% Sequenzidentität bedeutet, dass nur die KH-Domänen konserviert sind und deswegen keine eindeutige Homologie erkannt werden kann. Die Konservierung innerhalb einer KH-Domäne ist größer als 30%. hnRNP E1 und E2 sind im Menschen zu 88% identisch.

Spezies	Konservierung in % Identität/Homologie		
	<i>Homo sapiens</i>		
	hnRNP K	hnRNP E1	hnRNP E2
<i>Homo sapiens</i>	100 / 100	28 / 44	28 / 44
<i>Gallus gallus</i>	88 / 89	31 / 45	
<i>Xenopus laevis</i>	73 / 75	29 / 46	
<i>Danio rerio</i>	76 / 81	<30, nur KH-Domänen	
<i>Drosophila melanogaster</i>	<30, nur KH-D.	<30, nur KH-Domänen	
<i>Caenorhabditis elegans</i>	<30, nur KH-D.	<30, nur KH-Domänen	

Seit der Entdeckung des Proteins sind eine Vielzahl von Funktionen beschrieben und postuliert worden. In nahezu allen Fällen nimmt das Protein eine regulierende Funktion ein und beeinflusst verschiedene Mechanismen der Genexpression, darunter zum Beispiel die Transkription (Choi *et al.*, 2009), den RNA-Metabolismus (Venables *et al.*, 2008), die Signaltransduktion (Wolf *et al.*, 2008) und die Translation (Ostareck-Lederer und Ostareck, 2012). Einige der beschriebenen Funktionen stehen in engem Zusammenhang mit strukturellen Merkmalen von hnRNP K, weshalb zunächst diese Strukturmerkmale näher beschrieben werden, bevor einige ausgewählte physiologische Funktionen diskutiert werden.

1.2.1 Struktur determinanten von hnRNP K

Abb. 1-1 enthält eine vereinfachte Darstellung der wichtigsten Sequenzmotive innerhalb von hnRNP K.



Abb. 1-1 Schematische Darstellung der Struktur determinanten

Nummern über der Abbildung sind Aminosäurenummern. NLS: nuclear localisation signal, KH 1-3: hnRNP K-homology domain, RGG P-rich: arginin-, glycin- und prolinreicher Sequenzbereich, KNS: hnRNP K specific nuclear shuttling sequence.

Am N-Terminus befindet sich ein klassisches zweigeteiltes Kern-Lokalisierungssignal (NLS). Ein zweites Lokalisierungssignal zwischen der KH2 und KH3, das KNS (*hnRNP K specific nuclear shuttling sequence*), vermittelt sowohl den Kern-Import als auch den Export. Import und Export sind ATP- und GTP-unabhängig, so dass der Transport unabhängig vom klassischen RanGTP-Gradienten verläuft. Der

Export aus dem Kern ist nicht durch Leptomycin B inhibierbar, woraus geschlossen werden kann, dass der Export CRM1/*exportin1*-unabhängig ist. (Henderson und Eleftheriou, 2000; Michael *et al.*, 1997). Das Gleichgewicht des KNS-vermittelten Transports liegt allerdings auf der Seite der Kernlokalisation, die Exportwirkung ist nur moderat. Zusammen mit dem NLS bewirkt das KNS die für die allermeisten Zelltypen beobachtete starke nukleäre Lokalisation von hnRNP K (Matunis *et al.*, 1992).

Drei KH-Domänen können in der Sequenz identifiziert werden, KH1, KH2 und KH3 (Valverde *et al.*, 2008). Die ersten Bindungsstudien der einzelnen Domänen konnten nur für die dritte KH-Domäne eine signifikante Bindung an Nukleinsäure nachweisen (Dejgaard und Leffers, 1996). Für diese Domäne sind Kristall- und NMR-Strukturen mit und ohne ssDNA-Ligand bestimmt worden (Backe *et al.*, 2005; Braddock *et al.*, 2002). Die Strukturen zeigen eine Sekundärstruktur, wie sie für eukaryotische KH-Domänen typisch ist: N- β 1- α 1- α 2- β 2- β 3- α 3-C (Abb. 1-2).

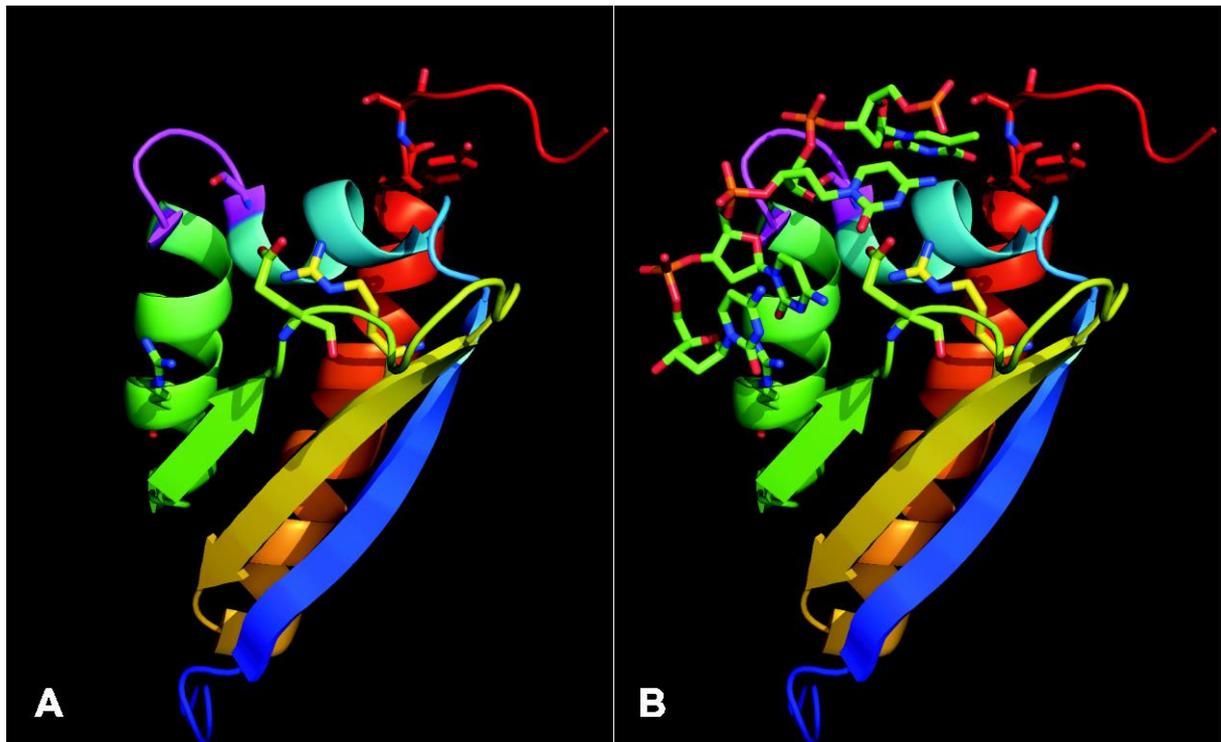


Abb. 1-2 Struktur der KH₃ im Komplex mit dem Tetranukleotid d(CCCT)

Cartoonpräsentation der dritten KH-Domäne (KH₃) in Farbcodierung vom N-(blau) zum C-(rot) Terminus. Ausgewählte Aminosäuren sind als Stick dargestellt (siehe Text), rot: Tyr458. Der innerhalb der KH-Domänen invariante GXXG-loop ist magenta. PDB 1ZZI

Der Kontakt zur Nukleinsäure wird hauptsächlich von den α -Helices 1 und 2 sowie dem β -Strang 2 hergestellt. Einzelne Basen werden von Arg414, Glu425, Arg433, Gly404, und Ser459 kontaktiert (Abb. 1-2). Das Zucker-Phosphat-Rückgrat ist größtenteils lösungsmittel exponiert und wird lediglich

vom GXXG-loop kontaktiert. Es sind keine direkten Interaktionen mit dem 2'-OH der Ribose zu erkennen. Von vier spezifisch gebundenen Desoxyribonucleotiden eines DNA-Liganden nehmen drei Desoxyribosen die für RNA typische 3'endo-Konformation ein (Braddock *et al.*, 2002). Das erklärt den Befund, dass hnRNP K sowohl RNA als auch einzelsträngige DNA mit ähnlicher Affinität binden kann. Die Dissoziationskonstanten der KH3 mit verschiedenen Ribo- oder Desoxyribooligonukleotiden liegen im niedrigen mikromolaren Konzentrationsbereich (Backe *et al.*, 2005).

Quantitative Bindungsstudien oder Strukturdaten zur ersten und zweiten KH-Domäne von hnRNP K sind nicht beschrieben. Allerdings konnte für hnRNP E1 die Struktur der Tandem-Domäne KH1-KH2 mittels NMR gelöst werden (Du *et al.*, 2008). Diese zeigt, dass die beiden Domänen über ein ausgedehntes β -Faltblatt und hydrophobe Wechselwirkungen assoziiert sind. Die beteiligten Aminosäuren sind, bis auf ein am Rand der Interaktionsfläche gelegenes Phenylalanin, auch in hnRNP K konserviert und lassen eine homologe Struktur vermuten (Abschn. 4.9).

Zwischen der zweiten KH-Domäne und dem KNS befinden sich prolinreiche Regionen. Polyprolinhaltige Sequenzen können typischerweise mit SH3- und WW-Domänen interagieren (Taylor und Shalloway, 1994; Weng *et al.*, 1994).

Ebenfalls zwischen der zweiten und dritten KH-Domäne befinden sich RGG-Motive. Zusammen mit dem RXR-Motiv gehören RGG-Motive zu den wichtigsten Erkennungssequenzen der Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) (Bedford und Clarke, 2009). HnRNP K ist unter physiologischen Bedingungen an fünf Argininen innerhalb der RGG Boxen quantitativ asymmetrisch dimethyliert (Abschn. 1.5; (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006)). RGG-Motive werden auch als Nukleinsäurebindemotive diskutiert (Burd und Dreyfuss, 1994; Rajyaguru und Parker, 2012).

1.3 Zelluläre Bedeutungen von hnRNP K

1.3.1 Nukleäre Funktionen - hnRNP K als Regulator der Transkription

HnRNP K wurde bereits mehrfach eine Funktion als Transkriptionsregulator zugeschrieben (Michelotti *et al.*, 1996a). Die Expression von c-Myc, einem Protoonkogen, wurde durch Überexpression von hnRNP K aktiviert. Die Aktivierung war dabei von einer pyrimidinreichen Sequenz (CT-Element) im Promotor des c-Myc-Gens abhängig. In-vitro-Transkriptionsreaktionen mit nukleärem Extrakt waren ebenfalls vom CT-Element abhängig und wurden durch Zugabe von hnRNP K-bindenden Oligonukleotiden inhibiert. Die Aktivierung wurde teilweise auf eine direkte Interaktion mit dem TATA-Bindeprotein-(TBP)-assoziierten-Komplex zurückgeführt. Eine hnRNP K-Affinitätschromatographie depletierte aus dem verwendeten nukleären Extrakt Transkriptionsfaktoren, die für die In-vitro-Transkription des Reportergens notwendig waren. Das Eluat der hnRNP K-

Affinitätschromatographie konnte den depletierten Extrakt komplementieren und die Transkriptionsaktivität wiederherstellen. Die Assoziation mit dem CT-Element erfolgte über Einzelstrangbereiche die vermutlich während der Transkriptionsinitiation aus der Duplex-DNA gebildet wurden (Ginno *et al.*, 2012; Michelotti *et al.*, 1996bb; Wongsurawat *et al.*, 2012).

Auch der Promotor von eIF4E beinhaltet eine cytidinreiche Sequenz, die die Rekrutierung von hnRNP K und dem TBP vermitteln soll. So zeigen heterolog exprimierte Transkriptionsreporter zum einen die Abhängigkeit vom cytidinreichen Promotorelement, zum anderen führt die Überexpression oder die siRNA vermittelte Reduktion von hnRNP K zu einer erhöhten oder, respektive, einer verminderten Synthese der eIF4E-mRNA (Lynch *et al.*, 2005). Weil eIF4E das Zellwachstum in der G1-Phase limitiert, führt eine erhöhte Expression von eIF4E zu einer starken Proliferation der getesteten Zellen (Lynch *et al.*, 2005).

1.3.2 HnRNP K als Protoonkogen in der p53-vermittelten Stressantwort

Das Tumorsuppressorgen TP53 ist das am häufigsten mutierte Gen in menschlichen Tumoren (Vousden und Prives, 2005). Als Transkriptionsfaktor reguliert p53 die konzertierte Stressantwort. So bewirkt p53, z. B. bei strahlungsinduzierten DNA-Schäden die Aktivierung der DNA-Reparatursysteme und den durch p21 vermittelten Zellzyklusarrest. Unter normalen Bedingungen wird die Aktivität von p53 durch die Ubiquitin-E3-Ligase HDM2 (MDM2) und den Proteasom-vermittelten Abbau niedrig gehalten. UV-Strahlung führt zur Aktivierung der Kinasen ATM/ATR, die p53 und HDM2 phosphorylieren und die p53-Proteolyse inhibieren (Perry, 2004). Auch hnRNP K ist ein Substrat der ATM/ATR-Kinasen und steht unter proteolytischer Regulation durch HDM2 (Moumen *et al.*, 2013; Moumen *et al.*, 2005). In Zellkulturexperimenten mit humanen Osteosarkom-Zellen (U2OS) führte UV-Strahlung zu einem vorübergehenden Anstieg der hnRNP K-Konzentration, welche notwendig war, um sowohl die Transkriptionsaktivierung durch p53 als auch einen Zellzyklusarrest in der G1-Phase hervorzurufen. Interessanterweise führte die ATM/ATR vermittelte Phosphorylierung von hnRNP K zur SUMOylierung, die in der Folge die HDM2 vermittelte Ubiquitinierung inhibierte und damit hnRNP K stabilisierte. Als SUMO-E3-Ligase wurden *protein inhibitor of activated STAT 3* und *chromobox homolog 4* identifiziert (Lee *et al.*, 2012; Pelisch *et al.*, 2012). Unter den durch p53 induzierten Transkripten war auch hnRNP K (Rahman-Roblick *et al.*, 2007). Somit unterlag die Transkriptionsregulation durch p53 einer positiven Feedback-Regulation durch hnRNP K. In einer weiteren Studie wurde zudem gezeigt, dass die Argininmethylierung von hnRNP K die Interaktion mit p53 verstärkte und zu einer erhöhten p53 Aktivität beitrug (Chen *et al.*, 2008).

1.3.3 Nukleäre Funktionen - hnRNP K als Regulator von kodierenden und nichtkodierenden Primärtranskripten

hnRNP K assoziiert mit prä-mRNA (hnRNA) und vermittelt entweder die Rekrutierung weiterer Faktoren oder beeinflusst die Funktion einer speziellen RNA. In einer globalen Analyse der Funktion der hnRNPs auf die Regulation des alternativen Spleißens wurden für hnRNP K und hnRNP C die deutlichsten Effekte auf die untersuchten Transkripte beobachtet (Venables *et al.*, 2008). Dabei wurde nach einem hnRNP K-*knock down* in verschiedenen Zelllinien sowohl verstärkte als auch verminderte Spleißstellen-Verwendung gefunden. Die genauere Analyse der Transkripte des Gens Bcl-x, eines je nach alternativ gespleißter Transkriptvariante proapoptotisch- (Bcl-x(Long)) oder antiapoptotisch- (Bcl-x(Short)) wirkenden Genproduktes, zeigte den reprimierenden Einfluss einer cytidylatreichen Sequenz nahe der x(S)-Spleißstelle, die das Transkriptverhältnis zu Bcl-x(L) verschob. Sowohl die Verminderung der hnRNP K-Konzentration als auch Punktmutationen in der oligo(C)-Region bewirkten die verstärkte Verwendung der x(S)-Spleißstelle (Revil *et al.*, 2009). Eine genomweite Analyse der hnRNP K-DNA-Interaktion mittels Chromatin-Immunpräzipitation und *deep sequencing* (ChIP-Seq) zeigte eine serumstimulierte Rekrutierung von hnRNP K an 640 verschiedene DNA-Sequenzen, unter denen eine Reihe von *immediate early gene loci* waren. Dabei zeigte sich, dass hnRNP K vor allem im Transkriptions-Terminationsbereich akkumuliert und, wenigstens im Falle der *early growth response* (EGR)-mRNA, die durch XRN2 vermittelte Transkriptionstermination unterstützt. SiRNA vermittelte Reduktion von hnRNP K hatte nach Serumstimulation eine Akkumulation der EGR-hnRNA zur Folge (Mikula *et al.*, 2013).

Neuere Befunde zeigten nicht nur die Assoziation von hnRNP K mit kodierenden RNAs, sondern auch mit regulatorischen, nicht-kodierenden RNAs. So führte die Manipulation von MCF7-Zellen mit kurzer dsRNA, die komplementär zur Promotorsequenz des Progesteronrezeptor (PR)-Gens war, zu einer verstärkten Bindung von hnRNP K an *antisense*-Transkripte des PR-Gens (Schwartz *et al.*, 2008). Manche dieser *antisense*-Transkripte bestimmten die Synthese der *sense*-Transkripte. Welcher Mechanismus dieser Regulation zugrunde liegt ist noch unklar. Mutmaßlich aber sind RNA-bindende Proteine wie hnRNP K daran beteiligt (Schwartz *et al.*, 2008).

Transkriptomanalysen zeigten, dass ein großer Teil der genomischen Sequenz transkribiert und zu kürzeren RNAs prozessiert wird. Für die meisten dieser nicht-kodierenden RNAs ist bisher keine Funktion beschrieben (Carninci *et al.*, 2005; Kapranov *et al.*, 2007). Die Assoziation dieser RNAs mit hnRNPs ist aufgrund der Abundanz der hnRNPs und ihrer ausgeprägten RNA-Affinität sehr wahrscheinlich. Für die lange nicht-kodierende RNA-p21 (lincRNA-p21), benannt nach dem in unmittelbarer Sequenznähe gelegenen p53-Effektorgen p21 (CDKN1A), wurde eine Assoziation mit hnRNP K gezeigt (Dimitrova *et al.*, 2014; Huarte *et al.*, 2010). LincRNA-p21 wurde, zusammen mit anderen lincRNAs, als Zielgen der p53-Induktion identifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass

lincRNA-p21 wesentlich an der durch p53-induzierten Repression einer großen Anzahl von antiapoptotischen Genen beteiligt war. Die Repression der lincRNA-p21-Zielgene war abhängig von hnRNP K und dem Teil der lincRNA-p21, mit dem hnRNP K assoziierte (Huarte *et al.*, 2010). Die globalen Effekte der lincRNA-p21 ließen sich in einer Folgestudie allein auf die regulierte Expression des p21 zurückführen, in der hnRNP K und die lincRNA-p21 als Koaktivatoren der durch p53 induzierten Transkription von p21 fungierten (Dimitrova *et al.*, 2014).

1.3.4 Zytoplasmatische Funktionen

Zytoplasmatische Funktionen von hnRNP K lassen sich grob in zwei Aspekte unterteilen. Zum Einen ist hnRNP K als Translationsregulator beschrieben, zum Anderen gibt es vielfältige Beschreibungen als Ziel und Regulator der Signaltransduktion.

1.3.5 Zytoplasmatische Funktionen - Translationsregulation der r15-LOX-mRNA

Eines der am besten untersuchten Beispiele für Translationsregulation durch 3'-UTR bindende Proteine ist die Expression der Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX, Gen-Symbol ALOX15) in *Oryctolagus cuniculus* (Ostareck-Lederer und Ostareck, 2004). Die Expression der r15-LOX leitet als einen der letzten Schritte der Erythrozytenreifung die Degradation der Mitochondrien im Retikulozyten ein. Weil in dieser Phase der Blutzellreifung die Zellen bereits entkernt vorliegen, müssen alle mRNAs, die für Proteine kodieren, welche spätere Schritte der Blutzellreifung katalysieren, als inaktive mRNPs gespeichert werden. Zu diesen mRNAs gehört auch die r15-LOX-mRNA (Hohne *et al.*, 1988; Maretzki *et al.*, 1986; van Leyen *et al.*, 1998).

In der 3'-UTR der r15-LOX-mRNA befindet sich eine repetitive, cytidylreiche Sequenz, die *differentiation control element* (DICE oder 10R) genannt wurde (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; Ostareck *et al.*, 1997). Das DICE vermittelte, eingebracht in die 3'-UTR einer Reporter-mRNA, eine Translationsrepression, die nicht auf verminderte Stabilität der Reporter-mRNA zurückzuführen war (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Eine RNA-Affinitätschromatographie führte zur Identifizierung von hnRNP K und -E1. In-vitro-Translationsexperimente mit rekombinanten Proteinen in Retikulozytenlysat zeigten, dass die Zugabe beider Proteine, sowohl einzeln als auch gemeinsam, die Repression verstärkte. Die translationsreprimierende Wirkung des DICE konnte auf 38 nt (2R) eingengt werden. Eine weitere Verkürzung zu 19 nt (1R) war nicht mehr funktional (Ostareck *et al.*, 1997). Der inhibitorische Effekt des 3'-UTR-DICE konnte auch auf die Initiation der Translation einer Reporter-mRNA detektiert werden, die nicht wie üblich am 5'-cap beginnt, sondern an einer internen Ribosomen Bindestelle (IRES). So war die cap-unabhängig Translation, initiiert durch das EMCV-IRES

oder CSFV-IRES, ebenfalls durch hnRNP K inhibiert (Ostareck *et al.*, 2001). Wurde dagegen die Translation einer Reporter-RNA untersucht, die für die Initiation der Translation keine bekannten Initiationsfaktoren benötigt (CrPV- oder IGR-IRES), so beobachtete man keine Repression der DICE-enthaltenden Reporter-mRNAs (Ostareck *et al.*, 2001). Daraus konnte geschlossen werden, dass die Inhibition der Translation vor der Elongationsphase stattfinden muss. Die Analyse von Translationsintermediaten (80S-, 48S-Partikel) mittels Dichtegradientenzentrifugation zeigte eine DICE-abhängige Verminderung von Monosomen (80S) aber nicht von 48S-Initiationskomplexen. Damit wurde deutlich, dass der vom DICE ausgehende inhibitorische Effekt die Assemblierungsrate der 80S-Monosomen beeinflusst. Damit wurde gleichzeitig die physische Interaktion von 5'- und 3'-Ende, analog dem *close loop*-Modell (Kahvejian *et al.*, 2001; Wells *et al.*, 1998) der RNA postuliert. Empirische Evidenzen für eine stabile Wechselwirkung zwischen dem DICE und dem 5'-UTR existieren bisher nicht. Während das *closed loop*-Modell notwendigerweise auf die *cap*-Struktur und den Poly(A)-Schwanz angewiesen ist, ist die Inhibition durch das DICE *cap*- und Poly(A)-unabhängig (Ostareck *et al.*, 2001; Ostareck *et al.*, 1997). Der molekulare Mechanismus der Translationsrepression und der daran beteiligten Proteine verlangt nach weiterer Aufklärung (Naarmann *et al.*, 2010; Ostareck-Lederer und Ostareck, 2012).

Da die Translationsrepression während der Reifung der Blutzellen aufgehoben wird, muss es auch Mechanismen der Aktivierung der inaktiven mRNPs geben. Nicht selten wird die Aktivität von Proteinen durch posttranslationale Modifikationen reguliert, von denen die reversible Phosphorylierung die bedeutendste ist. Als potenzielle Kinase für hnRNP K war bereits c-Src vermutet worden, weil hnRNP K mit der SH3-Domäne der Tyrosinkinase c-Src assoziiert (Weng *et al.*, 1994). Die Untersuchungen zur Wechselwirkung beider Proteine bestätigte die vermutete Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src an mehreren Tyrosinen (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Das phosphorylierte hnRNP K zeigte in *North-Western*-Experimenten eine verminderte Bindung an das DICE. Die damit nach Phosphorylierung von hnRNP K durch c-Src zu erwartende Aufhebung der Translationsrepression wurde mittels Transfektion von Luciferase-Reportern in HeLa-Zellen gezeigt. Die Koexpression von hnRNP K mit Reporter-RNAs, die im 3'-UTR das DICE enthielten, führte zu einer verminderten Synthese der Luciferase. Wurde jedoch gleichzeitig mit den Reporter-RNAs und hnRNP K auch c-Src koexprimiert, konnte keine Translationsrepression mehr beobachtet werden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die durch Phosphorylierung regulierte Assoziation von hnRNP K mit dem DICE stellt damit einen Mechanismus dar, der die entwicklungsabhängige Aufhebung der Translationsrepression während der Blutzellreifung ermöglichen kann. Die entwicklungsabhängige Expression von c-Src konnte später auch in terminal differenzierenden erythroiden Zellen nachgewiesen werden. Dabei wurde c-Src als einzige Tyrosinkinase aus der c-Src-Familie in späten Phasen der Blutzellreifung nachgewiesen

(Naarmann *et al.*, 2008). Auch c-Src unterliegt der Regulation durch hnRNP K. *Knock down*-Experimente mit siRNAs gegen hnRNP K führten in K562-Zellen zu einem Anstieg der c-Src-Expression. Die Assoziation von hnRNP K mit der 3'-UTR von c-Src konnte mittels *UV-crosslink* gezeigt werden und wurde weiter auf das letzte Drittel der 3'-UTR eingegrenzt (Naarmann *et al.*, 2008). Sollte auch in diesem Fall die Assoziation von hnRNP K mit der c-Src-mRNA durch Tyrosinphosphorylierung aufgehoben werden, unterläge c-Src einer positiven Feedback-Regulation. Ein Konzentrationsanstieg von c-Src würde zu einer erhöhten Phosphorylierung von hnRNP K führen, die in Folge eine verminderte Translationsrepression der c-Src-mRNA bewirken und damit zu einem weiteren Anstieg an c-Src-Konzentration führen würde. Über die Enzym-Substrat-Interaktion hinaus wurde auch eine aktivierende Wirkung von hnRNP K auf c-Src beschrieben (Adolph *et al.*, 2007; Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

1.3.6 Posttranskriptionelle Regulation von Zytoskelett-mRNAs in *Xenopus laevis*

Während die Untersuchungen zur r15-LOX-Expression hnRNP K als Translationsrepressor identifizierten, beobachtete man in anderen Organismen und Geweben auch gegenteilige Effekte. So führte in *X. laevis*-Embryonen die Reduktion der hnRNP K-Expression durch *antisense*-Morpholinos (aMOs) zu einer Inhibition der Axonbildung und zu einer Desorganisation des Zytoskeletts (Liu Y., 2008). Dieser Phänotyp war zum Teil auf eine verminderte Expression des *medium neurofilament protein* (NF-M) zurückzuführen. HnRNP K assoziiert in *Xenopus* und Ratte mit der NF-M-mRNA-3'-UTR (Thyagarajan und Szaro, 2008; Thyagarajan und Szaro, 2004). Die Reduktion der hnRNP K-Konzentration in neuronalen *X. laevis*-Zellen durch aMOs führt zu einem verzögerten nukleären Export und zu einer verminderten Translation der NF-M-mRNA. Der Mechanismus der Translationsaktivierung beruht nicht auf RNA-Stabilisierung, ist aber im Detail noch unklar. Die Verminderte Expression von NF-M allein kann jedoch nicht den drastischen Phänotyp der hnRNP K-Depletion erklären. RNA-hnRNP K-Immunpräzipitationen aus *X. laevis*-Neuronen mit anschließender Mikroarray-Analyse der gebundenen mRNAs zeigten weitere Zytoskelett-mRNAs als putative Bindungspartner von hnRNP K auf. Wurden zwei dieser mRNAs zusammen mit der NF-M-mRNA in *X. laevis*-Embryonen depletiert, wurde ein Axon-Entwicklungsdefekt beobachtet, wie er bereits für die hnRNP K-Depletion beschrieben wurde. Auch das Injizieren einer cytidylatreichen RNA in *X. laevis*-Embryonen verursachte den Entwicklungsdefekt der Axonbildung (Liu und Szaro, 2011). In wie weit sich die Ergebnisse der *X. laevis*-Untersuchungen auch auf den Menschen anwenden lassen, bleibt abzuwarten.

1.4 Posttranslationale Modifikationen von hnRNP K

1.4.1 Serin-Phosphorylierung durch MAP-Kinasen

Die Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Proteinen an exponierten Aminosäureseitenketten ist die bedeutendste kovalente und dynamische posttranslationale Modifikation in Eukaryoten. Dabei wird entweder die Aktivität des Proteins verändert oder die biologische Funktion durch veränderte Wechselwirkungspartner beeinflusst (Alberts, 2002). hnRNP K ist als Substrat einer Vielzahl von Kinasen beschrieben. Welche biologische Bedeutung der jeweiligen Phosphorylierung zukommt, konnte noch nicht in jedem Fall gut herausgearbeitet werden.

Bei der gezielten Suche nach Substraten der *c-Jun N-terminalen kinase* (JNK) wurde unter anderem auch hnRNP K identifiziert (Habelhah *et al.*, 2001a). Es wurden drei Serine innerhalb der typischen Erkennungssequenz (N-Ser/Thr-Pro-C) der *mitogen-activated protein kinases* (MAPK), in die JNKs eingeordnet werden ((Bogoyevitch und Kobe, 2006), als Akzeptorstellen für Phosphorylierung durch sowohl JNK als auch *extracellular signal-regulated kinase 2* (ERK2) identifiziert. In In-vitro-Kinase-Experimenten phosphorylierte JNK hauptsächlich Serin 216 und 353, während ERK2 Serin 284 und 353 als wesentliche Akzeptorstellen benutzte (Habelhah 2001a). Obwohl die Phosphorylierungsstellen teilweise identisch sind, wurden unterschiedliche biologische Effekte beobachtet. Die JNK-katalysierte Phosphorylierung führte zu einer Transkriptionsaktivierung von Reportergenen, die nur nach Koexpression von hnRNP K, nicht aber der Ser216/353Ala-Mutante von hnRNP K, beobachtet wurde (Habelhah *et al.*, 2001a). Die ERK2-katalysierte Phosphorylierung von hnRNP K in HEK293-Zellen führte dagegen zu einer drastischen Verschiebung der Lokalisation von einer stark nukleären Akkumulation zu einer Gleichverteilung zwischen Kern und Zytoplasma (Habelhah *et al.*, 2001b). Die zelluläre Lokalisation war zum Einen von Ser284/353 abhängig, die Mutation zu Alanin unterdrückte die zytoplasmatische Akkumulation, zum Anderen konnte die Mutation der Ser284/353 zu Aspartat den Phänotyp der Phosphorylierung nachahmen, wie er zusätzlich auch durch Serum-Stimulations-Experimente beobachtet wurde (Habelhah *et al.*, 2001b).

1.4.2 Die Tyrosinkinase c-Src - von der Tertiärstruktur zum Mechanismus der Regulation

Die zytoplasmatische, membranassoziierte Nichtrezeptor-Tyrosinkinase c-Src ist durch das homologe virale Protein v-Src bekannt geworden (Stehelin *et al.*, 1976), weil das im Gegensatz zu c-Src konstitutiv aktive v-Src (Smart *et al.*, 1981) eine onkogene Transformation von viral infizierten Zellen auslösen kann (Frame, 2004). Vergleiche von v-Src und c-Src zeigten, dass die apparente Tyrosinkinaseaktivität verschieden war (Collett *et al.*, 1978; Martin, 2001). Wie Src die onkogene Transformation bewirkt, ist

immer noch unklar. Die Rolle von Src in der Krebsentwicklung und Zellproliferation ist vielfältig (Alvarez *et al.*, 2006; Frame, 2004). Biochemische Studien zur Regulation von c-Src waren schwierig, weil das Enzym posttranslationale Modifikationen enthält, die für die physiologische Regulation essentiell sind, die aber in rekombinant dargestelltem Enzym nicht vorliegen.

C-Src ist eine modular aufgebaute Tyrosinkinase. Das am N-Terminus myristoylierte Protein besteht aus zwei konsekutiven regulatorischen Domänen, der SH3- und SH2-Domäne, und der weiter C-terminal gelegenen Kinasedomäne (Engen *et al.*, 2008). Die onkogene Wirkung von c-Src wird durch autoinhibitorische Konformationen und Modifikationen unterdrückt. So bindet die SH3-Domäne eine kurze intramolekulare Peptidsequenz zwischen SH2- und Kinasedomäne, die in der autoinhibierten (deaktivierten) Konformation eine für SH3-Liganden typische Polyprolin-Helix-Konformation einnimmt (Xu *et al.*, 1999). In der autoinhibierten (deaktivierten) Konformation bindet die SH2-Domäne intramolekular den phosphorylierten C-Terminus (das Tyr527, historische *Gallus gallus*-Nomenklatur, Abb. 1-3). Die konstitutive Phosphorylierung des Tyr527 wird durch die C-terminale-Src-Kinase (CSK) katalysiert (Levinson *et al.*, 2008).

Kristallstrukturen von deaktiviertem c-Src zeigen im Vergleich zu bekannten aktiven Kinasedomänen, wie die beiden regulatorischen Domänen die beiden Kinasedomänenhälften gegeneinander orientieren und die Aktivierungsschleife in eine gestauchte, inaktive Konformation zwingen (Azam *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 1999).

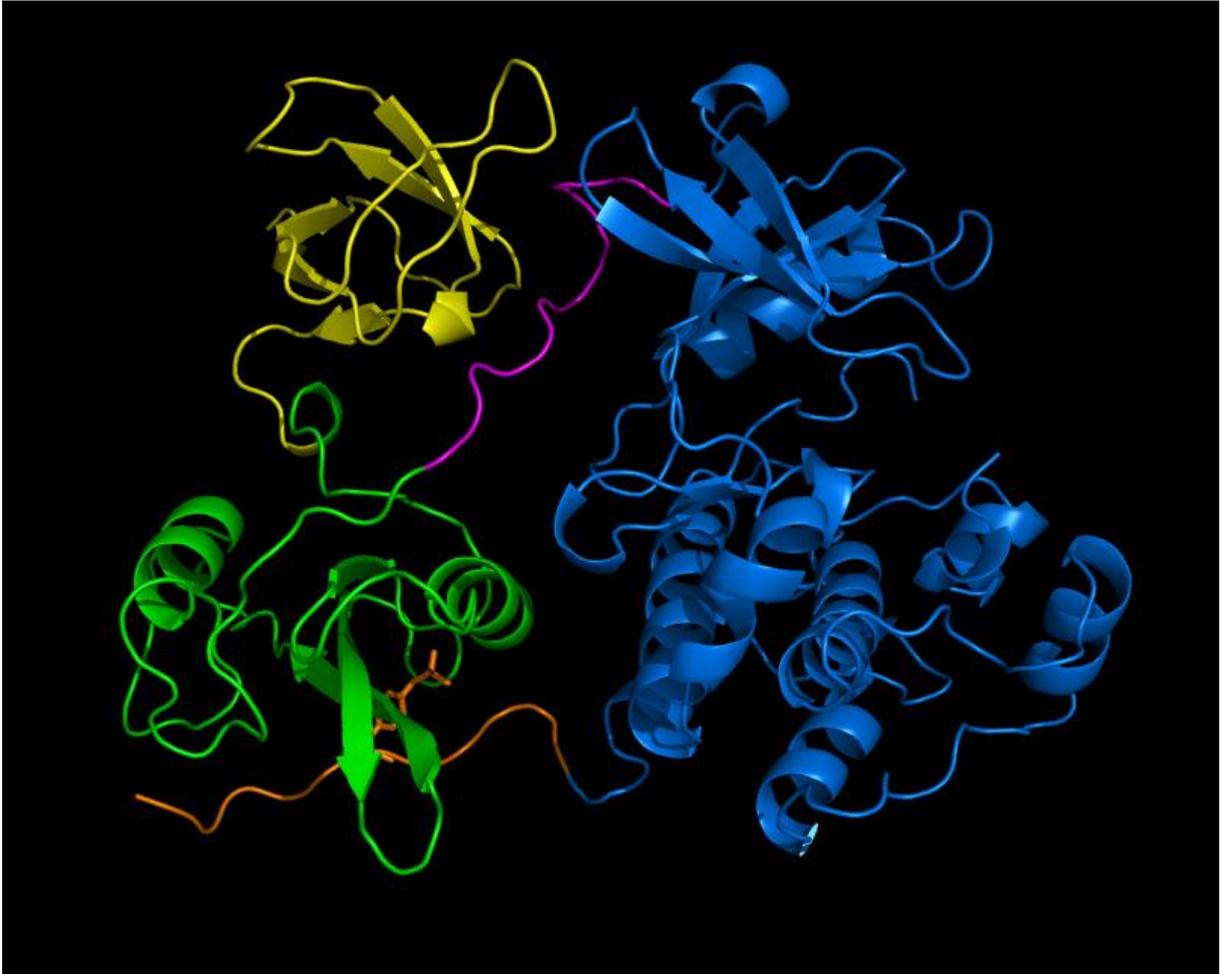


Abb. 1-3 Cartoonmodell der deaktivierten c-Src

Blau: Kinasedomäne, gelb: SH3-Domäne, grün SH2-Domäne, magenta: SH3-gebundener Peptid-linker zwischen SH2- und Kinasedomäne, braun: C-Terminus mit SH2 gebundenem pTyr527; PDB: 1FMK.

Eine Aktivierung der Kinase ist durch wenigstens eine kompetitive Assoziation der regulatorischen Domänen mit einem intermolekularen Liganden möglich. Durch das Auseinanderdriften der zwei Kinasehälften wird die Aktivierungsschleife freigesetzt und das Tyr416 für die Autophosphorylierung exponiert. Die Phosphorylierung des Tyr416 stabilisiert eine Salzbrücke zwischen Glu310 und Lys295, die das aktive Zentrum in seiner aktiven Form arretiert (Abb. 1-4). Die intramolekularen Wechselwirkungen des aktiven Zentrums mit den regulatorischen Domänen werden aufgehoben und setzen diese einer erhöhten Wechselwirkung mit intermolekularen Interaktionspartnern aus (Gonfloni *et al.*, 2000; Huse und Kuriyan, 2002).

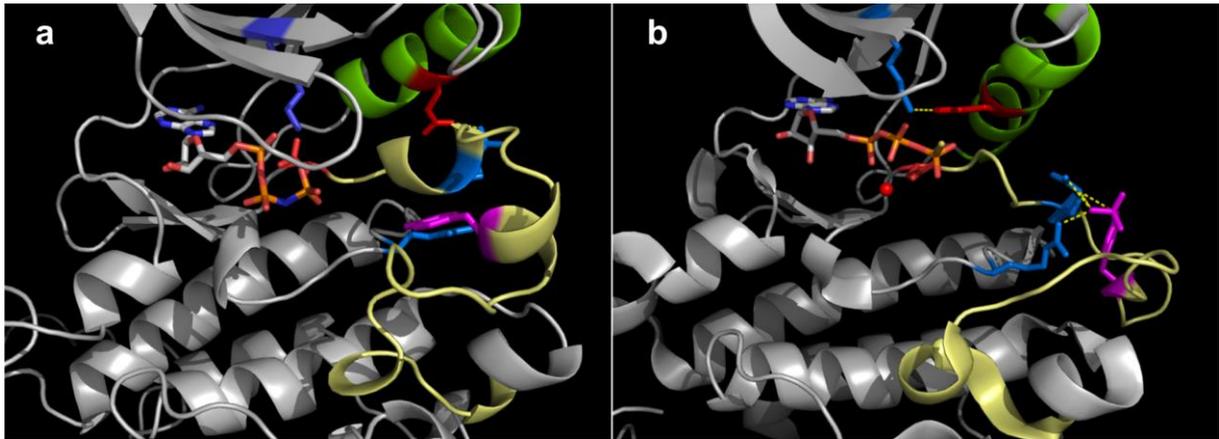


Abb. 1-4 Aktives Zentrum des deaktivierten (a) und aktivierten (b) c-Src

Cartoonpräsentation der Kinasedomäne (grau) mit α -Helix (grün), Aktivierungsschleife (hellgelb), Tyr416 (magenta) und ATP-Analog (Element-spezifische Farbe). Glu310 (rot) und Lys295 (hellblau) bilden nur im aktivierten Zustand eine Salzbrücke aus (b). PDB: 2SRC (a), 3DQW (b).

1.4.3 Die c-Src katalysierte Tyrosinphosphorylierung von hnRNP K mindert dessen RNA-Affinität

Bei der Suche nach Substraten von c-Src wurde schon früh hnRNP K identifiziert (Taylor und Shalloway, 1994; Weng *et al.*, 1994). Welche Auswirkung die Tyrosinphosphorylierung hat, blieb zunächst unklar. Untersuchungen zur Translationsrepression der r-15 LOX-mRNA zeigten später, dass eine Koexpression von c-Src und hnRNP K zu einer Aufhebung der sonst beobachteten Translationsrepression von Expressionsreportern führte (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Koexpression einer katalytisch inaktiven c-Src-Mutante (SrcY416F) hatte keinen Effekt auf die Translationsrepression. Damit deutete sich an, dass die Tyrosinphosphorylierung von hnRNP K zum Verlust der Translationsrepressoraktivität führt. Durch *North western blotting* konnte gezeigt werden, dass durch rekombinantes c-Src phosphoryliertes hnRNP K eine verminderte Assoziation mit dem DICE aufweist. Es wurden mehrere Tyrosin-Phosphorylierungsstellen in hnRNP K identifiziert (Tyr72, 225, 230, 234, 236, 380) (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Ostrowski *et al.*, 2000). Auch nach Mutation dieser sechs Tyrosine zu Phenylalaninen (Y6F-Variante) konnte hnRNP K *in vitro* immer noch partiell von c-Src phosphoryliert werden. Ob die Y6F-Variante von hnRNP K nach In-vitro-Phosphorylierung durch c-Src weiterhin die DICE-RNA bindet, wurde nicht untersucht (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002).

Bei der Suche nach Phosphoakzeptorstellen innerhalb der KH3-Domäne wurde das Tyr458 als c-Src-Substrat identifiziert (Messias *et al.*, 2006). Da qualitative Bindungsstudien mit den einzelnen KH-Domänen von hnRNP K die dritte KH-Domäne als Hauptbindungs determinante charakterisiert hatten (Leffers *et al.*, 1995), wurde der Einfluss der Tyr458-Phosphorylierung auf die DICE-Bindung untersucht. Nach Mutation des Tyrosinrestes 458 zu Phenylalanin konnte *in vitro* keine Phosphorylierung durch c-Src mehr beobachtet werden (Messias *et al.*, 2006). Qualitative Bindungsstudien mit der durch

rekombinantes c-Src phosphorylierten KH3-Domäne und der phosphomimetischen Mutante Tyr458Asp zeigten eine verminderte Bindung der DICE-RNA an die KH3-Domäne. NMR-Untersuchungen mit freier und ligandengebundener KH3-Domäne zeigten eine erhöhte Flexibilität des Peptidrückgrats am Tyr458 im RNA-gebundenen Zustand, wenn dieses zu Aspartat ausgetauscht war. Die erhöhte Flexibilität wurde als Grund für die verminderte Affinität interpretiert. Die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante der Wildtypdomäne und der Tyr458Asp-Mutante mit dem Liganden r(UCCCCAA), ergaben 1,8 μ M vs. 5,3 μ M. Gleichgewichtsmessungen mit der phosphorylierten Domäne oder dem vollständigen hnRNP K sind nicht erwähnt (Messias *et al.*, 2006).

Die biologische Bedeutung der Phosphorylierung an Tyr458 wurde in einem In-vitro-Translations-Repressionsexperiment belegt. Die Zugabe von rekombinantem hnRNP K zur In-vitro-Translation der r15-LOX-mRNA führte zu einem verminderten Translationsprodukt, während die Zugabe der gleichen Menge von pseudophosphoryliertem hnRNP K(Y458D) einen geringeren Effekt hatte (Messias *et al.*, 2006). Damit deutet sich eine mögliche Regulation der Translationsrepression der r15-LOX-mRNA durch die c-Src-abhängige Phosphorylierung von hnRNP K an Tyr458 an. Die Phosphorylierung führt zu einer verminderten RNA-Affinität und damit zur Aufhebung der reprimierenden Wirkung von hnRNP K.

Wie bereits erwähnt, wird c-Src erst in den späten Stadien der Blutzellreifung exprimiert (Naarmann *et al.*, 2008). Damit c-Src hnRNP K phosphorylieren kann, muss es aber aus der typischen deaktivierten Form in die aktive Form überführt werden. Um diesen Prozess der Aktivierung zu verstehen, wurden Aktivierungsstudien mit hnRNP K durchgeführt (Adolph *et al.*, 2007; Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Immunpräzipitations-Experimente mit hnRNP K und c-Src-Deletionsvarianten deuten, neben der Enzym-Substrat Interaktion am aktiven Zentrum, auf eine physische Interaktion der SH3-Domäne und hnRNP K hin (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die für SH3-Domänen typischen Polyprolinliganden innerhalb der hnRNP K-Primärstruktur wurden in einer Folgestudie auf ihren aktivierenden Einfluss auf c-Src untersucht (Adolph *et al.*, 2007). Dabei zeigte sich, dass die prolinreiche Region von Arg286-Arg316 notwendig ist, um eine Aktivierung von c-Src durch hnRNP K zu bewirken. Diese In-vitro-Studien mit immunpräzipitierten Proteinen weisen hnRNP K nicht nur als Zielmolekül der Signaltransduktionkaskade aus, sondern zusätzlich auf die übergeordnete Effektorrolle als c-Src-Aktivator hin.

1.5 Argininmethylierung von hnRNP K

1.5.1 Protein-Arginin-Methyltransferasen - determinierte Produkte in promiskuitiven Substraten

Zu den bekannten posttranslationalen Modifikationen von hnRNP K zählt auch die Argininmethylierung, die bereits 1995 beschrieben wurde (Liu und Dreyfuss, 1995). Zu dieser Zeit war jedoch nicht klar, welche Arginine in hnRNP K wie methyliert werden. Heute kennt man vier Typen von Protein-Arginin-Methyltransferasen (PRMTs) (Bedford und Clarke, 2009). Typ I katalysiert die sukzessive Übertragung von zwei Methylgruppen des Kofaktors S-Adenosyl-Methionin (SAM) auf ein ω -N^G des Arginins, so dass ω -N^G,N^G-Dimethylarginin entsteht. Typ II-PRMTs katalysieren die Übertragung von zwei Methylgruppen des Kofaktors SAM auf die zwei endständigen N-Atome des Guanidinrestes, sodass ω -N^G,N^G-Dimethylarginin entsteht. Beide Typen bilden als Intermediat Monomethylarginin (ω -N^G-MR) und führen dann zu entweder asymmetrischer Arginindimethylierung (aDMR, Typ I) oder symmetrischer Arginindimethylierung (sDMR, Typ II) (Abb. 1-5).

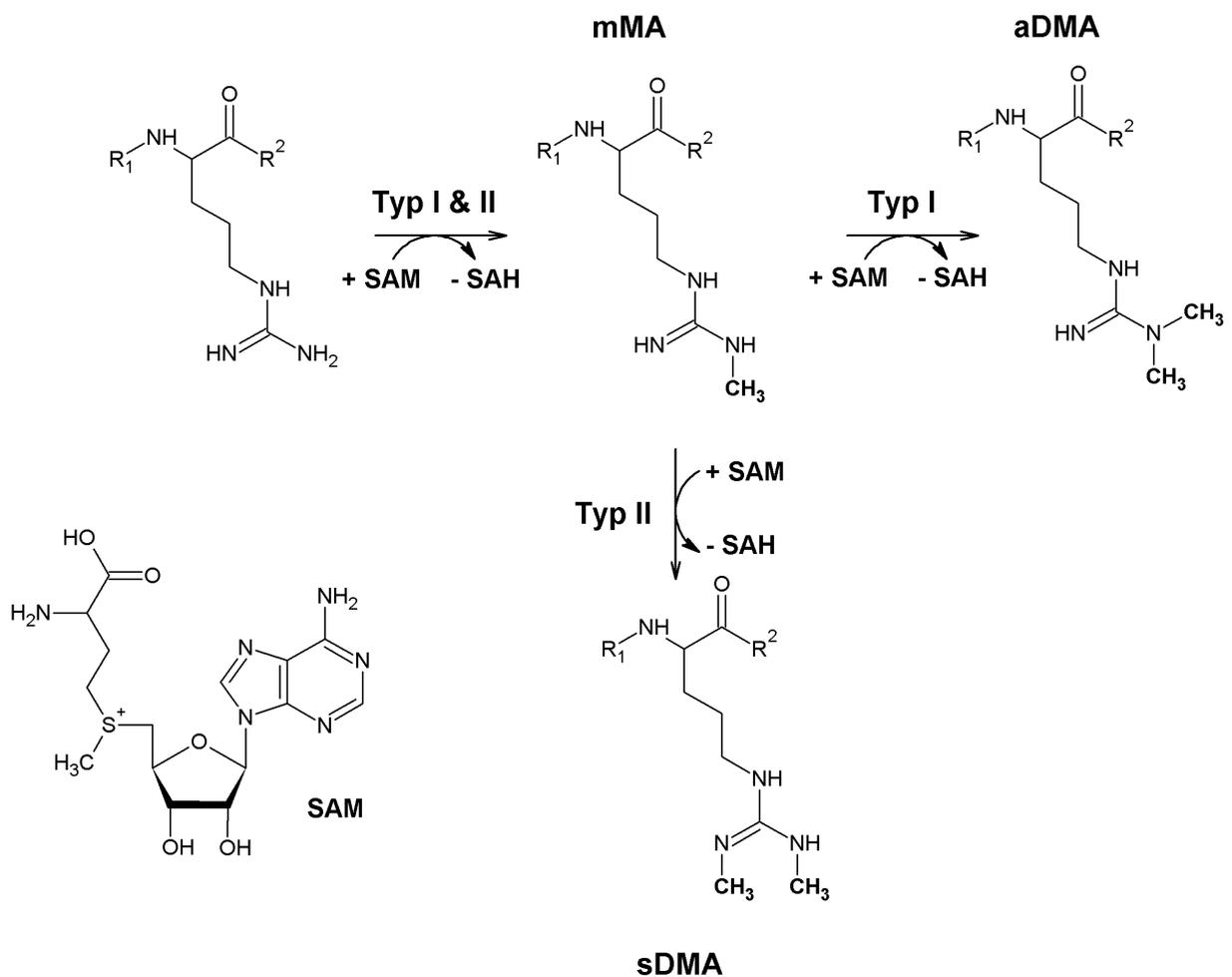


Abb. 1-5 Argininmethylierung durch PRMTs

mMA: Monomethylarginin, aDMA: asymmetrisch dimethyliertes Arginin, sDMA: symmetrisch dimethyliertes Arginin, SAM: S-Adenosylmethionin, SAH: S-Adenosylhomocystein.

Weitaus seltener findet man monomethylierte Arginine. Enzyme, die nur eine Methylgruppe auf das ω - N^G übertragen, werden als Typ III-PRMTs eingeteilt, während Enzyme, die das δ - N^G monomethylieren, zu den Typ IV-PRMTs gezählt werden (Bedford und Clarke, 2009). Im humanen Genom lassen sich elf PRMTs identifizieren (Wolf, 2009). PRMT 1, 3, 4, 6 und 8, gehören zum Typ I, PRMTs 5 und 9 gehören zum Typ II (Krause *et al.*, 2007) PRMT 10 und 11 sind noch nicht biochemisch charakterisiert, sodass eine Einteilung noch nicht möglich ist. Die wohl wichtigste PRMT ist PRMT1 (Tang *et al.*, 2000). Mehr als 55% aller asymmetrisch dimethylierten Arginine in Proteinen werden durch PRMT1 synthetisiert (Pawlak *et al.*, 2002). Das Fehlen von PRMT1 führt in Mäusen zu einem schweren Entwicklungsdefekt. Homozygote PRMT1-*knock out*-Mäuse sterben im Embryonalstadium um den Tag 12. Damit wird aber auch deutlich, dass PRMT1 vermutlich keine essentielle Funktion in der Homöostase einzelner Zellen zukommt, denn die Kultivierung von embryonalen PRMT1-*knock out*-Zellen wurde gezeigt (Pawlak *et al.*, 2002), sondern vielmehr für die korrekte Entwicklung multizellulärer Systeme bedeutsam ist (Pawlak *et al.*, 2000).

Obwohl seit der Entdeckung der Argininmethylierung (Paik und Kim, 1967) viele Substrate der PRMTs identifiziert wurden, führten die Untersuchungen zur Substratspezifität nicht zu einem eindeutigen Ergebnis (Bedford und Clarke, 2009; Paik *et al.*, 2007). Lediglich eine Häufung von aDMR in RGG-Boxen und RXR-Clustern wurde festgestellt (Gary und Clarke, 1998). Ein weiteres Kriterium scheint die strukturelle Flexibilität der Peptidregionen zu sein, in denen Substratarginine vorkommen (Kolbel *et al.*, 2012). Stark strukturierte Bereiche innerhalb eines Proteins beinhalten selten aDMRs und sDMRs. Das führt dazu, dass für potenzielle PRMT-Substrate die Art und Anzahl sowie die Sequenzposition der Argininmethylierung nicht vorhergesagt werden können.

Aus diesem Grund wurde hnRNP K aus HeLa-Zellextrakt aufgereinigt, und mittels Edman-Sequenzierung und MS-Analyse die Argininmethylierung genau bestimmt. Es stellte sich heraus, dass Arg256, 258, 268, 296 und 299 quantitativ asymmetrisch dimethyliert waren. Damit ist hnRNP K eines der wenigen Proteine, deren Methylierungsstatus genau bestimmt wurde. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass hnRNP K nur von PRMT1 methyliert wird (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Für viele andere methylierte Proteine sind die modifizierten Arginine und die verantwortlichen Methyltransferasen noch nicht bekannt (Pahlich *et al.*, 2006), oder es sind mehrere PRMTs für die Methylierung verantwortlich (Fronz *et al.*, 2008). Beides erschwert Experimente zur Funktion der Argininmethylierung. Im Fall von hnRNP K kann nun jedoch auf Aminosäure-Punktmutanten und die murine embryonale PRMT1-*knock out*-Zelllinie (ES^{PRMT1-/PRMT1}-Zellen (Pawlak *et al.*, 2000)) zurückgegriffen werden, um in vergleichenden zellbiologischen Untersuchungen die biologische Bedeutung der Argininmethylierung zu erforschen.

1.6 Die funktionale Bedeutung der Argininmethylierung

1.6.1 PRMT-Substratsequenzen und die putative Nukleinsäureinteraktion

HnRNP-Proteine tragen ca. 65% aller nukleären aDMA (Boffa *et al.*, 1977). Nicht selten sind die methylierten Arginine in so genannten GAR-Motiven (*glycine arginine rich region*) angereichert. Damit lag recht früh schon die Vermutung nahe, dass die Methylierung zu einer veränderten Nukleinsäurebindung führen kann (Bedford und Richard, 2005; Kim *et al.*, 1997). Tatsächlich sind aber bisher nur marginale Veränderungen der Nukleinsäurebindung nach Methylierung berichtet worden (Rajpurohit *et al.*, 1994), oder die Analysen zum Bindungsverhalten nicht hinreichend auswertbar (Denman, 2002).

In den wenigen Fällen, in denen systematisch der Einfluss der Argininmethylierung auf die Nukleinsäurebindung untersucht wurde, konnte keine Veränderung der Affinität des untersuchten Proteins zu Nukleinsäuren festgestellt werden (Kuhn *et al.*, 2003; Raman *et al.*, 2001; Valentini *et al.*, 1999). So wurde das Hefeprotein Hrp1p rekombinant hergestellt, *in vitro* mit einem 10 fachen (n/n) Überschuss an Htm1p und SAM methyliert, und die Bindungsisothermen für das methylierte und nicht-methylierte Protein und einem RNA-Liganden ermittelt. Es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen beiden Proteinvarianten (Valentini *et al.*, 1999). Für die Analyse mit dem bovinen Poly(A)-Bindeprotein N1 (PABPN1) konnte auf ein aus Kalbsthymus gereinigtes, methyliertes Protein zurückgegriffen werden. Der Vergleich der Poly(A)-Bindung in Filterbindungsexperimenten und *gel shift*-Analysen mit rekombinantem, nicht-methylierten Protein und dem aus Thymus aufgereinigten Protein, ergab ebenfalls kaum Unterschiede (Kuhn *et al.*, 2003).

Diese Studien zeigen zugleich die Schwierigkeit der Untersuchung auf. Will man In-vitro-Untersuchungen mit methylierten Proteinen durchführen, kann entweder rekombinantes Protein *in vitro* methyliert werden, oder es muss methyliertes Protein aus einer natürlichen Quelle gereinigt werden. Die In-vitro-Methylierung ist technisch schwierig, weil die Reaktion (i) produktinhibiert ist (Bartel und Borchardt, 1984), (ii) die Vollständigkeit der Methylierung nur aufwendig zu überprüfen ist und (iii) das Reaktionsprodukt gegebenenfalls erneut aufgereinigt werden muss. Die Reinigung methylierter Proteine aus Zellextrakt ist zeitintensiv und die Ausbeuten sind vergleichsweise gering. Das sind wahrscheinlich die Hauptgründe für einen Mangel an quantitativen In-vitro-Studien, die natürlich auch auf die Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen übertragen werden können. Obwohl GAR-Regionen in Proteinen Protein-Nukleinsäureinteraktionen vermitteln können (Liu und Dreyfuss, 1995), kristallisierte sich in den letzten Jahren heraus, dass die meisten durch Argininmethylierung verursachten Effekte wohl auf veränderte Protein-Protein-Interaktionen zurückzuführen sind (Bedford und Clarke, 2009; Bedford und Richard, 2005; Pahlich *et al.*, 2006).

1.6.2 Argininmethylierung verändert die Lokalisation einiger hnRNPs

Die Funktion der Argininmethylierung von hnRNPs wurde zuerst in der Hefe beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass für die Hefe-Methyltransferase 1 (HMT1)-Substrate Npl3p und Hrp1p in Abwesenheit der Hmt1p-Aktivität der nukleäre Export gestört ist (Henry und Silver, 1996). In einer temperatursensitiven Hefezelllinie, die einen defekten nukleären Protein-Import aufweist, führte die Hypomethylierung der beiden hnRNP-Proteine Hrp1p und Npl1p zu einer Akkumulation im Kern der Zellen (Shen *et al.*, 1998). Der Export von Hrp1p ist allerdings nicht von der eigenen Methylierung abhängig, sondern von der Methylierung des Npl3p (Xu und Henry, 2004b). Die nicht mehr methylierbare Mutante Hrp1p (R516/519K) zeigt in Wildtyp- und $\Delta hmt1$ -Stämmen den gleichen Phänotyp wie das Wildtypprotein. Dagegen führt die Inhibierung des Npl3p-Exports zu einer Inhibierung des Hrp1p-Exports. Es konnte jedoch keinerlei Einfluss der methylierten Arginine von Npl3p auf die physische Interaktion mit Hrp1p nachgewiesen werden (McBride *et al.*, 2000; Xu und Henry, 2004b). Aus Immunpräzipitationsexperimenten leiten die Autoren ab, dass der beobachtete Zusammenhang durch z.B. eine übergeordnete RNP-Assemblierung hervorgerufen werden könnte. Diese Vermutung wird durch den Befund gestützt, dass Hmt1p seine Substrate zu bestimmten Genen rekrutiert und dort die Assemblierung von hnRNPs moduliert (Yu *et al.*, 2004). Dabei wurden durch ChIP-Experimente in Wildtyp- und $\Delta hmt1$ -Zellen für Hrp1p Unterschiede in der Assoziation mit bestimmten Genen gefunden. Diese Veränderungen waren aber mehr auf die physische Abwesenheit des Hmt1p als auf dessen Methyltransferaseaktivität zurückzuführen, da eine katalytisch inaktive Punktmutante (G68R) deutlich geringere Effekte zeigte als die Deletion (Yu *et al.*, 2004).

Npl3p wird im Zytoplasma von der SR-Kinase Sky1p phosphoryliert und interagiert dann mit dem Importfaktor Mtr10p. Die Argininmethylierung von Npl3p vermindert die Phosphorylierung durch Sky1p und damit indirekt auch den nukleären Import (Yun und Fu, 2000). Npl3p ist am Export von mRNAs beteiligt und essentiell für den Export der prä-60S ribosomalen Untereinheit (Hackmann *et al.*, 2011). Die C-terminale Domäne, in der 15 RGG-Motive enthalten sind, ist zudem für die Bildung von translationskompetenten 80S Monosomen essentiell (Baierlein *et al.*, 2013). Der Einfluss der Argininmethylierung auf die Translation wurde aber nicht getestet.

Auch in Metazoen sind einige Beispiele für veränderte Lokalisierung von hypomethylierten Proteinen bekannt. Das KH-Domänen-Protein *Src-associated during mitosis 68* (Sam68) wird in seiner GAR-Region von PRMT1 methyliert. In embryonalen Stammzellen (ES^{+/+}-Zellen) ist das Protein im Zellkern lokalisiert. In PRMT1-*knock out*-ES-Zellen (ES^{-/-}-Zellen) liegt dagegen ein substantieller Anteil an Sam68 auch im Zytoplasma vor (Cote *et al.*, 2003). Die zytoplasmatische Akkumulation kann auch nach einer Behandlung der Zellen mit Adenosine-2',3'-dialdehyde (Adox) beobachtet werden. Diese Substanz inhibiert allerdings alle S-Adenosylmethionin-abhängigen Stoffwechselprozesse, so dass indirekte Effekte

nicht ausgeschlossen werden können. Mittlerweile stehen spezifischere PRMT-Inhibitoren zur Verfügung (Lakowski *et al.*, 2010; Spannhoff *et al.*, 2007).

Bei Untersuchungen zum intrazellulären Transport der RNA-Helikase A (RHA) stellte sich heraus, dass der für den bidirektionalen Kerntransport hinreichende C-terminale Bereich (*nuclear transport domain* (NTD)) von PRMT1 methyliert wird (Smith *et al.*, 2004). Für die Untersuchungen zur Lokalisation umgingen die Autoren das Problem der Methylierungsinhibitoren weitgehend, indem *in vitro* methylierte Reporterproteine in das Zytoplasma von HeLa-Zellen injiziert wurden. Es zeigte sich, dass nur die methylierten und nicht die unmodifizierten Reporterproteine in den Kern der untersuchten Zellen gelangten. Um die intrazelluläre Methylierung auszuschließen, wurden die Zellen kurz zuvor mit 2 mM Adenosin, 2 mM DL-Homocystein, und 2 mM *N*⁶-Methyl-2'-Desoxyadenosin behandelt. Die NTD beinhaltet ein mutmaßlich klassisches NLS und wird damit RanGTP-abhängig vom Importin α/β -Dimer transportiert (Tang *et al.*, 1999). Damit wurde erstmals gezeigt, dass auch der klassische Kerntransport von NLS-haltigen Proteinen durch die Methylierung beeinflusst werden kann (Smith *et al.*, 2004).

Auch für das Importin-(Karyopherin-) β 2-Substrat PABPN1 ist die Modulierung der Affinität von Transporter und Substrat durch Protein-Argininmethylierung nachgewiesen worden (Fronz *et al.*, 2011). Das Erkennungsmotiv von Karyopherin β 2 ist ein dreigeteiltes basisches Motiv, welches nicht in eine Sekundärstruktur eingebettet ist und teilweise aus der PRMT-Substratsequenz RXR besteht. Für PABPN1 konnte gezeigt werden, dass die spezifische und RanGTP-sensitive Interaktion mit Karyopherin β 2 *in vitro* durch die Methylierung der C-terminalen Arginine um ca. den Faktor 10 abgeschwächt war. Weil die Karyopherin β 2-Erkennungssequenzen sehr ähnlich sind, implizieren die Ergebnisse, dass die Interaktion weitere Transportsubstrate von Karyopherin β 2 durch Methylierung moduliert werden (Fronz *et al.*, 2011). Auch für das *fused in sarcoma* (FUS)-Protein wurde die pathologisch relevante Modulierung der Karyopherin β 2-FUS-Interaktion durch Argininmethylierung beschrieben. Mutationen im NLS von FUS, die den Kernimport verhindern, führen zu *amyotrophic lateral sclerosis* (ALS). Die Methylierung von FUS durch PRMT1 führt ebenfalls zur zytoplasmatischen Akkumulation von FUS und steht im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen (Bentmann *et al.*, 2012; Dormann *et al.*, 2012).

1.6.3 Methylierte Arginine in prolinreichen Interaktionssequenzen

Polyprolinsequenzen formen in Lösung eine charakteristische Polyprolin-Helix (Adzhubei *et al.*, 2013). Diese kann in unterschiedlichen Orientierungen an SH3- und WW-Domänen binden (Ball *et al.*, 2005; Macias *et al.*, 2002). Für die Assoziation mit SH3-Domänen sind flankierende Arginine von

entscheidender Bedeutung (Feng *et al.*, 1995). Für prolinreiche Peptide, abgeleitet von Sam68, wurde gezeigt, dass die asymmetrische Methylierung dieser flankierenden Arginine die Assoziation mit einigen SH3-Domänen inhibierte, während die Assoziation mit den getesteten WW-Domänen unverändert blieb (Bedford *et al.*, 2000).

Die prolinreichen Regionen in hnRNP K sind von einigen asymmetrisch dimethylierten Argininen (Arg 268, 296, 299) flankiert. Um den Einfluss der Argininmethylierung auf die Interaktion mit der SH3-Domäne von c-Src zu untersuchen, wurden Ko-Immünpräzipitationsexperimente mit in HeLa-Zellen exprimierten Proteinen durchgeführt (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Dabei zeigte sich, dass die typische Kopräzipitation von c-Src mit hnRNP K durch eine vorherige Überexpression von PRMT1 vermindert werden kann. Wird im gleichen Experiment die nicht methylierbare 5RG-Mutante von hnRNP K (Abschn. 2) präzipitiert, so ist kein Unterschied in der Kopräzipitation von c-Src zu beobachten. Unter der Voraussetzung, dass eine Überexpression von hnRNP K zu einem hypomethylierten Protein führt, dass durch Koexpression von PRMT1 wieder vollständig methyliert werden kann, deutet der Befund auf eine inhibitorische Wirkung der Argininmethylierung auf die hnRNP K-c-Src-Interaktion hin (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

Die Beobachtung, dass die asymmetrische Argininmethylierung in nahezu allen bisher untersuchten Protein-Protein-Interaktionen einen allenfalls inhibitorischen Effekt hat, korreliert mit dem Befund, dass bis vor kurzem noch keine spezifische Bindedomäne für aDMA identifiziert werden konnte (Yang und Bedford, 2013).

1.6.4 Symmetrische Argininmethylierung fördert die Wechselwirkung mit der Tudor-Domäne

Die ersten Hinweise auf eine spezifische Erkennung der Argininmethylierung wurden für die symmetrische Arginindimethylierung gefunden. So wurde gezeigt, dass das *survival of motor neurons* (SMN) Protein mit der GAR-Region der snRNP-Proteine SmD1 und SmD3 interagiert und diese Interaktion durch sDMA deutlich verstärkt wird (Friesen *et al.*, 2001). SMN enthält eine so genannte Tudor-Domäne (Ponting, 1997). Für diese und einige andere Tudordomänen wurde später gezeigt, dass sie bevorzugt mit sDMA-haltigen Peptiden interagieren (Cote und Richard, 2005). Tudordomänen binden allerdings nicht ausschließlich sDMA. So zeigten die Tudor-Domänen der Proteine JMJD2 und 53BP1 eine Selektivität für Methyllysreste (Adams-Cioaba und Min, 2009; Huang *et al.*, 2006).

Strukturelle Analysen zur Bindung von sDMA an Tudordomänen zeigen, dass neben der zuvor identifizierten Tudor-Domäne noch flankierende Bereiche N- und C-terminal für eine substantielle Assoziation notwendig sind (Friberg *et al.*, 2009). Das sDMA wird dabei in einer hydrophoben Tasche aus konservierten aromatischen Aminosäuren gebunden. Zusätzlich existiert eine

Wasserstoffbrückenbindung zwischen einem Asparaginrest und dem sDMA, die aus sterischen Gründen mit aDMA nicht ausgebildet werden kann (Liu *et al.*, 2010a; Liu *et al.*, 2010b).

Obwohl auch TDRD3 ursprünglich als sDMA spezifischer Interaktionspartner beschrieben wurde (Cote und Richard, 2005), ist die Assoziation mit asymmetrisch dimethyliertem Histon3-Arg17 und Histon4-Arg3 beschrieben worden. Dass TDRD3 sowohl sDMA- als auch aDMA-Liganden binden kann, wurde formal nicht gezeigt (Yang *et al.*, 2010). Für das SMN-Protein wurde mittels NMR und ITC-Titrationen eine Assoziation von sDMA und aDMA nachgewiesen, wobei aDMA eine geringere Affinität aufwies (Tripsianes *et al.*, 2011).

1.7 Transkriptionelle Regulation durch Argininmethylierung

Weil die transkriptionelle Regulation durch Argininmethylierung von großer Bedeutung ist, aber nicht generell mit hnRNP K zusammenhängt, sei sie hier kurz erwähnt. Die Arginindimethylierung bildet einen Teil des Histon-Codes (Lee *et al.*, 2005). Argininmethylierung findet sowohl an Histonen H3 und H4 statt (Kouzarides, 2007; Taverna *et al.*, 2007), als auch an Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren statt (Bedford und Clarke, 2009; Lee und Stallcup, 2009). Dabei gilt die Regulation als weniger dynamisch als Lysinmethylierung oder Phosphorylierung, weil die Existenz einer Arginindemethylase noch umstritten ist. Das bedeutet, dass eine substanzielle Demethylierung möglicherweise mit dem Austausch des Proteins gegen neu synthetisiertes Protein einhergehen muss, wie es bereits für den Austausch von Histonen in Nukleosomen beschrieben ist (Jin *et al.*, 2005).

1.8 Ziel

Das Ziel der vorgelegten Arbeit war die Untersuchung der biologischen Bedeutung der Argininmethylierung von hnRNP K. Diesem Ziel liegt ein Postulat zugrunde, dass nur schwer zu verifizieren und daher nicht gänzlich unumstritten ist: Die Argininmethylierung von hnRNP K hat sich im Laufe der Evolution herausgebildet, weil der Organismus einen wie auch immer gearteten Vorteil daraus zieht, und nicht weil sie ein tolerierbares Nebenprodukt eines wichtigen aber unspezifischen Enzyms ist. Weil das Reproduzieren von bereits bekannten Befunden im Zweifel keine neuen Erkenntnisse liefert, sollten neue und genauere Messmethoden entwickelt werden, mit Hilfe derer bereits bekannte Untersuchungen erweitert werden können und einen größeren Erkenntnisgewinn erlauben sollen. Dabei standen die Untersuchung von Wechselwirkungspartnern des hnRNP K und der putative Einfluss der Argininmethylierung im Vordergrund.

2 Ergebnisse

Die Etablierung einer funktionalen Konsequenz der Argininmethylierung von hnRNP K geht von einem im physiologischen Kontext konstitutiv methylierten Protein aus. Analysen der Primärstruktur des aus HeLa-Zellen gereinigten hnRNP K mittels Edman-Sequenzierung und MALDI-MS zeigten eine quantitative asymmetrische Dimethylierung von Arginin 256, 258, 268, 296, 299, sowie eine partielle Methylierung von Arginin 287 und 303. Von den bekannten PRMTs konnte lediglich PRMT1 eine signifikante Methylierung von hnRNP K katalysieren. Um mögliche Einflüsse der Methylierung auf die Funktion des hnRNP K zu untersuchen, wurde in Ermangelung eines konservativen Aminosäureaustauschs, welcher Hypomethylierung mimt, eine nicht methylierbare Arginin 256, 258, 268, 296, 299 zu Glycin-Variante (hnRNP K5RG) verwendet (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

2.1 Intrazelluläre Lokalisation von hnRNP K in Abhängigkeit der Argininmethylierung

In hnRNP K wurden mit dem NLS und dem KNS bereits zwei unabhängige Sequenzbereiche identifiziert, die Einfluss auf die zelluläre Lokalisation des Proteins nehmen (Abschn. 1.2.1). Obwohl die methylierten Arginine nicht im NLS und KNS liegen, wurde die Gleichgewichtsverteilung in der Zelle in Abhängigkeit von der Protein-Argininmethylierung untersucht. Die Motivation dieser Experimente leitet sich von Studien an dem Hefeprotein Npl3p ab, für das bekannt ist, dass die Protein-Argininmethylierung die Gleichgewichtslokalisation beeinflussen kann, obwohl auch da die bekannten methylierten Arginine nicht in einer Lokalisationssequenz liegen (Xu und Henry, 2004a). Für die Untersuchung wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurde die Gleichgewichtslokalisation in immortalisierten embryonalen Stammzellen verglichen, die eine oder keine *loss of function* Mutation im PRMT1-Gen ($ES^{-/-}$, $ES^{+/+}$) trugen. Zum anderen wurden hnRNP K-Varianten in HeLa-Zellen exprimiert, die zum Teil durch Arginin-zu-Glycin-Mutationen nicht mehr methylierbar waren, und deren Lokalisation untersucht.

2.1.1 Lokalisation von hnRNP K in ES-Zellen

Um die physiologische Bedeutung von PRMT1 im zellulären Kontext zu untersuchen, wurden von der Arbeitsgruppe Ruley PRMT1-*knock out*-Mäuse generiert (Pawlak *et al.*, 2000). Die Kreuzung der für PRMT1 heterozygoten Mäuse zeigte jedoch, dass der homozygote *knock out* letal ist. PRMT1^{-/-}-Embryonen sterben am Tag 13 der Entwicklung. Daraufhin wurden Stammzellen aus der Blastula der PRMT1^{-/-}-Embryonen isoliert und immortalisiert (Pawlak *et al.*, 2000). Zum Vergleich mit

der PRMT1-*knock out*-Zelllinie wurde die Prozedur mit naiven Blastulazellen wiederholt. Die so präparierten murinen ES^{PRMT1-/PRMT1-} (ES^{-/-})- und ES^{+/+}-Zellen konnten für die Lokalisationsstudien von methyliertem und nichtmethyliertem hnRNP K herangezogen werden, weil PRMT1 die einzige Methyltransferase ist, die hnRNP K methyliert und bei deren Fehlen von einer Hypomethylierung des hnRNP K ausgegangen werden kann (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Zur Bestimmung der Gleichgewichtslokalisierung wurde die Immunfluoreszenz genutzt. Dabei wurde das Kernkompartiment mit DAPI angefärbt und das Zytoplasma durch den Nachweis von Tubulin markiert (Abschn. 4.1). Die Färbung für hnRNP K in den ES^{+/+}- und ES^{-/-}-Zellen (Abb. 2-1) ist bis auf nukleolare Aussparungen kongruent zur DAPI-Färbung und zeigt somit eine deutliche nukleäre Lokalisation. Das durch die Tubulinfärbung angezeigte Zytoplasma weist keine signifikante Färbung für hnRNP K auf (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006))

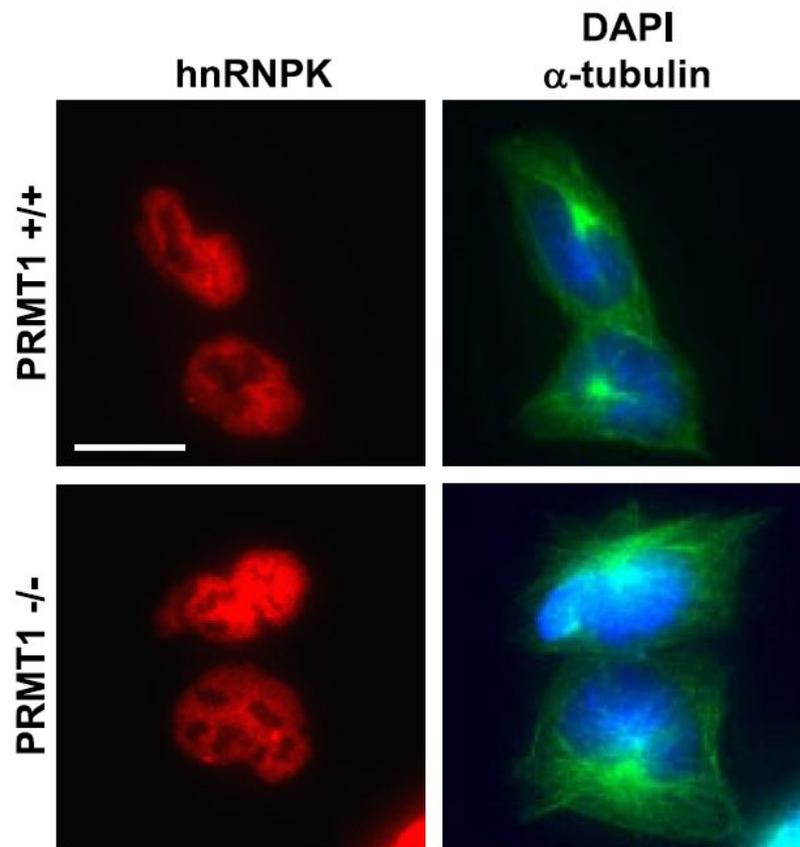


Abb. 2-1 Nukleäre hnRNP K-Lokalisation in ES-Zellen

ES-Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert, mit Formaldehyd fixiert und mit Triton-X 100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit primären Antikörpern gegen hnRNP K (Matritec) und Tubulin (F13) inkubiert und diese in einer zweiten Inkubation mit spezifischen fluoreszenzgekoppelten sekundären Antikörpern nachgewiesen. hnRNP K (rot) wurde indirekt Cy3 und Tubulin (grün) indirekt mit Fluorescein markiert. Das Kernkompartiment wird durch DAPI-Färbung (blau) angezeigt.

Des Weiteren ist kein Unterschied der hnRNP K-Lokalisation in den beiden verwendeten Zelllinien festzustellen. Für die deutliche nukleäre Lokalisation von hnRNP K ist PRMT1 und damit dessen Aktivität nicht notwendig. Der Anteil des zytoplasmatischen hnRNP K liegt unter der Nachweisgrenze. Es spielt offenbar für die Lokalisation in ES-Zellen keine Rolle, ob das Protein methyliert oder hypomethyliert ist, da die Gleichgewichtslokalisierung in den ES^{+/+}- und ES^{-/-}-Zellen identisch ist (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

2.1.2 Lokalisation von hnRNP K in HeLa-Zellen

Um die Gleichgewichtsverteilung von hnRNP K auch in einem anderen Zelltyp zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen mit Expressionsplasmiden für hnRNP K oder hnRNP K5RG transfiziert. Weil die starke Überexpression von hnRNP K die Methylierungskapazität endogener Methyltransferasen übersteigen könnte und zu einem partiell hypomethylierten hnRNP K führen würde, sollte durch die Koexpression von PRMT1 eine hinreichende Methylierungsaktivität sichergestellt werden. Die Arginin-Glycin-Variante von hnRNP K sollte grundsätzlich nicht methylierbar sein und die Notwendigkeit der Argininreste für die Lokalisation aufzeigen. Die transfizierten Zellen wurden mittels Immunfluoreszenz gegen hnRNP K, PRMT1 und Tubulin untersucht (Abschn. 4.1).

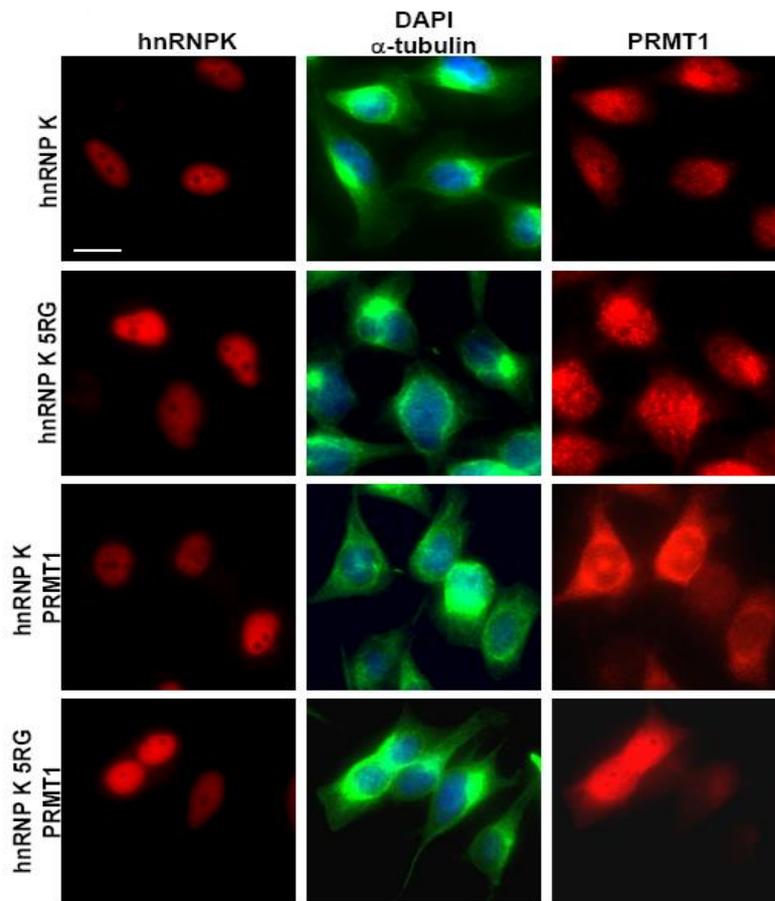


Abb. 2-2 Nukleäre Lokalisation von hnRNP K in HeLa-Zellen

Auf Deckgläschen kultivierte HeLa-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die links angegebenen Proteine für 48 h transfiziert, mit Formaldehyd fixiert und mit Triton-X 100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit oben angegebenen primären Antikörpern gegen hnRNP K (Matritec), PRMT1 und Tubulin (F13) inkubiert und die primären Antikörper mit fluoreszierenden sekundären Antikörpern detektiert. hnRNP K wurde indirekt Cy3 (rot), PRMT1 Cy5 (infrarot) markiert und Tubulin indirekt mit Fluorescein (grün) markiert. Das Kernkompartiment wird durch DAPI-Färbung angezeigt.

Wie in Abb. 2-2 zu sehen ist, zeigt nicht jede HeLa-Zelle ein Immunfluoreszenzsignal für hnRNP K. Durch die Transfektion mit Expressionsplasmiden ist die Konzentration des heterologen Proteins in den einzelnen Zellen sehr verschieden. Für die Immunfluoreszenzen wurden die Zellen ausgewählt, deren heterolog exprimiertes hnRNP K deutlich über dem des endogenen hnRNP Ks lagen und somit der Einfluss der einzelnen Varianten vor dem Hintergrund des endogenen Proteins untersucht werden kann. In allen Zellen, in denen eine hnRNP K-Färbung zu sehen ist, ist diese auf den Nucleus mit Aussparungen der Nucleoli beschränkt. Die Koexpression von PRMT1 mit hnRNP K ändert die nukleäre Gleichgewichtslagerung nicht (dritte Bildreihe Abb. 2-2). Damit führt die starke Überexpression entweder nicht zu einer Hypomethylierung des hnRNP K oder das Fehlen der Methylgruppen hat keinen Einfluss auf die zelluläre Lokalisation des Proteins. Auch die hnRNP K5RG-Variante weist die typische nukleäre Lokalisation auf, obwohl diese Variante nicht wesentlich methyliert sein s (Abb. 2-2). Weil auch das Fehlen der unter normalen Umständen methylierten Arginine keine

Änderung der Gleichgewichtsverteilung hervorruft, ist die Bedeutung der Methylierung dieser Arginine für die Lokalisation von hnRNP K mutmaßlich gering.

2.1.3 Argininmethylierung und Serinphosphorylierung von hnRNP K in HEK-Zellen

Die Lokalisation von hnRNP K hängt maßgeblich von den bereits erwähnten NLS- und KNS-Sequenzen ab (Abschn. 1.2.1). Allerdings wurde in *human embryonic kidney* (HEK-) 293-Zellen nach einer Serumstimulation oder der Überexpression einer konstitutiv aktiven *extracellular-signal regulated*-Kinase (ERK) eine starke zytoplasmatische Anreicherung von hnRNP K beobachtet. Die Untersuchung potenzieller Phosphorylierungsstellen durch Aminosäure-Austauschvarianten führte zur Identifizierung zweier durch ERK phosphorylierter Serine, S284 und S353 (Habelhah *et al.*, 2001b). Interessanterweise liegt das Serin 284 in unmittelbarer Nähe zu dem methylierten Arginin 286. Damit stellte sich die Frage, ob die zytoplasmatische Lokalisation, nach Phosphorylierung an Serin 284, von der Argininmethylierung hnRNP Ks abhängig ist. Daher sollte die zytoplasmatische Akkumulation, wie sie in (Habelhah *et al.*, 2001b) gezeigt wurde, rekapituliert werden. Dazu wurden Expressionsvektoren kloniert, die für eine N-terminale Hämagglutinin-(HA) Fusion der hnRNP K-Varianten kodieren (Abschn. 4.2.2). Das HA-Peptid kann zur Detektion der heterolog exprimierten Proteine verwendet werden, ohne gleichzeitig das endogene Protein nachzuweisen.

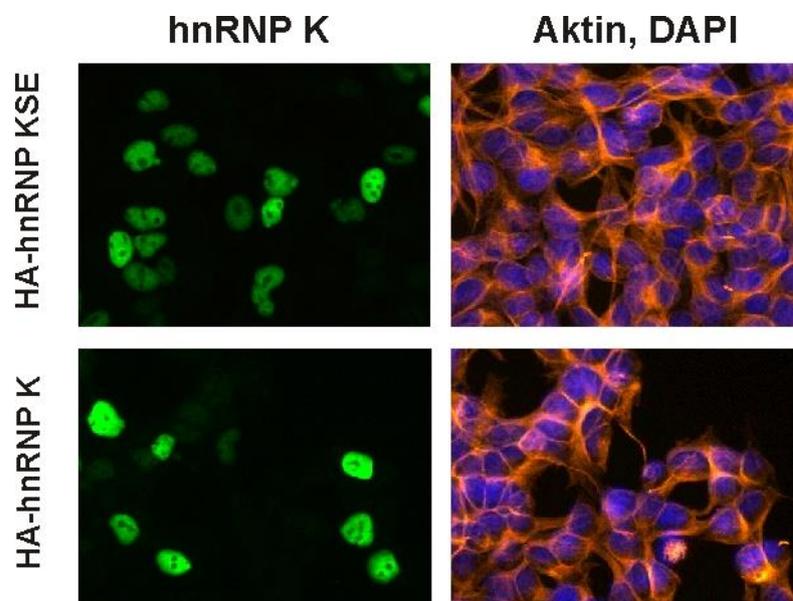


Abb. 2-3 Nukleäre Lokalisation der Phosphomimikry-Variante hnRNP K S284/353E

Auf Deckgläschen kultivierte HEK 293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für das HA-hnRNP K oder HA-hnRNP K S284/353E transfiziert, nach 48 h mit Formaldehyd fixiert und mit Triton-X 100 permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit Antikörpern gegen das HA-Peptid inkubiert und der primäre Antikörper mit Fluorescein-gekoppeltem sekundären Antikörpern detektiert. hnRNP K wurde indirekt mit Fluorescein (grün) markiert, F-Aktin wurde mittels TRITC-Phalloidin (Orange) angefärbt. Das Kernkompartiment wird durch DAPI-Färbung (blau) angezeigt.

Abb. 2-3 zeigt die Lokalisation der Serin-Glutamat-Mutante (S284/353E; KSE) in transfizierten HEK 293-Zellen. Der immunologische Nachweis dieser Phosphomimikry-Variante zeigt wider Erwarten eine starke nukleäre Akkumulation mit kaum nachweisbaren zytoplasmatischen Signalen für hnRNP K.

Um endogenes ERK zu aktivieren, wurde ein Serum *starvation-stimulation*-Experiment durchgeführt. HEK 293-Zellen wurden für 12 h in serumfreiem Medium kultiviert (*starvation*) bevor sie erneut mit serumhaltigem Medium versetzt wurden (*stimulation*, (Habelhah *et al.*, 2001b)). Lokalisationsstudien des endogenen hnRNP K, sowie überexprimierter HA-hnRNP K-Varianten nach 5, 10, und 30 Minuten der Serum-Stimulation führten ebenfalls nicht zum Nachweis eines signifikanten zytoplasmatischen Signals für hnRNP K (nicht gezeigt). Die Lokalisationsstudien der Serin-Glutamat-Variante wurden auch in HeLa-Zellen und mit N- und C-terminalen GFP-Fusionen in HeLa- und HEK 293-Zellen durchgeführt (nicht gezeigt). Es konnte in keinem Fall eine zytoplasmatische Lokalisation nachgewiesen werden. Die Phosphorylierung nach ERK-Aktivierung oder Pseudophosphorylierung durch Serin-Glutamat-Austausche ist somit nicht hinreichend für eine Verschiebung der Gleichgewichtslokalisation. Der Untersuchung eines möglichen Einflusses der Argininmethylierung auf die zytoplasmatische Lokalisation hnRNP Ks nach ERK-Aktivierung konnte somit nicht nachgegangen werden.

Im Rahmen der durchgeführten Lokalisationsstudien konnte kein Einfluss der Argininmethylierung hnRNP Ks auf die zelluläre Lokalisation nachgewiesen werden.

2.2 Reinigung endogenen hnRNP Ks aus ES^{+/+} und ES^{-/-} Zellextrakten

Um die Funktion des hnRNP Ks in Abhängigkeit von seiner Argininmethylierung zu untersuchen, wurde eine Reinigung aus ES-Zellen durchgeführt. Weil hnRNP K in den ES^{-/-}-Zellen nicht methyliert vorliegt (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006) und mit der ES^{+/+}-Zelllinie eine vergleichbare Quelle für methyliertes hnRNP K zu Verfügung steht, können die daraus gereinigten Proteine direkt auf funktionale Unterschiede hinsichtlich ihres Methylierungsstatus untersucht werden. Dazu wurden TritonX 100-Extrakte von ES^{+/+}-Zellen und ES^{-/-}-Zellen präpariert. Anschließend wurden die Extrakte sukzessive über einen Anionenaustauscher, Kationenaustauscher, Hydroxylapatit und Blaue Sepharose so weit fraktioniert, dass eine ausreichende Reinheit hnRNP Ks erzielt wurde (Abb. 2-4, Abschn. 4.4.1).

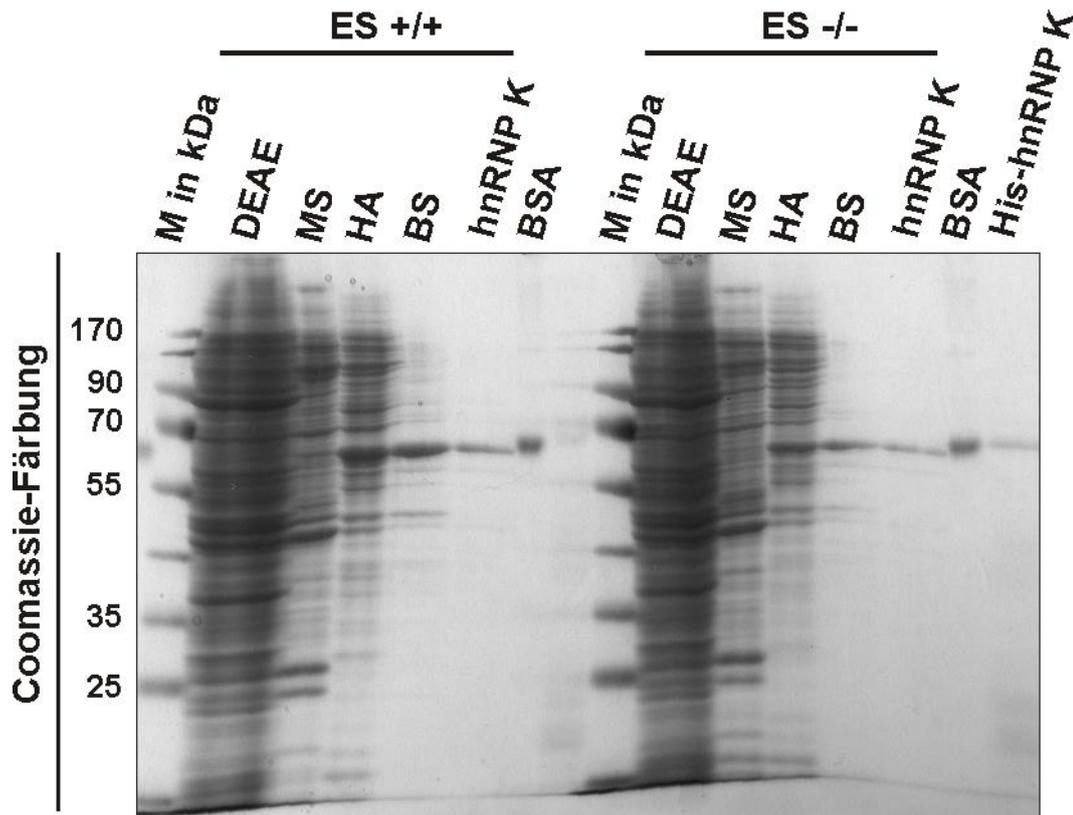


Abb. 2-4 Reinigung von methyliertem und nicht methyliertem hnRNP K aus ES-Extrakten

SDS-PAGE-Analyse von 10 μ l der für die jeweiligen Chromatographien eingesetzten Fraktionen sowie 500 ng gereinigter Proteine (BSA, hnRNP K, His-hnRNP K). Chromatographie-Matrizen; DEAE: Diethylaminoethyl-Sepharose, MS: MacroprepS, HA: Hydroxylapatit, BS: Blaue Sepharose. M: Marker in kDa.

Die finale Fraktion beinhaltete zum überwiegenden Teil hnRNP K und war frei von nachweisbaren Kontaminationen durch Nukleinsäure. Die Analyse der Fraktionierung gestaltete sich aufgrund eines fehlenden, quantifizierbaren Aktivitätstestes schwierig und wurde deswegen mit Hilfe der Western Blot-Analyse und des UV-*cross linking* durchgeführt. Die Reinigungstabelle (Abschn. 4.4.1) zeigt die 600-700-fache Anreicherung des Proteins im Verlauf der Fraktionierung. Auffällig sind die hohen Verluste nach der Fraktionierung über der „Blauen Sepharose“, die auf irreversible Adsorption an der Sepharosematrix zurückzuführen sind. Auf eine Konzentrierung des Proteins nach der „Blauen Sepharose“-Chromatographie wurde aus technischen Gründen verzichtet. Die Konzentration der Proteinlösung wurde mit Hilfe einer BSA-Kalibriertitration mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung densitometrisch bestimmt. Die Argininmethylierung wurde qualitativ mittels Western Blot-Analyse der gereinigten Proteine nachgewiesen. Dabei wurde ein monoklonaler Antikörper (3D1, Abschn. 4.3.2) benutzt, der spezifisch nicht methyliertes hnRNP K erkennt (Abb. 2-5, (Naarmann *et al.*, 2008)).

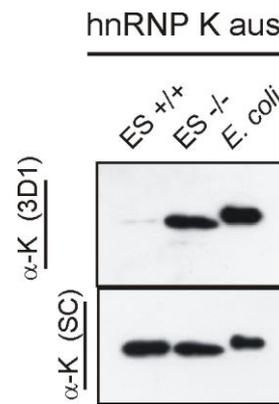


Abb. 2-5 Western Blot-Analyse des Methylierungsstatus von hnRNP K

50 ng der aus Extrakt gereinigten Proteine sowie rekombinantes hnRNP K wurden mittels Western Blot mit den angegebenen Antikörpern detektiert. 3D1: monoklonaler Antikörper spezifisch für nicht methyliertes hnRNP K, SC: polyklonaler Antikörper gegen den N-Terminus von hnRNP K.

Abb. 2-5 zeigt die starke Diskriminierung der gleichen Mengen (unteres Bild) an hnRNP K aus den zwei verschiedenen Zelllinien durch den monoklonale Antikörper 3D1. Somit kann von einem signifikant verschiedenen Methylierungsstatus der Proteine ausgegangen werden.

2.2.1 Bindungsstudien mit den aus ES-Zellen gereinigten hnRNP K-Fractionen

Die Funktionalität der aus ES^{+/+}- und ES^{-/-}-Zellen gereinigten Proteine hnRNP K^{+/+Met} und hnRNP K^{-/-Met} wurde anhand der Nukleinsäurebindung untersucht. Dazu diente als RNA-Ligand ein Teil der r15-LOX-3'UTR, das DICE (Abschn. 1.3.5 (Ostareck *et al.*, 1997)). Die durch In-vitro-Transkription synthetisierte, ca. 240 nt lange und [³²P]-markierte RNA, wurde zusammen mit dem aus ES-Zellen gereinigten hnRNP K in einem Filterbindungsexperiment eingesetzt (Abschn. 4.3.5). Abb. 2-6 zeigt die Bindungsisotherme des methylierten und des nichtmethylierten hnRNP Ks. Der apparente K_D -Wert ($K_{0,5}$) liegt im niedrigen, nanomolaren Konzentrationsbereich (~ 1 nM). Auffällig ist die systematische Abweichung der Datenpunkte von einem bimolekularen Bindungsmodell, welches durch die blaue Anpassungskurve dargestellt ist. Für eine bessere Beschreibung der Datenpunkte wurde eine multiple Assoziation der Proteine an die repetitive DICE-RNA in Erwägung gezogen und die Anpassung mit einer Gleichung für höhermolekulare Reaktionen nach Hill durchgeführt. (Abb. 2-6 (Hill, 1910)).

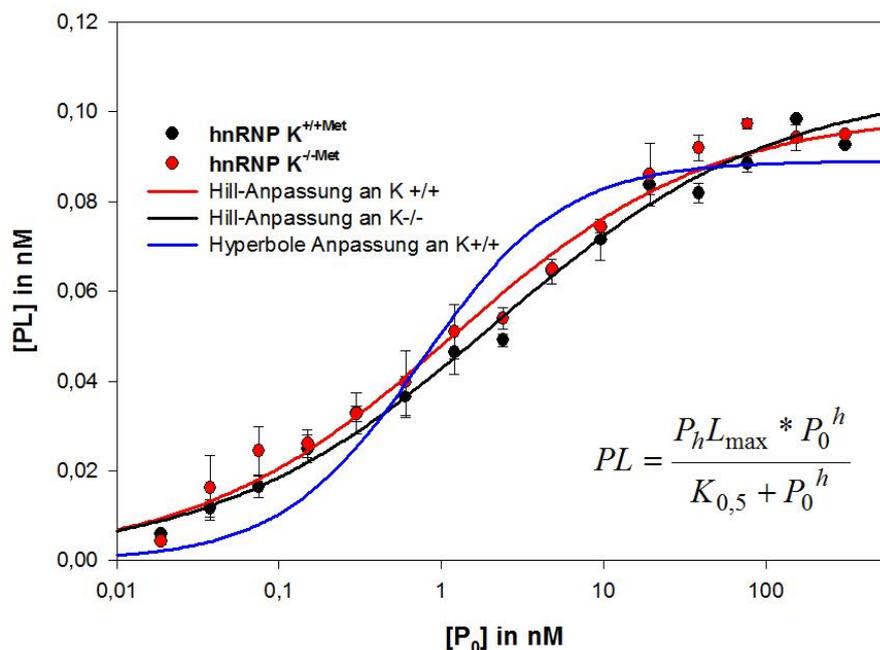


Abb. 2-6 Filterbindungsexperiment mit hnRNP K aus ES-Zellen

Die gereinigten Proteine wurden in 20 mM Tris-HCl pH 8,0^{20°C}, 100 mM KCl, 5% Glycerin und 50 µg/ml BSA mit 0,15 nM [³²P]-markierter DICE-RNA vorinkubiert und anschließend durch einen Nitrocellulosefilter gesaugt. Die retardierte RNA wurde mittels Flüssigszintillation vermessen. Abgebildet ist der Mittelwert aus 3 unabhängigen Experimenten. P₀=hnRNP K aus ES^{+/+} oder ES^{-/-}, PL=Komplex aus RNA und Protein, Hill-Gleichung unten rechts. Tabelle mit den ermittelten Parametern in Abschn. 4.3.5.

Obwohl eine Mehrfachbindung mit dem Filterbindungsexperiment nicht zu messen ist, weil der RNA-Ligand bereits durch ein assoziiertes Protein auf dem Filter retardiert wird, soll die Anpassung nach Hill die Interpretation der Daten erleichtern. Der Parameter *h*, auch als Hill-Koeffizient bezeichnet, liegt für beide Filterbindungsexperimente unter dem theoretischen Minimum von 1 und zeigt an, dass die Bindungsisotherme flacher verläuft, als es einem einfachen Bindungsmodell entspricht. Dies kann auf zwei unabhängige Gründe zurückgeführt werden. (i) Im höheren Konzentrationsbereich führt eine Mehrfachbindung von Proteinen an den RNA-Liganden zu einer stärkeren Retardierung der RNA auf dem Filter. Daraus folgt eine scheinbar konzentrationsabhängige Erhöhung der maximalen Komplexmenge ($P_h L_{\max}$). (ii) Im niedrigen Konzentrationsbereich deutet der flache Kurvenverlauf auf eine Zunahme an Aktivität mit steigender Verdünnung. Das ist genau dann der Fall, wenn das Protein reversibel aggregiert. Unter diesen Umständen führt die Verdünnung des Proteins zur Dissoziation der Aggregate und damit zur scheinbaren Erhöhung der Aktivität. Der Einfluss der Ionenstärke und die Reversibilität der Aggregation werden im Abschnitt 2.3.2 beschrieben. Abgesehen von dem ungewöhnlichen Verhalten der Proteine wird deutlich, dass beide Datenreihen des Filterbindungsexperimentes nahezu perfekt aufeinander liegen. Das heißt, die Argininmethylierung hat keinen Einfluss auf die Affinität des hnRNP K zur DICE-RNA.

2.3 Präparation von rekombinantem und methyliertem hnRNP K

Die Reinigung von hnRNP K aus Extrakten hat gezeigt, dass es nur unter hohem zeitlichem und ökonomischem Aufwand möglich ist, substanzielle Mengen an methyliertem Protein zu präparieren. Des Weiteren benötigen viele der Standard-Analysemethoden der Biophysik weit größere Proteinmengen als die, die durch eine Präparation aus Säugerezell-extrakt erzielt werden können. Daher wurden mehrere andere Möglichkeiten der Präparation in Betracht gezogen. Prinzipiell sind zwei Ansätze denkbar. Zum einen die In-vitro-Methylierung von rekombinantem Substrat durch rekombinantes PRMT1, zum anderen die Methylierung des Substratproteins in *E. coli* durch Koexpression von hnRNP K und PRMT1. Die In-vitro-Methylierung hat den Nachteil, dass eine erneute Reinigung der Proteine nach der Methylierung nötig ist und bei jedem neuen Reaktionsansatz eine vollständige Methylierung nachgewiesen werden muss. Des Weiteren dauert die In-vitro-Methylierung aufgrund geringer spezifischer Aktivitäten der Methyltransferasen oft mehrere Stunden (Kolbel *et al.*, 2009) und stellt damit besondere Ansprüche an die Reinheit und Stabilität der verwendeten Proteine.

Bei der Präparation von methyliertem Protein aus *E. coli* kann exakt dem Reinigungsprotokoll des unmodifizierten Proteins gefolgt werden, ohne das zusätzliche Präparationsschritte nötig wären. Zudem wird in *E. coli* permanent SAM synthetisiert und das inhibitorische SAH metabolisiert. In *E. coli* gibt es keine PRMTs. Deshalb wurde die Koexpression von PRMT1 und hnRNP K zur Präparation von methyliertem hnRNP K getestet. Dazu wurde ein bicistronisches Expressionskonstrukt kloniert, das die Synthese von Enzym (PRMT1) und Substrat (hnRNP K) von einer mRNA erlaubt. Um die Wirksamkeit der Methode zu testen, wurde das einzeln oder mit PRMT1 koexprimiertes hnRNP K gereinigt und einer In-vitro-Methylierung unterzogen. Dabei wurde der Einbau von radioaktiven Methylgruppen durch PRMT1 in das Substratprotein gemessen (Abschn. 4.3.6). Je geringer der Methylierungsstatus des in zuvor *E.coli* methylierten hnRNP K war, desto mehr radioaktiv markierte Methylgruppen konnten *in vitro* übertragen werden. Die In-vitro-Methylierung des koexprimierten hnRNP K wies immer noch 60% der maximalen Methylierungsmenge des unmodifizierten hnRNP K auf, und war somit lediglich zu 40% methyliert (nicht gezeigt). Ein aus einer physiologischen Quelle gereinigtes hnRNP K sollte kaum noch *in vitro* methyliert werden können und damit im Vergleich zu einem rekombinanten hnRNP K eine um über 90% verminderte Methylierbarkeit zeigen (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

Um eine effizientere Methylierung zu gewährleisten, wurde zum einen versucht, das Expressionsverhältnis von Enzym zu Substrat zu Gunsten des Enzyms zu verschieben, indem in das bicistronische Expressionskonstrukt ein zweites ORF (Cistron) für PRMT1 kloniert wurde (Abb. 2-7).

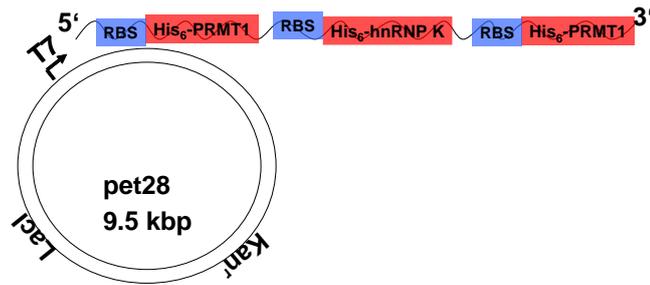


Abb. 2-7 Tricistronisches Expressionskonstrukt für ^{Met}hnRNP K

Schematische Darstellung des pet28-Koexpressionsvektors sowie der resultierenden mRNA für die Präparation von methyliertem hnRNP K. T7: Transkriptinsstart, Kan^r: Kanamycin-Phosphotransferase-Gen, LacI: Lac-Repressor-Gen, RBS: Shine-Dalgarno-Sequenz.

Zum anderen wurde der geringen spezifischen Aktivität der Methyltransferase Rechnung getragen, indem sowohl der Einfluss der Syntheszeit der Proteine, als auch einr nachfolgenden Inkubationszeit auf den Methylierungsstatus des hnRNP K untersucht (Abb. 2-8). Das Abstoppen der Translation durch Erythromycin verhindert die konstitutive Neusynthese von hnRNP K und sollte PRMT1 genügend Zeit verschaffen, um eine quantitative Methylierung des gesamten hnRNP Ks zu ermöglichen (Abschn. 4.3.6). Das gereinigte hnRNP K wurde nachfolgend auf den Methylierungsstatus untersucht. Abb. 2-8C zeigt die Quantifizierungen der Methylierungsreaktionen der durch unterschiedliche Expressionsbedingungen erhaltenen hnRNP K-Präparationen. Als Vergleich dient das nicht-methylierte hnRNP K, welches die maximale Methylierbarkeit anzeigt. Vergleicht man die Präparationen mit unterschiedlicher Syntheszeit und gleichlanger Nachinkubation, wird lediglich eine leichte Verbesserung der endogenen Methylierung mit zunehmender Syntheszeit erreicht. Die entscheidende Verbesserung wird durch die posttranslationale Inkubation erreicht. Mit dieser Methode kann eine Methylierungseffizienz von über 95% erzielt werden (Abb. 2-8C). Damit ist die Präparation von methyliertem hnRNP K (^{Met}hnRNP K) mit praktisch dem gleichen Aufwand möglich, wie die des rekombinanten nicht-methylierten Proteins. Es bleibt aber noch zu prüfen, ob die methylierten Arginine denen des Proteins aus HeLa-Zellextrakt entsprechen (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

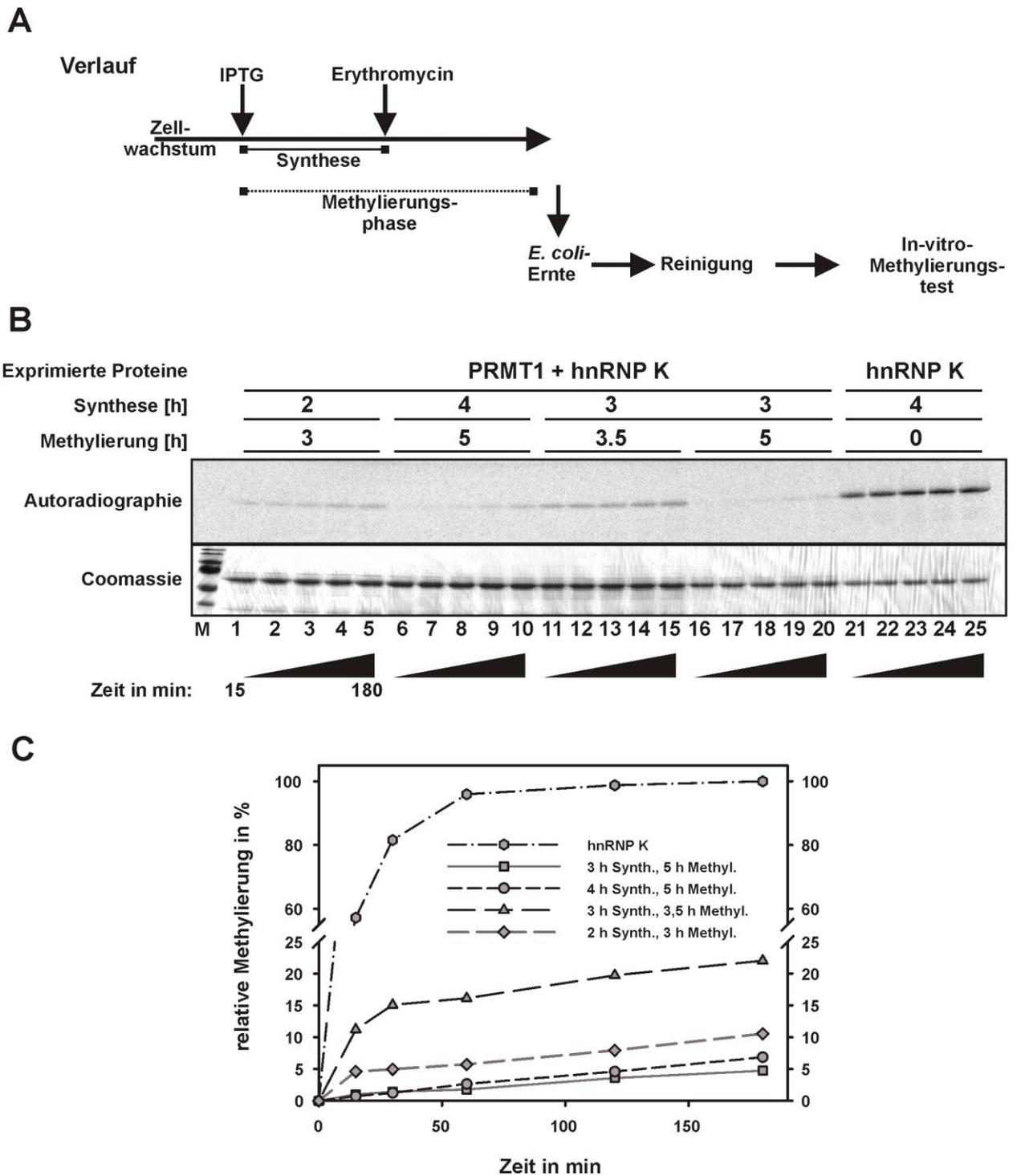


Abb. 2-8 Ko- und posttranslationale Methylierung von hnRNP K in *E. coli*

A) Verlaufsschema der Testexpression. B) Das tricistronische Expressionskonstrukt wurde in *E. coli* BL21-Zellen transformiert und die Synthese der Zielproteine durch Zugabe von IPTG induziert. Die zelluläre Proteinsynthese wurde durch Zugabe von Erythromycin nach den angegebenen Zeitpunkten gestoppt und die Zellkultur bis zum Ernten weiter inkubiert (Methylierung). HnRNP K wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt und für eine In-vitro-Methylierungskinetik verwendet. Dargestellt sind die Coomassie gefärbten Proteine sowie das Autoradiogramm der $[^{14}\text{C}]$ -markierten Proteine. C) Quantifizierung der Autoradiographie.

2.3.1 Analyse des Methylierungsstatus des rekombinanten hnRNP K

Um auf eine größere Menge einheitlich methylierten hnRNP Ks zurückgreifen zu können, wurde die Expression in einem Fermenter durchgeführt (Abschn. 4.4.3). Dabei wurden die Expressionsbedingungen weitgehend an die der Schüttelkolbenexpression mit der höchsten Methylierungseffizienz angepasst. Die Expressionskultur wurde bis zu einer OD_{600} von 30 angezogen und die Synthese der rekombinanten Proteine mit IPTG gestartet. Nach 4 h wurde der Ansatz mit 30 mg/l Erythromycin versetzt und nach weiteren 2 h wurde die Kultur geerntet. Dabei wurde eine Feuchtmasse von ca. 500 g *E. coli*-Zellen erhalten. Das methylierte hnRNP K wurde gereinigt (Abschn. 2.3.2, Abschn. 4.4.4) und die Effizienz der In-vivo-Methylierung mit Hilfe des In-vitro-Methylierungstests bestimmt (Abb. 2-9).

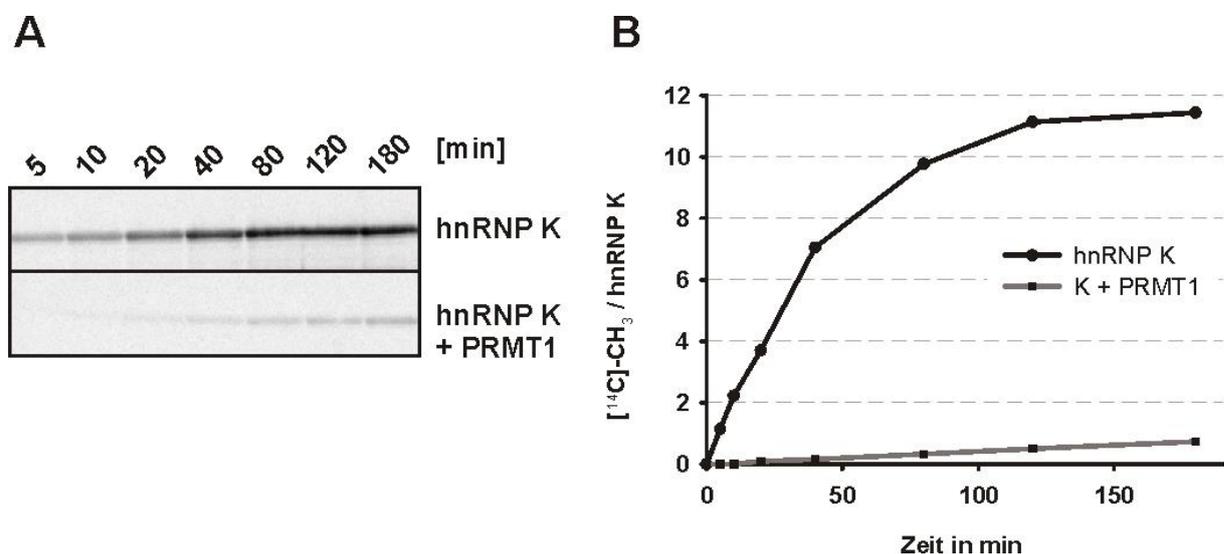


Abb. 2-9 Methylierungsstatus der Fermenterpräparation des ^{Met}hnRNP K

A) hnRNP K wurde aus den fermentierten *E. coli* präpariert und ein Methylierungsassay durchgeführt (Abschn. 4.3.6). Nach einer SDS-PAGE-Analyse der Produkte, wurde die eingebaute Radioaktivität ermittelt und mit Hilfe einer Kalibriergeraden an SAM bekannter Konzentration die molare Menge an übertragenen Methylgruppen pro hnRNP K umgerechnet. B) Quantifizierung der Gelanalyse.

Dabei zeigte sich, dass nach 180 min Methylierungszeit nur ca. 6% der maximalen Methylierung erreicht wurde, d. h., dass das nach Koexpression gereinigte Protein zu ca. 94% methyliert ist. Die Quantifizierung der eingebauten Methylgruppen pro Protein, mittels einer [¹⁴C]-SAM-Kalibriergeraden, ergab ca. $11-12 \pm 2$ Methylgruppen pro hnRNP K (Abb. 2-9). Eine Bestimmung der exakten Molmasse mittels MALDI-TOF-MS war nicht möglich, weil das MS-Signal kein klar definiertes Maximum aufwies. Um die methylierten Arginine zu identifizieren, wurde das Protein mit Trypsin hydrolysiert und die Masse der Peptide mittels ESI-MS bestimmt (Henning Urlaub, MPI Göttingen). Bei einer Sequenzabdeckung von 82% konnten die bereits bekannten Arginine 254, 256, 268, 296, 299 als dimethyliert identifiziert werden (Abb. 2-10). Des Weiteren wurden Peptidmassen für methylierte und

nicht methylierte Arginine 271 und 316 gefunden, was auf eine partielle Methylierung dieser Aminosäuren des hnRNP K in *E. coli* hindeutet.

```

1   MGSSHHHHHH  SSSLVPRGSH  MASETEQPEE  TFPNTETNGE  FGKRPAEDME
51  EEQAFKRSRN  TDEMVELRIL  LQSKNAGAVI  GKGGKNIKAL  RTDYNASVSV
101 PDSSGPERIL  SISADIETIG  EILKKIIP TL  EEGLQLPSPT  ATSQLPLESD
151 AVECLNYQHY  KGSDFDCELR  LLIHQSLAGG  IIGVKGAKIK  ELRENTQTTI
201 KLFQECPPHS  TDRVVLIGGK  PDRVVECIKI  ILDLISESPI  KGRAQPYDPN
251 FYDETYDYGG  FTMMEFDRRG  RPVGFPMRGR  GGFDRMPPGR  GGRPMPPSRR
301 DYDDMSPRRG  PPPPPPRGG  RGGSRARNLP  LPPPPPPRGG  DLMAYDRRGR
351 PGDRYDGMVG  FSADETWDSA  IDTWSPSEWQ  MAYEPQGGSG  YDYSYAGGRG
401 SYGDLGGPII  TTQVTIPKDL  AGSIIGKGGQ  RIKQIRHESG  ASIKIDEPLE
451 GSEDRIITIT  GTQDQIQNAQ  YLLQNSVKQY  SGKFF

```

Abb. 2-10 Identifizierung der methylierten Arginine des koexprimierten hnRNP K

Primärstruktur des rekombinanten ^{Met}hnRNP K. Fett gedruckte Sequenzen zeigen die mittels MS-Analyse identifizierten Aminosäuren. Rote und unterstrichene Arginine wurden ausschließlich dimehyliert vorgefunden. Rote Arginine lagen nicht-, mono- sowie dimehyliert vor.

Die durchgeführten Analysen zeigen, dass eine quantitative Methylierung von hnRNP K in *E. coli* möglich ist, die den Methylierungsstatus von eukaryotischem hnRNP K widerspiegelt. Die entwickelte Methodik ermöglicht nun, den Einfluss der Methylierung in vergleichenden In-vitro-Studien mit praktisch nicht limitierten Proteinmengen zu untersuchen.

Während der Präparation des rekombinanten hnRNP Ks wurde eine erhöhte Anfälligkeit für Proteolyse, sowie eine starke, von der Ionenstärke abhängige, Aggregation beobachtet. Für die Interpretation von In-vitro-Experimenten ist es allerdings erforderlich, mit reinem Protein zu arbeiten, dass unter den getesteten Bedingungen weitgehend monodispers vorliegt. Das Erreichen dieser Anforderungen ist nachfolgend dargestellt.

2.3.2 Reinigung von hnRNP K aus *E. coli*

Der ORF von hnRNP K wurde von einem pET19-Vektor (Ostareck *et al.*, 1997) in einen pET28-Vektor subkloniert, um die (His)₁₀-Fusion auf eine (His)₆-Fusion zu verkürzen. Zu Beginn der Arbeit wurde hnRNP K nur in Gegenwart eines Hochsalzpuffers über eine Ni²⁺-NTA-Chromatographie gereinigt und anschließend gegen einen Niedrigsalzpuffer dialysiert. Dabei präzipitierte allerdings ein substantieller Teil des vollständigen Proteins, während Fragmente überwiegend in Lösung blieben. Des Weiteren war die Proteinlösung noch mit Nukleinsäuren kontaminiert. Es musste also eine Reinigungsstrategie entwickelt werden, die 1. lösliches Protein erzielt, 2. die Nukleinsäuren vollständig entfernt, und 3. wie sich im Verlauf der Arbeit herausstellte, eine Dialyse unter Niedrigsalzbedingungen umgeht.

Im Laufe der Studien wurden verschiedene Chromatographiematerialien getestet. Dabei flossen auch

Erkenntnisse von Löslichkeitsstudien (Abschnitt weiter unten) ein, die die Reinigungsstrategie immer weiter verbesserten. Die letztlich angewandte Prozedur war eine Kombination aus mehreren chromatographischen Trennverfahren (Abschn. 4.4.4). Die Ni^{2+} -NTA-Chromatographie wurde in Gegenwart von 1 M KCl durchgeführt. Dabei wurde so lange gewaschen, bis die kontinuierlich gemessene Absorption bei 280 nm (A_{280}) unter 0,2 fiel und damit eine signifikante Reduktion der Nukleinsäurekontamination erreicht wurde. Das Eluat wurde direkt auf eine Hydroxylapatitsäule geladen und auf der Säule auf 150 mM KCl umgepuffert. Das Protein wurde mit einem flachen Phosphatgradienten eluiert. Die vereinten Fraktionen wurden in einem Polypropylengefäß mit 10%iger Saccharose so weit verdünnt, dass die Leitfähigkeit unter $13 \text{ mS/cm}^{(10^\circ\text{C})}$ lag. Diese Lösung wurde auf eine MonoQ[®]-Säule geladen und mit einem linearen KCl-Gradienten eluiert. Der starke Anionenaustauscher bewirkt die Separierung der letzten Nukleinsäurereste von hnRNP K. Das UV-Spektrum zwischen 240 nm und 340 nm zeigt die Abwesenheit von Nukleinsäure, jedoch ist bei einer Salzkonzentration von 0,3 M KCl eine signifikante Extinktion bei 320 nm zu beobachten (Abb. 2-11). Dies deutet auf Aggregation hin.

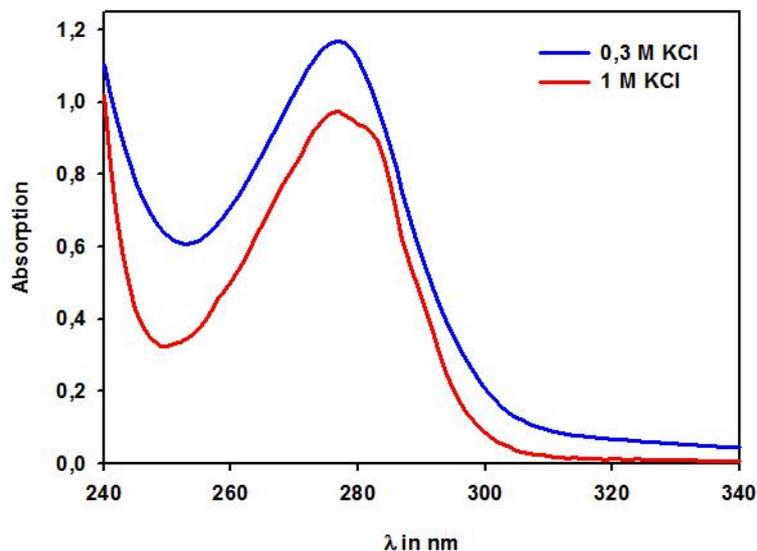


Abb. 2-11 Absorptionsspektrum von hnRNP K

UV-Spektrum einer $22 \mu\text{M}$ hnRNP K-Lösung in 20 mM Tris-HCl pH 8,0^{20°C}, 10% Glycerin und der in der Legende angegebenen KCl-Konzentrationen.

Schon während der Reinigung fiel auf, dass eine hohe Ionenstärke die Aggregation unterdrückt. Um zu untersuchen, ob die Aggregation durch geeignete Substanzen unterdrückt werden kann und ob die Aggregation reversibel ist, wurde die Lichtstreuung einer hnRNP K-Lösung ($0,5 \mu\text{M}$) in Gegenwart unterschiedlicher Substanzen gemessen. Eine monodisperse Proteinlösung eines kleinen Proteins streut das Licht bei 320 nm praktisch nicht. Hingegen streuen Aggregate bei dieser Wellenlänge, selbst wenn sie deutlich kleiner als 320 nm sind (Rayleigh- und Mie-Streuung; (Vogel, 1995)).

Wenn die Ionenstärke einen Einfluss auf die Aggregation hat, so ist es möglich, dass auch andere Substanzen auf das Aggregationsverhalten von hnRNP K einwirken. Eine wesentliche Komponente einer Proteinlösung ist die pH-Puffersubstanz. HEPES, Tris, MES, Borsäure und TAPS wurden bei pH 8^{20 °C}, je 20 mM, als pH-Puffer getestet und zeigten unterschiedlichen Einfluss auf das Aggregationsverhalten von hnRNP K. Tris führte dabei zu den geringsten Streuwerten (nicht gezeigt). Ein Komplexpuffer, der die individuellen physikochemischen Einflüsse ausmittelt, wurde aus MES, HEPES, Tris und Borat hergestellt und pH-Werte zwischen 9,0 und 7,0 getestet (Abb. 2-12). Dabei ist eine klare Tendenz zu erkennen: je basischer die Lösung, desto geringer ist die Aggregation.

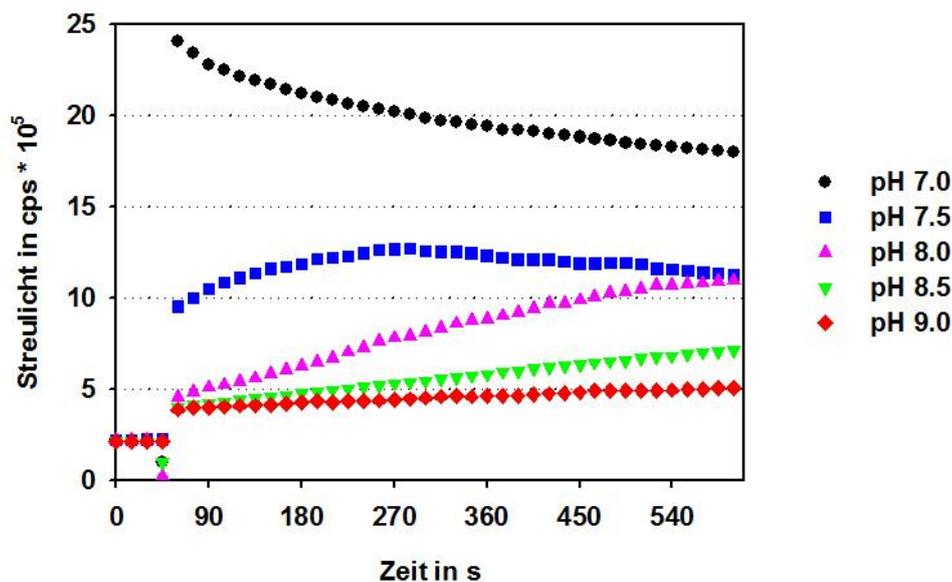


Abb. 2-12 pH-Abhängigkeit der Aggregation von hnRNP K

Lichtstreuung einer 0,5 μ M hnRNP K-Lösung im Komplexpuffer aus MES, HEPES, Tris und Borsäure der angegebenen pH-Werte. In eine Fluoreszenzküvette mit 2 ml des gerührten Puffers aus 150 mM KCl, 10% Glycerin und des Komplexpuffers, mit jeweils 15 mM der Einzelkomponenten, wurde nach 45 s die Proteinlösung zugegeben und für weitere 515 s die Lichtstreuung im rechten Winkel zum einfallenden Licht der Wellenlänge 320 nm detektiert.

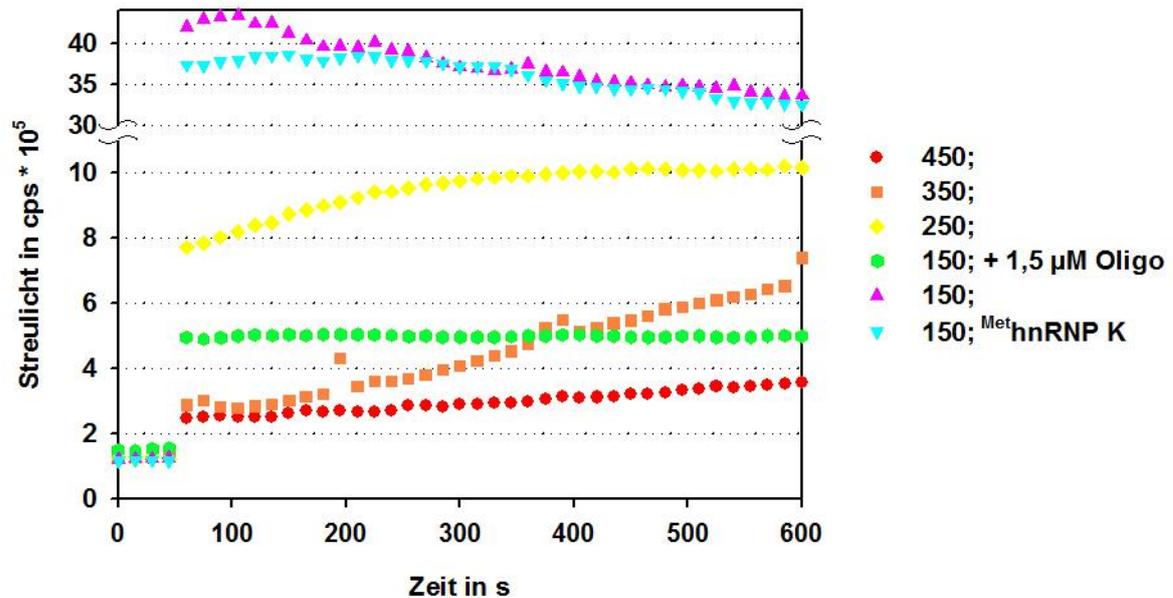


Abb. 2-13 Einflüsse der Ionenstärke und Nukleinsäure auf die Aggregation von hnRNP K

Lichtstreuungsmessung wie in Abb. 2-12. Der Puffer bestand aus 20 mM Tris-HCl pH 8.0^{20°C}, 10% Glycerin und den in der Legende angegebenen KCl-Konzentrationen sowie gegebenenfalls weiteren Additiven. Oligo: 38 nt langes Desoxyoligonukleotid der Sequenz von d2R (Tabelle 2-2), Gua-HCl: Guanidinium-Hydrochlorid, Zitat: Trikaliumzitat. Wenn nicht anders angegeben, wurde hnRNP K benutzt.

Die KCl-Konzentration zeigt ebenfalls eine klare Tendenz: je mehr Salz in der Lösung vorliegt, desto weniger Aggregate lassen sich beobachten (Abb. 2-13). Des Weiteren wurden verschiedene Zusätze getestet, wie z. B. Malonat, Glutamat, Harnstoff, Succinat, Phosphat, Arginin. Dabei zeigten organische Säuren einen positiven Effekt, der bei Zitat und EDTA am größten war (Abb. 2-14 und nicht gezeigt). Da eine Ultrazentrifugation bei 300 mM KCl, 50 mM Zitat, 20 mM Tris-HCl pH 8.0^{20°C}, 10% Glycerin noch eine signifikante Aggregation zeigte, wurden auch Glukose, Fruktose, Saccharose, Trehalose, Galaktose und Maltose als Zusatz getestet. Es stellte sich heraus, dass Saccharose der Aggregation am stärksten entgegen wirkte (nicht gezeigt, Moritz *et al.*, 2014).

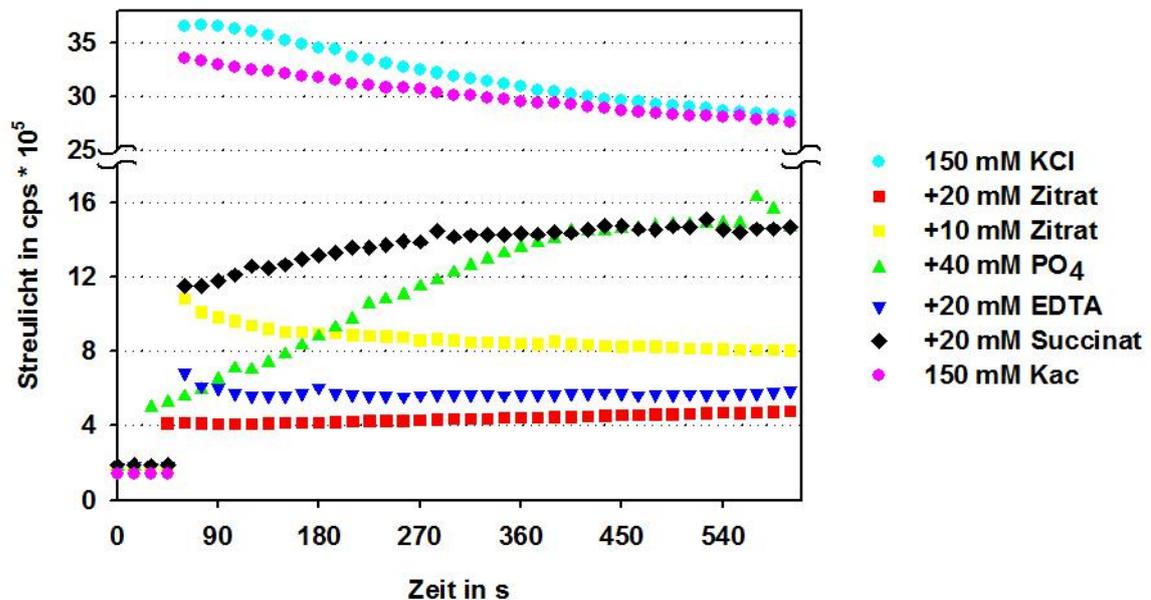


Abb. 2-14 Organische Säuren vermindern die Aggregation von hnRNP K

Lichtstreuungsmessung wie in Abb. 2-12. Der Puffer bestand, wenn nicht anders angegeben, aus 150 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0^{20°C}, 10% Glycerin und den angegebenen Zusätzen. Zitrat: Trikaliumzitrat, PO₄: K₂HPO₄, Succinat: Dikaliumsuccinat, Kac: Kaliumacetat.

In einem Sedimentations-Geschwindigkeitsexperiment konnte monodispers sedimentierendes hnRNP K in 300 mM KCl, 50 mM Zitrat, 20 mM Tris-HCl pH 8.0^{20 °C}, 10% Saccharose, nachgewiesen werden (Abschn. 2.3.3). In Gegenwart von 10% Saccharose, 300 mM KCl und 20 mM TrisHCl pH 8,0 konnte unter einer Konzentrationen von 0,5 mg/ml hnRNP K auch auf Zitrat verzichtet werden und immer noch monomeres Protein in Lösung nachgewiesen werden. Die Reversibilität der Aggregation konnte erneut in einem Lichtstreuexperiment nachgewiesen werden, in dem, nach der Beobachtung einer deutlichen Aggregation in Niedrigsalzpuffer, durch Zugabe von KCl die Lichtstreuung drastisch reduziert werden konnte (Abb. 2-15). Die signifikante Reduktion der Lichtstreuung konnte nicht durch die Verdünnung nach Zugabe der KCL-Lösung erklärt werden, sondern zeigt das Auflösen der Aggregate an.

Diese Reversibilität der Aggregation zeigt sich auch während der Reinigung des hnRNP Ks, denn dabei werden äußerst ungünstige Puffer-Bedingungen (150 mM KCl, 20 mM Imidazol pH 8.0^{20 °C}, 10% Saccharose) durchlaufen, unter denen das Protein mutmaßlich aggregiert vorliegt. Dennoch kann anschließend im Hochsalzpuffer ein monodisperses Protein nachgewiesen werden (Abb. 2-17). Bemerkenswert ist auch die Geschwindigkeit, mit der das Protein aggregiert. Binnen weniger Sekunden hat sich der maximale Lichtstreuwert eingestellt. Der darauf folgende Abfall an Intensität ist vermutlich auf eine Umwandlung der Aggregate von vielen kleinen zu wenigen großen Partikeln zu erklären. Des Weiteren kann die Aggregation durch Nukleinsäure unterdrückt bzw. vermindert werden. In Abb. 2-12 ist der Effekt eines DNA-Oligonukleotides (d2R) gezeigt, dass mit hoher Affinität gebunden wird. Selbst bei 150 mM KCl ist die Lichtstreuung erheblich geringer als ohne dieses Desoxyoligonukleotid.

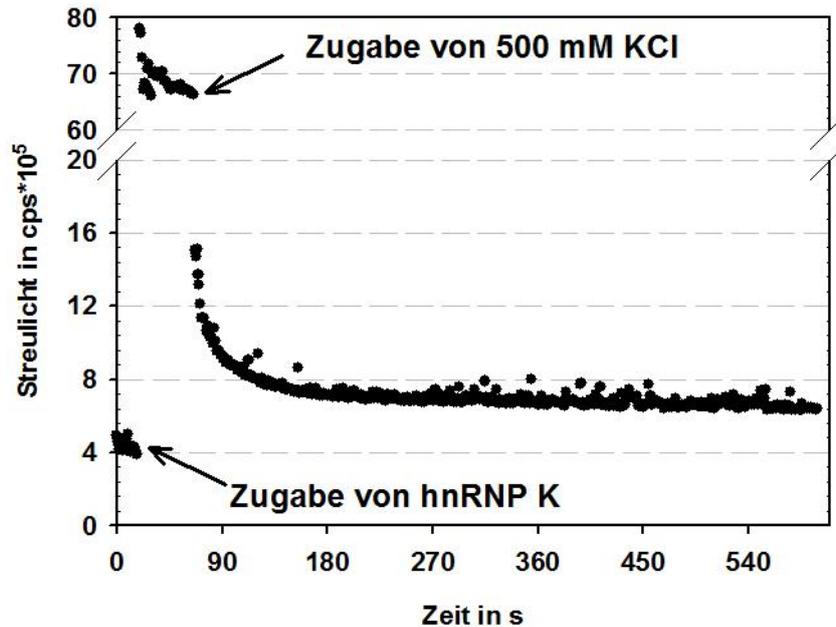


Abb. 2-15 Reversibilität der Aggregation von hnRNP K

Lichtstreuungsmessung wie in Abb. 2-12. hnRNP K wurde in die Niedrigsalzlösung pipetiert (50 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0^{20°C}, 10% Glycerin) und kurz darauf die KCl-Konzentration auf 500 mM erhöht.

Um die Struktur der Aggregate zu untersuchen, die unter Umständen einen Hinweis auf eine geordnete Zusammenlagerung geben kann, wurden elektronenmikroskopische Aufnahmen mit einem Transmissionselektronen-Mikroskop angefertigt (Lodderstedt *et al.*, 2007), Dr. Gerd Hause MLU Halle/Wittenberg)). Die Wellenlänge der Elektronenstrahlen ist so klein, dass Strukturen bis in den nm-Bereich erfasst werden können. Um die Elektronenstrahlen stärker zu streuen, wurde das Kontrastierungsmittel Uranylacetat benutzt. hnRNP K wurde in die unter Abb. 2-16 angegebenen Puffer verdünnt, auf einen Objektträger aufgebracht und mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Dabei ließen sich zwei verschiedene Typen von Aggregaten detektieren: zum einen amorph (c und d), im Puffer mit 300 mM KCl ohne bestimmte Strukturen, zum anderen sphärische Partikel unterschiedlicher Größe (a und b), im Puffer mit 100 mM KCl. Es ist keine einheitliche oder geordnete Struktur zu beobachten. Im Gegenteil, die beobachteten Partikel weisen sehr unterschiedliche Größen auf. Weil die verwendeten Puffer die Aggregation von hnRNP K unterschiedlich stark beeinflussen, wird vermutlich die Partikelform auch durch die Geschwindigkeit der Aggregation beeinflusst. Ob die sphärischen Partikel hohl sind oder ausgefüllt, kann in mit diesem Experiment nicht unterschieden werden. Um sicher zu stellen dass die sphärischen Partikel aus hnRNP K aufgebaut sind, könnte noch ein immunologischer Nachweis des Proteins mit Immuno-Gold-Markierung durchgeführt werden. Weil die beobachteten Strukturen aber keinen Hinweis auf eine geordnete Zusammenlagerung geben, wurden keine weiteren Aufnahmen angefertigt.

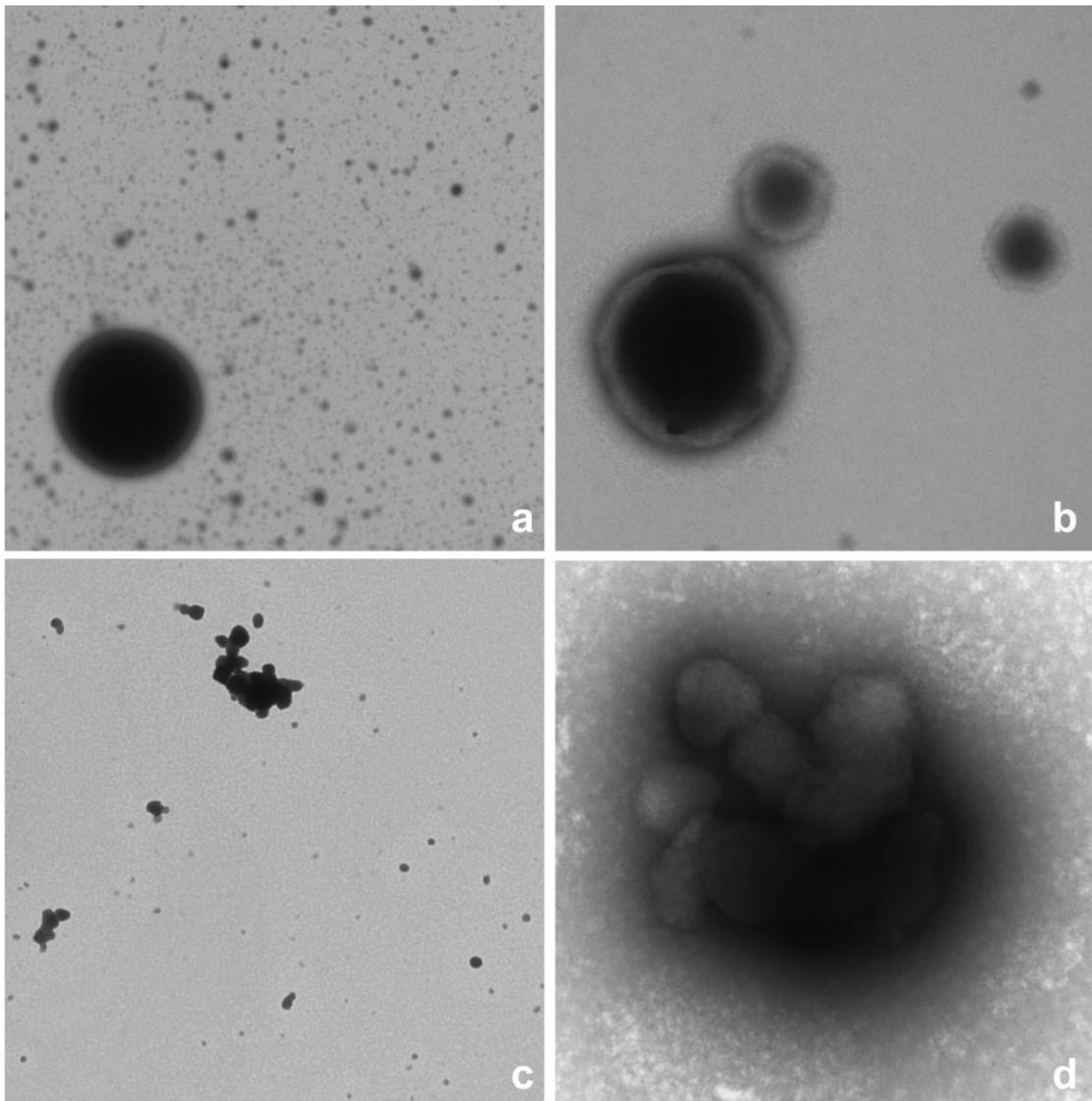


Abb. 2-16 Elektronenmikroskopische Aufnahmen der hnRNP K-Aggregate

HnRNP K wurde aus einer 1 M KCl Lösung entweder in 100 mM KCl, 20 mM HEPES-KOH pH 7,5^{20°C} (a und b) oder 300 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0^{20°C}, 10% Glycerin (c und d) verdünnt, auf einen Objektträger aufgebracht und eine Kontrastierung mit Uranylacetat durchgeführt (Lodderstedt *et al.*, 2007). von Gerd Hause, MLU Halle-Wittenberg.

2.3.3 Ultrazentrifugation zur Bestimmung der nativen Molmasse

Zur Bestimmung der nativen Molmasse und damit indirekt des Oligomerisierungszustandes von Proteinen eignet sich die Ultrazentrifugation, weil sie ohne Hypothesen aus den zwei physikalischen Kräften Zentrifugalkraft und Diffusion die Molmasse direkt bestimmbar macht (Laue, 2001). Durch ein gekoppeltes Sedimentationsgeschwindigkeits-Gleichgewichtszentrifugations-Experiment kann man die native Molmasse, bestimmt durch die Anpassung der Gleichgewichtsverteilung innerhalb der Zentrifugationsküvette, mit dem Sedimentationskoeffizienten (S) korrelieren. Wenn die native Molmasse des Proteins einem monomeren Partikel entspricht, dann korreliert auch der S-Wert strikt mit dem monomeren Protein. Damit ist es möglich, durch Sedimentationsexperimente Aussagen zur

Monodispersität des Proteins in Abhängigkeit der Pufferzusammensetzung zu machen. In einem Gleichgewichtszentrifugations-Experiment mit rekombinantem hnRNP K in Hochsalz-Puffer wich die ermittelte native Molmasse von 52,5 kDa kaum von dem theoretischen Molekulargewicht von 53,3 kDa ab (Abb. 2-17). Damit konnte nachgewiesen werden, dass das Protein unter den gewählten Bedingungen (1 M KCl, 20 mM Tris pH 8,0^{20°C}, 5% Glycerin (w/v), 1 mM DTT) in monomerer Form vorliegt. Das vorgeschaltete Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment ergab einen apparenten S-Wert von ca. 2,3.

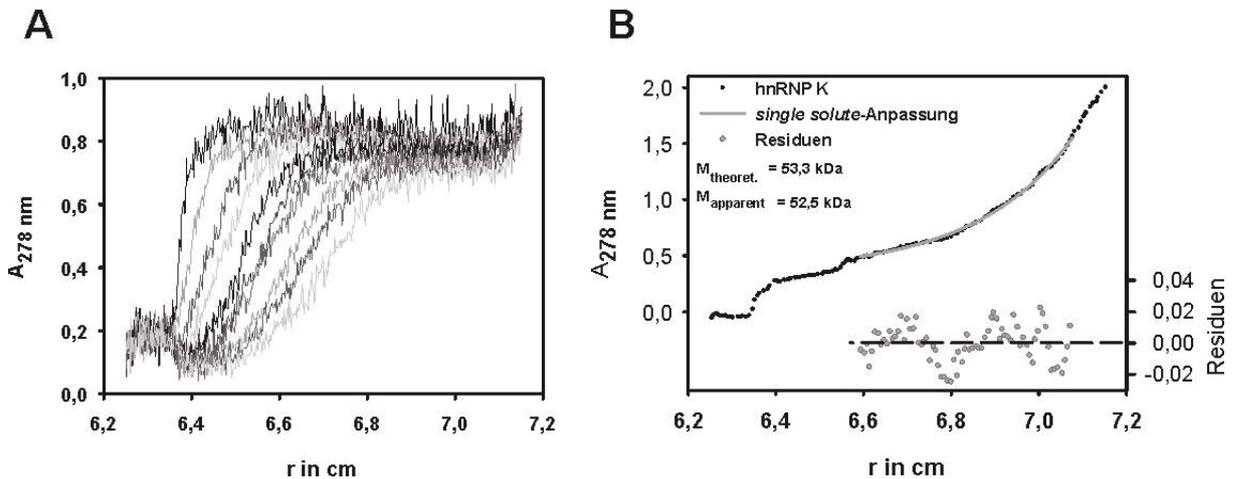


Abb. 2-17 Monomer sedimentierendes hnRNP K

A) 20 μM hnRNP K wurden in 1 M KCl, 20 mM Tris pH 8,0, 5% Glycerin, 1 mM DTT einem Sedimentationsgeschwindigkeits-Experiment ausgesetzt. Absorptionsmessungen bei 278 nm über den Küvettenquerschnitt nach jeweils 10 min bei 40.000 rpm, 20 °C, in einer Beckman XLA. B) Gleichgewichtszentrifugationsexperiment bei 12.000 rpm (Gleichgewicht nach 6 d). Aus dem Kurvenverlauf der Absorption bei 278 nm, wurde mit Hilfe des Programms Sedfit (Schuck, 2004) die native Molmasse bestimmt.

Eine Zentrifugation in 300 mM KCl, 50 mM Zitrat, 20 mM Tris pH 8,0^{20 °C} und 10% Saccharose zeigte die Sedimentation eines monodispersen Partikels mit einem S-Wert um 2,3 (Abb. 2-18).

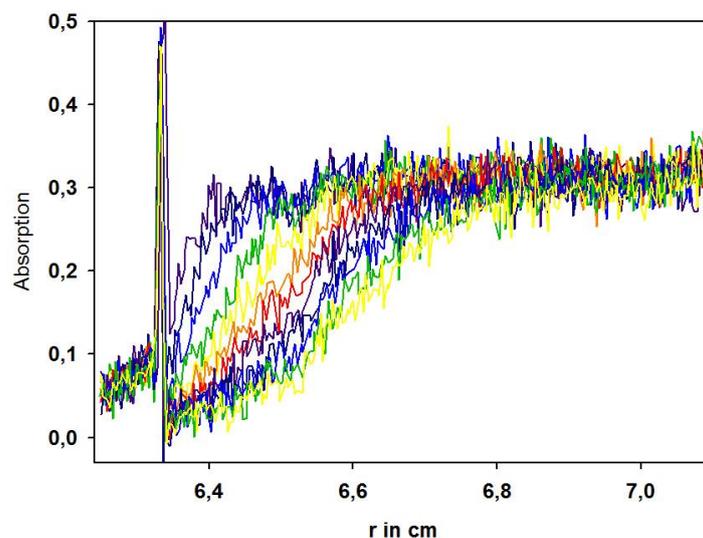


Abb. 2-18 Sedimentation von hnRNP K in optimiertem Puffer

Geschwindigkeitssedimentations-Experiment wie in Abb. 2-17 mit 2 μM hnRNP K in 300 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0^{20°C}, 50 mM Kalium-Zitrat, 10% Saccharose.

Die Löslichkeitsstudien zeigten unter üblichen Pufferbedingungen (150 mM monovalentes Salz, 20 mM Puffersubstanz pH 7-8) aggregiertes rekombinantes hnRNP K, das nur unter speziellen Pufferbedingungen in eine Form überführt werden kann, welche es erlaubt, klassische Gesetze zur Beschreibung von Protein-Interaktionen anzuwenden. Dabei ist die Reversibilität der Aggregation hervorzuheben. Diese erlaubt auch, dass Interaktionspartner Einfluss auf die Aggregation nehmen können. So wurde in Sedimentations-Experimenten beobachtet, dass kleine Domänen, die mit poly-Prolin-reichen Sequenzen interagieren, wie die SH3-Domäne der regulatorischen Untereinheit p85 der Phosphoinositol-3-Kinase (PIK3R1) oder der WW-Domänen des *WW domain binding protein 4* (FBP21) (Bedford *et al.*, 2000), das Verteilungsgleichgewicht von aggregiertem zu löslichem hnRNP K verschieben können (nicht gezeigt, Abschn. 4.4.8). Wie hoch die Affinität der Interaktionsdomänen ist, konnte aus technischen Gründen nicht bestimmt werden. Daher kann auch keine Aussage zur quantitativen Wirkung der Domänen auf die Aggregation getroffen werden.

2.4 Interaktionsstudien

2.4.1 Interaktion des hnRNP K mit Nukleinsäuren

Die inhärente Affinität von hnRNP K zu Nukleinsäuren ist seit seiner Entdeckung bekannt. Qualitative Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Nukleinsäure zeigen eine Präferenz zu Polycytidylaten. Von den drei isolierten KH-Domänen zeigte lediglich die dritte KH-Domäne eine signifikante Wechselwirkung mit Nukleinsäuren (Abschn. 1.2). Für diese Domäne sind sowohl Kristallstrukturen als auch NMR-Strukturen, jeweils mit und ohne Nukleinsäure-Ligand, gelöst worden. Die Strukturdaten zeigen eine spezifische Erkennung dreier konsekutiver Cytidylate. An der vierten Stelle werden vermutlich Pyrimidine toleriert (Backe *et al.*, 2005; Braddock *et al.*, 2002; Sidiqi *et al.*, 2005). Eines der biologischen RNA-Substrate für hnRNP K, die r15-LOX-mRNA, enthält eine große Anzahl an Tetracytidylaten. Für die biologische Funktion der Translationsrepression sind 38 nt (2R) mit 6 Tetracytidylaten, hinreichend (Ostareck *et al.*, 1997). Um Art und Anzahl der Wechselwirkung von hnRNP K mit (pC)₄-reichen RNA-Liganden aufzuklären, wurden Interaktionsstudien mit dem gereinigten vollständigen hnRNP K mit verschiedenen Nukleinsäuren durchgeführt. Für das vollständige hnRNP K sind noch keine K_D -Werte zu hochaffinen RNAs bestimmt worden. Dabei eignet sich die Bestimmung der Gleichgewichtsdissoziationskonstante nicht nur zur Charakterisierung der Affinität von Proteinen zu Nukleinsäuren, sondern kann unter Umständen auch Aufschluss über RNA-vermittelte Protein-Protein-Interaktionen geben. Systematische Abweichungen vom Verlauf der Bindungsisothermen einer bimolekularen Assoziation geben Hinweise auf eine komplexere z.B. kooperative Assoziation (Eftink, 1997).

Wie sich durch die Löslichkeitsstudien aus Abschn. 2.3.2 herausgestellt hat, unterliegt hnRNP K einer reversiblen Aggregation. Damit könnte die scheinbar negative Kooperativität der Wechselwirkung zwischen hnRNP K und der DICE-RNA (Abb. 2-6) auf eine Aggregation zurückzuführen sein, weil die verwendete Ionenstärke niedriger war (100 mM KCl, Abb. 2-6) als für monodisperses hnRNP K notwendig ist. Um den Einfluß der Ionenstärke auf die Abweichung von einer bimolekularen Bindungsisotherme zu untersuchen, wurden Filterbindungsexperimente mit rekombinantem hnRNP K und der DICE-RNA bei unterschiedlich hohen Salzkonzentrationen durchgeführt (Abb. 2-19).

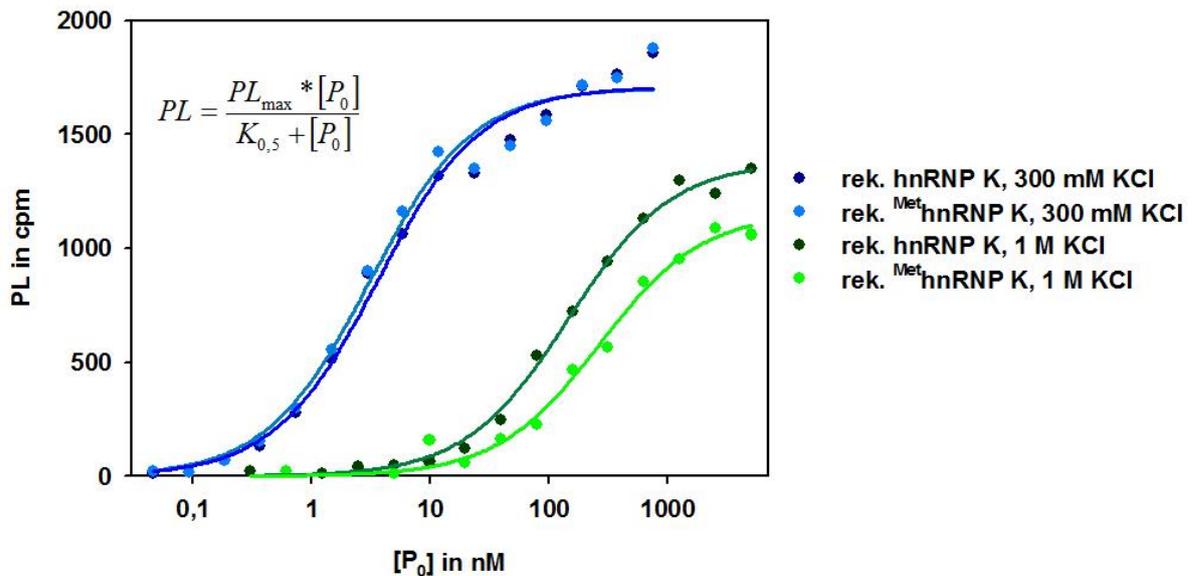


Abb. 2-19 Salzabhängigkeit der RNA-hnRNP K Assoziation

Die Assoziation von rekombinantem hnRNP K mit [³²P]-markierter DICE-RNA wurde in 300 mM oder 1 M KCl unter Standardbedingungen mittels Filterbindungsexperiment untersucht (Abschn. 4.3.5). [P₀] = Konzentration des eingesetzten Proteins, PL = retardierter Protein-RNA-Komplex in cpm; K_{0,5} für hnRNP K und ^{Met}hnRNP K bei 300 mM KCl je 3 nM, bei 1 M KCl 140 nM bzw. 260 nM.

Die Datenpunkte der Messreihe in Gegenwart von 300 mM KCl zeigten lediglich im oberen Konzentrationsbereich Abweichungen von einer bimolekularen Bindungsisotherme (blaue Linie), die bereits diskutiert wurden (Abschn. 2.1.1). In Gegenwart von 50 mM KCl lassen sich die Datenpunkte nicht an eine einfache hyperbole Gleichung anpassen und zeigen tendenziell die gleichen Abweichungen wie in Abb. 2-6 (nicht gezeigt).

Obwohl der RNA-Ligand mehrere gleiche Bindestellen für hnRNP K besitzt, wird unter den getesteten Bedingungen keine Kooperativität der Assoziation von hnRNP K an die DICE-RNA beobachtet. Auffällig ist der drastische Einfluss der Ionenstärke auf die Affinität. Von 300 mM KCl zu 1 M KCl verschlechtert sich die Affinität für hnRNP K zur DICE-RNA um das 50-fache und für ^{Met}hnRNP K um nahezu das 100-fache. Das Filterbindungsexperiment ergab einen apparenten K_D-Wert für methyliertes und nicht-methyliertes hnRNP K von jeweils 3 nM. Damit ist auch mit rekombinantem Protein kein Einfluss der Methylierung auf die Wechselwirkung von hnRNP K mit einer hochaffinen RNA

festzustellen. Die leicht geringere Affinität des rekombinanten Proteins für die DICE-RNA, im Vergleich zu hnRNP K aus ES-Zellen, ist vermutlich auf die unterschiedliche Ionenstärke der jeweils eingesetzten Bindungspuffer zurückzuführen, zumal eine deutliche Abnahme der Affinität mit erhöhter Ionenstärke gezeigt wurde (Abb. 2-19).

Für die Bestimmung definierter Gleichgewichtsdissoziationskonstanten ist es notwendig in Lösung zu messen und den Liganden so weit zu verkürzen, dass multiple Assoziationen vermieden werden. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die translationsreprimierende Wirkung der DICE-RNA (**10 Repeats** von 19 Nukleotiden) auf 2R (38 Nukleotide) mit sechs Tetracytidylaten (Tabelle 2-2) eingeengt werden kann (Ostareck *et al.*, 1997). Daher wurden die weiteren Experimente mit der am 5'-Ende mit 6-Carboxyfluorescein markierten, synthetischen 2R-RNA (^{FAM}2R) oder der am 5'-Ende mit Fluorescein markierten, synthetischen 2R-DNA (^{Flu}d2R) durchgeführt. Die Fluorophore ermöglichen die Beobachtung der Assoziation des hnRNP K mit der Nukleinsäure, die aufgrund mangelnder intrinsischer Fluorophore in den KH-Domänen mittels Proteinfluoreszenz kaum oder nicht zu beobachten wäre. Die Assoziation des hnRNP K mit der markierten RNA oder DNA führen zu einer teilweisen Auslöschung des Fluoreszenzsignals (Quenching). Das relative Fluoreszenzsignal korreliert dann mit der Assoziation des Proteins mit der RNA oder DNA. In Abb. 2-20 sind die Bindungsisothermen des methylierten und nicht-methylierten rekombinanten hnRNP Ks zu sehen, die ausreichend gut durch ein exaktes bimolekulares Bindungsmodell beschrieben werden können. Eine bimolekulare Assoziation ist jedoch unerwartet, weil die 38 Nukleotide 6 repetitive Oligocytidylate enthalten, die eine Mehrfachbindung von hnRNP K erlauben sollten. Entweder führt die erste Assoziation bereits zu einer so großen sterischen Behinderung, dass in dem gemessenen Konzentrationsbereich kein weiteres Molekül hnRNP K assoziieren kann, oder eine weitere Assoziation ist durch das Messsystem nicht beobachtbar (Abb. 3-2).

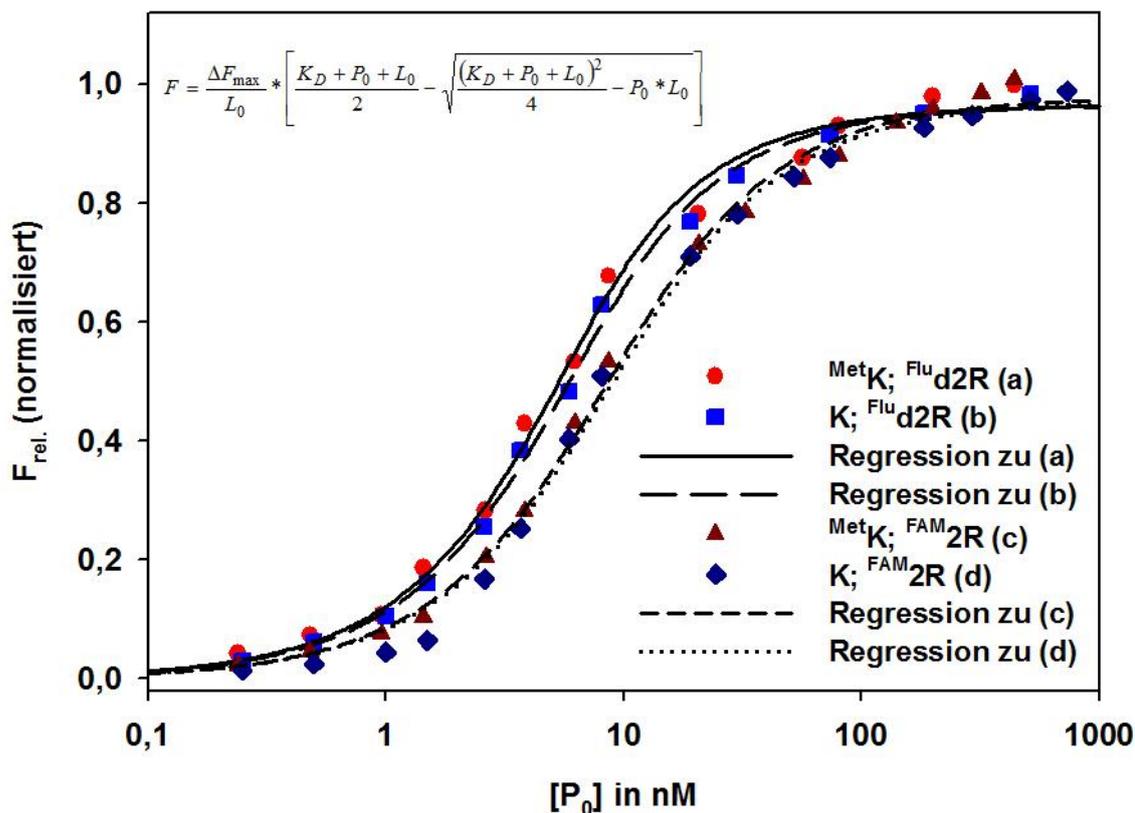


Abb. 2-20 Bindungsisotherme von hnRNP K und 2R und d2R

Bestimmung der Bindungsisothermen in Fluoreszenzpuffer (300 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, 10% Saccharose bei 20 °C) mittels Fluoreszenztitration. Anregung 488 nm, Emission 520 nm. Zu 2 mL 5 nM ^{FAM}2R oder ^{Flu}d2R wurden steigende Mengen hnRNP K titriert und die Änderung der Fluoreszenz gegen die Konzentration aufgetragen. K_D -Werte wurden durch Anpassung mittels Gleichung F (oben im Diagramm) ermittelt und sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Die ermittelten K_D -Werte von 6 nM für die Bindung der ^{FAM}2R-RNA durch methyliertes und nicht methyliertes hnRNP K liegen nur um wenig höher als die K_D -Werte aus den Filterbindungsstudien mit 10R-RNA aus Abb. 2-19 und bestätigen die hochaffine Wechselwirkung zwischen hnRNP K und cytidylreichen RNAs. Gleichgewichtsmessungen mit dem ^{Flu}d2R ergaben geringfügig niedrigere K_D -Werte (Abb. 2-20 und Tabelle 2-1) und bestätigen, dass auch für das vollständige hnRNP K keine signifikante Diskriminierung zwischen RNA und DNA zu erkennen ist (Backe *et al.*, 2005; Braddock *et al.*, 2002).

Tabelle 2-1 Dissoziationskonstanten der hnRNP K-2R Interaktion

^{Flu}d2R: 5'-Fluorescin markiertes desoxy-2R-Oligonukleotid, ^{FAM}2R: 5'-Carboxyfluorescin markiertes Ribooligonukleotid, SD: Standard Abweichung.

Protein	Oligonukleotid	K_D +/- SD in nM
^{Met} hnRNP K	^{Flu} d2R	2,6 +/- 0,7
hnRNP K	^{Flu} d2R	3,1 +/- 0,7
^{Met} hnRNP K	^{FAM} 2R	5,8 +/- 1
hnRNP K	^{FAM} 2R	6,1 +/- 1

2.4.2 Bindung mehrerer Proteine an das 2R-Sequenzelement

Die Untersuchung der hnRNP K-Oligonukleotid-Wechselwirkung mittels fluoreszenzmarkierter RNA/DNA war nötig, weil die Assoziation von hnRNP K an Nukleinsäure keine Änderung der intrinsischen Proteinfluoreszenz bewirkte. Verfolgt man allerdings die intrinsische Proteinfluoreszenz einer 0,5 μM hnRNP K-Lösung bei der Titration des d2R-Oligonukleotids, so kann man eine Zunahme der Proteinfluoreszenz beobachten, die ein Maximum bei einer Stöchiometrie von zwei hnRNP K zu einem d2R hat (Abb. 2-21).

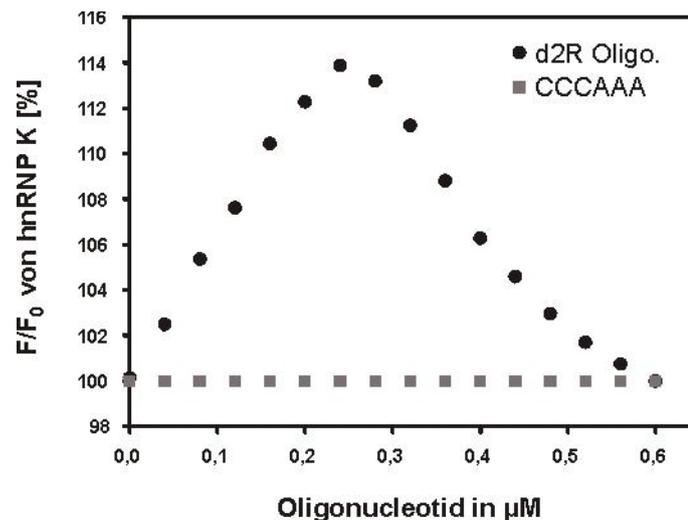


Abb. 2-21 Dimerisierung von hnRNP K an d2R

Intrinsische Fluoreszenz einer 0,5 μM hnRNP K Lösung in Fluoreszenzpuffer (Abb. 2-20) bei 20°C. Anregung bei 296 nm, Emission bei 350 nm. Steigende Mengen des Oligonukleotids wurden dazu titriert und die relative Fluoreszenz gegen Oligonukleotidkonzentration aufgetragen. Auf Abwesenheit des inneren Filtereffektes wurde geprüft.

Da die Wechselwirkung von hnRNP K mit dem Oligonukleotid CCCAAA selbst keine Fluoreszenzänderung bewirkt, obwohl von einer Assoziation ausgegangen werden kann (Abschn. 2.4.3, Tabelle 2-2), ist das zusätzlich detektierte Fluoreszenzsignal mutmaßlich auf eine Wechselwirkung zweier hnRNP K-Moleküle an einem Molekül d2R zurückzuführen. Bemerkenswerterweise fällt das Fluoreszenzsignal bei weiterer Zugabe von d2R wieder ab und kehrt bereits bei einem molaren Verhältnis von 1:1 auf den Ausgangswert zurück. Sowohl das zusätzliche Fluoreszenzsignal als auch die exakte 2:1 Stöchiometrie bei maximaler Fluoreszenzänderung der d2R-Titration deuten auf eine Mehrfachbindung von hnRNP K an das d2R hin, wenn die Konzentration von hnRNP K hoch genug ist. Offensichtlich ist das 2. Bindungsereignis energetisch deutlich ungünstiger als das erste Bindungsereignis, denn bei weiterer Zugabe von d2R fällt das mutmaßliche Dimersignal wieder ab und erreicht bei einer 1:1 Stöchiometrie den Ausgangswert. Für die Annahme zweier gleichwertiger Bindestellen auf einem 2R müsste aus statistischen Gründen bei einer 1:1 Stöchiometrie zwischen hnRNP K und d2R ein gewisser Teil der d2R-Oligonukleotide ein Dimer tragen und damit ein

entsprechend höheres Fluoreszenzsignal als den 100% Wert detektiert werden. Weil die Datenpunkte im äquimolaren Konzentrationsbereich sich jedoch dem Ausgangswert annähern (Abb. 2-21), werden die zwei Bindestellen mit unterschiedlicher Bindungsenergie gebunden.

Dies wird bei einer Titration deutlich, in der wesentlich höhere Konzentrationen an hnRNP K und FAM₂R im Vergleich zur Titration in Abb. 2-20 eingesetzt wurden (Abb. 2-22).

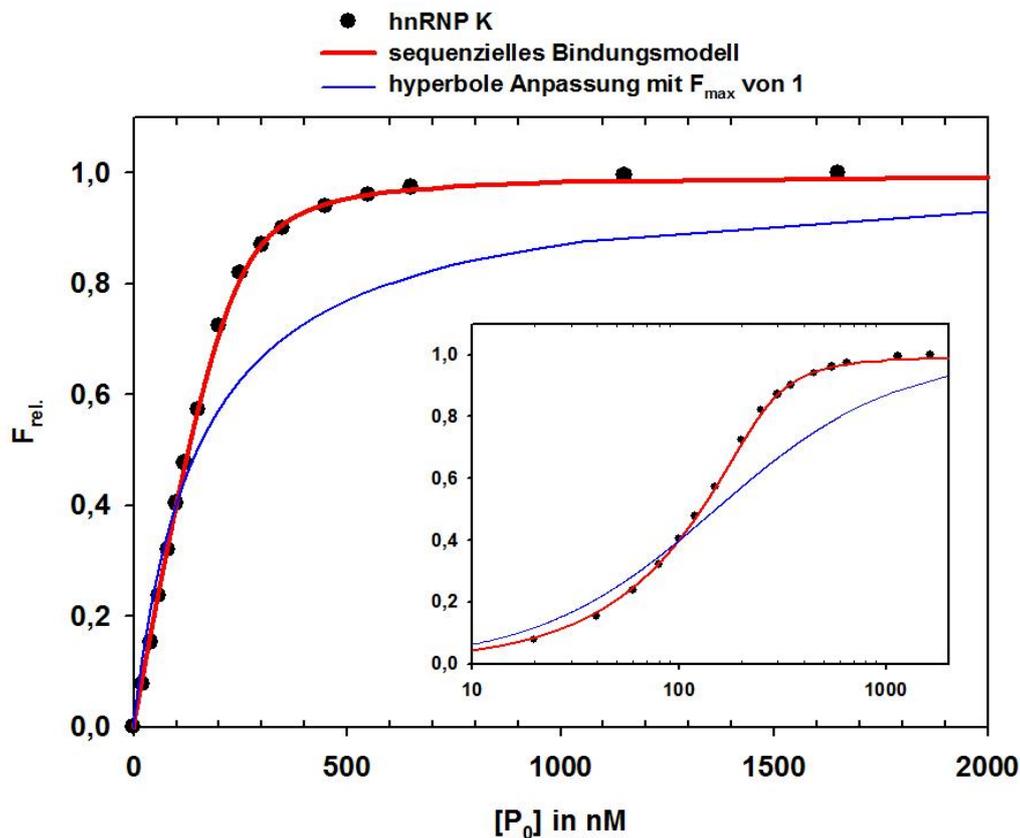


Abb. 2-22 Sequenzielle Assoziation von hnRNP K an FAM₂R

Fluoreszenz-Gleichgewichtstitration wie in Abb. 2-20 mit 125 nM FAM₂R und steigenden Mengen hnRNP K. Fluoreszenzänderung auf 1 normiert. Die blaue Linie stellt eine hyperbole Anpassung nach PL (Abb. 2-19) dar. Die rote Linie stellt die Anpassung nach einem sequenziellen Bindungsmodell dar (Abb. 2-23, Abschn. 4.8) mit der ersten Dissoziationskonstante, K_{D1} von 5 nM und der zweiten Dissoziationskonstante K_{D2} von 30 nM. Der eingefügte Graph zeigt eine logarithmische Darstellung.

Die Titrationskurve zeigt einen nahezu linearen Anstieg an Fluoreszenz-Differenzsignal zu Beginn der Titration (vergleichbar mit einer *active site titration*), weil Protein- und RNA-Konzentration deutlich über dem bereits ermittelten K_D -Wert liegen. Ab ca. der Hälfte des maximalen Fluoreszenz-Differenzsignals beginnt die Kurve abzufachen und nähert sich einem Maximum. Da bereits ein Bindungsereignis mit einem K_D -Wert von 6 nM ermittelt wurde, deuteten die Datenpunkte auf eine sequenzielle Bindungsreaktion mit zwei unterschiedlichen K_D -Werten hin (Abb. 2-22).

Die Bestimmung der 2. Dissoziationskonstante (K_{D2}) ist unter den gewählten Konzentrationsbedingungen schwierig, weil keine Vereinfachung der Masseerhaltungssätze möglich ist. Um eine numerischen Bestimmung von K_{D2} zu umgehen, wurde ein sequenzielles Bindungsmodell nach

Abb. 2-23 aufgestellt, die Massenwirkungsgesetze für die einzelnen Reaktanden beschrieben und in eine einheitliche Gleichgewichtsgleichung dritter Ordnung überführt (Michel Spinka, MLU-Halle-Wittenberg, Abschn. 4.8).

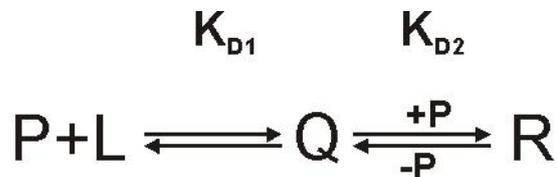
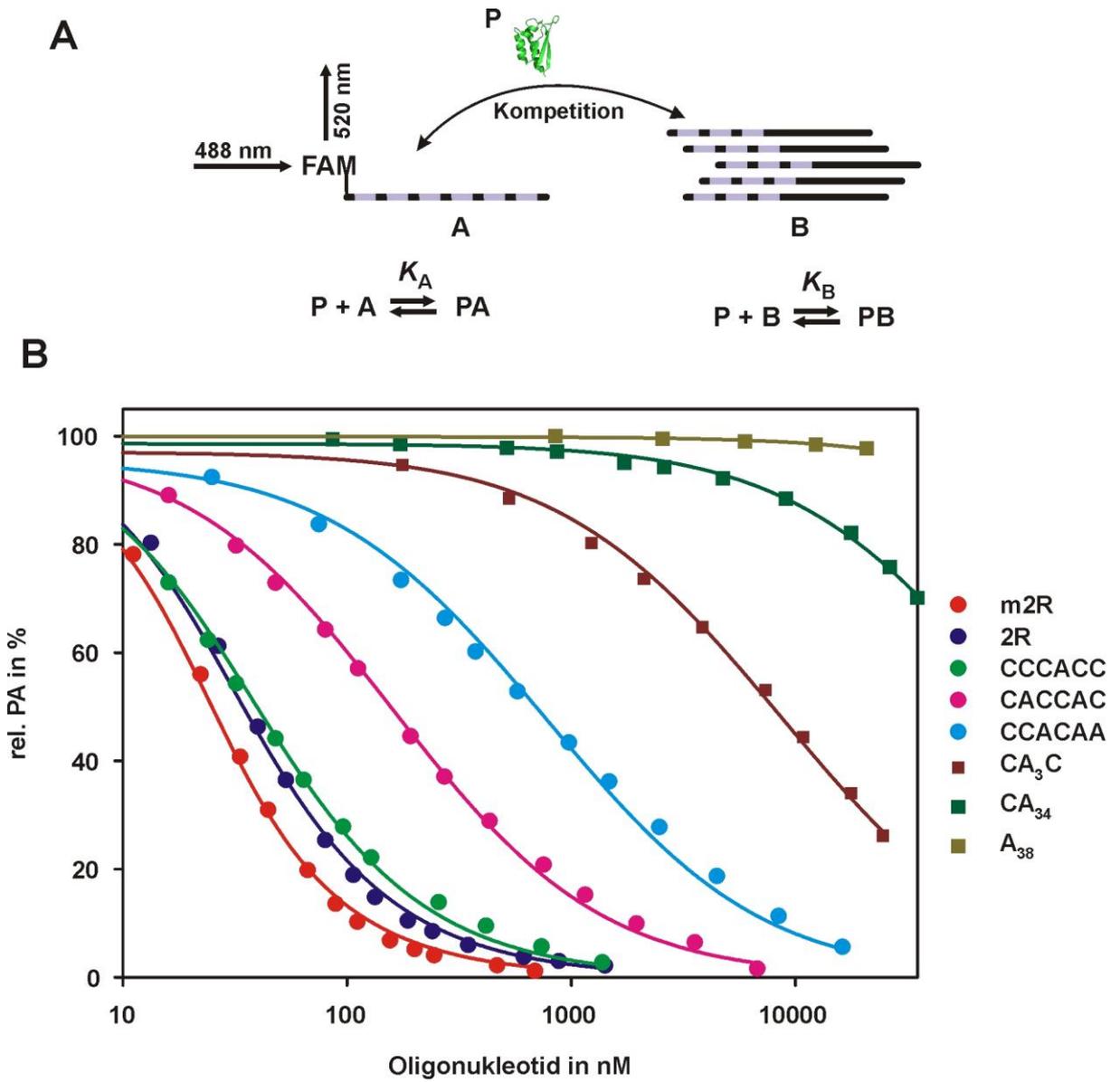


Abb. 2-23 Reaktionsschema der sequenziellen Assoziation

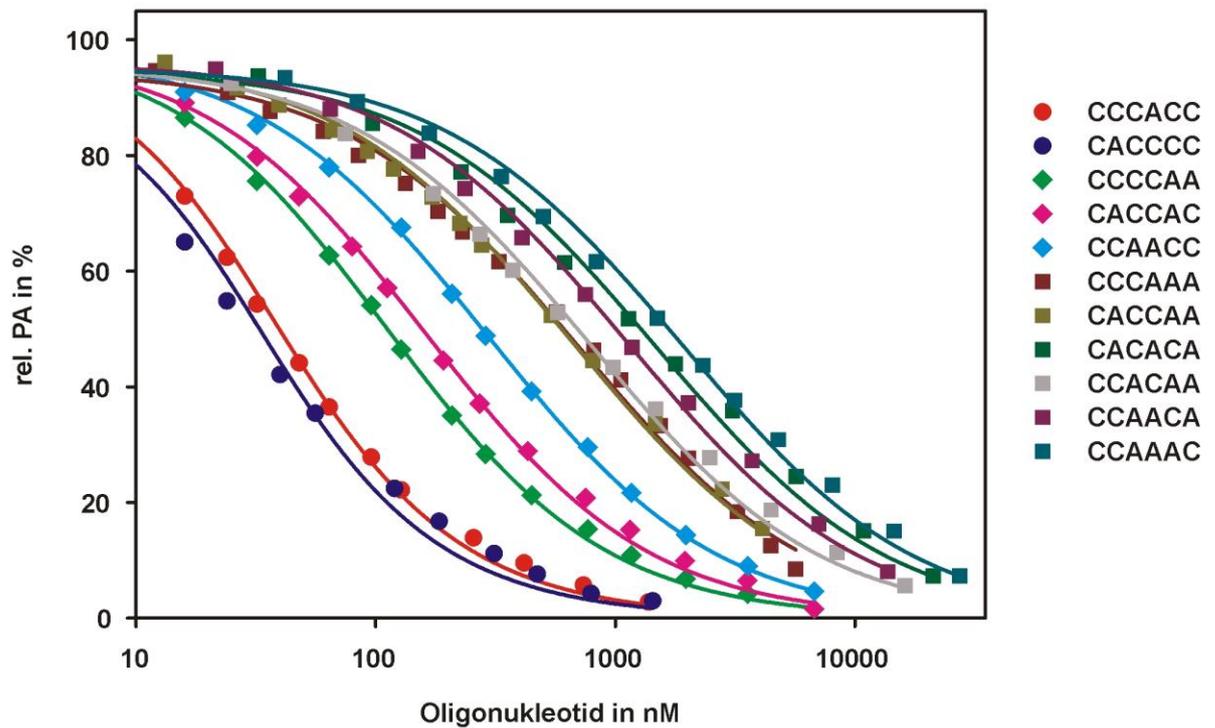
Die physisch sinnvolle Wurzel wurde für eine Anpassung der Datenpunkte im verwendeten Konzentrationsbereich verwendet und unter Annahme der 1. Dissoziationskonstante (K_{D1}) die K_{D2} zu 30 nM ermittelt. (Abb. 2-22, Abschn. 4.8). Weil für die Bestimmung von K_{D2} nur noch K_{D2} selbst und die Verteilung (α) der Signalintensitäten zwischen Q und R variabel sind, ist die Anpassung der Datenpunkte trotz der recht komplexen Gleichung nicht überbestimmt und liefert hinreichend sichere Werte für α und K_{D2} (Abschn. 4.8).

2.4.3 Die Sequenzabhängigkeit der Assoziation von hnRNP K mit Oligo-Tetracytidylat-Substraten

Die Sequenz des 2R beinhaltet eine sechsfache Wiederholung eines Tetracytidylates (pC)₄, nachfolgend durch die 6-Buchstabenchiffre CCCCCC benannt, wobei ein C die Position eines Tetracytidylates innerhalb des 38 nt langen Oligonukleotides angibt (Tabelle 2-2). Um die molekularen Ursachen der zwei unterschiedlichen Affinitäten für die sequenzielle Assoziation an die gleichen repetitiven Sequenzen besser zu verstehen, wurde ein Gleichgewichts-Kompetitionsexperiment mit unterschiedlich zusammengesetzten, aber gleich langen Desoxyoligonukleotiden durchgeführt (Tabelle 2-2). Die Konkurrenz erlaubt die Bestimmung der im Gleichgewicht gemessenen K_D -Werte für nicht-markierte Oligonukleotide, für deren Assoziation mit hnRNP K sonst kein Messsignal zu Verfügung stand (Abschn. 2.4.2). Durch die Verwendung von gleich langen Oligonukleotiden werden Änderungen der elektrostatischen Wechselwirkungen vermieden und allein die Basenspezifität der Wechselwirkung untersucht.



C



D

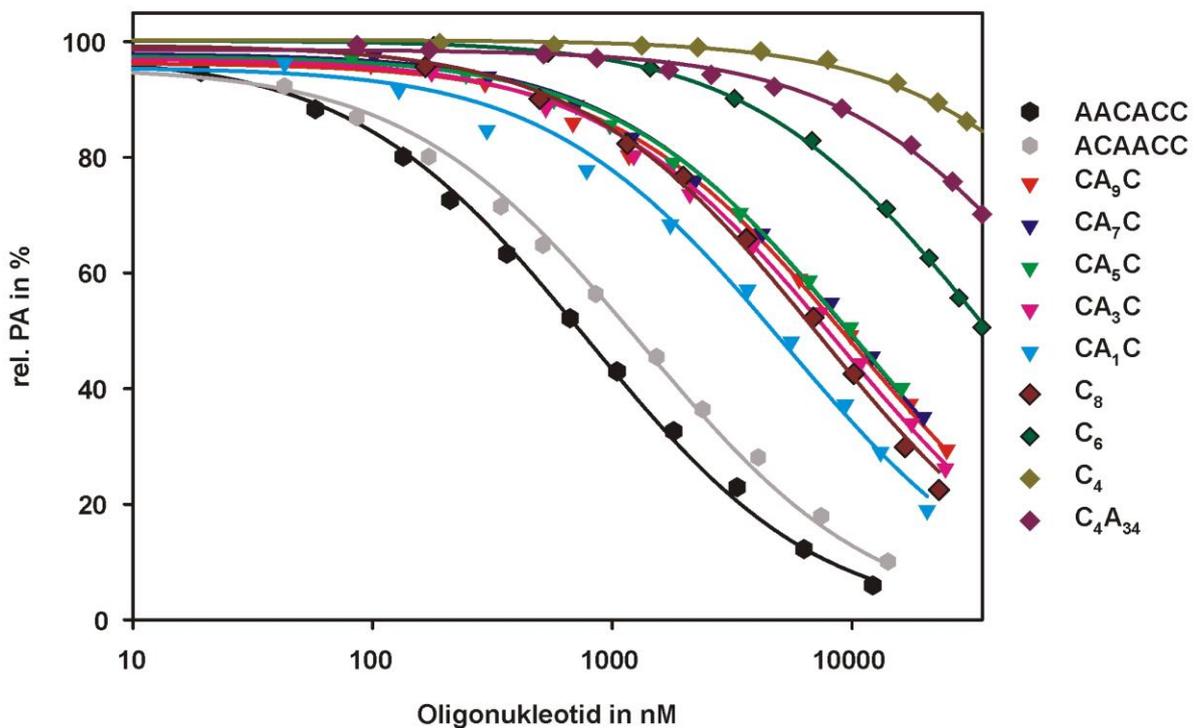


Abb. 2-24 Konkurrenz des hnRNP K-FAM₂R Komplexes

A) Schema des Konkurrenzexperimentes. P: hnRNP K, PA: hnRNP K-FAM₂R-Komplex, PB: hnRNP K-Kompetitor-Komplex. B) 25 nM FAM₂R und 25 nM nicht-methyliertes hnRNP K wurden unter Fluoreszenzpufferbedingungen bei 20°C in einer 2 ml Fluoreszenzküvette vorgelegt und die Fluoreszenzänderung nach Zugabe der Kompetitoren detektiert. Die Legende (rechts) zeigt die schematische Sequenz der Kompetitoren. Durchgezogene Linien sind die Anpassungen nach X. Wang (Abschn. 4.6.4). Sequenzen und K_D-Werte in Tabelle 2-2. C) Titration wie in B mit Oligonucleotiden mit 5, 4 und 3 C₄-Elementen. D) Titration wie in B mit Oligonucleotiden mit 3, 2 und 1 Oligo(C)-Element(en).

Zu diesem Zweck wurde das fluoreszenzmarkierte ^{FAM}2R und nicht methyliertes hnRNP K vorgelegt und die Freisetzung des ^{FAM}2R durch die zugesetzten Kompetitoren fluoreszenzspektroskopisch verfolgt (Abb. 2-24). Eine einfache quantitative Auswertung ist unter den gewählten experimentellen Bedingungen nicht möglich und nicht nötig, weil die K_D -Werte der Kompetitoren nach der analytischen Lösung nach X. Wang 1995 erhalten werden können. In Tabelle 2-2 sind die ermittelten Daten zusammengefasst. Der Vergleich der K_D -Werte ermöglicht einige generelle Aussagen zur Nukleinsäureinteraktion von hnRNP K: (i) $(A)_{38}$ wird im verwendeten Konzentrationsbereich fast überhaupt nicht gebunden und zeigt damit die starke Präferenz für die Erkennung von Basen. Das Zucker-Phosphatrückgrat ist nicht hinreichend für eine substanzielle Assoziation. (ii) Ein $(A)_{34}$ -Ligand mit einem C_4 -Motiv wird schlecht gebunden, egal an welcher Stelle innerhalb des Liganden sich das C_4 -Motiv befindet. (iii) Die Affinität zu den Liganden erhöht sich mit Zunahme der Länge des C-Motivs als auch mit zunehmender Anzahl der C_4 -Motive.

Tabelle 2-2 Dissoziationskonstanten von hnRNP K und Oligonukleotiden mit unterschiedlich vielen C₄-Motiven

Name	Sequenz	K _D in nM	R ²	abs. Fehler	C ₄ -Motive	Gruppen-Mittel
m2R/CCCCC	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCACCCCAAACCCCAA	1,0	0,998	0,3	6	1
d2R	CCCCGCCUCUUCCCCAAGCCCCGCCUCUUCCCCAAG	2,2	0,999	0,5	6	
CACCC	CCCCAAAAAAAAACCCCAAACCCACCCCAAACCCCAA	3,6	0,997	1,2	5	4
CCCACC	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	4,1	0,997	1,2	5	4
CCCCAA	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	16	0,999	4	4	28
CACCAC	CCCCAAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	24	0,998	5	4	28
CCAACC	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	45	0,999	12	4	28
CCCAA	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	108	0,994	18	3	168
CACCAA	CCCCAAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	102	0,994	23	3	168
CCACAA	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	122	0,994	30	3	168
CCAACA	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	176	0,995	42	3	168
CAAAC	CCCCACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	300	0,994	60	3	168
AACACC	AAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	124	0,997	25	3	168
ACAACC	AAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	181	0,996	40	3	168
CACACA	CCCCAAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	231	0,992	55	3	168
CA₉C	AAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	1590	0,993	540	2	1350
CA₇C	AAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	1625	0,996	550	2	1350
CA₅C	AAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	1655	0,996	550	2	1350
CA₃C	AAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	1369	0,996	450	2	1350
CA₁C	AAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	837	0,992	260	2	1350
C₈	AAAAAAAAACCCCCCAACCCCAAACCCCAA	1000	0,993	420	2	1350
C₆	AAAAAAAAACCCCCCAACCCCAAACCCCAA	5950	0,999	1500	1	6000
C₄	AAAAAAAAACCCCAACCCCAAACCCCAA	36000	0,992	10000	1	22200
C₄A₃₄	CCCCAAAAAAAAACCCCAAACCCCAAACCCCAA	16000	0,993	4000	1	22200
A₃₄C₄	AAAAAAAAACCCCAACCCCAAACCCCAA	14000	0,937	8000	1	22200
A₃₈	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	200000	0,966	200000	0	

2.4.4 Interpretation der hnRNP K-Oligo(C₄)-Liganden-Interaktion: der *K-combination mode*

Die Zunahme an Affinität für längere Homopolymere eines RNA-Bindproteins wird durch das Modell von von Hippel vorhergesagt, wonach $K_{app.} = (l-m+1) \cdot K_{min}$ berechnet wird, wobei $K_{app.}$ die Assoziationskonstante für das Oligonukleotid, K_{min} die intrinsische Assoziationskonstante für den Liganden mit der minimalen Bindestelle (m), l die Länge des Oligonukleotids und m die minimale Anzahl an gebundenen Nukleotiden ist (Kelly *et al.*, 1976; Mackereth *et al.*, 2011). Der empirische Zusammenhang zwischen der Anzahl an Bindestellen und der Affinität basiert darauf, dass die Assoziation entropisch (statistisch) durch eine höhere Anzahl möglicher Bindestellen am Liganden begünstigt wird. Dieser empirische Zusammenhang äußert sich qualitativ darin, dass die Verkürzung des minimalen Bindemotivs aus enthalpischen Gründen zur drastischen Minderung der Affinität führt, während die Verlängerung des minimalen Bindemotivs lediglich zur moderaten Erhöhung der Affinität aus entropischen Gründen führt. Diese ungleiche Korrelation von Bindemotivlänge und Affinität kann zur Bestimmung des minimalen Bindemotivs eines Proteins benutzt werden, indem die apparenten Affinitäten von zunehmend kürzeren Liganden mit den aus statistischen Gründen vorhergesagten Affinitäten verglichen werden (Kelly *et al.*, 1976). Ein Rechenbeispiel verdeutlicht den Zusammenhang. Angenommen, ein RNA-Bindeprotein assoziiert spezifisch mit einer RNA aus 4 gleichen Nukleotiden (minimale Bindestelle) mit einem K_D von 100 nM. Wird ein weiteres gleiches Nukleotid an die minimale Bindestelle angehängt so nimmt die apparente Assoziationskonstante um den Wert 2 zu ($K_{app.} = (5-4+1) \cdot K_{min}$), denn es sind zwei verschiedene Komplexbildungen möglich. Weil $K_D = 1/K$ ist, halbiert sich die Dissoziationskonstante auf 50 nM. Wird jedoch die Minimalsequenz von 4 auf nur noch 3 Nukleotide verkürzt, geht ein Viertel der intermolekularen Bindungsenergie verloren, wenn alle 4 Nukleotide gleichmäßig von Protein kontaktiert werden. Ein K_D -Wert von 100 nM entspricht einer freien Standardenthalpie von -40 kJ/mol, ein Viertel davon 10 kJ/mol ($\Delta G^{\circ} = -RT \cdot \ln K$). Eine Gleichgewichtsreaktion mit einem ΔG° von -30 kJ/mol entspricht einem K_D -Werte von ca. 3 μ M (Alberts, 2002). Das Verkürzen der Minimalsequenz vergrößert also den K_D -Wert um den Faktor 30. Die Argumentation von R. C. Kelly *et al.*, die ursprünglich für Homopolymere mit überlappenden Bindestellen abgeleitet wurde, gilt auch für Polymere mit mehreren distinkten Bindestellen innerhalb einer sonst inerten Umgebung, wie z. B. im Fall von hnRNP K für Liganden mit C₄-Motiven innerhalb einer Poly(A)-Sequenz. Nimmt man für solch einen Fall an, dass hnRNP K mit einer einzigen RNA-Bindedomäne mit Nukleinsäure-Liganden assoziiert, dann würde die Affinität des Proteins zu einem Liganden mit drei verglichen mit einem C₄-Motiv um ca. den Faktor 3 zunehmen. Ausgehend von dieser Überlegung müssen Liganden mit mehr als einem C₄-Motiv von mehr als einer Domäne gebunden werden, weil die Affinität für Liganden mit 2, 3, 4, 5 und 6 C₄-Motiven verglichen zu einem C₄-Motiv

um ca. 15, 130, 750, 5.500, und 22.000 zunimmt (Tabelle 2-2). Diese Faktoren sind zu groß, um durch eine einzelne Domänen-Nukleinsäure-Interaktion erklärt werden zu können und zwingen zu der Annahme, dass mehr als eine Domäne an der RNA-Bindung partizipiert.

Nimmt man an, dass zwei Domänen an der RNA-Bindung partizipieren, können zwei verschiedene Mechanismen unterschieden werden. Wenn die Domänen zusammengelagert vorliegen, also als Einheit und sich nicht unabhängig voneinander bewegen, und mit zwei benachbarten C₄-Motiven assoziieren, dann führt die erhöhte Anzahl von 2 zu 4, zu 6 C₄-Motiven zu einer ca. 3- bzw. 5-fachen Erhöhung der Affinität. Die K_D-Werte aus Tabelle 2-2 stimmen nicht mit dieser Vorhersage überein und falsifizieren damit diese Annahme. Sollten die zwei Domänen unabhängig voneinander mit C₄-Motiven assoziieren, so ergeben sich mehrere Möglichkeiten (Kombinationen) der Assoziation mit Liganden mit mehreren C₄-Motiven, die nach den Gesetzen der Kombinatorik ($n!/(n-k)!$) berechnet werden können, wobei n die Anzahl der C₄-Motive und k die Anzahl der Domänen ist. Für Liganden mit 4 und 6 C₄-Motiven ergeben sich für das Zwei-Domänenmodell Kombinationen von $4!/2! = 12$ and $6!/4! = 30$. Will man die Zunahme an Affinität von 2 zu 4 zu 6 C₄-Motiven vorhersagen, müssen die Kombinationen noch durch die Anzahl an Kombinationen des Liganden mit zwei C₄-Motiven (2!) geteilt werden. Es ergeben sich für das Zwei-Domänenmodell bei der Zunahme von 2 zu 4 zu 6 C₄-Motiven erhöhte Affinitäten von 6- bzw. 15-fach. Die experimentell ermittelten Werte (Tabelle 2-2) sind allerdings mit ca. 50- bzw. 1350-fach deutlich größer und somit auch nicht mit einem Zwei-Domänenmodell zu erklären.

Für die Interaktion von drei zusammengelagerten, also als Einheit und nicht unabhängig voneinander interagierenden Domänen ist die Zunahme der Affinität von 3 auf 4, 5 und 6 C₄-Motiven entsprechend 2-, 3- und 4-fach. Die beobachteten K_D-Werte der entsprechenden Liganden (Tabelle 2-2) korrelieren auch nicht mit den Vorhersagen dieses Modells. Die unabhängige Assoziation von drei Domänen mit drei C₄-Motiven führt unter der oben aufgeführten Argumentation für zwei unabhängige Domänen zur Annahme, dass die Affinität zu Liganden mit 4, 5 und 6 C₄-Motiven um den Faktor 4 ($(4!/[(4-3)!])/3!$), 10 ($(5!/[(5-3)!])/3!$) und 20 ($(6!/[(6-3)!])/3!$) steigt. Die beobachteten Faktoren von 6, 40 und 160 weichen zwar nicht drastisch aber dennoch merklich von den theoretischen Werten ab.

NMR-Untersuchungen an Fragmenten von hnRNP E1 zeigten, dass die KH-Domäne 1 und 2 als strukturelle Einheit in Lösung vorliegen und eine obligate „Pseudo-Didomäne“ (Du *et al.*, 2008), im folgendem als Tandem-Domäne bezeichnet, bilden. Weil die Aminosäuren in der Interaktionsfläche der KH-Domäne 1 und 2 auch in hnRNP K konserviert sind, kann die Tandem-Domäne auch für hnRNP K angenommen werden (Abschn. 4.9). Die RNA-Interaktionsflächen in der Tandem-Domäne liegen allerdings auf der gegenüberliegenden Seite, so dass für eine gemeinsame Wechselwirkung mit einem Nukleinsäure-Liganden die Bindemotive beider Domänen um wenigstens 5 Nukleotide auseinander liegen sollten (Du *et al.*, 2008). Tatsächlich zeigten Bindungsstudien mit einer hnRNP K-Variante, der

die dritte KH-Domäne fehlte, und einem Oligonukleotid mit zwei C₄-Motiven eine deutliche Abhängigkeit des Sequenzabstandes der beiden C₄-Motive. Lagen beide C₄-Motive zu dicht beieinander war die Affinität schlechter als mit einem größeren Abstand beobachtet wurde. Der optimale Sequenzabstand beider C₄-Motive lag bei ca. 7-9 Nukleotiden und führte zu einer 10-fachen Erhöhung der Affinität gegenüber Liganden mit sehr kurzem Abstand (Moritz *et al.*, 2014). Unter der Annahme, dass allein die KH-Domänen in hnRNP K eine spezifische Erkennung der Cytidylate ermöglichen, zeigen diese Daten, dass beide Domänen mit der vermuteten Sequenzrestriktion an der Assoziation mit oligocytidylatreichen Liganden beteiligt sind.

Im Gegensatz dazu ist die dritte KH-Domäne durch einen 170 Aminosäure langen und mutmaßlich unstrukturierten *linker* mit der Tandem-Domäne verbunden, so dass von einer unabhängigen Interaktion der KH3-Domäne ausgegangen werden kann. Das bedeutet für die untersuchten Liganden, dass die KH1-KH2-Tandemdomäne nur dann die Bindungsenergien beider KH-Domänen beisteuert, wenn die optimalen Sequenzmotive mindestens 5 nt auseinander liegen, während die dritte KH-Domäne mit jedem übrigen C₄-Motiv assoziieren kann. Für einen Liganden mit drei „benachbarten“ C₄-Motiven (z. B. CCCAAA, Tabelle 2-2) reduzieren sich dadurch die möglichen Kombinationen auf zwei. Mit der Einschränkung durch die Tandem-Domäne ergeben sich ausgehend von einem Liganden mit drei C₄-Motiven Zunahmen an Affinitäten zu Liganden mit 4, 5 und 6 C₄-Motiven von 6, 18 und 40 (Rechenwege in Abschn. 4.9). Die beobachteten Werte von 6, 40 und 160 passen tatsächlich besser zum Modell mit einer Tandem-Domäne als zum Modell mit drei unabhängigen Domänen.

Zusammenfassend lassen sich die experimentellen Daten zur Interaktion von hnRNP K mit Liganden mit mehreren C₄-Motiven nur durch die Beteiligung dreier C-spezifischer Domänen erklären. Die Basenspezifität der Wechselwirkungen legt die KH-Domänen als ursächliche Struktureinheiten nahe. Als minimales Bindemotiv für hnRNP K ist somit eine Sequenz von 3 C₄-Motiven anzusehen. Die durch das Modell, nachfolgend als *K-combination mode* bezeichnet, postulierte Unabhängigkeit einzelner Domänen erklärt auch den beobachteten geringen Einfluss von Insertionen zwischen einzelnen C₄-Motiven auf die Affinität (Tabelle 2-2). Dies steht im scharfen Kontrast zu Beobachtungen mit strukturell eng verknüpften Domänen mit ihren Liganden (Mackereth *et al.*, 2011). Der *K-combination mode* lässt weitere Verallgemeinerungen zu: (i) Die Affinität eines Multidomänenproteins zu einem Liganden erhöht sich aus entropischen Gründen durch Kombinatorik, wenn die Bindestellen der einzelnen unabhängigen Domänen austauschbar sind. (ii) Die Position der einzelnen Domänen auf der Nukleinsäure kann durch ihre Unabhängigkeit der Assoziation variieren. Diesem Umstand wurde bisher keine Rechnung getragen, wenn Nukleinsäure-Interaktionspartner von hnRNP K benutzt wurden, um durch Sequenz-*alignments* das minimale Bindemotiv zu identifizieren (Klimek-Tomczak *et al.*, 2004; Liu und Szaro, 2011).

Die Assoziation von hnRNP K mit dem Liganden CCCAAA ($K_D \sim 110$ nM, Tabelle 2-2) legt die

Vermutung nahe, dass auch nach der Assoziation von hnRNP K mit dem 2R-Oligonukleotid noch 3 der 6 C₄-Motive frei sind für eine zweite Assoziation, wie sie in Abb. 2-21 und Abb. 2-22 gezeigt ist. Die direkte Fluoreszenzmessung ergab einen K_D-Wert der zweiten Assoziation von ~30 nM. Der geringe Unterschied (30 nM gegenüber 110 nM) zeigt an, dass die Kooperativität der zweiten Assoziation sehr gering ist mit einem $\Delta\Delta G$ von lediglich -3,1 kJ/mol.

2.4.5 Kinetische Untersuchung der Nukleinsäurebindung.

Um weitere Informationen zum Mechanismus der Nukleinsäurebindung zu erhalten, wurden die Kinetiken der Dissoziation des hnRNP K-^{FAM}2R-Komplexes untersucht. Für die Bestimmung der Geschwindigkeitsdissoziationskonstante wurde ein Gemisch aus 20 nM ^{FAM}2R und 20 nM hnRNP K mit 4 μ M eines nicht fluoreszierenden Kompetitor-Desoxyoligonukleotides der Sequenz d2R in einer *stopped-flow*-Apparatur zusammengemischt und die Zunahme der Fluoreszenz über 60 s gemessen. Die Kinetik der Dissoziation lässt sich erst mit einer Gleichung mit zwei exponentiellen Termen hinreichend genau beschreiben (Abb. 2-25, Tabelle 2-3).

Die zwei Dissoziationskonstanten k_1 und k_2 unterscheiden sich um ca. den Faktor vier, wobei die langsamere Kinetik mit einer Halbwertszeit von 2,5 s (hnRNP K) und 7 s (^{Met}hnRNP K) voranschreitet. Die zwei signifikant unterschiedlichen Geschwindigkeitsprozesse könnten als zwei verschiedene Komplexformen gedeutet werden, die innerhalb der beobachteten Zeit nicht ineinander umgewandelt werden können. Die Amplituden beider Prozesse (Parameter a und c in Tabelle 2-3) sind ähnlich groß.

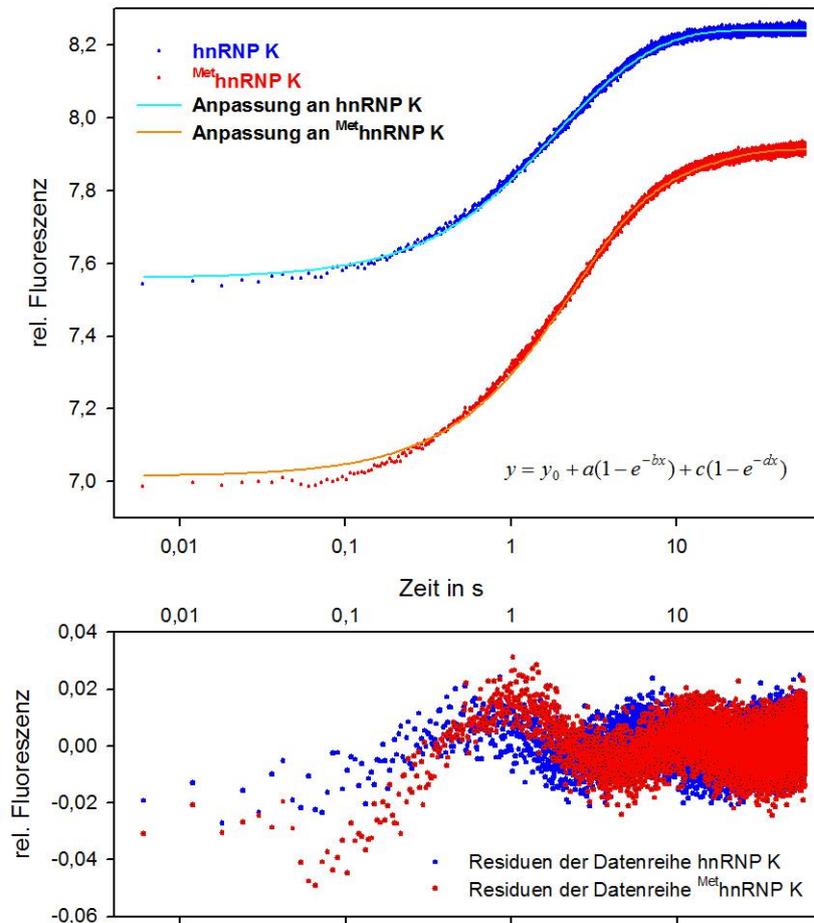


Abb. 2-25 Stopped-flow-Analyse der Dissoziation des hnRNP K-FAM₂R-Komplexes

Gleiche Volumina einer 4 μM d2R-Lösung und einer 20 nM FAM₂R-hnRNP K oder FAM₂R-Met-hnRNP K-Lösung wurden in einem Applied Photophysics SX-20MV stopped-flow-Instrument zusammengemischt und die Änderung der Fluoreszenz über die angegebene Zeit durch ein 520 nm long pass filter verfolgt. Puffer: 300 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}, 10% Saccharose, Temperatur 20 °C.

Tabelle 2-3 Dissoziations-Parameter der stopped flow-Analyse

Anpassung an Gleichung y mit zwei Exponentialtermen. Die Signalamplituden sind mit a und c gegeben. Die Geschwindigkeits-Dissoziationskonstanten k_1 und k_2 sind zusätzlich in eine Halbwertszeit ($t_{1/2}$) umgerechnet.

$y = y_0 + a(1 - e^{-k_1x}) + c(1 - e^{-k_2x})$		
Parameter	hnRNP K	^{Met} hnRNP K
y_0	7,56	7,02
a	0,32	0,7
k_1 in s ⁻¹ ($t_{1/2}$ in s)	0,87 (0,8)	0,47 (1,5)
c	0,37	0,2
k_2 in s ⁻¹ ($t_{1/2}$ in s)	0,27 (2,5)	0,1 (7)

Unter der Voraussetzung, dass beide Komplexformen zu einer ähnlichen Fluoreszenzlöschung führen, korrelieren die Amplituden der Dissoziationskinetik mit den relativen Mengen der zwei verschiedenen Komplexformen. Für ^{Met}hnRNP K ist die Amplitude des schnelleren Zerfalls deutlich größer als die zweite Amplitude und damit der schneller zerfallende Komplex scheinbar stärker angereichert. Aus k_2 und K_D (Abschn. 2.4.1) lässt sich die Assoziationsgeschwindigkeit über folgende Beziehung abschätzen: $K_D = k_{\text{diss}}/k_{\text{ass}}$. Damit ergibt sich eine Assoziationsgeschwindigkeit von $5 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für hnRNP K und $2 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ für ^{Met}hnRNP K. Die k_{ass} liegt somit etwas unter dem diffusionskontrollierten Maximalwert von ca. $1 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$. Es sei darauf hingewiesen, dass die beobachtete Dissoziation nicht die tatsächliche Existenz von zwei verschiedenen Komplexen nahe legt. Basierend auf dem *K-combination mode* werden für die Assoziation von hnRNP K an 2R bis zu 80 verschiedene Komplexe postuliert (Abschn. 4.9). Diese Komplexität durch eine Dissoziationskinetik zu erfassen, ist nahezu unmöglich. Dazu kommt, dass die stöchiometrischen Verhältnisse und die jeweiligen Anteile an der Fluoreszenzänderung der einzelnen Komplexe sicherlich verschieden sind. Die beobachtete Dissoziationskinetik steht daher nicht im Widerspruch mit dem *K-combination mode*. Im Gegenteil, obwohl die Residuen der verwendeten Anpassungen bereits klein sind, streuen sie doch systematisch um Null. Eine Anpassung mit drei Exponentialtermen bewirkt zwar eine weitere Minderung der Residuen, aber nicht deren systematische Abweichung (nicht gezeigt). Das deutet an, dass der beobachteten Dissoziation eine Vielzahl ähnlich schneller Dissoziationen zu Grunde liegen.

2.5 Proteininteraktionen

HnRNP K ist als Wechselwirkungspartner einer großen Anzahl von Proteinen beschrieben worden (Abschn. 1). Für einige der postulierten Wechselwirkungspartner soll die physische Interaktion der Wechselwirkung validiert und der Einfluss der Protein-Argininmethylierung auf das Assoziationsgleichgewicht untersucht werden.

2.5.1 Interaktion von hnRNP K und hnRNP E1

HnRNP E1 gehört, wie auch hnRNP K, zu der Familie der poly(rC)-bindenden Proteine. Es ist ebenfalls aus drei KH-Domänen aufgebaut und bindet an das DICE (Ostareck *et al.*, 1997). Beide Proteine sind als translationsreprimierende Proteine in Retikulozytenlysat beschrieben (Ostareck *et al.*, 1997). Einen Hinweis auf direkte Interaktion lieferte eine *yeast two hybrid*-Studie zur Untersuchung der Assoziationen von hnRNP Proteinen (Kim *et al.*, 2000). Beide Proteine führten sowohl als *bait* als auch als *prey* zu einem positiven Signal, das als direkte Interaktion gedeutet wurde. Die Wechselwirkung beider Proteine

mit der DICE-RNA führte zu der Annahme einer kooperativen Bindung (Ostareck-Lederer und Ostareck, 2004; Ostareck *et al.*, 1997).

HnRNP E1 wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt, mittels Affinitäts-Chromatographie gereinigt und nach dem Abspalten der N-terminalen His-SUMO-Fusion zur Homogenität aufgearbeitet (Abschn. 4.4.5). Die Funktionalität des Proteins wurde mittels Filterbindungstest sichergestellt (Abb. 2-26).

Um eine direkte Interaktion zwischen hnRNP K und -E1 zu prüfen, wurde ein Sedimentationsgeschwindigkeitsexperiment mit jeweils 50 μM hnRNP E1 und hnRNP K sowie beiden Proteinen gleichzeitig durchgeführt. HnRNP E1 sedimentiert mit einem apparente S-Wert von 2,1 als monomeres Partikel. Zwischen den einzelnen Proteinen und der Mischung ergaben sich keine Unterschiede im Sedimentationsverhalten (nicht gezeigt). Unter den verwendeten Bedingungen (300 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0^{20 °C}, 50 mM Kaliumzitat, 10% Glycerin, 50 μM Protein bei 20 °C) findet keine Interaktion statt. Eine mögliche Wechselwirkung mit einem K_D -Wert jenseits der 100 μM kann allerdings nicht ausgeschlossen werden.

Sehr schwache Interaktionen von RNA-bindenden Proteinen lassen sich anhand kooperativer Wechselwirkungen nachweisen. Dazu wurden die Bindungsisothermen zwischen der DICE-RNA und jeweils hnRNP K oder -E1 oder einer 1:1 Mischung beider Proteine aufgenommen und auf Abweichungen vom Bindungsverhalten der Einzelproteine untersucht. In Abb. 2-26 sind die 3 apparenten Bindungsisothermen abgebildet. Sie lassen sich jeweils einzeln nach einer einfachen hyperbolen Gleichung anpassen. Für die Bindung von hnRNP E1 an das DICE läßt sich ein app. K_D -Wert von 0,6 nM und für hnRNP K ein app. K_D -Wert von 1,1 nM ermitteln. Die Mischung der beiden Proteine führt zu einem app. K_D -Wert von 0,8 nM, der also zwischen denen der app. K_D -Werte von hnRNP K und E1 liegt. Abgesehen von dem „übersteilen“ Verlauf, der für positiv kooperative Bindungsisotherme zu erwarten ist, sollte die kooperative Bindung von zwei Proteinen auf einer RNA zu einer noch niedrigeren Gleichgewichtsdissoziationskonstante führen. Der app. K_D -Wert sollte demnach niedriger sein als der der Einzelproteine. Dies ist nicht zu beobachten. Auch in diesem Experiment lassen sich keine Hinweise auf eine kooperative Bindung, das heißt RNA-vermittelte Protein-Protein-Interaktion zwischen hnRNP K und hnRNP E1 finden.

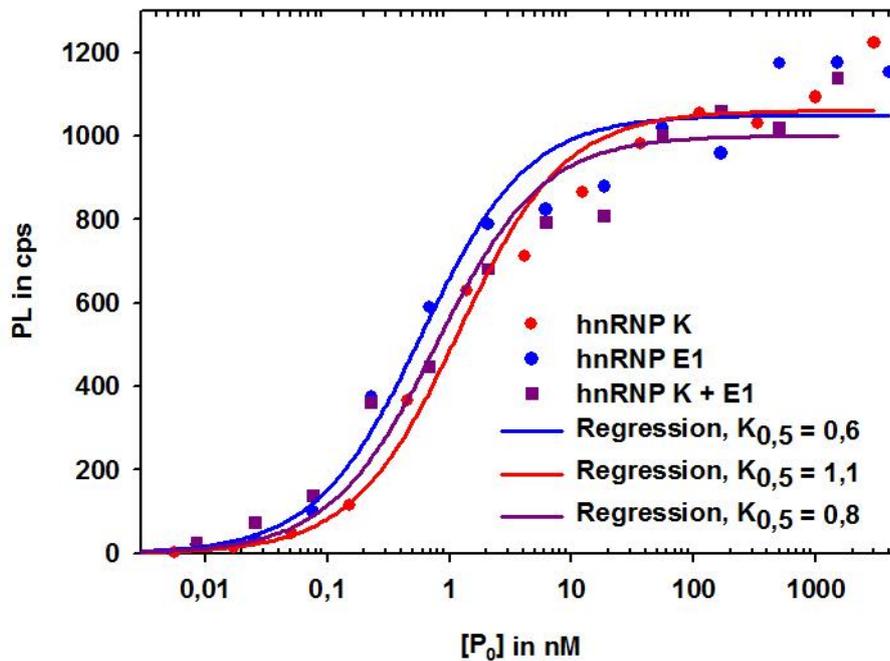


Abb. 2-26 Hyperbole Assoziation von hnRNP K und E1 im Filterbindungsexperiment

Filterbindungsexperiment mit den angegebenen Proteinen in 300 mM KCl, 20 mM Tris pH 8,0^{20°C}, 5% Glycerin mit 10 pM [³²P]-markierte DICE-RNA als Ligand. PL = Protein-RNA-Komplex, P_0 = Konzentration der einzelnen, oder die Summe aus beiden, angegebenen Proteinen. Regression mittels hyperboler Gleichung aus Abb. 2-19.

Mit den nukleinsäurefreien, aufgereinigten Proteinen hnRNP K und hnRNP E1 ist weder ohne noch mit RNA-Ligand eine direkte Interaktion nachzuweisen. Auf die Wiederholung der Experimente mit ^{Met}hnRNP K wurde verzichtet.

2.5.2 Autoaktivierung von c-Src.

Seit der Entdeckung von c-Src als Protoonkogen haben Struktur-Funktionsuntersuchungen einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis von autoaktivierten Tyrosinkinasen geleistet. Frühe Studien belegen den onkogenen Charakter einzelner Punktmutanten von c-Src (Kmieciak und Shalloway, 1987). Mit der 1997 veröffentlichten Röntgenkristallstruktur der deaktivierten c-Src Form konnten viele der biologisch bedeutsamen Punktmutationen in ein rationales Struktur-Funktionsprinzip eingeordnet werden (Xu *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1997). Autoaktivierte Tyrosinkinasen des c-Src Typs sind demnach modular aufgebaut. Am N-Terminus befindet sich eine SH4-Domäne, die myristoyliert ist und das Protein in der Membran verankert. Weiter C-terminal befindet sich die SH3-Domäne, gefolgt von einer SH2-Domäne. Die SH2-Domäne ist durch einen *linker* mit der Kinasedomäne verbunden. Am äußersten C-Terminus befindet sich eine kurze unstrukturierte Sequenz, die ein *in vivo* phosphoryliertes Tyrosin enthält (Abb. 1-3). Man stellt sich heute vor, dass c-Src in einer geschlossenen und in mehreren geöffneten Konformationen vorkommen kann. In der geschlossenen Form bindet die SH2-Domäne das

C-terminale pTyr527 und die SH3-Domäne den *linker* zwischen der SH2- und der Kinasedomäne. Dadurch wird die Kinasedomäne „gestaucht“ und das aktive Zentrum in einem inaktiven Zustand gehalten (Xu *et al.*, 1999).

Wird nur eine der beiden intramolekularen Interaktionen aufgehoben, z. B. durch intermolekulare Kompetition von SH2- oder SH3-Liganden, relaxiert das aktive Zentrum und die Kinase wird aktiver. Im aktivierten Zustand wird das Tyr416 exponiert und einer Phosphorylierung zugänglich. Ist Tyr416 phosphoryliert wird das aktive Zentrum in einer stabilen Konformation arretiert, so dass die regulatorischen Domänen keinen Einfluss mehr auf die Aktivität der Kinase haben. Die Phosphorylierung des Tyr416 ist eine Autophosphorylierung in *trans* (Moarefi *et al.*, 1997).

In vorhergehenden Studien wurde eine Aktivierung von c-Src durch hnRNP K gezeigt und der Einfluss der Argininmethylierung diskutiert (Adolph *et al.*, 2007; Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Durch die Präparation von methyliertem hnRNP K ist es möglich, den Einfluss der Methylierung auf die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K *in vitro* zu untersuchen. Weil dem Experimentator aber keine theoretischen und praktischen Auswertalgorithmen für In-vitro-Versuche mit autoaktivierten Kinasen bekannt waren, wurde zum besseren Verständnis zunächst die Geschwindigkeitsgleichung für eine einfache Autoaktivierung abgeleitet (Michel Spinka, MLU Halle-Wittenberg).

Ein einfacher Fall einer Autokatalyse ist gegeben durch:



Dabei ist A die inaktive Spezies und B die aktive Spezies.

Die Zeitgesetze lauten:

$$d(A)/dt = -k(A)(B)$$

$$d(B)/dt = +k(A)(B)$$

Die Summe aus A und B bleibt stets gleich. Also

$$(A_0) + (B_0) = S \quad \text{sowie} \quad S = (A) + (B)$$

Durch Umformen und Integrieren der Zeitgesetze (Abschn. 4.7) erhält man den zeitlichen Verlauf für die Spezies (A) und (B) (Gleichung 2-1, 2-2)

$$(A) = \frac{S e^{-Skt}}{\varepsilon + e^{-Skt}} \quad \varepsilon \equiv \frac{B_0}{A_0} \quad S \equiv A_0 + B_0 \quad \text{Gleichung 2-1}$$

(B) erhält man durch Subtraktion von (A) von S: (B)=S-(A)

$$(B) = \frac{S\varepsilon}{\varepsilon + e^{-Skt}} \quad \text{Gleichung 2-2}$$

Damit ist der zeitliche Verlauf der Konzentration der deaktivierten (A) und aktivierten (B) Spezies

während der Autoaktivierung für eine einfache Modellreaktion aus Reaktion 2-1 gegeben. Um den zeitlichen Verlauf der Konzentration der aktivierten Spezies B während einer Autoaktivierung darzustellen, wurden Kurven für verschiedene Anfangssituationen ε ($\varepsilon = B_0/A_0$) simuliert und die relative Konzentration der aktivierten Spezies B im Verhältnis zur Gesamtmenge S (B/S , Ordinatenachse) für eine gegebene Gesamtmenge S und der Aktivierungskonstanten k gegen die Zeit aufgetragen (Skt, Abszissenachse, Abb. 2-27).

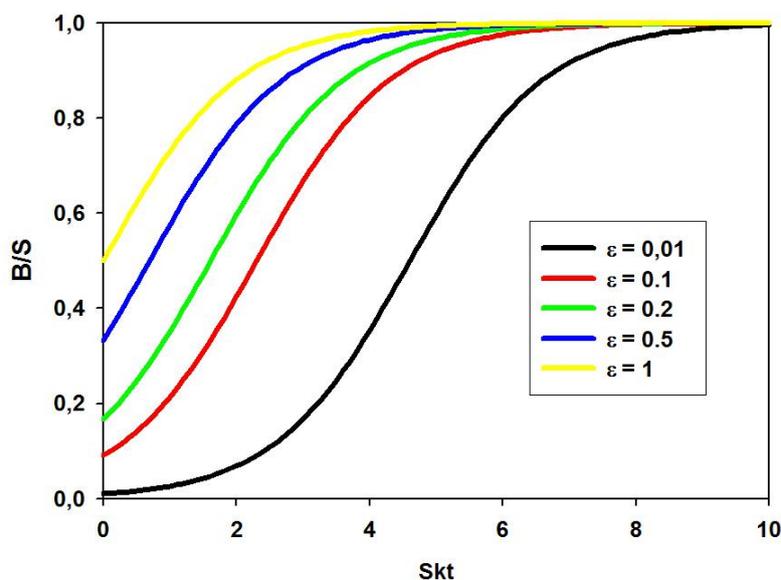


Abb. 2-27 Autoaktivierung mit unterschiedlichen Startbedingungen

Für Gleichung 2-2 wurden für verschiedene Startbedingungen (ε -Werte) achsennormierte Kurven generiert und die relative Zunahme an aktivierter Spezies gegen den Exponentialterm Skt aufgetragen.

Aus der Abb. 2-27 ergeben sich mehrere Aussagen zur Autoaktivierung: (i) Der Kurvenverlauf hängt stark von ε und damit vom Verhältnis B_0 zu A_0 ab. Bei geringer Anfangsaktivität bildet sich ein sigmoides Autoaktivierungs-Zeit-Profil. (ii) Dieses Profil verschiebt sich zu einem hyperbolischen Verlauf mit zunehmender Anfangsaktivität (Vergleich ε von 0,01 zu 0,5). (iii) Die Gesamtmenge S verändert nicht den Kurvenverlauf sondern nur die Geschwindigkeit, mit der die Autoaktivierung durchlaufen wird. Eine niedrige Gesamtkonzentration (S) bewirkt eine starke Verzögerung der Reaktion und eine hohe Gesamtkonzentration (S) bewirkt eine starke Beschleunigung der Reaktion. (iv) Aktivatoren oder Inhibitoren der Autoaktivierung werden sich in einer veränderten apparenten Geschwindigkeitskonstante k widerspiegeln.

Für die In-vitro-Aktivierung von c-Src durch hnRNP K wurde eine verkürzte c-Src Variante (Δ_{83} c-Src) rekombinant hergestellt. Dieser Variante fehlen die ersten Tyrosinkinase-spezifischen 83 Aminosäuren (SH4-Domäne) und damit auch die native Myristoylierung. Das resultierende Fragment unterliegt allen bisher untersuchten Regulationsmechanismen (Xu *et al.*, 1997) und stellt damit ein gut lösliches Untersuchungsobjekt dar. Um zu untersuchen welchen Einfluss die Argininmethylierung von hnRNP K

auf die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K hat, wurde zunächst sicher gestellt, dass eine Autoaktivierung von c-Src beobachtet werden kann. Dazu musste das Protein in einer aktivierbaren Form präpariert werden. Die Expressionen der Δ_{83} c-Src in *E. coli* ergaben allerdings keine hinreichenden Mengen vollständigen Proteins, weshalb eine Koexpression mit *C-terminal-Src-kinase* (CSK) durchgeführt wurde (Abschn. 4.2.2, Abschn. 4.4.11). CSK phosphoryliert das Tyr527 (pY527) im C-Terminus von c-Src, welches daraufhin eine intramolekulare Wechselwirkung mit der SH2-Domäne eingeht. Diese Wechselwirkung erlaubt die Ausbildung der deaktivierten Konformation, wie sie in den Kristallstrukturen beobachtet wurde (Xu *et al.*, 1997). Durch die Koexpression von Δ_{83} c-Src und CSK gelang die Präparation substanzieller Mengen Δ_{83} c-Src^{pY527} (Abschn. 4.4.11), die für weitere Untersuchungen genutzt wurden. Die Phosphorylierungsaktivität von Δ_{83} c-Src^{pY527} wurde durch Verwendung von γ -[³²P]-ATP verfolgt, in dem die radioaktiv markierten Substratproteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden und die eingebaute Radioaktivität durch *storage phosphor imaging* detektiert wurde (Abb. 2-28). Durch die elektrophoretische Trennung der Proteine kann die Phosphorylierung einzelner Proteine aus einer Mischung mehrerer Substrate bestimmt werden.

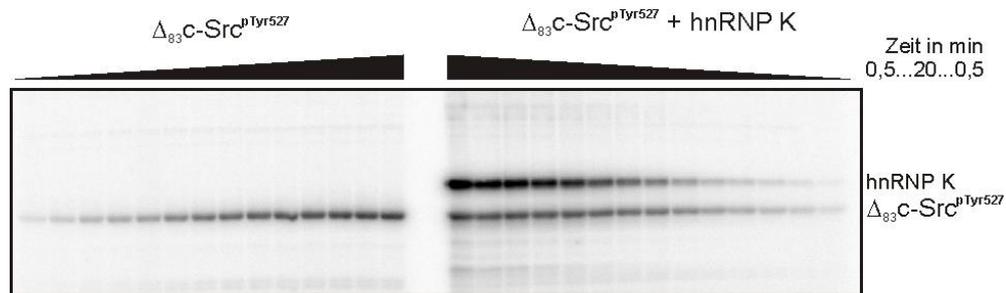


Abb. 2-28 Autophosphorylierung von Δ_{83} c-Src^{pY527} in Gegenwart von hnRNP K

Beispielhaftes Gelbild einer Phosphorylierungsanalyse. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben aus einer Phosphorylierungsreaktion entnommen, mittel SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel getrocknet und die Radioaktivität mit Hilfe eines *phosphor storage screens* sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Radioaktivität einzelner Proteine erfolgte durch die Verwendung von ImageQuant®.

Die Phosphorylierungsaktivität der Δ_{83} c-Src^{pY527} gemessen an hnRNP K war bei 37 °C instabil. Ein Vergleich der Reaktion bei 37 °C, 30 °C und 25 °C zeigte einen jeweils höheren Einbau an [³²P]-Phosphat. Auch eine Vorinkubation bei 37 °C führte zu einem signifikanten Aktivitätsverlust (nicht gezeigt). Bei 25 °C konnten jedoch Kinetiken mit annähernd gleich bleibender Aktivität gegenüber einem großen Überschuss eines einfachen Substrates mit nur einer Phosphorylierungsstelle (KH3-Domäne, (Messias *et al.*, 2006)) aufgenommen werden (Abb. 2-29).

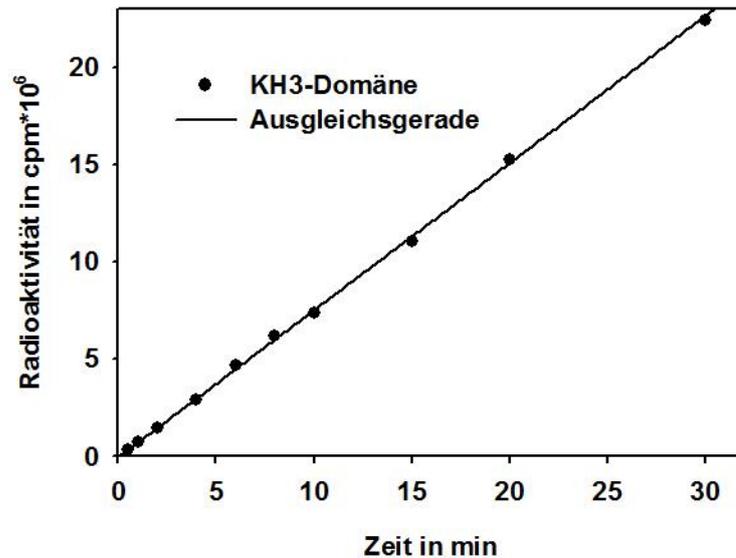


Abb. 2-29 Phosphorylierungskinetik der $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ mit der KH3-Domäne

0,5 μM $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ und 0,5 mM der dritten KH-Domäne von hnRNP K wurden in einer Phosphorylierungsreaktion mit $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ bei 25 °C zusammengegeben (Abschn. 4.3.7). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und wie in Abb. 2-28 Ausgewertet und mit ImageQuant® quantifiziert.

Weil die Geschwindigkeit der Autoaktivierung auch von der ATP-Konzentration abhängen kann, denn dies ist ein Kosubstrat, wurden ATP-Abhängigkeiten der $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ -Aktivität für das Substrat hnRNP K aufgenommen. Es zeigte sich eine Optimumskurve mit der höchsten Anfangsgeschwindigkeit der Autoaktivierung bei 0,3-0,8 mM ATP (Abb. 2-30).

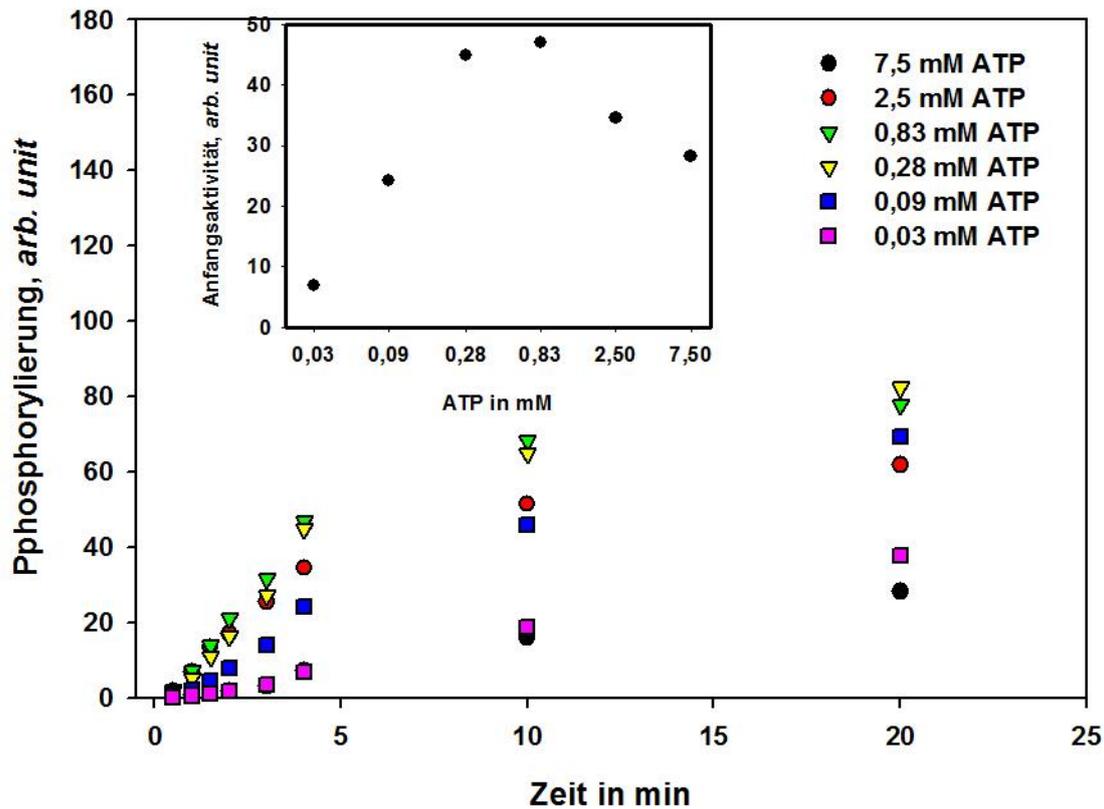


Abb. 2-30 ATP-Abhängigkeit der $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ -Aktivität mit hnRNP K

Phosphorylierungsreaktion von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ mit hnRNP K in Gegenwart unterschiedlicher ATP Konzentrationen (Abschn. 4.3.7). Auswertung wie in Abb. 2-28. Eingesetzte Grafik zeigt die Sekundärauftragung der Anfangsaktivität von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ gegen hnRNP K in Abhängigkeit der ATP-Konzentration (logarithmisch skaliert).

Um eine Autoaktivierung nachzuweisen, muss eine sigmoide Phosphorylierungs-Kinetik des c-Src beobachtet werden. Nimmt man an, dass die Phosphorylierung am Tyr416 zu einer signifikanten Erhöhung der Phosphorylierungs-Aktivität führt (Chong *et al.*, 2005), so kann die Autophosphorylierung durch den zeitlichen Verlauf des Einbaus von [^{32}P]-Orthophosphat in c-Src verfolgt werden, selbst dann, wenn das Tyr416 nicht die einzige Akzeptorstelle ist. Eine weitere Voraussetzung für die Beobachtung einer sigmoiden Autophosphorylierung ist ein niedriger Phosphorylierungsgrad am Tyr416 zu Beginn der Reaktion, was einem niedrigen ε -Werte, wie er in Abb. 2-27 gezeigt ist, entspricht. Weil die Autophosphorylierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ während der Expression in *E. coli* nicht unterbunden werden kann, ist davon auszugehen, dass ein Teil der $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ -Präparation bereits aktiviert ist. Daher wurde das $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ mit Hilfe der Tyrosinphosphatase PTPN2 dephosphoryliert ($\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$, Abschn. 4.4.12). Das $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ wurde erneut aufgereinigt, die Dephosphorylierung mittels Massenspektrometrie geprüft und ein Autophosphorylierungstest mit γ -[^{32}P]-ATP durchgeführt. In Abb. 2-31 ist der zeitliche Verlauf der Phosphorylierung von 4 μM $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ dargestellt. Die Datenpunkte durchlaufen im linearen Zeitintervall eine sigmoide Kurve, die einen Sättigungswert erreicht. Sollte das Enzym andere Tyrosine als das Tyr416 phosphorylieren (und dafür gibt es Hinweise, (Barker *et al.*,

1995)) dann vermutlich nicht mit derselben Effizienz oder innerhalb des beobachteten Zeitraums. Somit kann eine Autoaktivierung durch den Einbau von ^{32}P -Orthophosphat in $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ und damit auch in $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ verfolgt werden.

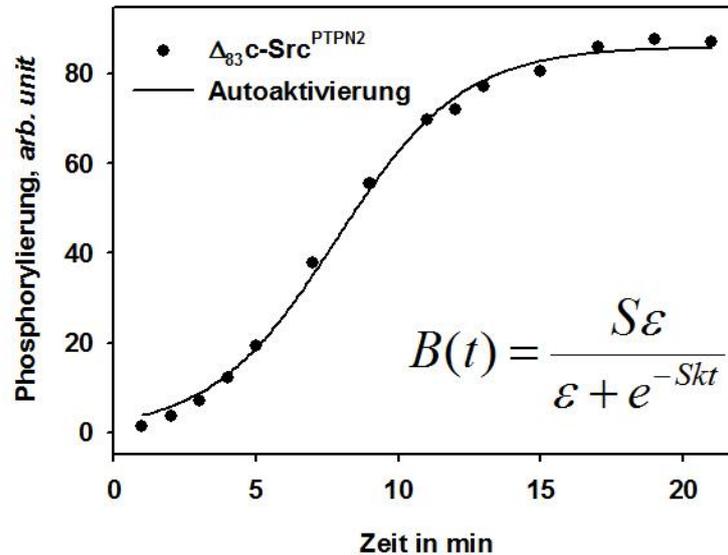


Abb. 2-31 Autoaktivierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$

$4 \mu\text{M}$ $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ wurden in einem Phosphorylierungs-Experiment mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP bei 25°C inkubiert und nach angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und wie in Abb. 2-28 analysiert. Anpassung an eine Autoaktivierung $B(t)$, mit den Parametern $S = 85,4$; $\varepsilon = 0,03$ und $k = 0,005 \text{ min}^{-1}$.

Ein wesentliches Kriterium der Autoaktivierung ist die überproportional starke Abhängigkeit der Autoaktivierung von der Gesamtkonzentration des $\Delta_{83}\text{c-Src}$. Um diesen Umstand zu dokumentieren, wurden die Autophosphorylierungen und damit die Autoaktivierungen für zwei verschiedene Konzentrationen von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ gemessen.

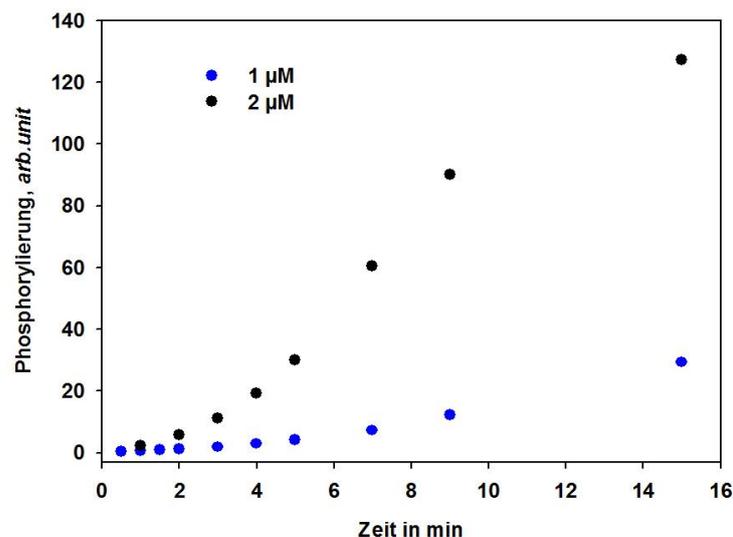


Abb. 2-32 Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$

$\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ wurde in einem Phosphorylierungs-Experiment (Abschn. 4.3.7) mit $\gamma\text{-}^{32}\text{P}$ -ATP bei 25°C inkubiert und nach angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen und wie in Abb. 2-28 analysiert.

Wie in Abb. 2-32 zu sehen, verläuft die Autophosphorylierung bei doppelter Konzentration deutlich schneller, wobei auch weit mehr als doppelte Mengen Phosphat in gleicher Zeit eingebaut werden.

Auch die Autophosphorylierung der deaktivierten $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ -Spezies unterliegt der Konzentrationsabhängigkeit. In Abb. 2-33 ist eine Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ nach einer Minute Reaktionszeit gezeigt. Bei der Verwendung von linear ansteigenden Mengen $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$, werden in der gleichen Zeit exponentiell ansteigende Mengen Phosphatgruppen übertragen. Das bedeutet wiederum, dass Punkt (iii) der theoretischen Betrachtung einer einfachen Autoaktivierung auch praktisch zu beobachten ist. Durch die Wahl der Gesamtkonzentration an $\Delta_{83}\text{c-Src}$ kann die Geschwindigkeit der Autoaktivierung moduliert werden.

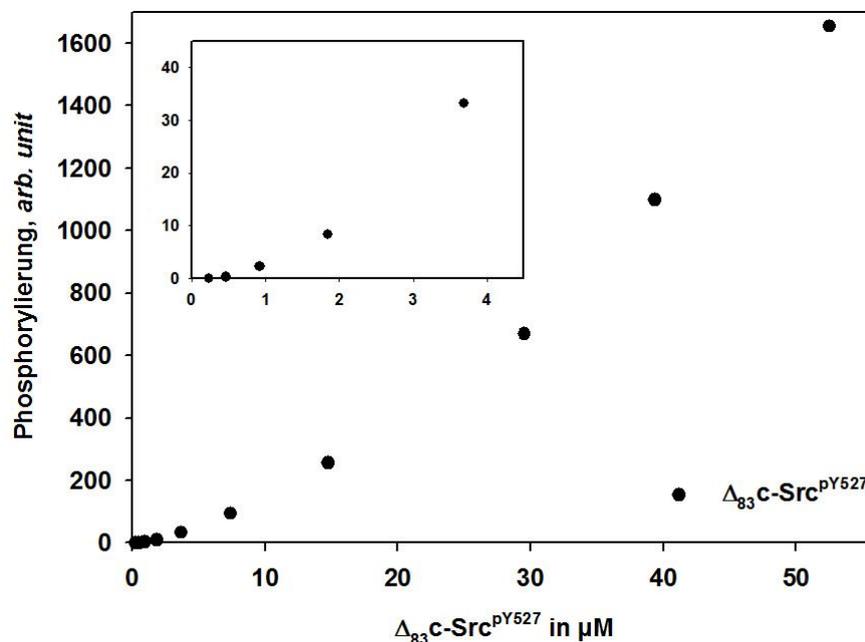


Abb. 2-33 Konzentrationsabhängigkeit der Autophosphorylierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$

Verschiedene $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ -Konzentrationen wurden in einem Phosphorylierungsexperiment mit $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ bei 25 °C inkubiert und nach einer Minute Proben entnommen und wie in Abb. 2-28 analysiert. Die eingesetzte Grafik zeigt eine Vergrößerung der niedrigen Konzentrationen.

In den für hnRNP K optimierten Pufferbedingungen wurde nun eine Autoaktivierung von 10 μM $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ allein und in Anwesenheit von 5 μM hnRNP K oder 5 μM $^{\text{Met}}\text{hnRNP K}$ aufgenommen (Abb. 2-34). Der Kurvenverlauf der Autoaktivierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ ähnelt dem Kurvenverlauf der modulierten einfachen Autoaktivierung mit einem ε -Wert von ca. 0,2 (Abb. 2-27). Nach 25 Minuten ist ein Großteil der Autoaktivierung durchlaufen, d.h. die aktivierte, am Tyrosin 416 phosphorylierte Spezies, ist stark angereichert. In Anwesenheit von hnRNP K oder $^{\text{Met}}\text{hnRNP K}$ ist keine Beschleunigung der Autoaktivierung festzustellen.

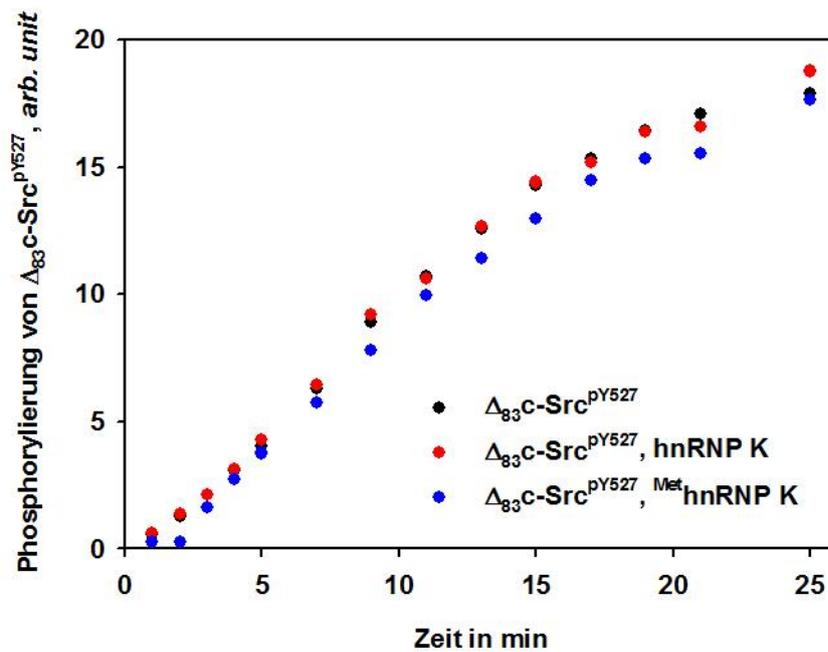


Abb. 2-34 Autoaktivierung von deaktiviertem $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$

10 μM $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ wurden entweder ohne oder mit 5 μM hnRNP K oder ^{Met}hnRNP K in 300 mM KCl, 20 mM Tris-HCl pH 8.0²⁰ °C, 2 mM MgCl₂, 10% Saccharose bei 25 °C vorinkubiert und eine durch 0,5 mM $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ initialisierte Autophosphorylierungs-Kinetik aufgenommen. Aliquots wurden zu den angegebenen Zeitpunkten entnommen und wie in Abb. 2-28 ausgewertet.

Vergleicht man die Autophosphorylierungs-Kinetiken der $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ mit der $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ so ist festzustellen, dass, mit einer deutlich geringeren Konzentration an $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$, die komplette Autoaktivierung in kürzerer Zeit durchlaufen wird als die nicht vollständige Autophosphorylierung mit der $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ -Variante (Abb. 2-31 und Abb. 2-34). Dies legt den Schluss nahe, dass die CSK-katalysierte Phosphorylierung am Tyr527 zu der erwarteten Deaktivierung des Enzyms c-Src führt und durch Liganden der SH2- oder SH3-Domäne moduliert werden kann.

In einem weiteren Experiment wurde der Einfluss von SH3-Liganden getestet. Dazu wurden Autoaktivierungskinetiken in Anwesenheit von polyprolinhaltigen kurzen Peptiden aufgenommen, die sich von Sequenzen des hnRNP K ableiten (Abschn. 4.3.7). Wie in Abb. 2-35 zu sehen ist, führt das Peptid P3 zu einer drastischen Beschleunigung der Autoaktivierung, die mit fallender Konzentration des Peptides abnimmt. Das Peptid P1 beschleunigt die Autoaktivierung nur geringfügig. Damit ist gezeigt, dass die $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ -Variante eine Beschleunigung der Autoaktivierung durch Ligandenbindung erfahren kann. Die effektiven Konzentrationen der verwendeten Peptide sind jedoch so hoch, wie sie aus praktischen Gründen für hnRNP K nicht erreicht werden können. Zumindest unter den getesteten Bedingungen kann hnRNP K oder ^{Met}hnRNP K *in vitro* keine Beschleunigung der Autoaktivierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ bewirken.

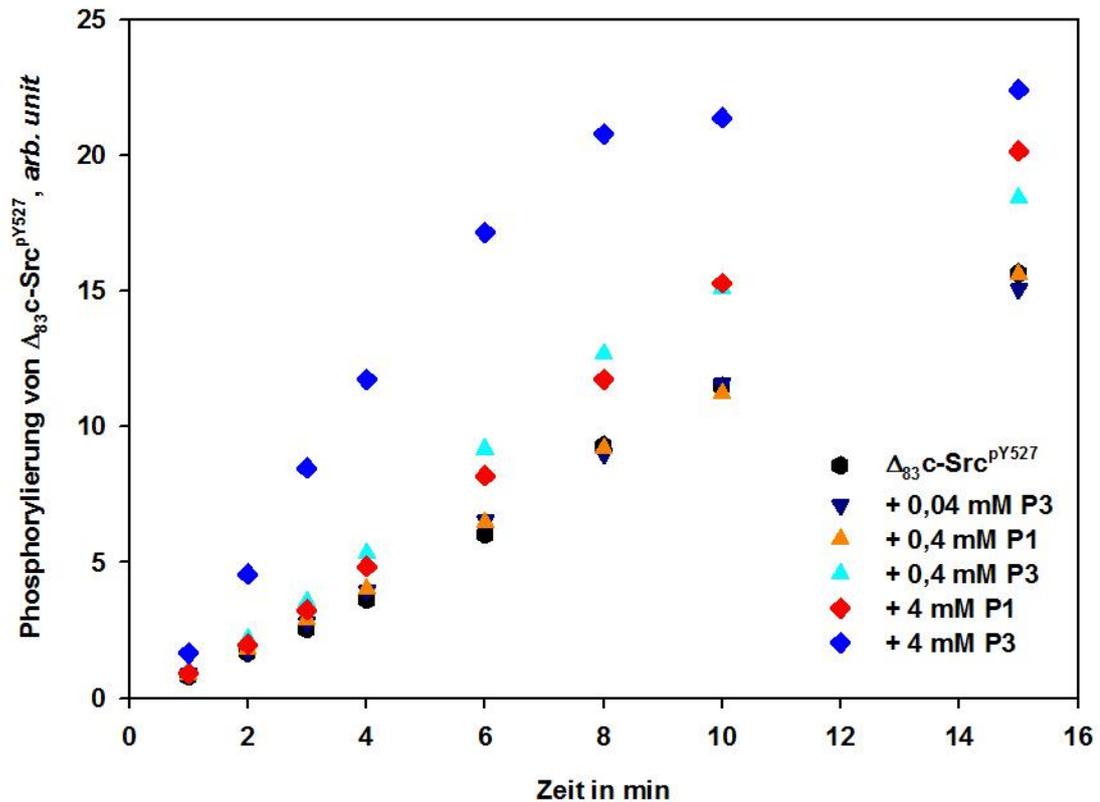


Abb. 2-35 Aktivierung der Autophosphorylierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ durch kurze Peptide

$5\ \mu\text{M}$ $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ wurden unter Standardphosphorylierungsbedingungen (Abb. 2-34) ohne oder mit den angegebenen Mengen P1- oder P3-Peptid inkubiert, nach den angegebenen Zeitpunkten Aliquots entnommen und wie in Abb. 2-28 analysiert.

Die Eigenschaft von hnRNP K und $^{\text{Met1}}$ hnRNP K, als Substrate der Tyrosinkinase $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ zu dienen, kann mit dem K_M -Werte quantifiziert werden. Dazu wurden $0,5\ \mu\text{M}$ $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ mit steigenden Konzentrationen hnRNP K für 3 min in einer Phosphorylierungsreaktion umgesetzt und die eingebaute Radioaktivität mit der Substratkonzentration korreliert. Die Bestimmung der apparenten K_M -Werte ergab ca. $50\ \mu\text{M}$ für hnRNP K und $75\ \mu\text{M}$ für $^{\text{Met1}}$ hnRNP K (nicht gezeigt). Durch die geringe Konzentration $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ und der kurzen Inkubationszeit kann eine substantielle Autoaktivierung ausgeschlossen werden. Jedoch werden in hnRNP K mehrere Tyrosine (mit vermutlich unterschiedlicher Effektivität) phosphoryliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002), so dass lediglich ein apparter K_M -Wert angegeben werden kann.

Da der Phosphorylierung eine physische Wechselwirkung zwischen hnRNP K und c-Src zugrunde liegt, ist es vorstellbar, dass eine Beschleunigung der Autophosphorylierung durch hnRNP K im mittleren mikromolaren Konzentrationsbereich stattfindet. Allerdings sollten hohe Substratkonzentrationen automatisch zur Konkurrenz der Autophosphorylierung - und damit zum Gegenteil dessen, was beobachtet werden soll - führen. Zusätzlich ist die gelbasierte Auswertung der Autophosphorylierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ durch zu hohe Störsignale der Substratproteine kompromittiert, so dass völlig andere

Methoden zur Analyse benutzt werden müssten. Eine Möglichkeit besteht in der Verwendung von ANS als Fluoreszenzfarbstoff, der durch Einlagerung in die Nukleotid-Bindetasche Änderungen am Aktiven Zentrum von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$, wie sie bei der Autoaktivierung auftreten, detektierbar macht.

2.5.3 Identifizierung methylierungsspezifischer hnRNP K-Interaktionspartner

Für die Identifizierung von methylierungsspezifischen Interaktionspartnern wurde ein *pull down*-Experiment durchgeführt. Als Zellsystem für die Identifizierung von Interaktionspartnern wurden K562-Zellen gewählt (Lozzio und Lozzio, 1975). Diese erythroiden Zellen wurden bereits als Modellsystem für die terminale Differenzierung von Blutzellen verwendet, in dem speziell die von hnRNP K regulierte Expression der r15-LOX-mRNA rekapituliert werden konnte (Naarmann-de Vries *et al.*, 2013; Naarmann *et al.*, 2008; Naarmann *et al.*, 2010). Um die Konkurrenz durch endogenes hnRNP K zu vermindern und das chemische Gleichgewicht auf die Seite der Komplexbildung zu verschieben, wurde versucht, mit möglichst hohen Konzentrationen an hnRNP K zu arbeiten. Dazu wurde eine Mikrochromatographiesäule präpariert, die 200 μl Ni^{2+} -NTA Material in einem dünnen Schlauch enthielt. Die Mikrosäule wurde an eine FPLC angeschlossen und mit 1 mg hnRNP K oder $^{\text{Met}}$ hnRNP K beladen. Um Proteine die mit der Matrix interagieren besser auszuschließen zu können, wurde der *pull down* auch mit dem leeren Ni^{2+} -NTA-Material durchgeführt (blanko). Anschließend wurden 2 ml vorbehandelter zytoplasmatischer K562-Extrakt durch die Mikrosäule gepumpt (Kontaktzeit ca. 5 min). Für die Vorbehandlung wurde der Extrakt mit RNase A inkubiert (Abschn. 4.3.4). Um Wechselwirkungen aufgrund von Aggregation zu minimieren wurde der Extrakt auf den Laufpuffer (300 mM KCl, 20 mM Imidazol, 20 mM Zitrat und 10% Saccharose) eingestellt und mit 0,1 mg/ml ca. 20-50 nt langer RNA versetzt. Nach kurzem Waschen wurden die gebundenen Proteine mit 200 mM Imidazol in Laufpuffer eluiert und fraktioniert gesammelt. Die Peakfraktion wurde massenspektrometrisch analysiert (Henning Urlaub, MPI Göttingen). Es konnten insgesamt 1050 Proteine identifiziert werden, die sich in die in Abb. 2-36 gezeigten Schnittmengen aufteilen.

Viele Proteine wurden nur mit ≤ 4 Peptiden identifiziert und wurden als unsichere Ergebnisse angesehen. In Tabelle 2-4 sind sicher identifizierte Proteine aufgelistet (≥ 5 Peptide), die erhebliche Unterschiede in der Anzahl der gefundenen Peptide und MS-scores im Vergleich zur Kontrollreaktion (blanko) aufwiesen. Weil für einige Proteine mehrere alternative Namen existieren, wurde in der Tabelle der Gename des Proteins aufgenommen. Von den sicher angereicherten Proteinen sind 16 Proteine durch methyliertes und nicht-methyliertes hnRNP K ähnlich stark angereichert worden. 38 Proteine wurden zuverlässiger durch $^{\text{Met}}$ hnRNP K identifiziert. Lediglich 9 Proteine wurden zuverlässiger durch nicht-methyliertes hnRNP K identifiziert. Damit zeigt sich eine deutlich stärkere Ungleichverteilung der sicher identifizierten Proteine als in Abb. 2-36.

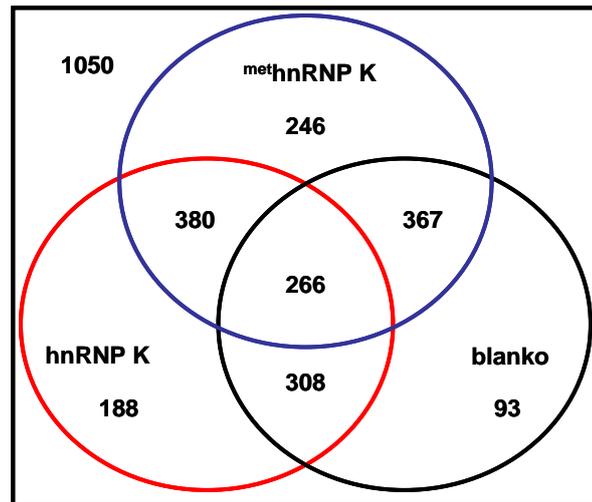


Abb. 2-36 Schnittmengen der durch pull down identifizierten Proteine

Die Kreise stellen die drei einzelnen pull down-Experimente dar. Die Zahlen repräsentieren die Schnittmengen der Experimente.

Neben RNA-bindenden Proteinen sind mehrere Proteine gefunden worden, die im Zusammenhang mit Spleißen und dem Ubiquitin-Proteasom-Netzwerk stehen. Des weitern sind einige Kinasen z. B. ERK2 und c-Src identifiziert worden, sowie PRMT1. Neben vielen ribosomalen Proteinen sind einige Translationsfaktoren identifiziert worden, von denen eIF5B speziell in dem ^{Met}hnRNP K-pull down angereichert war (Tabelle 2-4). Im Allgemeinen sind deutlich weniger RNA-bindende Proteine gefunden worden als erwartet. Die Inkubation mit RNase A und der Zusatz von kurzer RNA führten somit zum gewünschten Erfolg, indirekte durch RNA vermittelte Assoziationen zu unterdrücken. Für die Evaluierung einzelner Interaktionspartner sollten die verwendeten Reaktionsbedingungen nicht außer Acht gelassen werden.

Tabelle 2-4 Liste der mittels MS-Analyse identifizierten koeluierten Proteine

Aufgeführt sind nur Proteine mit deutlich unterschiedlicher Anreicherung von wenigstens 5 Peptiden. Die Namen entsprechen den Gennamen (HGNC) der identifizierten Proteine.

hnRNP K		^{Met} hnRNP K		blanko		Name (HGNC)
score	Peptide	score	Peptide	score	Peptide	
106	7	390	26	316	1	ABCF2
		230	14			RHA
247	13	2121	33	112	4	PRMT1
136	9	259	17	59	3	BIRC6
		170	15			DDB1
		350	23			USP7
83	4	317	8			DDX5
171	5	263	12	102	5	SERBP1
		321	17			PITHD1
		743	36			KIA1967
172	8	483	26	90	4	DDX3X DDX14
329	15	592	24	364	16	IKBKAP
		367	19			STUB1
		249	11			BAG3

130	7	656	19			DDX17
		280	10			RBM27
		264	9			GRB2
154	7	211	14			MCM5
		124	7			SEC23B
60	3	132	7	62	2	WDR82
		142	5			HNRNPH3
31	2	159	6			AVL9
204	9	345	21	268	10	TRIM28
76	3	271	15	97	6	HNRNPM
90	5	161	11	91	4	PI4KA
		201	11			XRN1
36	2	120	7	65	3	EIF5B
56	2	132	8	45	3	CDK9
48	3	172	8	50	2	PAFAH1B1
80	3	189	8	41	2	PRDX1
65	3	231	10	95	5	PPFIA1
116	6	212	16			CBL
		171	9			RBMX
		296	11			RBM14
		157	11	43	4	NUDT21
96	3	194	7	83	3	CAPRIN1
51	3	135	7	42	2	GTF2H2
57	4	246	12			PSPC1
951	45					DSP
712	22	46	2			MYH9
254	9	79	1			S100-A8
259	8					S100-A9
466	14					JUP
185	8					PANK4
145	9			40	1	HNRNPU
129	5	58	2			HNRNPA2B1
225	9	165	4			YWHAZ
244	4	273	7			SF1
136	9	175	7			PRKAG1
37	2	91	4			MCM6
144	8	175	7	65	1	DNAJB1
420	15	514	17	136	8	MAPK1/ERK2
384	22	264	21	179	9	PRPF8
194	6	159	6			PRPF4B
243	7	216	10			ERP44
137	5	91	6			MLLT4
101	2	127	5			TRA2B
161	5	121	4			EIF4A
102	9	128	7	52	2	DOCK11
96	3	140	6			ILF3
69	2	70	5			ILF2
186	6	136	8	58	2	EEF1A1
172	6	260	10	88	4	LANCL2
54	2	49	1			SRC

3 Zusammenfassung und Diskussion

Die Untersuchungen zum Einfluss der Argininmethylierung auf physiologische Funktionen von hnRNP K begannen *in vivo* und wurden, auf Grund der eingeschränkten experimentellen Möglichkeiten der Manipulation der Argininmethylierung eines spezifischen Proteins im Kontext der lebenden Zelle (Abschn. 1.6.2), auf In-vitro-Studien ausgedehnt. Diese ermöglichen die Deduktion mechanistischer Zusammenhänge, wie sie nur in einem definierten Minimalsystem möglich sind. Ob die gefundenen Erkenntnisse über den Einzelfall hinaus allgemeine Bedeutung erlangen können, soll im Weiteren diskutiert werden.

3.1 Die Argininmethylierung von hnRNP K hat keinen Einfluss auf dessen Lokalisation

Als hnRNP wurde hnRNP K bereits bei seiner Entdeckung als nukleäre Komponente identifiziert (Abschn. 1.2). Viele der bisher beschriebenen Funktionen von hnRNP K lassen sich auch auf nukleäre Ereignisse zurückführen (Abschn. 1.3.1). Färbungen in verschiedenen Zelltypen zeigten eine sehr deutliche Anreicherung des Proteins im Nukleus, mit Aussparungen der Nukleoli (Abschn. 2.1). Dennoch spiegelt die beobachtete Gleichgewichtsverteilung von hnRNP K innerhalb der Zelle die vielfältigen zytoplasmatischen Funktionen des Proteins nicht wider, und ist somit zum Teil unerwartet. Die Lokalisationsstudien in ES- und HeLa-Zellen zeigten eine deutliche nukleäre Lokalisation des hnRNP K. Sowohl das endogene hnRNP K in ES^{PRMT1-/-}-Zellen als auch die heterolog exprimierte nicht methylierbare Arginin-Glycin-Mutante zeigte keine Abweichungen der nukleären Lokalisation (Abschn. 2.1). Unter den verwendeten Kultivierungsbedingungen der ES- und HeLa-Zellen ist damit kein Einfluss der Argininmethylierung auf die Gleichgewichtsverteilung von hnRNP K festzustellen. Diese Beobachtung entspricht in soweit den Erwartungen, als dass die methylierten Arginine außerhalb der beschriebenen Lokalisationssequenzen von hnRNP K liegen und damit nicht, wie im Falle von PABPN1 oder FUS, mit den bekannten Transportinteraktionspartnern interferieren (Dormann *et al.*, 2012; Fronz *et al.*, 2011). Allerdings wurde nach Phosphorylierung an Ser284/353 eine starke Verschiebung der Gleichgewichtsverteilung von hnRNP K vom Nukleus ins Zytoplasma beobachtet (Habelhah *et al.*, 2001b). Ser353 liegt innerhalb der KNS-Sequenz und kann damit einen direkten Einfluss auf Transportinteraktionspartner haben. Ser285 liegt nahe der RGG-Motive, sodass ein Einfluss der Methylierung auf die Phosphorylierung und deren Konsequenzen untersucht werden sollte. Allerdings ist es innerhalb dieser Arbeit nicht gelungen, die zytoplasmatische Akkumulation nach Serin-Phosphorylierung durch ERK2 zu rekapitulieren. Obwohl nicht nur die Experimente wiederholt wurden, die bereits beschrieben waren, sondern die Studien auch auf weitere N- und C-terminale

GFP-Fusionsproteine ausgedehnt wurden, sowie eine weitere Zelllinie (HeLa-Zellen) für die Analysen herangezogen wurde, konnte kein Einfluss der Pseudophosphorylierung oder Serumstimulation auf die zelluläre Lokalisation beobachtet werden (Abschn. 2.1.3). Falls die ERK2 vermittelte Phosphorylierung die Lokalisation in bestimmten Zellen beeinflussen kann, ist sie nicht wie bisher vermutet hinreichend, sondern lediglich eine Voraussetzung für die beobachtete zytoplasmatische Anreicherung von hnRNP K. Der genaue Mechanismus sowie weitere physiologische Notwendigkeiten der zytoplasmatischen Akkumulation nach ERK2-Aktivierung bleiben offen. Dieser Mangel an Kausalität wird auch durch die Beschreibung gegensätzlicher Beobachtungen deutlich, in denen eine zytoplasmatische Anreicherung gezeigt werden konnte (Chen *et al.*, 2009; Habelhah *et al.*, 2001b), sowie Veröffentlichungen, in denen keine zytoplasmatische Akkumulation nach ERK2-Aktivierung beobachtet wurde (Chang *et al.*, 2009; Zhou *et al.*, 2010). Der Einfluss der Argininmethylierung konnte unter der fehlenden Voraussetzungen der putativen ERK-vermittelten zytoplasmatischen Akkumulation nicht untersucht werden.

3.2 Präparation und physiko-chemische Eigenschaften von hnRNP K

3.2.1 Herstellung von Arginin-methyliertem hnRNP K in *E. coli*

Die mikrobielle Herstellung rekombinanter Proteine bietet die Möglichkeit, beliebige Mengen Protein zu synthetisieren und dieses, durch geeignete Manipulation der Proteinsequenz, schnell und in einer nahezu beliebigen Reinheit zu präparieren (Burgess und Deutscher, 1990; Rehm, 2006). Das Reinigungsverfahren wird dabei durch die Verwendung von N- oder C-terminalen Affinitätsfusionen, die eine sehr spezifische Wechselwirkung mit einer Reinigungsmatrix vermitteln, erheblich vereinfacht. Um hnRNP K heterolog in *E. coli* zu exprimieren, wurde der ORF in einen pET28-Vektor kloniert, so dass ein relativ kurzes N-terminales Fusionspeptid entsteht. Der pET28-Vektor kodiert für eine hexa-Histidinfusion, welches die Reinigung des Zielproteins über eine Metallchelate-Affinitätschromatographie (Ni²⁺-NTA) ermöglicht. Im Gegensatz zu den bisher verwendeten pET19-Expressionskonstrukten verringerte sich mit dem N-terminalen Fusionspeptid auch die oligo-Histidin-Sequenz von 10 auf 6 Histidine. Das im pET28-Vektor kodierte Antibiotika-Resistenzgen Kanamycin-Phosphotransferase ermöglicht zudem den Einsatz des Translationsinhibitors Kanamycin, der auch während längeren Inkubationszeiten den Selektionsdruck aufrecht erhält und nicht wie das Antibiotikum Ampicillin (eingesetzt bei Verwendung von pET19-Konstrukten) bereits nach kurzer Zeit verstoffwechselt wird (Burgess und Deutscher, 1990).

Um den Einfluss der Protein-Argininmethylierung auf die Funktion des rekombinanten Proteins untersuchen zu können, ist jedoch eine präparative Methode für die Modifizierung von hnRNP K

notwendig. Eine bereits verwendete Methode beruhte auf der In-vitro-Methylierung rekombinanter Proteine durch Verwendung hoher Mengen an PRMT1 und SAM (Valentini *et al.*, 1999). Lediglich in einer Studie wurde bisher der Versuch unternommen, die Protein-Argininmethylierung während der heterologen Expression in *E. coli* einzuführen (Hsieh *et al.*, 2007). Dabei wurde das Hefe-Enzym Hmt1p konstitutiv exprimiert und das Substrat Sbp1p nach Aktivierung eines induzierbaren Promotors koexprimiert (Hsieh *et al.*, 2007). Mittels dieser Koexpression gelang die Präparation von quantitativ methyliertem Sbp1p (Hsieh *et al.*, 2007). Die in dieser Arbeit durchgeführte „einfache“ Koexpression des eukaryotischen Enzym-Substrat-Paars PRMT1 und hnRNP K führte nicht zu einer quantitativen Methylierung in *E. coli* (Absch. 2.3). Daher wurde der Ansatz überarbeitet und der moderaten Enzymaktivität der PRMTs Rechnung getragen (Fronz *et al.*, 2008; Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Nach einer anfänglichen Koexpression von Enzym und Substrat wurde die Neusynthese von unmodifiziertem Protein inhibiert und der enzymatischen Methylierung des Substrates durch eine nachfolgende Inkubation mehr Zeit eingeräumt (Abschn. 2.3). Die In-vitro-Methylierungs-Analyse der Koexpressionsprodukte zeigt die deutliche Zunahme an posttranslationaler Protein-Argininmethylierung mit Verlängerung der Inkubationszeit nach Inhibition der Proteinsynthese mit Erythromycin. Weil nicht die Länge der gesamten Inkubation mit dem Ausmaß der Methylierung korreliert, ist die Inhibition der Neusynthese offenbar entscheidend für die quantitative Methylierung in *E. coli*. Die MS-Analyse der Primärstruktur weist die Methylierung der *in vivo* als PRMT1 Substrate identifizierten Arginine auf (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die nahezu physiologische Methylierung von hnRNP K in *E. coli* stellt damit die dritte und effizienteste Methode zur Gewinnung von Arginin-methyliertem Protein dar. Die Präparation ist deutlich günstiger und weniger zeitintensiv als die zwei Alternativen der In-vitro-Methylierung mit gereinigten Proteinen (Valentini *et al.*, 1999) oder der Präparation aus Gewebeextrakten (Kerwitz *et al.*, 2003; Smith *et al.*, 1999).

Die Methodik der posttranslationalen Modifikation der Arginine durch PRMT1 in *E. coli* kann sicherlich auch auf andere Proteine angewandt werden. Die einzigen offensichtlichen Voraussetzungen sind die Löslichkeit und die hinreichende Stabilität des zu methylierenden Proteins in *E. coli*. Auch die gleichzeitige Expression von verschiedenen PRMTs in *E. coli* sollte die vollständige Methylierung von Substratproteinen, die durch mehrere PRMTs methyliert werden, sicherstellen (Fronz *et al.*, 2008). Es ist sogar vorstellbar, dass immer wenn ein posttranslational modifiziertes Protein in *E. coli* hergestellt werden soll, eine Nachinkubation, in der die Proteinsynthese inhibiert ist, den Anteil an modifiziertem Protein erhöht, wenn die Modifizierungsreaktion im Vergleich zur Synthese des Proteins langsam ist (Saitoh *et al.*, 2009; Sugase *et al.*, 2008).

3.2.2 Reinigung und physiko-chemische Charakterisierung von hnRNP K

Die heterologe Expression von hnRNP K in *E. coli* führt zu einer hohen Anreicherung des Proteins innerhalb der Zelle. Im Verlaufe der Arbeit zeigte sich jedoch, dass die Kultivierungsbedingungen von *E. coli* Einfluss auf die Qualität der Proteinpräparation haben. So führt die Expression in LB- oder TB-Medium sowie die Expression über 25 °C zu einer erheblichen Anreicherung von proteolytischen Fragmenten von hnRNP K. Die besten Präparationsergebnisse wurden erzielt, wenn die Zellen während der Induktion der heterologen Expression in supplementiertem M9-Minimalmedium (Abschn. 4.4.4) bei verminderter Temperatur ($\leq 25^\circ\text{C}$) kultiviert wurden. Die Anfälligkeit von hnRNP K für Proteolyse ist typisch für wenigstens teilweise unstrukturierte Proteine, deren Lösungsmittel-exponiertes Peptid-Rückgrat von Proteasen angegriffen werden kann (Burgess und Deutscher, 1990).

Die Verwendung von Hochsalzlösungen während der Reinigung minimierte bereits die Kontamination der Präparation durch Nukleinsäuren. Um weitere notwendige Reinigungen durchzuführen, musste die Ionenstärke deutlich reduziert werden, um z. B. mittels Anionenaustauscher die Nukleinsäurekontamination vollständig zu entfernen. Während der Etablierung der Reinigungsstrategie ist die Anfälligkeit des Proteins für die Aggregation bereits aufgefallen und führte parallel zu Löslichkeitsstudien. Die Ergebnisse der Lichtstreuungsmessungen wurden in die Etablierung der Reinigungsstrategie aufgenommen. Eine Kombination aus Ni^{2+} -NTA, Hydroxyapatit und MonoQ-Chromatographie ermöglichte die Präparation von hnRNP K in hoher Qualität und vermied eine Dialyse und Konzentrierung während der Präparation (Abschn. 4.4.4). Die Löslichkeitsstudien zeigten zum einen den positiven Effekt einer hohen Ionenstärke als auch den positiven Einfluss von Polyolen und mehrfachen Karbonsäuren, die über den Effekt der bloßen Ionenstärkeerhöhung hinausgehen (Abb. 2-13, 2-14). So haben bereits geringe Zitratkonzentrationen (10-20 mM) einen deutlich günstigeren Einfluss als Phosphat. Aber auch nichtgeladene Substanzen wie die Osmolyte Saccharose oder Trehalose (nicht gezeigt) bewirkten eine Verminderung der Aggregate. Abgesehen von den mehrfachen Karbonsäuren ist allerdings kein klarer Trend zu erkennen, welche Art von Additiv die Löslichkeit des Proteins weiter verbessert. In lebenden Systemen sind Osmolyte dazu da, unter Stresssituationen den Wasserhaushalt zu regulieren und Proteine in ihrer Funktionalität zu erhalten (Auton *et al.*, 2011a). Dabei werden Osmolyte durchaus in hohen Konzentrationen synthetisiert (Yancey, 2005). Seit einiger Zeit liegen ein theoretischer Ansatz (Auton und Bolen, 2005; Street *et al.*, 2006) sowie darauf aufbauende systematische Untersuchungen zur Osmolytwirkung auf Proteine vor (Auton *et al.*, 2008). Dabei wurden sowohl Transferenergien (ΔG_{tr}) der einzelnen Aminosäureseitenketten als auch des Peptidrückgrates von Wasser in Osmolytlösungen bestimmt. Es zeigte sich, dass die ΔG_{tr} des Peptidrückgrates von Wasser in Polyole positiv ist. Weil das

Peptidrückgrat im denaturierten Zustand stark Lösungsmittel exponiert ist, ist die ΔG_{tr} im denaturierten Zustand stark positiv. Daraus ergibt sich eine Vergrößerung der freien Energie des denaturierten zum nativen Zustand und damit eine erhöhte Proteinstabilität in Polyol-haltigen Lösungsmitteln (Auton *et al.*, 2011b). Legt man diese Befunde der positiven Wirkung von Saccharose auf hnRNP K zu Grunde, so bewirken Polyole vermutlich eine induzierte Strukturierung, wie sie bereits mit nativ ungefalteten Proteinen beobachtet wurde (Baskakov und Bolen, 1998; Melo *et al.*, 2010). Die Wirkung von Polycarbonsäuren wurde allerdings noch nicht untersucht. Der positive Effekt dürfte in erster Linie durch Unterdrückung der Coulomb-Energie von gegensätzlich geladenen Bereichen des Proteins herrühren. Weil die Coulomb-Energie aber mit dem Quadrat des Abstandes abnimmt, kann auch eine Osmolyt-induzierte Faltung von unstrukturierten Proteinbereichen die durch ionische Wechselwirkung induzierte Aggregation vermindern. Osmolyt-induzierte Faltung wurde in dieser Arbeit nicht untersucht. Ein CD-Spektrum von hnRNP K in 1 M KCl mit und ohne Saccharose könnte Aufschluss über eine induzierte Faltung geben.

Es sei darauf hingewiesen, dass die Aggregationsstudien mit einer N-terminalen hexa-Histidinfusion des hnRNP K durchgeführt wurden. Die beobachtete Tendenz von hnRNP K in Lösungsmitteln mit geringer Ionenstärke zur Aggregation zu neigen, könnte durch diese hexa-Histidinfusion verstärkt worden sein. Die beobachtete pH-Abhängigkeit der Aggregation korreliert mit dem steigenden Protonierungsgrad der hexa-Histidinfusion. Eine am Ende der experimentellen Arbeiten präparierten hnRNP K-Variante ohne Affinitätsfusion zeigte tatsächlich ein geringeres apparentes Aggregationsverhalten, sowohl während der Präparation als auch in Lichtstreu-Experimenten mit dem gereinigten Protein (nicht gezeigt). Für zukünftige Studien sollte daher möglichst gänzlich auf eine Affinitätsfusion verzichtet werden, die auch Experimente in Puffern, die weniger als 300 mM KCl enthalten, erlauben sollten.

Die RNA-Bindungsstudien mit aus ES-Zellen gereinigtem hnRNP K zeigten Abweichungen, die am besten von einer intrinsischen Aggregationstendenz erklärt werden können. Möglicherweise stellt die Aggregation einen physiologischen Mechanismus dar, die Aktivität von hnRNP K zu regulieren. Folgende Indizien sprechen für diese Vermutung. Weil die im Aggregat vorliegenden Proteine keine Funktion ausüben können, führt die Aggregation zum Aktivitätsverlust. Dieser ist aber nicht endgültig sondern reversibel (Abb. 2-15). Weil die Aggregation stark von der Proteinkonzentration abhängt, können somit auch geringe Änderungen der Konzentration in beide Richtungen drastische Folgen auf den Anteil des aktiven Proteins haben. Die Reversibilität eröffnet zudem die Möglichkeit der Regulation durch Mechanismen, die das Aggregationsgleichgewicht und damit den Anteil des aktiven Proteins verschieben. So wurde beobachtet, dass der Nukleinsäure-Ligand d2R (Abb. 2-13) oder die WW-Domäne des Proteins FBP21 (nicht gezeigt) die Aggregation von hnRNP K vermindern können.

Zusammengenommen sind damit wichtige Kriterien für eine physiologisch sinnvolle Regulation durch den Mechanismus der Aggregation gegeben. Einige RNA-Bindeproteine aggregieren auch *in vivo* unter Stressbedingungen (Gilks *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2005), wobei die Aggregation durchaus einen nützlichen Effekt für die Zelle haben kann (Serio und Lindquist, 2001). Bisher gibt es keine Beschreibung der In-vivo-Aggregation von hnRNP K. In den meisten Lokalisationsstudien weist hnRNP K eine recht homogene Verteilung innerhalb des Kerns auf (Abschn. 2-1). Jedoch wurde eine lokale Anreicherung in so genannten *mRNP granules* in differenzierenden erythroiden Zellen beschrieben (Naarmann *et al.*, 2010).

3.3 Wechselwirkung von hnRNP K mit cytidylatreichen RNAs

Die Untersuchungen zur RNA-Assoziation mit rekombinatem als auch aus ES-Zellen gereinigtem hnRNP K mittels Filterbindungsexperimenten ergaben einen apparenten K_D -Wert um 1-3 nM (Abb. 2-6, 2-19). Unter verbesserten Pufferbedingungen sind mit dem rekombinanten hnRNP K keine Abweichungen der Bindungsisotherme von einer einfachen bimolekularen Wechselwirkung zu detektieren, wie sie für eine kooperative Wechselwirkung auftreten würde (Eftink, 1997; Ryder *et al.*, 2008). Allerdings ist die Datenqualität eines Filterbindungsexperimentes mit hnRNP K wenig dazu geeignet, systematische Abweichungen hinreichend genau zu detektieren und Aussagen zu komplexeren Bindungsmodi anstellen zu können. Durch die Verwendung der DICE-RNA als Ligand ist die Assoziation von mehreren Proteinen an der RNA wahrscheinlich. Die daraus resultierende Retention der RNA auf dem Filter kann von der verwendeten Konzentration an hnRNP K abhängen und zu Abweichungen vom erwarteten Kurvenverlauf gerade im höheren Konzentrationsbereich führen, die nicht auf ein komplexeres Bindungsmodell zurückzuführen sind (Abb. 2-19). In Experimenten mit niedrigeren Ionenstärken sind ebenfalls Abweichungen vom einem einfachen Bindungsmodell beobachtet worden, die jedoch nur durch Aggregation erklärt werden können (Abb. 2-6). Ein deutlich besseres Verfahren für die Analyse der Assoziation von Proteinen mit Nukleinsäure ist die Fluoreszenztitration, die es erlaubt, im Gleichgewicht zu messen und eine deutlich höhere Präzision der Messwerte zu erreichen. Die mittels Fluoreszenztitration gemessenen K_D -Werte von hnRNP K und ^{Met}hnRNP K mit dem ^{FAM}2R von ca. 6 nM lassen sich hinreichend gut durch ein bimolekulares Bindungsmodell beschreiben. Ein Einfluss der Argininmethylierung auf die Wechselwirkung mit Nukleinsäure ist nicht zu beobachten (Abb. 2-20). Sollten die RGG-Motive an der Assoziation mit Nukleinsäure partizipieren, so ist deren Methylierung weder hinderlich noch förderlich. Auch für PABPN1 wurde kaum ein Einfluss der Methylierung auf die Wechselwirkung zur RNA gemessen, obwohl die argininmethylierte C-terminale Domäne an der Assoziation mit RNA beteiligt ist (Kuhn *et al.*, 2003).

Die im Gleichgewicht gemessene Dissoziationskonstante für ^{FAM}2R ist etwas höher als Messungen mit

dem Filterbindungsexperiment und der DICE-RNA ergaben. Jedoch liegt der Anpassung an die Daten auch ein bimolekulares Bindungsmodell zu Grunde, welches nur ungenügend die Interaktion von hnRNP K mit dem ^{FAM}2R widerspiegelt. Bereits die Wiederholung des Titrationsexperimentes mit erhöhter ^{FAM}2R-Konzentration zeigte deutliche Abweichung von einer bimolekularen Reaktion (Abb. 2-22). Auch die Analyse der Bindungsereignisse mittels intrinsischer Fluoreszenz des hnRNP K deutet auf zwei Assoziationen von hnRNP K mit einem ^{FAM}2R hin (Abb. 2-21). Um die dazugehörigen Dissoziationskonstanten zu bestimmen, war es notwendig, die exakte Lösung für eine assoziative Folgereaktion abzuleiten (Abschn. 4.8, Spinka und Moritz). Mit Hilfe dieser Lösungen war es möglich, die Daten aus Abb. 2-22 anzupassen und die zweite Dissoziationskonstante zu bestimmen ($K_{D2} = 30 \text{ nM}$). Die erste Dissoziationskonstante wurde auf 5 nM festgelegt, weil unter den Messbedingungen im niedrigen Konzentrationsbereich praktisch kein freies Protein vorlag. Die analytische Lösung der Folgereaktion machte es zudem nun möglich, den Verlauf von Titrationskurven für beliebige Reaktandenkonzentrationen zu simulieren (Abschn. 4.8). Es zeigte sich, dass unter bestimmten Umständen der Verlauf der Titrationskurve trotz eines Folgereaktionsmechanismus einer bimolekularen Reaktion gleicht (Abb. 3-1). Die Modulationen aus Abb. 3-1 zeigen auch, dass durch das Verändern der Startbedingungen der Titration (z. B. erhöhte Ligandenkonzentration) das Abweichen der Bindungsisotherme von einer scheinbar bimolekularen Reaktion erzwungen werden kann.

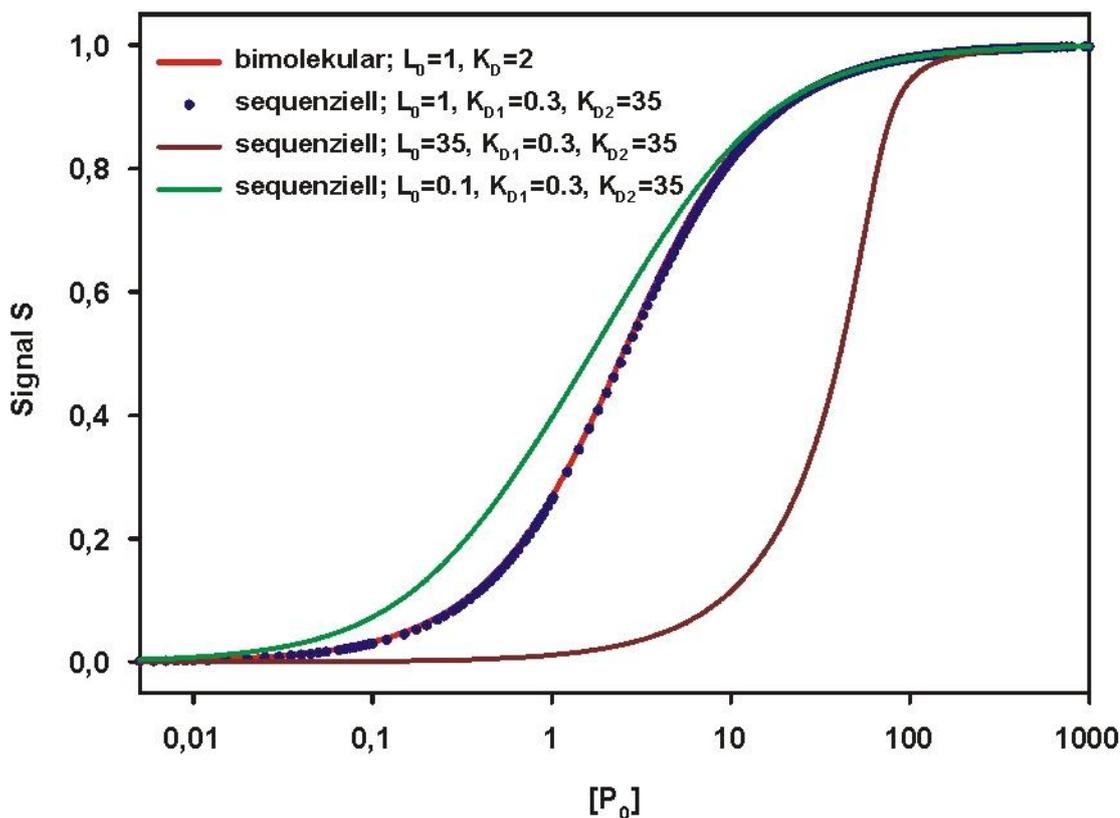


Abb. 3-1 Verlauf einer sequenziellen Reaktion

Modulation von Bindungsisothermen verschiedener sequenzieller Reaktionen mit den angegebenen Parameterkonstellationen. α wurde auf 0,5 festgelegt. Zum Vergleich wurde eine bimolekulare Reaktion abgebildet (rot).

Daraufhin wurden die Titrations aus Abb. 2-20 nach dem Folgereaktionsmodell (mit $\alpha = 0,56$) ausgewertet. Dabei ergaben sich Werte für die erste Dissoziation von etwas kleiner als 1 nM und ein K_{D2} -Wert von ca. 30 nM. Die zweite Dissoziationskonstante ist damit durch zwei unterschiedliche Titrations bestätigt worden. Weil die Identifizierung einer sequenziellen Reaktion aus der Bindungsisotherme nicht für jede Parameterkonstellation gegeben ist, sind Titrations bei unterschiedlichen Ligandenkonzentrationen grundsätzlich ratsam, wenn ein komplexeres Bindungsmodell nicht ausgeschlossen werden kann. Damit die Dissoziationskonstanten und die Verteilung der Signalintensitäten (α) sicher bestimmt werden können, empfiehlt sich eine globale Anpassungen mehrerer Titrations (Herman und Lee, 2012; Wang und Wu, 2002). Nach den Kenntnissen des Experimentators ist die analytische Beschreibung der Folgereaktion erstmalig, obwohl dieser Reaktionstyp häufig anzutreffen ist (Backe *et al.*, 2005; Mazzaferro *et al.*, 2011). Eine Schwierigkeit in der Anwendung der analytischen Lösung liegt in dem Auftreten zweier sich abwechselnder Wurzeln (Lösungen) der kubischen Gleichung (Abschn. 4.8). Dieses verhindert das einfache Anpassen von Datenpunkten an die Lösungsvorschrift, sodass gegebenenfalls ein analoger, iterativer Anpassungsprozess durchgeführt werden muss.

3.3.1 Sequenzabhängigkeit der hnRNP K-Nukleinsäure-Wechselwirkung und der *K-combination mode*

Die hohe Affinität von hnRNP K für cytidylatreiche Oligonukleotide ist abhängig von mehreren C₄-Motiven, die als Bindestellen für die KH-Domänen dienen. Im Gegensatz dazu, zeigt die geringe Affinität von hnRNP K für Poly(A), dass Adenine aus der Erkennungssequenz der KH-Domänen eher ausgeschlossen werden (Tabelle 2-2). Die systematische Evolution eines RNA-Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) führte zur Identifizierung von stark gefalteten RNAs mit nur einem Oligo(C)-Motiv innerhalb eines einzelsträngigen *loops* (Thisted *et al.*, 2001). Die Dissoziationskonstante von hnRNP K für diesen Liganden lag um ca. 50 nM und damit deutlich niedriger als die in dieser Arbeit gemessenen K_D-Werte für einen unstrukturierten Liganden mit nur einem Oligo(C)-Motiv (Tabelle 2-2)(Backe *et al.*, 2005). Möglicherweise kann hnRNP K zusätzlich zur bekannten Einzelstrang-Interaktion auch in einer anderen Art und Weise mit Nukleinsäure wechselwirken.

Die Daten des Konkurrenzexperimentes zeigen das komplexe Zusammenspiel von mehreren KH-Domänen mit Einzelstrang-Nukleinsäuren auf. Der *K-combination mode* stellt dabei ein mögliches Modell zur Interpretation der multivalenten Protein-RNA-Interaktion dar. Der durch Kombinatorik errechnete entropische (statistische) Gewinn in der freien Bindungsenergie ist allerdings eine Vereinfachung, die weder den Abstand einzelner C₄-Motive, noch sterische Hinderungen der Domänen mit in Betracht zieht (Kelly *et al.*, 1976). Möglicherweise aber unterstützt die flexible Struktur der RNA die unabhängige Assoziation mehrerer Domänen durch eine entsprechende Faltung, so dass nur in konkreten Fällen das Modell angepasst oder eingeschränkt werden muss.

Die Homologie von Aminosäuren in der Interaktionsfläche der Tandem-Domäne KH1-KH2 von hnRNP K und hnRNP E1 deuten auf eine als Einheit vorliegende „Pseudo-Didomäne“ in hnRNP K hin (Du *et al.*, 2008)(Abschn. 4.9). Weil sich die RNA-Interaktionsflächen in der Tandem-Domäne gegenüber liegen, müssen die Bindemotive für die Interaktion mit beiden KH-Domänen mindestens 5 Nukleotide auseinander liegen (Du *et al.*, 2008). Für den Liganden CCCAAA (Tabelle 2-2) zwingen sich dann nur wenige mögliche Konfiguration von hnRNP K für die Interaktion mit allen drei KH-Domänen auf: die Tandem-Domäne wechselwirkt mit den äußeren C₄-Motiven während KH3 mit dem mittleren Motiv assoziiert, so wie es für hnRNP E1 vermutet wurde (Du *et al.*, 2008). Tatsächlich gibt es Grund zur Annahme, dass die Assoziation der Tandem-Domäne an einen Liganden mit zwei C₄-Motiven thermodynamisch günstiger ist als die Assoziation der KH3-Domäne mit einem Liganden mit nur einem C₄-Motiv. Sind zwei RNA-Bindedomänen über eine flexible Peptidverbindung (*linker*) miteinander verbunden, so nimmt die Domänen-Kooperativität der Assoziation mit zunehmender *linker*-Länge ab (Shamoo *et al.*, 1995; Tripsianes *et al.*, 2011). Das heißt, die Bindungsenergie einer Didomäne sinkt von

der maximal additiven Bindungsenergie beider Einzeldomänen für eine *linker*-Länge von 0 Aminosäuren (nicht flexible/unabhängige Domänen) auf lediglich das zweifache der Bindungsenergie einer Domäne für sehr lange *linker*-Längen (Shamoo *et al.*, 1995). Weil die Tandem-Domäne durch einen mutmaßlich unstrukturierten 170 Aminosäure-langen *linker* mit der KH3-Domäne verbunden ist, kann der additive Effekt auf die Bindungsenergie nur noch sehr klein sein. Vergleicht man die K_D -Werte für Liganden mit einem C_4 -Motiv (22 μM , Tabelle 2-2), die mutmaßlich von der dritten KH-Domäne gebunden werden (Messias *et al.*, 2006), mit Liganden mit drei C_4 -Motiven (0,16 μM , Tabelle 2-2), so folgt daraus, dass die stark erhöhte Affinität nicht durch gleiche Bindungsenergien der Tandem-Domäne und der KH3-Domäne resultieren können, sondern die Tandem-Domäne einen deutlich stärkeren Bindungsenergie-Beitrag liefern muss. Diese Schlussfolgerung wird auch durch indirekte Bindungsdaten aus Hefe-drei-Hybrid-Experimenten gestützt, in denen die Tandem-Domäne stärkere RNA-Wechselwirkung zeigte als die drei einzelnen KH-Domänen des hnRNP K (Klimek-Tomczak *et al.*, 2004). Weil die Bindungsenergie der Tandem-Domäne aus der Summe der Bindungsenergien der einzelnen KH-Domänen resultiert (Shamoo *et al.*, 1995), sind die Affinitäten der isolierten KH1- und KH2-Domäne vermutlich relativ gering. Qualitative Bindungsstudien mit den isolierten Domänen zeigen für KH1 und KH2 nur geringe Wechselwirkungen mit Nukleinsäuren (Dejgaard und Leffers, 1996; Leffers *et al.*, 1995). Eine geringere Affinität bedeutet oft aber auch eine weniger starke Sequenzabhängigkeit der Assoziation. Die additiven Bindungsenergien zweier gekoppelter, niedrigaffiner und wenig sequenzabhängiger Domänen können damit durchaus zu einer hochaffinen Bindung mit geringer Sequenzspezifität führen (Naarmann-de Vries *et al.*, 2013). Daher führen Untersuchungen mit einzelnen Domänen leicht zum Unterschätzen der Wechselwirkungskompetenz komplexerer Multidomänenproteine (Dejgaard und Leffers, 1996; Messias *et al.*, 2006).

Der *K-combination mode* sagt für die Assoziation von hnRNP K mit $^{\text{FAM}}2\text{R}$ mehrere Konfigurationen des Proteins auf der Nukleinsäure voraus, die sicherlich nicht gleich populiert, sondern ihren thermodynamischen Unterschieden entsprechend verteilt sind. Das heißt, der Komplex aus hnRNP K und $^{\text{FAM}}2\text{R}$ ist eine Mischung verschiedener Komplexkonfigurationen. Misst man nun die Dissoziationsgeschwindigkeit des hnRNP K- $^{\text{FAM}}2\text{R}$ -Komplexes, ist es wahrscheinlich, dass die verschiedenen Subkomplexe mit verschiedenen Raten dissoziieren. Die Anpassung der Dissoziationskinetik durch zwei Exponentialterme macht bereits deutlich, dass nicht nur ein Komplex in Lösung vorliegt (Abb. 2-25). Die Residuen dieser Anpassung zeigen immer noch systematische Abweichung, so dass davon ausgegangen werden kann, dass weitere Dissoziationskinetiken dem Signal immanent sind. Auf eine Anpassung mit drei Exponentialthermen wurde allerdings verzichtet, weil lediglich die Werte der Residuen kleiner wurden, die systematischen Abweichungen jedoch nicht entfielen und die ermittelten Dissoziationskonstanten nicht sehr verschieden waren. Der Unterschied in den Amplituden der

Teilprozesse zwischen hnRNP K und ^{Met}hnRNP K könnte auf eine unterschiedliche Verteilung der Konfigurationen (Subspezies) innerhalb des Protein-RNA-Komplexes zurückzuführen sein. Weil aber die ermittelten Dissoziationskonstanten den Zerfall der Vielzahl an postulierten Kombinationen des Proteins an der RNA (Subkomplexe) nur ungenügend beschreiben, sollte die Messung mit dem CCCAAA Liganden wiederholt werden. Der *K-combination mode* sagt für diesen Liganden nur zwei mögliche Kombinationen voraus, die sich in einer klarer zu interpretierenden Dissoziationskinetik äußern sollten, welche dann auf Unterschiede in Abhängigkeit vom Methylierungszustand untersucht werden kann.

Welche Bedeutung hat der *K-combination mode* für die Interpretation der hnRNP K-Nukleinsäure-Interaktion *in vivo*? Die hohe Affinität zu oligo(C)-reichen Liganden wird durch die kooperative Beteiligung aller drei KH-Domänen bewirkt. Inaktivierung einer Domäne z. B. durch Phosphorylierung (Messias *et al.*, 2006) wird daher nur einen begrenzten Einfluss auf die Assoziation mit Nukleinsäure haben, weil die Bindungsenergien der einzelnen Domänen nicht additiv in die Wechselwirkungskonstante einfließen (Shamoo *et al.*, 1995)(siehe oben). Dagegen wirkt das Trennen der Domänen z. B. durch Proteolyse (Naarmann-de Vries *et al.*, 2013) sehr drastisch auf die Affinität der Fragmente, weil die Anzahl an möglichen Kombinationen drastisch reduziert wird. Umgekehrt führt auch die Verminderung der C₄-Motive zu einer Reduktion der Kombinationsmöglichkeiten (Tabelle 2-2). Die translationale Repression der 2R-Sequenz wird durch Verkürzen auf lediglich drei C₄-Motive (1R) aufgehoben (Ostareck *et al.*, 1997). Aus Tabelle 2-2 ist abzulesen, dass damit eine 100-fache Verminderung der Affinität von hnRNP K für CCCAAA einhergeht und deswegen vermutlich keine Repression mehr vermittelt werden kann. Möglicherweise aber ist die Assoziation von zwei Proteinen auf der 2R-Sequenz für die translationale Repression notwendig (Reimann *et al.*, 2002). Um die zwei Möglichkeiten zu unterscheiden, sollten Sequenzen mit 5 C₄-Motiven (z.B. CCCCCA) auf ihre reprimierende Wirkung in Translationsexperimenten getestet werden. Die erste Assoziation von hnRNP K mit CCCCCA ist nur um weniges geringer affin, sollte also kaum Einfluss auf die Repression haben. Die zweite Assoziation von hnRNP K mit CCCCCA jedoch ist deutlich schwieriger, d.h. erst bei sehr viel höheren Konzentrationen zu beobachten, so dass die Translationsrepression durch zwei Moleküle hnRNP K drastisch beeinträchtigt sein sollte.

Der *K-combination mode* kann auch auf andere Proteine übertragen werden. Das Strukturverwandte hnRNP E1, ebenfalls ein poly(C)-bindendes Protein mit drei KH-Domänen, sollte demnach ebenfalls durch die beschriebenen Mechanismen mit der Nukleinsäure interagieren (Dejgaard und Leffers, 1996; Ostareck *et al.*, 1997; Reimann *et al.*, 2002). Experimentelle Daten weisen auch auf sehr ähnliche Affinitäten zu den getesteten RNAs hin, wie sie für hnRNP K gemessen wurden (Abb. 2-26, nicht gezeigt). Daher ist anzunehmen, dass beide Proteine um die gleichen oder ähnlichen Bindestellen

konkurrieren und die anteilige Assoziation durch die Konzentration der Proteine bestimmt wird. In diesem Fall führt bereits die leichte Verminderung der Affinität durch z.B. Phosphorylierung eines Proteins (Messias *et al.*, 2006) zu einer signifikanten Verschiebung der anteiligen Assoziation beider Proteine mit der jeweiligen RNA. Durch eine räumliche Trennung beider Proteine durch die nukleäre Lokalisation von hnRNP K und die zytoplasmatische Lokalisation von hnRNP E1/2, wie sie in einigen Zellen beobachtet wurde (Chkheidze und Liebhaber, 2003; Kosturko *et al.*, 2006), kann die Konkurrenz umgangen werden, so dass die poly(C)-reichen Sequenzen je nach Kompartiment mehrheitlich mit dem einen oder dem anderen Protein assoziiert sind.

3.4 Die Autoaktivierung von c-Src - vom Modell zur Beobachtung

Die In-vitro-Studien mit der deaktivierten c-Src-Variante (Δ_{83} c-Src^{P^{Y527}}) zeigten keine Veränderung der Kinetik der Autoaktivierung durch den Zusatz von hnRNP K (Abb. 2-34). Unter den unten diskutierten technisch-experimentellen Vorbehalten lässt sich eine direkte Beteiligung von hnRNP K an der Aktivierung von c-Src nicht nachweisen. Die zuvor postulierte Aktivierung von c-Src durch hnRNP K ist vornehmlich durch zellbiologische Experimente und der Phosphorylierung am Tyr416 abgeleitet worden (Adolph *et al.*, 2007; Ostareck-Lederer *et al.*, 2002), die einen indirekten Mechanismus der Aktivierung nicht grundsätzlich ausschließen können. Wird die Aktivierung der Kinase durch die Phosphorylierung am Tyr416 nachgewiesen, so sollte in Betracht gezogen werden, dass mehrere Mechanismen auf die Konzentration des Tyr416-phosphorylierten Enzyms Einfluss nehmen. Das sind (i) Phosphatasen (Cloutier und Veillette, 1996; van Vliet *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2002), (ii) die Proteininstabilität (Patwardhan und Resh, 2010), (iii) die Konzentration der totalen c-Src Menge (Wang und Wu, 2002), (iv) die Aktivität von CSK (Chong *et al.*, 2004; Levinson *et al.*, 2008). Um direkte Rückschlüsse auf die Aktivierung von c-Src durch hnRNP K zu gewinnen, müssten alle aufgezählten Modulatoren der Aktivität über die Dauer und Anzahl der Experimente konstant bleiben. Dies ist *in vivo* nahezu unmöglich nachzuweisen und lässt daher kaum Rückschlüsse auf eine direkte Aktivierung von c-Src durch hnRNP K oder anderer Proteine zu. Hingegen ermöglicht die In-vitro-Analyse der Autoaktivierung, einen direkten Zusammenhang zwischen Aktivität und Aktivator herzustellen (Liu und Wang, 2004; Moarefi *et al.*, 1997). Dazu sind aber zwei Voraussetzungen zu erfüllen: (i) Die Möglichkeit der Präparation von deaktiviertem und damit aktivierbarem c-Src, sowie (ii) die Etablierung eines Modells der Autoaktivierung zur Interpretation der kinetischen Daten. Beides ist, wenn auch mit Einschränkungen, in dieser Arbeit gelungen.

Bisher war es nicht möglich, deaktiviertes c-Src^{P^{Y527}} aus *E. coli* zu präparieren, weil das Enzym zum einen posttranslational modifiziert und zum anderen proteolyseanfällig ist (Piserchio *et al.*, 2009; Young *et al.*, 2001). Die innerhalb dieser Arbeit durchgeführte Koexpression von c-Src und CSK führt zur

c-Src-Phosphorylierung am Tyr527 und gleichzeitig zur Deaktivierung und damit mutmaßlich auch zur Stabilisierung des Enzyms (Chong *et al.*, 2005). Weil aber die Autophosphorylierung am Tyr416 während der Expression von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ nicht unterbunden werden kann, ist ein Teil von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ bereits aktiviert, d. h. am Tyr416 Phosphoryliert (Abb. 2-34, Abschn. 4.3.8). Daher weisen die Autoaktivierungskinetiken auch nicht mehr den typisch S-förmigen Charakter auf. Eine Beschleunigung der Autoaktivierung kann aber dennoch beobachtet werden (Abb. 2-35). Für eine stärker deaktivierte c-Src-Präparation sollte ein weiteres Trennverfahren, z. B. eine Anionenaustausch-Chromatographie, zur Separierung unterschiedlich phosphorylierter Spezies etabliert werden. Prinzipiell stellt aber die Präparation von deaktiviertem $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ in *E. coli* eine deutliche Erleichterung für die In-vitro-Analyse der Autoaktivierung dar.

Um nachzuweisen, dass Tyr527 nach der Koexpression phosphoryliert ist, wurde eine MS-Analyse von tryptisch verdautem $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ durchgeführt (Abschn. 4.3.8). Diese zeigte die für Phosphorylierungen typische um 80 Da vergrößerte Molmasse des Tyr527-enthaltenden C-terminalen Peptides, jedoch auch ein Signal für das nicht phosphorylierte C-terminale Peptid (Abschn. 4.3.8). Weil der Nachweis der phosphorylierten Peptide durch schlechte Ionisierbarkeit problematisch ist, können die Signale nicht für eine Quantifizierung genutzt werden (Steen *et al.*, 2005) und damit keine Schlüsse über den Anteil des phosphorylierten Peptides gezogen werden.

Eine weitere MS-Analyse von „vollständig“ phosphoryliertem $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ sollte die Autophosphorylierung von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ qualitativ belegen (Abschn. 4.3.8). Es zeigte sich, dass neben den zwei erwarteten Phosphorylierungen auch ein Teil des Proteins dreifach phosphoryliert ist (Abschn. 4.3.8). Damit wird die Analyse der Phosphorylierungs-Kinetiken mit radioaktivem [³²P]-ATP vermutlich durch die komplexe Zusammensetzung des Phosphorylierungs-Signals aus mehreren Phosphorylierungs-Stellen und damit Phosphorylierungs-Ereignissen erschwert. Der Verlauf der Phosphorylierungs-Kinetiken deutet aber an, dass die Ereignisse unterschiedlich schnell ablaufen (Abb. 2-31). Für die Ableitung von Aktivierungskonstanten sollte mit einer $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ -Variante gearbeitet werden, in welcher weitere Phosphorylierungsstellen mutiert sind und damit lediglich die zwei regulatorischen Tyrosine phosphoryliert werden können. Eine dritte Phosphorylierungs-Stelle in c-Src wurde bereits beschrieben, die enzymatische oder biologische Bedeutung ist aber bisher unklar (Boerner *et al.*, 1996).

3.4.1 Wechselwirkung von hnRNP K und c-Src

Um einen möglichen Einfluss von hnRNP K auf $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{pY527}}$ zu untersuchen, wurden Reaktionsbedingungen gewählt, unter denen beide Proteine monodispers vorlagen. Diese beinhalten eine relativ hohe Salzkonzentration (300 mM KCl) sowie 10% Saccharose. Für einige SH3-Domänen ist

bekannt, dass ihre Affinität zu Interaktionspartnern durch eine erhöhte Ionenstärke vermindert wird (Feng *et al.*, 1995). Auch Saccharose könnte einen negativen Einfluss auf die Interaktion beider Proteine haben, falls notwendige unstrukturierte Peptidregionen dem Lösungsmittel und damit den Liganden durch Faltung entzogen werden (Abschn. 3.2.2). Daher steht das Ausbleiben der Beobachtung einer direkten Interaktion, abgesehen von der Substrat-Enzym-Wechselwirkung, unter dem Vorbehalt von möglicherweise ungünstigen Reaktionsbedingungen. Das gleiche Argument trifft auch auf die Aktivierung von Δ_{83} c-Src^{pY527} durch die Peptide P1 und P3 aus Abb. 2-35 zu. Es kann nicht unterschieden werden, ob die Aktivierung durch die Peptide tatsächlich erst bei sehr hohen Konzentrationen zu beobachten ist oder die Pufferbedingungen die Analyse kompromittieren. Die Wiederholung der Analysen mit einer hnRNP K-Variante, die auch in Niedrigsalzpuffern monodispers ist, sollte Aufschluss über die Bedeutung der Pufferzusammensetzung geben.

Die Ableitung eines einfachen Modells der Autoaktivierung diene vornehmlich der Beurteilung der erhaltenen Phosphorylierungskinetiken und der Verdeutlichung der nichtlinearen Zusammenhänge. Die daraus geschlussfolgerten Aussagen zur Autoaktivierung von c-Src stellen konkrete Anforderungen an Experimente zur Untersuchung von intermolekularen Wechselwirkungen, die in den folgenden Experimenten bedacht wurden. Für die Ableitung spezieller enzymatischer Parameter ist das Modell allerdings wenig geeignet, weil das zu Grunde liegende Reaktionsschema stark vereinfacht ist. Konkrete theoretische Betrachtungen zur Autoaktivierung wurden im Zusammenhang mit Zymogenen erarbeitet (Garcia-Moreno *et al.*, 1991). Diese können an die Enzymologie von Kinasen adaptiert werden (Wang und Wu, 2002). Sogar der Einfluss eines Aktivators (Ca^{2+}) auf die Autoaktivierung von Trypsinogen wurde theoretisch erarbeitet (Liu und Wang, 2004).

Seit einiger Zeit wird zunehmend die räumliche und zeitliche Beschränkung der Signaltransduktion innerhalb der Zelle erforscht (Salazar *et al.*, 2010). Dazu werden nicht selten Modellrechnungen zu möglichen Signalamplituden eines Signaltransduktionsweges erstellt und mit zellulären Beobachtungen abgeglichen (Kaimachnikov und Kholodenko, 2009). Für diese Modellrechnungen sind biochemische Untersuchungen zur Regulation und zum Katalysemechanismus einzelner Enzyme die Grundlage. So wurde in der Publikation von (Kaimachnikov und Kholodenko, 2009) ein fehlerhaftes Modell zur Regulation von c-Src erstellt, mit dessen Hilfe Kinasesignalamplituden moduliert wurden, die auch Eingang in bedeutende Übersichtsartikel gefunden haben (Kholodenko *et al.*, 2010). Der Fehler im Modell besteht in der nicht betrachteten Autoaktivierung in *trans* der pTyr527-Variante des c-Src (deaktiviert), obwohl diese bereits bekannt war (Boerner *et al.*, 1996; Sun *et al.*, 2002) und auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. Daher können biochemische Analysen zum grundlegenden mechanistischen Verständnis der Enzymologie der Autoaktivierung von c-Src noch Beiträge zum allgemeinen Verständnis von Signaltransduktions-Prozessen liefern.

3.5 Putative Wechselwirkungspartner

Die Synthese von methyliertem hnRNP K aus *E. coli* ermöglichte es, ein vergleichendes *pull down*-Experiment durchzuführen. Dazu wurden 1 mg des methylierten oder des nicht-methylierten hnRNP Ks an einer Ni²⁺-NTA-Matrix immobilisiert und 1 ml nativer zytoplasmatischer K562-Extrakt durch die Matrix gepumpt. Die kleine NTA-Säule sollte durch die hohe lokale Konzentration von hnRNP K mögliche Interaktionspartner retardieren und mit der anschließenden Elution von hnRNP K koeluiieren. Die SDS-Gel-basierte MS-Analyse identifizierte sowohl eine Reihe von Proteinen, die differentiell angereichert waren, als auch einige Proteine, die mit beiden hnRNP K-Varianten gleichermaßen interagierten. Insgesamt überrascht die relativ große Zahl an differenziell angereicherten Proteinen gegenüber den gleich angereicherten, da der Unterschied beider Experimente lediglich in dem Methylierungsstatus des hnRNP Ks lag (Tabelle 2-4). Es fällt auf, dass die meisten identifizierten Proteine in der ^{Met}hnRNP K-Fraktion deutlich stärker angereichert waren als in der hnRNP K-Fraktion. Das ist zum Teil unerwartet, weil die Methylierung bisher mehrheitlich zu einer Reduktion von Protein-Protein-Interaktionen führte (Bedford und Clarke, 2009; Bedford *et al.*, 2000). Möglicherweise verstärkt die Methylierung auch den hydrophoben Charakter eines Proteins, so dass vermehrt unspezifische hydrophobe Wechselwirkungen ausgebildet werden. Um die Auswirkungen der Methylierung auf einzelne Interaktion zu bestätigen, sollten weitere unabhängige Experimente in Lösung durchgeführt werden. Dabei wird die Präparation von rekombinantem Arginin-methyliertem hnRNP K die Analysen deutlich vereinfachen (Abschn. 2.3).

Einige bereits beschriebene Interaktionspartner konnten bestätigt werden. Die MAP-Kinase1 ERK2 wurde mit beiden hnRNP K-Varianten koeluiert und mit deutlichen mehr Peptiden nachgewiesen als in der Kontroll-Reaktion (Habelhah *et al.*, 2001b). Auch PRMT1 wurde mit nicht methyliertem Protein deutlich stärker angereichert als in der Kontrollreaktion (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Der sehr hohe Peptid-score für PRMT1 in der Fraktion mit ^{Met}hnRNP K ist vermutlich auf Reste des rekombinanten koexprimierten Proteins in der ^{Met}hnRNP K-Preparation zurückzuführen und lässt somit keine quantitativen Rückschlüsse auf die Interaktion zu. Für c-Src wurden wenige Peptide gefunden (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Der zytoplasmatische Extrakt enthielt aufgrund der Präparationsmethode ohne Detergenzien sicherlich nur einen geringen Teil der Membran-assoziierten Proteine (Abschn. 4.3.4). Zudem ist die Expression von c-Src in uninduzierten K562-Zellen gering (Naarmann *et al.*, 2008). Für einen Großteil der gefundenen Proteine wurde bisher keine Interaktion beschrieben. Um diese zu prüfen, sind weitere Experimente notwendig und gegebenenfalls deren biologische Bedeutung zu identifizieren.

Der angereicherte Translations-Initiationsfaktors 5B (eIF5B) stellt dabei ein besonders interessantes Untersuchungsobjekt dar. EIF5B ist eine GTPase, die während der Translationsinitiation die Ausbildung

der 80S Holoribosomen am Start-Methionin katalysiert (Hershey *et al.*, 2012; Pestova *et al.*, 2000). Das ist genau der Schritt der Translations-Initiationsreaktion, der bei Reporter-mRNAs inhibiert ist die das DICE im 3'-UTR enthalten (Ostareck *et al.*, 2001). Damit stellt diese putative Interaktion eine mögliche Verbindung zwischen dem DICE-assoziierten hnRNP K und der am 5'-Ende manifestierten Translationsinhibition dar. *In vivo* korreliert Austausch des methylierten hnRNP K zu nicht-methyliertem hnRNP K während der Blutzellreifung mit der Aufhebung der Translationsrepression der r15-LOX mRNA (Naarmann *et al.*, 2008). *In vitro* wurde die translationsreprimierende Wirkung von hnRNP K bisher nur mit rekombinantem Protein untersucht (Ostareck *et al.*, 1997). Möglicherweise können In-vitro-Translationsexperimente mit methyliertem und nicht-methyliertem hnRNP K bereits Hinweise für diese Interaktion geben.

3.6 Ausblick

Die Herstellung von methyliertem hnRNP K ermöglicht die Untersuchung des Einflusses der Argininmethylierung auf putative Interaktionspartner. Eine Reihe von möglichen Methylierungssensitiven Proteinen wurden durch das *pull down*-Experiment aufgezeigt. Nachfolgend sollten Gleichgewichtsmessungen benutzt werden, um die falsch positiven Ergebnisse, z. B. durch Aggregation oder RNA-vermittelte Interaktionen, durch bessere Kontrollen ausschließen zu können. Für die Untersuchung der putative Interaktion zu eIF5B könnten In-vitro-Translations-Repressions-Experimente in ES^{+/+} und ES^{-/-}-Extrakt oder der Vergleich von ^{Met}hnRNP K und hnRNP K in etablierten Translations-Experimenten in Retikulozytenlysat (Ostareck *et al.*, 1997) die Bedeutung der Argininmethylierung von hnRNP K in der Translationsrepression als auch die Funktionalität der Interaktion prüfen.

Die RNA-Bindungsstudien von hnRNP K mit der 2R-RNA zeigen die mögliche Assoziation von zwei Proteinen auf. Eine sukzessive Verkürzung der C₄-Motive kann nun in In-vitro-Translations-Experimenten auf die reprimierende Wirkung untersucht werden und die Notwendigkeit einer mehrfachen Assoziation von hnRNP K aufzeigen. Mit den Erkenntnissen des *K-combination mode* können verbesserte Sequenz-Vergleiche zur Identifizierung neuer hnRNP K-RNA-Liganden durchgeführt werden. Dazu sollte die genaue Sequenzspezifität der Tandem-Domäne untersucht werden.

4 Material und Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

Immortalisierte murine embryonale Stammzellen (ES-Zellen), die eine Insertion im PRMT1-Gen tragen ($ES^{\text{PRMT1-}/\text{PRMT1-}}$) (Pawlak *et al.*, 2000) sowie die immortalisierten Wildtyp-Zellen ($ES^{\text{PRMT1+}/\text{PRMT1+}}$) wurden wie in (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006) kultiviert und alle 2-3 Tage passagiert. Humane embryonale Nierenzellen (HEK) und humane Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (HeLa-Zellen) wurden bei 37 °C, 5% CO₂ in *Dulbecco's modified Eagle's Medium* (DMEM high glucose/GlutaMAX, pyruvat) mit 10% hitzeinaktiviertem (30 min, 55 °C) fetalem Kälberserum (FBS, Biochrom) und 1% Penicillin/Streptomycin (Invitrogen) kultiviert. Alle 5-6 Tage wurden die Zellen passagiert. Für Transfektionsexperimente wurden Zelllinien mit geringer Passagierung benutzt.

Für die Bestimmung der Lebend-Zellzahl wurde die Zellsuspension 1:1 mit 0,4% Trypanblau in PBS verdünnt und in einer Zählkammer nach Thoma ausgezählt (Phillips, 1993).

Für die Serum-Stimulations-Experimente wurden die Zellen für 16 h in DMEM mit nur 1% FBS kultiviert bevor für die angegebenen Zeitpunkte das Medium zu DMEM mit 10% FBS gewechselt wurde (Habelhah *et al.*, 2001b).

Die Transfektion von Plasmiden mittel Kalziumphosphat-Präzipitation wurden wie in (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006) durchgeführt. Dazu wurden die Zellen auf 75 cm²-Zellkulturschalen ausgesät und bei einer Konfluenz von weniger als 70% transfiziert.

Immunfluoreszenzen wurden nach (Huttelmaier *et al.*, 2001) mit wenigen Abweichungen durchgeführt. Die zu untersuchenden Zellen wurden auf angeätzte und im Falle der ES-Zellen mit Gelatine behandelten Deckgläschen ausgesät und über Nacht kultiviert. Die Deckgläschen wurden geerntet, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen mit 4% PFA (Sigma-Aldrich) in PBS für 30 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert. Die Deckgläschen wurden erneut zweimalig mit PBS gewaschen und die Zellen mit 0,2% Triton X-100 in PBS permeabilisiert (5 min, RT). Die gewaschenen permeabilisierten Zellen wurden mit 2% BSA in PBS für 30 min (RT) geblockt und direkt anschließend mit den primären Antikörpern in 0,2% BSA in PBS inkubiert (1 h, 37 °C). Überschüssige Antikörper wurden durch mehrmaliges Waschen entfernt und die Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wurden die Deckgläschen in ddH₂O sowie Ethanol getaucht und getrocknet. Die abgetrockneten Deckgläschen wurden zellseitig mit *ProLong Gold Antifade reagent with DAPI* (Antifade, Invitrogen) auf einem Objektträger fixiert. Das enthaltene DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) dient der Färbung des Zellkerns (Schweizer und Nagl, 1976).

Für die Fluoreszenzdetektion von GFP-fusionierten Proteinen wurden die Zellen entweder lebend

mikroskopiert oder mit PFA fixiert, gewaschen, getrocknet und auf dem Objektträger mit *Antifade* fixiert.

Um das Zytoplasma anzufärben wurden entweder Tubulin immunologisch angefärbt oder das Aktin-Cytoskelett mit Phalloidin-TRITC (Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat) (Sigma-Aldrich) angefärbt.

Fluoreszenz-Aufnahmen der Färbungen wurden entweder mit einem E600-Mikroskop (Nikon) mit angeschlossener Digitalkamera (Hamamatsu) aufgenommen und mit Lucia Software (Nikon) ausgewertet oder mit einem Axiovert 200M-Mikroskop (Carl Zeiss) aufgenommen und mit der Software AxioVision 4.7 ausgewertet. Die Geräteeinstellungen richteten sich nach den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen.

Tabelle 4-1 Antiseren und ihre Verdünnung für die Immunfluoreszenzen

Antikörper	Hersteller	Verdünnung
a-hnRNP K	Santa Cruz/ D-6	1:400
a- α -Tubulin	Sigma-Aldrich/ DM1A	1:800
a-HA	Sigma-Aldrich/ H6908	1:400
a-PRMT1	Upstate/ 07-404	1:200
a-Kaninchen-FITC	Dianova	1:400
a-Kaninchen-Cy3	Dianova	1:800
a-Kaninchen-Cy5	Dianova	1:400
a-Maus-FITC	Dianova	1:400
a-Maus-Cy3	Dianova	1:800

4.2 Molekularbiologische Methoden

Standardverfahren zur Vermehrung, Isolierung und Veränderung von Plasmid-DNA sind nach allg. üblichen Laborprotokollen (Green und Sambrook, 2012) oder nach Herstellerangaben der verwendeten Enzyme/Chemiebausätze (*kits*) durchgeführt worden. Die verwendeten *E. coli* Stämme für die Klonierung waren XL1-Blue und XL10-Gold (Stratagen), und für die rekombinante Expressionen BL21 CodonPlus (Stratagen) und Rosetta2 (Novagen). Die Authentizität der Stämme wurde durch Wachstumstests auf antibiotikahaltigen Medien geprüft.

Reagenzien der Molekularbiologie:

Enzyme: *Pfu* (Promega)
Pwo (Peqlab)
Taq (Promega)
 Restriktionsenzyme (NEB)
 T4-DNA-Ligase (NEB)
 Phosphatase (Roche Diagnostics)
 T4-PNK(NEB)
 T4-DNA-Pol (NEB)
 Poll *large fragment* (NEB)

Bausätze (Kits) PCR-purification (Roch)
Mini-prep-Kit (peqGOLD, Peqlab)
Midi-Prep-Kit (Qiagen)

Chemikalien wurden von Roth oder Merck in p.A.-Qualität bezogen.

4.2.1 PCR

Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde nach Herstellerangaben der verwendeten Polymerasen durchgeführt. Die *annealing*-Temperatur richtete sich dabei nach der komplementären Primersequenz, die nach der „4+2-Regel“ errechnet wurde. Um die Produktausbeute zu erhöhen, wurden gegebenenfalls die *annealing*-Temperatur variiert sowie 5-10% DMSO zugesetzt.

Mutagenesen wurden mittel QuickChange *site-directed mutagenesis* (Stratagen)(Costa *et al.*, 1996) mit der *Pfu*-Polymerase durchgeführt.

Die Sequenzidentität wurde durch DNA-Sequenzierung mit einem ABI PRISM 310-System (Applied Biosystems) und den dazugehörigen Chemikalien (BigDye Matrix Standards Kit, POP6) durchgeführt.

Die verwendeten Primer sind in Tabelle A im Anhang aufgeführt.

4.2.2 Klonierung und Herkunft der verwendeten Plasmide

pSG5-hnRNP K 5RG wurde durch *site-directed mutagenesis* (Stratagen) von pET16b-hnRNP K (Ostareck *et al.*, 1997) erhalten (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006) und in pSG5-His-hnRNP K (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002) subkloniert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

pCDNA-PRMT1 wurde von Stephane Richard (McGill University, Montreal, Kanada) erhalten (Cote *et al.*, 2003).

pET28-His-hnRNP K Der ORF von hnRNP K wurde aus pET16b-hnRNP K (Ostareck *et al.*, 1997) mit den Primern #43 und #44 amplifiziert und unter Verwendung der Restriktionsenzyme *NheI* und *XhoI* in den Vektor pET28 (Novagen) eingebracht, so dass das Leseraster von pET28-hnRNP K für eine N-terminale hexa-Histidinfusion kodiert.

pEGFP-hnRNP K S284/353A wurde schrittweise durch *site-directed mutagenesis* (Stratagen) mit den Primern #13 - #16 und dem Template pEGFP-hnRNP K mutagenisiert. Der mutierte ORF wurde in einen neuen Vektor kloniert, bevor er für weitere Experimente benutzt wurde.

pEGFP-hnRNP K S284/353E wurde schrittweise durch *site-directed mutagenesis* (Stratagen) mit den Primern #17 - #20 und dem Template pEGFP-hnRNP K mutagenisiert. Der mutierte ORF wurde in einen neuen Vektor kloniert bevor er für weitere Experimente benutzt wurde.

pEGFP-hnRNP K (sowie alle Aminosäurevarianten) wurde durch PCR-Amplifikation des ORF aus pET16b-hnRNP K mit den Primern #1 und #2 synthetisiert und anschließend mit Hilfe der

Restriktionsenzyme *XhoI* und *KpnI* in pEGFP-C1 (Clontech) eingebracht.

pFPhnRNP K-GFP (sowie alle Aminosäuremutanten) wurde durch PCR-Amplifikation des ORF aus pET16b-hnRNP K mit den Primern #3 und #4 synthetisiert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme *NheI* und *KpnI* in pEGFP-N1 (Clontech) eingebracht.

HA-hnRNP K (sowie alle Aminosäuremutanten) wurde durch Öffnen des Vektors pEGFP-hnRNP K mit *NheI* und *XhoI* und Insertion der komplementären Primer #5 und #6 generiert.

hnRNP K-HA (sowie alle Aminosäuremutanten) wurde durch Öffnen des Vektors pFPhnRNP K-GFP mit *KpnI* und Insertion der komplementären Primer #7 und #8 generiert.

pEGFP- Δ NLS-hnRNP K (sowie SA- und SE-Mutanten) wurde schrittweise synthetisiert. Mit Hilfe der Primer #1 und #10 sowie der Primer #2 und #9 wurden zwei Fragmente des ORFs von hnRNP K amplifiziert, die das NLS ausschließen. Diese wurden ligiert und als Template für eine PCR mit den Primern #1 und #2 eingesetzt. Das Produkt wurde analog zu pEGFP-hnRNP K kloniert.

pEGFP- Δ KNS-hnRNP K (sowie SA- und SE-Mutanten) wurde schrittweise synthetisiert. Mit Hilfe der Primer #1 und #12 sowie der Primer #2 und #11 wurden zwei Fragmente des ORFs von hnRNP K amplifiziert, die das KNS ausschließen. Diese wurden ligiert und als Template für eine PCR mit den Primern #1 und #2 eingesetzt. Das Produkt wurde analog zu pEGFP-hnRNP K kloniert.

Bicistronisches HishnRNP K-HisPRMT1: Die Shine-Dalgarno-Sequenz (RBS) gefolgt von der oligo-Histidinsequenz sowie dem ORF von PRMT1 wurden durch PCR-Amplifikation von pET28His-PRMT1 (Zhang und Cheng, 2003) mit den Primern #21 und #22 synthetisiert, mit *XhoI* geschnitten und in den mit *XhoI* geöffneten Vektor His-hnRNP K inseriert.

Tricistronisches HisPRMT1-HishnRNP K-HisPRMT1: Die Shine-Dalgarno-Sequenz gefolgt von der oligo-Histidinsequenz sowie dem ORF von PRMT1 wurden durch PCR-Amplifikation von pET28His-PRMT1 (Zhang und Cheng, 2003) mit den Primern #23 und #24 synthetisiert, mit *XhoI* geschnitten und in den mit *XhoI* geöffneten Vektor pET28His-PRMT1 inseriert (pET28HP_HP). Die Shine-Dalgarno-Sequenz gefolgt von der oligo-Histidinsequenz sowie der ORF von hnRNP K wurden durch PCR-Amplifikation von His-hnRNP K mit den Primern #25 und #26 synthetisiert mit *SaII* geschnitten und in den mit *SaII* geöffneten Vektor pET28HP_HP inseriert. Ausgehend vom T7-Promotor wird eine mRNA synthetisiert, auf der nacheinander die Translation von HisPRMT1, HishnRNP K und HisPRMT1 durch die Shine-Dalgarno-Sequenz initiiert werden kann.

pSUMO-hnRNP E1 wurde durch PCR-Amplifikation des ORF aus pET16b-hnRNP E1 (Ostareck *et al.*, 1997) mit den Primern #27 und #28 synthetisiert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme *BsaI* und *XhoI* in pETSUMOadapt (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008) eingebracht.

pSUMO-WWFBP21 wurde durch PCR-Amplifikation des ORF aus pGST-WWFBP21 (Espejo *et al.*, 2002) mit den Primern #29 und #30 synthetisiert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme

*Bsa*I und *Bam*HI in pETSUMOadapt (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008) inseriert.

pSUMO-SH3p85 wurde durch PCR-Amplifikation des ORF aus pGST-SH3p85 (Espejo *et al.*, 2002) mit den Primern #31 und #32 synthetisiert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bsa*I und *Bam*HI in pETSUMOadapt (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008) inseriert.

pSUMO- Δ 83c-Src wurde durch PCR-Amplifikation des Δ 83ORF aus pSGT-c-Src (Gonfloni *et al.*, 2000) mit den Primern #33 und #34 synthetisiert und anschließend mit Hilfe der Restriktionsenzyme *Bsa*I und *Bam*HI in pETSUMOadapt (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008) inseriert.

pET-ULP1p wurde freundlicherweise von C. Lima zu Verfügung gestellt und dessen Nutzung autorisiert (MTA zu B. Moritz) (Mossessova und Lima, 2000).

pET28CSK: Aus humaner total-RNA wurde mit Hilfe des Primers #35 die cDNA von CSK (Gene ID: 1445) synthetisiert und mit den Primern #36 und #37 der ORF amplifiziert. Das Produkt der PCR wurde mit *Nco*I geschnitten und in den *Nco*I geöffneten Vektor pET28b in inseriert.

Bicistronisches CSK-SUMO- Δ 83c-Src: Die Shine-Dalgarno-Sequenz (RBS) gefolgt von der oligo-HistidinSUMO-Sequenz sowie der ORF von Δ ₈₃c-Src wurden durch PCR-Amplifikation von SUMO- Δ ₈₃c-Src mit den Primern #38 und #39 amplifiziert, mit *Bam*HI geschnitten und in den mit *Bam*HI geöffneten Vektor pET28CSK inseriert.

pET28HisPTPN2: Aus humaner total-RNA wurde mit Hilfe des Primers #40 die cDNA von PTPN2 (Gene ID: 5771) synthetisiert und mit den Primern #41 und #42 der ORF amplifiziert. Das Produkt der PCR wurde mit *Pci*I und *Bam*HI geschnitten und in den *Nco*I und *Bam*HI geöffneten Vektor pET28b inseriert.

4.2.3 RNA-chemische Methoden

Synthese von [³²P]-markierter DICE-RNA für Filterbindungs- und UV-*cross linking*-Experimente wurde nach (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) mit wenigen Abweichungen durchgeführt. Die Synthese der RNA für die Filterbindungsexperimente wurde mit 0,05 mM UTP und 40 μ Ci α -[³²P]-UTP (Amersham) durchgeführt. Vor der Reinigung der RNA wurde die DNA mit DNase I (Roche) hydrolysiert.

UV-*cross linking*-Experimente wurden nach (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) durchgeführt. Die markierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das 10-prozentige Gel mehrfach in Fixierer (10% Essigsäure, 10% Ethanol) gewaschen, anschließend getrocknet und mit Hilfe eines Storage Phosphor Screens (Molecular Dynamics) und Phosphorimagers (Storm, Amersham) ausgewertet.

4.3 Proteinchemische Methoden

4.3.1 Western Blot

Proteinchemische Methoden wie SDS-PAGE, Western Blot und Coomassiefärbung wurden nach Standardlaborprotokollen durchgeführt (Green und Sambrook, 2012; Rehm, 2006).

Die Western Blot-Analyse wurde in einem Naßblot-Verfahren (Biorad) auf PVDF-Membran (Millipore) nach den Herstellerangaben der Membran durchgeführt. Die Membran wurde 1 h in 5% Milch ($m_{\text{Trockenpulver}}/v$) (Sucofin) in TBST (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0,05% Tween 20) geblockt und anschließend 1 h mit dem 1. Serum/Antikörper inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde der entsprechende 2. HRP-gekoppelte Antikörper (GE Healthcare) in TBST für 1 h auf die Membran gegeben. Nach erneutem Waschen wurden die Antikörperkomplexe mit einer Luminol-Peroxid-Lösung (WestPico, Fisher) zur Chemolumineszenz gebracht und das Signal mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) detektiert. Der Röntgenfilm wurde in einem fotochemischen Standardverfahren (Entwickler und Fixierer, Röntgen Bender) entwickelt.

4.3.2 Selektion von Methylarginin-spezifischen Antikörpern

Um einen Antikörper, der spezifisch das methylierte oder das nicht-methylierte hnRNP K erkennt, zu erhalten, wurden von Frau Dr. Elisabeth Kremmer (GSF Forschungszentrum, München) monoklonale Antikörper gegen methyliertes oder nicht-methyliertes Peptide der Sequenz MRGRGGFDRMPPGRGGRP generiert (methylierte Arginine unterstrichen)(Becker *et al.*, 1999). Die Sequenz ist Teil der Primärstruktur von hnRNP K (Met255-Pro272). Um die Spezifität der Antikörper zu testen, wurde für jedes Serum (je Peptid mehr als 20 verschiedene Seren) ein Western Blot gegen rekombinantes (nicht-methyliertes) hnRNP K und HeLa-Zelllysate durchgeführt (Abb. 4-1). Antikörper, die stark zwischen beiden Antigenen diskriminierten oder sehr gute Signale lieferten, wurden anschließend in der Immunfluoreszenz und der Immunpräzipitation mit einem gut charakterisierten anti-hnRNP K Antikörper (Santa Cruz/ D-6) verglichen. Das Screeningverfahren identifizierte den Hybridoma-Zellklon 3D1 als einzigen, dessen Antikörper spezifisch das nicht-methylierte hnRNP K erkennt (Abb. 4-1 und Abb. 2-5). Die Diskriminierung wurde auf ca. das 10-20-fache abgeschätzt, d. h. wird die 20-fache Menge methyliertes hnRNP K neben nicht-methyliertem hnRNP K mittels Western Blot analysiert, erhält man ein nahezu identisches Signal.

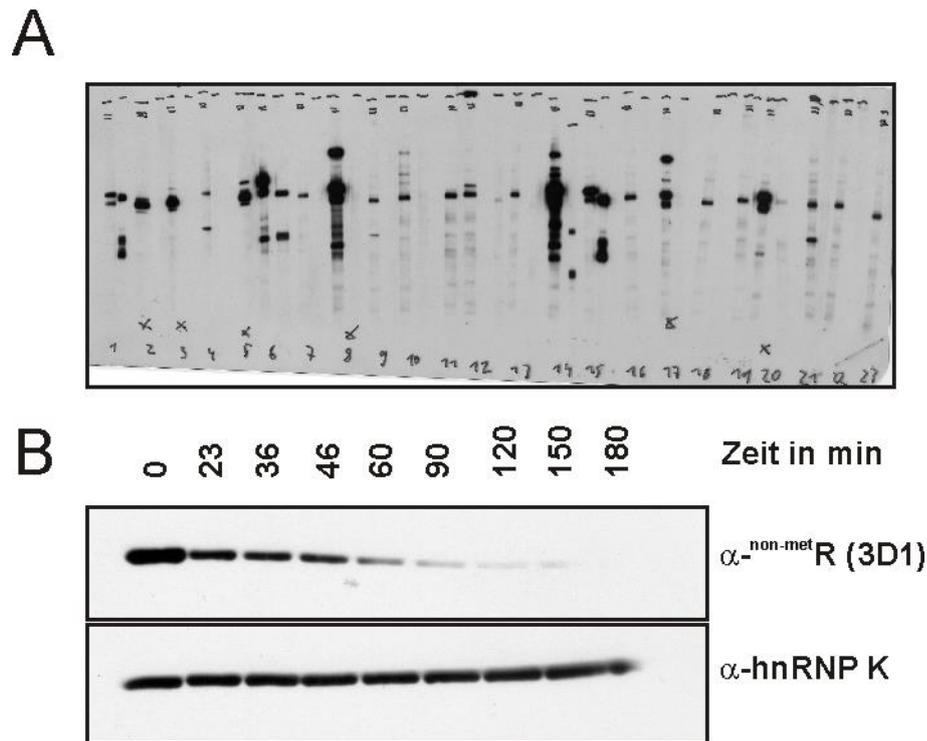


Abb. 4-1 Methylierungsspezifischer Antikörper

A) Exemplarischer Western Blot für das Screening der verschiedenen Seren zur Identifizierung eines Antikörpers, der in Abhängigkeit des Methylierungsstatus von hnRNP K differenziell reagiert. Jeweils ein Streifen einer PVDF-Membran mit adsorbiertem rekombinantem hnRNP K (ein Querstrich) oder HeLa-Zellextrakt (drei Querstriche) wurden mit je einem Serum inkubiert (1-23). B) Western blot-Analyse einer In-vitro-Methylierungskinetik gegen hnRNP K mit dem Antikörper 3D1 oder α -hnRNP K (Santa Cruz).

4.3.3 Präparation von Zell-Lysaten

Adhärente Zellen wurden mit PBS gewaschen, anschließend mit einer Trypsinlösung (Invitrogen) bei 37 °C abgelöst und in PBS resuspendiert. Die Zellen wurden 5 min bei 200 g, 4 °C pelletiert, erneut gewaschen und pro ml Zellpellet in 1 ml Triton-Lysepuffer resuspendiert. Die Suspension wurde für 30 min auf Eis inkubiert und danach 1 h bei 20.000 g, 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand (Triton-Lysat) wurde schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Triton-Lysepuffer:

300 mM NaCl
1% Triton X100
50 mM TrisHCl pH 7.3
10 μ g/ml Leupeptin
0,1 mM PMSF

4.3.4 Extraktpräparation aus K562-Zellen

Zytoplasmatischer Extrakt von nicht induzierten K562-Zellen wurde nach (Naarmann *et al.*, 2008) und (Bader und Sarre, 1986) von Dr. Isabel Naarmann-deVries (Uniklinik RWTH Aachen) präpariert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Der Extrakt wurde nach dem Auftauen auf 200 μ g/ml RNase A eingestellt und für 5 min bei 25 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Extrakt auf

Laufpuffer (300 mM KCl, 20 mM Imidazol, 20 mM Zitrat und 10% Saccharose) eingestellt, mit 0,1 mg/ml ca. 20-50 nt langer RNA versetzt und bei 20.000 g, 4°C abzentrifugiert bevor er auf die Mikrosäule aufgetragen wurde.

4.3.5 Filter-Bindungsexperiment

Nitrocellulose-Filterbindungsexperimente wurden mit wenigen Abweichungen wie in (Kuhn *et al.*, 2003) durchgeführt. In 25 µl Reaktionen wurde 0,1 nM [³²P]-markierte DICE-RNA mit geometrisch verdünntem hnRNP K in Filterbindungspuffer (wenn nicht anders angegeben: 100 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 8.0, 5% Glycerin, 1mM DTT, 100 µg/ml HisSUMO, 20 U/ml Ribolock (Fermentas)) 10 min bei Raumtemperatur inkubiert und bis zum Vermessen auf Eis gelagert. Die Nitrocellulosefilter (RC58, Whatman) wurden in Filterbindungspuffer (ohne Proteine) mit 0,01 mg/ml Hefe-RNA äquilibriert. 20 µl der Reaktion wurden durch den Filter gesaugt, sofort zweimal mit 5 ml eiskaltem Filterbindungspuffer (ohne Proteine) gewaschen und die retardierte Radioaktivität mittels Flüssigszintillation (Irgasafe, PerkinElmar) vermessen. Üblicherweise konnten 60-70% der eingesetzten Radioaktivität in der Sättigung retardiert werden.

Tabelle 4-2 Parameter der Hill-Anpassung aus Abb. 2-6

Die Datenpunkte wurden mit SigmaPlot an die in der Abb. 2-6 angegebene Gleichung angepasst.

	K ^{+/+Met}	K ^{-Met}	Std. Error
PL _{max} in nM	0,1	0,1	0,004
h	0,5	0,55	0,6
K _{0,5} in nM	1,5	1,1	0,15
R ² fit	0,99	0,99	

4.3.6 In-vitro-Methylierungstest

Für die Analyse des Methylierungsstatus von hnRNP K wurden In-vitro-Methylierungstests wie in (Fronz *et al.*, 2008) durchgeführt und der Einbau von [¹⁴C]-Methylgruppen mit dem nicht-methylierten hnRNP K verglichen. Dazu wurden je Zeitpunkt 500 ng hnRNP K und 100 ng His-PRMT1 (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006) in einer 25 µl Reaktion mit [¹⁴C]-SAM umgesetzt und die Reaktion nach den angegebenen Zeitpunkten mit SDS-Ladepuffer versetzt und durch Erhitzen (95 °C, 5 min) abgestoppt. Die eingebaute Menge Methylgruppen wurde über eine SDS-PAGE und *phosphor storage imaging* quantifiziert. Eine Kalibrierung der Radioaktivität mit bekannten Mengen an [¹⁴C]-SAM erlaubte die Bestimmung der molaren Menge übertragener Methylgruppen.

4.3.7 In-vitro-Phosphorylierungstest mit $\Delta_{83}\text{c-Src}$

Initiale Phosphorylierungsreaktionen ohne hnRNP K wurden in 150 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 20 mM TrisHCl pH 8.0, 5% Glycerin durchgeführt (Stabilitätstests). Für alle weiteren Experimente wurden die Reaktionsbedingungen an hnRNP K angepasst und ein Standard-Phosphorylierungspuffer (300 mM KCl, 2 mM MgCl_2 , 20 mM TrisHCl pH 8.0, 1 mM DTT, 10% Saccharose) bei 25 °C verwendet. Für Kinetiken wurde die Reaktionsmischungen bei 25 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mM $\gamma\text{-}[^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (0,01-1 μCi) gestartet. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und mit 10 mM EDTA in SDS-Ladepuffer abgestoppt. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, das Gel mehrfach in Fixierer (10% Essigsäure, 10% Ethanol) gewaschen, anschließend getrocknet und die Radioaktivität mit Hilfe eines *phosphor storage screens* sichtbar gemacht. Die Quantifizierung der Radioaktivität einzelner Proteine erfolgte durch Verwendung von ImageQuant®.

Für die Aktivierung durch SH3-Liganden wurden die Peptide P1 und P3 (W.M. Keck Biotechnology, USA) folgender Aminosäuresequenz benutzt:

P1: MPPGRGGRPMPPSRRDYD

P3: RARNLPLPPPPPPRGGD

4.3.8 Analyse des Phosphorylierungsstatus von $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ und $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$

Um sicher zu stellen, dass die $\Delta_{83}\text{c-Src}$ -Präparationen phosphoryliert oder dephosphoryliert waren, wurden MS-Analysen durchgeführt (Dr. Angelika Schierhorn, MLU Halle-Wittenberg). Zum einen wurde die Molmasse des dephosphorylierten $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PTPN2}}$ und der *in vitro* phosphorylierten $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ -Spezies bestimmt (Abb. 4-2 A, B). Für die Phosphorylierung wurde 20 μM $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ mit 0,5 mM ATP in Standard-Phosphorylierungspuffer bei 25°C für 30 min inkubiert. Die In-vitro-Phosphorylierung sollte zur maximalen Phosphorylierung des Proteins führen und die Anzahl maximal eingebauter Phosphatgruppen bestimmbar machen. Zum anderen wurde die $\Delta_{83}\text{c-Src}^{\text{PY527}}$ -Präparation tryptisch verdaut und die Phosphorylierung am C-terminalen Peptid nachgewiesen (Abb. 4-2 C). Die zu untersuchenden Proteine wurden mit Methanol/Chloroform (Wessel und Flugge, 1984) extrahiert, gefällt und entweder direkt (Abb. 4-2 A und B) oder nach tryptischem Verdau (Abb. 4-2 C) mittels ESI-TOF-MS oder MALDI-TOF-MS analysiert.

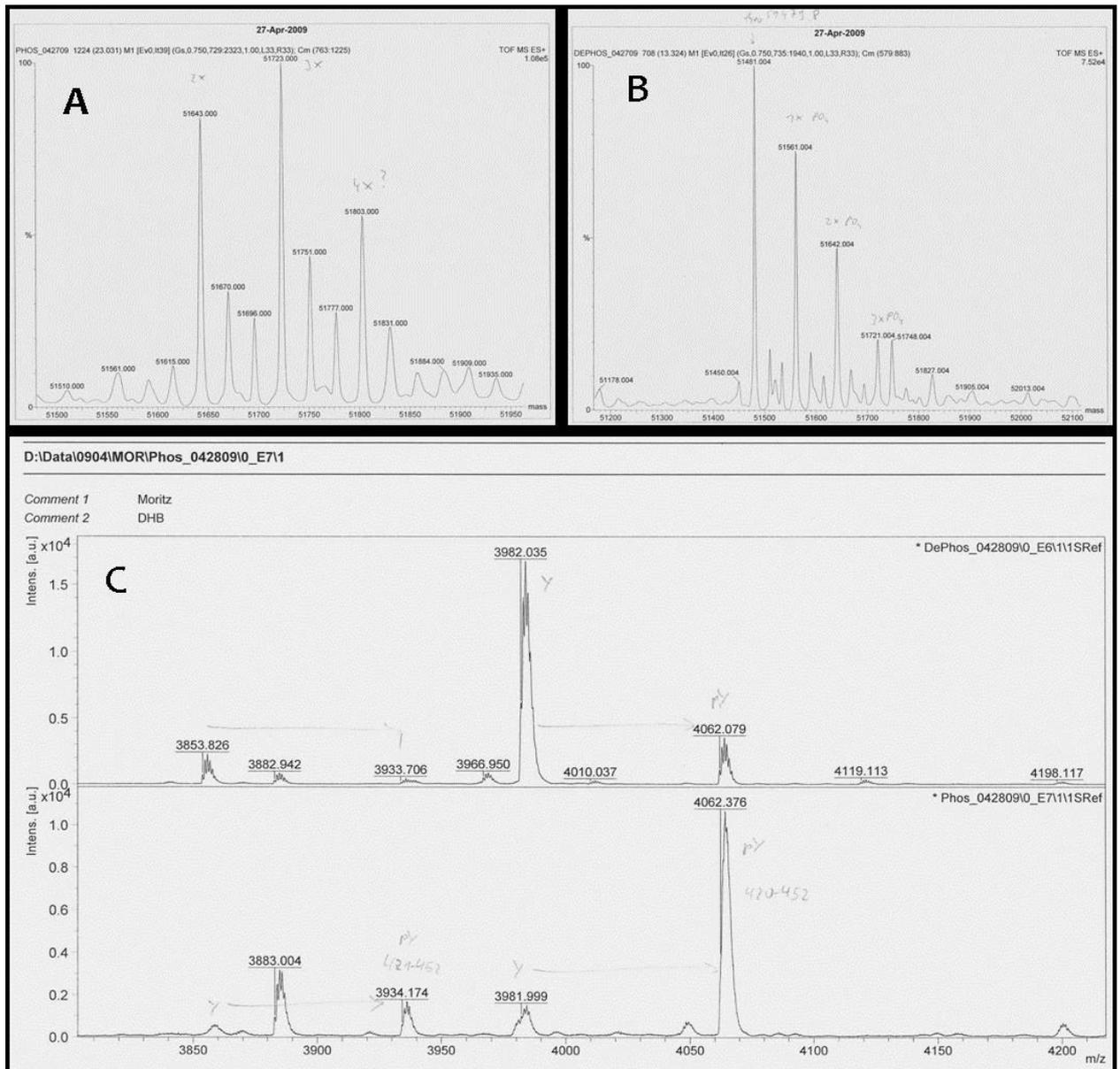


Abb. 4-2 Nachweis der Phosphorylierung am Tyr 527

A) TOF-MS-Analyse der $\Delta_{83}c\text{-Src}^{\text{PTPN}2}$ Präparation. Die theoretische Masse ist 51480 Da. B) ESI-TOF-MS-Analyse der phosphorylierten $\Delta_{83}c\text{-Src}^{\text{PY}527}$ -Präparation. Eine Phosphorylierung führt zu einem Masseunterschied von 80 Da. C) MALDI-TOF-MS-Analyse der tryptisch verdauten $\Delta_{83}c\text{-Src}^{\text{PTPN}2}$ - (oben) und $\Delta_{83}c\text{-Src}^{\text{PY}527}$ -Präparation (unten). Abgebildet ist ein m/z-Ausschnitt der die Analyse des C-terminalen Peptides mit dem regulatorischen Tyr527 zeigt.

4.4 Proteinreinigung

Proteinreinigungen wurden mit einem FPLC-System (Pharmacia) bei 8-12 °C durchgeführt. Dieses ermöglichte die *online*-Messung der Absorption sowie der Leitfähigkeit. Das System war mit einem automatischen Fraktionssammler bestückt. Die Analyse der Reinigungsprozedur erfolgte standardmäßig über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung der Fraktionen, die das Zielprotein beinhalten konnten. Die Auswahl der weiter verwendeten Fraktionen war abhängig von dem Verhältnis des Zielproteins zu den Verunreinigungen. Dabei wurden nur Fraktionen weiter verwendet die eine

deutliche Separierung von den Kontaminationen aufwiesen.

Die verwendeten stationären Phasen wurden in Leersäulen (Pharmacia) gepackt oder waren bereits vorgepackt. Vor jeder Chromatographie wurde die Proteinlösung mit 1 mM DTT reduziert. Proteine wurden üblicherweise ohne DTT schockgefroren.

Stationäre Phase (Matrix)	(Hersteller)
DEAE-Sepharose	(Pharmacia)
MS-Sepharose	(Pharmacia)
MonoQ	(Pharmacia)
MonoS	(Pharmacia)
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	(Qiagen)
HA (HTP)	(Biorad)
Sephacryl 200	(Pharmacia)
Superdex 200	(Pharmacia)
Superdex 75	(Amersham)
Phenyl-Sepharose	(Amersham)
Ethyl-Ether	(Pharmacia)

4.4.1 Reinigung von hnRNP K aus ES-Extrakten

Embryonale Stammzellen (ES^{PRMT1-/PRMT1-}, ES^{PRMT1+/PRMT1+}) wurden in 150 cm²-Zellkulturschalen (TPP, Tasingen, Schweiz) angezogen und über 3 Monate durchschnittlich 50 Platten/Woche geerntet.

Die Triton-Lysate wurden nach dem Auftauen erneut bei 20.000 g zentrifugiert und der Überstand vereinigt. Das gesammelte Lysat wurde anschließend einer sukzessiven chromatographischen Trennung unterzogen, die zuvor durch Testverfahren ausgearbeitet wurde. Die einzelnen chromatographischen Trennschritte wurden nach Standard-Vorschriften (Burgess und Deutscher, 1990) mit stationären Phasen von GE Healthcare (DEAE- und Blaue Sepharose, Macroprep S) und Biorad (Hydroxylapatit) durchgeführt. Aus Ermangelung eines quantifizierbaren Aktivitätstest wurden die Elutionsfraktionen mit Hilfe eines Western Blot auf die konzentrationsabhängige Verteilung von hnRNP K getestet (Abb. 4-3). Der Schematische Ablauf der Reinigung sowie eine Reinigungstabelle sind in Abb. 4-4 gezeigt. Zur Abschätzung der aktiven Konzentration wurde parallel jede *load*-Fraktion in einem UV-*cross linking*-Experiment eingesetzt und das erhaltene radioaktive Signal auf Höhe der elektrophoretischen Trennstrecke hnRNP Ks zur Menge an eingesetztem Protein korreliert (Signal/mg) und daraus die Reinigungseffizienzen errechnet. Die Konzentration der finalen hnRNP K-Präparationen wurde densitometrisch mittels einer BSA-Kalibriergeraden in einem Coomassie-gefärbten SDS-PA-Gel bestimmt.

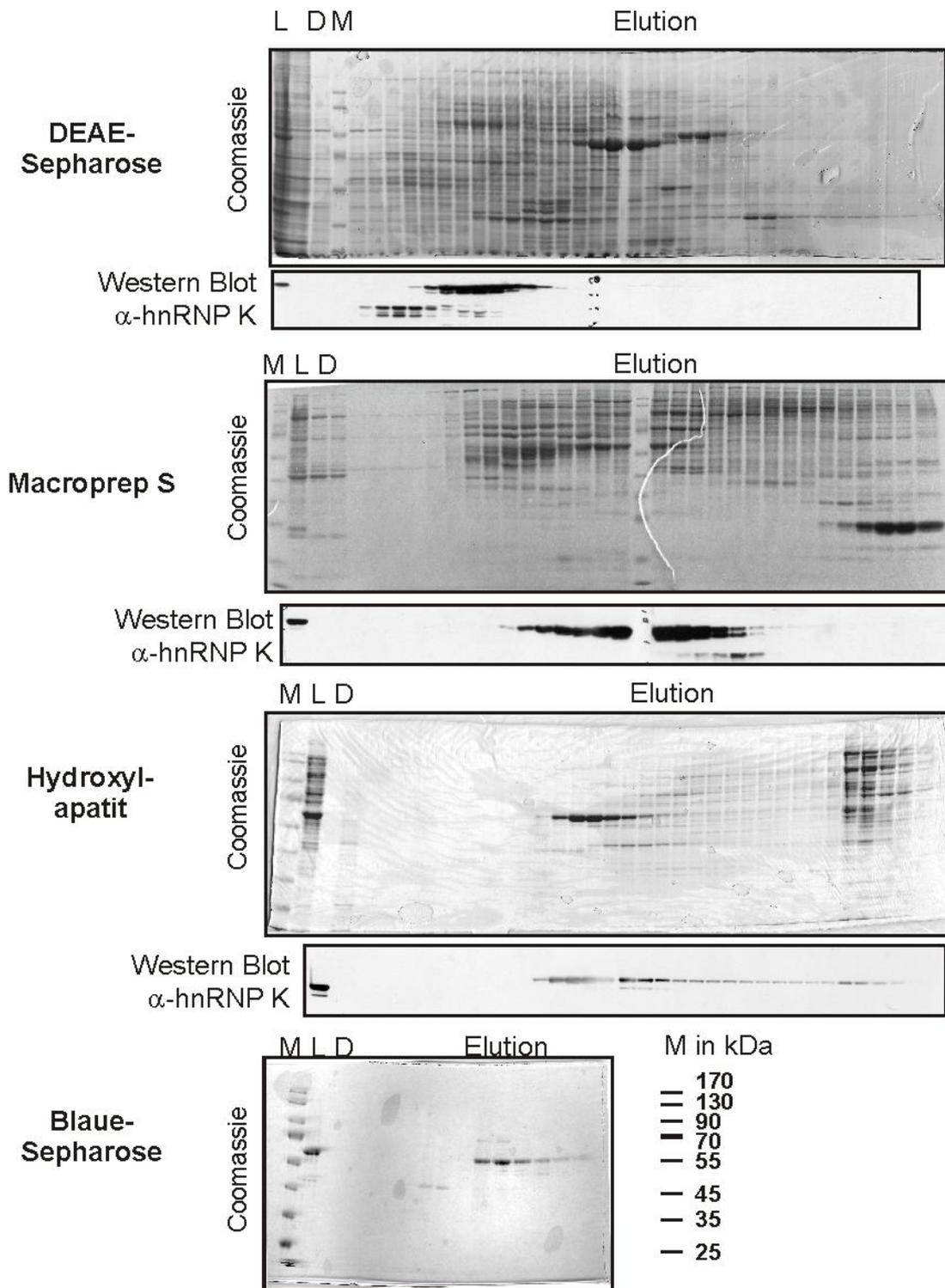


Abb. 4-3 Analyse der chromatographischen Trennung von hnRNP K aus ES-Extrakten

Aliquots der jeweiligen Säulenchromatographie wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und entweder Coomassie gefärbt (oberes Teilbild) oder einem Western Blot gegen hnRNP K (D-6/Santa Cruz) unterzogen. L: Auftrag, D: Durchfluss, M: Marker.

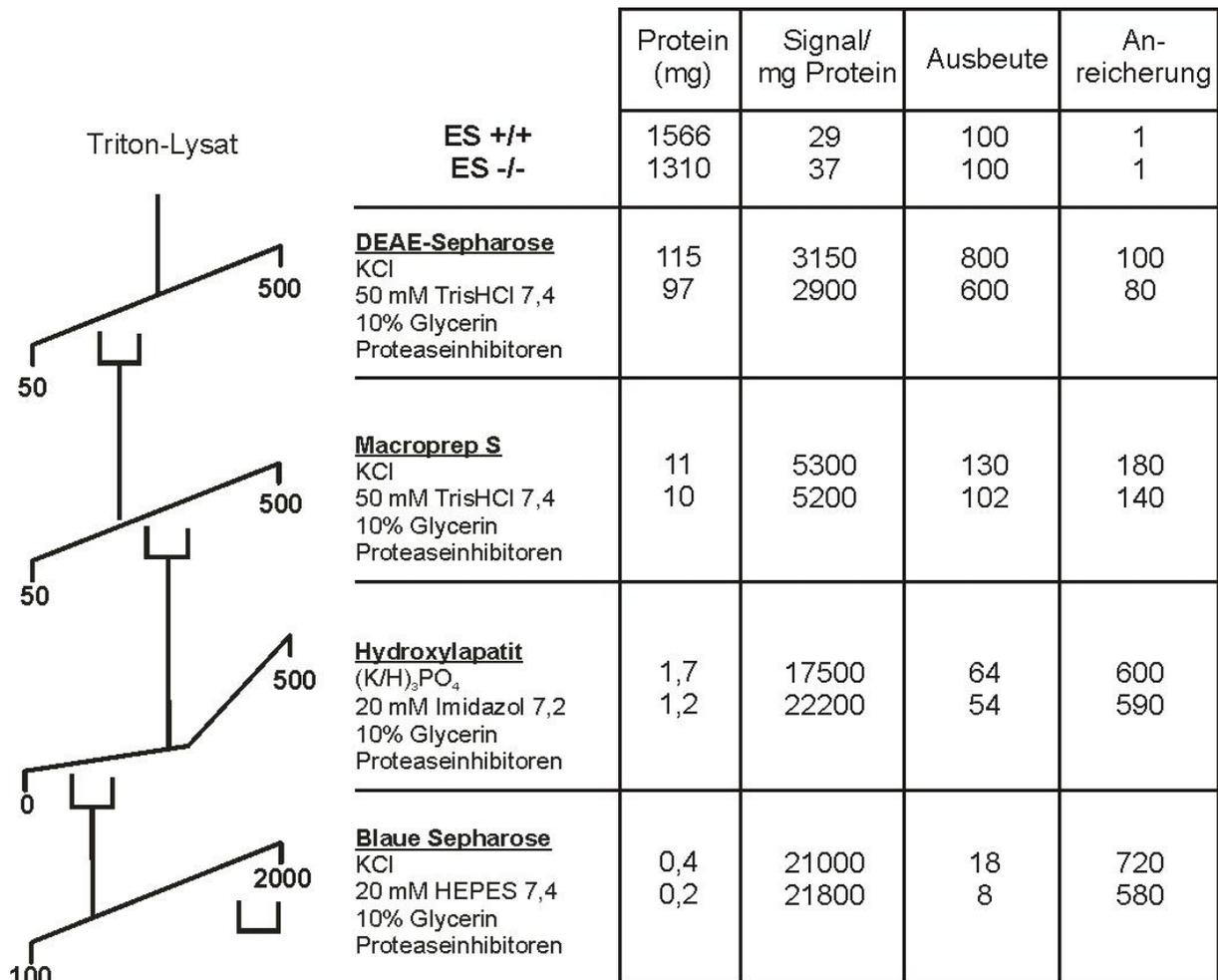


Abb. 4-4 Reinigungstabelle und schematisches Trennverfahren für hnRNP K aus ES-Zellextrakten.

Links: Flussdiagramm mit Start- und Endkonzentration der verwendeten Eluenten der rechtsseitig angegebenen stationären Phasen sowie deren mobile Phasen. Rechts: Reinigungstabelle mit jeweils dem Wert für ES^{+/+} (oberhalb) und ES^{-/-} (unterhalb) Extrakt. Signal bezieht sich auf ein UV-cross linking-Signal der jeweiligen vereinten Fraktionen.

4.4.2 Expression im Erlenmeyerkolben

Das Expressionsplasmid wurde in elektrokompetente Rosette 2-Zellen (Novagene) transformiert, 1 h bei 37 °C in LB-Medium inkubiert und über Nacht auf LB-Agarplatten angezogen (37 °C), die mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt waren. Nach 12-14 h wurde der *E. coli*-Rasen in Kulturmedium resuspendiert und Erlenmeyerkolben mit 500 ml des Kulturmediums mit einer OD₆₀₀ von 0,1 inokuliert. Die *E. coli*-Kultur wurde bei 37 °C und 200 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 angezogen. Zur Induktion der Expression wurde die Zellsuspension mit temperiertem Medium, welches IPTG enthielt (Peqlab, Zielkonzentration 0,5 mM) verdünnt und die Kultur bei der entsprechenden Zieltemperatur weiter inkubiert. Nach der Expression wurden die Zellen 14 min bei 3750 g abzentrifugiert, die *E. coli*-Pellets in dem 4-5-fachen Volumen Lysepuffer resuspendiert und in Flüssigstickstoff eingefroren.

Kulturmedien: LB
10 g/l Trypton
5 g/l Hefeextrakt
10 g/L NaCl

M9 (supplementiert)

12,8 g/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
3 g/l KH_2PO_4
0,5 g/l NaCl
1 g/l NH_4Cl
2 mM MgSO_4
0,1 mM CaCl_2
0,4 g/l Glukose
0,8 g/l Pepton

TB (*Terrific Broth*)

12 g Trypton
24 g Hefe Extrakt
0,4% (v/v) Glycerin
add. 900 ml H_2O
+ 100 ml 900 mM $\text{H}_2\text{KPO}_4/\text{HK}_2\text{PO}_4$ pH 7,4

E. coli-Lysepuffer: 20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
20 mM Imidazol
5% Glycerin
2 mM MgCl_2
1 mM PMSF
1 μM Pepstatin A
50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DNase I
200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Lysozym

4.4.3 Fermentation

Das Expressionsplasmid wurde in elektrokompetente Rosette 2-Zellen transformiert und über Nacht auf LB-Agarplatten mit dem jeweiligen Antibiotikum angezogen. Der *E. coli*-Rasen wurde abgekratzt, in M9-Fermentationsmedium aufgenommen und bei 37 °C inkubiert. Der Fermenter wurde gegen 22.00 Uhr mit 5 l Fermentationskultur mit OD_{600} von 0,4 befüllt. Die Kultur wurde über Nacht bei 20 °C inkubiert und am nächsten Morgen (7.00 Uhr) die Kultivierungstemperatur auf 37 °C angehoben. Gleichzeitig wurde die Fütterung mit Glukose (50 ml/h) gestartet. Das Wachstum der Kultur wurde durch halbstündige Messung der OD_{600} verfolgt sowie an dem Prozessparameter O_2 -Sättigung abgelesen. Stagnierte das Wachstum, wurde durch Zugabe von Additiven gegengesteuert. Die Glukosekonzentration wurde über einen Schnelltest abgeschätzt. Bei einer OD_{600} von 30 wurde der Reaktor auf 20 °C abgekühlt und die Expression des heterologen Proteins durch Zugabe von IPTG (Peqlab 0,5 mM) für 4 h induziert. Für die Expression des methylierten hnRNP K wurde die Translation durch Erythromycin (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gestoppt und 2 h weiter inkubiert. Die Zellsuspension wurde bei 5000 g, 20 min abzentrifugiert und das Pellet in Flüssigstickstoff eingefroren.

M9-Fermentationsmedium:	12,8 g/l Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 3 g/l KH ₂ PO ₄ 0,5 g/l NaCl 1 g/l NH ₄ Cl 2 mM MgSO ₄ 0,1 mM CaCl ₂ 0,4 g/l Glukose 0,8 g/l Pepton 30 mg/l Kanamycin 0,002 mg/l Biotin 0,002 mg/l Thiamin Spurenelemente (Mn, Co, Cu, Fe) nach (Pfennig und Lippert, 1966)
Additive:	Glukose (20% w/v) NH ₄ Cl (20% w/v) NH ₄ SO ₄ (1 M) H ₂ NaPO ₄ (1 M) MgCl ₂ (1 M) CaCl ₂ (1 M) H ₃ PO ₄ (10%) NaOH (10%)

4.4.4 Präparation von rekobinantem hnRNP K und ^{Met}hnRNP K

Schüttelkolbenexpressionen von hnRNP K, ^{Met}hnRNP K wurde bei OD₆₀₀ von 0,6 für 4 h bei 20 °C in supplementiertem M9-Medium durchgeführt. Das *E. coli*-Pellet wurde in *E. coli*-Lysepuffer mit 1 M KCl aufgetaut, resuspendiert und anschließend mit einer French Press 2-fach homogenisiert (Moritz und Wahle, 2014). Das Lysat wurde bei 30.000 g, 4 °C, 1 h zentrifugiert und der Überstand einer Ni²⁺-NTA-Chromatographie unterzogen.

Das Lysat wurde über eine 5 ml Ni²⁺-NTA-Säule gepumpt und mit Puffer A nachgewaschen, bis die A₂₈₀ auf unter 0,4 gesunken war. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten zu Puffer B eluiert und fraktioniert gesammelt.

A:	1 M KCl 20 mM TrisHCl pH 8.0 ^{20°C} 40 mM Imidazol 5% Glycerin 1,5 mM MgCl	B:	1 M KCl 20 mM TrisHCl pH 8.0 ^{20°C} 500 mM Imidazol 5% Glycerin 1,5 mM MgCl
----	---	----	--

Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt und direkt auf eine Hydroxylapatit (HA)-Säule geladen. Nach kurzem Spülen mit Puffer C wurde mit einem zweiphasigen linearen Gradient (5 SäulenVolumen (SV) bis 20% D weitere 0,5 SV zu 100% D) eluiert.

C:	150 mM KCl 20 mM Imidazol pH 8.0 ^{20°C} 10% Glycerin	D:	500 mM K ₂ HPO ₄ /KH ₂ PO ₄ pH 8.0 ^{20°C} 10% Glycerin
----	---	----	--

Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt und mit 1 mM DTT versetzt, 1 h bei 30.000 g, 4 °C, zentrifugiert und mit 20 mM TrisHCl pH 8.0, 10% Saccharose in einem Polycarbonatbecher auf ca. 150 mM KCl verdünnt. Die Lösung wurde sofort auf eine MonoQ-Säule geladen, mit 2 SV Puffer E gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem linearen KCl-Gradient (Puffer F) eluiert.

E:	150 mM KCl	F:	500 mM KCl
	20 mM TrisHCl pH 8.0 ^{20°C}		20 mM TrisHCl pH 8.0 ^{20°C}
	10% Saccharose		10% Saccharose

Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt (Abb. 4-5) und die Konzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{his-hnRNP K}} = 41830 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $M_w = 53,3 \text{ kDa}$, Abb. 4-5 B) spektroskopisch bestimmt.

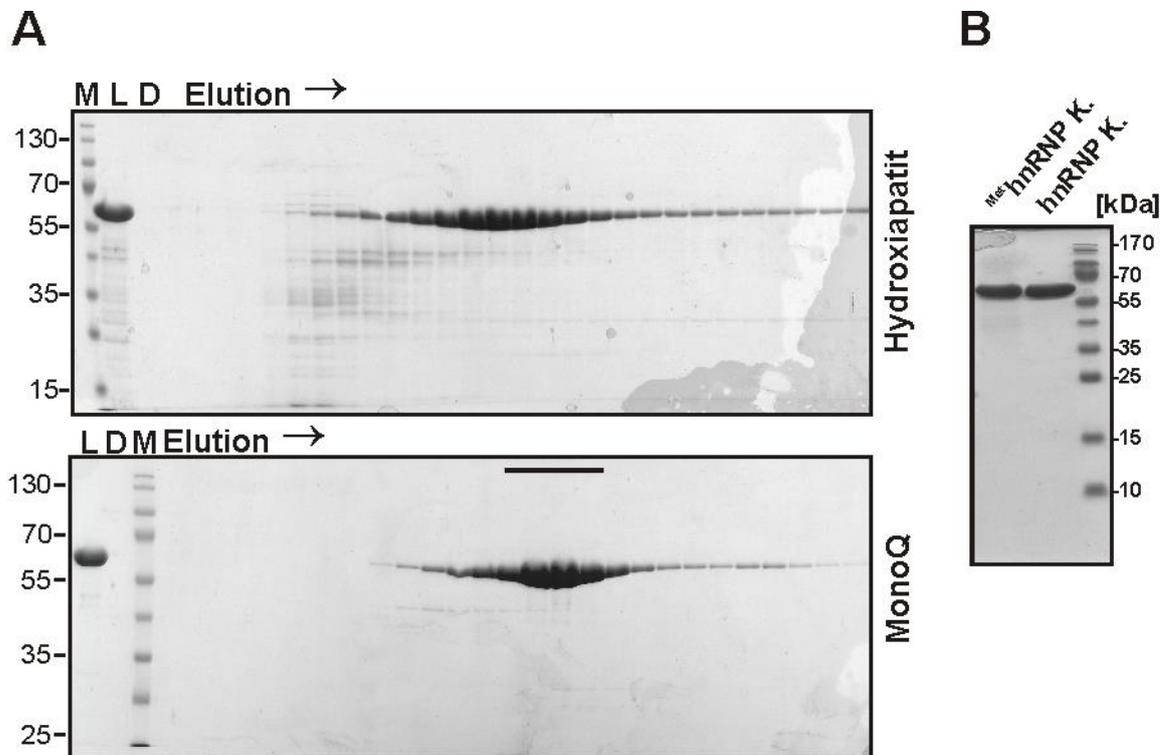


Abb. 4-5 Gelanalyse der Hydroxyapatit- und MonoQ-Fraktionierung von rekombinantem hnRNP K
 A) Coomassie gefärbte SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der HA- und MonoQ-Chromatographie. 5 μl der jeweiligen Proteinfraction wurden analysiert. L: Auftrag; D: Durchfluss; M: Marker in kDa. Der schwarze Balken markiert die vereinigten Fraktionen. B) Coomassie-gefärbte SDS-PAGE der finalen ^{Met}hnRNP K- und hnRNP K-Präparationen.

4.4.5 Präparation von hnRNP E1

HnRNP E1 wurde im Schüttelkolben bei einer OD_{600} von 0,6 für 4 h bei 20 °C in supplementiertem M9-Medium exprimiert. Das *E. coli*-Pellet wurde in *E. coli*-Lysepuffer mit 400 mM KCl aufgenommen, resuspendiert und anschließend mit einer French Press 2-fach homogenisiert (Moritz und Wahle, 2014). Das Lysat wurde bei 30.000 g, 4 °C, 1 h zentrifugiert und der Überstand über eine 5 ml Ni^{2+} -NTA-

Säule gepumpt. Die beladene Säule wurde mit Waschpuffer E2 nachgewaschen, bis die A_{280} auf unter 0,2 gesunken war. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Imidazolgradienten vom Lysepuffer nach E3 eluiert und fraktioniert gesammelt.

- E2: 1 M KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
20 mM Imidazol
5% Glycerin
1,5 mM MgCl₂
- E3: 300 mM KCl
20 mM TrisHCl
500 mM Imidazol pH 8.0^{20°C}
5% Glycerin
1,5 mM MgCl₂

Die ausgewählten Fraktionen wurden vereinigt und der SUMO-Spaltung (Abschn.2.4.6) unterzogen.

Die Durchflussfraktion sowie die ersten Waschfraktionen der 2. Ni²⁺-NTA enthielten das unmodifizierte hnRNP E1. Diese wurden in Puffer E4 umdialysiert und auf eine Mono S-Säule geladen. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen KCl-Gradienten zu Puffer E5 eluiert. Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt gegen Puffer E6 dialysiert (Abb. 4-6) und die Konzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{hnRNP E1}} = 12950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_w = 37,5 \text{ kDa}$, Abb. 4-12) spektroskopisch bestimmt.

- E4: 100 mM KCl
20 mM MES-KOH pH 6.0^{20°C}
10% Glycerin
- E5: 500 mM KCl
20 mM MES-KOH pH 6.0^{20°C}
10% Glycerin
- E6: 300 mM KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
10% Glycerin

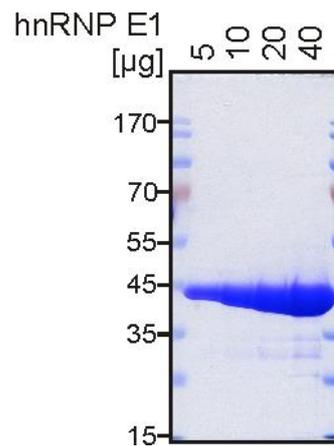


Abb. 4-6 SDS-PAGE der hnRNP E1 Präparation

Coomassie gefärbte SDS-PAGE verschiedener Mengen hnRNP E1. Links: Marker in kDa.

4.4.6 SUMO-Spaltung

Um rekombinante Proteine mit authentischen Termini zu präparieren wurde das SUMO-Fusions-System benutzt. Dazu wurden die kodierenden Sequenzen von hnRN K, hnRNP E1, Δ_{83C} -Src, WW^{FBP21}- und SH3^{p85}-Domäne 3' *in frame* mit einer HexahistidinSUMO-Fusion kloniert (Bosse-Doenecke *et al.*, 2008). Das Fusionsprotein kann mittels Ni²⁺-NTA gereinigt werden und das N-terminale Fusionspeptid mit der Protease Ulp1p aminosäuregenau abgespalten werden. Weil das Zielprotein ein zweites Mal über das gleiche Trennmateriale gereinigt wird, aber bei jeweils anderen Imidazolkonzentrationen eluiert, wird eine zufällige Koelution von Verunreinigungen ausgeschlossen (Mossessoiva und Lima, 2000; Reverter und Lima, 2009).

Die ausgewählten Fraktionen der 1. Ni²⁺-NTA wurden auf 0,5 mM EDTA, 2 mM DTT eingestellt und mit SUMO-Protease ($\sim 1:100$, $n_{\text{Protease}}:n_{\text{Substrat}}$) versetzt. Die Proteinlösung wurde anschließend in einem abgeschlossenen Gefäß über Nacht bei 6 °C gegen den entsprechenden Lysepuffer des jeweiligen Proteins zusammen mit der Protease dialysiert. Die Dialyselösung wurde am folgenden Tag noch 2-mal gewechselt. Die SUMO-Spaltung wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung verfolgt. Nach der vollständigen Spaltung wurde das Proteingemisch erneut über eine Ni²⁺-NTA-Chromatographie getrennt und das Zielprotein im Durchfluss aufgefangen.

4.4.7 Präparation von Ulp1p; Sumo-Protease

Die Synthese von Ulp1p wurde in TB-Medium bei OD₆₀₀ von 1 mit 0,5 mM IPTG induziert, für 2 h bei 37 °C exprimiert und wie in (Mossessoiva und Lima, 2000) mit Hilfe einer Ni²⁺-NTA gereinigt.

4.4.8 Präparation der WW^{FBP21}-Domäne

Die WW-Domäne wurde als SUMO-Fusion im Schüttelkolben bei OD₆₀₀ von 1 für 2 h bei 25 °C in TB-Medium exprimiert. Das *E. coli*-Pellet wurde in *E. coli*-Lysepuffer mit 600 mM KCl aufgetaut,

resuspendiert und anschließend mit einer French Press 2-fach homogenisiert (Moritz und Wahle, 2014). Das Lysat wurde bei 30.000g, 4 °C, 1 h zentrifugiert und der Überstand über eine 5 ml Ni²⁺-NTA-Säule gepumpt. Die beladene Säule wurde mit Lysepuffer mit 600 mM KCl nachgewaschen, bis die A_{280nm} auf unter 0,05 gesunken war. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Imidazolgradienten eluiert und fraktioniert gesammelt. Die ausgewählten Fraktionen wurden einer SUMO-Spaltung unterzogen und danach eine 2. Ni²⁺-NTA-Chromatographie durchgeführt (Abb. 4-7). Der Durchfluss wurde auf 750 mM K₃Zitrat eingestellt, ausgefallenen Proteine für 1 h bei 30.000 g, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand auf eine 1 ml Resource Ether-Säule geladen. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten von W1 zu W2 eluiert. Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt gegen Puffer W3 dialysiert und die Konzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{WW}}=32430 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_w = 7,98 \text{ kDa}$, Abb. 4-12) spektroskopisch bestimmt.

- W1: 300 mM KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
750 mM K₃Zitrat
5% Glycerin
- W2: 20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
5% Glycerin
- W3: 150 mM KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
10% Glycerin

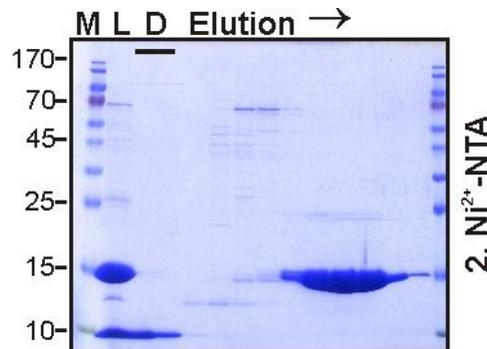


Abb. 4-7 Inversreinigung der WW-Domäne

Coomassie gefärbte SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der 2. Ni²⁺-NTA nach der SUMO Spaltung. Der Durchfluss enthält die gereinigte WW-Domäne. 5 µl der jeweiligen Proteinfraction wurden analysiert. L: Auftrag; D: Durchfluss; M: Marker in kDa (rechts).

4.4.9 Präparation der KH3-Domäne

Die KH3-Domäne wurde als (His)₆-Fusion (Messias *et al.*, 2006) im Schüttelkolben bei OD₆₀₀ von 1 für 2 h bei 25 °C in TB-Medium exprimiert. Das *E. coli*-Pellet wurde in *E. coli*-Lysepuffer mit 600 mM KCl aufgetaut, resuspendiert und anschließend mit einer French Press 2-fach homogenisiert (Moritz und Wahle, 2014). Das Lysat wurde bei 30.000g, 4 °C, 1 h zentrifugiert und der Überstand über eine 5 ml Ni²⁺-NTA-Säule gepumpt. Die beladene Säule wurde mit Lysepuffer mit 1 M KCl nachgewaschen, bis die A₂₈₀ auf unter 0,05 gesunken war. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen

Imidazol-Ggradienten eluiert und fraktioniert gesammelt. Ausgewählte Fraktionen wurden vereint, das Protein aufkonzentriert (Amicon, Millipore) und in Puffer W3 über eine Sephacryl 200 filtriert (Abb. 4-9). Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt und die Konzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{KH3}} = 15930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_w = 11,01 \text{ kDa}$, Abb. 4-12) spektroskopisch bestimmt.

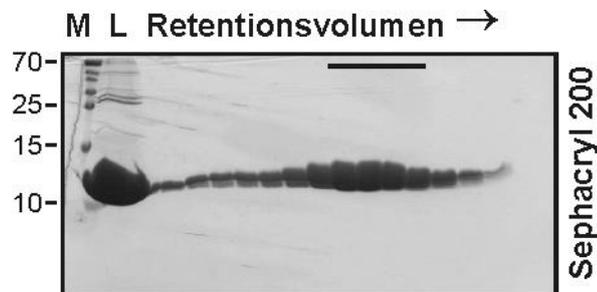


Abb. 4-8 Gelfiltration der KH-3 Domäne

Coomassie gefärbte SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der Sephacryl 200 Gelfiltration. 10 μl der jeweiligen Proteinfraktion wurden analysiert. L: Auftrag; M: Marker in kDa (links). Der schwarze Balken markiert die verwendeten Fraktionen.

4.4.10 Präparation der SH3^{p85}-Domäne

Die SH3-Domäne wurde analog zur WW-Domäne exprimiert und mittels 1. Ni^{2+} -NTA gereinigt. Nach der SUMO-Spaltung wurde das Protein aufkonzentriert (Amicon, Millipore) und in Puffer W3 über eine Sephadex 75 filtriert (Abb. 4-9). Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt und die Konzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{SH3}} = 15930 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_w = 8,95 \text{ kDa}$, Abb. 4-12) spektroskopisch bestimmt.

Das als Nebenprodukt anfallende His-SUMO wurde wegen des hohen Reinheitsgrades sowie der günstigen Absorptions- und Adsorptionseigenschaften als Kompetitor-Protein benutzt.

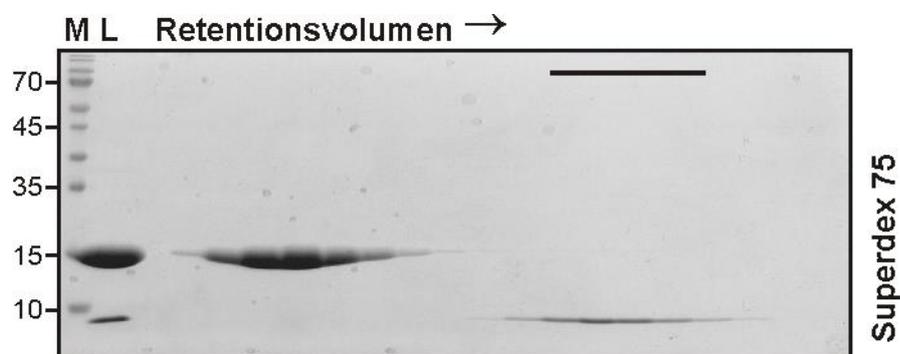


Abb. 4-9 Gelfiltration der SH3-Domäne

Coomassie gefärbte SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der Superdex 75-Gelfiltration der SH3-Reinigung. Der schwarze Balken markiert die vereinigten Fraktionen. 15 μl der jeweiligen Proteinfraktion wurden analysiert. L: Auftrag; M: Marker in kDa (rechts).

4.4.11 Präparation von $\Delta_{83}\text{C-Src}^{\text{pY527}}$

Das $\Delta_{83}\text{C-Src}^{\text{pY527}}$ wurde als SUMO-Fusion im Schüttelkolben bei OD_{600} von 0,6 für 20 h bei 16 °C in

supplementiertem M9-Medium exprimiert. Der Aufschluss und die Reinigung erfolgten analog der SH3-Domäne mit Ausnahme der finalen Gelfiltration. Der Durchfluss der 2. Ni²⁺-NTA wurde aufkonzentriert (Amicon, Millipor) und mittels einer Sephacryl S200 in Puffer W3 filtriert (Abb. 4-10). Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt und die Konzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\Delta_{83c}\text{-Src}} = 83770 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, $M_w = 51,48 \text{ kDa}$, Abb. 4-12) spektroskopisch bestimmt.

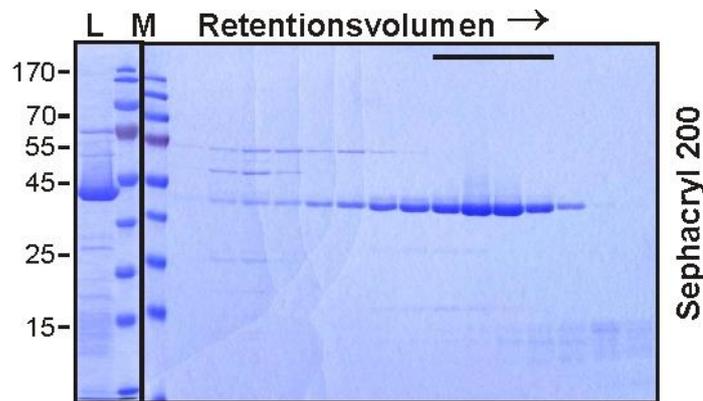


Abb. 4-10 Gelfiltration von $\Delta_{83c}\text{-Src}$

Coomassie gefärbte SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der Sephacryl 200-Gelfiltration der $\Delta_{83c}\text{-Src}$ -Reinigung. Der schwarze Balken markiert die vereinigten Fraktionen. 10 μl der jeweiligen Proteinfraktion wurden analysiert. L: Auftrag; M: Marker in kDa (rechts).

4.4.12 Präparation von $\Delta_{83c}\text{-Src}^{\text{PTPN2}}$

Für die Präparation von dephosphoryliertem $\Delta_{83c}\text{-Src}^{\text{PTPN2}}$ wurde das Reinigungsprotokoll für $\Delta_{83c}\text{-Src}^{\text{pY527}}$ bis zur SUMO-Spaltung verfolgt. Für die SUMO-Spaltung wurde die Proteinlösung in 300 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 8.0, 5% Glycerin dialysiert. Danach wurde die Proteinlösung mit 4 $\mu\text{g/ml}$ His-PTPN2 versetzt, 1 h bei 12 °C inkubiert und die Lösung mittels 2. Ni²⁺-NTA fraktioniert. Der Durchfluss der 2. Ni²⁺-NTA wurde analog der $\Delta_{83c}\text{-Src}^{\text{pY527}}$ -Variante mittels Sephacryl 200 filtriert und weiter behandelt.

4.4.13 Präparation von PTPN2

His-PTPN2 wurde im Schüttelkolben bei OD_{600} von 0,6 für 4 h bei 25 °C in LB-Medium exprimiert. Das *E. coli*-Pellet wurde in *E. coli*-Lysepuffer mit 600 mM KCl aufgetaut, resuspendiert und anschließend mit einer French Press 2-fach homogenisiert (Moritz und Wahle, 2014). Das Lysat wurde bei 30.000 g, 4 °C, 1 h zentrifugiert und der Überstand einer Ni²⁺-NTA-Chromatographie unterzogen. Das Lysat wurde über eine 5 ml Ni²⁺-NTA-Säule gepumpt und mit Puffer P1 nachgewaschen, bis die A_{280} auf unter 0,05 gesunken war. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen Gradienten zu Puffer P2 eluiert und fraktioniert gesammelt. Ausgewählte Fraktionen wurde in Puffer P4 dialysiert und auf

eine MonoQ-Säule geladen. Gebundene Proteine wurden mit einem linearen KCl-Gradienten von P4 zu P5 eluiert. His-PTPN2 befand sich in der Durchlaufraktion. Ausgewählte Fraktionen wurden vereinigt (Abb. 4-11) und die Konzentration mittels des theoretischen Extinktionskoeffizienten ($\epsilon_{\text{PTPN2}} = 52370 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, $M_w = 42 \text{ kDa}$, Abb. 4-12) spektroskopisch bestimmt.

- P1: 600 mM KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
20 mM Imidazol
10% Glycerin
- P2: 600 mM KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
500 mM Imidazol
10% Glycerin
- P3: 100 mM KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
10% Glycerin
- P4: 500 mM KCl
20 mM TrisHCl pH 8.0^{20°C}
10% Glycerin

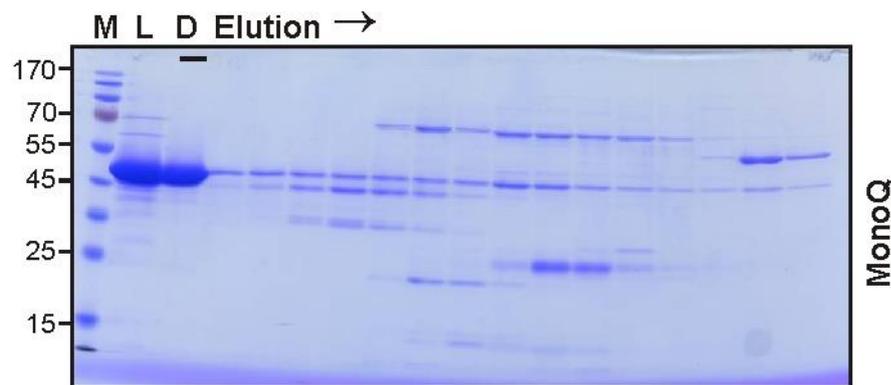


Abb. 4-11 Inversreinigung von PTPN2

Coomassie gefärbte SDS-PAGE ausgewählter Fraktionen der MonoQ-Chromatographie. Der Durchfluss enthält die gereinigte Phosphatase (schwarzer Balken). 10 μl der jeweiligen Proteinfraction wurden analysiert. L: Auftrag; D: Durchfluss; M: Marker in kDa (rechts).

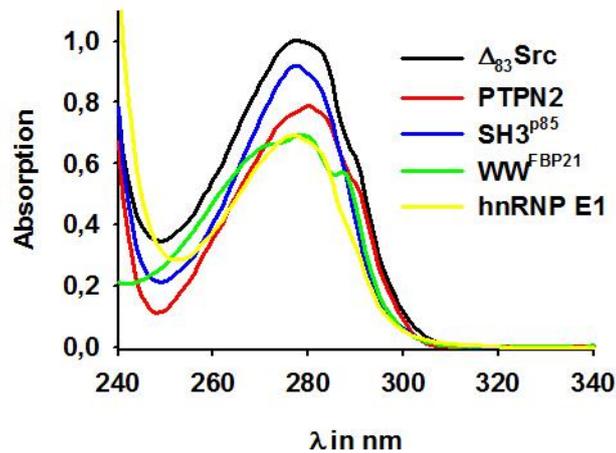


Abb. 4-12 Absorptionsspektren der rekombinanten Proteine

Die Absorptionen der präparierten Proteine wurden in geeigneter Konzentration gegen den Lagerpuffer vermessen.

4.5 Ultrazentrifugation

Ultrazentrifugationen wurden von PD Dr. Hauke Lilie (MLU Halle-Wittenberg) mit einer XLA Optima (Beckman) bei 20 °C durchgeführt.

Gleichgewichts-Sedimentationsexperimente wurden wie in (Buschmann *et al.*, 2013) durchgeführt und ausgewertet. Dabei richtete sich die Rotorgeschwindigkeit nach der Faustregel:

$$rpm = 2 * 10^6 * \sqrt{M^{-1}}, \text{ wobei } M \text{ die erwartete Molmasse ist.}$$

Sedimentations-Geschwindigkeitsexperimente wurden bei 40.000 rpm durchgeführt. Apparente S-Werte wurden mit Sedfit errechnet und mit Gleichung 4-1 in standardisierte $S^{20^\circ\text{C}, \text{Wasser}}$ -Werte umgerechnet.

Gleichung 4-1

$$S_w = S_{app} * \left[\frac{\eta^P}{\eta^W} \right] * \left[\frac{1 - \bar{v}_w * \rho_w}{1 - \bar{v}_P * \rho_P} \right], \text{ wobei } \eta^P \text{ und } \eta^W \text{ die Viskosität des Puffers und des Wassers bei}$$

20 °C ist, \bar{v}_P und \bar{v}_w sind die partiellen spezifischen Volumen in Puffer und H₂O bei 20 °C, ρ_w und ρ_P die Dichte des Wassers und des Puffers bei 20 °C.

In 1 M KCl, 20 mM TrisHCl pH 8,0^{20°C}, 5% Glycerin (w/v) berechnet sich der $S^{20^\circ\text{C}, \text{Wasser}}$ -Wert für hnRNP K zu 3,28 und in 0,3 M KCl, 20 mM TrisHCl pH 8,0^{20°C}, 10% Saccharose (w/v) zu 2,9.

4.6 Fluorometrische Methoden

4.6.1 Lichtstreuexperimente

Zur qualitativen Analyse der Proteinaggregation wurden Lichtstreuexperimente an einem Fluoromax-4 Spectrofluorometer (Jobin Yvon, France) durchgeführt. Eingestrahlt Licht der Wellenlänge

(λ) 320 nm (Spaltbreite am Monochromator 2 nm) wurde im rechten Winkel des Mittelpunkts einer Quarzglasküvette (1 * 1 cm) vermessen. 50 μ l einer 70 μ M hnRNP K-Lösung in 1 M KCl, 20 mM TrisHCl pH 8.0, 10 % Glycerin wurde in 2 ml der Bildunterschrift angegebenen Puffer mit den in der Legende angegebenen Zusatz verdünnt, kontinuierlich gerührt und das Streulicht in cps über die Zeit vermessen.

4.6.2 Intrinsische Proteinfluoreszenz

Intrinsische Proteinfluoreszenz wurde am Fluoromax-4 Spektrofluorometer mit der Anregungswellenlänge 295 nm (Spaltbreite 2 nm) und der Emissionswellenlänge von 355 nm (Spaltbreite 3 nm) in 300 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 8.0, 10% Saccharose, 1 mM DTT bei 20°C gemessen. Die Fluoreszenz einer 2.5 ml gerührten 500 nM hnRNP K-Lösung wurde während der Titration mit den angegebenen Oligonukleotiden aufgenommen. Die Fluoreszenz wurde nach Einstellung des Gleichgewichts (nach 2 min) über 60 Sekunden gemittelt, um den Verdünnungseffekt korrigiert, mit einer Puffertitration abgeglichen und gegen die Oligonukleotidkonzentration aufgetragen. Der Innere Filtereffekt war bei der höchsten Konzentration kleiner als 2%.

4.6.3 Fluoreszenzmessungen mit Fluorophor-gekoppelten Nukleinsäuren

Die Fluoreszenz der markierten Oligonukleotide ^{Flu}d2R und ^{FAM}2R wurde in 300 mM KCl, 20 mM TrisHCl pH 8.0, 10% Saccharose, 1 mM DTT, 20 U/ml Ribolock (Fermentas) und 15 μ g/ml His-SUMO vermessen (Anregung bei λ = 488 nm, Emission bei λ = 518 nm; Spaltbreite 1-4 und 2-4 nm, je nach Konzentration). Dazu wurden die Proteine schrittweise in die temperierte und gerührte Küvette pipettiert, während die Fluoreszenz aufgenommen wurde. Die Fluoreszenz wurde nach Einstellung des assoziativen Gleichgewichts (nach 2 min) über 30 Sekunden gemittelt, um den Verdünnungseffekt korrigiert, und gegen die hnRNP K-Konzentration aufgetragen. Die bimolekulare Gleichgewichts-Dissoziationskonstante (K_D) wurde mit Hilfe des Programms SigmaPlot[®] (SPSS Inc.) durch Anpassen der Datenpunkte an Gleichung 4-2 erhalten. Dabei ist P_0 = hnRNP K, L_0 = Oligonukleotid-Konzentration und ΔF die Fluoreszenzänderung.

Gleichung 4-2

$$\Delta F = \frac{\Delta F_{\max}}{L_0} * \left[\frac{(K_D + P_0 + L_0)}{2} - \sqrt{\frac{(K_D + P_0 + L_0)^2}{4} - P_0 * L_0} \right]$$

4.6.4 Konkurrenzexperimente

Für die Konkurrenzexperimente wurde die Fluoreszenz des ^{FAM}2R gegen die Oligonukleotidkonzentration logarithmisch aufgetragen. Die relativen Fluoreszenzen wurden an die

exakte Lösung für [PA] einer Gleichgewichtskompetition mit den gegebenen Komplexkonzentrationen aus Gleichung 4-3 angepasst (Wang, 1995).

$$\text{Gleichung 4-3} \quad [PB] = \frac{[P][B_0]}{K_B + [P]}; [PA] = \frac{[P][A_0]}{K_A + [P]}$$

P ist hnRNP K, A ist ^{FAM}2R, B ist der Kompetitor, PB ist der nicht fluoreszierende hnRNP K-Kompetitor-Komplex und PA ist der hnRNP K-^{FAM}2R-Komplex.

Für die Anpassung wurde der K_A -Wert auf 5 nM festgelegt und die Gleichgewichtsdissoziationskonstante für den Kompetitor (K_B) mit Hilfe des Programms SigmaPlot® (SPSS Inc.) bestimmt.

4.7 Modell einer einfachen Autokatalyse

Die Ableitung des Zeitgesetzes der Autokatalyse wurde freundlicherweise von Michael Spinka (Abteilung Enzymologie, MLU-Halle-Wittenberg) durchgeführt.

Ein einfacher Fall einer Autokatalyse ist gegeben durch:



Dabei ist A die inaktive Spezies und B die aktive Spezies.

Die Zeitgesetze lauten:

$$d(A)/dt = -k(A)(B)$$

$$d(B)/dt = +k(A)(B)$$

Die Summe aus A und B bleibt stets gleich. Also

$$(A_0) + (B_0) = S \quad \text{sowie} \quad S = (A) + (B)$$

Daraus folgt

$$d(S)/dt = 0 = d(A)/dt + d(B)/dt$$

$$d(A)/dt = -d(B)/dt$$

Für eine Geschwindigkeitsgleichung mit nur einer Veränderlichen wird B substituiert.

$$d(A)/dt = -k(A)(B) = -k(A)\{S - (A)\}$$

$$d(A)/dt = -kS(A) + k(A)^2$$

$$d(A)/dt = -k[S(A) - (A)^2] = -k(A)[S - (A)]$$

Zu integrieren ist daher:

$$\frac{d(A)}{(A)[S - (A)]} = -k dt$$

Integration in den Grenzen $t [0;t]$

$$\int_0^t \frac{d(A)}{(A)[S - (A)]} = -k \int_0^t dt$$

$$\int_0^t \frac{d(A)}{(A)[S - (A)]} = -kt$$

Das linkseitige Integral wird durch Partialbruchzerlegung erhalten.

$$\frac{1}{(A)[S - (A)]} = \frac{R}{(A)} + \frac{Q}{[S - (A)]}$$

$$1 = R[S - (A)] + Q(A)$$

$$1 = RS - R(A) + Q(A)$$

$$1 = RS + [Q - R](A)$$

$$1 = RS \rightarrow R = 1/S$$

$$Q - R = 0 \rightarrow Q = R = 1/S$$

$$\frac{1}{(A)[S - (A)]} = \frac{1}{S} \left\{ \frac{1}{(A)} + \frac{1}{[S - (A)]} \right\}$$

$$\begin{aligned} \int_0^t \frac{d(A)}{(A)[S - (A)]} &= \frac{1}{S} \left\{ \int \frac{1}{(A)} d(A) + \int \frac{1}{[S - (A)]} d(A) \right\} \\ &= \frac{1}{S} \{ \ln|A| + (-1) \ln|S - A| \} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \int_0^t \frac{d(A)}{(A)[S - (A)]} &= \frac{1}{S} \left\{ \ln \left| \frac{A(t)}{A_0} \right| - \ln \left| \frac{S - A(t)}{S - A_0} \right| \right\} \\ &= \frac{1}{S} \left\{ \ln \left[\left(\frac{A(t)}{S - A(t)} \right) \left(\frac{S - A_0}{A_0} \right) \right] \right\} = -kt \\ \ln \left[\left(\frac{A}{S - (A)} \right) \left(\frac{S - A_0}{A_0} \right) \right] &= -Skt \end{aligned}$$

$$\ln \left[\left(\frac{A}{S - (A)} \right) \left(\frac{B_0}{A_0} \right) \right] = -Skt$$

$$\frac{(A)}{S - (A)} \varepsilon = e^{-Skt}$$

$$\frac{(A)}{S - (A)} = \varepsilon^{-1} e^{-Skt}$$

$$(A) = [S - (A)] \varepsilon^{-1} e^{-Skt} = S \varepsilon^{-1} e^{-Skt} - (A) \varepsilon^{-1} e^{-Skt}$$

$$(A) = [1 + \varepsilon^{-1} e^{-Skt}] = S \varepsilon^{-1} e^{-Skt}$$

$$(A) = \frac{S \varepsilon^{-1} e^{-Skt}}{1 + \varepsilon^{-1} e^{-Skt}}$$

Gleichung 4-4 $(A) = \frac{S e^{-Skt}}{\varepsilon + e^{-Skt}} \quad \varepsilon \equiv \frac{B_0}{A_0} \quad S \equiv A_0 + B_0$

(B) erhält man durch Subtraktion von (A) von S: (B)=S-(A)

Gleichung 4-5 $(B) = \frac{S \varepsilon}{\varepsilon + e^{-Skt}}$

4.8 Sequenzielle Gleichgewichtsreaktion

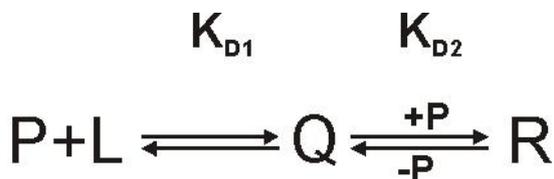


Abb. 4-13 Reaktionsgleichung der sequenziellen Assoziation

Eine Gleichgewichtsassoziation wie sie in Abb. 4-13 gezeigt ist - im Folgenden als sequenzielle Reaktion bezeichnet -, wird durch die zwei Gleichgewichts-Dissoziationskonstanten K_{D1} und K_{D2} (Gleichung 4-6) beschrieben. Gibt es ein Messsignal für die Assoziation von L und P (also für Q und R) können die K_D -Werte mit Hilfe einer exakten Beschreibung der Gleichgewichtskonzentrationen der beteiligten Spezies extrahiert werden.

Gleichung 4-6 $K_{D1} = \frac{[L] * [P]}{[Q]}; K_{D2} = \frac{[Q] * [P]}{[R]}$

Das Massenwirkungsgesetz beschreibt die Gleichgewichts-Konzentrationen der einzelnen Spezies:

$$[Q] = \frac{[L] * [P]}{K_{D1}}$$

$$[R] = \frac{[Q] * [P]}{K_{D2}} = \frac{[L] * [P]^2}{K_{D1} * K_{D2}}$$

Die Gesamtmenge an L (L_0) und P (P_0) ist durch die Massenerhaltung gegeben zu:

Gleichung 4-7 $[L]_0 = [L] + [Q] + [R]$

Gleichung 4-8 $[P]_0 = [P] + [Q] + 2[R]$

Durch einsetzen von [Q] und [R] in

Gleichung 4-7 erhält man

Gleichung 4-9.

Gleichung 4-9 $[L]_0 = [L] + \frac{[L] * [P]}{K_{D1}} + \frac{[L] * [P]^2}{K_{D1} * K_{D2}}$

Durch Umformen erhält man die Konzentration für L:

Gleichung 4-10 $[L] = \frac{[L]_0}{\left(1 + \frac{[P]}{K_{D1}} + \frac{[P]^2}{K_{D1} * K_{D2}}\right)}$

Durch Einsetzen von [Q] und [R] in

Gleichung 4-8 erhält man Gleichung 4-11:

Gleichung 4-11 $[P]_0 = [P] + \frac{[L] * [P]}{K_{D1}} + 2 \frac{[L] * [P]^2}{K_{D1} * K_{D2}}$

Durch Umformen erhält man:

Gleichung 4-12 $[P]_0 = [P] + [L] \left(\frac{[P]}{K_{D1}} + \frac{2 * [P]^2}{K_{D1} * K_{D2}} \right)$

Einsetzen von [L] (

Gleichung 4-10) in Gleichung 4-12 reduziert die veränderlichen Parameter auf [P]. Durch umstellen der kubischen Gleichung kann die Normalform dargestellt werden:

Gleichung 4-13 $0 = [P]^3 + r[P]^2 + s[P] + t$

wobei die einzelnen Parameter gegeben sind durch:

$$\begin{aligned} r &= 2[L]_0 - [P]_0 + K_{D2} \\ \text{Gleichung 4-14} \quad s &= K_{D2} * ([L]_0 - [P]_0) + K_{D1} * K_{D2} \\ t &= -K_{D1} * K_{D2} * [P]_0 \end{aligned}$$

Um die drei möglichen Lösungen (Wurzeln) der kubischen Gleichung zu bestimmen, wird diese durch Substitution vom $[P] = Y - (r/3)$ in die reduzierte Form überführt und es entsteht:

$$\text{Gleichung 4-15} \quad 0 = Y^3 + pY + q$$

wobei p und q gegeben sind durch:

$$\begin{aligned} p &= s - \frac{r^2}{3} \\ \text{Gleichung 4-16} \quad q &= \frac{2r^3}{27} - \frac{r * s}{3} + t \end{aligned}$$

Die Lösungen der reduzierten Form der kubischen Gleichung können durch die Cardanoschen Lösungsvorschriften gefunden werden.

$$\begin{aligned} Y_1 &= u_1 + v_1 \\ Y_{2/3} &= \frac{u_1 + v_1}{2} \pm \frac{u_1 - v_1}{2} + i\sqrt{3} \\ \text{Gleichung 4-17} \quad u_1 &= \sqrt[3]{-\frac{q}{2} + \sqrt{D}} \\ v_1 &= \sqrt[3]{-\frac{q}{2} - \sqrt{D}} \\ D &= \left(\frac{q}{2}\right)^2 + \left(\frac{p}{3}\right)^3 \end{aligned}$$

Die physisch sinnvolle Lösung ist durch Y_1 gegeben solange die Diskriminante D nicht negativ ist. Durch Rücksubstitution von Y_1 erhält man $[P] = u_1 + v_1 - r/3$

Testanalysen zeigten jedoch, dass das Vorzeichen der Diskriminante unter bestimmten Parameterbedingungen über den getesteten Konzentrationsbereich $[P_0]$ wechseln kann. Ist die Diskriminante negativ gilt die Lösungsvorschrift des *casus irreducibilis*.

$Y_1^\#$ ist dann gegeben durch:

$$Y_1^\# = 2 * \sqrt[3]{r} \cos \frac{\varphi}{3}$$

Gleichung 4-18

$$\varphi = \arccos \frac{-\frac{q}{2}}{\sqrt{\frac{-p^3}{27}}}$$

Die zwei anderen Lösungen sind lediglich um 120° „verschoben“ und sind für dieses Problem irrelevant. Durch Rücksubstitution von $Y_1^\#$ erhält man $[P^\#]$

Gleichung 4-19 $[P^\#] = 2 * \sqrt[3]{r} \cos \frac{\varphi}{3} - \frac{r}{3}$

Mit den physisch sinnvollen Lösungen $[P]$ und $[P^\#]$ könne die Konzentrationen der anderen Reaktanden bestimmt werden.

$[L]$ and $[L^\#]$ sind dann gegeben durch
Gleichung 4-20 und
Gleichung 4-21:

Gleichung 4-20 $[L] = \frac{L_0 * K_{D1} * K_{D2}}{K_{D1} * K_{D2} + K_{D2} \underbrace{\left(u_1 + v_1 - \frac{r}{3}\right)}_{\equiv [P]} + \underbrace{\left(u_1 + v_1 - \frac{r}{3}\right)^2}_{\equiv [P]^2}}$

Gleichung 4-21 $[L^\#] = \frac{L_0 * K_{D1} * K_{D2}}{K_{D1} * K_{D2} + K_{D2} \underbrace{\left(2 * \sqrt[3]{r} \cos \frac{\varphi}{3} - \frac{r}{3}\right)}_{\equiv [P^\#]} + \underbrace{\left(2 * \sqrt[3]{r} \cos \frac{\varphi}{3} - \frac{r}{3}\right)^2}_{\equiv [P^\#]^2}}$

Die Komplexkonzentration $[Q]$ und $[Q^\#]$ sind dann gegeben durch:

Gleichung 4-22

$$[Q] = \frac{[L] * [P]}{K_{D1}}$$

$$[Q^\#] = \frac{[L^\#] * [P^\#]}{K_{D1}}$$

Die Komplexkonzentration $[R]$ und $[R^\#]$ ergeben sich analog zu:

$$[R] = \frac{[L] * [P]^2}{K_{D1}}$$

Gleichung 4-23

$$[R^\#] = \frac{[L^\#] * [P^\#]^2}{K_{D1} * K_{D2}}$$

Mit den mathematischen Lösungen der Konzentration aller Reaktionsteilnehmer können die Gleichgewichtskonzentrationen der Reaktanden in Abhängigkeit von $[P_0]$ bei jedem beliebigen Set an Parametern (L_0 , K_{D1} und K_{D2}) bestimmt werden. In der Abb. 4-14 sind die Konzentrationen der Reaktanden L, Q und R bei gegebenen L_0 , K_{D1} und K_{D2} in Abhängigkeit von P_0 graphisch dargestellt. In dem gewählten Beispiel sind beide Lösungen der kubischen Gleichung notwendig, um die Reaktandenkonzentrationen gegen P_0 darzustellen.

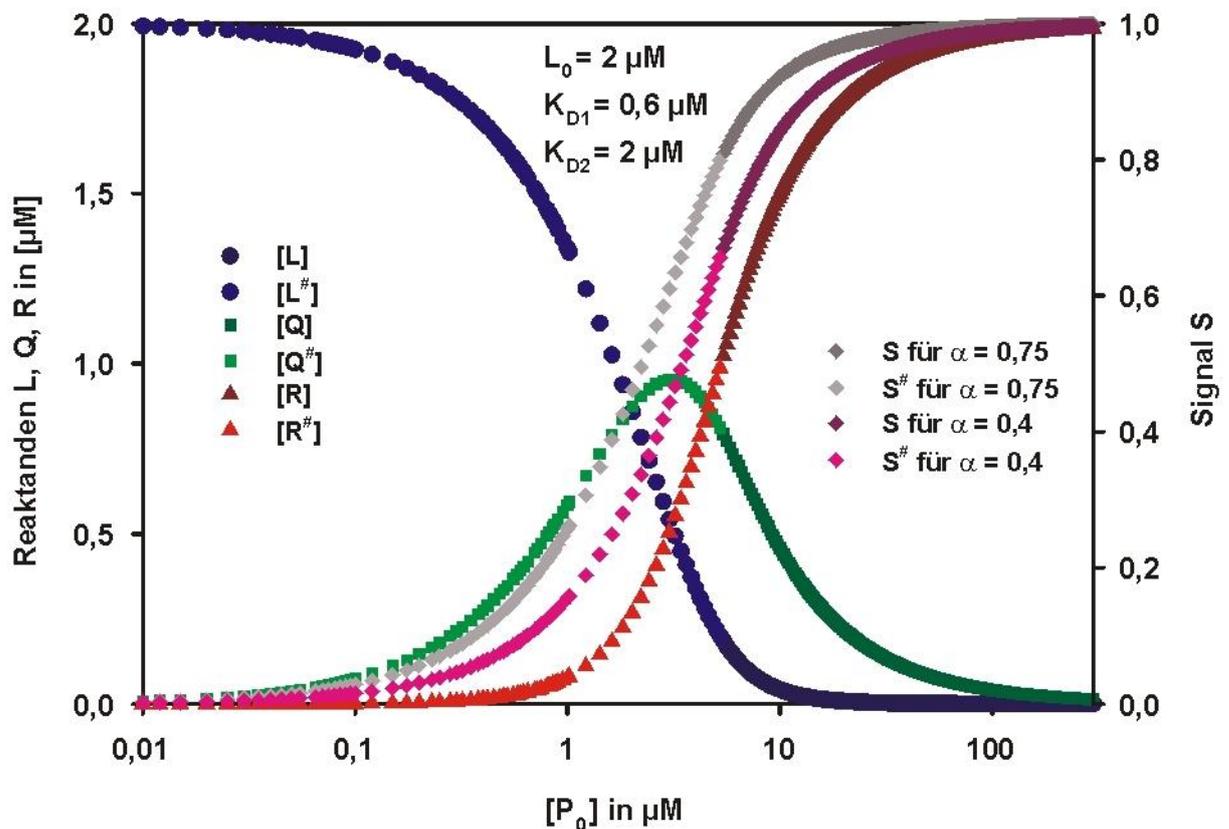


Abb. 4-14 Gleichgewichtsverteilung der Reaktanden einer sequenziellen Reaktion

Die Konzentration an L_0 sowie K_{D1} und K_{D2} wurden vorgegeben und die Konzentration für L, Q und R bei gegebenen P_0 errechnet und grafisch dargestellt. Die Beobachtungsgröße wurde auf eins normiert und für zwei verschiedene α -Werte gegen P_0 aufgetragen.

Um die algebraischen Lösungen für die Analyse einer Gleichgewichtsassoziation zu nutzen, muss zunächst noch geklärt werden, wie sich die Beobachtungsgröße zusammensetzt. Um die sequentielle Reaktion zu verfolgen, muss ein Differenzsignal (ΔS) für die Komplexe Q und R vorausgesetzt werden ($\Delta S = S_Q - (S_L + S_P) + S_R - (S_L + 2S_P) \neq 0$). Weil zwei aufeinander folgende Assoziationen betrachtet werden sollen, setzt sich das Signal aus den Differenzsignalen für Q und R zusammen: $\Delta S = (\alpha \Delta S_Q + \Delta S_R)$. Der

Wichtungsfaktor α gibt die Signalverteilung zwischen den Komplexen an. Wenn $\alpha = 0,5$ ist, dann ist das Differenzsignal für die erste Assoziation genau so groß wie für die zweite Assoziation (z. B. wenn das Differenzsignal aus P kommt). Ist α kleiner als 0,5, so ist das Differenzsignal für die erste Assoziation kleiner als das Differenzsignal der zweiten Assoziation (z.B. wenn nicht nur P an L sondern auch P an P ein Differenzsignal der gleichen Qualität liefert). Ist α größer als 0,5, so ist das Differenzsignal für die erste Assoziation größer als das Differenzsignal der zweiten Assoziation (z. B. die Enthalpie bei ITC-Messungen).

Für eine Anpassung von Datenpunkten an das sequenzielle Bindungsmodell kann nur eine Gleichung benutzt werden. Deshalb wurden die Lösungen beider Lösungsvorschriften für die Reaktanten generiert, der rationale Teil der Lösungsmenge grafisch dargestellt und durch iterative Variation der Parameter K_{D1} und K_{D2} sowie α an die Datenpunkte aus Abb. 2-22 und Abb. 2-20 angepasst, bis eine hinreichend gute Übereinstimmung der modulierten Verteilung mit den Messsignalen erhalten wurde. Durch die Verwendung von hohen Konzentrationen an L_0 (Abb. 2-22) reduzierten sich die für die Anpassung notwendigen Parameter auf K_{D2} und α ($K_{D2} = 30$ nM, $\alpha = 0,56$). Für die Anpassung der Daten aus Abb. 2-20 wurde dann der bereits ermittelte α -Wert festgelegt ($K_{D1} = 1$ nM, $K_{D2} = 30$ nM). Die Kalkulationen wurden mit SigmaPlot[®] (SPSS Inc.) durchgeführt.

4.9 Kombinatorik

NMR-Untersuchungen zu dem KH1-KH2 Fragment von hnRNP E2 zeigen eine kompakte Struktur, in der die beiden KH-Domänen über eine hydrophobe Kontaktfläche ein so genanntes „pseudo-Dimer“ bzw. eine Tandem-Domäne bilden (Du *et al.*, 2008)(Abb. 4-15). Der Sequenzvergleich in Abb. 4-15 legt eine homologe Struktur für die KH1 und KH2 von hnRNP K nahe. Daher wurde für das *K-combination mode*-Modell eine stärkere Sequenzbeschränkung der Tandem-Domäne angenommen als für die dritte KH-Domäne.



Aminosäure	44	46	48	49	50	103	107	110	147	149	151	152	204	205	208	212	216
aCP2	L	I	L	L	M	F	I	L	V	L	L	V	I	I	V	C	L
hnRNP K	V	L	I	L	L	L	I	C	C	L	L	L	V	V	I	L	S

Abb. 4-15 Tandem-Domäne KH1-KH2 von hnRNP E2

Cartoonmodell der Tandem-Domäne von hnRNP E1 (α CP2), PDB: 2JZX. Hydrophobe Aminosäuren der Interaktionsfläche (KH1: cyan; KH2: magenta) sind als stick dargestellt. Unten: Die Tabelle zeigt die homologen Aminosäuren (Nummerierung nach hnRNP K) in der Interaktionsfläche der beiden Proteine.

Berechnungen der erhöhten Affinität unter der Annahme einer Tandem-KH1-KH2-Domäne die keine gleichzeitige Wechselwirkung beider KH-Domänen mit direkt benachbarten C_4 -Motiven erlaubt. Zur Veranschaulichung ist das Prinzip der Berechnung schematisch in Abb. 4-16 gezeigt. Die Kombination von drei KH-Domänen an vier C_4 -Motiven ergibt $C = 4!/1! = 24$. 12 von diesen Kombinationen sind durch die Tandem-KH1-KH2-Domäne sterisch ausgeschlossen, bleiben 12 möglich Kombinationen übrig. Weil nur zwei Kombinationen aller drei KH-Domänen auf einem Liganden mit drei benachbarten C_4 -Motiven möglich sind, ist die Zunahme der Affinität von 3 zu 4 C_4 -Motiven $12/2 = 6$ -fach. Für die drei Domänen und 5 C_4 -Motiven ergibt sich dann eine $(5!/2! \cdot 24)/2 = 18$ -fache Affinitätserhöhung und für 6 C_4 -Motive eine $(6!/3! \cdot 40)/2 = 40$ -fache Affinitätserhöhung gegenüber einem Liganden mit drei C_4 -Motiven.

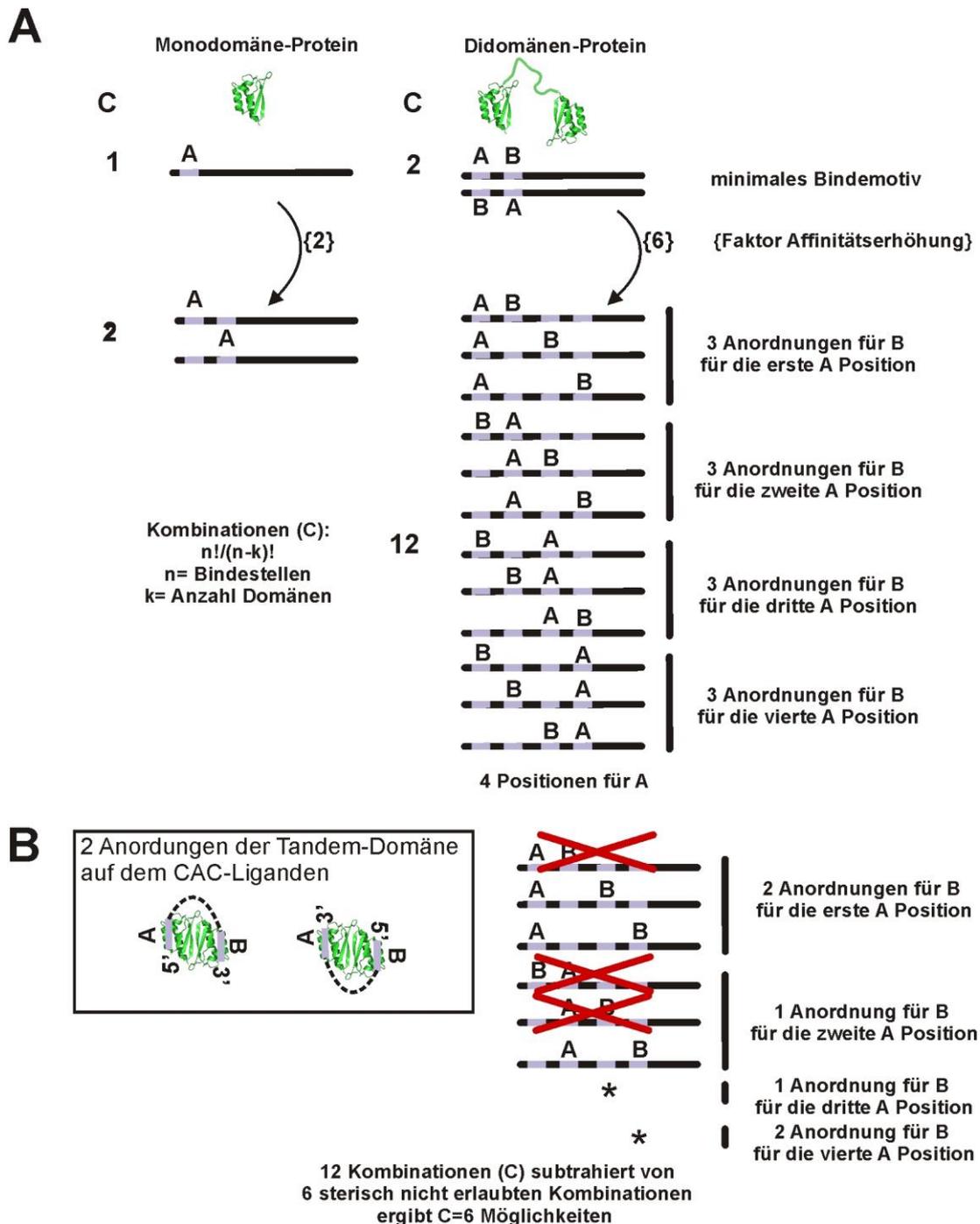


Abb. 4-16 Illustration des K-combination mode

A) Wird die Anzahl der Bindestellen eines Monodomänen-Proteins verdoppelt, so nimmt die Affinität zu diesem Liganden um ca. den Faktor zwei zu, weil die Assoziation entropisch (statistisch) durch die zwei möglichen Bindeereignisse begünstigt ist. Die Anzahl an möglichen Bindeereignissen mehrerer Domänen mit Liganden mit mehreren Bindestellen können mit den Gesetzen der Kombinatorik berechnet werden. Für zwei unabhängige Domänen ($k = 2$), die einen Liganden mit vier Bindestellen ($n = 4$) binden, sind 12 Kombinationen (C) möglich. Werden Liganden mit unterschiedlich vielen Bindestellen verglichen, so ergibt sich der Unterschied in der Affinität durch die unterschiedlichen Kombinationsmöglichkeiten. B) Wenn Domänen innerhalb eines Proteins nicht unabhängig von einander fungieren, sind einige Kombinationen nicht möglich. Hier angedeutet durch die Tandem-Domäne, deren Liganden-Interaktionsfläche auf gegenüberliegenden Seiten liegt, so dass für eine simultane Assoziation beider KH-Domänen die C_4 -Motive separiert sein müssen. Daher sind die theoretisch möglichen Kombinationen der gleichzeitig assoziierenden Domänen durch die sterisch nicht erlaubten Kombinationen zu reduzieren (angedeutet durch die roten Kreuze).

4.10 Abkürzungen

aDMR	asymmetrisch dimethyliertes Arginin
aMO	<i>antisens</i> -Morpholino
ANS	8-anilino-1-naphthalenesulfonsäure
ATM	<i>ataxia telangiectasia mutated</i>
BSA	bovines Serumalbumin
c-Src	zelluläres Src
CD	Circulardichroismus
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CRM1	<i>chromosome region maintenance 1</i>
ChIP	Chromatin-Immunpräzipitation
cps	<i>counts per second</i>
CSFV	<i>classical swine fever virus</i>
CSK	C-terminale-Src-Kinase
Cy3	Cyaninfarbstoff 3
ΔG_{tr}	Transferenergie
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DICE	<i>differentiation control element</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dsRNA	Doppelstrang RNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
eIF4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
eIF5B	eukaryotischer Initiationsfaktor 5B
EMCV	<i>encephalomyocarditis virus</i>
ERK2	<i>extracellular signal-regulated kinase 2</i>
ES	embryonale Stammzellen
ESI	Elektrospray-Ionisation
^{FAM} 2R	6-Carboxyfluorescein-markierte, synthetische 2R-RNA
FBS/FCS	fetales Kälberserum
^{Flu} d2R	Fluorescein-markierte, synthetische 2R-DNA
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
FUS	<i>fused in sarcoma</i>
GFP	grün fluoreszierende Protein
HA	Hämagglutinin oder Hydroxylapatit
HDM2	<i>human double minute 2</i>
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HGNC	<i>HUGO gene nomenclature committee</i>
HMT1	Hefe-Methyltransferase 1
hnRNP K	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein K
hnRNA	<i>heterogeneous nuclear RNA</i>
IGR	<i>intergenic region of cricket paralysis virus</i>
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
IRES	interne Ribosomen Bindestelle
JNK	<i>c-Jun N-terminal Kinase</i>

KH-Domäne	hnRNP K-Homologie-Domäne
KNS	hnRNP K <i>specific nuclear shuttle sequence</i>
LB	<i>Luria broth</i>
lincRNA	lange nicht-kodierende RNA
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinases</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
^{Met} hnRNP K	Arginin-methyliertes hnRNP K aus <i>E. coli</i>
MDM2	<i>murine double minute oncogene 2</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
mRNP	<i>messenger ribonucleoprotein particle</i>
MS	Massenspektrometrie
NF-M	<i>medium neurofilament protein</i>
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Kernspinresonanz)
nt	Nukleotide
NTA	nitrilotriacetic acid
NTD	<i>nuclear transport domain</i>
ORF	Offenes Leseraster
OD	Optische Dichte
p. A.	<i>per analysis</i>
PABPN1	nukleäres Poly(A)-Bindepotein
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
piRNA	<i>Piwi-interacting RNA</i>
PIWI	<i>P-element induced wimpy testis</i>
PDB	Protein Data Bank
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PR	Progesteronrezeptor
PRMT	Protein-Arginin-Methyltransferase
PTPN2	<i>protein tyrosin phosphatase non-receptor 2</i>
pTyr	phosphoryliertes Tyrosin
r15-LOX	Retikulozyten-15-Lipoxygenase
RBS	Shine-Dalgarno-Sequenz/Ribosomen-Bindestelle
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	<i>ribosomal ribonucleic acid</i>
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RT	Raumtemperatur
SAH	S-Adenosyl-Homocystein
SAM	S-Adenosyl-Methionin
Sam68	<i>Src-associated during mitosis</i>
sDMR	symmetrisch dimethyliertes Arginin
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SH2/3	<i>Src-homology 2/3</i>
SELEX	systematische Evolution eines RNA-Liganden durch exponentielle Anreicherung
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SMN	<i>survival of motor neurons</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNP	<i>small nucleolar ribonucleoprotein particle</i>
ssDNA	<i>single-stranded DNA</i>

STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SUMO	<i>small ubiquitin like modifier</i>
SV	Säulenvolumen
TAPS	N-Tris(hydroxymethyl)methyl-3-aminopropansulfonsäure
TB	<i>Terrific Broth</i>
TBB	TATA-Box-Bindeprotein
TDRD	<i>Tudor domain containing</i>
TOF	<i>time of flight</i> (Flugzeit)
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultra-Violett
v-Src	virales Src

5 Literatur

- Adams-Cioaba, M.A., Min, J. (2009) Structure and function of histone methylation binding proteins. *Biochem. Cell Biol.* *87*, 93-105.
- Adolph, D., Flach, N., Mueller, K., Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A. (2007) Deciphering the cross talk between hnRNP K and c-Src: the c-Src activation domain in hnRNP K is distinct from a second interaction site. *Mol. Cell. Biol.* *27*, 1758-1770.
- Adzhubei, A.A., Sternberg, M.J., Makarov, A.A. (2013) Polyproline-II helix in proteins: structure and function. *J. Mol. Biol.* *425*, 2100-2132.
- Alberts, B. *Molecular biology of the cell.* (2002) 4th edn. New York: Garland Science.
- Alvarez, R.H., Kantarjian, H.M., Cortes, J.E. (2006) The role of Src in solid and hematologic malignancies: development of new-generation Src inhibitors. *Cancer* *107*, 1918-1929.
- Auton, M., Bolen, D.W. (2005) Predicting the energetics of osmolyte-induced protein folding/unfolding. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 15065-15068.
- Auton, M., Bolen, D.W., Rosgen, J. (2008) Structural thermodynamics of protein preferential solvation: osmolyte solvation of proteins, aminoacids, and peptides. *Proteins* *73*, 802-813.
- Auton, M., Rosgen, J., Sinev, M., Holthauzen, L.M., Bolen, D.W. (2011a) Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and side-chains. *Biophys. Chem.* *159*, 90-99.
- Auton, M., Rosgen, J., Sinev, M., Holthauzen, L.M., Bolen, D.W. (2011b) Osmolyte effects on protein stability and solubility: a balancing act between backbone and side-chains. *Biophys. Chem.* *159*, 90-99.
- Azam, M., Seeliger, M.A., Gray, N.S., Kuriyan, J., Daley, G.Q. (2008) Activation of tyrosine kinases by mutation of the gatekeeper threonine. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 1109-1118.
- Backe, P.H., Messias, A.C., Ravelli, R.B., Sattler, M., Cusack, S. (2005) X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure* *13*, 1055-1067.
- Bader, M., Sarre, T.F. (1986) A (re)initiation-dependent cell-free protein-synthesis system from mouse erythroleukemia cells. *Eur. J. Biochem.* *161*, 103-109.
- Baierlein, C., Hackmann, A., Gross, T., Henker, L., Hinz, F., Krebber, H. (2013) Monosome formation during translation initiation requires the serine/arginine-rich protein Npl3. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 4811-4823.
- Ball, L.J., Kuhne, R., Schneider-Mergener, J., Oschkinat, H. (2005) Recognition of proline-rich motifs by protein-protein-interaction domains. *Angew Chem Int Ed Engl* *44*, 2852-2869.
- Barker, S.C., Kassel, D.B., Weigl, D., Huang, X., Luther, M.A., Knight, W.B. (1995) Characterization of pp60c-src tyrosine kinase activities using a continuous assay: autoactivation of the enzyme is an intermolecular autophosphorylation process. *Biochemistry* *34*, 14843-14851.

- Bartel, R.L., Borchardt, R.T. (1984) Effects of adenosine dialdehyde on S-adenosylhomocysteine hydrolase and S-adenosylmethionine-dependent transmethylation in mouse L929 cells. *Mol. Pharmacol.* 25, 418-424.
- Baskakov, I., Bolen, D.W. (1998) Forcing thermodynamically unfolded proteins to fold. *J. Biol. Chem.* 273, 4831-4834.
- Becker, K.F., Kremmer, E., Eulitz, M., Becker, I., Handschuh, G., Schuhmacher, C., Muller, W., Gabbert, H.E., Ochiai, A., Hirohashi, S., et al. (1999) Analysis of E-cadherin in diffuse-type gastric cancer using a mutation-specific monoclonal antibody. *Am J Pathol* 155, 1803-1809.
- Bedford, M.T., Clarke, S.G. (2009) Protein arginine methylation in mammals: who, what, and why. *Mol. Cell* 33, 1-13.
- Bedford, M.T., Frankel, A., Yaffe, M.B., Clarke, S., Leder, P., Richard, S. (2000) Arginine methylation inhibits the binding of proline-rich ligands to Src homology 3, but not WW, domains. *J. Biol. Chem.* 275, 16030-16036.
- Bedford, M.T., Richard, S. (2005) Arginine methylation an emerging regulator of protein function. *Mol. Cell* 18, 263-272.
- Bennett, M., Pinol-Roma, S., Staknis, D., Dreyfuss, G., Reed, R. (1992) Differential binding of heterogeneous nuclear ribonucleoproteins to mRNA precursors prior to spliceosome assembly in vitro. *Mol. Cell. Biol.* 12, 3165-3175.
- Bentmann, E., Neumann, M., Tahirovic, S., Rodde, R., Dormann, D., Haass, C. (2012) Requirements for stress granule recruitment of fused in sarcoma (FUS) and TAR DNA-binding protein of 43 kDa (TDP-43). *J. Biol. Chem.* 287, 23079-23094.
- Boerner, R.J., Kassel, D.B., Barker, S.C., Ellis, B., DeLacy, P., Knight, W.B. (1996) Correlation of the phosphorylation states of pp60c-src with tyrosine kinase activity: the intramolecular pY530-SH2 complex retains significant activity if Y419 is phosphorylated. *Biochemistry* 35, 9519-9525.
- Boffa, L.C., Karn, J., Vidali, G., Allfrey, V.G. (1977) Distribution of NG, NG,-dimethylarginine in nuclear protein fractions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74, 969-976.
- Bogoyevitch, M.A., Kobe, B. (2006) Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 70, 1061-1095.
- Bosse-Doenecke, E., Weininger, U., Gopalswamy, M., Balbach, J., Knudsen, S.M., Rudolph, R. (2008) High yield production of recombinant native and modified peptides exemplified by ligands for G-protein coupled receptors. *Protein Expr Purif* 58, 114-121.
- Braddock, D.T., Baber, J.L., Levens, D., Clore, G.M. (2002) Molecular basis of sequence-specific single-stranded DNA recognition by KH domains: solution structure of a complex between hnRNP K KH3 and single-stranded DNA. *EMBO J.* 21, 3476-3485.
- Burd, C.G., Dreyfuss, G. (1994) Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.
- Burgess, R.R., Deutscher, M.P. Guide to protein purification. (1990) 1990/01/01 edn.

- Buschmann, J., Moritz, B., Jeske, M., Lilie, H., Schierhorn, A., Wahle, E. (2013) Identification of *Drosophila* and human 7-methyl GMP-specific nucleotidases. *J. Biol. Chem.* *288*, 2441-2451.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., et al. (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* *309*, 1559-1563.
- Chang, J.W., Koike, T., Iwashima, M. (2009) hnRNP-K is a nuclear target of TCR-activated ERK and required for T-cell late activation. *Int. Immunol.* *21*, 1351-1361.
- Chen, L.C., Liu, H.P., Li, H.P., Hsueh, C., Yu, J.S., Liang, C.L., Chang, Y.S. (2009) Thymidine phosphorylase mRNA stability and protein levels are increased through ERK-mediated cytoplasmic accumulation of hnRNP K in nasopharyngeal carcinoma cells. *Oncogene* *28*, 1904-1915.
- Chen, Y., Zhou, X., Liu, N., Wang, C., Zhang, L., Mo, W., Hu, G. (2008) Arginine methylation of hnRNP K enhances p53 transcriptional activity. *FEBS Lett.* *582*, 1761-1765.
- Cheng, J., Kapranov, P., Drenkow, J., Dike, S., Brubaker, S., Patel, S., Long, J., Stern, D., Tammana, H., Helt, G., et al. (2005) Transcriptional maps of 10 human chromosomes at 5-nucleotide resolution. *Science* *308*, 1149-1154.
- Chkheidze, A.N., Liebhaber, S.A. (2003) A novel set of nuclear localization signals determine distributions of the alphaCP RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 8405-8415.
- Choi, H.S., Hwang, C.K., Song, K.Y., Law, P.Y., Wei, L.N., Loh, H.H. (2009) Poly(C)-binding proteins as transcriptional regulators of gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *380*, 431-436.
- Chong, Y.P., Ia, K.K., Mulhern, T.D., Cheng, H.C. (2005) Endogenous and synthetic inhibitors of the Src-family protein tyrosine kinases. *Biochim. Biophys. Acta* *1754*, 210-220.
- Chong, Y.P., Mulhern, T.D., Zhu, H.J., Fujita, D.J., Bjorge, J.D., Tantonco, J.P., Sotirellis, N., Lio, D.S., Scholz, G., Cheng, H.C. (2004) A novel non-catalytic mechanism employed by the C-terminal Src-homologous kinase to inhibit Src-family kinase activity. *J. Biol. Chem.* *279*, 20752-20766.
- Clery, A., Blatter, M., Allain, F.H. (2008) RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *18*, 290-298.
- Cloutier, J.F., Veillette, A. (1996) Association of inhibitory tyrosine protein kinase p50csk with protein tyrosine phosphatase PEP in T cells and other hemopoietic cells. *EMBO J.* *15*, 4909-4918.
- Collett, M.S., Brugge, J.S., Erikson, R.L. (1978) Characterization of a normal avian cell protein related to the avian sarcoma virus transforming gene product. *Cell* *15*, 1363-1369.
- Costa, G.L., Bauer, J.C., McGowan, B., Angert, M., Weiner, M.P. (1996) Site-directed mutagenesis using a rapid PCR-based method. *Methods Mol Biol* *57*, 239-248.
- Cote, J., Boisvert, F.M., Boulanger, M.C., Bedford, M.T., Richard, S. (2003) Sam68 RNA binding protein is an in vivo substrate for protein arginine N-methyltransferase 1. *Mol Biol Cell* *14*, 274-287.

- Cote, J., Richard, S. (2005) Tudor domains bind symmetrical dimethylated arginines. *J. Biol. Chem.* *280*, 28476-28483.
- Daubner, G.M., Clery, A., Allain, F.H. (2013) RRM-RNA recognition: NMR or crystallography...and new findings. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *23*, 100-108.
- Dejgaard, K., Leffers, H. (1996) Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur. J. Biochem.* *241*, 425-431.
- Dejgaard, K., Leffers, H., Rasmussen, H.H., Madsen, P., Kruse, T.A., Gesser, B., Nielsen, H., Celis, J.E. (1994) Identification, molecular cloning, expression and chromosome mapping of a family of transformation upregulated hnRNP-K proteins derived by alternative splicing. *J. Mol. Biol.* *236*, 33-48.
- Denman, R.B. (2002) Methylation of the arginine-glycine-rich region in the fragile X mental retardation protein FMRP differentially affects RNA binding. *Cell. Mol. Biol. Lett.* *7*, 877-883.
- Dimitrova, N., Zamudio, J.R., Jong, R.M., Soukup, D., Resnick, R., Sarma, K., Ward, A.J., Raj, A., Lee, J.T., Sharp, P.A., et al. (2014) LincRNA-p21 Activates p21 In cis to Promote Polycomb Target Gene Expression and to Enforce the G1/S Checkpoint. *Mol. Cell* *54*, 777-790.
- Dormann, D., Madl, T., Valori, C.F., Bentmann, E., Tahirovic, S., Abou-Ajram, C., Kremmer, E., Ansorge, O., Mackenzie, I.R., Neumann, M., et al. (2012) Arginine methylation next to the PY-NLS modulates Transportin binding and nuclear import of FUS. *EMBO J.* *31*, 4258-4275.
- Du, Z., Fenn, S., Tjhen, R., James, T.L. (2008) Structure of a construct of a human poly(C)-binding protein containing the first and second KH domains reveals insights into its regulatory mechanisms. *J. Biol. Chem.* *283*, 28757-28766.
- Eftink, M.R. (1997) Fluorescence methods for studying equilibrium macromolecule-ligand interactions. *Methods Enzymol.* *278*, 221-257.
- Engen, J.R., Wales, T.E., Hochrein, J.M., Meyn, M.A., 3rd, Banu Ozkan, S., Bahar, I., Smithgall, T.E. (2008) Structure and dynamic regulation of Src-family kinases. *Cell. Mol. Life Sci.* *65*, 3058-3073.
- Espejo, A., Cote, J., Bednarek, A., Richard, S., Bedford, M.T. (2002) A protein-domain microarray identifies novel protein-protein interactions. *Biochem. J.* *367*, 697-702.
- Feng, S., Kasahara, C., Rickles, R.J., Schreiber, S.L. (1995) Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc Natl Acad Sci U S A* *92*, 12408-12415.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806-811.
- Frame, M.C. (2004) Newest findings on the oldest oncogene; how activated src does it. *J. Cell Sci.* *117*, 989-998.
- Friberg, A., Corsini, L., Mourao, A., Sattler, M. (2009) Structure and ligand binding of the extended Tudor domain of *D. melanogaster* Tudor-SN. *J. Mol. Biol.* *387*, 921-934.

- Friesen, W.J., Massenet, S., Paushkin, S., Wyce, A., Dreyfuss, G. (2001) SMN, the product of the spinal muscular atrophy gene, binds preferentially to dimethylarginine-containing protein targets. *Mol. Cell* 7, 1111-1117.
- Fronz, K., Guttinger, S., Burkert, K., Kuhn, U., Stohr, N., Schierhorn, A., Wahle, E. (2011) Arginine methylation of the nuclear poly(a) binding protein weakens the interaction with its nuclear import receptor, transportin. *J. Biol. Chem.* 286, 32986-32994.
- Fronz, K., Otto, S., Kolbel, K., Kuhn, U., Friedrich, H., Schierhorn, A., Beck-Sickinger, A.G., Ostareck-Lederer, A., Wahle, E. (2008) Promiscuous modification of the nuclear poly(A)-binding protein by multiple protein-arginine methyltransferases does not affect the aggregation behavior. *J. Biol. Chem.* 283, 20408-20420.
- Garcia-Moreno, M., Havsteen, B.H., Varon, R., Rix-Matzen, H. (1991) Evaluation of the kinetic parameters of the activation of trypsinogen by trypsin. *Biochim. Biophys. Acta* 1080, 143-147.
- Gary, J.D., Clarke, S. (1998) RNA and protein interactions modulated by protein arginine methylation. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 61, 65-131.
- Gilks, N., Kedersha, N., Ayodele, M., Shen, L., Stoecklin, G., Dember, L.M., Anderson, P. (2004) Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell* 15, 5383-5398.
- Ginno, P.A., Lott, P.L., Christensen, H.C., Korf, I., Chedin, F. (2012) R-loop formation is a distinctive characteristic of unmethylated human CpG island promoters. *Mol. Cell* 45, 814-825.
- Gonfloni, S., Weijland, A., Kretzschmar, J., Superti-Furga, G. (2000) Crosstalk between the catalytic and regulatory domains allows bidirectional regulation of Src. *Nat. Struct. Biol.* 7, 281-286.
- Green, M.R., Sambrook, J. *Molecular cloning : a laboratory manual.* (2012) 4th edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Ronai, Z. (2001a) Identification of new JNK substrate using ATP pocket mutant JNK and a corresponding ATP analogue. *J. Biol. Chem.* 276, 18090-18095.
- Habelhah, H., Shah, K., Huang, L., Ostareck-Lederer, A., Burlingame, A.L., Shokat, K.M., Hentze, M.W., Ronai, Z. (2001b) ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat. Cell Biol.* 3, 325-330.
- Hackmann, A., Gross, T., Baierlein, C., Krebber, H. (2011) The mRNA export factor Npl3 mediates the nuclear export of large ribosomal subunits. *EMBO Rep* 12, 1024-1031.
- Henderson, B.R., Eleftheriou, A. (2000) A comparison of the activity, sequence specificity, and CRM1-dependence of different nuclear export signals. *Exp. Cell Res.* 256, 213-224.
- Henry, M.F., Silver, P.A. (1996) A novel methyltransferase (Hmt1p) modifies poly(A)⁺-RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* 16, 3668-3678.
- Herman, P., Lee, J.C. (2012) The advantage of global fitting of data involving complex linked reactions. *Methods Mol Biol* 796, 399-421.

- Hershey, J.W.B., Sonenberg, N., Mathews, M. Protein synthesis and translational control : a subject collection from Cold Spring Harbor perspectives in biology. (2012) Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hill, A.V. (1910) The possible effects of the aggregation of the molecules of haemoglobin on its dissociation curves. *J. Physiol.* 40, iv-vii.
- Hohne, M., Thiele, B.J., Prehn, S., Giessmann, E., Nack, B., Rapoport, S.M. (1988) Activation of translationally inactive lipoxygenase mRNP particles from rabbit reticulocytes. *Biomed Biochim Acta* 47, 75-78.
- Hsieh, C.H., Huang, S.Y., Wu, Y.C., Liu, L.F., Han, C.C., Liu, Y.C., Tam, M.F. (2007) Expression of proteins with dimethylarginines in *Escherichia coli* for protein-protein interaction studies. *Protein Sci.* 16, 919-928.
- Huang, Y., Fang, J., Bedford, M.T., Zhang, Y., Xu, R.M. (2006) Recognition of histone H3 lysine-4 methylation by the double tudor domain of JMJD2A. *Science* 312, 748-751.
- Huarte, M., Guttman, M., Feldser, D., Garber, M., Koziol, M.J., Kenzelmann-Broz, D., Khalil, A.M., Zuk, O., Amit, I., Rabani, M., et al. (2010) A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* 142, 409-419.
- Huntzinger, E., Izaurralde, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat. Rev. Genet.* 12, 99-110.
- Huse, M., Kuriyan, J. (2002) The conformational plasticity of protein kinases. *Cell* 109, 275-282.
- Huttelmaier, S., Illenberger, S., Grosheva, I., Rudiger, M., Singer, R.H., Jockusch, B.M. (2001) Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J. Cell Biol.* 155, 775-786.
- Jin, J., Cai, Y., Li, B., Conaway, R.C., Workman, J.L., Conaway, J.W., Kusch, T. (2005) In and out: histone variant exchange in chromatin. *Trends Biochem. Sci.* 30, 680-687.
- Kahvejian, A., Roy, G., Sonenberg, N. (2001) The mRNA closed-loop model: the function of PABP and PABP-interacting proteins in mRNA translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 66, 293-300.
- Kaimachnikov, N.P., Kholodenko, B.N. (2009) Toggle switches, pulses and oscillations are intrinsic properties of the Src activation/deactivation cycle. *FEBS J.* 276, 4102-4118.
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Dutttagupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermuller, J., Hofacker, I.L., et al. (2007) RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* 316, 1484-1488.
- Kelly, R.C., Jensen, D.E., von Hippel, P.H. (1976) DNA "melting" proteins. IV. Fluorescence measurements of binding parameters for bacteriophage T4 gene 32-protein to mono-, oligo-, and polynucleotides. *J. Biol. Chem.* 251, 7240-7250.
- Kerwitz, Y., Kuhn, U., Lilie, H., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwarz, E., Wahle, E. (2003) Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.* 22, 3705-3714.

- Kholodenko, B.N., Hancock, J.F., Kolch, W. (2010) Signalling ballet in space and time. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 414-426.
- Kim, J.H., Hahm, B., Kim, Y.K., Choi, M., Jang, S.K. (2000) Protein-protein interaction among hnRNPs shuttling between nucleus and cytoplasm. *J. Mol. Biol.* *298*, 395-405.
- Kim, S., Merrill, B.M., Rajpurohit, R., Kumar, A., Stone, K.L., Papov, V.V., Schneiders, J.M., Szer, W., Wilson, S.H., Paik, W.K., et al. (1997) Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* *36*, 5185-5192.
- Klimek-Tomczak, K., Wyrwicz, L.S., Jain, S., Bomsztyk, K., Ostrowski, J. (2004) Characterization of hnRNP K protein-RNA interactions. *J. Mol. Biol.* *342*, 1131-1141.
- Kmieciak, T.E., Shalloway, D. (1987) Activation and suppression of pp60c-src transforming ability by mutation of its primary sites of tyrosine phosphorylation. *Cell* *49*, 65-73.
- Kolbel, K., Ihling, C., Bellmann-Sickert, K., Neundorf, I., Beck-Sickinger, A.G., Sinz, A., Kuhn, U., Wahle, E. (2009) Type I Arginine Methyltransferases PRMT1 and PRMT-3 Act Distributively. *J. Biol. Chem.* *284*, 8274-8282.
- Kolbel, K., Ihling, C., Kuhn, U., Neundorf, I., Otto, S., Stichel, J., Robaa, D., Beck-Sickinger, A.G., Sinz, A., Wahle, E. (2012) Peptide backbone conformation affects the substrate preference of protein arginine methyltransferase I. *Biochemistry* *51*, 5463-5475.
- Kosturko, L.D., Maggipinto, M.J., Korza, G., Lee, J.W., Carson, J.H., Barbarese, E. (2006) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein (hnRNP) E1 binds to hnRNP A2 and inhibits translation of A2 response element mRNAs. *Mol Biol Cell* *17*, 3521-3533.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell* *128*, 693-705.
- Krause, C.D., Yang, Z.H., Kim, Y.S., Lee, J.H., Cook, J.R., Pestka, S. (2007) Protein arginine methyltransferases: evolution and assessment of their pharmacological and therapeutic potential. *Pharmacol. Ther.* *113*, 50-87.
- Kuhn, U., Nemeth, A., Meyer, S., Wahle, E. (2003) The RNA binding domains of the nuclear poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* *278*, 16916-16925.
- Lakowski, T.M., Zurita-Lopez, C., Clarke, S.G., Frankel, A. (2010) Approaches to measuring the activities of protein arginine N-methyltransferases. *Anal. Biochem.* *397*, 1-11.
- Lander, E.S., Linton, L.M., Birren, B., Nusbaum, C., Zody, M.C., Baldwin, J., Devon, K., Dewar, K., Doyle, M., FitzHugh, W., et al. (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860-921.
- Laue, T. (2001) Analytical centrifugation: equilibrium approach. *Curr Protoc Protein Sci Chapter 20, Unit20 23*.
- Lee, D.Y., Teyssier, C., Strahl, B.D., Stallcup, M.R. (2005) Role of protein methylation in regulation of transcription. *Endocr. Rev.* *26*, 147-170.

- Lee, S.W., Lee, M.H., Park, J.H., Kang, S.H., Yoo, H.M., Ka, S.H., Oh, Y.M., Jeon, Y.J., Chung, C.H. (2012) SUMOylation of hnRNP-K is required for p53-mediated cell-cycle arrest in response to DNA damage. *EMBO J.* *31*, 4441-4452.
- Lee, Y.H., Stallcup, M.R. (2009) Minireview: protein arginine methylation of nonhistone proteins in transcriptional regulation. *Mol. Endocrinol.* *23*, 425-433.
- Leffers, H., Dejgaard, K., Celis, J.E. (1995) Characterisation of two major cellular poly(rC)-binding human proteins, each containing three K-homologous (KH) domains. *Eur. J. Biochem.* *230*, 447-453.
- Levinson, N.M., Seeliger, M.A., Cole, P.A., Kuriyan, J. (2008) Structural basis for the recognition of c-Src by its inactivator Csk. *Cell* *134*, 124-134.
- Liu, H., Wang, J.Y., Huang, Y., Li, Z., Gong, W., Lehmann, R., Xu, R.M. (2010a) Structural basis for methylarginine-dependent recognition of Aubergine by Tudor. *Genes Dev.* *24*, 1876-1881.
- Liu, J.H., Wang, Z.X. (2004) Kinetic analysis of ligand-induced autocatalytic reactions. *Biochem. J.* *379*, 697-702.
- Liu, K., Chen, C., Guo, Y., Lam, R., Bian, C., Xu, C., Zhao, D.Y., Jin, J., MacKenzie, F., Pawson, T., et al. (2010b) Structural basis for recognition of arginine methylated Piwi proteins by the extended Tudor domain. *Proc Natl Acad Sci U S A* *107*, 18398-18403.
- Liu, Q., Dreyfuss, G. (1995) In vivo and in vitro arginine methylation of RNA-binding proteins. *Mol. Cell. Biol.* *15*, 2800-2808.
- Liu, Y., Szaro, B.G. (2011) hnRNP K post-transcriptionally co-regulates multiple cytoskeletal genes needed for axonogenesis. *Development* *138*, 3079-3090.
- Lodderstedt, G., Hess, S., Hause, G., Scheuermann, T., Scheibel, T., Schwarz, E. (2007) Effect of oculopharyngeal muscular dystrophy-associated extension of seven alanines on the fibrillation properties of the N-terminal domain of PABPN1. *FEBS J.* *274*, 346-355.
- Lozzio, C.B., Lozzio, B.B. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood* *45*, 321-334.
- Lunde, B.M., Moore, C., Varani, G. (2007) RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 479-490.
- Lynch, M., Chen, L., Ravitz, M.J., Mehtani, S., Korenblat, K., Pazin, M.J., Schmidt, E.V. (2005) hnRNP K binds a core polypyrimidine element in the eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) promoter, and its regulation of eIF4E contributes to neoplastic transformation. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 6436-6453.
- Macias, M.J., Wiesner, S., Sudol, M. (2002) WW and SH3 domains, two different scaffolds to recognize proline-rich ligands. *FEBS Lett.* *513*, 30-37.
- Mackereth, C.D., Madl, T., Bonnal, S., Simon, B., Zanier, K., Gasch, A., Rybin, V., Valcarcel, J., Sattler, M. (2011) Multi-domain conformational selection underlies pre-mRNA splicing regulation by U2AF. *Nature* *475*, 408-411.

- Maretzki, D., Kostic, M., Reimann, B., Schwarzer, E., Rapoport, S.M. (1986) Maturation of rabbit reticulocytes: strong decline of the turnover of polyphosphoinositides. *Biomed Biochim Acta* 45, 1227-1236.
- Martin, G.S. (2001) The hunting of the Src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 467-475.
- Matunis, M.J., Michael, W.M., Dreyfuss, G. (1992) Characterization and primary structure of the poly(C)-binding heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complex K protein. *Mol. Cell. Biol.* 12, 164-171.
- Mazzaferro, S., Bouchemal, K., Gallard, J.F., Iorga, B.I., Cheron, M., Gueutin, C., Steinmesse, C., Ponchel, G. (2011) Bivalent sequential binding of docetaxel to methyl-beta-cyclodextrin. *Int. J. Pharm.* 416, 171-180.
- McBride, A.E., Weiss, V.H., Kim, H.K., Hogle, J.M., Silver, P.A. (2000) Analysis of the yeast arginine methyltransferase Hmt1p/Rmt1p and its in vivo function. Cofactor binding and substrate interactions. *J. Biol. Chem.* 275, 3128-3136.
- Melo, E.P., Estrela, N., Lopes, C., Matias, A.C., Tavares, E., Ochoa-Mendes, V. (2010) Compacting proteins: pros and cons of osmolyte-induced folding. *Curr Protein Pept Sci* 11, 744-751.
- Messias, A.C., Harnisch, C., Ostareck-Lederer, A., Sattler, M., Ostareck, D.H. (2006) The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J. Mol. Biol.* 361, 470-481.
- Michael, W.M., Eder, P.S., Dreyfuss, G. (1997) The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J.* 16, 3587-3598.
- Michelotti, E.F., Michelotti, G.A., Aronsohn, A.I., Levens, D. (1996a) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K is a transcription factor. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2350-2360.
- Michelotti, G.A., Michelotti, E.F., Pullner, A., Duncan, R.C., Eick, D., Levens, D. (1996b) Multiple single-stranded cis elements are associated with activated chromatin of the human c-myc gene in vivo. *Mol. Cell. Biol.* 16, 2656-2669.
- Mikula, M., Bomsztyk, K., Goryca, K., Chojnowski, K., Ostrowski, J. (2013) Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (HnRNP) K Genome-wide Binding Survey Reveals Its Role in Regulating 3'-End RNA Processing and Transcription Termination at the Early Growth Response 1 (EGR1) Gene through XRN2 Exonuclease. *J. Biol. Chem.* 288, 24788-24798.
- Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C.H., Kuriyan, J., Miller, W.T. (1997) Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement. *Nature* 385, 650-653.
- Moritz, B., Lilie, H., Naarmann-de Vries I.S., Urlaub, H., Wahle, E., Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D., (2014) Biophysical and biochemical analysis of hnRNP K: arginine methylation, reversible aggregation and combinatorial binding to nucleic acids. *Biol. Chem. accepted 20.05.2014*
- Moritz, B., Wahle, E. (2014) Simple methods for the 3' biotinylation of RNA. *RNA* 20, 421-427
- Mossessova, E., Lima, C.D. (2000) Ulp1-SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast. *Mol. Cell* 5, 865-876.

- Moumen, A., Magill, C., Dry, K.L., Jackson, S.P. (2013) ATM-dependent phosphorylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K promotes p53 transcriptional activation in response to DNA damage. *Cell Cycle* 12, 698-704.
- Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M.J., Jackson, S.P. (2005) hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell* 123, 1065-1078.
- Naarmann-de Vries, I.S., Urlaub, H., Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A. (2013) Caspase-3 cleaves hnRNP K in erythroid differentiation. *Cell Death Dis* 4, e548.
- Naarmann, I.S., Harnisch, C., Flach, N., Kremmer, E., Kuhn, H., Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A. (2008) mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J. Biol. Chem.* 283, 18461-18472.
- Naarmann, I.S., Harnisch, C., Muller-Newen, G., Urlaub, H., Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H. (2010) DDX6 recruits translationally silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA* 16, 2189-2204.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P.B., Steitz, T.A. (2000) The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science* 289, 920-930.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H. (2004) Control of mRNA translation and stability in haematopoietic cells: the function of hnRNPs K and E1/E2. *Biol. Cell* 96, 407-411.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H. (2012) Precision mechanics with multifunctional tools: how hnRNP K and hnRNPs E1/E2 contribute to post-transcriptional control of gene expression in hematopoiesis. *Curr Protein Pept Sci* 13, 391-400.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Cans, C., Neubauer, G., Bomsztyk, K., Superti-Furga, G., Hentze, M.W. (2002) c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4535-4543.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Rucknagel, K.P., Schierhorn, A., Moritz, B., Huttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L., Wahle, E. (2006) Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J. Biol. Chem.* 281, 11115-11125.
- Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D.H., Standart, N., Thiele, B.J. (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, 1476-1481.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Shatsky, I.N., Hentze, M.W. (2001) Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell* 104, 281-290.
- Ostareck, D.H., Ostareck-Lederer, A., Wilm, M., Thiele, B.J., Mann, M., Hentze, M.W. (1997) mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell* 89, 597-606.

- Ostrowski, J., Schullery, D.S., Denisenko, O.N., Higaki, Y., Watts, J., Aebersold, R., Stempka, L., Gschwendt, M., Bomsztyk, K. (2000) Role of tyrosine phosphorylation in the regulation of the interaction of heterogenous nuclear ribonucleoprotein K protein with its protein and RNA partners. *J. Biol. Chem.* 275, 3619-3628.
- Pahllich, S., Zakaryan, R.P., Gehring, H. (2006) Protein arginine methylation: Cellular functions and methods of analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 1764, 1890-1903.
- Paik, W.K., Kim, S. (1967) Enzymatic methylation of protein fractions from calf thymus nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 29, 14-20.
- Paik, W.K., Paik, D.C., Kim, S. (2007) Historical review: the field of protein methylation. *Trends Biochem. Sci.* 32, 146-152.
- Patwardhan, P., Resh, M.D. (2010) Myristoylation and membrane binding regulate c-Src stability and kinase activity. *Mol. Cell. Biol.* 30, 4094-4107.
- Pawlak, M.R., Banik-Maiti, S., Pietenpol, J.A., Ruley, H.E. (2002) Protein arginine methyltransferase I: substrate specificity and role in hnRNP assembly. *J. Cell. Biochem.* 87, 394-407.
- Pawlak, M.R., Scherer, C.A., Chen, J., Roshon, M.J., Ruley, H.E. (2000) Arginine N-methyltransferase 1 is required for early postimplantation mouse development, but cells deficient in the enzyme are viable. *Mol. Cell. Biol.* 20, 4859-4869.
- Pelisch, F., Pozzi, B., Risso, G., Munoz, M.J., Srebrow, A. (2012) DNA damage-induced heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K sumoylation regulates p53 transcriptional activation. *J. Biol. Chem.* 287, 30789-30799.
- Perry, M.E. (2004) Mdm2 in the response to radiation. *Mol. Cancer Res.* 2, 9-19.
- Pestova, T.V., Lomakin, I.B., Lee, J.H., Choi, S.K., Dever, T.E., Hellen, C.U. (2000) The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature* 403, 332-335.
- Pfennig, N., Lippert, K.D. (1966) Uber das Vitamin B12-Bedurfnis phototropher Schwefelbakterien. *Arch. Mikrobiol.* 55, 245-256.
- Pheasant, M., Mattick, J.S. (2007) Raising the estimate of functional human sequences. *Genome Res.* 17, 1245-1253.
- Phillips, H.J. Dye exclusion tests for all viability. In: *Tissue Culture*.--Kruse P.F., ed. (1993) New York Academic Press. 407-408.
- Pinol-Roma, S., Choi, Y.D., Matunis, M.J., Dreyfuss, G. (1988) Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins. *Genes Dev.* 2, 215-227.
- Piserchio, A., Ghose, R., Cowburn, D. (2009) Optimized bacterial expression and purification of the c-Src catalytic domain for solution NMR studies. *J. Biomol. NMR* 44, 87-93.
- Ponting, C.P. (1997) Tudor domains in proteins that interact with RNA. *Trends Biochem. Sci.* 22, 51-52.

- Rahman-Roblick, R., Roblick, U.J., Hellman, U., Conrotto, P., Liu, T., Becker, S., Hirschberg, D., Jornvall, H., Auer, G., Wiman, K.G. (2007) p53 targets identified by protein expression profiling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 5401-5406.
- Rajpurohit, R., Paik, W.K., Kim, S. (1994) Effect of enzymic methylation of heterogeneous ribonucleoprotein particle A1 on its nucleic-acid binding and controlled proteolysis. *Biochem. J.* 304 (Pt 3), 903-909.
- Rajyaguru, P., Parker, R. (2012) RGG motif proteins: modulators of mRNA functional states. *Cell Cycle* 11, 2594-2599.
- Raman, B., Guarnaccia, C., Nadassy, K., Zakhariiev, S., Pintar, A., Zanuttin, F., Frigyes, D., Acatrinei, C., Vindigni, A., Pongor, G., et al. (2001) N(omega)-arginine dimethylation modulates the interaction between a Gly/Arg-rich peptide from human nucleolin and nucleic acids. *Nucleic Acids Res.* 29, 3377-3384.
- Rehm, H. *Proteinbiochemie/Proteomics*. (2006): Spektrum Akademischer Verlag.
- Reimann, I., Huth, A., Thiele, H., Thiele, B.J. (2002) Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'-UTR control element DICE. *J. Mol. Biol.* 315, 965-974.
- Reverter, D., Lima, C.D. (2009) Preparation of SUMO proteases and kinetic analysis using endogenous substrates. *Methods Mol Biol* 497, 225-239.
- Revil, T., Pelletier, J., Toutant, J., Cloutier, A., Chabot, B. (2009) Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K represses the production of pro-apoptotic Bcl-xS splice isoform. *J. Biol. Chem.* 284, 21458-21467.
- Ryder, S.P., Recht, M.I., Williamson, J.R. (2008) Quantitative analysis of protein-RNA interactions by gel mobility shift. *Methods Mol Biol* 488, 99-115.
- Saitoh, H., Uwada, J., Azusa, K. (2009) Strategies for the expression of SUMO-modified target proteins in *Escherichia coli*. *Methods Mol Biol* 497, 211-221.
- Salazar, C., Brummer, A., Alberghina, L., Hofer, T. (2010) Timing control in regulatory networks by multisite protein modifications. *Trends Cell Biol.* 20, 634-641.
- Schuck, P. (2004) A model for sedimentation in inhomogeneous media. I. Dynamic density gradients from sedimenting co-solutes. *Biophys. Chem.* 108, 187-200.
- Schwartz, J.C., Younger, S.T., Nguyen, N.B., Hardy, D.B., Monia, B.P., Corey, D.R., Janowski, B.A. (2008) Antisense transcripts are targets for activating small RNAs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 15, 842-848.
- Schweizer, D., Nagl, W. (1976) Heterochromatin diversity in *Cymbidium*, and its relationship to differential DNA replication. *Exp. Cell Res.* 98, 411-423.
- Serganov, A., Nudler, E. (2013) A decade of riboswitches. *Cell* 152, 17-24.
- Serio, T.R., Lindquist, S.L. (2001) [PSI⁺], SUP35, and chaperones. *Adv Protein Chem* 57, 335-366.

- Shamoo, Y., Abdul-Manan, N., Williams, K.R. (1995) Multiple RNA binding domains (RBDs) just don't add up. *Nucleic Acids Res.* 23, 725-728.
- Shen, E.C., Henry, M.F., Weiss, V.H., Valentini, S.R., Silver, P.A., Lee, M.S. (1998) Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev.* 12, 679-691.
- Sidiqi, M., Wilce, J.A., Vivian, J.P., Porter, C.J., Barker, A., Leedman, P.J., Wilce, M.C. (2005) Structure and RNA binding of the third KH domain of poly(C)-binding protein 1. *Nucleic Acids Res.* 33, 1213-1221.
- Siomi, H., Matunis, M.J., Michael, W.M., Dreyfuss, G. (1993) The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21, 1193-1198.
- Smart, J.E., Oppermann, H., Czernilofsky, A.P., Purchio, A.F., Erikson, R.L., Bishop, J.M. (1981) Characterization of sites for tyrosine phosphorylation in the transforming protein of Rous sarcoma virus (pp60v-src) and its normal cellular homologue (pp60c-src). *Proc Natl Acad Sci U S A* 78, 6013-6017.
- Smith, J.J., Rucknagel, K.P., Schierhorn, A., Tang, J., Nemeth, A., Linder, M., Herschman, H.R., Wahle, E. (1999) Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J. Biol. Chem.* 274, 13229-13234.
- Smith, W.A., Schurter, B.T., Wong-Staal, F., David, M. (2004) Arginine methylation of RNA helicase a determines its subcellular localization. *J. Biol. Chem.* 279, 22795-22798.
- Spannhoff, A., Machmur, R., Heinke, R., Trojer, P., Bauer, I., Brosch, G., Schule, R., Hanefeld, W., Sippl, W., Jung, M. (2007) A novel arginine methyltransferase inhibitor with cellular activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 17, 4150-4153.
- Spinka, M. and Moritz, B., (2014) An exact mathematical expression for a sequential equilibrium association. *in preparation*
- Steen, H., Jebanathirajah, J.A., Springer, M., Kirschner, M.W. (2005) Stable isotope-free relative and absolute quantitation of protein phosphorylation stoichiometry by MS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 3948-3953.
- Stehelin, D., Varmus, H.E., Bishop, J.M., Vogt, P.K. (1976) DNA related to the transforming gene(s) of avian sarcoma viruses is present in normal avian DNA. *Nature* 260, 170-173.
- Street, T.O., Bolen, D.W., Rose, G.D. (2006) A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 13997-14002.
- Sugase, K., Landes, M.A., Wright, P.E., Martinez-Yamout, M. (2008) Overexpression of post-translationally modified peptides in *Escherichia coli* by co-expression with modifying enzymes. *Protein Expr Purif* 57, 108-115.
- Sun, G., Ramdas, L., Wang, W., Vinci, J., McMurray, J., Budde, R.J. (2002) Effect of autophosphorylation on the catalytic and regulatory properties of protein tyrosine kinase Src. *Arch Biochem Biophys* 397, 11-17.
- Swanson, M.S., Dreyfuss, G. (1988) Classification and purification of proteins of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles by RNA-binding specificities. *Mol. Cell. Biol.* 8, 2237-2241.

- Tang, H., McDonald, D., Middlesworth, T., Hope, T.J., Wong-Staal, F. (1999) The carboxyl terminus of RNA helicase A contains a bidirectional nuclear transport domain. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 3540-3550.
- Tang, J., Frankel, A., Cook, R.J., Kim, S., Paik, W.K., Williams, K.R., Clarke, S., Herschman, H.R. (2000) PRMT1 is the predominant type I protein arginine methyltransferase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* *275*, 7723-7730.
- Taverna, S.D., Li, H., Ruthenburg, A.J., Allis, C.D., Patel, D.J. (2007) How chromatin-binding modules interpret histone modifications: lessons from professional pocket pickers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 1025-1040.
- Taylor, S.J., Shalloway, D. (1994) An RNA-binding protein associated with Src through its SH2 and SH3 domains in mitosis. *Nature* *368*, 867-871.
- Teixeira, D., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A., Brengues, M., Parker, R. (2005) Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. *RNA* *11*, 371-382.
- Thisted, T., Lyakhov, D.L., Liebhaber, S.A. (2001) Optimized RNA targets of two closely related triple KH domain proteins, heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K and alphaCP-2KL, suggest Distinct modes of RNA recognition. *J. Biol. Chem.* *276*, 17484-17496.
- Thyagarajan, A., Szaro, B.G. (2004) Phylogenetically conserved binding of specific K homology domain proteins to the 3'-untranslated region of the vertebrate middle neurofilament mRNA. *J. Biol. Chem.* *279*, 49680-49688.
- Thyagarajan, A., Szaro, B.G. (2008) Dynamic endogenous association of neurofilament mRNAs with K-homology domain ribonucleoproteins in developing cerebral cortex. *Brain Res.* *1189*, 33-42.
- Tripsianes, K., Madl, T., Machyna, M., Fessas, D., Englbrecht, C., Fischer, U., Neugebauer, K.M., Sattler, M. (2011) Structural basis for dimethylarginine recognition by the Tudor domains of human SMN and SPF30 proteins. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1414-1420.
- Valentini, S.R., Weiss, V.H., Silver, P.A. (1999) Arginine methylation and binding of Hrp1p to the efficiency element for mRNA 3'-end formation. *RNA* *5*, 272-280.
- Valverde, R., Edwards, L., Regan, L. (2008) Structure and function of KH domains. *FEBS J.* *275*, 2712-2726.
- van Leyen, K., Duvoisin, R.M., Engelhardt, H., Wiedmann, M. (1998) A function for lipoxygenase in programmed organelle degradation. *Nature* *395*, 392-395.
- van Vliet, C., Bukczynska, P.E., Puryer, M.A., Sadek, C.M., Shields, B.J., Tremblay, M.L., Tiganis, T. (2005) Selective regulation of tumor necrosis factor-induced Erk signaling by Src family kinases and the T cell protein tyrosine phosphatase. *Nat. Immunol.* *6*, 253-260.
- Venables, J.P., Koh, C.S., Froehlich, U., Lapointe, E., Couture, S., Inkel, L., Bramard, A., Paquet, E.R., Watier, V., Durand, M., et al. (2008) Multiple and specific mRNA processing targets for the major human hnRNP proteins. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6033-6043.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A., et al. (2001) The sequence of the human genome. *Science* *291*, 1304-1351.

- Vogel, H. Gerthsen Physik. (1995): Springer.
- Vousden, K.H., Prives, C. (2005) P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* 120, 7-10.
- Wang, Z.X. (1995) An exact mathematical expression for describing competitive binding of two different ligands to a protein molecule. *FEBS Lett.* 360, 111-114.
- Wang, Z.X., Wu, J.W. (2002) Autophosphorylation kinetics of protein kinases. *Biochem. J.* 368, 947-952.
- Wang, Z.X., Zhou, B., Wang, Q.M., Zhang, Z.Y. (2002) A kinetic approach for the study of protein phosphatase-catalyzed regulation of protein kinase activity. *Biochemistry* 41, 7849-7857.
- Watkins, N.J., Bohnsack, M.T. (2012) The box C/D and H/ACA snoRNPs: key players in the modification, processing and the dynamic folding of ribosomal RNA. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3, 397-414.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D., Sachs, A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* 2, 135-140.
- Weng, Z., Thomas, S.M., Rickles, R.J., Taylor, J.A., Brauer, A.W., Seidel-Dugan, C., Michael, W.M., Dreyfuss, G., Brugge, J.S. (1994) Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol. Cell. Biol.* 14, 4509-4521.
- Wessel, D., Flugge, U.I. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* 138, 141-143.
- Winkler, W., Nahvi, A., Breaker, R.R. (2002) Thiamine derivatives bind messenger RNAs directly to regulate bacterial gene expression. *Nature* 419, 952-956.
- Wolf, D., Witte, V., Clark, P., Blume, K., Lichtenheld, M.G., Baur, A.S. (2008) HIV Nef enhances Tat-mediated viral transcription through a hnRNP-K-nucleated signaling complex. *Cell Host Microbe* 4, 398-408.
- Wolf, S.S. (2009) The protein arginine methyltransferase family: an update about function, new perspectives and the physiological role in humans. *Cell. Mol. Life Sci.* 66, 2109-2121.
- Wongsurawat, T., Jenjaroenpun, P., Kwoh, C.K., Kuznetsov, V. (2012) Quantitative model of R-loop forming structures reveals a novel level of RNA-DNA interactome complexity. *Nucleic Acids Res.* 40, e16.
- Xu, C., Henry, M.F. (2004a) Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10742-10756.
- Xu, C., Henry, M.F. (2004b) Nuclear export of hnRNP Hrp1p and nuclear export of hnRNP Npl3p are linked and influenced by the methylation state of Npl3p. *Mol. Cell. Biol.* 24, 10742-10756.
- Xu, W., Doshi, A., Lei, M., Eck, M.J., Harrison, S.C. (1999) Crystal structures of c-Src reveal features of its autoinhibitory mechanism. *Mol. Cell* 3, 629-638.
- Xu, W., Harrison, S.C., Eck, M.J. (1997) Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-602.

- Yancey, P.H. (2005) Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *J. Exp. Biol.* *208*, 2819-2830.
- Yang, Y., Bedford, M.T. (2013) Protein arginine methyltransferases and cancer. *Nat. Rev. Cancer* *13*, 37-50.
- Yang, Y., Lu, Y., Espejo, A., Wu, J., Xu, W., Liang, S., Bedford, M.T. (2010) TDRD3 is an effector molecule for arginine-methylated histone marks. *Mol. Cell* *40*, 1016-1023.
- Young, M.A., Gonfloni, S., Superti-Furga, G., Roux, B., Kuriyan, J. (2001) Dynamic coupling between the SH2 and SH3 domains of c-Src and Hck underlies their inactivation by C-terminal tyrosine phosphorylation. *Cell* *105*, 115-126.
- Yu, M.C., Bachand, F., McBride, A.E., Komili, S., Casolari, J.M., Silver, P.A. (2004) Arginine methyltransferase affects interactions and recruitment of mRNA processing and export factors. *Genes Dev.* *18*, 2024-2035.
- Yun, C.Y., Fu, X.D. (2000) Conserved SR protein kinase functions in nuclear import and its action is counteracted by arginine methylation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* *150*, 707-718.
- Zaug, A.J., Cech, T.R. (1986) The intervening sequence RNA of *Tetrahymena* is an enzyme. *Science* *231*, 470-475.
- Zhang, X., Cheng, X. (2003) Structure of the predominant protein arginine methyltransferase PRMT1 and analysis of its binding to substrate peptides. *Structure* *11*, 509-520.
- Zhou, R., Shanas, R., Nelson, M.A., Bhattacharyya, A., Shi, J. (2010) Increased expression of the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K in pancreatic cancer and its association with the mutant p53. *Int. J. Cancer* *126*, 395-404.

6 Anhang

Tabelle A Primersequenzen für die Klonierung

Primer #	Sequenz (5'-3')	Schnittstelle	Orientierung
1	CCGCCCTCGAGATATGGAAACTGAACAGCCAG	XhoI	forw
2	CGCGGTACCTTAGAAAACTTCCAGAATAC	KpnI	rev
3	AATAGCTAGCCACCATGGAAACTGAACAGCCAG	NheI	forw
4	CGCGGTACCGCGAAAACTTCCAGAATAC	KpnI	rev
5	CTAGCCCGCCATGTACCCTTATGACGTGCCCGATTACGC	NheI/XhoI	forw
6	TCGAGCGTAATCGGGCACGTCATAAGGGTACATGGCGGG	NheI/XhoI	rev
7	CCTACCCTTATGACGTGCCCGATTACGCTTAAGGTAC	KpnI	forw
8	CTTAAGCGTAATCGGGCACGTCATAAGGGTAGGGTAC	KpnI	rev
9	AACACTGATGAGATGGTTGAATTACG	blunt	forw
10	ACCAAATCACCATTGGTTTCAGTG	blunt	rev
11	GAACCACAGGGTGGCTCCGGATATG	blunt	forw
12	GGCCATGAGGTCTCCCCTCTAGG	blunt	rev
13	GAAGAGATTATGATGATATGGCTCCTCGTCGAGGACCACCTCCC		forw
14	GGGAGGTGGTCTCGACGAGGAGCCATATCATATAATCTCTTC		rev
15	GGGACTCTGCAATAGATACATGGGCTCCATCAGAATGGCAGATGGCTTATG		forw
16	CATAAGCCATCTGCCATTCTGATGGAGCCCATGTATCTATTGCAGAGTCCC		rev
17	GAAGAGATTATGATGATATGGAGCCTCGTCGAGGACCACCTCCC		forw
18	GGGAGGTGGTCTCGACGAGGCTCCATATCATATAATCTCTTC		rev
19	GGGACTCTGCAATAGATACATGGGAACCATCAGAATGGCAGATGGCTTATG		forw
20	CATAAGCCATCTGCCATTCTGATGGTCCCATGTATCTATTGCAGAGTCCC		rev
21	CCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC	XhoI	forw
22	CAGCCGGATCTCAGTGGTG	blunt	rev
23	aaaCTCGAGAACTTTAAGAAGGAGATATACCATG	XhoI	forw
24	TTTCTCGAGTTCAGCGCATCCGGTAGTCGG	XhoI	rev
25	tttGTCGACAACCTTAAGAAGGAGATATACCATG	Sall	forw
26	TTTGTGACTCATCAGAAAACTTCCAGAATACTGC	Sall	rev
27	ATATGGTCTCatggtatgccggtgtgac	BsaI	forw
28	ATATCTCGAGctagctgcacccatg	XhoI	rev
29	TTGGTCTCATGGTTCCTGGTGGAAGGCGTG	BsaI	forw
30	TTGGATCCTCAATCTTCAGGCTTTTCC	BamHI	rev
31	TTGGTCTCATGGTATGAGTGCTGAGGGGTACC	BsaI	forw
32	TTGGATCCTCACCTTCCAATGTACTC	BamHI	rev
33	AAAAGGTCTCATGGTGTCACTTTCTCGTG	BsaI	forw
34	AAAAGGATCCCTATAGGTTCTCTCCAG	BamHI	rev
35	CCATGGCCTTGCGG	RT	rev
36	TTTCCATGGcagcaatacaggcc	NcoI	forw
37	AAACCATGtccaggtgcagctcatg	NcoI	rev
38	AAAAGGATCCCCTCTAGAAATAATTTTGTTTAAC	BamHI	forw
39	AAAAGGATCCCTATAGGTTCTCTCCAG	BamHI	rev
40	ggtgtacttgcagcc	RT	rev
41	TTTTACATGTCACATCATCATCATCATATGCCACCACCATCG	PciI	rev
42	ATATGGATCCTTAGGTGTCTGTCAATCTTG	BamHI	forw
43	ATAGCTAGCGAAACTGAACAGCCAG	NheI	forw
44	ATACTCGAGTTAGAAAACTTCCAGAATACTGC	XhoI	rev

Lebenslauf

Nachname: Moritz
Vorname: Bodo
Anschrift: Nickel-Hoffmann-Straße 12
06110 Halle/Saale
Email: bodo.moritz@biochemtech.uni-halle.de
Telefon: 015203153985
Geburtsdatum: 10.09.1980
Familienstand: ledig
Kinder: Sophia Troschke, geboren am 30.09.2004
Staatsangehörigkeit: deutsch

Jan. 2014 - Jun. 2014 Präparation zweier Manuskripte, sowie Abschließen und Einreichen der
Dissertation: „Argininmethyliertes hnRNP K - Synthese und
kombinatorische Multidomänen-Nukleinsäure-Assoziation“

Okt. 2009 - Dez. 2013 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der MLU Halle-Wittenberg
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, AG Wahle; Projekte:
„Translationale Regulation der *nanos*-mRNA in *Drosophila*“ und
„Degradation von ^{m7}GMP durch eine neue 5'-Nucleotidase“.

Sep. 2008 - Sep. 2009 Fortsetzung des Promotionsstudiums als Stipendiat im GRK 1026
„Conformational transitions in macromolecular interactions“
Thema: Analyse von Protein-Liganden-Interaktionen

Aug. 2005 - Aug. 2008 Promotionsstudium an der MLU Halle-Wittenberg, Abteilung Allg.
Biochemie, AG Ostareck;
Projekt: Protein-Argininmethylierung von hnRNP K, Assoziation von
hnRNP K mit RNA und Proteinen

Jul. 2005 Studienabschluss: Diplom-Biochemiker; Diplomarbeit:
„Deadenylierung der *Hsp70*-mRNA in *Drosophila melanogaster*“ im Labor
von Elmar Wahle

2000-2005 Hochschulstudium Biochemie (Diplom)
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

1999-2000 Wehrdienst
1999 Schulabschluss: Allgemeine Hochschulreife
1992-1999 Gymnasium Bernhard von Cotta, Brand-Erbisdorf (Erzgebirge)

Halle, 2014-07-02

Eigene Publikationen

1. Moritz, B., Lilie, H., Naarmann-de Vries I.S., Urlaub, H., Wahle, E., Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D., (2014) Biophysical and biochemical analysis of hnRNP K: arginine methylation, reversible aggregation and combinatorial binding to nucleic acids. *Biol. Chem. accepted* 20.05.2014
2. Moritz, B. and Wahle, E. (2014) Simple methods for the 3' biotinylation of RNA, *RNA* 20, 421-427
3. Wahle, E., and Moritz, B. (2013) Methylation of the nuclear poly(A)-binding protein by type I protein arginine methyltransferases - how and why, *Biol. Chem.* 394, 1029-1043.
4. Buschmann, J.*, Moritz, B.*, Jeske, M., Lilie, H., Schierhorn, A., and Wahle, E. (2013) Identification of Drosophila and human 7-methyl GMP-specific nucleotidases, *J. Biol. Chem.* 288, 2441-2451. *equal contribution
5. Harnisch, C., Moritz, B., Rammelt, C., Temme C. and Wahle, E., (2012) Activity and Function of Deadenylases. In: *The Enzymes*, Vol. 31; editors: G. F. Chanfreau and F. Tamanoi, Burlington: Academic Press, pp. 181-211. ISBN: 978-0-12-404740-2
6. Gross, H., Hennard, C., Masouris, I., Cassel, C., Barth, S., Stober-Grasser, U., Mamiani, A., Moritz, B., Ostareck, D., Ostareck-Lederer, A., Neuenkirchen, N., Fischer, U., Deng, W., Leonhardt, H., Noessner, E., Kremmer, E., and Grasser, F. A. (2012) Binding of the heterogeneous ribonucleoprotein K (hnRNP K) to the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 (EBNA2) enhances viral LMP2A expression, *PLoS One* 7, e42106.
7. Jeske, M., Moritz, B., Anders, A., and Wahle, E. (2011) Smaug assembles an ATP-dependent stable complex repressing nanos mRNA translation at multiple levels, *EMBO J.* 30, 90-103.
8. Bonisch, C., Temme, C., Moritz, B., and Wahle, E. (2007) Degradation of hsp70 and other mRNAs in Drosophila via the 5'-3' pathway and its regulation by heat shock, *J. Biol. Chem.* 282, 21818-21828.
9. Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., Rucknagel, K. P., Schierhorn, A., Moritz, B., Huttelmaier, S., Flach, N., Handoko, L., and Wahle, E. (2006) Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src, *J. Biol. Chem.* 281, 11115-11125.

Danksagung

Ich danke Prof. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk Ostareck für die Überlassung dieses speziellen Themas und die Möglichkeit, an den Herausforderungen zu wachsen.

Ich danke Prof. Elmar Wahle für die wohlwollende Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, die stete Diskussionsbereitschaft und für den unerschütterlichen Glauben an die Fertigstellung dieser Arbeit. Ihm verdanke ich einen gehörigen Anteil meiner wissenschaftlichen Ausbildung.

PD Dr. Hauke Lilie danke ich für die Durchführung der Ultrazentrifugations-Experimenten sowie für die intellektuelle Auseinandersetzung zur Charakterisierung von assoziativen Gleichgewichten.

Michael Spinka danke ich für die Anfertigung von mathematischen Ableitungen, Hilfestellung zur Verwendung von SigmaPlot sowie die intellektuelle Auseinandersetzung zur kinetischen Charakterisierung von biochemischen Reaktionen.

Dem Labor von Prof. Henning Urlaub danke ich für die Durchführung von MS-Analysen. Dem Labor von Dr. Elisabeth Kremmer danke ich für die Herstellung von monoklonalen Antikörpern. Dr. Angelika Schierhorn danke ich für die MS-Analyse von phosphorylierten Proteinen und Peptiden.

Dem GRK 1026 danke ich für die themenübergreifende Diskussionen und die unkomplizierten Kooperationen bei der Verwendung von Messgeräten.

Ich bedanke mich herzlich bei den Doktoren Mandy Jeske, Christiane Harnisch, Michael Reuter, Katharina Fronz und Knut Kölbel, weil sie immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und mir nach Kräften mit Ratschlägen zur Seite standen.

Ich bedanke mich bei Juliane Buschmann und Michael Götze für die enge und vertrauensvolle Zusammenarbeit sowie dem regen bidirektionalen Austausch von Wissen.

Ich bedanke mich bei den gesamten Arbeitsgruppen Ostareck und Wahle für das freundliche und fruchtbare Arbeitsklima, sowie der produktiven Zusammenarbeit.

Meiner Familie danke ich für die andauernde Unterstützung in guten wie in schwierigen Zeiten.

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle (Saale),