

**Analyse der Mechanismen zur Regulation der Zellzyklus-
abhängigen Stabilität der MARCKS-mRNA**

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

zur Erlangung des Grades

D o k t o r d e r N a t u r w i s s e n s c h a f t e n

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz
vorgelegt von

Georg Wein
geb. in Konstanz

Mainz, 2002

Dekan: Prof. Dr. J. Markl

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 10. Juli 2002

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 1. August 1998 bis zum 29. April 2002 am Institut für Physiologische Chemie und Pathobiochemie des Fachbereichs Medizin im Arbeitskreis von Prof. Dr. A. Maelicke unter Betreuung von PD Dr. T. Herget angefertigt.

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Amp.	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-reiches Element
ATP	Adenosin 5'-triphosphat
AUBP	ARE bindende Proteine
AUF1	AU-Bindungsfaktor 1
BCA	<i>bicinchroinic acid</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie (1 Ci = $3,7 \times 10^{10}$ Becquerel)
CMV	Cytomegalievirus
cpm	Zählereignis pro Minute (<i>counts per minute</i>)
CstF64	<i>Cleavage stimulation factor of 64 kDa</i>
CTP	Cytidin 5'-triphosphat
Da	Dalton
DAG	Diacylglycerin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dN ₆	Hexadesoxyribonukleotide
dNTP	Desoxyribonucleosidtriphosphat
Dox.	Doxycyclin
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>enhanced</i> Chemilumineszenz
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELAV	<i>embryonic lethal abnormal vision</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electromobility shift assay</i>
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	Serum fetaler Kälber (<i>fetal calf serum</i>)
GAP-43	<i>growth associated protein of 43 kDa</i>
GST	Glutathion-S-Transferase
GTC	Guanidiniumthiocyanat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-ethylsulfonsäure
His	Histidin
hnRNP	heterogene nukleäre Ribonukleoproteine
HNS	<i>HuR nucleocytoplasmatic shuttling</i>
hph	Hygromycin Phosphotransferase
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen

kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
MARCKS	<i>myristoylated alanine-rich C kinase substrate</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
nt	Nukleotide
NTA	<i>nitriloacetic acid</i>
NTP	Nukleosidtriphosphat
OD	Optische Dichte
PAA	Polyacrylamid
PABP	Poly(A)-Schwanz-bindende Proteine
PARN	Poly(A)-Schwanz-Ribonuklease
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCC	Pheochromocytoma
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PDB	Phorbol-12, 13-dibutyrat
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonsäurefluorid
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNasin	RNase-Inhibitor
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	Svedbergeinheit
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>sodium dodecyl sulfate</i>)
SSC	Standard Salz Citrat
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin
TEN	Tris-EDTA-Natrium-Puffer
TRE	<i>tetracycline responsive element</i>
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
tRNA	Träger-RNA
tTA	Tetracyclin-regulierter Transaktivator
U	Units (Enzymeinheit)
ü.N.	über Nacht
UTP	Uridin 5'-triphosphat
UTR	nichttranslatierte Region (<i>untranslated region</i>)
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-Indolyl- β -D-Galactosid

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1 Signaltransduktion und Proteinkinase C.....	1
2 MARCKS.....	2
2.1 Funktionen von MARCKS.....	4
2.2 MARCKS-Expression in Abhängigkeit des Zellzyklus.....	5
3 mRNA-Stabilität in Eukaryonten.....	6
3.1 mRNA-Degradation in eukaryontischen Zellen.....	7
3.1.1 Exonukleolytische mRNA-Degradation.....	7
3.1.1.1 Die 5'-Kappe.....	7
3.1.1.2 Der Poly(A)-Schwanz.....	7
3.1.1.3 5'-3' und 3'-5' Degradation der mRNA.....	8
3.1.2 Endonukleolytische mRNA-Spaltung.....	9
3.2 Regulation der mRNA-Stabilität – <i>cis</i> -Elemente und <i>trans</i> -Faktoren.....	9
3.2.1 Cytosin-reiche Elemente (CRE).....	10
3.2.2 <i>Iron-responsive element</i> (IRE).....	10
3.2.3 AU-reiche Elemente (ARE).....	11
3.2.3.1 Die hnRNP-Genfamilie.....	12
3.2.3.2 Die ELAV/Hu-Genfamilie.....	12
4 Stabilität der MARCKS-mRNA in Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Zellen.....	14
5 Aufgabenstellung.....	16
II. Material und Methoden	18
1 Material.....	18
1.1 Geräte.....	18
1.2 Chemikalien und Reagenzien.....	19
1.2.1 Molekularbiologische Arbeiten.....	19
1.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten.....	21
1.2.3 Zellbiologische Arbeiten.....	22
1.3 Antiseren und Antikörper.....	22
1.4 Radioaktive Materialien.....	23
1.5 Primer und Desoxyribonukleotide.....	23

1.6	Vektoren.....	24
1.6.1	pBluescript KS II [®]	24
1.6.2	pBS-MARCKS 3'UTR Deletionsklone (pBS-DC1 bis pBS-DC10).....	24
1.6.3	pCR-Script-poly(A).....	25
1.6.4	pGex-2T.....	25
1.6.5	pQE30.....	25
1.6.6	pGex-HuR.....	25
1.6.7	λUniZAP-265114.....	25
1.6.8	p809.1.....	26
1.6.9	pZeoSV2(-)-HuR sense.....	26
1.6.10	pTetoff (pUHD 15-1Neo).....	26
1.6.11	pTRE (pUHD 10-3).....	26
1.6.12	pTK-Hyg.....	27
1.7	Bakterienstämme.....	27
1.8	Zelllinien.....	27
1.8.1	Swiss 3T3.....	27
1.8.2	MEF/3T3-Tetoff [®]	28
1.8.3	PCC7-Mz1.....	28
2	Methoden.....	29
2.1	Molekularbiologische Methoden.....	29
2.1.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	29
2.1.2	Transformation kompetenter Bakterien.....	29
2.1.3	Minipräparation von Plasmid-DNA.....	30
2.1.4	Maxipräparation von Plasmid-DNA.....	31
2.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.1.6	Restriktionsspaltung von DNA.....	33
2.1.7	Auffüllreaktion überhängender DNA-Enden (<i>blunt</i>).....	33
2.1.8	Elektrophoretische Auftrennung von DNA.....	34
2.1.9	Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	35
2.1.9.1	QIAEX II Agarose Gel Extraction [®]	35
2.1.9.2	QIAquick Gel Extraction [®]	36
2.1.10	Ligation von DNA.....	36
2.1.11	Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe von PCR.....	37
2.1.11.1	Amplifikation der HuD cDNA.....	37
2.1.11.2	Amplifikation der HuR cDNA.....	38
2.1.11.3	Reinigung der PCR-Produkte.....	38
2.1.12	Radioaktive Markierungen von DNA.....	39
2.1.12.1	Radioaktiv markierte DNA-Sonden.....	39
2.1.12.2	5'-Endmarkierung von DNA-Oligos.....	40
2.1.13	Arbeiten mit RNA.....	41
2.1.13.1	<i>In vitro</i> -Transkription.....	42
2.1.13.2	Northern Blot Analyse.....	44
2.1.13.3	Berechnung der RNA-Sekundärstruktur.....	48

2.2	Proteinbiochemische Methoden.....	48
2.2.1	Western Blot Analyse.....	48
2.2.1.1	Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	48
2.2.1.2	Elektrotransfer der Proteine auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen.....	50
2.2.1.3	Immunfärbung der Protein-Membranen und <i>enhanced</i> Chemilumineszenz (ECL)-Nachweis.....	51
2.2.1.4	Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen.....	52
2.2.2	Expression und Reinigung von rekombinanten Hu-Proteinen.....	52
2.2.2.1	Reinigung von GST-markiertem HuD/HuR (GST-HuD/GST-HuR).....	52
2.2.2.2	Reinigung von Histidin-markiertem HuD (His ₆ -HuD).....	54
2.2.2.3	Konzentrationsbestimmung von GST-HuD, GST-HuR und His ₆ -HuD.....	55
2.2.3	Herstellung von polyklonalen ELAV/Hu-Antikörpern.....	56
2.2.4	Überprüfung des Hu-Antiserums im ELISA.....	56
2.2.5	Affinitätsreinigung des polyklonalen Kaninchen-Antiserums.....	57
2.2.6	Proteinextraktion.....	59
2.2.6.1	Zytoplasmatischer Gesamtextrakt.....	59
2.2.6.2	Fraktionierung von Zellextrakten in Zytoplasma- und Kernfraktion.....	60
2.2.6.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	61
2.2.7	RNase/EMSA-Analyse (<i>electro mobility shift assay</i>).....	61
2.2.7.1	DNase/EMSA-Analyse.....	63
2.2.7.2	Kompetition mit nicht-markierter RNA.....	63
2.2.7.3	Supershift-Analyse.....	63
2.2.8	Gel-Retardation-Assay.....	63
2.2.9	UV-crosslink-Assay.....	64
2.2.10	Northwestern-Analyse.....	65
2.2.11	RNA <i>in vitro</i> -Degradationsanalyse.....	66
2.3	Zellbiologische Methoden.....	67
2.3.1	Kultivierung von Swiss 3T3-Fibroblasten.....	67
2.3.2	Kultivierung von MEF/3T3-Tetoff [®] -Zellen.....	68
2.3.3	Kultivierung von PCC7-Mz1-Zellen.....	69
2.3.4	Auftauen und Einfrieren von Zellen.....	69
2.3.5	Transfektion eukaryontischer Zellen.....	70
2.3.5.1	Transiente Transfektion von Swiss 3T3-Zellen.....	70
2.3.5.2	Stabile Transfektion von MEF/3T3-Tetoff [®] -Zellen.....	71

III. Ergebnisse	74
1 Identifizierung zweier <i>cis</i> -Elemente innerhalb der MARCKS 3'UTR.....	74
1.1 Die pBS-MARCKS 3'UTR Deletionsklone.....	74
1.1.1 Präparation und Kontrolle der pBS-MARCKS 3'UTR Plasmid-DNA.....	76
1.1.2 Herstellung der MARCKS 3'UTR Transkripte	76
1.2 Nachweis von RNA/Protein-Komplexen und Lokalisierung der Protein-Bindungsstellen innerhalb der MARCKS 3'UTR	77
1.3 Ein 52nt CU-reiches Sequenzmotiv reagiert als <i>cis</i> -Element mit Swiss-3T3 Proteinen	82
1.3.1 Klonierung der MARCKS 52nt Element cDNA in pBluescript.....	82
1.3.2 RNase/EMSA-Analyse der MARCKS 52nt-RNA.....	83
1.3.3 Das MARCKS 52nt Element wird als einzelsträngige DNA von RNA-bindenden Proteinen erkannt.....	86
2 Identifizierung und Charakterisierung von RNA-bindenden Proteinen.....	89
2.1 Identifizierung der Proteine, die an die MARCKS 52nt-RNA binden	89
2.2 Subzelluläre Lokalisierung der MARCKS RNA-bindenden Proteine.....	91
2.3 ELAV-Proteine binden die MARCKS-RNA.....	94
2.3.1 Herstellung der HuD-Expressionsvektoren.....	95
2.3.2 Expression und Reinigung von GST-HuD (GST-HuR) sowie von His ₆ -HuD	96
2.3.3 GST-HuD und GST-HuR binden das 52nt <i>cis</i> -Element der MARCKS 3'UTR	98
2.3.4 Herstellung und Affinitätsreinigung des ELAV/Hu-spezifischen Antiserums	101
2.3.5 Spezifitätskontrolle des affinitätsgereinigten Antiserums.....	103
2.3.6 Subzelluläre Expression von HuR in Swiss 3T3-Zellen.....	104
2.3.7 Nachweis von HuR als MARCKS RNA-bindendes Protein	106
2.3.8 Beteiligung des Poly(A)-Schwanzes an der Protein-Bindung des 52nt <i>cis</i> -Elements.....	108
2.3.8.1 Klonierung der MARCKS 3'UTR und des MARCKS 52nt Elements in pCR-Script-poly(A)	109
2.3.8.2 Effekt des Poly(A)-Schwanzes auf die RNA/Protein-Interaktion	110
3 Funktion von ELAV/Hu bei der MARCKS-mRNA-Stabilitätskontrolle.....	112
3.1 RNA in vitro-Degradationsanalyse	112
3.2 Funktionsanalyse von HuR und HuD durch Überexpression	114
3.2.1 Klonierung der induzierbaren Expressionsvektoren pTRE-HuR und pTRE-HuD.....	114
3.2.2 Transiente Überexpression von HuR und HuD in Swiss 3T3-Zellen	116
3.2.3 Stabile Transfektion von MEF/3T3-Tetoff [®] mit pTRE-HuD	117
3.2.3.1 MARCKS-mRNA-Expression in MEF/3T3-Tetoff [®]	118
3.2.3.2 Transfektion, Selektion und Screening nach HuD-überexprimierenden MEF/3T3-Tetoff [®] -Klonen.....	120
3.2.3.3 UV-crosslinking des überexprimierten HuD mit der MARCKS 52nt-RNA	121
3.2.3.4 Stabilisierung der MARCKS-mRNA durch HuD.....	124
3.2.3.5 Einfluss von HuD auf die Degradation des MARCKS-Proteins.....	125

IV. Diskussion	127
1 Charakterisierung der MARCKS 3'UTR <i>cis</i> -Elemente	127
1.1 Die MARCKS 3'UTR <i>cis</i> -Elemente sind ARE der Klasse III	128
1.2 Die Sekundärstruktur der MARCKS 3'UTR.....	129
2 Charakterisierung der an die MARCKS 3'UTR-RNA bindenden Proteine	131
2.1 Nukleäre Lokalisierung der MARCKS-RNA-bindenden Proteine.....	132
2.2 Charakterisierung der UV-quervernetzten MARCKS-RNA-bindenden Proteine	132
2.3 HuR – ein <i>trans</i> -Faktor des MARCKS 52nt <i>cis</i> -Elements in Swiss 3T3-Zellen.....	133
2.3.1 HuR-abhängiger mRNA-Export aus dem Zellkern	133
2.3.2 Rolle des Poly(A)-Schwanzes	134
3 Die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität	135
3.1 Regulation in Swiss 3T3-Zellen	135
3.2 Die MARCKS-Expression in PCC7-Mz1-Zellen.....	137
4 Ausblick.....	139
V. Zusammenfassung	142
VI. Literaturverzeichnis	144

I. Einleitung

1 Signaltransduktion und Proteinkinase C

Die Aufnahme und Weiterleitung extrazellulärer Signale erfolgt in Zellen durch ein sehr komplexes Netzwerk von Signalübertragungskaskaden. Physikalische Reize (z.B. elektrophysikalische Signale, Hitzeschock) und chemische Signale (z.B. Hormone, Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren) werden ins Zytoplasma und/oder den Zellkern weitergeleitet, wo sie in zelluläre Effekte umgewandelt werden (Herget, 1997). Die Aufnahme der Signalstoffe geschieht über membranständige oder zytoplasmatische Rezeptoren, welche als Liganden-Rezeptorkomplex die Ausschüttung oder Synthese sekundärer Botenstoffe (z.B. Ca^{2+} , zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), Diacylglycerin (DAG), Inositolphosphate) durch bestimmte Effektorenzyme vermitteln oder selbst die zelluläre Antwort auslösen. Die sekundären Botenstoffe (*second messenger*) regulieren die Aktivität sekundärer Effektorproteine, bei denen es sich im Allgemeinen um Proteinkinasen handelt.

Eine wichtige Rolle bei der Signaltransduktion spielen die Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Genfamilie (Dekker & Parker, 1994). Bisher wurden elf verschiedene Isoformen dieser Serin/Threonin-spezifischen Proteinkinasen kloniert, welche anhand ihres Aufbaus und ihrer Aktivierung in drei Gruppen differenziert werden (Nishizuka, 1995). Konventionelle bzw. klassische cPKC (PKC α , β I, β II, γ) werden durch Ca^{2+} , Phosphatidylserin und DAG aktiviert, während eine Aktivierung durch Ca^{2+} -Ionen bei den neuartigen nPKC (PKC δ , ϵ , η /L, θ) nicht erfolgt. Die Bindedomäne für Ca^{2+} -Ionen ist bei diesen Isoformen nicht vorhanden. Den atypischen aPKC (PKC λ /I, ζ) fehlt zusätzlich die Bindungsdomäne für DAG, allerdings kann aPKC ζ durch Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat und Ceramide aktiviert werden (Nakanishi et al, 1993; Müller et al., 1995). Eine Sonderstellung nimmt die PKC μ /PKD-Isoform ein, welche von Phospholipiden und DAG aktiviert wird und zwischen den neuartigen und atypischen PKCs eingeordnet wird (Johannes et al., 1994).

Der Effekt von Diacylglycerin auf cPKCs und nPKCs kann durch Phorbolster simuliert werden. Diese polyzyklischen Alkoholderivate aus dem Crotonöl sind als Tumorpromotoren bekannt und können aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu DAG wie dieses die Proteinkinase C aktivieren (Nishizuka, 1995). 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetat (TPA), Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) oder Phorbol-12,13-dibutyrate (PDB) werden häufig experimentell zur Aktivierung der PKC eingesetzt, weil die Bindung der Phorbolster im Vergleich zu DAG irreversibel ist und die Aktivierung damit länger anhält.

Nicht aktive c und nPKC-Isoformen sind im Allgemeinen im Zytoplasma lokalisiert. Die Bindung von Ca^{2+} , DAG oder Phorbolster löst die Autophosphorylierung bestimmter Serin- und Threo-

ninreste aus (Parekh et al., 2000) und führt dazu, dass das aktivierte Enzym innerhalb von Sekunden zu Membranstrukturen der Zelle transloziert (Zytoplasmamembran, Golgi-Apparat oder Kernmembran) (Saito et al., 1989; Mochly-Rosen et al., 1990; Olson et al., 1993).

Über die Aktivierung der PKC wird eine ganze Reihe von zellulären Reaktionen gesteuert, darunter die Veränderung der Zellmorphologie, Genexpression, Proliferation und Differenzierung, Sekretion von Hormonen, sowie die Regulation der Apoptose und des Zellzyklus (Newton, 1995; Liu, 1996; Herget, 1997; Buchner, 2000). Vor allem im Gehirn, dem einzigen Organ, in dem alle elf PKC-Isoformen exprimiert werden, sind eine Vielzahl von PKC-Funktionen bekannt, darunter das Neuritenwachstum (Hundle et al., 1996), die Neurotransmitterausschüttung (Zamponi et al., 1997) und die synaptische Signaltransduktion (Swartz et al., 1993). Über die molekularen Mechanismen, die den vielen PKC-Effekten zu Grunde liegen, ist aber noch relativ wenig bekannt. Um diese aufzuklären, werden deshalb verstärkt die Substrate der PKC untersucht, wobei bisher *in vitro* über 110 Proteine als Substrate der PKC identifiziert werden konnten (Liu, 1996).

2 MARCKS

Ein Hauptsubstrat der Proteinkinase C in vielen Zellen ist das MARCKS-Protein (*myristoylated alanine-rich C kinase substrate*) (Aderem, 1992; 1995; Blackshear, 1993; Ramsden, 2000). Bislang wurden MARCKS cDNAs aus dem Rind (Stumpo et al., 1989), dem Huhn (Graff et al. 1989a), der Ratte (Erusalimsky et al., 1991), der Maus (Seykora et al., 1991), dem Mensch (Harlan et al., 1991) und dem südafrikanischen Krallenfrosch *Xenopus* (Shi et al., 1997) isoliert, wobei die jeweiligen Proteine trotz geringer Sequenzhomologie äquivalente PKC-Substrate verschiedener Spezies sind (Herget et al., 1992). MARCKS ist ein hitzestabiles, stäbchenförmiges Protein mit einem sauren isoelektrischen Punkt (p_i 4,4) (Blackshear, 1993) und reich an den Aminosäuren Alanin, Prolin, Glycin und Glutaminsäure. Tyrosin und Tryptophan hingegen fehlen. MARCKS wird durch cPKC und nPKC, aber nicht durch aPKC phosphoryliert (Herget et al., 1995; Überall et al., 1997). Das Protein hat eine Molekülmasse von etwa 32 kDa (Rind) (Marenti et al., 1992), weist im SDS-Polyacrylamidgel aber eine apparente molekulare Masse von 68 bis 87 kDa auf, weshalb es auch 80K (Rozenfurt et al., 1983) oder p87 benannt wurde.

MARCKS enthält drei konservierte funktionelle Domänen (Abb.1): Am aminoterminalen Ende (Domäne 1) befindet sich die Konsensussequenz für die N-Myristoylierung. Nach posttranslationalem Entfernen des Starter-Methionins wird kotranslational (James & Olson, 1989) bzw. posttranslational (McIlhinney & McGlone, 1990) das darauffolgende Glycin durch die N-Myristoyl-Transferase myristoyliert. Mit Hilfe dieses Myristoylsäurerests ist MARCKS mit der Zyto-

plasmamembran assoziiert. Die zweite Domäne wird als MH2 (MARCKS *homology* 2) bezeichnet und ist hochkonserviert, wobei bisher ihre Funktionen noch unbekannt sind (Douglas et al., 1999; Ramsden, 2000). Schließlich befindet sich in der Mitte des Proteins eine basische, aus 25 Aminosäuren bestehende Effektor-domäne. Diese ist zusammen mit dem Myristoylsäure-rest an der Membranassoziation beteiligt (Taniguchi & Manenti, 1993), bindet Aktinfilamente und quervernetzt diese (Hartwig et al., 1992), reagiert Ca^{2+} abhängig mit Calmodulin (Graff et al., 1989b) und enthält mehrere PKC-Phosphorylierungsstellen (Graff et al., 1989c).

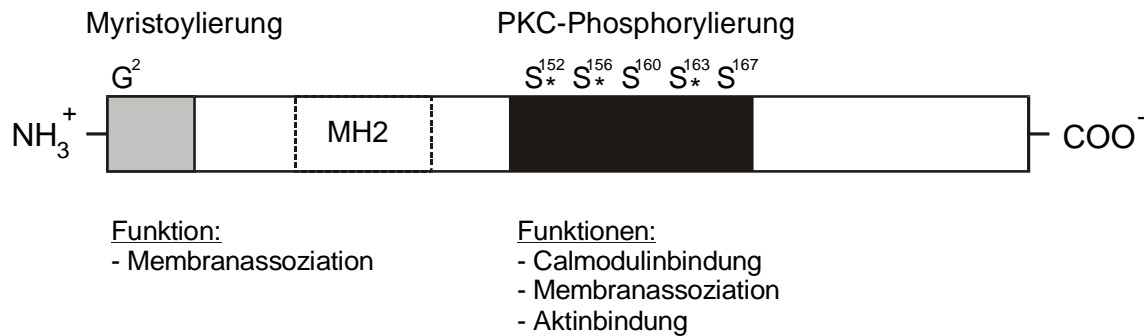


Abb. 1: Schematische Darstellung des MARCKS Proteins

Nach dem Abspalten des Starter-Methionins wird der Glycinrest 2 (G^2) am N-Terminus von MARCKS (grau) myristoyliert. Die hydrophobe Kohlenwasserstoffkette trägt zur Assoziation von MARCKS mit der Plasmamembran bei. Die basische Effektor-domäne im mittleren Teil der MARCKS-Sequenz (schwarz) enthält die PKC-Phosphorylierungsstellen. Von den fünf potentiellen Phosphorylierungsstellen der Maussequenz werden *in vitro* und *in vivo* nur die drei gekennzeichneten (*) Serinreste 152, 156 und 163 phosphoryliert (Herget et al., 1995). Im unphosphorylierten Zustand bindet MARCKS über die Effektor-domäne Calmodulin und Aktinfilamente. Gleichzeitig unterstützt die Effektor-domäne die Membranverankerung. Die Bedeutung der konservierten MH2-Domäne für die Funktion von MARCKS ist bislang unbekannt.

Über die innerhalb der Effektor-domäne lokalisierten PKC-Phosphorylierungsstellen wird die Interaktion von MARCKS mit der Plasmamembran, Calmodulin und Aktinfilamenten reguliert. Im PKC-inaktiven Zustand ist MARCKS nicht phosphoryliert und an der Plasmamembran verankert. Die Verankerung beruht auf der Einlagerung des Myristoylsäurerests in die Lipidmembran und der elektrostatischen Anziehung zwischen Effektor-domäne und sauren Membranlipiden (McLaughlin & Aderem, 1995; Arbuza et al., 1998; Bubb et al., 1999). In diesem membranassoziierten Zustand ist MARCKS über seine Effektor-domäne auch mit Calmodulin und Aktinfilamenten verbunden. Wird die Proteinkinase C aktiviert, transloziert sie zur Plasmamembran und phosphoryliert MARCKS an den drei Phosphorylierungsstellen der Effektor-domäne (Abb. 1). Dies führt zu einer Konformationsänderung der Effektor-domäne (Bubb et al., 1999) und zur elektrostatischen Abstoßung von MARCKS von der Plasmamembran (*myristoyl-electrostatic switch*). Gleichzeitig wird auch die Interaktion mit Calmodulin und Aktinfilamenten drastisch eingeschränkt. Innerhalb weniger Minuten nach Aktivierung der PKC transloziert MARCKS von der Membran in das Zytoplasma (Thelen et al., 1991; Taniguchi et al., 1993; Herget & Rozen-gurt, 1994; Seki et al., 1996; Ohmori et al., 2000). Bei kurzer Dauer der PKC-Aktivierung wird

das phosphorylierte MARCKS durch die Proteinphosphatase 2A wieder dephosphoryliert (Clarke et al., 1993) und kehrt zur Membran zurück.

Neben den PKC-Phosphorylierungsstellen existieren auch einige Phosphorylierungsstellen für Prolin-gerichtete Kinasen (Tanigushi et al., 1994). So konnte *in vitro* die Phosphorylierung von MARCKS durch die p42 MAP-Kinase (Schönwaßer et al., 1996) und mehrere Cyclin-abhängige Kinasen (Cdk1, Cdk2, Cdk4, Cdk5) nachgewiesen werden (Yamamoto et al., 1995; Manenti et al., 1999). Die physiologische Bedeutung dieser Phosphorylierungen ist noch unbekannt. Fest steht jedoch, dass diese Phosphorylierungen keinen Einfluss auf die PKC-Phosphorylierung und die damit verbundene Regulation der Membran-, Calmodulin- und Aktinfilamentbindung nehmen (Schönwaßer et al., 1996).

2.1 Funktionen von MARCKS

Obwohl MARCKS als Substrat der PKC schon lange bekannt ist, weiß man über seine Funktionen bisher relativ wenig. Einige Funktionen ließen sich aus der Interaktion von MARCKS mit Membranlipiden, Aktinfilamenten und Calmodulin ableiten. Dazu zählen die Beteiligung bei Zellmigration und -bewegung (Rosen et al., 1990; Thelen et al., 1991; Aderem, 1995; Myat et al., 1997), Vesikel- und Membrantransport inklusive Neurosekretion (Wu et al., 1982; Wang et al., 1989), Phagozytose (Allen & Aderem, 1995), neuronaler Plastizität und räumlicher Lernfähigkeit (McNamara et al., 1998), Wachstumssuppression (Brooks et al., 1996), Phospholipid-vermittelter Signaltransduktion (Glaser et al., 1996; Rose et al., 1996; Morash et al., 1998) und der Kontrolle des Zellzyklus (Herget et al., 1993; Zhao et al., 2000). MARCKS scheint ein negativer Regulator der Zelladhäsion an extrazelluläre Matrixbestandteile zu sein (Spizz & Blackshear, 2001) und wurde kürzlich als Adapterprotein identifiziert, welches die Schleimsekretion in Epithelzellen der Luftröhren vermittelt (Li et al., 2001). MARCKS wird besonders stark im Zentralen Nervensystem, der Milz und der Lunge exprimiert (Stumpo et al., 1989), jedoch nur schwach in Skelettmuskel und Leber (Blackshear et al., 1986; Herget et al., 1992). In fetalem Nervengewebe wird MARCKS stärker exprimiert als im adulten (Albert et al., 1987; Patel & Klingman, 1987). Dies wies auf eine Funktion bei der Neurogenese hin. Durch MARCKS-*knock-out* Mäuse konnte diese Annahme bestätigt werden. Die MARCKS-defizienten Mäuse waren nicht lebensfähig und starben noch im Mutterleib bzw. kurz nach der Geburt (Stumpo et al., 1995). Defekte der Feten betrafen insbesondere die Neurulation, die Fusion der Hirnhemisphären, die Bildung der Vorderhirnkommissuren und den Aufbau von Cortex und Retina (Stumpo et al., 1995). Worin die Beteiligung von MARCKS an den beschriebenen Funktionen im Säugerhirn besteht, konnte noch nicht eindeutig geklärt werden.

2.2 MARCKS-Expression in Abhängigkeit des Zellzyklus

Um die Funktion von Proteinen zu analysieren, ist es hilfreich, deren Expression genau zu untersuchen. Auch die Expression des MARCKS-Gens, welches in allen untersuchten Arten als singuläres Gen vorliegt, wurde intensiv analysiert. Dabei wurde in der murinen nicht-tumorigenen Fibroblastenzelllinie Swiss 3T3 festgestellt, dass eine inverse Korrelation zwischen der MARCKS-Expression und dem Fortschreiten im Zellzyklus vorliegt. Swiss 3T3-Zellen stellen bei Mangel an Wachstumsfaktoren die Proliferation ein und arretieren das Wachstum in der G₀-Phase des Zellzyklus (Dicker & Rozengurt, 1980). In dieser Ruhephase (*quiescent*) lassen sich in Swiss 3T3-Zellen hohe Konzentrationen an MARCKS-mRNA und -Protein nachweisen (Brooks et al., 1991; Herget et al., 1993). Stimuliert man die Zellen mit Wachstumsfaktoren, Phorbolestern oder dem Neuropeptid Bombesin, treten die Zellen wieder in den Zellzyklus ein und regulieren die MARCKS-Expression drastisch herunter. Nach 5 h Stimulation werden nur noch 5% der Ausgangsmenge an MARCKS-mRNA nachgewiesen und nach 18 h ist auch das MARCKS-Protein kaum noch nachzuweisen (Brooks et al., 1991; 1992). Dieser wachstumsabhängige Effekt auf die MARCKS-Expression wird über PKC-abhängige und PKC-unabhängige Mechanismen vermittelt (Brooks et al., 1992). Umgekehrt wird die MARCKS-Expression bei Serumentzug wieder hochreguliert und die Swiss 3T3-Zellen stellen das Wachstum ein (Herget et al., 1993). Die wachstumssupprimierende Funktion von MARCKS wurde sowohl in MEF/3T3-Fibroblasten (Brooks et al., 1991; Herget et al., 1993) als auch in Melanocyten und Endothelzellen beobachtet (Brooks, 1994; Brooks et al., 1996; Zhao et al., 2000).

Auf welche Weise MARCKS den Zellzyklus in diesen Zelllinien beeinflusst, ist noch nicht geklärt. Möglicherweise geschieht dies über die Interaktion von MARCKS mit Calmodulin (Herget et al., 1994; Herget, 1997), welches an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt ist (Rasmussen & Means, 1987; 1989). Die Konzentrationen von Calmodulin und MARCKS sind in Fibroblastenzellen so aufeinander abgestimmt, dass eine Regulation der freien Calmodulin-Konzentration durch MARCKS möglich ist (Herget, 1997).

Die Zellzyklus-abhängige Expression der MARCKS-mRNA in Swiss 3T3-Zellen wird durch posttranskriptionelle Mechanismen reguliert. Dies konnte durch Vergleich der MARCKS-mRNA-Halbwertszeiten und durch Untersuchungen der Transkriptionsaktivität in ruhenden und proliferierenden Swiss 3T3-Zellen nachgewiesen werden (Brooks et al., 1991, 1992): Durch Inhibition der Transkription mit Actinomycin D ergab sich in ruhenden Swiss 3T3-Fibroblasten eine Halbwertszeit für die MARCKS-mRNA von 11,5 h. In Zellen, die durch Stimulierung der PKC zur Proliferation angeregt worden waren, lag die MARCKS-mRNA-Halbwertszeit hingegen nur noch bei 2 h. *Nuclear Run On*-Experimente zeigten, dass nach der Stimulierung der Fibroblasten keine verringerte Aktivität des MARCKS-Promotors vorlag. Die MARCKS-mRNA wird daher bei Wiedereintritt in den Zellzyklus spezifisch degradiert, d.h. die MARCKS-Expression wird in Swiss 3T3-Zellen auf Ebene der mRNA-Stabilität reguliert.

3 mRNA-Stabilität in Eukaryonten

Der Weg vom Gen zum Protein wird in Eukaryonten auf mehreren Ebenen in Zellkern und Zytoplasma reguliert. Zu diesen Ebenen zählen Transkription, mRNA-Prozessierung (Spleißen, *Capping* und Polyadenylierung), mRNA-Export aus dem Zellkern, Lokalisierung der mRNA innerhalb der Zelle, Variation der mRNA-Stabilität und Regulation der Translation. Vor allem der Kontrolle der mRNA-Stabilität im Zytoplasma wird eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression in Eukaryonten zugeschrieben (Ross, 1995; McCarthy & Kollmus, 1995; Beelman & Parker, 1995; Mitchell & Tollervey, 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Die Expression eines Gens kann allein durch Stabilisierung der mRNA um ein Vielfaches erhöht werden, ohne dass dazu die Transkriptionsrate gesteigert wird (Ross, 1995). Auf diese Weise wird z.B. die Expression von Cytokinen und Lymphokinen in Reaktion auf extrazelluläre Signale hochreguliert. Langlebige mRNA-Moleküle können bei terminierter Transkription noch über einen langen Zeitraum translatiert werden. Auf der anderen Seite können Zellen durch raschen mRNA-Abbau die Genexpression an neue physiologische Bedingungen anpassen.

Reife eukaryontische mRNA-Moleküle sind im Allgemeinen wie in Abb. 2 dargestellt aufgebaut. An das 5'-Triphosphatende wird posttranskriptionell die 5'-Kappe angefügt (I.3.1.1.1). Daran schließt sich die 5' nicht-translatierte Region (5'UTR) an, gefolgt von der proteinkodierenden Region (eingegrenzt vom Startcodon AUG und einem der drei möglichen Stoppcodons UAA, UGA oder UAG) und der 3' nicht-translatierten Region (3'UTR). Am 3'-Ende befindet sich in der Regel der Poly(A)-Schwanz (I.3.1.1.2), welcher wie die 5'-Kappe posttranskriptionell angefügt wird. Alle Bereiche der mRNA können an der Regulation der mRNA-Stabilität beteiligt sein.

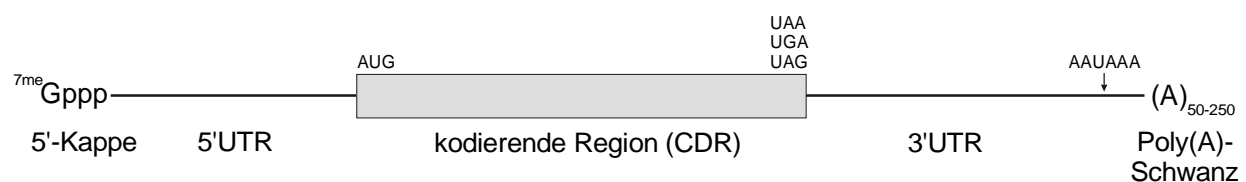


Abb. 2: Schematische Darstellung einer reifen eukaryontischen mRNA

Dargestellt sind die 5'-Kappe, 5'UTR, kodierende Region (CDR), 3'UTR und der Poly(A)-Schwanz. Ebenfalls eingezeichnet sind das Startcodon, die drei möglichen Stoppcodons, sowie das Polyadenylierungssignal AAUAAA. Jeder Bereich der mRNA kann an der Regulation der mRNA-Stabilität beteiligt sein.

3.1 mRNA-Degradation in eukaryontischen Zellen

Nach heutiger Kenntnis gibt es kein einheitliches und allgemeingültiges Abbauprinzip für alle mRNAs. Es scheinen vielmehr unterschiedliche Abbauewege zu existieren, die miteinander verbunden sind, aufeinander aufbauen oder unabhängig voneinander ablaufen können. Diese Mechanismen sind häufig auf bestimmte Transkripte individuell abgestimmt und bestehen aus exonukleolytischen und endonukleolytischen Abbauewegen (Mitchell & Tollervey, 2000; Staton et al., 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001).

3.1.1 Exonukleolytische mRNA-Degradation

Um mRNAs vor dem schnellen exonukleolytischen Abbau durch RNasen zu schützen, werden sie am 5'- und 3'-Ende posttranskriptionell modifiziert.

3.1.1.1 Die 5'-Kappe

Das 5'-Ende einer mRNA wird im Zellkern posttranskriptionell mit einer sogenannten Kappe (*Cap*) versehen. Diese besteht aus einem 7-Methylguanosin, welches über eine 5'-5'-Triphosphatbindung mit dem ersten Nukleotid des 5'-Endes verestert wird. Auf diese Weise wird das 5'-Ende vor einem schnellen 5'-3' exonukleolytischen Abbau geschützt. Im Zytoplasma bindet der Translationsfaktor eIF4E (*Cap-binding protein*) an die 5'-Kappe. Dieser bildet mit eIF4G (*bridging factor*) und eIF4A (ATPase) den Komplex eIF4F, welcher die Translation stimuliert (McCarthy, 1998; Sonenberg & Gingras, 1998; Pestova & Hellen, 1999).

3.1.1.2 Der Poly(A)-Schwanz

Die Polyadenylierung des 3'-Endes von eukaryontischen mRNAs im Zellkern ist ein komplizierter Vorgang. Das Polyadenylierungssignal AAUAAA der 3'UTR wird vom 160 kDa Protein CPSF (*cleavage and polyadenylation specificity factor*) gebunden, wenn in einem bestimmten Abstand stromabwärts davon eine GU- bzw. U-reiche Sequenz vorliegt, die wiederum vom Protein CstF64 (*cleavage stimulation factor of 64 kDa*) gebunden wird. Zwischen den Bindungsstellen für CPSF und CstF64 befindet sich die eigentliche Schnittstelle, an die die Synthese des Poly(A)-Schwanzes erfolgt (Chen et al., 1995b). Mitbeteiligt sind noch weitere CstF-Proteine (CstF50 und 77), CF I und II (*Cleavage factors*), sowie die Poly(A)-Polymerase (Keller, 1995; Manley, 1995). Noch während der Polymerisierung der 50-250 Adenin-Nukleotide binden Poly(A)-bindende Proteine (PABP, bzw. Pab1p in der Hefe) an den wachsenden Poly(A)-

Schwanz, stimulieren die Poly(A)-Polymerase und schützen vor dem 3'-5' exonukleolytischen Abbau der mRNA (Keller, 1995; Manley, 1995).

Wie die 5'-Kappe stimuliert auch der Poly(A)-Schwanz die Translation im Zytoplasma. Dies geschieht synergistisch mit der 5'-Kappe durch die Interaktion der PABP mit eIF4G (Tarun & Sachs, 1996; Tarun et al., 1997; Imataka et al., 1998). 5'- und 3'-Enden sind folglich über diese Proteine miteinander verbunden, und reife mRNA-Moleküle liegen in der Zelle zirkulär vor (Wells et al., 1998; Michel et al., 2000).

3.1.1.3 5'-3' und 3'-5' Degradation der mRNA

Der sukzessive Abbau des Poly(A)-Schwanzes im Zytoplasma ist oft der erste Schritt der mRNA-Degradation in Eukaryonten (Shyu et al., 1991; Beelman & Parker, 1995; Mitchell & Tollervey, 2000; Staton et al., 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Verantwortliche Enzyme sind in Säugern die Poly(A)-Ribonuklease (PARN) bzw. Deadenylierende Nuklease (DAN) (Korner & Wahle, 1997) und in der Hefe die Poly(A)-Nuklease (PAN) (Brown & Sachs, 1998). Bei Unterschreiten einer kritischen Länge des Poly(A)-Schwanzes (25-60 Nukleotide bei Säugerzellen, 10-12 Nukleotide in der Hefe) können Poly(A)-bindende Proteine nicht mehr an den Poly(A)-Schwanz binden (Shyu et al., 1991; Decker & Parker, 1993) und eine rasche mRNA-Degradation setzt ein.

In der Hefe gilt der Poly(A)-Schwanz-abhängige Kappenabbau mit anschließender 5'-3' exonukleolytischer Degradation als Hauptabbauweg für mRNAs (Decker & Parker, 1993; Muhlrads et al., 1994). Nach der Deadenylierung folgt hierbei die Entfernung der 5'-Kappe durch Dcp1p (*decapping enzyme 1*) und die sukzessive mRNA-Degradation durch die 5'-3' Exoribonuklease Xrn1p (Larimer et al., 1992; LaGrandeur & Parker, 1998; Hatfield et al., 1996; Duckley & Parker, 1999).

Alternativ wurde auch die Poly(A)-Schwanz-abhängige mRNA-Degradation in 3'-5' Richtung ohne Entfernung der 5'-Kappe in der Hefe nachgewiesen (Jacobs et al., 1998). Diese Form des mRNA-Abbaus wird durch das Exosom durchgeführt, einem Multienzymkomplex aus 10 Untereinheiten, welche 3'-5' Exonukleasen und/oder RNA-bindende Proteine sind (Mitchell et al., 1997; Mitchell & Tollervey, 2000).

Über den weiteren mRNA-Abbau in Säugerzellen ist weniger bekannt (Ross, 1995; Mitchell & Tollervey, 2000; Staton et al., 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Zwar wurde ein Hefe-Homolog der zytoplasmatischen 5'-3' Exoribonuklease Xrn1p in der Maus nachgewiesen (Bashkirov et al., 1997) und in HeLa-Extrakten gelang vor kurzem die Identifizierung des Poly(A)-Schwanz-abhängigen Kappen-Abbaus (Gao et al., 2001), doch fehlt bislang noch der direkte Nachweis für den Poly(A)-Schwanz-abhängigen Kappenabbau mit anschließender 5'-3' Degradation in Säugerzellen. Vor kurzem wurde aus Jurkat-Zellextrakten das Säuger-Exosom isoliert und cha-

rakterisiert (Chen et al., 2001). Aufgrund von Ergebnissen aus *in vitro*-Degradationsstudien, bei denen der mRNA-Abbau in 3'-5' Richtung erfolgte (Brewer, 1998), wird in Säugerzellen der Exosom-vermittelte mRNA-Abbau in 3'-5'-Richtung gegenüber dem 5'-3' gerichteten Abbau favorisiert (Staton et al., 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001; Wang & Kiledjian, 2001).

3.1.2 Endonukleolytische mRNA-Spaltung

Obwohl schwierig zu identifizieren (Ross, 1995), gilt es als sicher, dass die mRNA-Degradation in Vertebraten häufig durch endonukleolytischen Angriff initiiert wird (Schoenberg & Chernoskalkskaya, 1997). Die Endonukleasen benötigen spezifische Erkennungssequenzen, die sich innerhalb der 5'UTR, der kodierenden Region und vor allem der 3'UTR befinden können. Nachdem sie an diese gebunden haben, wird die mRNA an speziellen Schnittstellen gespalten. Die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes oder der 5' Kappe ist dazu im Allgemeinen nicht notwendig (Ross, 1995; Beelman & Parker, 1995; Staton et al., 2000). Die Spaltprodukte des endonukleolytischen Verdaus können anschließend durch Exoribonukleasen in 5'-3'- (Xrn1p) bzw. 3'-5'- (Exosom) Richtung degradiert werden (Guhaniyogi & Brewer, 2001).

3.2 Regulation der mRNA-Stabilität – *cis*-Elemente und *trans*-Faktoren

Die Lebensdauer einer mRNA, und damit das zeitliche Fenster für die Möglichkeit der Translation, kann zwischen wenigen Minuten (z.B. Protoonkogene, Cytokine) und mehreren Tagen (z.B. α -Globin oder Kollagen) variieren. Verantwortlich für die unterschiedlich langen Halbwertszeiten der mRNA-Moleküle sind Interaktionen zwischen spezifischen Sequenzmotiven der mRNA (*cis*-Elemente) und daran bindenden Proteinen (*trans*-Faktoren). Diese Wechselwirkungen vermitteln eine schnelle mRNA-Degradation oder die Stabilisierung der mRNA (Ross, 1995; Mitchell & Tollervey, 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Dabei kann die Stabilität einer mRNA mit ihrer Translation gekoppelt sein oder unabhängig von ihr reguliert werden. Drei wichtige Sequenzmotive, die eine von der Translation unabhängige mRNA-Stabilität vermitteln, befinden sich innerhalb der 3'UTR (Jackson, 1993; Decker & Parker, 1995; Grzybowska et al., 2001) und sollen hier näher beschrieben werden.

3.2.1 Cytosin-reiche Elemente (CRE)

Langlebige mRNA-Moleküle kodieren oftmals für Proteine mit hohen Halbwertszeiten. Zu ihnen zählen u.a. die mRNAs der Tyrosin-Hydroxylase (Paulding & Czyzyk-Krzeska, 1999), des Kollagens $\alpha 1(I)$ (Stefanovic et al., 1997; Lindquist et al., 2000), des Insulins (Tillmar et al., 2002) und des α -Globins (Wang & Liebhaber, 1996). Allen diesen Transkripten gemeinsam ist ein Cytosin-reiches Element (CRE) innerhalb ihrer 3'UTR. Mit dem CRE der α -Globin mRNA bilden im Zytoplasma bis zu sieben Proteine einen sogenannten α -Komplex, der über Protein-Protein-Kontakte mit PABP interagiert (Wang et al. 1999). Diese Interaktion führt zur wechselseitigen Stabilisierung von Poly(A)-Schwanz und α -Komplex, worauf letztlich die hohe Halbwertszeit der α -Globin-mRNA (24 bis 60 h; Volloch & Housman, 1981) beruht (Wang & Kiledjian, 2000b). Zusätzlich befindet sich innerhalb des CRE eine Zielsequenz für eine Endoribonuklease, die durch den α -Komplex abgeschirmt wird (Wang & Kiledjian, 2000a). Demnach werden über das CRE und den α -Komplex zwei getrennte mRNA-Degradationswege reguliert: Die mRNA-Degradation nach Entfernung des Poly(A)-Schwanzes und die endonukleolytische Spaltung nach Entfernen des α -Komplexes (Wang & Kiledjian, 2000b). Da für die Tyrosin-Hydroxylase- und Kollagen $\alpha 1(I)$ -mRNA die Existenz des α -Komplexes ebenfalls nachgewiesen wurde (Paulding & Czyzyk-Krzeska, 1999; Stefanovic et al., 1997), vermutet man die gleiche CRE-abhängige Regulation der mRNA-Stabilität, wie sie für die α -Globin mRNA beschrieben wurde.

3.2.2 Iron-responsive element (IRE)

Neben der primären mRNA-Sequenz spielen auch Sekundärstrukturelemente, wie z.B. Haarnadelschleifen (*stem loop structures*) eine Rolle bei der Wechselwirkung mit Proteinen. Ein Beispiel hierfür ist das *iron-responsive element* (IRE) solcher mRNAs, die für Proteine kodieren, die am zellulären Eisenstoffwechsel beteiligt sind. In der 3'UTR der Transferrin-Rezeptor (TfR) mRNA werden 5 hochkonservierte, hintereinanderliegende IREs ausgebildet, die bei Eisenmangel von IRE-regulierenden Proteinen (IRP1 und IRP2) gebunden werden. Die auf diese Weise vor dem endonukleolytischen Abbau geschützte TfR-mRNA wird entsprechend länger translatiert, so das genügend Transferrin-Rezeptor exprimiert wird, um Eisen in die Zelle zu schleusen. Im Gegensatz dazu wird die Ferritin-mRNA nicht translatiert, da sich ein IRE innerhalb der 5'UTR befindet und durch die Bindung der IRPs an dieses IRE die Translationsinitiation blockiert wird. Bei Eisenüberschuss in der Zelle ändert sich die Struktur und Affinität der IRPs, so dass sie nicht mehr an die IREs binden können. Infolgedessen wird die TfR-mRNA durch endonukleolytischen Angriff abgebaut und die Blockade der Translation der Ferritin-mRNA aufgehoben. Das synthetisierte Ferritin kann daraufhin die überschüssigen Eisenionen speichern (Rouault & Klausner, 1997; Guhaniyogi & Brewer, 2001).

3.2.3 AU-reiche Elemente (ARE)

Das am häufigsten anzutreffende *cis*-Element in den 3'UTRs von Säuger-mRNAs ist das AU-reiche Element (ARE) (Chen & Shyu, 1995). Es vermittelt schnellen mRNA-Abbau und damit besonders kurze Halbwertszeiten transient exprimierter Gene (Fan et al., 1997). Beispiele hierfür sind die Transkriptionsfaktoren *c-fos* und *c-myc*, Lymphokine und Cytokine, wie Interleukin-3 oder TNF (*tumor necrosis factor*) α und Wachstumsfaktoren, wie NGF (*nerve growth factor*) oder VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Brewer, 1991; Chen et al., 1995a; Levy et al., 1996; Tang et al., 1997; Chen et al., 1998; Lai et al., 1999). Die charakteristische Leitsequenz der ARE ist das Pentanukleotid AUUUA (Shaw & Kamen 1986). Die Kopienzahl und Position dieser Sequenz führte zur Einteilung der ARE-tragenden mRNAs in drei Klassen (Chen & Shyu, 1995; Xu et al., 1997):

(I) Klasse 1 AREs (z.B. *c-fos*) enthalten ein bis drei Kopien des AUUUA-Pentamers, welche in einer U-reichen Umgebung eingebettet sind.

(II) Klasse 2 AREs (z.B. TNF α) bestehen aus mehreren Kopien des AUUUA-Pentamers, die sich zu überlappenden UUAUUUA(U/A)(U/A)-Nonameren assoziieren.

(III) Klasse 3 AREs (z.B. *c-jun*) bestehen lediglich aus U-reichen Sequenzen, ohne dass ein AUUUA-Pentamer enthalten ist.

Desweiteren wurde festgestellt, dass die ARE-vermittelte mRNA-Degradation mit der Entfernung des Poly(A)-Schwanzes eingeleitet wird (Wilson & Treisman, 1988; Chen & Shyu, 1995), wobei die drei ARE-Klassen unterschiedliche Deadenylierungskinetiken aufweisen (Chen & Shyu, 1995; Xu et al., 1997; 1998). Klasse I und III AREs zeigen ein biphasisches Abbau-muster: Zunächst erfolgt die synchrone Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes ohne erkennbare mRNA-Degradation. Nach Unterschreiten einer kritischen Poly(A)-Schwanzlänge (20-60 Nucleotide) erfolgt dann der Abbau des mRNA-Körpers. Im Gegensatz dazu vermitteln AREs der Klasse II keinen biphasischen Abbau. Die Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes geschieht asynchron und deadenylierte mRNA-Moleküle werden sofort degradiert (Chen et al., 1995a).

Die Expression vieler kurzlebiger mRNAs mit ARE wird unter bestimmten physiologischen Bedingungen (z.B. Stress durch Hitzeschock oder UV-Licht), bei onkogener Zelltransformation oder in Reaktion auf bestimmte Stimuli (z.B. Phorbolester oder Lymphokine) durch Stabilisierung der mRNA hochreguliert (Jacquier-Sarlin et al., 1995; Hirsch et al., 1995; Blattner et al., 2000; Gallouzi et al., 2000; Rodriguez-Pascual et al., 2000; Tebo et al., 2000). Die Stabilisierung wie auch die schnelle Degradation wird durch unterschiedliche ARE-bindende Proteine (AUBP) vermittelt. Bisher sind eine große Anzahl von AUBPs beschrieben worden (Wilson & Brewer, 1999), darunter u.a. Mitglieder der hnRNP-Genfamilie (Zhang et al., 1993; Hamilton et al., 1993; Myer & Steitz, 1995), AUH (AUBP mit intrinsischer Enoyl-CoA-Hydratase Aktivität) (Nakagawa et al., 1995), Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Nagy & Rigby, 1995), Tristetraprolin (TTP) (Lai et al., 1999), TIAR (*T-cell restricted intracellular antigen-*

related protein) (Gueydan et al., 1999) und Mitglieder der ELAV/Hu-Genfamilie (Ma et al., 1997, Myer et al., 1997). Da letztere zusammen mit den hnRNP-Proteinen für die Regulation der ARE-vermittelten mRNA-Stabilität in dieser Arbeit wichtig sind (Mitchell & Tollervey, 2000; Brennan & Steitz, 2001, Guhaniyogi & Brewer, 2001), werden diese beiden Gen-Familien im Folgenden näher vorgestellt.

3.2.3.1 Die hnRNP-Genfamilie

Die heterogenen nukleären Ribonukleoproteine (hnRNP) binden an wachsende RNA-Transkripte und verpacken die heterogene nukleäre RNA (hnRNA) in sogenannte hnRNP-Partikel. Die Genfamilie umfasst mehr als 30 Proteine mit vielen Isoformen, die durch alternatives Spleißen und posttranslationale Modifikationen entstehen (Krecic & Swanson, 1999). HnRNPs binden an RNA und einzelsträngige DNA und sind an vielen nukleären Prozessen (z.B. Transkription, Spleißen, Telomerstabilisierung) beteiligt (Krecic & Swanson, 1999). Darüberhinaus translozieren einige der hnRNPs vom Kern ins Zytoplasma (z.B. hnRNP-A, -D und -L) (Pinol-Roma & Dreyfuss, 1992) und nehmen Einfluss auf die zytoplasmatische mRNA-Lokalisierung und die Regulation von Translation und mRNA-Stabilität (Shyu & Wilkinson, 2000).

Eines dieser Proteine ist hnRNP-D (auch AU-Bindungsfaktor 1, AUF1), welches in vier durch differentielles Spleißen gebildeten Isoformen (p37, p40, p42 und p45) auftritt. HnRNP-D/AUF1 besitzt hohe Affinität zu AU-reichen *cis*-Elementen (DeMaria et al., 1997) und vermittelt die Destabilisierung von mRNAs mit ARE *in vitro* (Brewer, 1991; DeMaria & Brewer, 1996; Sirenko et al., 1997; Buzby et al., 1999) und *in vivo* (Loflin et al., 1999). AUF1 bindet neben den AREs gleichzeitig an die Proteine PABP, eIF4G, sowie an die Hitzeschockproteine hsp70 und hsc70 (Laroia et al., 1999). Wie Laroia und Mitarbeiter (1999) weiter herausfanden, ist der AUF1-vermittelte mRNA-Abbau mit der Dissoziation von eIF4G, der Ubiquitinierung von AUF1 und der anschließenden Degradation durch das Proteosom verbunden.

AUF1 ist auch Bestandteil des α -Komplexes, welcher mit dem CRE der α -Globin mRNA interagiert (I.3.2.1; Kiledjian et al., 1997). HnRNP-D/AUF1 scheint daher generell an der Stabilitätskontrolle von eukaryontischen mRNAs mitzuwirken.

3.2.3.2 Die ELAV/Hu-Genfamilie

Mitglieder der ELAV/Hu-Genfamilie wurden als Regulatoren der Genexpression auf posttranskriptioneller Ebene in den letzten Jahre intensiv analysiert. Ursprünglich entdeckt als Antigene einer humanen Autoimmunkrankheit (paraneoplastische Encephalomyelitis oder Hu-Syndrom) (Dalmau et al., 1992; Darnell, 1996), stellen sie eine Klasse von RNA-bindenden Proteinen dar, die zwischen Vertebraten hochkonserviert ist (Good, 1995) und große Ähnlich-

keit zum ELAV (*embryonic lethal, abnormal vision*)-Genprodukt aus *Drosophila* aufweist (Szabo et al., 1991). Da ELAV in *Drosophila* für die Entwicklung und Aufrechterhaltung des Nervensystems essentiell ist, indem es an der posttranskriptionellen Regulation neuronaler Gene beteiligt ist (Campos et al., 1985; Robinow & White, 1988), wurde für die Hu-Proteine in Vertebraten eine ähnliche Funktion erwartet (Good, 1997). Insgesamt konnten vier verschiedene ELAV/Hu-Gene kloniert werden, die für Proteine mit Molekülmassen zwischen 36 kDa und 42 kDa kodieren (Good, 1997). Während HuC (auch ElrC, *elav-like ribonucleoprotein C*) und HuD (ElrD) ausschließlich in neuronalen Zellen exprimiert werden und HuB (ElrB, Hel-N1 im Menschen) zusätzlich in der Keimbahn, wird HuR (HuA, ElrA) ubiquitär exprimiert (Szabo et al., 1991; Abe et al., 1994; Good, 1995; Okano & Darnell, 1997; Wakamatsu & Weston, 1997). Alle Hu-Proteine und auch das ELAV-Protein aus *Drosophila* besitzen den gleichen Aufbau (Abb. 3). Sie enthalten drei RNA-Erkennungsmotive (RRM, *RNA recognition motif*) vom RNP2/RNP1 Typ (Kenan et al., 1991), von denen zwei RRM im Tandem angeordnet und vom dritten RRM durch 80 vornehmlich basische Aminosäuren getrennt sind. Diese sogenannte Scharnier (*hinge* oder *linker*)-Region enthält Bindungsstellen für Interaktionspartner der Hu-Proteine (Brennan et al., 2000) und spezifische Sequenzen, die für die intrazelluläre Translokation der Hu-Proteine verantwortlich sind (Fan & Steitz, 1998b; Kasashima et al., 1999).

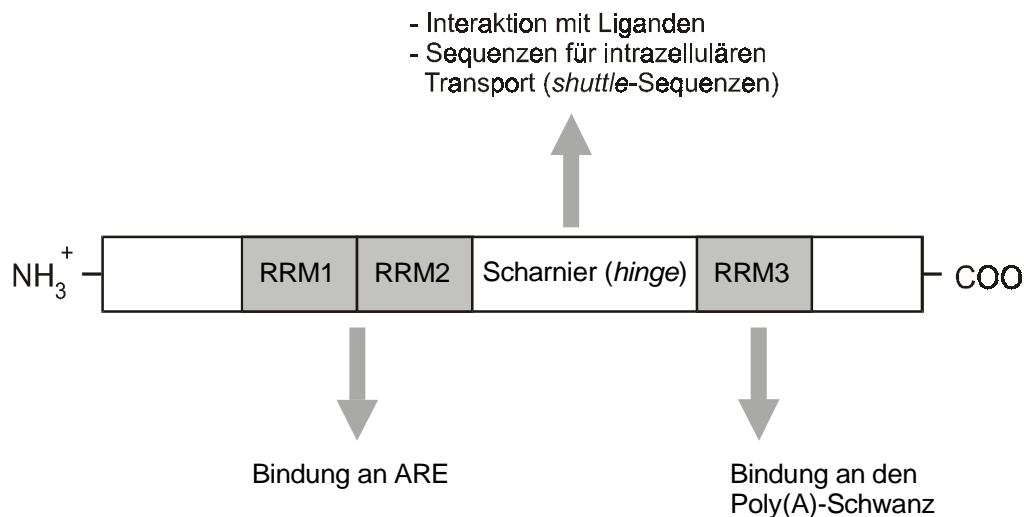


Abb. 3: Schematische Darstellung der ELAV/Hu-Proteine

Die große Homologie der vier ELAV/Hu-Proteine beruht auf der Sequenzidentität ihrer drei RNA-Erkennungsmotive (RRM1-3), die ca. 75% des Proteins ausmachen. Sequenzunterschiede treten vornehmlich am N-Terminus und in der *hinge*-Region auf. Diese besteht aus etwa 80 meist basischen Aminosäuren und enthält Bindungsstellen für Hu-Liganden und Sequenzen, die die intrazelluläre Lokalisierung der Hu-Proteine bestimmen. Während RRM1 und RRM2 für die Wechselwirkung mit ARE verantwortlich sind, bindet RRM3 an den Poly(A)-Schwanz.

ELAV/Hu-Proteine besitzen eine hohe Affinität zu ARE-tragenden mRNAs, die für Proteine kodieren, die Zellwachstum und Differenzierung kontrollieren (Chung et al., 1996; Chagnovich & Cohn, 1996; Ma et al., 1996; Chung et al., 1997; Myer et al., 1997; Levy et al., 1998; Joseph et al., 1998; Ford et al., 1999; Aranda-Abreu et al., 1999; Maurer et al., 1999; King, 2000; Rodriguez-Pascual, 2000; Wang et al., 2000a; 2000b; Dean et al., 2001; Dixon et al., 2001; Nabors et al., 2001). Diese Bindung wird durch die ersten beiden RNA-Erkennungsdomänen RRM1 und RRM2 vermittelt, während RRM3 mit dem Poly(A)-Schwanz der mRNA interagiert (Chung et al., 1996; Ma et al., 1997). Wie in Transfektionsstudien demonstriert werden konnte, führt die ARE-Bindung der ELAV/Hu-Proteine zur Stabilisierung der mRNA (Peng et al., 1998; Fan & Steitz, 1998a; Levy et al., 1998; Rodriguez-Pascual, 2000; Wang et al., 2000b; Anderson et al., 2000; Dean et al., 2001; Dixon et al., 2001; Manohar et al., 2002). Dieser *in vivo*-Effekt bezüglich der ARE-vermittelten mRNA-Stabilität konnte bisher für kein anderes AUBP beschrieben werden. Die neuronenspezifischen ELAV/Hu-Proteine Hel-N1, HuC und HuD sind entscheidend an der neuronalen Differenzierung beteiligt, indem sie die mRNAs von Genen stabilisieren, die für die Neuralentwicklung essentiell sind. Beispiele hierfür sind die GAP-43- (Anderson et al., 2000), tau- (Aranda-Abreu et al., 1999) und Neurofilament M-mRNA (Antic et al., 1999).

4 Stabilität der MARCKS-mRNA in Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Zellen

Im Gegensatz zu Swiss 3T3-Zellen (I.2.2) wird MARCKS in der neuronalen Embryokarzinomzelllinie PCC7-Mz1, einem *in vitro*-Modellsystem der Neurogenese, konstitutiv exprimiert. Weder nach PKC-Aktivierung noch nach Retinsäure-Induktion zur Differenzierung der Stammzellen in Neurone, Fibroblasten und Astrogliazellen (Lang et al., 1989; Herget et al., 1998), trat eine Abnahme der MARCKS-mRNA oder des -Proteins auf (Schäfer, 1997; Herget, 1997; Oehrlein-Karpi, 1998; Rössler, 1999). Auch bei hippocampalen Neuronen des fetalen Rattenhirns konnte keine verringerte MARCKS-Expression nach PKC-Aktivierung beobachtet werden (Schäfer, 1997). Demnach erfolgt in neuronalen Zellen die Regulation der MARCKS-Expression nicht in Abhängigkeit des Zellzyklus und damit anders als in Fibroblasten.

In Kenntnis der zentralen Rolle, die die 3' nichttranslatierte Region bei der Regulation der mRNA-Stabilität spielt (Jackson, 1993; Ross, 1995; Beelman & Parker, 1995; Decker & Parker, 1995; Grzybowska et al., 2001), konzentrierte sich die Suche nach den unterschiedlichen Mechanismen zur Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Zellen auf diesen mRNA-Bereich. Die Klonierung der MARCKS 3'UTR-cDNA aus einer PCC7-Mz1-Genbank ergab völlige Übereinstimmung zur MARCKS 3'UTR-Sequenz aus Swiss 3T3-Zellen (Brooks et al., 1991) oder Mausmakrophagen (Seykora et al., 1991). Demnach war die unter-

schiedliche Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität nicht auf unterschiedliche *cis*-Elemente zurückzuführen, sondern auf zelltypspezifische *trans*-Faktoren (Schäfer, 1997). Um dies nachzuweisen, wurden RNase/EMSA-Analysen (*electromobility shift assays*) mit radioaktiv transkribierter MARCKS 3'UTR und Swiss 3T3- bzw. PCC7-Mz1-Extrakten durchgeführt. Dabei ergab die Inkubation mit Swiss 3T3-Extrakten die Detektion von zwei RNA/Protein-Komplexen, während mit PCC7-Mz1-Extrakten drei Komplexe nachgewiesen wurden (Schäfer, 1997). Für die unterschiedliche Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in den beiden Zelltypen scheinen also tatsächlich unterschiedliche *trans*-Faktoren verantwortlich zu sein. Mit Hilfe von MARCKS 3'UTR-Deletionsklonen und der RNase/EMSA-Technik wurden die für die Proteinbindung verantwortlichen Sequenzabschnitte der MARCKS 3'UTR näher eingegrenzt (Komplex 1 zwischen 1773 und 2243 bp, Komplex 2 zwischen 1610 und 1773 bp, Komplex 3 zwischen 1480 und 1610 bp; Sequenzposition nach Seykora et al., 1991).

Die Verwendung von Extrakten aus Zellzyklus-arretierten und mit Phorbol ester-behandelten Swiss 3T3-Zellen ergab in der RNase/EMSA-Analyse identische Schutzkomplexe (Schäfer, 1997). Dies bedeutet, dass die Aktivierung der Proteinkinase C auf die Formierung der RNA/Protein-Komplexe keinen Einfluss zu haben scheint. Demzufolge könnte die Destabilisierung der MARCKS-mRNA nicht durch eine PKC-abhängige Änderung der Proteinbindung an die MARCKS 3'UTR ausgelöst werden, sondern durch Modifizierung (z.B. Phosphorylierung) der an die RNA gebundenen Proteine (Schäfer, 1997).

Eine Beteiligung der 3'UTR an der Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität wurde auch in Transfektionsstudien an Fibroblasten untersucht (Rössler, 1999). Die cDNAs der MARCKS 3'UTR und zweier Deletionsklone wurde hinter ein Luciferasegen kloniert und die chimären Luciferase-MARCKS-3'UTR-Konstrukte stabil in Swiss 3T3-Zellen transfiziert. Als Kontrolle diente der Luciferase-Vektor ohne MARCKS-Anteile. Die Fusion mit der MARCKS 3'UTR führte zu einer konstitutiven Destabilisierung der ansonsten stabilen Luciferase-mRNA. War der Sequenzbereich deletiert, der für die Ausbildung der beiden RNA/Protein-Komplexe verantwortlich ist, wurden signifikant höhere Luciferaseaktivitäten gemessen, als bei Anwesenheit dieses mRNA-Bereichs (Rössler, 1999). Wie Northern Blot Analysen zeigten, ließ sich die Abnahme der Luciferaseaktivität auf eine reduzierte mRNA-Menge zurückführen. Eine verminderte Transkription des chimären Luciferase-MARCKS-Gens im Vergleich zum Luciferasegen konnte durch *Nuclear Run On*-Experimente ausgeschlossen werden (Rössler, 1999).

5 Aufgabenstellung

Zur Aufklärung der molekularen Mechanismen, durch die Mitglieder der Proteinkinase C (PKC)-Genfamilie an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind, ist die Charakterisierung der physiologischen Substrate der PKC hilfreich. Ein Hauptsubstrat der PKC in vielen Zellen ist das MARCKS-Protein (Aderem, 1992; 1995; Blackshear, 1993; Ramsden, 2000), dem eine Funktion als Wachstumssuppressor zugeschrieben wird (Brooks et al., 1996). Die MARCKS-Expression wird in Swiss 3T3-Fibroblasten in Abhängigkeit des Zellzyklus auf Ebene der mRNA-Stabilität reguliert (Brooks et al., 1991; 1992; Harget et al., 1993). Die MARCKS-Expression von Zellen, die in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert sind, wird bei Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Degradation von MARCKS-mRNA und -Protein herunterreguliert. Dies lässt sich durch Aktivierung der PKC induzieren. Eine vergleichbare Regulation der MARCKS-Expression kann in neuronalen PCC7-Mz1-Zellen nicht beobachtet werden. Nach PKC-Aktivierung bleibt die MARCKS-Expression unverändert. Demnach sind die Mechanismen zur Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität zelltypspezifisch. Die vorliegende Arbeit sollte zur Aufklärung dieser Mechanismen beitragen.

Die mRNA-Stabilität in Eukaryonten wird durch die Interaktion spezifischer Sequenzabschnitte innerhalb der mRNA (*cis*-Elemente) und daran bindender Proteine (*trans*-Faktoren) reguliert. Dies führt zur Stabilisierung der mRNA oder zu ihrer Degradation (Ross, 1995; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Um die unterschiedliche Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Zellen aufzuklären, ist es deshalb wichtig, die beteiligten *cis*-Elemente und *trans*-Faktoren zu kennen.

Cis-Elemente sind häufig innerhalb der 3'UTR der mRNA lokalisiert (Jackson, 1993; Decker & Parker, 1995; Grzybowska et al., 2001) und auch die MARCKS 3'UTR enthält Protein-Bindungsstellen (Schäfer, 1997). Im ersten Teil dieser Arbeit sollten deshalb die *cis*-Elemente der MARCKS 3'UTR identifiziert und charakterisiert werden. Dies sollte mit der RNase/EMSA-Technik erfolgen. Durch Verwendung verkürzter MARCKS 3'UTR-RNA (Deletionsklon-RNA) sollten etwaige Proteinbindungsstellen genau eingegrenzt und durch Wettbewerbsstudien überprüft werden. Auf diese Weise identifizierte Sequenzen sollten kloniert und ihre Funktion als *cis*-Element in RNase/EMSA-Analysen charakterisiert werden. Durch die Verwendung von DNA-Oligonukleotiden sollte sich klären lassen, ob die RNA-bindenden Swiss 3T3-Proteine die identifizierten *cis*-Elemente auch als DNA erkennen.

Zur Charakterisierung der RNA-bindenden Proteine sollten im zweiten Teil der Arbeit UV-cross-link-Assays und Northwestern-Analysen durchgeführt werden. Dabei sollte vor allem die Spezifität zur RNA-Sequenz sowie die subzelluläre Verteilung der RNA-bindenden Proteine überprüft werden. Durch Verwendung polyadenylierter Transkripte sollte eine mögliche Funktion des

Poly(A)-Schwanzes bei der Wechselwirkung zwischen *cis*-Element und Proteinen untersucht werden.

Zu den wichtigsten Regulatorproteinen der mRNA-Stabilität in Säugerzellen gehören die Mitglieder der ELAV/Hu-Genfamilie (I.3.2.3.2; Mitchell & Tollervy, 2000; Brennan & Steitz, 2001; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Da diese Proteine die mRNAs von Genen stabilisieren, die Zellwachstum und Differenzierung steuern (Antic & Keene, 1997; Brennan & Steitz, 2001; Atasoy et al., 1998), und MARCKS eine Funktion als Wachstumssuppressor zugeschrieben wird (Brooks et al., 1991; 1992), sollte eine mögliche Bindung dieser Proteine an die MARCKS 3'UTR-*cis*-Elemente untersucht werden. Dazu sollten das ubiquitär exprimierte HuR und das neuronenspezifische HuD als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und in Bindungsstudien mit der MARCKS 3'UTR bzw. den im ersten Teil der Arbeit identifizierten *cis*-Elementen eingesetzt werden. Um die Expression der ELAV/Hu-Proteine in Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Zellen untersuchen zu können, sollte ein polyklonales Antiserum hergestellt und affinitätsgereinigt werden. Dieses Antiserum sollte auch in Supershiftanalysen verwendet werden.

Im dritten Teil der Arbeit sollte untersucht werden, ob ELAV/Hu-Proteine bei der Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in Fibroblasten eine Rolle spielen. Zunächst sollte versucht werden, einen *in vitro*-Degradationsassay zu etablieren, mit dessen Hilfe der MARCKS-mRNA-Abbau in einem zellfreien System nachgestellt werden könnte. Durch Überexpression der ELAV/Hu-Proteine in Fibroblastenzelllinien sollte ihre Beteiligung an der Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität zellulär überprüft werden. Dazu sollte das Tetracyclin-induzierbare Expressionssystem der Firma Clontech (Tetoff) verwendet werden, da bei diesem System die Expression eines Transgens über die Menge an Tetracyclin (Doxycyclin) im Kulturmedium gesteuert werden kann (Gossen & Bujard, 1992). Der Effekt von transient überexprimiertem HuR und HuD in Swiss 3T3-Zellen auf die PKC-induzierte MARCKS-mRNA-Destabilisierung sollte durch Northern Blot Analysen untersucht werden. Da die Tetracyclin-regulierbare Genexpression nur mit stabilen Transfektanten möglich ist, sollte HuD in murinen embryonalen Fibroblastenzellen (MEF/3T3-Tetoff[®]) stabil überexprimiert werden und die HuD-Expression der etablierten Zellklone mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum im Western Blot nachgewiesen werden. Durch Northern- und Western Blot Analysen sollten die Auswirkungen der HuD-Überexpression auf die wachstumsabhängige Expression der MARCKS-mRNA und des -Proteins untersucht werden.

II. Material und Methoden

1 Material

1.1 Geräte

Bezeichnung		Bezugsquelle
Brutschrank:	<ul style="list-style-type: none"> • Stericult • Zellkultur 	Labotech/Göttingen Heraeus/Hanau
Elektrophoresekammer für Agarosegele:		Werkstatt des Instituts für Physiologische Chemie und Pathobiochemie/Mainz
Elektrophoresekammer für PAGE mit Gelküvetten:	<ul style="list-style-type: none"> • Minigele • Hoefer SE 600 	Phase/Mölln Amersham-Pharmacia/Freiburg
ELISA-Messgerät:	<ul style="list-style-type: none"> • Immunoreader NJ-200 	Teknunc/Roskilde/Dänemark
Gefrierschrank:	<ul style="list-style-type: none"> • -86°C Freezer, Model 917 	Forma Scientific/USA
Gelfotografie:	<ul style="list-style-type: none"> • UVT-28MP Transluminator • E.A.S.Y. 429K Kamera • ICU-1 Steuerungseinheit • UP-890 CE Video Graphic Printer • Moncor B+W Video Monitor 	Herolab/Wiesloch Herolab/Wiesloch Herolab/Wiesloch (Sony) Herolab/Wiesloch Inter-Mercado/Bremen
Geltrocknung:	<ul style="list-style-type: none"> • Slab Gel Dryer SE 1160 • Drehscheibenvakuumpumpe RC5 • Kühlfalle Model RF100 	Backhofer/Reutlingen Vacuubrand/Wertheim Savant/USA
Heizbad:	<ul style="list-style-type: none"> • IKA Heizbad HBR-250 	Jahnke & Kunkel/Staufen
Heizblöcke:	<ul style="list-style-type: none"> • Thermostat 5320 • Thermomixer 5436 • Block Heater 	Eppendorf/Hamburg Eppendorf/Hamburg Stuart Scientific/Darmstadt
Hybridisierungsöfen:	<ul style="list-style-type: none"> • PersonalHyb • 400 HY-E 	Stratagene/Amsterdam/Niederlande Backhofer/Reutlingen
Inkubationsschüttler:	<ul style="list-style-type: none"> • klein • groß 	Infors AG/Bottmingen/Schweiz Buchner-Laborservice/München
Mikroskop:	<ul style="list-style-type: none"> • Invertmikroskop D 	Zeiss/Oberkochen
Phosphorimager:	<ul style="list-style-type: none"> • GS-250 Molecular Imager • GS-250 Sample Loading Dock • GS-505 Screen Eraser • Computer 	BioRad/München BioRad/München BioRad/München BioRad/München
Photometer:	<ul style="list-style-type: none"> • BioPhotometer • Thermodrucker DPU 414 • Ultrospec 1000E 	Eppendorf/Hamburg Eppendorf/Hamburg Amersham-Pharmacia/Freiburg

Radioaktivitätsmessgerät:	• Liquid-Scintillations-Analyzer Tri-Carb 1600 CA	Packard/Frankfurt
Semi-Dry-Blot-Apparatur:		Phase/Mölln
Sonifizierstab:	• Sonoplus HD60, 60 Watt	Bandelin/Berlin
Spannungsquelle:	• Power Pack 35/60 • E443	Phase/Mölln Biotech-Fischer/Reiskirchen
Sterilbank:	• Laminar-Fallstrom Bank	Nunc/Wiesbaden
Thermocycler:	• Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer/USA
UV-Crosslinker:	• UV Stratalinker 1800	Stratagene/Amsterdam/Niederlande
Verwirbler (Vortex):	• VF2 • -	Jahnke & Kunkel/Staufen Duco instrumenten/ Niederlande
Laborwaagen:	• Precisa Junior PJ 2000C • PJ 300	PAG Oerlikon/Schweiz Mettler/Giessen
Zählkammer:	• Neubauer	Assistent/Sodenheim
Zentrifugen:	• Kühlzentrifuge RC-5 Superspeed • Megafuge 1.0 R • Tischzentrifuge Labofuge GL • Tischzentrifuge Sepatech Biofuge A • Tischzentrifuge 5412 • Tischzentrifuge 5417R • Tischzentrifuge 5417C	Sorvall/Bad Nauheim Heraeus/Hanau Heraeus/Hanau Heraeus/Hanau Eppendorf/Hamburg Eppendorf/Hamburg Eppendorf/Hamburg

Sterile Kunststoffmaterialien und Reaktionsgefäße für Labor und Zellkultur wurden von den Firmen Costar/Bodenheim, Greiner/Frickenhausen, Falcon/Heidelberg sowie Nunc/Wiesbaden bezogen.

1.2 Chemikalien und Reagenzien

1.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

Bezeichnung	Bezugsquelle
Agar	Sigma/Steinheim
Agarose	Sigma/Steinheim
Ampicillin	Sigma/Steinheim
Borsäure	Sigma/Steinheim
Bromphenolblau	Serva/Heidelberg
Caseinhydrolysat (Pepton 140)	Life Technologies/Karlsruhe
Chromatographiepapier 3MM	Whatman/England

Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma/Steinheim
dNTP	Amersham-Pharmacia/Freiburg
DNA-Größenmarker (1-kb ladder mix)	MBI-Fermentas/St. Leon-Roth
DNase I (RNase frei)	Roche Biochemicals/Mannheim
5'-End Labelling Kit (Ready to use)	Amersham-Pharmacia/Freiburg
Ethylendiamin-N,N,N',N',-tetraessigsäure (EDTA)	Merck/Darmstadt
Ethidiumbromid	Roche Biochemicals/Mannheim
Ficoll 400	Amersham-Pharmacia/Freiburg
Formaldehyd	Merck/Darmstadt
Formamid	Merck/Darmstadt
Fotochemikalien, Entwickler: Kodak LX24 Fixierer: Kodak AL4	Röntgen-Bender/Baden-Baden Röntgen-Bender/Baden-Baden
Gelfiltrationsmaterial Sephadex G75	Amersham-Pharmacia/Freiburg
Hefeextrakt	Life-Technologies/Karlsruhe
Heringssperma-DNA	Merck/Darmstadt
Membranen: Nitrocellulose, Poren- \varnothing 0,44 μ m PVDF Immobilon P Hybond [®] -N	BioRad/München Millipore/Eschborn Amersham-Pharmacia/Freiburg
Morpholinopropansulfonsäure (MOPS)	Roth/Karlsruhe
NTP	Amersham-Pharmacia/Freiburg
Nucleobond [®] AX 500 (Maxipräp) - Kit	Machery-Nagel/Düren
Qiaex [®] II Agarose Gel Extract - Kit	Qiagen/Hilden
Qiaquick [®] Agarose Gel Extract- Kit	Qiagen/Hilden
Qiaquick [®] PCR Purification - Kit	Qiagen/Hilden
RNeasy [®] Total RNA Mini - Kit	Qiagen/Hilden
RNase A	Roche Biochemicals/Mannheim
RNase Inhibitor (RNasin)	MBI-Fermentas/St. Leon-Roth
RNase T1	Roche Biochemicals/Mannheim
Röntgenfilme: Fuji Medical X-Ray RX Kodak X-OMAT AR	Röntgen-Bender/Baden-Baden Röntgen-Bender/Baden-Baden
Thermopapier K65HM für ELISA-Messgerät	Mitsubishi/Japan
Tris-hydroxymethyl-aminomethan	Sigma/Steinheim
tRNA aus Hefe	Roche Biochemicals/Mannheim
T3 RNA Polymerase	Roche Biochemicals/Mannheim
T7 RNA Polymerase	Roche Biochemicals/Mannheim Promega/Mannheim
Xylencyanol	Serva/Heidelberg

Restriktionsendonukleasen, sowie nicht namentlich aufgeführte DNA modifizierende Enzyme und ihre entsprechenden Puffer wurden von den Firmen Roche Biochemicals/Mannheim, Amersham-Pharmacia/Freiburg, Life-Technologies/Karlsruhe und MBI-Fermentas/St. Leon-Roth bezogen.

1.2.2 Proteinbiochemische Arbeiten

Bezeichnung	Bezugsquelle
Aurintricarbonsäure (ATA)	Sigma/Steinheim
Acrylamidlösung für SDS-Gele (30% Acrylamid, 0,8% Bis-acrylamid; 38:1)	Roth/Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma/Steinheim
Aprotinin	Sigma/Steinheim
BCA-Proteinkonzentrationsbestimmungs-Kit	Pierce/Bonn
Benzamidin	Sigma/Steinheim
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma/Steinheim MBI-Fermentas/St. Leon-Roth
Coomassie Brilliant Blau R250	Merck/Darmstadt
Dithiothreitol (DTT)	Sigma/Steinheim
Glucose	Roth/Karlsruhe
Glutathion	Sigma/Steinheim
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham-Pharmacia/Freiburg
β -Glycerophosphat	Sigma/Steinheim
HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-ethylsulfonsäure)	Sigma/Steinheim
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Applichem/Darmstadt
N-Lauroylsarcosin	Fluka/Neu-Ulm
Leupeptin	Sigma/Steinheim
Magermilchpulver	Nestlé/Frankfurt
β -Mercaptoethanol	Sigma/Steinheim
Natriumorthovanadat	Sigma/Steinheim
Ni ²⁺ -NTA (Nitril-Triessigsäure)-Agarose	Qiagen/Hilden
Nonidet P-40 (NP-40)	Sigma/Steinheim
Okadainsäure	Life-Technologies/Karlsruhe
Phenylmethylsulfonsäurefluorid (PMSF)	Sigma/Steinheim
Proteinmolekulargewichts-Standards:	
• LMW (<i>low molecular weight</i>) SDS-PAGE Standard	BioRad/München
• <i>Prestained Low Range</i> SDS-PAGE Standard	BioRad/München
• <i>See blue</i> [®] <i>prestained</i> Protein-Standard (<i>low range</i>)	Life-Technologies/Karlsruhe

SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck/Darmstadt
TEMED (N,N,N',N'-Tetraethyl-methylen-diamin)	Sigma/Steinheim
Triton X-100	Merck/Darmstadt
Tween 20	Sigma/Steinheim

1.2.3 Zellbiologische Arbeiten

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck/Darmstadt
Doxycyclin (Na ⁺ -Salz)	Sigma/Steinheim
Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Life-Technologies/Karlsruhe
Geneticin (G418)	Life-Technologies/Karlsruhe
Hygromycin	Life-Technologies/Karlsruhe
Lipofectamin 2000 [®] (Transfektionsreagenz)	Life-Technologies/Karlsruhe
Phorbol-12,13-dibutyrat (PDB)	Sigma/Steinheim
Penicillin (100 U/ml) - Streptomycin (100 µg/ml)	Life-Technologies/Karlsruhe
Serum fötaler Rinder (FBS)	Roche Biochemicals/Mannheim Life Technologies/Karlsruhe
Tet-System geprüftes FBS	Clontech/Heidelberg
Trypanblau-Lösung	Seromed/Berlin
Trypsin	Life-Technologies/Karlsruhe

Alle weiteren, nicht ausdrücklich genannten Substanzen, einschließlich Salzen, Säuren, Basen und organischen Lösungsmitteln besaßen p.A. Qualität und wurden von den Firmen Baker/Niederlande, Fluka/Neu-Ulm, Merck/Darmstadt, Roth/Karlsruhe, Serva/Heidelberg und Sigma/Steinheim bezogen.

1.3 Antiseren und Antikörper

Die in der Tabelle aufgeführten Primär- und Sekundärantikörper (P bzw. S) wurden in Western Blot Analysen unter der angegebenen Verdünnung verwendet. α -CstF64 (mAb 3A7) wurde freundlicherweise von Dr. I. Mattaj (EMBL, Heidelberg) zur Verfügung gestellt.

Antigen	Spezies	Eigenschaft	Verdünnung	Quelle
Hu-Proteine	Kaninchen	polyklonal (P)	1:1000	diese Arbeit
MARCKS	Kaninchen	polyklonal (P)	1:1000	Oehrlein et al., 1998
CstF64 (3A7)	Maus	monoklonal (P)	1:500	I. Mattaj/Heidelberg
Kaninchen	Ziege	POD-gekoppelt (S)	1:2000	Dako/Hamburg
Maus	Kaninchen	POD-gekoppelt (S)	1:2000	Dako/Hamburg

1.4 Radioaktive Materialien

γ -[³²P]-ATP, α -[³²P]-dCTP, α -[³²P]-CTP, α -[³²P]-UTP und α -[³²P]-ATP wurden von den Firmen ICN/Eschwege und Hartmann/Braunschweig bezogen. Die spezifischen Aktivitäten betragen 3000 Ci/mmol, bzw. im Falle von γ -[³²P]-ATP 7000 Ci/mmol (*end labeling grade*).

1.5 Primer und Desoxyribonukleotide

Die direkt zur Klonierung verwendeten MARCKS 52nt-Oligonukleotide wurden von der Firma Roth/Karlsruhe synthetisiert und gereinigt. Oligonukleotide für den Einsatz als Primer in PCR-Reaktionen wurden von der Firma GenTech/Mainz bezogen. Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen dargestellt.

- Klonierungsoligonukleotid MARCKS 52nt

sense:

5' CCC CGG GCC CGA ATT CCT TTC TTT CTT TCT TTC TTT CTT TCT TTC TTT CTT
TCT TTC TTT TTT TTT TTC TCG AGC CCC 3'

antisense:

5' GGG GCT CGA GAA AAA AAA AAA GAA AGA AAG AAA GAA AGA AAG AAA GAA AGA
AAG AAA GAA AGG AAT TCG GGC CCG GGG 3'

- 52nt Element Oligonukleotid:

5' CTT TCT TTC TTT CTT TCT TTC TTT CTT TCT TTC TTT CTT TCT TTT TTT TTT T 3'

- HuD-Primer:

sense:

5' TAG CGG ATC CGA GCC TCA GGT GTC AAA TGG 3'

antisense:

5' AAT GCC CGG GTC AGG ACT TGT GGG CTT TGT 3'

- HuR-Primer:

sense:

5' AAA CGA ATT CGC CCG CCC GCA TCC AGA TTT 3'

antisense:

5' CTC ATC TAG ACA AAG ACA AAC ACT TGT GAA 3'

1.6 Vektoren

1.6.1 pBluescript KS II[®]

(Stratagene/Amsterdam/Niederlande)

Dieser Phagemidvektor (pBS) stellt einen etablierten Klonierungs- und Sequenziervektor dar und besitzt ein Ampicillinresistenzgen. Der Polylinker mit den Erkennungssequenzen für Restriktionsenzyme wird von Promotoren für T3 und T7 RNA Polymerasen flankiert. Der pBluescript KS II wurde deshalb für Klonierungen und *in vitro* Transkriptionen verwendet.

1.6.2 pBS-MARCKS 3'UTR Deletionsklone (pBS-DC1 bis pBS-DC10)

(Schäfer, 1997)

Die cDNA der MARCKS 3'UTR war über *EcoRI* und *HindIII* in pBS einkloniert (pBS-DC1). Anschließend waren mittels exonukleolytischem Verdau vom 3'-Ende 9 Deletionsklone mit unterschiedlich langen MARCKS 3'UTR Fragmenten erstellt worden (pBS-DC2 bis pBS-DC10; Tab. 1). Die 10 Vektoren dienten als template-DNA bei *in vitro* Transkriptionen.

pBS -	DC1	DC2	DC3	DC4	DC5	DC6	DC7	DC8	DC9	DC10
5'-Ende:	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310	1310
3'-Ende:	2597	2407	2243	1950	1773	1672	1610	1582	1480	1385
Insert-Größe:	1287	1097	933	640	463	362	300	272	170	75

Tab. 1: pBS-MARCKS 3'UTR-Deletionsklone

Die Größe des MARCKS 3'UTR Inserts sowie die 5'- und 3'-Positionen bezüglich der MARCKS-Sequenz nach Seykora et al. (1991) sind in bp angegeben.

1.6.3 pCR-Script-poly(A)

Dieser Vektor, dem pBluescript sehr ähnlich, enthält eine Polyadenylsäuresequenz von 56 bp Länge, die über *Xba*I und *Sac*I einkloniert wurde. Er wurde freundlicherweise von PD Dr. H. Kleinert (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt und erlaubte die Herstellung polyadenylierter Transkripte eines einklonierten DNA-Fragments.

1.6.4 pGex-2T

(Amersham-Pharmacia/Freiburg)

Der bakterielle Expressionsvektor pGex2T enthält die cDNA der bakteriellen Glutathion-S-Transferase (GST) unter Kontrolle des *tac*-Promotors in Verbindung mit dem *lac*-Operon und dient nach IPTG-Induktion zur Expression von rekombinanten GST-Fusionsproteinen. Diese können mit Hilfe der Glutathion-Sepharose unter nativen Bedingungen aus dem Bakterienlysate isoliert werden. Die humane HuD cDNA wurde über *Bam*HI und *Sma*I in den pGex-2T Vektor einkloniert, um GST-HuD-Fusionsproteine herzustellen (II.2.2.2.1).

1.6.5 pQE30

(Qiagen/Hilden)

Der bakterielle Expressionsvektor pQE30 kodiert stromabwärts des T5-Promotors in Verbindung mit dem *lac*-Operon für 6 Histidin-Aminosäuren und dient nach IPTG-Induktion zur Expression von rekombinanten Proteinen mit Histidin₆-Markierung, die unter nativen Bedingungen mit Hilfe der Ni²⁺-NTA-Agarose aus dem Bakterienlysate isoliert werden können. Wie bei pGex-2T wurde die humane HuD cDNA über *Bam*HI und *Sma*I in pQE30 einkloniert und das resultierende Plasmid zur Herstellung von Histidin-markiertem HuD verwendet (II.2.2.2.2).

1.6.6 pGex-HuR

Der Vektor pGex-HuR diente zur Expression von rekombinantem GST-HuR. Er wurde freundlicherweise von PD Dr. H. Kleinert (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

1.6.7 λUniZAP-265114

Der Phagen-Vektor λUniZAP (Stratagene/Amsterdam/Niederlande) wird zur Erzeugung von cDNA Banken verwendet. Klon 265114 einer humanen cDNA Bank, die in λUniZAP einkloniert ist, kodiert für die kodogene Sequenz und die 3'UTR des HuD-Proteins. Das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. M. Kock (BASF, Ludwigshafen) zur Verfügung gestellt und diente als Ausgangsmaterial zur Amplifizierung der HuD cDNA mittels PCR.

1.6.8 p809.1

(Brooks et al., 1991)

Aus einer Swiss 3T3 cDNA Bibliothek wurde ein Klon isoliert, der Sequenzen der 5'UTR und die gesamte kodierende Region der MARCKS cDNA (bp 1–1233) enthielt. Das Insert war in den pBluescript-Vektor via *EcoRI* einkloniert. Dieses *EcoRI*-Insert wurde als Sonde für Northern Blot Analysen verwendet.

1.6.9 pZeoSV2(-)-HuR sense

In den eukaryontischen Expressionsvektor pZeoSV2(-) (Ecogen/Karlsruhe) war ein 1,6 kb großes *Apal* Fragment der HuR cDNA, welches die vollständige proteinkodierende Region enthält, einkloniert. Der Vektor wurde von Dr. A. Levy (Haifa, Israel) dankenswerterweise zur Verfügung gestellt und diente als Ausgangsmaterial zur Amplifizierung der HuR cDNA mittels PCR.

1.6.10 pTetoff (pUHD 15-1Neo)

(Clontech/Heidelberg) (Gossen & Bujard, 1992)

Der eukaryontische Expressionsvektor pTetoff kodiert für das Tet-Repressor-VP16 Fusionsprotein (Tetracyclin regulierter Transaktivator, tTA), welches die Transkription von Genen induziert, die unter der Kontrolle des Tet-Operons stehen (pTRE, II.1.6.11). Diese Induktion steht ihrerseits unter der Kontrolle von Tetracyclin. In Anwesenheit von Tetracyclin im Medium bindet Tetracyclin an tTA und verhindert die Induktion der Transkription des Zielgens, weil der Tetracyclin-tTA-Komplex nicht an das Tet-Operon binden kann (Tetoff). pTetoff verfügt ferner über eine CMV (humaner Cytomegalievirus)-Promotor/Enhancer-Region, ein SV40 (Simian Virus 40) Late Polyadenylierungssignal und Resistenzgene für die Antibiotika Ampicillin und Neomycin bzw. Geneticin/G418. Der Vektor wurde für transiente Transfektionen in Swiss 3T3-Zellen verwendet und wird von MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen bereits stabil exprimiert (II.1.8.2).

1.6.11 pTRE (pUHD 10-3)

(Clontech/Heidelberg) (Gossen & Bujard, 1992)

Der eukaryontische Expressionsvektor pTRE (*tet responsive element*) besitzt neben der Minimalsequenz des CMV-Promotors (P_{CMVmin}) mehrere Kassetten des Tet-Operons, so dass die Transkription eines Gens nur erfolgen kann, wenn der tTA-Transaktivator (tTA auf dem pTetoff Vektor, II.1.6.10) nach Bindung an das Tet-Operon den CMV-Promotor aktiviert. Ferner sind ein SV40 L Polyadenylierungssignal und ein Resistenzgen für Ampicillin vorhanden.

Die cDNA von HuD und HuR wurden in diesen Vektor einkloniert und die resultierenden Vektoren pTRE-HuD und pTRE-HuR in transienten und stabilen Transfektionen eingesetzt.

1.6.12 pTK-Hyg

(Clontech/Heidelberg)

Dieser Vektor besitzt unter der Kontrolle des TK Promotors (Thymidin Kinase des *Herpes Simplex Virus*) das Resistenzgen für das Hygromycinantibiotikum. Er wurde in stabilen Transfektionen zusammen mit pTRE-HuD in MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen transfiziert, da pTRE keinen eukaryontischen Selektionsmarker besitzt.

Die Vektoren pTetoff, pTRE und pTK-Hyg wurden freundlicherweise von PD Dr. H. Kleinert (Universität Mainz) zur Verfügung gestellt.

1.7 Bakterienstämme

Zur Klonierung wurden die entsprechenden Vektoren in die *E. coli* Stämme C600 (Appleyard, 1954; Raleigh et al., 1988) bzw. XL1-Blue (Stratagene/Amsterdam/Niederlande) transformiert. Letzterer wurde auch zur Expression der rekombinanten Fusionsproteine verwendet.

Bakteriengenotypen:

- C600: e14⁻(mcrA), supE44, thi-1, thr-1, leuB6, lacY1, tonA21
- XL1-Blue: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac, [F[']proAB, lacI^qZΔM15, Tn10(Tet^r)]

1.8 Zelllinien

1.8.1 Swiss 3T3

(Todaro & Green, 1963)

Diese nicht-tumorigene Fibroblastenzelllinie aus der Maus (Swiss) bildet in Kultur eine konfluente Einzelzellschicht aus, die aufgrund dichteabhängiger Wachstumsinhibition (Kontaktinhibition) nicht überwachsen wird. Bei Verbrauch der Wachstumsfaktoren im Medium stellen die Zellen das Wachstum ein und werden in der G₀-Phase des Zellzyklus arretiert. Durch Zugabe von frischem Serum in das Medium, sowie Polypeptid-Wachstumsfaktoren, Neuropeptiden oder pharmakologischen Substanzen wie z.B. Phorbol ester (Dicker & Rozengurt, 1978), lassen sich die ruhenden (*quiescent*) Zellen wieder zur Proliferation stimulieren.

1.8.2 MEF/3T3-Tetoff®

(Clontech/Heidelberg)

Bei der MEF/3T3-Zelllinie handelt es sich um nicht-tumorigene murine embryonale Fibroblastenzellen (MEF), die nach Isolation aus der Maus (Swiss) nach der 3T3 Standard-Passagiermethode immortalisiert wurden. Sie weisen die selben Wachstumseigenschaften wie Swiss 3T3-Zellen auf.

Diese Zelllinie wurde vom Hersteller mit dem Konstrukt pTetoff (II.1.6.10) stabil transfiziert (G418 Selektion) und exprimiert den Tetracyclin kontrollierten Transaktivator (tTA) in hoher Rate. Durch eine weitere stabile Transfektion dieser Zellen mit dem Vektor pTRE (II.1.6.11) können Gene induzierbar exprimiert werden, indem durch Zugabe oder Wegnahme von Tetracyclin die Transkription des zu untersuchenden Gens ab- oder angeschaltet wird (Tetoff-System).

1.8.3 PCC7-Mz1

(Pfeiffer et al., 1981)

Bei der Embryokarzinomzelllinie PCC7-Mz1 handelt es sich um einen Azaguanin-resistenten Klon der PCC7-S-Zellen (PCC7-AzaR1, Klon 1009), welche aus einem spontanen testikulären Tumor des rekombinanten Inzuchtmäusestammes 129xC57B1/6J hervorgegangen sind (Fellous et al., 1978; Paulin et al., 1982). PCC7-Mz1-Zellen wachsen als pro-neural determinierte Stammzellen und differenzieren nach Zugabe von *all trans*-Retinsäure (RA) in ein stabiles Muster aus Neuronen, Fibroblasten, Gliazellen und wenigen Endothelzellen (Lang et al., 1989). Dabei stirbt ein definierter Anteil der Stammzellkultur apoptotisch ab (Herget et al., 1998). PCC7-Mz1-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Christina Esdar und Diplom Biologin Sandra Milasta (beide Universität Mainz) kultiviert und zur Verfügung gestellt.

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Herstellung kompetenter Bakterien

(Hanahan, 1983)

Um Bakterien zur Aufnahme von Fremd-DNA zu befähigen, werden sie mit zweiwertigen Kationen (Ca^{2+} , Mn^{2+} , Rb^{2+}) behandelt, wodurch die Bakterienzellwand durchlässig gemacht wird.

- LB-Medium: 10 g/l Caseinhydrolysat, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl; pH 7,4
- TFB I-Puffer: 30 mM Na-Acetat, 50 mM MnCl_2 , 100 mM RbCl_2 , 10 mM CaCl_2 , 15% (v/v) Glycerin; pH 5,8
- TFB II-Puffer: 10 mM MOPS, 75 mM CaCl_2 , 10 mM RbCl_2 , 15% (v/v) Glycerin; pH 7

5 ml LB-Medium wurden mit einer einzelnen Bakterienkolonie *E.coli* C600 bzw. XL-1 Blue angeimpft und ü.N. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Davon wurden 2 ml in 200 ml LB-Medium überimpft (Verdünnung 1:100) und auf dem Schüttler weiterkultiviert bis eine OD_{595} von 0,45 bis 0,55 erreicht wurde ($1 \text{ OD}_{595} \cong 8 \times 10^8$ Bakterien/ml). Die Bakterienkultur wurde auf Eis abgekühlt und auf Zentrifugenröhrchen verteilt bei 4000 rpm in einer vorgekühlten Sorvall-Kühlzentrifuge (SS34-Rotor) bei 4°C für 10 min abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 15 ml eiskaltem TFB I-Puffer unter Vermeidung von Luftblasen resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (SS34-Rotor, 4000 rpm, 4°C, 10 min) wurde das Zellpellet in 4 ml TFB II-Puffer aufgenommen und zu Aliquots à 100 µl in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen schockgefroren (N_2). Die kompetenten Zellchargen wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.1.2 Transformation kompetenter Bakterien

- LB-Amp-Platten: LB-Medium (II.2.1.1) mit 15 g/l Agar (autoklaviert), nach Abkühlen auf ca. 45°C Zugabe von 200 µg/ml Ampicillin
- LB-Amp-IPTG-X-Gal-Platten: LB-Medium mit 15 g/l Agar (autoklaviert), nach Abkühlen auf ca. 45°C Zugabe von 200 µg/ml Ampicillin, 0,001% X-Gal und 0,2 mM IPTG

Kompetente *E.coli* C600- bzw. XL-1 Blue-Bakterien (II.2.1.1) wurden auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende Plasmid-DNA (max. 100 ng) wurde zu 50 µl Bakteriensuspension pipettiert, wenn eine Retransformation etablierter Plasmide vorgenommen wurde, bzw. zu 100 µl Bakterienlösung gegeben, wenn ein Ligationsansatz transformiert werden sollte. Die DNA/Bakterien Gemische wurden für 30 min unter gelegentlichem Aufwirbeln auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitzeschock unterzogen. Dazu wurden die Ansätze für exakt 90 s im 42°C warmen Wasserbad inkubiert und wieder auf Eis abgekühlt. Die Transformationsansätze wurden mit

100 µl (250 µl) LB-Medium versehen und für weitere 30 min bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. In dieser Zeit begannen die Bakterien das Resistenzgen gegen Ampicillin (β -Lactamase) zu exprimieren. Zur Selektion von erfolgreich transformierten Bakterien wurde die gesamte Bakterienlösung auf LB-Amp-Platten bzw. LB-Amp-IPTG-X-Gal Platten (bei Blau/Weiß-Selektion) ausgestrichen und ü.N. bei 37°C inkubiert. Nach ca. 12 Stunden waren einzelne Ampicillin-resistente Kolonien sichtbar. Die Agarplatten wurden mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C bis zu vier Wochen gelagert.

2.1.3 Minipräparation von Plasmid-DNA

(Birnboim & Doly, 1979; Birnboim, 1983)

Das Prinzip der alkalischen Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA beruht auf dem unterschiedlichen Verhalten von chromosomaler DNA und Plasmid-DNA beim Wechsel von alkalischem zu neutralem Milieu. Bei stark basischem pH werden beide DNA-Formen denaturiert, doch bei Neutralisierung fällt die chromosomale DNA als unlösliches Präzipitat aus der Lösung aus, während die weniger komplexe zirkuläre Plasmid-DNA wieder in Lösung geht. Durch Zentrifugation werden die unterschiedlichen Nukleinsäuren voneinander getrennt.

- Lösung I: 50 mM Glucose, 50 mM EDTA, 25 mM Tris (pH 8)
- Lösung II: 1% SDS, 200 mM NaOH
- Lösung III: 3 M Na-Acetat (pH 4,8)
- Lithium-Chlorid-Lösung: 5 M LiCl, 50 mM Tris (pH 7,5)
- Isopropanol, Ethanol (abs.) und 70% Ethanol

Pro Minipräparationsansatz wurden 3 ml LB-Medium, supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin, mit einer transformierten Bakterienkolonie angeimpft und ü.N. bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert. Von diesen ü.N.-Kulturen wurden ~1,5 ml in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und bei 8000 rpm für 30 s zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C). Die Überstände wurden abgenommen und verworfen, und die Bakterienzellen des Pellets in 150 µl Lösung I resuspendiert (sanftes Aufwirbeln). Die alkalische Lyse erfolgte durch Zugabe von 300 µl Lösung II, kurzem Mischen und Inkubation auf Eis für 5 min. Bei Neutralisierung der Lösung durch Zugabe von 230 µl Lösung III fielen Proteine und genomische *E.coli*-DNA aus der Lösung aus. Zur quantitativen Fällung wurden die Lysate für 10 min auf Eis inkubiert und bei 14000 rpm für 10 min in der Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert. Die Überstände (~700 µl) wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Die verbliebene Plasmid-DNA wurde durch Zugabe von 700 µl Isopropanol gefällt und durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 14000 rpm pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurden die Präzipitate kurz an der Luft getrocknet und in 250 µl H₂O gelöst. Um noch vorhandene RNA abzutrennen, wurde den Ansätzen Lithium-Chlorid-Lösung (250 µl) zugesetzt, und die Ansätze nach Inkubation für 10 min auf Eis

bei 14000 rpm für 5 min zentrifugiert. Die verbliebenen Überstände (~500 µl) wurden in frische Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 1 ml Ethanol (abs.) versetzt. Zur Fällung der Plasmid-DNA wurden die Ansätze 2 min bei RT inkubiert und 5 min bei 14000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde durch Zugabe von 1 ml 70%igem Ethanol unter kräftigem Mischen (Vortex) gewaschen und erneut abzentrifugiert (14000 rpm, 3 min). Die Präzipitate wurden an der Luft getrocknet und in 40 µl H₂O gelöst. Die so erhaltene Plasmid-DNA wurde bei 4°C gelagert.

2.1.4 Maxipräparation von Plasmid-DNA

(Macherey-Nagel/Düren)

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu isolieren, wurden Maxipräparationen aus 500 ml Bakterienkulturen durchgeführt. Hierbei schloss sich nach alkalischer Lyse und Neutralisation ein Reinigungsschritt mit Hilfe einer auf Kieselerde (Silica) basierenden Anionen-Austauschersäule an (Nucleobond® AX 500), welche eine maximale Bindekapazität von 500 µg Plasmid-DNA besitzt.

- S1-Puffer: 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase A, 50 mM Tris (pH 8)
- S2-Puffer: 1% SDS, 200 mM NaOH
- S3-Puffer: 2,8 M K-Acetat (pH 5,1)
- N2-Puffer: 900 mM KCl, 15% EtOH, 100 mM Tris; pH 6,3 mit H₃PO₄ eingestellt
- N3-Puffer: 1150 mM KCl, 15% EtOH, 100 mM Tris; pH 6,3 mit H₃PO₄ eingestellt
- N5-Puffer: 1000 mM KCl, 15% EtOH, 100 mM Tris; pH 8,5 mit H₃PO₄ eingestellt
- Isopropanol und 70% Ethanol

Eine 5-ml-Vorkultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) wurde mit einer einzelnen Bakterienkolonie, die mit dem zu isolierenden Plasmid transformiert war, angeimpft und für 8-10 Stunden auf dem Schüttler bei 37°C kultiviert. Mit dieser wurden 500 ml LB-Ampicillin im 1-Liter-Kolben mit Schikanen angeimpft und ü.N. bei 37°C auf dem Schüttler kultiviert. Die Kultur wurde auf zwei Zentrifugenbecher verteilt und mit 5000 rpm bei RT für 10 min in der Sorvall-Kühlzentrifuge (GSA-Rotor) abzentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets in 12 ml 4°C kaltem S1-Puffer auf Eis vorsichtig resuspendiert und vereinigt. Zur Zelllyse und Denaturierung der DNA erfolgte die Zugabe von 12 ml S2 Puffer. Der Ansatz wurde nach sachtem Schwenken für 5 min bei RT inkubiert. Nach Neutralisierung des Ansatzes mit 12 ml S3-Puffer und erneutem Schwenken folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis. Das Bakterienlysate wurde auf 50-ml-Zentrifugenröhrchen verteilt und bei 15000 rpm und 4°C für 20 min (SS34-Rotor) zentrifugiert. Während dieser Zentrifugation wurde die Nucleobond AX 500 Säule vorbereitet, indem sie mit einer Klemme an einem Stativ befestigt und die Säule mit 5 ml N2-Puffer equilibriert wurde. Um die Säule nicht zu verstopfen, wurde der Zentrifugationsüberstand

nicht direkt auf die Säule appliziert. Die unlöslichen Präzipitate wurden durch Filtration mittels Faltenfilter (Schleicher & Schüll) oder zweier Lagen steriler Mullbinde entfernt, und nur das klare Filtrat wurde auf die Säule gegeben. Während das Lysat durch die Säule lief, wurde die Plasmid-DNA von der Säulenmatrix zurückgehalten. Der Durchfluss wurde aufgefangen und erneut auf die Säule pipettiert, wodurch sich die Ausbeute an gereinigter Plasmid-DNA erhöhte. Die Säule wurde mit 2 x 12 ml N3-Puffer gewaschen, bevor zur Elution der DNA 2 x 6 ml N5-Puffer auf die Säule gegeben wurden. Das Eluat wurde in Zentrifugenröhrchen aufgefangen und die Plasmid-DNA mit 0,7-fachem Volumen Isopropanol (8,4 ml) gefällt. Nach kurzer Inkubation bei RT (~5 min) wurden die gefällten Nukleinsäuren abzentrifugiert (SS34-Rotor, 15000 rpm, 4°C, 15 min) und nach Waschung mit 12 ml 4°C kaltem Ethanol (70%) erneut für 10 min zentrifugiert. Die DNA-Pellets wurden an der Luft getrocknet und in 500 µl H₂O gelöst. Die Menge, Integrität und Reinheit der DNA wurde photometrisch ermittelt, sowie durch Elektrophorese eines definierten Aliquots in einem 1%igen Agarosegel abgeschätzt. Die Lagerung der Plasmid-DNA erfolgte bei 4°C.

2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

(Sambrook et al., 1989)

Die aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen von Nukleinsäuren besitzen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bestrahlt man eine wässrige, Nukleinsäure-haltige Probe mit Licht dieser Wellenlänge, so lässt sich aus der resultierenden Extinktion mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die Konzentration berechnen.

$$c[\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times VF \times \varepsilon$$

- c: Konzentration der Nukleinsäure in µg/ml
E₂₆₀: Extinktion bei 260 nm
VF: Verdünnungsfaktor
ε: Konzentration bei einer E₂₆₀ = 1 (DNA: ε ~50 µg/ml; RNA: ε ~40 µg/ml)

In 800 µl H₂O wurden 3, 5 oder 8 µl der DNA- bzw. RNA-Präparationen pipettiert und die Extinktion bei 260 nm im Ultrospec 1000E Photometer gemessen (Referenzwert: steriles H₂O). Zur Messung von sehr geringen Konzentrationen, die nicht verdünnt werden konnten und von denen nur geringe Mengen vorhanden waren, wurde der Biophotometer (Eppendorf) verwendet, der mit sterilen Messküvetten mit einem Minimalprobevolumen von 50 µl ausgerüstet ist. Zusätzlich wurde von jeder DNA- bzw. RNA-Probe die Extinktion bei 280 nm gemessen. Der Quotient aus den Extinktionen bei 260 und 280 nm (E₂₆₀/E₂₈₀) gibt Aufschluss über den Grad der Reinheit der Präparation. Ein Wert zwischen 1,8 und 2,0 weist auf eine saubere Probe hin.

2.1.6 Restriktionsspaltung von DNA

(Roberts, 1989)

Die endonukleolytische Spaltung von DNA wurde unter den vom Hersteller für das jeweilige Enzym angegebenen Pufferbedingungen durchgeführt. Bei analytischer Restriktionsspaltung oder zur Integritätskontrolle von Plasmid-DNA wurden in 15 µl Gesamtvolumen 100-500 ng DNA, 1,5 µl 10 x Puffer und durchschnittlich 2 U Enzym für 1h bei 37°C inkubiert. Bei Analyse von Minipräparationen enthielt der Ansatz zusätzlich 1 µl RNase A (10 mg/ml), um noch evtl. vorhandene RNA zu entfernen.

Präparative Restriktionsansätze für Klonierungen, Fragmentisolierungen und Linearisierungen enthielten in 50 µl oder 100 µl Gesamtvolumen 3-10 µg DNA und die entsprechende Menge 10 x Puffer. Die notwendigen Enzymeinheiten wurden gemäß der unten stehenden Formel berechnet und hinzugefügt. Die Inkubation erfolgte für mindestens 1 h. Bei Klonierungen wurde anschließend das Enzym durch Inkubation der Ansätze für 10 min bei 65°C inaktiviert.

$$X \text{ Units Enzym} = Y \text{ µg DNA} \times \frac{\text{Anzahl der Schnittstellen im Plasmid} \times \text{MG von } \lambda}{\text{Anzahl der Schnittstellen in } \lambda \times \text{MG vom Plasmid}}$$

2.1.7 Auffüllreaktion überhängender DNA-Enden (*blunt*)

(Sambrook et al., 1989)

Um nicht kompatible DNA-Enden zu ligieren, war es bei einigen Klonierungen notwendig, durch die Restriktionsspaltung erzeugte einzelsträngige DNA-Enden zum Doppelstrang aufzufüllen, wodurch glattendige DNA-Fragmente (*blunt ends*) entstanden. Dies wurde mit Hilfe der T4-DNA Polymerase bzw. der DNA Polymerase I (Klenow-Fragment) durchgeführt, die dNTPs als Ko-substrate benötigten.

Ein Reaktionsansatz enthielt (pro µg DNA):

je 100 µM dATP, dTTP, dCTP, dGTP

1 x T4-DNA Polymerase Puffer

1 U T4-DNA Polymerase

Die Ansätze wurden 30 min bei 10°C inkubiert und anschließend das Enzym für 10 min bei 65°C hitzeinaktiviert. Bei Verwendung des Klenow-Fragments wurden lediglich dNTPs und Enzym hinzugegeben und der Ansatz für 20 min bei RT inkubiert. Auch hier folgte eine Enzym-inaktivierung bei 65°C.

2.1.8 Elektrophoretische Auftrennung von DNA

(Sambrook et al, 1989)

Zur Trennung unterschiedlich langer DNA-Fragmente, die nach einer Restriktionsspaltung entstehen, diente die horizontale Gelelektrophorese in 0,8 bis 2%igen Agarosegelen. Der Agaroseanteil im Gel wurde nach den zu erwarteten DNA-Fragmentgrößen gewählt (kleine Fragmente: hochprozentig, große Fragmente: niedrigprozentig). Durch die Anwesenheit von Ethidiumbromid im Gel wurden die DNA-Moleküle unter UV-Bestrahlung sichtbar, weil Ethidiumbromid sequenzunspezifisch zwischen den einzelnen Basenpaaren der DNA interkaliert.

- TBE-Puffer: 89 mM Borsäure, 0,9 mM EDTA, 89 mM Tris (pH 8,4)
- Ethidiumbromid: 10 mg/ml 3,8-Diamino-6-ethyl-5-phenylanthridiniumbromid
- 6 x Probenpuffer: 20% Ficoll 400, 0,075% Bromphenolblau, 0,075% Xylencyanol in 6 x TBE
- DNA-Längenstandards und ihre Fragmentgrößen:
 1. Mischung aus *Styl* restringierter λ -DNA und *Alul* geschnittener pBR322-DNA: 19329, 7743, 6223, 4354, 3472, 2690, 1882, 1489, 925, 908, 659, 521, 421, 403, 281, 257 und 226 bp
 2. Ladder Mix (MBI-Fermentas): 10000, 8000, 6000, 5000, 4000, 3500, 3000, 2500, 2000, 1500, 1200, 1031, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200 und 100 bp

Für ein 1%iges Agarosegel wurde die Mischung von 0,5 g Agarose und 50 ml TBE-Puffer im Mikrowellenherd kurz aufgekocht, bis die Agarose vollständig geschmolzen war und keine Schlieren in der Lösung zu erkennen waren. Nach kurzem Abkühlen wurde Ethidiumbromid zur Gellösung pipettiert (0,08 $\mu\text{g/ml}$), die nach kurzem Schwenken in eine rechteckige Gelschale (8,5 cm x 12 cm) gegossen wurde. Der Probenkamm (10 große Taschen bei präparativen und 20 kleine Taschen bei analytischen Gelen) wurde eingesteckt bis das Gel ausgehärtet war. Die DNA-Proben wurden (bis zu 10 μg pro Tasche bei präparativer Gelelektrophorese und bis zu 1 μg bei analytischem Gellauf) mit der entsprechenden Menge 6 x Probenpuffer versetzt (1/6 des Gesamtprobenvolumens), mit H_2O auf identische Volumina eingestellt und gut gemischt (Vortex). Die ausgelierten Gele wurden in eine horizontale Gelelektrophoresekammer gelegt, fixiert und mit 1 x TBE vollständig überschichtet. Nicht benötigte Gelbereiche wurden vorher mit einem Skalpell herausgetrennt und in Frischhaltefolie bei 4°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (max. 2 Wochen). Die DNA-Proben wurden kurz abzentrifugiert und in die Taschen pipettiert. Zur Abschätzung der Längen der aufgetrennten DNA-Fragmente wurde in eine Tasche einer der beiden Längenstandards eingefüllt und schließlich eine Spannung von 150-220 V angelegt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel aus der Schale herausgenommen und unter UV-Licht (254 nm) betrachtet und fotografiert.

2.1.9 Isolation von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

(Qiagen/Hilden)

Um DNA-Fragmente nach der Elektrophorese aus dem Gel zu isolieren, wurden zwei verschiedene Extraktions-Kits der Firma Qiagen verwendet, die aber auf demselben Isolationsprinzip basieren. Nach Verflüssigung der Agarose binden *QIAEX*[®] II-Silica-Gelpartikel unter Hochsalzbedingungen Nukleinsäuren quantitativ. Die Gelpartikel werden gewaschen, bevor mit Niedrigsalzpuffer oder H₂O die DNA wiedergewonnen wird.

2.1.9.1 *QIAEX II* Agarose Gel Extraction[®]

Die Gelpartikel liegen in Form von Glasmilch vor, welche durch Zentrifugation am Gefäßboden pelletiert werden.

- Puffer QX1: keine Herstellerangaben
- Puffer PE: keine Herstellerangaben (Zugabe von EtOH)
- *QIAEX*[®] II: *QIAEX*[®] II-Silica-Gelpartikel (Glasmilch)

Die DNA-Fragmente, die eluiert werden sollten, wurden mit einem sauberen, scharfen Skalpell unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Das von überschüssiger Agarose befreite Gelstück wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, gewogen und mit dem dreifachen Volumen QX1-Puffer (bezogen auf das Gewicht des Gelstücks) versetzt. Hatte das DNA-Fragment eine Länge <100 bp, wurde die 6-fache Menge QX1-Puffer zugegeben. *QIAEX*[®] II wurde auf dem Vortex gründlich gemischt und 10 µl bei ≤2 µg DNA bzw. 30 µl bei >2 µg DNA zum Ansatz hinzugefügt. Anschließend wurde die Mischung unter gelegentlichem Aufwirbeln bei 50°C inkubiert (max. 10 min). Während dieser Zeit ging die Agarose in Lösung und die DNA wurde von den Silica-Partikeln gebunden. Der Ansatz wurde für 30 s bei 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf-Tischzentrifuge 5417C) und der Überstand vorsichtig abgenommen und verworfen. Um Agarosespuren zu entfernen, wurden 500 µl QX1-Puffer zupipettiert. Der Ansatz wurde auf dem Vortex gemischt und erneut 30 s bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert. Anschließend folgte ein Waschschriff mit 500 µl PE-Puffer, wodurch Salzkontaminationen entfernt wurden. Nach Trocknen der Gelpartikel an der Luft (~12 min, bei Verwendung von 30 µl *QIAEX*[®] II ~30 min) erfolgte die Elution der DNA durch Zugabe von 15 µl H₂O, Mischen auf dem Vortex und 5-minütiger Inkubation bei RT. Nach 1 min Zentrifugation bei 14000 rpm wurde der Überstand, welcher die DNA enthielt, abgenommen und in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Die Effizienz der Isolation wurde durch einen zweiten Elutionsschritt mit 15 µl H₂O erhöht (10-15%). Ein Aliquot (1-2 µl) der eluierten DNA wurde einer analytischen Gelelektrophorese unterzogen und Menge und Qualität der eluierten DNA kontrolliert. In der Regel wurden zwischen 50 und 80% der Ausgangs-DNA wiedergewonnen.

2.1.9.2 *QIAquick Gel Extraction*[®]

Die Silica-Gelpartikel sind in einer Zentrifugationssäule immobilisiert und halten gelöste DNA-Fragmente beim Passieren der Säulenmatrix unter Hochsalzbedingungen zurück. Da keine längeren Trocknungszeiten eingehalten werden müssen, ergibt sich im Vergleich zur *QIAEX II* Agarose Gel Extraktion[®] (II.2.1.9.1) eine kürzere Präparationsdauer.

- Puffer QG: entspricht QX1-Puffer
- Puffer PE: vgl. II.2.1.9.1
- *QIAquick spin columns:* *QIAEX*[®] II-Gelpartikel in Säule immobilisiert

Wie bei *QIAEX* wurden die zu isolierenden DNA-Banden unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, gewogen und in der dreifachen Menge QG-Puffer in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgenommen. Während einer 10-minütigen Inkubation bei 50°C unter gelegentlichem Aufwirbeln ging die Agarose in Lösung. Im Anschluss wurde 1 Volumen (bezogen auf das ursprüngliche Gelstückgewicht) Isopropanol hinzugegeben, wodurch die Ausbeute von DNA-Fragmenten, die kleiner als 500 bp waren, erhöht wurde. Der Ansatz wurde gemischt und auf eine *QIAquick spin column* im 2-ml-Sammelgefäß pipettiert. Durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm (Eppendorf Tischzentrifuge 5417C) wurde die DNA an die Säulenmatrix gebunden. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule mit 500 µl QG-Puffer gewaschen (Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min). Ein weiterer Waschschrift mit 750 µl PE-Puffer zur Entfernung von Salzkontaminationen schloss sich an (Zentrifugation bei 13000 rpm für 1 min). Zur Trocknung der Matrix wurde die Zentrifugation ohne erneute Pufferzugabe wiederholt (13000 rpm, 1 min). Die Säule wurde auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Nach Applikation von 50 µl H₂O und einminütiger Inkubation ließ sich die DNA durch Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm eluieren.

Die isolierte DNA wurde entweder gleich zur Ligation eingesetzt oder bei 4°C gelagert.

2.1.10 Ligation von DNA

(Sambrook et al., 1989)

Zur Ligation von restringierter Vektor-DNA mit geschnittener und geextrahierter Insert-DNA wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. 50 ng Vektor (2 pMol/ml) und ein dreifach molarer Überschuss an Insert-DNA wurden mit 1 U T4-DNA-Ligase in 1 x Ligase-Puffer bei einem Gesamtvolumen von 10 bis 20 µl bei 18°C ü.N. inkubiert (1 x Ligase-Puffer: 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP, 25 µg/ml BSA, 50 mM Tris (pH 7,5)). Als Negativkontrolle diente ein Ligationsansatz ohne Insert-DNA (Autoligation).

2.1.11 Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente mit Hilfe von PCR

(Saiki et al., 1988)

Bei zwei Klonierungen war es notwendig, das zu integrierende cDNA Fragment mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zu amplifizieren. Als Matrize diente Plasmid-DNA, welche vor der eigentlichen PCR-Reaktion mit einem geeigneten Restriktionsenzym linearisiert worden war.

2.1.11.1 Amplifikation der HuD cDNA

50 ng λ UniZAP-265114 (II.1.6.7) wurden mit dem Enzym *PvuII* in einem Volumen von 20 μ l linearisiert und anschließend 1:50 mit sterilem H_2O verdünnt (Endkonzentration: 50 pg/ μ l).

Ein PCR-Ansatz (50 μ l) enthielt:

- 1 μ l der linearisierten und verdünnten Plasmid-DNA (50 pg)
- 5 μ l 10 x PCR-Puffer (500 mM KCl, 10% Triton X-100 und 100 mM Tris (pH 9))
- 3 μ l $MgCl_2$ (25 mM)
- 1,25 μ l HuD 5'-Primer (II.1.5) (50 pMol)
- 0,877 μ l HuD 3'-Primer (II.1.5) (50 pMol)
- 37,5 μ l H_2O

Als Negativkontrolle wurde ein PCR-Ansatz ohne Matrizen-DNA zusammengestellt. Die Ansätze wurden für 5 min bei 95°C inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Es folgte die Zugabe der Desoxyribonukleotide (1 μ l dNTP-Mix; 10 mM aller vier Desoxyribonukleosidtriphosphate) und der Taq DNA Polymerase (1,5 U) (Promega/Mannheim).

Die PCR wurde im *Gene Amp PCR System 2400* Thermocycler (Perkin Elmer) durchgeführt und folgendes Syntheseprogramm gewählt:

Start:	1 min 94°C
Zyklus (30 x):	1 min 55°C (Primer/Matrizen-Hybridisierung)
	1,5 min 72°C (DNA-Synthese)
	1 min 94°C (Primer/Matrizen-Trennung)
Endsynthese:	7 min 72°C
Ende:	∞ bei 4°C

Zur Kontrolle der PCR wurde je 1 μ l der Ansätze einer Gelelektrophorese im 1%igen Agarosegel unterzogen.

2.1.11.2 Amplifikation der HuR cDNA

Als Matrizen-DNA wurde der Vektor pZeoSV(-)-HuR sense (II.1.6.9) verwendet, von dem 50 ng in 20 µl Gesamtvolumen mit *EcoRI* linearisiert wurden. Der linearisierte Vektor wurde 1:50 mit sterilem H₂O verdünnt (Endkonzentration: 50 pg/µl) und in folgendem PCR-Ansatz verwendet:

1 µl der linearisierten und verdünnten Plasmid-DNA (50 pg)
5 µl 10 x PCR-Puffer
3 µl MgCl₂
0,42 µl HuR 5'-Primer (II.1.5) (50 pMol)
0,71 µl HuR 3'-Primer (II.1.5) (50 pMol)
38,5 µl H₂O

Auch hier wurde eine Negativkontrolle (H₂O) mitgeführt. Als Positivkontrolle diente obige HuD-PCR (II.2.1.11.1). Nach Zugabe von dNTPs und Taq-Polymerase (vgl. II.2.1.11.1) wurde folgendes Syntheseprogramm gewählt:

Start: 1 min 94°C
Zyklus (30 x): 1 min 52°C (Primer/Matrizen-Hybridisierung)
1,5 min 72°C (DNA-Synthese)
1 min 94°C (Primer/Matrizen-Trennung)
Endsynthese: 7 min 72°C
Ende: ∞ bei 4°C

2.1.11.3 Reinigung der PCR-Produkte

Um die amplifizierte HuD- bzw. HuR-cDNA für die anschließende Klonierung verwenden zu können, mussten die PCR-Primer entfernt werden, da sie die Aktivität von Restriktionsendonukleasen und Ligasen inhibieren. Dies wurde entweder durch eine präparative Gelelektrophorese im 1%igen Agarosegel und anschließender DNA-Elution mittels *QIAEX*[®] (II.2.1.9.1) oder durch Verwendung des *QIAquick PCR Purification*-Kit (Qiagen/Hilden) durchgeführt.

- Puffer PB: keine Herstellerangaben
- Puffer PE: keine Herstellerangaben (Zugabe von EtOH)
- QIAquick column: wie bei *QIAquick Gel Extraction*[®] (II.2.1.9.2)

Dem gesamten PCR Ansatz (50 µl) wurde das fünffache Volumen PB-Puffer zugesetzt (250 µl) und die Mischung auf eine *QIAquick* Zentrifugationssäule im 2-ml-Sammelgefäß pipettiert. Der Ansatz wurde zentrifugiert (1 min, 13000 rpm, 5417C Eppendorf-Zentrifuge) und der Durchfluss verworfen. Mit 750 µl PE-Puffer wurde das an die Säulenmatrix gebundene PCR-Produkt gewa-

schen (Zentrifugation für 1 min bei 13000 rpm) und durch erneute Zentrifugation (1 min bei maximaler Geschwindigkeit) sämtliche Puffer- und Ethanolspuren beseitigt. Die Säule wurde auf ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und die DNA mit 50 µl H₂O von der Säule eluiert (1 min Inkubation, dann 1 min Zentrifugation). Der Erfolg der Wiedergewinnung wurde durch Elektrophorese von 1 µl des Eluats im 1%igen Agarosegel kontrolliert.

2.1.12 Radioaktive Markierungen von DNA

2.1.12.1 Radioaktiv markierte DNA-Sonden

(Feinberg und Vogelstein, 1983)

Mit der Methode des *Random Primed Oligolabeling* wurden DNA-Sonden für Northern Blot Analysen (II.2.1.13.2) hergestellt, die mit hoher spezifischer Aktivität markiert waren. Statistisch zusammengesetzte Hexanukleotide (dN₆) hybridisieren an komplementäre Sequenzabschnitte der denaturierten DNA-Matrize und dienen als Primer für die DNA-Synthese durch das Klenow-Fragment der DNA Polymerase I aus *E. coli*. Dabei wird dem Enzym neben nicht-radioaktiven dNTPs auch [α -³²P]-dNTP geboten, so dass die synthetisierten DNA-Oligomere radioaktiv markiert werden.

- 5 x Klenow-Puffer: 25 mM MgCl₂, 250 mM Tris (pH 7,5)
- dNTP-Mix: je 2 mM dGTP, dTTP und dATP in H₂O
- Stopp-Puffer: 5% Glycerin, 1% Dextranblau, 200 mM EDTA; pH 8
- TEN 100: 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris (pH 8)
- G75-Säulenmaterial: 1 g Sephadex[®] G75 in ~30 ml TEN, 3 h quellen lassen, dann autoklavieren

Zunächst mussten durch Restriktionsverdau die Sequenzbereiche der Plasmid-DNAs ausgeschnitten werden, die als Matrize zur Markierung eingesetzt werden sollten. Dies waren im Einzelnen:

<u>Plasmid (II.1.6)</u>	<u>geschnitten mit</u>	<u>Fragmentgröße</u>
p809.1	<i>EcoRI</i>	1,2 kb
pBS-DC1	<i>EcoRI/HindIII</i>	1,3 kb

Ein Restriktionsansatz enthielt 10 µg Plasmid-DNA und die entsprechenden Einheiten der Restriktionsendonukleasen (II.2.1.6) im jeweils empfohlenen Puffer. Die resultierenden Fragmente wurden nach den beschriebenen Methoden extrahiert (II.2.1.9) und die Konzentrationen abgeschätzt.

Ein Ansatz von 50-100 ng zu markierende DNA mit 3 µl dN₆ (1 µg/µl) und H₂O in einem Volumen von 8 µl wurde 5 min bei 95°C denaturiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde der

Ansatz kurz abzentrifugiert. Während einer 10-minütigen Inkubation auf Eis hybridisierten die Hexanukleotide mit der Matrizen-DNA. 4 μ l 5 x Klenow-Puffer, 1 μ l dNTP-Mix sowie 1 μ l DTT (100 mM) wurden hinzugegeben und die Synthese mit 2 U Klenow-Fragment (MBI-Fermentas/St.Leon-Roth) und 5 μ l [α - 32 P]-dCTP (= 50 μ Ci) gestartet. Nach einer Inkubation für 80 min bei 37°C wurde die Synthese mit 20 μ l Stopp-Puffer beendet.

Um nicht inkorporierte radioaktiv markierte Nukleotide abzutrennen, wurde der Reaktionsansatz einer Gelfiltrationschromatographie unterzogen. Dies wurde zum Einen mit Pasteurpipetten durchgeführt, die mit dem Säulenmaterial G75 bis ~1 cm unterhalb des Glasrandes gefüllt wurden. Nach Equilibrierung mit TEN-Puffer wurde der gesamte blaugefärbte (Dextranblau) Reaktionsansatz auf die Säule gegeben und die radioaktive DNA-Sonde, die in der Blaufront lief, mit TEN-Puffer eluiert.

Die zweite Methode zur Abtrennung nicht inkorporierter Nukleotide beruhte auf der Verwendung von Zentrifugationssäulchen (*HR200 Spin columns*, Amersham-Pharmacia/Freiburg), die ebenfalls mit G75-Material gepackt sind. Nach Entfernen der Verschlusskappe wurde die Säule auf ein steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt und für 1 min bei 750 g zentrifugiert. Dabei wurde der Lagerpuffer entfernt. Der abgestoppte Reaktionsansatz wurde auf die Säule pipettiert und für 2 min bei der gleichen Umdrehung zentrifugiert, wobei im Durchfluss die radioaktiv markierte DNA-Sonde gewonnen wurde.

Um die Markierungseffizienz zu bestimmen, wurde vom gesammelten Eluat (~400 μ l bei Methode 1 und ~40 μ l bei Methode 2) 1 μ l abgenommen, in ein Plastiksintillationsgefäß überführt und die Cerenkov-Strahlung ermittelt (Tri Carb 1600CA/Packard).

Vor Verwendung der markierten DNA-Sonden in Northern Blot Analysen wurden sie bei 95°C für 5 min denaturiert.

2.1.12.2 5'-Endmarkierung von DNA-Oligos

(Amersham-Pharmacia/Freiburg)

Um einzelsträngige DNA-Oligonukleotide (MARCKS 52nt *sense* und *antisense* Klonierungsoligonukleotide, II.1.5) radioaktiv zu markieren, wurde der *5'-end labeling Kit (Ready to go)* der Firma Amersham-Pharmacia/Freiburg verwendet. Die Markierungsreaktion beruht auf der Aktivität der T4 Polynukleotid-Kinase (T4-PNK), welche die endständige γ -Phosphatgruppe von ATP auf die 5' OH-Gruppe von einzel- und doppelsträngigen Nukleinsäuren überträgt. Dabei muss gewährleistet sein, dass die 5'-Enden der Nukleinsäuren nicht phosphoryliert sind. Synthetisch erzeugte einzelsträngige DNA-Oligonukleotide sind *per se* nicht phosphoryliert und können deshalb direkt eingesetzt werden. Jedes DNA-Molekül erhält als Resultat der enzymatischen Reaktion genau eine radioaktive Markierung am 5'-Ende.

- 5'-end labeling Reaction mix: lyophilisierter Puffer und T4-PNK
- Oligonukleotide: MARCKS 52nt *sense* und *antisense*, 10 pmol/ μ l
- [γ - 32 P]-ATP: (7000 Ci/mMol) *end labeling grade*
- Stopp-Puffer: 250 mM EDTA

In 2 Reaktionsgefäße, die mit den lyophilisierten Kitbestandteilen des Reaction Mix gefüllt waren, wurden je 25 μ l H₂O gegeben und die Bestandteile rekonstituiert (5 min bei RT). Die Lösung wurde vorsichtig resuspendiert und die zu markierenden Oligonukleotide hinzugegeben (je 1 μ l Oligonukleotid *sense* bzw. *antisense*). Jeder Ansatz wurde mit H₂O bis auf 49 μ l aufgefüllt und die Markierungsreaktion durch Zugabe von je 1 μ l [γ - 32 P]-ATP und kurzes Abzentrifugieren gestartet. Nach 30 min bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 μ l Stopp-Puffer beendet. 2 μ l der Markierungsansätze wurden zur Kontrolle im 1,5%igen Agarosegel aufgetrennt und durch Auflegen (30 min) eines Kodak X-OMAT-Films dokumentiert.

Zur Reinigung der markierten Oligonukleotide wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Dazu wurde zunächst das Volumen der Markierungsansätze mit H₂O auf 100 μ l aufgefüllt. Nach Zugabe von 100 μ l Phenollösung wurde der Ansatz mit dem Vortex kräftig durchmischt. Zur Phasentrennung erfolgte eine kurze Zentrifugation (14000 rpm), der sich die Überführung des wässrigen Überstands in ein frisches Eppendorf-Reaktionsgefäß anschloss. Dabei war darauf zu achten, dass die Interphase nicht mitgeführt wurde. Um Phenolspuren zu beseitigen, wurde die wässrige Phase dreimal mit Chloroform extrahiert (gleiches Prozedere wie bei Phenolextraktion). Die von Proteinen befreiten Oligonukleotide wurden zwecks Abtrennung nicht inkorporierter Nukleotide einer G75-Gelfiltrationschromatographie unterzogen (II.2.1.12.1). Schließlich wurde die Cerenkov-Strahlung von je 1 μ l der gewonnenen Oligofractionen im Radioaktivitätsmessgerät bestimmt.

2.1.13 Arbeiten mit RNA

Da beim Arbeiten mit Ribonukleinsäuren (RNA) die Gefahr der Kontamination durch RNasen sehr groß ist, mussten hier besondere Vorsichtsmaßnahmen gelten. Neben dem selbstverständlichen Arbeiten mit Handschuhen und Verwendung von mit Handschuhen gesteckten Pipettenspitzen mussten vor allem auch die eingesetzten Puffer RNase-frei sein. Sofern die Lösungen selbst hergestellt wurden und keine stickstoffhaltigen-Puffersubstanzen wie Tris enthielten, wurden durch Zugabe von 0,1% DEPC und ~2-stündiger Inkubation bei 37°C sämtliche evtl. vorhandenen RNasen inaktiviert. Nach dem Autoklavieren der Lösungen war auch das DEPC zerstört, so dass keine Beeinträchtigungen der Pufferfunktionen bestanden. Insbesondere H₂O wurde für RNA-Arbeiten auf diese Weise aufbereitet.

2.1.13.1 *In vitro*-Transkription

(Melton et al., 1984; Krieg et al., 1987)

Radioaktiv markierte oder nicht-radioaktive RNA-Moleküle wurden durch *in vitro*-Transkription hergestellt. RNA Polymerasen synthetisieren abhängig von einer DNA-Matrize sequenzkomplementäre RNA-Moleküle, wenn eine entsprechende Promotorregion den Startpunkt auf der DNA-Matrize vorgibt. Durch Restriktion des zu transkribierenden Plasmids an der Stelle, an der die RNA-Synthese enden soll, wird die Länge der Transkripte bestimmt (*run-off-transcription*). Neben der geeigneten Plasmid-DNA benötigen die RNA-Polymerasen Mg^{2+} -Ionen und NTPs. Ist eines der vier Ribonukleosidtriphosphate radioaktiv markiert, erhält das RNA-Molekül an diesen Stellen radioaktive Signale.

- 10 x Transkriptionspuffer (Roche): 60 mM $MgCl_2$, 100 mM DTT, 20 mM Spermidin, 400 mM Tris; pH 8
- 5 x Transkriptionspuffer (Promega): 30 mM $MgCl_2$, 50 mM NaCl, 10 mM Spermidin, 200 mM Tris; pH 7,9
- T7 RNA Polymerase
T3 RNA Polymerase
(beide Roche): je 20 U/ μ l in 200 mM KCl, 0,1 mM EDTA, 10 mM β -Mercaptoethanol, 50% (v/v) Glycerin, 10 mM Kaliumphosphat; pH 7,9
- T3 RNA Polymerase
(Promega): 20 U/ μ l in 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 0,1% Triton X-100, 50% (v/v) Glycerin, 20 mM Kaliumphosphat; pH 7,7
- RNase-Inhibitor
(MBI-Fermentas): 20-50 U/ μ l (gereinigt aus der humanen Plazenta), in 50 mM NaCl, 8 mM DTT, 0,5 mM Elugent-Detergenz, 50% (v/v) Glycerin, 20 mM HEPES; pH 7,5
- DNase I (Roche): 20 U/ μ l (gereinigt aus der Rinder-Plazenta), in 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 100 μ g/ml BSA, 50% (v/v) Glycerin, 20 mM Tris; pH 7,6

Die cDNA-Sequenzen, die in dieser Arbeit transkribiert wurden, waren in pBluescript- bzw. pCR Script-Vektoren inkloniert. Diese besitzen Promotorregionen für die T7- und die T3-RNA Polymerase. Deshalb wurden diese Enzyme in den *in vitro*-Transkriptionsreaktionen eingesetzt. Vor der eigentlichen Transkription wurden die Plasmide linearisiert, um den Terminationspunkt der Transkription festzulegen. Außerdem musste gewährleistet sein, dass am 3'-Ende der zu transkribierenden DNA ein 3' zurückhängendes oder stumpfes DNA-Ende entstand, da sonst die RNA Polymerase auf den Gegenstrang wechseln und die RNA weiter verlängern könnte. 10 μ g Plasmid-DNA wurden mit dem entsprechenden Restriktionsenzym und dem empfohlenen Puffer (Gesamtvolumen 50 μ l) für 1 h bei 37°C linearisiert. Nach gelelektrophoretischer Kontrolle eines 2- μ l-Aliquots wurde der Restriktionsansatz mit DEPC- H_2O auf 200 μ l aufgefüllt und die DNA einmal mit Phenol/Chloroform (1:1) extrahiert. Dazu wurden 100 μ l Phenollösung hinzugefügt und nach kräftigem Mischen (Vortex) 100 μ l Chloroform beigemischt. Nach erneutem kräftigem Mischen wurden die Ansätze zur Phasentrennung kurz bei max. Umdrehung abzentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein frisches steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und durch erneute Zugabe von 200 μ l Chloroform, kräftiges Mischen und kurze

Zentrifugation gewaschen. Dieser Chloroform-Waschschritt wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Die saubere DNA wurde durch 1/20 Volumen Na-Acetat (3 M; pH 5,2) und 3 Volumen EtOH (abs.) für 10 min bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wurde für 10 min bei 14000 rpm und RT pelletiert (5417C Eppendorf Zentrifuge) und mit 500 μl 70%igen EtOH gewaschen (Vortex). Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet an der Luft getrocknet und in 50 μl DEPC- H_2O gelöst. Ein 2- μl -Aliquot wurde erneut zur gelelektrophoretischen Kontrolle herangezogen und abgeschätzt, wieviel von den 10 μg Ausgangsmaterial noch vorhanden war. Zur Herstellung radioaktiv markierter und nicht markierter Transkripte wurden Enzyme zweier Hersteller (Roche und Promega) verwendet.

Für einen Transkriptionsansatz (50 μl), der zu radioaktiv markierter RNA führte, wurden pipetiert (Beispiel [α - ^{32}P]-UTP-Markierung):

- 1 μg linearisiertes Plasmid
- 5 μl 10 x Transkriptionspuffer (Roche) oder 10 μl 5 x Transkriptionspuffer (Promega)
(nur bei Promega: 5 μl 100 mM DTT, vom Hersteller mitgeliefert)
- 4,5 μl NTP-Mix (ATP, GTP, CTP, je 25 mM)
- 1,5 μl UTP (1 mM)
- 2 μl RNase Inhibitor (\sim 50 U)
- X μl DEPC- H_2O bis auf 44 μl

Die Transkription wurde durch Zugabe von 1 μl RNA Polymerase (20 U) und 5 μl [α - ^{32}P]-UTP (50 μCi ; 3000 Ci/mMol) gestartet und der Ansatz für 2 h bei 37°C inkubiert. Bei [α - ^{32}P]-CTP bzw. [α - ^{32}P]-ATP Markierungen waren die nicht-markierten Ribonukleotide im NTP-Mix entsprechend ausgetauscht.

Durch Zugabe von 2 μl DNase I (40 U) wurde die Transkription beendet und die DNA-Matrize während der Inkubation für 30 min bei 37°C abgebaut. Das Volumen des Ansatzes wurde mit DEPC- H_2O auf 100 μl aufgefüllt und die RNA durch eine Phenol/Chloroform(1:1)-Extraktion und zwei anschließende Chloroformextraktionen (analog der Plasmidvorbereitung) gereinigt. Die nicht inkorporierten Nukleotide wurden durch eine G75-Gelfiltrationschromatographie oder mit Hilfe der *HR200 Spin Columns* (Amersham-Pharmacia/Freiburg) entfernt (II.2.1.12.1). Bei Verwendung der *Spin Columns* wurde vor der Zentrifugation der RNA-Probe die Säule zweimal mit DEPC- H_2O gewaschen. Die RNA wurde mit 1/10 Volumen RNase-freiem Na-Acetat (3 M; pH 5,2) und 3 Volumen EtOH (abs.) ü.N. bei -20°C , oder alternativ für 1 h bei -80°C , gefällt. Zur Pelletierung der RNA wurde der Ansatz für 30 min bei 4°C und maximaler Umdrehung (14000 rpm, Eppendorf-Tischzentrifuge) zentrifugiert, die RNA mit 500 μl 70%igem EtOH gewaschen und erneut für 5 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Das an der Luft getrocknete RNA-Präzipitat wurde abschließend in 20 μl DEPC- H_2O aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle der Markierung wurde die Cerenkov-Strahlung von 1 μl der RNA-Lösung im

Radioaktivitätsmessgerät bestimmt. Gelegentlich wurde zur Kontrolle ein 1- μ l-Aliquot der RNA einer 1%igen Agarosegelelektrophorese unterzogen.

Um nicht-markierte RNA-Transkripte zu synthetisieren, wurde der gleiche Transkriptionsansatz (50 μ l) pipettiert, mit der Ausnahme, dass der NTP-Mix (6 μ l) alle vier Ribonukleotide (ATP, GTP, CTP, UTP, je 25 mM) enthielt und kein radioaktives NTP verwendet wurde. Die Durchführung der Transkription und die Reinigung der RNA erfolgten wie oben beschrieben.

2.1.13.2 Northern Blot Analyse

Zum Nachweis von mRNA oder *in vitro*-Transkripten wurde die Northern Blot Analyse durchgeführt. Aus Zellen isolierte Gesamt-RNA oder *in vitro* synthetisierte RNA wird unter denaturierenden Bedingungen gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran übertragen. Die Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden, welche spezifisch an die komplementären RNA-Sequenzen binden, führt zum autoradiographischen Nachweis der gesuchten RNA-Moleküle.

2.1.13.2.1 Präparation von Gesamtzell-RNA

(Qiagen/Hilden)

Um die gesamte RNA aus eukaryontischen Zellen zu isolieren, wurde der *RNeasy[®] Mini Total RNA Kit* der Firma Qiagen verwendet. Dabei werden die Zellen in einem Guanidinium Isothiocyanat (GITC)-haltigen Puffer lysiert, wodurch freiwerdende zelleigene RNasen sofort inaktiviert werden. Die Nukleinsäuren werden auf einer Silika-Membran, die in einer Zentrifugationssäule immobilisiert ist, unter Hochsalzbedingungen gebunden und anschließend selektiv alle Komponenten außer der RNA durch verschiedene Waschpuffer entfernt. Mit RNase-freiem H₂O wird schließlich die gereinigte Gesamt-RNA eluiert. Dabei können pro Säule bis zu 100 μ g RNA isoliert werden (Angaben laut Hersteller).

- PBS (steril): 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄; pH 7,4
- Lysispuffer RLT: keine Herstellerangaben (GITC-haltig)
- Waschpuffer RW1: keine Herstellerangaben
- Waschpuffer RPE: keine Herstellerangaben (Zugabe von EtOH)

Die für die RNA-Präparation vorgesehenen 10-cm-Kulturschalen wurden auf Eis gestellt und das Kulturmedium wurde vom Rand mit einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt (maximal konnte die RNA von 2-3 Schalen ruhender Swiss 3T3-Zellen auf eine Säule geladen werden). Die adhärent wachsenden Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (5 ml) gewaschen. Zur Zellyse wurde jede Schale mit 600 μ l RLT-Puffer versetzt, dem zuvor 10 μ l β -Mercaptoethanol (14,5 M) pro ml RLT-Puffer zupipettiert worden war. Der Puffer wurde mit einem sterilen

Gummispatel verteilt und das Lysat am Rand der Kulturschale gesammelt. Aufgrund der ebenfalls freigesetzten genomischen DNA besaß die Lösung eine hohe Viskosität. Um diese zu reduzieren, musste die DNA geschert werden. Dies geschah durch 5-10-maliges Aufziehen des Lysates mit einer 2-ml-Spritze mit 25-G Kanüle. Die Lysate von gleichbehandelten Kulturschalen wurden in einem sterilen 15-ml-Kunststoffröhrchen vereinigt und mit einem Volumen 70%igem EtOH gemischt. Zur Bindung an die Säulenmatrix wurden max. 700 µl dieser Mischung auf eine *RNeasy[®]-Mini*-Säule im 2-ml-Sammelgefäß gegeben. Nach Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm (5417C Eppendorf Tischzentrifuge) wurde der Durchfluss verworfen und der Arbeitsschritt so lange wiederholt, bis das gesamte Lysat auf die Säule appliziert worden war. Durch Zugabe von 700 µl RW1-Puffer auf die Säule und Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm wurde die RNA gewaschen. Der Durchfluss und das Sammelgefäß wurden verworfen. Die Säule wurde auf ein neues Sammelgefäß gesteckt und die RNA mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 15 s bei 10000 rpm). Nach Verwerfen des Durchflusses wurde die RNA erneut mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm), um EtOH-Spuren von der Säulenmatrix zu entfernen. Nach Verwerfen von Durchfluss und Sammelgefäß wurde die Säule auf ein frisches steriles Eppendorf-Reaktionsgefäß gesteckt. Zur RNA-Elution wurden 50 µl RNase-freies H₂O auf die Säule pipettiert, und die Säule nach 3-minütiger Inkubation bei RT für 1 min bei 10000 rpm zentrifugiert. Dieser letzte Schritt wurde zur Erhöhung der Ausbeute einmal wiederholt. Die Konzentration der RNA wurde photometrisch bestimmt (II.2.1.5) und die RNA bei -20°C gelagert.

2.1.13.2.2 Gelelektrophoretische Auftrennung von RNA

(Fourney et al., 1988; Sambrook et al., 1989)

Die gelelektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte analog zur DNA-Elektrophorese in 1,2%igen Agarosegelen in horizontaler Laufrichtung. Um Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen, mussten stark denaturierende Bedingungen vorliegen, weshalb die Gele und der Probenpuffer hohe Konzentrationen an Formaldehyd (2,2 M bzw. 1,8 M) enthielten.

- 10 x MOPS: 250 mM MOPS, 50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA; pH 7
- 1,2%iges Formaldehyd-Agarosegel (50 ml): 0,6 g Agarose in 36 ml DEPC-H₂O, 5 ml 10 x MOPS, 9 ml Formaldehyd (37%ig)
- RNA-Probenpuffer: 1 x MOPS, 50% Formamid, 1,8 M Formaldehyd, 3,5% Ficoll 400, 0,025% Bromphenolblau

Zunächst wurde das denaturierende Formaldehyd-Agarosegel hergestellt. Dazu wurden 0,6 g Agarose in 36 ml DEPC-H₂O durch Kochen im Mikrowellenherd gelöst und nach Abkühlen auf ~60°C 5 ml 10 x MOPS und 9 ml 37%iges Formaldehyd (2,2 M) hinzugefügt. Die gemischte Gellösung wurde in eine mit Ethanol gereinigte Gelschale (8,5 cm x 12 cm) gegossen und der Probenkamm eingesteckt (große Taschen). Während das Gel aushärtete, wurden die RNA-

Proben vorbereitet. 5 µg der Gesamtzell-RNA wurden mit RNA-Probenpuffer 1:1 gemischt und mit DEPC-H₂O auf gleiches Volumen aller Proben aufgefüllt. War die RNA-Konzentration der Probe sehr gering, so dass das Probevolumen nicht in eine Geltasche passte, wurde das benötigte RNA-Volumen mit 1/10 Volumen Na-Acetat und 3 Volumen EtOH für 10 min bei -20°C gefällt und anschließend für 10 min bei 14000 rpm und RT zentrifugiert (5417C Eppendorf Zentrifuge). Das RNA-Pellet wurde in einem passenden Volumen DEPC-H₂O gelöst und mit der entsprechenden Menge RNA-Probenpuffer versetzt. Die RNA-Proben wurden zur Denaturierung für 15 min bei 56°C inkubiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis wurde den Proben 1 µl Ethidiumbromid (1 mg/ml) zugesetzt und kurz zentrifugiert. Das ausgehärtete Gel wurde in der Gelkammer fixiert und mit 1 x MOPS überschichtet. Dann folgte das Beladen der Probentaschen und die Elektrophorese bei 100-120 V für ~3 h. War die Lauffront (Bromphenolblau) ca. 1 cm vom unteren Gelrand entfernt, wurde der Gellauf beendet und das Gel unter UV-Licht (254 nm) fotografiert. Die kräftigen Signale der 28S rRNA und 18S rRNA dienten dabei als Anhaltspunkt für Integrität und gleiche Auftragsmengen der RNA-Proben.

2.1.13.2.3 Northern Blot Transfer

(Sambrook et al., 1989)

Der Übertrag der Nukleinsäuren aus dem Agarosegel auf eine Membranoberfläche (Nylon) geschah durch Diffusion mit Hilfe des Kapillartransfers. Als Laufmittel diente 10 x SSC-Puffer.

- 10 x SSC Transferpuffer: 1,5 M NaCl, 150 mM Na-Citrat; pH 7

Eine breite Plastikschaale wurde mit 10 x SSC Transferpuffer gefüllt und eine Glasplatte quer daraufgelegt, so dass rechts und links von der Glasplatte ein Pufferreservoir bestand. Auf die Glasplatte wurden zwei Lagen 3MM-Papier gelegt, deren beide Enden jeweils in den Puffer eintauchten. Die Oberfläche der mit 10 x SSC getränkten Papiere wurden mit einer Glaspipette glattgestrichen. Das Agarosegel wurde aus der Plastikschaale gelöst und mit einem Skalpell ca. 1 mm des Randes abgeschnitten. Das Gel wurde mit der Oberseite nach unten auf das 3MM-Papier gelegt, und auf dem Gel eine mit Transferpuffer angefeuchtete Nylonmembran (Hybond[®]-N) gleicher Größe plaziert. Zwei Lagen 3MM-Papier in der Größe von Gel bzw. Membran wurden in 10 x SSC Puffer getränkt und auf die Membran gelegt. Mit einer Glaspipette wurden noch vorhandene Luftblasen aus dem „Sandwich“ herausgestrichen, bevor ein Stapel saugfähiger Papiertücher daraufgelegt wurde. Die resultierenden Diffusionskräfte führten dazu, dass der Puffer über Gel und Membran in das Papier wanderte und die RNA-Moleküle mittransportierte, welche von der Membranoberfläche zurückgehalten wurden. Um die Diffusion ausschließlich über Gel und Membran zu leiten, wurde eine Isolationsschicht mit Frischhaltefolie um das Gel gelegt. Der Transferaufbau wurde mit einem Gewicht (~500 g) beschwert, wodurch die Kontakte der einzelnen Lagen verstärkt wurden. Nach dem Transfer ü.N. wurde die

Membran für ~2 h bei 80°C gebacken, um die übertragene RNA auf der Membranoberfläche zu fixieren. Unter UV-Licht wurde der Erfolg des Transfers kontrolliert und zur Dokumentation der Blot fotografiert. Mit Bleistift wurde die Position der murinen 28S rRNA und 18S rRNA als Größenstandard auf der Membran markiert (28S rRNA: 4,7 kb; 18S rRNA: 1,9 kb). Die Membran wurde in 3MM Papier eingeschlagen und bei RT gelagert oder zur Hybridisierung direkt weiterverarbeitet.

2.1.13.2.4 Hybridisierung der RNA mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (Sambrook et al., 1989)

- 50 x Denhardt's-Lösung: 10 g/l BSA, 10 g/l Ficoll 70, 10 g/l Polyvinylpyrrolidon
- Hybridisierungspuffer: 50% Formamid, 5 x Denhardt's-Lösung, 6 x SSC, 0,5% SDS
- Heringssperma-DNA: 10 mg/ml in DEPC-H₂O, geschert, Phenol/Chloroform-extrahiert, gefällt und erneut in DEPC-H₂O gelöst
- DNA-Sonde: ³²P-markiert (II.2.1.12.1); ~10⁶ cpm/ml
- Waschpuffer I: 2 x SSC, 0,2% SDS
- Waschpuffer II: 0,2 x SSC, 0,2% SDS

Die Nylon-Membran mit der immobilisierten RNA wurde in eine Hybridisierungsröhre aus Glas überführt und mit H₂O befeuchtet. Dabei zeigte die RNA-tragende Seite zum Lumen der Röhre. 250 µl der Heringssperma-DNA-Lösung wurden für 5 min bei 95°C denaturiert, kurz auf Eis abgekühlt und mit 10 ml Hybridisierungslösung in die Glasröhre gegeben. Die Prähybridisierung der Membran, bei der unspezifische Bindungsstellen abgesättigt wurden, erfolgte durch Inkubation für mindestens 4 h bei 42°C im Hybridisierungssofen. Zur eigentlichen Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden (II.2.1.12.1) wurde frischer Hybridisierungspuffer zur Membran gegeben und auch die Heringssperma-DNA ersetzt (250 µg/ml). Diese wurde, wie auch die DNA-Sonde, für 5 min bei 95°C denaturiert und nach kurzer Abkühlung in die Glasröhre pipettiert. Nach Inkubation ü.N. bei 42°C im Hybridisierungssofen wurde die Hybridisierungslösung entfernt und die Membran dreimal für 15 min bei 42°C mit Waschpuffer I gewaschen. Als zweiter, stringenterer Waschschrift wurde dreimal je 15 min mit Waschpuffer II bei 60°C gewaschen. Danach wurde die Membran der Röhre entnommen und in Frischhaltefolie eingeschlagen der Autoradiographie unterzogen. Bei starken Signalen wurde der Fuji-Medical Röntgenfilm exponiert, bei schwachen Signalen der Kodak X-OMAT AR Röntgenfilm. Die Expositionszeit dauerte je nach Intensität 1-7 Tage. Bei Detektion mit Kodak X-OMAT wurden Verstärkerfolien verwendet.

2.1.13.3 Berechnung der RNA-Sekundärstruktur

Die Berechnung der RNA-Sekundärstruktur wurde mit den Programmen *mfold* und *mplot* durchgeführt, die von der *Biocomputing Service Group* des deutschen Krebsforschungszentrums in Heidelberg (DKFZ) innerhalb des HUSAR (*Heidelberg unix sequence analysis resources*) über das Internet (<http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de/menu/w2h/w2hdkfz/index.shtml>) angeboten werden. Die Programme basieren auf den Algorithmen und Energieparametern nach Mathews und Mitarbeitern (1999) bzw. Zuker und Mitarbeitern (1999). Um einen Vergleich zwischen den Bedingungen in der Zelle und im Experiment zu erhalten, wurden die Strukturen bei 37°C und 22°C berechnet. Alle Einstellungen entsprachen ansonsten den Grundeinstellungen der Programme (Darstellung im *squiggle plot*).

2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.1 Western Blot Analyse

2.2.1.1 Auftrennung von Proteinen durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

(Laemmli, 1970)

Bei der denaturierenden SDS-PAGE werden Proteine im elektrischen Feld entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Um die Denaturierung zu ermöglichen und um die Eigenladung der Proteine zu überdecken, werden die Proteine in einem Puffer mit dem anionischen Detergenz Sodiumdodecylsulfat (SDS) behandelt. Auch β -Mercaptoethanol, zur Reduktion von Disulfidbrücken, ist in diesem Puffer enthalten. Das Polyacrylamidgel, in welchem die Proteine aufgetrennt werden, besteht aus einem Sammelgel und einem Trenngel, die unterschiedliche Polyacrylamidkonzentrationen und pH-Werte aufweisen. Durch dieses diskontinuierliche System wird gewährleistet, dass die Proteine sich an der Phasengrenze zwischen Sammel- und Trenngel konzentrieren, bevor die eigentliche Trennung entsprechend der Länge der Polypeptidketten im Trenngel erfolgt.

- 4 x Trenngelpuffer: 0,4% SDS, 1,5 M Tris (pH 8,8)
- 4 x Sammelgelpuffer: 0,4% SDS, 0,5 M Tris (pH 6,8)
- Acrylamidlösung: 29,2% Acrylamid, 0,8% N,N'-Methylen-bis-acrylamid (38:1)
- 5 x Elektrophoresepuffer: 960 mM Glycin, 0,5% SDS, 125 mM Tris (pH 8,3)
- 2 x Laemmli-Probenpuffer: 4% SDS, 1,5 M β -Mercaptoethanol, 20% Glycerin, 0,04% Bromphenolblau, 125 mM Tris (pH 6,8)
- TEMED und 10% APS

Zur Herstellung des Gels wurden zwei mit EtOH gereinigte Glasplatten (7,5 cm x 15 cm), von denen eine einen etwa 1,5 cm tiefen Ausschnitt besaß, mit Fotoklammern zusammengeheftet. Je nach Probevolumen wurden 0,5 mm (20 µl Probe), 1 mm (40 µl) oder 1,5 mm (60 µl) dicke Abstandhalter zwischen die Glasplatten geschoben. Zunächst wurde die Trenngellösung pipettiert (Tab. 2), wobei sich die Konzentration des Acrylamid (10% bzw. 12,5%) nach den Molekulargewichten der zu trennenden Proteine richtete. Nach Start der Polymerisierung wurde die Gellösung bis ca. 2,5 cm unter den Rand der Aussparung der einen Glasplatte in den Spalt gegeben und mit EtOH überschichtet. Dadurch wurde zum Einen eine glatte Oberfläche geschaffen und zum Anderen ein Abfangen der freien Radikale durch den Luftsauerstoff und damit ein ungleichmäßiges Auspolymerisieren des Gels verhindert. Nach dem Auspolymerisieren (~30 min) wurde der EtOH abgegossen und mit H₂O die Grenzschicht gewaschen. Nach Trocknung mit 3MM Papier wurde das 4%ige Sammelgel (Tab. 2) gegossen, nach Polymerisationsstart auf das Trenngel gegeben und der Kamm mit 21 Probenaschen eingesteckt. Sobald auch das Sammelgel auspolymerisiert war (~30 min), wurde der Probenkamm entfernt, das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und 1 x Elektrophoresepuffer in das obere und untere Pufferreservoir eingefüllt. Mit einer mit Elektrophoresepuffer gefüllten Spritze mit gebogener Kanüle wurden eventuell vorhandene Luftblasen, die sich unter dem Trenngel befanden, entfernt und auch die Probenaschen ausgespült. Die zu analysierenden Proteinproben wurden mit der identischen Menge 2 x Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation wurden die Proteine in die Probenaschen gefüllt, und eine Spannung von 100 V wurde so lange angelegt, bis die Proben aus den Taschen ins Sammelgel eingewandert waren. Danach wurde die Spannung auf 150 V erhöht.

Stammlösungen	Sammelgel 4%	Trenngel	
		10%	12,5%
Acrylamidlösung (30%)	0,5 ml	2 ml	2,5 ml
4 x Sammelgelpuffer	0,94 ml	-	-
4 x Trenngelpuffer	-	1,5 ml	1,5 ml
H ₂ O	2,31 ml	2,5 ml	2 ml
APS (10%)	60 µl	48 µl	48 µl
TEMED	1,5 µl	4,8 µl	4,8 µl

Tab. 2: Zusammensetzung des 4%igen Sammelgels und der beiden Trenngele

Die angegebenen Volumina beziehen sich auf ein Gel mit 0,5 mm Abstandshaltern. Bei Verwendung von 1 mm Abstandshaltern muss jeweils die 1,5-fache und bei 1,5 mm Abstandshaltern die 2-fache Menge eingesetzt werden.

Nach ~70 min begann die Bromphenolblaufront aus dem Gel zu laufen und die Elektrophorese wurde beendet. Die aufgetrennten Proteine wurden direkt im Gel mit Coomassie Blau angefärbt oder auf eine Membran elektrotransferiert.

Zusammen mit den Proben wurde auch einer der drei verwendeten Proteinstandardmarker aufgetrennt, um die Molekulargewichte der detektierten Proteinbanden abschätzen zu können. Bei Transfer der Proteine auf eine Membran wurde ein vorgefärbter Standard verwendet, welcher im Gel und auf der Membran direkt sichtbar war.

• <u>LMW (<i>low molecular weight</i>) Standard</u>	molekulare Masse (kDa)
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	94
Albumin (Rinderserum)	67
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	43
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	30
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	20
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14
• <u>vorgefärbter <i>Low Range</i> SDS-PAGE Standard I</u>	molekulare Masse (kDa)
Phosphorylase b (Kaninchenmuskel)	103
Albumin (Rinderserum)	77
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	50
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	34,3
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	28,8
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	20,7
• <u>vorgefärbter <i>Low Range</i> SDS-PAGE Standard II</u>	molekulare Masse (kDa)
Ovalbumin (Hühnereiweiß)	43
Carboanhydrase (Rindererythrocyten)	29
Trypsin-Inhibitor (Sojabohne)	18,4
α -Lactalbumin (Kuhmilch)	14,3

2.2.1.2 Elektrotransfer der Proteine auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen

Um die aufgetrennten Proteine einer Immunfärbung zu unterziehen, wurden sie auf eine Membran übertragen. Dies geschah durch Elektrotransfer nach dem Prinzip des *Semi-Dry-Blottings*.

- Bjerrum-Schäffer-Nielsen Transferpuffer: 39 mM Glycin, 20% Methanol, 1,3 mM SDS, 48 mM Tris; pH 9,2

Vor dem Transfer wurden 12 3MM Papiere und die PVDF-Membran in der Größe des zu transferierenden Gels zurechtgeschnitten. Die stark hydrophobe PVDF-Membran wurde durch kurzes Eintauchen in Methanol benetzt und nach Abwaschen des überschüssigen Methanols mit H₂O in Transferpuffer equilibriert. Auch das Gel und die 3MM-Papiere wurden in Transfer-

puffer getränkt. Zum Aufbau des Transfers wurde zunächst die Kathodenseite der Semi-Dry-Blot-Apparatur mit Transferpuffer befeuchtet und dann 3MM Papier (6 Lagen) darauf gelegt. Auf dem Papier wurde das Gel ausgerichtet, darauf die PVDF-Membran gelegt und das Ganze mit einem Stapel von 6 feuchten 3MM Papieren bedeckt. Luftblasen zwischen den einzelnen Lagen, die den Protein-Transfer auf die Membran stören, wurden mit einer Glaspipette aus dem „Sandwich“ herausgestrichen. Die Anodenseite der Apparatur wurde mit Transferpuffer befeuchtet und oben aufgelegt. Der Protein-Transfer erfolgte für 90 min bei einer Stromstärke von $0,7 \text{ mA/cm}^2$ Gelfläche.

2.2.1.3 Immunfärbung der Protein-Membranen und *enhanced* Chemilumineszenz (ECL)-Nachweis

Der Nachweis der Proteine erfolgt durch spezifische Antikörper, die das Zielprotein erkennen. Ein Sekundärantikörper ist mit der Peroxidase aus Meerrettich gekoppelt und gegen den speziesspezifischen konstanten Teil des primären Antikörpers gerichtet. Durch Inkubation in einer Luminol-Lösung mit H_2O_2 , dem Substrat der Peroxidase, werden die bei der Spaltung von H_2O_2 freigesetzten Elektronen auf Luminol übertragen, wodurch chemoluminiszierende Signale emittiert werden. Diese werden von einem empfindlichen Röntgenfilm erfasst.

- Blockierungslösung: PBS, 0,1% Triton X-100, 5% Magermilchpulver
- Antikörperverdünnungslösung: PBS, 0,1% Triton X-100, 1% Magermilchpulver
- Waschlösung I: PBS, 0,1% Triton X-100, 1% Magermilchpulver
- Waschlösung II: PBS, 0,1% Triton X-100
- Luminol-Lösung: 2,5 mM Luminol, 0,4 mM *p*-Cumarsäure, 100 mM Tris (pH 8,5)
- H_2O_2 -Lösung: 5,4 mM H_2O_2 , 100 mM Tris (pH 8,5)

Nach dem Transfer (II.2.2.1.2) wurde die Membran in Blockierungslösung für mindestens 1 h auf einem Schütteltisch inkubiert. Dies diente zur Absättigung freier, nicht von Protein besetzter Bindungsstellen. Anschließend wurde der Antikörper, welcher zur Immundetektion verwendet wurde, entsprechend der unter II.2.1.3 beschriebenen Verdünnung in Antikörperverdünnungslösung aufgenommen und auf die Membran gegeben. Die Inkubation der Membran mit diesem Antikörper erfolgte ü.N. bei 4°C auf einem Schütteltisch. Nach 5-maligem Waschen in Waschpuffer I für je 10 min wurde der Sekundärantikörper entsprechend II.2.1.3 in Antikörperverdünnungslösung für 1-2 h bei RT mit der Membran auf dem Schütteltisch inkubiert. Nach 5-maligem Waschen mit Waschpuffer II für je 10 min wurde der Chemilumineszenznachweis durchgeführt. Dazu wurde die Membran in einer Schale mit 10 ml Luminol-Lösung und 10 ml H_2O_2 -Lösung 1 min inkubiert. Die Membran wurde herausgenommen und nach Abstreifen über-

schüssiger Flüssigkeit zwischen zwei Klarsichtfolien in eine Filmkassette gelegt. Fuji-Röntgenfilme wurden je nach Signalintensität für 1-45 min exponiert und entwickelt.

2.2.1.4 Coomassie-Blau-Färbung von Polyacrylamidgelen und PVDF-Membranen

- Färbelösung: 0,1% Coomassie-Blau (R250), 10% Essigsäure, 50% technischer Ethanol
- Entfärbelösung: 7,5% Essigsäure, 25% technischer Ethanol

Zur Färbung von Proteinen in Polyacrylamidgelen wurden diese für ca. 30 min in der Färbelösung inkubiert und nach kurzem Waschen in H₂O für die gleiche Zeit in die Entfärbelösung gelegt. Diese wurde ein- bis zweimal gewechselt. Nach Entfärbung wurde das Gel auf 2 Lagen 3MM-Papier plaziert, mit Frischhaltefolie bedeckt und für 1 h unter Vakuum bei 70°C getrocknet (Gel-Trockner). Etwa 30 ng Protein/Bande waren mit Coomassie-Blau noch detektierbar.

Nach der ECL-Detektion wurde auch mit der PVDF-Membran eine Coomassie-Färbung durchgeführt. Dadurch konnte die Effizienz des Proteintransfers und die einheitliche Beladung der PAA-Gele kontrolliert werden. Die Membran wurde für 15 min in die Färbelösung gelegt, kurz mit H₂O gewaschen und mit der Entfärbelösung entfärbt (ca. 30 min). Nach Trocknung an der Luft waren die Proteinbanden deutlich erkennbar.

2.2.2 Expression und Reinigung von rekombinanten Hu-Proteinen

Zur *in vitro*-Untersuchung von Wechselwirkungen zwischen der MARCKS-RNA und RNA-bindenden Hu-Proteinen wurden rekombinante Proteine hergestellt, die nach Expression in Bakterien unter nativen Bedingungen gereinigt wurden. Dazu wurden zwei Expressionssysteme verwendet, die beide auf der Induktion des *lac*-Operons mit Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG) beruhen. Glutathion-S-Transferase (GST)-gekoppelte Proteine werden durch die Affinität des GST-Anteils zum an Sepharose gekoppelten Glutathion aus dem Bakterienlysat gereinigt (Amersham-Pharmacia/Freiburg), während Histidin-markierte Proteine durch die Interaktion der sechs N-terminal lokalisierten Histidin-Aminosäuren mit Ni²⁺-NTA-Agarose aus dem Bakterienlysat isoliert werden (Qiagen/Hilden).

2.2.2.1 Reinigung von GST-markiertem HuD/HuR (GST-HuD/GST-HuR)

(Oehrlein, 1995, Herget & Rozengurt, 1994)

Die Expression von GST-Fusionsproteinen wird durch den Vektor pGex-2T (II.1.6.4) ermöglicht. In diesen Vektor wurde die cDNA von HuD (HuR) einkloniert (stromabwärts zum GST-Anteil, im Leserahmen) und in *E.coli* XL1-Blue transformiert.

- Glucoselösung: 1 M in H₂O; sterilfiltriert
- IPTG-Lösung: 1 M in H₂O
- Lysispuffer: 1% N-Laurylsarkosin, 1% Triton X-100 in 1 x PBS (pH 7,5)
- Waschpuffer: 1 x PBS (pH 7,5)
- Elutionspuffer: 150 mM NaCl, 50 mM Glutathion, 10 mM DTT, 10 mM Tris; pH 7,5

Mit einer Kolonie pGex-HuD (pGex-HuR) transformierter Bakterien wurden 5 ml LB-Amp-Medium, dem 2 mM Glucose beigefügt war, angeimpft. Die Zugabe von Glucose sorgte für ein Abschalten des *lac*-Operons durch das CAP-System von *E.coli*. Mit der ü.N. auf einem Schüttler bei 37°C kultivierten Vorkultur wurden 500 ml LB-Amp-Medium (+ 2 mM Glucose) angeimpft und auf dem Schüttler bei 37°C kultiviert, bis eine OD₅₉₅ von 0,5-0,7 im Photometer gemessen wurde (nach 3-5 Stunden). Ein Aliquot von 50 µl wurde der Bakteriensuspension entnommen und bei 14000 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 50 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Es diente als Kontrolleextrakt 1 (vor der IPTG-Induktion) und wurde zusammen mit noch folgenden Kontrolleextrakten in einer 10%igen SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt und analysiert.

Die Induktion der Bakterien zur Produktion des GST-Fusionsproteins erfolgte durch Zugabe von 2 mM IPTG. Im Anschluss an eine zweistündige Inkubation bei 37°C auf dem Schüttler wurde erneut eine 50-µl-Kontrolle (2) entnommen, mit der wie oben beschrieben verfahren wurde. Die 500-ml-Bakterienkultur wurde auf zwei sterile Zentrifugenbecher verteilt, austariert und bei 4°C mit 7000 rpm für 20 min zentrifugiert (GSA-Rotor, Sorvall-Zentrifuge). Der Überstand wurde verworfen und die Bakterienpräzipitate bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert (ü.N.).

Die Bakterien wurden auf Eis in 15 ml Lysispuffer resuspendiert, vereinigt und anschließend durch Ultraschall aufgebrochen. Dazu wurde ein Sonifizierstab zu etwa 2/3 in die Zellsuspension eingetaucht und dreimal je 30 s beschallt (Sonifizierstab Sonoplus HD60, Cycle 90, Power 60%). Zwischen den drei Zyklen wurde je 1 min auf Eis abgekühlt, damit sich das Lysat nicht erhitzte. Anschließend wurden die Zelltrümmer durch Zentrifugation abgetrennt (SS34-Rotor, 4°C, 20 min, 9000 rpm).

Zeitgleich wurde die Glutathion-Sepharose in den Waschpuffer (PBS) umgepuffert. Nach kräftigem Mischen der Glutathion-Sepharoselösung auf dem Vortex wurden 500 µl in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 14000 rpm (5417C-Zentrifuge) wurde der Überstand abgenommen und durch 500 µl PBS ersetzt. Es folgte erneutes Mischen, Zentrifugieren und Abnehmen des Überstandes. Nach 4-maligem Waschen war die Glutathion-Sepharose in 1 x PBS equilibriert. Sie wurde mit dem gelblich-klaaren Bakterienlysate, von dem erneut 50 µl als Kontrolleextrakt 3 entnommen und mit 50 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer versetzt worden waren, in ein 50-ml-Plastikröhrchen pipettiert und der Ansatz für 4 h bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. In dieser Zeit kam es über den GST-

Anteil der exprimierten GST-Fusionsproteine zur Bindung an das an Sepharose gekoppelte Glutathion.

Für die Reinigung von an Glutathion-Sepharose gebundenem GST-HuD/HuR wurde eine sterile 25-ml-Kunststoffpipette als Säule verwendet. Diese wurde in ein Stativ eingespannt, das obere Ende abgetrennt (~5 cm) und mit steriler Watte das ausgezogene Ende verschlossen. Nach kurzem Quellen der Watte mit H₂O wurde das Glutathion-Sepharose-Lysat-Gemisch vorsichtig auf die Säule appliziert, so dass sich die Sepharose-beads auf der Watte absetzen konnten. Der Durchfluss wurde aufgefangen und erneut auf die Säule pipettiert, um eventuell zu Beginn der Beladung hindurchgelaufene beads mitzuerfassen. Von dieser zweiten Passage wurde wiederum eine 50- μ l-Kontrolle (4) entnommen, direkt mit 50 μ l 2 x Laemmli-Probenpuffer versetzt und eingefroren (-20°C).

Die Säule wurde mit Waschpuffer so lange gewaschen, bis kein Protein im Säuleneluat mehr nachweisbar war. Dies wurde durch photometrische Messung der Extinktion bei 280 nm (E_{280}) von zu verschiedenen Zeiten aufgefangenen 1-ml-Aliquots der Wascheluate bestimmt. Sobald die Extinktion der Eluate unter 0,01 gesunken war, wurde der Waschvorgang beendet. 50 μ l der Waschlösung mit der geringsten Extinktion wurden als Kontrolle 5 wie die anderen Kontrollen verarbeitet und eingefroren.

Zur Elution von GST-HuD/HuR wurde sechsmal 1 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und die jeweilige Fraktion in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gesammelt. Von jedem Eluat wurden 10 μ l mit der gleichen Menge 2 x Laemmli-Probenpuffer versetzt (Kontrollextrakte 6-12). Zusammen mit den Kontrollextrakten 1-5 wurden sie gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine durch Coomassie-Blau angefärbt (II.2.2.1.1 und II.2.2.1.4). Die gewonnenen Eluate wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2.2 Reinigung von Histidin-markiertem HuD (His₆-HuD)

(Oehrlein, 1995; Hergert et al., 1995)

Für die Expression von Histidin-markiertem-HuD Protein wurde die cDNA von HuD in pQE30 inkloniert (II.1.6.5) und der resultierende Vektor pQE30-HuD in *E.coli* XL1-Blue transformiert.

- Sonifizierungspuffer: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 1 % Triton X-100, 1 % Lauroylsarkosin; pH 8,0
- Waschpuffer 1: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl; pH 8,0
- Waschpuffer 2: 50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 10 % Glycerin; pH 6,0
- Elutionspuffer 1: 50 mM NaH₂PO₄, 500 mM NaCl, 10 % Glycerin; pH 5,5
- Elutionspuffer 2: 50 mM NaH₂PO₄, 750 mM NaCl, 10 % Glycerin; pH 5,0
- Elutionspuffer 3: 50 mM NaH₂PO₄, 1000 mM NaCl, 10 % Glycerin; pH 4,5
- Elutionspuffer 4: 50 mM NaH₂PO₄, 1000 mM NaCl, 10 % Glycerin; pH 4,0

Die Animpfung, Kultivierung, Induktion, Ernte und Sonolyse von 500 ml mit pQE30-HuD transformierter Bakterienkultur erfolgte nach gleichem Protokoll wie bei GST-HuD/HuR. Die Ni²⁺-NTA-Agarose wurde in Waschpuffer 1 umgepuffert (400 µl Agarose in 400 µl Waschpuffer 1, vgl. II.2.2.2.1), zum Bakterienlysat pipettiert und der Ansatz bei 4°C für 4 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Über die Affinität der Histidinseitenketten zu den Nickelionen ließ sich das rekombinante Protein aus dem bakteriellen Lysat isolieren und säulenchromatographisch abtrennen.

Wiederum diente eine 25-ml-Serumpipette (steril, aus Kunststoff) als Säule, in der sich die Agarose-beads auf einem mit H₂O gequollenen Stück Watte absetzten. Das Ni²⁺-NTA-Agarose-Lysatgemisch wurde vorsichtig auf die Säule appliziert, und der Durchfluss noch einmal auf die Säule gegeben. Nach diesem zweiten Durchlauf wurde Waschpuffer 1 so lange auf die Säule gegeben, bis die Extinktion des Säuleneluats $E_{280} < 0,01$ war. Mit Waschpuffer 2 wurde ebenso verfahren. Durch diese gründlichen Waschschrte wurden die Agarose-beads von unspezifisch gebundenem *E.coli*-Protein befreit. Sobald E_{280} vom Säuleneluat des zweiten Waschvorgangs unter 0,01 abgesunken war, konnte His₆-HuD von der Säule eluiert werden. Die Elution wurde nicht wie vom Hersteller der Ni²⁺-NTA-Agarose empfohlen mit Imidazol vorgenommen, sondern durch schrittweise Absenkung des pH-Werts (pH 5,5 - 4) und gleichzeitige Anhebung der Salzkonzentration im Elutionspuffer (0,5-1 M NaCl). Dadurch wurden an der Säule verbliebene *E.coli*-Proteine, die über Histidin-reiche Regionen (z.B. Zinkfinger motive) an die Nickelionen gebunden hatten, unter Elutionsbedingungen eluiert, unter denen die Hauptfraktion von His₆-HuD noch nicht eluiert wurde. Jeweils 2 x 400 µl Elutionspuffer 1-4 wurden auf die Säule gegeben und die einzelnen Fraktionen in 1,5-ml-Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen. Da His₆-HuD bevorzugt durch Elutionspuffer 4 eluiert wurde, wurden zwei weitere Fraktionen mit diesem Puffer gewonnen.

Von jedem Arbeitsschritt dieser Proteinreinigung wurden Aliquots entnommen, in 2 x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und entsprechend analysiert (vgl. II.2.2.1.1 und II.2.2.1.4).

Die His₆-HuD enthaltenden Eluate wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.2.2.3 Konzentrationsbestimmung von GST-HuD, GST-HuR und His₆-HuD

Um die Konzentration der gewonnenen Hu-Proteine zu bestimmen, wurde eine BSA-Verdünnungsreihe hergestellt (5 / 2,5 / 1,25 / 0,625 / 0,31 / 0,156 µg) und zusammen mit Aliquots der Eluate auf einem 10%igem SDS-PAA-Gel aufgetrennt (II.2.2.1.1). Nach dem Lauf, wurde das Gel einer Coomassie-Blau-Färbung unterzogen (II.2.2.1.4) und die Proteinkonzentration durch Vergleich der BSA-Banden mit den Hu-Banden abgeschätzt.

2.2.3 Herstellung von polyklonalen ELAV/Hu-Antikörpern

(Herget & Rozengurt, 1994)

Die Herstellung eines polyklonalen Antiserums, welches gegen Hu-Proteine gerichtet ist, wurde von Dr. A. Maidhof, Physiologische Chemie der Universität Mainz, durchgeführt. Dabei wurde nach der Arbeitsanleitung von Herget und Rozengurt (1994) für die Herstellung des polyklonalen MARCKS-Antiserums verfahren. Ein Kaninchen wurde mit affinitätsgereinigtem GST-HuD (100 µg in komplettem Freud'schen Adjuvanz) immunisiert und die Immunisierung im vierwöchigen Abstand dreimal mit je 50 µg GST-HuD aufgefrischt. Zwei Wochen nach der letzten Immunisierung wurde die erste Blutung vorgenommen, wobei 20 ml Rohserum gewonnen wurden.

2.2.4 Überprüfung des Hu-Antiserums im ELISA

Mit Hilfe eines ELISA (*enzyme-linked-immunosorbent-assay*) mit His₆-HuD wurde die Affinität des Rohserums zum Antigen überprüft. Bei diesem Testverfahren werden die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte mit dem Antigen beschichtet, gegen das das zu testende Antiserum gerichtet ist. Nach Applikation des Testserums erfolgt eine Inkubation mit einem Antikörper, der einerseits den speziesspezifischen konstanten Teil der Antikörper im Testserum erkennt und andererseits mit einem Enzym gekoppelt ist, welches einen Farbstoff umsetzt, dessen Extinktion bei einer bestimmten Wellenlänge photometrisch gemessen wird. Dabei ist die Extinktion proportional zur Antigenerkennung des Testserums.

- Beschichtungspuffer: 100 mM Na₂CO₃ (pH 9,5)
- Blockierlösung: 1% Gelatine in PBS
- Waschpuffer I: PBS
- Waschpuffer II: PBS + 0,05% Tween 20
- Antikörperverdünnungslösung: PBS + 1% BSA
- Citratpuffer: 100 mM Citronensäure, 100 mM Na-Citrat; pH 5
- Substratlösung: 150 mM *ortho*-Phenylendiamin (OPD), 0,05% H₂O₂ in Citratpuffer (pH 5); frisch und im Dunkeln ansetzen!
- Stopplösung: 4,5 M H₂SO₄

Der ELISA wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mit runden Vertiefungen durchgeführt. Von den 96 Testlöchern wurden 80 (10 x 8) für Serumverdünnungen und 2 für das Präimmunserum mit affinitätsgereinigtem His₆-HuD beschichtet. Dazu wurden 50 µl His₆-HuD mit der Konzentration 10 µg/ml in Beschichtungspuffer in jedes Loch pipettiert. Die Platte wurde mit Frischhaltefolie eingeschlagen und ü.N. bei 37°C im Zellkultur-Brutschrank inkubiert (Feuchtkammer). Anschließend wurde die Beschichtungslösung abgenommen und zur Absättigung nicht beschichteter Bereiche Blockierlösung (100 µl/Loch) appliziert. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C

im Brutschrank inkubiert und anschließend dreimal mit Waschpuffer I (je 200 µl/Loch) gewaschen. Das Rohserum wurde wie angegeben in Antikörperverdünnungslösung verdünnt und die Mikrotiterplatte mit je 50 µl der entsprechenden Verdünnungen nach folgendem Schema befüllt (8-fach Bestimmung):

A1 – H1	Antikörperverdünnungslösung
A2 – H2	1:1000 Verdünnung des Serums
A3 – H3	1:2000 Verdünnung des Serums
A4 – H4	1:4000 Verdünnung des Serums
A5 – H5	1:8000 Verdünnung des Serums
A6 – H6	1:16000 Verdünnung des Serums
A7 – H7	1:32000 Verdünnung des Serums
A8 – H8	1:64000 Verdünnung des Serums
A9 – H9	1:128000 Verdünnung des Serums
A10 – H10	1:256000 Verdünnung des Serums
A11 + A12	Präimmunserum

Während der Inkubation von 2 h im Brutschrank bei 37°C reagierten die Antikörper mit dem rekombinanten HuD-Protein. Um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen, wurde dreimal mit Waschpuffer II (je 200 µl/Loch) gewaschen. Im Anschluss folgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper (*goat-anti-rabbit-IgG-POD*, II.1.3). Dieser wurde in einer Verdünnung von 1:2000 in Antikörperverdünnungslösung zupipettiert (50 µl/Loch). Nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank wurde dreimal mit Waschpuffer II gewaschen (je 100 µl/Loch) und die Substratlösung vorbereitet. Diese muss vor Gebrauch frisch angesetzt und vor Licht geschützt werden, da die farblose OPD-Lösung durch Licht zerfällt und sich gelb verfärbt. Nach Zugabe von 50 µl Substratlösung in jedes Loch wurde der Ansatz bei RT im Dunkeln inkubiert. Da nicht der Endpunkt der Enzymaktivität entscheidend ist, sondern die Menge des Enzyms je Loch, wurde nach exakt 5 min die enzymatische Umsetzung abgebrochen. 25 µl Stopplösung wurden je Loch pipettiert, um das Enzym zu denaturieren. Die Extinktion des Farbstoffs bei 490 nm wurde für jedes Loch bestimmt (Immunoreader NJ-200) und eine Referenzextinktion bei 620 nm aufgenommen. Diese Referenzwerte wurden von den eigentlichen Messwerten abgezogen und der Mittelwert aus den 8 Einzelmessungen der Verdünnungen ermittelt.

2.2.5 Affinitätsreinigung des polyklonalen Kaninchen-Antiserums

(Harlow & Lane, 1988)

Das gewonnene Rohserum enthielt neben den Antikörpern gegen Hu-Proteine auch Antikörper, die gegen Kaninchenproteine und den GST-Anteil gerichtet waren. Um diese abzutrennen und das Antiserum von Serumproteinen zu reinigen, wurde eine Affinitätschromatographie durch-

geführt. Histidin-markiertes HuD-Protein wurde kovalent an eine Säulenmatrix gebunden, so dass die Hu-spezifischen Antikörper bei Passieren der Säule mit dem Antigen reagierten und zurückgehalten wurden. Nach zwei Waschschrritten wurden die Hu-Antikörper durch drei verschiedene Elutionspuffer von der Säule isoliert.

Die verwendete Affi-Gel 10-Lösung (Bio-Rad/München) enthält als Matrix an Agarose gekoppelte N-Hydroxysuccimidester. Da der 10-atomige Abstandhalter neutral geladen ist, eignet sich das Material besonders zur Kopplung von neutralen bis basischen Proteinen unter physiologischem pH-Wert. Die Kopplungsreaktion beruht auf einer spontanen Amidbindung zwischen freien Aminogruppen des Proteinliganden und dem Ester des Säulenmaterials unter Freisetzung von N-Hydroxysuccimid.

- Affi-Gel 10: Bio-Gel A-5m Agarose Gel, in Isopropanol
- Kopplungslösung: affinitätsgereinigtes His₆-HuD in neutralisiertem Elutionspuffer 4 (II.2.2.2.2)
- Lösung 1: 10 mM Tris (pH 7,5)
- Lösung 2: 100 mM Glycin (pH 2,5)
- Lösung 3: 10 mM Tris (pH 8,8)
- Lösung 4: 100 mM Triethylamin (pH 11,5)
- Lösung 5: 500 mM NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5)
- Antiserum: 5 ml Rohserum + 10 ml PBS
- Lösung 6: 1 M Tris (pH 7,5)

Die Affi-Gel 10-Lösung wurde zu einer homogenen Suspension aufgeschüttelt und so viel in eine 20-ml-Econo-Säule (Bio-Rad/München) mit Fritte gefüllt, dass die Matrix bis zum ersten Markierungsstrich der Säule reichte (~1 ml). Das Isopropanol wurde abgelassen und das Gelbett dreimal mit je 1 ml kaltem H₂O gewaschen. Der Säulenausgang wurde verschlossen und mit Parafilm abgedichtet. Zur Kopplung wurden 265 µg rekombinantes affinitätsgereinigtes His₆-HuD Protein in 10 ml neutralisiertem Elutionspuffer 4 der His₆-HuD-Reinigung (II.2.2.2.2) auf das Gel pipettiert. Nach Verschließen der Säule mit dem Deckel wurde während der Inkubation auf einem Schwenktisch bei 4°C ü.N. His₆-HuD an die Säule gekoppelt.

Im Anschluss daran wurden nicht belegte Bindungsstellen abgesättigt. Die Säule wurde bei 5000 rpm und 4°C kurz zentrifugiert, damit sich das Gelbett besser absetzte. Nach Ablassen der Kopplungslösung wurden nacheinander 10 ml Lösung 1, 10 ml Lösung 2 und 10 ml Lösung 3 auf die Säule gegeben. Der pH-Wert des letzten Eluats wurde überprüft und sollte bei pH 8,8 liegen. Nach Auftragen von 10 ml Lösung 4 wurde die Säule so lange mit Lösung 1 gewaschen, bis der pH-Wert des Durchflusses wieder 7,5 erreichte. Die Säule war nun bereit für die Affinitätschromatographie. 5 ml Rohserum wurden mit 10 ml PBS gemischt und auf die Säule pipettiert. Die verschlossene Säule wurde ü.N. bei 4°C auf einem Wipptisch inkubiert, zur Absetzung der Gelmatrix kurz bei 5000 rpm zentrifugiert und das Serum abgelassen. Um

unspezifisch gebundene Serumbestandteile von der Säule zu entfernen, wurde zunächst mit 10 ml Lösung 1 und dann mit 10 ml Lösung 5 (erhöhte Salzkonzentration) gewaschen. Schließlich wurden Hu-spezifische Antikörper von der Säule eluiert, indem drei Elutionspuffer mit saurem, neutralem und basischem pH-Wert die Säule passierten. Zunächst wurden 10 ml Lösung 2 auf die Säule gegeben (saure Elution), dann 10 ml Lösung 3 (neutral) und schließlich 10 ml Lösung 4 (basisch). Zur Neutralisierung der Eluate wurden die aufgefangenen Fraktionen der sauren und basischen Elution in je 1 ml Lösung 6 aufgefangen. Durch Waschen der Säule mit Lösung 1 wurde wieder ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Die Säule wurde schließlich mit 10 ml PBS/0,1% Na-Azid gefüllt, mit Parafilm abgedichtet und bei 4°C aufbewahrt.

Von allen Arbeitsschritten wurden Aliquots entnommen und im SDS-PAA-Gel nach Coomassie-Blau-Färbung analysiert. Die Antikörpereluat wurden anschließend in Western Blot Analysen auf ihre Spezifität getestet.

2.2.6 Proteinextraktion

Proteine wurden von Swiss 3T3- und MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen isoliert, die auf 6- oder 10-cm-Schalen ausplattiert worden waren. Zur Vermeidung von Proteindegradation wurden den Puffern Proteaseinhibitoren zugesetzt. Desweiteren verhinderten Phosphataseinhibitoren, dass phosphorylierte Proteine während der Extraktion dephosphoryliert wurden.

2.2.6.1 Zytoplasmatischer Gesamtextrakt

(Harlow & Lane, 1988, McMillan et al., 1993)

Mit einem NP-40 haltigen Puffersystem werden Zytoplasmamembran und äußere Kernmembran permeabilisiert, so dass nach Zentrifugation im Überstand ein zytoplasmatischer Gesamtextrakt vorliegt.

- 10 x PBS: 138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄;
pH 7,4
- Lysis-Puffer: 20 mM K-Acetat, 50 mM MgCl₂, 2 mM DTT, 0,5% NP-40,
30 mM Tris (pH 7,1)
 - Proteaseinhibitoren: 100 µg/ml Leupeptin
100 µg/ml Aprotinin
10 mM Benzamidin
2 mM PMSF
 - Phosphataseinhibitoren: 0,1 mM Natriumorthovanadat
10 mM NaF
20 mM β-Glycerophosphat
400 nM Okadainsäure

Von den auf Eis gestellten Zellen wurde das Medium abgesaugt. Um die adhärennten Zellen zu waschen, wurden zweimal 5 ml eiskaltes PBS auf die Zellen gegeben und nach Schwenken der Schale wieder abgenommen. Pro Schale wurden 100 µl Lysispuffer, dem die Protease- und Phosphataseinhibitoren sowie das oxidationsschützende Agens DTT frisch zugesetzt worden waren, auf die Zellen verteilt und die Zellen mit einem Gummispatel abgelöst. Das Lysat wurde am Rand der Schale gesammelt und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Zur vollständigen Lyse wurde das Lysat 10 min auf Eis inkubiert und anschließend bei 4°C zentrifugiert (10000 rpm, 10 min) (Eppendorf Zentrifuge 5417R). Der Überstand wurde abgenommen und bei -20°C gelagert.

2.2.6.2 Fraktionierung von Zellextrakten in Zytoplasma- und Kernfraktion

(Lee et al., 1988)

Um Kern und Zytoplasma getrennt zu isolieren, wurden die Zellen rein mechanisch permeabilisiert und die Kernproteine nach Abtrennung der zytosolischen Proteine durch Extraktion in einem Hochsalzpuffer gewonnen.

- Puffer A: 1,5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 1 mM DTT, 10 mM HEPES; pH 7,9
- Puffer C: 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 25% (v/v) Glycerin, 420 mM NaCl, 1 mM DTT, 20 mM HEPES; pH 7,9
- PBS, Protease- und Phosphataseinhibitoren (vgl. II.2.2.6.1)

Aus den auf Eis plazierten Kulturschalen wurde das Medium abgesaugt. Die adhärennten Zellen wurden einmal mit 5 ml eiskaltem PBS gewaschen und nach Absaugen der Waschlösung mit einem Gummispatel in 1 ml frischem PBS vom Boden abgelöst. Gleichbehandelte Zellen wurden in einem graduierten 15-ml-Röhrchen vereinigt und für 5 min bei 2000 rpm und 4°C abzentrifugiert (Megafuge 1.0/Heraeus). Pro Schale wurden 100 µl Puffer A, frisch versetzt mit DTT und den Protease- und Phosphataseinhibitoren, zum Zellpellet gegeben und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Während einer Inkubation von 15 min auf Eis schollen die Zellen an. Sie wurden mechanisch aufgebrochen, indem die Suspension mehrmals durch eine 1-ml-Spritze mit einer 25-G Kanüle gepresst wurde. Dies sollte luftblasenfrei geschehen. Dazu wurde etwas Puffer A in die Spritze aufgenommen und nach Abklopfen der Luft wieder entleert. Nach 10 Schüben mit der Spritze waren die Zellen homogenisiert, ohne dass die Kerne lysiert worden waren. Durch eine 5-minütige Zentrifugation mit 14000 rpm bei 4°C (Eppendorf-Zentrifuge 5417R) wurde die Kernfraktion pelletiert und der zytoplasmatische Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und auf Eis gehalten. Die Kerne wurden in 100 µl Puffer C (je Schale) resuspendiert und zur Proteinextraktion 30 min auf Eis inkubiert. Dabei wurden die Kerne gelegentlich aufgewirbelt. Schließlich wurden Kern- und Zytoplasmafraktion für 15 min

bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert und die Überstände als Zytoplasma- bzw. Kernextrakte abgenommen und bei -80°C gelagert.

2.2.6.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Um die Menge der isolierten Proteine zu quantifizieren, wurde der *BCA-Detection-Assay* der Firma Pierce/Bonn verwendet. Diesem Assay liegt die Reduktion von Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen durch die Aminogruppen der Proteine zu Grunde. Die Cu^{1+} -Ionen reagieren mit dem BCA-Reagenz zu einem lilafarbenen Komplex, dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 540 nm gemessen wird und proportional zur vorhandenen Proteinmenge ist.

- Substratlösung A: Na_2CO_3 , NaHCO_3 , Natriumtartrat, BCA-Reagenz
- Substratlösung B: 4% $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$
- BSA-Standardreihe: 2 / 1 / 0,5 / 0,25 / 0,1 / 0,05 [mg/ml] in PBS

Der Assay wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplatte durchgeführt (gerade Vertiefungen), wobei von jeder Proteinprobe eine 1:2 und 1:5 Verdünnung in PBS hergestellt wurde. Von diesen Proben und der BSA-Standardreihe wurden 10 µl/Loch pipettiert, als Blindwert dienten 10 µl PBS. Von allen Messungen wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Nachdem die Proben auf die Platte appliziert worden waren, wurde die Substratlösung hergestellt, indem Lösung A und Lösung B im Verhältnis 50:1 gemischt wurden. Mit einer Multistep-Pipette (Eppendorf) wurde in jedes Loch ein 200-µl-Aliquot der Substratlösung pipettiert und der Ansatz bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend folgte die Extinktionsmessung für jedes Loch bei 540 nm im ELISA-Messgerät (Immunoreader NJ-200). Vom Mittelwert jeder Doppelbestimmung wurde der durchschnittliche Blindwert abgezogen. Mit Hilfe der Eichgeraden, die aus den Extinktionen der Standardreihe und den entsprechenden BSA-Konzentrationen erstellt wurde, ließ sich die Proteinkonzentration für jede Probe errechnen.

2.2.7 RNase/EMSA-Analyse (*electro mobility shift assay*)

(modifiziert nach Mangelsdorf et al., 1991)

Diese Methode erlaubt die *in vitro*-Analyse der Bindung zellulärer Proteine an RNA-Moleküle. *In vitro* transkribierte und radioaktiv markierte RNA wird mit Swiss 3T3-Zellextrakten inkubiert. Dabei kommt es gegebenenfalls zur sequenzspezifischen Bindung RNA-bindender Proteine an die eingesetzte RNA. Bei einer anschließenden RNase-Behandlung werden nur die RNA-Bereiche degradiert, die nicht von Proteinen gebunden sind. Die Reaktionsprodukte werden in einem nativen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt, wobei die Protein/RNA-Komplexe gegenüber den degradierten RNA-Fragmenten im Laufverhalten im Gel verzögert sind (*electro mobility shift*). Der Nachweis erfolgt durch Autoradiographie.

- 10 x Bindungspuffer: 500 mM KCl, 50% Glycerin, 1% NP-40, 10 mM DTT, 10 mM MgCl₂, 100 mM Tris (pH 8)
- tRNA: 2,5 µg/µl in DEPC-H₂O
- 10 x TBE-Puffer: 890 mM Borsäure, 9 mM EDTA, 890 mM Tris; pH 8,4
- 5%iges natives PAA-Gel (35 ml): 5,8 ml Acrylamidlösung (29,2% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid), 3,5 ml 10 x TBE, 25,7 ml DEPC-H₂O, 240 µl APS (10%), 24 µl TEMED

Zunächst wurde das native 5%ige PAA-Gel gegossen. Hierfür wurde die PAGE-Apparatur nach Hoefer (Amersham-Pharmacia/Freiburg) verwendet. Zwei Glasplatten (16 cm x 18 cm) wurden mit Ethanol gründlich gereinigt, die 1,5 mm Teflonabstandhalter angelegt und das Ganze mit Schraubklammern fixiert. Nach Einbau in den Gelgießstand wurde die 5%ige PAA-Lösung hergestellt, die Polymerisierung durch TEMED und APS gestartet und der Zwischenraum zwischen den Glasplatten mit Gellösung bis zum oberen Rand gefüllt. Schließlich wurde der Probenkamm für 15 Taschen eingesteckt.

Während das Gel auspolymerisierte, wurden die RNase/EMSA-Proben vorbereitet. In ein Gesamtvolumen von 30 µl wurden pipettiert:

Probe	RNA	Protein	10 x Puffer	tRNA	DEPC-H ₂ O
RNA-Kontrolle	2,5 ng (~3000 cpm)	-	3 µl	4 µl (=10 µg)	X µl (bis 30 µl)
BSA-Kontrolle	2,5 ng (~3000 cpm)	1 µg	3 µl	4 µl (=10 µg)	X µl (bis 30 µl)
Testansatz	2,5 ng (~3000 cpm)	1-10 µg	3 µl	4 µl (=10 µg)	X µl (bis 30 µl)

Zunächst wurden 10 x Bindungspuffer und tRNA, zum Abblocken unspezifischer Protein-RNA Interaktionen, zusammenpipettiert und je 7 µl des Mixes in sterile Eppendorf-Reaktionsgefäße gegeben. Dann folgte die berechnete H₂O-Menge und die Menge an Zellextrakt, die 1-10 µg entsprachen. Um in der RNA-Kontrolle eine unspezifische RNA-Degradation zu verhindern, wurde 1 µl RNase-Inhibitor hinzugefügt, die anderen Ansätze enthielten keinen Inhibitor. Schließlich wurde die *in vitro* transkribierte ³²P-markierte RNA hinzugegeben, von der in der Regel 20 µl zur Verfügung standen (II.2.1.13.1). 1 µl davon wurde in H₂O 1:200 verdünnt und 1 µl dieser Verdünnung in die Ansätze pipettiert (~3000 cpm). Nach 20 min Inkubation bei RT, in der die Proteine an Zielsequenzen der RNA banden, wurden 10 U RNase T1 in die Ansätze mit Protein gegeben. Dieses Enzym schneidet die RNA nach Guaninbasen, so dass nach 30-minütiger Inkubation bei RT die ungeschützte RNA fragmentiert vorlag.

Schließlich wurden die Ansätze auf das bei 4°C vorgekühlte native 5%ige PAA-Gel aufgetragen und für 2 h bei 200 V und 4°C aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TBE verwendet. Das Gel wurde auf 3 Lagen 3MM Papier plaziert, mit Frischhaltefolie bedeckt und im Gel-

trockner bei 70°C unter Vakuum für 1 h getrocknet. Die Exposition eines Röntgenfilms (Kodak X-OMAT AR) mit Verstärkerfolien wurde für mindestens 1 d bei -80°C vorgenommen.

Die RNase/EMSA-Methode erlaubt einige Modifikationen, mit denen die Proteinbindung an die RNA genauer charakterisiert werden kann. Drei davon werden im Folgenden erläutert.

2.2.7.1 DNase/EMSA-Analyse

Anstelle von radioaktiv markierter RNA wurden 5'-endmarkierte DNA-Oligonukleotide (II.2.1.12.2) einer Bindung durch Swiss 3T3-Proteine zugeführt und die Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Zur Degradation nicht gebundener DNA wurden 10 U DNase I zu den Proben pipettiert und die Ansätze für 30 min inkubiert.

2.2.7.2 Konkurrenz mit nicht-markierter RNA

Um die Spezifität nachgewiesener Proteinbindung an RNA-Sequenzen zu überprüfen, wurden vor der Zugabe der radioaktiv markierten RNA die Proteine mit nicht-markierter RNA in bis zu 50-fachem Überschuss inkubiert. Die Präinkubation mit der nicht-markierten RNA erfolgte für 15 min bei RT. Auch nicht-markierte DNA-Oligonukleotide wurden in dieser Weise eingesetzt.

2.2.7.3 Supershift-Analyse

Um die Wechselwirkung bestimmter Proteine aus dem Swiss 3T3-Zellextrakt mit der MARCKS 3'UTR-RNA nachzuweisen, wurde vor der Zugabe der ³²P-markierten RNA zu den RNase/EMSA-Ansätzen Antiserum (4 µl) hinzugegeben und der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Der Bindungspuffer enthielt für Supershift-Analysen kein NP-40. Zum sogenannten Supershift kam es, wenn das vom Antikörper gebundene Protein mit der RNA interagierte, wodurch die Migration des RNA/Protein-Komplexes im PAA-Gel zusätzlich gebremst wurde.

2.2.8 Gel-Retardation-Assay

(Chung et al., 1996)

Die Bindungsaktivität rekombinanter Hu-Proteine wurde im Gel-Retardation-Assay untersucht. Unterschiedliche Mengen des rekombinanten Proteins wurden mit radioaktiv markierter RNA inkubiert und die Komplexe in einem Agarosegel aufgetrennt. Auf eine Behandlung mit RNase konnte dabei verzichtet werden.

- 10 x Retardation-Puffer: 1,5 M NaCl, 2,5 mg/ml BSA, 2,5 mg/ml tRNA, 500 mM Tris (pH 7)
- Dye-Mix: 50% Glycerin, 0,1% Bromphenolblau, 0,1% Xylencyanol
- 10 x TAE-Puffer: 10 mM EDTA, 400 mM Tris; mit Essigsäure pH 7 eingestellt
- 0,8% Agarosegel (50 ml): 0,4 g Agarose, 5 ml 10 x TAE-Puffer, 45 ml DEPC-H₂O

Zunächst wurde das Agarosegel gegossen, indem die oben beschriebenen Komponenten zusammengegeben und entsprechend II.2.1.8 verarbeitet wurden (Probenkamm mit breiten Taschen). Ethidiumbromid wurde dabei nicht verwendet.

Die Assayproben besaßen ein Gesamtvolumen von 20 µl:

Probe	RNA	rek. Hu-Protein	10 x Puffer	DEPC-H ₂ O
RNA-Kontrolle	2,5 ng (~3000 cpm)	-	2 µl	X µl (bis 20 µl)
Testansatz	2,5 ng (~3000 cpm)	1 ng – 1 µg	2 µl	X µl (bis 20 µl)

Die Ansätze wurden für 10 min bei 37°C inkubiert und anschließend 4 µl Dye-Mix in jeden Ansatz pipettiert. 6 µl vom Gesamtansatz wurden auf das 0,8%ige Agarosegel aufgetragen und für 2-3 h bei 200 V und 4°C aufgetrennt. Als Elektrophoresepuffer wurde 1 x TAE-Puffer verwendet. Das Agarosegel wurde auf 3 Lagen 3MM Papier gelegt und bei 50°C unter Vakuum für 1 h getrocknet. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm für 1-5 Tage exponiert (Kodak X-OMAT AR mit Verstärkerfolien, bei -80°C).

2.2.9 UV-crosslink-Assay

(Kjems et al., 1998)

Fotochemische Quervernetzung kann dazu verwendet werden, Protein-RNA u.a. Interaktionen nachzuweisen. Besonders die Verwendung von kurzwelligem UV-Licht (254 nm) ist aufgrund der effektiven Quervernetzung geeignet. Durch die Bestrahlung mit Licht dieser Wellenlänge werden die aromatischen Ringe der RNA-Basen (insbesondere Uracil) aktiviert und kovalent mit den Seitenketten aromatischer Aminosäuren (vor allem Phenylalanin), die mit der RNA interagieren, verknüpft. Da diese Vernetzung irreversibel ist, können nach Degradierung nicht vernetzter RNA mit RNase A (Schnitt nach jeder Pyrimidinbase) die Proteine einer denaturierenden SDS-PAA-Gelelektrophorese unterzogen und durch Autoradiographie die RNA-bindenden Proteine nachgewiesen werden.

- 10 x Bindungspuffer, tRNA: vgl. RNase/EMSA (II.2.2.7)
- SDS-PAA-Gel, 2 x Laemmli-Probenpuffer, 5 x Elektrophoresepuffer: vgl. II.2.2.1.1, Gießanleitung für das Gel wie Tab. 2 (Angaben mit Faktor 3 (1 mm Spacer) bzw. 5 (1,5 mm Spacer) multiplizieren)

Zur Durchführung des UV-crosslink-Assays wurde zunächst wie bei der RNase/EMSA-Analyse vorgegangen. Die eingesetzten Proteinmengen betragen dabei mindestens 1 µg Zellextrakt oder 10 ng rekombinantes Protein. Nach 15-minütiger Inkubation von Protein und RNA bei RT schloss sich die Bestrahlung mit UV-Licht an. Dazu wurde eine Plexiglasbox (Wanddicke 1,5 cm) mit Eis gefüllt und die Crosslink-Proben in der Box auf das Eis gelegt (nicht ins Eis gesteckt!). Die Box wurde in einem Stratalinker (Stratagene/Amsterdam) plaziert und mit 180 mJ UV-Licht (Dauer 1 min 45 s) bestrahlt. Jedem Ansatz wurden 10 µg RNase A zugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation bei RT und Zugabe von je 30 µl 2 x Laemmli-Probenpuffer (II.2.2.1.1) wurden die Proben für 10 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf ein 10%iges oder 12,5%iges SDS-PAA-Gel aufgetragen (Hoefer Gelapparatur). Parallel wurde ein vorgefärbter Proteinmarker aufgetragen. Er diente zur Größenabschätzung der RNA-bindenden Proteine. Der Gellauf erfolgte ü.N. bei 50 V und RT. Analog zur RNase/EMSA-Analyse wurde das Gel getrocknet und autoradiographisch ausgewertet (II.2.2.7).

In einigen Experimenten wurde im Anschluss an den UV-crosslink-Assay eine Western Blot Analyse durchgeführt. Nach dem Gellauf wurde das Gel nicht getrocknet, sondern die Proteine per *Semi-Dry-Blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen (II.2.2.1.2). Die Membran wurde erst autoradiographisch ausgewertet (Kodak X-OMAT AR mit Verstärkerfolien, 1-3 d bei -80°C) und anschließend, wie unter II.2.2.1.3 und II.2.2.1.4 beschrieben, weiter verwendet. Als Antiserum wurden die in dieser Arbeit affinitätsgereinigten polyklonalen Hu-Antikörper eingesetzt.

2.2.10 Northwestern-Analyse

(Sela-Brown et al., 2000)

Eine weitere Möglichkeit, die Bindung von Proteinen an RNA nachzuweisen, stellt die Northwestern-Analyse dar. Dabei werden Proteinextrakte zunächst denaturiert und im SDS-PAA-Gel aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran folgt eine Absättigung nicht belegter Bindungsplätze. Die Membran wird mit einer radioaktiv markierten RNA inkubiert, wobei es zur Bindung der RNA-Moleküle an RNA-bindende Proteine kommt. Durch Autoradiographie werden diese dann sichtbar gemacht. Der Vorteil dieser Methode liegt darin, dass auch Proteine mit niedriger Affinität zur untersuchten RNA nachgewiesen werden und Änderungen in den Bindungseigenschaften der Proteine infolge unterschiedlicher Behandlung der Zellen detektiert werden können. Allerdings ist gegebenenfalls eine Renaturierung der Proteine nach dem Transfer erforderlich, da die Fähigkeit zur RNA-Bindung durch die Denaturierung verloren gehen kann. Dies kann dazu führen, dass RNA/Protein-Interaktionen nicht nachgewiesen werden können, obwohl sie stattfinden. In dieser Arbeit wurde auf eine Renaturierung allerdings verzichtet.

- 1 x TBS + Tween: 150 mM NaCl, 0,05% Tween, 10 mM Tris (pH 8)
- Blockierungspuffer: 40 mM KCl, 500 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 mM EDTA, 5% (v/v) Glycerin, 0,2% NP-40, 1 mM DTT, 0,3% PMSF, 5 mg/ml BSA, 10 mM HEPES; pH 7,6
- TEN 50: 50 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 10 mM Tris; pH 7,5
- Bindungspuffer: 150 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0,2 mM DTT, 8% (v/v) Glycerin, 10 mM HEPES; pH 7,6
- 12,5% SDS-PAA-Gel, 2 x Laemmli-Probenpuffer, Elektrophoresepuffer: vgl. II.2.2.1.1, Gießanleitung für das Gel wie Tab. 2 (Angaben mit Faktor 3 (1 mm Spacer) multiplizieren)

In die Probestaschen eines 12,5%igen SDS-PAA-Gels (Hoefer-Gelapparatur) wurden je 10 µg Zellextrakt pipettiert (II.2.2.1.1) und die Proteine nach der Elektrophorese ü.N. bei 50 V durch Elektrotransfer (II.2.2.1.2) auf eine in Transferpuffer equilibrierte Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,44 µm) übertragen. Nach 90-minütigem Transfer wurde die Membran aus der Blotapparatur herausgenommen und für 15 min in TBS + Tween gelegt. Anschließend folgte der Blockierungsschritt. Dazu wurde die Membran zusammen mit 5 ml Blockierungspuffer, dem DTT, PMSF und BSA frisch zugesetzt worden waren, in Folie eingeschweißt und für 15 min auf einem Taumeltisch bei RT inkubiert. Das zugegebene BSA im Puffer diente der Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran. Die Membran wurde aus der Folie genommen und zweimal in TEN 50 gewaschen (frische Zugabe von DTT). Dem Bindungspuffer wurden 100 µg/ml tRNA und die ³²P-markierte *in vitro* transkribierte RNA mit der Aktivität von 60000 cpm/ml zugesetzt, bevor er zur Membran gegeben wurde (2,5 ml). Die Inkubation mit der RNA-Sonde erfolgte in eine Folie eingeschweißt für 20 min bei 37°C und weitere 2 h bei RT. Schließlich wurde die Membran aus der Folie herausgenommen und zweimal in TEN 50 für 5 min gewaschen, um unspezifisch gebundene RNA von der Membran zu entfernen. Die Membran wurde in Frischhaltefolie eingeschlagen und ein Röntgenfilm (Kodak AR) mit Verstärkerfolien der Membran bei -80°C für 1-3 Tage exponiert.

2.2.11 RNA *in vitro*-Degradationsanalyse

(McMillan et al., 1993; Klaff, 1995)

Um den RNA-Abbau in einem definierten, zellfreien System zu analysieren, wurde eine *in vitro* Degradationsanalyse durchgeführt. Dazu wurde *in vitro* transkribierte, nicht-markierte MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA eingesetzt. Diese wurde mit Swiss 3T3-Proteinen für unterschiedliche Zeitintervalle inkubiert, anschließend gereinigt und die verbliebene RNA mit Hilfe der Northern Blot Analyse nachgewiesen.

- 10 x Decay-Puffer: 50 mM KCl, 1,5 mM NaCl, 10 mM K-Acetat, 25 mM MgCl₂, 1 mM DTT, 0,25% Triton X-100, 200 mM Tris (pH 8)
- Stopp-Puffer: 6 M Harnstoff, 1% SDS, 4,5 mM Aurintricarbonsäure
- Phenol, Chloroform, Ethanol, Na-Acetat

Wie unter II.2.1.13.1 beschrieben, wurde MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA ohne radioaktive Markierung *in vitro* synthetisiert. Jeder Decay-Ansatz enthielt (100 µl):

Probe	RNA	Protein	10 x Puffer	DEPC-H ₂ O
Puffer-Kontrolle	4 µl	-	10 µl	X µl (bis 100 µl)
Decay-Probe	4 µl	40 µg	10 µl	X µl (bis 100 µl)

Unmittelbar nach Zugabe der RNA wurde ¼ des Reaktionsansatzes (25 µl) als Startwert der Degradation entnommen und mit 25 µl Stopp-Puffer versetzt. Nach 5, 10 und 20 min wurde ebenso verfahren, so dass vier Zeitpunkte der RNA-Degradation festgehalten wurden. Um den proteinabhängigen RNA-Abbau von unspezifischer Degradation unterscheiden zu können, wurde eine Puffer-Kontrolle mitgeführt, die kein Protein enthielt, aber in gleicher Weise behandelt wurde. DEPC-H₂O (50 µl) wurde zu jeder Probe hinzugefügt und eine Phenol/Chloroformextraktion (1:1) vorgenommen. Nach einer weiteren Chloroformextraktion wurde die RNA mit 1/10 Volumen Acetat und dreifachem Volumen Ethanol ü.N. bei -80°C gefällt. Die RNA wurde 30 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge 5417R), mit je 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen und bei RT getrocknet. Die RNA wurde in 15 µl DEPC-H₂O aufgenommen und bis zur Northern Blot Analyse (II.2.1.13.2) bei -20°C aufbewahrt.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Kultivierung von Swiss 3T3-Fibroblasten

(Higgins & Rozengurt, 1994; Dicker & Rozengurt, 1980)

Bei der Kultivierung der Swiss 3T3-Zellen muss darauf geachtet werden, dass die Zellen im subkonfluenten Zustand passagiert werden. Sonst besteht die Gefahr, dass sich Populationsvarianten etablieren, die unter konfluenten Bedingungen noch wachsen können. Um dies zu gewährleisten, wurden die Zellen in 10-cm-Zellkulturschalen mit einer Dichte von $0,5 \times 10^5$ Zellen in 10 ml Kulturmedium ausplattiert und alle 3 bis 4 Tage passagiert. Insgesamt wurden etwa 25 Passagen durchgeführt, bevor eine frische Zellcharge aufgetaut wurde.

- Kulturmedium: DMEM und 12,5% FBS; auf 37°C vorgewärmt
- Versene: 0,2 g/l EDTA in 1 x PBS (pH 7); auf 37°C vorgewärmt
- Trypsin-Lösung: 0,025% Trypsin in Versene
- Trypanblau-Lösung: 0,1% Trypanblau in 1 x PBS

Zum Passagieren wurden die adhärennten Zellen nach Absaugen des Kulturmediums zweimal mit 5 ml Versene/Schale gewaschen. Zum vollständigen Ablösen der Zellen wurden je Schale 500 µl frisch hergestellte Trypsin-Lösung zupipettiert und die Zellen für 3-4 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Klopfen der Schale gegen die Tischkante vereinzelt und der Erfolg der Prozedur wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach Abstoppen der Trypsinierung mit 5 ml FBS-haltigem Medium wurden die abgelösten Zellen in einem 10-ml-Röhrchen gesammelt. Ein 50-µl-Aliquot wurde mit 50 µl Trypanblau-Lösung vermischt und der Anteil lebender, d.h. nicht blau gefärbter Zellen, in der Neubauer-Zählkammer ermittelt. Mit der bestimmten Zellzahl wurde berechnet, wieviel Zelllösung in eine neue Kulturschale zu 10 ml Medium pipettiert werden musste, um die gewünschte Zelldichte zu erhalten. Sollten Swiss 3T3-Zellen für Experimente bereitgestellt werden (Protein- oder RNA-Ernte), wurden die Zellen mit einer Dichte von 1×10^5 Zellen/Schale ausplattiert und die Kulturen 8-10 Tage im Begasungsbrutschrank bei 37°C kultiviert. Nach dieser Zeit waren die Schalen konfluent mit Swiss 3T3-Zellen bewachsen und die Zellen infolge des Verbrauchs der Wachstumsfaktoren in der G_0 -Phase des Zellzyklus arretiert. Dies konnte anhand der gleichförmigen und abgekugelten Morphologie der Zellen im Mikroskop kontrolliert werden.

2.3.2 Kultivierung von MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen

(Clontech/Heidelberg)

Für die Kultivierung der MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen gelten die selben Bedingungen, die für Swiss 3T3-Zellen beschrieben wurden (II.2.3.1). Nur die Zusammensetzung des Kulturmediums unterschied sich vom Medium, das für Swiss 3T3-Zellen verwendet wurde.

- Kulturmedium: DMEM, 10% FBS (Tet-System geprüft), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 100 µg/ml G418 (+ 50 µg/ml Hygromycin und 1 µg/ml Doxycyclin bei stabil transfizierten Zellen)

Bei stabil transfizierten Zellen wurden zur Aufrechterhaltung des Selektionsdrucks 50 µg/ml Hygromycin ins Medium gegeben. Das Medium enthielt außerdem 1 µg/ml Doxycyclin, wodurch die Expression des Transgens abgeschaltet wurde (Tetoff).

2.3.3 Kultivierung von PCC7-Mz1-Zellen

(Lang et al, 1989)

Die Kultivierung der PCC7-Mz1-Stammzellen erfolgte in 20 ml Kulturmedium in 75-cm²-Kulturflaschen bei 10% CO₂ und 37°C im Begasungsbrutschrank. Damit sich die Zellen während der gesamten Kultivierungsdauer in der Wachstumsphase befanden, wurden die Zelldichten beim Ausplattieren auf 1 x 10⁴ Zellen/cm² (48 h-Kultur) und 0,5 x 10⁴ Zellen/cm² (72 h-Kultur) eingestellt. Zur Passage wurden die Zellen durch Abspülen mit Medium vereinzelt. Insgesamt wurden 40 Passagen kultiviert.

- Kulturmedium: DMEM, 12,5% FBS (Charge 148, Roche-Biochemicals/Mannheim)

Zur Ernte von Proteinen wurden die Zellen mit einer Dichte von 1,75 x 10⁴ Zellen/cm² in 10-cm-Zellkulturschalen ausplattiert, mit 10 ml Kulturmedium versorgt und für einen Tag kultiviert.

2.3.4 Auftauen und Einfrieren von Zellen

Um Zellen aufzutauen, die in 2-ml-Einfrierampullen in flüssigem Stickstoff tiefgefroren worden waren, wurde eine Ampulle zügig und unter leichtem Schütteln bei 37°C im Wasserbad erwärmt. Nach Überführen der Zellen in ein steriles 10-ml-Röhrchen wurde das im Einfriermedium befindliche DMSO mit 5 ml Kulturmedium tropfenweise ausgedünnt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 1000 rpm (Labofuge GL/Heraeus) und RT wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml frischem Kulturmedium aufgenommen und in eine 10-cm-Kulturschale gegeben (Passage 0). Nach 1-2 Tagen Kultivierung im Begasungsbrutschrank waren die Zellen an die Wachstumsbedingungen gewöhnt, so dass die erste Passage vorgenommen werden konnte.

- Einfriermedium: das jeweilige Kulturmedium (ohne G418/Hygomycin) + 10% DMSO

Zum Einfrieren von Zellen wurde zunächst wie beim Passagieren verfahren (Waschen, Ablösen und Aufnehmen der Zellen in 5 ml Kulturmedium). Die geernteten Zellen wurden bei 1000 rpm und RT für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet je nach Zellmenge in 1-2 ml Einfriermedium aufgenommen und auf 2-ml-Einfrierampullen (Nunc/Wiesbaden) verteilt (~5 x 10⁵ Zellen/ml, 1 ml/Ampulle). Zum schonenden Einfrieren der Zellen wurden die einzufrierenden Ampullen in einer Styroporbox, die mit Zellstoff ausgekleidet war, für 4-5 Tage bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

2.3.5 Transfektion eukaryontischer Zellen

Unter Transfektion versteht man die Einschleusung von Nukleinsäuren in höhere Zellen durch nicht-virale Methoden. Speziell für den Transfer von Plasmid-DNA in Säuger-Zellen wurden verschiedene Methoden entwickelt, mit denen bei unterschiedlichen Zelllinien ganz unterschiedliche Transfektionseffizienzen erreicht wurden. Die hier angewandte Methode der Lipofektion (Fraleigh, 1980; Felgner et al., 1987) mit dem Produkt Lipofectamin 2000 (Life Technologies/Karlsruhe) hat sich für Fibroblasten als die am effektivsten erwiesen (Rössler, 1999). Sie beruht auf der Bildung von Lipid-DNA-Komplexen nach Mischung kationischer Phospholipide mit der zu transfizierenden DNA. Die positiv geladenen Kopfgruppen der Lipide interagieren mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und neutralisieren so die DNA, wodurch eine nähere Assoziation der Komplexe mit der Zellmembran möglich wird. Über die lipophilen Lipidschwänze internalisieren die Komplexe durch Endocytose oder Fusion mit der Zellmembran.

Lipofectamin 2000™ ist eine Weiterentwicklung des Zweikomponentensystems Lipofectamin Plus® und enthält das polykationische Lipid 2,2-dioleoyloxy-N-[2(spermincarboxyamido)ethyl]-N,N-dimethyl-1-propaniumtrifluoroacetat (DOSPA) zu drei Teilen und das neutrale Lipid DOPE zu einem Teil. Die DNA wird nicht vorkomplexiert, sondern direkt mit der Lipidlösung vermischt.

2.3.5.1 Transiente Transfektion von Swiss 3T3-Zellen

(Gorman, 1985)

Um eingeschleuste Gene zu exprimieren, müssen sie nicht ins Genom der Zellen integriert werden. Als extrachromosomale DNA können Plasmide aber in eukaryontischen Zellen nicht repliziert werden und gehen daher wenige Tage nach der Transfektion durch Verdünnung infolge der Zellteilung und durch nukleolytischen Abbau verloren. Die Effekte der Genexpression nach einer transienten Transfektion werden deshalb zwischen 12 und 72 h nach der Transfektion untersucht.

- DNA-Lösung I: 30 µg DNA von pTetoff + 30 µg DNA von pTRE-HuD; in 1 ml DMEM ohne Serum
- DNA-Lösung II: 30 µg DNA von pTetoff + 30 µg DNA von pTRE-HuR; in 1 ml DMEM ohne Serum
- DNA-Lösung III: 30 µg DNA von pTetoff + 30 µg DNA von pTRE; in 1 ml DMEM ohne Serum
- Lipofectamin 2000-Lösung: 20 µl Lipofectamin 2000 in 1 ml DMEM ohne Serum

Für die transiente Expression von HuD bzw. HuR in Swiss 3T3-Zellen wurden die zum Tetoff-System gehörenden Vektoren pTetoff und pTRE-HuD, pTRE-HuR und pTRE (II.1.6.10 und II.1.6.11) verwendet. Die Transfektion wurde mit Zellen in 10-cm-Schalen durchgeführt, die einen Tag vor der Transfektion mit einer Dichte von $3,5 \times 10^5$ Zellen/Schale ausplattiert worden

waren. In 15-ml-Röhrchen wurden drei Transfektionslösungen (I, II und III) hergestellt, indem jeweils DNA-Lösung I, II oder III mit Lipofectamin 2000-Lösung im Verhältnis 1:1 vereinigt wurde. Nach Inkubation für 20 min bei RT wurden die jeweiligen Transfektionslösungen I, II oder III den entsprechenden Schalen mit Swiss 3T3-Zellen zupipettiert (2 ml/Schale) und die Zellen im Begasungsbrutschrank bei 37°C für 24 h kultiviert. Anschließend wurde das Experiment zur Wirkung von HuD bzw. HuR auf die MARCKS-Expression durchgeführt.

2.3.5.2 Stabile Transfektion von MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen

Wenn Zellen nach Einschleusen der DNA diese durch illegitime Rekombination in ihr Genom integrieren, spricht man von stabiler Transfektion. Diese Integration ist aber ein sehr seltenes Ereignis, nur etwa 0,001 bis 1% der transfizierten Zellen zeigen dieses Phänomen (Chen & Okayama, 1987). Damit man diese Zellen anreichern kann, werden positive Selektionsmarker verwendet, die in der Regel mit auf dem transfizierten Plasmid liegen und ebenfalls ins Zellgenom integriert werden. Es handelt sich dabei um Resistenzgene gegen bestimmte Antibiotika, wie z.B. das *hph*-Gen, welches für eine Phosphotransferase kodiert, die den Proteinsynthese-Inhibitor Hygromycin inaktiviert (Hygromycin-Phosphotransferase).

MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen (II.1.8.2) sind vom Hersteller (Clontech/Heidelberg) bereits einer stabilen Transfektion unterzogen worden. Dabei wurde der Vektor pTetoff (II.1.6.10) in die MEF/3T3-Zellen eingeschleust und durch G418-Selektion wurden stabile Transfektanten isoliert, die den Tetracyclin-regulierten Transaktivator (tTA) konstitutiv exprimieren. Die MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen wurden in dieser Arbeit verwendet, um in einer zweiten Transfektion das RNA-bindende Protein HuD stabil unter Kontrolle des tTA zu exprimieren. Da der Vektor pTRE, in den die cDNA von HuD einkloniert worden war, keinen Selektionsmarker besaß (II.1.6.11), musste eine Kotransfektion von pTRE-HuD und pTK-Hyg, einem Vektor, der das Gen für die Hygromycinresistenz trägt (II.1.6.12), durchgeführt werden. Indem das molare Verhältnis von pTRE-HuD zu pTK-Hyg auf 9:1 eingestellt wurde, sollte gewährleistet werden, dass möglichst viele Hygromycin-resistente Zellen HuD exprimierten.

- DNA-Lösung: 9 µg DNA von pTRE-HuD + 1 µg DNA von pTK-Hyg; in 250 µl DMEM ohne Serum
- Lipofectamin 2000-Lösung: 5 µl Lipofectamin 2000 in 250 µl DMEM ohne Serum
- Medium zum Selektieren stabiler Transfektanten: Kulturmedium für MEF/3T3-Tetoff[®] (II.2.3.2) + 100 µg/ml Hygromycin + 1 µg/ml Doxycyclin

Einen Tag vor der Transfektion wurden 4×10^3 MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen in einer 3-cm-Kulturschale ausplattiert, mit 3 ml Medium versorgt und bei 37°C kultiviert. Dem Medium war Doxycyclin (1 µg/ml) beigelegt, einem Analogon von Tetracyclin, welches im Vergleich zu Tetracyclin im Medium eine etwas längere Halbwertszeit (2 d) hat und bei niedrigeren Konzentrationen

wirksam ist. Damit war das Abschalten der (Trans)genexpression während der gesamten Transfektionsdauer gewährleistet. Wie bei der transienten Transfektion wurden am folgenden Tag DNA- und Lipofectamin 2000-Lösung vereinigt und das Gemisch nach 20 min Inkubation bei RT den Zellen zupipettiert. Nach 24 h wurden die Zellen wie unter II.2.3.1 beschrieben trypsinisiert und auf 4 Löcher einer 6-Loch-Platte ausgesät. Innerhalb der folgenden 48 h teilten sich die Zellen und ein Teil der Zellen integrierte dabei die transfizierte DNA ins Genom. Nach diesen zwei Tagen wurde durch Zugabe von Hygromycin (100 µg/ml) mit der Selektion begonnen. Um tote Zellen und Zelltrümmer (Debris) zu entfernen, wurde nach zwei weiteren Tagen das selektive Medium gewechselt, wobei ca. 0,5 ml auf den Zellen belassen wurden. Dadurch blieben den Zellen selbst gebildete Faktoren erhalten. Aufgrund begrenzter Halbwertszeiten von Doxycyclin und Hygromycin im Medium musste bis zur Detektion Hygromycin-resistenter Zellkolonien nach 24 Tagen alle zwei Tage Doxycyclin (1 µg/ml) und alle 4 Tage Hygromycin (100 µg/ml) erneuert werden. Darüberhinaus wurde jede Woche ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die resistenten Zellen aus einem Loch der 6-Loch-Platte wurden trypsinisiert und als Pool stabiler Transfektanten eingefroren (II.2.3.4), die übrigen Zellen einer „limitierenden Verdünnung“ unterzogen, um Abkömmlinge einzelner Klone zu isolieren. Dazu wurden die Zellen durch Trypsinierung abgelöst, in der Neubauer-Zählkammer ausgezählt und 100 µl dieser Zelllösung in 10 ml hygromycinhaltigem Medium verdünnt. Ein Volumen, das 100 bzw. 200 Zellen entsprach, wurde entnommen und jeweils mit Medium auf 10 ml aufgefüllt. Von beiden Zellverdünnungen wurden mit einer Multistep-Pipette mit steriler Combitip (Eppendorf) 100 µl in jedes Loch einer 96-Loch-Mikrotiterplatte pipettiert, die Platten mit Frischhaltefolie umwickelt und die Zellen im Brutschrank kultiviert. Die Frischhaltefolie sollte Mediumverlust infolge von Verdunstung verhindern. Rein rechnerisch waren damit in jedes Loch eine bzw. zwei Zellen überführt worden. Das hygromycinhaltige Medium in jedem Loch wurde jede Woche erneuert und die Zellen bis zur Konfluenz kultiviert. Bei Erreichen der Konfluenz wurden die Transfektanten in eine 24-Loch-Platte überführt und dann schrittweise in eine 6-Loch-Platte, eine 6-cm-Schale und schließlich eine 10-cm-Schale passagiert. Die dazu notwendigen Volumina an Versene zum Waschen der Zellen, Trypsinlösung, Medium zum Abstoppen und Vereinzeln der Zellen und vorgelegtem Medium im jeweiligen Kulturgefäß sind Tabelle 3 zu entnehmen.

von auf	Versene [ml]	Trypsinlösung [ml]	Abstopp- medium [ml]	vorgelegtes Medium [ml]
96-Loch-Platte 24-Loch-Platte	0,1	0,05	0,1	1
24-Loch-Platte 6-Loch-Platte	0,5	0,1	0,5	2,5
6-Loch-Platte 6-cm-Schale	1	0,3	1	4
6-cm-Schale 10-cm-Schale	2,5	0,4	2	8

Tab. 3: Übersicht über die eingesetzten Volumina bei der schrittweisen Passage von stabilen Transfektanten
Die Passage erfolgte wie im Text beschrieben.

Die konfluenten Zellen der 10-cm-Schale wurden vor dem Einfrieren (II.2.3.4) im Hinblick auf die HuD-Expression unter Kontrolle des Tet-Operons getestet. Dazu wurden in zwei 6-cm-Schalen stabile MEF-Tetoff-Klone mit bzw. ohne Doxycyclinzusatz im Medium ausplattiert. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen geerntet, Extrakte hergestellt (II.2.2.6.1) und diese durch Western Blot Analyse untersucht (II.2.2.1).

III. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit wurde der Mechanismus analysiert, der für die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in Swiss 3T3-Zellen verantwortlich ist (Brooks et al., 1991, 1992; Herget et al., 1993, 1994). Im Gegensatz zu neuronalen PCC7-Mz1-Zellen führt die Behandlung von ruhenden Swiss 3T3-Zellen mit Wachstumsfaktoren, Neuropeptiden oder Phorbol ester zur Degradation der MARCKS-mRNA (Schäfer, 1997; Rössler, 1999). Dass der 3' nichttranslatierten Region (3'UTR) der MARCKS-mRNA dabei eine zentrale Bedeutung zukommt, war bereits bekannt. Verschiedene Proteine aus Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Zellen binden an Sequenzen innerhalb der MARCKS 3'UTR und sind möglicherweise für die unterschiedliche Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in den beiden Zelltypen verantwortlich (Schäfer, 1997). Darüber hinaus ergaben Reporter gen-Studien nach stabiler Transfektion von chimären Luciferase-MARCKS 3'UTR-Konstrukten in Swiss 3T3-Zellen, dass die 3'UTR konstitutiv die Luciferase-mRNA destabilisiert (Rössler, 1999). Damit ließ sich das Vorhandensein von *cis*-Elementen innerhalb der 3'UTR postulieren, welche durch Wechselwirkung mit Proteinen diese Instabilität vermitteln.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden diese *cis*-Elemente innerhalb der MARCKS 3'UTR identifiziert. Nachdem solche Sequenzmotive charakterisiert worden waren, wurde im zweiten Teil versucht, die Identität der mit diesen RNA-Sequenzen interagierenden Swiss 3T3-Proteine (*trans*-Faktoren) aufzudecken. Im dritten Teil wurde schließlich durch Transfektionsstudien die Funktion eines der MARCKS 3'UTR bindenden Proteine bei der Stabilitätskontrolle der MARCKS-mRNA untersucht.

1 Identifizierung zweier *cis*-Elemente innerhalb der MARCKS 3'UTR

Die Identifikation von *cis*-Elementen innerhalb der MARCKS 3'UTR erforderte ausreichende Mengen an MARCKS 3'UTR-RNA. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente dienten die unter *Material und Methoden* (II.1.6.2) beschriebenen exonukleolytischen Deletionsklone pBS-DC1 bis pBS-DC10 als Ausgangsmaterial.

1.1 Die pBS-MARCKS 3'UTR Deletionsklone

Die cDNA der MARCKS 3'UTR war in pBluescript einkloniert (pBS-DC1). Von diesem Plasmid waren durch exonukleolytischen Verdau des MARCKS 3'-Endes neun Deletionsklone erzeugt worden (pBS-DC2 bis pBS-DC10; Schäfer, 1997). Stromaufwärts des 5'-Endes der einklonier-

ten MARCKS-Sequenzen befand sich im Vektor ein T7-Promotor, der zur *in vitro* Transkription des MARCKS 3'UTR Inserts durch die T7 RNA Polymerase genutzt wurde (Abb. 4A).

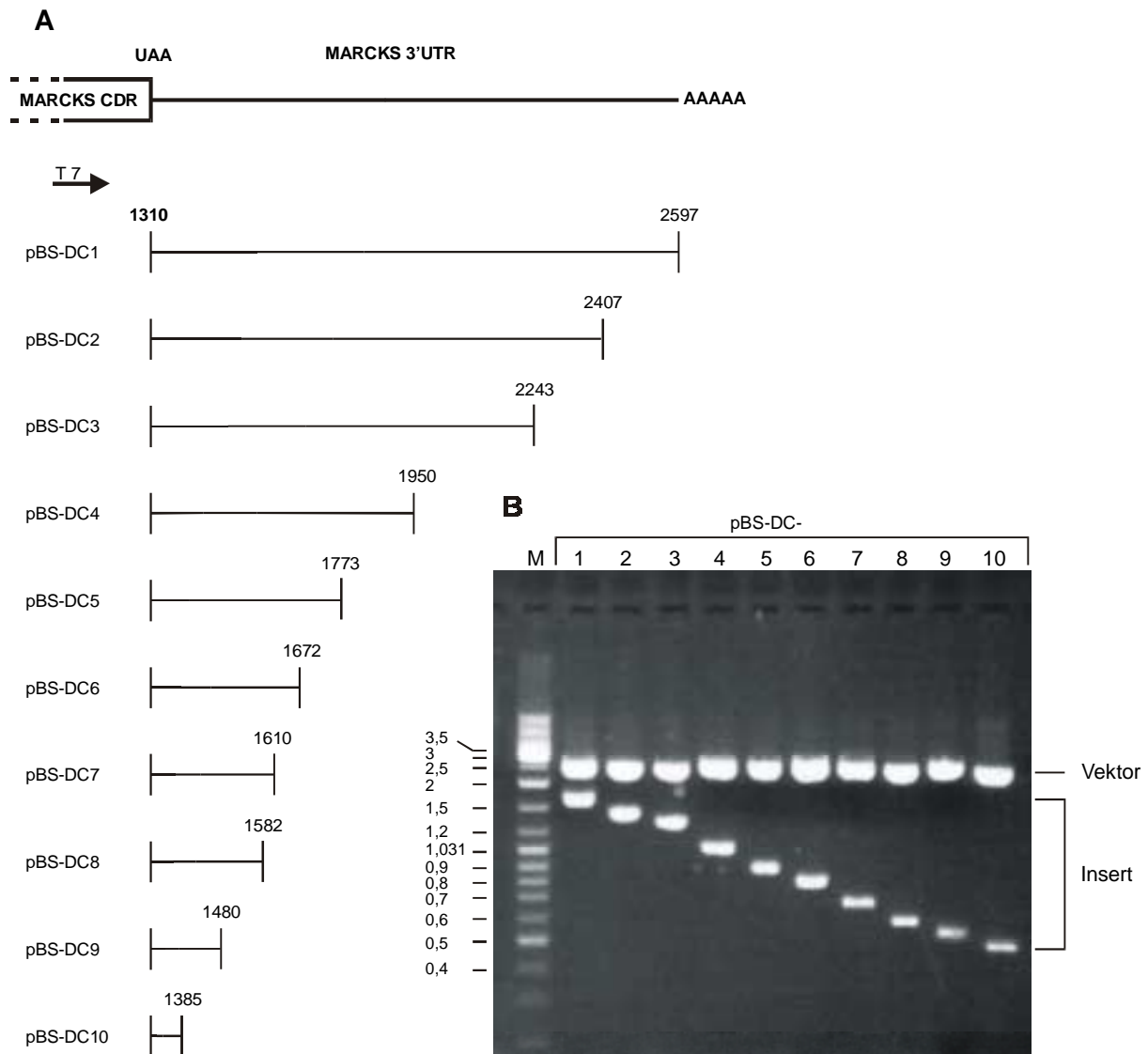


Abb. 4: pBS-MARCKS 3'UTR (pBS-DC1) und neun Deletionsklone (pBS-DC2 – pBS-DC10)

A: Schematische Übersicht der MARCKS 3'UTR (CDR: kodierende Region). Darunter sind die in pBluescript einklonierten Fragmente der 3'UTR, die durch exonukleolytischen Verdau erzeugt wurden (Schäfer, 1997), dargestellt (pBS-DC1 – pBS-DC10). Die Positionen der 5'- und 3'-Enden der Inserts nach Seykora et al. (1991) sind angegeben, ebenso die T7-Promotorregion für *in vitro* Transkriptionen unmittelbar vor dem 5'-Ende der MARCKS Sequenzen.

B: Restriktionsverdau der Deletionsklon-DNA. Die Plasmid-DNAs wurden mit dem Restriktionsenzym *PvuII* geschnitten und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach der Gelelektrophorese wurden die Ethidiumbromid-gefärbten DNA-Banden unter UV-Licht fotografiert. Die obere Bande in jedem Ansatz repräsentiert den pBluescript-Vektoranteil (2,513 kb), die untere Bande die 3' deletierten MARCKS-Sequenzen (z.B. pBS-DC1: 0,448 kb Polylinker + 1287 bp MARCKS 3'UTR; pBS-DC10: 0,448 kb Polylinker + 75 bp MARCKS 3'UTR; vgl. Tab. 1 in II.1.6.2). Die MARCKS 3'UTR-Anteile wurden durch Sequenzierung der Deletionsklone ermittelt. Die Größen der Markerbanden (M) sind in kb angegeben.

1.1.1 Präparation und Kontrolle der pBS-MARCKS 3'UTR Plasmid-DNA

Plasmid-DNA von allen 10 Deletionsklonen wurde in kompetente *E.coli* XL-1 Blue Bakterien retransformiert und nach Minipräparation durch Verdau mit dem Restriktionsenzym *PvuII* kontrolliert. Die Schnittstellen für *PvuII* in pBluescript KSII⁺ befinden sich 5' und 3' vom Polylinker und grenzen eine Fragmentgröße von 448 bp ein. Folglich ergab die Restriktion mit diesem Enzym, dass zwei Banden nach elektrophoretischer Auftrennung der DNA im 1%igen Agarosegel detektiert wurden: Eine Vektorbande von 2,513 kb Länge und eine *PvuII*-Fragment-Bande, die sich aus dem 0,448 kb Vektoranteil und den jeweiligen MARCKS 3'UTR cDNA-Sequenzen zusammensetzte (Abb. 4B). Die Konstrukte wurden sequenziert und damit die Länge der MARCKS 3'UTR-Anteile genau ermittelt.

1.1.2 Herstellung der MARCKS 3'UTR Transkripte

Um die Deletionsklon-DNA *in vitro* zu transkribieren, wurden die Vektoren stromabwärts vom Insert linearisiert. Dabei war darauf zu achten, dass der Restriktionsschnitt zu glatten oder 3' zurückhängenden Einzelstrangenden der zu transkribierenden cDNA führte, da sonst die Möglichkeit bestand, dass die RNA-Polymerase während der Transkription am 3'-Ende auf den Gegenstrang wechselte und die Transkripte fälschlicherweise verlängerte. Der Verdau des pBS-MARCKS 3'UTR (pBS-DC1) Plasmids mit *HindIII* führte zu 3' zurückhängenden Einzelstrangenden, so dass korrekte Transkripte bei der anschließenden *in vitro* Transkription entstanden. Für die übrigen Deletionsklone (pBS-DC2 bis pBS-DC10) war dies nicht möglich. Im Zuge der exonukleolytischen Deletion war neben MARCKS-Sequenzen auch die Polylinkerregion mit den Restriktionsschnittstellen, darunter *HindIII*, deletiert worden. Um die Deletionsklone dennoch zu linearisieren, wurden die Plasmide mit *PvuII* geschnitten, welches die pBluescript-DNA an Position 529 und 977 schneidet, also zu beiden Seiten des MARCKS-Inserts. Bei Verwendung auf diese Weise linearisierter DNA als DNA-*template* bei der *in vitro* Transkription besaßen die entstehenden MARCKS-Transkripte am 3'-Ende zusätzliche 218 Vektornukleotide. Dies hatte aber keinen Einfluss auf die untersuchte Wechselwirkung zwischen RNA und Proteinen (nicht gezeigt).

Nach der *in vitro* Transkription der linearisierten DNA-*templates* (II.2.1.13.1) wurde die Ausbeute und Integrität der synthetisierten Transkripte durch Gelelektrophorese eines Aliquots der Transkriptionsansätze in einem 1%igen Agarosegel unmittelbar vor der Zugabe von DNase I kontrolliert (Abb. 5). Mit allen eingesetzten DNA-Matrizen ließen sich entsprechende RNA-Transkripte herstellen. Dabei lag die Ausbeute zwischen 10 und 15 µg RNA bei 1 µg eingesetztem DNA-*template*. Zum Größenvergleich wurde im Gel ein DNA-Marker mit aufgetrennt. Da die Markerbanden aus doppelsträngigen DNA-Fragmenten bestehen, die RNA-Transkripte aber einzelsträngig sind und sich dadurch Sekundärstrukturen bilden, kann keine direkte

Größenabschätzung erfolgen. Das durch die unterschiedliche Transkriptlänge bedingte Leitermuster der RNA-Banden ist gut erkennbar. Die synthetisierte RNA wurde wie unter II.2.1.13.1 beschrieben nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung in RNase-freiem Wasser gelöst. Auf diese Weise wurden radioaktiv markierte und nicht-markierte Transkripte hergestellt, die in den folgenden Versuchen eingesetzt wurden.

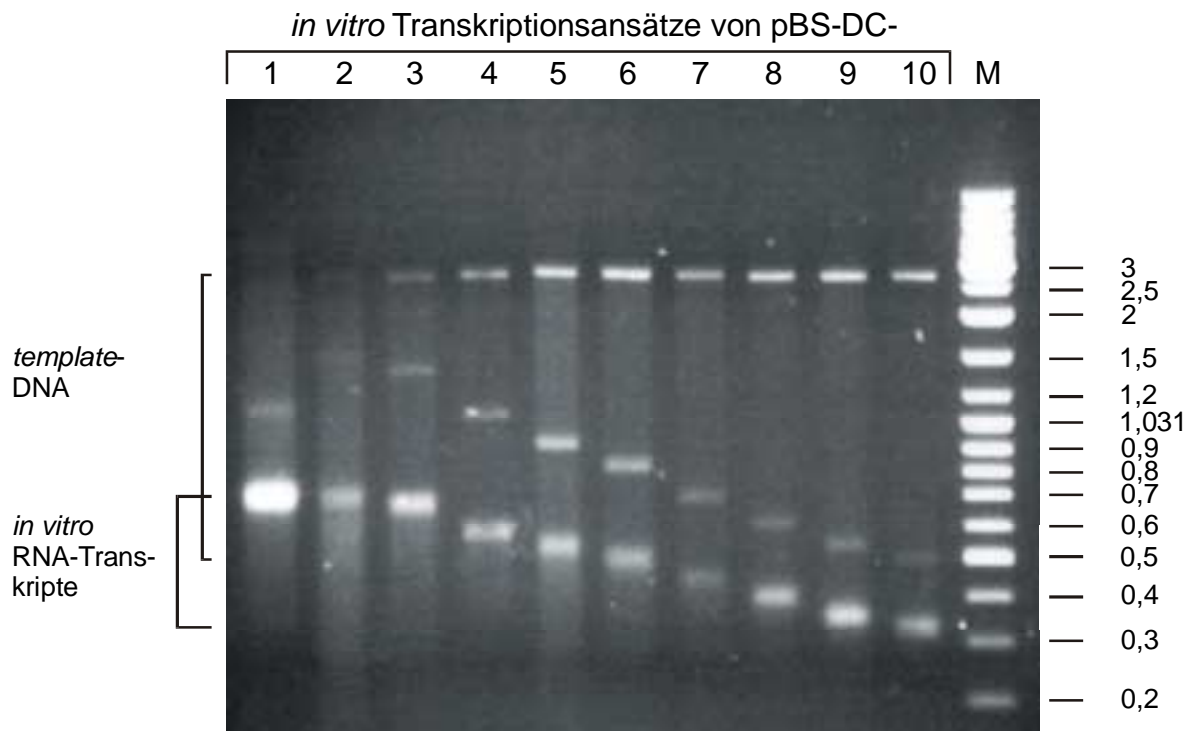


Abb. 5: *In vitro* Transkription der zehn Deletionsklon-Plasmide

pBS-DC1 wurde mit *Hind*III linearisiert, die Deletionsklone pBS-DC2 bis pBS-DC10 mit *Pvu*II. 1 µg DNA von jedem Plasmid wurden mit der T7 RNA Polymerase *in vitro* transkribiert (II.2.1.13.1). Nach 2 Stunden Inkubation bei 37°C wurde 1/25 von jedem Transkriptionsansatz in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt und unter UV-Licht fotografiert. Die Positionen der synthetisierten RNA sowie der *template*-DNA sind mit Klammern gekennzeichnet. Letztere wurden zur Termination der Transkriptionsreaktion durch Verdau mit DNase I entfernt. Die Größen der DNA-Markerbanden (M) sind in kb angegeben.

1.2 Nachweis von RNA/Protein-Komplexen und Lokalisierung der Protein-Bindungsstellen innerhalb der MARCKS 3'UTR

Um die Bindung von Swiss 3T3-Proteinen an Sequenzbereiche der MARCKS 3'UTR-RNA nachzuweisen, wurden RNase/EMSA-Analysen durchgeführt (II.2.2.7). Dazu wurden zunächst gesamtzytoplasmatische Swiss 3T3-Extrakte hergestellt (II.2.2.6.1), die aus ruhenden (S3T3⁻) bzw. für 12 h mit 200 nM PDB behandelten Zellen (S3T3⁺) isoliert wurden. Diese Zellextrakte wurden mit ³²P-markierten Transkripten der Deletionsklone 1, 4 und 5 inkubiert, bevor mit RNase T1 die nicht von Proteinen gebundene und vor RNaseverdau geschützte RNA beseitigt wurde. Zur Kontrolle wurden die Transkripte ohne Proteine oder mit BSA inkubiert. Die Reak-

tionsprodukte wurden in einem nativen 5%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend autoradiographisch nachgewiesen (Abb. 6).

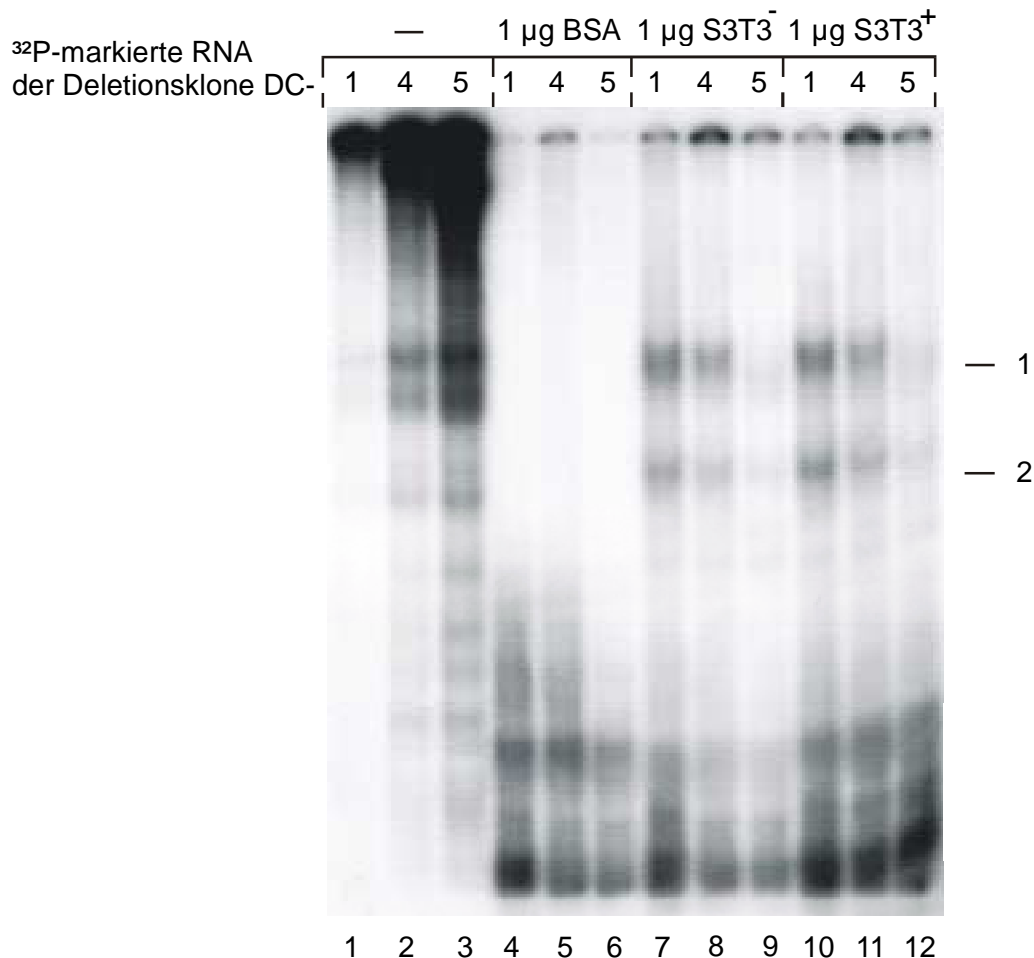


Abb. 6: RNase/EMSA-Analyse mit RNA der Deletionsklone 1, 4 und 5 und Swiss 3T3-Extrakten

pBS-DC1, -DC4 und -DC5 wurden mit [α -³²P]-CTP *in vitro* transkribiert (T7 RNA Polymerase) und jeweils 2,5 ng der Transkripte (~3000 cpm) eingesetzt (MARCKS 3'UTR-Sequenzen der Deletionsklon-RNA, DC1: 1310-2597 bp; DC4: 1310-1950 bp und DC5: 1310-1773 bp; nach Seykora et al., 1991; vgl. Abb. 4A). Die Transkripte wurden für 20 min bei RT entweder nur mit Reaktionspuffer (Spuren 1-3), mit 1 µg BSA (Spuren 4-6), mit 1 µg gesamtzytoplasmatischem Zellextrakt von Zellzyklus-arretierten Swiss 3T3-Zellen (S3T3⁻; Spuren 7-9) oder von 12 h mit 200 nM PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen (S3T3⁺; Spuren 10-12) inkubiert und anschließend für 30 min mit 10 U/Ansatz RNase T1 behandelt. Die Reaktionsansätze wurden in einem vorgekühlten 5%igen PAA Gel für 2 h bei 200 V und 4°C elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels (1 h, 70°C, Vakuum) wurde ein Röntgenfilm (Kodak AR) mit Verstärkerfolien für 1 d bei -80°C exponiert. Die beiden RNA/Protein-Komplexe sind rechts markiert (1, 2).

Aufgrund ihrer Länge (DC1: 1287nt, DC4: 858nt, DC5: 681nt) waren die drei Transkripte kaum ins PAA-Gel eingewandert (Spuren 1-3) und zeigten einige Abbruchbanden. Diese waren vermutlich während der *in vitro* Transkription entstanden, da die T7 RNA Polymerase zu verfrühter Transkriptionstermination neigt (Milligan et al., 1987). Die Inkubation mit BSA ergab keine Wechselwirkung mit der angebotenen RNA. Durch die RNase T1-Behandlung wurde die RNA nahezu vollständig abgebaut und befand sich deshalb nach Elektrophorese am unteren Gelrand (Spuren 4-6). Im Gegensatz dazu führte die Inkubation mit den beiden Swiss 3T3-Extrakten zur

Bildung von zwei RNA/Protein-Komplexen (1 und 2, Abb. 6) unterschiedlicher elektrophoretischer Mobilität (Spuren 7-12). Dabei konnten keine Unterschiede zwischen Extrakten aus unstimulierten (Spuren 7-9) und PKC-aktivierten Zellen (Spuren 10-12) festgestellt werden.

Beide Komplexe wurden mit RNA der Deletionsklone 1 und 4 gebildet, wobei die Intensität der Autoradiographiesignale bei DC4 (Spur 8, 11) etwas geringer war, als bei DC1 (Spur 7, 10). Mit RNA von DC5 ergab sich allerdings nur eine sehr schwache Ausbildung der beiden Komplexe, woraus zu schließen ist, dass hier nur noch geringe Proteinbindung erfolgte (Spur 9, 12). Offenbar fehlten der DC5-RNA die Zielsequenzen, die in der DC4-RNA enthalten sind und von Swiss 3T3-Proteinen gebunden werden.

Um zu kontrollieren, ob sich die beobachtete Abnahme in der Komplexbildung auch bei weiterer Verkürzung der Transkriptlänge fortsetzte, wurde in einer weiteren RNase/EMSA-Analyse *in vitro* synthetisierte und radioaktiv markierte RNA der Deletionsklone 4, 7, 8, 9 und 10 (Transkriptlängen von pBS-DC7: 518 nt, pBS-DC8: 490 nt, pBS-DC9: 388 nt, pBS-DC10: 293 nt) mit den selben Zellextrakten inkubiert (Abb. 7).

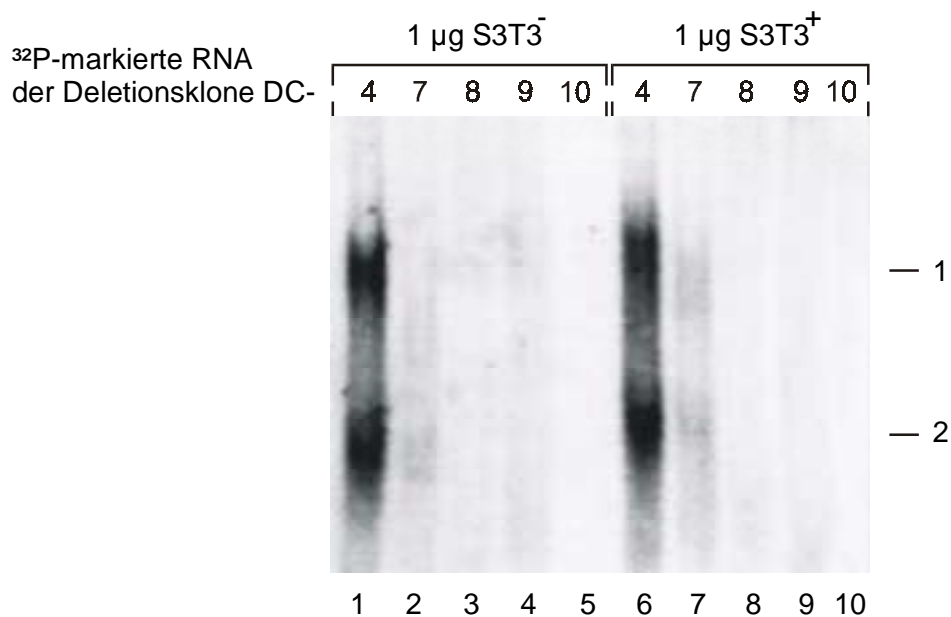


Abb. 7: RNase/EMSA-Analyse mit RNA der Deletionsklone 4, 7, 8, 9 und 10 und Swiss 3T3-Extrakten

pBS-DC4, -DC7, -DC8, -DC9 und -DC10 wurden mit [α - 32 P]-CTP *in vitro* transkribiert (T7 RNA Polymerase) und jeweils 2,5 ng der Transkripte (\sim 3000 cpm) eingesetzt (MARCKS 3'UTR-Sequenzen der Deletionsklon-Transkripte, DC4: 1310-1950 bp, DC7: 1310-1610 bp, DC8: 1310-1582 bp, DC9: 1310-1480 bp und DC10: 1310-1385 bp; nach Seykora et al., 1991; siehe Abb. 4A). Die Durchführung der RNase/EMSA-Analyse erfolgte wie in Abb. 6 beschrieben. Die beiden RNA/Protein-Komplexe sind rechts markiert (1, 2).

Während mit RNA von pBS-DC7 noch die gleiche reduzierte Wechselwirkung zwischen RNA und Proteinen zu beobachten war (Spur 2, 7), wie mit RNA von pBS-DC5 (Abb. 6, Spur 9, 12), fehlten diese schwachen Signale in den Spuren mit RNA von pBS-DC8 bis pBS-DC10 voll-

ständig (Spuren 3-5, 8-10). Folglich befanden sich zwischen den 3'-Enden der Transkripte von pBS-DC7 und pBS-DC8 weitere Bindungsstellen für Swiss 3T3-Proteine.

Um diese Ergebnisse durch Konkurrenzexperimente zu bestätigen, wurde die RNase/EMSA-Methode abgewandelt: Alle zehn Deletionsklon-Plasmide wurden *in vitro* ohne radioaktive Markierung transkribiert (vgl. Abb. 5). Die nicht-markierten Transkripte wurden im Vergleich zur anschließend hinzugefügten radioaktiv markierten MARCKS 3'UTR (DC1) in 30-fachem Überschuss mit Swiss 3T3-Proteinen (*quiescent*, ohne PDB-Behandlung) inkubiert.

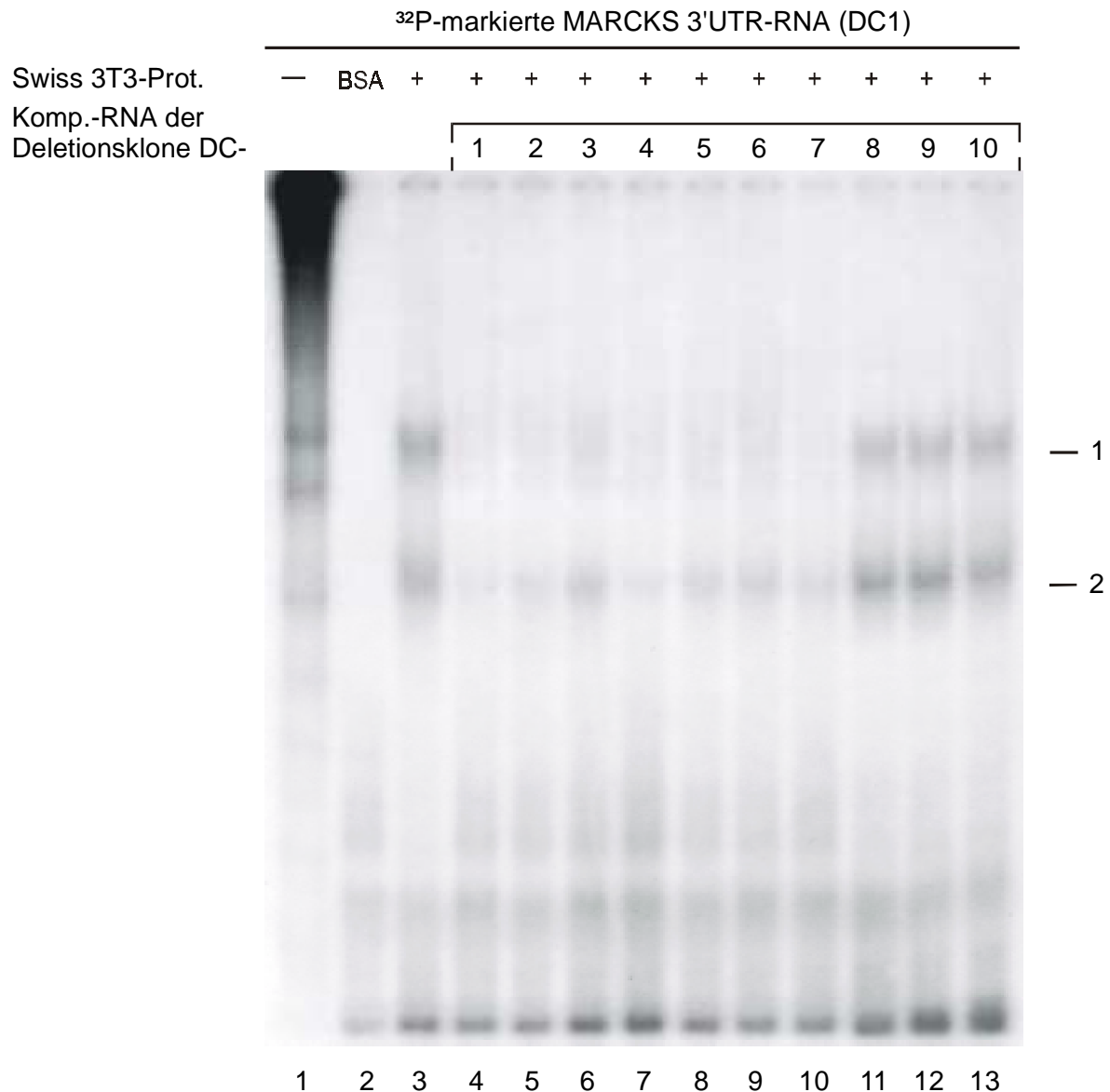


Abb. 8: RNase/EMSA-Analyse der MARCKS 3'UTR und Konkurrenz der RNA/Protein-Komplexe mit nicht-markierter RNA aller zehn Deletionsklone

pBS-DC1 bis pBS-DC10 wurden nicht-radioaktiv und pBS-DC1 mit [α -³²P]-CTP *in vitro* transkribiert (T7 RNA Polymerase). 75 ng der unmarkierten Transkripte wurden mit 1 μ g gesamtzytoplasmatischem Swiss 3T3-Extrakt für 15 min bei RT inkubiert, bevor 2,5 ng der ³²P-markierten DC1-RNA (~3000 cpm) jedem Ansatz hinzugefügt wurden (Spuren 4-13). Kontrollen: ³²P-markierte DC1-RNA ohne Protein (Spur 1), mit 1 μ g BSA (Spur 2) und mit Swiss 3T3-Protein ohne Konkurrenz-RNA (Spur 3). Das Experiment wurde dann wie in Abb. 6 beschrieben mit der RNase T1-Inkubation fortgesetzt (Filmexposition: Kodak AR für 4 d). Die beiden RNA/Protein-Komplexe sind rechts markiert (1, 2).

Nach 20 min Inkubation und RNase T1-Verdau wurden die Reaktionsprodukte in einem 5%igen nativen PAA-Gel aufgetrennt (Abb. 8). Die nicht-markierte Deletionsklon-RNA konkurrierte mit der radioaktiven MARCKS 3'UTR um die Bindung durch RNA-bindende Proteine, wobei der 30-fache Überschuss zur Folge hatte, dass die Bildung der beiden in Abb. 6 und 7 dargestellten und radioaktiv markierten RNA/Protein-Komplexe ausblieb, wenn *cis*-Elemente vorlagen (Kompetition). Wie Abb. 8 deutlich macht, ließ sich die Bildung der RNA/Protein-Komplexe mit RNA der Deletionsklone 1-7 gut kompetitieren (Spuren 4-10), wobei die Bildung von Komplex 1 jeweils etwas stärker inhibiert wurde, als die von Komplex 2. Lediglich die ersten 272 nt der MARCKS 3'UTR (1310 bp-1582 bp, DC8-DC10) besitzen keine Zielsequenzen für diese RNA-bindenden Proteine (Spur 11-13).

Zusammen mit den Ergebnissen aus den Abbildungen 6 und 7 ließen sich zwei Regionen innerhalb der MARCKS 3'UTR identifizieren, die mit RNA-bindenden Proteinen in Wechselwirkung treten (Abb. 9): Region A zwischen den 3'-Enden der Deletionsklone 5 und 4 (1773 bp und 1950 bp) und Region B zwischen den 3'-Enden der Deletionsklone 8 und 7 (1582 bp und 1610 bp; Sequenz nach Seykora et al., 1991). Innerhalb dieser beiden Regionen waren *cis*-Elemente lokalisiert, die von RNA-bindenden Proteinen gebunden wurden. Da die nachgewiesenen RNA/Protein-Komplexe 1 und 2, die sowohl mit Region A als auch mit Region B gebildet wurden, im PAA-Gel mit gleicher elektrophoretischer Mobilität wanderten (Abb. 6-8), kann angenommen werden, dass die beiden RNA-Regionen von den gleichen Proteinen erkannt werden. Allerdings bestehen zu den beiden Regionen unterschiedliche Affinitäten. Die Intensität der zwei RNA/Protein-Komplexe, die durch Interaktion mit der Region A entstand, war wesentlich höher als die mit Region B (Abb. 6, 7). Die Proteine binden demzufolge mit wesentlich höherer Affinität an Region A, welche deshalb als Hauptbindungsstelle bezeichnet wird. Region B stellt hingegen nur eine kryptische Bindungsstelle für RNA-bindende *trans*-Faktoren dar.

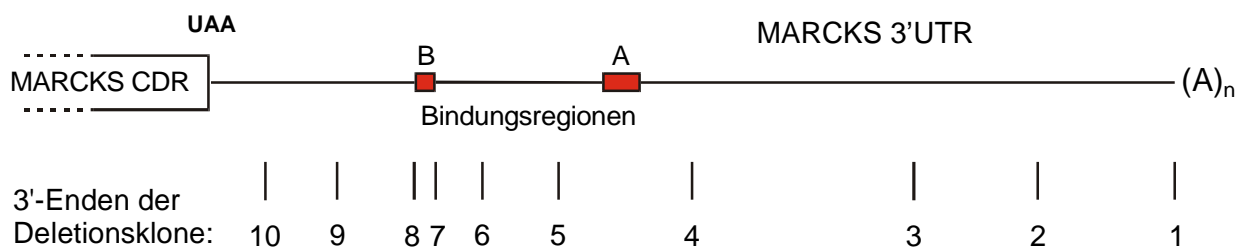


Abb. 9: Zusammenfassung der RNase/EMSA-Ergebnisse

Schematische Darstellung der MARCKS 3'UTR und der identifizierten Regionen, die *cis*-Elemente enthalten (A, B). Darüberhinaus sind auch die Positionen der 3'-Enden der Deletionsklone angegeben, mit denen die Analyse vorgenommen wurde. Die Affinität der RNA-bindenden Proteine zu Region A ist größer als zu Region B. Region A wird deshalb als Hauptbindungsstelle für RNA-bindende Proteine bezeichnet und Region B als kryptische Bindungsstelle.

1.3 Ein 52nt CU-reiches Sequenzmotiv reagiert als *cis*-Element mit Swiss-3T3 Proteinen

In Abb. 10 sind die RNA-Sequenzen dargestellt, die sich zwischen den 3'-Enden der Deletionsklone 4 und 5 (Region A) bzw. 7 und 8 (Region B) befinden (Abb. 9). Beide Regionen enthalten sehr große in rot und unterstrichen dargestellte U-Motive, wie sie für destabilisierende *cis*-Elemente aus der Gruppe der AU-reichen Elemente (ARE) typisch sind. Die CU-reiche Sequenz der Region A zeigt darüberhinaus große Homologie zu den AUUUA-Pentameren, dem Leitmotiv der ARE (Shaw und Kamen, 1986; Ross, 1995; Chen und Shyu, 1995; Xu et al., 1997; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Da sich die Hauptbindungsstelle für RNA-bindende Proteine innerhalb von Region A befindet (III.1.2), wurde das CU-reiche 52nt Sequenzmotiv von Region A kloniert und geprüft, ob es als *cis*-Element von Swiss 3T3-Proteinen erkannt wurde.

5' ... AGGCCG	AGGACGUGUU	AGACAGCUUC	CUCUGCCUUC	1570
UUUCUUUACU	UUU ^{DC 8 →} AC <u>UUUUU</u>	<u>UUUUUUUUUU</u>	<u>UUU</u> ^{DC 7 →} GGCAUCA	1610
GUAUUA AUGU	UUUUUGCAUA	CUUUGCAUCU	UUAUUAA ...	1647
.....	
... CUAUGGG	AAAUUGAAGC	AGUGCAUAAC	^{DC 5 →} AUU GCCAAGA	1780
UAAUAUGCCA	CUAAA AUGGU	GGUGGGUGUA	AAGGCUUAGG	1820
GUUCUUGUC <u>C</u>	<u>UUUCUUUCUU</u>	<u>UCUUUCUUUC</u>	<u>UUUCUUUCUU</u>	1860
<u>UCUUUCUUUC</u>	<u>UUUUUUUUUU</u>	<u>UAAAGAAAA</u>	UUAUUACGAU	1900
GUAUUUUGUG	AGGCAGGUUU	ACAACACUAC	ACGUUUUGAA	1940
^{DC 4 →} UAAGAAGGAA	AGAGAAAAAA	AUAAAAACAC	CAAUACC . . 3'	1977

Abb. 10: RNA-Sequenz der MARCKS 3'UTR zwischen den 3'-Enden der Deletionsklone 4 und 5 (Region A), bzw. 7 und 8 (Region B)

Die 3'-Enden der Deletionsklone 4, 5, 7 und 8 sind in rot mit Pfeil gekennzeichnet. Ein U-Sequenzmotiv (homo-(U)₁₈; 1586 bp-1603 bp) sowie eine CU-reiche Sequenz bestehend aus elf Wiederholungen von CUUU und einem sich anschließenden Abschnitt von 8 Uridylaten ist ebenfalls in rot und unterstrichen dargestellt (1830 bp-1881 bp). Dieses 52nt Sequenzmotiv wurde als *cis*-Element identifiziert, welches mit RNA-bindenden Proteinen aus Swiss 3T3-Zellen interagiert (Abb. 12). Die Zahlen am rechten Bildrand geben die Position entsprechend der kompletten murinen MARCKS cDNA in bp wider (Seykora et al., 1991).

1.3.1 Klonierung der MARCKS 52nt Element cDNA in pBluescript

Zunächst wurde eine cDNA mit der 52nt langen CU-reichen Sequenz (Abb. 10) hergestellt, die in pBluescript einkloniert werden sollte. Dies geschah durch Hybridisierung zweier einander komplementärer Oligonukleotide von 78nt Länge (Klonierungsoligo MARCKS 52nt *sense* und

antisense; II.1.5), die neben der ausgewählten 52nt Sequenz auch Restriktionsschnittstellen für *EcoRI*, *Apal* (5') und *XhoI* (3') aufwies. Die Klonierung in pBluescript (II.1.6.1) sollte über glatte DNA-Enden erfolgen. Deshalb wurde der pBluescript-Vektor mit *SmaI* geschnitten und mussten die Enden des 78 bp cDNA-Fragment zum Doppelstrang aufgefüllt werden. Nach Ligation, Transformation in *E.coli* XL-1 Blue (Blau-Weiß-Selektion) und Minipräparation wurde das in Abb. 11 schematisch dargestellte Plasmid erhalten. Die Lage des MARCKS-Inserts im Vektor bezüglich der Promotoren für die T3 und T7 RNA Polymerasen wurde durch Kontrollverdau und Sequenzierung verifiziert. Das Plasmid wurde pBS-MARCKS 52nt genannt.

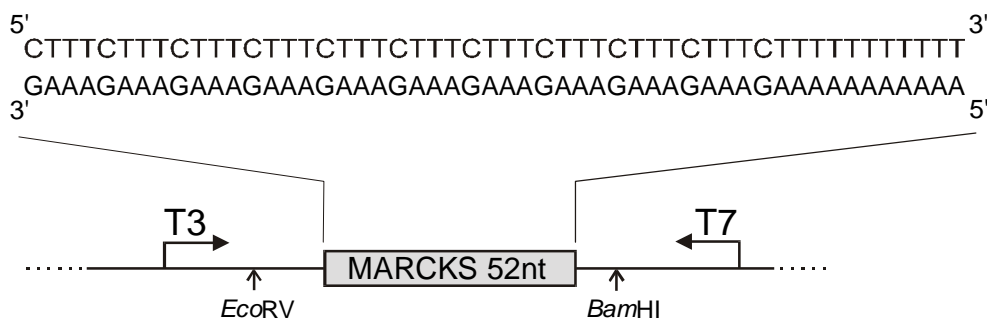


Abb. 11: Das MARCKS 52nt Element in pBluescript KS II⁺

Schematische Darstellung des Plasmids pBS-MARCKS 52nt. Die Klonierung erfolgte wie im Text beschrieben. Die Position des MARCKS 52nt Inserts bezüglich der T3 und T7 Promotoren wurde durch Kontrollverdau ermittelt und durch DNA-Sequenzierung verifiziert. Die Schnittstellen der Restriktionsenzyme *EcoRV* und *BamHI* sind eingezeichnet und dienen zur Linearisierung der Plasmid-DNA für die Transkription in *sense*- oder *antisense*-Orientierung (vgl. III.1.3.2).

1.3.2 RNase/EMSA-Analyse der MARCKS 52nt-RNA

Wie die schematische Darstellung von pBS-MARCKS 52nt in Abb. 11 deutlich macht, ließ sich das 52nt Element durch Verwendung der T3 RNA Polymerase in *sense*-Orientierung transkribieren, während *antisense*-Transkripte durch die T7 RNA Polymerase synthetisiert wurden. Für die Transkription in *sense*-Orientierung wurde die DNA mit *BamHI* geschnitten, für die *antisense*-Transkription mit *EcoRV*. Dadurch hatten die synthetisierten Transkripte im Falle der *sense*-Transkription eine Länge von 162 nt und die *antisense*-RNA eine Länge von 152 nt. Bei der *sense*-Transkription wurde zur Markierung der CU-reichen 52nt Sequenz [α -³²P]-UTP verwendet, während bei der *antisense*-Transkription [α -³²P]-ATP eingesetzt wurde.

Zur RNase/EMSA-Analyse wurde analog zu den Experimenten mit der Deletionsklon-RNA das *sense*- bzw. *antisense*-Transkript ohne Protein (Spur 1, 5), mit BSA (2, 6), mit zytoplasmatischen Proteinen aus ruhenden (3, 7) sowie PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen (4, 8) inkubiert und anschließend mit RNase T1 die ungeschützte RNA verdaut. Die Reaktionsprodukte wurden auf ein natives 5%iges PAA-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 12).

Wurde das 52nt Element in *sense* Orientierung transkribiert, konnte man mit beiden Zellextrakten (S3T3⁻ und S3T3⁺) die Bildung zweier RNA/Protein-Komplexe feststellen (Spur 3, 4), in glei-

cher Weise wie es mit der vollständigen MARCKS 3'UTR-RNA (DC1-RNA) beobachtet wurde (Abb. 6). Die Bildung der Komplexe blieb aber vollständig aus, wenn die *antisense*-RNA mit den Proteinen inkubiert wurde (Spur 7, 8).

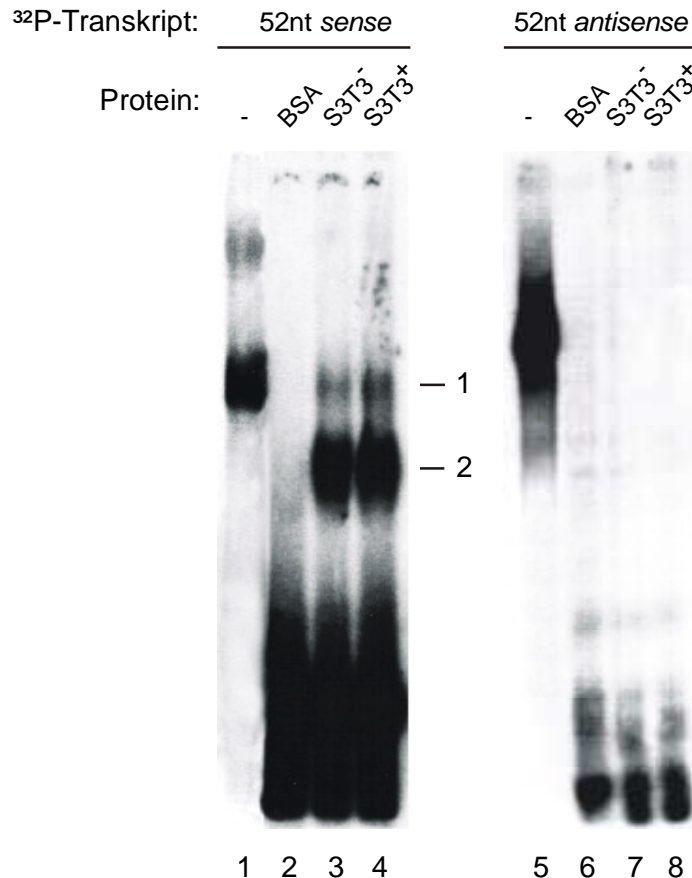


Abb. 12: RNase/EMSA-Analyse mit der MARCKS 52nt-RNA, transkribiert in *sense*- und *antisense*- Orientierung

2,5 ng (~3000 cpm) der MARCKS 52nt *sense*- bzw. *antisense*-RNA wurden ohne Protein (Spur 1, 5), mit 1 µg BSA (Spur 2, 6), mit 1 µg gesamtytoplasmatischen Proteinen ruhender Swiss 3T3-Zellen (Spur 3, 7) sowie mit für 12 h mit 200 nM PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen (Spuren 4, 8) für 10 min bei RT inkubiert. Das Experiment wurde dann wie unter Abb. 6 beschrieben fortgesetzt. Die Filmexposition erfolgte für 1 d bei -80°C (Kodak AR) mit Verstärkerfolien. Die beiden RNA/Protein Komplexe, die sich nur mit dem *sense*-Transkript ergaben, sind mit 1 und 2 gekennzeichnet.

Zur Bestätigung der spezifischen Wechselwirkung zwischen den RNA-bindenden Proteinen und der CU-reichen Sequenz, wurde ein Konkurrenzexperiment durchgeführt. pBS-MARCKS 52nt wurde nicht-radioaktiv in *sense*- und *antisense*-Orientierung transkribiert und steigende Mengen dieser Transkripte mit Proteinen aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen inkubiert, bevor radioaktiv markierte MARCKS 3'UTR-RNA (DC1-RNA) zu den Ansätzen gegeben wurde. Sollte die nicht-markierte RNA Zielsequenzen für RNA-bindende Proteine der Swiss 3T3-Zellen enthalten, so war mit zunehmender Menge Konkurrenz-RNA eine Reduktion in der Bildung der radioaktiv markierten RNA/Protein-Komplexe zu erwarten (Abb. 13).

Tatsächlich war nur die 52nt *sense*-RNA in der Lage, die Bildung der beiden RNA/Protein-Komplexe zu inhibieren. Die Inhibition ließ sich bereits bei einer Menge von 1 ng nachweisen (Spur 7) und ab 5 ng *sense*-Transkript wurde die RNA/Protein-Komplexbildung vollständig inhibiert (Spur 8-9). Im Gegensatz dazu konnte selbst mit 100 ng *antisense*-Transkript (40-fachem Überschuss) keine Reduktion in der Ausbildung der RNA/Protein-Komplexe erreicht werden (Spur 10-14).

Damit konnte gezeigt werden, dass die (CUUU)₁₁U₈-Sequenz ein *cis*-Element ist, an das RNA-bindende Proteine aus Swiss 3T3-Zellen binden.

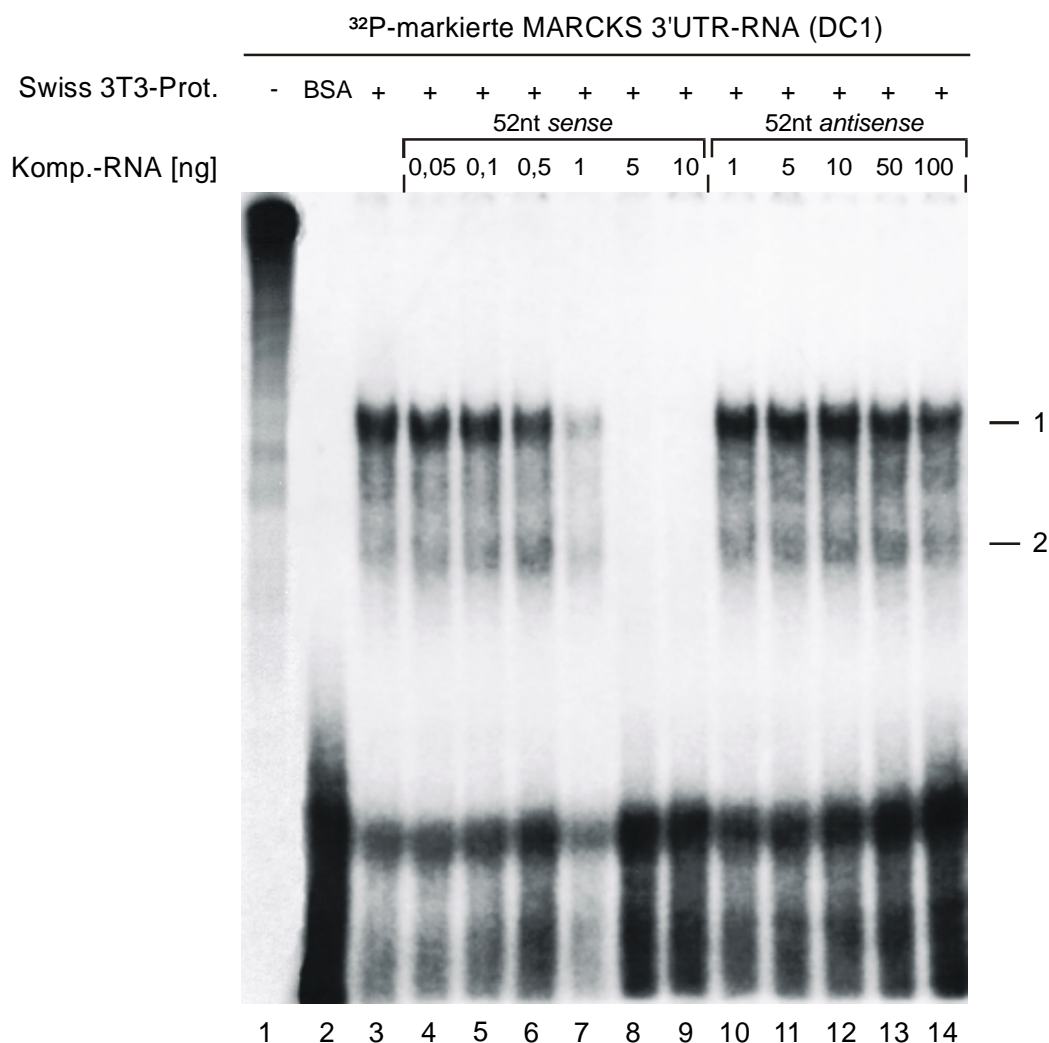


Abb. 13: RNase/EMSA-Analyse zur Konkurrenz der RNA/Protein-Komplexe mit nicht-markierter *sense*- und *antisense*-MARCKS 52nt-RNA

pBS-MARCKS 52nt wurde nicht-radioaktiv in *sense*- und *antisense*-Orientierung transkribiert, während pBS-DC1 unter Verwendung von [α -³²P]-UTP transkribiert wurde. Die angegebenen Mengen *sense*- bzw. *antisense*-Transkript wurden für 20 min mit 1 µg gesamtzytoplasmatischen Proteinen aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen bei RT inkubiert und 2,5 ng der ³²P markierten DC1-RNA (~3000 cpm) in jeden Ansatz gegeben (Spuren 4-9 *sense*, 10-14 *antisense*). Als Kontrollen ohne Komp.-RNA diente ³²P-markierte DC1-RNA ohne Protein (Spur 1), mit 1 µg BSA (Spur 2) und mit 1 µg Swiss 3T3-Proteinen (Spur 3). Das Experiment wurde wie unter Abb. 6 beschrieben fortgesetzt (Filmexposition: Kodak AR für 1 d bei -80°C, mit Verstärkerfolien). Die Positionen der beiden RNA/Protein-Komplexe sind rechts gekennzeichnet.

1.3.3 Das MARCKS 52nt Element wird als einzelsträngige DNA von RNA-bindenden Proteinen erkannt

Viele RNA-bindende Proteine sind auch in der Lage, an einzelsträngige DNA-Moleküle zu binden (Kenan et al., 1991). Um zu überprüfen, ob die Proteine, die das MARCKS 3'UTR *cis*-Element binden, auch mit einzelsträngiger DNA interagieren können, wurde ein Oligonukleotid hergestellt, welches aus der 52nt langen Sequenz bestand (52nt Element Oligonukleotid, II.1.5).

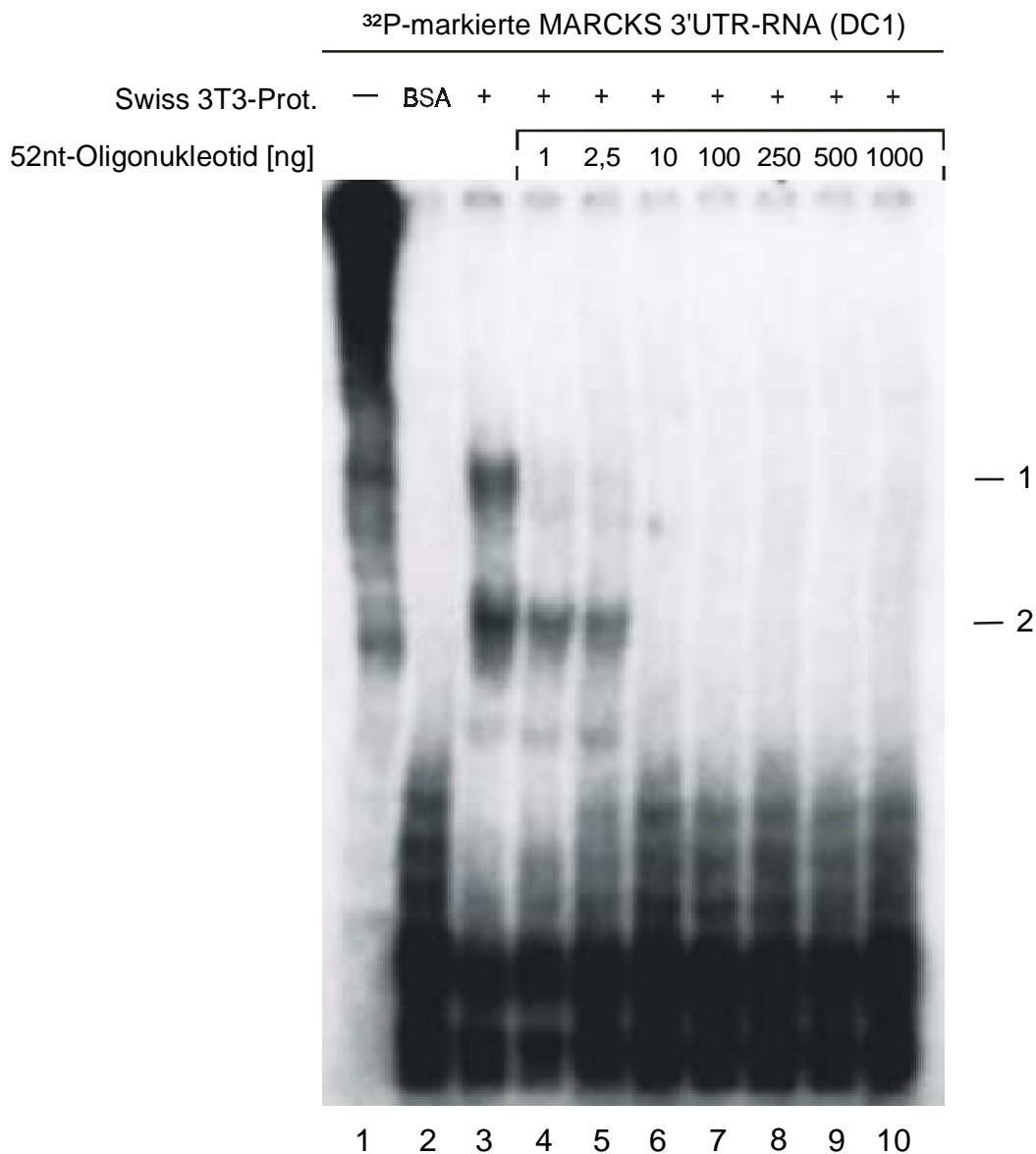


Abb. 14: RNase/EMSA-Analyse mit ansteigenden Mengen der 52nt Oligonukleotid-DNA als Kompetitor

pBS-DC1 wurde mit *Hind*III linearisiert und mit [α -³²P]-CTP durch die T7 RNA Polymerase *in vitro* transkribiert. Die 52nt Oligonukleotid-DNA mit der Sequenz d(CTTT)₁₁T₈ wurde in den angegebenen Mengen (1-1000 ng, Spur 4-10) mit 1 μ g gesamtzytoplasmatischen Proteinen aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen für 10 min bei RT inkubiert, bevor 2,5 ng (~3000 cpm) der ³²P-markierten DC1-RNA hinzugefügt wurden. Als Kontrollen ohne Kompetitions-Oligonukleotid diente ³²P-markierte DC1-RNA ohne Protein (Spur 1), mit 1 μ g BSA (Spur 2) und mit 1 μ g Swiss 3T3-Proteinen (Spur 3) (Filmexposition: Kodak AR mit Verstärkerfolien für 2 d bei -80°C). Die Positionen der beiden RNA/Protein-Komplexe sind auf der rechten Seite markiert.

Dieses wurde in einer RNase/EMSA-Analyse zur Konkurrenz der beiden RNA/Protein-Komplexe verwendet, die durch Bindung der Swiss 3T3-Proteine an die MARCKS 3'UTR entstehen. Ansteigende Mengen des 52nt Element DNA-Oligonukleotids wurden mit gesamtzytoplasmatischen Proteinen, die aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen isoliert worden waren, inkubiert, bevor die radioaktiv transkribierte MARCKS 3'UTR-RNA (DC1-RNA) hinzugefügt wurde und der RNase T1-Verdau erfolgte. Die Reaktionsprodukte wurden wie in den vorigen Versuchen in einem 5%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und autoradiographisch ausgewertet.

Wie Abb. 14 zeigt, wurde die Bildung der beiden RNA/Protein-Komplexe bei Präinkubation mit 10 ng und mehr des Oligonukleotids (ab 4-fachem Überschuss) vollständig inhibiert (Spur 6-10). Bei 1 ng und 2,5 ng der 52nt Element-DNA erfolgte eine teilweise Konkurrenz: Während die Formierung von Komplex 1 vollständig inhibiert wurde, ließ sich Komplex 2 auch bei 2,5 ng des Konkurrenzoligonukleotids noch nachweisen (Spur 4, 5). Dies stand im Einklang mit der Beobachtung aus dem Konkurrenzexperiment, das in Abb. 8 dargestellt ist. Auch hier hatte sich gezeigt, dass Komplex 2 durch die Konkurrenz-RNA weniger kompetitiert wurde, als Komplex 1. Die Proteine, die zusammen mit der MARCKS 3'UTR den Komplex 2 bilden, weisen entweder eine stärkere Affinität zur CU-reichen RNA-Sequenz auf, als die Proteine, die Komplex 1 bilden, oder sie binden die RNA-Sequenz mit höherer Affinität als die DNA-Sequenz.

Die Spezifität der RNA-bindenden Proteine bezüglich ihrer Fähigkeit, die DNA zu binden, wurde in einem weiteren Experiment untersucht. Dazu wurden die zwei Oligonukleotide, die zur Klonierung des 52nt Elements in pBluescript verwendet worden waren (MARCKS 52nt *sense* und *antisense*, II.1.5), durch die T4 Polynukleotidkinase am 5'-Ende radioaktiv markiert (II.2.1.12.2). Die endmarkierten Oligonukleotide wurden dann in einer DNase/EMSA-Analyse eingesetzt (II.2.2.7.1). *Sense*- und *antisense*-Oligonukleotid-DNA wurden mit BSA, bzw. Proteinen aus ruhenden oder PDB behandelten (12 h, 200 nM PDB) Swiss 3T3-Zellen inkubiert, bevor mit DNase I ungeschützte DNA verdaut wurde. Zusammen mit den Oligonukleotid-Kontrollen wurden die Ansätze in einem nativen 8%igen PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 15).

Die Inkubation der *sense*-Oligonukleotid-DNA mit den Swiss 3T3 Proteinen ergab wieder die Formierung zweier Komplexe (Spur 5, 7), wie sie auch mit dem 52nt-*sense*-RNA-Transkript festzustellen war. Mit der *antisense*-Oligonukleotid-DNA konnte im Gegensatz dazu keine Proteinbindung nachgewiesen werden (Spur 6, 8). Die Spezifität der RNA-bindenden Proteine zur CU-reichen Sequenz zeigte sich damit auch auf DNA-Ebene. Nur mit der dCT-reichen Sequenz konnten Proteinbindungen festgestellt werden, die dGA-reiche *antisense*-Sequenz wurde hingegen nicht gebunden.

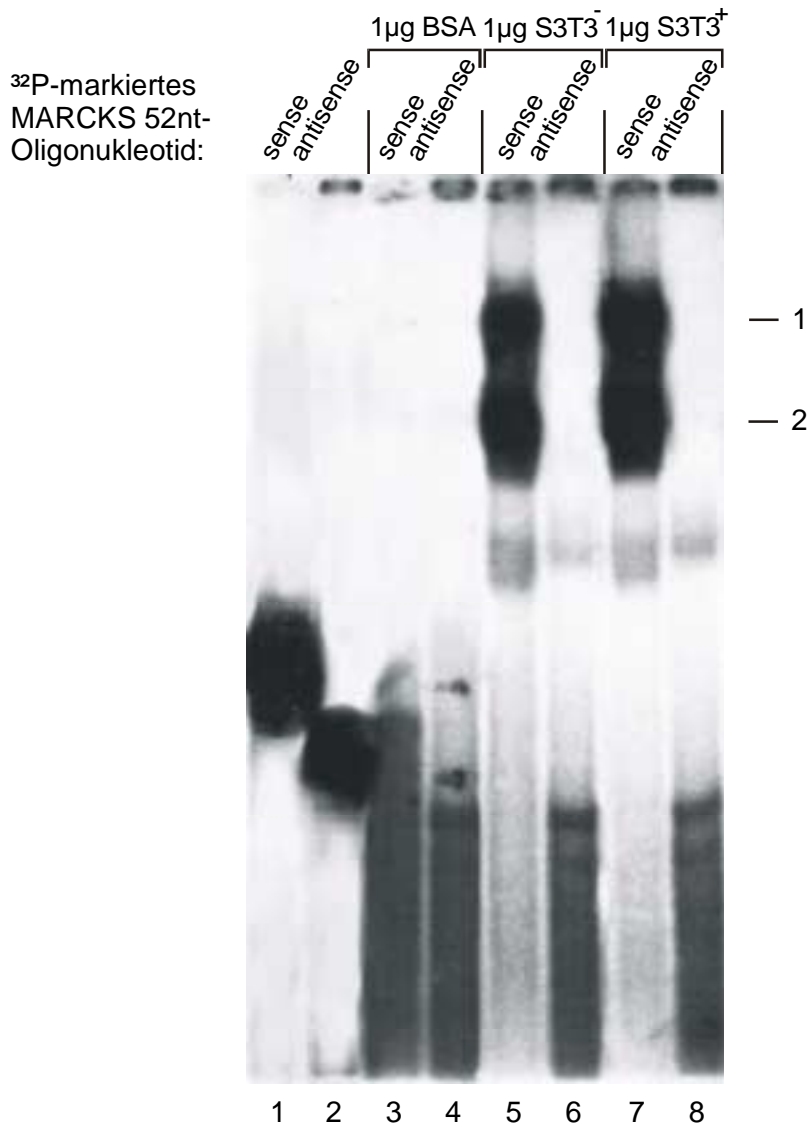


Abb. 15: DNase/EMSA-Analyse der *sense*- und *antisense*-MARCKS 52nt Oligonukleotide

Mit Hilfe der T4 Polynukleotidkinase und [γ -³²P]-ATP wurden beide Klonierungsoligonukleotide (MARCKS 52nt *sense* und *antisense*, II.1.5), am 5'-Ende radioaktiv markiert (II.2.1.12.2). 24 ng (~8500 cpm) von jedem Oligonukleotid wurden ohne Protein (Spur 1, 2), mit 1 µg BSA (Spur 3, 4), mit 1 µg gesamtzytoplasmatischen Proteinen ruhender Swiss 3T3-Zellen (Spur 5, 6) sowie 1 µg von Proteinen aus 12 h mit 200 nM PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen (Spur 7, 8) für 20 min bei RT inkubiert, bevor mit 10 U DNase I je Ansatz für 30 min bei RT nicht gebundene DNA verdaut wurde. Die Reaktionsprodukte wurden auf ein 8%iges PAA-Gel geladen und für 2 h bei 4°C und 250 V elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Geltrocknung unter Vakuum bei 70°C für 1 h wurde ein Röntgenfilm (Kodak AR) mit Verstärkerfolie für 1 d bei -80°C exponiert. Die Positionen der DNA/Protein-Komplexe sind rechts markiert.

2 Identifizierung und Charakterisierung von RNA-bindenden Proteinen

Nachdem im ersten Teil der Arbeit zwei *cis*-Elemente innerhalb der MARCKS 3'UTR identifiziert werden konnten, sollten im Folgenden die daran bindenden *trans*-Faktoren charakterisiert werden. Da an beide *cis*-Elemente die gleichen Proteine binden, die Affinität gegenüber dem MARCKS 52nt *cis*-Element aber höher ist (III.1.2; Abb. 6, 7), wurden die folgenden Experimente mit diesem Sequenzabschnitt der MARCKS 3'UTR durchgeführt. Ein besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die Wechselwirkung mit Mitgliedern der ELAV/Hu-Genfamilie gelegt.

2.1 Identifizierung der Proteine, die an die MARCKS 52nt-RNA binden

Zur Charakterisierung der MARCKS-RNA bindenden *trans*-Faktoren wurde der UV-crosslink Assay (II.2.2.9) angewendet. RNA/Protein-Komplexe werden bei dieser Methode mit kurzwelligem UV-Licht bestrahlt und miteinander kovalent vernetzt. Diese Quervernetzung ist irreversibel, so dass die RNA/Protein-Komplexe nach denaturierender SDS-PAA-Gelelektrophorese autoradiographisch nachgewiesen werden können.

pBS-MARCKS 52nt wurde in *sense*-Orientierung *in vitro* radioaktiv transkribiert und nach Inkubation der 52nt *sense*-RNA mit zytoplasmatischen Swiss 3T3-Proteinen mit 180 mJ UV-Licht bestrahlt. Außerdem wurden in Anlehnung an das Competitionsexperiment, dessen Ergebnis in Abb. 14 dargestellt ist, die Swiss 3T3-Proteine mit ansteigenden Mengen der *sense*- und *antisense*-MARCKS-Klonierungsoligonukleotide (II.1.5) präinkubiert. Damit konnten Unterschiede in der Affinität der einzelnen RNA-bindenden Proteine zur MARCKS 52nt-RNA deutlich gemacht werden. Nach Verdau mit RNase A wurden die RNA/Protein-Komplexe in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen (Abb. 16). Auf diese Weise ließen sich vier RNA/Protein-Komplexe nachweisen, deren RNA-Bindung nahezu vollständig vom 52nt *sense*-Oligonukleotid (Spur 2-5), jedoch nicht vom 52nt *antisense*-Oligonukleotid kompetitiert wurde (Spur 6-9). Sie besaßen eine apparente molekulare Masse von 55, 40, 36 und 30 kDa (nach Größenmarker bestimmt) und zeigten unterschiedliche Affinität zum RNA- bzw. DNA-Substrat. Das 55 kDa-Protein (p55) zeigte ohne *sense*-Kompetition das stärkste RNA-Signal, die übrigen Proteine waren unter diesen Bedingungen kaum zu detektieren (Spur 1, 6-9). Aber schon bei Inkubation mit 0,5 ng *sense*-Oligonukleotid nahm die Intensität des RNA/p55-Komplexes stark ab und die anderen drei RNA/Protein-Komplexe (RNA/p40, RNA/p36 und RNA/p30) wurden sichtbar (Spur 2, 3). Durch Inkubation mit 4- bzw. 20-facher Menge *sense*-Oligonukleotid (10 und 50 ng) wirkte sich die Competition auf alle vier Proteine aus.

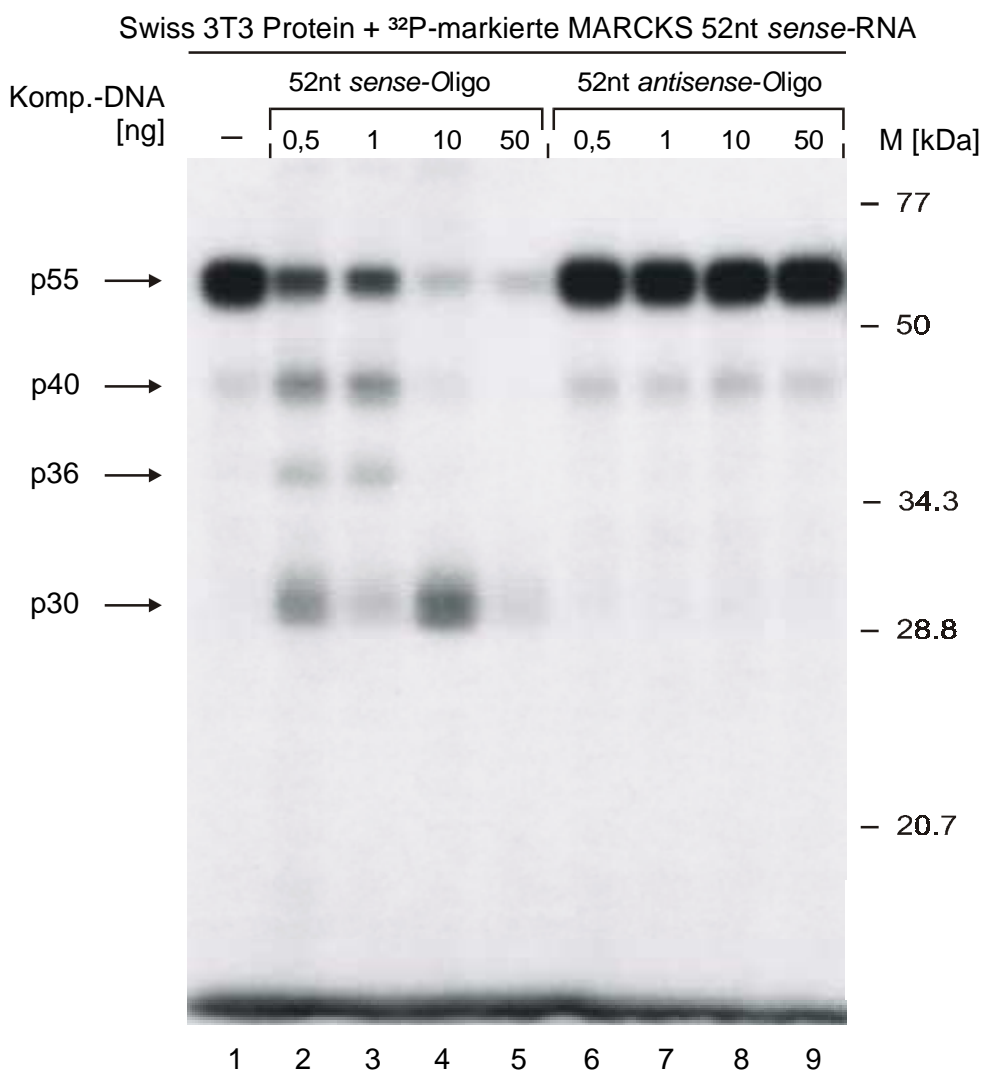


Abb. 16: UV-crosslink-Assay der MARCKS 52nt-RNA mit Swiss 3T3-Proteinen und Konkurrenz durch 52nt sense- und antisense-DNA-Oligonukleotide

pBS-MARCKS 52nt wurde mit *Bam*HI linearisiert und durch die T3 RNA Polymerase mit [α -³²P]-UTP radioaktiv transkribiert. 5 μ g zytoplasmatischer Zellextrakt aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen wurden mit den angegebenen Mengen 52nt sense- bzw. antisense-Oligonukleotid für 10 min bei RT inkubiert und anschließend 2,5 ng der *in vitro* transkribierten MARCKS 52nt sense-RNA (~3000 cpm) in die Ansätze gegeben. Die Ansätze wurden nach weiteren 10 min im Stratalinker (Stratagene/Invitrogene) mit 180 mJ UV-Licht bestrahlt (auf Eis). Nach Abbau nicht geschützter RNA-Bereiche mit 10 μ g RNase A (30 min) wurden die UV-crosslink-Proben in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel ü.N. bei RT elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet (1 h, 70°C, Vakuum) und zur Autoradiographie ein Röntgenfilm (Kodak AR) mit Verstärkerfolien bei -80°C für 1 Woche exponiert. Positionen und Größen des Proteinstandards sind rechts angegeben, die Positionen der durch UV-crosslinking markierten RNA/Protein-Komplexe p55, p40, p36 und p30 sind links mit Pfeilen markiert.

Das Ergebnis macht deutlich, dass alle vier Proteine hochspezifisch die CU-reiche Sequenz erkennen, die Proteine sich aber in Menge und Affinität zur Sequenz unterscheiden. Obwohl der RNA/p55-Komplex das stärkste Signal besaß, wurde die Bindung von p55 an die MARCKS 52nt-RNA bereits durch niedrigste Mengen des sense-DNA-Oligonukleotids (0,5 und 1 ng) inhibiert. Dies lässt sich so interpretieren, dass p55 im Zytoplasma zwar stark exprimiert wird, die Affinität dieses Proteins zur 52nt-RNA-Sequenz aber nur gering ist. Die übrigen drei Proteine bilden RNA/Protein-Komplexe mit schwächerer Intensität, die Bindung an die RNA wird aber

erst durch die 4- bis 20-fache Menge des *sense*-DNA-Oligonukleotids kompetitiert. Demnach werden diese Proteine im Vergleich zu p55 im Zytoplasma weniger stark exprimiert, besitzen aber eine höhere Affinität zur 52nt CU-reichen RNA-Sequenz als p55.

2.2 Subzelluläre Lokalisierung der MARCKS RNA-bindenden Proteine

Die vier in Abb. 16 identifizierten RNA/Protein-Komplexe wurden von zytoplasmatischen Proteinen gebildet. Die meisten an der mRNA-Stabilitätskontrolle beteiligten RNA-bindenden Proteine sind aber häufig an Transkription, Spleißen und mRNA-Export mitbeteiligt und deshalb auch im Zellkern lokalisiert (Shyu & Wilkinson, 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001; Brennan & Steitz, 2001). Deshalb wurde im folgenden Experiment das Potential von nukleären Proteinen überprüft, die MARCKS 52nt-RNA zu binden. Gleichzeitig wurde untersucht, ob die Aktivierung der PKC diese Bindung beeinflusst. Swiss 3T3-Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus wurden für 5 h mit 200 nM PDB behandelt und parallel mit unstimulierten Kontrollzellen geerntet. Wie unter II.2.2.6.2 beschrieben, wurden davon Kern- und Zytoplasmaextrakte gewonnen und im UV-crosslink-Assay mit der radioaktiv transkribierten MARCKS 52nt-RNA inkubiert. Nach Quervernetzung und RNase A-Verdau wurden die Ansätze in einem denaturierenden SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 17).

Der dominierende Komplex zwischen der RNA und p55 entstand mit Proteinen beider Zellkompartimente (Spur 1-4), d.h. p55 war in Kern und Zytoplasma nachweisbar und besaß in beiden Zellkompartimenten die gleiche Affinität zur 52nt-RNA. Im Gegensatz dazu konnte die Quervernetzung von p36 und p40 mit der MARCKS 52nt-RNA nur mit Kernextrakten nachgewiesen werden (Spur 1, 3). Der vierte RNA/Protein-Komplex mit p30 konnte gar nicht nachgewiesen werden, so dass anzunehmen ist, dass seine Konzentration und/oder Affinität zur RNA in Kern und Zytoplasma im Vergleich zu den anderen Proteinen gering ist.

Die Verteilung der nachgewiesenen UV-crosslink-Banden im Kern- und Zytoplasmakompartiment veränderte sich durch Aktivierung der PKC nicht. Mit S3T3⁻ und S3T3⁺ wurden die gleichen Intensitäten der RNA/Protein-Komplexe nachgewiesen und auch eine Translokation der MARCKS-RNA-Bindung vom Kern in das Zytoplasma oder umgekehrt wurde nicht beobachtet. Da aber nicht auszuschließen war, dass sich Affinitätsänderungen im UV-crosslink-Assay mangels Sensitivität nicht nachweisen ließen und deshalb PKC-abhängige Änderungen der RNA-Bindung nicht zu beobachten waren, wurden die gleichen Zellextrakte in einer Northwestern-Analyse (II.2.2.10) eingesetzt, einer im Vergleich zum UV-crosslink-Assay wesentlich sensitiveren Methode.

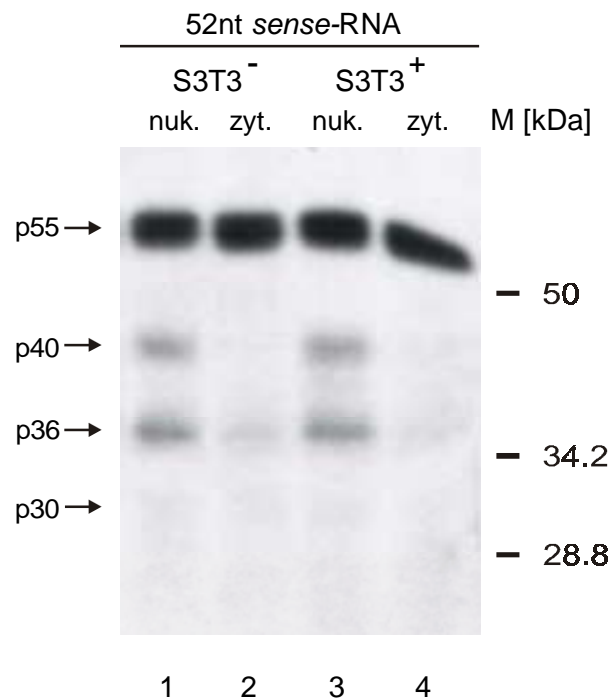


Abb. 17: UV-crosslink-Assay der MARCKS 52nt-RNA mit Kern- und Zytoplasmaproteinen von Swiss 3T3-Zellen

pBS-MARCKS 52nt wurde mit *Bam*HI linearisiert und radioaktiv durch die T3 RNA Polymerase unter Verwendung von [α -³²P]-UTP *in vitro* transkribiert. Jeweils 20 μ g der Kern- und Zytoplasmafraktion, die aus ruhenden und PKC-stimulierten Swiss 3T3-Zellen isoliert worden waren, wurden mit 2,5 ng (~3000 cpm) der markierten RNA für 15 min bei RT inkubiert und anschließend auf Eis mit 180 mJ UV-Licht bestrahlt. Das Experiment wurde wie in Abb. 16 beschrieben fortgesetzt (Filmexposition: Kodak AR mit Verstärkerfolien für 5 d bei -80°C). Die Positionen und Größen des Proteinstandards sind rechts angegeben, die Positionen der durch UV-crosslinking markierten Proteine p55, p40, p36 und p30 sind links mit Pfeilen markiert.

Die nukleären und zytoplasmatischen Extrakte wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen. Dann wurde radioaktiv transkribierte MARCKS 52nt-RNA (52nt *sense*) zur Hybridisierung mit den membran-immobilisierten Proteinen inkubiert. Die Proteine, die die RNA gebunden hatten, wurden mit einem Röntgenfilm autoradiographisch nachgewiesen. Zur Kontrolle wurde eine Parallelmembran mit einer radioaktiv transkribierten Bluescript-RNA (Bluescript *sense*) hybridisiert. Diese RNA bestand nur aus den die MARCKS 52nt-Sequenz flankierenden Vektornukleotiden, das 52nt CU-reiche *cis*-Element fehlte (Abb. 18).

Bei Inkubation der Membran mit der MARCKS 52nt-RNA ließ sich in Extrakten aus unstimulierten Zellen eine große Anzahl RNA-bindender Proteine nachweisen. Die RNA-Bindung wurde vor allem mit nuklärem Extrakt beobachtet, bis zu elf Proteine dieser Zellfraktion (S3T3⁻, nuk.) waren durch die gebundene RNA markiert worden. Die RNA-Bindung durch zytoplasmatische Proteine (S3T3⁻, zyt.) fiel hingegen bis auf eine Ausnahme schwächer aus. Nur bei ~16 kDa überwog das radioaktive Signal der Zytoplasmafraktion das Signal der Kernfraktion. Interessanterweise wirkte sich die Aktivierung der PKC gravierend auf die RNA-Bindung in der Kernfraktion (S3T3⁺, nuk.) aus. Die Bindungsaktivität der meisten Proteine wurde infolge der PDB-

Behandlung stark reduziert, manche Proteine zeigten unveränderte Bindung (z.B. ~25 kDa-Protein) und ein Protein schien durch die PKC-Aktivierung erst zur RNA-Bindung befähigt zu werden (~46 kDa-Protein). Demgegenüber änderte sich die RNA-Bindung in der Zytoplasmafraktion nach PKC-Aktivierung kaum (S3T3⁺, zyt.).

Die Spezifität der nachgewiesenen RNA/Protein-Interaktionen zur MARCKS 52nt-RNA wurde durch die Inkubation der Membran mit der Bluescript *sense*-RNA demonstriert (rechte Seite). Mit dieser RNA ließen sich keine RNA-bindenden Proteine nachweisen, wodurch deutlich wurde, dass die mit der 52nt *sense*-RNA detektierten Proteine hochspezifisch mit dem CU-reichen *cis*-Element reagiert hatten und nicht mit Sequenzen des Bluescriptvektors.

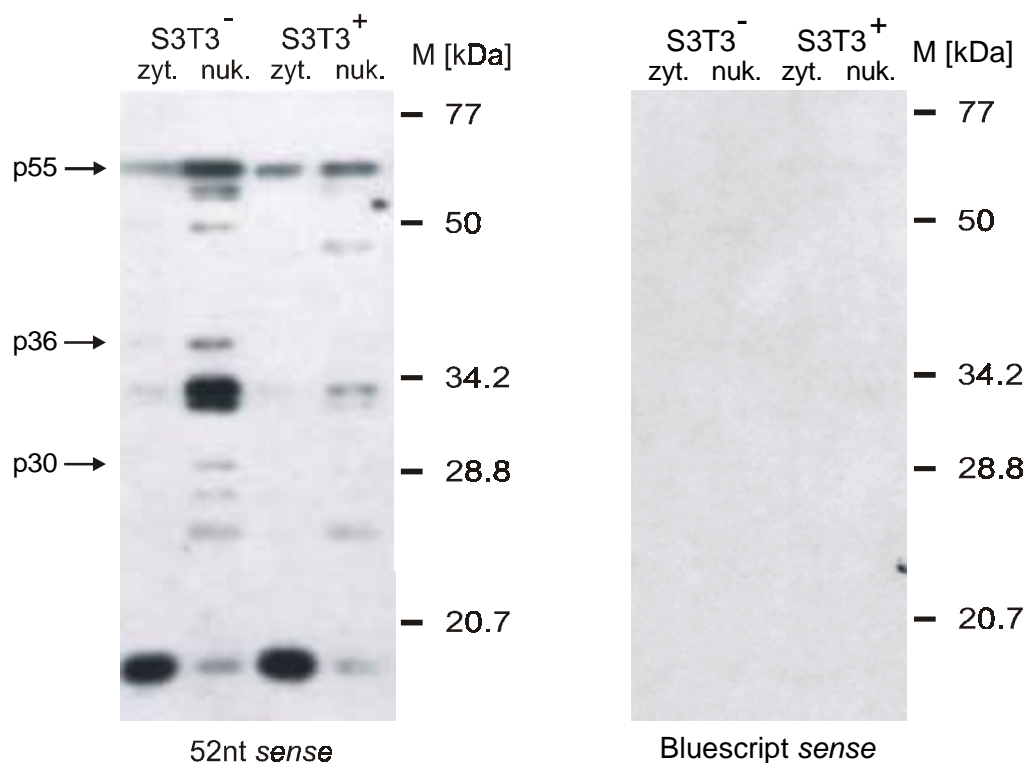


Abb. 18: Northwestern-Analyse der MARCKS 52nt-RNA-Bindung durch Kern- und Zytoplasmaproteine von Swiss 3T3-Zellen

pBS-MARCKS 52nt und pBluescript wurden mit *Bam*HI linearisiert und durch die T3 RNA Polymerase unter Verwendung von [α -³²P]-UTP radioaktiv *in vitro* transkribiert. 10 μ g der Kern- und Zytoplasmafractionen (S3T3⁻ und S3T3⁺) wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel ü.N. bei 50 V elektrophoretisch aufgetrennt, bevor die Proteine auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert wurden. Nach Blockierung freier Bindungsplätze der Membran mit BSA wurde die Membran entweder mit der radioaktiv markierten 52nt *sense*-RNA (links) oder der pBluescript *sense*-RNA (rechts) für 20 min bei 37°C und anschließend für 2 h bei RT inkubiert. Nach Entfernung nichtgebundener RNA wurde ein Röntgenfilm (Kodak AR) mit Verstärkerfolien bei -80°C für 1 d exponiert. Positionen und Größen des Proteinstandards sind jeweils rechts angegeben, die Positionen von drei in Abb.16 und 17 identifizierte Proteinen p55, p36 und p30 sind links mit Pfeilen markiert.

Fasst man die Ergebnisse der letzten drei Experimente zusammen (Abb. 16-18), so lassen sich drei der vier im UV-crosslink-Assay identifizierten RNA-bindenden Proteine (p55, p36 und p30) auch in der Northwestern-Analyse nachweisen (mit Pfeil markiert). Lediglich p40 wurde in der Northwestern-Analyse nicht detektiert. Vermutlich führte die Denaturierung der Zellextrakte vor der Elektrophorese zum Verlust der RNA-Bindungsaktivität für p40. In der Northwestern-Analyse wurden noch 8 weitere Proteine detektiert, die mit der CU-reichen MARCKS-RNA reagieren konnten. Auch die Affinitätsänderung dieser Proteine zur 52nt *sense*-RNA infolge der Behandlung der Zellen mit PDB war nur in der Northwestern-Analyse nachweisbar, wodurch die hohe Empfindlichkeit dieser Methode deutlich wurde. Die RNA-Bindung von nukleärem p36 war mit beiden Methoden demonstriert worden.

2.3 ELAV-Proteine binden die MARCKS-RNA

Die Funktion der MARCKS 3'UTR liegt in der konstitutiven Destabilisierung der MARCKS-mRNA (Rössler, 1999). Die hohe Stabilität der MARCKS-mRNA in ruhenden Swiss 3T3-Zellen kann daher nur zustande kommen, wenn aus der Bindung durch *trans*-Faktoren eine Stabilisierung der mRNA resultiert. Als solche stabilisierenden *trans*-Faktoren wurden Vertreter der ELAV/Hu-Genfamilie beschrieben. Sie binden vor allem AU- und/oder U-reiche Elemente von mRNAs, die für Proteine kodieren, die Zellwachstum und Differenzierung regulieren, und stabilisieren auf diese Weise die sonst kurzlebigen RNA-Moleküle (Antic & Keene, 1997; Brennan & Steitz, 2001; Atasoy et al., 1998).

Zusammen mit publizierten Eigenschaften der ELAV/Hu-Proteine ließen die hier präsentierten Ergebnisse aus folgenden Gründen eine Beteiligung dieser Genfamilie an der Bindung der MARCKS 3'UTR vermuten:

1. Die 52nt lange CU-reiche Sequenz, die als *cis*-Element identifiziert worden war (III.1.3), besitzt große Homologie zu Sequenzen, die durch ELAV/Hu-Proteine gebunden werden (Joseph et al., 1998; Chung et al., 1997).
2. Die mRNAs, deren Stabilität durch ELAV/Hu reguliert wird, kodieren für Proteine, die an Wachstum und Differenzierung beteiligt sind. Da MARCKS in Fibroblasten, Melanocyten und Endothelzellen eine wichtige Rolle bei der Wachstumskontrolle spielt (Herget et al., 1993; Brooks et al. 1996; Zhao et al., 2000), könnte auch die Stabilität der MARCKS-mRNA durch ELAV/Hu reguliert werden.
3. Eines der identifizierten Proteine, die die MARCKS 52nt-RNA binden (p36; Abb. 16-18), hat eine Molekülmasse von 36 kDa. Diese entspricht der Molekülmasse von HuR, einem der vier bekannten ELAV/Hu-Proteine (Ma et al., 1996).

4. HuR wird ubiquitär exprimiert und wurde auch in Fibroblasten nachgewiesen (Atasoy et al., 1998)
5. HuR ist in erster Linie kernlokalisiert mit vorübergehender Translokation ins Zytoplasma (Atasoy et al., 1998; Fan & Steitz, 1998b; Peng et al., 1998; Keene, 1999). Diese Eigenschaft entspricht dem identifizierten 36 kDa-Protein, dessen RNA-Bindung überwiegend in Kernextrakten nachgewiesen wurde und nur geringfügig in Zytoplasmaextrakten (Abb. 17, 18).

Im Folgenden sollte daher eine Beteiligung von HuR an der Bindung der MARCKS 52nt-RNA analysiert werden. Zusätzlich wurde auch die RNA-Bindung durch das neuronal exprimierte HuD-Protein untersucht, da die von den Swiss 3T3-Zellen abweichende Regulation der MARCKS mRNA-Stabilität in PCC7-Mz1-Zellen auf unterschiedlichen *trans*-Faktoren beruht (Schäfer, 1997; Rössler, 1999), und HuD einer dieser Faktoren sein könnte.

2.3.1 Herstellung der HuD-Expressionsvektoren

Um die RNA-Bindung *in vitro* untersuchen zu können, wurden die Hu-Proteine rekombinant hergestellt. HuD und HuR wurden als GST-Fusionsproteine in *E.coli* exprimiert und anschließend durch Glutathion-Sepharose aus dem Bakterienlysat isoliert. Darüberhinaus wurde auch Histidin-markiertes HuD hergestellt. Die Expressionsplasmide zur Gewinnung von GST-HuD und His₆-HuD mussten zunächst kloniert werden.

Der Klon 265114 des Phagenvektors λ UniZAP (II.1.6.7) diente als Ausgangsmaterial zur Amplifizierung der HuD-cDNA mit Hilfe der PCR-Reaktion. Mit den unter II.1.5 aufgeführten 5'- und 3'-HuD-Primern wurde die unter II.2.1.11.1 beschriebene PCR durchgeführt und ein Aliquot der PCR-Reaktionen im 1%igen Agarosegel aufgetrennt (Abb. 19A). Das synthetisierte 1,1 kb PCR-Fragment (Spur 2) korrespondierte mit der Größe der berechneten HuD-Bande (1,139 kb). Nach Gelreinigung wurde dieses PCR-Fragment für die Klonierung in die Expressionsvektoren pGex2T (II.1.6.4) und pQE30 (II.1.6.5) verwendet. Dazu wurde der Vektor pGex2T zunächst mit *EcoRI* geschnitten. Die entstandenen Enden wurden mit dem Klenow-Fragment zum Doppelstrang aufgefüllt, bevor mit *Bam*HI der zweite Restriktionsschnitt ausgeführt wurde. Das HuD-Fragment besaß durch die PCR-Reaktion am 5'-Ende eine *Bam*HI- und am 3'-Ende eine *Sma*I-Schnittstelle. Die Klonierung der HuD-cDNA in pGex2T erfolgte somit über *Bam*HI (5') und *Sma*I/*Eco*RI_{blunt} (3').

Der pQE30-Vektor wurde durch Restriktion mit *Bam*HI und *Sma*I für die Ligation vorbereitet, so dass das ebenso restringierte HuD-PCR-Fragment über *Bam*HI (5') und *Sma*I (3') einkloniert wurde. Die entstandenen Plasmide pGex-HuD und pQE30-HuD sind in Abb. 19B schematisch dargestellt.

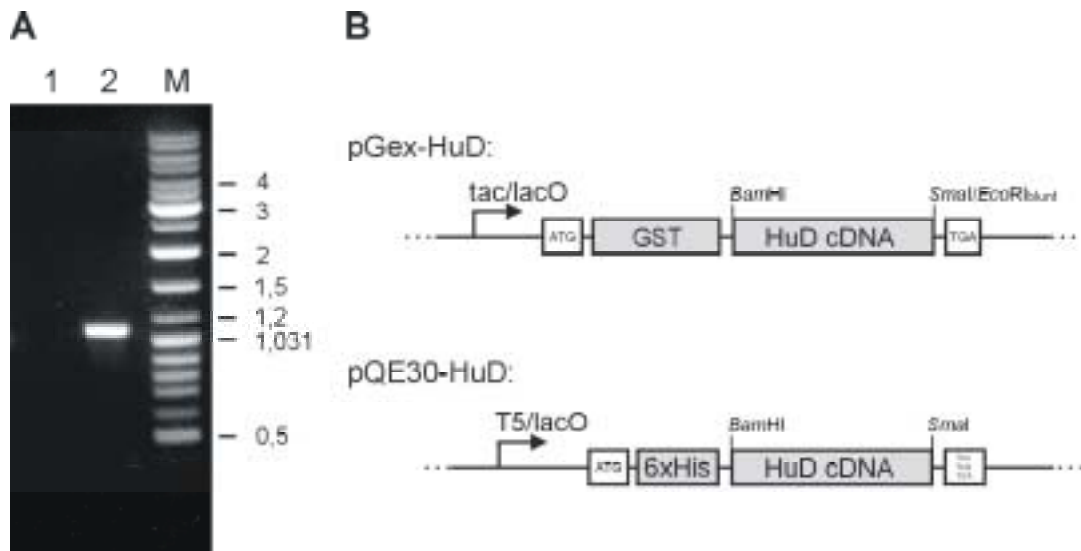


Abb. 19: Amplifikation der HuD-cDNA zur Klonierung in die bakteriellen Expressionsvektoren pGex2T und pQE30

A: Gelelektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate und Fotografie der DNA-Banden unter UV-Licht. Spur 1: H₂O Negativkontrolle; Spur 2: HuD-PCR-Produkt, bei 1,139 kb; Spur M: DNA-Marker. Die Positionen und Größen der Markerbanden sind rechts in kb angegeben.

B: Schematische Darstellung der Plasmide pGex-HuD und pQE30-HuD: Die Expression der einklonierten HuD-cDNA steht bei pGex-HuD unter der Kontrolle des tac-Promotors, bei pQE30-HuD unter der des T5-Promotors, beide in Verbindung mit dem lac-Operon (*E.coli*). Dadurch kann die Expression durch Zugabe von IPTG ins Bakterienmedium induziert werden. Die Klonierung erfolgte wie im Text beschrieben, die verwendeten Restriktionsschnittstellen sind eingezeichnet.

2.3.2 Expression und Reinigung von GST-HuD (GST-HuR) sowie von His₆-HuD

Die Expression und Reinigung der rekombinanten Fusionsproteine GST-HuD, GST-HuR und His₆-HuD wurde so durchgeführt, wie sie unter *Material und Methoden* (II.2.2.2) für beide Expressionssysteme (Abb. 19B) beschrieben wurde. Beispielhaft sind in Abb. 20 die Coomassie-Blau-gefärbten SDS-PAA-Kontrollgele zur Dokumentation der Reinigungsschritte für die Gewinnung von GST-HuD (A) und His₆-HuD (B) dargestellt. Deutlich zu erkennen ist die Expression von GST-HuD bzw. His₆-HuD infolge der Induktion durch IPTG (Abb. 20A und B, Spur 2). Die Molekülmasse der exprimierten Proteine betrug im Falle von GST-HuD 65 kDa, entsprechend der Addition aus der Molekülmasse von HuD (39 kDa) und GST (26 kDa), und im Falle von His₆-HuD 39 kDa.

Bei der Isolierung der GST-HuD-Fusionsproteine wurden mit den ersten beiden Elutionsschritten bereits ca. 76% des gesamten GST-HuD-Proteins von der Säule eluiert (Abb. 20A, Spur 6, 7), wobei neben dem vollständigen Fusionsprotein auch verkürzte GST-HuD Proteine eluiert wurden. Diese waren entweder durch Proteolyse während der Reinigung oder als Nebenprodukte während der GST-HuD-Expression entstanden. Durch Vergleich der Eluate mit einer BSA-Standardreihe ließ sich die Ausbeute an rekombinantem Protein bestimmen. Insgesamt wurden aus 500 ml Bakterienkultur 1180 µg GST-HuD mit Eluatkonzentrationen zwischen

0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Spur 7) und 0,04 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (Spur 11) isoliert. Entsprechend verlief die Gewinnung von GST-HuR und GST.

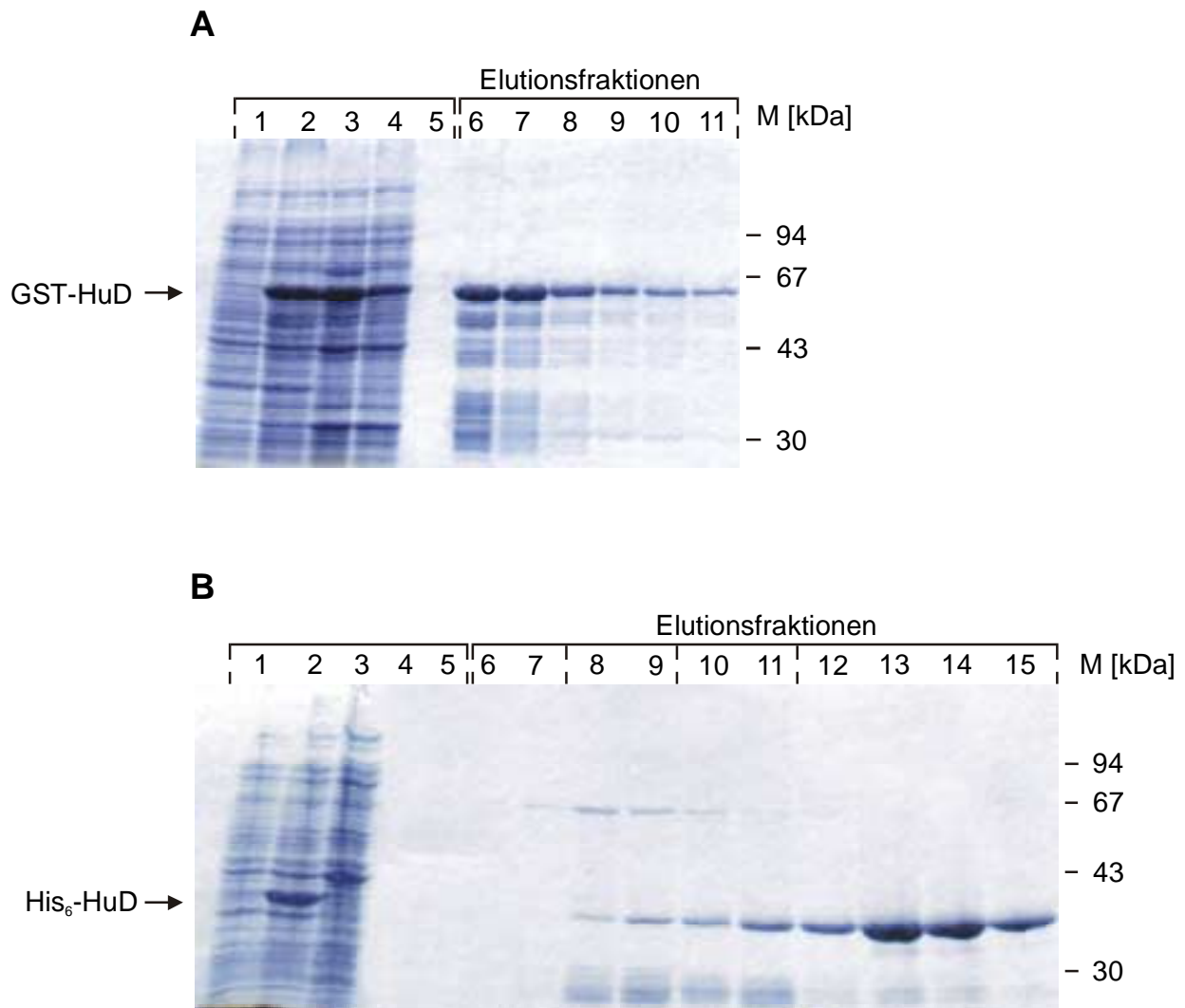


Abb. 20: Kontrolle der Reinigung von rekombinantem GST-HuD bzw. His₆-HuD

A: GST-HuD-Gewinnung: Durchführung der Proteinreinigung wie unter II.2.2.2.1 beschrieben. Probenauftrag (je 10 μl): Spur 1: Bakteriensuspension bei $\text{OD}_{595} = 0,5$ vor der Induktion mit IPTG; Spur 2: Bakteriensuspension nach 2-stündiger Induktion mit IPTG; Spur 3: Bakterienlysat nach der Sonolyse; Spur 4: Lysat-Säulendurchfluss; Spur 5: Wascheluat mit $E_{280} < 0,01$; Spur 6-11: Elution mit 150 mM NaCl und 50 mM Glutathion. Die Position des GST-HuD Fusionsproteins ist links mit Pfeil markiert.

B: His₆-HuD-Gewinnung: Durchführung der Proteinreinigung wie unter II.2.2.2.2 beschrieben. Probenauftrag (je 10 μl): Spur 1: Bakteriensuspension bei $\text{OD}_{595} = 0,5$ vor der Induktion mit IPTG; Spur 2: Bakteriensuspension nach 2-stündiger Induktion mit IPTG; Spur 3: Lysat-Säulendurchfluss; Spur 4: Wascheluat 1 (300 mM NaCl, pH 8) mit $E_{280} < 0,01$; Spur 5: Wascheluat 2 (300 mM NaCl, pH 6) mit $E_{280} < 0,01$; Spur 6-7: Elution bei pH 5,5 mit 500 mM NaCl; Spur 8-9: Elution bei pH 5 mit 750 mM NaCl; Spur 10-11: Elution bei pH 4,5 mit 1 M NaCl; Spur 12-15: Elution bei pH 4 mit 1 M NaCl. Die Position des His₆-HuD Fusionsproteins ist links mit Pfeil markiert.

Positionen und Größen der Proteinstandards in A und B sind rechts angegeben.

Die Elution von His₆-HuD (Abb. 20B) erfolgte bevorzugt mit Elutionspuffer IV bei pH 4 mit 1 M NaCl (Spur 12-15). Wie bei der Gewinnung von GST-HuD sind auch hier verkürzte His₆-HuD Proteine isoliert worden, die bevorzugt durch Elutionspuffer II und III eluiert wurden (Spur 8-11).

Außerdem wurde neben His₆-HuD noch ein bakterielles Protein von ~70 kDa koeluiert, welches bei pH 5 mit 750 mM NaCl von der Säule entfernt wurde (Spur 8-11). Für die folgenden Experimente wurden daher nur die Eluatfraktionen 12 bis 15 genutzt. Eine Mengenabschätzung dieser 4 Eluate mit einer BSA-Konzentrationsreihe im 10%igen SDS-PAA-Gel ergab eine Ausbeute von insgesamt 320 µg His₆-HuD aus 500 ml Bakterienkultur mit Konzentrationen zwischen 0,13 µg/µl (Spur 12) und 0,3 µg/µl (Spur 13). Die GST-HuD-Fraktionen 6-11 und die His₆-HuD-Eluate 12-15 wurden jeweils aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.3.3 GST-HuD und GST-HuR binden das 52nt *cis*-Element der MARCKS 3'UTR

Nachdem rekombinante Hu-Proteine zur Verfügung standen, konnte untersucht werden, ob diese Proteine die vollständige MARCKS 3'UTR binden. Zunächst wurde deshalb pBS-DC1 radioaktiv transkribiert und die markierte MARCKS 3'UTR-RNA im Gel-Retardation-Assay (II.2.2.8) mit ansteigenden Mengen GST-HuD inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden in einem nicht-denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, da sich native PAA-Gele als ungünstig erwiesen hatten: Die rekombinanten Proteine bildeten Präzipitate, so dass sie in den Probenaschen der PAA-Gele hängen blieben und kaum in das Gel einwanderten.

Nach Elektrophorese und Trocknung des Agarosegels wurde die Wechselwirkung von GST-HuD mit der MARCKS 3'UTR-RNA autoradiographisch nachgewiesen (Abb. 21).

Bereits mit 0,8 nM GST-HuD ließ sich eine schwache Interaktion nachweisen, die mit zunehmender HuD-Menge immer stärker wurde. Auffallend war dabei, dass sich die RNA/HuD-Komplexe bei niedrigeren HuD-Konzentrationen bis zum unteren Gelrand hinzogen und bei zunehmend höheren Mengen in einem Komplex zusammenliefen. Offenbar boten sich viele Bindungsplätze auf der MARCKS 3'UTR-RNA für HuD an, die bei niedriger HuD-Menge nicht alle besetzt waren. Dadurch wanderten die RNA/HuD-Aggregate als breiter „Schmier“. Die freie DC1-RNA war aus dem Gel bereits hinausgelaufen.

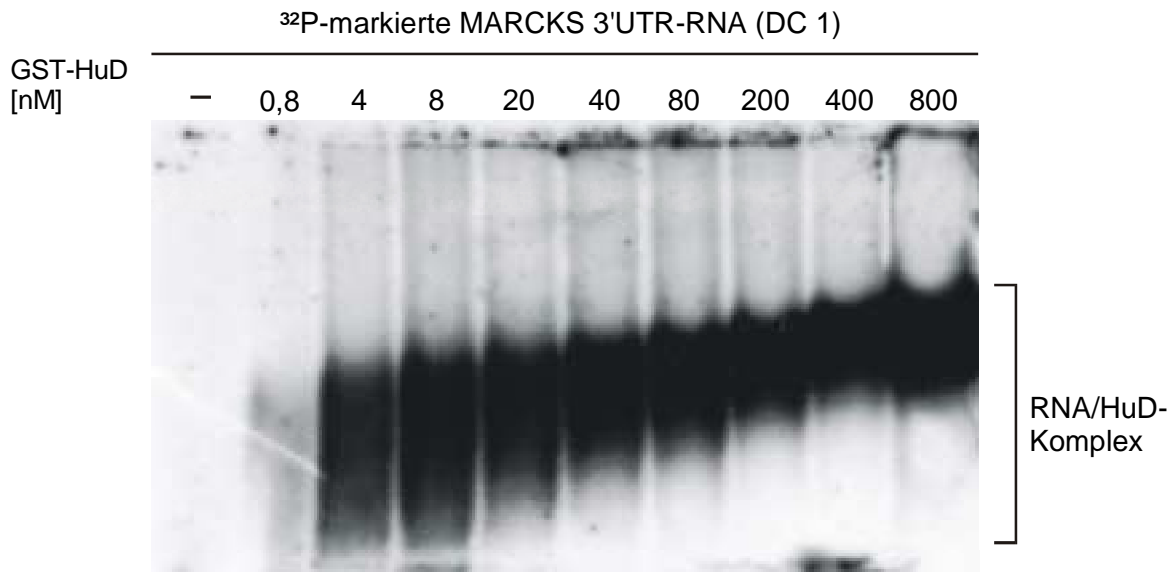


Abb. 21: Gel-Retardation-Assay mit radioaktiv markierter MARCKS 3'UTR-RNA und ansteigenden GST-HuD Konzentrationen

pBS-DC1 wurde mit *Hind*III linearisiert und unter Verwendung von [α -³²P]-UTP mit der T7 RNA Polymerase *in vitro* transkribiert. 2,5 ng der synthetisierten DC1-RNA (~3000 cpm) wurden in Retardationspuffer mit den angegebenen Konzentrationen von rekombinantem GST-HuD für 10 min bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe eines Dye-Mix wurde ein Viertel der jeweiligen Reaktionsansätze in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (2 h, 200 V, 4°C) und das Agarosegel anschließend unter Vakuum bei 50°C für 1 h getrocknet (Filmexposition: Kodak AR mit Verstärkerfolien für 5 d bei -80°C). Die Komplexe aus MARCKS 3'UTR-RNA und GST-HuD sind rechts mit einer Klammer markiert.

Damit konnten innerhalb der MARCKS 3'UTR tatsächlich Bindungsstellen für HuD nachgewiesen werden. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob das identifizierte 52nt CU-reiche *cis*-Element eines dieser Bindungsstellen war. pBS-MARCKS 52nt wurde in *sense*-Orientierung radioaktiv transkribiert (T3 RNA Polymerase) und wie oben mit zunehmenden GST-HuD Konzentrationen inkubiert. Parallel dazu wurde auch GST-HuR mit der radioaktiven 52nt *sense*-RNA inkubiert und beide Ansätze in je einem nicht-denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 22A und B).

Wie die Autoradiographien der Gele verdeutlichen, reagierten beide ELAV/Hu-Proteine (HuD, HuR) mit der MARCKS 52nt-RNA. Schon bei 0,8 nM GST-HuD und 4 nM GST-HuR konnten RNA/HuD- (A) bzw. RNA/HuR-Komplexe (B) detektiert werden. Zur Überprüfung der Spezifität wurden radioaktive Bluescript-Transkripte mit GST-HuD inkubiert. Dieses RNA-Substrat bestand nur aus den MARCKS-flankierenden Nukleotiden von pBS-MARCKS 52nt, das *cis*-Element selbst aber fehlte (Abb. 22C). Da keinerlei Wechselwirkung zwischen der RNA und HuD festgestellt werden konnte, waren die in A beobachteten RNA/HuD-Komplexe allein auf die Interaktion mit dem 52nt *cis*-Element zurückzuführen. In einer weiteren Kontrolle wurde die 52nt *sense*-RNA mit rekombinantem GST inkubiert und die Reaktionsprodukte elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 22D). Auch hier konnten keine Wechselwirkungen zwischen RNA und Protein festgestellt werden. Folglich waren die detektierten RNA/GST-Hu-Komplexe in A und B durch die Hu-Proteine zustande gekommen und nicht durch unspezifische Bindung der GST-Anteile.

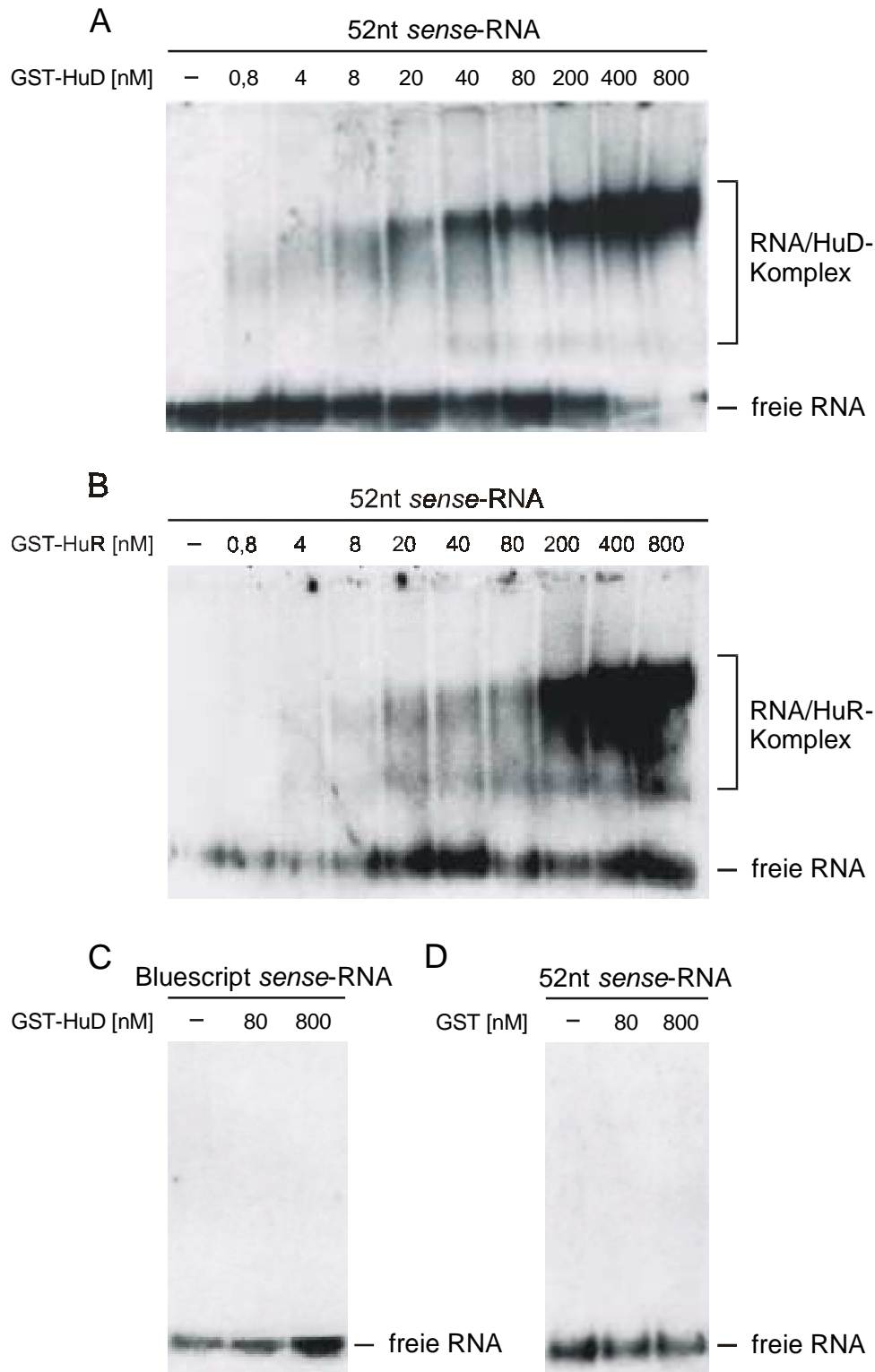


Abb. 22: Gel-Retardation-Assay mit ELAV/Hu-Proteinen und der MARCKS 52nt-RNA

pBS-MARCKS 52nt wurde mit *Bam*HI linearisiert und unter Verwendung von [α - 32 P]-UTP mit der T3 RNA Polymerase *in vitro* transkribiert. 2,5 ng der synthetisierten 52nt *sense*-RNA (~3000 cpm) wurden in Retardationspuffer mit den angegebenen Konzentrationen GST-HuD (**A**), GST-HuR (**B**), sowie GST (**D**) für 10 min bei 37°C inkubiert, bevor ein Dye-Mix zugegeben wurde. $\frac{1}{4}$ der Ansätze wurde in einem 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknen des Gels (1 h bei 50°C unter Vakuum) wurde ein Röntgenfilm exponiert (mit Verstärkerfolien, bei -80°C, 3 d). Zur Kontrolle wurde pBluescript mit *Bam*HI linearisiert und durch die T3 RNA Polymerase *in vitro* transkribiert ([α - 32 P]-UTP). 2,5 ng der Bluescript *sense*-RNA (~3000 cpm) wurden mit den angegebenen GST-HuD Konzentrationen inkubiert (**C**) und wie für A, B und D beschrieben weiter verfahren. Die Komplexe aus MARCKS 52nt-RNA und GST-HuD bzw. GST-HuR sind rechts mit einer Klammer markiert. Auch die Position der freien, ungebundenen RNA ist rechts markiert.

2.3.4 Herstellung und Affinitätsreinigung des ELAV/Hu-spezifischen Antiserums

Nachdem gezeigt werden konnte, dass HuD und HuR sowohl mit der gesamten MARCKS 3'UTR-RNA (Abb. 21), als auch mit der MARCKS 52nt-RNA (Abb. 22) interagieren konnten, sollte die Expression der Hu-Proteine in Swiss 3T3 und PCC7-Mz1-Zellen untersucht werden. Durch Vergleich der Expressionsdaten mit den im UV-crosslink-Assay detektierten Proteinen sollte sich eine mögliche Beteiligung der Hu-Proteine an den in Abb. 16 und 17 gezeigten RNA/Protein-Komplexen feststellen lassen. Für solche Analysen musste ein ELAV/Hu-spezifisches Antiserum zur Verfügung stehen, welches im Rahmen dieser Arbeit hergestellt wurde.

Um polyklonale Antikörper gegen ein bestimmtes Antigen zu erhalten, sind GST-Fusionsproteine als Immunogene geeignet, da sie nach Injektion in den Blutkreislauf eines Versuchstieres eine starke Immunantwort hervorrufen (Harlow & Lane, 1988). Durch Verwendung von GST-HuD sollte dieser Vorteil genutzt werden. Wegen der nahezu 70%igen Sequenzidentität zwischen den einzelnen ELAV/Hu-Proteinen (Okano & Darnell, 1997; Brennan & Steitz, 2001) konnte außerdem erwartet werden, dass das resultierende Antiserum auch die übrigen Vertreter der ELAV/Hu-Genfamilie erkennen kann.

Wie unter *Material und Methoden* (II.2.2.3 und II.2.2.4) beschrieben, wurde ein Kaninchen mit GST-HuD immunisiert und die Antigenerkennung des gewonnenen Rohserum durch ELISA-Test überprüft. Da bei einer Verdünnung von 1:32000 das Serum noch maximale Aktivität besaß (nicht gezeigt), wurde mit dem Rohserum auch eine Western Blot Analyse durchgeführt. Hier zeigte sich, dass zwar rekombinantes GST-HuD, GST-HuR und His₆-HuD sowie GST vom Antiserum erkannt wurden, in Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Extrakten jedoch neben ELAV/Hu noch weitere Proteine angefärbt wurden (nicht gezeigt). Um diese Kreuzreaktivitäten zu beseitigen, war eine Affinitätsreinigung des Antiserums nötig. Dies sollte zur Anreicherung der ELAV/Hu-spezifischen Antikörper führen und Serumproteine wie Albumin entfernen.

Wie beim ELISA-Test wurde zur Affinitätsreinigung rekombinantes His₆-HuD als Antigen eingesetzt, welches an eine aktivierte Gelmatrix (Affi-Gel 10) gekoppelt wurde. Die Kopplungsreaktion von HuD an den N-Hydroxysuccimidester des Säulenmaterials wird durch erhöhte Salzkonzentrationen nicht gestört (BioRad/München), weshalb die Eluate der His₆-HuD-Gewinnung (II.2.2.2.2 bzw. III.2.3.2) nach Vereinigung neutralisiert und direkt zur Säulenmatrix gegeben wurden.

Der Verlauf von Kopplung und Affinitätsreinigung (II.2.2.5) wurde in einem SDS-PAA-Gel kontrolliert, in welchem Aliquots von jedem Arbeitsschritt aufgetrennt worden waren (Abb. 23A). Die Färbung des Gels mit Coomassie-Blau machte deutlich, dass die HuD-Menge in der Kopplungslösung nach der Kopplungsreaktion abnahm und somit ein Großteil des His₆-HuD-Proteins an die Säulenmatrix gebunden hatte (Spur 1, 2). Von den Antikörpern im Rohserum reagierte nur ein kleiner Teil mit dem säulenständigen-HuD (Spur 3-5). Diese ließen sich durch neutrale

(pH 8,8) und basische Elution (pH 11,5), aber kaum durch saure Elution (pH 2,5) von der Säule isolieren (Spur 6-8).

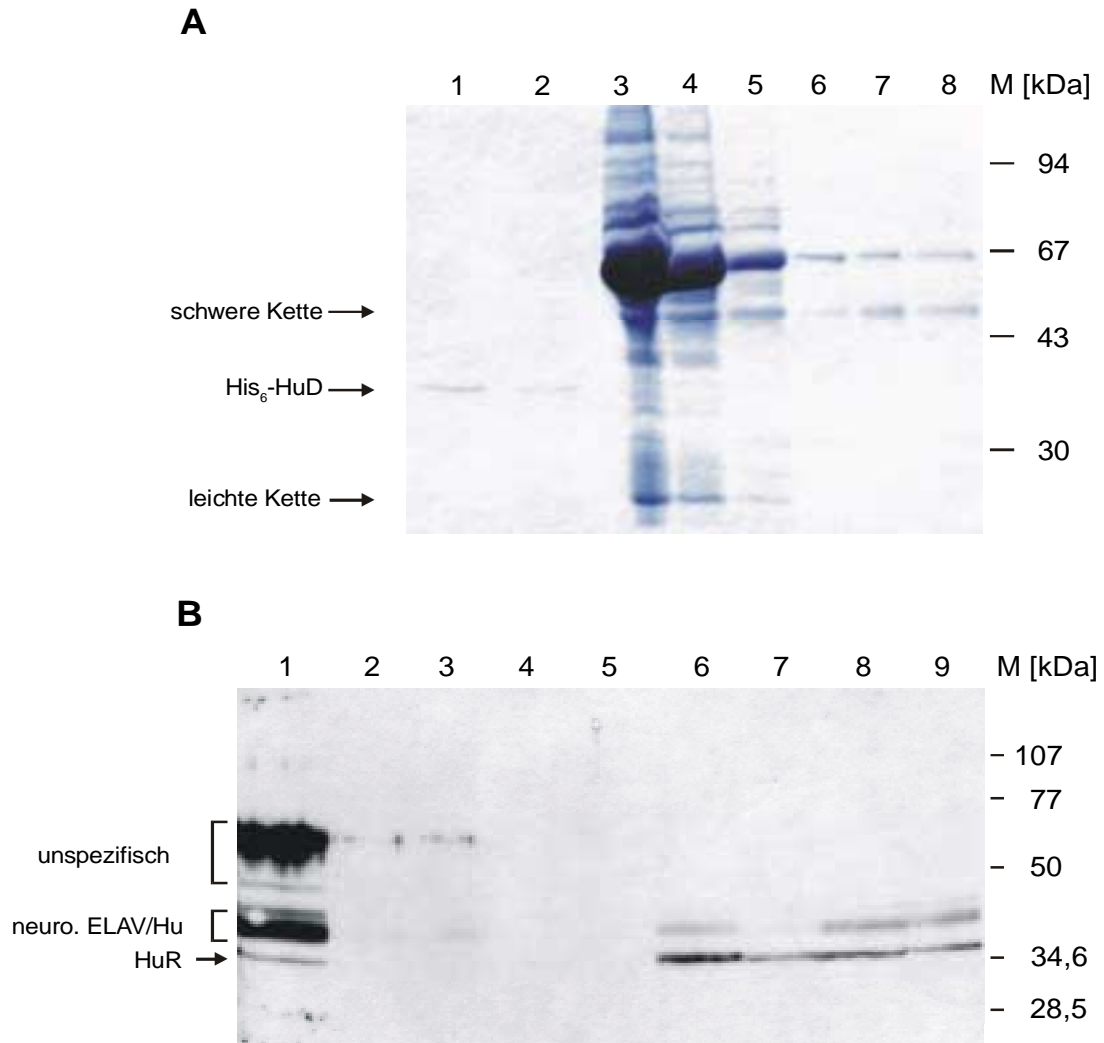


Abb. 23: Affinitätsreinigung des ELAV/Hu-Antiserums, Kontrollgel und Western Blot

A: Coomassie-Blau-gefärbtes Kontrollgel zur Affinitätsreinigung des ELAV/Hu-spezifischen Antiserums (je 10 µl). Spur 1: Kopplungslösung vor der Kopplung; Spur 2: Kopplungslösung nach der Kopplung; Spur 3: Säulendurchfluss des Rohserums; Spur 4: Wascheluat 1; Spur 5: Wascheluat 2; Spur 6-8: saures, neutrales und basisches Antikörpereluat. Die Positionen der schweren und leichten Antikörperketten sowie des gekoppelten His₆-HuD sind links mit Pfeilen markiert.

B: Western Blot Analyse mit den Eluatfraktionen der Affinitätsreinigung. 100 µg gesamtzytoplasmatischer Extrakt aus subkonfluenten PCC7-Mz1-Stammzellen wurden in eine die ganze Breite des Gels umspannenden Tasche eines 10%igen SDS-PAA-Gels aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine PVDF-Membran wurde diese in neun Streifen geschnitten und mit den Eluatfraktionen inkubiert: Spur 1: Säulendurchfluss des Rohserums, 1:8000; Spur 2: Wascheluat 1, 1:4000; Spur 3: Wascheluat 2, 1:2000; Spur 4-5: saures Eluat, 1:2000 und 1:4000; Spur 6-7: neutrales Eluat, 1:2000 und 1:4000; Spur 8-9: basisches Eluat, 1:2000 und 1:4000. Nach der Chemilumineszenzreaktion wurde ein Fuji Medical X-Ray-Röntgenfilm für 2 min exponiert. Die Positionen von HuR und den neuronalen ELAV/Hu-Proteinen sind links mit Pfeil bzw. Klammer markiert.

Die Position und Größe des Proteinstandards in A und B ist jeweils rechts angegeben.

Um zu überprüfen, ob die Eluate tatsächlich Antikörper gegen ELAV/Hu enthielten, wurde mit den verschiedenen Säulenfraktionen aus Abb. 23A eine Western Blot Analyse durchgeführt. Zytoplasmatischer PCC7-Mz1-Extrakt wurde in eine die ganze Breite des Gels überspannende Tasche eines 10%igen SDS-PAA-Gels gegeben und elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Elektrotransfer auf eine PVDF-Membran wurde diese in neun Streifen geschnitten und die Streifen mit den verschiedenen Antikörperfraktionen inkubiert (Abb. 23B).

Neben den noch im Durchfluss des Rohserums befindlichen ELAV/Hu-spezifischen Antikörpern enthielten auch die neutralen und basischen Eluate gegen ELAV/Hu-gerichtete Antikörper. Störende Kreuzreaktivitäten, die mit dem Rohserum zu beobachten waren (vgl. Spur 1), konnten in diesen Eluaten nicht beobachtet werden. Wegen der etwas höheren Aktivität der neutralen Antikörperfraktion (Spur 6, 7) wurde diese als ELAV/Hu-spezifisches Antiserum eingesetzt.

2.3.5 Spezifitätskontrolle des affinitätsgereinigten Antiserums

Maximale Hu-Signale ohne unspezifische Proteinanfärbungen wurden bei einer Verdünnung des ELAV/Hu-spezifischen Antiserums von 1:1000 detektiert, weshalb diese Verdünnung für die Western Blot Analyse optimal war (nicht gezeigt). In Zellextrakten von ruhenden und PDB-stimulierten Swiss 3T3-Zellen wurde jeweils eine Bande detektiert (Abb. 24A), die eine Molekülgröße von 36 kDa hatte (Spur 1, 2) und sich deshalb als HuR identifizieren ließ (Ma et al., 1996). In Folge der PKC-Aktivierung konnte keine Änderung in der HuR-Menge festgestellt werden, beide Zellextrakte enthielten offenbar gleich viel HuR.

In PCC7-Mz1-Zellen färbte das Antiserum neben HuR noch drei weitere Proteine an (Spur 3), die gemäß ihrer Molekülgrößen zwischen 38 und 42 kDa als HuC, HuD und Hel-N1 identifiziert werden konnten (Okano & Darnell, 1997). Wie erwartet, hatte die hohe Sequenzidentität der vier ELAV/Hu-Proteine dazu geführt, dass durch die Immunisierung des Kaninchens mit GST-HuD das Antiserum alle vier Proteine erkennen konnte. Auch die rekombinanten Hu-Proteine His₆-HuD, GST-HuD und GST-HuR wurden vom Antiserum angefärbt (Spur 4-6). Keine Signale wurden hingegen mit GST und His₆-GAP-43 erhalten (Spuren 7-8).

Dass es sich bei den detektierten Proteinen tatsächlich um ELAV/Hu-Proteine handelte, sollte in einer Western Blot Analyse mit den selben Proteinen wie in Abb. 24A geprüft werden, wobei das ELAV/Hu-Antiserum mit His₆-HuD präinkubiert wurde, um die Antigenerkennung auf der Membran zu blockieren. Durch Vergleich der detektierten Proteinbanden mit und ohne Antiserumblockierung konnten unspezifische Proteinanfärbungen von spezifischen unterschieden werden (Abb. 24B).

Wie erwartet wurden die rekombinanten Hu-Proteine durch das mit HuD komplexierte Antiserum nicht mehr angefärbt (Spur 4-6), bei den zytoplasmatischen Swiss 3T3- und PCC7-Mz1-Extrakten konnte aber ein überraschendes Phänomen beobachtet werden: Einerseits war die

Bindung an die ELAV/Hu-Proteine blockiert worden, andererseits wurden bis zu vier neue Proteine angefärbt, die ohne Blockierung nicht nachweisbar waren (Spur 1-3). Dieses Phänomen ließ sich dadurch erklären, dass HuD neben RNA auch an Proteine bindet. War HuD mit den Antikörpern des Antiserums komplexiert, wurden über die Bindung von HuD an weitere Proteine auch diese angefärbt, obwohl sie selbst nicht vom Antiserum erkannt wurden. Für HuR sind tatsächlich bereits Interaktionspartner identifiziert worden. Dabei handelt es sich um Proteine, die am mRNA-Export aus dem Kern beteiligt sind (Brennan et al., 2000; Gallouzi & Steitz, 2001). Für HuD können ebenfalls solche Interaktionspartner postuliert werden, da die neuronalen ELAV/Hu-Proteine mit Polysomen kolokalisieren (Antic & Keene, 1998).

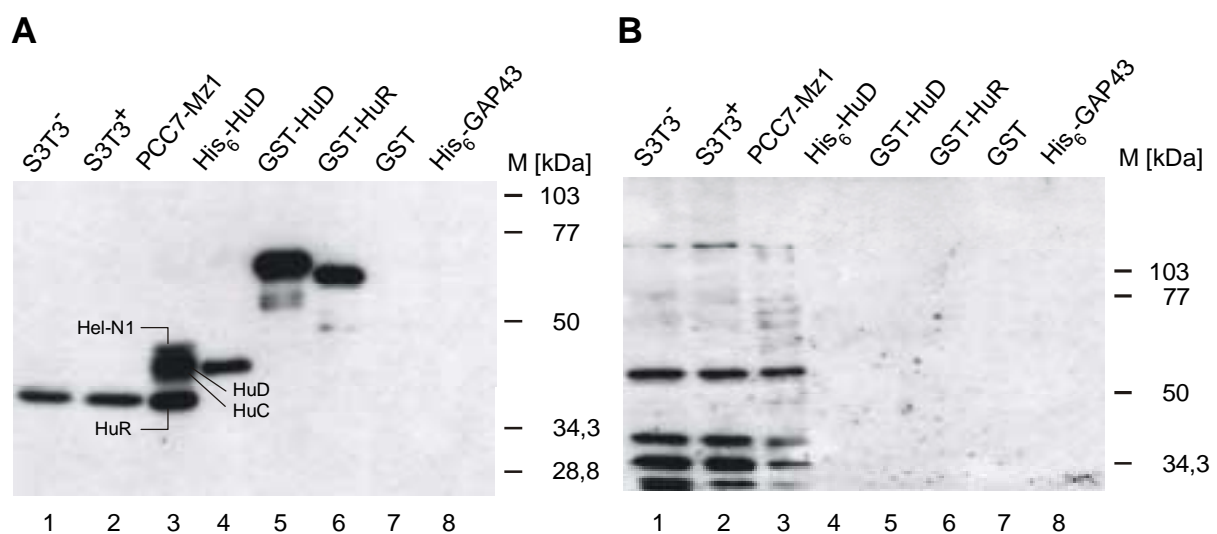


Abb. 24: Spezifitätskontrolle des affinitätsgereinigten Antiserum im Western Blot

A: Western Blot Analyse; Spur 1: 20 µg zytoplasm. Extrakt aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen; Spur 2: 20 µg zytoplasm. Extrakt aus 12 h mit 200 nM PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen; Spur 3: 10 µg zytoplasm. Extrakt aus subkonfluenten PCC7-Mz1-Stammzellen; Spur 4-7: je 2 ng His₆-HuD, GST-HuD, GST-HuR oder GST; Spur 8: 10 ng His₆-GAP43. Nach Elektrophorese im 10%igen SDS-PAA-Gel und Elektrotransfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurden die Hu-Proteine mit dem neutralen Eluat der ELAV/Hu-Affinitätsreinigung (1:1000) detektiert (Filmexposition mit Fuji X-ray Medical für 2 min). Die Banden der vier ELAV/Hu-Proteine im PCC7-Mz1-Extrakt sind markiert.

B: Western Blot in Anwesenheit des rekombinanten His₆-HuD; Spur 1-8: wie in A. Nach Elektrophorese (10%iges SDS-PAA-Gel) und Elektrotransfer wurden 0,2 nMol Antiserum (neutrales Eluat) und 0,2 nMol His₆-HuD für 10 min bei RT inkubiert und nach kurzem Abzentrifugieren ü.N. bei 4°C mit der Membran inkubiert. Der Nachweis angefärbter Proteine erfolgte über Chemilumineszenzreaktion und Filmexposition (Fuji X-ray Medical für 2 min). Die Positionen und Größen des mitaufgetragenen Proteinstandards in A und B sind jeweils rechts angegeben.

2.3.6 Subzelluläre Expression von HuR in Swiss 3T3-Zellen

HuR soll hauptsächlich im Zellkern lokalisiert sein, aber im Verlauf des Zellzyklus auch in das Zytoplasma translozieren (Atasoy et al., 1998; Fan & Steitz, 1998b; Keene, 1999). Ob diese Translokation durch die Aktivierung der PKC beeinflusst wird, war bisher noch nicht untersucht worden. Deshalb wurden Swiss 3T3-Zellen nach Eintritt in die G₀-Phase des Zellzyklus für 12 h mit 200 nM PDB stimuliert und zusammen mit unstimulierten Zellen geerntet. Nach Fraktionierung in Kern- und Zytoplasmaextrakte (II.2.2.6.2) wurde im Western Blot die intrazelluläre Ver-

teilung von HuR analysiert (Abb. 25, linke Seite). Dabei wurde deutlich, dass HuR in Swiss 3T3-Zellen im Kern lokalisiert ist und in geringerem Umfang auch im Zytoplasma nachgewiesen werden kann. Durch Stimulierung der PKC wurde diese Verteilung nicht verändert. Auch eine Induktion der HuR-Expression konnte nicht festgestellt werden.

Neben HuR wurde in diesen Extrakten die Expression eines weiteren RNA-bindenden Proteins untersucht. CstF64 (*cleavage stimulation factor of 64 kDa*) ist Bestandteil der Polyadenylierungsmaschinerie in Säugern und bindet GU- und/oder U-reiche Sequenzmotive, die sich ca. 30 Basen stromabwärts der Schnittstelle, an die die Poly(A)-Schwanz-Synthese erfolgt, befinden (vgl. *Einleitung* I.3.1.1.2; Chen et al., 1995b). Dass dieses Protein ausschließlich im Zellkern exprimiert wird, konnte auch mit den Swiss 3T3-Extrakten bestätigt werden (Abb. 25, rechte Seite). Und wie bei HuR änderte sich die Kernlokalisierung von CstF64 nach PKC-Aktivierung nicht. Allerdings wurde mit dem monoklonalen Antikörper 3A7 noch ein weiteres, ca. 70 kDa großes Protein detektiert, welches nach PKC-Aktivierung vollständig aus dem Zellkern depletiert wurde. Neben dem 64 kDa-Protein sind bisher noch zwei weitere Isoformen von CstF (CstF50 und CstF77) beschrieben worden. Der Antikörper wurde aber spezifisch gegen die 64 kDa-Isoform der CstF-Proteine gerichtet (Takagaki et al., 1990; Martincic et al., 1998) und sollte deshalb nicht mit diesen beiden CstF-Proteinen reagieren. Ob es sich bei dem 70 kDa-Protein um eine weitere CstF-Variante handelt, bleibt zu klären.

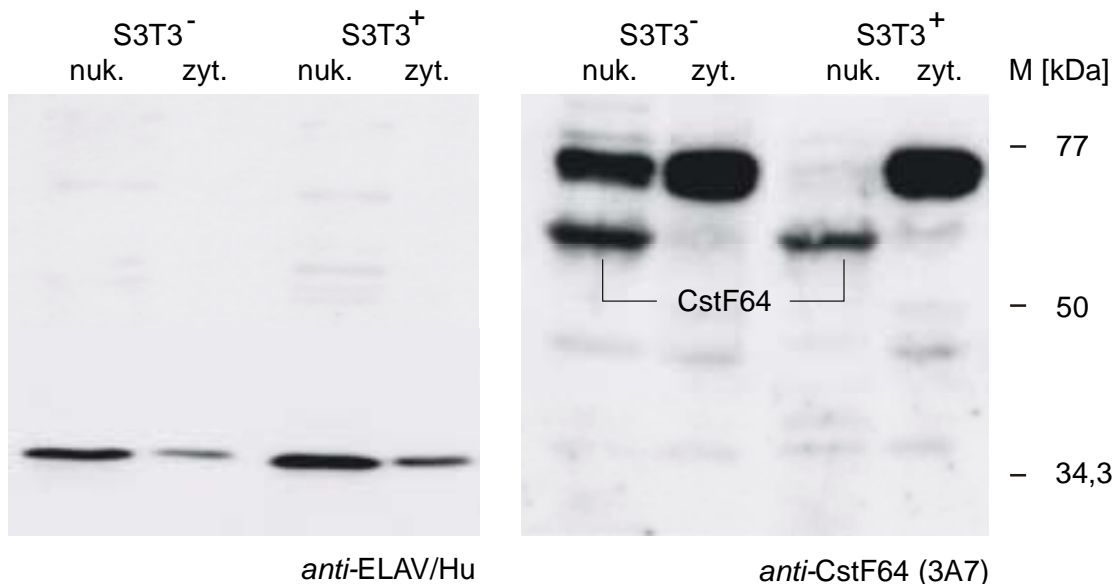


Abb. 25: Western Blot Analyse zur HuR- und CstF64-Expression in Swiss 3T3-Zellen nach PKC-Aktivierung

Je 20 µg zytoplasmatischer und nukleärer Zellextrakt aus ruhenden (S3T3⁻) und für 12 h mit 200 nM PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen (S3T3⁺) wurden in einem 10%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion von HuR wurde mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum vorgenommen, die Detektion von CstF64 mit dem monoklonalen Antikörper 3A7. Nach Inkubation mit POD-gekoppeltem Sekundärantikörper und Chemilumineszenzreaktion wurde für 10 min ein Röntgenfilm (Fuji X-ray Medical) exponiert. Die Bande von CstF64 sowie die Positionen und Größen des Proteinstandards sind rechts markiert.

2.3.7 Nachweis von HuR als MARCKS RNA-bindendes Protein

Nachdem demonstriert wurde, dass ELAV/Hu-Proteine die MARCKS 3'UTR über das 52nt *cis*-Element binden können (Abb. 21 und 22), und die subzelluläre Expression von HuR in Swiss 3T3-Fibroblasten aufgeklärt war (Abb. 25), wurde geprüft, ob das im UV-crosslink-Assay detektierte 36 kDa-Protein (Abb. 16 und 17) mit HuR identisch ist. Ansteigende Mengen von gesamtzytoplasmatischem Swiss 3T3-Extrakt wurden mit radioaktiv transkribierter MARCKS 52nt-RNA inkubiert und die RNA/Protein-Komplexe durch UV-Behandlung quervernetzt. Nach Auftrennung der Reaktionsprodukte durch denaturierende Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert und zur Autoradiographie ein Röntgenfilm exponiert.

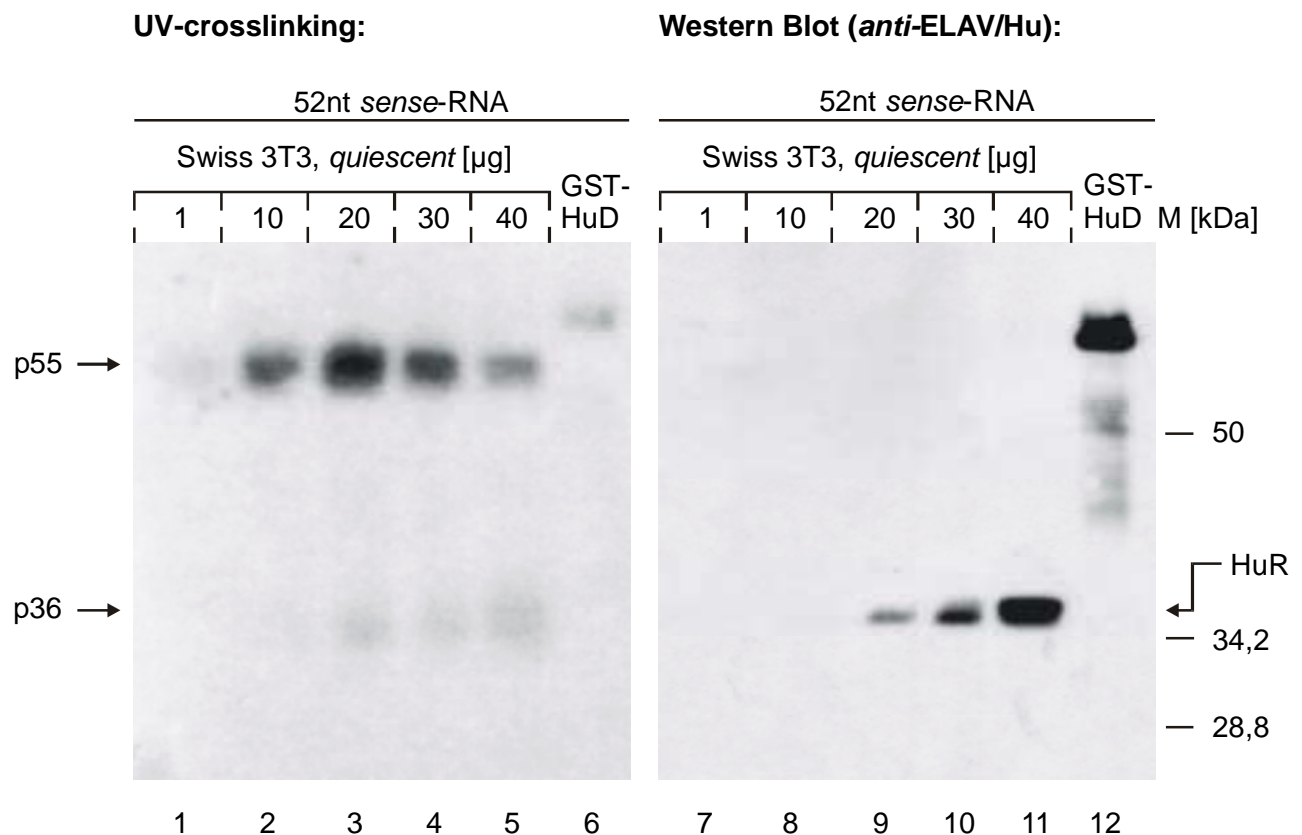


Abb. 26: UV-crosslinking Assay und Western Blot Analyse

pBS-MARCKS 52nt wurde mit *Bam*HI linearisiert und mit der T3 RNA Polymerase und [α - 32 P]-UTP radioaktiv transkribiert. 2,5 ng der *in vitro* transkribierten MARCKS 52nt-RNA (~3000 cpm) wurden mit den angegebenen Mengen von zytoplasmatischem Extrakt aus ruhenden (*quiescent*) Swiss 3T3-Zellen bzw. mit 10 ng GST-HuD für 15 min bei RT inkubiert und anschließend die sich gebildeten RNA/Protein-Komplexe durch 180 mJ UV-Licht quervernetzt. Nach Degradation nicht gebundener RNA mit 10 μ g RNase A je Ansatz für 30 min bei RT wurden die Reaktionsprodukte in einem 10%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch Elektrotransfer wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran übertragen und zur Autoradiographie ein Röntgenfilm (Kodak AR) mit Verstärkerfolien für 14 d bei -80°C exponiert (Spur 1-6). Die Membran wurde anschließend zur Western Blot Analyse mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum (1:1000) inkubiert (Filmexposition mit Fuji X-ray Medical für 10 min; Spur 7-12). Die Autoradiographiesignale für p55 und p36 sowie die HuR-Bande sind mit Pfeilen markiert, die Position und Größen des Proteinstandards sind rechts angegeben.

Zusätzlich zur autoradiographischen Auswertung wurde die HuR-Expression durch eine Western Blot Analyse kontrolliert. Sollte HuR im Swiss 3T3-Extrakt mit der MARCKS 52nt-RNA quervernetzt worden sein, müssten die autoradiographischen Signale bei 36 kDa mit den HuR-spezifischen Signalen im Western Blot deckungsgleich sein (Abb. 26).

Mit der Autoradiographie ließen sich auf der Membran zwei RNA/Protein-Komplexe nachweisen: Der dominierenden RNA/Protein-Komplex p55 (vgl. Abb. 16, 17) und ab 20 µg Swiss 3T3-Extrakt auch der Komplex p36, dessen Intensität bei weiterer Zunahme der Extraktmenge stärker wurde (Abb. 26, Spur 3-5). Das gleiche Ergebnis wurde für das HuR-Protein ermittelt. Dessen Position befand sich im Gel auf exakt derselben Höhe, wie die 36 kDa-UV-crosslink-Bande (Spur 9-11). Demnach scheinen p36 und HuR tatsächlich identisch zu sein.

Zur Kontrolle wurde auch rekombinantes GST-HuD mit der RNA UV-quervernetzt und wie erwartet befanden sich UV-crosslink- und Western Blot-Signal im Gel auf derselben Position (Spur 6, 12).

Um die Beteiligung von HuR an der Bindung des MARCKS 52nt *cis*-Elements direkt nachzuweisen, wurde eine Supershift-Analyse durchgeführt (II.2.2.7.3). Nukleäre und zytoplasmatische Extrakte von ruhenden und PKC-aktivierten Swiss 3T3-Zellen wurden mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum und zum Vergleich mit dem CstF64-spezifischen monoklonalen Antikörper inkubiert, bevor die radioaktiv transkribierte MARCKS 52nt-RNA hinzugefügt wurde. Nach RNase T1-Verdau nicht gebundener RNA wurden die Reaktionsprodukte in einer nativen PAA-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch nachgewiesen (Abb. 27).

Sowohl mit nukleären als auch mit zytoplasmatischen Extrakten bildeten sich zwei RNA/Protein-Komplexe, wie sie auch mit gesamtzytoplasmatischen Extrakten nachgewiesen wurden (vgl. Abb. 12). Die Komplexe der zytoplasmatischen Fraktionen wanderten im Gel im Vergleich zu den nukleären Komplexen etwas schneller (vgl. Spur 1-3 und 7-9 mit 4-6 und 10-12). Durch Inkubation mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum konnte in den nukleären Extrakten ein dritter, gegenüber den beiden RNA/Protein-Komplexen zusätzlich im Laufverhalten gebremster Komplex detektiert werden (Spur 2, 8) Auch im zytoplasmatischen Extrakt war dieser Komplex noch schwach erkennbar (Spur 5, 11). Die Verhältnisse der Supershift-Intensitäten der nukleären und zytoplasmatischen Extrakte entsprachen genau den im Western Blot detektierten HuR-Signalen in Swiss 3T3-Zellen (Abb. 25). Da das Antiserum in Swiss 3T3-Zellen hochspezifisch nur mit HuR reagierte (Abb. 24A und 25), konnte dieser Supershift auch nur durch die Wechselwirkung zwischen HuR, der MARCKS 52nt-RNA und dem Hu-spezifischen Antiserum zustande gekommen sein. Im Gegensatz dazu konnte mit dem CstF64-spezifischen Antikörper keine zusätzliche Supershift-Bande detektiert werden (Spur 3, 6, 9, 12). Zwischen CstF64 und dem MARCKS 52nt *cis*-Element besteht demnach keine Wechselwirkung.

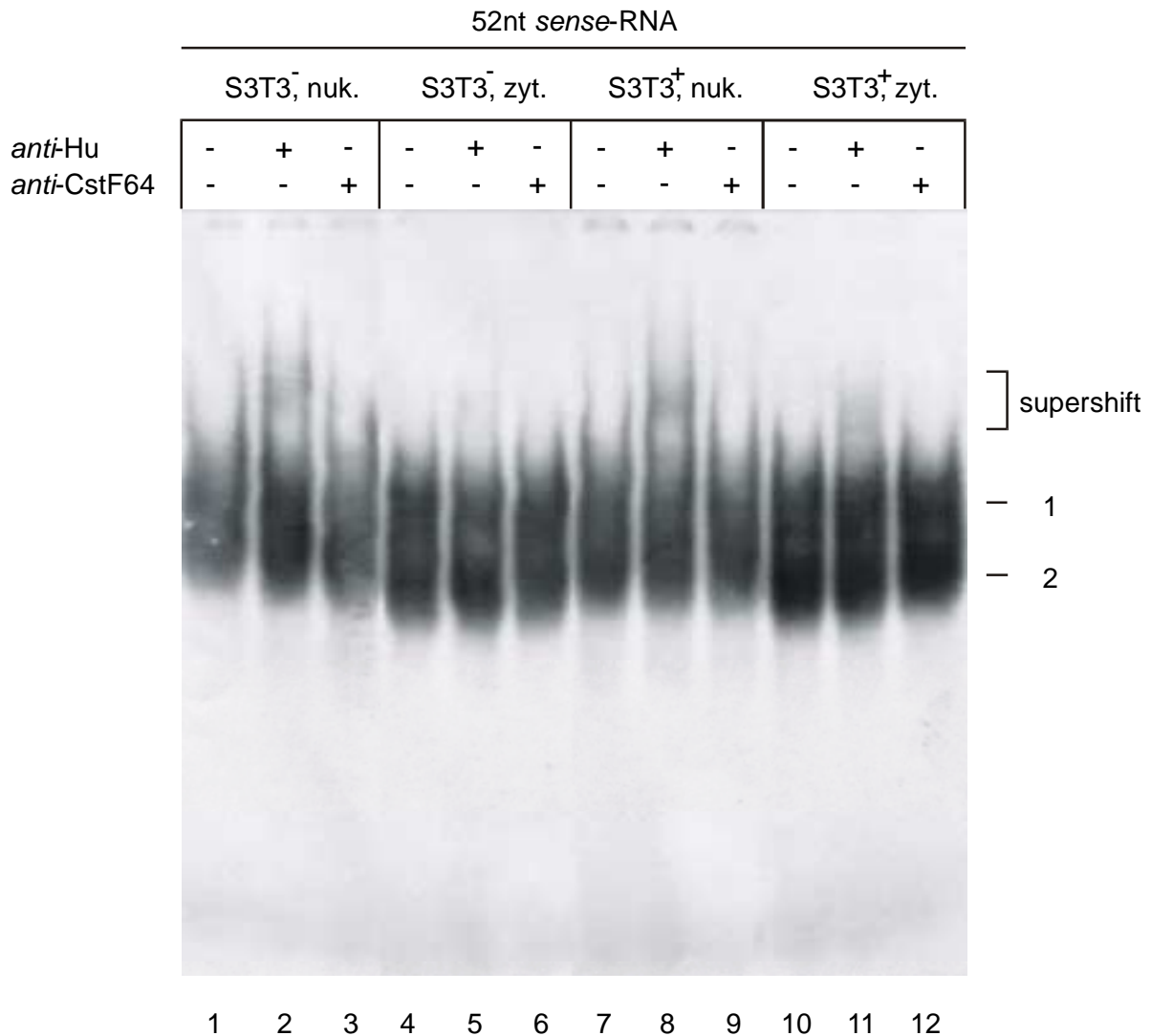


Abb. 27: Supershift-Analyse: Nachweis der Wechselwirkung von HuR mit der MARCKS 52nt-RNA

pBS-MARCKS 52nt wurde mit *Bam*HI linearisiert und durch die T3 RNA Polymerase mit [α -³²P]-UTP radioaktiv transkribiert. Je 10 μ g nukleärer und zytoplasmatischer Extrakte aus ruhenden sowie für 5 h mit 200 nM PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen wurden wie angegeben ohne Antiserum, mit 4 μ l ELAV/Hu- oder CstF64- spezifischen Antikörpern für 30 min auf Eis inkubiert, bevor 2,5 ng der *in vitro* transkribierten MARCKS 52nt-RNA (~3000 cpm) je Ansatz hinzugefügt wurden. Das Experiment wurde wie in Abb. 6 beschrieben fortgesetzt (Filmexposition: Kodak AR mit Verstärkerfolien für 1 d bei -80°C). Die beiden RNA/Protein-Komplexe (1, 2) sowie die Supershiftbanden sind rechts markiert.

Nur mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum ließ sich ein Supershift erzeugen. Entsprechend der HuR-Expression war dieser hauptsächlich in Kernextrakten zu beobachten.

2.3.8 Beteiligung des Poly(A)-Schwanzes an der Protein-Bindung des 52nt *cis*-Elements

In den RNase/EMSA-Analysen mit den MARCKS 3'UTR-Transkripten, bzw. der MARCKS 52nt-RNA zeigten Extrakte aus unstimulierten und PKC-aktivierten Zellen keine Unterschiede in der Ausbildung der RNA/Protein-Komplexe (Abb. 6, 7, 12). Um auszuschließen, dass diese Ergebnisse auf das Fehlen einer wichtigen Komponente in den Reaktionsansätzen zurückzuführen war, sollte eine mögliche Beteiligung des Poly(A)-Schwanzes an der RNA/Protein-Interaktion

überprüft werden. In Säugerzellen ist bekannt, dass eine *cis*-Element-gesteuerte Destabilisierung der mRNA, z.B. durch AU-reiche Elemente (ARE), zuerst die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes und dann die Degradation der mRNA zur Folge hat (Wilson & Treisman, 1988; Xu et al., 1997; Brewer, 1998; Ford et al., 1999; Brennan & Steitz, 2001). Die Anwesenheit destabilisierender ARE beschleunigt die Deadenylierung und setzt eine Wechselwirkung zwischen *cis*-Element und Poly(A)-Schwanz durch *cis*-Element-bindende Proteine voraus (Chen et al., 1995a; Fan et al., 1997). Diese Wechselwirkung kann entweder über Protein-Protein-Interaktion mit Poly(A)-bindenden Proteinen (PABP) erfolgen (Laroia et al., 1999) oder durch direkte Bindung des Poly(A)-Schwanzes. So ist von ELAV/Hu-Proteinen bekannt, dass neben der Interaktion mit U-reichen *cis*-Elementen auch der Poly(A)-Schwanz gebunden wird (Ma et al., 1997) und diese Bindung essentiell für die Funktion der Hu-Proteine ist (Anderson et al., 2000). Da HuR als *trans*-Faktor identifiziert worden war, der die MARCKS 52nt-RNA bindet (Abb. 26, 27), könnte auch der Poly(A)-Schwanz für die Wechselwirkung zwischen dem 52nt *cis*-Element der MARCKS 3'UTR und den Swiss 3T3-Proteinen von Bedeutung sein. Durch die Verwendung von polyadenylierten Transkripten ließe sich evtl. eine Änderung der RNA/Protein-Bindung infolge der PKC-Aktivierung nachweisen, die die PKC-vermittelte Destabilisierung der MARCKS-mRNA begründen könnte. Dazu mussten zunächst die MARCKS 3'UTR und das MARCKS 52nt Element in einen Vektor umkloniert werden, der die Synthese polyadenylierter RNA ermöglichte.

2.3.8.1 Klonierung der MARCKS 3'UTR und des MARCKS 52nt Elements in pCR-Script-poly(A)

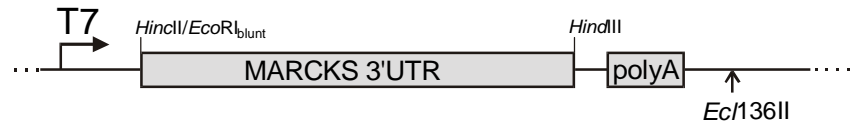
In den Vektor pCR-Script-poly(A) (II.1.6.3) war über *Xba*I und *Sac*I eine Polyadenylsäuresequenz von 56nt Länge einkloniert worden (H. Kleinert, pers. Mitteilung). Um die cDNAs der MARCKS 3'UTR und des MARCKS 52nt Elements in diesen Vektor unmittelbar vor den Poly(A)-Bereich einzuklonieren, wurde folgendermaßen vorgegangen. Das Plasmid pBS-DC1 lieferte die cDNA der MARCKS 3'UTR, indem die DNA zuerst mit *Eco*RI geschnitten wurde und nach Auffüllen der entstandenen Enden durch das Klenow-Fragment der zweite Schnitt mit *Hind*III ausgeführt wurde. pCR-Script-poly(A) wurde mit *Hinc*II und *Hind*III verdaut, so dass die MARCKS 3'UTR-cDNA (1287 bp) über *Hinc*II/*Eco*RI_{blunt} (5') und *Hind*III (3') einkloniert werden konnte.

Durch Verdau des Plasmids pBS-MARCKS 52nt mit *Apa*I (5') und *Xho*I (3') wurde die cDNA des MARCKS 52nt *cis*-Elements isoliert (66 bp) und in den in gleicher Weise restringierten Vektor pCR-Script-poly(A) einkloniert.

Die Klonierung von pCR-MARCKS 3'UTR-poly(A) und pCR-MARCKS 52nt-poly(A) wurde durch Sequenzierung kontrolliert. Die beiden Plasmide sind in Abb. 28 schematisch dargestellt. Für

die *in vitro* Transkription wurden die Konstrukte mit *Ec*136II linearisiert und durch die T7 RNA Polymerase transkribiert.

pCR-MARCKS 3'UTR-poly(A):



pCR-MARCKS 52nt-poly(A):

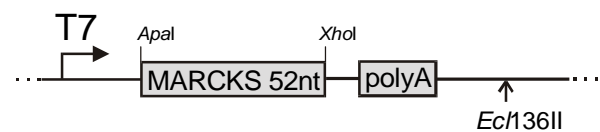


Abb. 28: Klonierung der cDNAs der MARCKS 3'UTR und des MARCKS 52nt Elements in pCR-Script-poly(A)

Schematische Darstellung der Plasmide pCR-MARCKS 3'UTR-poly(A) und pCR-MARCKS 52nt-poly(A). Wie im Text beschrieben, wurden über die angegebenen Restriktionsschnittstellen die MARCKS 3'UTR (1287 bp) und das MARCKS 52nt Element (66 bp) einkloniert.

2.3.8.2 Effekt des Poly(A)-Schwanzes auf die RNA/Protein-Interaktion

Zum direkten Vergleich der Proteinbindung an MARCKS-Transkripte mit und ohne Poly(A)-Schwanz wurden sowohl die Konstrukte pCR-MARCKS 3'UTR-poly(A) und pCR-MARCKS 52nt-poly(A) (Abb. 28) als auch pBS-DC1 (Abb. 4) und pBS-MARCKS 52nt (Abb. 11) radioaktiv *in vitro* transkribiert. In einem UV-crosslink-Assay wurden diese Transkripte mit fraktionierten Swiss 3T3-Extrakten (Kern- und Zytoplasmafraktion) inkubiert, die von in der G₀-Phase arretierten bzw. für 5 h mit 200 nM PDB stimulierten Zellen stammten (Abb. 29).

Zunächst wurde eine unerwartete Beobachtung gemacht: Die RNA-Bindung von p55 konnte nur noch mit den MARCKS 52nt- bzw. MARCKS 52nt-poly(A)-Transkripten nachgewiesen werden (Spur 9-16), mit der MARCKS 3'UTR ergab sich keine Interaktion (Spur 1-8). Vergleichbar dem Konkurrenzexperiment mit dem 52nt-Oligonukleotid (Abb. 16) führte die fehlende Wechselwirkung zwischen p55 und der RNA offenbar dazu, dass wesentlich mehr p40 und HuR an die MARCKS 3'UTR-RNA binden konnten, als bei gleichzeitiger Formierung des RNA/p55-Komplexes. Die stärkere Wechselwirkung zwischen der RNA und p40 bzw. HuR betraf nicht nur die Kernfraktionen (Spur 1, 3, 5, 7), sondern konnte auch im Zytoplasma beobachtet werden (Spur 2, 4, 6, 8). Die Bindung von p40 und HuR an die MARCKS 52nt-RNA (mit oder ohne Poly(A)-Schwanz) ließ sich, wie schon in Abb. 17 demonstriert, nur in der Kernfraktion nachweisen (Spur 9, 11, 13, 15).

Die Verwendung polyadenylierter RNA lieferte keinen Hinweis auf eine Beteiligung des Poly(A)-Schwanzes an der Formierung der zytoplasmatischen RNA/Protein-Komplexe. (Spur 1-4, 9-12).

In den Kernfraktionen konnte allerdings nach PKC-Aktivierung eine Abnahme der Komplexe zwischen p40 bzw. HuR und der Poly(A)-RNA beobachtet werden (Spur 1, 3, 9, 11), die ohne Poly(A)-Schwanz nicht (Spur 5, 7), oder nur schwach (Spur 13, 15) vorhanden war. Im Zytoplasma war diese Änderung nicht zu beobachten (Spur 2, 4, 10, 12). Der Poly(A)-Schwanz scheint demnach wichtiger für die RNA/Protein-Interaktion im Kern zu sein, als im Zytoplasma.

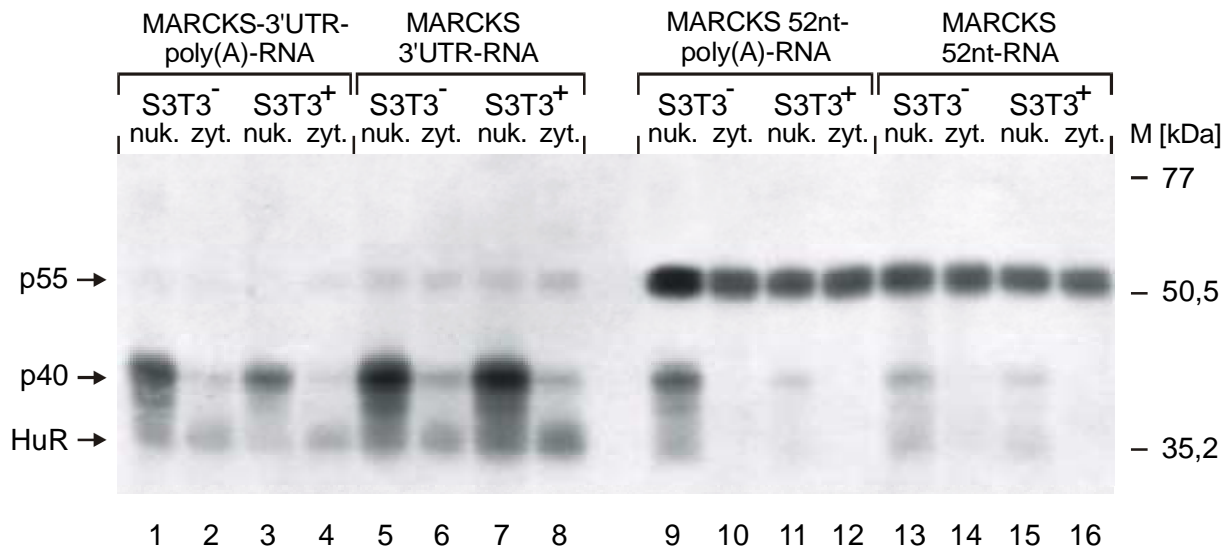


Abb. 29: UV crosslink-Assay mit der MARCKS 3'UTR- bzw. MARCKS 52nt-RNA: Effekt des Poly(A)-Schwanzes auf die RNA-Bindung der Swiss 3T3-Proteine

pBS-DC1 wurde mit *Hind*III und pCR-MARCKS 3'UTR-poly(A) bzw. pCR-MARCKS 52nt-poly(A) mit *Eco*136II linearisiert und durch die T7 RNA Polymerase mit [α - 32 P]-UTP transkribiert. pBS-MARCKS 52nt wurde mit *Bam*HI linearisiert und durch die T3 RNA Polymerase radioaktiv transkribiert. Je 2,5 ng der RNA-Transkripte (~3000 cpm) wurden mit 10 μ g Kern- oder Zytoplasmaextrakten aus ruhenden bzw. für 5 h mit 200 nM PDB stimulierten Swiss 3T3-Zellen für 15 min bei RT inkubiert und die entstandenen RNA/Protein-Komplexe durch 180 mJ UV-Licht quervernetzt. Nach RNase A-Verdau für 30 min bei RT wurden die Reaktionsprodukte in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Dem getrockneten Gel wurde für 4 d ein Röntgenfilm (Kodak AR) mit Verstärkerfolien bei -80°C exponiert. Die Positionen von p55, p40 und HuR sind links mit Pfeilen markiert, die Positionen und Größen des Proteinstandards sind rechts angegeben.

3 Funktion von ELAV/Hu bei der MARCKS-mRNA-Stabilitätskontrolle

In den bisher präsentierten Ergebnissen wurde die Bindung von RNA-interagierenden Proteinen an das 52nt *cis*-Element der MARCKS 3'UTR charakterisiert. Vertreter der ELAV/Hu-Genfamilie konnten dabei als sehr effektive *trans*-Faktoren beschrieben werden, die mit der MARCKS 52nt-RNA einen RNA/Protein-Komplex bilden können (Abb. 21, 22A und B). Tatsächlich wurde das ubiquitär exprimierte HuR-Protein in Swiss 3T3-Fibroblasten als ein solcher *trans*-Faktor identifiziert (Abb. 26, 27). Mit diesem Befund stellte sich aber auch die Frage, welche Funktion HuR bezüglich der MARCKS-mRNA-Stabilität ausübt. Um diese Frage zu klären, wurden die im Folgenden beschriebenen Experimente durchgeführt.

3.1 RNA *in vitro*-Degradationsanalyse

Zunächst sollte eine *in vitro*-Degradationsanalyse (II.2.2.11) durchgeführt werden, um die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in Swiss 3T3-Zellen im definierten zellfreien System nachzustellen. Mit einem solchen System könnte die Rolle, die ELAV/Hu für die Stabilitätskontrolle der RNA spielt, *in vitro* überprüft werden.

pCR-MARCKS 3'UTR-poly(A) (Abb. 28) wurde nicht-radioaktiv *in vitro* transkribiert und die MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA mit zytoplasmatischen Zellextrakten aus ruhenden bzw. PKC-aktivierten Swiss 3T3-Zellen (5 h, 200 nM PDB) inkubiert. Zur Kontrolle wurde ein Degradationsansatz ohne Protein mitgeführt (Puffer-Kontrolle). Die verbliebene RNA wurde nach 0, 5, 10 und 20 min isoliert und im Northern Blot durch Hybridisierung mit einer ³²P-markierten MARCKS 3'UTR cDNA-Sonde nachgewiesen.

Wie in Abb. 30A dargestellt, wiesen die Signale der MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA-Banden in allen Ansätzen nur sehr geringe Unterschiede auf. Die RNA-Degradation schien aber schneller einzusetzen, wenn die RNA mit Extrakt von PKC-aktivierten Zellen inkubiert worden war (Spur 5-8). Zur exakten Quantifizierung der Degradationsanalyse wurde die Membran im Phosphorimager exponiert. Die RNA-Banden wurden densitometrisch gescannt und die Intensitätswerte mit denen der Puffer-Kontrolle korreliert. Diese Werte wurden schließlich prozentual zur Pufferkontrolle zum jeweiligen Zeitpunkt graphisch aufgetragen (Abb. 30B).

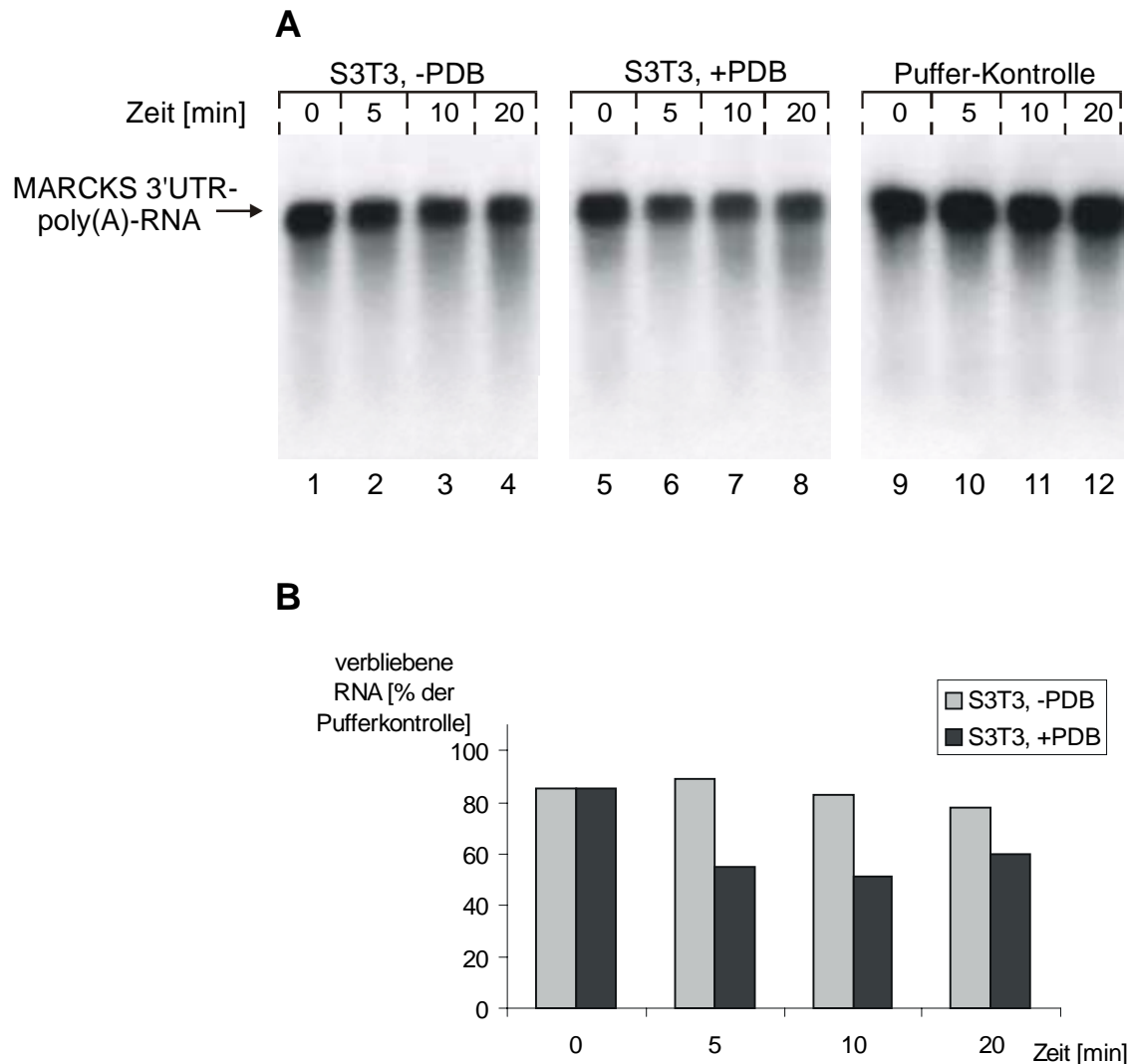


Abb. 30: *In vitro*-Degradationsanalyse der MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA

A: pCR-MARCKS 3'UTR-poly(A) wurde mit *Ec136II* linearisiert und durch die T7 RNA Polymerase transkribiert. 2 µg der synthetisierten RNA wurden ohne Proteine (Puffer-Kontrolle) bzw. mit 40 µg gesamtzytoplasmatischen Extrakten aus ruhenden bzw. PKC-aktivierten Swiss 3T3-Zellen (5 h mit 200 nM PDB) in Decay-Puffer inkubiert und nach 0, 5, 10 und 20 min je ¼ der Reaktionsansätze mit Stopp-Puffer versetzt. Die RNA-Proben wurden Phenol/Chloroform-extrahiert und zur Northern Blot Analyse im 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die auf eine Nylon-Membran übertragene RNA wurde mit einer ³²P-markierten MARCKS 3'UTR-cDNA-Sonde (pBC-DC1) hybridisiert und ein Röntgenfilm (Fuji X-ray Medical) für 1 h exponiert.

B: Nach densitometrischer Quantifizierung der RNA-Banden im Phosphorimager wurden die Intensitätswerte der Spuren 1-8 in A mit denen der Puffer-Kontrolle (Spuren 9-12) zum jeweiligen Zeitpunkt in Relation gesetzt und in % der Pufferkontrolle gegen die Zeit aufgetragen.

Mit Extrakt aus unstimulierten Zellen (Spur 1-4) ergab sich ein langsamer kontinuierlicher Abbau von anfangs 85% der RNA-Menge der Puffer-Kontrolle auf 78% nach 20 min (Spur 4), während mit Extrakt aus Phorbolster-stimulierten Zellen die RNA-Menge schon nach 5 min auf 55% der Puffer-Kontrolle gefallen war (Spur 6) und dann auf diesem Niveau blieb (Spur 7-8). Demnach verlief der RNA-Abbau mit Extrakt aus PKC-aktivierten Zellen tatsächlich etwas schneller als mit Extrakt aus unstimulierten Zellen und spiegelte die *in vivo*-Situation wider (Brooks et al., 1991, 1992). Allerdings waren diese Ergebnisse kaum zu reproduzieren und

auch der hohe RNA-Verlust im Vergleich zur Puffer-Kontrolle (15% schon zu Beginn der Degradationsanalyse) ließ eine Studie zur Funktion der ELAV/Hu-Proteine mit diesem Versuchsaufbau nicht sinnvoll erscheinen. Um die Beteiligung von HuR bzw. HuD an der Stabilitätskontrolle der MARCKS-mRNA in Fibroblastenzellen zu untersuchen, wurde deshalb eine andere Strategie gewählt.

3.2 Funktionsanalyse von HuR und HuD durch Überexpression

Anstatt den Effekt der ELAV/Hu-Proteine auf die MARCKS-mRNA Stabilität *in vitro* zu analysieren, wurde die Funktion von HuR bzw. HuD durch Überexpression in Fibroblastenzellen überprüft. Dies hatte den Vorteil, dass die Stabilität der vollständigen MARCKS-mRNA unter physiologischen Bedingungen untersucht werden konnte und der direkte Vergleich mit den von Brooks und Mitarbeitern (1991; 1992) bzw. Herget und Mitarbeitern (1993) publizierten Daten möglich war.

Dazu mussten die cDNAs der beiden ELAV/Hu-Proteine in eukaryontische Expressionsvektoren inkloniert werden. Durch Transfektion dieser Vektoren in Fibroblastenzellen wurde HuR/HuD in diesen Zellen überexprimiert.

3.2.1 Klonierung der induzierbaren Expressionsvektoren pTRE-HuR und pTRE-HuD

Um die ELAV/Hu-Expression in den transfizierten Zellen kontrollieren zu können, wurden die cDNAs von HuR und HuD in den Vektor pTRE (II.1.6.11) kloniert. Die Transkription eines Gens in diesem Vektor erfolgt nur bei Bindung des Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator-Proteins (tTA) an das Tet-Operon von pTRE. Die Zellen müssen daher zusätzlich mit pTetoff transfiziert worden sein, der konstitutiv tTA exprimiert (II.1.6.10; Abb. 31). Das tTA-Protein besteht aus einem Tet-Repressor (aus *E.coli*), über den die Bindung an das Tet-Operon erfolgt, und einem VP16-Anteil (Virion Protein 16 vom *Herpes Simplex Virus*), welcher den in pTRE verkürzten CMV-Promotor (P_{CMV_{min}}) aktiviert. Durch Zugabe von Tetracyclin bzw. Doxycyclin in das Kulturmedium wird tTA an der Bindung des Tet-Operons gehindert, wodurch die Transkription des Transgens abgeschaltet wird. Entsprechend führt die Kultivierung unter Tetracyclin/Doxycyclin-freien Bedingungen zum Anschalten der Transkription. Dieses induzierbare Genexpressions-system wurde von Gossen und Bujard (1992) entwickelt und wird von der Firma Clontech unter dem Namen Tetoff-System vertrieben. Die Plasmide und ihr Zusammenwirken bei der induzierbaren Genexpression sind in Abb. 31 schematisch zusammengefasst.

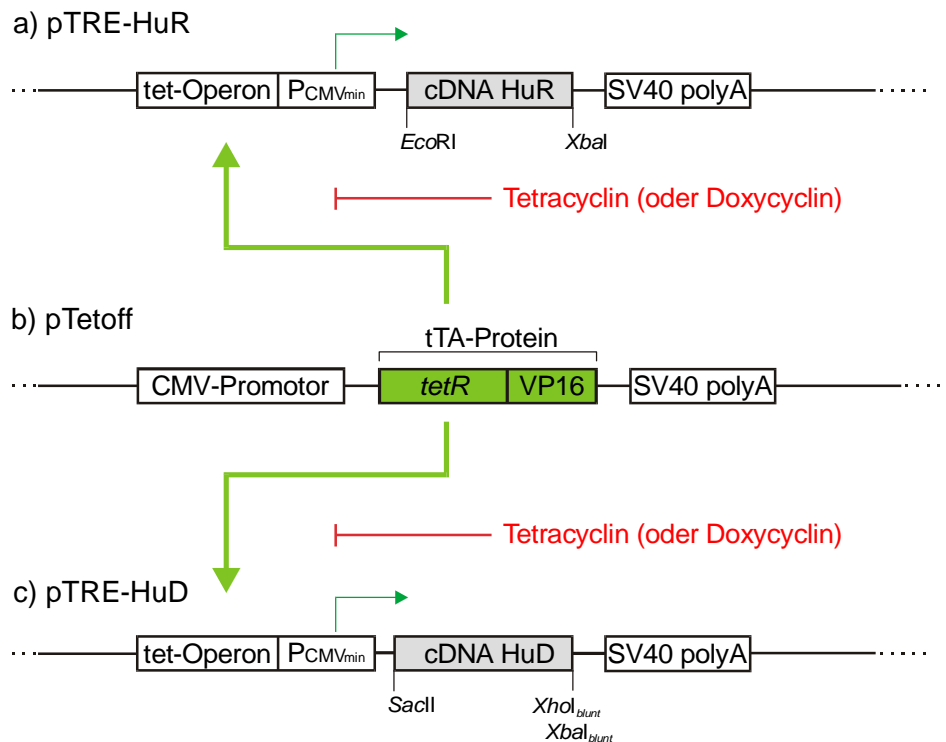


Abb. 31: Schematische Darstellung des Tetracyclin-kontrollierten Expressionssystems (Tetoff System)

Zellen, die mit pTetoff (b) transfiziert wurden, exprimieren den Tetracyclin-kontrollierten Transaktivator (tTA), welcher ein Fusionsprotein aus Tet-Repressor (*E.coli*) und VP16 Aktivator (*Herpes Simplex Virus*) ist. Ersterer bindet nur dann an das Tet-Operon von pTRE-HuR (a) bzw. pTRE-HuD (c) (dicker grüner Pfeil), wenn kein Tetracyclin bzw. Doxycyclin im Medium vorhanden ist. Die VP16-Region aktiviert den verkürzten CMV-Promotor (P_{CMVmin}) von pTRE (dünner grüner Pfeil). Ohne tTA-Aktivierung wird die einklonierte cDNA von HuR bzw. HuD nicht transkribiert, so dass die Überexpression abgeschaltet ist (Tetoff).

Die Klonierung von HuR bzw. HuD in den Vektor pTRE erfolgte wie im Text beschrieben.

Die cDNA von HuR wurde durch PCR-Amplifikation aus dem Plasmid pZeoSV(-)-HuR sense (II.1.6.9) gewonnen. Dazu wurde mit den in II.1.5 dargestellten HuR-Primern die in II.2.1.11.2 beschriebene PCR-Reaktion durchgeführt. Über *EcoRI* (5') und *XbaI* (3') wurde das HuR-PCR-Fragment (1133 bp) in den entsprechend restringierten pTRE-Vektor einkloniert (Abb. 31 a).

Die cDNA von HuD wurde aus λ UniZAP-265114 (II.1.6.7) durch Restriktion mit *XhoI*, Auffüllen der Schnittstellen zum Doppelstrang durch das Klenow-Fragment und Restriktion mit *SacI* erhalten. Der pTRE-Vektor wurde durch Verdau mit *XbaI*, Auffüllen zum Doppelstrang und Verdau mit *SacI* für die Klonierung vorbereitet. Über *SacI* (5') und *XhoI*_{blunt}/*XbaI*_{blunt} (3') wurde die HuD cDNA (1524 bp) in pTRE einkloniert (Abb. 31 c).

3.2.2 Transiente Überexpression von HuR und HuD in Swiss 3T3-Zellen

Bevor mit der stabilen Transfektion zur Erzeugung von Zellklonen mit regulierbarer ELAV/Hu-Überexpression begonnen wurde, wurden die Konstrukte pTetoff, pTRE-HuR und pTRE-HuD zunächst transient in Swiss 3T3-Zellen eingeschleust. Damit sollte ein erster Nachweis erbracht werden, dass sich eine Überexpression von HuR bzw. HuD auf die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität auswirkt.

Swiss 3T3-Zellen wurden in sechs 10-cm-Schalen ausplattiert und nach einem Tag Kultivierung wie unter II.2.3.5.1 beschrieben transfiziert. Dabei enthielt die Transfektionslösung für je zwei Schalen entweder pTetoff + pTRE (leer), pTetoff + pTRE-HuR oder pTetoff + pTRE-HuD. Nach 24 h Kultivierung wurden die Zellen je einer Schale der drei Transfektionsansätze für 5 h mit 200 nM PDB behandelt. Dies sollte die PKC-abhängige MARCKS-mRNA-Degradation auslösen. Anschließend wurde von allen sechs Schalen die Gesamtzell-RNA isoliert (II.2.1.13.2.1) und durch Northern Blot Analyse die MARCKS-mRNA nachgewiesen (Abb. 32).

Die publizierte Degradation der MARCKS-mRNA nach Aktivierung der PKC in Swiss 3T3-Zellen (Brooks et al., 1991, 1992) konnte auch in pTetoff/pTRE-transfizierten Zellen beobachtet werden (Spur 1, 2). Beide mRNA-Spezies, die 4,3 kb große Vorläufer-mRNA und die 2,6 kb große reife MARCKS-mRNA, waren nach PDB-Stimulierung kaum noch nachweisbar (Spur 2). Im Gegensatz dazu wirkte sich die transiente Überexpression von HuD und HuR drastisch auf die MARCKS-mRNA-Expression aus. Sowohl in den Ansätzen mit induzierter HuD-Überexpression (Spur 3, 4) als auch mit HuR-Überexpression (Spur 5, 6) blieb die Abnahme der MARCKS-mRNA-Signale nach PKC-Aktivierung völlig aus (Spur 4, 6). Die HuR-Transfektanten schienen sogar insgesamt die MARCKS-mRNA-Expression im Vergleich zu den Kontrolltransfektanten (Spur 1, 2) erhöht zu haben.

Mit der transienten Überexpression von HuR und HuD konnte demonstriert werden, dass die ELAV/Hu-Proteine einen stabilisierenden Effekt auf die MARCKS-mRNA in der Swiss 3T3-Zellkultur ausübten. Besonders interessant war die MARCKS-mRNA-Stabilisierung durch HuD. In neuronalen PCC7-Mz1-Zellen findet nach PKC-Aktivierung keine MARCKS-mRNA-Degradation statt (vgl. *Einleitung* I.4; Schäfer, 1997; Rössler, 1999). Da HuD in diesen Zellen nachgewiesen werden konnte (Abb. 24A), stellte sich die Frage, ob HuD als *trans*-Faktor für die in neuronalen Zellen von Swiss 3T3-Zellen abweichende Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität verantwortlich ist. Darüberhinaus würde die stabile Überexpression von HuD die Diskriminierung gegenüber endogenem HuR ermöglichen, da HuD in Fibroblastenzellen nicht exprimiert wird und im Vergleich zu HuR eine um 3 kDa größere Molekülgröße besitzt. Aus diesen Gründen wurden stabil transfizierte Klone erzeugt, deren HuD-Expression durch das Tetoff-System reguliert werden sollte.

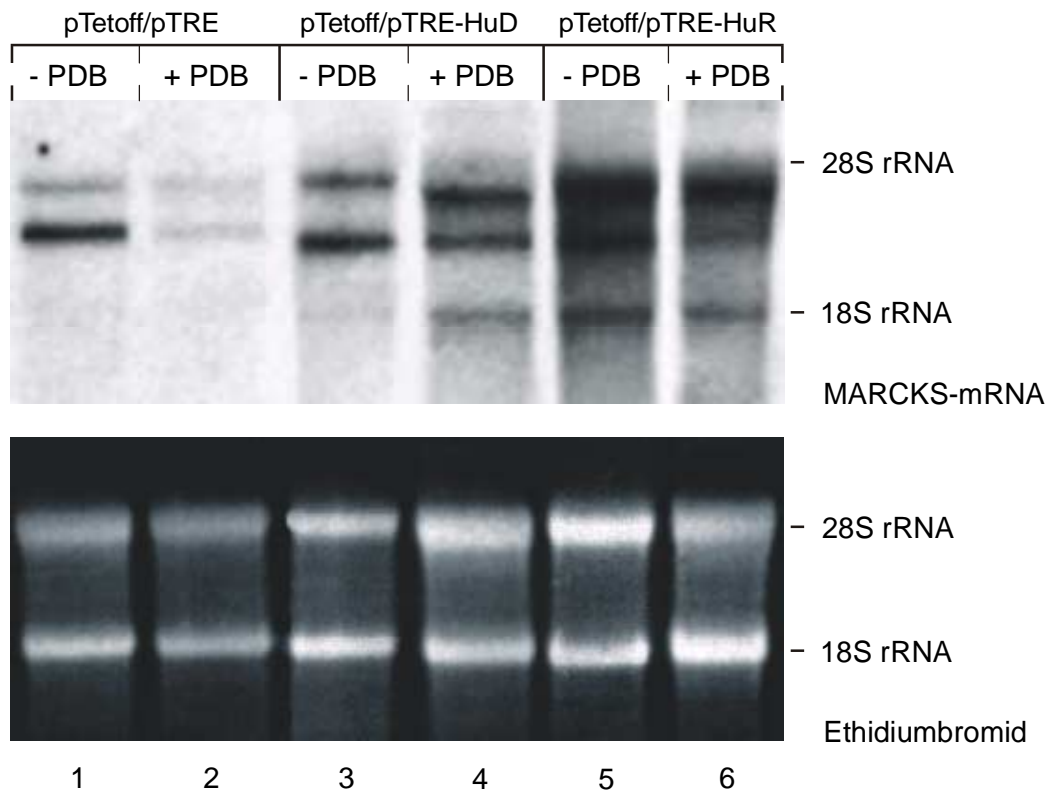


Abb. 32: MARCKS-mRNA-Expression nach transienter Transfektion von pTetoff + pTRE, pTRE-HuD oder pTRE-HuR in Swiss 3T3-Zellen vor und nach PKC-Aktivierung

Swiss 3T3-Zellen wurden mit der Dichte $3,5 \times 10^5$ Zellen/Schale in 10-cm-Schalen ausplattiert und für einen Tag kultiviert. Je zwei Schalen wurden mit pTetoff + pTRE, pTetoff + pTRE-HuD oder pTetoff + pTRE-HuR durch Lipofektion transfiziert. Nach 24 h wurde je ein Transfektionsansatz für 5 h mit 200 nM PDB behandelt und von allen 6 Ansätzen die Gesamtzell-RNA isoliert. Je 5 µg RNA pro Ansatz wurden im 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Durch Hybridisierung mit einer ^{32}P -markierten MARCKS cDNA-Sonde (p809.1; Brooks et al., 1991) wurde die MARCKS-mRNA autoradiographisch nachgewiesen (Filmexposition 1 d mit Kodak AR). Oben ist die Autoradiographie, darunter die unter UV-Licht fotografierte Membran nach Ethidiumbromid-Färbung abgebildet. Die Positionen der 28S und 18S ribosomalen RNA sind rechts eingezeichnet. Die MARCKS-mRNA-Degradation nach PKC-Aktivierung (Spur 2) wird bei Überexpression von HuD (Spur 4) und HuR (Spur 6) vollständig blockiert.

3.2.3 Stabile Transfektion von MEF/3T3-Tetoff[®] mit pTRE-HuD

Wie bereits mehrfach beschrieben (II.1.6.10-11; III.3.2.1; Abb. 31), werden bei der Tetracyclin-abhängigen Genexpression des Tetoff-Systems Zellen benötigt, die das tTA-Protein exprimieren und abhängig von der Zu- oder Wegnahme von Tetracyclin bzw. Doxycyclin die Expression des Zielgens reproduzierbar steuern. Dazu müssen die Zellen zunächst mit pTetoff stabil transfiziert werden und nach G418-Selektion die etablierten Klone bezüglich der oben genannten Eigenschaften getestet werden. Diese sehr zeitraubende und aufwendige Prozedur konnte umgangen werden, indem MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen (II.1.8.2) verwendet wurden. Diese den Swiss 3T3-Zellen sehr ähnliche Fibroblasten-Zelllinie wurde vom Hersteller (Clontech/Heidelberg) mit pTetoff stabil transfiziert, exprimiert dadurch tTA und läßt eine Tetracyclin-abhängige Genexpression zu.

3.2.3.1 MARCKS-mRNA-Expression in MEF/3T3-Tetoff[®]

Eine Voraussetzung zur Verwendung der MEF/3T3-Tetoff[®]-Zelllinie war, dass diese Zellen die Expression der MARCKS-mRNA in gleicher Weise regulieren wie Swiss 3T3-Zellen. Insbesondere war zu prüfen, ob die Tetoff-Zellen wie Swiss 3T3 die MARCKS-mRNA-Expression nach PKC-Aktivierung herunterregulieren und ob die Konzentration der MARCKS-mRNA in stark teilungsaktiven Zellen auf niedrigem Niveau gehalten wird.

Je zwei Schalen mit Swiss 3T3- und MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen wurden bis zum Eintritt in die G₀-Phase kultiviert und anschließend jeweils eine der Schalen für 5 h mit 200 nM PDB behandelt. Nach Isolierung der Gesamtzell-RNA wurde durch Northern Blot Analyse die Menge der MARCKS-mRNA nachgewiesen (Abb. 33A).

In Swiss 3T3-Zellen wurde in der Ruhephase eine hohe Expression der MARCKS-mRNA nachgewiesen, die im Zuge der 5-stündigen PDB-Stimulierung bis zur Nachweisgrenze absank (ca. 5% der Ausgangsmenge). Ähnlich verhielten sich auch die MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen, mit dem Unterschied, dass in der Ruhephase viel stärkere MARCKS-mRNA-Signale detektiert wurden, als in Swiss 3T3-Zellen. Die Reduktion der MARCKS-mRNA-Expression infolge der PKC-Aktivierung sank in den Tetoff-Zellen auf etwa 50% der Ausgangsmenge und fiel damit weniger drastisch aus, als in der Swiss 3T3-Zellkultur. Diese Ergebnisse stimmten mit den Literaturdaten überein (Rodriguez-Pena & Rozengurt, 1985; Brooks et al., 1991).

Zur Überprüfung der proliferationsbedingten Herunterregulation der MARCKS-mRNA in MEF/3T3-Tetoff[®] wurden die Zellen bis zum Eintritt in die G₀-Phase des Zellzyklus kultiviert, dann mit frischem Medium passagiert und weiterkultiviert. Von den ruhenden (Tag 0) und nach der Passage weiterkultivierten Zellen (Tag 1-4) wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und die Expression der MARCKS-mRNA per Northern Blot Analyse nachgewiesen (Abb. 33B).

Zum Zeitpunkt der stärksten Wachstumsaktivität, 1 d nach dem Ausplattieren, waren die MARCKS-mRNA-Signale stark herunterreguliert, aber schon an Tag 2 kehrte die Expression der MARCKS-mRNA auf das Ausgangsniveau (Tag 0) zurück. Diese Abnahme entsprach auch hier den Ergebnissen, die für MEF-Zellen in der Literatur beschrieben sind und stimmte mit der Regulation in Swiss 3T3-Zellen überein (Herget et al., 1993).

Demzufolge wird in den MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen die Expression der MARCKS-mRNA wie in Swiss 3T3-Zellen reguliert. Wegen dieser Übereinstimmung konnten die MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen für die tTA-regulierte HuD-Überexpression verwendet werden.

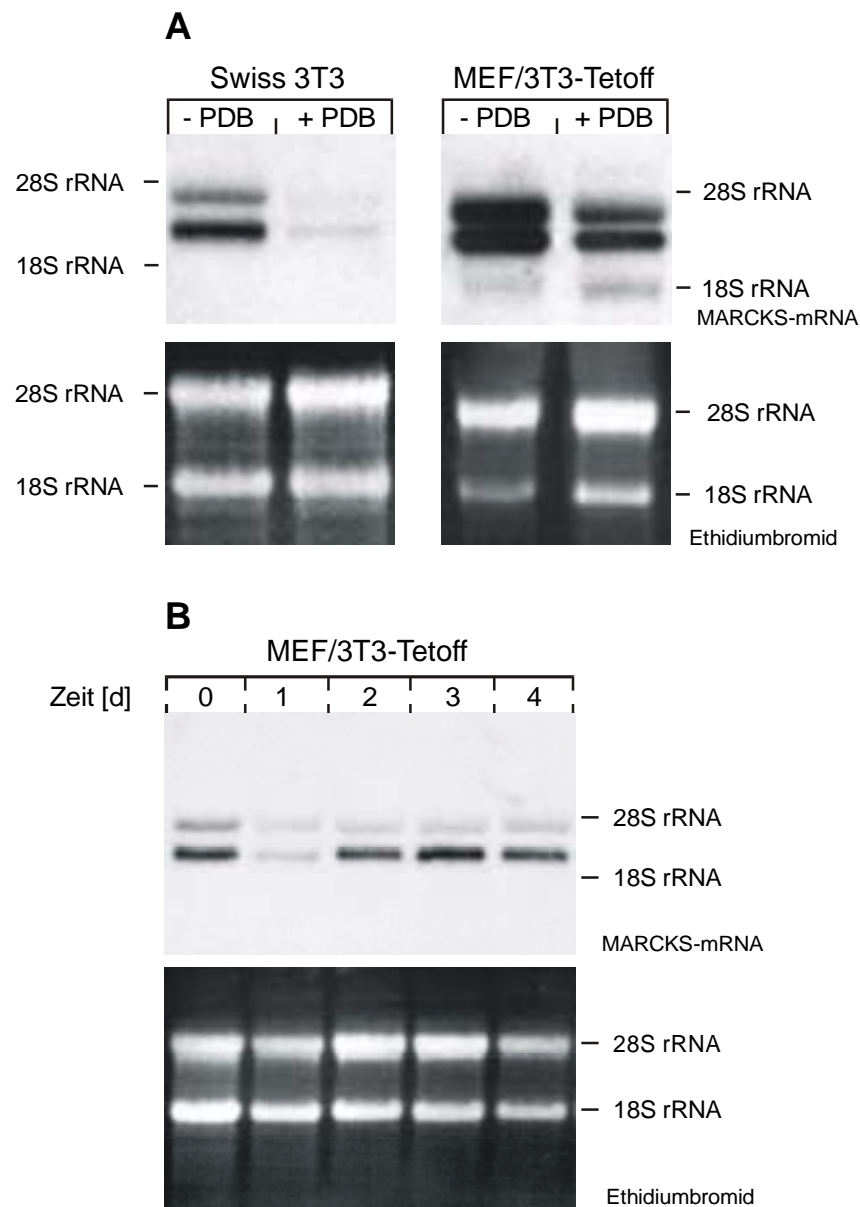


Abb. 33: Vergleich der MARCKS-mRNA-Expression in Swiss 3T3- und MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen

A: Northern Blot Analyse zur PKC-abhängigen MARCKS-mRNA-Depletion. Swiss 3T3- und MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/10-cm-Schale ausplattiert und bis zum Eintritt in die G₀-Phase kultiviert. Nach Stimulierung der PKC für 5 h mit 200 nM PDB wurde aus diesen Zellen sowie unstimulierten Kontrollzellen die Gesamtzell-RNA isoliert. Je 5 µg RNA wurden im 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Mit der MARCKS-spezifischen radioaktiv-markierten DNA-Sonde (p809.1; Brooks et al., 1991) wurde die Expression der MARCKS-mRNA nachgewiesen (Kodak AR, 3 d Exposition). Oben ist die Autoradiographie, darunter die Fotografie der ethidiumbromidgefärbten Membran unter UV-Licht dargestellt.

B: Zeitverlauf der MARCKS-mRNA Expression in MEF/3T3-Tetoff[®] nach Passagieren der Kultur. MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen wurden in einer Dichte von 1×10^5 Zellen/10-cm-Schale ausplattiert und bis zum Eintritt in die G₀-Phase kultiviert (Tag 0). Die Zellen wurden passagiert und mit der gleichen Zelldichte wieder ausplattiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und per Northern Blot die MARCKS-mRNA nachgewiesen (vgl. A). Die Positionen der 28S und 18S rRNA sind links (A) und rechts (A, B) angegeben.

3.2.3.2 Transfektion, Selektion und Screening nach HuD-überexprimierenden MEF/3T3-Tetoff[®]-Klonen

Die stabile Transfektion von pTRE-HuD in MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen erfolgte als Kotransfektion zusammen mit pTK-Hyg (II.1.6.12) im molaren Verhältnis 9:1 (II.2.3.5.2). Dies war erforderlich, da pTRE keinen Selektionsmarker besitzt. Der Vektor pTK-Hyg kodiert für eine Phosphotransferase, die das Antibiotikum Hygromycin inaktiviert, so dass drei Tage nach der Transfektion mit der Selektion Hygromycin-resistenter Zellen begonnen werden konnte. Nach 24-tägiger Kultivierung unter selektiven Bedingungen wurden die Transfektanten zur Etablierung stabiler Zelllinien durch limitierende Verdünnung in 96-Loch-Platten subkloniert. Nach weiteren 40 Tagen und schrittweiser Passage in größere Kulturgefäße konnten die ersten Zellklone im Hinblick auf eine Doxycyclin-regulierbare HuD-Expression getestet werden. Dazu wurden die MEF-Tetoff-HuD Klone in zwei Kulturschalen unter Zu- oder Wegnahme von Doxycyclin bis zur Konfluenz kultiviert und dann zur Generierung zytoplasmatischer Zellextrakte geerntet. Mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum wurde die HuD-Expression in diesen Zellextrakten durch Western Blot Analyse überprüft. Da HuD eine molekulare Masse von 39 kDa besitzt (Chung et al., 1996), konnte es vom endogenen HuR (36 kDa) unterschieden werden (Abb. 34).

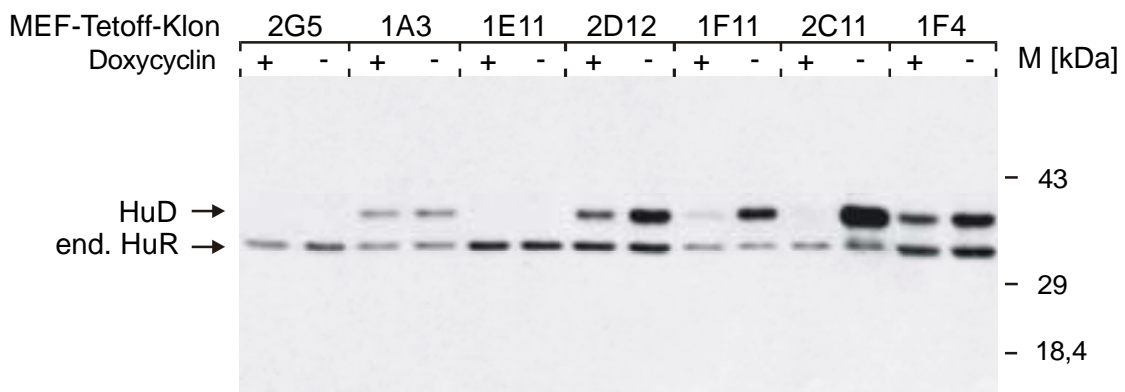


Abb. 34. Western Blot Analyse zur Überprüfung der MEF-Tetoff-Klone auf ihre Doxycyclin-regulierbare HuD-Expression

Sieben zu testende MEF-Tetoff-Klone wurden in je zwei 6-cm-Schalen ausplattiert und bis zur Konfluenz unter selektiven Bedingungen (100 µg/ml Hygromycin) kultiviert. Dabei enthielt das Kulturmedium entweder 1 µg/ml Doxycyclin (Abschalten der HuD-Expression) oder kein Doxycyclin (Anschalten der HuD-Expression). Je 20 µl der isolierten zytoplasmatischen Zellextrakte wurden in einem 12,5%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Hu-Proteine nach Transfer auf eine PVDF-Membran mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum detektiert. Endogenes HuR und das überexprimierte HuD sind links mit Pfeilen markiert, die Positionen und Größen des Proteinstandards sind rechts angegeben.

Unter den Hygromycin-resistenten MEF-Tetoff-Klonen zeigten knapp die Hälfte (46%) keine HuD-Expression (z.B. Klon 2G5, 1E11). Die Klone, die HuD exprimierten (53%), ließen sich in Doxycyclin-regulierbare und nicht-regulierbare Zelllinien (z.B. Klon 1A3) unterteilen, wobei innerhalb der Klone mit regulierbarer HuD-Expression zwischen geringfügig regulierenden (z.B. Klon 2D12, 1F4) und stark regulierenden Zelllinien (z.B. Klon 1F11, 2C11) unterschieden

wurde. Eine Übersicht bezüglich der HuD-Expression aller 37 etablierten Hygromycin-resistenten MEF-Tetoff-Klone gibt Tab. 4 wider.

HuD-Expression	Anzahl	% aller untersuchten Klone	Klonbezeichnung
nicht nachweisbar	17	46	2A12, 2F6, 2A8, 1C5, 2H8, 2G5, 1E11, 2C3, 1F5, 2F12, 2D10, 2B12, 1G11, 2H4, 1F8, 2E9, 2G11
konstitutiv, d.h. keine Dox.-abhängige Regulation	10	27	2C6, 1A3, 2H7, 2D4, 2E6, 2E12, 1G8, 2C12, 2C1, 2A5
Dox.-abhängige Regulation	8 (schwach)	22	1A8, 1E7, 1B10, 2F11, 1F4, 2D12, 2B6, 2G7
	2 (stark)	5	2C11, 1F11

Tab. 4: Einteilung der stabilen Transfektanten entsprechend ihrer HuD-Expression

Die 37 mit Hygromycin selektierten Zellklone wurden in drei Gruppen eingeteilt: Ohne nachweisbare HuD-Expression, mit konstitutiver HuD-Expression ohne Doxycyclin-abhängige Regulation und mit Doxycyclin abhängiger HuD-Expression. Innerhalb der letzten Gruppe wurde zwischen Zellklonen mit schwacher Expressionsinduktion (ca. 2-3 fach) und starker Induktion (ca. 5-10 fach) unterschieden.

3.2.3.3 UV-crosslinking des überexprimierten HuD mit der MARCKS 52nt-RNA

Nachdem HuD-überexprimierende MEF-Tetoff-Klone etabliert worden waren, musste gewährleistet sein, dass das überexprimierte HuD auch funktionell war, d.h. mit dem MARCKS 52nt *cis*-Element reagierte. In einem Kontrollexperiment wurde zunächst das Potential von HuD überprüft, in Konkurrenz zu den zelleigenen RNA-bindenden Proteinen mit der MARCKS 52nt-RNA zu interagieren. Dazu wurden ansteigende Mengen von rekombinantem His₆-HuD (0,5-25 ng) mit zytoplasmatischen Proteinen aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen und der radioaktiv markierten MARCKS 52nt-RNA inkubiert und nach UV-Bestrahlung und RNase A-Behandlung im 10%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 35A).

Die hohe Spezifität, die HuD dem MARCKS 52nt *cis*-Element entgegenbrachte, wurde in diesem Experiment sehr deutlich. Mit zunehmender HuD-Menge in den UV-crosslink-Ansätzen nahm auch der entsprechende RNA/HuD-Komplex zu (Spur 2-7), so dass bei 10 ng His₆-HuD die RNA-Bindung durch das endogene HuR vollständig inhibiert wurde (Spur 6) und bei 25 ng auch p55 kaum noch an das 52nt Element binden konnte (Spur 7). Demnach sollte auch überexprimiertes HuD mit den endogenen MARCKS-mRNA-bindenden Proteinen um die RNA-Bindung konkurrieren können.

Dies wurde geprüft, indem zwei MEF-Tetoff-Klone, einer mit HuD-Expression (2C11) und einer ohne (1E11), jeweils mit und ohne Doxycyclin bis zur Konfluenz kultiviert und zur Präparation zytoplasmatischer Zellextrakte geerntet wurden. Diese Extrakte wurden im UV-crosslink-Assay mit *in vitro* transkribierter radioaktiver MARCKS 52nt-poly(A)-RNA inkubiert und nach UV-Quervernetzung und RNase A-Verdau im 12,5%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 35B, Spur 1-4). Um die RNA/Protein-Komplexe, die mit Proteinen aus PCC7-Mz1-Zellen durch UV-Quervernetzung mit der MARCKS 52nt-RNA detektiert werden, mit denen der MEF-Tetoff-Klone vergleichen zu können, wurden im UV-crosslink-Assay auch Zellextrakte von PCC7-Mz1-Zellen eingesetzt. Dabei wurde auch der Effekt der PKC-Aktivierung (5 h, 200 nM PDB) auf die UV-Quervernetzung mit PCC7-Mz1-Extrakten analysiert (Abb. 35B, Spur 5-6).

Die Doxycyclin-abhängige Induktion der HuD-Expression von MEF-Tetoff-2C11, die auch in Abb. 34 im Western Blot für diesen Klon dargestellt ist, führte im UV-crosslink-Assay zum entsprechenden Anstieg der Intensität des RNA/HuD-Komplexes (Spur 1, 2). Infolgedessen konnte auch eine leichte Konkurrenz gegenüber der Formierung der RNA/p55- und RNA/p40-Komplexe beobachtet werden. Da MEF-Tetoff-1E11 keine ektopische HuD-Expression zeigte (Abb. 34), wurde kein HuD-Signal in diesen Extrakten detektiert (Spur 3, 4). Die UV-Behandlung führte hier nur zur Detektion der bereits beschriebenen RNA/p55-, RNA/p40- und RNA/p30-Komplexe (RNA/HuR-Komplex im Zytosolextrakt ohne Kompetitor erst ab 20 µg Protein nachweisbar; vgl. Abb. 16, Spur 1 bzw. Abb. 26, Spur 3). Mit Klon 2C11 wurde aber demonstriert, dass das überexprimierte HuD an das 52nt *cis*-Element binden konnte.

Die UV-Quervernetzung der MARCKS 52nt-poly(A)-RNA mit den PCC7-Mz1-Extrakten führte zur Detektion zweier RNA/Protein-Komplexe mit den Molekülmassen von 55 und 39 kDa (Spur 5, 6). Wie bei Swiss 3T3 veränderte sich diese Komplexbildung durch Aktivierung der PKC nicht. Die Übereinstimmung im Molekulargewicht zwischen dem 39 kDa-Protein und HuD, welches in PCC7-Mz1-Zellen bereits nachgewiesen worden war (Abb. 24A), legte den Schluss nahe, dass p39 mit HuD identisch ist. Demnach scheint in PCC7-Mz1-Zellen HuD an der Bindung des *cis*-Elements innerhalb der MARCKS 3'UTR beteiligt zu sein.

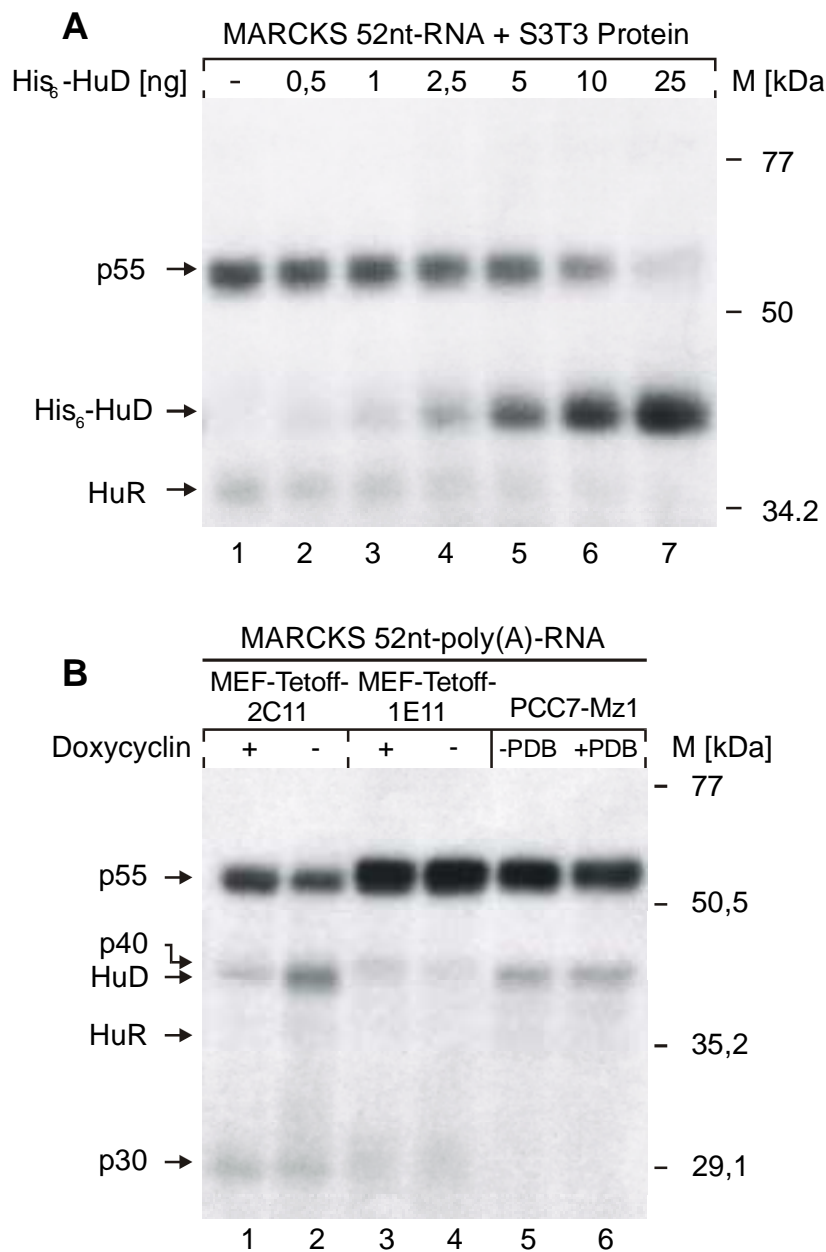


Abb. 35: UV-crosslink-Assay zur RNA-Bindung von rekombinatem (A) und überexprimiertem (B) HuD

A: Bindung der MARCKS 52nt-RNA durch rek. His₆-HuD. pBS-MARCKS 52nt wurde mit *Bam*HI linearisiert und durch die T3 RNA Polymerase mit [α -³²P]-UTP *in vitro* transkribiert. Je 2,5 ng MARCKS 52nt-RNA (~3000 cpm) wurden zusammen mit den angegebenen Mengen His₆-HuD und 20 μ g zytoplasmatischem Zellextrakt aus ruhenden Swiss 3T3-Zellen für 15 min inkubiert und mit 180 mJ UV-Licht quervernetzt. Nach 30-minütigem RNase A-Verdau wurden die Reaktionsprodukte in einem 10%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Trocknung des Gels wurde ein Röntgenfilm (Kodak AR mit Verstärkerfolien) für 6 d exponiert (-80°C).

B: Vergleich zwischen HuD-exprimierendem und nicht exprimierendem MEF-Tetoff-Klon, sowie PCC7-Mz1-Proteinen im UV-crosslink-Assay. MEF-Tetoff-2C11 (+HuD) und MEF-Tetoff-1E11 (-HuD) wurden in je zwei Kulturschalen ausplattiert, von denen eine mit Doxycyclin im Medium, die andere ohne kultiviert wurde. Nach Erreichen der Konfluenz wurden von beide Schalen zytoplasmatische Zellextrakte hergestellt. PCC7-Mz1-Zellen wurden für 5 h mit 200 nM PDB behandelt und zusammen mit unstimulierten Kontrollzellen zur Herstellung zytoplasmatischer Zellextrakte ebenfalls geerntet. pCR-MARCKS 52nt-poly(A) wurde mit *Ec*136II linearisiert und durch die T7 RNA Polymerase mit [α -³²P]-UTP *in vitro* transkribiert. 2,5 ng MARCKS 52nt-poly(A)-RNA (~3000 cpm) wurden mit je 10 μ l Zellextrakt für 15 min inkubiert und das Experiment wie in A beschrieben fortgesetzt (Filmexposition: Kodak AR mit Verstärkerfolien für 5 d bei -80°C). Die Positionen der mit der RNA UV-quervernetzten Proteine p55, p40, HuD, HuR und p30 in A und B sind links mit Pfeilen markiert, die Positionen und Größen der Proteinstandards sind jeweils rechts eingezeichnet.

3.2.3.4 Stabilisierung der MARCKS-mRNA durch HuD

Um zu untersuchen, welche Bedeutung die HuD-Expression auf die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität hatte, wurde ein Klon ausgewählt, der kein HuD exprimiert (Klon 2A12) und ein Klon, der HuD konstitutiv synthetisiert (Klon 2A5). Beide wurden bis zum Eintritt in die G₀-Phase unter Doxycyclin-freien Bedingungen kultiviert und dann mit geringer Zelldichte ausplattiert. Von den ruhenden (Tag 0) und nach der Passage weiterkultivierten Zellen (Tag 1) wurde die Gesamtzell-RNA isoliert und die Expression der MARCKS-mRNA durch Northern Blot Analyse bestimmt (Abb. 36).

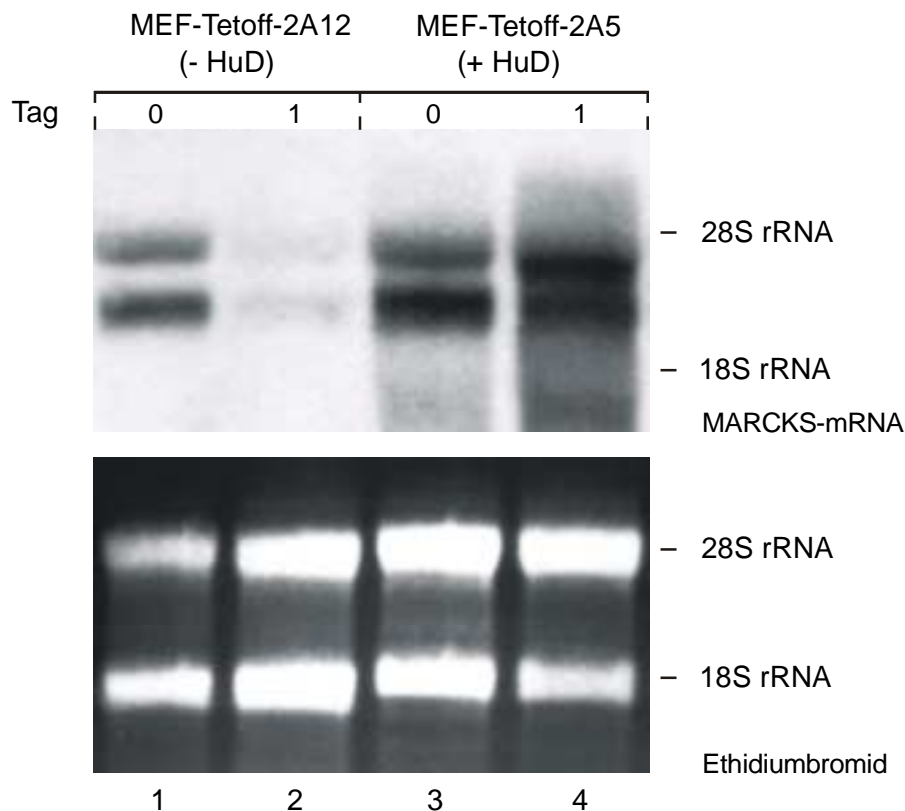


Abb. 36: Northern Blot Analyse zum Einfluss von HuD auf die MARCKS-mRNA-Expression

Die MEF-Tetoff-Klone 2A12 (-HuD) und 2A5 (+HuD) wurden mit der Dichte 1×10^5 Zellen/10-cm-Schale ausplattiert und bis zum Eintritt in die G₀-Phase kultiviert (Medium mit 50 µg/ml Hygromycin, ohne Doxycyclin). Die Zellen wurden passagiert und mit der Dichte 1×10^5 Zellen/Schale neu ausplattiert. Von den ruhenden (Tag 0) und nach der Passage weiterkultivierten Zellen (Tag 1) wurde jeweils die Gesamtzell-RNA isoliert und je 5 µg der RNA wurden im 1,2%igen Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der RNA auf eine Nylonmembran wurde die MARCKS-mRNA mit einer ³²P-markierten DNA-Sonde (p809.1; Brooks et al., 1991) nachgewiesen. Oben ist die Autoradiographie (Kodak AR mit Verstärkerfolien für 3 d bei -80°C), darunter die Fotografie der Ethidiumbromid-gefärbten Membran dargestellt. Die Positionen der 28S und 18S rRNA sind rechts markiert.

Der MEF-Tetoff-Klon 2A12, der kein HuD exprimiert, zeigte nach dem Ausplattieren die erwartete Herunterregulation der MARCKS-mRNA-Expression (Spur 1, 2). Dies entsprach der Regulation in untransfizierten MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen (vgl. Abb. 33B). Im Gegensatz dazu zeigte der MEF-Tetoff-Klon 2A5 eine andere Regulation. Die starke MARCKS-mRNA-Expression an Tag 0 (Spur 3) wurde nach Passagieren von den Zellen nicht mehr reduziert (Spur 4) und blieb auf

dem Ausgangsniveau. Die proliferationsbedingte Degradation der MARCKS-mRNA wurde unter dem Einfluss der HuD-Expression vollständig blockiert. Damit war das Resultat der transienten Überexpression (Abb. 32) mit einem stabil transfizierten MEF-Tetoff-Klon bestätigt worden. Dieses Resultat konnte inzwischen auch mit dem regulierenden Klon 2C11 und weiteren HuD-überexprimierenden Klonen mehrfach reproduziert werden (R. Klug, pers. Mitteilung).

3.2.3.5 Einfluss von HuD auf die Degradation des MARCKS-Proteins

Nachdem demonstriert worden war, dass durch die HuD-Überexpression die MARCKS-mRNA in den transfizierten Zellen stabilisiert wird (Abb. 32, 36), stellte sich die Frage, ob dadurch auch die Proteinmenge gegenüber untransfizierten Zellen erhöht wird. Bei Stabilisierung der MARCKS-mRNA durch HuD wäre denkbar, dass infolge vermehrter Translation auch die Menge an MARCKS-Protein erhöht wird.

Um dies zu überprüfen, wurden je zwei MEF-Tetoff-Klone mit (2A5, 2C11) bzw. ohne HuD-Expression (2A12, 2G5) bis zum Eintritt in die G₀-Phase des Zellzyklus kultiviert (ohne Doxycyclin im Medium) und dann passagiert. Von den ruhenden (Tag 0) und nach der Passage weiterkultivierten Zellen (Tag 1) wurden zytoplasmatische Zellextrakte hergestellt, die im Western Blot im Hinblick auf die MARCKS- bzw. HuD-Expression analysiert wurden (Abb. 37).

Wie der Western Blot zur Hu-Detektion deutlich macht, wurde die Überexpression von HuD in den MEF-Klonen 2A5 und 2C11 an Tag 0 fast vollständig abgeschaltet. Obwohl kein Doxycyclin im Medium vorhanden war, so dass die HuD-Expression durch das tTA-Protein induziert werden müsste, wurde während der Zellzyklusarretierung die (Trans)genexpression derart gedrosselt, dass kaum HuD gebildet wurde. Das endogene HuR wurde hingegen kontinuierlich exprimiert. Nach der Passage stieg die HuD-Expression drastisch an.

Der Expressionsanstieg des HuD-Proteins wirkte sich aber nicht auf die Degradation des MARCKS-Proteins aus. Für alle vier MEF-Tetoff-Klone wurden zum Zeitpunkt der Zellzyklusarretierung (Tag 0) starke MARCKS-Signale detektiert, die dann an Tag 1 nach dem Ausplattieren proliferationsbedingt reduziert waren. Dabei hatte die HuD-Expression auf die MARCKS-Degradation keinen Einfluss. Die HuD-bedingte Stabilisierung der MARCKS-mRNA (Abb. 36) führte offenbar nicht zu einer nachweisbaren Erhöhung der Expression des MARCKS-Proteins und auch die Degradation des MARCKS-Proteins infolge des Passagierens wurde nicht beeinflusst.

Die Mechanismen, die zur proliferationsbedingten Degradation der MARCKS-mRNA und des MARCKS-Proteins führen, sind nach diesem Ergebnis nicht unmittelbar miteinander verbunden, sondern laufen getrennt voneinander ab. Die Inhibition des MARCKS-mRNA-Abbaus führt nicht zwangsläufig auch zur Inhibition des MARCKS-Proteinabbaus.

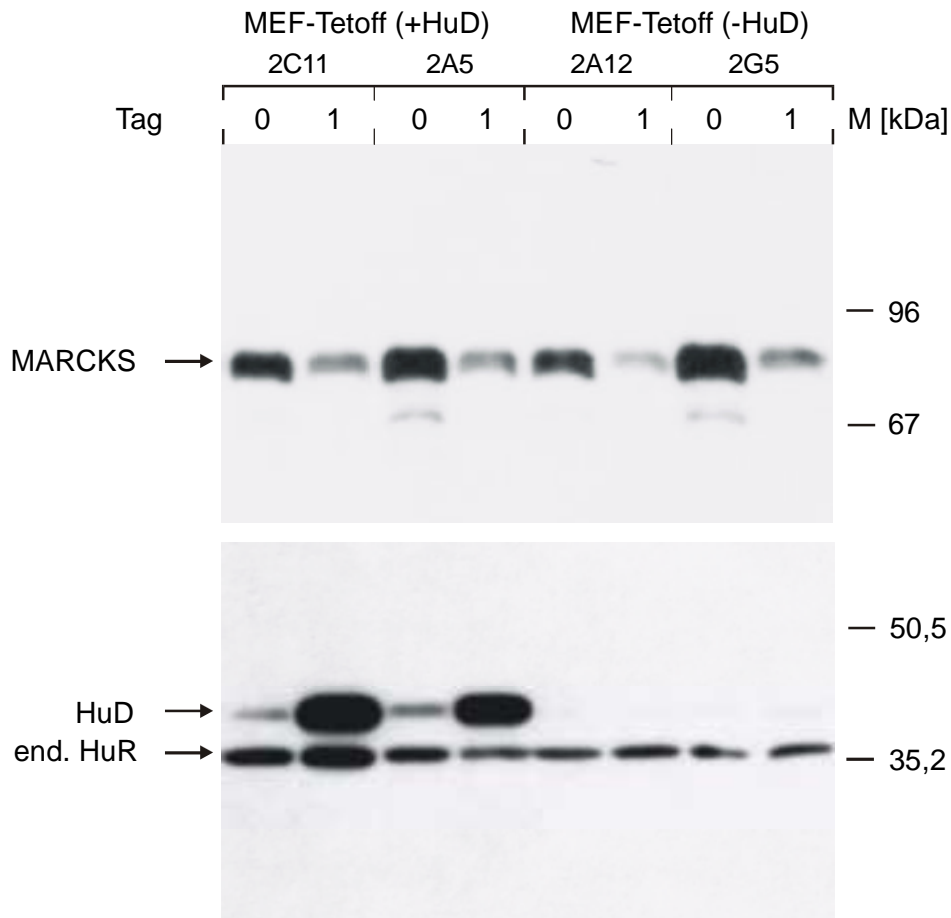


Abb. 37: Western Blot Analyse zum möglichen Einfluss von HuD auf die Regulation der MARCKS-Protein-Expression

Die MEF-Tetoff-Klone 2C11, 2A5 (mit HuD-Expression), 2A12 und 2G5 (ohne HuD-Expression) wurden mit der Dichte 1×10^5 Zellen/10-cm-Schale ausplattiert und bis zum Eintritt in die G_0 -Phase kultiviert (Medium mit 50 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin, ohne Doxycyclin). Die Zellen wurden passagiert und mit der Dichte 1×10^5 Zellen/Schale wieder ausplattiert. Aus den ruhenden (Tag 0) und nach der Passage weiterkultivierten Zellen (Tag 1) wurden zytoplasmatische Extrakte isoliert. Je 2,5 μg Protein für die MARCKS-Analyse und 20 μg Protein für die HuD-Detektion wurden in einem 10%igen (MARCKS) bzw. 12,5%igen (HuD) SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zur Detektion des MARCKS-Proteins wurde das MARCKS-spezifische Antiserum appliziert, die HuD-Expression wurde mit dem ELAV/Hu-spezifischen Antiserum bestimmt. Oben ist die MARCKS-Expression (Fuji X-ray Medical für 30 sec), darunter die HuD-Expression (Fuji X-ray Medical für 2 min) dargestellt. Die Positionen der detektierten MARCKS-, HuD- und HuR-Proteine sind jeweils links mit Pfeilen, die Positionen und Größen der Proteinstandards rechts angegeben.

IV. Diskussion

Obwohl Vertreter der Proteinkinase C-Genfamilie (PKC) durch ihre Schlüsselposition in der Signaltransduktion an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt sind (Fishman et al., 1998; Black, 2000; Frey et al., 2000), sind die molekularen Mechanismen, die diesem PKC-Effekt zu Grunde liegen, nur unzureichend beschrieben. Um diese aufzuklären, ist die Analyse der PKC-Substrate hilfreich. Ein Hauptsubstrat der PKC in vielen Zellen ist das MARCKS-Protein (Aderem, 1992; 1995; Blackshear, 1993; Ramsden, 2000), dem eine Funktion als Wachstumssuppressor zugeschrieben wird (Brooks et al., 1996). In Fibroblastenzellen wird seine Expression in Abhängigkeit vom Zellzyklus auf Ebene der mRNA-Stabilität reguliert. Die starke Expression der MARCKS-mRNA in der G₀-Phase wird bei Wiedereintritt in den Zellzyklus durch Destabilisierung der mRNA auf 5% des Ausgangsniveaus reduziert (Brooks et al., 1991; 1992; Herget et al., 1993). Diese Destabilisierung kann durch die Aktivierung der PKC ausgelöst werden (Brooks et al., 1992; Herget et al., 1993). Die vorliegende Arbeit sollte dazu beitragen, den Mechanismus aufzuklären, der der Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität im Verlauf des Zellzyklus zu Grunde liegt.

Die Stabilität eukaryontischer mRNAs wird durch die Interaktion spezifischer Sequenzabschnitte (*cis*-Elemente) mit daran bindenden Proteinen (*trans*-Faktoren) reguliert. Diese Wechselwirkungen finden oft innerhalb der 3' nicht-translatierten Region (3'UTR) der mRNA statt (vgl. *Einführung* I.3.2; Jackson, 1993; Decker & Parker, 1995; Grzybowska et al., 2001). Auch die 3'UTR der MARCKS-mRNA enthält *cis*-Elemente, die mit *trans*-Faktoren in Wechselwirkung treten (Schäfer, 1997; Rössler, 1999), doch waren die genauen Positionen und Sequenzen der *cis*-Motive innerhalb der 3'UTR und die Identität der *trans*-Faktoren nicht bekannt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden deshalb die *cis*-Elemente der MARCKS 3'UTR identifiziert und charakterisiert. Der zweite Teil befasste sich mit der Charakterisierung der Proteine, die mit den *cis*-Elementen der MARCKS 3'UTR interagieren. Besonderer Schwerpunkt wurde dabei auf die ELAV/Hu-Genfamilie gelegt. Die Bedeutung dieser RNA-bindenden Proteine für die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität wurde schließlich im dritten Teil dieser Arbeit untersucht.

1 Charakterisierung der MARCKS 3'UTR *cis*-Elemente

Der Nachweis der Bindung von Swiss 3T3-Proteinen an die MARCKS 3'UTR erfolgte durch RNase/EMSA (*electro mobility shift assay*)-Studien. Durch die Inkubation von Swiss 3T3-Extrakten mit der MARCKS 3'UTR-RNA und anschließende Degradation der durch gebundene Proteine nicht geschützten RNA konnten zwei RNA/Protein-Komplexe detektiert werden. Mit dem Einsatz verkürzter MARCKS 3'UTR-Sequenzen ließ sich die Formierung der RNA/Protein-

Komplexe auf die Bindung an zwei *cis*-Elemente zurückführen und deren Position innerhalb der 3'UTR bestimmen. Dabei handelte es sich in beiden Fällen um Uracil-reiche Sequenzmotive, die von den gleichen Proteinen mit unterschiedlicher Affinität gebunden wurden. Die Affinität zu einem 52nt langen *cis*-Element mit der Sequenz (CUUU)₁₁(U)₈ (Position: 1830-1881 b, nach Seykora et al., 1991) war wesentlich höher als zu einem homo-(U)₁₈ *cis*-Element (Position: 1585-1603 b, nach Seykora et al., 1991). Daher wurde das MARCKS 52nt *cis*-Element als primäre Protein-Bindungsstelle (Hauptmotiv) bezeichnet, während die homo-(U)₁₈-Sequenz als kryptische Bindungsstelle angesehen wurde.

1.1 Die MARCKS 3'UTR *cis*-Elemente sind ARE der Klasse III

Der sehr hohe Uracilanteil der identifizierten *cis*-Elemente ist charakteristisch für AU-reiche Elemente (ARE), die als destabilisierende Sequenzmotive für kurze mRNA-Halbwertszeiten verantwortlich sind (vgl. *Einleitung* I.3.2.3). Die überlappenden CUUUC-Pentamere des MARCKS 52nt *cis*-Elements weisen sehr große Homologie zu den AUUUA-Pentameren der ARE auf, die ebenfalls häufig überlappend auftreten (Abb. 38; Shaw & Kamen, 1986; Chen & Shyu 1995; Xu et al., 1997). Außerdem kann man für die MARCKS 3'UTR *cis*-Elemente eine ähnlich destabilisierende Funktion annehmen, wie sie die ARE besitzen (Rössler, 1999), da die Stabilität einer Reporter-gen-mRNA (Luciferase) als Fusion mit der MARCKS 3'UTR-RNA drastisch reduziert wurde (vgl. *Einleitung* I.4). Wegen der destabilisierenden Funktion der MARCKS 3'UTR (Rössler, 1999) und der großen Homologie der identifizierten *cis*-Elemente zu ARE, können das MARCKS 52nt- und homo-(U)₁₈-*cis*-Element den ARE-*cis*-Determinanten zugeordnet werden. ARE werden in drei Klassen eingeteilt (vgl. *Einleitung* I.3.2.3; Chen & Shyu, 1995; Xu et al., 1997): ARE der Klasse I bestehen aus 1 bis 3 Kopien der AUUUA-Pentamere, die einzeln über die 3'UTR in U-reicher Umgebung verteilt sind. Jedes dieser AUUUA-Motive besitzt eigene Destabilisierungsfunktion, doch wird die volle Instabilität der mRNA erst durch alle gemeinsam erreicht (Xu et al., 1997). ARE der Klasse II bestehen aus einer lokalen Anhäufung von mehreren Kopien der AUUUA-Motive, die sich häufig zu überlappenden UUAUUUA(U/A)(U/A)-Nonameren assoziieren (Chen & Shyu, 1995; Xu et al., 1997). ARE der Klasse III zeichnen sich hingegen durch eine Anhäufung U-reicher Sequenzabschnitte aus, ohne dass die charakteristischen AUUUA-Motive enthalten sind (Peng et al., 1996). In Abb. 38 sind die ARE-enthaltenden Sequenzabschnitte einiger mRNAs und ihrer ARE-Klassen dargestellt. Zum Vergleich wurde die Sequenz des MARCKS 52nt *cis*-Elements gegenübergestellt. Da die größte Sequenzhomologie zu ARE der Klasse III besteht, wurden die MARCKS 3'UTR *cis*-Elemente den ARE der Klasse III zugeordnet.

ARE Klasse I:**c-fos**^(ARE1): UUUUAUUGUGUUUUUA[AUUUAUUUA]UUAAGAUGGAUUCUCAGAU[AUUUA]**c-myc**^(ARE2): UACUAUAAACCCUAAUUUUUUUU[AUUUA]AG**p21**^{waf1}: UCUUAAUUUUUUUUUGUGUUUU[AUUUA]AACACCUCCUCAUGARE Klasse II:**IL-3**: UCUUAUCA[AUUUA]UCUACUUUCUGU[AUUUAUUUAUUUA]UUG**GM-CSF**: AAU[AUUUA]UAU[AUUUA]UAUUUUUAAA[AUUUAUUUAUUUAUUUA]**TNF α** : CUUGUGAUU[AUUUA]UU[AUUUAUUUA]UU[AUUUAUUUAUUUA]CAGAARE Klasse III:**GAP-43**: UCCACUUCCUCUCUAUUUCUCUCUG**VEGF**: AAUUCUACAUACUAAAUCUCUCUCCUUUUUUAAUUUUAAUAAUUUG**tau**: CUUUUUUUUUUUUUACUUUAG**MARCKS 52nt**: CUUUCUUUCUUUCUUUCUUUCUUUCUUUCUUUCUUUCUUUCUUUUUUU
UUUU**Abb. 38: Vergleich von mRNA-Sequenzen mit AU-reichen Elementen (ARE) der Klassen I bis III mit der MARCKS 52nt-RNA-Sequenz**

Dargestellt sind ARE-enhaltende Sequenzabschnitte der c-fos-, c-myc-, p21^{waf1}-, Interleukin-3-, GM-CSF-, TNF- α -, GAP-43-, VEGF- und tau-mRNA, eingeteilt nach Zugehörigkeit zu einer der drei ARE-Klassen. AUUUA-Pentamere sind durch Kästen hervorgehoben. Zum Vergleich ist die RNA-Sequenz des MARCKS 52nt *cis*-Elements (Position: 1830-1881 b, nach Seykora et al., 1991) dargestellt. Aufgrund seiner großen Homologie zu ARE der Klasse III kann es dieser Klasse zugeordnet werden.

1.2 Die Sekundärstruktur der MARCKS 3'UTR

U-reiche Regionen, wie die beiden identifizierten *cis*-Elemente, sind in der MARCKS 3'UTR sehr häufig. Von den ca. 30 U-reichen Regionen wurden jedoch nur die MARCKS 52nt- und homo-(U)₁₈-Sequenz als Proteinbindungsstellen identifiziert. Warum binden die Swiss 3T3-Proteine die MARCKS 3'UTR nur über diese beiden U-reichen Sequenzen? Ein Grund hierfür dürfte in der Sekundärstruktur der *cis*-Elemente liegen.

Die Erkennung von *cis*-Motiven durch RNA-bindende Proteine hängt nicht nur von der Primärsequenz, sondern auch von strukturellen Merkmalen ab (Mattaj, 1993; Grzybowska et al., 2001). Ein Beispiel dafür sind die *iron-responsive-elements* der Transferrin-Rezeptor-mRNA (IRE; vgl. *Einleitung* I.3.2.2). RNA-Moleküle bilden umfangreiche Sekundärstrukturen aus Doppelhelices und Einzelstrangschleifen (*stem-loop-structures*), welche nicht starr festgelegt sind, sondern abhängig von der Temperatur, zweiwertigen Kationen (Mg²⁺) oder der Bindung durch Proteine die Konformation ändern (Mattaj, 1993). Dabei können auch ungewöhnliche Basenpaare entstehen, die nicht den Watson-Crick-Paarungen entsprechen (Leontis & Westhof, 1998). Mit Hilfe von Computer-gestützten Berechnungen (II.2.1.13.3) lässt sich die thermodynamisch stabilste Sekundärstruktur vorhersagen und graphisch darstellen (Mathews et al. 1999;

Zuker et al., 1999). Für die MARCKS 3'UTR-RNA ergibt sich die in Abb. 39A dargestellte komplexe Struktur aus doppelhelikalen Abschnitten und Haarnadelschleifen.

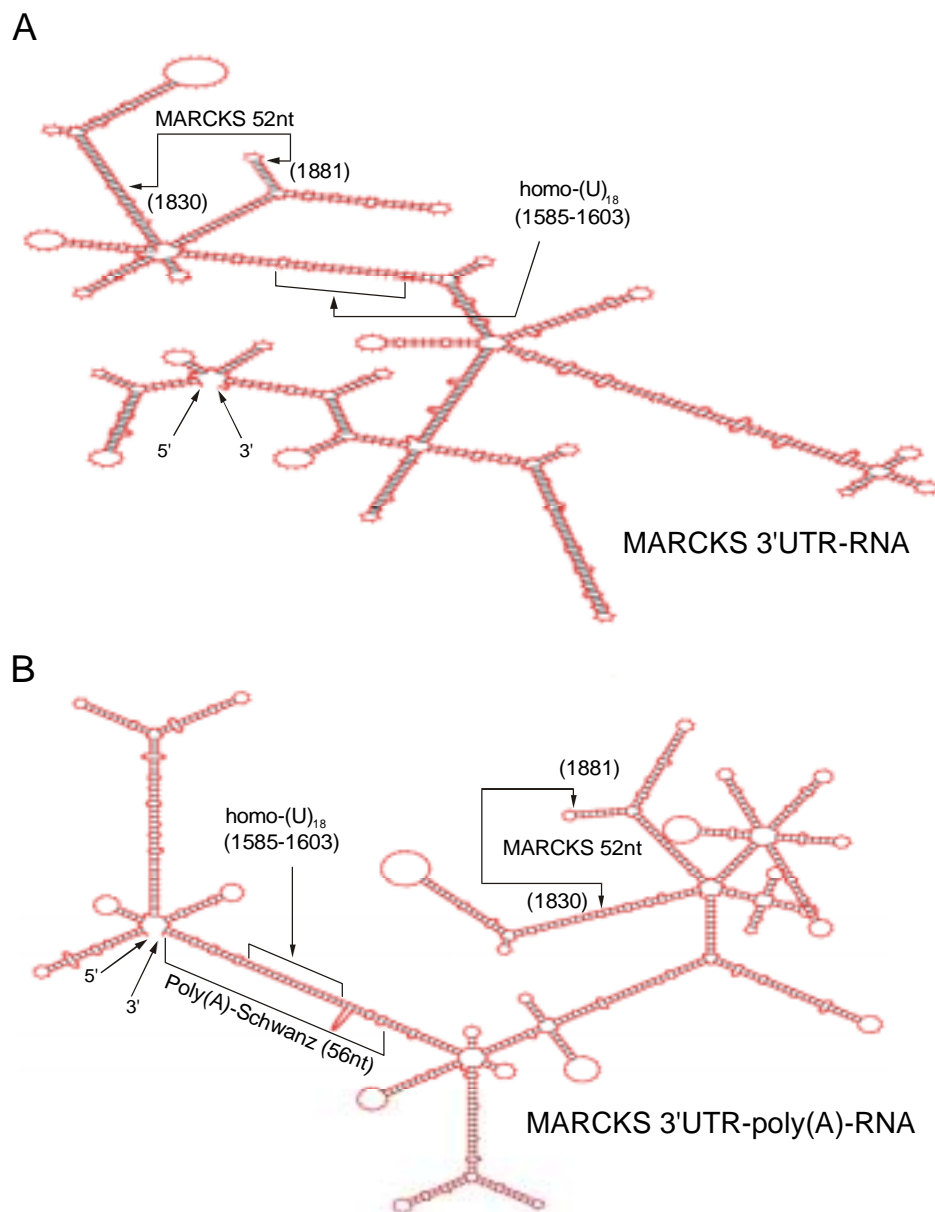


Abb. 39 Computer-gestützte Berechnung der Sekundärstrukturen der MARCKS 3'UTR-RNA und der MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA

Die Sekundärstrukturen der MARCKS 3'UTR-RNA (**A**) und MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA (**B**) wurden mit dem Programm *mfold* (II.2.1.13.3) berechnet und als *Squiggle plot* mit dem Programm *mplot* dargestellt. Bei 22°C beträgt die freie Energie der Sekundärstruktur -412,2 kJ (A) bzw. -440,5 kJ (B). Die Positionen des MARCKS 52nt- und des homo-(U)₁₈-*cis*-Elements sind jeweils eingezeichnet. In A bildet die homo-(U)₁₈-Sequenz eine Doppelhelix mit einer Adenosin-reichen Sequenz innerhalb der 3'UTR (1985-1999 b), in B hybridisiert sie mit einem Abschnitt des Poly(A)-Schwanzes. Das MARCKS 52nt *cis*-Element hat in A und B die gleiche Konformation (Sequenzangaben nach Seykora et al., 1991).

Die beiden identifizierten *cis*-Elemente nehmen in dieser Struktur unterschiedliche Konformationen an. Die homo-(U)₁₈-Sequenz hybridisiert mit einem Adenosin-reichen Abschnitt (Position: 1985-1999 b, nach Seykora et al., 1991) innerhalb der 3'UTR zu einer Doppelhelix. Das MARCKS 52nt *cis*-Element wird auf der 5'-Seite von einem langen abgewinkelten und auf der 3'-Seite von einem kurzen Helixarm begrenzt, so dass eine Art „Tasche“ geformt wird. Beide Helixarme enden in unterschiedlich großen Haarnadelschleifen. Verfügt die MARCKS 3'UTR-RNA über einen Poly(A)-Schwanz, ändert sich die Sekundärstruktur der MARCKS 3'UTR-RNA (Abb. 39B) mit unterschiedlicher Auswirkung auf die Konformation der beiden *cis*-Elemente. Das kryptische *cis*-Element hybridisiert jetzt mit einem Abschnitt des Poly(A)-Schwanzes, während das MARCKS 52nt-Strukturelement seine Konformation beibehält. Auch bei unterschiedlichen Temperaturen bleibt die Struktur des 52nt-Motivs erhalten (nicht gezeigt). Diese auffällige Inflexibilität scheint für das 52nt-Strukturelement charakteristisch zu sein und prädestiniert diesen RNA-Abschnitt für die Proteinbindung.

Eine auffällig gefaltete Sekundärstruktur wie beim MARCKS 52nt *cis*-Element wird vom kryptischen *cis*-Element nicht gebildet. Die homo-(U)₁₈-Sequenz hybridisiert ohne Ausbildung von Haarnadelschleifen mit Poly(A)-Sequenzen, bevorzugt mit dem Poly(A)-Schwanz (Abb. 39A und B). Warum Proteine gerade an diese Struktur binden, kann nicht befriedigend erklärt werden. Die Interaktion der Proteine mit dem kryptischen *cis*-Element könnte aber eine wichtige Funktion für die Stabilität der MARCKS-mRNA haben. Die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes ist in Säugerzellen oft der erste Schritt der mRNA-Degradation und ARE stimulieren diese Deadenylierung (*Einleitung* 1.3.2.3; Wilson & Treisman, 1988; Chen & Shyu, 1995; Brewer, 1998; Ford et al., 1999; Gao et al., 2001). Die Hybridisierung des homo-(U)₁₈-*cis*-Elements mit dem Poly(A)-Schwanz und die Proteinbindung an das kryptische *cis*-Element könnten mit der Initiation des MARCKS-mRNA-Abbaus verbunden sein.

2 Charakterisierung der an die MARCKS 3'UTR-RNA bindenden Proteine

Nach Charakterisierung innerhalb der MARCKS 3'UTR lokalisierter *cis*-Elemente wurden im nächsten Schritt die *cis*-Element-bindenden *trans*-Faktoren charakterisiert. Mit Zuordnung der identifizierten *cis*-Elemente zu ARE der Klasse III (IV.1.1) war zu erwarten, dass es sich bei den Proteinen, die mit diesen *cis*-Elementen reagierten, um ARE-bindende Proteine (AUBPs) handelt. Wie DNase/EMSA- und Kompetitionsstudien mit MARCKS 52nt DNA-Oligonukleotiden gezeigt hatten, binden diese AUBPs auch an einzelsträngige DNA.

2.1 Nukleäre Lokalisierung der MARCKS-RNA-bindenden Proteine

Durch UV-crosslinking und Northwestern-Analyse wurden in Swiss 3T3-Zellextrakten bis zu elf Proteine mit Molekülmassen zwischen 16 und 55 kDa detektiert, die an die MARCKS 52nt-RNA binden konnten. Von p55 und einem Protein bei ~16 kDa abgesehen, ließ sich eine Interaktion der Proteine mit der MARCKS 52nt-RNA nur im nukleären Extrakt nachweisen. Für die vergleichsweise geringe RNA/Protein-Komplexbildung in zytoplasmatischen Extrakten bieten sich zwei Interpretationsansätze an: Einerseits könnten die ARE-bindenden Proteine im Kern in höherer Konzentration vorliegen, andererseits könnte aber auch die Affinität der ARE-bindenden Proteine zur MARCKS 52nt-RNA im Kernextrakt höher sein als im Zytoplasmaextrakt.

Um dies zu klären, wären Western Blot Analysen zur Untersuchung der subzellulären Expression jedes einzelnen Proteins notwendig gewesen. Da unbekannt war, um welche Proteine es sich handelte, war dies nicht möglich. Lediglich die subzelluläre Expression des ELAV-ähnlichen Proteins HuR, das als MARCKS 52nt-spezifischer *trans*-Faktor identifiziert werden konnte (IV.2.3), konnte nach Herstellung eines affinitätsgereinigten ELAV/Hu-spezifischen Antiserums im Rahmen dieser Arbeit überprüft werden. In Übereinstimmung mit publizierten Daten erwies sich HuR als nukleäres Protein mit geringer Expression im Zytoplasma (Fan & Steitz, 1998a und b; Keene, 1999; Brennan & Steitz, 2001). Dieses Expressionsmuster wird auch für andere AUBPs beschrieben (Zhang et al., 1993; Krecic & Swanson, 1999; Shyu & Wilkinson, 2000). Die stärkere RNA/Protein-Komplexbildung in nukleären Extrakten könnte daher tatsächlich auf einer höheren Konzentration der an der MARCKS 52nt-RNA-Bindung beteiligten Proteine im Kernextrakt beruhen.

2.2 Charakterisierung der UV-quervernetzten MARCKS-RNA-bindenden Proteine

In den UV-crosslink-Experimenten mit der MARCKS 52nt-RNA und Swiss 3T3-Extrakten konnten vier Proteine nachgewiesen werden, die sich mit der 52nt-RNA quervernetzen ließen (p55, p40, p36, p30). Der RNA/p55-Komplex besaß dabei die stärkste Intensität aller detektierten RNA/Protein-Komplexe, ließ sich aber durch geringe Mengen des MARCKS 52nt-DNA-Oligonukleotids kompetitieren. Auffällig war auch, dass das in Kern und Zytoplasma exprimierte 55 kDa-AUBP nicht in der Lage war, an die vollständige MARCKS 3'UTR-RNA zu binden. Möglicherweise wird die Affinität von p55 zur 52nt CU-reichen Sequenz durch die Sekundärstruktur des MARCKS 52nt Motivs innerhalb der MARCKS 3'UTR-RNA (Abb. 39) negativ beeinflusst.

Die Proteine p40, p36 und p30 bildeten RNA/Protein-Komplexe mit schwächerer Intensität, hatten aber in Kompetitionsstudien mit dem MARCKS 52nt-DNA-Oligonukleotid eine im Vergleich zu p55 höhere Affinität zur MARCKS 52nt-RNA. Die Verwendung fraktionierter Zellex-

trakte zeigte, dass die Komplexbildung von p40 und p36 mit der MARCKS 52nt-RNA in nukleären Extrakten stärker als in zytoplasmatischen Extrakten war.

Aus den in III.2.3 genannten Gründen (z.B. der Molekülmasse von p36, der großen Homologie der MARCKS 52nt-RNA zu Sequenzen, die durch ELAV/Hu-Proteine gebunden werden, und der Lokalisation von HuR im Nukleus mit vorübergehender Translokation ins Zytoplasma) ließ sich vermuten, dass es sich bei p36 um das ubiquitär exprimierte ELAV-Protein HuR handelte.

2.3 HuR – ein *trans*-Faktor des MARCKS 52nt *cis*-Elements in Swiss 3T3-Zellen

HuR vermittelt die Stabilisierung ARE-tragender mRNAs und könnte für die hohe Stabilität der MARCKS-mRNA während der Arretierung in der G₀-Phase des Zellzyklus verantwortlich sein. Um zu überprüfen, ob HuR einer der MARCKS 52nt-RNA-bindenden *trans*-Faktoren ist, wurde rekombinantes GST-HuR in *E.coli* exprimiert und affinitätsgereinigt. Dieses Fusionsprotein war in der Lage, die MARCKS 52nt-RNA mit hoher Affinität zu binden (1). Mit Hilfe eines ELAV/Hu-spezifischen Antiserums, welches im Zuge dieser Arbeit hergestellt und affinitätsgereinigt wurde, ließ sich die HuR-Expression in Swiss 3T3-Zellen untersuchen. Dabei stimmten Molekülmasse und subzelluläre Lokalisierung von HuR mit denen von p36 überein (2). Durch eine Supershift-Analyse konnte die vermutete Beteiligung von HuR an der Formierung der RNA/Protein-Komplexe direkt bestätigt werden (3). Die stabilisierende Funktion, die HuR auf ARE-enhaltende mRNAs ausübt und die vielfach dokumentiert ist (Fan & Steitz, 1998a; Peng et al., 1998; Levy et al., 1998; Rodriguez-Pascual et al., 2000; Wang et al., 2000a und b; Ming et al., 2001; Dixon et al., 2001; Dean et al., 2001; Raghavan et al., 2001), wurde auch für die MARCKS-mRNA demonstriert: Infolge einer transienten Überexpression von HuR in Swiss 3T3-Zellen blieb die Degradation der MARCKS-mRNA nach PKC-Aktivierung aus (4).

Mit diesen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass das ubiquitär exprimierte ELAV-Protein HuR den RNA/p36-Komplex bildet und einer der MARCKS 3'UTR bindenden *trans*-Faktoren in Swiss 3T3-Zellen ist. Die hohe Stabilität der MARCKS-mRNA während der Arretierung in der G₀-Phase des Zellzyklus kann mit der Bindung von HuR an das MARCKS 52nt *cis*-Element innerhalb der MARCKS 3'UTR-RNA erklärt werden.

2.3.1 HuR-abhängiger mRNA-Export aus dem Zellkern

In der Northwestern-Analyse wurde beobachtet, dass nach Behandlung der Swiss 3T3-Zellen mit Phorbol ester die Wechselwirkung der kernlokalisierten RNA-bindenden Proteine mit der MARCKS 52nt-RNA stark abnahm. Offensichtlich führte die Aktivierung der PKC dazu, dass die Affinität der Kernproteine zur angebotenen RNA, darunter auch HuR (p36), drastisch reduziert

wurde. Da die MARCKS-Expression bei Wiedereintritt in den Zellzyklus, wie er durch PKC-Aktivierung ausgelöst wird (Brooks et al., 1991; 1992), posttranskriptionell herunterreguliert wird, könnte sich in dieser reduzierten RNA/Protein-Komplexbildung auch eine Abnahme des MARCKS-mRNA-Exports aus dem Zellkern widerspiegeln. Dies wäre neben der mRNA-Stabilität eine weitere posttranskriptionelle Ebene der Regulation der MARCKS-Expression in Swiss 3T3-Zellen.

Wie neuere Studien belegen, bindet HuR ARE-enthaltende mRNAs im Zellkern und transportiert sie in Form von mRNP-Partikeln in das Zytoplasma (Fan & Steitz, 1998a; Keene, 1999; Brennan and Steitz, 2001; Keene, 2001), wobei dieser Export über zwei alternative Transportwege erfolgen kann: Das HuR-spezifische Translokationssignal HNS (*HuR nucleocytoplasmatic shuttling*; Fan & Steitz, 1998b) wird vom Export-Rezeptor Trn2 (Transportin 2) erkannt, während die Assoziation von HuR mit seinen Liganden pp32 und APRIL (32 kDa-Phosphoprotein und *acidic protein rich in leucine*) zur Bindung an den Export-Rezeptor CRM1 (*chromosome maintenance region 1*) führt (Gallouzi & Steitz, 2001; Moore & Rosbash, 2001). Trn2 und CRM1 reagieren mit dem Nukleären-Poren-Komplex (NPC) und ermöglichen so den Export der mRNP-Partikel aus dem Zellkern.

Mit der Identifizierung von HuR als MARCKS RNA-bindendes Protein ist davon auszugehen, dass auch der Kernexport der MARCKS-mRNA über HuR vermittelt wird. Ob dieser Export über einen der beiden beschriebenen Transportwege bevorzugt erfolgt, bleibt zu klären.

2.3.2 Rolle des Poly(A)-Schwanzes

Die Kontrolle der mRNA-Stabilität findet im Zytoplasma statt (Ross, 1995; McCarthy & Kollmus, 1995; Beelman & Parker, 1995; Mitchell & Tollervey, 2000; Guhaniyogi & Brewer, 2001). Deshalb wurde erwartet, dass sich die RNA/Protein-Interaktion zwischen zytoplasmatischen Swiss 3T3-Proteinen und den verwendeten MARCKS RNA-Sequenzen (MARCKS 3'UTR, MARCKS 3'UTR-Deletionsklon, MARCKS 52nt) nach PKC-Aktivierung verändern würde. In den durchgeführten Assays konnte dies jedoch nicht nachgewiesen werden. Weder im RNase/EMSA noch im UV-crosslink-Assay wurde eine PKC-induzierte Umgruppierung der detektierten RNA/Protein-Komplexe festgestellt. Um zu prüfen, ob diese Ergebnisse auf das Fehlen des Poly(A)-Schwanzes zurückzuführen waren, wurden polyadenylierte MARCKS-Transkripte (MARCKS 3'UTR-poly(A)-RNA und MARCKS 52nt-poly(A)-RNA) mit subzellulär fraktionierten Swiss 3T3-Extrakten im UV-crosslink-Assay eingesetzt. Dabei konnte kein Einfluss des Poly(A)-Schwanzes auf die Bindung zytoplasmatischer Proteine an die MARCKS-RNA nachgewiesen werden. Mit nukleären Extrakten ergab sich allerdings nach PKC-Aktivierung eine Abnahme der RNA/Protein-Interaktion. Diese Abnahme war auch in der Northwestern-Analyse zu beobachten. Wie unter IV.2.3.1 beschrieben, könnte sich in diesem Ergebnis die Abnahme des

MARCKS-mRNA-Exports durch HuR und andere AUBPs aus dem Zellkern widerspiegeln. Da außerdem durch *in vivo*-UV-crosslink-Studien gezeigt werden konnte, dass HuR im Zellkern mit poly(A)⁺-RNA interagiert (Gallouzi et al., 2000; Brennan et al., 2000; Brennan & Steitz, 2001), könnte die Regulation des HuR-abhängigen mRNA-Exports aus dem Zellkern mit der Bindung an den Poly(A)-Schwanz verbunden sein.

3 Die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität

Alle bisher im Zusammenhang mit der Stabilitätskontrolle der MARCKS-mRNA gewonnenen Daten (Brooks et al., 1991; 1992; Herget et al., 1993; Schäfer, 1997; Rössler, 1999; diese Arbeit) machen deutlich, dass kein einfacher, sondern ein sehr komplexer Regulationsmechanismus vorliegt, zu dessen Aufklärung die vorliegende Arbeit beiträgt. Im folgenden Kapitel wird ein Modell vorgeschlagen, mit dessen Hilfe die Zellzyklus-abhängige Stabilität der MARCKS-mRNA erklärt werden kann, welches aber vor allem Ausgangspunkt für zukünftige Forschungen sein soll.

3.1 Regulation in Swiss 3T3-Zellen

In allen durchgeführten Analysen zur RNA/Protein-Interaktion (RNase/EMSA, UV-crosslinking, Northwestern) konnte mit zytoplasmatischen Extrakten keine PKC-vermittelte Änderung der gebildeten RNA/Protein-Komplexe nachgewiesen werden. Weder unter denaturierenden noch nativen Bedingungen waren Unterschiede in der Ausbildung der RNA/Protein-Komplexe festzustellen. Für die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität ergeben sich aus diesen Befunden zwei alternative Modellvorschläge:

Im ersten Modell wird davon ausgegangen, dass die Zellzyklus-abhängige Stabilität der MARCKS-mRNA über die 3'UTR-lokalisierten *cis*-Elemente allein reguliert wird (Schäfer, 1997). Wenn sich, wie die Resultate zeigen, die Bindung der *trans*-Faktoren an die *cis*-Elemente nach PKC-Aktivierung nicht ändert, folgt daraus, dass eine PKC-abhängige Destabilisierung der MARCKS-mRNA nur durch Modifizierung der an die RNA gebundenen Proteine (z.B. durch Phosphorylierung) ausgelöst werden kann (Schäfer, 1997). Dies könnte dann die Rekrutierung MARCKS-mRNA-spezifischer RNasen oder allgemeiner mRNA-Degradationsenzyme (z.B. des Exosoms) ermöglichen. Von einigen destabilisierenden AUBPs ist beispielsweise bekannt, dass sie das Exosom rekrutieren können (Chen et al., 2001). Wenn diese Rekrutierung durch PKC-abhängige Phosphorylierung aktiviert würde, wäre ein Regulationsmechanismus für die MARCKS-mRNA-Stabilität gegeben.

Im zweiten Modell wird davon ausgegangen, dass an der Regulation der Zellzyklus-abhängigen MARCKS-mRNA-Stabilität neben den 3'UTR-lokalisierten *cis*-Elementen weitere *cis*-Elemente innerhalb der 5'UTR und/oder kodierenden Region (CDR) beteiligt sind (Rössler, 1999). Die Bindung MARCKS-spezifischer AUBPs würde diesem Modell zufolge durch das Zusammenwirken der 3'UTR- und 5'UTR/CDR-lokalisierten *cis*-Elemente reguliert, so dass bei Wachstumsarretierung die Bindung stabilisierender AUBPs (HuR) und bei Eintritt in den Zellzyklus destabilisierender AUBPs an die RNA begünstigt würde.

Um zu entscheiden, welches Regulationsmodell geeigneter erscheint, den Mechanismus zur Zellzyklus-abhängigen Stabilität der MARCKS-mRNA zu beschreiben, sind die Ergebnisse zur MARCKS 3'UTR-Funktion *in vivo* hilfreich (Rössler, 1999). Durch stabile Überexpression einer Luciferase-MARCKS 3'UTR-Chimäre in Swiss 3T3-Zellen wurde gezeigt, dass die MARCKS 3'UTR destabilisierenden Einfluss auf die Luciferase-mRNA hat. Diese Instabilität war aber konstitutiv und nicht über die 3'UTR *cis*-Elemente regulierbar, da bei Arretierung der transfizierten Zellen in der G₀-Phase des Zellzyklus keine Stabilisierung der Luciferase-MARCKS 3'UTR-mRNA festgestellt werden konnte (Rössler, 1999). Im Gegensatz dazu wurde die Expression der endogenen MARCKS-mRNA wie in untransfizierten Zellen reguliert. Die überexprimierte MARCKS 3'UTR konnte also weder die Stabilität der Luciferase-mRNA in Abhängigkeit des Zellzyklus regulieren, noch auf die Regulation der endogenen MARCKS-mRNA-Expression einwirken. Diese Ergebnisse lassen sich nur mit dem zweiten Modell zur Regulation der Zellzyklus-abhängigen MARCKS-mRNA-Stabilität vereinbaren.

Untersuchungen mittels atomarer Kraftmikroskopie haben ergeben, dass die 5'-Kappe und der Poly(A)-Schwanz eukaryontischer mRNAs durch die Interaktion mit eIF4E, eIF4G und PABP miteinander verbunden sind (Wells et al. 1998), so dass die mRNA *in vivo* zyklisiert vorliegt (Michel et al., 2000). Auf die MARCKS-mRNA übertragen folgt daraus, dass durch die Zyklisierung die 3'UTR lokalisierten ARE in räumlicher Nähe zu Sequenzen der 5'UTR und/oder der kodierenden Region positioniert werden. Die komplexen Faltungsmöglichkeiten der einzelsträngigen mRNA könnten, begünstigt durch die Zyklisierung, dazu führen, dass das MARCKS 52nt *cis*-Element mit einem oder mehreren weiteren *cis*-Elementen der 5'UTR oder der kodierenden Region gemeinsame Strukturelemente ausbildet. Diese komplexeren *cis*-Element-Strukturen könnten dann als regulative Einheiten funktionieren, die kooperativ die Variation der MARCKS-mRNA-Stabilität in Abhängigkeit der Wachstumsphase steuern.

Basierend auf diesen Überlegungen wird das in Abb. 40 dargestellte hypothetische Modell der MARCKS-mRNA-Struktur und der davon abgeleitete Mechanismus zur Stabilitätskontrolle vorgeschlagen.

Die postulierten *cis*-Elemente der 5'UTR bzw. kodierenden Region regulieren zusammen mit den 3'UTR ARE die Bindung von HuR und anderen ARE-bindenden Proteinen an das MARCKS 52nt *cis*-Element in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand der Zelle. Bei Verbrauch der

Wachstumsfaktoren im Kulturmedium würde die Bindung von HuR an die mRNA gefördert, so dass die MARCKS-mRNA stabilisiert und verstärkt translatiert wird. Die Stimulierung der ruhenden Zellen durch Wachstumsfaktoren führt zum Wiedereintritt in den Zellzyklus, indem HuR durch destabilisierende AUBPs von der Bindung an das MARCKS 52nt *cis*-Element verdrängt wird. Die MARCKS-mRNA wird daraufhin abgebaut.

Ein Beispiel für die Regulation mit kooperierenden *cis*-Elementen stellt die Stabilitätskontrolle der KC-mRNA in der Maus dar (Tebo et al., 2000). Die endzündungsbedingte Ausschüttung von IL-1 α bewirkt neben der Transkriptionsinduktion des KC-Gens auch die Stabilisierung der KC-mRNA. Die dies vermittelnden *cis*-Elemente liegen hier in der 3' und 5'UTR der KC-mRNA. Die IL-1 α -vermittelte Stabilisierung eines Reportergens (Chloramphenicol Acetyltransferase) wurde nur dann beobachtet, wenn beide UTRs an das CAT-Gen fusioniert wurden, jede für sich allein zeigte keine Aktivität (Tebo et al., 2000). Ähnlich wie bei MARCKS handelt es sich bei dem *cis*-Element der KC 3'UTR um ein ARE, die daran bindenden *trans*-Faktoren sind bislang noch nicht identifiziert worden.

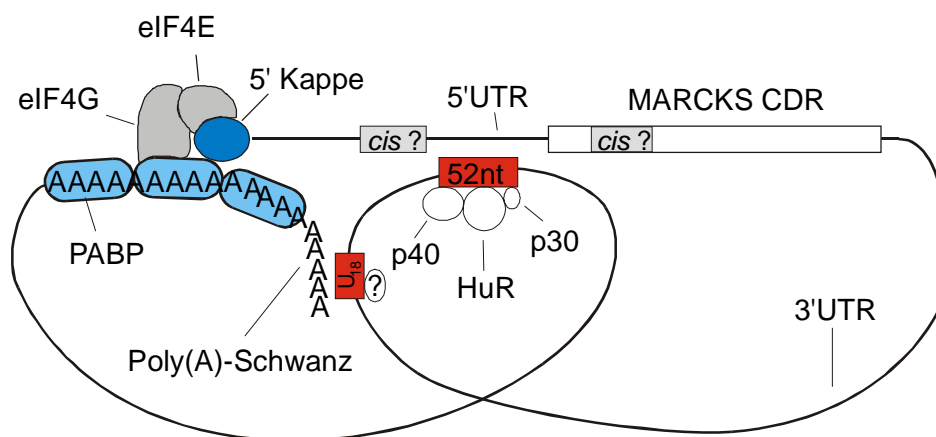


Abb. 40: Modell zur Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität in Swiss 3T3-Zellen

Der Poly(A)-Schwanz der MARCKS-mRNA wird durch Proteininteraktion zwischen PABP, eIF4G und eIF4E mit der 5'-Kappe verknüpft, wodurch die mRNA zyklisiert wird. Die 3'UTR lokalisierten *cis*-Elemente werden dadurch in räumliche Nähe zur 5'UTR und kodierenden Region gebracht, so dass eine Kommunikation zwischen dem MARCKS 52nt *cis*-Element und postulierten *cis*-Elementen der 5'UTR/kodierenden Region möglich wird. Über diese Kommunikation wird die Stabilität der MARCKS-mRNA im Verlauf des Zellzyklus reguliert. Die Interaktion des kryptischen *cis*-Elements homo-(U)₁₈ mit dem Poly(A)-Schwanz, wie in Abb. 39B dargestellt, ist ebenfalls eingezeichnet.

3.2 Die MARCKS-Expression in PCC7-Mz1-Zellen

Im Gegensatz zu Swiss 3T3-Zellen wird MARCKS in neuronalen PCC7-Mz1-Zellen konstitutiv exprimiert. Eine Destabilisierung der MARCKS-mRNA nach Aktivierung der Proteinkinase C findet in PCC7-Mz1-Zellen nicht statt (vgl. *Einleitung* I.4; Schäfer, 1997; Rössler, 1999). Die MARCKS-Expression hat in den neuronalen Zellen nicht den supprimierenden Einfluss auf das

Zellwachstum, wie in Swiss 3T3-Zellen. Demzufolge besitzt MARCKS im neuralen Gewebe andere Funktionen, als in Fibroblastenzellen. Diese sind für die Entwicklung des Nervengewebes essentiell, denn MARCKS-*knock-out*-Mäuse sind nicht lebensfähig und weisen abnorme Defekte in der Gehirnanlage auf (Stumpo et al., 1995).

Um eine konstitutive MARCKS-Expression auf Ebene der mRNA-Stabilität zu gewährleisten, müssen neurale Zellen die MARCKS-mRNA dauerhaft stabilisieren. Da die MARCKS-Sequenz in PCC7-Mz1- und Swiss 3T3-Zellen identisch ist (Schäfer, 1997), kann diese dauerhafte Stabilisierung der MARCKS-mRNA in PCC7-Mz1-Zellen nur durch PCC7-Mz1-spezifische *trans*-Faktoren erfolgen. Tatsächlich wurde mit PCC7-Mz1-Extrakten im RNase/EMSA ein zusätzlicher dritter RNA/Protein-Komplex detektiert, der gegenüber den zwei Komplexen, die auch mit Swiss 3T3-Extrakten beobachtet wurden, eine höher elektrophoretische Mobilität besaß (Schäfer, 1997). Bei diesen *trans*-Faktoren sollte es sich um ARE-bindende Proteine (AUBP) handeln, denn das MARCKS 52nt *cis*-Element wurde als ARE der Klasse III charakterisiert (IV.1.1). Die einzigen bisher bekannten AUBPs, die *in vitro* und *in vivo* eine mRNA-Stabilisierung bewirken, sind die Mitglieder der ELAV/Hu-Genfamilie. Drei der vier ELAV-ähnlichen Proteine werden ausschließlich in neuronalen Zellen (Hel-N1, HuC, HuD) und der Keimbahn (Hel-N1) exprimiert und sind essentiell für die neurale Differenzierung (Okano & Darnell, 1997; Antic & Keene, 1997; Wakamatsu & Weston, 1997; Kasashima et al., 1999; Aranda-Abreu et al., 1999; Mobarak et al., 2000; Anderson et al., 2000). So wird beispielsweise die Differenzierung neuronaler PC12-Zellen (Pheochromocytoma-Zelllinie) nach NGF (*nerve growth factor*)-Behandlung durch die HuD-vermittelte Stabilisierung der GAP-43-mRNA ausgelöst (Anderson et al., 2000; 2001; Mobarak et al., 2000). Auch die tau-, Neurofilament M- und MycN-mRNA werden durch neuronale ELAV-Proteine stabilisiert (Aranda-Abreu et al., 1999; Antic & Keene, 1999; Manohar et al., 2002). Wegen der großen Bedeutung von MARCKS für die Neurogenese (Stumpo et al., 1995) stellte sich deshalb die Frage, ob die konstitutive Stabilisierung der MARCKS-mRNA in den neuronalen PCC7-Mz1-Zellen durch HuD vermittelt werden könnte.

Die hier präsentierten Daten lassen den Schluss zu, dass HuD tatsächlich in PCC7-Mz1-Zellen die MARCKS-mRNA stabilisiert:

- (1) HuD konnte die vollständige MARCKS 3'UTR wie auch das MARCKS 52nt *cis*-Element *in vitro* effizient binden und war in der Lage, die Bindung von Swiss 3T3-Proteinen an die MARCKS 52nt-RNA zu kompetitieren.
- (2) Im PCC7-Mz1-Extrakt wurden neben HuR auch die neuronenspezifischen ELAV/Hu-Proteine, darunter HuD, durch Western Blot nachgewiesen.
- (3) Durch stabile Überexpression von HuD in MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen wurde die wachstumsinduzierte Destabilisierung der MARCKS-mRNA unterbunden. Damit konnte die Funktionalität von HuD als MARCKS-mRNA-stabilisierendes Protein im Zellkulturexperiment demonstriert werden.

(4) Durch UV-crosslinking mit PCC7-Mz1-Extrakten und radioaktiv transkribierter MARCKS 52nt-poly(A)-RNA ließ sich ein RNA/Protein-Komplex von 39 kDa detektieren, der weder mit Swiss 3T3-Proteinen noch mit Proteinen aus mock-transfizierten MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen gebildet wurde. Dieser RNA/Protein-Komplex besaß die gleiche Größe, wie das in MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen überexprimierte HuD.

Alle Daten zusammengenommen führen zu dem Schluss, dass HuD als *trans*-Faktor in den neuronalen PCC7-Mz1-Zellen die MARCKS-mRNA stabilisieren und damit die konstitutive MARCKS-Expression gewährleisten könnte.

4 Ausblick

Um den molekularen Mechanismus zu verstehen, dem die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität im Verlauf des Zellzyklus zu Grunde liegt, ist es erforderlich, alle beteiligten *cis*-Elemente und *trans*-Faktoren zu kennen. Im Rahmen dieser Arbeit sind zwei *cis*-Elemente innerhalb der MARCKS 3'UTR identifiziert und als ARE der Klasse III charakterisiert worden. Außerdem gelang es, eines der an das MARCKS 52nt *cis*-Element bindenden Proteine (p36) als das ELAV/Hu-Protein HuR zu identifizieren, welches nach transienter Überexpression in Swiss 3T3-Zellen die MARCKS-mRNA stabilisiert. An dieses *cis*-Element binden aber noch weitere Proteine, die bisher noch nicht identifiziert sind. Um auch diese zu identifizieren, könnten *Pull-down*-Assays oder Affinitätschromatographien, z.B. mit biotinylierter MARCKS 52nt-RNA und Streptavidin-beschichteten Magnet-*beads*, durchgeführt werden. Die auf diese Weise angereicherten Proteine könnten anschließend sequenziert oder über massenspektroskopische Methoden identifiziert werden. Eine mögliche Beteiligung von AUF1 an der Formierung des RNA/Protein-Komplex p40 könnte, analog zu den hier durchgeführten Experimenten, mit rekombinanten AUF1-Proteinen sowie einem AUF1-spezifischen Antiserum erfolgen.

Da die Stabilität der MARCKS-mRNA nicht allein über die MARCKS 3'UTR-lokalisierten *cis*-Elemente reguliert wird (vgl. IV.3.1; Rössler, 1999), müssen weitere *cis*-Elemente in der 5'UTR und/oder kodierenden Region existieren, die mit *trans*-Faktoren interagieren. Folglich sollten auch diese mRNA-Bereiche bezüglich etwaiger RNA/Protein-Wechselwirkung analysiert werden. Dies könnte durch RNase/EMSA-, UV-crosslinking- oder Northwestern-Analysen erfolgen, so wie dies in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde. Wenn weitere *cis*-Elemente und *trans*-Faktoren identifiziert worden sind, sollte in Transfektionsstudien mit induzierbaren Expressionsvektoren die Funktionalität der einzelnen *cis*-Elemente, isoliert oder in Kombination miteinander, getestet werden. Damit ließe sich das Modell der kooperierenden *cis*-Elemente *in vivo* überprüfen.

Im Zuge dieser Arbeit wurde HuD unter Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystems stabil in MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen transfiziert, womit sich die stabilisierende Funktion von ELAV/Hu bezüglich der MARCKS-mRNA im Zellkulturerperiment nachweisen ließ. Die Stabilisierung der MARCKS-mRNA schien auf die Konzentration und Stabilität des MARCKS-Proteins keinen unmittelbaren Einfluss zu haben. Mit den etablierten Klonen ist es aber möglich, auch längerfristige Effekte der MARCKS-mRNA-Stabilisierung über mehrere Zellteilungen hinweg zu analysieren. So wachsen HuD-überexprimierende MEF/3T3-Klone signifikant langsamer als mock-transfizierte Kontrollzellen (R. Klug, persönliche Mitteilung). Diese Wachstumsverzögerung könnte auf vermehrter MARCKS-Translation im Zuge der HuD-vermittelten MARCKS-mRNA-Stabilisierung beruhen, womit die Funktion von MARCKS als Wachstumssuppressor in Fibroblasten erneut unter Beweis gestellt wäre. HuD kann aber auch an andere ARE-tragende mRNAs der MEF/3T3-Klone binden und diese stabilisieren. So bindet HuD beispielsweise an die mRNA von p21^{waf1}, einem Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen, welcher die Wachstumsarretierung in der G₁/S-Phase induziert (Joseph et al., 1998). Es ist deshalb erforderlich, die Expression weiterer Gene, deren mRNA von HuD gebunden wird, in den HuD-exprimierenden MEF/3T3-Tetoff-Klonen zu untersuchen. Erst wenn die Wachstumssuppression durch diese Expressionsdaten nicht erklärbar ist, kann die beobachtete Verzögerung im Wachstum der HuD-exprimierenden MEF/3T3-Klone der vermehrten MARCKS-Expression zugeschrieben werden.

Weitgehend unbekannt blieben bisher die Signaltransduktionswege, die in Swiss 3T3-Zellen die extrazellulären Signale auf den Regulationsapparat der MARCKS-mRNA-Stabilität übertragen. Da die Degradation der MARCKS-mRNA bei Wiedereintritt in den Zellzyklus auch ohne Beteiligung der PKC stattfindet (Brooks et al., 1992; Herget et al., 1993), scheint ein zentraler Signalweg zu existieren, der durch übergeordnete Signalwege (PKC, PKA) aktiviert wird und der letztlich die MARCKS-Depletion vermittelt. Vertreter der Ras-GTPase-Superfamilie könnten in diesem Signalweg vertreten sein. Ras-Proteine werden durch Serum aktiviert und sind an der Kontrolle des Zellzyklus beteiligt (Malumbres & Pellicer, 1998). Vor kurzem konnte eine ubiquitär exprimierte Endoribonuklease identifiziert werden, die durch den Ras-Signalweg aktiviert wird und mRNAs mit ARE schneidet (Gallouzi et al., 1998; Tourrière et al., 2001). Die Aktivierung dieser Endoribonuklease (G3BP) führt zum Wiedereintritt ruhender Zellen in den Zellzyklus (Guitard et al., 2001). Es wäre deshalb lohnend, eine mögliche Beteiligung dieser Ras-abhängigen Endoribonuklease an der Degradation der MARCKS-mRNA zu untersuchen.

Der Eintritt in die G₀-Phase des Zellzyklus und die Stabilisierung der MARCKS-mRNA durch HuR könnte durch den p38/MAP-(*mitogen-activated-protein*)-Kinase-Signalweg ausgelöst werden. Dies liegt nahe, da die Stabilisierung mehrerer ARE-enthaltender mRNAs über den MAP-Kinase Signalweg vermittelt wird (Winzen et al., 1999; Brook et al., 2000; Lasa et al., 2000), und in einem Fall auch die direkte HuR-Aktivierung über die MAP-Kinase dokumentiert wurde (Ming et al., 2001). Auch andere wichtige Proteinkinasen, wie z.B. die Phosphatidylinositol 3-Kinase

(PI3-K) oder die c-jun N-terminale Kinase (JNK) werden mit mRNA-Stabilisierung in Verbindung gebracht (Chen et al., 1998; Ming et al., 2001) und sollten in Bezug auf die MARCKS-mRNA-Stabilisierung näher untersucht werden.

MARCKS ist in vielen Tumorzelllinien herunterreguliert (Wolfman et al., 1987; Simek et al., 1989; Otsuka & Yang, 1991; Joseph et al., 1992; Rose et al., 1994; Manenti et al., 1998) und wird wegen seiner wachstumshemmenden Funktion auch als Tumorsuppressor-Gen bezeichnet (Brooks, 1994). Der Regulationsmechanismus der MARCKS-mRNA-Stabilität im Verlauf des Zellzyklus könnte womöglich allgemein für Tumorsuppressor-Gene gelten. Mit Hilfe der *cis*-Element-Sequenzen der MARCKS-mRNA könnten cDNA-Datenbanken nach homologen Sequenzmotiven durchsucht und auf diese Weise neue Tumorsuppressor-Gene identifiziert werden. Deren Expression sollte in ähnlicher Zellzyklus-abhängiger Weise reguliert werden, wie die MARCKS-mRNA.

V. Zusammenfassung

Die Expression des PKC-Hauptsubstrates MARCKS wird in Swiss 3T3-Fibroblasten Zellzyklus-abhängig auf Ebene der mRNA-Stabilität reguliert. Die vorliegende Arbeit sollte zur Aufklärung der Mechanismen beitragen, die für die Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität verantwortlich sind.

Da die mRNA-Stabilität in Eukaryonten durch RNA-bindende Proteine (*trans*-Faktoren) reguliert wird, die im Allgemeinen mit 3'UTR-lokalisierten Sequenzmotiven der mRNA (*cis*-Elemente) interagieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit die *cis*-Elemente der MARCKS 3'UTR und die daran bindenden *trans*-Faktoren analysiert. Wegen ihrer herausragenden Bedeutung für die mRNA-Stabilität in Säugerzellen wurde eine mögliche Beteiligung von Mitgliedern der ELAV/Hu-Genfamilie an der Regulation der MARCKS-mRNA-Stabilität *in vitro* und *in vivo* untersucht.

Cis-Elemente der MARCKS 3'UTR:

Innerhalb der MARCKS 3'UTR konnten zwei *cis*-Elemente identifiziert werden, die mit Swiss 3T3-Proteinen jeweils zwei RNA/Protein-Komplexe bilden. Das MARCKS 52nt *cis*-Element (CUUU)₁₁U₈ (1830-1881 bp) wurde von Swiss 3T3-Proteinen mit hoher Affinität gebunden und ist daher das Hauptmotiv der RNA/Protein-Interaktion. Das zweite *cis*-Element homo(U)₁₈ (1586-1603 bp) wurde mit niedriger Affinität gebunden und stellt eine kryptische Bindungsstelle für RNA-bindende Proteine dar. Die identifizierten *cis*-Elemente sind AU-reiche Elemente (ARE) der Klasse III, da die beiden *cis*-Elemente sehr große Sequenzhomologie zu ARE dieser Klasse aufweisen und die MARCKS 3'UTR *cis*-Elemente, wie für ARE typisch, Instabilität vermitteln.

Trans-Faktoren der MARCKS 3'UTR cis-Elemente:

Wegen der Charakterisierung der *cis*-Elemente als ARE sollten die beteiligten *trans*-Faktoren zur Gruppe der ARE-bindenden Proteine (AUBP) gehören. Die MARCKS-spezifischen AUBPs binden neben der RNA-Sequenz auch an einzelsträngige DNA und besitzen unterschiedliche Affinität zur MARCKS 52nt-RNA. Die RNA/Protein-Komplexbildung war in Kernextrakten stärker als in Zytoplasmaextrakten. Eine Affinitätsänderung der AUBP nach Aktivierung der PKC durch Phorbolester konnte in zytoplasmatischen Extrakten nicht festgestellt werden. In nukleären Extrakten nahm die RNA/Protein-Interaktion nach PKC-Aktivierung hingegen deutlich ab, wenn polyadenylierte Transkripte verwendet oder die sehr sensitive Northwestern-Analyse durchgeführt wurde. In diesem Befund könnte sich eine Abnahme des MARCKS-mRNA-Exports aus dem Zellkern bei Wiedereintritt in den Zellzyklus widerspiegeln.

ELAV/Hu-Proteine und die MARCKS-mRNA:

Rekombinantes GST-HuD und GST-HuR konnten das MARCKS 52nt *cis*-Element mit hoher Affinität binden. Mit Hilfe eines im Rahmen dieser Arbeit hergestellten und gereinigten polyklonalen Antiserums, ließ sich in Swiss 3T3-Zellen das ubiquitär und überwiegend im Kern exprimierte HuR nachweisen, während in PCC7-Mz1-Extrakten zusätzlich die neuronal-

exprimierten Proteine Hel-N1, HuC und HuD detektiert wurden. Darüberhinaus konnte mit diesem Antiserum nachgewiesen werden, dass einer der Swiss 3T3-spezifischen *trans*-Faktoren (p36) das ELAV-Protein HuR ist.

Durch transiente Überexpression von HuR und HuD in Swiss 3T3-Zellen wurde demonstriert, dass ELAV/Hu-Proteine die PKC-induzierte MARCKS-mRNA-Degradation blockieren. Durch stabile Überexpression von HuD unter Kontrolle des Tetracyclin-induzierbaren Promotorsystems in MEF/3T3-Tetoff[®]-Zellen ließ sich der wachstumsinduzierte Abbau der MARCKS-mRNA aber nicht des -Proteins unterbinden. Die mRNA- und Protein-Abbauwege scheinen demnach getrennt reguliert zu werden.

Mit den präsentierten Daten kann die hohe Stabilität der MARCKS-mRNA in ruhenden Swiss 3T3-Zellen auf die Bindung von HuR an die MARCKS 3'UTR *cis*-Elemente zurückgeführt werden, während die konstitutive MARCKS-mRNA-Stabilisierung in PCC7-Mz1-Zellen mit der Bindung von HuD erklärt werden kann. Der genaue Mechanismus, der in Swiss 3T3-Zellen die Stabilität der MARCKS-mRNA in Abhängigkeit des Zellzyklus im Zytoplasma reguliert, ist sehr komplex und erfolgt nicht über die 3'UTR allein. Es wird daher ein Modell vorgeschlagen, bei dem die MARCKS 3'UTR *cis*-Elemente mit *cis*-Elementen der 5'UTR und/oder kodierenden Region kooperieren.

VI. Literaturverzeichnis

- Abe**, R., Uyeno, Y., Yamamoto, K. & Sakamoto, H. (1994): Tissue-specific expression of the gene encoding a mouse RNA binding protein homologous to human HuD antigen. *DNA Res.* **1**, 175-180.
- Aderem, A. (1992): The MARCKS brothers: a family of protein kinase C substrates. *Cell* **71**, 713-716.
- Aderem, A. (1995): The MARCKS family of protein kinase C substrates. *Biochem. Soc. Trans.* **23**, 587-591.
- Albert, K.A., Naim, A.C. & Greengarrd, P. (1987): The 87 kDa protein, a major specific substrate for protein kinase C: Purification from bovine brain and characterization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7046-7050.
- Allen, L.A.H. & Aderem, A. (1995): A role for MARCKS, the α isozyme of protein kinase C and myosin I in zymosan phagocytosis by macrophages. *J. Exp. Med.* **182**, 829-840.
- Anderson, K.D., Morin, M.A., Beckel-Mitchener, A., Mobarak, C.D., Neve, R.L., Furneaux, H.M., Burry, R. & Perrone-Bizzozero, N. (2000): Overexpression of HuD, but not of its truncated form HuD I+II, promotes GAP-43 gene expression and neurite outgrowth in PC12 cells in the absence of nerve growth factor. *J. Neurochem.* **75**, 1103-1114.
- Anderson, K.D., Sengupta, J., Morin, M., Neve, R. L., Valenzuela, C. F. & Perrone-Bizzozero, N. I. (2001): Overexpression of HuD accelerates neurite outgrowth and increases GAP-43 mRNA expression in cortical neurons and retinoic acid-induced embryonic stem cells *in vitro*. *Exp. Neurol.* **168**, 250-258.
- Antic, D. & Keene, J.D. (1997): Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation and posttranscriptional gene expression. *Am. J. Hum. Genet.* **61**, 273-278.
- Antic, D. & Keene, J.D. (1998): Messenger ribonucleoprotein complexes containing human ELAV proteins: interactions with cytoskeleton and translational apparatus. *J. Cell Sci.* **111**, 183-197.
- Antic, D., Lu, N. & Keene, J.D. (1999): ELAV tumor antigen, Hel-N1, increases translation of neurofilament M mRNA and induces formation of neurites in human teratocarcinoma cells. *Genes Dev.* **13**, 449-461.
- Appelyard, R.K. (1954): Segregation of new lysogenic types during growth of doubly lysogenic strain derived from *Escherichia coli* K12. *Genetics* **39**, 440-452.
- Aranda-Abreu, G.E., Behar, L., Chung, S., Furneaux, H. & Ginzburg, I. (1999): Embryonic lethal abnormal vision-like RNA-binding proteins regulate neurite outgrowth and Tau expression in PC12 cells. *J. Neurosci.* **19**, 6907-6917.
- Arbuzova, A., Murray, D. & McLaughlin, S. (1998): MARCKS, membranes, and calmodulin: kinetics of their interaction. *Biochim. Biophys. Acta* **1376**, 369-379.
- Atasoy, U., Watson, J., Patel, D. & Keene, J.D. (1998): ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is upregulated during serum stimulation and T cell activation. *J Cell Sci.* **111**, 3145-3156.

- Bashkirov**, V.I., Scherthan, H., Solinger, J.A., Buerstedde, J.M. & Heyer, W.D. (1997): A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *J. Cell Biol.* **136**, 761-773.
- Beelman, C.A. & Parker, R. (1995): Degradation of mRNA in Eukaryotes. *Cell* **81**, 179-183.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979): A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Birnboim, H.C. (1983): A rapid alkaline extraction procedure for the isolation of plasmid DNA. *Meth. in Enzymol.* **100**, 243-255.
- Black, J.D. (2000): Protein kinase C-mediated regulation of the cell cycle. *Front. Biosci.* **5**, 406-423.
- Blackshear, P.J., Wen, L., Glynn, B.P. & Witters, L.A. (1986): Protein kinase C-stimulated phosphorylation *in vitro* of a Mr 80,000 protein phosphorylated in response to phorbol esters and growth factors in intact fibroblasts. Distinction from protein kinase C and prominence in brain. *J. Biol. Chem.* **261**, 1459-1469.
- Blackshear, P.J. (1993): The MARCKS family of cellular protein kinase C substrates. *J. Biol. Chem.* **268**, 1501-1504.
- Blattner, C., Kannouche, P., Litfin, M., Bender, K., Rahmsdorf, H.J., Angulo, J.F. & Herrlich, P. (2000): UV-induced stabilization of *c-fos* and other short-lived mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 3616-3625.
- Brennan, H.C., Gallouzi, I.-E. & Steitz, J.A. (2000): Protein ligands to HuR modulate its interaction with target mRNAs *in vivo*. *J. Cell Biol.* **151**, 1-13.
- Brennan, C.M. & Steitz, J.A. (2001): Review: HuR and mRNA stability. *Cell. Mol. Life Sci.* **58**, 266-277.
- Brewer, G. (1991): An A + U-rich element RNA-binding factor regulates *c-myc* stability *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **11**, 2460-2466.
- Brewer, G. (1998): Characterization of *c-myc* 3' to 5' mRNA decay activities in an *in vitro* system. *Mol. Cell. Biol.* **273**, 34770-34774.
- Brook, M., Sully, G., Clark, A.R. & Saklatvala, J. (2000): Regulation of tumor necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *FEBS Letters* **483**, 57-61.
- Brooks, S., Herget, T., Erusalimsky, J. & Rozengurt, E. (1991): Protein kinase C activation potently down-regulates the expression of its major substrate, 80K, in Swiss 3T3 cells. *EMBO J.* **10**, 2497-2505.
- Brooks, S.F., Herget, T., Broad, S. & Rozengurt, E. (1992): The Expression of 80K/MARCKS, a major substrate of protein kinase C (PKC), is down-regulated through both PKC-dependent and -independent pathways. *J. Biol. Chem.* **267**, 14212-14218.
- Brooks, G. (1994): The role of 80K/MARCKS, a specific substrate of protein kinase C, in cell growth and tumor progression. *Pigment Cell Res.* **7**, 451-457.
- Brooks, G., Brooks, S.F. & Goss, M.W. (1996): MARCKS functions as a novel growth suppressor in cells of melanocyte origin. *Carcinogenesis* **17**, 683-689.

- Brown, C.E. & Sachs, A.B. (1998): Poly(A)-tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6548-6559.
- Bubb, M.R., Lenox, R.H. & Edison, A.S. (1999): Phosphorylation-dependent conformational changes induce a switch in the actin-binding function of MARCKS. *J. Biol. Chem.* **274**, 36472-36478.
- Buchner, K. (2000): The role of protein kinase C in the regulation of cell growth and in signalling to the cell nucleus. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **126**, 1-11.
- Buzby, J.S., Brewer, G. & Nugent, D.J. (1999): Developmental regulation of RNA transcript destabilization by A + U-rich elements is AUF1-dependent. *J. Biol. Chem.* **274**, 33973-33978.
- Campos**, A.R., Grossman, D. & White, K. (1985): Mutant alleles at the locus *elav* in *Drosophila melanogaster* lead to nervous system defects. A developmental-genetic analysis. *J. Neurogenet.* **2**, 197-218.
- Chagnovich, D. & Cohn, S.L. (1996): Binding of a 40-kDa protein to the n-*myc* 3'-untranslated region correlates with n-*myc* expression in human neuroblastoma. *J. Biol. Chem.* **271**, 33580-33586.
- Chen, C. & Okayama, H. (1987): High efficiency transformation of mammalian cells by plasmid DNA. *Mol. Cell. Biol.* **7**, 2745-2752.
- Chen, C.-Y. & Shyu, A.-B. (1995): AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 465-470.
- Chen, C.-Y.A., Xu, N. & Shyu, A.-B. (1995a): mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and GM-CSF transcripts: Different deadenylation kinetics and uncoupling from translation. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 5777-5788.
- Chen, C.-Y.A., Gatto-Konczak, F.D., Wu, Z. & Karin, M. (1998): Stabilization of interleukin-2 mRNA by the c-jun NH₂-terminal kinase pathway. *Science* **281**, 1945-1949.
- Chen, C.-Y., Gherzi, R., Ong, S.-E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Pruijn, G.J.M., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M. & Karin, M. (2001): AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell* **107**, 451-464.
- Chen, F., MacDonald, C.C. & Wilusz, J. (1995b): Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucl. Acids. Res.* **23**, 2614-2620.
- Chung, S., Jiang, L., Cheng, S. & Furneaux, H. (1996): Purification and properties of HuD, a neuronal RNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 11528-11524.
- Chung, S., Eckrich, M., Perrone-Bizzozero, N., Kohn, D. & Furneaux, H. (1997): The Elav-like proteins bind to a conserved regulatory element in the 3'-untranslated region of GAP-43 mRNA. *J. Biol. Chem.* **272**, 6593-6598.
- Clarke, P.R., Siddhanti, S.R., Cohen, P. & Blackshear, P.J. (1993): Oocadaic-acid-sensitive protein phosphatases dephosphorylate MARCKS, a major protein kinase C substrate. *FEBS Letters* **336**, 37-42.

- Dalmau**, J., Furneaux, H.M., Cordon Cardo, C. & Posner, J.B. (1992): The expression of the Hu (paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy) antigen in human normal and tumor tissues. *Am. J. Pathol.* **141**, 881-886.
- Darnell, R.B. (1996): Onconeural antigens and the paraneoplastic neurologic disorders: at the intersection of cancer, immunity, and the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4529-4536.
- Dean, J.L.E., Wait, R., Mahtani, K.R., Sully, G., Clark, A.R. & Saklatvala, J. (2001): The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 721-730.
- Decker, C.J. & Parker, R. (1993): A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.* **7**, 1632-1643.
- Decker, C.J. & Parker, R. (1995): Diversity of cytoplasmic functions for the 3' untranslated region of eukaryotic transcripts. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **7**, 386-392.
- Dekker, L.V. & Parker, P.J. (1994): Protein kinase C – a question of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 73-77.
- DeMaria, C.T. & Brewer, G. (1996): AUF1 binding affinity to A + U-rich elements correlates with rapid mRNA degradation. *J. Biol. Chem.* **271**, 12179-12184.
- DeMaria, C.T., Sun, Y., Long, L., Wagner, B. & Brewer, G. (1997): Structural determinants in AUF1 required for high affinity binding to A+U-rich elements. *J. Biol. Chem.* **272**, 27635-27643.
- Dicker, P. & Rozengurt, E. (1978): Stimulation of DNA synthesis by tumor promoter and pure mitogenic factors. *Nature* **276**, 723-726.
- Dicker, P. & Rozengurt, E. (1980): Phorbol esters and vasopressin stimulate DNA synthesis by a common mechanism. *Nature* **287**, 607-612.
- Dixon, D.A., Tolley, N.D., King, P.H., Nabors, L.B., McIntyre, T.M., Zimmerman, G.A. & Prescott, S.M. (2001): Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J. Clin. Invest.* **108**, 1657-1665.
- Douglas, D.N., Fink, H.-S., Ridgway, N.D., Cook, H.W. & Byers, D.M. (1999): Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate is phosphorylated and translocated by a phorbol ester-insensitive and calcium-independent protein kinase C isoform in C6 glioma cell membranes. *Biochim. Biophys. Acta* **1448**, 439-449.
- Duckley, T. & Parker, R. (1999): The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* **18**, 5411-5422.
- Erusalimsky**, J.D., Brooks, S.F., Herget, T., Morris, C. & Rozengurt, E. (1991): Molecular cloning and characterization of the acidic 80-kDa protein kinase C substrate from rat brain. *J. Biol. Chem.* **266**, 7073-7078.
- Fan**, X.C., Myer, V.E. & Steitz, J.A. (1997): AU-rich elements target small nuclear RNAs as well as mRNAs for rapid degradation. *Genes & Dev.* **11**, 2557-2568.
- Fan, X.C. & Steitz, J.A. (1998a): Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the *in vivo* stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* **17**, 3448-3460.

- Fan, X.C. & Steitz, J.A. (1998b): HNS, a nuclear-cytoplasmic shuttling sequence in HuR. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15293-15298.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1983): A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* **132**, 6-13.
- Felgner, P.L., Gadek, T.R., Holm, M., Roman, R., Chan, H.W., Wenz, M., Northrop, J.P., Ringold, G.M. and Danielsen, M. (1987): Lipofection: A highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 7413-7417.
- Fellous, M., Gunther, E., Kemler, R., Wiels, J., Berger, R., Guenet, I., Jakob, H. & Jakob, F. (1978): Association of the H-Y male antigen with β 2-microglobulin on human lymphoid and differentiated mouse teratocarcinoma cell lines. *J. Exp. Med.* **148**, 58-70.
- Fishman, D.D., Segal, S. & Livneh, E. (1998): The role of protein kinase C in G₁ and G₂/M phases of the cell cycle. *Int. J. Oncol.* **12**, 181-186.
- Ford, L.P., Watson, J., Keene, J.D. & Wilusz, J. (1999): ELAV proteins stabilize deadenylated intermediates in a novel *in vitro* mRNA deadenylation/degradation system. *Genes Dev.* **13**, 188-201.
- Fourney, R.M., Miyakosh, J., Day, R.S. & Paterson, M.C. (1988): Northern Blotting: efficient RNA staining and transfer. *BRL Focus* **10**, 5-7.
- Fraley, R., Subramani, S., Berg, H. & Papahadjopoulos, D. (1980): Introduction of liposome-encapsulated SV40 DNA into cells. *J. Biol. Chem.* **255**, 10431-10435.
- Frey, M.R., Clark, J.A., Leontieva, O., Uronis, J.M., Black, A.R., Black, J.D. (2000): Protein kinase C signaling mediates a program of cell cycle withdrawal in the intestinal epithelium. *J. Cell Biol.* **151**, 763-777.
- Gallouzi, I.E., Brennan, C.M., Stenberg, M.G., Swanson, M.S., Eversole, A., Maizels, N. & Steitz, J.A. (2000): HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 3073-3078.**
- Gallouzi, I.E., Parker, F., Chelbi, K., Maurier, F., Labourier, E., Barlat, I., Capony, J.P., Tocque, B. & Tazi, J. (1998): A novel phosphorylation-dependent RNase activity of GAP-SH3 binding protein: a potential link between signal transduction and RNA stability. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 3956-3965.
- Gallouzi, I.E. & Steitz, J.A. (2001): Delineation of mRNA export pathways by the use of cell-permeable peptides. *Science* **294**, 1895-1901.
- Gao, M., Wilusz, C.J., Peltz, S.W. & Wilusz, J. (2001): A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* **20**, 1134-1143.
- Glaser, M., Wanaski, S., Buser, C.A., Boguslavsky, V., Rashidzade, W., Morris, A., Rebecchi, M., Scarlata, S.F., Runnels, L.W., Restwich, G.D., Chen, J., Aderem, A., Ahn, J. & McLaughlin, S. (1996): Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) produces reversible inhibition of phospholipase C by sequestering phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in lateral domains. *J. Biol. Chem.* **271**, 26187-26193.
- Good, P.J. (1995): A conserved family of *elav*-like genes in vertebrates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 4557-4561.

- Good, P.J. (1997): The role of *elav*-like genes, a conserved family encoding RNA binding proteins, in growth and development. *Semin. Cell Dev. Biol.* **8**, 577-584.
- Gorman, C. (1985): In: DNA cloning II – A practical approach (Glover, D.M. ed.), IRL Press, Oxford, 143-190.
- Gossen, M. & Bujard, H. (1992): Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 5547-5551.
- Graff, J.M., Stumpo, D.J. & Blackshear, P.J. (1989a): Molecular cloning, sequence, and expression of a cDNA encoding the chicken myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS). *Mol. Endocrinol.* **3**, 1903-1906.
- Graff, J.M., Young, T.N., Johnson, J.D. & Blackshear, P.J. (1989b): Phosphorylation-regulated calmodulin binding to a prominent cellular substrate of protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**, 21818-21832.
- Graff, J.M., Stumpo, D.J. & Blackshear, P.J. (1989c): Characterization of the phosphorylation sites in the chicken and bovine myristoylated alanine-rich C kinase substrate protein, a prominent cellular substrate for protein kinase C. *J. Biol. Chem.* **264**, 11912-11919.
- Grzybowska, E.A., Wilczynska, A. & Siedlecki, J.A. (2001): Breakthroughs and views: Regulatory Functions of 3'UTRs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **288**, 291-295.
- Gueydan, C., Droogmans, L., Chalou, P., Huez, G., Caput, D. & Kruys, V. (1999): Identification of TIAR as a protein binding to the translational regulatory AU-rich element of tumor necrosis factor alpha mRNA. *J. Biol. Chem.* **274**, 2322-2326.
- Guhaniyogi, J. & Brewer, G. (2001): Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**, 11-23.
- Guitard, E., Parker, F., Millon, R., Abecassis, J. & Tocque, B. (2001): G3BP is overexpressed in human tumors and promotes S phase entry. *Cancer Letters* **162**, 213-221.
- Hamilton, B.J., Nagy, E., Malter, J.S., Arrick, B.A. & Rigby, W.F. (1993): Association of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 and C proteins with reiterated AUUUA sequences. *J. Biol. Chem.* **268**, 8881-8887.
- Hanahan, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557.
- Harlan, D.M., Graff, J.M., Stumpo, D.J., Eddy, R.L., Shows, T.B., Boyle, J.M. & Blackshear, P.J. (1991): The human myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) gene (MACS). Analysis of its gene product, promoter, and chromosomal localization. *J. Biol. Chem.* **266**, 14399-14405.
- Harlow, E. & Lane, D. (1988): Antibodies – a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory, New York, USA.
- Hartwig, J.H., Thelen, M., Rosen, A., Janmey, P.A., Naim, A.C. & Aderem, A. (1992): MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* **356**, 618-622.
- Hatfield, L., Beelman, C.A., Stevens, A. & Parker, R. (1996): Mutations in *trans*-acting factors affecting mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 5830-5838.

- Herget, T., Brooks, S.F., Broad, S. & Rozengurt, E. (1992): Relationship between the major protein kinase C substrates acidic 80-kda protein kinase C substrate (80K) and myristoylated alanine-rich C-kinase substrate (MARCKS): Members of gene family or equivalent genes in different species. *Eur. J. Biochem.* **209**, 7-14.
- Herget, T., Brooks, S.F., Broad, S. & Rozengurt E. (1993): Expression of the major protein kinase C substrate, the acidic 80-kilodalton myristoylated alanine-rich C kinase substrate, increases sharply when Swiss 3T3 cells move out of cycle and enter G₀. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 2945-2949.
- Herget, T. & Rozengurt, E. (1994): Bombesin, endothelin, and platelet-derived growth factor induce rapid translocation of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate 80K/MARCKS in Swiss 3T3 cells. *Eur. J. Biochem.* **225**, 539-548.
- Herget, T., Broad, S. & Rozengurt, E. (1994): Overexpression of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate in Rat1 cells increases sensitivity to calmodulin antagonists. *Eur. J. Biochem.* **225**, 549-556.
- Herget, T., Oehrlein, S.A., Pappin, D.J.C., Rozengurt, E. & Parker, P.J. (1995): The myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) is sequentially phosphorylated by conventional, novel and atypical isoforms of PKC. *Eur. J. Biochem.* **233**, 448 – 457.
- Herget, T. (1997): Beteiligung der Proteinkinase C-Genfamilie an Proliferation, Differenzierung und Apoptose. *Habilitationschrift*, Fachbereich Medizin der Universität Mainz.
- Herget, T., Specht, H., Esdar, C., Oehrlein, S.A. & Maelicke A. (1998): Retinoic acid induces apoptosis -related neural differentiation of a murine teratocarcinoma cell line. *J. Neurochem.* **70**, 47-58.
- Higgins, T. & Rozengurt, E. (1994): Stimulation of DNA synthesis in quiescent 3T3 cells. In: *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Academic Press, USA, 294-301.
- Hirsch, H.H., Nair, A.P., Backenstoss, V. & Moroni, C. (1995): Interleukin-3 mRNA stabilization by a *trans*-acting mechanism in autocrine tumors lacking interleukin-3 gene rearrangements. *J. Biol. Chem.* **270**, 20629-20635.
- Hundle, B., McMahon, T., Dadgar, J., Chen, C.H., Mochly-Rosen, D. & Messing R.O. (1997): An inhibitory fragment derives from protein kinase C epsilon prevents enhancement of nerve growth factor responses by ethanol and phorbol esters. *J. Biol. Chem.* **272**, 15028-15035.
- Imataka**, H., Gradi, A. & Sonenberg, N. (1998): A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* **17**, 7480-7489.
- Jacobs**, J.S., Anderson, A.R., & Parker, R.P. (1998): The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* **17**, 1497-1506.
- Jackson, R.J. (1993): Cytoplasmic regulation of mRNA function: the importance of the 3' untranslated region. *Cell* **74**, 9-14.
- Jacquier-Sarlin, M.R., Jomot, L. & Polla, B.S. (1995): Differential expression and regulation of hsp70 and hsp90 by phorbol esters and heat shock. *J. Biol. Chem.* **270**, 14094-14099.

- James, G. & Olson, E.N. (1989): Myristoylation, phosphorylation and subcellular distribution of the 80K protein kinase C substrate in BC₃H1 monocytes. *J. Biol. Chem.* **264**, 20928-20933.
- Johannes, F.-J., Prestle, J., Eis, S., Oberhagemann, P. & Pfizenmaier, K. (1994): PKC μ is a novel, atypical member of the protein kinase C family. *J. Biol. Chem.* **269**, 6140-6148.
- Joseph, B., Orlian, M. & Furneaux, H. (1998): p21^{waf1} mRNA contains a conserved element in its 3'-untranslated region that is bound by the Elav-like mRNA stabilizing proteins. *J. Biol. Chem.* **273**, 20511-20516.
- Joseph, C., Qureshi, S.A., Wallace, D.J. & Foster, D.A. (1992): MARCKS protein is transcriptionally down-regulated in v-src-transformed BALB/c 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **267**, 1327-1330.
- Kasashima**, K., Terashima, K., Yamamoto, K., Sakashita, E. & Sakamoto, H. (1999): Cytoplasmic localization is required for the mammalian ELAV-like protein HuD to induce neuronal differentiation. *Genes Cells* **4**, 667-683.
- Keene, J.D. (1999): Commentary: Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5-7.
- Keene, J.D. (2001): Ribonucleoprotein infrastructure regulating the flow of genetic information between the genome and the proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 7018-7024.
- Keller, W. (1995): No end yet to messenger RNA 3' processing! *Cell* **81**, 829-832.
- Kenan, D.J., Query, C.C. & Keene, J.D. (1991): RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem. Sci.* **16**, 214-220.
- Kiledjian, M., DeMaria, C.T., Brewer, G. & Novick, K. (1997): Identification of AUF1/hnRNP-D as a component of the α -globin mRNA stability complex. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4870-4876.
- King, P.H. (2000): RNA-binding analyses of HuC and HuD with VEGF and c-myc 3'-untranslated regions using a novel ELISA-based assay. *Nucl. Acids Res.* **28**, E20.
- Kjems, J., Egebjerg, J. & Christiansen, J. (1998): Analysis of RNA-protein interactions *in vitro*. Elsevier, Amsterdam.
- Klaff, P. (1995): mRNA decay in spinach chloroplasts: psbA mRNA degradation is initiated by endonucleolytic cleavages within the coding region. *Nucl. Acids Res.* **23**, 4885-4892.
- Korner, C.G. & Wahle, E. (1997): Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* **272**, 10448-10456.
- Krecic, A.M. & Swanson, M.S. (1999): hnRNP complexes: composition, structure and function. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **11**, 363-371.
- Krieg, P.A. & Melton, D.A. (1987): *In vitro* RNA synthesis with SP6 RNA polymerase. *Methods Enzymol.* **155**, 397-415.
- Laemmli**, U.K. (1970): Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

- LaGrandeur, T.E. & Parker, R. (1998): Isolation and characterization of Dcp1p, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.* **17**, 1487-1496.
- Lai, W.S., Carballo, E., Strum, J.R., Kennignton, E.A., Phillips, R.S. & Blackshear, P.J. (1999): Evidence that Tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4311-4323.
- Lang, E., Mazauric-Stüker, M.-L. & Maelicke, A. (1989): States of developmental commitments of a mouse embryonal carcinoma cell line differentiating along a neural pathway. *J. Cell Biol.* **109**, 2481-2493.
- Larimer, F.W., Hsu, C.L., Maupin, M.K. & Stevens, A. (1992): Characterization of the XRN1 gene encoding a 5'→3' exoribonuclease: sequence data and analysis of disparate protein and mRNA levels of gene-disrupted yeast cells. *Gene* **120**, 51-57.
- Laroia, G., Cuesta, R., Brewer, G. & Schneider, R.J. (1999): Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science* **284**, 499-502.
- Lasa, M., Mahtani, K.R., Finch, A., Brewer, G., Saklatvala, J. & Clark, A.R. (2000): Regulation of cyclooxygenase 2 mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signaling cascade. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 4265-4274.
- Lee, K.A., Bindereif, A. & Green, M.R. (1988): A small-scale procedure for preparation of nuclear extracts that support efficient transcription and pre-mRNA splicing. *Gene Anal. Tech.* **5**, 22-31.
- Leontis, N.B. & Westhof, E. (1998): Conserved geometrical base-pairing patterns in RNA. *Quart. Rev. Biophys.* **34**, 399-455.
- Levy, A.P., Levy, N.S. & Goldberg, M.A. (1996): Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J. Biol. Chem.* **271**, 2746-2753.
- Levy, N.S., Chung, S., Furneaux, H., & Levy, A.P. (1998): Hypoxic stabilization of vascular endothelial growth factor mRNA by the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* **273**, 6417-6423.
- Li, Y., Martin, L.D., Spizz, G. & Adler, K.B. (2001): MARCKS protein is a key molecule regulating mucin secretion by human airway epithelial cells *in vitro*. *J. Biol. Chem.* **276**, 40982-40990.
- Lindquist, J.N., Kauschke, S.G., Stefanovic, B., Burchardt, E.R. & Brenner, D.A. (2000): Characterization of the interaction between αCP_2 and the 3'-untranslated region of collagen $\alpha 1(\text{I})$ mRNA. *Nucl. Acids Res.* **28**, 4306-4316.
- Liu, J.P. (1996): Protein kinase C and its substrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* **116**, 1-29.
- Loflin, P., Chen, C.-Y.A. & Shyu, A.-B. (1999): Unraveling a cytoplasmic role for hnRNP D in the *in vivo* mRNA destabilization directed by the AU-rich element. *Genes Dev.* **13**, 1884-1897.
- Ma**, W.-J., Cheng, S., Campbell, C., Wright, A. & Furneaux, H. (1996): Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein. *J. Biol. Chem.* **271**, 8144-8151.
- Ma, W.-J., Chung, S. & Furneaux, H. (1997): The Elav-like proteins bind to AU-rich elements and to the poly(A) tail of mRNA. *Nucl. Acids Res.* **25**, 3564-3569.

- Malumbres, M. & Pellicer, A. (1998): Ras pathways to cell cycle control and cell transformation. *Front. Biosci.* **3**, 887-912.
- Mangelsdorf, D.J., Umesono, K., Kliewer, S.A., Borgmeyer, U., Ong, E.S. & Evans, R.M. (1991): A direct repeat in the cellular retinol-binding protein type II gene confers differential regulation by RXR and RAR. *Cell* **66**, 555-61.
- Manley, J.L. (1995): A complex protein assembly catalyzes polyadenylation of mRNA precursors. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **5**, 222-228.
- Manohar, C.F., Short, M.L., Nguyen, A., Nguyen, N.N., Chagnovich, D., Yang, Q. & Cohn, S.L. (2002): HuD, a neuronal-specific RNA-binding protein, increases the *in vivo* stability of MycN RNA. *J. Biol. Chem.* **277**, 1967-1973.
- Manenti, S., Malecaze, F., Chap, H. & Darbon, J.-M. (1998): Overexpression of the myristoylated alanine-rich C substrate in human choroidal melanoma cells affects cell proliferation. *Cancer Res.* **58**, 1429 – 1434.
- Manenti, S., Sorokine, O., Van Dorsselaer, A. & Taniguchi, H. (1992): Affinity purification of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) from bovine brain. *J. Biol. Chem.* **267**, 22310-22315.
- Manenti, S., Yamauchi, E., Sorokine, O., Knibiehler, M., Van Dorsselaer, A., Taniguchi, H., Ducommun, B. & Darbon, J.-M. (1999): Phosphorylation of the myristoylated protein kinase C substrate MARCKS by the cyclin E-cyclin-dependent kinase 2 complex *in vitro*. *Biochem. J.* **340**, 775-782.
- Martincic, K., Campbell, R., Edwards-Gilbert, G., Souan, L., Lotze, M. & Milcarek, C. (1998): Increase in the 64-kDa subunit of the polyadenylation/cleavage stimulatory factor during the G₀ to S phase transition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 11095-11100.
- Mathews, D.H., Sabina, J., Zuker, M. & Turner D.H. (1999): Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *J. Mol. Biol.* **288**, 911-940.
- Mattaj, I.W. (1993): RNA recognition: a family matter? *Cell* **73**, 837-841.
- Maurer, F., Tierny, M. & Medcalf, R.L. (1999): An AU-rich sequence in the 3'-UTR of plasminogen activator inhibitor type 2 (PAI-2) mRNA promotes PAI-2 mRNA decay and provides a binding site for nuclear HuR. *Nucl. Acids Res.* **27**, 1664-1673.
- McCarthy, J.E.G. & Kollmus, H. (1995): Cytoplasmic mRNA-protein interactions in eukaryotic gene expression. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 191-197.
- McCarthy, J.E.G. (1998): Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1492-1553.
- McIlhenney, R.A. & McGlone, K. (1990): Evidence for a non-myristoylated pool of the 80 kDa protein kinase C substrate in rat brain. *Biochem. J.* **271**, 681-685.
- McLaughlin, S. & Aderem, A. (1995): The myristoyl-electrostatic switch: a modulator of reversible protein-membrane interactions. *Trends Biochem. Sci.* **20**, 272-276.
- McMillan, P.J., Tondravi, M.M. & Bannon, G.A. (1993): resB, a chromosomal locus that affects the stability of a temperature-specific surface protein mRNA in *Tetrahymena thermophila*. *Nucl. Acids Res.* **21**, 4356-4362.

- McNamara, R.K., Stumpo, D.J., Morel, L.M., Lewis, M.H., Wakeland, E.K., Blackshear, P.J. & Lenox, R.H. (1998): Effect of reduced myristoylated alanine-rich C kinase substrate expression on hippocampal mossy fiber development and spatial learning in mutant mice: Transgenic rescue and interactions with gene background. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14517-14522.
- Melton, D., Krieg, P.A., Rabagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. & Green, M.R. (1984): Efficient *in vitro* synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *Nucl. Acids Res.* **12**, 7035-7056.
- Michel, Y.M., Poncet, D., Piron, M., Kean, K.M. & Borman, A.M. (2000): Cap-Poly(A) synergy in mammalian cell-free extracts; Investigation of the requirements for poly(A)-mediated stimulation of translation initiation. *J. Biol. Chem.* **275**, 32268-32276.
- Milligan, J.F., Groebe, D.R., Witherell, G.W., Uhlenbeck, O.C. (1987): Oligoribonucleotide synthesis using T7 RNA polymerase and synthetic DNA templates. *Nucl. Acids Res.* **15**, 8783-8798
- Ming, X.-F., Stoecklin, G., Lu, M., Looser, R. & Moroni, C. (2001): Parallel and independent regulation of interleukin-3 mRNA turnover by phosphatidylinositol 3-kinase and p38 mitogen-activated protein kinase. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 5778-5789.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. & Tollervey, D. (1997): The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' – 5' exoribonucleases. *Cell* **91**, 457-466.
- Mitchell, P. & Tollervey, D. (2000): mRNA stability in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 193-198.
- Mobarak, C.D., Anderson, K.D., Morin, M., Beckel-Mitchener, A., Rogers, S.L., Furneaux, H., King, P. & Perrone-Bizzozero, N.I. (2000): The RNA-binding protein HuD is required for GAP-43 mRNA stability, GAP-43 gene expression and PKC-dependent neurite outgrowth in PC12 cells. *Mol. Biol. Cell* **11**, 3191-3203.
- Mochly-Rosen, D., Henrich, C.J., Cheever, L., Kahner, H. & Simpson, P.C. (1990): A protein kinase C isozym is translocated to cytoskeletal elements on activation. *Cell. Regul.* **1**, 693-706.
- Moore, M.J. & Rosbash, M. (2001): TAPping into mRNA export. *Science* **294**, 1841-1842.
- Morash, S.C., Rose, S.D., Byers, D.M., Ridgway, N.D. & Cook, H.W. (1998): Overexpression of myristoylated alanine-rich C kinase substrate enhances activation of phospholipase D by protein kinase C in SK-N-MC human neuroblastoma cells. *Biochem. J.* **332**, 321-327.
- Müller, G., Ayoub, M., Storz, P., Rennecke, J., Fabbro, D. & Pfizenmaier, K. (1995): PKC ζ is a molecular switch in signal transduction of TNF- α , bifunctionally regulated by ceramide and arachidonic acid. *EMBO J.* **14**, 1961-1969.
- Muhrad, D., Decker, C.J. & Parker, R. (1994): Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast *MFA2* gene leads to decapping followed by 5'→3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* **8**, 855-866.
- Myat, M.M., Anderson, S., Allen, L.H. & Aderem, A. (1997): MARCKS regulates membrane ruffling and cell spreading. *Curr. Biol.* **7**, 611-614.

- Myer, V.E., Fan, X.C. & Steitz, J.A. (1997): Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay. *EMBO J.* **16**, 2130-2139.
- Myer, V.E. & Steitz, J.A. (1995): Isolation and characterization of a novel, low abundance hnRNP protein: A0. *RNA* **1**, 171-182.
- Nabors**, L.B., Gillespie, G.Y., Harkins, L. & King, P.H. (2001): HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3'-untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res.* **61**, 2154-2161.
- Nagy, E. & Rigby, W.F. (1995): Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase selectively binds AU-rich RNA in the NAD(+)-binding region (Rossmann fold). *J. Biol. Chem.* **270**, 2755-2763.
- Nakagawa, J., Waldner, H., Meyer-Monard, S., Hofsteenge, J., Jenö, P. & Moroni, C. (1995): AUH, a gene encoding an AU-specific RNA binding protein with intrinsic enoyl-CoA hydratase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 2051-2055.
- Nakanishi, H., Brewer, K.A. & Exton, J.H. (1993): Activation of the ζ isozyme of protein kinase C by phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate. *J. Biol. Chem.* **268**, 13-16.
- Newton, A.C. (1995): Minireview: protein kinase C: structure, function, and regulation. *J. Biol. Chem.* **270**, 28495-28498.
- Nishizuka, Y. (1995): Protein kinase C and lipid signaling for sustained cellular responses. *FASEB J.* **9**, 484-496.
- Oehrlein**, S.A. (1995): Untersuchungen zur Phosphorylierung der Substrate MARCKS und GAP-43 durch verschiedene Isoformen der PKC-Genfamilie. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie der Universität Mainz.
- Oehrlein, S.A., Maelicke, A. & Herget, T. (1998): Expression of protein kinase C gene family members is temporally and spatially regulated during neural development *in vitro*. *Eur. J. Cell Biol.* **77**, 323-337.
- Oehrlein-Karpi, S.A. (1998): RA-induzierte Signaltransduktionsprozesse während der neuronalen Differenzierung der PCC7-Mz1-Zellen. *Dissertation*, Fachbereich Biologie der Universität Mainz.
- Ohmori, S., Sakai, N., Shirai, Y., Yamamoto, H., Miyamoto, E., Shimizu, N. & Saito, N. (2000): Importance of protein kinase C targeting for the phosphorylation of its substrate, myristoylated alanine-rich C kinase substrate. *J. Biol. Chem.* **275**, 26449-26457.
- Okano, H.J. & Darnell, R.B. (1997): A hierarchy of Hu RNA binding proteins in developing and adult neurons. *J. Neurosci.* **17**, 3024-3037.
- Olson, E.N., Burgess, R. & Staudinger, J. (1993): Protein kinase C as a transducer of nuclear signal. *Cell Growth Differen.* **4**, 699-705.
- Otsuka, M. & Yang, H.C. (1991): Decreased expression of the myristoylated alanine-rich C kinase substrate in transformed BALB/c 3T3 mouse fibroblasts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 494-500.

- Parekh**, D.B., Ziegler, W. & Parker, P.J. (2000): Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* **19**, 496-503.
- Patel, J. & Klingman, D. (1987): Purification and characterization of an Mr 87,000 protein kinase C substrate from rat brain. *J. Biol. Chem.* **262**, 16686-16691.
- Paulding, W.R. & Czyzyk-Krzeska, M.F. (1999): Regulation of tyrosin hydroxylase mRNA stability by protein-binding, pyrimidine-rich sequence in the 3' untranslated region. *J. Biol. Chem.* **274**, 2532-2538.
- Paulin, D., Jakob, F., Weber, K. & Osborn, M. (1982): *In vitro* differentiation of mouse teratocarcinoma cells monitored by intermediate filament expression. *Differentiation* **22**, 90-99.
- Peng, S.S.-Y., Chen, C.-Y.A. & Shyu, A.-B. (1996): Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from *c-jun* proto-oncogene mRNA: evidence of a novel class of AU-rich elements. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1490-1499.
- Peng, S.S.-Y., Chen, C.-Y.A., Xu, N. & Shyu, A.-B. (1998): RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J.* **17**, 3461-3470.
- Pestova, T.V. & Hellen, C.U. (1999): Ribosome recruitment and scanning: what's new? *Trends Biochem. Sci.* **24**, 85-87.
- Pfeiffer, S.E., Jacob, H., Mikoshiba, K., Dubois, P., Guenet, J.L., Nicolas, L.-F., Gaillard, J., Chevance, G. & Jacob, F. (1981): Differentiation of a teratocarcinoma line: preferential development of cholinergic neurons. *J. Cell Biol.* **88**, 57-66.
- Pinol-Roma, S. & Dreyfuss, G. (1992): Shuttling of pre-mRNA binding proteins between nucleus and cytoplasm. *Nature* **335**, 730-732.
- Raghavan**, A., Robison, R.I., McNabb, J., Miller, C.R, Williams, D.A. & Bohjanen, P.R. (2001): HuA and Tristetraprolin are induced following T cell activation and display distinct but overlapping RNA binding specificities. *J. Biol. Chem.* **276**, 47958-47965.
- Raleigh, E.A., Murray, N.E., Revel, H., Blumenthal, R.M., Westaway, D., Reith, A.D., Rigby, P.W., Elhai, J., Hanahan, D. (1988): Mcr A and Mcr B restriction phenotypes of some *E.coli* strains and implications of gene cloning. *Nucl. Acids Res.* **16**, 1563-1575.
- Ramsden, J.J. (2000): MARCKS: a case of molecular exaptation? *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **32**, 475-479.
- Rasmussen, C.D. & Means, A.R. (1987): Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation. *EMBO J.* **6**, 3961-3968.
- Rasmussen, C.D. & Means, A.R. (1989): Calmodulin is required for cell-cycle progression during G1 and mitosis. *EMBO J.* **8**, 71-82.
- Roberts, R.J. (1989): Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucl. Acids Res.* **17**, 347-387.
- Robinow, S. & White, K. (1988): The locus *elav* of *Drosophila melanogaster* is expressed in neurons at all developmental stages. *Dev. Biol.* **126**, 294-303.

- Rodriguez-Pascual, F., Hausding, M., Ihrig-Biedert, I., Furneaux, H., Levy, A.P., Förstermann, U. & Kleinert, H. (2000): Complex contribution of the 3'-untranslated region to the expressional regulation of the human inducible nitric-oxide synthase gene – involvement of the RNA-binding protein HuR. *J. Biol. Chem.* **275**, 26040-26049.
- Rodriguez-Pena, A. & Rozengurt, E. (1985): Serum, like phorbol esters, rapidly activates protein kinase C in intact quiescent fibroblasts. *EMBO J.*, **4**, 71-76.
- Rössler, M. (1999); Untersuchungen zur Funktion der 3' nicht-translatierten Region der MARCKS-mRNA bei der Regulation der mRNA-Stabilität *in vivo*. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie der Universität Mainz.
- Rose, S.D., Cook, H.W., Palmer, F.B., Ridgway, N.D. & Byers, D.M. (1994): Differential expression of MARCKS and other calmodulin-binding protein kinase C substrates in cultured neuroblastoma and glioma cells. *J. Neurochem.* **63**, 2314-2323.
- Rose, S.D., Morash, S.C., Ridgway, N.D. & Cook, H.W. (1996): Overexpression of MARCKS, but not protein kinase C- α , increases phorbol ester-stimulated synthesis of phosphatidylcholin in human SK-N-MC neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **66**, 1766-1769.
- Rosen, A., Keenan, K.F., Thelen, M., Naim, A.C. & Aderem, A. (1990): Activation of protein kinase C results in the displacement of its myristoylated, alanine-rich substrate from punctate structures in macrophage filopodia. *J. Exp. Med.* **172**, 1211-1215.
- Ross, J. (1995): Review: mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.* **59**, 423-450.
- Rouault, T & Klausner, R. (1997): Regulation of iron metabolism in eukaryotes. *Curr. Top. Cell. Regul.* **35**, 1-19.
- Rozengurt, E., Rodriguez-Pena, M. & Smith, K.A. (1983): Phorbol ester, phospholipase C and growth factors rapidly stimulate the phosphorylation of an Mr 80.000 protein in intact quiescent 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**, 6858-6862.
- Saiki**, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Ehrlich, H.A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostabile DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Saito, N., Kose, A., Ito, A., Hosoka, K., Mori, M., Hirata, M., Ogita, K., Kikkawa, U., Ono, Y., Igarashi, K., Nishizuka, Y. & Tanaka, C. (1989): Immunocytochemical localization of β II sub-species of protein kinase C in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 3409-3413.
- Sambrook, J.T., Fritsch, E.F. & Maniatis, T. (1989): *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- Schäfer, F. (1997): Untersuchungen zur Stabilität der MARCKS-mRNA in Swiss 3T3 und PCC7-Mz1 Zellen. *Diplomarbeit*, Fachbereich Biologie der Universität Mainz.
- Schoenberg, D.R. & Chernokalskaya, E. (1997): Ribonucleases involved in eukaryotic mRNA turnover. In: mRNA metabolism and post-transcriptional gene regulation, (Harford, J. & Morris, D.R., eds.), Wiley, New York, 217-240.
- Schönwaßer, D., Palmer, R.H., Herget, T. & Parker, P.J. (1996): p42 MAPK phosphorylates 80 kDa MARCKS at Ser-113. *FEBS Letters* **295**, 1-5.

- Seki, K., Sheu, F.S. & Huang, K.P. (1996): Binding of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate to phosphoinositides attenuates the phosphorylation by protein kinase C. *Arch. Biochem. Biophys.* **326**, 193-201.
- Sela-Brown, A., Silver, J., Brewer, G. & Naveh-Many, T. (2000): Identification of AUF1 as a parathyroid hormone mRNA 3'-untranslated region-binding protein that determines parathyroid hormone mRNA stability. *J. Biol. Chem.* **275**, 7424-7429.
- Seykora, J.T., Ravech, J.V. & Aderem, A. (1991): Cloning and molecular characterization of the murine macrophage 68-kDa protein kinase C substrate and its regulation by bacterial lipopolysaccharide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2505-2509.
- Shaw, G. & Kamen, R. (1986): A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell* **46**, 659-667.
- Shi, Y., Stephan, K.S., Pitterle, D.M., Kennigton, E.A., Graff, J.M. & Blackshear, P.J. (1997): Mechanisms of MARCKS gene activation during *Xenopus* development. *J. Biol. Chem.* **272**, 29290-29300.
- Shyu, A.-B., Belasco, J.G. & Greenberg, M.E. (1991): Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.* **5**, 221-231.
- Shyu, A.-B. & Wilkinson, M.F. (2000): The double lives of shuttling mRNA binding proteins. *Cell* **102**, 135-138.
- Simek, S., Kligman, D., Patel, J. & Colburn, N.H. (1989): Differential expression of an 80-kDa protein kinase C substrate in preneoplastic and neoplastic mouse JB6 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 7410-7414.
- Sirenko, O.I., Lofquist, A.K., DeMaria, C.T., Morris, J.S., Brewer, G. & Haskill, J.S. (1997): Adhesion-dependent regulation of an A + U-rich element-binding activity associated with AUF1. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 3898-3906.
- Sonenberg, N. & Gingras, A.C. (1998): The mRNA 5' cap-binding protein eIF4G and control of cell growth. *Curr. Opin. Cell Biol.* **10**, 268-275.
- Spizz, G. & Blackshear, P.J. (2001): Overexpression of the myristoylated alanine-rich C-kinase substrate inhibits cell adhesion to extracellular matrix components. *J. Biol. Chem.* **276**, 32264-32273.
- Staton, J.M., Thomson, A.M. & Leedman, P.J. (2000): Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary (Review). *J. Mol. End.* **25**, 17-34.
- Stefanovic, B., Hellerbrand, C., Holcik, M., Briendl, M., Liebhaber, S.A. & Brenner, A.D. (1997): Posttranscriptional regulation of collagen $\alpha 1(I)$ mRNA in hepatic stellate cells. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5201-5209.
- Stumpo, D.J., Graff, J.M., Albert, K.A., Greengard, P. & Blackshear, P.J. (1989): Molecular cloning, characterization and expression of a cDNA encoding the '80-87 kDa' myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a major endogenous substrate for protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 4012-4016.
- Stumpo, D.J., Bock, C.B., Tuttle, J.S. & Blackshear, P.J. (1995): MARCKS deficiency in mice leads to abnormal brain development and perinatal death. *Proc. Natl., Acad. Sci. USA* **92**, 944-948.

- Swartz, K.J., Merritt, A., Bean, B.P. & Lovinger, D.M. (1993): Protein kinase C modulates glutamate receptor inhibition of Ca²⁺ channels and synaptic transmission. *Nature* **361**, 165-168.
- Szabo, A., Dalmau, J., Manley, G., Rosenfeld, M., Wong, E., Henson, J., Posner, J.B. & Furneaux, H.M. (1991): HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and sex-lethal. *Cell* **67**, 325-333.
- Takagaki**, Y., Manley, J.L., MacDonald, C.C., Wilusz, J. & Shenk, T. (1990): A multisubunit factor, CstF, is required for polyadenylation of mammalian pre-mRNAs. *Genes Dev.* **4**, 2112-2120.
- Tang, B., Wang, M. & Wise, B.C. (1997): Nerve growth factor mRNA stability is controlled by a *cis*-acting instability determinant in the 3'-untranslated region. *Mol. Brain Res.* **46**, 118-126.
- Taniguchi, H. & Manenti, S. (1993): Interaction of myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate (MARCKS) with membrane phospholipids. *J. Biol. Chem.* **268**, 9960-9963.
- Tanigushi, H., Manenti, S., Suzuki, M. & Titani, K. (1994): Myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS), a major protein kinase C substrate, is an *in vivo* substrate of proline-directed protein kinases. *J. Biol. Chem.* **269**, 18299-18302.
- Tarun, S.Z. & Sachs, A.B. (1996): Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* **15**, 7168-7177.
- Tarun, S.Z., Wells, S.E., Deardorff, J.A. & Sachs, A.B. (1997): Translation initiation factor eIF4G mediates *in vitro* poly(A) tail-dependent translation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9046-9051.
- Tebo, J.M., Datta, S., Kishore, R., Kolosov, M., Major, J.A., Ohmori, Y. & Hamilton, T.A. (2000): Interleukin-1-mediated stabilization of mouse KC mRNA depends on sequences in both 5'- and 3'-untranslated regions. *J. Biol. Chem.* **275**, 12987-12993.
- Thelen, M., Rosen, A., Naim, A.C. & Aderem, A. (1991): Regulation by phosphorylation of reversible association of a myristoylated protein kinase C substrate with the plasma membrane. *Nature* **351**, 320-322.
- Tillmar, L., Carlsson C. & Welsh N. (2002): Control of insulin mRNA stability in rat pancreatic islets. Regulatory role of a 3'-untranslated region pyrimidine-rich sequence. *J. Biol. Chem.* **277**, 1099-1106.
- Todaró, G.L. & Green, H. (1963): Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established cell lines. *J. Cell Biol.* **17**, 299-313.
- Tourrière, H., Gallouzi, I.-E., Chebli, K., Capony, J.P., Mouaikel, J., van der Geer, P. & Tazi, J. (2001): RasGAP-associated endoribonuclease G3BP: Selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 7747-7760.
- Überall**, F., Giselbrecht, S., Hellbrecht, K., Fresser, S., Bauer, B., Gschwendt, M., Grunicke, H.H. & Baier, G. (1997): Conventional PKC- α , novel PKC- ϵ and PKC- θ , but not atypical PKC- λ are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **272**, 4072-4078.

- Volloch**, V. & Housman, D. (1981): Stability of globin mRNA in terminally differentiating murine erythroleukemia cells. *Cell* **23**, 509-514.
- Wakamatsu**, Y. & Weston, J.A. (1997): Sequential expression and role of Hu RNA-binding proteins during neurogenesis. *Development* **124**, 3449-3460.
- Wang, J.K., Walaas, S.I., Sihra, T.S., Aderem, A. & Greengard, P. (1989): Phosphorylation and associated translocation of the 87-kDa protein, a major protein kinase C substrate, in isolated nerve terminals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 2253-2256.
- Wang, W., Caldwell, M.C., Lin, S., Furneaux, H. & Gorospe, M. (2000a): HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation. *EMBO J.* **19**, 2340-2350.
- Wang, W., Furneaux, H., Cheng, H., Caldwell, M.C., Hutter, D., Liu, Y., Holbrook, N. & Gorospe, M. (2000b): HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 760-769.
- Wang, X. & Liebhaber, S.A. (1996): Complementary change in *cis* determinants and *trans* factors in the evolution of an mRNP stability complex. *EMBO J.* **15**, 5040-5051.
- Wang, Z., Day, N., Trifillis, P. & Kiledjian, M. (1999): An mRNA stability complex functions with poly(A)-binding protein to stabilize mRNA *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 4552-4560.
- Wang, Z. & Kiledjian, M. (2000a): Identification of an erythroid-enriched endoribonuclease activity involved in specific mRNA cleavage. *EMBO J.* **19**, 295-305.
- Wang, Z. & Kiledjian, M. (2000b): The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Mol. Cell. Biol.* **20**, 6334-6341.
- Wang, Z. & Kiledjian, M. (2001): Functional link between the mammalian exosome and mRNA-decapping. *Cell* **107**, 751-762.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D. & Sachs, A.B. (1998): Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell* **2**, 135-140.
- Wilson, G.M. & Brewer, G. (1999): The search for *trans*-acting factors controlling messenger RNA decay. *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* 257-291.
- Wilson, T. & Treisman, R. (1988): Removal of poly(A) and consequent degradation of c-fos mRNA facilitated by 3' AU-rich sequences. *Nature* **336**, 396-399.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C.Y., Shyu, A.-B., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K. & Holtmann, H. (1999): The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region targeted mechanism. *EMBO J.* **18**, 4969-4980.
- Wolfman, A., Wingrove, T.G., Blackshear, P.J. & Macara, I.G. (1987): Down-regulation of protein kinase C and of an endogenous 80 kDa substrate in transformed fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **262**, 16546-16552.
- Wu, W.C., Walaas, S.I., Naim, A.C. & Greengard, P. (1982): Calcium/phospholipid regulates phosphorylation of a Mr "87k" substrate protein in brain synaptosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 5249-5253.

- Xu, N., Chen, C.-Y.A. and Shyu, A.-B. (1997):** Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: Key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4611-4621.
- Xu, N., Loflin, P., Chen, C.-Y.A. & Shyu, A.-B. (1998): A broader role for AU-rich element-mediated mRNA turnover revealed by a new transcriptional pulse strategy. *Nucl. Acids Res.* **26**, 558-565.
- Yamamoto, H., Arakane, F., Ono, T., Tashima, K., Okumura, E., Yamada, K., Hisanaga, S., Fukunaga, K., Kishimoto, T. & Miyamoto, E. (1995):** Phosphorylation of myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) by proline-directed protein kinases and its dephosphorylation. *J. Neurochem.* **65**, 802-809.
- Zamponi, G.W., Bourinet, E., Nelson, D., Nargeot, J. & Snutch, T.P. (1997):** Crosstalk between G proteins and protein kinase C mediated by the calcium channel alpha I subunit. *Nature* **385**, 442-446.
- Zhang, W., Wagner, B.J., Ehrenman, K., Schaefer, A.W., DeMaria, C.T. & Crater, D., et al. (1993): Purification, characterization and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 3494-3504.
- Zhao, Y., Neltner, B.S. & Davis, H.W. (2000): Role of MARCKS in regulating endothelial cell proliferation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **279**, 1611-1620.
- Zuker, M., Mathews, D.H. & Turner, D.H. (1999): Algorithms and thermodynamics for RNA secondary structure prediction: A practical guide. In: RNA Biochemistry and Biotechnology, (Barciszewski, J. & Clark, B.F.C., eds.), NATO ASI Series, *Kluwer Academic Publishers*, 11-43.

Lebenslauf

Name: Wein
Vorname: Georg
Geburtsdatum: 15.12.1968
Geburtsort: Konstanz
Staatsangehörigkeit: deutsch
Anschrift: Virchowstraße 11
97072 Würzburg

1975 – 1979: Grundschule im Wallgut, Konstanz
1979 – 1988: Heinrich Suso Gymnasium, Konstanz
1990 – 1996: Studium der Biologie an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität, Würzburg
Diplomarbeit bei Prof. Dr. R. Benz
„Schwermetallelimination mit Hilfe sulfatreduzierender Bakterien; Untersuchungen an einer Massenkultur zur Stoffwechselphysiologie, Schwermetallrückhaltung und Biosorption“

seit 1998: Anfertigung der vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. A. Maelicke unter Betreuung von PD Dr. T. Herget

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt habe und nur die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Mainz, den