

## **Posttranskriptionelle Genregulation**

**- Die Funktion der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress -**

### **Dissertation**

Zur Erlangung des Akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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

von

Nadine Stöhr

geboren am 19.01.1980 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter:

Prof. Behrens

Prof. E. Wahle

Prof. St Kindler

Halle, Juli 2007

Verteidigungsdatum: 21.02.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000013408**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013408>]

## **M e i n e n E l t e r n ,**

Heike und Uwe

"Wenn jemand sucht, dann geschieht es leicht, dass sein Auge nur noch das Ding sieht, das er sucht, dass er nichts zu finden, nichts in sich einzulassen vermag, weil er nur immer an das Gesuchte denkt, weil er ein Ziel hat, weil er vom Ziel besessen ist. Suchen heißt: ein Ziel haben. Finden aber heißt: frei sein, offen stehen, kein Ziel haben."

Hermann Hesse, *Siddhartha*

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Die VICKZ Protein Familie und deren Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation .....	1
1.1.1	Funktionelle Sequenzmotive und Domänen von ZBP1 .....	2
1.1.2	Das Expressionsmuster von ZBP1 .....	5
1.1.3	Die Funktionen von ZBP1 in der posttranskriptionellen Genregulation.....	6
1.1.3.1	Die lokalisierte Translation der <i>β-Aktin</i> mRNA.....	7
1.1.3.2	Translationelle Repression der <i>IGF-II</i> mRNA.....	9
1.1.3.3	Translationsgekoppelte Regulation der <i>c-myc</i> mRNA-Stabilität.....	10
1.1.3.4	Stabilitätskontrolle von <i>CD44</i> - und <i>βTrCP</i> -mRNA durch ZBP1 .....	12
1.1.4	ZBP1 enthaltende RNP <i>granules</i> .....	13
1.2	Zellulärer Stress – die Entstehung von stress granules .....	14
1.3	Zielstellung der Arbeit .....	20
<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>21</b>
2.1	Material .....	21
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Größenstandards .....	21
2.1.2	Bakterien .....	21
2.1.3	Zelllinien .....	21
2.1.4	Antikörper .....	22
2.1.5	Plasmide .....	23
2.1.6	Oligonukleotide.....	23
2.1.7	Systeme .....	25
2.1.8	Sonstiges.....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden.....	26
2.2.1.1	Molekularbiologische Standardmethoden.....	26
2.2.1.2	Mikrobiologische Standardmethoden .....	26
2.2.1.3	Klonierungen .....	26
2.2.2	Zellkultur.....	28
2.2.2.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	28
2.2.2.2	Transfektion von U2OS Zellen .....	28
2.2.2.3	Stressapplikation .....	29

2.2.3	Biochemische Methoden .....	29
2.2.3.1	RNA-Isolierung .....	29
2.2.3.2	Reverse Transkription .....	30
2.2.3.3	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) .....	31
2.2.3.4	SDS-PAGE und Western Blotting .....	33
2.2.3.5	Ko-Immunopräzipitation von ZBP1-mRNA-Liganden .....	35
2.2.3.6	Mikroarray-Analysen .....	37
2.2.3.7	Stress-Erholungs-Assay .....	38
2.2.3.8	Statistische Auswertungen .....	40
2.2.4	Immunohistologische Methoden .....	41
2.2.4.1	Immunofluoreszenz .....	41
2.2.4.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH) .....	41
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>44</b>
3.1	Funktion der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress .....	44
3.1.1	Lokalisierung der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress.....	44
3.1.1.1	Lokalisierung von endogenen ZBP1 unter verschiedenen Stress-Stimuli .....	45
3.1.1.2	Lokalisierung von exogenem ZBP1 unter zellulärem Stress .....	48
3.1.1.3	Lokalisierung von Imp1-3 unter oxidativem Stress .....	49
3.1.1.4	Lokalisierung anderer RBPs unter oxidativem Stress.....	49
3.1.1.5	Die Überexpression von GFP-ZBP1 induziert keine SG-Bildung.....	51
3.1.1.6	ZBP1 wird nicht <i>processing bodies</i> (PBs) rekrutiert .....	52
3.1.1.7	Die KH-Domänen drei und vier sind für die SG-Rekrutierung von ZBP1 essentiell .. .....	54
3.1.2	Lokalisierung verschiedener mRNAs unter zellulärem Stress.....	57
3.1.2.1	Die Mehrheit zytoplasmatischer mRNAs wird in SGs rekrutiert.....	57
3.1.2.2	Exogene Reporter-mRNAs lokalisieren in SGs unabhängig von <i>cis</i> -agierenden Elementen.....	60
3.1.2.3	ZBP1 assoziiert spezifisch mit dem $\beta$ -Aktin-Zipcode in SGs .....	62
3.1.3	Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress .....	63
3.1.3.1	ZBP1 hat keinen Einfluss auf die SG-Bildung und mRNA-Rekrutierung.....	65
3.1.3.2	Anreicherung verschiedener mRNAs nach Stressinduktion .....	66
3.1.3.3	Die <i>c-myc</i> mRNA wird unter Stress vermindert abgebaut.....	67
3.1.3.4	Der ZBP1 Knockdown destabilisiert die <i>c-myc</i> mRNA unter zellulärem Stress.....	68

3.1.3.5	ZBP1 Knockdown destabilisiert mRNA-Liganden unter zellulärem Stress.....	70
3.1.3.6	Überexpression von GFP-ZBP1 stabilisiert selektiv <i>β-Aktin</i> und <i>IGF-II</i> mRNA....	72
3.1.3.7	ZBP1 Knockdown destabilisiert selektiv den Zipcode-Reporter.....	73
3.1.3.8	ZBP1 Knockdown destabilisiert mRNA-Liganden spezifisch in SGs.....	75
3.1.3.9	<i>β-Aktin</i> mRNA lokalisiert nicht in PBs nach ZBP1 Knockdown .....	77
3.1.3.10	Zipcode-Reporter wird nach ZBP1 Knockdown in SGs <i>und</i> PBs destabilisiert .....	78
3.2	ZBP1 als "gatekeeper" in SGs.....	80
3.2.1	Die "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 in SGs zur Identifizierung neuer mRNA- Liganden.....	81
3.2.1.1	Das SIRL-Verfahren .....	82
3.2.1.2	Die Anwendung des SIRL-Verfahrens zur Identifizierung von ZBP1-Liganden....	84
3.2.1.3	Die SIRL-Daten basierend auf Mikroarray-Analysen.....	85
3.2.2	Charakterisierung der durch SIRL identifizierten mRNAs.....	86
3.2.2.1	ZBP1 Knockdown destabilisiert putative Liganden unter oxidativem Stress.....	86
3.2.2.2	Assoziation von SIRL-Transkripten mit ZBP1 in ungestressten Zellen .....	89
3.2.3	Posttranskriptionelle Regulation ausgewählter SIRL-Transkripte durch ZBP1 unter Normalbedingungen .....	91
3.2.3.1	Einfluss von ZBP1 auf die mRNA-Stabilität putativer mRNA-Liganden.....	92
3.2.3.2	Einfluss von ZBP1 auf die Translation putativer Liganden.....	94
<b>4</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>96</b>
4.1	ZBP1 assoziiert während der zellulären Stressantwort mit RNA-Liganden in SGs	96
4.2	ZBP1 als "gatekeeper" in SGs.....	100
4.3	SIRL – ein neues stressbasierendes Verfahren zur Identifizierung von RNA- Liganden.....	106
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>108</b>
<b>6</b>	<b>Literatur.....</b>	<b>111</b>
<b>7</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>119</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis .....	119
7.2	Transfektionen.....	121
7.3	Daten der Mikroarray-Analyse.....	121

# 1 Einleitung

## 1.1 Die VICKZ Protein Familie und deren Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation

Die Differenzierung einer großen Zahl spezialisierter Gewebe- und Zellarten, so wie deren Fähigkeit auf unterschiedlichste Bedingungen zu reagieren erfordert eine sehr präzise Regulation des zellulären Stoffwechsels. Dazu muss in unterschiedlichen Zelltypen ein jeweils spezifischer Teil der Erbinformation zunächst in mRNA umgeschrieben, prozessiert, ins Zytoplasma exportiert und in Proteine translatiert werden. Verschiedenen Mechanismen, die entweder die Transkription spezifischer Gene regulieren oder durch posttranslationelle Modifikationen die Aktivität und die Lebensdauer der Proteine regulieren, sind seit langem bekannt und gut charakterisiert. Eine weitere Regulation der Genexpression, die ganz wesentlich die Reaktionsfähigkeit einer Zelle auf veränderte Umweltbedingungen beeinflusst, geschieht auf posttranskriptioneller Ebene und wird durch verschiedene RNA-bindende Proteine (RBPs) sowie mikroRNAs vermittelt. RBPs, welche spezifisch mit einer mRNA interagieren, modulieren dadurch die Stabilität, Lokalisierung oder Translation dieser mRNA, ohne dabei deren Transkription zu beeinflussen. In ähnlicher Weise vermittelt auch der miRISC (*mikroRNA-induced silencing complex*) seine Wirkung, welcher neben der mikroRNA auch Argonaute Proteine enthält und je nach Zusammensetzung entweder die Translation einer mRNA inhibiert oder aber deren Degradation bewirkt (reviewed (Pillai et al., 2007)). Im Gegensatz zur mRNA-Prozessierung, welche das *capping*, *splicing* sowie die Polyadenylierung einer mRNA umfasst und im Zellkern abläuft, findet die Regulation auf posttranskriptioneller Ebene im Wesentlichen zytoplasmatisch statt. Durch posttranskriptionelle Genregulation werden wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung, Zellmotilität und -migration sowie die Adaptierung auf verschiedene Umweltbedingungen entscheidend beeinflusst.

Die VICKZ Proteinfamilie, deren Name sich von den Anfangsbuchstaben ihrer Mitglieder ableitet, ist eine Familie von RBPs, welche eine Vielzahl von Funktionen während der posttranskriptionellen Regulation verschiedener mRNAs erfüllt. Sie besteht aus Vg1-RBP/Vera (*Vg1 mRNA Binding Protein*) aus *Xenopus* und *Drosophila*, den humanen Proteinen Imp1-3 (*IGF-II mRNA binding protein 1-3*) und KOC (*KH-domain-containing protein overexpressed in cancer*), dem murinen CRD-BP (*Coding Region instability*

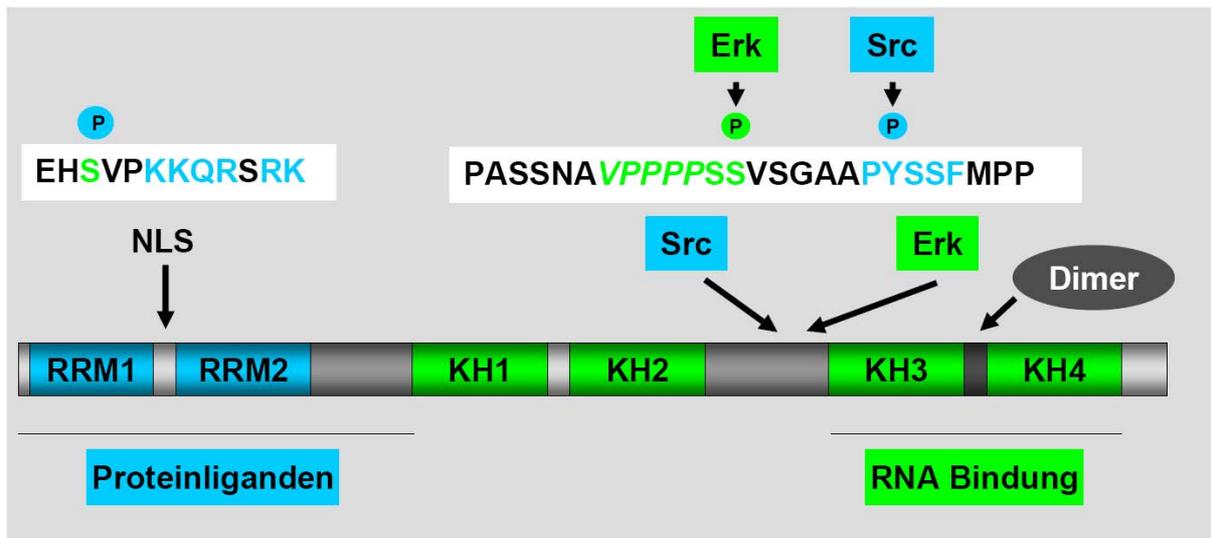
*Determinant Binding Protein*) sowie ZBP1 (*Zipcode Binding Protein 1*) aus Huhn (Doyle et al., 1998; Havin et al., 1998; Mueller-Pillasch et al., 1999; Nielsen et al., 1999; Ross et al., 1997). Im Folgenden werden die Proteine die orthologen Proteine ZBP1, Imp1 und CRD-BP unter dem Begriff ZBP1 zusammengefasst.

Die Mitglieder dieser Proteinfamilie regulieren die Stabilität, Lokalisation und Translation ihrer mRNA-Liganden. So vermittelt z.B. Vg1BP/Vera die Lokalisierung der *Vg1* mRNA zum vegetativen Pol in *Xenopus* Oozyten (Deshler et al., 1998; Havin et al., 1998). Das *Drosophila*-Homologe ist an der Lokalisierung der *oskar*-mRNA in während der Embryogenese beteiligt (Deshler et al., 1998; Havin et al., 1998; Munro et al., 2006). ZBP1 wurde als Translationsrepressor der  $\beta$ -Aktin mRNA identifiziert (Ross et al., 1997). Das Protein reguliert die lokalisierte Translation dieser mRNA und moduliert dadurch die Ausbildung von Neuriten während der Differenzierung primärer Neuronen (Farina et al., 2003; Huttelmaier et al., 2005). In humanen Zellen wurde nachgewiesen, dass ZBP1 die Translation der *IGF-II* mRNA kontrolliert (Liao et al., 2004; Nielsen et al., 1999). Darüber hinaus hat das Protein Funktionen bei der mRNA-Stabilisierung. Nachgewiesen wurde dies für c-Myc, CD44 sowie  $\beta$ TrCP (Doyle et al., 1998; Kobel et al., 2007; Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006).

VICKZ Proteine weisen ein onkofötales Expressionsmuster auf, d.h. sie werden während der Embryogenese exprimiert, bei der sie die zuvor beschriebenen Funktionen erfüllen. Im adulten Organismus kaum vorhanden, werden die Proteine dieser Familie in malignen Tumoren *de novo* exprimiert und scheinen von fundamentaler Bedeutung für die Tumorprogression zu sein (Kobel et al., 2007; Yaniv and Yisraeli, 2002).

### 1.1.1 Funktionelle Sequenzmotive und Domänen von ZBP1

Wie alle VICKZ Proteine enthält ZBP1 zwei verschiedene Arten von RNA-bindenden Motiven, welche für die Assoziation der Proteine mit ihren mRNA-Liganden notwendig sind. Zum einen befinden sich am N-Terminus zwei *RNA Recognition Motifs* (RRMs), zum anderen sind im C-terminalen Bereich vier *hnRNP K Homology* Domänen (KHs) lokalisiert.



**Abb. 1.1: Sequenzmotive des ZBP1 Proteins.** Die beiden RRM (RNA Recognition Motifs) am N-Terminus interagieren auch mit Proteinliganden und enthalten ein putatives NLS (nuclear localization signal). Die C-terminal gelegenen KH-Domänen (*hnRNP K Homology*) liegen als Di-Domänen vor. Besonders die 2. Di-Domäne (KH3-4) weist eine hohe RNA-Bindungsaffinität auf. Die Linkerregion zwischen KH2 und 3 enthält zwei Phosphorylierungsstellen. Während die Tyrosin-Phosphorylierung durch Src-Kinasen die RNA-Bindungsaffinität des Proteins reduziert, verhindert die Serin-Phosphorylierung durch ERK die Assoziation des Proteins mit Src-Kinasen (Farina et al., 2003; Huttelmaier et al., 2005)(ERK; Huttelmaier et al., noch nicht publiziert). Über die Linkerregion zwischen KH3 und 4 bildet ZBP1 Homo- oder Heterodimere mit anderen Mitgliedern der ZBP Familie.

Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der Sequenzmotive von ZBP1. Im N-terminalen Bereich des Proteins befinden sich zwei RRM, welche jedoch nur eine geringe RNA-Affinität besitzen, weshalb diesen Motiven eine putative Interaktion mit Proteinliganden zugeschrieben wird (Farina et al., 2003). Die Linkerregion zwischen RRM1 und RRM2 enthält vermutlich ein *nuclear localization signal* (NLS), welches für den Import des Proteins in den Zellkern verantwortlich sein könnte, sowie eine putative Serin-Phosphorylierungsstelle. ZBP1, das vorwiegend zytoplasmatisch vorliegt, wird jedoch auch im Zellkern nachgewiesen. Hier ist es in einzelnen *spots* zu finden, welche möglicherweise Transkriptionsstellen markieren (Oleynikov and Singer, 2003). Das deutet darauf hin, dass ZBP1 seine RNA-Liganden bereits im Zellkern bindet und RNA-abhängig ins Zytoplasma exportiert wird.

Der C-terminale Bereich von ZBP1 enthält vier KH-Domänen, die als Di-Domänen, bestehend aus je zwei benachbarten KH-Domänen, vorliegen. Die zweite Di-Domäne weist eine ähnlich hohe Bindungsaffinität zu RNA auf wie das Wildtyp-Protein und ist für die Interaktion von ZBP1 mit mRNA-Liganden essentiell (Farina et al., 2003). Die Affinität der RNA-Bindung wird durch zwei Phosphorylierungsstellen, welche sich in der Linkerregion zwischen KH2 und KH3 befinden, reguliert. Zum einen handelt es sich hierbei um das Tyrosin 396, welches ein Substrat von Kinasen der Src-Familie darstellt. Die Tyrosin-

Phosphorylierung von ZBP1 reduziert dessen Affinität, RNA zu binden, und bewirkt dadurch die Freisetzung der RNA vom Protein (Huttelmaier et al., 2005). Dem gegenüber steht die Phosphorylierung des Serin 388 durch ERK-Kinasen, welche die Tyrosin-Phosphorylierung inhibiert, indem es die Assoziation der Src-Kinasen mit ZBP1 verhindert. Dabei bildet die Src-Phosphorylierungsstelle die Assoziationsstelle für die ERK-Kinase und umgekehrt (siehe Abb. 1.1). Durch den Phosphorylierungsstatus des Proteins werden die verschiedenen Funktionen von ZBP1 moduliert, die Phosphatase PP2B reguliert hierbei vermutlich die Dephosphorylierung des Proteins (Lederer et al., in Vorbereitung).

ZBP1 bildet zudem über ein Sequenzmotiv, welches sich zwischen KH3 und KH4 befindet, Homo- und Heterodimere mit anderen Mitgliedern der Proteinfamilie (siehe Abb. 1.1). Nielson und Kollegen postulieren für die Dimerisierung einen kooperativen sequenziellen Mechanismus, welcher die RNA involviert. Zunächst assoziiert ein ZBP1-Molekül mit dem Bindungsmotiv der RNA und bildet ein instabiles Intermediat. Im 2. Schritt bindet ein weiteres ZBP1-Molekül an dieselbe mRNA und stabilisiert den entstandenen RNP-Komplex durch Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Dimerisierungsmotiven (Nielsen et al., 2004). Hierbei ist zu vermuten, dass besonders durch Heterodimerisierung unterschiedlicher Mitglieder der Proteinfamilie eine diversifizierte Substratspezifität und gegebenenfalls erhöhte Komplexität der Regulationsmechanismen erreicht werden kann.

Wie bereits erwähnt assoziiert ZBP1 über seine KH-Domänen (besonders KH3 und 4) mit *cis*-Elementen seiner mRNA-Liganden. *Cis*-Elemente sind spezifische Sequenzmotive, welche bevorzugt in den untranslatierten Bereichen (5'UTR und 3'UTR) aber auch in der kodierenden Region einer mRNA vorkommen und für deren Interaktion mit *trans*-agierenden RNA-bindenden Proteinen (RBPs) verantwortlich sind. Diese Sequenzmotive bilden sehr wahrscheinlich Sekundärstrukturen aus, welche durch RBPs spezifisch erkannt werden können. Bislang wurde jedoch keine *Consensus*-Sequenz in ZBP1-Liganden identifiziert, stattdessen wurden verschiedene *cis*-Elemente in den einzelnen ZBP1-Liganden identifiziert.

Ein solches *cis*-Element ist der Zipcode des  $\beta$ -Aktin 3'UTRs, durch welchen ZBP1 (*Zipcode Binding Protein*) seinen Namen erhielt (Regulationsmechanismus siehe 1.1.3.1). Der Zipcode, welcher vermutlich eine *stem-loop* Struktur ausweist, enthält ein essentielles Sequenzmotiv (5'-ACACCC-3') (Kislauskis et al., 1993; Ross et al., 1997). Ein beinahe identisches Motiv (5'-RCACCC-3', wobei R eine Pyrimidinbase bezeichnet) wurde mittels SELEX Analyse als ZBP1 Bindungsmotiv identifiziert (Farina et al., 2003). Innerhalb der ersten 233 Nukleotide des  $\beta$ -Aktin-3'UTR befinden sich zwei putative Zipcode-Elemente

(Huttelmaier et al., noch nicht publiziert). Dieser Bereich ist für die posttranskriptionelle Regulation der  $\beta$ -Aktin mRNA durch ZBP1 notwendig und hinreichend.

Ein weiteres bekanntes *cis*-Element, mit dem ZBP1 interagiert, ist die 249 Nukleotid große CRD (*Coding Region instability Determinant*) in der kodierenden Region der *c-myc* mRNA (Lemm and Ross, 2002). Dieses *cis*-Element vermittelt die translationsgekoppelte Stabilitätskontrolle der RNA, welche durch ZBP1 reguliert wird (Regulationsmechanismus siehe 1.1.3.2). Die ZBP1 Bindungsstelle in der CRD befindet sich *downstream* einiger seltener Codons und überlappt mit einer endonukleolytischen Schnittstelle.

### 1.1.2 Das Expressionsmuster von ZBP1

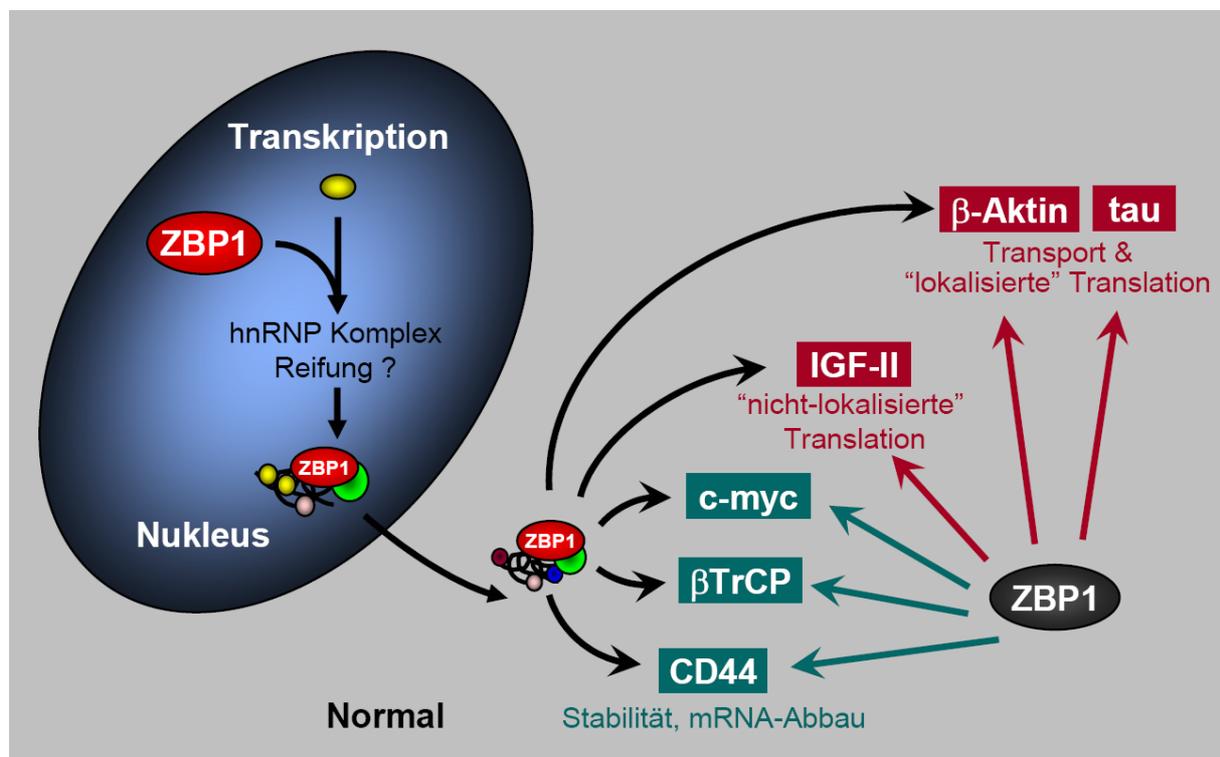
Das onkofötale RNA-bindende Protein ZBP1 wird hauptsächlich während der Embryonalentwicklung exprimiert. In Expressionsanalysen wurde die höchste ZBP1-Menge am Tag E12.5 der Mausembryogenese detektiert (Runge et al., 2000). Darauf folgte eine stetige Abnahme der ZBP1 RNA-Menge bis hin zur Geburt, in neonatalen Mäusen konnte keine Expression von ZBP1 nachgewiesen werden (Runge et al., 2000). Im adulten Gewebe ist ZBP1 mit Ausnahme von geringen Mengen in Darm und Testis ebenfalls nicht exprimiert (Hansen et al., 2004; Ioannidis et al., 2001; Leeds et al., 1997; Ross et al., 2001). Eine *de novo* Expression oder Überexpression von ZBP1 wurde allerdings in verschiedenen humanen Neoplasien und Tumorarten beobachtet (Gu et al., 2004; Ioannidis et al., 2004; Ioannidis et al., 2003; Ioannidis et al., 2001; Kobel et al., 2007; Ross et al., 1997; Ross et al., 2001). Darüber hinaus wurden erhöhte Spiegel von Autoimmunantikörpern gegen ZBP1 in Seren von Krebspatienten nachgewiesen (Zhang and Chan, 2002; Zhang et al., 2007). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass ZBP1 jüngst als *target* des  $\beta$ -Catenin Signaltransduktionsweges identifiziert wurde, welcher die Transkription von ZBP1 aktiviert (Noubissi et al., 2006).

Mausmodelle zeigen, dass eine ZBP1-Defizienz während der Embryogenese zu Zwergenwuchs, unvollständiger Darmentwicklung und erhöhter perinataler Mortalität führt (Hansen et al., 2004). Dem gegenüber führte die gezielte Überexpression von ZBP1 im Brustgewebe weiblicher Mäuse zur Entwicklung von Brustkrebs (Tessier et al., 2004).

### 1.1.3 Die Funktionen von ZBP1 in der posttranskriptionellen Genregulation

ZBP Proteine weisen eine charakteristische Lokalisierung in zytoplasmatischen RNPs (Ribonukleokomplexe) auf, welche z.T. als mRNA-Transport *granules* entlang des Zytoskeletts transportiert werden (Farina et al., 2003; Jonson et al., 2007)(siehe Abb. 1.3). Aufgrund der Lokalisierung des Proteins an putativen Transkriptionsstellen im Zellkern (Huttelmaier et al., 2005; Oleynikov and Singer, 2003), wird vermutet, dass ZBP1 seine mRNA-Liganden bereits in Nukleus bindet, mit diesen zusammen ins Zytoplasma exportiert wird und dort deren weiteres Schicksal bestimmt (siehe Abb. 1.2).

Abhängig von der RNA, an welche es über ein spezifisches *cis*-Element, wie z.T. den Zipcode der  $\beta$ -Aktin mRNA, bindet, kontrolliert das Protein entweder die Stabilität, Lokalisierung oder Translation seiner *target*-Transkripte (*reviewed* (Yisraeli, 2005)) (siehe Abb. 1.2). Dadurch moduliert ZBP1 verschiedene Prozesse während der Embryo- und Karzinogenese wie z.B. Zellpolarität, Migration und Proliferation.



**Abb. 1.2: Posttranskriptionelle Regulation verschiedener mRNAs durch ZBP1.** ZBP1 bindet seine mRNA-Liganden vermutlich bereits im Nukleus, wird zusammen mit diesen ins Zytoplasma exportiert, wo es deren weiteres Schicksal bestimmt. ZBP1 ist für den Transport und die lokalisierte Translation der  $\beta$ -Aktin und vermutlich der tau mRNA verantwortlich. Es reprimiert darüber hinaus die Translation der IGF-II mRNA und stabilisiert c-myc, CD44 und  $\beta$ TrCP mRNAs.

In primären Neuronen reguliert ZBP1 den Transport sowie die lokalisierte Translation der  $\beta$ -Aktin mRNA in Wachstumskronen unter der Kontrolle von Kinasen der Src-Familie (Huttelmaier et al., 2005). Dieser Mechanismus ist u.a. in primären Neuronen für die Ausbildung von Neuriten verantwortlich (siehe auch 1.1.3.1.).

Im Komplex mit dem ELAV-Protein HuD assoziiert ZBP1 vermutlich mit der neuronalen *tau* mRNA, welche für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein kodiert und asymmetrisch in den Axonen primärer Neuronen lokalisiert wird (Atlas et al., 2004). Auch für diese mRNA wird der Mechanismus der lokalisierten Translation postuliert, bei dem ZBP1 als translationeller Repressor fungieren könnte. Translationskontrolle durch ZBP1 wurde auch für die *IGF-II* mRNA beschrieben (Nielsen et al., 1999; Liao et al., 2004), wobei in diesem Fall neben einer Regulation über den 3'UTR auch eine über den 5'UTR-vermittelte Repression der Translation postuliert wird (siehe 1.1.3.2).

Neben Lokalisierung und Translation reguliert ZBP1 auch die Stabilität verschiedener mRNAs. Leeds et al., 1997 beschreiben erstmals die Stabilisierung der *c-myc* mRNA durch ZBP1 (Leeds et al., 1997). Hierbei handelt es sich um einen translationsgekoppelten Mechanismus, bei dem ZBP1 durch Bindung an die so genannte CRD (*Coding Region instability Determinant*) die endonukleolytische Spaltung derselbigen verhindert. Für die Regulation der  $\beta$ TrCP mRNA-Stabilität wird ebenfalls ein Mechanismus postuliert, welcher die kodierende Region der mRNA involviert, wohingegen *CD44* mRNA-Stabilität durch ZBP1 vermutlich über deren 3'UTR reguliert wird (Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006).

### 1.1.3.1 Die lokalisierte Translation der $\beta$ -Aktin mRNA

Besonders während der Embryonalentwicklung ist es für verschiedene Prozesse notwendig, dass mRNAs asymmetrisch sortiert und lokalisiert translatiert werden. Lokalisierte Translation ist aus zweierlei Hinsicht von Bedeutung: zum einen stellt sie einen Energiegewinn für eine Zelle dar, da es energetisch günstiger ist wenige RNA-Moleküle an die Peripherie zu transportieren, um dort größere Proteinmengen zu synthetisieren, als große Proteinmengen zu transportieren. Zum anderen bietet das lokale Vorhandensein einer RNA den Vorteil, das entsprechende Protein lokal zu dem Zeitpunkt zu synthetisieren, an dem es benötigt wird, um so ektopische Fehlfunktionen zu verhindern. Der Mechanismus der

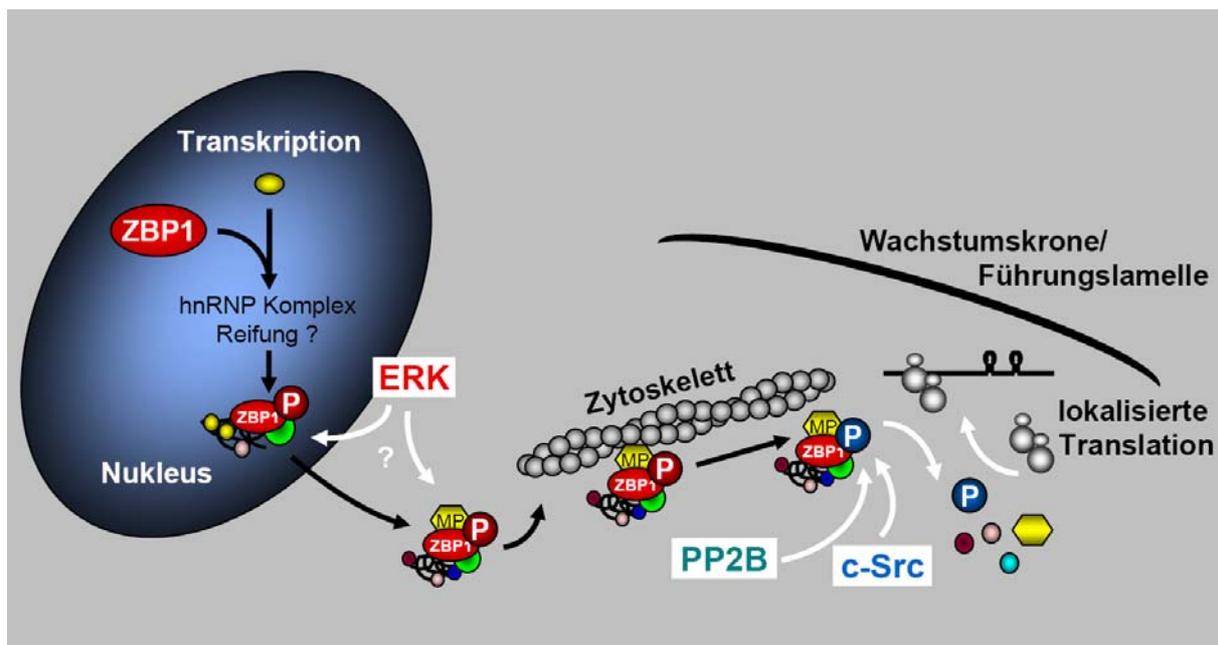
lokalisierten Translation wurde für verschiedene mRNAs in unterschiedlichen Organismen beobachtet. So werden z.B. *oskar* oder *nanos* mRNAs während der *Drosophila* Embryogenese asymmetrisch sortiert und anschließend lokal translatiert (*reviewed* (Wilhelm and Smibert, 2005)). Auch für die Vg1 mRNA aus *Xenopus* wurde eine durch Vg1BP/Vera regulierte lokalisierte Translation postuliert (Zhang et al., 1999).

Diese Arbeiten postulieren, dass in primären Fibroblasten die Zellmotilität und Ausbildung einer intrinsischen Polarität durch die Lokalisierung der  $\beta$ -Aktin mRNA an die Führungslamelle und deren lokale Translation gewährleistet wird (Farina et al., 2003; Kislauskis et al., 1994). Die lokalisierte Translation führt zu einer erhöhten Konzentration von monomerem Aktin, welches zu F-Aktin polymerisiert und dadurch eine gerichtete Bewegung der Zelle fördert (Condeelis and Singer, 2005). Auch in Neuronen spielt die lokalisierte  $\beta$ -Aktin Translation eine wichtige Rolle (Huttelmaier et al., 2005). Hier führt die lokale Erhöhung des monomeren Aktin-Spiegels zu vermehrter F-Aktin-Polymerisation, sorgt dadurch für das gerichtete Auswachsen von Dendriten und Axonen, wodurch letztlich die Ausbildung synaptischer Vernetzungen im Gehirn gewährleistet wird.

Um eine RNA an die Zellperipherie transportieren zu können, ist es notwendig, diese translationell zu reprimieren. Dies wird durch die Integration der RNA in einen RNP-Komplex gewährleistet, welcher verhindert, dass die RNA mit Ribosomen assoziiert (Dahm and Kiebler, 2005). Einen solchen Translationsrepressor stellt ZBP1 für die  $\beta$ -Aktin mRNA dar. Das Protein bindet an den so genannten Zipcode, einem RNA-Sequenzmotiv innerhalb der ersten 54 Nukleotide des  $\beta$ -Aktin 3'UTRs (Farina et al., 2003; Ross et al., 1997). Der  $\beta$ -Aktin 3'UTR enthält innerhalb der ersten 233 Nukleotide zwei dieser ZBP1 Bindungsstellen. Gebunden an die  $\beta$ -Aktin mRNA reprimiert ZBP1 während des Transports deren Translation. Am Zielort angekommen, wird die RNA vom Protein freigesetzt und kann lokal translatiert werden. Der Mechanismus der RNA-Bindung und -Freisetzung wird über den Phosphorylierungsstatus von ZBP1 reguliert (siehe 1.1.1).

Wie bereits unter 1.1.1 erwähnt, besitzt ZBP1 in der Linkerregion zwischen KH2 und KH3 zwei Phosphorylierungsstellen (Abb. 1.1). Gebunden an die  $\beta$ -Aktin mRNA wird ZBP1 auf seinem Weg vom Nukleus ins Zytoplasma am Serin 388 durch die Serin/Threonin-Kinase ERK1/2 phosphoryliert. Die Serin-Phosphorylierung verhindert die Assoziation des Proteins mit Src-Kinasen und damit dessen Tyrosin-Phosphorylierung (Huttelmaier et al., 2005). Dadurch wird gewährleistet, dass die  $\beta$ -Aktin mRNA während ihres Transports an die Zellperipherie von ZBP1 gebunden bleibt und nicht frühzeitig freigesetzt wird.

Der translationell reprimierte RNP-Komplex wird entlang des Zytoskeletts zur Zellperipherie transportiert (Abb. 1.3). Dort angekommen wird das Serin 388 wahrscheinlich durch die Phosphatase PP2B dephosphoryliert (Lederer et al., in Vorbereitung). Dadurch wird die Assoziation der Src-Kinase begünstigt, welche ZBP1 nun am Tyrosin 396 phosphorylieren kann, was wiederum die Freisetzung der  $\beta$ -Aktin mRNA zur Folge hat (Huttelmaier et al., 2005). Nach Freisetzung der  $\beta$ -Aktin mRNA von ZBP1 kann sich der Translationsinitiationskomplex ausbilden. Die lokalisierte Translation findet statt.



**Abb. 1.3: Die Lokalisierte Translation der  $\beta$ -Aktin mRNA.** Nach der Translation bindet ZBP1 an die  $\beta$ -Aktin mRNA und wird ins Zytoplasma exportiert. Die Bindung von ZBP1 an die  $\beta$ -Aktin mRNA verhindert die Ausbildung eines Translationsinitiationskomplexes. Translationell reprimiert wird der RNP-Komplex entlang des Zytoskeletts zur Zellperipherie transportiert. Während des Transports ist ZBP1 am Serin 388 phosphoryliert. Dadurch wird die Assoziation der Src-Kinase inhibiert, was eine frühzeitige Freisetzung der RNA verhindert. An der Zellperipherie wird das Serin 388 vermutlich durch PP2B dephosphoryliert, wodurch Src-Kinasen mit ZBP1 assoziieren und Letzteres am Tyrosin 396 phosphorylieren können. Durch diese Phosphorylierung wird die  $\beta$ -Aktin mRNA von ZBP1 freigesetzt und kann lokal translatiert werden.

### 1.1.3.2 Translationelle Repression der *IGF-II* mRNA

IGF-II (*Insulin-like Growth Factor II*) ist ein sezernierter onkofötaler Wachstumsfaktor mit auto- und parakriner Wirkung, dessen Überexpression zu überproportionalen Wucherungen und Missbildungen im Embryo führen (*Beckwith-Wiedemann-Syndrom*, (Weksberg et al., 1993). Die IGF-II Expression wird wesentlich durch paternales *Imprinting* reguliert (DeChiara et al., 1991). Darüber hinaus findet eine zusätzliche

Regulation auf posttranskriptioneller Ebene statt. Es existieren vier Isoformen der mRNA, welche alle eine identische kodierende Region und 3'UTR besitzen, sich jedoch im 5'UTR stark unterscheiden und differentiell exprimiert werden (Nielsen et al., 1995). Die *leader4*-mRNA, welche einen nur 100 Nukleotide großen 5'UTR enthält, wird konstitutiv exprimiert. Die *leader3*-mRNA, deren ca. 1,2 kb großer 5'UTR sehr cytosinreich ist und einen hohen Grad an Sekundärstrukturen aufweist, wird translationell reprimiert in 100S Partikeln gespeichert und kann in proliferierenden Zellen vermehrt translatiert werden. Mittels *UV-crosslinking* wurde ZBP1 als Bindungspartner des *leader3* identifiziert (Nielsen et al., 1999). Anhand eines Luziferase-Reportersystems demonstrierten Nielsen und Kollegen eine *leader3* abhängige Reprimierung der Translation der *IGF-II* mRNA, die vermutlich durch ZBP1 vermittelt wurde (Nielsen et al., 1999). Interessanterweise zeigen die *leader3*-mRNA und ZBP1 sowohl während der Embryogenese als auch in adulten Geweben ein nahezu identisches Expressionsmuster (Runge et al., 2000). Der Knockdown von ZBP1 erhöht die IGF-II Translation. Die damit verbundene vermehrte Sekretion von IGF-II steigert die Proliferation von K562 Zellen (Liao et al., 2004). Neben dem *leader3* wurden auch im *IGF-II* 3'UTR ZBP1-Bindungsstellen identifiziert (Nielsen et al., 2004). Jedoch wurde hierfür bis *dato* kein Regulationsmechanismus beschrieben.

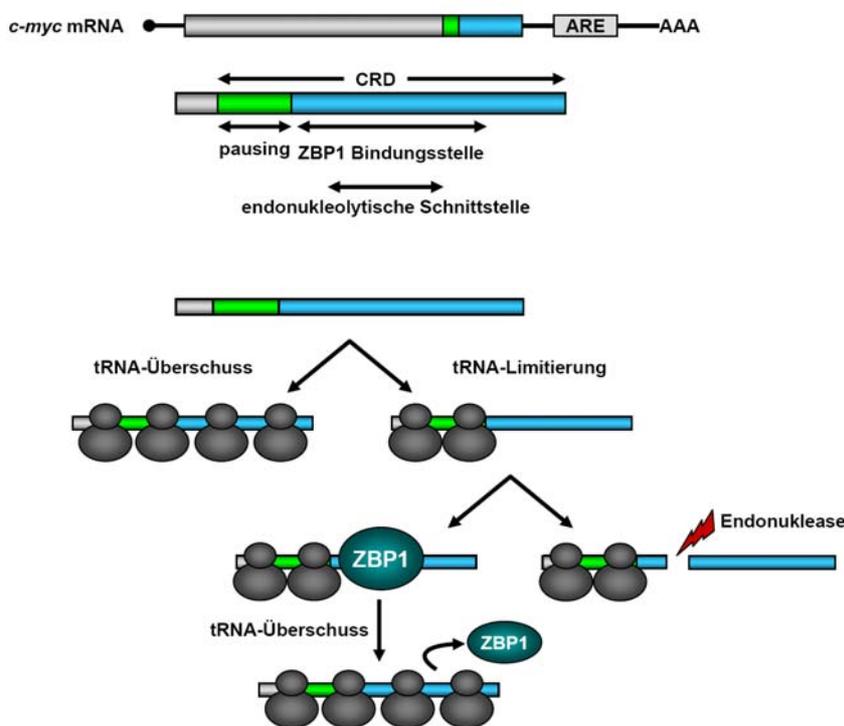
Die H19 RNA, welche mit dem *Imprinting* des IGF-II Genlokus im Mausmodell in Verbindung gebracht wird, assoziiert ebenfalls mit ZBP1 (Zemel et al., 1992). Die Funktionen der untranslatierten H19 RNA, welche keinen bekannten ORF (*open reading frame*) enthält, sind weitestgehend unbekannt. Jedoch wird auch für die H19 RNA eine Funktion bei der negativen Regulation der IGF-II Expression postuliert (Li et al., 1998). Auch der Verlust der H19 RNA führt zu erhöhtem Wachstum während der Embryogenese (Leighton et al., 1995). Es wird vermutet, dass ZBP1 den 3' Terminus der H19 RNA bindet und deren zytoplasmatische Lokalisierung reguliert (Runge et al., 2000).

### 1.1.3.3 Translationsgekoppelte Regulation der *c-myc* mRNA-Stabilität

Die mRNA-Stabilität des Protoonkogens c-Myc wird durch verschiedene RBPs reguliert. Die mRNA enthält zwei destabilisierende Elemente, über die unterschiedliche Regulationsmechanismen vermittelt werden. Neben einem ARE (*AU-rich element*), welches im 3'UTR der mRNA lokalisiert ist und u.a. durch das ELAV-Protein HuR reguliert wird, befindet sich in der kodierenden Region der mRNA auch eine CRD (*Coding Region*

*instability Determinant*), durch welche die mRNA in einem translationsgekoppelten Mechanismus destabilisiert wird (Abb. 1.4). Die CRD vermittelte Destabilisierung der *c-myc* mRNA wird durch Bindung von ZBP1 verhindert und ist aufgrund des Expressionsmusters von ZBP1 besonders während der Embryonalentwicklung und Karzinogenese von Bedeutung (Ioannidis et al., 2001; Leeds et al., 1997).

Die CRD vermittelte Stabilisierung der *c-myc* mRNA durch ZBP1 ist an aktive Translation der mRNA gekoppelt. Der 5' Bereich der 249 Nukleotide großen CRD enthält einige seltene Codons (*rare codon region*), wodurch die Elongationsgeschwindigkeit in diesem Bereich verringert wird (*ribosomal pausing* (Lemm and Ross, 2002)). An die Region seltener Codons schließt eine endonukleolytische Schnittstelle an. Wird die Elongation durch das Fehlen einer bestimmten tRNA inhibiert, ist die endonukleolytische Schnittstelle ungeschützt. Die RNA ist dem Abbau durch Endonukleasen ausgesetzt. Ist jedoch ausreichend ZBP1 in der Zelle vorhanden, bindet dieses an die CRD und verhindert dadurch den endonukleolytischen Abbau der mRNA (Sparanese and Lee, 2007). Die Bindung von ZBP1 an die *c-myc* mRNA inhibiert jedoch nicht die Translation. Im weiteren Verlauf der Elongation wird ZBP1 durch Ribosomen von der mRNA verdrängt (Lemm and Ross, 2002).



**Abb. 1.4: Mechanismus der translationsgekoppelten Stabilitätskontrolle der *c-myc* mRNA durch ZBP1.** Die CRD (*Coding Region instability Determinant*) der *c-myc* mRNA besteht aus einem Bereich seltener Codons (grün). Daran schließt sich die ZBP1 Bindungsstelle, welche mit einer endonukleolytischen Schnittstelle überlappt, an (blau). Die Limitierung bestimmter tRNAs verringert die Elongationsgeschwindigkeit der Translation. Dadurch ein Teil der RNA vor Endonukleaseangriffen ungeschützt. Ist ausreichend ZBP1 vorhanden, bindet dieses die *c-myc* RNA und verhindert dadurch deren Abbau. Im Verlauf der Elongation wird ZBP1 von den Ribosomen verdrängt. (Lemm and Ross, 2002)

### 1.1.3.4 Stabilitätskontrolle von *CD44*- und *βTrCP*-mRNA durch ZBP1

ZBP1 reguliert neben *c-myc* auch die Stabilität zweier weiterer mRNAs – *CD44* und *βTrCP* (Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006). Ähnlich wie für die *c-myc* mRNA ist auch für *βTrCP* ein Mechanismus beschrieben, welcher einen Teil der kodierenden Region der mRNA involviert. Noubissi und Kollegen postulieren, dass infolge der Aktivierung des  $\beta$ -Catenin/TCF Signaltransduktionsweges die *βTrCP* mRNA stabilisiert wird (Noubissi et al., 2006). Überraschenderweise aktiviert der  $\beta$ -Catenin/TCF Signaltransduktionsweg jedoch nicht die Transkription von  $\beta$ TrCP. Stattdessen wird das RNA-bindende Protein ZBP1 verstärkt transkribiert, welches direkt mit der kodierenden Region der *βTrCP* mRNA assoziiert, was wiederum die Stabilisierung letzterer zur Folge hat. Eine erhöhte endogene  $\beta$ TrCP Proteinmenge führt ihrerseits zu einer Aktivierung der SCF <sup>$\beta$ TrCP1</sup> E3 Ligase, wodurch  $\beta$ TrCP-Substrate wie  $\beta$ -Catenin oder I $\kappa$ B $\alpha$  vermehrt degradiert werden. ZBP1 wird in diesem Zusammenhang als direktes Zielgen des  $\beta$ -Catenin/TCF Signaltransduktionsweg beschrieben, welches in einem negativen *feed back* Mechanismus  $\beta$ -Catenin/TCF *signaling* induziert (Noubissi et al., 2006).

Die Stabilität der *CD44* mRNA hingegen wird über deren 3'UTR und dessen Assoziation mit ZBP1 reguliert. Vikesaa und Kollegen identifizierten mittels *mobility-shift assays* und *UV crosslinking* im 3'UTR der *CD44* mRNA fünf putative ZBP1 Bindungsregionen (Vikesaa et al., 2006). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die *CD44* mRNA mit ZBP1 in RNP *granules* kolokalisierte. Der Knockdown von ZBP1 und Imp3 reduzierte zudem die Halbwertszeit der *CD44* mRNA und führte ähnlich wie der *CD44* Knockdown selbst zu reduzierter Zelladhäsion und dem Verlust von Invadopodien (Vikesaa et al., 2006).

#### 1.1.4 ZBP1 enthaltende RNP *granules*

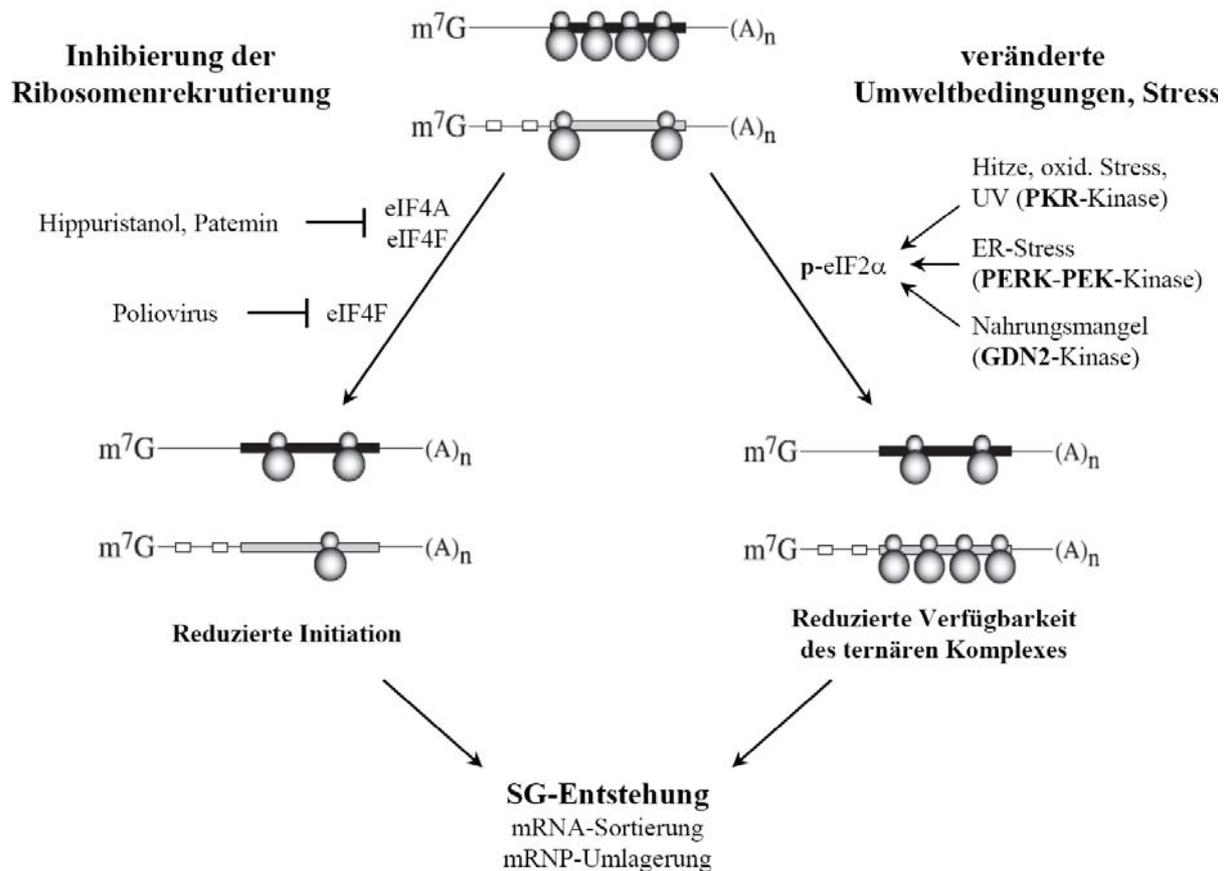
Zytoplasmatische RNPs (Ribonukleoprotein *granules*) kommen in verschiedenen Zellen vor, z.B. in Keimzellen (*germinal granules*), somatischen Zellen (*stress granules* und *processing bodies*) oder Neuronen (*neuronal granules* wie Staufen- oder FMRP-*granules*). Sie alle spielen eine Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation, allerdings variiert die Zusammensetzung dieser Partikel z.T. sehr stark. Sie können u.a. ribosomale Untereinheiten, Translationsinitiationsfaktoren, Enzyme, die am RNA-Abbau beteiligt sind, Helikasen, Gerüstproteine (*scaffolding factors*), Motorproteine und RNA-bindende Proteine enthalten und die Lokalisierung, Translation oder Stabilität der assoziierten Transkripte (*cargo*-RNAs) bestimmen (*reviewed* (Anderson and Kedersha, 2006)). Die Funktion dieser zytoplasmatischen RNP *granules* ist dennoch weitgehend unerforscht. Auch ist unbekannt, wie viele verschiedene RNP *granules* existieren, wie groß ihre Heterogenität ist, wie sie assembliert oder dissoziiert werden und welche Komponenten sie enthalten. Gleichwohl gibt es Hinweise, dass lokale Signalereignisse eine Rolle bei der RNA-Freisetzung spielen (Huttelmaier et al., 2005) uns anzunehmen, dass RNAs während ihres Transportes in solchen Partikeln translationell reprimiert werden können.

Kürzlich wurden von Jonson und Kollegen ZBP1 enthaltende RNP *granules* identifiziert, welche anscheinend eine eigene Spezies von *granules* darstellen, die sich von *stress granules*, *processing bodies* oder neuronalen Staufen- und FMRP-*granules* unterscheiden soll (Jonson et al., 2007). Für die identifizierten Partikel wurde ein Durchmesser von 100-300 nm bestimmt und eine sphärische Form postuliert. Neben ZBP1 enthielten diese *granules* auch 40S ribosomale Untereinheiten, verschiedene *heterologous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP D, hnRNP L, hnRNP Q, hnRNP R und hnRNP U), *poly(A)-binding proteins* (PABP1, PABP2, PABP4), den Transkriptionsfaktor YB1, RNA Helikase A sowie Proteine des NFAK-Komplexes. Darüber hinaus wurden auch das nukleäre *cap-binding protein* CBP80 und Komponenten des *exon junction complex* (EJC) identifiziert, was darauf hindeutet, dass zumindest ein Teil der in den *granules* enthaltene RNA unmittelbar nach Prozessierung in diese Strukturen rekrutiert wurde und noch nicht die erste Runde der Translation durchlaufen haben konnte (Jonson et al., 2007). Darauf deutet auch die Abwesenheit der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF4G, and eIF2 $\alpha$  hin. Noch ungeklärt ist die Frage, in wieweit ZBP1 *granules* heterogen in ihrer Protein- und RNA-Zusammensetzung sind.

## 1.2 Zellulärer Stress – die Entstehung von stress granules

Umwelteinflüsse können eine Vielzahl zellulärer Prozesse stören und erfordern deshalb eine kontinuierliche Anpassung auf zellulärer Ebene, um das Überleben zu sichern. Deshalb haben Zellen im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um auf solche Umwelteinflüsse reagieren zu können. Häufig lösen veränderte Umweltbedingungen intrazelluläre Stressreaktionen aus. Während einer solchen zellulären Stressreaktion modifizieren Zellen ihr Repertoire an Proteinen, welches sie synthetisieren, indem sie z.B. bestimmte Gene wie Hitzeschockproteine (HSPs) aktivieren, und bilden darüber hinaus im Zytoplasma so genannte *stress granules* (SGs) aus. SGs sind zytoplasmatische granuläre Strukturen, in denen translationell reprimierte RNP-Komplexe (Ribonukleoprotein-Komplexe) infolge des stressbedingten Erliegens der Translation reversibel aggregieren. Faktoren, welche eine solche Stressreaktion auslösen können, sind z.B. erhöhte Temperatur, die Intoxikation mit bestimmten Schwermetallen (oxidativer Stress, ER-Stress), osmotischer Schock, UV-Bestrahlung, Nahrungsmangel oder auch Virusinfektionen.

Während der zellulären Stressreaktion kommt es zu einem beinahe vollständigen Erliegen der Translation. Ein Großteil der mRNAs, welcher von Polysomen freigesetzt wird, wird dabei in SGs rekrutiert (Anderson and Kedersha, 2002b; Kedersha and Anderson, 2002). Bislang sind zwei Wege bekannt, über welche die Ausbildung von SGs initiiert werden kann. Beiden Wegen ist eine Inhibierung der Translation gemeinsam, die entweder durch Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  oder durch die funktionelle Blockierung der Helikase eIF4A hervorgerufen wird (Anderson and Kedersha, 2002a; Anderson and Kedersha, 2002b; Bordeleau et al., 2006; Bordeleau et al., 2005; Kedersha et al., 1999; Low et al., 2005; Mazroui et al., 2006).



**Abb. 1.5: Induktion der SG-Bildung.** Wird der Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$  infolge von Stress phosphoryliert, sinkt die Konzentration des eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> Komplexes. Dadurch wird der Initiationskomplex nicht mit tRNA<sup>Met</sup> beladen, was eine Inhibition der Translation zur Folge hat. Auch die Blockierung der Helikase eIF4A durch Hippuristanol oder Patemin sowie die verminderte Ausbildung des eIF4F-Komplexes infolge Poliovirus-Infektion inhibiert die Translationsinitiation. Das Erliegen der Translation führt zu SG-Bildung. Abb. In Anlehnung (Mazroui et al., 2006)

Bei der Initiation der Translation bilden die eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF1, eIF2, eIF3 und eIF5 zusammen mit der 40S ribosomalen Untereinheit den 43S Prä-Initiationskomplex aus (Asano et al., 2000; Dever, 1999; Pestova and Hellen, 1999; Phan et al., 2001). Dieser 43S Komplex rekrutiert die cap-Struktur der mRNA und die damit assoziierten eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren des eIF4F-Komplexes sowie das poly(A) bindende Protein, wodurch der 48S Initiationskomplex gebildet wird. Der 48S Initiationskomplex durchsucht die mRNA nach dem Startcodon. Wird dieses durch das Anticodon der tRNA<sub>Met</sub> erkannt, hydrolysiert eIF5 das mit eIF2 assoziierte GTP, wodurch es zu Umlagerungen des Initiationskomplexes kommt. Frühe Initiationsfaktoren dissoziieren aus dem Komplex. Die 60S ribosomale Untereinheit wird

rekrutiert, wodurch das 80S Ribosom entsteht. Durch Rekrutierung weiterer Ribosomen bildet sich ein Polysom.

Der Prozess der Initiation ist stark reguliert. Ein Schlüsselereignis bei der Initiation der Translation ist die Beladung der kleinen ribosomalen Untereinheit mit der tRNA<sub>Met</sub> während der Ausbildung des 43S Prä-Initiationskomplexes. Dies geschieht durch den eIF2-GTP-tRNA<sub>Met</sub> ternären Komplex. Die  $\alpha$  Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 ist ein Substrat verschiedener stressaktivierter Kinasen (PKR, PERK-PEK und GCN2), welche diese am Serin51 phosphorylieren können. Die Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  reduziert die Konzentration des eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> ternären Komplexes, der die kleine ribosomale Untereinheit zur Initiation der Translation mit tRNA<sup>Met</sup> belädt. Außerdem findet unter eIF2 $\alpha$  Phosphorylierung kein GDP/GTP-Austausch statt, der jedoch für die Ausbildung des eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> ternären Komplexes essentiell ist (Kedersha and Anderson, 2002; Kedersha et al., 2002; Kedersha et al., 1999). Fehlt der 40S ribosomalen Untereinheit die tRNA<sup>Met</sup>, kann sich der 43S Prä-Initiationskomplex nicht ausbilden, wodurch die Translationsinitiation inhibiert wird.

Die Kinasen, welche die Serin51 Phosphorylierung der eIF2 $\alpha$ -Untereinheit katalysieren, werden durch Stress infolge veränderter Umweltbedingungen aktiviert. So wird z.B. die Kinase PKR infolge erhöhter Temperatur, UV-Bestrahlung, oxidativen Stresses oder virale Infektionen aktiviert (Williams, 2001). ER-Stress hingegen induziert infolge PERK-PEK-Aktivierung die eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung und damit die SG-Bildung (Harding et al., 2000). Kommt es aufgrund Nahrungsmangel zu Hungerzuständen im Organismus, entstehen SGs infolge GCN2-Aktivierung (Kimball, 1999). Die HRI-Kinase, welche eine veränderte Häm-Versorgung während der Erythrozyten-Differenzierung widerspiegelt, induziert ebenfalls die SG-Bildung infolge eIF2 $\alpha$ -Phosphorylierung (Han et al., 2001; Lu et al., 2001).

Infolge der Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  wird die Translationsinitiation inhibiert, wodurch ein Großteil an mRNAs in translationell reprimierten 48S Komplexen vorliegt. Anderson und Kedersha postuliert, dass die Bindung der RNA-bindenden Proteine TIA-1 und TIAR an diese inhibierten 48S Komplexe deren Aggregation bewirkt, wodurch es zur Ausbildung von SGs kommt (Kedersha et al., 1999). SGs sind reversible Strukturen, so dass die in SGs gespeicherten 48S Komplexe infolge der Stresserholung verbunden mit einer ausreichenden Menge des eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> ternären Komplexes reinitiiert werden können (Kedersha et al., 2005).

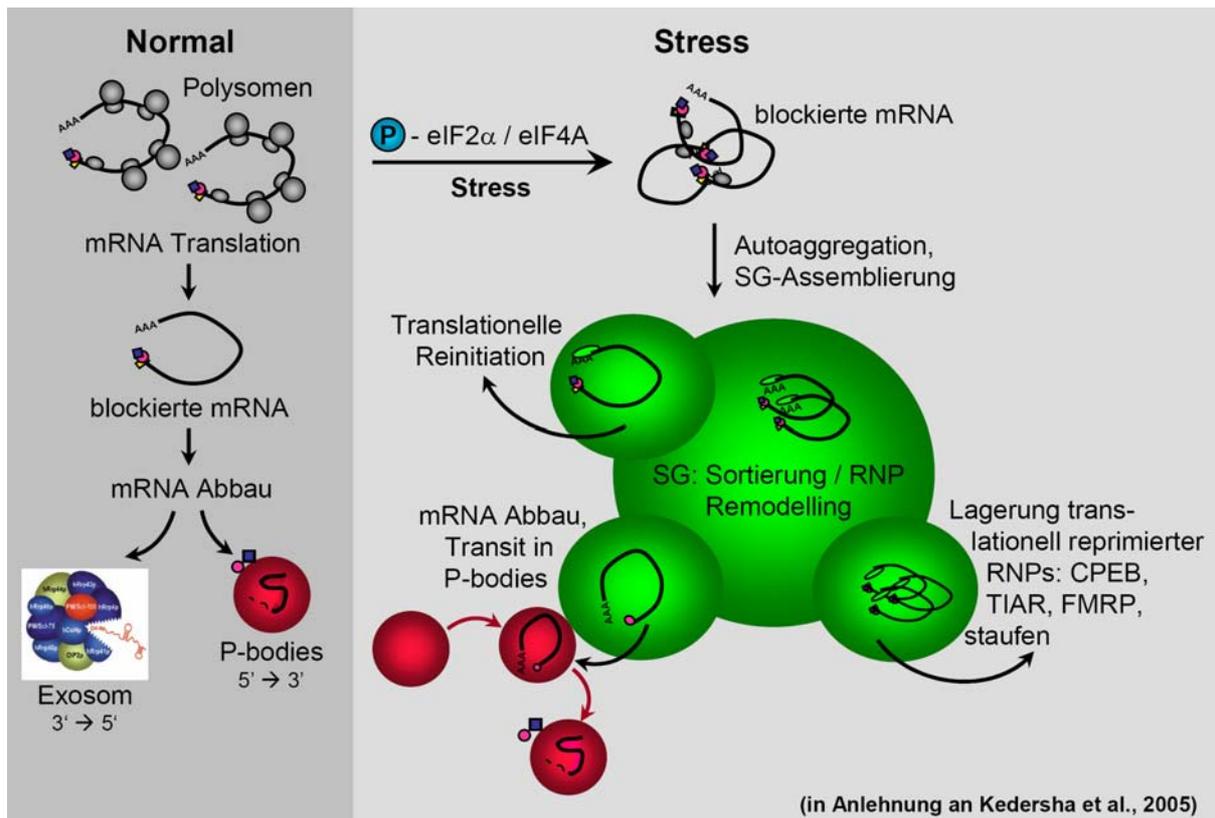
Neben der Inhibierung der Translationsinitiation durch Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$ , welche durch veränderte Umweltbedingungen ausgelöst wird, können SGs auch unabhängig

von diesem Schlüsselereignis entstehen. So wurde z.B. beschrieben, dass mitochondrial wirkende Gifte zur SG-Bildung ohne gleichzeitige eIF2 $\alpha$  Phosphorylierung führen (Kedersha et al., 2002). Jüngst wurde beobachtet, dass die Inhibierung anderer an der Initiation der Translation beteiligter Faktoren ebenfalls SG-Entstehung zur Folge hat. Hierbei ist besonders die Inhibierung der RNA-Helikase eIF4A bzw. des eIF4F-Komplexes zu erwähnen, in deren Folge SGs unabhängig der eIF2 $\alpha$  Phosphorylierung assemblieren (Mazroui et al., 2006). Die RNA-Helikase eIF4A ist der in der Zelle am häufigsten vorkommende Translationsinitiationsfaktor, welcher in drei Kopien pro Ribosom vorliegt (Duncan et al., 1987). Es gibt drei Isoformen, von denen zwei (eIF4AI und eIF4AII) beinahe identisch und funktionell austauschbar sind (Conroy et al., 1990; Yoder-Hill et al., 1993). eIF4A liegt in der Zelle frei oder als Untereinheit des eIF4F-Komplexes vor, welcher neben eIF4A auch das *cap*-bindende Protein eIF4E sowie den als Plattform des Komplexes dienenden Translationsinitiationsfaktor eIF4G enthält (Edery et al., 1983; Grifo et al., 1983). Die RNA-Helikase eIF4A ist während der Initiation der Translation für die Rekrutierung der Ribosomen zur mRNA notwendig (Rogers et al., 2002). Jüngst wurde zwei Wirkstoffe, Hippuristanol und Patemin, welche die Aktivität der RNA-Helikase eIF4A beeinflussen, als Inhibitoren der Translationsinitiation und SG-Induktoren identifiziert (Bordeleau et al., 2006; Bordeleau et al., 2005; Low et al., 2005). Hippuristanol inhibiert die Fähigkeit der Helikase, mRNA zu binden (Bordeleau et al., 2006), während Patemin die Affinität des freien eIF4A zu mRNA erhöht, wodurch weniger eIF4A für die Ausbildung des eIF4F-Komplexes zur Verfügung steht (Bordeleau et al., 2005; Low et al., 2005). Dem gegenüber affektieren Poliovirus-Infektionen eIF4A nur indirekt. Die Poliovirus Protease 2A<sup>pro</sup> schneidet den bei der Ausbildung des eIF4F-Komplexes als Plattform dienenden Faktor eIF4G, wodurch die Assoziation der RNA-Helikase eIF4A an der *cap*-Struktur der mRNA verhindert wird (Gradi et al., 1998). Poliovirusinfektionen induzieren daher auch SG-Bildung unabhängig der Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  (Mazroui et al., 2006).

Allen initialen Schritten der SG-Entstehung ist damit die Inhibierung der translationellen Initiation gemeinsam. Infolge eines translationellen Arrests, der durch die Inhibierung der Translationsinitiation hervorgerufen wird, lösen sich Polysomen auf. Translationell blockierte mRNAs werden aus letzteren freigesetzt und aggregieren zusammen mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (RBPs) wie TIA-1, TIAR, G3BP, oder CPEB in SGs (Abb. 1.6)(Anderson and Kedersha, 2006; Kedersha et al., 1999; Mazroui et al., 2002; Thomas et al., 2005; Tourriere et al., 2003; Wilczynska et al., 2005).

Nach dem Modell von Kedersha und Kollegen stellen SGs ein Reservoir stabiler aber translationell reprimierter mRNAs dar, welche durch Lagerung in selbigen Strukturen vor Abbau durch *processing bodies* (PBs) oder das Exosom geschützt werden (Kedersha et al., 2005)(Abb. 1.6). Hierbei wird postuliert, dass RNP-Komplexe in SGs einer Reorganisation unterzogen werden, aufgrund derer sie entweder für die Speicherung in SGs, die Degradation in PBs oder aber die Reinitiation nach Stresserholung sortiert werden (Kedersha et al., 2005). Dieses Modell stützt sich darauf, dass es sich bei SGs und PBs um bewegliche Strukturen handelt, welche *in vivo* temporär miteinander assoziieren (siehe Abb. 4.1). Bislang gibt es keinerlei Hinweise auf RNA-Abbau in SGs, da mRNAs in SGs stabil und zudem polyadenyliert sind. Darüber hinaus lokalisieren die *decapping* Enzyme DCP1 und DCP2, welchen in den RNA-Abbau in PBs involviert sind, ausschließlich in PBs, nicht jedoch in SGs (Sheth and Parker, 2003). Dem gegenüber werden verschiedene RBPs wie HuR, Staufen oder FMRP, welche unter physiologisch normalen Bedingungen die Stabilität und/oder Translation bestimmter mRNAs regulieren, unter Stress in SGs rekrutiert (Gallouzi et al., 2000; Mazroui et al., 2002; Thomas et al., 2005).

Obwohl bisher viele RBPs als SG-Komponenten identifiziert wurden, ist ihre Funktion in diesen Strukturen weitestgehend unbekannt. Ebenso unzureichend untersucht ist das Schicksal von mRNAs in SGs. Ob und in wieweit RBPs das Schicksal von mRNAs unter Stress beeinflussen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.



**Abb. 1.6: Zytoplasmatische stress granules (SGs).** Unter physiologisch normalen Bedingungen werden mRNAs in Polysomen translatiert. Ihre anschließende Degradation verläuft über zwei Abbauewege – zum einem durch Exonukleasen des Exosoms in 3'→5' Richtung, zum anderen durch *processing bodies* (PBs) in 5'→3' Richtung. Während der zellulären Stressantwort wird der Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$  phosphoryliert, was eine Reduktion des eIF2-GTP-tRNA<sup>Met</sup> zur Folge hat und die Initiation der Translation inhibiert. Inhibition der Helikase eIF4A führt ebenfalls zu einem translationellen Arrest. Die Bindung von TIA-1 und TIAR an die inhibierten 48S Komplexe bewirkt deren Aggregation zu SGs. In SGs können RNP-Komplexe gespeichert oder zum Abbau in PBs oder möglicherweise auch das Exosom sortiert werden. In SGs selbst finden kein Abbau und keine Translation statt. Nach Stresserholung können die eingelagerten mRNAs reinitiiert werden.

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

Das onkofötale RNA-bindende Protein ZBP1 ist ein wichtiger posttranskriptioneller Regulator verschiedener mRNAs. Indem ZBP1 den Transport, die Translation und die Stabilität seiner RNA-Liganden reguliert, moduliert das Protein wichtige zelluläre Prozesse wie Zellpolarität, Migration und Proliferation. Aufgrund dieser multiplen Funktionen ist ZBP1 sowohl an der Embryonalentwicklung als auch an der Karzinogenese beteiligt.

Die Rolle RNA-bindender Proteine wie ZBP1 unter physiologischen Stressbedingungen ist jedoch bislang weitestgehend unerforscht. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher die Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress untersucht werden. Einen Schwerpunkt bildete dabei der Einfluss von ZBP1 auf das Schicksal seiner mRNA-Liganden während der zellulären Stressantwort. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit spezifische *cis/trans*-Interaktionen unter Zellstress von Bedeutung sind und möglicherweise den Aufbau von SGs bzw. die RNA-Rekrutierung oder das Schicksal bestimmter mRNAs in SGs regulieren können. Dabei sollte analysiert werden, ob möglicherweise die gleichen regulatorischen Netzwerke, welche die Stabilität, Lokalisierung und Translation von mRNAs unter physiologisch normalen Bedingungen kontrollieren, auch unter zellulärem Stress wirksam sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues stressbasierendes *screening*-Verfahren (SIRL, *Stress-based Isolation of RNA-Ligands*) entwickelt, mit dem es nicht nur gelang, bereits für ZBP1 bekannte spezifische *cis/trans*-Interaktionen als stressrelevant zu charakterisieren, sondern darüber hinaus neue mRNA-Liganden zu identifizieren, welche sowohl unter Stress als auch unter physiologisch normalen Bedingungen von ZBP1 reguliert werden. Dadurch wurde belegt, dass dieselben regulatorischen Interaktionen zwischen mRNAs und ihren RBPs sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Stress wirksam sind. Darüber hinaus konnte erstmalig eine Funktion für RBPs in SGs identifiziert und charakterisiert werden. Die SIRL-Methode ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: erstens verdeutlicht sie, dass unter Stress dieselben regulatorischen Netzwerke aktiv sind wie unter Normalbedingungen und gewährt damit Einblick in die Funktionsweise von SGs, und zweitens stellt sie ein Verfahren dar, welches es ermöglicht, in einem einzigen *screening*-Ansatz sowohl auf Translations- als auch auf mRNA-Stabilitätsebene regulierte RNA-Liganden für in SG-lokalisierte RBPs zu identifizieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Größenstandards

Die verwendeten Chemikalien, soweit nicht anders vermerkt, wurden von den Firmen Sigma und Roth bezogen. Soweit nicht anders erwähnt war die Bezugsquelle für Enzyme, 2xPCR-Master-Mix und DNA-Größenstandards die Firma Promega. Protein-Größenstandards wurden von Fermentas bezogen. Zellkulturchemikalien und -lösungen wie DMEM, HANKS, Trypsin, FCS und OptiMem wurde von PAA Laboratories bezogen.

#### 2.1.2 Bakterien

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>E. coli</i> K12, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac-</i> , <i>F'</i> , <i>proAB</i> , <i>lacI<sub>q</sub>ZΔM15</i> , <i>Tn10 (Tet)<sub>r</sub></i>

LB (Luria Bertani) 1% (w/v) Trypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, zur Herstellung von LB-Agar wurden 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Für die Selektion rekombinanter Klone wurde das Medium in Abhängigkeit des Vektors mit 30 µg Kanamycin/mL oder 150 µg Ampicillin/mL supplementiert.

#### 2.1.3 Zelllinien

U-2 OS	HTB-96;	humane Osteosarcoma-Zelllinie,	(Heldin et al., 1986)
HEK 293	ACC-305;	humane embryonale Nierenzellen,	(Graham et al., 1977)

## 2.1.4 Antikörper

**Tab. 2.1: Verwendete Primär- und Sekundärantikörper und deren Verdünnung.**

<b>Primärantikörper</b>	<b>Typisierung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-CD44, HCAM	mAK Maus	Santa Cruz	1:1000 WB
anti-c-myc	mAK Maus	Upstate	1:500 WB
anti-Flag	mAK-Maus	Sigma	1:1000 IF
anti-FXR1	mAK Maus	Santa Cruz	1:100 IF
anti-hnRNP F	mAK Maus	Abnova	1:100 IF
anti-hnRNP M	mAK Maus	Santa Cruz	1:100 IF
anti-hnRNP Q	mAK Maus	Sigma	1:250 IF
anti-hnRNP U	mAK Maus	Sigma	1:100 IF
anti-HuR	mAK Maus	Sigma	1:100 IF
anti-LEF1	mAK Maus	Santa Cruz	1:500 WB
anti-MAPK4	mAK Maus	Abnova	1:500 WB
anti-MSK1	mAK Maus	Santa Cruz	1:500 WB
anti-PTEN	mAK Maus	Cell Signaling	1:500 WB
anti-RAPGEF2	mAK Maus	Abnova	1:500 WB
anti-TIAR	mAK Maus	BD Transduction	1:500 IF
anti-Tubulin, DM1 $\alpha$	mAK Maus	Sigma	1:2500 WB
anti-Vinculin, hVin1	mAK Maus	Sigma	1:2500 WB
anti-ZBP1	mAK Maus	Eigenimmunisierung	IP
anti- $\beta$ -Aktin	mAK Maus	Sigma	1:1000 WB
anti-hnRNP A1	mAK Ziege	Santa Cruz	1:100 IF
anti-hnRNP R	mAK Ziege	Santa Cruz	1:100 IF
anti-YB1	mAK Ziege	Santa Cruz	1:100 IF
anti-DCP2	pAK Kaninchen	(Meyer et al., 2004)	1:50 IF
anti-HA	pAK Kaninchen	Sigma	1:1000 IF
anti-hnRNP E1	pAK Kaninchen	zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer (Peptidimmunisierung)	1:100 IF
anti-hnRNP E2	pAK Kaninchen	zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer (Peptidimmunisierung)	1:100 IF
anti-hnRNP k	pAK Kaninchen	zur Verfügung gestellt von A. Ostareck-Lederer (Peptidimmunisierung)	1:100 IF
anti-RHA	pAK Kaninchen	Abcam	1:100 IF
anti-ZBP1 (460)	pAK Kaninchen	(Huttelmaier et al., 2005)	1:200 IF, 1:1000 WB
<b>Sekundärantikörper</b>	<b>Antigen</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
anti-Maus FITC	Maus IgG	Dianova	1:500
anti-Maus Cy3	Maus IgG	Dianova	1:1000
anti-Maus Cy5	Maus IgG	Dianova	1:50
anti-Maus HRP	Maus IgG	Dianova	1:2500
anti-Kaninchen FITC	Kaninchen IgG	Dianova	1:500
anti-Kaninchen Cy3	Kaninchen IgG	Dianova	1:1000
anti-Kaninchen HRP	Kaninchen IgG	Dianova	1:2500
anti-Ziege FITC	Kaninchen IgG	Dianova	1:500

## 2.1.5 Plasmide

pCR <sup>®</sup> -blunt	Invitrogen
pcDNA3.1 (+)	Invitrogen
pEGFP-C1	CLONTECH
pEGFP-C2	CLONTECH
pEGFP-C1	CLONTECH
pEYFP-C1	CLONTECH

## 2.1.6 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Klonierung und qRT-PCR wurden von MWG und Invitrogen bezogen. siRNAs wurden von Invitrogen bezogen.

**Oligonukleotide zur Klonierung.** Alle in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden standardmäßig bei *annealing*-Bedingungen von 55°C und 30 s verwendet. Die Elongationszeit variierte je nach Größe des PCR-Produkts (Amplikon). Hierbei wurde die vom Hersteller angegebene Reaktionsgeschwindigkeit der Pfx-Polymerase von 1 min/1 kb zu Grunde gelegt. Die eingeführten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen.

**Tab. 2.2: Oligonukleotide zur Klonierung.**

Oligonukleotid	Sequenz (5' → 3')
V1C Nhe I <i>s</i>	GAT <u>TGC TAG CAT</u> GGT GAG CAA GGG CGA GG
V1C Bgl II <i>as</i>	GAT <u>TAG ATC TGG</u> TGA TAT AGA CGT TGT GGC
V2C Nhe I <i>s</i>	GGG <u>CTA GCA</u> TGG CCG ACA AGC AGA AGA ACG GC
V2C Bgl II <i>as</i>	GAT <u>TAG ATC TCT</u> TGT ACA GCT CGT CCA TGC
Flag(Bgl II/EcoRI) <i>s</i>	<u>GAT CTA</u> TGG ACT ACA AGG ACG ACG ACA <u>AGG</u>
Flag(Bgl II/EcoRI) <i>as</i>	<u>AAT TCC</u> TTG TCG TCG TCC TTG TAG TCC <u>ATA</u>
HA(Bgl II/EcoRI) <i>s</i>	<u>GAT CTA</u> TGG GCT ACC CCT ACG ACG TGC CCG ACT <u>ACG</u>
HA(Bgl II/EcoRI) <i>as</i>	<u>AAT TCG</u> GCG TAG TCG GGC ACG TCG TAG GGG TAG <u>CCC</u>
MS2BP Xho I <i>s</i>	GGG <u>CTC GAG</u> CAC GCT TCT AAC TTT ACT CAG TTC GTT
MS2BP Xba I, BamHI <i>as</i>	GGG <u>TCT AGA GGA TCC</u> TTA GTA GAT GCC GGA GTT TGC TGC G
G3BP EcoRI <i>s</i>	GGG <u>AAT TCA</u> TGG TGA TGG AGA AGC CTA GTC
G3BP Sal I <i>as</i>	GGG <u>TCG ACT</u> TAC TGC CGT GGC GCA AGC CCC CTT C

**Oligonukleotide für qRT-PCR.** Alle in der Tabelle aufgeführten Oligonukleotide wurden standardmäßig bei *annealing*-Bedingungen von 60°C und 30 s verwendet. Reaktionsbedingungen für qRT-PCR siehe 2.2.3.3.

**Tab. 2.3: Oligonukleotide für qRT-PCR.**

Gen	<i>sense (5' 3')</i>	<i>antisense (5' 3')</i>
18S	AGGGCAGGGACTTAATCAACGC	GTTGGTGGAGCGATTTGTCTGG
ACTR2	ATCACGGTTGGAACGAGAAC	CACACGGACACCCTTTTCTT
$\alpha$ -Tubulin	AGTGCATCTCCATCCACGTT	TCAATGACTGTGGGTTCCAA
AVPR1A	ACCGAATCGGAAAACCCTAC	CATGGGAAGCTTTGAACACA
$\beta$ -Aktin	TCCCTGGAGAAGAGCTACG	GTAGTTTCGTGGATGCCACA
BCAN	CGGATCAGACCGTGAGGTAT	CAGCTTCTCTGGAGGGTCAC
BCL2L1	GGGGTAAACTGGGGTTCGATT	ACCTGCGGTTGAAGCGTTC
BCOR	AGCAACCAAAGACTCCGAGA	TTCGTTCTGTTCTGCAATG
c-myc	CAGCTGCTTAGACGCTGGATT	GTAGAAATACGGCTGCACCGA
CPSF6	AAGATTGCCTTCATGGAATTGAG	TCGTGATCTACTATGGTCCCTCTCT
CUL4A	TCGAAAACCTCAGTGGCAA	TGGCCATTTTTATCTCCTCA
Cyclophilin A	GTC AAC CCC ACC GTG TTC TT	CTG CTG TCT TTG GGA CCT TGT
ENPP1	GCCTGTTTCAGATGACTGCAA	AGAAGTCCACCCCAAGTGTG
EPM2A	AGTGTCCCCTATTGCCACTC	GAAGAGGTGCCTGCAAAGAC
firefly	GAATCCATCTTGCTCCAACAC	TTCGTCCACAAACACAACCTC
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGTC	GAAGATGGTGATGGGATTTC
HSPB1 (Hsp27#1)	GTCCCTGGATGTCAACCACT	GGACAGGGAGGAGGAAACTT
IGF-II	CGATGCTGGTGCTTCTCACC	GTCACAGCTGCGGAAACAGC
JUP	TCAGCAGCAAGGGCATCAT	TGGGTGTAAGTGGTGGTTTTCTT
LAMA1	GAACAGTGTGTGGTGGATGC	CCTTGCCAAGGTCAAACAT
LEF1	ACAGATCACCCACCTCTTG	TGAGGCTTCACGTGCATTAG
MAPK4	TGCTCAAGATTGGGGATTTC	GATGAGTTGCATCTGCTCCA
MERTK	CCCGGCGTGCTAACTGTT	TTGTCATTGTGGGCCTCACA
NRG1	CGTGGAAATCAAACGAGATCATCA	GCTTGTCCCAGTGGTGGATGT
NRXN2	TTGTCATCGAGCTGGTCAAG	TTGTGCCACTGGTTGTCATT
PBX1	CCCATCTCAGCAACCCTTACC	CCATGGGCTGACACATTGG
PTEN	ACCAGGACCAGAGGAAACCT	GCTAGCCTCTGGATTTGACG
RAPGEF2	ACATTCTGAGGACGGTGGAC	CATTGAGAAGTGCAGCCAGA
renilla	ATCAGGCAAATCTGGTAATGG	ACATCTACTACACTTTCAGCGT
RPLP 0	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT	CCATCAGCACCACAGCCTTC
RPS6KA5	TTCAGCTGTAAGCCACATGC	TGAGATTGGAAGGGAACCTG
RRBP1	TGGAGGATGAGCAGACACAG	GTTCTGTCAGCTTCTTACC
SFRS14	ACAGCACCGATAACCCTGAC	GGGCTCGTCTTCAAACCTCTG
SHANK3	GCCTGAAGACGACAAACCA	ACTTCTTGGCAGGGTCCAG
STAT3	CAGTCAGTGACCAGGCAGAA	GCTGCAACTCCTCCAGTTTC
TBC1D10A	GAGTCCAAGTGGCTGGACAT	CTGACAGGTAAGTCCAAGCA
Vinculin	TTACAGTGGCAGAGGTGGTG	TCACGGTGTTCATCGAGTTC
ZBP1	TAGTACCAAGAGACCAGACCC	GATTTCTGCCCGTTGTTGTC

Tab. 2.4: siRNAs.

siRNA	Sequenz (5' → 3')
Kontrolle	UGG GCG UCG UGG AGG CUU UTT
ZBP1	CCG GGA GCA GAC CAG GCA ATT

### 2.1.7 Systeme

WIZARD Plus SV Miniprep	Promega
PURE YIELD™ Plasmid Midprep System	Promega
RNeasy MiniElute Clean Up	QIAGEN
QIAEX II Gel Extraktion Kit	QIAGEN
Dc Protein Assay	Biorad
Dual-Glo™ Luziferase Assay System	Promega
pCR®-blunt	Invitrogen

### 2.1.8 Sonstiges

Blotmembran	Amersham
ECL	Amersham
Zellkulturmaterialien	TPP
qRT-PCR-Materialien	VWR
Lipofectamine 2000	Invitrogen
Prolong-Antifade	Invitrogen

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden**

#### **2.2.1.1 Molekularbiologische Standardmethoden**

Die Protokolle für grundlegende Methoden wie z.B. Ethanol-fällung, die Phenol-Chloroformextraktion von Nukleinsäuren oder die Bestimmung der Konzentration von DNA und RNA-Lösungen wurden allgemein gebräuchlichen Laborhandbüchern entnommen (Ausubel, 1996; Sambrook, 1989). Enzymatische Reaktionen, wie Ligation, Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung oder die Restriktionsspaltung von DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der entsprechenden Enzyme und Puffer. Die Präparation geringer Mengen (1-2 µg) Plasmid-DNA erfolgte nach (Birnboim, 1976). Es wurden standardmäßig 2 ml einer Über-Nacht-Kultur eingesetzt. Zur Sequenzierung oder Transfektion verwendete DNA wurde unter Verwendung der unter 2.1.8 angegebenen Isolationssysteme von Promega präpariert, Sequenzierung wurden durch die Firma MWG durchgeführt. Die Reinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte ebenfalls nach Herstellerangaben unter Verwendung des QIAEX II Gel Extraktion Kits von QIAGEN.

#### **2.2.1.2 Mikrobiologische Standardmethoden**

Allgemeine mikrobiologische Methoden, wie die Sterilisierung von Lösungen und Gegenständen, die Kultivierung von *E. coli* in Medien bzw. auf selektiven Agarplatten, die Herstellung chemokompetenter *E. coli*-Zellen sowie deren Transformation durch Hitzeschock wurden anhand von Standardprotokollen durchgeführt.

#### **2.2.1.3 Klonierungen**

Alle Klonierungen wurden standardmäßig wie folgt durchgeführt. Das zu klonierende DNA-Fragment wurde mittels Pfx-Polymerase (Invitrogen) und mit spezifischen Oligonukleotiden, welche die entsprechenden Restriktionsschnittstellen enthielten, nach Angaben des Herstellers amplifiziert (Oligonukleotide siehe 2.1.6). Als *template* für *de novo* Amplifikationen diente aus RNA von U2OS-Zellen hergestellte cDNA, welche mittels

SuperScriptII (Invitrogen) nach Herstellerangaben synthetisiert wurde. Die BiFC-Plasmide (YFP<sub>N</sub> und YFP<sub>C</sub>) wurden basierend auf dem pEYFP C1-Vektor von CLONTECH synthetisiert. Das PCR-Produkt wurde in einem 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Bande der entsprechenden Größe wurde anschließend mit Hilfe des QIAEX II Gel Extraktion Kits von QIAGEN isoliert und in den pCR<sup>®</sup>-blunt-Vektor ligiert. Die Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert und anschließend über die entsprechenden Restriktionsschnittstellen in die in Tab. 2.5 angegebenen Vektoren mittels T4-DNA-Ligase subkloniert. Die Oligonukleotid-Linker Flag bzw. HA wurden aus den entsprechenden Oligonukleotiden (2.1.6) hergestellt. Dazu wurde ein 1:1 Gemisch aus *sense* und *antisense* Oligonukleotid bei 95°C für 2 min denaturiert und zur Hybridisierung auf Raumtemperatur abgekühlt. Anschließend wurde der Oligonukleotid-Linker im Überschuss in das YFP<sub>N</sub>- bzw. YFP<sub>C</sub>-Plasmid mittels T4-DNA-Ligase unter Verwendung der angegebenen Restriktionsschnittstellen ligiert. Bei der Subklonierung des MS2BP in den YFP<sub>C</sub>-HA-Vektor wurde letzterer nach dem Restriktionsverdau mit BamHI mittels alkalischer Phosphatase nach Standardprotokollen dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Alle Plasmide wurden durch Restriktionsanalysen und Sequenzierung verifiziert.

**Tab. 2.5: Verwendete Plasmide.**

Plasmidname	Insert	Vektor	Restriktions-schnittstellen	Beschreibung
ZBP1-Deletions-fragmente	ZBP1-Deletions-fragmente	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Farina et al., 2003)
GFP-Imp1	Imp1	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
GFP-Imp2	Imp2	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
GFP-Imp3	Imp3	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
GFP-Raver	Raver	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
GFP-PTB	PTB	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
GFP-EF1 $\alpha$	EF1 $\alpha$	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
GFP-KSRP	KSRP	pEGFP C1		(Huttelmaier et al., 2001)
RFP-DCP1	DCP1b	mRFP C1	EcoRI / BamHI	
GFP-DCP1	DCP1b	pEGFP C1	EcoRI / BamHI	
GFP-G3BP	G3BP1	pEGFP C2	EcoRI / Sal I	(Stohr et al., 2006)
YFP <sub>N</sub>	YFP <sub>N</sub>	pEGFP C1	Nhe I / Bgl II	in Anlehnung an (Rackham and Brown, 2004)
YFP <sub>C</sub>	YFP <sub>C</sub>	pEGFP C1	Nhe I / Bgl II	in Anlehnung an (Rackham and Brown, 2004)
YFP <sub>N</sub> -Flag	Flag	YFP <sub>N</sub>	Bgl II / EcoRI	
YFP <sub>C</sub> -HA	HA	YFP <sub>C</sub>	Bgl II / EcoRI	
YFP <sub>N</sub> -Flag-ZBP1	ZBP1	YFP <sub>N</sub> -Flag	EcoRI / XhoI in Sal I	(Stohr et al., 2006)
YFP <sub>C</sub> -HA-MS2BP	MS2BP	YFP <sub>C</sub> -HA	BamHI	(Stohr et al., 2006)

GFP-NLS-MS2BP	NLS, MS2BP	pEGFP C1		(Bertrand et al., 1998)
Luc-ΔZip	firefly Luziferase	pcDNA3.1	BamHI / EcoRI	(Huttelmaier et al., 2005)
Luc-Zip	firefly Luziferase, β-Aktin Zipcode	pcDNA3.1	HindIII / XhoI	(Huttelmaier et al., 2005)
Luc-ΔZip-MS2	firefly Luziferase, 6 MS2	pcDNA3.1	HindIII / BamHI	(Bertrand et al., 1998)
β-Aktin-Zip-MS2	β-Aktin cds und Zipcode, 6 MS2	pcDNA3.1	HindIII / BamHI	(Bertrand et al., 1998)

## 2.2.2 Zellkultur

### 2.2.2.1 Kultivierung humaner Zelllinien

U2OS und HEK293 Zellen wurden in DMEM (*Dublecco's Modified Eagle Medium*), welchem 10% FCS (Fötale Kälber Serum) zugesetzt wurden, bei 37°C und unter 10% CO<sub>2</sub> und 90% Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Zellen wurden in 10 cm TC-Platten kultiviert.

Zum Passagieren wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit HANKS-Puffer mit einer Trypsin/EDTA-Lösung inkubiert, bis sich ca. 50-70% der Zellen vom Gefäßboden gelöst hatten. Die Enzymwirkung wurde durch Zugabe des doppelten Volumens DMEM/10% FCS gestoppt, die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die gewünschte Zellzahl replattiert.

Zur Transfektion wurden U2OS-Zellen in *6well*-Platten mit einer Konzentration von  $3 \times 10^5$  Zellen/*well* ausgesät. Für Immunofluoreszenzen wurden *24well*-Platten, welche 12 mm Deckgläschen enthielten, verwendet. Hierfür wurde eine Zellzahl  $5 \times 10^4$  Zellen/*well* ausgesät. Für die Immunopräzipitationen wurden U2OS- sowie HEK293-Zellen in 15 cm Schalen und einer Zellzahl von  $1 \times 10^7$  kultiviert.

### 2.2.2.2 Transfektion von U2OS Zellen

Für alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Transfektionen wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) nach Herstellerangaben verwendet. Die Menge des verwendeten OptiMem richtete sich hierbei nach der Größe der zu transfizierenden Kulturschale und wurde ebenfalls, wie vom Hersteller empfohlen, verwendet. U2OS-Zellen wurden am Vortag in der entsprechenden Zellzahl ausgesät und am Folgetag transfiziert. Sechs Stunden nach Transfektion wurde das Medium gewechselt. Die in den einzelnen

Experimenten verwendeten DNA- bzw. siRNA-Mengen wurden im Anhang in Tab. 6.1 zusammengestellt.

### **2.2.2.3 Stressapplikation**

Zur Erzeugung von oxidativem Stress in U2OS-Zellen wurde dem Kulturmedium eine Endkonzentration von 2,5 mM Natriumarsenat zugesetzt. Das Natriumarsenat wurde in Kulturmedium gelöst. Wenn nicht anders vermerkt erfolgte die Inkubation mit Natriumarsenat für eine Stunde im Brutschrank. Ein Hitzeschock wurde durch Applikation von 42°C warmen Kulturmedium und einer anschließenden Inkubation bei 42°C für eine Stunde ausgelöst. Die radioaktive Bestrahlung von U2OS-Zellen wurde in Zusammenarbeit mit der Radiologie (Medizinische Fakultät, Universität Halle/Wittenberg) durchgeführt. Die Zellen wurden mit 0,5 Gy, 1 Gy bzw. 6Gy für eine Minute bestrahlt, danach für 1 h bzw. 4 h im Brutschrank inkubiert und anschließend fixiert.

Zur Inhibierung der PolymeraseII-gesteuerten Transkription für die Analyse des mRNA-Abbaus in U2OS-Zellen wurde dem Kulturmedium 5 µM Aktinomycin D für die angegebenen Zeitpunkte zugesetzt. Das Aktinomycin D wurde hierfür nach Herstellerangaben in 95%igem Ethanol gelöst.

## **2.2.3 Biochemische Methoden**

### **2.2.3.1 RNA-Isolierung**

Zur Isolierung von Gesamt-RNA mittels TRIZOL wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen mit TRIZOL von der Kulturschale lysiert. Es wurde 1 mL TRIZOL pro *well* einer 6*well*-Platte verwendet. Die Suspension wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Reinigung bei -80°C gelagert. Nach dem Auftauen wurden Zelltrümmer für 5 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde in ein frische Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 200 µL Chloroform unter Vortexen extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Die wässrige (obere) Phase wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die Fällung der RNA erfolgt durch Zugabe von 500 µL Isopropanol für 15 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 13000 rpm und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde mit 200 µL kaltem

80%igen Ethanol gewaschen und anschließend getrocknet. Die RNA wurde in 30  $\mu\text{L}$  RNase/DNase-freiem Wasser gelöst und bis zur reversen Transkription bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

**TRIZOL:**

0,8 M Guanidiniumthiocyanat  
0,4 M Ammoniumthiocyanat  
0,1 M Natriumacetat, pH 5.0  
5% (w/v) Glycerol  
48% Roti-Aqua-Phenol für RNA-Isolierung

### 2.2.3.2 Reverse Transkription

Zur Analyse der RNA mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) wurden 2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA revers transkribiert. Die reverse Transkription erfolgte mit der M-MLV reversen Transkriptase (Promega) nach folgendem Protokoll:

2  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA  
1  $\mu\text{L}$  *random hexamers*  
Auffüllen auf 14,5  $\mu\text{L}$  mit RNase/DNase-freiem Wasser

Denaturierung der RNA für 5 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  und anschließende Inkubation auf Eis für weitere 5 min.

Zugabe von 5,5  $\mu\text{L}$  Master-Mix, bestehend aus:

4  $\mu\text{l}$  5xRT-Puffer  
1  $\mu\text{l}$  dNTPs  
0,25  $\mu\text{l}$  RNasin  
0,25  $\mu\text{l}$  M-MLV reverse Transkriptase

Inkubation für 2 h bei  $42^{\circ}\text{C}$  und anschließende Inaktivierung der reversen Transkriptase durch Inkubation für 15 min bei  $75^{\circ}\text{C}$ . Die cDNA wurde falls nicht unmittelbar verwendet bis zur Analyse mittels qRT-PCR bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

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

Veränderungen des RNA-Gehaltes von Zellen bzw. Verschiebungen im Mengenverhältnis einzelner Transkripte können im Wesentlichen mit zwei Methoden quantifiziert werden – dem Northern Blot und der quantitative RT-PCR (qRT-PCR). Die Vorteile der qRT-PCR liegen vor allem in der höheren Sensitivität, die es erlaubt, auch geringe Unterschiede zu detektieren, und der wesentlich geringen Menge an benötigter RNA. Darüber hinaus verzichtet die qRT-PCR auf die Verwendung von Radioaktivität bei den eingesetzten Sonden und ermöglicht zudem, einen höheren Messdurchsatz.

Es gibt im Wesentlichen zwei Technologien, die die Quantifizierung einer PCR erlauben, zum einen ist das die SYBR<sup>®</sup> Green I-Technologie, zum anderen finden so genannte Taqman-Sonden Anwendung. Beiden Technologien liegt eine herkömmliche PCR zu Grunde, deren Verlauf jedoch anhand einer fluoreszenzbasierenden Messung dokumentiert werden kann. Demnach ist die gemessene Fluoreszenz proportional der entstandenen Menge an PCR-Produkt. Unter Berücksichtigung der Reaktionszyklen können daraus Rückschlüsse auf die Ausgangsmenge der untersuchten Transkripte gezogen werden.

Bei dem Taqman-System kommt neben den PCR-Primern, eine zusätzliche Sonde zum Einsatz, welche sowohl ein Fluorophor als auch einen Quencher enthält, der das Fluoreszieren der Sonde verhindert. Diese Sonde ist komplementär zu einem Teil des entstehenden PCR-Produkts. Im Verlauf der PCR wird durch die Exonuklease-Aktivität der Polymerase die erste Base der Sonde, an welche der Fluorophor gekoppelt ist, entfernt. Die freigesetzte Fluoreszenzmenge ist zu der entstandenen Produktmenge proportional. Vorteil der Taqman-Technologie ist die hohe Spezifität, jedoch sind bei weitem nicht für alle Gene Taqman-Sonden kommerziell erhältlich. Darüber hinaus ist diese Methode besonders kostenintensiv.

In dieser Arbeit wurde die SYBR<sup>®</sup> Green I-Technologie angewendet. Diese Methode basiert auf der Verwendung des Fluoreszenzfarbstoff SYBR<sup>®</sup> Green I, welcher durch Interkalieren in doppelsträngige DNA fluoresziert. Bei dieser Form der qRT-PCR wird lediglich ein spezifisches Primerpaar zur Detektion eines Transkripts benötigt. Zusätzliche Sonden finden hierbei keine Anwendung. Unter Berücksichtigung bestimmter Parameter beim Primerdesign und den Reaktionsbedingungen kann auch mit dieser Methode eine hohe Spezifität erzielt werden. Beim Primerdesign ist besonders auf die Schmelztemperatur und auf mögliche Sekundärstrukturen, welche zu Primerdimerisierungen führen können, zu achten. Außerdem ist es von Vorteil, dass die Amplikons eine Exon/Exon-Grenze beinhalten, um die

Amplifikation von genomischen DNA-Verunreinigungen zu verhindern. Im Anschluss an die PCR findet eine Schmelzkurvenanalyse statt, bei der durch langsame kontinuierliche Temperaturerhöhung das doppelsträngige PCR-Produkt in seine beiden Einzelstränge geschmolzen wird, wodurch das gebundene SYBRgreen<sup>®</sup> freigesetzt wird und nicht mehr fluoresziert. Die Anzahl der dadurch erhaltenen *peaks* korreliert mit der Anzahl der entstandenen PCR-Produkte. Da die doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstandene Primerdimere, ist eine Unterscheidung möglich. Die Höhe des *peaks* der Schmelzkurve gibt zusätzlich Auskunft über die Menge des gebildeten Fragments.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde jede qRT-PCR als Dreifachbestimmung durchgeführt. Dabei kamen folgende Standardbedingungen zur Anwendung:

Master-Mix1: (Angaben pro Reaktionsansatz)

- 7,5 µL 2xPCR-Master-Mix (enthält Taq-Polymerase)
- 0,3 µL SYBRgreen<sup>®</sup> (Stocklösung 1:1000 in DMSO verdünnt, Lagerung bei -20°C, nach dem Auftauen nicht wieder einfrieren)
- 0,03 µL Rox (Referenzfarbstoff, Stratagene)
- 2,17 µL RNase/DNase-freies Wasser

Master-Mix2: (Angaben pro Reaktionsansatz)

- 10 µL Master-Mix1
- 0,03 µL *sense primer* (100 µM)
- 0,03 µL *antisense primer* (100 µM)

Zunächst wurde der Master-Mix1 im Überschuss für alle durchzuführenden Reaktionen hergestellt. Der Master-Mix2 wurde anschließend für jedes einzelne Primerpaar separat hergestellt, indem die entsprechende Menge Master-Mix1 mit dem jeweiligen Primern versetzt wurde. Pro Reaktion wurden zuerst 10 µL Master-Mix2 in ein *well* einer 96well-Mikrotiterplatte pipettiert. Anschließend wurden 5 µL der zuvor 1:5 verdünnten cDNA zugegeben. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer optischen Folie versiegelt und mit dem MX3000P-Cycler von Stratagene unter Verwendung des folgenden PCR-Programms vermessen: initiale Denaturierung für 3 min bei 95°C, 50 Zyklen bestehend aus Denaturierung

(30 s bei 95°C), *annealing* (30 s bei 60°C) und Elongation (30 s bei 72°C), Schmelzkurve (55°C-95°C).

Im Anschluss an eine Schmelzkurvenanalyse wurden die Messwerte unter Verwendung der  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ -Methode ausgewertet (Livak and Schmittgen, 2001). Bei dieser relativen Quantifizierung werden die  $C_T$ -Werte (*threshold cycle*; Zykluszahl, bei der die entstandene Produktmenge einen definierten Schwellenwert erreicht) der zu quantifizierenden Transkripte zweier Populationen (z.B. Knockdown und Kontrolle) direkt unter Normalisierung auf ein Kontrollgen mit einander verglichen. Eine vorherige Quantifizierung der Absolutmengen mittels Standardkurven ist dadurch nicht mehr notwendig. Hierbei wird eine 100%ige PCR-Effizienz vorausgesetzt. Zur Auswertung wurde folgende Formel verwendet:

$$R = 2^{(-((C_{TA} - C_{TB})_x - (C_{TA} - C_{TB})_y))}$$

R - mRNA ratio  
 $C_{TA}$  -  $C_T$ -Wert Gen  
 $C_{TB}$  -  $C_T$ -Wert Kontrollgen  
 $x$  - Population  
 $y$  - Kontrollpopulation

Standardmäßig dienten in dieser Arbeit 18S rRNA und *RPLP0* als Kontrollgene der Normalisierung. Für die SIRT-Analysen wurden zusätzlich *Cyclophilin A*, *GAPDH*, *HSP27*,  $\alpha$ -*Tubulin* sowie *Vinculin* verwendet.

#### 2.2.3.4 SDS-PAGE und Western Blotting

Für Western Blot-Analysen wurde zunächst ein Proteinextrakt aus U2OS-Zellen mittel RIPA-Puffer hergestellt. Hierfür wurden die Zellen in RIPA-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die unlösliche Fraktion durch Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 10 min pelletiert. Die Proteinkonzentration wurde mit Dc Protein Assay (Biorad) bestimmt. Zur elektrophoretischen Trennung der Proteine wurden 10%ige SDS-Polyacrylamidgele verwendet, die mit jeweils 10  $\mu$ g Proteinextrakt pro Tasche beladen wurden. Anschließend erfolgte der Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einer *Semi-dry*-Blotapparatur (VWR) unter Verwendung des Drei-Puffer-Systems. Der Proteintransfer wurde durch PonceauS-Färbung überprüft. Nach dem Entfärben der Membran durch mehrmaliges Waschen mit TBST erfolgt die Absättigung von unspezifischen Bindestellen für mind. 1 h in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in TBST. Primärantikörper

wurden je nach Spezifität und Affinität in einem Bereich von 1:250 bis 1:2500 in 2,5% (w/v) BSA in TBST verdünnt (siehe 2.1.4) und für 1 h mit der Membran unter leichtem Schwenken inkubiert. Vor der Zugabe der Sekundärantikörper wurde mehrmals mit TBST gewaschen. Die Sekundärantikörper waren mit einer Peroxidase (HRP, *horse raddish peroxidase*) gekoppelt und wurden in einer Verdünnung von 1:2500 in 2,5% Magermilchpulver in TBST für 1 h mit der Membran inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit TBST erfolgte die chemiluminometrische Detektion unter Verwendung der ECL-, ECL *plus*- oder *advanced*-ECL-Systeme von Amersham in einem Syngene-Detektionsgerät (Syngene Bio Imaging). Die Blots wurden durch Quantifizierung der Bandenintensitäten mittels Gene-Tools (Syngene Bio Imaging) Software semiquantitativ ausgewertet.

**RIPA-Puffer:**

50 mM Tris pH7.4  
200 mM NaCl  
1% Triton X100  
0,25 % Deoxycholate  
1 mM EDTA  
1 mM EGTA

**10xTBST**

100 mM Tris/HCl, pH 8  
1,5 m NaCl  
1% Tween 20

**Probenauftragspuffer**

250 mM Tris/HCl, pH 6.8  
10 mM EDTA  
5% SDS  
50% Glycerin  
0,005% Bromphenolblau  
5%  $\beta$ -Mercaptoethanol

**Trenngelpuffer**

1,5 M Tris/HCl, pH 8.8  
0,4% SDS

**Sammelgelpuffer**

0,5 M Tris/HCl, pH 6.8  
0,4% SDS

**5xElektrophorepuffer**

25 mM Tris  
250 mM Glycin  
0,1% SDS

**Trenngelzusammensetzung**

12,5 mL Acrylamid/Bisacrylamid  
7,5 mL Trenngelpuffer  
9,9 mL Aqua bidest  
10  $\mu$ L TEMED  
100  $\mu$ L APS

**Sammelgelzusammensetzung**

1,3 mL Acrylamid/Bisacrylamid  
2,5 mL Sammelgelpuffer  
6,2 mL Aqua bidest  
10  $\mu$ L TEMED  
200  $\mu$ L APS

**Transferpuffer 1**

300 mM Tris/HCl, pH 10.4  
20% Methanol

**Transferpuffer 2**

25 mM Tris/HCl, pH 10.4  
20% Methanol

**Transferpuffer 3**

25 mM Tris/HCl, pH 9.4  
20% Methanol  
40 mM  $\gamma$ -Aminocaprinsäure

### 2.2.3.5 Ko-Immunopräzipitation von ZBP1-mRNA-Liganden

Um die spezifische Assoziation von ZBP1 mit verschiedenen mRNAs zu untersuchen, wurde endogenes ZBP1 mit monoklonalen Antikörpern präzipitiert. Die aus dem Präzipitat isolierte RNA wurde mittels semiquantitativer und quantitativer RT-PCR analysiert. Das Experiment wurde mit HEK293 und U2OS-Zellen wie folgt durchgeführt.

Zur Herstellung eines Zellextraktes aus vier konfluenten 15 cm Petrischalen wurde das Tap-Lysis-Puffersystem verwendet, welches eine fraktionierte Extraktion von Zytoplasma und Zellkernen ermöglicht. Hierfür wurden die zuvor geernteten Zellen einmal mit 10 mL Lysis I-Puffer gewaschen und bei 1500g für 5 min zentrifugiert. Der Lysis II-Puffer wurde mit 50U/mL RNasin, 100  $\mu$ M RVC (Ribonukleotid-Vanadyl-Komplexe) und Protease-Inhibitoren (nach Angaben des Herstellers) versetzt, bevor das Zellpellet in 1,5 mL resuspendiert wurde. Zur Lyse wurde die Suspension 10 min auf Eis inkubiert und anschließend 15-20-mal "gedounced". Um die Zellkerne beim Pelletieren nicht zu zerstören, wurde für 5 min bei 5000g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frisches Eppendorfgefäß überführt, das Pellet ein zweites Mal mit 1 mL Lysis II-Puffer wie zuvor extrahiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt von 5 min bei 5000g und 4°C wurden die beiden Überstände vereinigt. Ein DNase I -Verdau wurde mit 10 U/mL DNase I (RNase-frei) für 15 min auf Eis durchgeführt. Zelltrümmer wurden anschließend für 10 min bei 13000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein frische Eppendorfgefäß überführt und mit 0,2% (v/v) Hefe-tRNA versetzt. Von dem fertigen Zellextrakt wurden 3 Proben entnommen: zweimal 100  $\mu$ L als RNA-Input, einmal 100  $\mu$ L als Protein-Input. Die Proben verblieben bis zur Aufarbeitung auf Eis.

In der Zwischenzeit wurden die in einem ZBP1-Immunsereum enthaltenen Antikörper an Protein-A *beads* gekoppelt. Hierfür wurde der Lysis II-Puffer auf 150 mM KCl unter Verwendung des Lysis III-Puffer eingestellt. 50  $\mu$ L Protein-A *beads* wurden mit Lysis II-Puffer (150 mM KCl) eingewaschen. 25  $\mu$ L Protein-A *beads* wurden zur Immobilisierung des Antikörpers mit 1 mL ZBP1-Immunsereum für 1h bei 4°C unter Rotation inkubiert. Weitere 25  $\mu$ L Protein-A *beads* wurden als Kontroll-*beads* mit 1 mL DMEM/10% FCS ebenfalls für eine Stunde bei 4°C unter Rotation inkubiert. Die *beads* wurden abzentrifugiert und mit Lysis II-Puffer (150 mM KCl) gewaschen. 2 mL Zellextrakt wurden mit 600  $\mu$ L Lysis III-Puffer auf 150 mM KCl eingestellt. Die ZBP1- bzw. Kontroll-*beads* wurden zur Immunopräzipitation jeweils mit 1,3 mL Zellextrakt (150 mM KCl) für 1,5 h bei 4°C unter Rotation inkubiert.

Im Anschluss wurden die *beads* dreimal mit Lysis II-Puffer (150 mM KCl) gewaschen, bevor eine Protein/RNA-Elution wie folgt durchgeführt wurde. Die *beads* wurden in 200  $\mu$ L DEPC-Wasser mit 0,2% SDS und 2% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen und für 5 min bei 70°C zur Proteinelution inkubiert. Nach dem Pelletieren der *beads* durch Zentrifugation für 30 s bei 13000 rpm wurde jeweils eine Probe von 20  $\mu$ L als Protein-IP entnommen. Um die spezifische Immunopräzipitation von ZBP1 zu überprüfen, wurden die Proben zusammen mit der Inputprobe auf ein SDS-PAGE aufgetragen und es wurde ein Western Blot gegen ZBP1 durchgeführt. Die verbliebenen *beads* wurden einem Proteinase-K-Verdau mit 4  $\mu$ L Proteinase-K für 15 min bei 55°C unter Schütteln unterzogen. Die beiden RNA-Input-Fractionen wurden nach Zugabe von 80  $\mu$ L Lysis II-Puffer (150 mM KCl) ebenfalls Proteinase-K-Verdau unterzogen. Anschließend wurden alle Proben mit jeweils 160  $\mu$ L DEPC-Wasser und 80  $\mu$ L NH<sub>4</sub>-Acetat (7,5 M) versetzt. Die *beads* wurden für 30 s bei 13000 rpm abzentrifugiert. 400  $\mu$ L des Übersandes wurden in ein frisches Eppendorfgefäß überführt und durch Zugabe von 400  $\mu$ L Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol unter Vortexen extrahiert. Zur Phasentrennung wurde für 5 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. 380  $\mu$ L der oberen Phase wurden in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde durch Zugabe von 1 mL 99%igen Ethanol und 2  $\mu$ L Glycogen für 1 h bei -20°C gefällt. Anschließend wurde für 15 min bei 13000 rpm und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 80%igem Ethanol gewaschen und in 20  $\mu$ L RNase/DNase-freiem Wasser resuspendiert.

10  $\mu$ L der RNA wurden revers transkribiert (siehe 2.2.3.2) und mittels qRT-PCR (siehe 2.2.3.3) analysiert und wie folgt unter Anwendung der  $2^{-\Delta C_T}$  ausgewertet (Livak and Schmittgen, 2001):

- Die spezifische Anreicherung der ZBP1-IP (Z) bezogen auf die Kontroll-IP (C) wurde berechnet;  $E1 = 2^{-(C_T^{Z-C} - C_T^C)}$
- Die spezifische Anreicherung der ZBP1-IP (Z) bezogen auf den RNA-Input (I) wurde berechnet;  $E2 = 2^{-(C_T^{Z-C} - C_T^I)}$
- Die unspezifische Bindung in der Kontroll-IP (C) bezogen auf den RNA-Input (I) wurde berechnet;  $E3 = 2^{-(C_T^{C-C} - C_T^I)}$
- Ein spezifischer Aufreinigungsindex  $F_G$  wurde für jedes Gen berechnet;  $F_G = (E1 * E2) / E3$
- Ein normalisierter Aufreinigungsindex  $F$  wurde durch Normalisierung auf den mittleren Aufreinigungsindex aller Kontrollgene  $\overline{F_G}$  berechnet;  $F = F_G / \overline{F_G}$

<b>Lysis I:</b>	<b>Lysis II:</b>	<b>Lysis III:</b>
10 mM Hepes pH 7.2-7.6	10 mM Hepes pH 7.2-7.6	10 mM Hepes pH 7.2-7.6
10 mM KCl	3 mM MgCl <sub>2</sub>	3 mM MgCl <sub>2</sub>
5 mM MgCl <sub>2</sub>	10 mM KCl	0,5 M KCl
	5% Glycerol	5% Glycerol
	0,5% NP40	0,5% NP40

### 2.2.3.6 Mikroarray-Analysen

Für die Mikroarray-Analysen wurde je eine 10 cm Petrischale mit ZBP1 spezifischen- bzw. Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurden die Zellen für 2 h mit 2,5 mM Natriumarsenat gestresst und anschließend geerntet. Aus einem Teil der Zellen wurde Proteinextrakt hergestellt und ein Western Blot gegen ZBP1 und Vinculin durchgeführt, um den Knockdown auf Proteinebene zu überprüfen. Aus den restlichen Zellen wurde Gesamt-RNA mittels TRIZOL isoliert, welche anschließend mit dem RNeasy MinElute Cleanup Kit (QIAGEN) nach Angaben des Herstellers nachgereinigt wurde. Veränderungen des RNA-Gehaltes von *β-Aktin*, *IGF-II*, *c-myc* und *CD44* wurden mittels qRT-PCR validiert.

Die Mikroarray-Analysen wurden durch die Microarray Core Facility des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) Leipzig (Medizinische Fakultät der Universität Leipzig) wie folgt durchgeführt: Die Beschaffenheit und Konzentration der RNA wurde mit Hilfe eines Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA) unter Verwendung des LabChip Kit (Agilent Technologies) nach Angaben des Herstellers untersucht. Anschließend wurde aus 5 µg Gesamt-RNA doppelsträngige cDNA unter Verwendung der Superscript II reversen Transkriptase (Superscript II, Life Technologies, Gaithersburg, MD USA) sowie oligo dT Primern, welche eine T7 RNA *polymerase promoter site* (Genset SA, Paris, France) enthielten, generiert. Die cDNA wurde durch Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und danach unter Verwendung des IVT labeling Kits (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) zu cRNA *in vitro* transkribiert. Nicht eingebaute Nukleotide wurden mittels RNeasy Kit (QIAGEN) aus der cRNA entfernt. Anschließend wurde diese fragmentiert und mit dem Affymetrix GeneChip HG133 Plus 2.0 Array hybridisiert. Der Array wurde mit dem *third generation* Affymetrix GeneChipScanner 3000 ausgelesen. Die Affymetrix GeneChip Daten repräsentieren ca. 47 000 Transkripte und decken das vollständige menschliche Genom ab. Die Daten wurden durch Dr. Krohn des IZKF unter Verwendung der MAS 5.0 *software* sowie Normalisierung auf einen Inter-Array

ausgewertet. Die vollständige Liste der unter ZBP1 Knockdown am stärksten reduzierten Transkripte befindet sich im Anhang (Tab. 6.2).

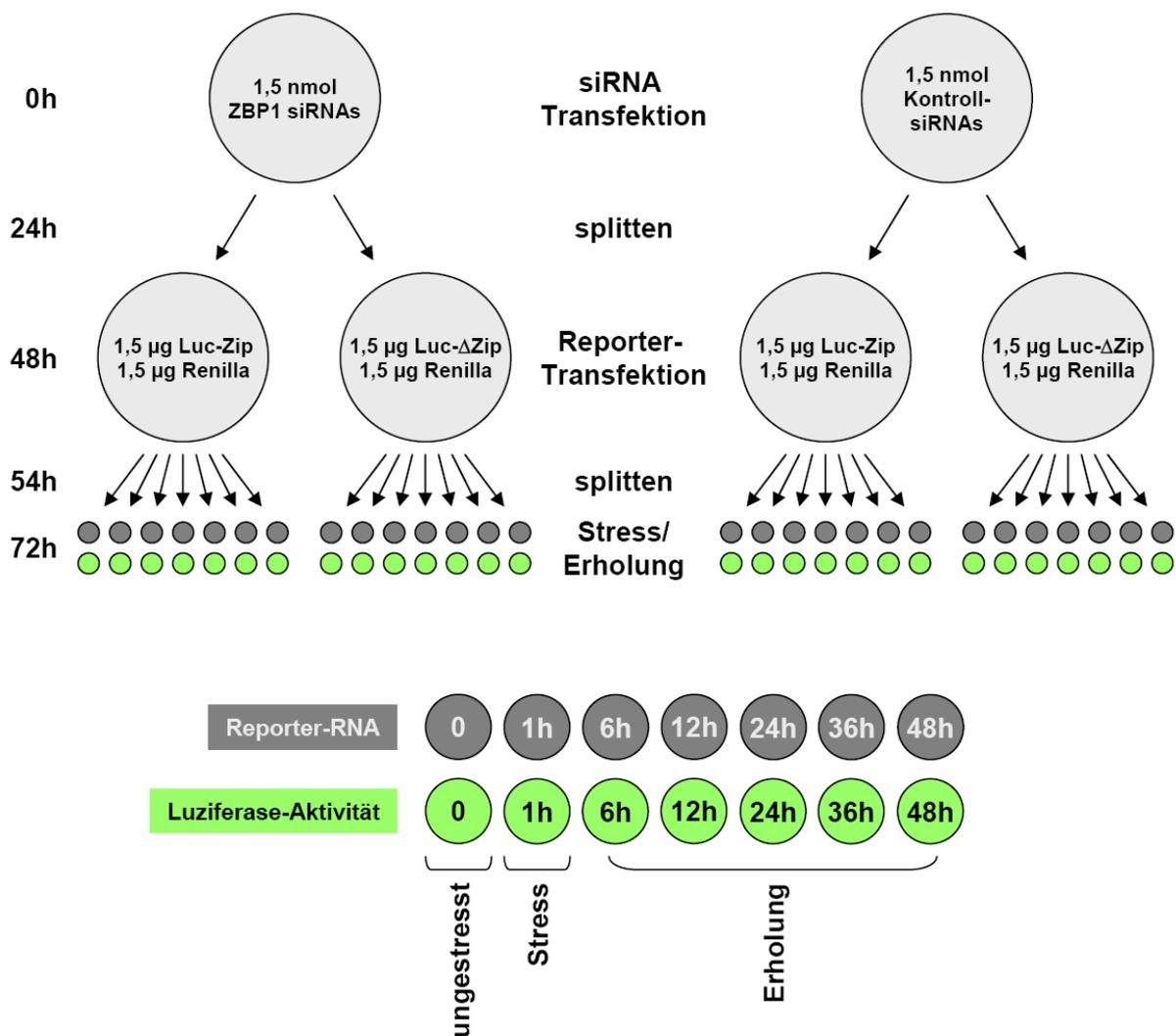
### 2.2.3.7 Stress-Erholungs-Assay

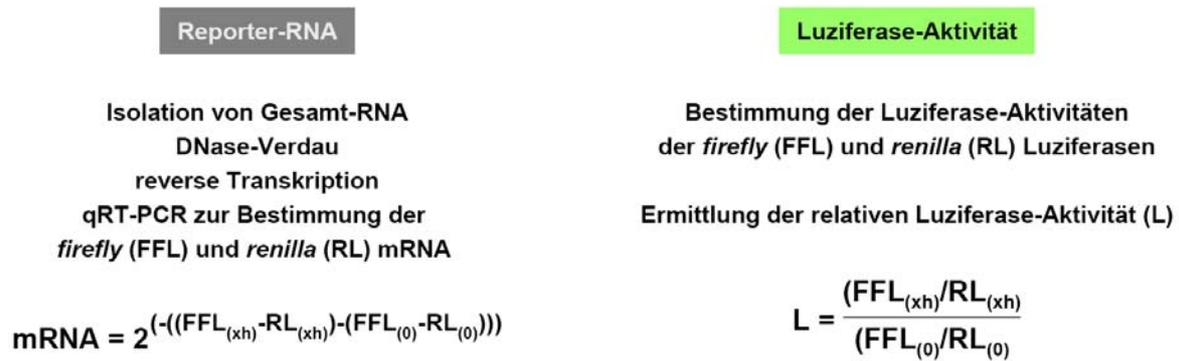
U2OS-Zellen wurden mit einer Zellzahl von jeweils  $2 \times 10^6$  in zwei 10 cm Schalen ausgesät und am Folgetag mit ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. Nach 24h wurden die Zellen zu gleichen Teilen partagiert und nach weiteren 24h mit jeweils 1,5  $\mu\text{g}$  Luc-Zip-Reporter (kodiert für *firefly* Luziferase) und *renilla* Luziferase bzw. Luc- $\Delta$ Zip-Reporter (kodiert für *firefly* Luziferase) und *renilla* Luziferase erneut transfiziert. Nach weiteren 6h wurden die Zellen in 12well-Platten umgesetzt. Hierbei wurde jede der vier Population auf 14 wells aufgeteilt. 72 h nach Transfektion der siRNAs wurde aus jeweils einem well pro Population Gesamt-RNA isoliert und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivität der *firefly* und *renilla* Luziferase bestimmt (Nullprobe). Den übrigen wells wurde für 1 h oxidativer Stress durch Zugabe von Natriumarsenat appliziert. Nach 1 h Stress wurde erneut aus jeweils einem well pro Population Gesamt-RNA isoliert und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivität der *firefly* und *renilla* Luziferase bestimmt (Stressprobe). Bei den übrigen wells wurde zur Stresserholung das Kulturmedium gewechselt. Nach 6 h, 12 h, 24 h, 36 h sowie 48 h wurde aus jeweils einem well pro Population Gesamt-RNA isoliert und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivität der *firefly* und *renilla* Luziferase bestimmt (Erholungsproben).

Gesamt-RNA wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben mittels TRIZOL isoliert. Um eine Kontamination der RNA mit Reporter-Plasmid zu vermeiden, wurde die RNA einem DNase I Verdau unterzogen. Dazu wurden 5  $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu\text{L}$  mit 5  $\mu\text{L}$  DNase I (Promega) im entsprechenden Puffer für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$  verdaut. Anschließend wurde zur Inaktivierung der DNase I 1  $\mu\text{L}$  DNase-Stop-Solution (Promega) zugegeben und der Reaktionsansatz bei  $70^\circ\text{C}$  für 10 min inkubiert. Zusätzlich wurde eine Phenol/Chloroform-Extraktion durchgeführt. Hierfür wurde das Volumen des Reaktionsansatzes mit RNase-freiem Wasser auf 200  $\mu\text{L}$  erhöht und mit 200  $\mu\text{L}$  Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol extrahiert. Zur Phasentrennung wurde 5 min bei 13000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  zentrifugiert. Die RNA wurde mit 500  $\mu\text{L}$  99%igem Ethanol, 2  $\mu\text{L}$  Glycogen und 20  $\mu\text{L}$  einer 7,5 M Ammoniumacetat-Lösung für 1 h bei  $-20^\circ\text{C}$  gefällt. Anschließend wurde die RNA für 10 min bei 13000 rpm und  $4^\circ\text{C}$  pelletiert. Das Pellet wurde mit 100  $\mu\text{L}$

80%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 30 µL RNase/DNase-freiem Wasser gelöst. Die reverse Transkription erfolgte wie unter 2.2.3.2 beschrieben. Zur Quantifizierung der mRNA-Mengen der Reporter wurde eine qRT-PCR durchgeführt (siehe 2.2.3.3). Die Auswertung erfolgte nach der in Abb. 2.1 dargestellten Formel, die *renilla* Transkriptmenge diente hierbei dem Transfektionsabgleich.

Für Messungen der Aktivitäten der *firefly* und *renilla* Luziferasen wurde das Dual-Glo™ Luziferase Assay Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurde die *renilla* Luziferase als Transfektionsabgleich verwendet. Die Auswertung erfolgte nach der in Abb. 2.1 dargestellten Formel.





**Abb. 2.1: Versuchsaufbau des Stress-Erholungs-Assays.** U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen zu gleichen Teilen partigiert. Nach 48 h erfolgte die Transfektion der Reporter-Plasmide. Nach weiteren 6 h wurden die Zellen auf 12well-Platten wie dargestellt umgesetzt. 72 h nach Transfektion der siRNAs wurde für 1h Natriumarsenat appliziert. Anschließend wurde zur Stresserholung das Medium gewechselt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde aus je einem well pro Population die RNA-Mengen und aus einem weiteren well die Luziferase-Aktivitäten bestimmt und nach den dargestellten Formeln ausgewertet.

### 2.2.3.8 Statistische Auswertungen

Soweit nicht besonders erwähnt wurden alle im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Quantifizierungen anhand mind. drei unabhängiger Experimente durchgeführt. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichungen berechnet, letztere wurden als Fehlerbalken in den einzelnen Diagrammen dargestellt. Zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der Unterschiede zweier Populationen (z.B. ZBP1 Knockdown- und Kontrollpopulation) wurden die p-Werte anhand eines zweiseitigen heteroskedastischen Student' s t-Test ermittelt. Der p-Wert bezeichnet hierbei die Wahrscheinlichkeit, mit der die beiden analysierten Populationen zur Deckung zu bringen sind. Ein p-Wert von 0.05 entspricht somit einer Wahrscheinlichkeit von 5%, dass Argumente der einen Population auch in der zweiten Population enthalten sind. Die p-Werte wurden in den Diagrammen durch "\*" dargestellt, hierbei bezeichnet \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$  sowie \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ . Wurden mehr als zwei Populationen miteinander verglichen, wie es bei den SIRT-Analysen der Fall war, wurde zusätzlich ein Anova-Test durchgeführt. Anhand des Anova-Tests wurde bestimmt, ob die Einzelanalyse mittels Student' s t-Test zulässig ist. Bei einem durch Anova ermittelten p-Wert  $< 0.05$  wurden anschließend Einzelanalysen mittels Student' s t-Test durchgeführt. Anova-Tests wurden als Box-Plots dargestellt.

## 2.2.4 Immunohistologische Methoden

### 2.2.4.1 Immunofluoreszenz

Die subzelluläre Lokalisierung von Proteinen wurde mittels Immunofluoreszenzen analysiert. Hierfür wurden U2OS-Zellen in 24well-Platten auf 12 mm Deckgläschen kultiviert und ggf. transfiziert und/oder Stress appliziert. Die Fixierung der Zellen erfolgt mit 4% PFA (Paraformaldehyd) in PBS für 20 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS für 5 min permeabilisiert. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen erfolgte eine Inkubation in 1% BSA in PBS für 1 h. Daran schloss sich eine einstündige Inkubation mit den Primärantikörpern an, welche in 1% BSA in PBS verdünnt wurden (siehe 2.1.4). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen mit den entsprechenden Sekundärantikörpern, welche an FITC-, Cy3- oder Cy5-Fluorophore gekoppelt waren und in 1% BSA in PBS verdünnt wurden, für 1 h inkubiert (siehe 2.1.4). Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt, bevor die Deckgläschen mehrmals mit PBS, zweimal mit *Aqua dest.* und zweimal mit 96%igen Ethanol zur Dehydrierung gewaschen wurden. Nach dem vollständigen Trocknen wurden die Deckgläschen unter Verwendung von Prolong-Antifade auf Objektträgern befestigt und mittels Fluoreszenzmikroskopie (TE2000 von Nikon) analysiert.

#### **10x PBS (Phosphatgepufferte Saline), pH 7.4**

**A:** 0,2 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

1,3 M NaCl

**B:** 0,2 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$

1,3 M NaCl

Lösung **A** vorlegen und mit Lösung **B** einen pH-Wert von 7.4 einstellen

### 2.2.4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Zur Visualisierung endogener mRNA wurde die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung verwendet. Hierfür wurden pro Transkript ein Gemisch aus fünf verschiedenen spezifischen DNA-Sonden verwendet, welche jeweils aus 50 Nukleotiden bestanden. Jede Sonde enthielt fünf modifizierte Thyminer, die eine Veresterung mit dem Fluorochrom Cy3 ermöglichten. Die Sonden wurden im Labor von Robert H. Singer, New York, hergestellt.

Um vor der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung eine endogene Markierung von SGs mittels Immunofluoreszenz durchführen zu können, wurde die Methode wie folgt modifiziert. Nachdem U2OS-Zellen auf Deckgläschen kultiviert und der Stressbehandlung mit Natriumarsenat unterzogen wurden, wurden sie für 30 min bei Raumtemperatur mit 4% PFA in PBS fixiert. Daran schloss sich ein weiterer Fixierungsschritt mit 1% PFA in PBS über Nacht im Kühlschrank an. Am Folgetag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und für 10 min mit 0,5% Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Für die anschließende Antikörperfärbung wurden unspezifische Bindungen für 30 min mit 1% BSA in PBS abgesättigt. Die Inkubation mit dem anti-TIAR-Antikörper erfolgte in einer Verdünnung von 1:300 in 1% BSA in PBS für 1 h. Daran schlossen sich zwei Waschschriffe mit PBS sowie die halbstündige Inkubation mit dem Sekundärantikörper an. Es wurde ein FITC-gekoppelter anti-Maus-IgG Sekundärantikörper in einer Verdünnung von 1:400 in 1% BSA in PBS verwendet. Nach dreimaligem Waschen in PBS wurde die Antikörperfärbung in 4% PFA in PBS für 30 min fixiert, da die anschließenden Behandlung im Hochsalzpuffer mit Formamid während der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung diese sonst ablösen würde. Danach wurde zweimal mit PBS und einmal mit Hybridisierungspuffer gewaschen, bevor die Deckgläschen in Hybridisierungspuffer bei 42°C für 1 h prähybridisiert wurden. Während der Prähybridisierung wurden die Sonden wie folgt präpariert:

- Lösung 1: 160 µL Formamid, 24.5 µL DEPC-Wasser, 3.6 µL 20x SSC, 2 µL Kompetitor<sup>1</sup>
- Lösung 2: 198 µL DEPC-Wasser, 50 µL 20x SSC, 2 µL BSA (20 mg/mL Stock in Wasser); wird auf Eis gehalten
- pro Deckgläschen (12 mm) wurden 10 ng Sonde mit 9.5 µL Lösung 1 gemischt, für 3 min bei 95°C denaturiert und auf Eis gekühlt
- zu der denaturierten Sonde wurden 10 µL Lösung 2 gegeben

Die prähybridisierten Deckgläschen wurden mit jeweils 20 µL der präparierten Sonde über Kopf auf Parafilm in einer feuchten Kammer über Nacht bei 37°C hybridisiert. Am Folgetag wurden die Deckgläschen zweimal für 15 min bei 37°C mit Hybridisierungspuffer gewaschen. Daran schlossen sich zwei weitere Waschschriffe mit PBS für 20-30 min bei Raumtemperatur. Nach anschließender DAPI-Färbung wurden die Deckgläschen zum Analyse, wie unter 2.2.4.1 beschrieben, auf Objektträgern fixiert.

**20x SSC:**

**Hybridisierungspuffer (frisch hergestellt):**

40 mL Formamid

12 mL 20x SSC

48 mL DEPC-Wasser

<sup>1</sup> **Kompetitor:** Gemisch aus gleichen Volumina 10mg/mL ssDNA (Sigma D-7656) und 10mg/mL tRNA (Roche 109541)

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Funktion der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress

Die ZBP Proteinfamilie besteht aus drei onkofötalen, RNA-bindenden Proteinen (Imp1-3, Nomenklatur siehe 1.1), welche die Lokalisierung, Translation und mRNA-Stabilität ihrer Zielgene modulieren (*reviewed* (Yisraeli, 2005)). In primären Neuronen reguliert ZBP1 die lokalisierte Translation der  $\beta$ -Aktin mRNA und moduliert dabei u.a. die Ausbildung von Neuriten (Huttelmaier et al., 2005). Auch die *IGF-II (insulin-like growth factor II)* mRNA wird durch ZBP1 translationell reguliert (Liao et al., 2004; Nielsen et al., 1999). Darüber hinaus kontrolliert ZBP1 die mRNA Stabilität von *CD44*,  *$\beta$ TrCP* sowie des Protoonkogens *c-myc* (Leeds et al., 1997; Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006). Um zu untersuchen, ob und in wie weit RNA-bindende Proteine wie ZBP1 auch Funktionen unter zellulärem Stress erfüllen, wurde zunächst ihre subzelluläre Lokalisierung nach Stressinduktion untersucht.

#### 3.1.1 Lokalisierung der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress

Während der zellulären Stressantwort, welche durch verschiedene Umwelteinflüsse ausgelöst werden kann, reprogrammieren Zellen ihr "Translatom". Dabei werden mRNAs, welche von Polysomen freigesetzt werden, zusammen mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (RBPs) in *stress granules* (SGs) sortiert (Anderson and Kedersha, 2002a; Kedersha and Anderson, 2002; Kedersha et al., 2005). Physiologischer Stress, infolge dessen SGs entstehen, kann durch verschiedene Stimuli wie z.B. Hitze, UV-Bestrahlung oder Intoxikation von Schwermetallen ausgelöst werden. Entscheidend für die Bildung von SGs ist dabei die Inhibierung Translation aufgrund der Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  oder der Inhibierung der RNA-Helikase eIF4A (Kedersha et al., 2002; Kedersha et al., 1999; Mazroui et al., 2006).

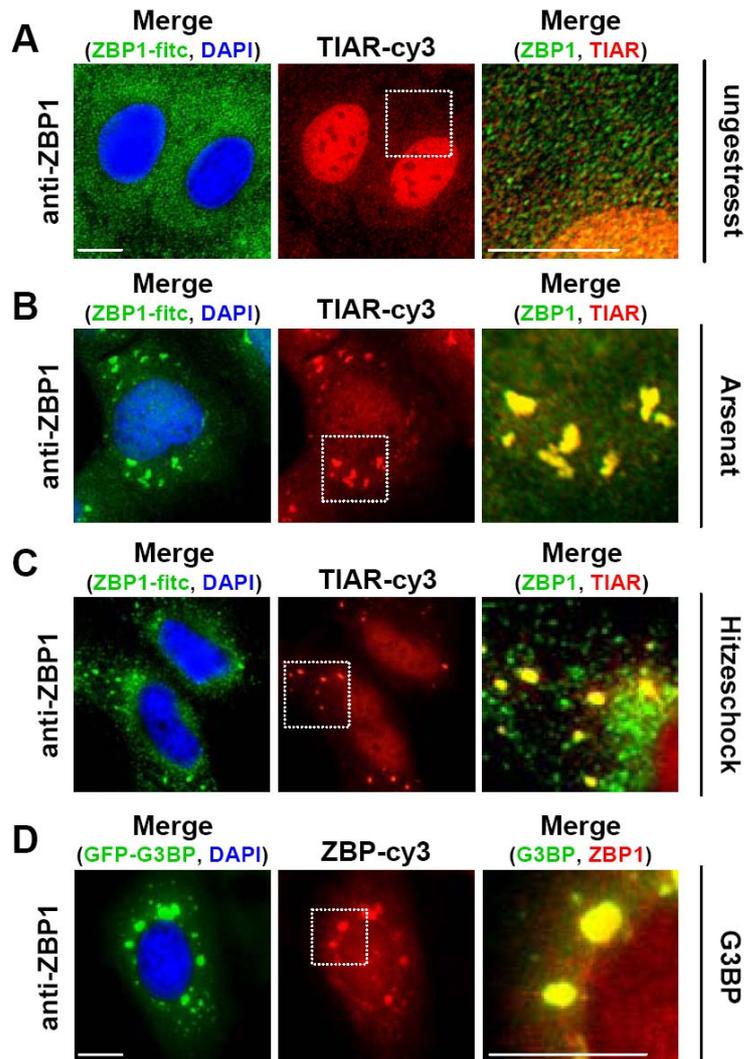
Da SGs durch verschiedene Stimuli induziert werden können und ihre Proteinzusammensetzung abhängig von der Art des Stresses, der ihre Bildung induziert, variieren kann, wurde die subzelluläre Lokalisierung von endogenem ZBP1 sowie GFP-ZBP1 in Abhängigkeit unterschiedlicher Stress-Stimuli analysiert. Darüber hinaus wurde die

Lokalisierung aller Mitglieder der ZBP Proteinfamilie unter oxidativem Stress untersucht. Da auch die Überexpression verschiedener Proteine zur SG-Bildung führt, wurde weiterhin untersucht, ob die forcierte Expression von GFP-ZBP1 SGs induzieren kann.

### **3.1.1.1 Lokalisierung von endogenen ZBP1 unter verschiedenen Stress-Stimuli**

Um die subzelluläre Verteilung von endogenem ZBP1 in nicht gestressten Zellen sowie unter verschiedenen physiologischen Stressbedingungen zu untersuchen, wurden U2OS-Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen ausgesät. Nach ca. 24 h wurde Stress appliziert. Dies erfolgte im Falle von oxidativem Stress durch die Zugabe von Natriumarsenat für 1 h. Um einen Hitzeschock auszulösen, wurden die Zellen 1 h bei 42°C inkubiert. Wurde SG-Bildung durch die Überexpression der RasGAP-assoziierten Endoribonuklease (G3BP) induziert, so wurde diese als GFP-Fusionsprotein transfiziert und 24 h überexprimiert. Die gestressten Zellpopulationen sowie eine ungestresste Kontrollpopulation wurden anschließend fixiert und immunhistochemisch mit Antikörpern gegen ZBP1 und TIAR, welches als SG-Marker diente, gefärbt. Im Falle der GFP-G3BP-Überexpression wurde ausschließlich gegen ZBP1 gefärbt.

In ungestressten Zellen liegt ZBP1 in RNP Granula vor und kolokalisiert nicht mit TIAR, welches sich unter physiologisch normalen Bedingungen vorwiegend im Zellkern befindet (Abb. 3.1 A). ZBP1 bildet keine größeren zytoplasmatischen Aggregate. Unter zellulärem Stress hingegen lokalisiert das Protein in SGs. Abb. 3.1 zeigt, dass endogenes ZBP1 sowohl unter oxidativem Stress (Abb. 3.1 B) als auch nach Hitzeschock (Abb. 3.1 C) mit TIAR in SGs kolokalisiert. Darüber hinaus wird endogenes ZBP1 in auch G3BP-induzierte SGs rekrutiert (Abb. 3.1 D). ZBP1 stellt somit eine ubiquitäre Komponente von SGs dar, da es unabhängig von der Art des Stresses in SGs lokalisiert.

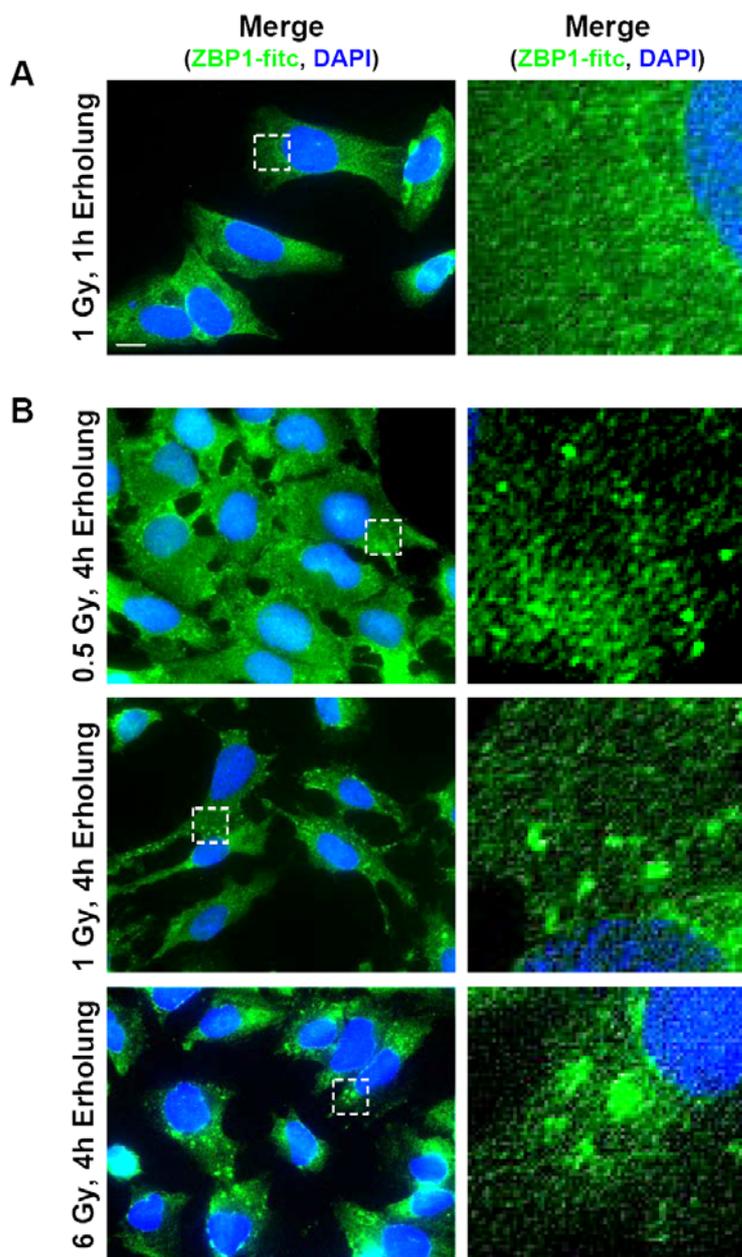


**Abb. 3.1: ZBP1 kolokalisiert mit TIAR in SGs unter verschiedenen Stress-Stimuli.** (A) In nicht gestressten Zellen liegt endogenes ZBP1 in zytoplasmatischen RNP Granula vor und kolokalisiert nicht mit dem kernständigen TIAR. (B) Nach oxidativen Stress (Arsenat) und (C) Hitzeschock kolokalisiert endogenes ZBP1 mit TIAR in SGs. (D) Endogenes ZBP1 kolokalisiert mit GFP-G3BP in G3BP-induzierten SGs. Balken 5  $\mu$ m.

Es ist bekannt, dass radioaktive Bestrahlung, welche bei der Krebstherapie eingesetzt wird, die Blutgefäße, welche den Tumor versorgen, zerstört. Die Tumorzellen sterben infolge von Unterversorgung ab. Jedoch wurde festgestellt, dass die Endothelzellen solcher Gefäße eine Resistenz gegen radioaktive Bestrahlung entwickeln können. Diese Resistenz ist u.a. auf die Sezernierung von Zytokinen wie VEGF durch den Tumor zurückzuführen, welche durch radioaktive Bestrahlung induziert wird (Gorski et al., 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass durch radioaktive Bestrahlung die im Tumor herrschende Hypoxie, welche ihrerseits SGs induzieren kann (Anderson and Kedersha, 2006), aufgehoben und der Tumor vermehrt mit Sauerstoff versorgt wird. Dadurch entsteht wiederum oxidativer Stress (Chandel et al., 1998). Das deutet darauf hin, dass infolge radioaktiver Bestrahlung die zelluläre Stressreaktion ausgelöst werden und es zur Ausbildung von SGs kommen kann.

Um zu untersuchen, ob radioaktive Bestrahlung in Dosen, wie sie bei der Krebstherapie Anwendung finden, die SG-Bildung induzieren, wurden U2OS-Zellen mit 0,5

Gy, 1 Gy sowie 6 Gy für 1 min bestrahlt. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank kultiviert, bevor sie 1 h bzw. 4 h nach Bestrahlung fixiert wurden. Abb. 3.2 zeigt, dass bereits durch Bestrahlung mit 0,5 Gy SGs entstehen. Jedoch assemblieren diese erst während einer längeren Erholungsphase. Während 1 h nach der Bestrahlung noch keine SGs erkennbar sind (Abb. 3.2 A), weisen die Zellen 4 h nach Bestrahlung mit 1 Gy eine deutliche Stressreaktion auf (Abb. 3.2 B).

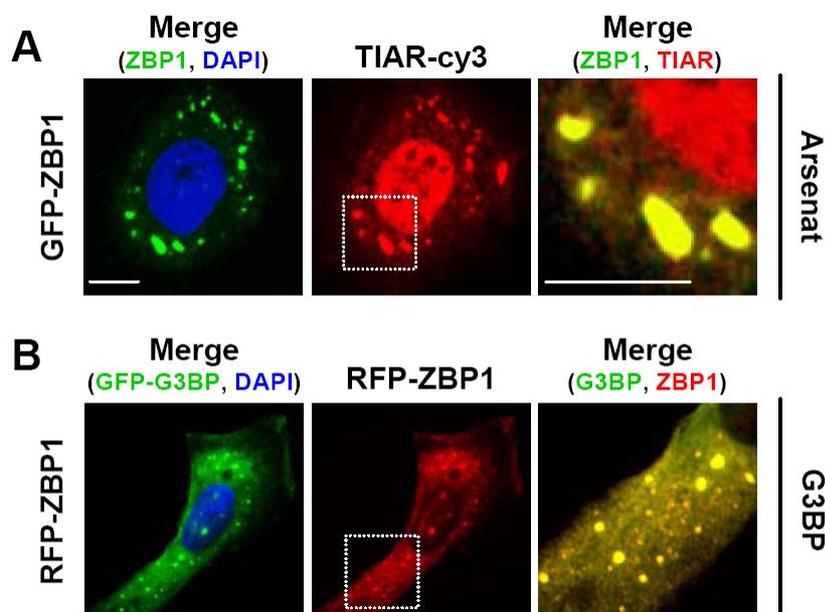


**Abb. 3.2 Radioaktive Bestrahlung induziert SG-Bildung.** U2OS-Zellen wurden für 1 min mit 0,5 Gy, 1 Gy bzw. 6 Gy bestrahlt und anschließend für 1 h (A) bzw. 4 h (B) im Brutschrank kultiviert, ehe sie fixiert und mit Antikörpern gegen ZBP1 gefärbt wurden. Während 1 h nach Bestrahlung noch keine SGs zu finden sind, wurde 4 h nach Bestrahlung eine Stressreaktion beobachtet. ZBP1 lokalisierte in SGs, welche durch radioaktive Bestrahlung induziert wurden. Balken 5 µm.

### 3.1.1.2 Lokalisierung von exogenem ZBP1 unter zellulärem Stress

Um auszuschließen, dass es sich bei der immunhistochemischen Färbung von endogenem ZBP1 um Artefakt handelt, wurde zusätzlich die subzelluläre Verteilung von GFP-ZBP1 bzw. RFP-ZBP1 unter verschiedenen Stressbedingungen untersucht. Dazu wurde in U2OS-Zellen GFP-ZBP1 transfiziert. Oxidativer Stress wurde 24 h nach Transfektion durch die Zugabe von Arsenat appliziert, bevor die Zellen fixiert und die SG-Bildung durch Färbung gegen TIAR überprüft wurde. Wie erwartet kolokalisiert GFP-ZBP1 mit TIAR in SGs unter oxidativem Stress (Abb. 3.3 A). Ein ähnliches Bild zeichnete sich auch unter Hitzeschock ab. Hier wurde ebenfalls eine Kolokalisierung von GFP-ZBP1 mit TIAR in SGs beobachtet, welche durch Hitzeschock induziert wurden (Daten nicht gezeigt).

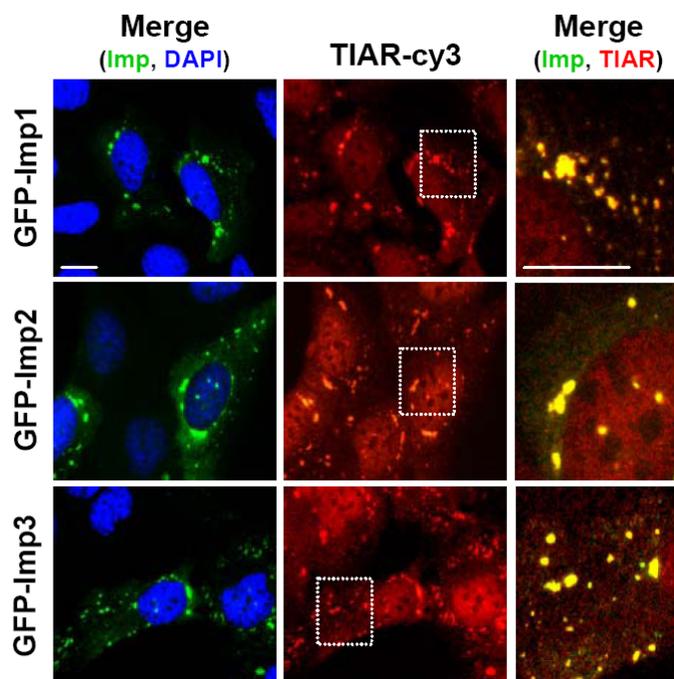
Darüber hinaus wurde die Rekrutierung von RFP-ZBP1 in G3BP-induzierte SGs untersucht. Hierfür wurde GFP-G3BP und RFP-ZBP1 in U2OS-Zellen überexprimiert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI markiert. Wie bereits für das endogene Protein beobachtet, kolokalisiert auch RFP-ZBP1 mit GFP-G3BP in G3BP-induzierten SGs (Abb. 3.3 B). Die Daten belegen, dass sowohl endogenes ZBP1 als auch überexprimierte ZBP1-Fusionsproteine ubiquitäre SG-Komponenten sind, die unabhängig von der Art des applizierten Stresses in SGs lokalisieren.



**Abb. 3.3: Exogenes ZBP1 lokalisiert in SGs.** (A) GFP-ZBP1 kolokalisiert mit TIAR in SGs unter oxidativem Stress. U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Arsenat gestresst. SGs wurden mit TIAR gefärbt. (B) RFP-ZBP1 kolokalisiert mit GFP-G3BP in G3BP-Granula. U2OS-Zellen wurden mit GFP-G3BP und RFP-ZBP1 kotransfiziert. Nach 24 h fixiert, permeabilisiert und die Zellkerne mit DAPI markiert. Balken 5  $\mu$ m.

### 3.1.1.3 Lokalisierung von Imp1-3 unter oxidativem Stress

Die Lokalisierung der anderen Mitglieder der ZBP Proteinfamilie (Imp1-3) wurde mittels Überexpression entsprechender GFP-Fusionsproteine untersucht, da keine Antikörper erhältlich sind, welche spezifisch für ein einzelnes Familienmitglied sind. U2OS Zellen wurden dazu mit dem entsprechenden GFP-Konstrukt transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress appliziert und die SG-Bildung durch eine Antikörper-Färbung gegen TIAR überprüft. Abb. 3.4. zeigt, dass alle drei Familienmitglieder unter oxidativem Stress mit TIAR in SGs kolokalisieren. Somit ist die Lokalisierung in SGs eine allen Familienmitgliedern gemeinsame Eigenschaft.

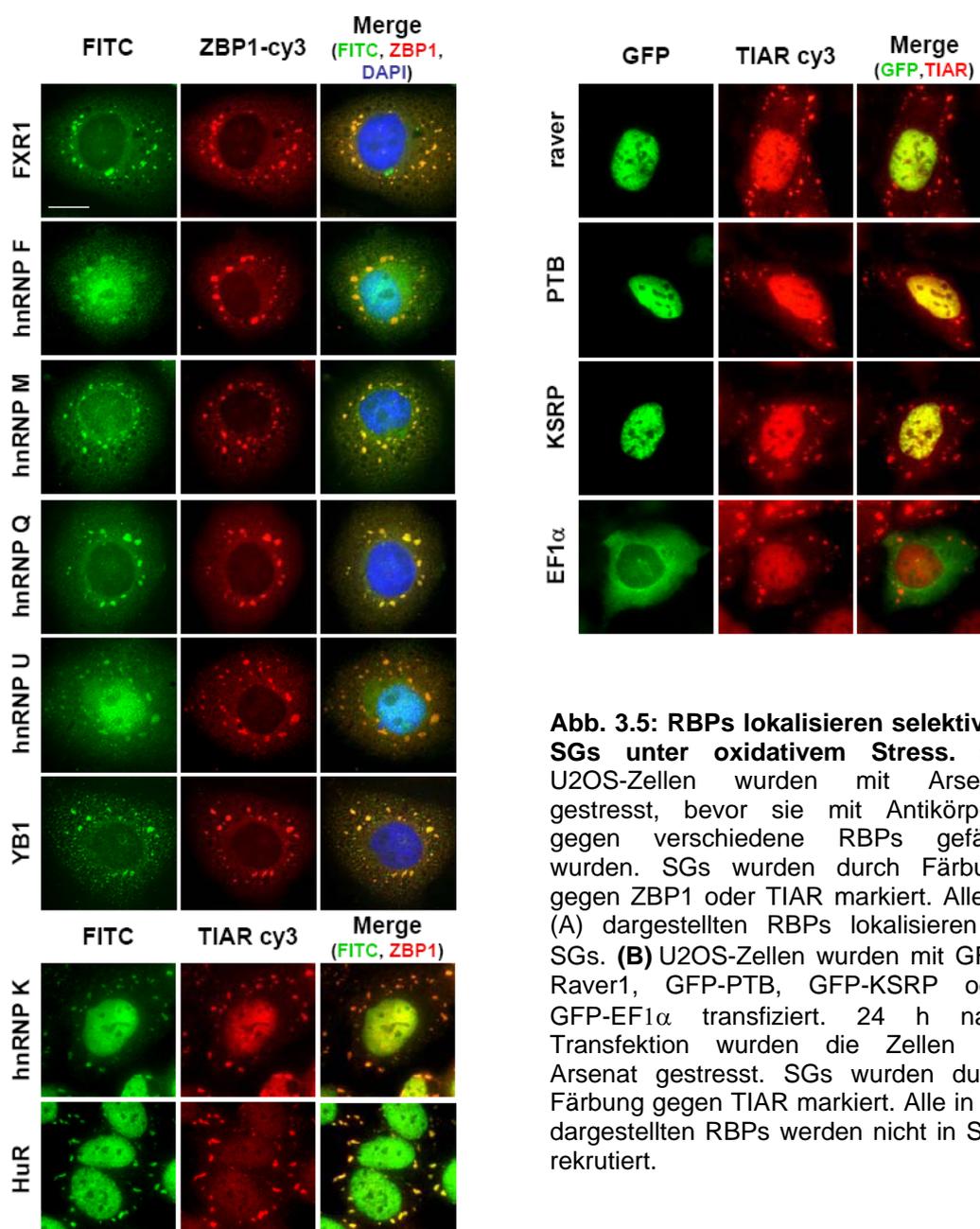


**Abb. 3.4: GFP-Imp1-3 kolokalisieren mit TIAR in SGs nach oxidativem Stress.** U2OS-Zellen wurden mit GFP-Imp1-3 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress durch Zugabe von Arsenat appliziert. SGs wurden mit anti-TIAR gefärbt. Balken 5  $\mu$ m.

### 3.1.1.4 Lokalisierung anderer RBPs unter oxidativem Stress

Um zu untersuchen, ob die SG-Lokalisierung unter zellulärem Stress eine generelle Eigenschaft von RBPs ist oder aber hinter einer selektiven Lokalisierung eine spezifische Funktion vermutet werden kann, wurden verschiedene RBPs hinsichtlich ihrer subzellulären Verteilung unter oxidativem Stress untersucht. Unter ihnen befanden sich auch Proteine wie hnRNP Q (Syncrip), hnRNP U oder YB1, welche in ungestressten Zellen Teil des jüngst identifizierten ZBP1 enthaltenden RNA-*granules* sind (Jonson et al., 2007). In Abb. 3.5 ist zu

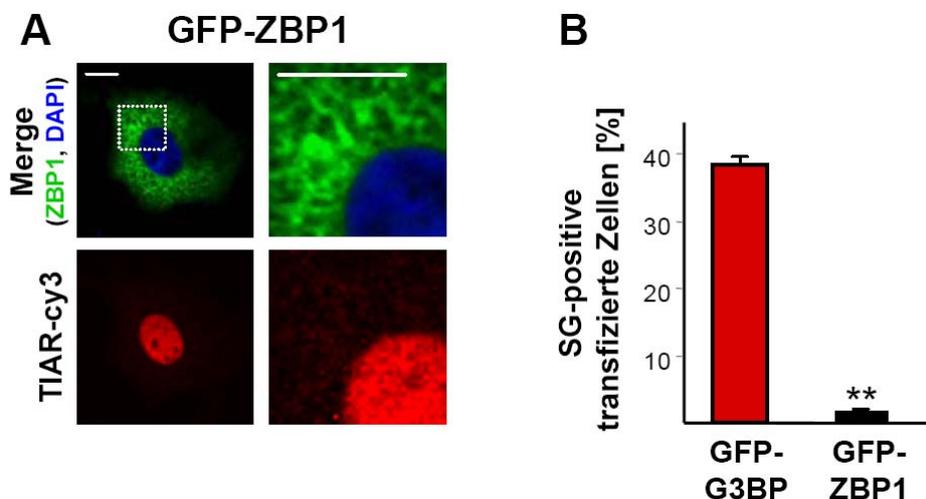
sehen, dass alle untersuchten hnRNPs sowie FXR1, YB1 und HuR in SGs rekrutiert werden (Gallouzi et al., 2000), während raver, PTB, KSRP oder EF1 $\alpha$  nicht in diesen Strukturen zu finden waren. Das deutet darauf hin, dass SGs zumindest eine ähnliche Zusammensetzung besitzen wie RNPs ungestresster Zellen, da zum einen dieselben Proteine, welche in ungestressten Zellen gemeinsam in RNP-Komplexen vorliegen (ZBP1, hnRNP Q, hnRNP U und YB1), in SGs lokalisieren, und zum anderen auch Proteine rekrutiert werden, die in ungestressten Zellen dieselbe mRNA stabilisieren (Bsp. ZBP1 und HuR stabilisieren die *c-myc* mRNA). Demgegenüber ist die SG-Rekrutierung jedoch keine generelle Eigenschaft von RBPs, da z.B. Proteine wie raver, PTB, KSRP oder auch EF1 $\alpha$  nicht in SGs lokalisieren.



**Abb. 3.5: RBPs lokalisieren selektiv in SGs unter oxidativem Stress.** (A) U2OS-Zellen wurden mit Arsenat gestresst, bevor sie mit Antikörpern gegen verschiedene RBPs gefärbt wurden. SGs wurden durch Färbung gegen ZBP1 oder TIAR markiert. Alle in (A) dargestellten RBPs lokalisieren in SGs. (B) U2OS-Zellen wurden mit GFP-Raver1, GFP-PTB, GFP-KSRP oder GFP-EF1 $\alpha$  transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Arsenat gestresst. SGs wurden durch Färbung gegen TIAR markiert. Alle in (B) dargestellten RBPs werden nicht in SGs rekrutiert.

### 3.1.1.5 Die Überexpression von GFP-ZBP1 induziert keine SG-Bildung

Es ist bekannt, dass die Überexpression von Proteinen wie TIA-1 und G3BP die SG-Bildung induziert (Kedersha et al., 1999; Tourriere et al., 2003). Dies geschieht vermutlich durch Autoaggregation, welche über "prionenartige Strukturen" im C-terminalen Bereich dieser Proteine vermittelt wird. Um zu untersuchen, ob auch ZBP1 in der Lage ist, eine SG-Bildung zu induzieren, wurde das Protein als GFP-Fusion in U2OS-Zellen überexprimiert. Vergleichend dazu wurde in einem zweiten Experiment GFP-G3BP überexprimiert. Die Zellen wurden 48 h nach Transfektion fixiert und die SG-Bildung mittels TIAR-Färbung charakterisiert und quantifiziert. Obwohl GFP-ZBP1 transfizierte Zellen nach 48-stündiger Überexpression granuläre zytoplasmatische Strukturen aufwiesen, wurden keine transfizierten Zellen identifiziert, welche TIAR-positive SGs enthielten (Abb. 3.6 A). Dem gegenüber waren in der Kontrollpopulation, in welcher GFP-G3BP überexprimiert wurde, in ca. 38 % der transfizierten Zellen große TIAR-positive SGs zu finden (Abb. 3.5 B, Quantifizierung). Somit stellt ZBP1 ein RBP dar, welches zwar ubiquitär in SGs rekrutiert wird, jedoch selbst keine SG-Bildung induzieren kann.

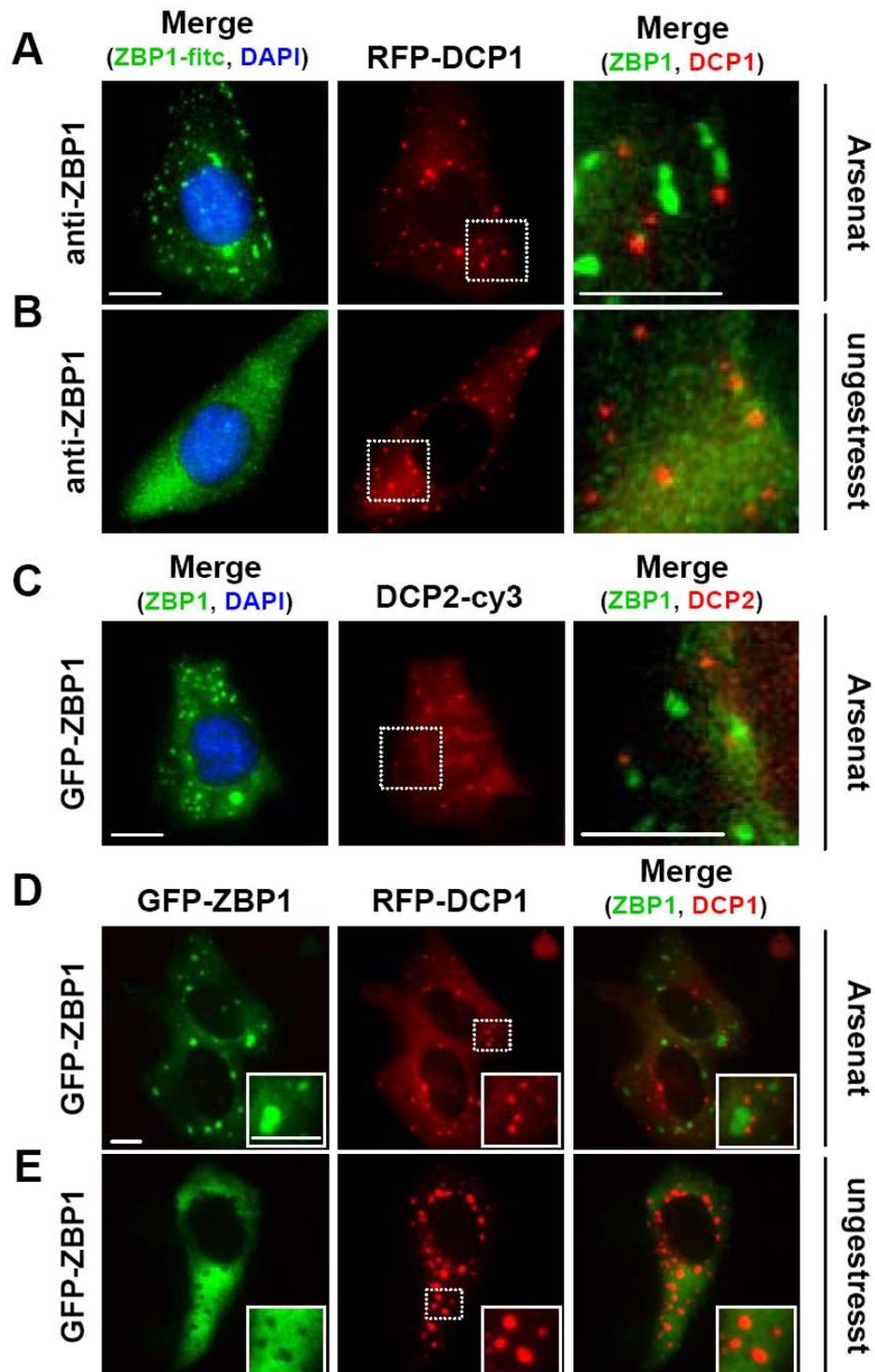


**Abb. 3.6: GFP-ZBP1 Überexpression induziert keine SG-Bildung.** U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 **(A)** oder GFP-G3BP transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen fixiert. Die SG-Bildung wurde durch TIAR-Färbung überprüft. Balken 5  $\mu$ m. **(B)** Transfizierte Zellen wurden gezählt (n=100). Das Diagramm zeigt den Anteil der transfizierten Zellen mit TIAR-positiven SGs. Fehlerbalken repräsentieren Standardabweichungen aus zwei unabhängigen Transfektionen. \*\*,  $p \leq 0.005$ .

### 3.1.1.6 ZBP1 wird nicht *processing bodies* (PBs) rekrutiert

Um zu untersuchen, ob sich die putative Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress auf SGs beschränkt oder möglicherweise auch *processing bodies* (PBs) involviert, welche eine wichtige Funktion im mRNA-Abbau besitzen und unter zellulärem Stress vergrößert sind, wurde die Lokalisierung von ZBP1 auch im Hinblick auf PBs sowohl in gestressten als auch in ungestressten U2OS-Zellen untersucht. Eine der Hauptkomponenten von PBs sind die *decapping*-Enzyme DCP1a, DCP1b und DCP2, welche die *cap*-Struktur von mRNAs entfernen, bevor es zum 5' → 3' gerichteten mRNA-Abbau durch die Exonuklease Xrn1 kommt. RFP-DCP1 wurde in den folgenden Experimenten zur PB-Markierung verwendet. Um PBs endogen zu visualisieren, wurde ein Antikörper gegen DCP2 verwendet (Meyer et al., 2004).

Abb. 3.7 zeigt die subzelluläre Verteilung von endogenem ZBP1 und GFP-ZBP1 in gestressten und nicht-gestressten Zellen im Vergleich zu DCP1 bzw. DCP2 markierten PBs. Es ist zu sehen, dass weder endogenes noch GFP-ZBP1 unter oxidativem Stress in PBs lokalisiert. Diese Beobachtung war unabhängig davon, ob PBs durch Überexpression von RFP-DCP1 oder endogen mittels DCP2-Antikörper markiert wurden. Auch in ungestressten Zellen wurde ZBP1 nicht in RFP-DCP1 positiven PBs detektiert. Die Daten zeigen, dass ZBP1 unter zellulärem Stress ausschließlich in SGs jedoch nicht in PBs lokalisiert und legen damit eine SG-spezifische Funktion für ZBP1 nahe.



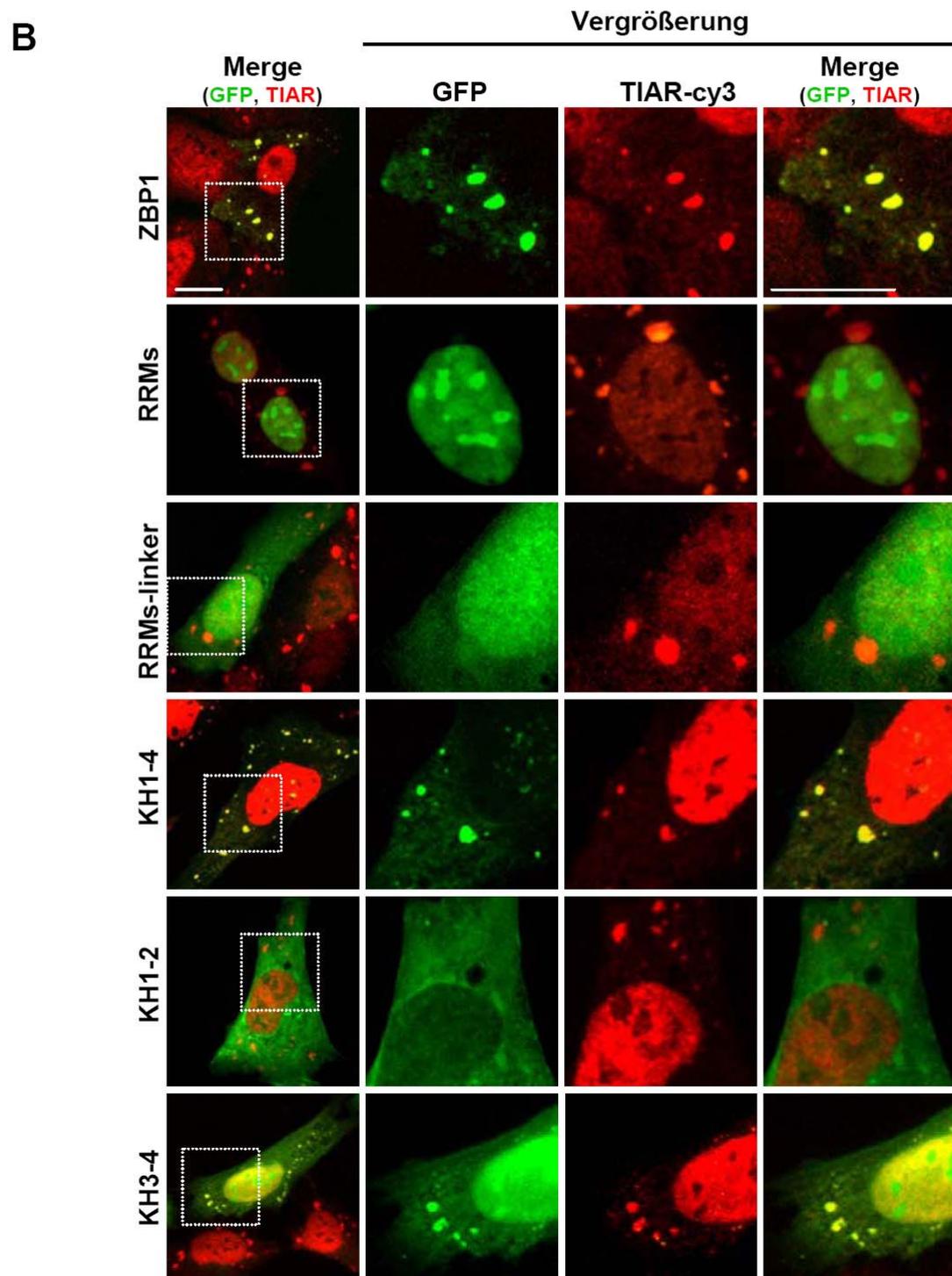
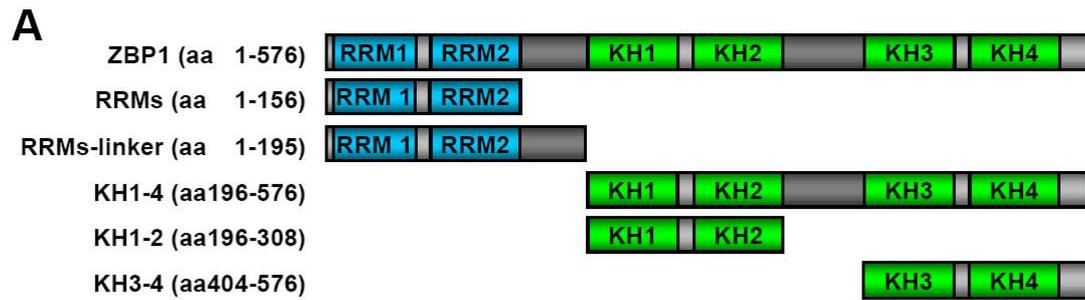
**Abb. 3.7: ZBP1 lokalisiert nicht in PBs.** (A+B) U2OS-Zellen wurden mit RFP-DCP1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen ggf. mit Arsenat gestresst und mit einem ZBP1-Antikörper gefärbt. (A) zeigt die Lokalisierung von endogenem ZBP1 in SGs unter oxidativer Stress. (B) zeigt die Lokalisierung von endogenem ZBP1 in ungestressten Zellen. (C) U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 transfiziert und nach 24 h mit Arsenat gestresst, bevor PBs mit anti-DCP2 gefärbt wurden. (D+E) U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 und RFP-DCP1 transfiziert. (D) zeigt die Lokalisierung von GFP-ZBP1 unter oxidativem Stress. (E) zeigt die Lokalisierung von GFP-ZBP1 in ungestressten Zellen. Weder endo- noch exogenes ZBP1 kolokalisieren mit DCP1 oder DCP2 in PBs. Balken 5  $\mu$ m.

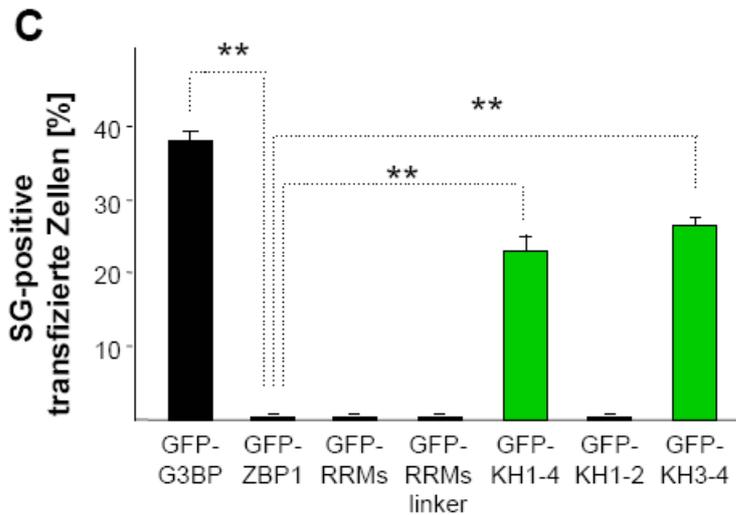
### 3.1.1.7 Die KH-Domänen drei und vier sind für die SG-Rekrutierung von ZBP1 essentiell

Um Hinweise darüber zu erhalten, wie ZBP1 in SGs fungiert, ist es von Bedeutung zu wissen, welche Domänen für dessen SG-Rekrutierung essentiell sind. Grundsätzlich könnte ein Protein auf zweierlei Arten in SGs transportiert werden – entweder wird ein Protein direkt z.B. über Transportproteine in SGs sortiert oder aber es wird über die Assoziation mit einer mRNA indirekt in SGs rekrutiert. Da es sich bei ZBP1 um ein RNA-bindendes Protein handelt, liegt die Vermutung nahe, dass ZBP1 durch Assoziation mit *target*-mRNAs in SGs transportiert wird. Um die SG-Rekrutierung näher zu charakterisieren, wurden ZBP1-Deletionsfragmente (Abb. 3.8 A) als GFP-Fusionsproteine überexprimiert und hinsichtlich ihrer subzellulären Verteilung nach oxidativem Stress untersucht.

Die beiden Deletionsfragmente, welche die RRM-Domänen von ZBP1 enthalten (RRMs bzw. RRM<sub>s</sub>-linker) waren auch unter oxidativem Stress vorwiegend im Nukleus lokalisiert, wobei RRM<sub>s</sub>-linker zusätzlich schwach im Zytoplasma zu finden war. Die Kernlokalisierung begründet sich möglicherweise in einem putativen NLS (*nuclear localization signal*), das sich zwischen den beiden RRMs befindet. Beide Fragmente lokalisierten nicht in SGs (Abb. 3.8 B). Erwartungsgemäß induzierte die Überexpression von RRMs und RRM<sub>s</sub>-linker auch nicht die SG-Bildung (Abb. 3.8 C, Quantifizierung).

Für das Fragment, welches alle vier KH-Domänen enthält (KH1-4), wurde unter normalen physiologischen Bedingungen ein ähnliches Verhalten beschrieben wie für Wildtyp-ZBP1 (Farina et al., 2003). Dies ist auch unter Stress zu beobachten. KH1-4 lokalisiert vorwiegend zytoplasmatisch und kolokalisiert mit TIAR in SGs (Abb. 3.8 B). Im Gegensatz zu Wildtyp-ZBP1 wurde allerdings für KH1-4 in ca. 25% der transfizierten Zellen eine Induktion der SG-Bildung beobachtet (Abb. 3.8 C, Quantifizierung). SG-Lokalisierung und -Induktion wurde in ähnlichem Maße auch für das Fragment bestehend aus den letzten beiden KH-Domänen (KH3-4) beobachtet (Abb. 3.8 B und C). Im Gegensatz zu KH1-4 wurde jedoch für KH3-4 zudem eine starke Kernlokalisierung beobachtet. Dies lässt sich zum einen durch die geringe Größe des Fragmentes KH3-4 (GFP-KH3-4 ca. 45 kDa) zu anderen durch ein putatives NLS am C-Terminus begründen. Dem gegenüber lokalisierte KH1-2 zwar hauptsächlich zytoplasmatisch, wies jedoch weder SG-Lokalisierung noch -Induktion auf.





**Abb. 3.8: Lokalisierung von ZBP1-Deletionsfragmenten unter oxidativem Stress. (A)** Schematische Darstellung der Domänen von ZBP1 sowie der verwendeten ZBP1-Deletionsfragmente. **(B)** ZBP1 sowie ZBP1-Deletionsfragmente wurden als GFP-Fusion überexprimiert. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress appliziert. SG-Bildung wurde durch TIAR-Färbung visualisiert. Wildtyp-ZBP1 sowie Fragmente, die KH3-4 enthalten, lokalisieren in SGs. Balken 5  $\mu$ m. **(C)** Die Überexpression von KH1-4 und KH3-4 induziert die SG-

Bildung. SG-positive Zellen wurden ausgezählt ( $n=100$ ). Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus zwei unabhängigen Transfektionen. \*\*,  $p \leq 0.005$ .

Die Ergebnisse korrelieren mit den von Farina und Kollegen publizierten Daten, wonach KH1-4 und KH3-4 eine ähnlich hohe Bindungsaffinität zu RNA aufweisen wie Wildtyp-ZBP1 (Farina et al., 2003). Die RNA-Affinität von KH3-4 lag hierbei um ein Vielfaches höher als die von KH1-2. Zusammenfassend lässt sich somit vermuten, dass die RNA-bindenden Domänen für die Rekrutierung von ZBP1 in SGs notwendig und hinreichend sind. Daraus kann man schließen, dass das Protein wahrscheinlich durch die Assoziation mit seinen *target*-mRNAs in SGs rekrutiert wird.

Darüber hinaus konnte durch Quantifizierung der SG-positiven Zellen nachgewiesen werden, dass Wildtyp-GFP-ZBP1 nicht die SG-Bildung induziert, wohl aber die Deletionsfragmente GFP-KH1-4 und GFP-KH3-4. Die könnte darauf hindeuten, dass eine intramolekulare Regulation die SG-Induktion durch GFP-ZBP1 inhibiert. In Deletionsfragmenten, welche die für die Oligomerisierung von ZBP1 notwendigen Sequenzmotive enthalten, scheint diese Inhibierung möglicherweise durch Deletion der N-terminalen RRM's aufgehoben zu sein.

### 3.1.2 Lokalisierung verschiedener mRNAs unter zellulärem Stress

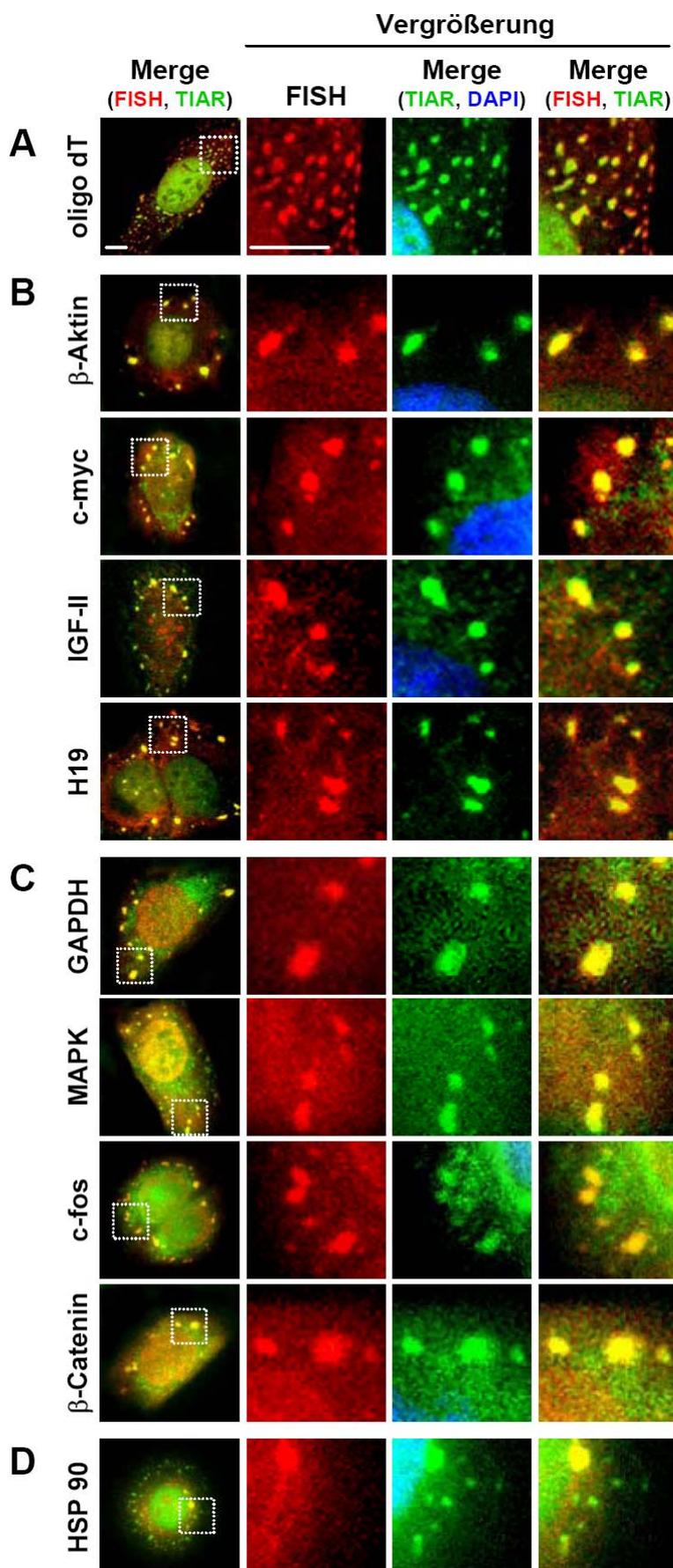
Als Antwort auf verschiedene Umwelteinflüsse reprogrammieren Zellen ihre Translationsmaschinerie und sortieren mRNAs in SGs. Kommt es infolge von zellulärem Stress zum Erliegen der Translationsinitiation, aggregieren mRNAs, welche aus Polysomen freigesetzt werden, zu SGs. Hierfür wird ein unspezifischer Mechanismus postuliert, welcher die Mehrheit zytoplasmatischer mRNA involviert (Kedersha and Anderson, 2002). Dennoch existieren Mechanismen, welche regulieren, dass z.B. mRNAs, die unter Stress vermehrt translatiert werden wie HSP kodierende Transkripte, nicht in SGs akkumulieren. Hierbei stellt sich die Frage, ob und inwieweit RBPs die Lokalisierung von mRNAs in SGs beeinflussen können.

#### 3.1.2.1 Die Mehrheit zytoplasmatischer mRNAs wird in SGs rekrutiert

Um auf eine putative Funktion von ZBP1 in SGs schließen zu können, wurde die zytoplasmatische Verteilung verschiedener ZBP1 *target*-mRNAs mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) unter oxidativem Stress untersucht. Hierfür wurde eine Methode entwickelt, welche eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung nach vorheriger Immunmarkierung endogener Proteine erlaubt. Der bei der *in situ* Hybridisierung verwendete Hochsalzpuffer und das Formamid beeinträchtigen vorausgegangene immunhistochemische Färbungen signifikant. Durch zusätzliche Fixierungsschritte gelang es, zuvor durchgeführte Immunmarkierungen so zu konservieren, dass eine gleichzeitige Visualisierung von endogenem Protein und endogener RNA möglich wurde (siehe dazu 2.2.4.2).

In Abb. 3.9 sind Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen mit verschiedenen Sonden nach vorheriger Immunmarkierung von SGs mit anti-TIAR dargestellt. Abb. 3.9 A zeigt die Hybridisierung mittels oligo dT-Sonde, welche verdeutlicht, dass die Mehrheit zytoplasmatischer polyadenylierter mRNAs nach Stressinduktion in SGs lokalisiert. In Abb. 3.9 B sind die ZBP1 RNA-Liganden  $\beta$ -Aktin, *c-myc*, *IGF-II* und H19 dargestellt, welche ebenfalls in SGs rekrutiert werden. Hierbei ist zu bemerken, dass die H19 RNA, obwohl vollständig prozessiert und polyadenyliert, nicht translatiert wird, da die RNA keinen ORF besitzt (Runge et al., 2000). Dennoch ist diese RNA in SGs zu finden. Die Lokalisierung von

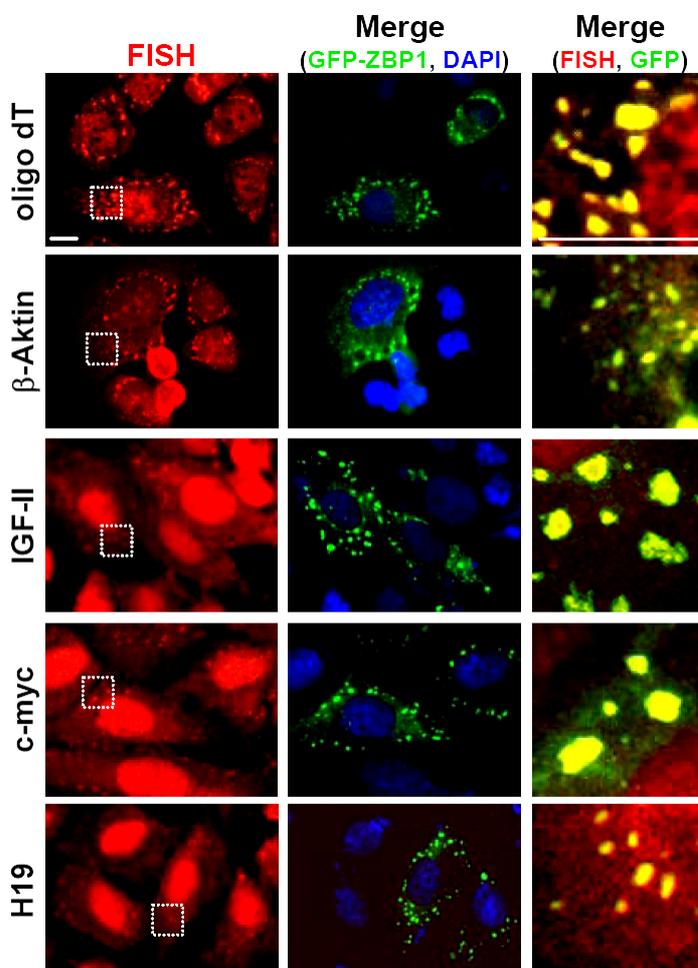
H19 in SGs lässt darauf schließen, dass die Fähigkeit einer RNA, translatiert zu werden, offenbar nicht für deren SG-Lokalisierung erforderlich ist.



**Abb. 3.9 Lokalisierung verschiedener mRNAs unter oxidativem Stress.** U2OS-Zellen wurden mit Arsenat gestresst. SGs wurden mit anti-TIAR markiert. Die Immunmarkierung der SGs wurde fixiert, bevor die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) durchgeführt wurde. **(A)** Die Mehrheit zytoplasmatischer poly(A)<sup>+</sup> mRNA lokalisiert in SGs (oligo dT Sonde). **(B)** die ZBP1 Liganden  $\beta$ -Aktin, c-myc, IGF-II und H19 lokalisieren in SGs. **(C)** mRNAs, die nicht durch ZBP1 reguliert werden, lokalisieren in SGs (GAPDH, MAPK, c-fos,  $\beta$ -Catenin). **(D)** HSP90 mRNA, welche unter Stress translatiert wird, ist kaum in SGs zu beobachten. Balken 2.5  $\mu$ m.

In Abb. 3.9 C ist die Lokalisierung von *GAPDH*, *MAPK*, *c-fos* und  $\beta$ -*Catenin* zu sehen, welche unter oxidativem Stress ebenfalls in SGs lokalisieren. Die einzige mRNA, welche im Rahmen dieser Studie nur vereinzelt in SGs zu finden war, ist die *HSP90* mRNA (Abb. 3.9 D). Allgemein wird angenommen, dass mRNAs, welche für HSPs (Hitzeschockproteine) kodieren, unter Stress bevorzugt translatiert werden, weshalb eine Lokalisierung in translationsinkompetente SGs nicht zu erwarten ist (Anderson and Kedersha, 2002b; Nover et al., 1989). Die *HSP90* mRNA wurde nur in einigen wenigen Zellen in SGs und dann auch nur in einem einzelnen großen *granule* pro Zelle gefunden, was neben einer geringen Rekrutierung der RNA in SGs besonders auf einen schnellen SG-Transit hindeutet.

ZBP1 und seine Liganden  $\beta$ -*Aktin*, *c-myc*, *IGF-II* und auch die untranslatierte *H19* RNA lokalisieren infolge zellulären Stresses in SGs. Um die zu erwartende Kolokalisation des Proteins mit seinen *target*-mRNAs zu untersuchen und darüber hinaus die FISH-Daten des vorausgegangenen Experimentes unabhängig zu überprüfen, wurde eine weitere *in situ* Hybridisierung durchgeführt, für welche die Zellen zuvor mit GFP-ZBP1 transfiziert wurden. Wie erwartet wurde eine Kolokalisation von GFP-ZBP1 mit allen untersuchten mRNAs in SGs unter oxidativem Stress beobachtet (Abb. 3.10).



**Abb. 3.10: Kolokalisation von GFP-ZBP1 mit *target*-mRNAs in SGs.** U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Arsenat gestresst und fixiert. Anschließend wurde FISH mit Sonden gegen poly(A)<sup>+</sup> RNA (oligo dT) sowie  $\beta$ -*Aktin*, *IGF-II*, *c-myc* und *H19* durchgeführt. Alle untersuchten RNAs sowie poly(A)<sup>+</sup> RNA kolokalisieren mit GFP-ZBP1 in SGs. Balken 5  $\mu$ m.

Diese Lokalisierungsstudien legen nahe, dass ZBP1 während der zellulären Stressantwort zusammen mit der Mehrheit der polyadenylierten mRNAs, unter denen sich auch ZBP1-Liganden befinden, in SGs rekrutiert wird. Vermutlich ist ZBP1 dabei jedoch nicht an der SG-Rekrutierung seiner RNA-Liganden beteiligt, da auch nicht mit ZBP1 assoziierte mRNAs unter Stress in SGs lokalisieren (Bsp. *GAPDH*, *MAPK*, *c-fos* und *β-Catenin*). Vielmehr ist zu erwarten, dass das Protein durch seine Liganden rekrutiert wird. Der Prozess der RNA-Rekrutierung scheint zudem eher unspezifisch zu sein, da die Mehrheit zytoplasmatischer mRNAs in SGs vorliegt und es für die Rekrutierung einer RNA nicht notwendig zu sein scheint, dass diese translatiert werden kann (Bsp. H19). Demgegenüber gibt es offenbar Regulationsmechanismen, die eine geringfügige Rekrutierung oder aber einen schnellen Transit bestimmter RNAs wie z.B. der unter Stress translatierten *HSP70* oder *HSP90* mRNA ermöglichen (Kedersha and Anderson, 2002).

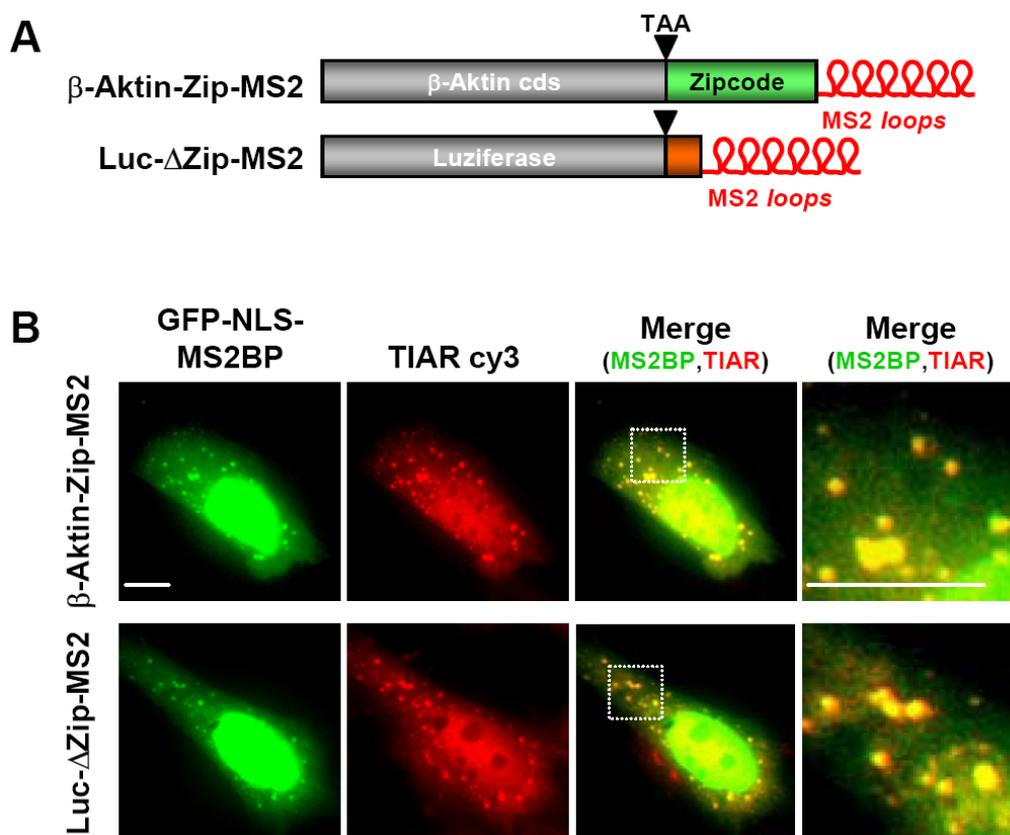
### **3.1.2.2 Exogene Reporter-mRNAs lokalisieren in SGs unabhängig von *cis*-agierenden Elementen**

Wäre die Rekrutierung von RNAs in SGs in der Tat ein unspezifischer Prozess, welcher eine Vielzahl zytoplasmatischer mRNAs gleichermaßen involviert, so würde man erwarten, dass die Lokalisierung einer mRNA unabhängig von spezifischen *cis*-agierenden Elementen abläuft. Um die mögliche Abhängigkeit der SG-Rekrutierung spezifischer mRNAs von spezifischen *cis/trans*-Interaktionen zu untersuchen, wurden zwei verschiedene exogene Reporter-mRNAs hinsichtlich ihrer subzellulären Verteilung unter Stress analysiert.

Das erste Reporter-Konstrukt kodiert für das  $\beta$ -Aktin Protein und enthält zusätzlich die ersten 233 Nukleotide des  $\beta$ -Aktin-3'UTRs ( $\beta$ -Aktin-Zip-MS2, siehe Abb. 3.11 A). In diesem Bereich befinden sich die beiden Zipcodes, welche die ZBP1-Bindungsstellen darstellen (Huttelmaier et al., 2005; Ross et al., 1997). Der zweite Reporter kodiert für eine Luziferase und enthält nur den kurzen artifiziellen 3'UTR des pcDNA3.1 Vektors, ist aber ebenso wie der  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2 Reporter polyadenyliert (Luc- $\Delta$ Zip-MS2, siehe Abb. 3.11 A). Der Luc- $\Delta$ Zip-MS2 Reporter kodiert also weder für ein humanes Protein noch besitzt er ein *cis*-agierendes Element in seinem 3'UTR, welches für eine spezifische *cis/trans*-Interaktion mit einem RBP wie ZBP1 notwendig wäre. Darüber hinaus enthalten beide Konstrukte sechs MS2-loops, wodurch die Transkripte in Zellen mit Hilfe eines GFP-NLS-

fusionierten MS2 *binding protein* (GFP-NLS-MS2BP) visualisiert werden können. Das NLS-Motiv (*nuclear localization signal*) wurde in das GFP-NLS-MS2BP eingefügt, um die zytoplasmatische Hintergrundfluoreszenz des GFP-MS2BP zu reduzieren.

In Abb. 3.11 B ist zu sehen, dass beide Reporter-Transkripte unter oxidativem Stress mit TIAR in SGs kolokalisieren. Das bedeutet, dass keine *cis*-agierenden Elemente in der RNA und damit keine Assoziation eines oder mehrerer spezifische *trans*-agierender Faktoren (RBP) für die Rekrutierung einer RNA in SGs notwendig sind. Dieses Ergebnis bekräftigt die Vermutung, dass die Sortierung einer RNA in SGs ein eher unspezifischer Vorgang ist, der weder die aktive Translation einer RNA noch spezifische *cis/trans*-Interaktionen zwischen RNAs und RBPs voraussetzt. Es ist daher anzunehmen, dass die Lokalisierung von mRNAs in SGs durch poly(A)-bindende Proteine (PABPs) und/oder eukaryotische Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) vermittelt wird (Kedersha and Anderson, 2002).



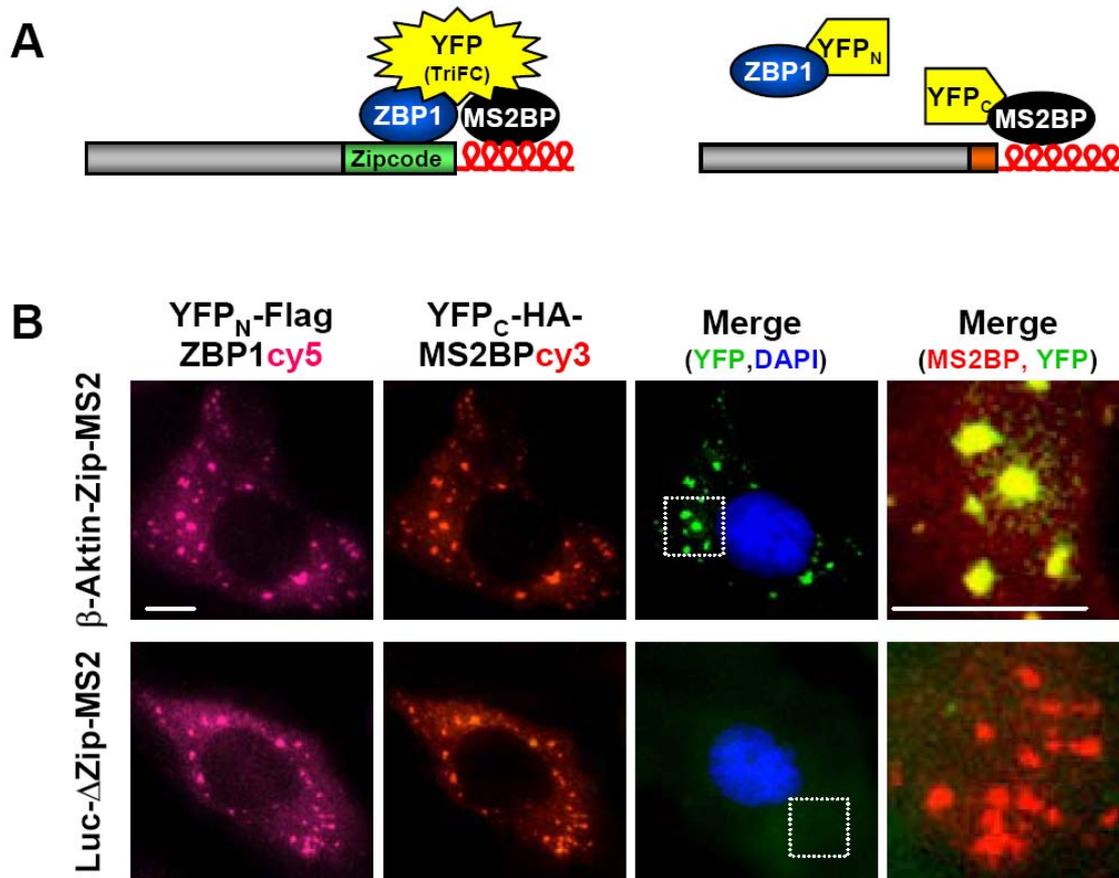
**Abb. 3.11: Lokalisierung exogener Reporter mRNAs unter oxidativem Stress.** (A) Schematische Darstellung der verwendeten Reporter-Konstrukte. β-Aktin-Zip-MS2 enthält zusätzlich zur kodierenden Sequenz (cds) von β-Aktin das Zipcode-Element des β-Aktin-3'UTRs, welches die spezifische Bindungsstelle für ZBP1 darstellt (Huttelmaier et al., 2005; Ross et al., 1997). Luc-ΔZip-MS2 kodiert für die *firefly* Luziferase und enthält den artifiziellen 3'UTR des pcDNA3.1-Vektors. Beide Reporter besitzen sechs MS2 loops zur Visualisierung mittels GFP-NLS-MS2BP und sind polyadenyliert. (B) U2OS-Zellen wurden mit GFP-NLS-MS2BP sowie dem jeweiligen Reporter-Konstrukt transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress appliziert. Die Zellen wurden fixiert, SGs wurden mit anti-TIAR angefärbt. Beide Reporter-Transkripte kolokalisieren mit TIAR in SGs. Balken 5 μm.

### 3.1.2.3 ZBP1 assoziiert spezifisch mit dem $\beta$ -Aktin-Zipcode in SGs

Auf Basis der dargestellten Daten war anzunehmen, dass keiner spezifischen *cis/trans*-Interaktion bedarf, damit eine mRNA in SGs rekrutiert wird. Daher stellte sich die Frage, ob solche *cis/trans*-Interaktionen in SGs überhaupt eine Rolle spielen und wenn ja, welche Funktionen selbige ausüben können. Um die erste Frage zu klären, wurde der *Tri-Molecular Fluorescent Complementation-Assay* (TriFC) verwendet. Grundlage dieses Assays bildet ein EYFP (*Enhanced Yellow Fluorescent Protein*), dessen kodierende Sequenz in zwei ungleichgroße Teile geteilt wurde (Hu et al., 2002; Hu and Kerppola, 2003; Rackham and Brown, 2004). Die N-terminale Hälfte des EYFP wurde mit ZBP1 fusioniert, der C-Terminus mit MS2BP. Das ZBP1-Konstrukt enthält zusätzlich ein Flag-*Taq* (YFP<sub>N</sub>-Flag-ZBP1), das MS2BP-Konstrukt hingegen ein HA-*Taq* (YFP<sub>C</sub>-HA-MS2BP). Die *Taq*s dienen der Überprüfung der Transfektion mittels Immunofluoreszenz.

Werden beide YFP-Fusionsproteine mit dem  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2-Reporter koexprimiert, so assoziiert die ZBP1-Fusion mit dem Zipcode des Reporters und die MS2BP-Fusion mit den MS2-*loops* desselben Transkripts. Dadurch ist gewährleistet, dass beide YFP-Hälften in die notwendige räumliche Nähe zueinander kommen, sodass das YFP-Signal rekonstituiert werden kann (siehe Abb. 3.12 A). Geschieht dies unter zellulärem Stress, wird ein YFP-Signal in SGs erwartet. Wird aber der Luc- $\Delta$ Zip-MS2-Reporter verwendet, so ist die Assoziation des ZBP1-Fusionsproteins inhibiert, da die ZBP1-Bindungsstelle im Reporter fehlt. Dadurch kommen beide YFP-Hälften nicht in die notwendige räumliche Nähe zueinander. Das YFP-Signal wird nicht rekonstituiert (Abb. 3.12 A).

In Abb. 3.12 B ist zu sehen, dass nur bei Verwendung des  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2-Reporters ein YFP-Signal in SGs beobachtet wurde, nicht jedoch, wenn der Reporter ohne ZBP1-Bindungsstelle verwendet wurde. Die Färbungen (anti-Flag in Cy5, anti-HA in Cy3) verdeutlichen aber, dass sowohl ZBP1 als auch MS2BP in beiden Fällen in SGs lokalisieren. Aus diesen Analysen lässt sich schließen, dass, wenngleich spezifische *cis/trans*-Interaktionen scheinbar nicht für die SG-Rekrutierung einer mRNA notwendig sind, dennoch spezifische Interaktionen zwischen einer mRNA und verschiedenen RBPs auch in SGs konserviert werden. Diese Annahme lässt eine spezifische Funktion für ZBP1 in SGs vermuten.



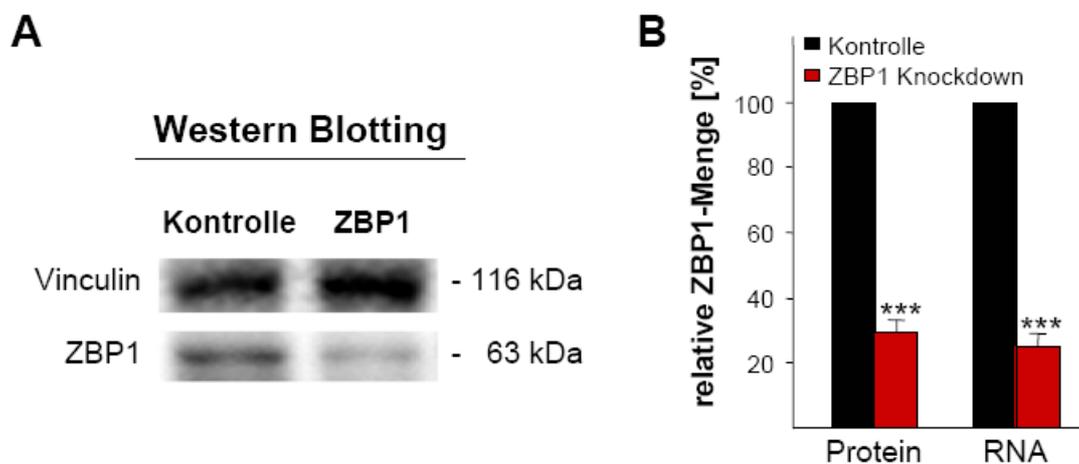
**Abb. 3.12: Tri-Molecular Fluorescent Complementation-Assay (TriFC) in SGs.** (A) Schematische Darstellung des TriFC-Assays und der verwendeten Konstrukte. Nur die Bindung von YFP<sub>N</sub>-Flag-ZBP1 und YFP<sub>C</sub>-HA-MS2BP an denselben Reporter resultiert in einem rekonstituierten YFP. (B) U2OS-Zellen wurden mit YFP<sub>N</sub>-Flag-ZBP1, YFP<sub>C</sub>-HA-MS2BP und dem jeweiligen Reporter transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde Stress durch Arsenat-Zugabe appliziert. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Antikörpern gegen das Flag- und HA-Tag gefärbt. Die Färbungen zeigen in beiden Ansätzen eine Lokalisierung von ZBP1 und MS2BP in SGs, jedoch wurde nur bei Verwendung des Zipcode-Reporters ein TriFC-Signal in SGs beobachtet. Balken 5  $\mu$ m.

### 3.1.3 Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress

Sowohl ZBP1 als auch seine *target*-mRNAs lokalisieren unter Stress in SGs. Die Rekrutierung von ZBP1 in SGs ist unabhängig von der Art des Stress-Stimulus, der deren Bildung induziert. Darüber hinaus bedarf es weder aktiver Translation noch spezifischer *cis/trans*-Interaktionen, damit eine mRNA in SGs lokalisiert, da sowohl die untranslatierte H19 RNA als auch exogene Reporter mRNAs mit artifiziellem 3'UTR in SGs rekrutiert werden. Dennoch interagiert ZBP1 spezifisch in SGs mit dem Zipcode-Element, welches die ZBP1-Bindungsstelle im  $\beta$ -Aktin-3'UTR darstellt. Daraus lassen sich nun verschiedene mögliche Funktionen ableiten, die ZBP1 unter Zellstress ausüben könnte. Zum einen könnte

das Protein an SG-Aufbau und -Integrität beteiligt sein. Zum anderen, was aufgrund der Funktionen des Proteins in ungestressten Zellen wahrscheinlicher ist, könnte es Funktionen bei der Sortierung von mRNAs in SGs ausüben. Da SGs temporär mit PBs assoziieren (siehe Abb. 4.2, (Kedersha et al., 2005)), welche wahrscheinlich am mRNA-Abbau unter Stress beteiligt sind, ZBP1 jedoch nicht in PBs vorkommt, könnte das Protein möglicherweise die Stabilität seiner RNA-Liganden in SGs regulieren.

Um putative Funktionen zu analysieren, wurde zunächst der ZBP1 Knockdown in U2OS-Zellen etabliert. Dazu wurden ZBP1 spezifische und Kontroll-siRNAs mit Lipofectamine 2000 transfiziert. Sowohl die Menge an ZBP1 RNA mittels qRT-PCR als auch das Protein mittels semiquantitativen Western Blotting wurde 72 h nach Transfektion quantifiziert. Der ZBP1 Knockdown resultierte nach 72 h in einer Reduktion der ZBP1 mRNA auf ca. 25% (Abb. 3.13 B, Quantifizierung). Die endogene ZBP1 Proteinmenge war nach Normalisierung auf das als Ladekontrolle dienende Vinculin auf ca. 30 % reduziert (Abb. 3.13 A, Quantifizierung B).

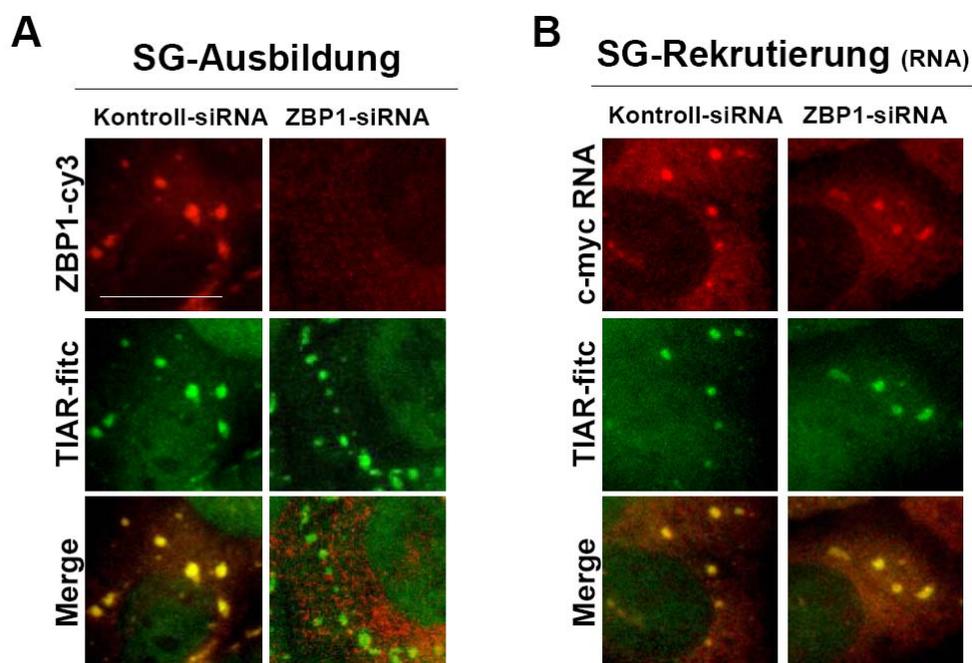


**Abb. 3.13: Reduktion der endogenen ZBP1-Menge in U2OS-Zellen.** 72 h nach Transfektion von ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs wurde die Menge an endogener ZBP1 mRNA und endogenem ZBP1 Protein quantifiziert. **(A)** Western Blot gegen ZBP1 sowie Vinculin als Ladekontrolle. **(B)** Quantifizierung der RNA mittels qRT-PCR, hierbei dienten 18S und Cyclophilin A der Normalisierung, sowie semiquantitative Auswertung der Western Blots mit Normalisierung auf Vinculin. Die endogene ZBP1 mRNA-Menge war auf ca. 25%, die Proteinmenge auf ca. 30% reduziert. Standardabweichungen repräsentieren 3 unabhängige Messungen. \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

### 3.1.3.1 ZBP1 hat keinen Einfluss auf die SG-Bildung und mRNA-Rekrutierung

Um zu überprüfen, ob der Knockdown von ZBP1 einen Einfluss auf die SG-Bildung hat, wurde endogenes ZBP1 mittels siRNAs reduziert und Stress durch Zugabe von Arsenat appliziert. Die SG-Integrität wurde anhand einer TIAR-Färbung überprüft. Abb. 3.14 A zeigt, dass auch Zellen, in denen ZBP1 deutlich reduziert ist (rechte Spalte), TIAR-positive SGs ausbilden. Das bedeutet, dass ZBP1 nicht an der SG-Entstehung beteiligt ist.

Darüber hinaus wurde die Rekrutierung von ZBP1 *target*-mRNAs unter ZBP1 Knockdown untersucht. Dies ist in Abb. 3.14 B am Beispiel der *c-myc* mRNA dargestellt. Sowohl in der Knockdown- als auch in der Kontroll-Population lokalisiert *c-myc* in TIAR-positiven SGs, wenngleich die *c-myc* mRNA-Menge in der Knockdown-Population leicht reduziert erscheint. Ein ähnliches Bild wurde auch für  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* beobachtet. Dieser Befund deutet darauf hin, dass ZBP1 nicht die Rekrutierung seiner RNA-Liganden beeinflusst, möglicherweise aber deren Transit oder Sortierung in SGs steuert. Dies hätte nach Knockdown von ZBP1 zur Folge hat, dass sich RNA-Liganden weniger stark in SGs anreichern bzw. vermehrt abgebaut werden.

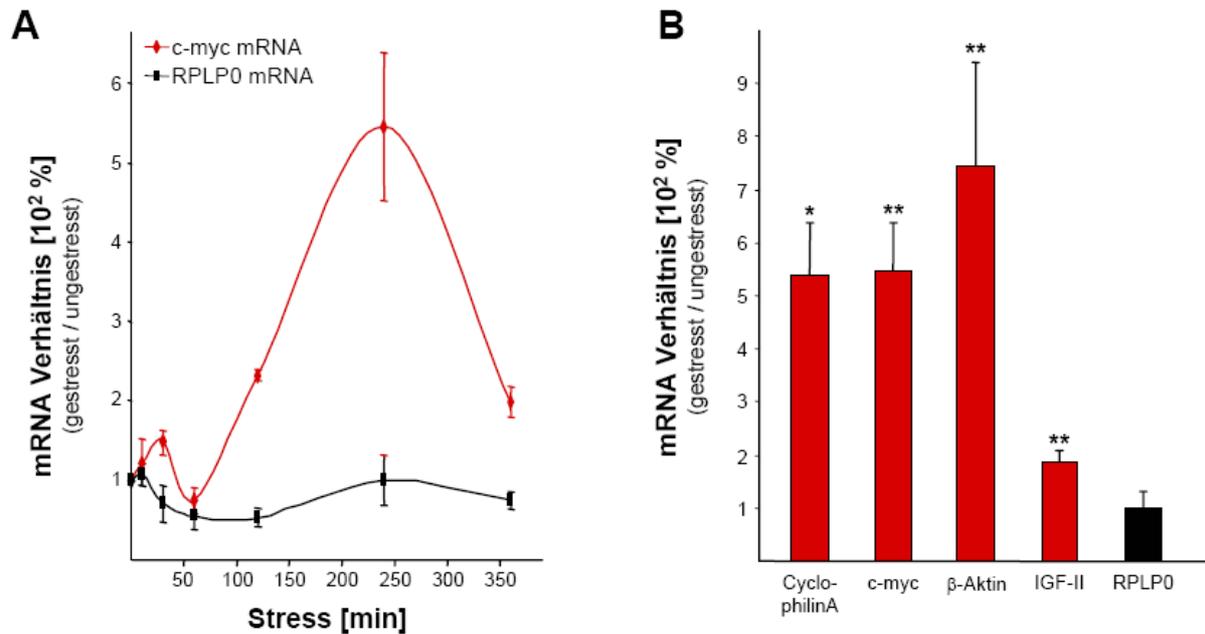


**Abb. 3.14: SG-Ausbildung und RNA-Rekrutierung sind ZBP1 unabhängig.** U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress durch Zugabe von Arsenat appliziert. **(A)** ZBP1 Knockdown hat keinen Einfluss auf die Ausbildung von SGs. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen ZBP1 und TIAR gefärbt. Auch Zellen mit reduzierter ZBP1 Proteinmenge (rechte Spalte) enthalten TIAR-positive SGs. **(B)** SGs wurden mit TIAR gefärbt, bevor eine FISH gegen die *c-myc* mRNA durchgeführt wurde. Die *c-myc* mRNA wird auch nach ZBP1 Knockdown in SGs rekrutiert, jedoch erscheint die mRNA-Menge nach Knockdown reduziert. Balken 10  $\mu$ m.

### 3.1.3.2 Anreicherung verschiedener mRNAs nach Stressinduktion

ZBP1 hat keinen signifikanten Einfluss auf die Rekrutierung seiner mRNA-Liganden in SGs. Jedoch erscheinen diese mRNAs unter ZBP1 Knockdown in SGs reduziert vorzuliegen. Um deshalb zu untersuchen, ob ZBP1 möglicherweise an der Sortierung von mRNAs sowie der Regulation des mRNA-Abbaus unter Stress beteiligt ist, wurde das Schicksal verschiedener Transkripte während der zellulären Stressantwort näher charakterisiert. Hierfür wurde zunächst RNA aus ungestressten Zellen sowie zu verschiedenen Zeitpunkten nach Stressinduktion isoliert und mittels quantitativer RT-PCR (qRT-PCR) analysiert. Abb. 3.15 A zeigt das Schicksal zweier mRNAs (*c-myc* und *RPLP0*) normalisiert auf 18S rRNA. Während *RPLP0* über den vermessenen Zeitraum (6 h) der Stressapplikation weitgehend konstant bleibt, ist für die *c-myc* mRNA eine starke Anreicherung zu beobachten, deren Maximum sich 4 h nach Stressinduktion auf das ca. Fünffache der Ausgangsmenge beläuft. Der Abfall der RNA-Menge 6 h nach Stressinduktion ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass viele Zellen durch die verwendete Arsenat-Dosis bereits apoptotisch waren.

Eine ähnliche Anreicherung wurde auch für *β-Aktin* und *Cyclophilin A*, sowie in geringerem Ausmaß auch für *IGF-II* beobachtet (Abb. 3.15 B). Das bedeutet, dass mRNAs während der zellulären Stressantwort in SGs gespeichert werden können, dass dies jedoch keine besondere Eigenschaft von ZBP1 *target*-Transkripten ist. Darüber hinaus findet auch unter Stressbedingungen aktive Transkription statt, die zusammen mit der Speicherung der mRNAs in SGs zu einer mehr oder weniger starken Anreicherung einer Vielzahl von mRNAs führen könnte. Da dieser Effekt für die *RPLP0* mRNA nicht beobachtet wurde, diente diese mRNA neben der 18S rRNA der zusätzlichen Normalisierung in den weiteren Experimenten.

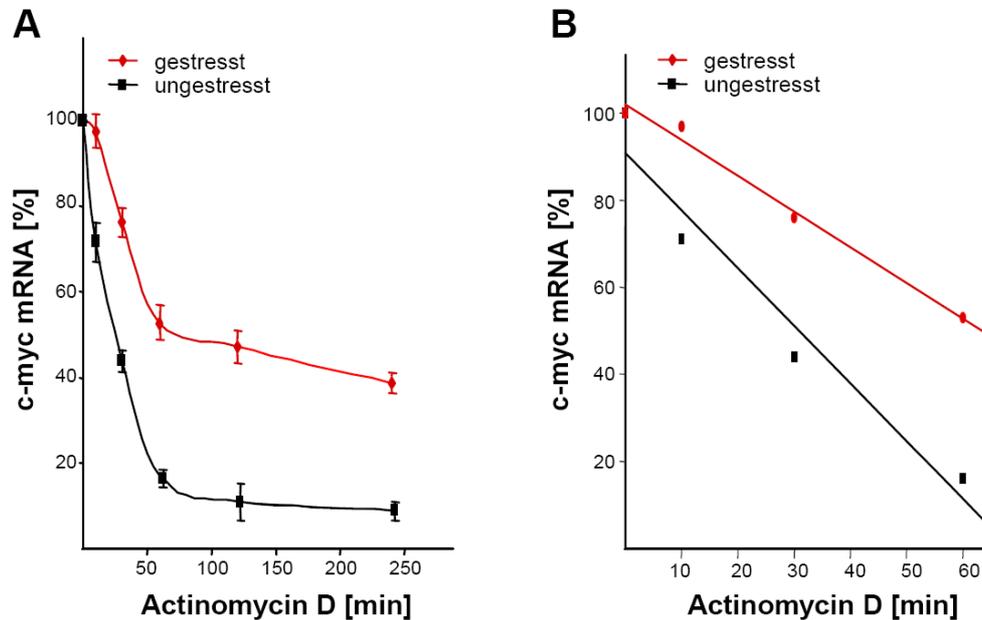


**Abb. 3.15: Anreicherung verschiedener mRNAs unter oxidativem Stress.** U2OS-Zellen wurden mit Arsenat für verschiedene Zeitintervalle gestresst. Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. 18S rRNA diente der Normalisierung gleicher RNA-Inputmengen. **(A)** Verlauf der *c-myc* und *RPLP0* mRNA-Menge unter oxidativem Stress. Während *c-myc* stark angereichert wird mit einem Maximum 4 h nach Stressinduktion, bleibt *RPLP0* weitgehend konstant. **(B)** Anreicherung verschiedener mRNAs 4 h nach Stressinduktion. Neben *c-myc*, sind auch  $\beta$ -Aktin, Cyclophilin A und in geringerem Maße auch *IGF-II* angereichert, *RPLP0* zeigte keine signifikante Veränderung. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ .

### 3.1.3.3 Die *c-myc* mRNA wird unter Stress vermindert abgebaut

Um auszuschließen, dass es sich bei der Anreicherung der *c-myc* mRNAs unter oxidativem Stress vorrangig um Transkriptionseffekte handelt, wurde das Experiment unter Inhibierung der Polymerase II - Transkription durch Aktinomycin D wiederholt. Der Abbau der *c-myc* mRNA wurde in gestressten sowie ungestressten Zellen untersucht. In ungestressten Zellen besitzt *c-myc* eine kurze zelltypabhängige Halbwertszeit von 30-45 min. Abb. 3.16 B zeigt, dass *c-myc* unter oxidativem Stress deutlich langsamer abgebaut wird als in ungestressten Zellen. Verglichen mit ungestressten Zellen, in denen die Menge an *c-myc* mRNA nach 1 h Aktinomycin D Behandlung bereits auf unter 20 % des Ausgangsniveaus gesunken ist, enthält die gestresste Population eine erheblich höhere RNA-Menge, welche nicht degradiert wird (Abb. 3.16 A). Dies deutet auf eine Stabilisierung der *c-myc* mRNA in SGs hin, welche demnach ein verhältnismäßig großes Reservoir an stabilen Transkripten

enthalten müssten. Dieses sollte wiederum sofort nach Aufhebung der Stresseinflüsse für die Translation verfügbar sein.

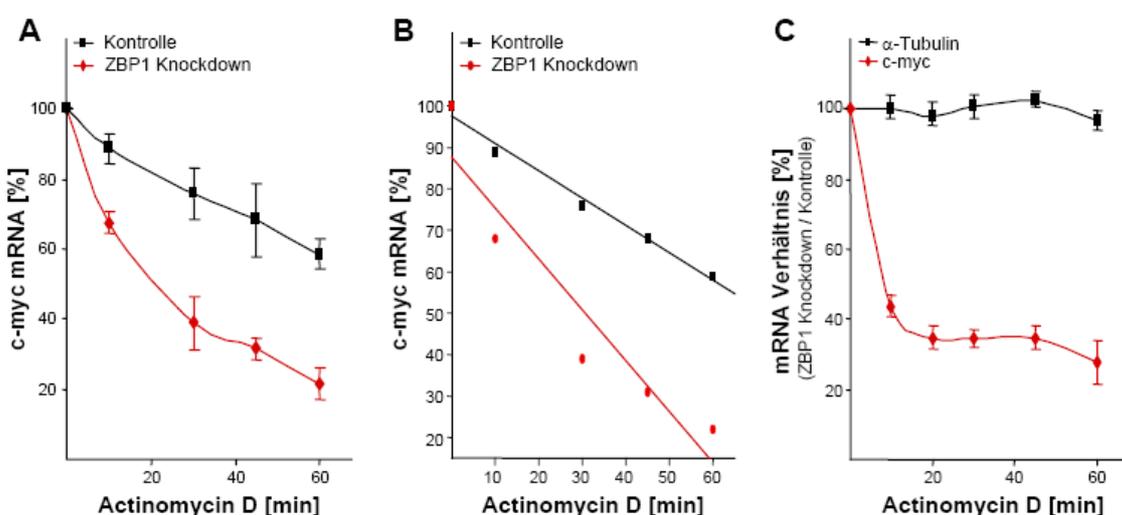


**Abb. 3.16: Verminderter Abbau der *c-myc* mRNA unter oxidativem Stress.** Der Abbau der *c-myc* mRNA wurde in gestressten sowie ungestressten U2OS-Zellen unter Inhibierung der Polymerase II vermittelten Transkription untersucht. Die Transkription wurde durch Zugabe von Actinomycin D 15 min vor Stressapplikation durch Arsenat inhibiert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Messungen wurden auf *18S* und *RPLP0* normalisiert. **(A)** Abbau der mRNA unter physiologisch normalen Bedingungen (schwarz) sowie oxidativem Stress (rot). **(B)** Lineare Regression zur Validierung der Abbaugeschwindigkeiten der mRNA. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

### 3.1.3.4 Der ZBP1 Knockdown destabilisiert die *c-myc* mRNA unter zellulärem Stress

Nachdem festgestellt wurde, dass die *c-myc* mRNA unter zellulärem Stress stabilisiert wird, galt es nun im nächsten Schritt herauszufinden, ob diese Stabilisierung während der zellulären Stressantwort auf die Assoziation mit ZBP1 zurückzuführen sein könnte. Unter dieser Annahme würde man erwarten, dass die Stabilisierung von *c-myc* durch ZBP1 Knockdown inhibiert sein sollte. Das bedeutet, dass die *c-myc* mRNA unter Stress und ZBP1 Knockdown stärker abgebaut werden sollte als in gestressten Zellen mit normalem ZBP1 Proteingehalt. Um diese Frage zu beantworten, wurde der Abbau der *c-myc* mRNA unter oxidativem Stress und ZBP1 Knockdown im Vergleich zu einer Kontrollpopulation

untersucht. Abb. 3.17 verdeutlicht, dass *c-myc* nach ZBP1 Knockdown schneller (etwa doppelt so schnell, Abb. 3.17 B) und in größerem Umfang degradiert wurde. Die Stabilisierung der RNA in SGs auf ca. 50 % der Ausgangsmenge wurde durch den Knockdown inhibiert (Abb. 3.17 A). Dieser Effekt wurde spezifisch für die *c-myc* mRNA beobachtet. Der Knockdown von ZBP1 hatte dagegen keinen Effekt auf mRNAs wie z.B.  $\alpha$ -Tubulin (Abb. 3.17 C), welche unter Normalbedingungen auch nicht durch ZBP1 reguliert wird. Dieser Befund ist allerdings nicht überraschend, da ZBP1 die Stabilität der *c-myc* mRNA auch in ungestressten Zellen reguliert (Leeds et al., 1997). Demnach könnte man vermuten, dass der Effekt unter Zellstress derselbe ist wie unter Normalbedingungen. Jedoch ist hierbei zu bedenken, dass es sich bei der Stabilitätskontrolle unter Normalbedingungen um einen translationsgekoppelten Mechanismus handelt (Lemm and Ross, 2002) und die Translation unter Zellstress inhibiert ist (Kedersha et al., 1999).



**Abb. 3.17: Destabilisierung der *c-myc* mRNA unter Zellstress und ZBP1 Knockdown.** U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde die Transkription durch Zugabe von Actinomycin D inhibiert und die Zellen mit Arsenat für die angegebenen Zeitpunkte gestresst. Anschließend wurde Gesamt-RNA isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. *RPLP0* und *18S* dienten der Normalisierung der RNA-Inputmengen. **(A)** Abbau der *c-myc* mRNA unter oxidativem Stress und ZBP1 Knockdown (rot) bzw. Kontroll-Knockdown (schwarz). Nach Knockdown degradiert *c-myc* schneller und in größerem Umfang. **(B)** Lineare Regression zur Analyse der Abbaugeschwindigkeiten. Nach ZBP1 Knockdown degradiert *c-myc* etwa doppelt so schnell wie in der Kontrolle. **(C)** Einfluss des ZBP1 Knockdown auf den Abbau der *c-myc* mRNA verglichen mit der  $\alpha$ -Tubulin mRNA, welche auch unter Normalbedingungen nicht durch ZBP1 reguliert wird. Geplottet ist das relative mRNA-Verhältnis zwischen Knockdown- und Kontroll-Population. Während *c-myc* nach ZBP1 Knockdown verstärkt abgebaut wird, bleibt  $\alpha$ -Tubulin unbeeinflusst. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten.

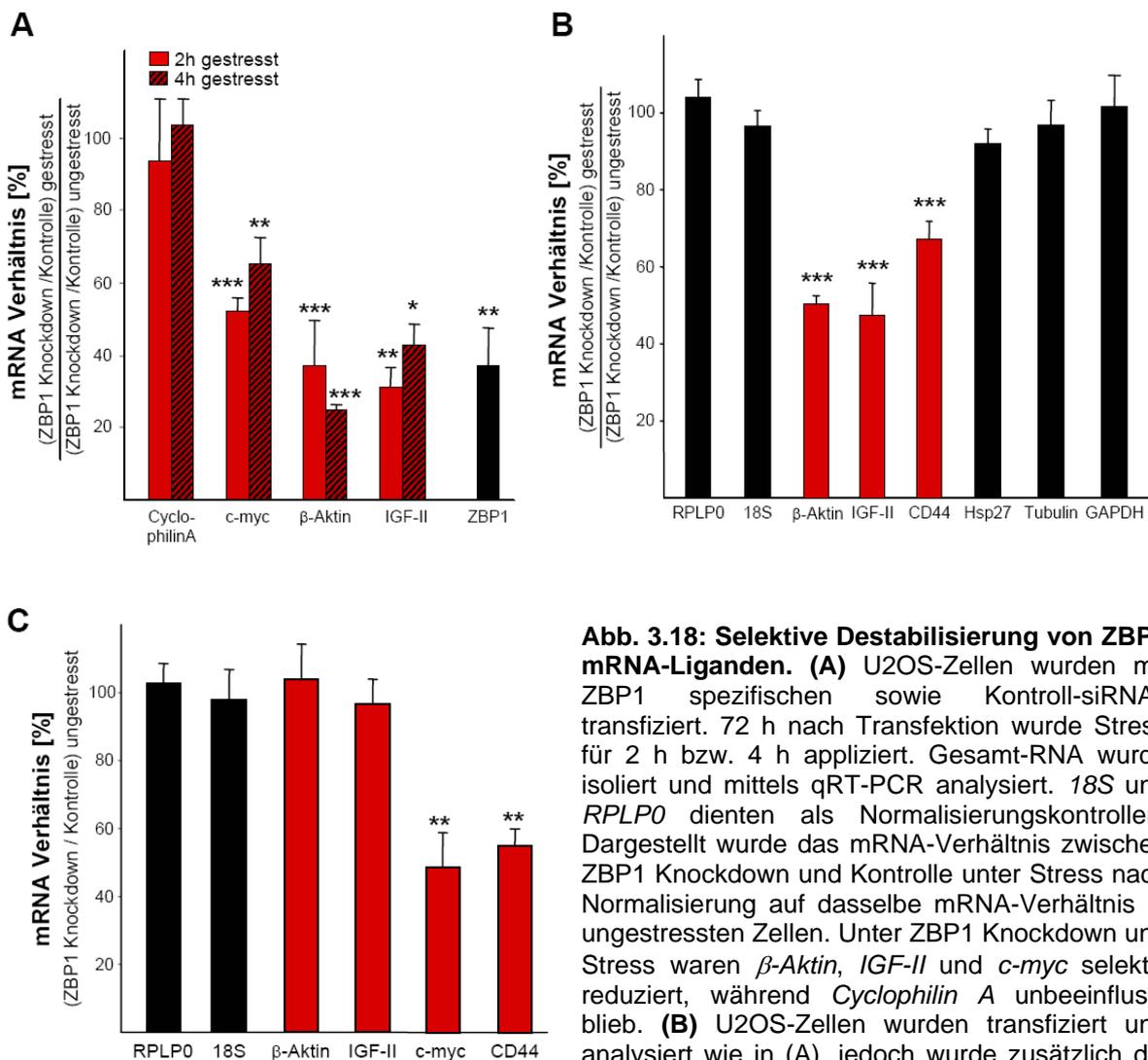
### 3.1.3.5 ZBP1 Knockdown destabilisiert mRNA-Liganden unter zellulärem Stress

ZBP1, welches als Stabilisator der *c-myc* mRNA unter Normalbedingungen fungiert (Leeds et al., 1997), beeinflusst die Stabilität dieser mRNA auch unter zellulärem Stress (Abb. 3.17). Neben der mRNA-Stabilität reguliert ZBP1 in ungestressten Zellen jedoch auch die lokalisierte Translation  $\beta$ -Aktin mRNA und fungiert als Translationsrepressor der *IGF-II* mRNA (Huttelmaier et al., 2005; Nielsen et al., 1999). Daher stellte sich die Frage, inwieweit ZBP1 auch das Schicksal dieser beiden translationsregulierten mRNA-Liganden während der zellulären Stressreaktion beeinflusst.

Um zu untersuchen, ob ZBP1 neben der *c-myc* mRNA auch den Abbau anderer mRNA-Liganden wie  $\beta$ -Aktin oder *IGF-II* beeinflusst, wurde die Mengenverschiebung dieser mRNAs unter Stress und ZBP1 Knockdown vergleichend untersucht. Dieses Experiment wurde sowohl unter aktiver Transkription (Abb. 3.18 A) als auch unter Inhibierung der Polymerase II-Transkription mittels Aktinomycin D (Abb. 3.18 B) durchgeführt. Beide Diagramme zeigen das mRNA-Verhältnis zwischen ZBP1 Knockdown- und Kontrollpopulation normalisiert auf die mRNA-Inputmenge vor Stressinduktion, wobei 18S rRNA und *RPLP0* als der Normalisierungskontrollen dienten (siehe auch 3.1.3.2). Sowohl unter aktiver Transkription als auch unter Ausschluss der Transkription ist eine deutliche und statistisch signifikante Destabilisierung aller untersuchten ZBP1-Liganden (*c-myc*,  $\beta$ -Aktin, *IGF-II* und *CD44*) zu beobachten (Abb. 3.18 A und B). Demgegenüber bleiben verschiedene mRNAs, welche in ungestressten Zellen nicht durch ZBP1 reguliert werden, auch unter Stress durch ZBP1 Knockdown unbeeinflusst (*Cyclophilin A* in Abb. 3.18 A; *HSP27*,  $\alpha$ -Tubulin und *GAPDH* in Abb. 3.18 B). Dieser Befund ist besonders im Hinblick auf die  $\beta$ -Aktin oder *IGF-II* mRNA interessant, da ZBP1 unter Normalbedingungen die Translation dieser beiden mRNAs reguliert, ohne hierbei deren mRNA-Mengen signifikant zu beeinflussen (siehe dazu Abb. 3.18 C).

Der Knockdown von ZBP1 führt unter zellulärem Stress zu einer signifikanten Destabilisierung aller untersuchten mRNA-Liganden unabhängig davon, ob ZBP1 die mRNA-Stabilität, Lokalisierung oder Translation dieser mRNAs unter Normalbedingungen reguliert. Dieser Befund lässt vermuten, dass ZBP1 seine *target*-mRNAs unter Stress stabilisiert, indem es durch Assoziation mit selbigen deren Freisetzung aus SGs verhindert. Hierdurch würde der Abbau dieser mRNAs durch PBs oder das Exosom signifikant reduziert

werden. Dies legt nahe, dass RBPs unter Stress als "gatekeeper" in SGs fungieren könnten, da sie möglicherweise mRNAs spezifisch in diesen Kompartimenten zurückhalten und dadurch vor Abbau schützen.



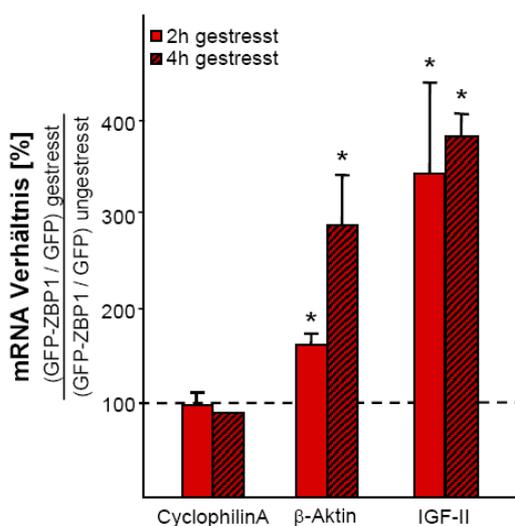
**Abb. 3.18: Selektive Destabilisierung von ZBP1 mRNA-Liganden.** (A) U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde Stress für 2 h bzw. 4 h appliziert. Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. 18S und RPLP0 dienten als Normalisierungskontrollen. Dargestellt wurde das mRNA-Verhältnis zwischen ZBP1 Knockdown und Kontrolle unter Stress nach Normalisierung auf dasselbe mRNA-Verhältnis in ungestressten Zellen. Unter ZBP1 Knockdown und Stress waren  $\beta$ -Aktin, IGF-II und c-myc selektiv reduziert, während Cyclophilin A unbeeinflusst blieb. (B) U2OS-Zellen wurden transfiziert und analysiert wie in (A), jedoch wurde zusätzlich die Polymerase II-Transkription inhibiert. Die

Stressapplikation erfolgte für 2h. Auch hier war eine selektive Reduktion der ZBP1-Liganden  $\beta$ -Aktin, IGF-II sowie CD44 zu beobachten, während für verschiedene Kontroll-mRNAs kein Effekt zu beobachten war. (C) Gleichgewichts-mRNA-Verhältnis in ungestressten Zellen nach ZBP1 Knockdown. Die Zellen wurden transfiziert und analysiert wie in (A), jedoch wurde kein Stress appliziert. Während die c-myc und CD44 mRNA-Mengen nach ZBP1 Knockdown statistisch signifikant reduziert war, blieb die Menge der  $\beta$ -Aktin und der IGF-II mRNA unbeeinflusst. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

### 3.1.3.6 Überexpression von GFP-ZBP1 stabilisiert selektiv $\beta$ -Aktin und IGF-II mRNA

Unter ZBP1 Knockdown wurde eine selektive Destabilisierung aller untersuchten mRNA-Liganden beobachtet, welche unabhängig von der Art der posttranskriptionellen Regulation dieser mRNAs durch ZBP1 in ungestressten Zellen war. Das bedeutet, auch mRNAs wie  $\beta$ -Aktin und IGF-II, welche unter Normalbedingungen durch ZBP1 auf der Ebene der Translation nicht jedoch der mRNA-Stabilität reguliert werden, wurden infolge ZBP1 Knockdown und Stress destabilisiert.

Wenn ZBP1 tatsächlich als "gatekeeper" in SGs fungiert, würde man erwarten, dass durch ZBP1-Überexpression eine Stabilisierung von mRNA-Liganden unter Stress beobachtet werden kann. Um dies zu untersuchen, wurde GFP-ZBP1 bzw. GFP als Kontrolle für 48 h überexprimiert, bevor den Zellen oxidativer Stress appliziert wurde. Abb. 3.19 zeigt eine selektive Stabilisierung der  $\beta$ -Aktin und IGF-II mRNA nach ZBP1-Überexpression, während die Cyclophilin A mRNA, welche in ungestressten Zellen ebenfalls nicht durch ZBP1 reguliert wird, unbeeinflusst blieb. Durch die Überexpression von ZBP1 wurde somit der Effekt des Knockdowns umgekehrt. Zusammen mit den Ergebnissen der Knockdown-Experimente lassen diese Daten auf eine neue Funktion von ZBP1 als Stabilisator seiner mRNA-Liganden unter Stress schließen und unterstützen damit die "gatekeeper"-Hypothese, nach der RBPs unter Stress mRNAs spezifisch in SGs zurückhalten und dadurch von Abbau durch PBs oder das Exosom schützen.



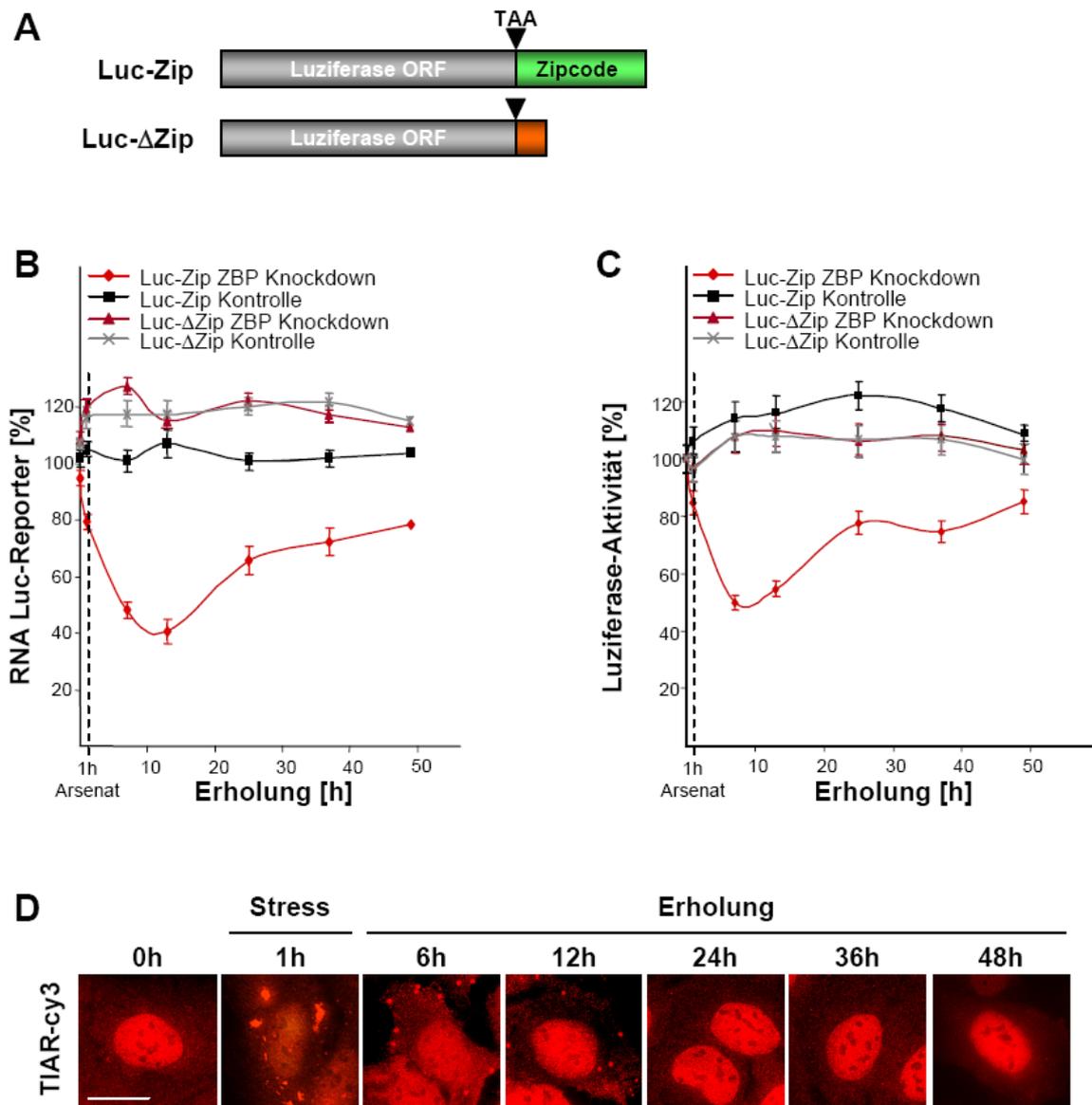
**Abb. 3.19: Stabilisierung der  $\beta$ -Aktin und IGF-II mRNA durch GFP-ZBP1 unter oxidativem Stress.** U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 oder GFP als Kontrolle transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde Stress durch Arsenat-Zugabe für 2 h bzw. 4 h appliziert. Gesamt-RNA wurde isoliert und mittels qRT-PCR analysiert. 18S und *RPLP0* dienen als Normalisierungskontrollen. Dargestellt wurde das mRNA-Verhältnis zwischen GFP-ZBP1-Überexpression und GFP-Überexpression (Kontrolle) unter Stress normalisiert auf dasselbe mRNA-Verhältnis in ungestressten Zellen. Die Überexpression von GFP-ZBP1 stabilisierte selektiv  $\beta$ -Aktin und IGF-II, während *Cyclophilin A* unbeeinflusst blieb. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ .

### 3.1.3.7 ZBP1 Knockdown destabilisiert selektiv den Zipcode-Reporter

Nach der im vorherigen Abschnitt aufgestellten Hypothese stabilisiert ZBP1 als "gatekeeper" in SGs seine mRNA-Liganden unter zellulärem Stress, indem es deren SG-Transit und damit deren Abbau verhindert. Die postulierte "gatekeeper"-Funktion beruht auf einer spezifisch *cis/trans*-Interaktion, wie sie z.B. zwischen ZBP1 und dem Zipcode-Element der  $\beta$ -Aktin mRNA vorliegt. Ist eine solche *cis/trans*-Interaktion tatsächlich verantwortlich für die Regulation einer mRNA unter zellulärem Stress, so würde man erwarten, dass auch eine exogene Reporter-mRNA, welche den Zipcode der  $\beta$ -Aktin mRNA enthält, durch ZBP1 unter Stress stabilisiert wird. Nach dieser Annahme sollte ein solcher exogener Reporter wie der Luziferase-Reporter, der den  $\beta$ -Aktin Zipcode enthält (Abb. 3.20 A, Luc-Zip), nach ZBP1 Knockdown unter Stress selektiv destabilisiert werden, während ein Luziferase-Reporter ohne Zipcode (Abb. 3.20 A, Luc- $\Delta$ Zip) davon unbeeinflusst bleiben sollte. Analysiert man das Schicksal beider Reporter-Transkripte über den Stress hinaus, so würde man erwarten, dass nach Aufhebung des Stresses und Auflösung der SGs in der ZBP1 Knockdownpopulation auch die Destabilisierung des Luc-Zip-Reporters aufgehoben wird. Über die Zeit der Stresserholung sollten wieder mehr Luc-Zip-Transkripte vorhanden sein. Einen ähnlichen Effekt würde man auch auf Proteinebene erwarten. Da die Luc-Zip-Reportertranskripte unter ZBP1 Knockdown und Stress selektiv destabilisiert werden, können nach der Aufhebung des Stresses weniger Transkripte für die Translation reinitiiert werden, was wiederum in einer geringeren Proteinmenge der durch den Reporter kodierten Luziferase resultieren sollte. Während der Erholungsphase werden die Luc-Zip-Transkripte nicht mehr destabilisiert, dadurch steigt auch die Menge an Luziferase-Protein, was einem Anstieg der Luziferase-Aktivität zur Folge haben sollte.

Abb. 3.20 B zeigt die Veränderung der mRNA-Menge der beiden in Abb. 3.20 A dargestellten Reporter während einer Stress- und Erholungsphase. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass der Luc-Zip-Reporter (Abb. 3.20 B, roter Graph) nach ZBP1 Knockdown während der einstündigen Stressapplikation destabilisiert wird. Diese Destabilisierung wurde nicht in der Kontrollpopulation (schwarzer Graph) und auch nicht für den Luc- $\Delta$ Zip-Reporter, welcher nicht den  $\beta$ -Aktin Zipcode enthält (brauner und grauer Graph), beobachtet. Nach Aufhebung des Stresses hält diese Destabilisierung des Luc-Zip-Reporters für ca. 12 Stunden an, da in den Zellen noch SGs vorhanden sind. Im weiteren Verlauf der Erholung ist ein Anstieg der Transkriptmenge zu beobachten. Dieser Effekt wurde wie erwartet nur für den

Luc-Zip-Reporter nach ZBP1 Knockdown beobachtet und unterstützt daher die für ZBP1 postulierte "gatekeeper"-Funktion in SGs.



**Abb. 3.20: Spezifische Destabilisierung des Luc-Zip-Reporters in SGs.** U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert, zu gleichen Teilen partigiert, nach 48 h mit den entsprechenden Reportern erneut transfiziert und erneut für die angegebenen Zeitpunkte partigiert. 72 h nach siRNA-Transfektion wurde für 1 h Stress appliziert, anschließend wurden die Zellen durch Wechsel des Kulturmediums in die Erholungsphase überführt. Der Einfluss auf die RNA-Menge wurde mittels qRT-PCR, der Einfluss auf die Proteinmenge mittels Luciferase-Aktivitätsmessung für ungestresste Zellen, 1 h Stress sowie 6, 12, 24, 36 und 48h Erholung analysiert (siehe auch 2.2.3.7). **(A)** Verwendete Reporter-Konstrukte. Luc-Zip, *firefly* Luziferase ORF fusioniert mit den ersten 233 nt des  $\beta$ -Aktin 3'UTRs, in dem der Zipcode enthalten ist; Luc-ΔZip, *firefly* Luziferase ORF mit artifiziellem 3'UTR des pcDNA 3.1 Vektors. Beide Reporter sind polyadenyliert. **(B)** mRNA-Menge der verwendeten Reporter während Stress und Erholung. Der ZBP1 Knockdown destabilisiert spezifisch den Luc-Zip-Reporter. Destabilisierung war bis 12 h nach Beginn der Erholung zu beobachten, bis zu diesem Zeitpunkt waren noch in geringem Maße SGs vorhanden. **(C)** Luciferase-Aktivitäten der verwendeten Reporter. Die spezifische Destabilisierung des Luc-Zip-Reporter-mRNA wirkt sich auf Proteinebene aus, die Luciferase-Aktivität war in ähnlichem Maß reduziert. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 2 unabhängigen Experimenten. **(D)** SG-Bildung und -Auflösung während der Stress- und Erholungsphase. Zellen wurden mit anti-TIAR gefärbt. Balken 10  $\mu$ m.

Da beide Reporter für die *firefly*-Luziferase kodieren, wurde zusätzlich der Einfluss auf die Proteinmenge anhand der Luziferase-Aktivität unter o.g. Bedingungen untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass es durch die selektive Destabilisierung der Luc-Zip-mRNA unter ZBP1 Knockdown und zellulärem Stress (Abb. 3.20 B) ebenfalls zu einer selektiven Reduktion der Luziferase-Aktivität kommt (Abb. 3.20 C, roter Graph). In Übereinstimmung mit den mRNA-Mengen bleiben auch die Luziferase-Aktivitäten für den Luc-Zip-Reporter in der Kontrollpopulation (schwarzer Graph) sowie für den Luc- $\Delta$ Zip-Reporter in der Knockdown- und Kontrollpopulation (brauner und grauer Graph) weitgehend konstant.

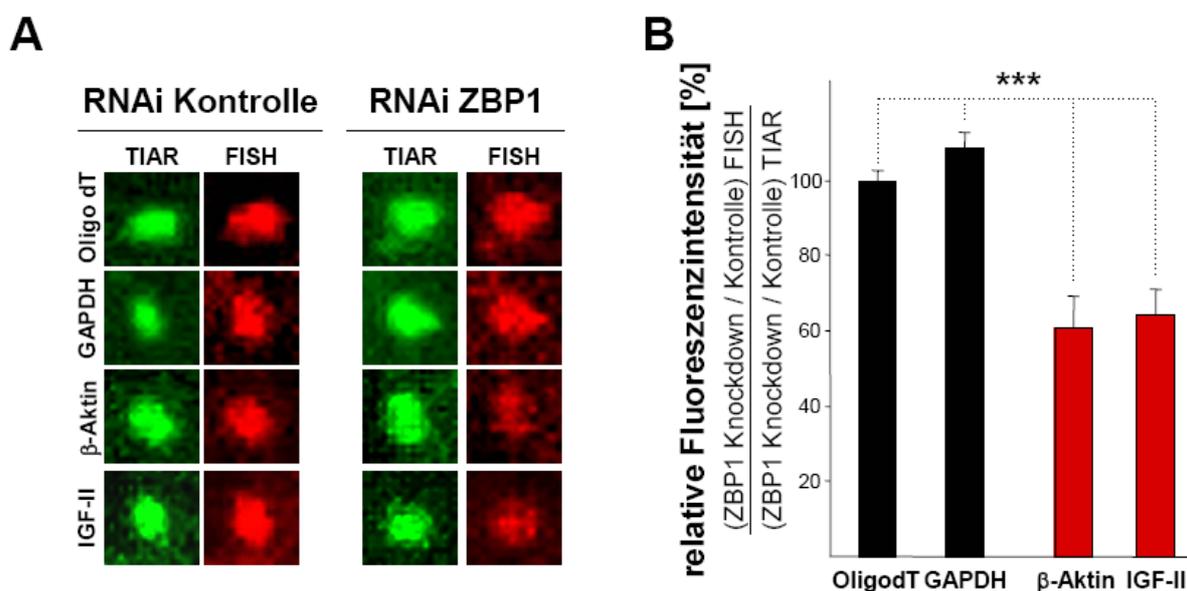
Dieses Experiment demonstriert eindeutig, dass die selektive Destabilisierung einer mRNA unter Stress und ZBP1 Knockdown auf einer spezifischen *cis/trans*-Interaktion beruht. Zudem spiegelt sich die stressbedingte Reduktion der mRNA-Menge auch auf der Proteinebene wider. Diese Daten verdeutlichen, dass dieselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen, welche unter Normalbedingungen die mRNA-Stabilität, Lokalisierung und/oder Translation einer mRNA kontrollieren, diese mRNA unter Stress in SGs stabilisieren, indem sie deren Freisetzung und damit deren Abbau verhindern.

### 3.1.3.8 ZBP1 Knockdown destabilisiert mRNA-Liganden spezifisch in SGs

Die vorangegangenen Experimente belegen, dass der ZBP1 Knockdown unter Stressbedingungen zu einer selektiven Destabilisierung von ZBP1 mRNA-Liganden führt, und legen daher nahe, dass ZBP1 als "*gatekeeper*" in SGs fungiert. Jedoch wurde bisher nicht abschließend untersucht, ob die Destabilisierung von mRNA-Liganden unter Stress und ZBP1 Knockdown auch tatsächlich räumlich SGs zugeordnet werden kann und ZBP1 damit faktisch als "*gatekeeper*" in SGs fungiert. Erste Hinweise gab diesbezüglich bereits die in Abb. 3.14 B dargestellte Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) den *c-myc* mRNA, welche in der Knockdownpopulation in SGs schwächer erschien.

Um diese Fragestellung genau zu untersuchen, wurden Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen (FISH) einzelner SGs wie folgt analysiert und quantifiziert. In einer ZBP1 Knockdown- sowie Kontrollpopulation wurden SGs durch Antikörperfärbung gegen endogenes TIAR markiert. Anschließend wurde eine FISH gegen  $\beta$ -Aktin, *IGF-II*, *GAPDH* und poly(A)<sup>+</sup> mRNA durchgeführt. Die FISH-Fluoreszenzintensität wurde über die Fläche eines SGs quantifiziert und auf die korrespondierende TIAR-Fluoreszenzintensität desselben SGs normalisiert. Vergleicht man das FISH-Signal von SGs der ZBP1 Knockdownpopulation

mit dem FISH-Signal von SGs der Kontrollpopulation, stellt man fest, dass die  $\beta$ -Aktin und die *IGF-II* mRNA in SGs deutlich reduziert sind (Abb. 3.21 A). Demgegenüber ist keine Veränderung der *GAPDH*-Menge in SGs zu beobachten. Ebenso war die Menge an poly(A)<sup>+</sup> mRNA in SGs nahezu unverändert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzen zeigt, dass  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* verglichen mit *GAPDH* oder poly(A)<sup>+</sup> mRNA nach ZBP1 Knockdown statistisch signifikant in SGs reduziert sind (Abb. 3.21 B). Das deutet darauf hin, dass ZBP1 tatsächlich seine mRNA-Liganden in SGs stabilisiert und legt das im Folgenden beschriebene Modell der ZBP1-Funktion unter Stress nahe: Durch Assoziation mit seinen mRNA-Liganden wird ZBP1 in SGs rekrutiert. In SGs fungiert ZBP1 als "gatekeeper", da das Protein durch spezifische *cis/trans*-Interaktion mit seinen Liganden deren Freisetzung aus SGs verhindert. Hierfür sind dieselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen verantwortlich, über die ZBP1 in ungestressten Zellen seine Funktionen als posttranskriptioneller Regulator derselben mRNAs ausübt, die es unter Stress stabilisiert. Durch die Speicherung der mRNAs in SGs werden diese vor Abbau durch PBs oder das Exosom geschützt.



**Abb. 3.21: Selektive Destabilisierung der  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* mRNA in SGs nach ZBP1 Knockdown.** (A) U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress appliziert. SGs wurden mittels anti-TIAR (fitc) gefärbt. Anschließend wurde FISH gegen  $\beta$ -Aktin, *IGF-II*, *GAPDH* und poly(A)<sup>+</sup> mRNA durchgeführt. Nach ZBP1 Knockdown waren die  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* mRNA in SGs deutlich reduziert. Die Mengen an *GAPDH* oder poly(A)<sup>+</sup> mRNA blieben hingegen durch ZBP1 Knockdown unbeeinträchtigt. (B) Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten über die Fläche einzelner SGs. Das FISH-Signal eines SGs wurde auf die korrespondierende TIAR-Färbung desselben SGs normalisiert. Das Diagramm zeigt die relative Fluoreszenzintensität in ZBP1 Knockdown- vs. Kontrollzellen.  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* sind nach Knockdown statistisch signifikant reduziert, während *GAPDH* und poly(A)<sup>+</sup> mRNA keine Veränderung aufwiesen. (n=45; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ ).

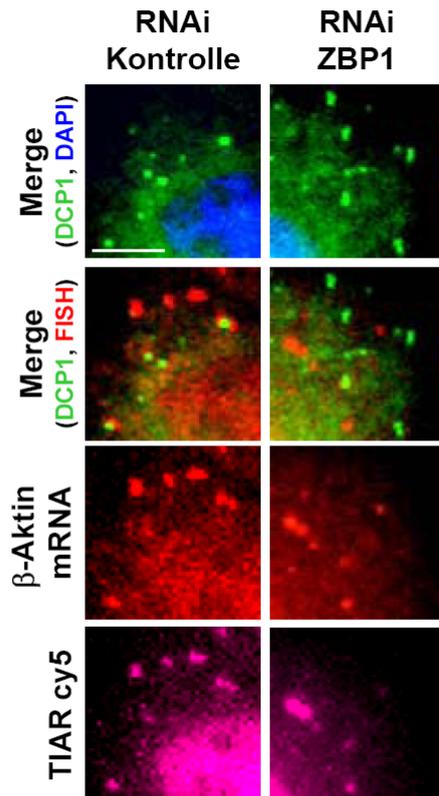
### 3.1.3.9 $\beta$ -Aktin mRNA lokalisiert nicht in PBs nach ZBP1 Knockdown

Das postulierte Modell der "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 während der zellulären Stressantwort impliziert eine Stabilisierung von *target*-mRNAs in SGs durch Assoziation mit ZBP1. Dadurch werden diese mRNAs in SGs zurückgehalten, was wiederum ihren vorzeitigen Abbau verhindert.

Daraus resultiert die Frage nach dem Abbaukompartiment. Prinzipiell kann RNA durch das Exosom oder PBs abgebaut werden. Nach dem Modell von Kedersha assoziieren SGs und PBs temporär mit einander (siehe auch Abb. 4.1)(Kedersha et al., 2005). Zudem sind PBs unter zellulärem Stress vergrößert. Dies legt die Vermutung nahe, dass mRNAs, welche aus SGs freigesetzt werden, durch PBs abgebaut werden. Wird eine RNA in PBs vermehrt abgebaut, so ist diese möglicherweise verstärkt in PBs detektierbar. Daher würde man vermuten, dass z.B. die  $\beta$ -Aktin mRNA unter zellulärem Stress und ZBP1 Knockdown in PBs detektierbar wird bzw. verglichen mit Kontrollzellen angereichert ist.

Um zu untersuchen, ob es unter ZBP1 Knockdown zu einer Verschiebung der  $\beta$ -Aktin mRNA von SGs zu PBs kommt, wurde die endogene  $\beta$ -Aktin mRNA in einer ZBP1 Knockdown- bzw. Kontrollpopulation mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung hinsichtlich ihrer PB-Lokalisierung untersucht. PBs wurden hierbei durch Überexpression von GFP-DCP1, SGs durch spezifische Antikörper gegen endogenes TIAR markiert. Obwohl ähnlich wie im vorherigen Versuch eine Reduktion der  $\beta$ -Aktin mRNA nach ZBP1 Knockdown in SGs beobachtet wurde, war die RNA nicht in PBs detektierbar (Abb. 3.22). Dies kann vor allem zwei Gründe haben. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass mRNAs unter Stress entgegen der Vermutung nicht oder nur in geringem Maße durch PBs abgebaut werden und stattdessen der größere Anteil durch Exonukleasen des Exosoms degradiert wird. Demzufolge würde man einen geringen Anteil der  $\beta$ -Aktin mRNA in PBs vermuten, welcher nicht detektiert werden kann. Zum zweiten ist der mRNA-Abbau in PBs wahrscheinlich auch unter Stress nicht limitiert, sodass mRNAs schnell degradiert werden und es dadurch nicht zu einer Anreicherung kommen kann. Der unverzügliche Abbau der Transkripte erschwert zudem deren Detektion mittels FISH.

Letzteres kann möglicherweise mit Hilfe eines Reporters, der aufgrund hoher Sekundärstruktur und vermehrter Assoziation von RBPs schlechter abgebaut wird, umgangen werden (siehe dazu 3.1.3.10).



**Abb. 3.22: Die  $\beta$ -Aktin mRNA lokalisiert nach ZBP1 Knockdown nicht in PBs.** U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit GFP-DCP1 zur PB-Markierung erneut transfiziert. Nach weiteren 24 h wurde oxidativer Stress appliziert. SGs wurden mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR markiert. Anschließend wurde FISH gegen  $\beta$ -Aktin durchgeführt. Verglichen mit der Kontrolle ist die  $\beta$ -Aktin mRNA in SGs nach ZBP1 Knockdown reduziert. Jedoch wurde  $\beta$ -Aktin in beiden Fällen nicht in PBs detektiert. Balken 5  $\mu$ m.

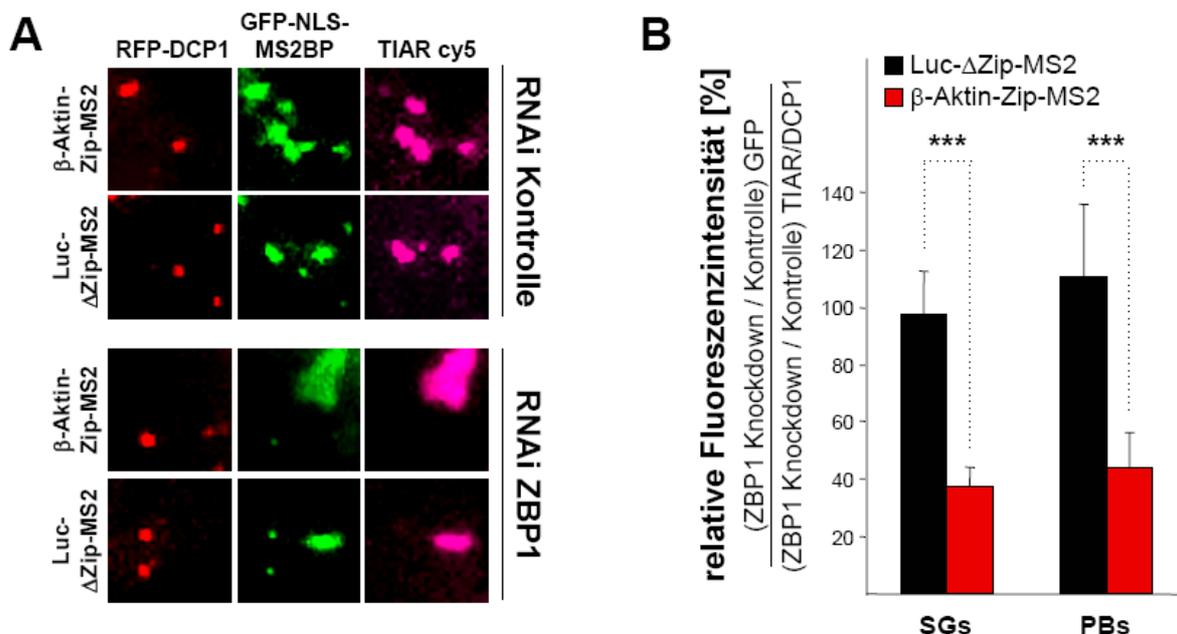
### 3.1.3.10 Zipcode-Reporter wird nach ZBP1 Knockdown in SGs und PBs destabilisiert

Da die endogene  $\beta$ -Aktin mRNA mittels FISH nicht in PBs detektiert werden konnte, wurde in einem weiteren Versuch das "*MS2-tethering*" zur RNA-Markierung eingesetzt. Hierzu wurden die in Abb. 3.11 A dargestellten Reporter-Konstrukte verwendet. Diese beiden Reporter enthalten am 3' Ende sechs MS2-loops, welche der mRNA-Markierung mittels GFP-NLS-MS2BP dienen (siehe auch 3.1.2.2). Dabei wird vermutet, dass das "*MS2-tethering*" zusätzlich zur Stabilität einer mRNA beitragen kann.

Eine ZBP1 Knockdown- sowie Kontrollpopulation wurde mit dem jeweiligen Reporter, GFP-NLS-MS2BP sowie RFP-DCP1 zur PB-Markierung transfiziert. Nach Transfektion der siRNAs (72 h) wurde Stress induziert und SGs mit TIAR spezifischen Antikörpern markiert. Beide Reporter wurden sowohl in SGs als auch PBs detektiert (Abb. 3.23). Der  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2-Reporter erschien jedoch nach Knockdown sowohl in SGs als auch in PBs reduziert (Abb. 3.23 A). Daher wurde auch hier eine Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten durchgeführt. Analog zu den unter 3.1.3.8. durchgeführten Analysen

wurde die GFP-Fluoreszenzintensität über die Fläche eines SGs quantifiziert und auf die korrespondierende TIAR-Fluoreszenzintensität (cy5) normalisiert. Bei der Quantifizierung von PBs wurde gleichermaßen verfahren, jedoch wurde das GFP-Signal auf die RFP-DCP1-Fluoreszenzintensität normalisiert. Vergleicht man den  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2-Gehalt von SGs zwischen einer ZBP1 Knockdown- und einer Kontrollpopulation, stellt man fest, dass dieser wiederum statistisch signifikant reduziert ist (Abb.3.23 B), da dieser Reporter unter ZBP1 Knockdown in SGs destabilisiert wird. Demgegenüber liegt die Luc- $\Delta$ Zip-MS2 Reporter-mRNA in beiden Populationen unverändert vor. Diese Beobachtung korreliert mit vorangegangenen Untersuchungen zur *cis/trans*-Spezifität der stressbedingten mRNA-Stabilität (siehe 3.1.3.8).

Ein ähnliches Bild ergibt sich für PBs. Die  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2 Reporter-mRNA ist in PBs in vergleichbarer Größenordnung wie in SGs reduziert, während für die Luc- $\Delta$ Zip-MS2 Reporter-mRNA keine Veränderung beobachtet wird (Abb. 3.23 B). Wie bereits in den FISH-Experimenten beobachtet, scheint der Abbau in PBs sehr schnell und nicht limitiert zu sein. Dadurch kommt es nicht zu einer Anreicherung von mRNAs in PBs. Vielmehr spiegeln PBs im Gleichgewichtszustand den RNA-Gehalt von SGs wider, der vermutlich aufgrund der veränderten Abbauraten der GFP-NLS-MS2BP markierten Reporter-Transkripte detektiert werden kann.



**Abb. 3.23: PBs spiegeln den RNA-Gehalt von SGs wider.** (A) U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen zu gleichen Teilen partagiert. Ein Teil wurde mit RFP-DCP1, GFP-NLS-MS2BP sowie dem  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2-Reporter, der zweite Teil mit RFP-DCP1, GFP-NLS-MS2BP sowie dem Luc- $\Delta$ Zip-MS2-Reporter transfiziert. 72 h nach Transfektion der siRNAs wurde Stress induziert. SGs wurden mit spezifischen Antikörpern gegen TIAR markiert. Beide Reporter wurden in SGs und PBs detektiert. Der  $\beta$ -Aktin-Zip-

MS2 Reporter war nach Knockdown in SGs und PBs reduziert. **(B)** Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten über die Fläche einzelner SGs und PBs. Die GFP-Fluoreszenz (mRNA) wurde für SGs auf die TIAR-Fluoreszenz (cy5) desselben SGs, für PBs auf die RFP-DCP1-Fluoreszenz desselben PBs normalisiert. Das Diagramm zeigt die relative Fluoreszenzintensität in ZBP1 Knockdown- vs. Kontrollzellen.  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2 war nach Knockdown in SGs und PBs statistisch signifikant reduziert, während Luc- $\Delta$ Zip-MS2 keine Veränderung aufwies. ( $n_{SG} = 25$ ,  $n_{PB} = 45$ , \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ ).

### 3.2 ZBP1 als "gatekeeper" in SGs

Als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen, welche eine zelluläre Stressreaktion auslösen, reorganisieren Zellen ihre Translatom und sortieren mRNAs, welche aus Polysomen freigesetzt werden in SGs (Anderson and Kedersha, 2002b; Kedersha and Anderson, 2002). Zusammen mit diesen mRNAs werden auch verschiedene RNA-bindende Proteine (RBPs) rekrutiert, welche in ungestressten Zellen Funktionen in der posttranskriptionellen Regulation verschiedener mRNAs besitzen, deren Funktion in SGs aber bislang ungeklärt ist (reviewed (Anderson and Kedersha, 2006)). ZBP1 ist ein solches RNA-bindendes Protein, welches ubiquitär in SGs rekrutiert wird (siehe Abb. 3.1-3.3). Über die Funktion von ZBP1 in SGs wird folgendes Modell postuliert: ZBP1 wird durch Assoziation mit RNA-Liganden vermutlich als Teil eines RNPs in SGs rekrutiert. Durch Assoziation mit seinen RNA-Liganden reguliert ZBP1 die Speicherung dieser Transkripte in SGs. Diese Regulation geschieht über dieselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen, welche in ungestressten Zellen für die Regulation der mRNA-Stabilität, Lokalisierung oder Translation einer mRNA durch ZBP1 verantwortlich sind. Unter Stress verhindert ZBP1 die Freisetzung seiner mRNA-Liganden aus SGs und damit deren Abbau durch PBs oder Exonukleasen des Exosoms. ZBP1 stabilisiert demnach seine RNA-Liganden, indem das Protein als "gatekeeper" in SGs fungiert. Dieses Modell beschreibt erstmalig eine Funktion, die RBPs wie ZBP1 während der zellulären Stressantwort in SGs ausüben können. Diese Funktion wurde im zweiten Teil der Arbeit genutzt, um neue mRNA-Liganden und regulatorische Protein-RNA-Netzwerke unter Stress zu identifizieren.

### 3.2.1 Die "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 in SGs zur Identifizierung neuer mRNA-Liganden

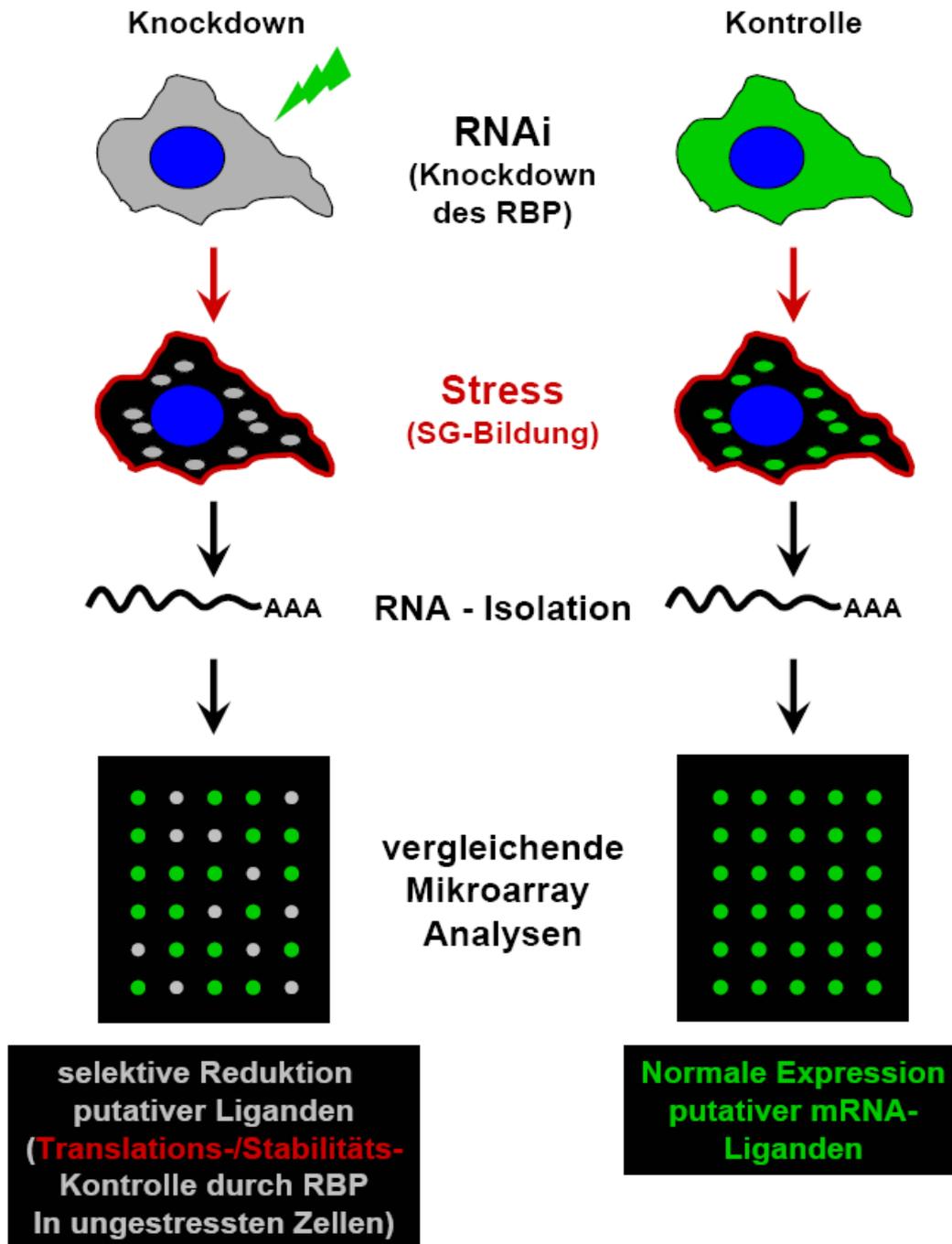
Die Suche nach neuen spezifischen RNA-Liganden für RBPs erweist sich oftmals als schwierig. Herkömmliche Verfahren unterliegen verschiedenen Limitierungen, die es erschweren, physiologisch relevante Liganden zu isolieren. Häufig verwendete *screening*-Ansätze sind zum einen RNAi-Experimente kombiniert mit vergleichenden Mikroarray-Analysen. Der Nachteil dieser Technik ist vor allem der, dass nur mRNAs, welche auf der Ebene der mRNA-Stabilität durch das RBP reguliert werden, isoliert werden können. Darüber hinaus müssen die Analysen auf mögliche Knockdown induzierte Sekundäreffekte, z.B. auf transkriptioneller Ebene, überprüft werden. Um translationell regulierte mRNA-Liganden zu identifizieren, ist es notwendig, Verschiebungen von mRNAs im Ribosomenprofil unter Knockdown des entsprechenden RBPs zu untersuchen. Auch diese Technik wird mit Mikroarray-Analysen kombiniert. Eine weitere häufig verwendete Methode, mit der sowohl stabilitäts- als auch translationskontrollierte RNA-Liganden von RBPs identifiziert werden können, ist der Pulldown-Assay. Bei diesem Verfahren wird das entsprechende RBP immunopräzipitiert. RNAs, die von dem RBP gebunden werden, sollten dabei ko-präzipitiert werden. Die spezifische Anreicherung dieser RNAs wird anschließend über vergleichende Mikroarray-Analysen ermittelt. Der Nachteil dieser Methode ist, dass es während der Präzipitation häufig zur Reorganisation von RNP-Komplexen kommt, wodurch es z. B. zur Isolierung falsch positiver Liganden kommen kann. Außerdem sind solche Analysen schwer durch interne Kontrollen zu normalisieren und unterliegen daher massiven qualitativen wie quantitativen Schwankungen.

Basierend auf für ZBP1 identifizierten "gatekeeper"-Funktion unter zellulärem Stress wurde daher ein neues *screening*-Verfahren entwickelt, mit welchem schnell und mit verhältnismäßig geringem Aufwand neue stabilitäts- und translationsregulierte Liganden in einem Analyseverfahren identifiziert werden können. Das SIRL-Verfahren (*Stress-based Isolation of RNA-Ligands*) ist vermutlich für RBPs anwendbar, die ein ähnliches Verhalten unter Stressbedingungen zeigen wie ZBP1.

### 3.2.1.1 Das SIRL-Verfahren

Die Grundlage des SIRL-Verfahren (*Stress-based Isolation of RNA-Ligands*) bildet die für ZBP1 identifizierte "gatekeeper"-Funktion in SGs. Die "gatekeeper"-Hypothese besagt, dass ZBP1 unter zellulärem Stress seine mRNA-Liganden in SGs stabilisiert. Demnach würde man unter Stress und reduzierter ZBP1-Proteinmenge eine Destabilisierung der mRNA-Liganden erwarten, wie es bereits für bekannte ZBP1 Zielgene beobachtet wurde (Abb. 3.18). Da die "gatekeeper"-Funktion auf spezifischen *cis/trans*-Interaktionen beruht, wie sie auch in ungestressten Zellen vorkommen, würde man erwarten, dass physiologisch relevante mRNA-Liganden unter Stress und ZBP1 Knockdown destabilisiert werden. Diese Destabilisierung sollte zudem unabhängig von der Art der Regulation durch ZBP1 in ungestressten Zellen sein, sodass sowohl stabilitäts- als auch translationsregulierte mRNAs isoliert werden können.

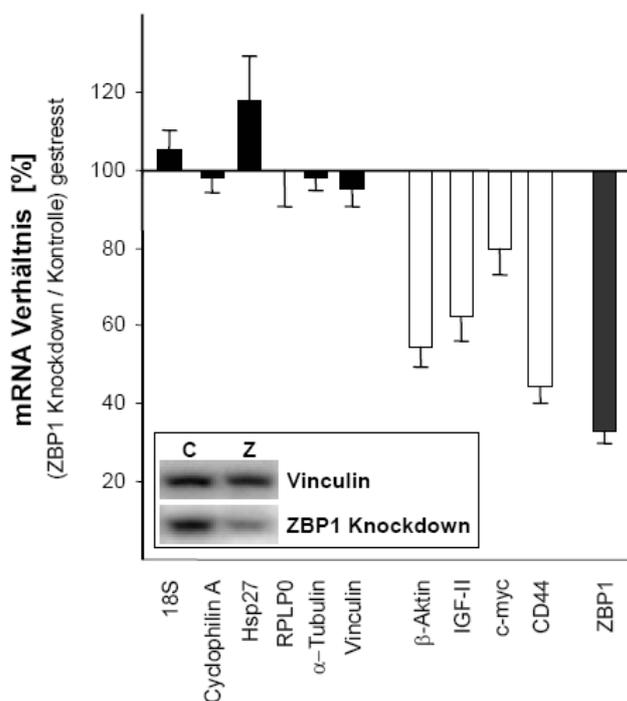
Unter diesen Voraussetzungen wurde der in Abb. 3.24 dargestellte Versuchsaufbau konzipiert. Zunächst wird in einer Zellpopulation die Proteinmenge des zu analysierenden RBPs, in diesem Fall ZBP1, reduziert. Anschließend wird dieser Population sowie einer Kontrollpopulation, transfiziert mit Kontroll-siRNAs, Stress appliziert, wodurch SGs entstehen. Dadurch werden in der Knockdownpopulation putative mRNA-Liganden selektiv destabilisiert. Diese Destabilisierung involviert mRNAs, die unter Normalbedingungen sowohl auf der Ebene der mRNA-Stabilität als auch der Translation durch das RBP reguliert werden. Die im Anschluss isolierte Gesamt-RNA wird mit Hilfe von vergleichenden Mikroarrays analysiert. Hierbei sollten putative RNA-Liganden in der Knockdownpopulation selektiv reduziert sein. Der Vorteil des Verfahrens liegt darin, dass im Gegensatz zu herkömmlichen Methoden in einem einzigen Ansatz sowohl mRNA-Liganden identifiziert werden können, die unter Normalbedingungen auf der mRNA-Stabilitätsebene als auch auf der Ebene der Translation durch das RBP reguliert werden.



**Abb. 3.24: Das SIRL-Verfahren.** Die Proteinmenge des zu untersuchenden RBPs wird z.B. mittels RNAi reduziert. In der Knockdown- sowie Kontrollpopulation wird anschließend Stress induziert, wodurch SGs entstehen. Nach der Isolation der Gesamt-RNA werden vergleichende Mikroarrayanalysen durchgeführt. Dabei sind putative RNA-Liganden in der Knockdown-Population selektiv reduziert. Durch die der Methode zugrunde liegende "gatekeeper"-Funktion werden unter Stress und Knockdown mRNAs destabilisiert, welche unter Normalbedingungen durch das RBP sowohl stabilitäts- als auch translationsreguliert sein können.

### 3.2.1.2 Die Anwendung des SIRL-Verfahrens zur Identifizierung von ZBP1-Liganden

Zur Isolierung putativer ZBP1 Liganden mittels SIRL wurden U2OS-Zellen mit ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. Oxidativer Stress wurde 72 h nach Transfektion durch Zugabe von Arsenat für 2 h appliziert. Aus einem Teil der Zellen wurde Proteinextrakt hergestellt, um den ZBP1 Knockdown mittels Western Blot zu überprüfen (Abb. 3.25, Box). Aus den übrigen Zellen wurde Gesamt-RNA mittels TRIZOL isoliert und anschließend mit dem *RNeasy MinElute Cleanup Kit* von QIAGEN nachgereinigt. Veränderungen der RNA-Menge bekannter ZBP1 Zielgene wurden mittels qRT-PCR überprüft (Abb. 3.25). Dabei wurde festgestellt, dass in diesem Experiment die Reduktion der *c-myc* mRNA verglichen mit der Kontrolle nur gering war.



**Abb. 3.25: Evaluierung der zur Mikroarray-Hybridisierung verwendeten RNA.** U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde für 2 h Stress durch Arsenat-Applikation induziert. Die isolierte und nachgereinigte Gesamt-RNA wurde mittels qRT-PCR hinsichtlich der Veränderung bekannter ZBP1 Zielgene untersucht. Der ZBP1 Knockdown wurde mittels Western Blot überprüft (Box, Kontroll-siRNAs (C), ZBP1 spezifische siRNAs (Z)) sowie qRT-PCR überprüft (grauer Balken).

Anschließend wurde eine Mikroarray Analyse der RNA in der Microarray Core Facility des Interdisziplinären Zentrums für klinische Forschung (IZKF) Leipzig (Medizinische Fakultät, Universität Leipzig) durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die RNA-Beschaffenheit und Konzentration in einem Agilent 2100 Bioanalyzer unter Verwendung des RNA 6.000 LabChip Kit nach Herstellerangaben untersucht. Aus 5 µg Gesamt-RNA wurde unter Verwendung der Superscript II und oligo dT Primern, welche ihrerseits einen T7 RNA-Polymerase Promotor enthielten, doppelsträngige cDNA hergestellt. Die cDNA wurde mittels

Phenol/Chloroform-Extraktion gereinigt und anschließend unter Verwendung des IVT labeling Kits von Affimetrix zu cRNA *in vitro* transkribiert. Nicht inkorporierte Nukleotide wurden mittel RNeasy Kit von QIAGEN entfernt. Ein Affymetrix GeneChip HG133 Plus 2.0 Array wurde mit der zuvor fragmentierten cRNA hybridisiert. In gleicher Weise wurde für die Kontroll-RNA ein Kontroll-Array durchgeführt. Beide Arrays wurden mit einem Third Generation Affymetrix GeneChipScanner 3000 mit 7G upgrade detektiert.

Affymetrix GeneChip Daten repräsentieren ca. 47,000 Transkripte, die das vollständige humane Genom abdecken. Die Auswertung sowie Normalisierungen mittels Interarray wurden mit Hilfe der MAS 5.0 *software* durch Dr. Krohn durchgeführt.

### 3.2.1.3 Die SIRT-Daten basierend auf Mikroarray-Analysen

Tab. 1

MikroArray Probe Set ID	Gen Titel	Symbol	GenBank ID	MikroArray Daten Kontrolle	ZBP1
206252_s_at	arginine vasopressin receptor 1A	AVPR1A	NM_000706	P	A
234210_x_at	ARP2 actin-related protein 2	ACTR2	NM_005722	P	A
206665_s_at	BCL2-like 1, cancer, apoptosis, FAS (FAST)	BCL2L1	NM_138578	P	A
223916_s_at	BCL6 co-repressor	BCOR	NM_017745	P	A
91920_at	brevican	BCAN	NM_021948	P	A
236582_at	Cleavage and polyadenylation specific factor 6	CPSF6	NM_007007	P	A
211913_s_at	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	MERTK	NM_006343	P	A
242194_at	Cullin 4A	CUL4A	NM_001008895	P	A
228952_at	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	ENPP1	NM_006208	P	A
205231_s_at	epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Laforin	EPM2A	NM_014805	P	A
226613_at	Homo sapiens TBC1 domain family, member 10A	TBC1D10A	NM_031937	P	A
201015_s_at	junction plakoglobin	JUP	NM_002230	P	A
222346_at	laminin alpha 1	LAMA1	NM_005559	P	A
243361_at	lymphoid enhancer-binding factor 1	LEF1	NM_016269	P	A
204708_at	mitogen-activated protein kinase 4	MAPK4, p63	NM_002747	P	A
206237_s_at	neuregulin 1	NRG1	NM_013964	P	A
209982_s_at	neurexin 2	NRXN2	NM_015080	P	A
228006_at	Phosphatase and tensin homolog	PTEN	NM_000314	P	A
242022_at	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1	PBX1	NG_002434	P	A
215987_at	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	RAPGEF2	XM_376350	P	A
204635_at	ribosomal protein S6 kinase	MSK1	NM_004755	P	A
201205_at	ribosome binding protein 1	RRBP1	NM_004587	P	A
227923_at	SH3 and multiple ankyrin repeat domains	SHANK3	XM_037493	P	A
235680_at	Signal transducer and activator of transcription 3	STAT3	NM_139276	P	A
212000_at	splicing factor, arginine/serine-rich 14	SFRS14	NM_001017392	P	A

**Tab. 3.1: Auswahl der im Mikroarray am stärksten betroffenen Gene.** Durch vergleichende Mikroarray-Analysen wurden 128 Gene als "vorhanden" in der Kontrollpopulation jedoch "abwesend" infolge ZBP1 Knockdown identifiziert (vollständige Liste siehe Anhang Tab. 6.2). Davon wurden diese in der Tabelle dargestellten 25 Gene für weitere Analysen ausgewählt.

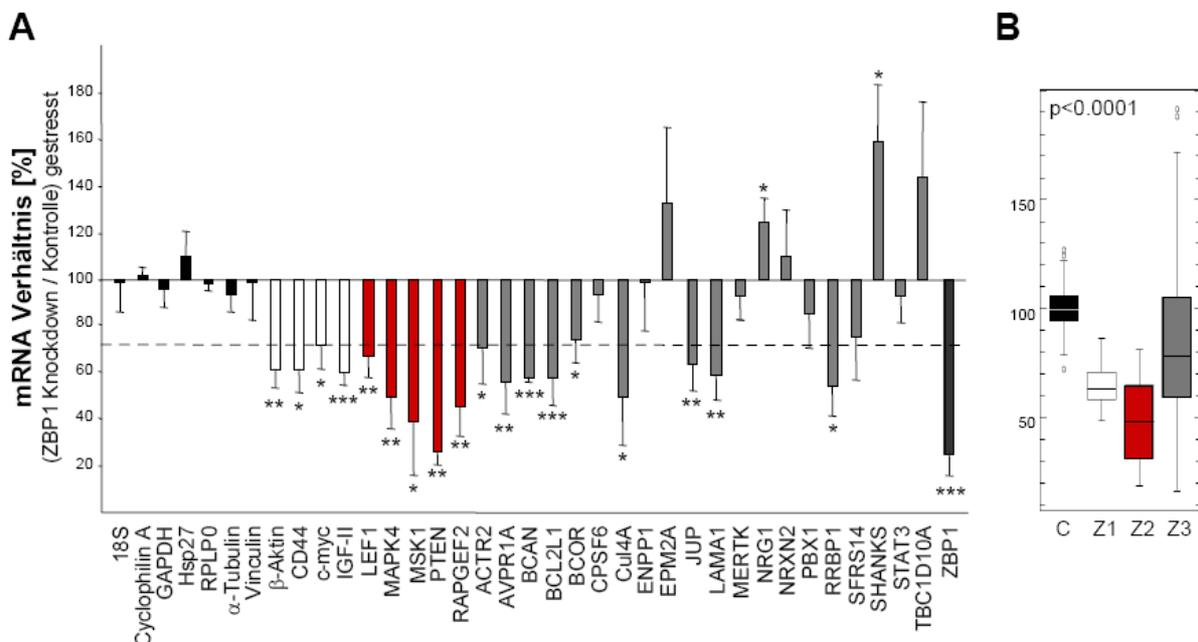
Die Auswertung der vergleichenden Mikroarray-Analysen wurde durch Dr. Krohn vom IZKF Leipzig durchgeführt. Dabei wurden 128 Gene identifiziert, welche im Kontrollarray als "vorhanden" infolge ZBP1 Knockdown jedoch als "abwesent" detektiert wurden. Eine vollständige Liste dieser im Array am stärksten affizierten Gene befindet sich im Anhang in Tab. 6.2. Aus dieser Liste wurden 25 Gene ausgewählt (Tab. 3.1), welche im Folgenden mit verschiedenen Methoden näher charakterisiert wurden: (1) Validierung der Stabilitätskontrolle durch ZBP1 unter zellulärem Stress; (2) Assoziation mit ZBP1 in ungestressten Zellen; (3) Regulation auf posttranskriptioneller Ebene durch ZBP1 in ungestressten Zellen.

### 3.2.2 Charakterisierung der durch SIRT identifizierten mRNAs

#### 3.2.2.1 ZBP1 Knockdown destabilisiert putative Liganden unter oxidativem Stress

Um eine Destabilisierung putativer RNA-Liganden infolge ZBP1 zu verifizieren, wurde einer ZBP1 Knockdown- und einer Kontrollpopulation von U2OS-Zellen für 2 h oxidativer Stress zugeführt. Anschließend wurden Veränderungen im RNA-Gehalt der zu analysierenden Gene mittels qRT-PCR charakterisiert. Der Normalisierung gleicher mRNA-Mengen dienten in diesem Versuch sieben RNAs (18S rRNA,  $\alpha$ -Tubulin, Cyclophilin A, GAPDH, HSP27, RPLP0 und Vinculin), welche nicht durch ZBP1 posttranskriptionell reguliert werden (Abb. 3.26 schwarze Balken, C im Box-Plot). Diese RNAs wiesen als Negativkontrollen keine signifikante Veränderung auf. Der Knockdown von ZBP1 wurde auf RNA-Ebene evaluiert (Abb. 3.26 A, dunkelgrauer Balken). Die bekannten ZBP1 Zielgene  $\beta$ -Aktin, CD44, c-myc und IGF-II fungierten als Positivkontrolle (Abb. 3.26 A weiße Balken, Z1 im Box-Plot), sie waren nach ZBP1 Knockdown und Stress statistisch signifikant reduziert. Die c-myc mRNA, welche die geringste Veränderung aufwies, bildete die Grundlage für den Schwellenwert (getrichelte Linie), ab welchen eine mRNA als verändert beurteilt wurde. Abb. 3.26 A zeigt, dass die meisten der SIRT-Gene (Abb. 3.26 A, rote und graue Balken, Z2 und Z3 im Box-Plot) infolge ZBP1 Knockdown und oxidativen Stresses destabilisiert werden. Einige der mRNAs wiesen z.T. stärkere Effekte auf als die bekannten ZBP1 Zielgene. Zur Überprüfung der statistischen Signifikanz der Messungen wurde ein Anova-Test durchgeführt

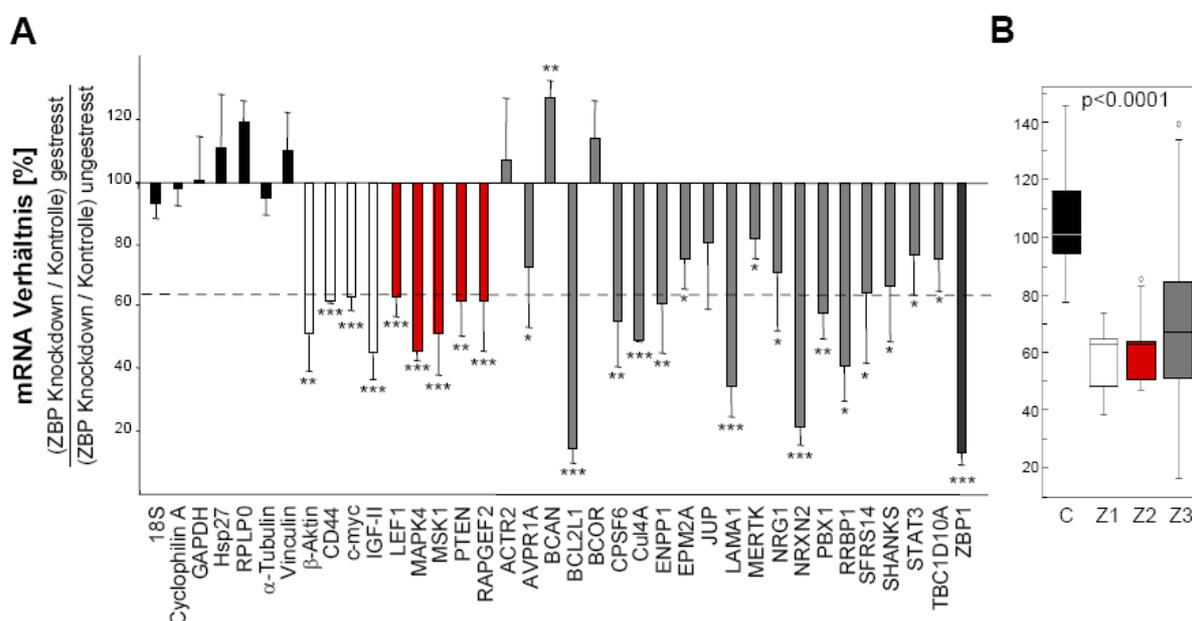
(Abb. 3.26 B, Box-Plot). Verglichen mit den Kontrollen (C, schwarz) waren die bekannten Zielgene (Z1, weiß) sowie ein Teil der SIRL-Gene (Z2, rot) statistisch signifikant reduziert. Eine weitere Gruppe von SIRL-Genen (Z3, grau) wies eine starke Streuung auf (siehe auch Einzelmessungen). Dies deutet darauf hin, dass diese Gruppe neben putativen Liganden auch mRNAs enthält, welche scheinbar nicht direkt durch ZBP1 reguliert werden. Der durchgeführte Anova-Test erlaubte eine Analyse der einzelnen mRNAs mittels Student' s t-Test, welcher für die bekannten sowie die meisten der SIRL-Gene eine statistische Signifikanz der Reduktion bestätigte. Diese Reduktion lässt sich zum einen mit der "gatekeeper" Funktion von ZBP1 unter Stress begründen, könnte zum anderen aber auch aus Sekundäreffekten herrühren, welche durch den Knockdown von ZBP1 hervorgerufen werden könnten.



**Abb. 3.26: Destabilisierung putativer ZBP1 Liganden unter Stress und Knockdown.** (A) U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress für 2 h appliziert und anschließend Gesamt-RNA isoliert. Das mRNA Verhältnis zwischen ZBP1 Knockdown und Kontrolle wurde mittels qRT-PCR für sieben Kontroll-RNAs (schwarze Balken, C in B), bekannte ZBP1-Zielgene (weiße Balken, Z1 in B), ZBP1 Knockdown (dunkelgrauer Balken) sowie die SIRL-Gene (rote und graue Balken, Z2 und Z3 in B) analysiert. Die sieben Kontrollgene dienten dabei der Normalisierung gleicher mRNA-Mengen. Die meisten der SIRL-Gene sind in ähnlichem Maße reduziert wie die bekannten ZBP1-Zielgene und stellen damit putative Liganden dar. Die gestrichelte Linie bezeichnet den Schwellenwert, ab dem eine mRNA als verändert beurteilt wurde. (B) Anova-Test dargestellt als Box-Plot zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der Unterschiede im RNA-Gehalt. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

Um Sekundäreffekte als Ursache für die in Abb. 3.26 dargestellten Veränderungen des mRNA-Gehalts auszuschließen, wurde der oben dargestellte Versuch unter Berücksichtigung

der RNA-Inputmengen vor Stressinduktion wiederholt. Dazu wurden die Zellen nach Reduktion der endogenen ZBP1 Proteinmenge zu gleichen Teilen partagiert. Der eine Teil der Zellen wurde für 2 h mit Arsenat gestresst, bevor die RNA mittels qRT-PCR analysiert wurde. Der andere Teil der Zellen wurde ungestresst analysiert. In Abb. 3.27 ist das mRNA-Verhältnis zwischen ZBP1 Knockdown- und Kontrollpopulation von gestressten Zellen über demselben Verhältnis in ungestressten Zellen dargestellt. Die der Normalisierung dienenden sieben Kontrollgene (Abb. 3.27 A, schwarze Balken, C im Box-Plot), wiesen keine signifikanten Mengenveränderungen auf. Der ZBP1 Knockdown wurde auf RNA-Ebene validiert (Abb. 3.27 A, dunkelgrauer Balken). Die bekannten ZBP1 Zielgene wiesen eine deutliche und statistisch signifikante Reduktion auf (Abb. 3.27 A weiße Balken, Z1 im Box-Plot). Auch in diesem Versuch bildete die *c-myc* mRNA die Grundlage für den Schwellenwert (gestrichelte Linie), ab welchen eine mRNA als verändert beurteilt wurde. Auch nach Normalisierung auf ungestresste Zellen (RNA-Inputmengen) waren die meisten der SIRT-Gene statistisch signifikant reduziert (Abb. 3.27 A, rote und graue Balken, Z2 und Z3 im Box-Plot). Die Normalisierung auf eine ungestresste Zellpopulation eliminiert dabei potentielle Sekundäreffekte, welche durch den ZBP1 Knockdown hervorgerufen werden. Darüber hinaus kann durch diese Art der Auswertung die beobachtete Reduktion der mRNA-Mengen ausschließlich der "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress zugeschrieben werden, wenngleich die Effekte dadurch z. T. geringer ausfallen. Auch in diesem Experiment wurde die statistische Signifikanz der Veränderungen mittels Anova-Test (Abb. 3.27 B, Box-Plot) und Student's t-Test charakterisiert.

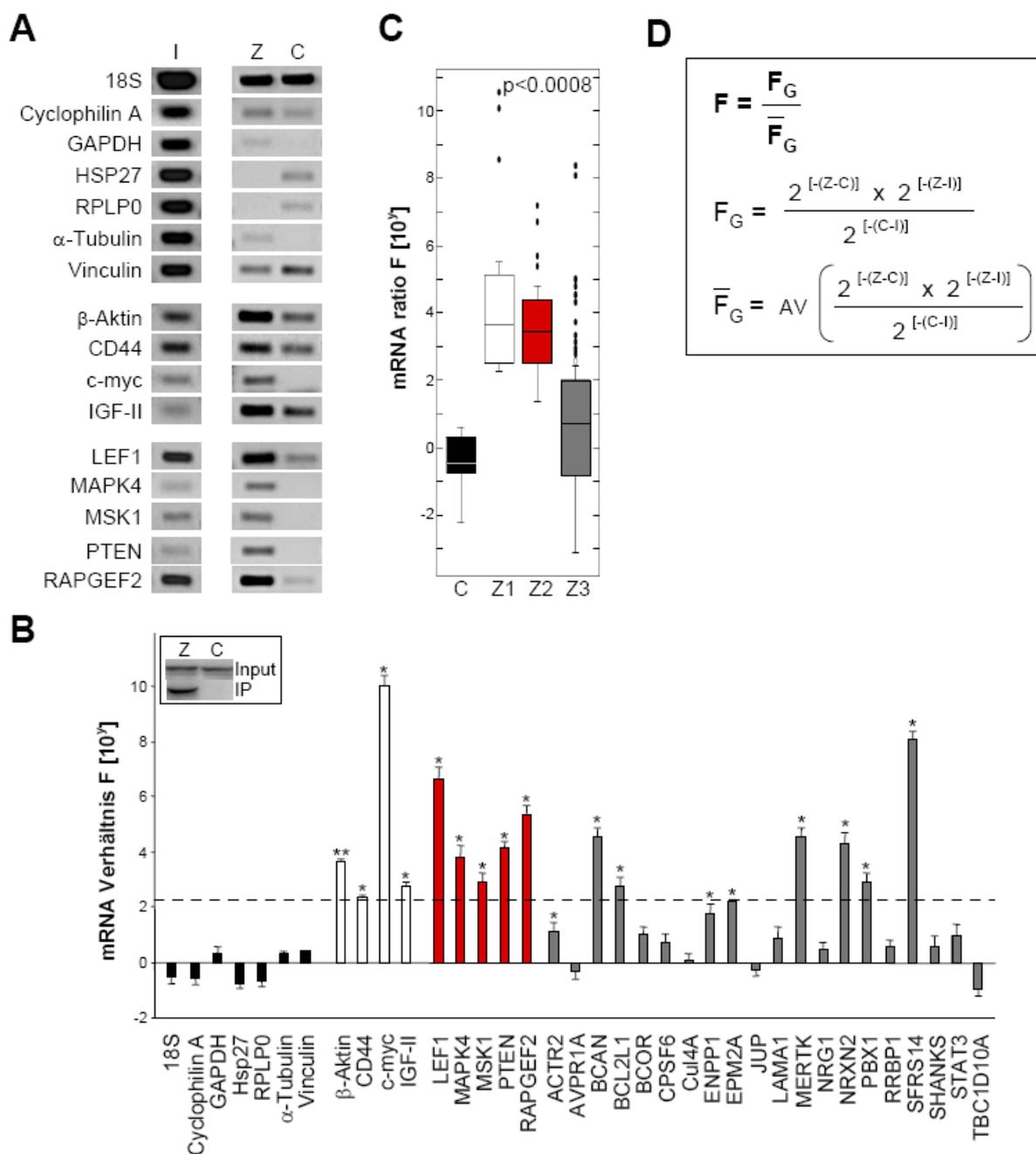


**Abb. 3.27: Destabilisierung putativer ZBP1 Liganden nach ZBP1 Knockdown und oxidativem Stress nach Normalisierung auf RNA-Inputmengen.** (A) U2OS-Zellen wurden mit ZBP1 spezifischen und Kontroll-siRNAs transfiziert und zu gleichen Teilen partigiert. 72 h nach Transfektion wurde die Hälfte der Zellen 2 h gestresst, die andere Hälfte der Zellen wurde ungestresst analysiert. Die anschließend isolierte Gesamt-RNA aller vier Populationen wurde mittels qRT-PCR für sieben Kontroll-RNAs (schwarze Balken, C in B), bekannte ZBP1-Zielgene (weiße Balken, Z1 in B), ZBP1 Knockdown (dunkelgrauer Balken) sowie die SIRL-Gene (rote und graue Balken, Z2 und Z3 in B) analysiert. Dargestellt ist das Verhältnis zwischen ZBP1 Knockdown und Kontrolle in gestressten Zellen über demselben Verhältnis in ungestressten Zellen (RNA-Inputmengen). Die meisten der SIRL-Gene sind in ähnlichem Maße reduziert wie die bekannten ZBP1-Zielgene und stellen damit putative Liganden dar. (B) Anova-Test zur Untersuchung der statistischen Signifikanz der Unterschiede im RNA-Gehalt. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

### 3.2.2.2 Assoziation von SIRL-Transkripten mit ZBP1 in ungestressten Zellen

Mit den beiden vorangegangenen Experimenten wurde der Einfluss von ZBP1 auf die Stabilität putativer mRNA-Liganden unter Stress untersucht. Zur Identifizierung physiologisch relevanter Zielgene ist es jedoch von Bedeutung, dass Letztere auch unter Normalbedingungen von ZBP1 reguliert werden. Eine wichtige Voraussetzung für eine Regulation auf posttranskriptioneller Ebene ist die Assoziation der RNA mit ZBP1. Um zu untersuchen, ob die SIRL-Gene in nicht gestressten Zellen mit ZBP1 assoziieren, wurde ein Pulldown-Experimente in U2OS- sowie HEK293-Zellen durchgeführt, wobei endogenes ZBP1 wurde mittels monoklonaler Antikörper immunopräzipitiert wurde. Im Anschluss wurde die RNA aus dem Präzipitat, dem Input sowie einem Kontrollpräzipitat isoliert und mittels semi-quantitativer bzw. quantitativer RT-PCR analysiert.

Abb. 3.28 A zeigt die semi-quantitative RT-PCR nach 40 Zyklen für sieben Kontrollgene, die bekannten Zielgene  *$\beta$ -Aktin*, *CD44*, *c-myc* und *IGF-II* sowie eine Auswahl der SIRL-Gene. Es ist zu erkennen, dass die bekannten wie auch die untersuchten putativen Liganden im ZBP1-Pulldown (Z) verglichen mit dem Kontroll-Pulldown (C) und dem RNA-Input (I) angereichert sind, während dies für die Kontrollgene mit Ausnahme von *Cyclophilin A* und  *$\alpha$ -Tubulin* nicht der Fall ist.



**Abb. 3.28: Spezifische Assoziation putativer RNA-Liganden mit ZBP1 in nicht gestressten Zellen.** (A) ZBP1 wurde aus ungestressten U2OS- sowie HEK293-Zellen mit spezifischen Antikörpern immunopräzipitiert. Aus dem Präzipitat wurde die ko-präzipitierte RNA isoliert und mittels semi-qRT-PCR analysiert. Nach 40 Zyklen wurde für bekannte Zielgene sowie für ausgewählte SIRL-Gene eine spezifische Anreicherung im ZBP1-Pulldown (Z) verglichen mit Kontroll-Pulldown (C) und RNA-Input (I) beobachtet, während die Kontrollgene keine bzw. eine geringfügige Anreicherung aufwiesen. (B+C) Zur Quantifizierung der Anreicherung wurde die RNA mittels qRT-PCR analysiert. Anschließend wurde ein normalisierter Aufreinigungsindex [F] nach der in (D) dargestellten Formel berechnet. Die gestrichelte Linie bezeichnet den Schwellenwert, ab welchem eine mRNA als angereichert beurteilt wurde. Das Inset in (B) zeigt den Western Blot der ZBP1-IP bzw. Kontroll-IP. Die statistische Signifikanz der Anreicherung wurde mittels Anova (C) und Student' s t-Test untersucht. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus mind. 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

Aufgrund der leichten Anreicherung zweier Kontrollgene (*Cyclophilin A* und  $\alpha$ -*Tubulin*) war es notwendig, die spezifische Anreicherung einer RNA gegenüber dem Kontroll-*pulldown* sowie dem RNA-Input mittels qRT-PCR zu quantifizieren. Hierfür wurde ein normalisierter Aufreinigungssindex [F] nach der in Abb. 3.28 D dargestellten Formel berechnet. [F] errechnet sich dabei aus dem spezifischen Aufreinigungsindex  $[F_G]$  über  $[\overline{F_G}]$ , wobei  $[\overline{F_G}]$  der Mittelwert der spezifischen Aufreinigungsindices  $F_G$  der sieben Kontrollgene bezeichnet. Diese Normalisierung ermöglicht es, mehrere unabhängige Experimente miteinander zu vergleichen. In Abb. 3.28 B sind die normalisierten Aufreinigungsindices für sieben Kontrollgene (schwarz), die bekannten Zielgene (weiß) sowie SIRL-Gene (rot und grau) dargestellt. Dabei ist zu erkennen, dass die bekannten ZBP1 Zielgene sowie einige der SIRL-Gene im Vergleich zu den Kontrollgenen stark angereichert sind. Die gestrichelte Linie bezeichnet den Schwellenwert, ab welchem eine mRNA als angereichert beurteilt wurde. Der Schwellenwert basiert auf der *CD44* mRNA, welche als bekannter ZBP1-Ligand die geringfügigste Anreicherung aufwies.

Die statistische Signifikanz der spezifischen Anreicherung bekannter Zielgene (Z1) sowie der SIRL-Gene (Z2 und Z3) wurde gegenüber den Kontrollgenen (C) mittels Anova-Test (Abb. 3.28 B, Box-Plot) und Student's t-Test analysiert. Hierbei wurde festgestellt, dass die Population Z3 sowohl putative ZBP1 Liganden als auch mRNAs enthält, welche nicht mit ZBP1 assoziieren.

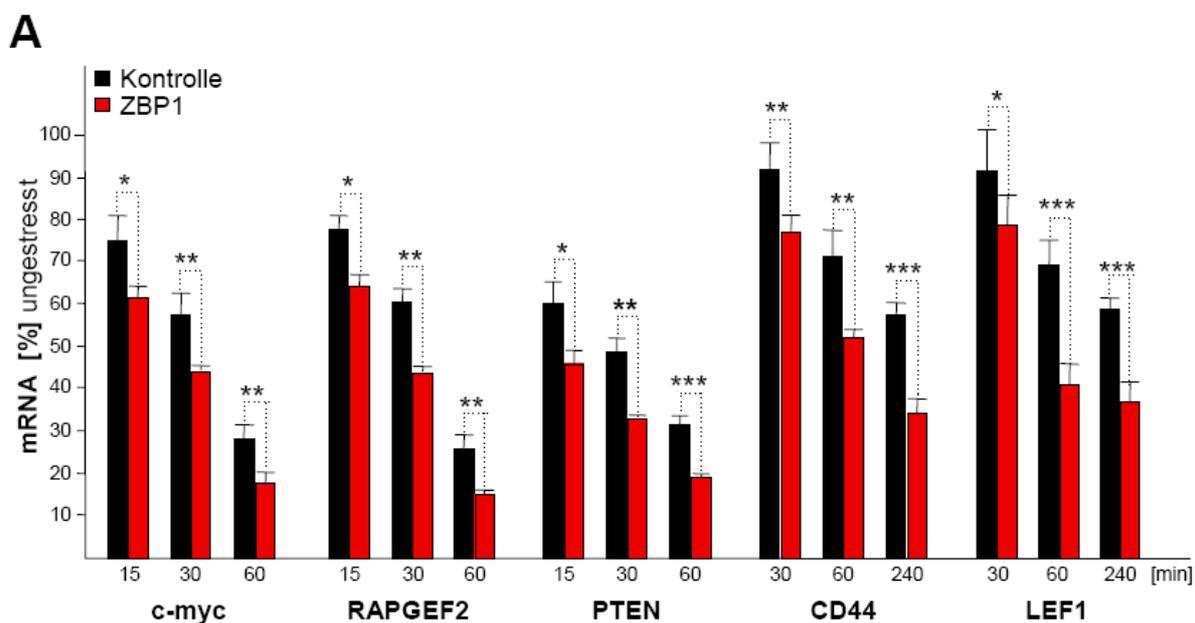
### 3.2.3 Posttranskriptionelle Regulation ausgewählter SIRL-Transkripte durch ZBP1 unter Normalbedingungen

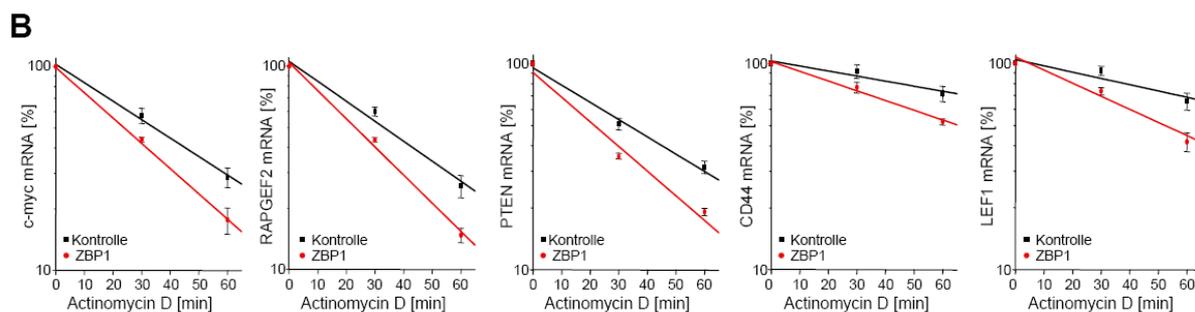
Nach detaillierter Evaluierung der SIRL-Gene mit Hilfe der unter 3.2.2.1 – 3.2.2.3 dargestellten Experimente wurden alle diejenigen Gene als putative ZBP1 Liganden beurteilt, welche in allen drei Assays mindestens so stark affektiert waren wie die unter Stress an wenigsten destabilisierte sowie im Pulldown am geringfügigsten angereicherte bekannte Ziel-mRNA (siehe Schwellenwert). Demnach wurden für weitere Analysen alle diejenigen Gene ausgewählt, welche unter Stress mindestens so stark destabilisiert wurden wie die *c-myc* mRNA und mindestens so effizient mit ZBP1 assoziieren wie die *CD44* mRNA. Auf diesem Weg wurden *LEF1*, *MAPK4*, *MSK1*, *PTEN* und *RAPGEF2* als putative ZBP1 Liganden identifizierten (rote Balken in Abb. 3.26 -3.28). Diese mRNAs wurden im Folgenden

hinsichtlich ihrer Regulation auf posttranskriptioneller Ebene durch ZBP1 in ungestressten Zellen charakterisiert. Hierbei wurde der Einfluss von ZBP1 auf die Stabilität der mRNA sowie auf die Translation der putativen Liganden untersucht.

### 3.2.3.1 Einfluss von ZBP1 auf die mRNA-Stabilität putativer mRNA-Liganden

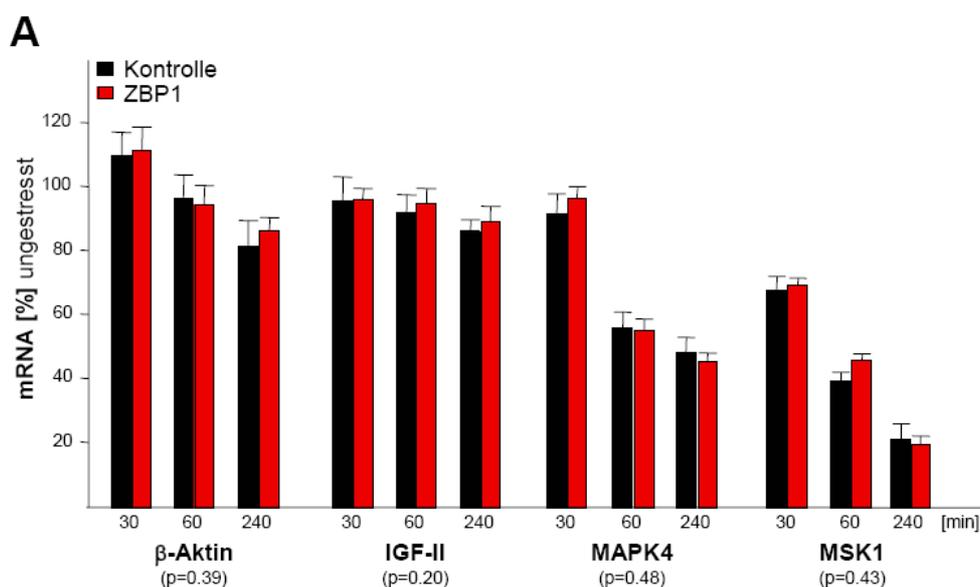
Um den Einfluss von ZBP1 auf die mRNA-Stabilität der putativen Liganden zu untersuchen, wurde der Abbau dieser mRNAs unter ZBP1 Knockdown untersucht. Hierfür wurde nach Reduktion der endogenen ZBP1-Proteinmenge die Polymerase II-Transkription durch Applikation von Aktinomycin D inhibiert. Der Einfluss auf die mRNA-Stabilität unter ZBP1 Knockdown wurde für verschiedene Zeitpunkte mittels qRT-PCR analysiert. Dabei dienten 18S rRNA und die *Cyclophilin A* mRNA der Normalisierung gleicher RNA-Mengen. Durch diese Analysen wurde festgestellt, dass die *PTEN* und *RAPGEF2* mRNAs infolge ZBP1 Knockdowns destabilisiert wurden (Abb. 3.29). Beide mRNAs wiesen eine ähnliche kurze Halbwertszeit wie *c-myc* auf. Auch die *LEF1* mRNA wurde nach Knockdown von ZBP1 destabilisiert (Abb. 3.29). Diese mRNA besaß jedoch eine wesentlich längere Halbwertszeit und zeigte daher ein der *CD44* mRNA ähnliches Abbauverhalten (Abb. 3.29). Die Untersuchungen des mRNA-Abbaus verdeutlichen, dass ZBP1 unter physiologisch normalen Bedingungen die mRNA-Stabilität der durch SIRL identifizierte mRNAs *LEF1*, *PTEN* und *RAPGEF2* beeinflusst.

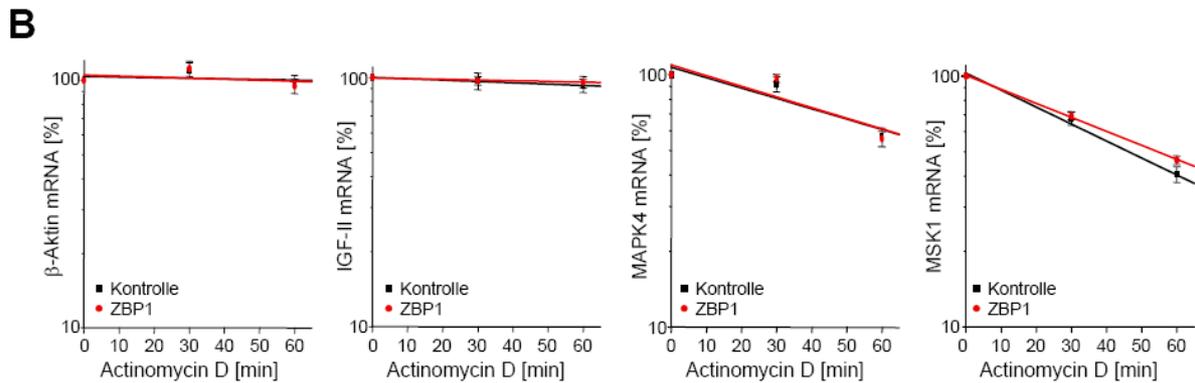




**Abb. 3.29: Destabilisierung der *LEF1*, *PTEN* und *RAPGEF2* mRNA infolge des ZBP1 Knockdowns.** U2OS Zellen wurden mit für ZBP1 spezifischen (rot) sowie Kontroll-siRNAs (schwarz) transfiziert und partagiert. 72h nach Transfektion wurde die Transkription durch Zugabe von Actinomycin D für die angegebenen Zeitpunkte inhibiert. Die RNA wurde mittels qRT-PCR analysiert, wobei 18S rRNA und *Cyclophilin A* als Normalisierungskontrollen dienen. **(A)** Abbau der untersuchten mRNAs einer ZBP1 Knockdown- sowie Kontrollpopulation. Alle dargestellten mRNAs wurden nach ZBP1 Knockdown statistisch signifikant destabilisiert. **(B)** Die logarithmische Darstellung verdeutlicht eine erhöhte Abbaugeschwindigkeit für alle fünf untersuchten mRNAs. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

Im Gegensatz dazu wurde für die *MAPK4* und *MSK1* mRNA keine Destabilisierung nach ZBP1 Knockdown beobachtet (Abb. 3.30). *MAPK4* und *MSK1* wiesen kürzere Halbwertszeiten als die mRNAs der bekannten Zielgene  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* auf. Dennoch blieben diese beiden mRNAs ähnlich wie  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* vom ZBP1 Knockdown unbeeinflusst (Abb. 3.30). Es ist bekannt, dass  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* auf Translationsebene durch ZBP1 reguliert werden (Huttelmaier et al., 2005; Nielsen et al., 1999), jedoch keine Veränderungen der mRNA-Menge unter ZBP1 Knockdown aufweisen (siehe Abb. 3.18). Dies lässt vermuten, dass auch die *MAPK4* und *MSK1* mRNAs auf translationeller Ebene durch ZBP1 reguliert werden.



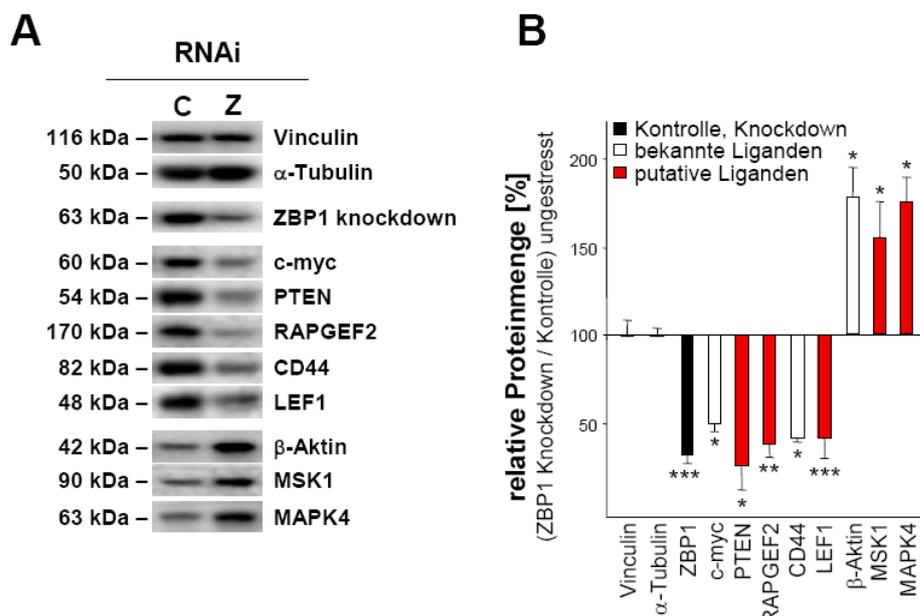


**Abb. 3.30: mRNA-Stabilität von *MAPK4* und *MSK1* bleibt infolge des ZBP1 Knockdowns unbeeinflusst.** U2OS-Zellen wurden wie in Abb. 3.29 behandelt und analysiert. **(A)** zeigt den Abbau der untersuchten mRNAs einer ZBP1 Knockdown- sowie Kontrollpopulation. Der ZBP1 Knockdown hat keinen statistisch signifikanten Einfluss auf den Abbau der dargestellten mRNAs. **(B)** Die logarithmische Darstellung verdeutlicht, dass die Abbaugeschwindigkeit der vier untersuchten mRNAs zwischen Knockdown und Kontrolle nicht unterscheiden. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

### 3.2.3.2 Einfluss von ZBP1 auf die Translation putativer Liganden

Um zu untersuchen, ob ZBP1 tatsächlich die Translation der *MAPK4* und *MSK1* mRNAs *in vivo* reguliert, wurden mittels semi-quantitativen Western-Blottings Veränderungen der endogenen Proteinmenge nach ZBP1 Knockdown analysiert. Darüber hinaus wurden in diesem Experiment die Ergebnisse der mRNA-Abbau-Versuche für die stabilitätskontrollierten Ziel-mRNAs validiert. Kontrolliert ZBP1 die Stabilität einer mRNA, so wird diese nach ZBP1 Knockdown schneller degradiert (siehe Abb. 3.29). Dies führt zu einer reduzierten endogenen Proteinmenge, da weniger Transkripte translatiert werden können. Wirkt ZBP1 jedoch als translationeller Repressor, so werden unter ZBP1 Knockdown weniger Transkripte reprimiert. Die Translation und damit die endogene Proteinmenge sollten erhöht sein, wohingegen die RNA-Menge unbeeinflusst bleiben sollte.

Abb. 3.31 zeigt, dass der Knockdown von ZBP1 wie erwartet die endogene Proteinmenge von c-myc, CD44, LEF1, PTEN und RAPGEF2 verringert, was eine Regulation der RNA-Stabilität dieser Transkripte durch ZBP1 bestätigt. Darüber hinaus war die endogene  $\beta$ -Aktin, MAPK4 und MSK1 Proteinmenge signifikant erhöht, was die vermutete translationelle Repression durch ZBP1 unterstützt.



**Abb. 3.31: ZBP1 Knockdown erhöht die Translation der *MAPK4* und *MSK1* mRNA.**

U2OS Zellen wurden mit für ZBP1 spezifischen sowie Kontroll-siRNAs transfiziert. 72 h nach Transfektion wurde ein Proteinextrakt hergestellt und ein semi-quantitativer Western Blott durchgeführt. (A) Reduktion der endogenen Proteinmenge von

ZBP1, c-myc, PTEN, RAPGEF2, CD44 und LEF1 nach ZBP1 Knockdown (Z) verglichen mit der Kontrolle (C). Die Proteinmengen von  $\beta$ -Aktin, MAPK4 und MSK1 waren hingegen nach ZBP1 Knockdown signifikant erhöht. Vinculin und  $\alpha$ -Tubulin dienten als Ladekontrollen. (B) Quantifizierung der Proteinmengen. Das Diagramm stellt die relative Proteinmenge zwischen Knockdown- und Kontrollpopulation nach Normalisierung auf Vinculin und  $\alpha$ -Tubulin dar. Fehlerbalken bezeichnen Standardabweichung aus 3 unabhängigen Experimenten. \*,  $p \leq 0.05$ ; \*\*,  $p \leq 0.005$ ; \*\*\*,  $p \leq 0.0005$ .

Zusammenfassend wurden mittels SIRL zahlreiche putative RNA-Liganden von ZBP1 identifiziert. Für fünf dieser putativen Liganden wurde eine posstranskriptionelle Regulation durch ZBP1 unter Normalbedingungen festgestellt. Diese Untersuchungen lassen vermuten, dass in ungestressten Zellen ZBP1 die Stabilität der *LEF1*, *PTEN* und *RAPGEF2* mRNA reguliert und als translationeller Repressor der *MAPK4* und *MSK1* mRNA fungiert. Damit unterstützen die Daten die für ZBP1 postulierte "gatekeeper"-Funktion in SGs, welche erstmalig eine Funktion für RBPs in SGs beschreibt. Darüber hinaus stellt das SIRL-Verfahren eine neue Technik dar, die es ermöglicht, schnell und mit verhältnismäßig geringem technischen Aufwand neue RNA-Liganden zu identifizieren, die sowohl auf Stabilitäts- oder aber Translationsebene von einem RBPs in ungestressten Zellen reguliert werden.

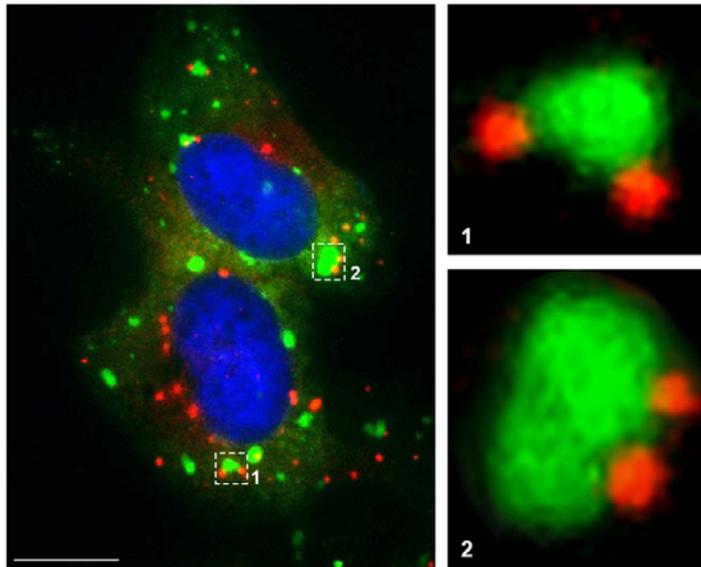
## 4 Diskussion

### 4.1 ZBP1 assoziiert während der zellulären Stressantwort mit RNA-Liganden in SGs

Das RNA-bindende Protein ZBP1 ist ein Mitglied der VICKZ Proteinfamilie, welche wichtige Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation erfüllt und dadurch während der Embryo- sowie Karzinogenese von Bedeutung ist (siehe Einleitung und *review* (Yisraeli, 2005)). In ungestressten Zellen hat ZBP1 einen Einfluss auf die Polarität, Migration und Proliferation von Zellen, indem es die Lokalisierung, Translation und mRNA-Stabilität verschiedener mRNAs kontrolliert. Über die Funktion von RBPs wie ZBP1 während der zellulären Stressantwort ist hingegen kaum etwas bekannt.

Die zelluläre Stressantwort, während der das gesamte Translatom von Zellen reorganisiert wird, kann durch verschiedene Umwelteinflüsse ausgelöst werden. Infolge der Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 $\alpha$  und/oder der Inhibierung der Helikase eIF4A werden mRNAs von Polysomen freigesetzt und in *stress granules* (SGs) sortiert (Anderson and Kedersha, 2002a; Kedersha and Anderson, 2002; Kedersha et al., 2002; Kedersha et al., 2005; Kedersha et al., 1999; Mazroui et al., 2006). Zusammen mit diesen mRNAs wird auch eine Reihe von RBPs in SGs rekrutiert. Letztere erfüllen unter physiologisch normalen Bedingungen eine Vielzahl von Funktionen insbesondere im Rahmen der posttranskriptionellen Genregulation. Ob und wenn ja, welche Prozesse solche RBPs wie ZBP1 in SGs steuern, war die zentrale Fragestellung, die es im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen galt.

Deshalb wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung von ZBP1 unter diversen Stresseinflüssen detailliert untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ZBP1 eine ubiquitäre SG-Komponente ist. Das bedeutet, dass sowohl endogenes als GFP/RFP-ZBP1 unter dem Einfluss verschiedener Stress-Stimuli, deren Wirkung über unterschiedliche Stresskinasen zu einer Phosphorylierung von eIF2 $\alpha$  führt, in SGs lokalisieren (siehe Abb. 3.1 - 3.3). Jedoch induziert die Überexpression von GFP-ZBP1 keine SG-Bildung wie es z.B. für TIA-1 oder G3BP beschrieben ist (siehe Abb. 3.6; (Kedersha et al., 1999; Tourriere et al., 2003)). Dies ist bereits ein erster Hinweis darauf, dass ZBP1 weniger an der SG-Entstehung beteiligt ist, als viel mehr eine regulatorische Funktion in SGs ausüben könnte.



**Abb. 4.1: SGs und PBs assoziieren temporär miteinander.** U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 und RFP-DCP1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress appliziert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Balken 10  $\mu\text{m}$ .

SGs und *processing bodies* (PBs) sind dynamische Strukturen, die temporär miteinander assoziieren können (Abb. 4.1) (Kedersha et al., 2005). Um zu evaluieren, ob die putative Funktion von ZBP1 während der zellulären Stressantwort für SGs spezifisch ist oder möglicherweise auch PBs involviert, wurde ZBP1 hinsichtlich seiner Lokalisierung in PBs analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass ZBP1 unter Stress ausschließlich in SGs, nicht jedoch in PBs lokalisiert (siehe Abb. 3.7). Auch in ungestressten Zellen wurde das Protein nicht in PBs detektiert (siehe Abb. 3.7). Da PBs Zentren des RNA-Abbaus sind, die unter Stress sogar vergrößert vorliegen, ZBP1 jedoch nicht in diesen Strukturen lokalisiert, könnte man spekulieren, dass das Protein möglicherweise entweder für die Lokalisierung von mRNAs in SGs verantwortlich ist oder aber mit der selektiven Stabilisierung einzelner mRNAs unter Stress im Zusammenhang steht. In dieser Hinsicht wäre es denkbar, dass ZBP1 den Abbau bestimmter RNAs verhindert, indem es diese an der Lokalisierung in PBs hindert.

Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, wie ZBP1 in SGs rekrutiert wird und ob dabei die Assoziation mit RNA-Liganden eine Rolle spielt. Zunächst wurden verschiedene ZBP1-Deletionsfragmente hinsichtlich ihrer Lokalisierung unter Stress analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass nur Fragmente, welche die letzten beiden KH-Domänen umfassen (KH1-4 und KH3-4, siehe Abb. 3.8 B), in SGs rekrutiert werden. Diese beiden Fragmente verhalten sich bezüglich ihrer Lokalisierung und ihres RNA-Bindungsverhaltens ähnlich dem Wildtyp-Protein. Die Domäne KH3-4 wurde als für die RNA-Bindung essentiell beschrieben (Farina et al., 2003). Das deutet darauf hin, dass die Assoziation mit RNA-Liganden auch für die SG-Rekrutierung des Proteins unter Stress notwendig ist und ZBP1

wahrscheinlich mit seinen mRNA-Liganden in SGs assoziiert oder möglicherweise die Lokalisierung dieser mRNAs vermittelt.

Aufgrund dessen wurde die Lokalisierung von ZBP1 mRNA-Liganden unter Stress untersucht und die Koloalysierung von RNA und Protein in SGs analysiert. Mit Hilfe einer eigens entwickelten Technik, welche eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung kombiniert mit einer Immunofluoreszenzfärbung erlaubt, wurde die Lokalisierung verschiedener RNAs unter Stress untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass alle untersuchten spezifischen mRNAs sowie polyA<sup>(+)</sup> mRNA mit endogenem SG-Marker TIAR in SGs koloalysieren (siehe Abb. 3.9). Unter den in SGs rekrutierten Transkripten befanden sich auch ZBP1-Liganden wie  $\beta$ -Aktin, IGF-II, *c-myc* oder die untranslatierte H19 RNA, welche mit TIAR und GFP-ZBP1 in SGs koloalysierten (siehe Abb. 3.10). Die einzige untersuchte mRNA, welche kaum in SGs zu beobachtet wurde, war die *HSP90* mRNA, welche, da sie für ein Hitzeschockprotein kodiert, auch unter Stress translatiert werden sollte (Kedersha et al., 1999; Nover et al., 1989). In Übereinstimmung mit der Literatur verdeutlichen diese Lokalisierungsstudien, dass die Mehrheit zytoplasmatischer polyadenylierter mRNAs unter Stress in SGs rekrutiert wird (Kedersha and Anderson, 2002). Die Anreicherung von poly(A)<sup>+</sup> RNA in SGs bestätigt darüber hinaus die Stabilisierungsfunktion dieser Kompartimente, da sowohl die mRNA Degradation durch PBs oder das Exosom durch Deadenylierung eingeleitet wird. Allerdings bedarf es vermutlich keiner spezifischen Regulation, damit eine RNA in SGs lokalisiert, da sogar RNAs, welche nicht translatierbar sind, in SGs rekrutiert werden, was am Beispiel der H19 RNA verdeutlicht wird. Vielmehr scheint es spezifische Mechanismen zu geben, welche die SG-Lokalisierung von mRNAs verhindert, die auch unter Stress translatiert werden müssen, wie es z.B. bei für HSPs kodierende Transkripte der Fall ist. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass spezifische RBPs wie ZBP1 an der Rekrutierung ihrer mRNA-Liganden in SGs beteiligt sind. Das führt zu der Vermutung, dass RBPs sehr viel wahrscheinlicher die mRNA-Sortierung in SGs und damit das Schicksal ihrer Liganden-mRNAs unter Stress regulieren.

Handelt es sich bei der SG-Rekrutierung von mRNAs tatsächlich um einen unspezifischen Prozess, der eine Vielzahl polyadenylierter mRNAs involviert und lediglich diejenigen ausschließt, welche auch unter Stressbedingungen translatiert werden, so würde man erwarten, dass exogene Reportertranskripte ebenfalls in SGs lokalisiert werden. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe des MS2-*tethering* Assays (siehe auch 3.1.2.2) anhand zweier Reporter untersucht, welche im Fall von  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2 einen Teil des endogenen  $\beta$ -Aktin-3'UTRs, in Fall von Luc- $\Delta$ Zip-MS2 nur den artifiziellen 3'UTR des pcDNA3.1-Vektors

enthielten. Beide Reporter wurden in SGs lokalisiert (siehe Abb. 3.11). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der SG-Rekrutierung von mRNAs in der Tat ein unspezifischer Mechanismus zu Grunde liegt, für welchen es offenbar nicht notwendig ist, dass eine mRNA ein regulatorisches *cis*-Element, wie z.B. der Zipcode, besitzt. Vielmehr werden mRNAs durch die Assoziation mit poly(A) bindenden Proteinen (PABPs) und/oder eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) in SGs rekrutiert (Kedersha et al., 2005).

Wenn nun spezifische *cis/trans*-Interaktionen nicht für die Rekrutierung einer mRNA in SGs notwendig sind, stellt sich die Frage, ob es solche spezifischen Interaktionen zwischen einer RNA und einem assoziierten RBP überhaupt in SGs gibt und wenn ja, wofür solche Interaktionen benötigt werden. Die Frage nach spezifischen *cis/trans*-Interaktionen in SGs wurde mittels TriFC-Assay (*Tri-Molekular Complementation Assay*) untersucht (Rackham and Brown, 2004). Basierend auf einem zweigeteilten YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), dessen eine Hälfte via MS2-Tagging den RNA-Reporter markiert und dessen andere Hälfte mit dem zu untersuchenden RBP fusioniert ist, können spezifische Protein-RNA-Interaktionen *in vivo* analysiert werden (siehe auch 3.1.2.3). Dabei wurde festgestellt, dass ZBP1 spezifisch mit dem Zipcode der  $\beta$ -Aktin mRNA in SGs interagiert (siehe Abb. 3.12,  $\beta$ -Aktin-Zip-MS2). Wurde der Luc- $\Delta$ Zip-MS2 Reporter verwendet, konnte kein rekonstituiertes YFP-Signal in SGs detektiert werden. Das bedeutet, dass es trotz Lokalisation von ZBP1, MS2BP und Reporter in SGs nicht zu einer Assoziation aller drei Komponenten kommt, weil die ZBP1 Bindungsstelle im Reporter fehlt (siehe Abb. 3.12). Diese Analysen deuten darauf hin, dass ZBP1 spezifisch an seine RNA-Liganden in SGs bindet. Das legt die Vermutung nahe, dass spezifische *cis/trans*-Interaktionen auch in SGs von Bedeutung sind.

Um die Funktion von ZBP1 in SGs zu untersuchen und damit einen Eindruck zu bekommen, wofür solche spezifischen *cis/trans*-Interaktionen in SGs notwendig sind, wurde ZBP1 mittels RNAi ausgeschaltet und zunächst die SG-Entstehung und RNA-Rekrutierung in SGs analysiert. Wie bereits vermutet, hatte der Knockdown von ZBP1 keinen Einfluss auf die Ausbildung von SGs (siehe Abb. 3.14). Auch wurden die ZBP1 mRNA-Liganden *c-myc*,  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* nach ZBP1 Knockdown weiterhin in SGs rekrutiert. Allerdings erschien die RNA-Menge der Knockdownpopulation verglichen mit der Kontrollpopulation reduziert (siehe Abb. 3.14 und 3.21). Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die SG-Rekrutierung einer mRNA keine spezifischen *cis/trans*-Interaktionen voraussetzt.

Zusammenfassend lassen diese Befunde den Schluss zu, dass ZBP1 ein ubiquitärer Bestandteil von SGs ist, welcher durch Bindung an RNA-Liganden in SGs rekrutiert wird und dort mit letzteren nicht nur kolokalisiert sondern spezifisch assoziiert. Das Protein ist jedoch

nicht in die SG-Entstehung involviert, da die Überexpression von GFP-ZBP1 keine SG-Bildung induziert und nach ZBP1 Knockdown SGs unverändert gebildet werden. Auch die Rekrutierung von mRNAs in SGs ist unbeeinflusst von ZBP1. Erstens wird die Mehrheit polyadenylierter mRNAs unter Stress in SGs rekrutiert. Hierbei ist es offenbar nicht von Bedeutung, ob eine mRNA translatiert werden kann oder ein spezifisches *cis*-Element besitzt. Zweitens sind nach ZBP1 Knockdown dessen RNA-Liganden immer noch in SGs lokalisiert. Da der Knockdown von ZBP1 allerdings zu einer scheinbar reduzierten Menge an Liganden-RNAs unter Stress führt und ZBP1 zudem nicht in PBs lokalisiert, könnte man ZBP1 mit dem RNA-Transit in SGs in Verbindung bringen. Aufgrund von dieser Überlegung wurde die Hypothese formuliert, dass ZBP1 den Abbau seiner RNA-Liganden unter Stress vermindert, indem es diese durch Assoziation mit selbigen in SGs zurückhält und dadurch deren Rekrutierung in PBs verhindert.

## 4.2 ZBP1 als "gatekeeper" in SGs

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, ist ZBP1 weder an der SG-Bildung noch an der Rekrutierung seiner mRNA-Liganden in SGs beteiligt. Dennoch scheint das Protein auch unter Stress eine Funktion zu erfüllen, da ZBP1 spezifisch mit seinen RNA-Liganden in SGs assoziiert. Darüber hinaus erscheinen ZBP1 mRNA-Liganden infolge des ZBP1 Knockdowns in SGs reduziert vorliegen, weshalb man auf eine Funktion des Proteins bei der Regulation des RNA-Abbaus unter Stress schließen könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher das Schicksal von ZBP1 RNA-Liganden während der zellulären Stressantwort genauer untersucht. Umfassende Analysen der RNA-Mengen von ZBP1 assoziierten und nicht-assoziierten mRNAs unter zellulärem Stress ergaben, dass bei aktiver Transkription eine Vielzahl von mRNAs über einen Zeitraum von mehreren Stunden angereichert wird (siehe Abb. 3.15). Zudem ist der Abbau der *c-myc* mRNA unter oxidativem Stress vermindert (siehe Abb. 3.16). Die Daten belegen, dass mRNAs unter Stress stabilisiert werden können und unterstützen damit das von Kedersha und Kollegen publizierte Modell (siehe Abb. 1.6; (Kedersha et al., 2005)), nach dem translationell reprimiert mRNAs in SGs gespeichert werden können, anstatt sofort durch die Degradationsmaschinerie der Zelle abgebaut zu werden.

Reduziert man die endogene ZBP1 Proteinmenge in der Zelle, ergibt sich ein anderes Bild. Verglichen mit einer Kontrollpopulation wird die *c-myc* mRNA nach ZBP1 Knockdown

nicht länger unter Stress stabilisiert (siehe Abb. 3.17). Diese Destabilisierung nach Knockdown ist für ZBP1-Liganden spezifisch, da nicht assoziierte mRNAs wie z.B.  *$\alpha$ -Tubulin* vom ZBP1 Knockdown unbeeinflusst bleiben (siehe Abb. 3.17 C). Dieser Befund erscheint zunächst nicht sonderlich überraschend, da ZBP1 auch unter physiologisch normalen Bedingungen die *c-myc* mRNA stabilisiert. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Stabilisierung durch ZBP1 unter Normalbedingungen ein Mechanismus zu Grunde liegt, welcher mit aktiver Translation gekoppelt ist (siehe 1.1.3.3 und Abb. 1.4 ((Lemm and Ross, 2002)). Letztere ist jedoch unter Stress fast vollständig blockiert. Interassenterweise wurde diese Destabilisierung unter Stress nach ZBP1 Knockdown für alle untersuchten ZBP1-Liganden ( *$\beta$ -Aktin*, *IGF-II* und *CD44*; siehe Abb. 3.18 A und B) beobachtet, welche unter Normalbedingungen nicht nur auf Stabilitäts- sondern auch auf Translationsebene reguliert werden. Unter physiologisch normalen Bedingungen bleibt die mRNA-Stabilität der translationell regulierten  *$\beta$ -Aktin* und *IGF-II* mRNA vom ZBP1 Knockdown unbeeinflusst (siehe Abb. 3.18 C). Unter oxidativen Stress und Knockdown hingegen werden auch diese beiden mRNAs destabilisiert. Darüber hinaus ist dieser Effekt "umkehrbar". Die Überexpression von GFP-ZBP1 führt zu einer zusätzlichen Stabilisierung der  *$\beta$ -Aktin* und *IGF-II* mRNA in gestressten Zellen (siehe Abb. 3.19). Diese Beobachtungen implizieren eine neue Funktion für ZBP1 unter zellulärem Stress, die sich von den posttranskriptionellen Regulationsmechanismen, die das Protein in ungestressten Zellen kontrolliert, unterscheidet.

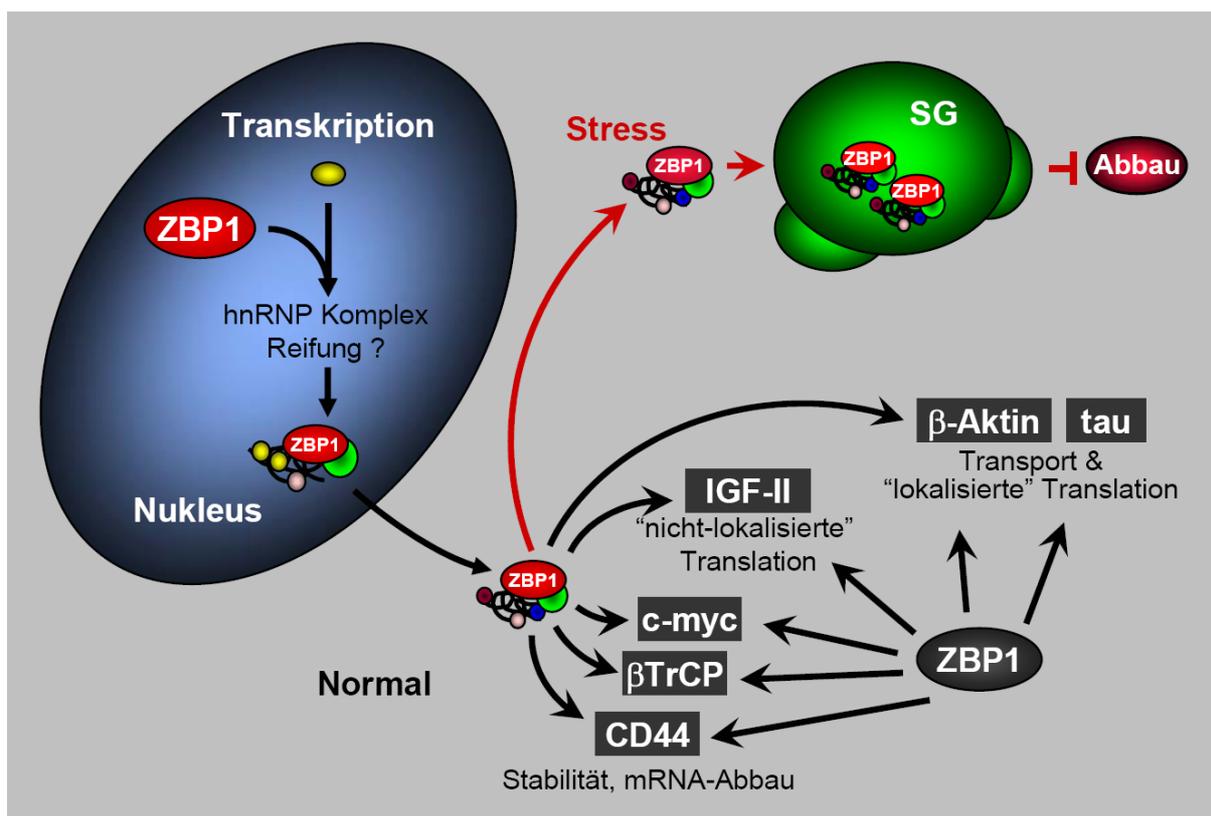
Aus diesen Ergebnissen leitet sich folgende Hypothese für die putative Funktion von ZBP1 als "*gatekeeper*" in SGs ab: Durch Assoziation mit seinen mRNA-Liganden wird ZBP1 in SGs rekrutiert, in welchen es deren weiteres Schicksal bestimmt. Das Protein stabilisiert seine RNA-Liganden unter Stress, indem es diese in SGs zurückhält und dadurch deren Abbau durch PBs oder das Exosom verhindert. Damit sorgt ZBP1 dafür, dass in SGs ein stabiles aber translationell reprimiertes Reservoir seiner mRNA-Liganden vorliegt, welches nach Stresserholung für die Reinitiation der Translation zur Verfügung steht.

Um diese Hypothese der "*gatekeeper*"-Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress weiter zu untermauern und dabei die Abhängigkeit von spezifischen *cis*-Elementen in der mRNA zu demonstrieren, wurde das Schicksal zweier exogener Reporter-Transkripte analysiert (siehe 3.1.3.7). Hierfür wurde die Auswirkung des ZBP1 Knockdowns unter Stress bzw. während einer Stresserholungsphase auf die mRNA-Stabilität der Reporter sowie deren Translation anhand der Luziferase-Aktivität untersucht. Dabei wurde nur für den Reporter, welcher das ZBP1-Bindungselement der  *$\beta$ -Aktin* mRNA (Zipcode, siehe Abb. 3.20, Luc-Zip) enthält, eine Destabilisierung der RNA unter Knockdown und Stress festgestellt, die auch eine

Reduktion der Luziferase-Aktivität zur Folge hatte. Die Destabilisierung der Reporter-RNA sowie die Reduktion der Luziferase-Aktivität hielten über den Stress hinaus auch in der ersten Phase der Erholung an. Der Reporter hingegen, welchem der Zipcode fehlte (siehe Abb. 3.20, Luc- $\Delta$ Zip), blieb vom ZBP1 Knockdown unbeeinflusst. Die Daten belegen, dass mRNAs aufgrund spezifischer *cis/trans*-Interaktionen unter Stress stabilisiert werden können. Die Beobachtungen korrelieren somit mit den Ergebnissen, die für die endogenen Transkripte beobachtet wurden, und bekräftigen damit die postulierte "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 in SGs. Darüber hinaus sind sie von physiologischer Bedeutung, da sich unter Stresserholung ein direkter Einfluss auf den Proteingehalt in Zellen abzeichnet. Im Hinblick auf die krebisrelevanten Liganden c-Myc und IGF-II könnte dies von besonderem Interesse sein. ZBP1 ist in verschiedenen humanen Tumoren stark überexprimiert (Gu et al., 2004; Ioannidis et al., 2004; Ioannidis et al., 2003; Ioannidis et al., 2001; Kobel et al., 2005; Ross et al., 1997; Ross et al., 2001). Die im Inneren von Tumoren herrschende Hypoxie kann zur Ausbildung von SGs führen (Moeller et al., 2004). Somit ist es denkbar, dass in Tumoren, welche ZBP1 überexprimieren, mRNA-Liganden wie *IGF-II* oder *c-myc* verstärkt in SGs stabilisiert werden. Kommt es zu einer Reoxygenierung des Tumors, dissoziieren SGs und die in den SGs stabilisierten mRNAs stehen für die Reinitiation der Translation zur Verfügung. Dadurch könnte es zu einer erhöhten Synthese von IGF-II und c-Myc Proteinen kommen, was sich wiederum auf das Wachstum des Tumors auswirken würde. Eine Reoxygenierung des Tumorgewebes kann z.B. durch radioaktive Bestrahlung ausgelöst werden, welche bei der Krebstherapie Anwendung findet (Dewhirst et al., 1990). Es ist bekannt, dass manche Tumore eine Resistenz gegen Radiotherapie entwickeln (Garcia-Barros et al., 2003). Diese Resistenz ist u.a. auf die Sekretion von Zytokinen wie VEGF durch den Tumor zurückzuführen, die durch radioaktive Bestrahlung induziert wird (Gorski et al., 1999).

Die bisherigen Daten unterstützen die postulierte Funktion von ZBP1 als "gatekeeper" in SGs, indem sie den Einfluss von ZBP1 auf das Schicksal seiner mRNA-Liganden unter Stress dokumentieren. Dennoch belegen sie nicht, dass diese Stabilisierung unter Stress bzw. Destabilisierung unter ZBP1 Knockdown tatsächlich in SGs stattfindet. Um dies zu untersuchen, wurde der RNA-Gehalt einzelner SGs vergleichend zwischen ZBP1 Knockdown- und Kontrollpopulationen anhand einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) quantifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass in SGs der Knockdownpopulation weniger  *$\beta$ -Aktin* und *IGF-II* mRNA enthalten war, während die Mengen an *GAPDH* und polyA<sup>(+)</sup> mRNA konstant blieben (siehe Abb. 3.21). Geht man davon aus, dass (1) ZBP1 die Rekrutierung von mRNAs in SGs nicht beeinflusst; (2) dennoch die Dichte der ZBP1 *target-*

Transkripte in SGs abnimmt, wenn die ZBP1-Proteinmenge in der Zelle reduziert ist; und (3) der Abbau *c-myc* mRNA erst dann fast völlig zum Erliegen kommt, wenn SGs vollständig ausgebildet sind; lässt sich folgendes Szenario in SGs postulieren. SGs stellen unter Stress die Kompartimente der mRNA-Sortierung sowie der Lagerung translationell reprimierter mRNAs dar, in denen RBPs als "gatekeeper" fungieren, da sie durch Assoziation mit ihren mRNA-Liganden deren Freisetzung aus SGs und den damit verbundenen verstärkten Abbau verhindern. Diese Funktion wird durch dieselben *cis/trans*-Interaktionen vermittelt, welche auch in ungestressten Zellen von Bedeutung sind, jedoch ist der damit verbundene Regulationsmechanismus ein anderer. Unabhängig davon, ob eine mRNA in ungestressten Zellen auf Stabilitäts- oder Translationsebene von einem RBP reguliert wird, bewirkt dasselbe RBP nach Stressinduktion ausschließlich die Stabilisierung dieser mRNA in SGs. Es kommt somit zu einem "switch of function".



**Abb. 4.2: Modell der "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 in SGs.** Unter physiologisch normalen Bedingungen kontrolliert ZBP1 die mRNA-Stabilität von *c-myc*, *CD44* und  $\beta$ TrCP und reguliert die lokalisierte bzw. nicht-lokalisierende Translation von  $\beta$ -Aktin, *IGF-II* und evtl. *tau*. Unter Stress wird ZBP1 mit seinen mRNA-Liganden in SGs rekrutiert, in denen es als "gatekeeper" deren Freisetzung aus SGs und den damit verbundenen Abbau verhindert. Diese Funktion wird über dieselben *cis/trans*-Interaktionen vermittelt, die auch unter Normalbedingungen von Bedeutung sind. Jedoch werden alle RNA-Liganden - unabhängig vom Regulationsmechanismus in nicht gestressten Zellen - unter Stress stabilisiert. Es kommt somit zu einem "switch of function".

Wenn RBPs das Schicksal ihrer mRNA-Liganden unter Stress regulieren, indem sie die Transkripte in SGs zurückhalten und dadurch deren Abbau verhindern, stellt sich die Frage, was mit der mRNA geschieht, wenn diese nicht durch assoziierte RBPs effektiv geschützt werden kann. Da es nach ZBP1 Knockdown zu einer spezifischen Destabilisierung der ZBP1-*targets* kommt, liegt die Vermutung nahe, dass diese in erhöhtem Maße abgebaut werden. PBs sind unter Stress vergrößert und können zudem temporär mit SGs assoziieren (siehe Abb. 4.2)(Kedersha et al., 2005). Daher könnte man vermuten, dass mRNAs, die aus SGs freigesetzt werden zum Abbau in PBs rekrutiert werden. Aufgrund dieser Überlegung wurde die  $\beta$ -Aktin mRNA hinsichtlich ihrer Lokalisierung in PBs unter oxidativem Stress und ZBP1 Knockdown mittels FISH untersucht (siehe Abb. 3.22). Dabei wurde festgestellt, dass  $\beta$ -Aktin nur in SGs nicht jedoch in PBs detektierbar ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der Abbau in PBs auch unter Stress nicht limitiert ist und es deshalb nicht zu einer Anreicherung der mRNA in PBs kommt, was wiederum deren Nachweis in diesen Kompartimenten erschwert. Demnach können PBs als Abbauzentren für von SGs freigesetzte RNAs nicht zwangsläufig ausgeschlossen werden.

Da es nicht möglich war, mittels FISH die  $\beta$ -Aktin mRNA in PBs zu detektieren, wurde der Versuch unternommen, Reporter-Transkripte durch MS2-*tethering* in PBs zu visualisieren. Hierbei wird angenommen, dass sich Transkripte mit MS2-*tethering* als deutlich stabiler erweisen, wodurch eine Detektion der RNA auch in PBs möglich war. Nach Quantifizierung des mRNA-Gehalts in SGs und PBs anhand der Fluoreszenzintensität wurde festgestellt, dass unter ZBP1 Knockdown nicht nur eine Reduktion der  $\beta$ -Aktin-Zip-Transkripte in SGs sondern auch in PBs vorlag (siehe Abb. 3.23). Dies erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, da man zunächst eine Delokalisierung der RNA von SGs in PBs und damit eine Erhöhung der RNA-Menge in PBs erwarten würde. Nach näherer Betrachtung ist es jedoch keineswegs überraschend, dass PBs genau die SG-Situation widerspiegeln. Da man in diesem Experiment lediglich ein kleines Zeitfenster betrachtet, detektiert man eine Gleichgewichtssituation der mRNA-Menge des Reporters zum Zeitpunkt x. Da sich zum Zeitpunkt x eine bestimmte Menge y des Reporters in SGs befindet, kann auch nur eben diese Menge von PBs abgebaut werden. Ist der Abbau in PBs nicht limitiert, kann keine Anreicherung des Reporters detektiert werden. Somit korreliert der MS2-*tethering* Assay mit dem Ergebnis der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und involviert darüber hinaus PBs in den RNA-Abbau unter Stress. Um jedoch den Hauptabbauweg von mRNAs unter Stress zu identifizieren, sofern PBs und das Exosom nicht gleichermaßen daran beteiligt sind, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Hierbei wären z.B. RNAi-Experimente gegen

Komponenten des einen oder anderen Abbaukompartimentes denkbar, an die sich eine Analyse des RNA-Gehalts von Zellen nach Stressinduktion anschließt.

Zusammenfassend lässt sich folgender Regulationsmechanismus in SGs postulieren: RBPs wie ZBP1, welche unter Normalbedingungen die Stabilität, Lokalisation und Translation ihrer RNA-Liganden regulieren, werden unter Stress zusammen mit diesen RNAs als RNPs in SGs lokalisiert. Die Assoziation dieser RBPs mit ihren Liganden wird durch dieselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen vermittelt, welche vermutlich auch den Regulationsmechanismen in ungestressten Zellen zu Grunde liegen. Diese spezifischen Bindungen halten eine RNA in SGs zurück und bewerkstelligen deren Lagerung in einem translationell reprimierten Zustand. Dadurch wird verhindert, dass die RNA freigesetzt und durch die zelluläre Degradationsmaschinerie abgebaut wird.

Die hier postulierte *"gatekeeper"*-Hypothese von RBPs wie ZBP1 in SGs beschreibt erstmalig gleichermaßen eine putative Funktion von RBPs in SGs sowie das Schicksal zytoplasmatischer mRNAs, welche unter Stress in diese Kompartimente rekrutiert werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten gewähren somit erstmals einen Einblick in die Funktionsweise von SGs und geben einen Hinweis auf deren physiologische Bedeutung. Neben veränderten Umweltbedingungen können auch radioaktive Bestrahlung und Hypoxie, wie sie im Inneren eines Tumors zu finden ist, Stress induzieren. Bedenkt man, dass ZBP1 in verschiedenen Tumorarten stark überexprimiert ist und die Überexpression von ZBP1 unter Stress mRNA-Liganden wie z.B. die für den Wachstumsfaktor IGF-II kodierende mRNA stabilisiert, eröffnet sich hieraus eine klinische Bedeutung der zellulären Stressantwort.

Neben dieser physiologischen Bedeutung ergibt sich aber noch ein weiterer interessanter wie nützlicher Aspekt aus der Rolle von ZBP1 unter Stress. Basierend auf der *"gatekeeper"*-Funktion von ZBP1 in SGs wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues stressbasierendes *Screening*-Verfahren (SIRL; *Stress-based Isolation of RNA-Ligands*) etabliert, welches eine schnelle Identifizierung physiologisch relevanter RNA-Liganden erlaubt und im nächsten Abschnitt näher erläutert wird.

### **4.3 SIRL – ein neues stressbasierendes Verfahren zur Identifizierung von RNA-Liganden**

Die "gatekeeper"-Hypothese besagt, dass aufgrund derselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen zwischen einem RBP und dessen mRNA-Liganden, welche die Stabilität, Lokalisierung oder Translation dieser mRNAs in ungestressten Zellen regulieren, diese mRNAs unter Stress durch das RBP in SGs stabilisiert werden. Erweist sich diese Hypothese tatsächlich als zutreffend, würde man erwarten, dass man, basierend auf dieser spezifischen Stabilisierung unter Stress, neue regulatorischer Netzwerke und bislang unbekannte mRNA-Liganden des entsprechenden RBPs identifizieren kann, welche auch in ungestressten Zellen von physiologischer Relevanz sind. Um die "gatekeeper"-Hypothese zu bekräftigen und dabei gleichzeitig putative ZBP1 mRNA-Liganden zu identifizieren, wurde ein auf zellulärem Stress basierendes *screening*-Verfahren (SIRL, *Stress-based Identification of RNA-Ligands*) entwickelt (siehe Abb. 3.24). Wird die Menge des als "gatekeeper" in SGs fugierenden RBPs in der Zelle reduziert, so werden dessen mRNA-Liganden unter Stress nicht länger in SGs stabilisiert. Diese selektive Destabilisierung ist unabhängig davon, ob das Protein die Stabilität, Lokalisierung oder Translation dieser mRNAs in ungestressten Zellen reguliert. Daher sollten mit Hilfe von sich anschließenden vergleichenden Mikroarray-Analysen sowohl translationell- als auch stabilitätsregulierte mRNA-Liganden identifiziert werden können (siehe Abb. 3.24). Darin ist ein entscheidender Vorteil von SIRL gegenüber herkömmlichen Verfahren zu sehen. Letztere wie RNAi, Ribosomenprofile oder Pulldown-Experimente in Kombination mit Mikroarray-Analysen erlauben hingegen nur die Identifizierung von entweder stabilitäts- oder aber translationskontrollierten mRNA-Liganden oder aber laufen Gefahr, zahlreiche falsch positive Ergebnisse zu liefern, was insbesondere bei Pulldown-basierenden *Screens* zu beobachten ist.

Unter Anwendung des SIRL-Verfahrens wurden in vergleichenden Mikroarray-Analysen 128 Gene identifiziert, welche in der Kontrollpopulation als "vorhanden" nach ZBP1 Knockdown jedoch als "abwesend" detektiert wurden (siehe Anhang Tab. 6.2). 25 dieser Gene (SIRL-Gene) wurden durch verschiedene stringente Assays verifiziert. Zunächst wurden mRNAs hinsichtlich ihrer Destabilisierung unter ZBP1 Knockdown und Stress untersucht (Abb. 3.26). Darüber hinaus wurden in diese Analysen auch die RNA-Input-Mengen vor Stressinduktion einbezogen, um mögliche Sekundäreffekte, die durch den Knockdown unabhängig von der Stressinduktion entstehen können, zu eliminieren (Abb.

3.27). Um zu evaluieren, ob die putativen Liganden auch unter Normalbedingungen relevant sind und in nicht gestressten Zellen mit ZBP1 assoziieren, wurden Pulldown-Experimente durchgeführt. Dabei wurde die spezifische Anreicherung der einzelnen Transkripts gegenüber einem Kontroll-Pulldown sowie dem Input ermittelt (Abb. 3.28). Diejenigen SIRL-Gene, welche unter Stress mindestens so stark destabilisiert sowie im Pulldown mindestens so stark angereichert wurden wie die bekannten ZBP1-Liganden, wurden als putative neue ZBP1-Liganden hinsichtlich ihrer Regulation durch ZBP1 in ungestressten Zellen untersucht. Hierfür wurde der Einfluss von ZBP1 auf das Abbauverhalten dieser mRNAs (siehe Abb. 3.29 und 3.30) sowie auf die Proteinmenge der durch diese mRNAs kodierten Proteine (siehe Abb. 3.31) analysiert. Dabei erwiesen sich die mRNAs des Transkriptionsfaktors LEF1, der Phosphatase PTEN sowie des *Guanine Nukleotide Exchange Factors* RAPGEF2 als durch ZBP1 stabilitätskontrolliert, da diese mRNAs infolge des Knockdowns von ZBP1 schneller abgebaut wurden (siehe Abb. 3.29). Für die mRNAs von MAPK4 sowie der stressaktivierten Kinase MSK1 scheint ZBP1 ähnlich wie für  $\beta$ -Aktin und *IGF-II* als translationeller Repressor zu fungieren, welcher die endogene Proteinmenge, die durch diese mRNAs kodiert wird, nicht jedoch ihre Stabilität beeinflusst (siehe Abb. 3.30 und 3.31).

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die SIRL Analysen für ZBP1 fünf neue RNA-Liganden identifiziert werden konnten, welche unter Normalbedingungen entweder auf der Ebene der mRNA-Stabilität oder aber der Translation durch ZBP1 regulierte werden. Darin ist ein entscheidender Vorteil dieses Verfahren gegenüber konventionellen Methoden zu sehen. Neben diesem technischen Aspekt liefern die durch SIRL gewonnenen Daten einen weiteren Beweis dafür, dass RBPs als "gatekeeper" in SGs das Schicksal derselben mRNAs regulieren, welche auch in ungestressten Zellen durch das RBP kontrolliert werden. Hierbei sind dieselben Protein-RNA-Interaktionen und vermutlich dieselben regulatorischen Netzwerke wirksam, wenngleich die posttranskriptionelle Genregulation in ungestressten Zellen die Ebenen der mRNA-Stabilität, Lokalisierung und Translation umfasst, die "gatekeeper"-Funktion unter Stress hingegen die Speicherung von mRNAs in SGs und dadurch deren Stabilität reguliert. Dabei ist anzunehmen, dass die Regulationsmechanismen und funktionellen Proteinkomplexe in gestressten im Vergleich zu ungestressten Zellen erweitert jedoch nicht grundlegend verändert sind. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass SGs Aggregate aus zytoplasmatischen RNPs ungestresster Zellen darstellen, welche entstehen, wenn mRNAs infolge der Stressinduktion aus Polysomen freigesetzt werden.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen reorganisieren Zellen ihre Translationsmaschinerie. Die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 $\alpha$  sowie die Inhibierung der RNA-Helikase eIF4A führen hierbei zu einem beinahe vollständigen Erliegen der Translation, in dessen Folge *stress granules* (SGs) entstehen (Anderson and Kedersha, 2002a; Anderson and Kedersha, 2002b; Bordeleau et al., 2006; Bordeleau et al., 2005; Kedersha et al., 1999; Low et al., 2005; Mazroui et al., 2006). Während dieser zellulären Stressantwort werden mRNAs, welche aus Polysomen freigesetzt werden, in SGs rekrutiert, welche dabei ein Reservoir an stabilen jedoch translationell reprimierten mRNAs darstellen. mRNAs, welche in SGs gespeichert werden, können nach Stresserholung für die Translation reinitiiert werden (Kedersha et al., 2005). Neben poly(A)<sup>+</sup>mRNA und einer Reihe von Translationsinitiationsfaktoren werden auch verschiedene RNA-bindende Proteine (RBPs) unter Stress in SGs rekrutiert. Letztere erfüllen unter physiologisch normalen Bedingungen eine Vielzahl von Funktionen insbesondere im Rahmen der posttranskriptionellen Genregulation. Ob und wenn ja, welche Prozesse solche RBPs in SGs steuern, war die zentrale Fragestellung, die es im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen galt.

Das onkofötale *Zipcode binding protein 1* (ZBP1) ist ein solches RBP, welches unter Normalbedingungen verschiedene Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation besitzt, unter zellulärem Stress jedoch in SGs lokalisiert. In ungestressten primären Neuronen reguliert ZBP1 den Transport sowie die lokalisierte Translation der  $\beta$ -Aktin mRNA in Wachstumskronen unter der Kontrolle von Kinasen der Src-Familie (Huttelmaier et al., 2005). Translationskontrolle durch ZBP1 wurde auch für die *IGF-II* mRNA beschrieben (Liao et al., 2004; Nielsen et al., 1999). Neben Lokalisierung und Translation reguliert ZBP1 auch die Stabilität der *c-myc*, *CD44* sowie  $\beta$ TrCP mRNAs (Leeds et al., 1997; Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006).

Während der zellulären Stressantwort wird ZBP1 zusammen mit seinen mRNA-Liganden in SGs rekrutiert. Das Protein ist jedoch nicht in die SG-Entstehung involviert. Auch die Rekrutierung von ZBP1 Liganden-RNAs in SGs bleibt von ZBP1 unbeeinflusst. Jedoch assoziiert ZBP1 in SGs über dieselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen, welche die Grundlage für posttranskriptionelle Genregulationen in ungestressten Zellen bilden, mit seinen Liganden-RNAs und reguliert dadurch das Schicksal Letzterer auch unter Stress.

Basierend auf diesen Protein-RNA-Interaktionen stabilisiert ZBP1 als "*gatekeeper*" in SGs spezifisch seine mRNA-Liganden, indem es deren Freisetzung aus diesen Kompartimenten und damit deren Abbau durch *processing bodies* (PBs) oder das Exosom verhindert. Diese Stabilisierung involviert alle bisher bekannten ZBP1 Liganden gleichermaßen und ist zudem unabhängig davon, ob ZBP1 die Stabilität oder aber die Translation dieser mRNAs in ungestressten Zellen reguliert (Stohr et al., 2006). Die in dieser Arbeit postulierte "*gatekeeper*"-Hypothese beschreibt erstmals gleichermaßen eine putative Funktion, die RBPs wie ZBP1 in *stress granules* ausüben können, wie auch das Schicksal zytoplasmatischer mRNAs und identifiziert ZBP1 als einen Schlüsselregulator unter zellulärem Stress.

Darüber hinaus bildet diese Funktion in SGs die Grundlage für ein neues *screening*-Verfahren (SIRL, *Stress-based Identification of RNA-Ligands*), welches eine schnelle und experimentell einfache Identifizierung physiologisch relevanter RNA-Liganden ermöglicht. Reduziert man die endogene Proteinmenge eines RBPs, welches als "*gatekeeper*" in SGs fungiert, werden unter zellulärem Stress dessen mRNA-Liganden selektiv destabilisiert. Da diese Destabilisierung auf denselben *cis/trans*-Interaktionen und regulatorischen Protein-RNA-Netzwerken beruht, welche die Regulation dieser mRNAs in ungestressten Zellen vermitteln, ist es möglich, physiologisch relevante Liganden zu identifizieren. Da diese Liganden, unabhängig von der Ebene der posttranskriptionellen Regulation in ungestressten Zellen, unter Stress destabilisiert werden, ermöglicht es das SIRL-Verfahren, in einem einzigen Ansatz sowohl stabilitäts- als auch translationskontrollierte Liganden zu identifizieren, was einen entscheidenden Vorteil dieser Methode im Vergleich zu herkömmlichen Ansätzen darstellt. Durch die Anwendung des SIRL-Verfahrens auf ZBP1 konnten fünf neue RNA-Liganden identifiziert werden, welche unter Normalbedingungen entweder auf der Ebene der mRNA-Stabilität oder aber der Translation durch ZBP1 reguliert werden. Die einzelnen Regulationsmechanismen dieser fünf mRNAs, welche ZBP1 in ungestressten Zellen vermittelt, müssen in weiterführenden Studien detailliert untersucht werden. Dabei ist es von Bedeutung, die ZBP1-Bindungselemente in diesen mRNAs zu charakterisieren. Nichtsdestotrotz liefern die durch SIRL gewonnenen Daten einen weiteren Beweis dafür, dass RBPs als "*gatekeeper*" in SGs das Schicksal derselben mRNAs regulieren, welche auch in ungestressten Zellen durch das RBP kontrolliert werden. Um zu untersuchen, ob die "*gatekeeper*"-Funktion eine generelle Eigenschaft von RBPs in SGs darstellt, ist es notwendig, das SIRL-Verfahren in weiterführenden Studien auf andere RBPs auszudehnen. FMRP oder Syncrin wären hierfür interessante Beispiele, da es sich bei diesen Proteinen

ähnlich wie bei ZBP1 um posttranskriptionelle Genregulatoren handelt und zweitens für diese beiden RBPs bislang kaum mRNA-Liganden bekannt sind.

Da in ungestressten wie in gestressten Zellen sehr wahrscheinlich dieselben Protein-RNA-Interaktionen und regulatorischen Netzwerke wirksam sind, ist anzunehmen, dass die Regulationsmechanismen und funktionellen Proteinkomplexe in gestressten im Vergleich zu ungestressten Zellen möglicherweise erweitert jedoch nicht grundlegend verändert sind. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass SGs Aggregate aus zytoplasmatischen RNPs ungestresster Zellen darstellen, welche entstehen, wenn mRNAs infolge der Stressinduktion aus Polysomen freigesetzt werden. Um diese Fragestellung umfassend zu beantworten, bedarf es jedoch detaillierter Analysen der SG-Zusammensetzung. Hierbei wäre es interessant zu wissen, ob eine mRNA bereits die erste Runde der Translation durchlaufen haben muss oder ob auch *virginRNP* rekrutiert werden kann. *VirginRNPs* stellen translationell reprimierte RNA-Transport *granules* dar, welche noch nicht translatierte mRNAs und daher auch Komponenten des EJC (*exon junction complex*) enthalten.

Darüber hinaus könnte die "*gatekeeper*"-Funktion im Hinblick auf die krebisrelevanten ZBP1-Liganden c-Myc und IGF-II auch von physiologischer Bedeutung sein. ZBP1 ist in verschiedenen humanen Tumoren stark überexprimiert (Gu et al., 2004; Ioannidis et al., 2004; Ioannidis et al., 2003; Ioannidis et al., 2001; Kobel et al., 2005; Ross et al., 1997; Ross et al., 2001). Die im Inneren von Tumoren herrschende Hypoxie kann zur Ausbildung von SGs führen (Moeller et al., 2004). Ebenso induziert radioaktive Bestrahlung, wie sie bei der Krebstherapie Anwendung findet, die SG-Bildung. Somit wäre es denkbar, dass in Tumoren, welche ZBP1 überexprimieren, mRNA-Liganden wie *IGF-II* oder *c-myc* verstärkt in SGs stabilisiert werden. Kommt es durch veränderte Bedingungen zu einer Dissoziation der SGs, stehen die in den SGs stabilisierten mRNAs für die Reinitiation der Translation zur Verfügung. Dadurch könnte es zu einer erhöhten Synthese von IGF-II und c-Myc Proteinen kommen, was sich wiederum auf das Wachstum des Tumors auswirken würde. Um diese physiologische Relevanz der zellulären Stressantwort zu analysieren, sind weiterführende Studien notwendig, um die die SG-Entstehung und –Dissoziation in Organismen charakterisieren

## 6 Literatur

- Anderson, P., and N. Kedersha. 2002a. Stressful initiations. *J Cell Sci.* 115:3227-34.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2002b. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones.* 7:213-21.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2006. RNA granules. *J Cell Biol.* 172:803-8.
- Asano, K., J. Clayton, A. Shalev, and A.G. Hinnebusch. 2000. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. *Genes Dev.* 14:2534-46.
- Atlas, R., L. Behar, E. Elliott, and I. Ginzburg. 2004. The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *J Neurochem.* 89:613-26.
- Ausubel, S.M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. 1996. *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Bertrand, E., P. Chartrand, M. Schaefer, S.M. Shenoy, R.H. Singer, and R.M. Long. 1998. Localization of ASH1 mRNA particles in living yeast. *Mol Cell.* 2:437-45.
- Birnboim, H.H., Doly, J. 1976. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.* 7:1513-1523.
- Bordeleau, M.E., R. Cencic, L. Lindqvist, M. Oberer, P. Northcote, G. Wagner, and J. Pelletier. 2006. RNA-mediated sequestration of the RNA helicase eIF4A by Pateamine A inhibits translation initiation. *Chem Biol.* 13:1287-95.
- Bordeleau, M.E., J. Matthews, J.M. Wojnar, L. Lindqvist, O. Novac, E. Jankowsky, N. Sonenberg, P. Northcote, P. Teesdale-Spittle, and J. Pelletier. 2005. Stimulation of mammalian translation initiation factor eIF4A activity by a small molecule inhibitor of eukaryotic translation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102:10460-5.
- Chandel, N.S., E. Maltepe, E. Goldwasser, C.E. Mathieu, M.C. Simon, and P.T. Schumacker. 1998. Mitochondrial reactive oxygen species trigger hypoxia-induced transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:11715-20.
- Condeelis, J., and R.H. Singer. 2005. How and why does beta-actin mRNA target? *Biol Cell.* 97:97-110.
- Conroy, S.C., T.E. Dever, C.L. Owens, and W.C. Merrick. 1990. Characterization of the 46,000-dalton subunit of eIF-4F. *Arch Biochem Biophys.* 282:363-71.
- Dahm, R., and M. Kiebler. 2005. Cell biology: silenced RNA on the move. *Nature.* 438:432-5.

- DeChiara, T.M., E.J. Robertson, and A. Efstratiadis. 1991. Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*. 64:849-59.
- Deshler, J.O., M.I. Highett, T. Abramson, and B.J. Schnapp. 1998. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol*. 8:489-96.
- Dever, T.E. 1999. Translation initiation: adept at adapting. *Trends Biochem Sci*. 24:398-403.
- Dewhirst, M.W., R. Oliver, C.Y. Tso, C. Gustafson, T. Secomb, and J.F. Gross. 1990. Heterogeneity in tumor microvascular response to radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 18:559-68.
- Doyle, G.A., N.A. Betz, P.F. Leeds, A.J. Fleisig, R.D. Prokipcak, and J. Ross. 1998. The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res*. 26:5036-44.
- Duncan, R., S.C. Milburn, and J.W. Hershey. 1987. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. *J Biol Chem*. 262:380-8.
- Ederly, I., M. Humbelin, A. Darveau, K.A. Lee, S. Milburn, J.W. Hershey, H. Trachsel, and N. Sonenberg. 1983. Involvement of eukaryotic initiation factor 4A in the cap recognition process. *J Biol Chem*. 258:11398-403.
- Farina, K.L., S. Huttelmaier, K. Musunuru, R. Darnell, and R.H. Singer. 2003. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol*. 160:77-87.
- Gallouzi, I.E., C.M. Brennan, M.G. Stenberg, M.S. Swanson, A. Eversole, N. Maizels, and J.A. Steitz. 2000. HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:3073-8.
- Garcia-Barros, M., F. Paris, C. Cordon-Cardo, D. Lyden, S. Rafii, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks, and R. Kolesnick. 2003. Tumor response to radiotherapy regulated by endothelial cell apoptosis. *Science*. 300:1155-9.
- Gorski, D.H., M.A. Beckett, N.T. Jaskowiak, D.P. Calvin, H.J. Mauceri, R.M. Salloum, S. Seetharam, A. Koons, D.M. Hari, D.W. Kufe, and R.R. Weichselbaum. 1999. Blockage of the vascular endothelial growth factor stress response increases the antitumor effects of ionizing radiation. *Cancer Res*. 59:3374-8.
- Gradi, A., Y.V. Svitkin, H. Imataka, and N. Sonenberg. 1998. Proteolysis of human eukaryotic translation initiation factor eIF4GII, but not eIF4GI, coincides with the shutoff of host protein synthesis after poliovirus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:11089-94.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. *J Gen Virol*. 59-74 pp.
- Grifo, J.A., S.M. Tahara, M.A. Morgan, A.J. Shatkin, and W.C. Merrick. 1983. New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J Biol Chem*. 258:5804-10.

- Gu, L., K. Shigemasa, and K. Ohama. 2004. Increased expression of IGF II mRNA-binding protein 1 mRNA is associated with an advanced clinical stage and poor prognosis in patients with ovarian cancer. *Int J Oncol.* 24:671-8.
- Han, A.P., C. Yu, L. Lu, Y. Fujiwara, C. Browne, G. Chin, M. Fleming, P. Leboulch, S.H. Orkin, and J.J. Chen. 2001. Heme-regulated eIF2alpha kinase (HRI) is required for translational regulation and survival of erythroid precursors in iron deficiency. *Embo J.* 20:6909-18.
- Hansen, T.V., N.A. Hammer, J. Nielsen, M. Madsen, C. Dalbaeck, U.M. Wewer, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 2004. Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol.* 24:4448-64.
- Harding, H.P., I. Novoa, Y. Zhang, H. Zeng, R. Wek, M. Schapira, and D. Ron. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol Cell.* 6:1099-108.
- Havin, L., A. Git, Z. Elisha, F. Oberman, K. Yaniv, S.P. Schwartz, N. Standart, and J.K. Yisraeli. 1998. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev.* 12:1593-8.
- Heldin, C.H., A. Johnsson, S. Wennergren, C. Wernstedt, C. Betsholtz, and B. Westermark. 1986. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature.* 319:511-4.
- Hu, C.D., Y. Chinenov, and T.K. Kerppola. 2002. Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell.* 9:789-98.
- Hu, C.D., and T.K. Kerppola. 2003. Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol.* 21:539-45.
- Huttelmaier, S., S. Illenberger, I. Grosheva, M. Rudiger, R.H. Singer, and B.M. Jockusch. 2001. Raver1, a dual compartment protein, is a ligand for PTB/hnRNPI and microfilament attachment proteins. *J Cell Biol.* 155:775-86.
- Huttelmaier, S., D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dichtenberg, M. Lorenz, X. Meng, G.J. Bassell, J. Condeelis, and R.H. Singer. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* 438:512-515.
- Ioannidis, P., C. Kottaridi, E. Dimitriadis, N. Curtis, L. Mahaira, M. Talieri, A. Giannopoulos, K. Iliadis, D. Papaioannou, G. Nasioulas, and T. Trangas. 2004. Expression of the RNA-binding protein CRD-BP in brain and non-small cell lung tumors. *Cancer Lett.* 209:245-50.
- Ioannidis, P., L. Mahaira, A. Papadopoulou, M.R. Teixeira, S. Heim, J.A. Andersen, E. Evangelou, U. Dafni, N. Pandis, and T. Trangas. 2003. CRD-BP: a c-Myc mRNA stabilizing protein with an oncofetal pattern of expression. *Anticancer Res.* 23:2179-83.

- Ioannidis, P., T. Trangas, E. Dimitriadis, M. Samiotaki, I. Kyriazoglou, C.M. Tsiapalis, C. Kittas, N. Agnantis, F.C. Nielsen, J. Nielsen, J. Christiansen, and N. Pandis. 2001. C-MYC and IGF-II mRNA-binding protein (CRD-BP/IMP-1) in benign and malignant mesenchymal tumors. *Int J Cancer*. 94:480-4.
- Jonson, L., J. Vikesaa, A. Krogh, L.K. Nielsen, T.V. Hansen, R. Borup, A.H. Johnsen, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 2007. Molecular composition of IMP1 RNP granules. *Mol Cell Proteomics*.
- Kedersha, N., and P. Anderson. 2002. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*. 30:963-9.
- Kedersha, N., S. Chen, N. Gilks, W. Li, I.J. Miller, J. Stahl, and P. Anderson. 2002. Evidence that ternary complex (eIF2-GTP-tRNA(i)(Met))-deficient preinitiation complexes are core constituents of mammalian stress granules. *Mol Biol Cell*. 13:195-210.
- Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M.J. Fitzler, D. Scheuner, R.J. Kaufman, D.E. Golan, and P. Anderson. 2005. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*. 169:871-84.
- Kedersha, N.L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*. 147:1431-42.
- Kimball, S.R. 1999. Eukaryotic initiation factor eIF2. *Int J Biochem Cell Biol*. 31:25-9.
- Kislauskis, E.H., Z. Li, R.H. Singer, and K.L. Taneja. 1993. Isoform-specific 3'-untranslated sequences sort alpha-cardiac and beta-cytoplasmic actin messenger RNAs to different cytoplasmic compartments. *J Cell Biol*. 123:165-72.
- Kislauskis, E.H., X. Zhu, and R.H. Singer. 1994. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol*. 127:441-51.
- Kobel, M., D. Budianto, W.D. Schmitt, L. Borsi, A. Siri, and S. Hauptmann. 2005. Influence of various cytokines on adhesion and migration of the colorectal adenocarcinoma cell line HRT-18. *Oncology*. 68:33-9.
- Kobel, M., D. Weidensdorfer, C. Reinke, M. Lederer, W.D. Schmitt, K. Zeng, C. Thomssen, S. Hauptmann, and S. Huttelmaier. 2007. Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene*.
- Leeds, P., B.T. Kren, J.M. Boylan, N.A. Betz, C.J. Steer, P.A. Gruppuso, and J. Ross. 1997. Developmental regulation of CRD-BP, an RNA-binding protein that stabilizes c-myc mRNA in vitro. *Oncogene*. 14:1279-86.
- Leighton, P.A., J.R. Saam, R.S. Ingram, C.L. Stewart, and S.M. Tilghman. 1995. An enhancer deletion affects both H19 and Igf2 expression. *Genes Dev*. 9:2079-89.

- Lemm, I., and J. Ross. 2002. Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Mol Cell Biol.* 22:3959-69.
- Li, Y.M., G. Franklin, H.M. Cui, K. Svensson, X.B. He, G. Adam, R. Ohlsson, and S. Pfeifer. 1998. The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. *J Biol Chem.* 273:28247-52.
- Liao, B., M. Patel, Y. Hu, S. Charles, D.J. Herrick, and G. Brewer. 2004. Targeted knockdown of the RNA-binding protein CRD-BP promotes cell proliferation via an insulin-like growth factor II-dependent pathway in human K562 leukemia cells. *J Biol Chem.* 279:48716-24.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods.* 25:402-8.
- Low, W.K., Y. Dang, T. Schneider-Poetsch, Z. Shi, N.S. Choi, W.C. Merrick, D. Romo, and J.O. Liu. 2005. Inhibition of eukaryotic translation initiation by the marine natural product pateamine A. *Mol Cell.* 20:709-22.
- Lu, L., A.P. Han, and J.J. Chen. 2001. Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol.* 21:7971-80.
- Mazroui, R., M.E. Huot, S. Tremblay, C. Filion, Y. Labelle, and E.W. Khandjian. 2002. Trapping of messenger RNA by Fragile X Mental Retardation protein into cytoplasmic granules induces translation repression. *Hum Mol Genet.* 11:3007-17.
- Mazroui, R., R. Sukarieh, M.E. Bordeleau, R.J. Kaufman, P. Northcote, J. Tanaka, I. Gallouzi, and J. Pelletier. 2006. Inhibition of ribosome recruitment induces stress granule formation independently of eukaryotic initiation factor 2alpha phosphorylation. *Mol Biol Cell.* 17:4212-9.
- Meyer, S., C. Temme, and E. Wahle. 2004. Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.* 39:197-216.
- Moeller, B.J., Y. Cao, C.Y. Li, and M.W. Dewhirst. 2004. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell.* 5:429-41.
- Mueller-Pillasch, F., B. Pohl, M. Wilda, U. Lacher, M. Beil, C. Wallrapp, H. Hameister, W. Knochel, G. Adler, and T.M. Gress. 1999. Expression of the highly conserved RNA binding protein KOC in embryogenesis. *Mech Dev.* 88:95-9.
- Munro, T.P., S. Kwon, B.J. Schnapp, and D. St Johnston. 2006. A repeated IMP-binding motif controls oskar mRNA translation and anchoring independently of Drosophila melanogaster IMP. *J Cell Biol.* 172:577-88.
- Nielsen, F.C., L. Ostergaard, J. Nielsen, and J. Christiansen. 1995. Growth-dependent translation of IGF-II mRNA by a rapamycin-sensitive pathway. *Nature.* 377:358-62.

- Nielsen, J., J. Christiansen, J. Lykke-Andersen, A.H. Johnsen, U.M. Wewer, and F.C. Nielsen. 1999. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol.* 19:1262-70.
- Nielsen, J., M.A. Kristensen, M. Willemoes, F.C. Nielsen, and J. Christiansen. 2004. Sequential dimerization of human zipcode-binding protein IMP1 on RNA: a cooperative mechanism providing RNP stability. *Nucleic Acids Res.* 32:4368-76.
- Noubissi, F.K., I. Elcheva, N. Bhatia, A. Shakoory, A. Ougolkov, J. Liu, T. Minamoto, J. Ross, S.Y. Fuchs, and V.S. Spiegelman. 2006. CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature.* 441:898-901.
- Nover, L., K.D. Scharf, and D. Neumann. 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol Cell Biol.* 9:1298-308.
- Oleynikov, Y., and R.H. Singer. 2003. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol.* 13:199-207.
- Pestova, T.V., and C.U. Hellen. 1999. Internal initiation of translation of bovine viral diarrhea virus RNA. *Virology.* 258:249-56.
- Phan, L., L.W. Schoenfeld, L. Valasek, K.H. Nielsen, and A.G. Hinnebusch. 2001. A subcomplex of three eIF3 subunits binds eIF1 and eIF5 and stimulates ribosome binding of mRNA and tRNA(i)Met. *Embo J.* 20:2954-65.
- Pillai, R.S., S.N. Bhattacharyya, and W. Filipowicz. 2007. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? *Trends Cell Biol.* 17:118-26.
- Rackham, O., and C.M. Brown. 2004. Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *Embo J.* 23:3346-55.
- Rogers, G.W., Jr., A.A. Komar, and W.C. Merrick. 2002. eIF4A: the godfather of the DEAD box helicases. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.* 72:307-31.
- Ross, A.F., Y. Oleynikov, E.H. Kislaukis, K.L. Taneja, and R.H. Singer. 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol.* 17:2158-65.
- Ross, J., I. Lemm, and B. Berberet. 2001. Overexpression of an mRNA-binding protein in human colorectal cancer. *Oncogene.* 20:6544-50.
- Runge, S., F.C. Nielsen, J. Nielsen, J. Lykke-Andersen, U.M. Wewer, and J. Christiansen. 2000. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J Biol Chem.* 275:29562-9.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.

- Sheth, U., and R. Parker. 2003. Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*. 300:805-8.
- Sparanese, D., and C.H. Lee. 2007. CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 35:1209-21.
- Stohr, N., M. Lederer, C. Reinke, S. Meyer, M. Hatzfeld, R.H. Singer, and S. Huttelmaier. 2006. ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol.*
- Tessier, C.R., G.A. Doyle, B.A. Clark, H.C. Pitot, and J. Ross. 2004. Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer Res.* 64:209-14.
- Thomas, M.G., L.J. Martinez Tosar, M. Loschi, J.M. Pasquini, J. Correale, S. Kindler, and G.L. Boccaccio. 2005. Staufen recruitment into stress granules does not affect early mRNA transport in oligodendrocytes. *Mol Biol Cell.* 16:405-20.
- Tourriere, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J.M. Blanchard, E. Bertrand, and J. Tazi. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol.* 160:823-31.
- Vikesaa, J., T.V. Hansen, L. Jonson, R. Borup, U.M. Wewer, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 2006. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *Embo J.* 25:1456-68.
- Weksberg, R., D.R. Shen, Y.L. Fei, Q.L. Song, and J. Squire. 1993. Disruption of insulin-like growth factor 2 imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet.* 5:143-50.
- Wilczynska, A., C. Aigueperse, M. Kress, F. Dautry, and D. Weil. 2005. The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci.* 118:981-92.
- Wilhelm, J.E., and C.A. Smibert. 2005. Mechanisms of translational regulation in *Drosophila*. *Biol Cell.* 97:235-52.
- Williams, B.R. 2001. Signal integration via PKR. *Sci STKE.* 2001:RE2.
- Yaniv, K., and J.K. Yisraeli. 2002. The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene.* 287:49-54.
- Yisraeli, J.K. 2005. VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biol Cell.* 97:87-96.
- Yoder-Hill, J., A. Pause, N. Sonenberg, and W.C. Merrick. 1993. The p46 subunit of eukaryotic initiation factor (eIF)-4F exchanges with eIF-4A. *J Biol Chem.* 268:5566-73.
- Zemel, S., M.S. Bartolomei, and S.M. Tilghman. 1992. Physical linkage of two mammalian imprinted genes, H19 and insulin-like growth factor 2. *Nat Genet.* 2:61-5.

- Zhang, J., and E.K. Chan. 2002. Autoantibodies to IGF-II mRNA binding protein p62 and overexpression of p62 in human hepatocellular carcinoma. *Autoimmun Rev.* 1:146-53.
- Zhang, J.Y., R. Megliorino, X.X. Peng, E.M. Tan, Y. Chen, and E.K. Chan. 2007. Antibody detection using tumor-associated antigen mini-array in immunodiagnosing human hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 46:107-14.
- Zhang, Q., K. Yaniv, F. Oberman, U. Wolke, A. Git, M. Fromer, W.L. Taylor, D. Meyer, N. Standart, E. Raz, and J.K. Yisraeli. 1999. Vg1 RBP intracellular distribution and evolutionarily conserved expression at multiple stages during development. *Mech Dev.* 88:101-6.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
Abb.	Abbildung
ARE	<i>AU-rich elements</i>
bwz.	beziehungsweise
ca.	cirka
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRD	<i>coding region instability determinant</i>
CRD-BP	<i>CRD binding protein</i>
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
et al.	<i>et altera</i>
evtl.	eventuell
FFL	<i>firefly</i> Luziferase
g	Erdbeschleunigung, Zentrifugationsgeschwindigkeit
g	Gramm
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
h	Stunde
hnRNP	<i>heterologous nuclear ribonucleoproteins</i>
IF	Immunfluoreszenz
Imp	<i>IGF-II mRNA binding protein</i>
IP	Immunopräzipitation
kb	Kilobasenpaare
KH	<i>hnRNP K homology domain</i>
L	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli
M	Molar

---

mAK	monoklonaler Antikörper
min	Minute
mind.	mindestens
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoprotein
n	nano
NLS	<i>nuclear localization signal</i>
nt	Nukleotide
o.a.	oben aufgeführt
ORF	<i>open reading frame</i>
pAK	polyklonaler Antikörper
PB	processing body
PBs	<i>processing bodies</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentium Hydrogenii</i>
qRT-PCR	quantitative reverse Transkriptase PCR
RBP	RNA bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonuklease
RNasin	RNase Inhibitor
Rpm	<i>rounds per minute</i> , Zentrifugationsgeschwindigkeit
RL	<i>renilla</i> Luziferase
RRM	RNA recognition motif
RT	reverse Transkriptase
RT-PCR	reverse Transkriptase PCR
SDS-PAGE	denaturierendes Polyacrylamid-Gel
SG	stress granule
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurylsäure
u.a.	und andere
UTR	untranslatierte Region
WB	Western Blot

YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZBP1	<i>Zipcode binding protein 1</i>

## 7.2 Transfektionen

**Tab. 6.1: Transfektionen.** In der Tabelle sind die Mengen der transfizierten DNA sowie des Lipofektamines 2000 zusammengefasst, welche in den einzelnen Experimenten verwendet wurden.

Versuch	TC-Platten-größe	siRNAs	DNA	Lipofectamine 2000	Zeit
Knockdown	6well	250 pmol		4 µL	72 h
	10 cm	1,5 nmol		24 µL	72 h
Immunfluoreszenz	24well		250 ng je GFP-/RFP-Fusionsplasmid	1 µL	24 h
MS2-tethering	24well		100 ng GFP-NLS-MS2BP 500 ng MS2-Reporter	1,5 µL	24 h
Knockdown und MS2-tethering	6well	250 pmol		4 µL	72 h
	24well		100 ng GFP-NLS-MS2BP 500 ng MS2-Reporter 250 ng RFP-DCP1	1,5 µL	24h
TriFC	24well		250 ng YFPN-Flag-ZBP1 250 ng YFPC-HA-MS2BP 500 ng MS2-Reporter	1,5 µL	24 h
Stress/Erholung			Siehe 3.1.3.7		

## 7.3 Daten der Mikroarray-Analyse

**Tab. 6.2: Daten der Mikroarray-Analyse.** Vollständige Liste der durch Auswertung mit der MAS 5.0 software als present (P) in der Kontrolle und absent (A) nach ZBP1 Knockdown eingestufteten Gene.

Microarray			Microarray data	
Probe Set ID	Gene Symbol	Gene Title	control	ZBP1
234962_at	---	---	P 404,2	A 9
232916_at	---	---	P 314,3	A 14,5
243822_at	---	---	P 429,1	A 22,9
216556_x_at	---	---	P 331,2	A 21,4
1560412_at	---	---	P 318,4	A 24,9
1564949_at	---	---	P 342,5	A 28,6
243718_at	---	---	P 320,5	A 27,9
236129_at	---	---	P 366,9	A 39,8
213215_at	AP3S2	Adaptor-related protein complex 3, sigma 2 subunit	P 333,4	A 34,9
221590_s_at	ALDH6A1	Aldehyde dehydrogenase 6 family, member A1	P 397,6	A 30,7
227533_at	ANGPTL1	Angiopietin-like 1	P 323,8	A 28,1

213001_at	ANGPTL2	angiopoietin-like 2	P 983,7	A 95,6
206252_s_at	AVPR1A	arginine vasopressin receptor 1A	P 300,8	A 30,6
234210_x_at	ACTR2	ARP2 Aktin-related protein 2 homolog (yeast)	P 349,4	A 30,8
243792_x_at	AHDC1	AT hook, DNA binding motif, containing 1	P 376,1	A 45,5
217586_x_at	ATXN2	Ataxin 2	P 795,3	A 55,3
1556595_at	WWOX	B-box and SPRY domain containing	P 368	A 21
206665_s_at	BCL2L1	BCL2-like 1	P 391,5	A 36,7
223916_s_at	BCOR	BCL6 ko-repressor	P 333,9	A 41,7
91920_at	BCAN	brevican	P 380,1	A 47
238612_at	BRD4	Bromodomain containing 4	P 495,6	A 44,9
223499_at	C1QTNF5	C1q and tumor necrosis factor related protein 5	P 342,3	A 40
233214_at	---	CDNA FLJ11900 fis, clone HEMBA1007341	P 423,5	A 44,6
227383_at	---	CDNA FLJ36837 fis, clone ASTRO2011422	P 546,6	A 27,8
230292_at	---	CDNA FLJ43180 fis, clone FCBBF3013846	P 321,1	A 12,6
216739_at	---	CDNA: FLJ20874 fis, clone ADKA02818	P 405	A 20,7
1562669_at	---	CDNA: FLJ21540 fis, clone COL06156	P 324,6	A 6,2
218178_s_at	CHMP1B	chromatin modifying protein 1B	P 543	A 65,7
228517_at	C1orf149	chromosome 1 open reading frame 149	P 324,6	A 38,2
204073_s_at	C11orf9	chromosome 11 open reading frame 9	P 499,2	A 24,1
233941_at	C14orf166B	Chromosome 14 open reading frame 166B	P 446,3	A 47,1
232619_at	C20orf134	chromosome 20 open reading frame 134	P 490,5	A 50,9
1566927_at	C21orf104	chromosome 21 open reading frame 104	P 317,7	A 39,5
231175_at	C6orf65	chromosome 6 open reading frame 65	P 423,2	A 39
224987_at	C6orf89	chromosome 6 open reading frame 89	P 305,6	A 28,7
1557805_at	C9orf77	Chromosome 9 open reading frame 77	P 392,6	A 12,3
236582_at	CPSF6	Cleavage and polyadenylation specific factor 6, 68kDa confirm sequence	P 310,3	A 11,2
211913_s_at	MERTK	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase ///	P 320,9	A 16,5
1569642_at	F2R	c-mer proto-oncogene tyrosine kinase	P 549,2	A 61,6
242194_at	CUL4A	coagulation factor II (thrombin) receptor	P 449,3	A 51,9
220153_at	ENTPD7	Cullin 4A	P 339,7	A 37,5
228952_at	ENPP1	ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase 7	P 405,2	A 17,3
205231_s_at	EPM2A	EctoNukleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 1	P 465,3	A 24,4
237262_at	FAM59A	epilepsy, progressive myoclonus type 2A, Lafora disease (laforin)	P 395,2	A 5,2
227002_at	FAM78A	Family with sequence similarity 59, member A	P 365,4	A 38,9
240891_at	FSTL1	family with sequence similarity 78, member A	P 479,5	A 52,7
226470_at	GGTL3	Follistatin-like 1	P 551,3	A 46,7
1558950_at	---	gamma-glutamyltransferase-like 3	P 331,7	A 19,3
1558784_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:4649634, mRNA	P 392,1	A 43,7
239958_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:4701563, mRNA	P 362,6	A 12,2
236555_at	---	Homo sapiens, clone IMAGE:5218355, mRNA ///	P 349,3	A 21,5
230812_at	LOC440462	CDNA FLJ41997 fis, clone SPLEN2029176	P 366	A 30,7
231987_at	LOC401212	Homo sapiens, clone IMAGE:5223057, mRNA	P 527,5	A 42,5
239922_at	FLJ14397	hypothetical gene supported by AK000477	P 316,7	A 22,2
1563945_at	LOC284100	Hypothetical protein DKFZp586C0721	P 303,8	A 18,8
223469_at	MGC10812	hypothetical protein FLJ14397	P 522,4	A 30
227313_at	MGC40499	hypothetical protein LOC284100	P 923,4	A 27,5
216493_s_at	IMP-3	hypothetical protein MGC10812	P 16565,2	A 16,4
216494_at	IMP-3	hypothetical protein MGC40499	P 644	A 11,7
201015_s_at	JUP	IGF-II mRNA-binding protein 3	P 373,7	A 35,1
234671_at	KRTAP4-2	IGF-II mRNA-binding protein 3	P 513,3	A 5,9
235674_at	KIAA0922	junction plakoglobin	P 398,9	A 21,1
1554438_at	KIAA1217	keratin associated protein 4-2	P 341,7	A 25,3
1554253_a_at	LASS3	KIAA0922 protein	P 303,1	A 28,6
222346_at	LAMA1	KIAA1217	P 496,9	A 22,4
		LAG1 longevity assurance homolog 3 (S. cerevisiae)		
		laminin, alpha 1		

1553329_at	LOC136263	LOC136263	P 341,6	A 29,4
1560842_a_at	LOC440132	LOC440132	P 307,2	A 23,2
1555977_at	LOC440476	LOC440476	P 348,6	A 14,4
242505_at	LOC440962	LOC440962	P 302,5	A 31,5
243361_at	LEF1	lymphoid enhancer-binding factor 1	P 354,6	A 11,3
208166_at	MMP16	matrix metalloproteinase 16 (membrane-inserted)	P 380,2	A 26,2
242223_at	MCCC1	Methylcrotonoyl-Coenzyme A carboxylase 1 (alpha)	P 456,5	A 27,7
241478_at	MICAL-L2	MICAL-like 2	P 341	A 28
230224_at	MCART6	Mitochondrial carrier triple repeat 6	P 347,9	A 11,9
223743_s_at	MRPL4	mitochondrial ribosomal protein L4	P 326,4	A 10,5
223357_s_at	MTIF3	mitochondrial translational initiation factor 3	P 313,7	A 37,8
204708_at	MAPK4	mitogen-activated protein kinase 4	P 307,5	A 19
233481_at	---	MRNA; cDNA DKFZp566O1624 (from clone DKFZp566O1624)	P 343,9	A 21,2
235965_at	---	MRNA; cDNA DKFZp779C0742 (from clone DKFZp779C0742)	P 535,5	A 32,9
206237_s_at	NRG1	neuregulin 1	P 563,2	A 38,9
209982_s_at	NRXN2	neurexin 2	P 312,4	A 37,5
228278_at	NFIX	nuclear factor I/X (CCAAT-binding transcription factor)	P 327,2	A 28,8
1561123_at	PRRX1	Paired related homeobox 1	P 308,1	A 19,8
230714_s_at	ZNF286	Peroxisome proliferative activated receptor, alpha-like	P 683,1	A 29
228006_at	PTEN	Phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)	P 328,8	A 37,5
215409_at	LOC254531	PLSC domain containing protein	P 340,7	A 22
233053_at	PB1	Polybromo 1	P 364,6	A 23,4
239834_at	KCTD1	Potassium channel tetramerisation domain containing 1	P 324,8	A 9
242022_at	PBX1	Pre-B-cell leukemia transcription factor 1	P 422,6	A 39,7
215837_x_at	PRO1621	PRO1621 protein	P 314,8	A 39,3
230374_at	PPP1R14B	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B	P 421,2	A 42,3
237669_at	PTPDC1	Protein tyrosine phosphatase domain containing 1	P 373,1	A 18,8
215987_at	RAPGEF2	Rap guanine Nucleotide exchange factor (GEF) 2	P 456,9	A 22,7
232053_x_at	RHBDL7	rhomboid, veinlet-like 7 (Drosophila)	P 547,5	A 14,8
204635_at	RPS6KA5	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5	P 341,4	A 40,7
201205_at	RRBP1	ribosome binding protein 1 homolog 180kDa (dog)	P 408,9	A 36,2
233337_s_at	SEZ6L2	seizure related 6 homolog (mouse)-like 2	P 345,1	A 29,1
233168_s_at	SELO	selenoprotein O	P 585,4	A 68,6
202695_s_at	STK17A	serine/threonine kinase 17a (apoptosis-inducing)	P 431,2	A 44,2
231806_s_at	STK36	serine/threonine kinase 36 (fused homolog, Drosophila)	P 377,9	A 26,7
220030_at	STYK1	serine/threonine/tyrosine kinase 1	P 389,8	A 28,2
221696_s_at	STYK1	serine/threonine/tyrosine kinase 1 /// serine/threonine/tyrosine kinase 1	P 403,1	A 30,7
227923_at	SHANK3	SH3 and multiple ankyrin repeat domains 3	P 415,7	A 29,5
235680_at	STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 (acute-phase response factor)	P 304,8	A 30
231658_x_at	LOC127295/391209	similar to 60S ribosomal protein L36 /// similar to ribosomal protein L36	P 568,4	A 56,5
242577_at	LOC389833	Similar to hypothetical protein MGC27019	P 588,4	A 20,4
212000_at	SFRS14	splicing factor, arginine/serine-rich 14	P 333,4	A 14,3
243805_at	ST8SIA6	ST8 alpha-N-acetyl-neuraminide alpha-2,8- sialyltransferase 6	P 503,6	A 28,6
244404_at	STXBP4	syntaxin binding protein 4	P 416,2	A 23,3
226613_at	TBC1D10A	TBC1 domain family, member 10A	P 320,5	A 24,2
1560553_at	TIAF1	TGFB1-induced anti-apoptotic factor 1	P 353	A 39,5
233675_s_at	LOC374491	TPTE and PTEN homologous inositol lipid phosphatase pseudogene	P 313,9	A 36,1
243114_at	---	Transcribed locus	P 394	A 14,3
243961_at	---	Transcribed locus	P 368,5	A 25,4
235660_at	---	Transcribed locus, moderately similar to XP_536558.2 PREDICTED: similar to reverse transcriptase [Canis familiaris]	P 339,9	A 39,3
241530_at	---	Transcribed locus, strongly similar to NP_077144.1 RIO	P 308,4	A 8,9

		kinase 3 [Mus musculus]		
244575_at	---	Transcribed locus, strongly similar to NP_694873.1 hydroxysteroid dehydrogenase-2, delta<5>-3-beta [Mus musculus]	P 334,6	A 26,6
240680_at	---	Transcribed locus, strongly similar to XP_085831.2 PREDICTED: hypothetical protein XP_085831 [Homo sapiens]	P 340,9	A 26,3
241853_at	---	Transcribed locus, strongly similar to XP_513591.1 PREDICTED: hypothetical protein XP_513591 [Pan troglodytes]	P 332,5	A 11,6
228623_at	---	Transcribed locus, weakly similar to XP_517454.1 PREDICTED: similar to hypothetical protein MGC45438 [Pan troglodytes]	P 359,6	A 29
232372_at	TULP4	Tubby like protein 4	P 319,6	A 28,5
205652_s_at	TTLL1	tubulin tyrosine ligase-like family, member 1	P 349,8	A 26,6
224836_at	TP53INP2	tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	P 387,1	A 46,4
230967_s_at	USP7	Unknown protein	P 367,4	A 23,6
238248_at	UMOD	Uromodulin (uromucoid, Tamm-Horsfall glycoprotein)	P 449,7	A 30,8
1556412_at	ZBTB40	Zinc finger and BTB domain containing 40	P 436,4	A 16,2
207394_at	ZNF137	zinc finger protein 137 (clone pHZ-30)	P 329,3	A 7,8
238994_at	ZA20D1	Zinc finger, A20 domain containing 1	P 310,3	A 21,7

## **Danksagung**

### **Ich danke...**

an erster Stelle Dr. Stefan Hüttelmaier, der mir nicht nur ermöglichte, diese Arbeit in seiner Gruppe anzufertigen, sondern mir während dieser Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

dem gesamten Hüttelmaier *Lab* für die gute Zusammenarbeit und nette Arbeitsatmosphäre.

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens, Prof. Dr. Mechthild Hatzfeld und Dr. Stefan Kindler dafür, dass sie sich freundlicherweise bereit erklärt haben, diese Arbeit zu begutachten.

meiner Freundin Jule ich für all ihre Unterstützung, Ehrlichkeit und Freundschaft.

meinen Freunden für viele offene Ohren und den Spaß nach Feierabend.

einem besonderen Menschen, der mich meine Grenzen lehrte und, dass ich im Stande bin, sie zu überwinden.

meiner Familie für ihre Liebe und bedingungslose Unterstützung in jeder Lebenslage.

"Wende dein Gesicht der Sonne zu, dann fallen die Schatten hinter dich."

*(afrikanisches Sprichwort)*

# Curriculum Vitae

## Persönliche Daten

Name: Nadine Stöhr  
geboren: am 19.01.1980 in Lutherstadt Eisleben  
Staatsangehörigkeit: deutsch  
Wohnort: Thomasiusstr. 36  
06110 Halle

## Werdegang

1986-1990 Grundschole POS "Hans Seidel" Lutherstadt Eisleben

1990-1998 Martin-Luther-Gymnasium Lutherstadt Eisleben  
Abschluss: Abitur, 1998

WS/1998-SS/2003 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität  
Halle/Wittenberg  
Abschluss: Diplom, 2003

11/2002-07/2003 Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe von  
Prof. Dr. Dr. Thomas Braun  
Medizinische Fakultät,  
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

08/2003-12/2004 AG Prof. Dr. Dr. Thomas Braun  
Medizinische Fakultät,  
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

seit 01/2005 Promotion in der NBL3-Nachwuchsgruppe von  
Dr. Stefan Hüttelmaier  
Medizinische Fakultät,  
Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

## **Publikationsliste:**

### **ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress**

**Nadine Stöhr,<sup>1</sup> Marcell Lederer,<sup>1</sup> Claudia Reinke,<sup>1</sup> Sylke Meyer,<sup>2</sup> Mechthild Hatzfeld,<sup>3</sup>  
Robert H. Singer,<sup>4</sup> and Stefan Hüttelmaier<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>NBL3 Research Group, Zentrum für Angewandte Medizinische und Humanbiologische Forschung, Department of Medicine, and <sup>2</sup>Department of Biochemistry, Martin-Luther-University, 06120 Halle, Germany

<sup>3</sup>Institute for Pathophysiology, Division of Pathobiochemistry, Martin-Luther-University Halle, 06114 Halle, Germany

<sup>4</sup>Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461

### **ENDOCYTOTIC INTERNALIZATION AS A CRUCIAL FACTOR FOR THE CYTOTOXICITY OF RIBONUCLEASES\***

**Franziska Leich<sup>‡</sup>, Nadine Stöhr<sup>§</sup>, Anne Rietz<sup>‡</sup>, Renate Ulbrich-Hofmann<sup>‡</sup>, and Ulrich Arnold<sup>‡</sup>**

From the <sup>‡</sup>Institute of Biochemistry and Biotechnology, and the <sup>§</sup>Interdisciplinary Center for Applied Medical and Human Biological Research, Martin-Luther University Halle-Wittenberg, D-06099 Halle, Germany

### **ZBP1 is a gatekeeper in stress granules**

**Nadine Stöhr<sup>1</sup>, Knut Krohn<sup>2</sup>, Marcell Lederer<sup>1</sup>, Sabine Buchmeier<sup>3</sup>, Robert H Singer<sup>4</sup>,  
Stefan Hüttelmaier<sup>1</sup>**

<sup>1</sup> NBL3-NWG6 of the Medical Faculty, Martin-Luther-University Halle-Wittenberg, 06120 Halle, Germany

<sup>2</sup> IZKF Leipzig, Core Unit DNA Technology, University of Leipzig, 04103 Leipzig, Germany

<sup>3</sup> Department of Cell Biology, Technical University of Braunschweig, 38102 Braunschweig, Germany

<sup>4</sup> Department of Anatomy and Structural Biology, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY 10461, USA

(submitted to Science)

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe. Die benutzten Quellen und Hilfsmittel wurden vollständig angegeben. Diese Arbeit wurde an keinerlei anderen wissenschaftlichen Instituten vorgelegt.

Nadine Böhm