

Analyse der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression während der erythroiden Reifung

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

**zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)**

vorgelegt der

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



von

Isabel Sophie Naarmann

**Diplom-Biochemikerin
geboren am 30. August 1982 in Solingen**

Gutachter

- 1. PD Dr. Antje-Ostareck-Lederer**
- 2. Prof. Dr. Elmar Wahle**
- 3. Prof. Dr. Thomas Preiss**

Halle (Saale), 27. Juni 2011

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Die Reifung roter Blutzellen	1
1.1.1 Die Erythropoese	1
1.1.2 Modellsysteme zur erythroiden Reifung	2
1.2 mRNA-Translation	4
1.2.1 Die Initiation der Translation in Eukaryoten	4
1.2.2 Möglichkeiten der Regulation der Translation	6
1.2.3 Die Regulation der r15-LOX mRNA-Translation	8
1.3 Abbau von Proteinen	12
1.3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System	12
1.3.2 Caspasen	16
1.3.3 Weitere zelluläre Proteasen	17
1.4 Zielstellung	18
2. Material und Methoden	20
2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen	20
2.1.1 K562-Zellen	20
2.1.2 CD34 ⁺ -Zellen	20
2.1.3 Induktion der erythroiden Reifung	20
2.1.4 Inhibition der proteasomalen Aktivität	21
2.1.5 Inhibition der Translation in K562-Zellen	21
2.1.6 Induktion von oxidativem Stress	22
2.1.7 Bestimmung der Zellzahl	22
2.1.8 Benzidin-Färbung	22
2.1.9 Präparation von Triton-Lysat	23
2.1.10 Präparation von cytoplasmatischem Extrakt	23
2.2 Plasmide und deren Klonierung	24
2.2.1 Methoden und Reagenzien	24
2.2.2 Plasmide für die <i>in vitro</i> -Transkription	24
2.2.3 Plasmide für K562-Zell-Transfektionen	24
2.3 Konzentrationsbestimmungen	25
2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	25
2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen	26
2.4 Gelelektrophorese	26
2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese	26
2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	26
2.4.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen	27
2.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen	28
2.5 Western Blot	28
2.6 Isolierung von RNA und RT-PCR	29
2.6.1 Isolierung von RNA mit der Trizol-Methode	29
2.6.2 RT-PCR	29
2.7 <i>in vitro</i> -Transkription	30
2.8 Dichtegradienten-Zentrifugation	31
2.9 Transfektionen	31
2.9.1 Transfektion von siRNAs	31
2.9.2 Transfektion von Plasmid-DNA	32
2.10 Fluoreszenz-Mikroskopie	33
2.10.1 Immunfluoreszenz-Färbung	33
2.10.2 Fluoreszenz- <i>in situ</i> -Hybridisierung	34

2.10.3 Weitere Fluoreszenz-Färbungen	35
2.10.4 Analyse der Fluoreszenz-Färbungen	36
2.11 Immunopräzipitation	37
2.11.1 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose	37
2.11.2 Immunopräzipitation von hnRNP K	37
2.11.3 <i>Micrococcus</i> -Nuklease-Behandlung	38
2.12 Reinigung des hnRNP K-Spaltprodukts	38
2.13 hnRNP K-Spaltungs-Assay	40
2.14 Massenspektrometrische Analyse	40
2.15 Microarray-Analyse	40
3. Ergebnisse	41
3.1 Etablierung und Charakterisierung des K562-Zellsystems	41
3.1.1 Charakterisierung der erythroiden Reifung von K562-Zellen	41
3.1.2 Expression der r15-LOX während der erythroiden Reifung von K562-Zellen	44
3.1.3 Analyse der Expression bekannter Regulatoren der r15-LOX-Translation	46
3.1.4 Untersuchung der Expression der hr15-LOX und ihrer Translations-Regulatoren während der erythroiden Reifung von CD34 ⁺ -Zellen	48
3.2 Identifizierung neuer durch hnRNP K regulierter mRNAs	51
3.2.1 Regulation der Translation der c-Src-mRNA	51
3.2.2 Identifizierung weiterer durch hnRNP K regulierter mRNAs	53
3.3 Analyse der r15-LOX-Translationsregulation	55
3.3.1 DDX6 ist ein neuer Regulator der hr15-LOX-mRNA-Translation	55
3.3.2 DDX6 rekrutiert die hr15-LOX-mRNA in cytoplasmatische granuläre Strukturen	60
3.4 Analyse des Abbaus von hnRNP K	68
3.4.1 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems	68
3.4.2 Der Abbau von hnRNP K erfolgt über ein Intermediat	71
3.4.3 Identifizierung des hnRNP K-Spaltprodukts	72
4. Zusammenfassung und Diskussion	76
4.1 Zur Etablierung und Charakterisierung des K562-Zellsystems	76
4.2 Zur Identifizierung neuer durch hnRNP K regulierter mRNAs	79
4.3 Zur Analyse der r15-LOX-Translationsregulation	82
4.4 Zur Analyse des Abbaus von hnRNP K	87
4.5 Ausblick	90
5. Literaturverzeichnis	92
6. Abkürzungsverzeichnis	115
7. Anhang	118
7.1 Primer	118
7.1.1 Primer für Klonierungen	118
7.1.2 Sequenzier-Primer	118
7.1.3 RT-PCR-Primer	118
7.2 Antikörper	119
7.2.1 Primär-Antikörper	119
7.2.2 Sekundär-Antikörper für Western Blot-Analysen	120
7.2.3 Sekundär-Antikörper für Immunfluoreszenzen	120
7.3 siRNAs	120
7.4 FISH-Sonden	121
7.5 Abbildungen zur Reinigung des hnRNP K-Spaltprodukts	122
7.6 Analyse der IF-FISH-Färbung an den Tagen 0 und 8 der erythroiden Reifung	124

1. Einleitung

1.1 Die Reifung roter Blutzellen

1.1.1 Die Erythropoese

Während der Erythropoese werden rote Blutzellen (Erythrozyten) gebildet. Erythrozyten sind hochspezialisierte Zellen, die Sauerstoff im Blut transportieren. Mit dieser Spezialisierung sind grundlegende morphologische Veränderungen verbunden: in Säugern werden während der Erythropoese der Zellkern ausgeschleust und die Mitochondrien abgebaut. Außerdem erfolgt eine Umstrukturierung der Zellmembran und des Cytoskeletts, die in einer bikonkaven Form der reifen Erythrozyten resultiert. Hierdurch wird der Sauerstofftransport optimiert (Castoldi und Beutler, 1988).

Die Erythropoese beginnt im roten Knochenmark. Pluripotente hämatopoetische Stammzellen (HSC) werden durch verschiedene Wachstumsfaktoren und Interleukine (Erythropoetin, Stammzellfaktor (SCF), Interleukin-3, IGF-I, GM-CSF) zur Differenzierung in erythroide Zellen angeregt. Außerdem sind diese Wachstumsfaktoren essentiell für das Überleben der erythroiden Vorläuferzellen (Dai *et al.*, 1991). Als wichtigster Wachstumsfaktor für die Differenzierung erythroider Zellen konnte Erythropoetin identifiziert werden (Adamson, 1968; Krantz, 1991).

Die ersten Zellen, die auf die erythroide Reifung festgelegt sind, bezeichnet man als *burst forming units-erythroid* (BFU-E). Für ihre Entstehung ist SCF wichtig (Migliaccio *et al.*, 1993). Die weitere Differenzierung der BFU-E zu den *colony forming units-erythroid* (CFU-E) (Migliaccio & Migliaccio, 1998; Koury *et al.*, 2002) ist neben SCF (Dai *et al.*, 1991) von IGF-I (Dai *et al.*, 1991), Erythropoetin (Sieff *et al.*, 1986; Kannourakis und Johnson, 1988; Sawada *et al.*, 1990), Interleukin-3 (Goodman *et al.*, 1985) und GM-CSF (Kannourakis und Johnson, 1988) abhängig. Erythropoetin und IGF-I sind außerdem notwendig für die weitere Differenzierung der CFU-E zu roten Blutzellen (Sawada *et al.*, 1989). Ab dem Stadium des Proerythroblasten ist die Hämoglobin-Synthese detektierbar. Proerythroblasten reifen über basophile Normoblasten weiter zu den polychromatischen Normoblasten. Während dieser Differenzierung steigt der Hämoglobin-Gehalt der Zellen stark an. Die Zellen werden kleiner und das Chromatin kondensiert, das Verhältnis von Kern zu Cytoplasma nimmt ab. Auf der Stufe des polychromatischen Normoblasten ist der Kern oft an der Peripherie der Zelle lokalisiert und die Zellteilung kommt zum Erliegen. Im Weiteren durchlaufen die Progenitorzellen einen hochspezifischen Reifungsprozess (Castoldi und Beutler, 1988; Geminard *et al.*, 2002). Beim Übergang vom polychromatischen zum orthochromatischen Normoblasten wird der Zellkern ausgeschleust (Simpson und Kling, 1967). Neben dem Kernausschluss kommt es meist

auch zur Ausstoßung beziehungsweise zum Abbau von endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat (Géminard *et al.*, 2002). Die kernlosen Zellen werden als junge Retikulozyten aus dem Knochenmark in die Blutbahn entlassen, wo sie weiter zu Erythrozyten reifen. Während dieser Reifung findet weiterhin Hämoglobin-Synthese statt, das Cytoskelett und die Plasmamembran werden umstrukturiert und die verbliebenen Organellen wie Golgi-Apparat und Endoplasmatisches Retikulum werden abgebaut (Castoldi und Beutler, 1988).

Der Abbau der Mitochondrien wird durch das Enzym Retikulozyten-15-Lipoxygenase (r15-LOX) eingeleitet. r15-LOX katalysiert die Dioxygenierung von Phospholipiden in der Mitochondrienmembran (Rapoport und Schewe, 1986; van Leyen *et al.*, 1998; Grüllich *et al.*, 2001). Durch die Bildung von Hydroxylradikalen bei der Lipoxygenase-Reaktion kommt es außerdem zu einer Oxygenierung von Proteinen der Mitochondrienmembran (Kühn und Borngräber, 1998; Schewe, 2002).

1.1.2 Modellsysteme zur erythroiden Reifung

Die Erythropoese ist, basierend auf den morphologischen Veränderungen, sehr gut charakterisiert (siehe 1.2.1). Für die Analyse der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen werden jedoch Modellsysteme benötigt.

Aufgrund der differentiellen Expression bestimmter Oberflächenmarker wie CD34 oder Glycophorin A und der großen morphologischen Unterschiede können erythroide Zellen unterschiedlicher Differenzierungsstadien aus dem Knochenmark und Blut isoliert (Gregory und Eaves, 1978; McGrath *et al.*, 2008) und zum Beispiel für die Analyse von Expressionsmustern genutzt werden.

Es ist desweiteren möglich, erythroide Vorläuferzellen aus Knochenmark, Nabelschnurblut oder peripherem Blut zu isolieren. Als Oberflächenmarker für die Isolierung verwendet man CD34, welches von hämatopoetischen Vorläuferzellen exprimiert wird (Hogg und Horton, 1987; Holyoake und Alcorn, 1994). Je nach Quelle und Organismus, aus dem die CD34⁺-Zellen stammen, existieren unterschiedliche Protokolle zur Expansion und Differenzierung *in vitro*. In dieser Arbeit wurden für einen Teil der Experimente humane CD34⁺-Zellen verwendet, die aus Wachstumsfaktor-mobilisiertem peripheren Blut isoliert wurden. Die Kultivierung und Differenzierung erfolgte nach Leberbauer *et al.*, 2005.

Die Ausbeute bei der Arbeit mit isolierten erythroiden Zellen ist jedoch in der Regel sehr gering, so dass keine biochemischen und molekularbiologischen *in vitro*-Untersuchungen durchgeführt werden können. Hierfür sind etablierte Zelllinien besser geeignet.

Es existieren mehrere murine und humane immortalisierte erythroide Zelllinien, die teilweise auch für eine *in vitro*-Differenzierung genutzt werden können.

Eines der ersten beschriebenen Zellsysteme, welches Aspekte der Erythropoese rekapituliert, basiert auf murinen Erythroleukämiezellen (MEL-Zellen). Diese Zellen wurden aus der Milz von Mäusen isoliert, die zuvor mit dem Friend-Virus-Komplex infiziert wurden (Friend *et al.*, 1966; Marks und Rifkind, 1978). Die Differenzierung von MEL-Zellen kann durch verschiedene Chemikalien induziert werden. Erstmals konnte eine erythroide Reifung von MEL-Zellen nach der Behandlung mit Dimethylsulfoxid (DMSO) festgestellt werden. Nach der Induktion mit DMSO wurde eine verstärkte Hämoglobin-Synthese, jedoch keine Inhibition der Zellteilung beobachtet. Die differenzierten Zellen zeigten Charakteristika von Normoblasten (Friend *et al.*, 1971). Desweiteren wurden unter anderem Natrium-Butyrat (Malinin und Ebert, 1980) und Hexamethylenbisacetamid (Reuben *et al.*, 1976) als Induktoren beschrieben. Die Differenzierung von MEL-Zellen ist jedoch reversibel, es scheint keine Festlegung auf die erythroide Reifung zu erfolgen (Friend *et al.*, 1971; Gusella *et al.*, 1980).

Humane K562-Zellen sind die Basis für ein weiteres Modellsystem der erythroiden Reifung. K562-Zellen wurden aus einer Patientin mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) in der Blastenkrise isoliert (Lozzio und Lozzio, 1975). Sie tragen das Philadelphia-Chromosom, eine Translokation zwischen den Chromosomen 9 und 22 (Rowley, 1973). Durch die Translokation entsteht eine Fusion von Teilen der Gene BCR (Chromosom 22, Groffen *et al.*, 1984) und ABL (Chromosom 9, de Klein *et al.*, 1982). Hierdurch wird die konstitutiv aktive Tyrosinkinase Bcr-Abl exprimiert (Ben-Neriah *et al.*, 1986). Aktive Abl-Kinase ist ein positiver Regulator des Zellzyklus (Kipreos und Wang, 1990; Kipreos und Wang, 1992). K562-Zellen haben Charakteristika erythroider Zellen, so exprimieren sie zum Beispiel Glycophorin A, ein Glykoprotein, das ausschließlich auf der Oberfläche erythroider Zellen vorkommt (Andersson *et al.*, 1979b). Ihre erythroide Reifung kann mit verschiedenen Chemikalien wie Hämin (Rutherford *et al.*, 1979) oder Natrium-Butyrat (Andersson *et al.*, 1979a) induziert werden. Natrium-Butyrat ist ein Inhibitor von Histon-Decacetylasen (Candido *et al.*, 1978; Boffa *et al.*, 1978; Sealy und Chalkley, 1978) und induziert die Differenzierung verschiedener Zelllinien (Leder und Leder, 1975; Kruh, 1982). Obwohl das β -Globin-Gen intakt ist (Fordis *et al.*, 1984), exprimieren mit Natrium-Butyrat induzierte K562-Zellen embryonales und fetales Hämoglobin (Rutherford *et al.*, 1981; Cioe *et al.*, 1981). Es handelt sich hierbei hauptsächlich um Hämoglobin Gower 1, das aus zwei ϵ - und zwei ζ -Ketten besteht, sowie Hämoglobin Portland, welches aus zwei γ - und zwei ζ -Ketten aufgebaut ist. Für Hämin-induzierte K562-Zellen wurde eine inäquale Zellteilung beschrieben, bei der ein kernhaltiges und ein kernloses Zellfragment entstehen (Hunt und Marshall, 1981). Dies deutet darauf hin, dass K562-Zellen das Potential zur terminalen erythroiden Reifung haben.

Ein Vorteil bei der Verwendung immortalisierter Zelllinien besteht darin, dass große Mengen induzierter Zellen generiert werden können. Außerdem besteht häufig die Möglichkeit der Manipulation der Genexpression durch RNA-Interferenz (RNAi, siehe 2.9.1) und Überexpressions-Studien. Nachteilig ist jedoch, dass es sich um transformierte Zellen handelt, die eventuell nur für die Untersuchung von Teilaspekten der Erythropoese geeignet sind. Da in Mäusen kein r15-LOX-Gen existiert (Schewe, 2002), wurden in dieser Arbeit humane K562-Zellen zur Analyse der posttranskriptionellen Regulation der r15-LOX-Expression verwendet.

1.2 mRNA-Translation

Während der Embryonalentwicklung und Differenzierung von Zellen ist neben der Regulation der Transkription die posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression von Bedeutung (Kuersten und Goodwin, 2003; de Moor *et al.*, 2005; Thompson *et al.*, 2007). Die Kontrolle der Translation von mRNAs ist ein möglicher posttranskriptioneller Regulationsmechanismus.

Eine eukaryotische mRNA enthält einen offenen Leserahmen (*open reading frame* (ORF)), die Protein-kodierende Sequenz. Dieser wird von 5'- und 3'-untranslatierten Regionen (UTR) flankiert. Außerdem ist für die meisten zellulären mRNAs am 5'Ende ein 7-Methylguanosin-*Cap* und am 3'Ende ein poly(A)-Schwanz charakteristisch.

Die mRNA-Translation kann in die drei Phasen Initiation, Elongation und Termination unterteilt werden. In vielen Fällen ist die Translationsinitiation der regulierte Schritt.

1.2.1 Die Initiation der Translation in Eukaryoten

Während der Initiation der Translation werden elongationskompetente 80S-Ribosomen gebildet. Der 43S-Präinitiationskomplex bindet bei den meisten zellulären mRNAs am 5'Ende der mRNA und bewegt sich entlang der 5'UTR bis zum Startcodon. Durch die Ausbildung der Codon-Anticodon-Basenpaarung zwischen dem Startcodon und der Initiator-tRNA wird der 48S-Initiations-Komplex gebildet. Das translationskompetente 80S-Ribosom entsteht dann durch die Bindung der 60S-Untereinheit (siehe Abb. 1.1).

Im ersten Schritt der Translationsinitiation wird der 43S-Präinitiationskomplex gebildet, welcher aus der 40S-Untereinheit des Ribosoms, den eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) 1, 1A, 3 und 5 sowie dem ternären Komplex aus eIF2, GTP und der Initiator-Methionyl-tRNA ($tRNA_i^{Met}$) besteht. Über die Interaktion mit dem eIF4F-Komplex wird der 43S-Präinitiationskomplex an die mRNA rekrutiert (Gebauer und Hentze, 2004; Jackson *et al.*, 2010). Der eIF4F-Komplex besteht aus den drei Proteinen

eIF4A, eIF4E und eIF4G (Grifo *et al.*, 1983). eIF4A ist eine DEAD-Box-RNA-Helikase (Lawson *et al.*, 1989; Rozen *et al.*, 1990), die vermutlich Sekundärstrukturen in der 5'UTR entwindet. eIF4E bindet die 5'Cap-Struktur (Sonenberg *et al.*, 1978). eIF4G fungiert als Plattform für Protein-Protein-Interaktionen, da es mit eIF4E (Mader *et al.*, 1995), eIF4A (Lamphear *et al.*, 1995; Imataka und Sonenberg, 1997), eIF3 (Lamphear *et al.*, 1995) und auch dem poly(A)-bindenden Protein (PABP) (Tarun und Sachs, 1996) interagiert. Der stimulierende Effekt des poly(A)-Schwanzes wird unter anderem als Resultat der Zirkularisierung diskutiert (Tarun *et al.*, 1997; Wells *et al.*, 1998).

Das derzeitige Modell besagt, dass sich der 43S-Präinitiationskomplex dann ATP-abhängig entlang der 5'UTR in Richtung Startcodon bewegt (Kozak, 1978; Kozak, 2002). eIF1 und eIF1A sind wichtig für die Prozessivität dieser Bewegung, eIF1 ist außerdem essentiell für die Auswahl des richtigen Initiationskodons (Pestova *et al.*, 1998; Pestova und Kolupaeva, 2002).

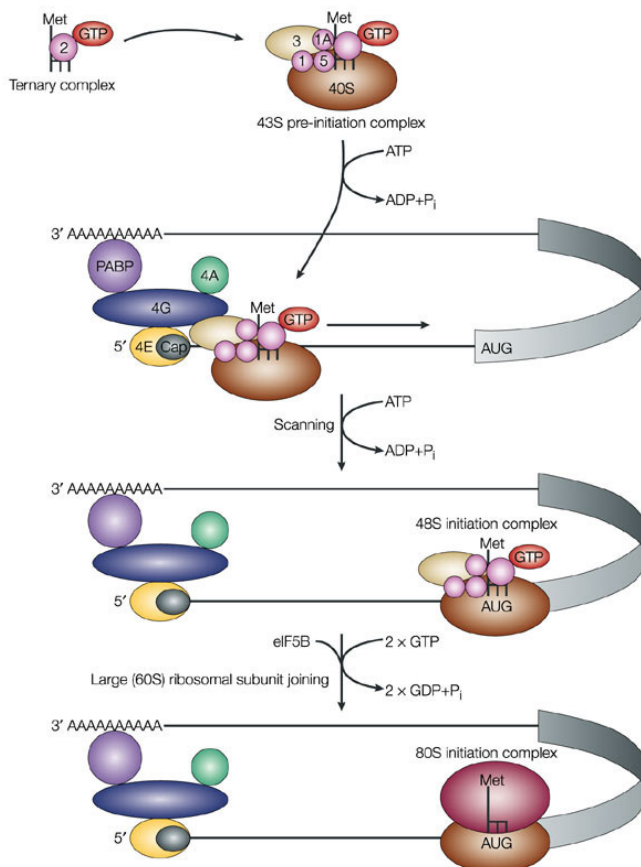


Abb. 1.1: Mechanismus der 5' Cap-abhängigen Translationsinitiation in Eukaryoten.

Der ternäre eIF2*GTP-tRNA^{Met}-Komplex bildet mit eIF 1, 1A, 3, 5 und der 40S-Untereinheit des Ribosoms den 43S-Präinitiationskomplex. Über die Interaktion mit eIF4E wird er an das 5'Ende der mRNA rekrutiert und bewegt sich bis zum Startcodon, wodurch der 48S-Initiationskomplex gebildet wird. Das eIF2-gebundene GTP wird hydrolysiert, die meisten eIFs dissoziieren, während die 60S-Untereinheit und eIF5B assoziieren. Durch Hydrolyse des eIF5B-gebundenen GTP entsteht das stabile 80S-Ribosom (aus Gebauer und Hentze, 2004).

Nach der Erkennung des Initiationskodons hydrolysiert eIF2 das gebundene GTP (Merrick, 1979; Parmeggiani und Sander, 1981). eIF5 wirkt dabei als GTPase-aktivierendes Protein (GAP) (Chakrabarti und Maitra, 1991; Huang *et al.*, 1997). Daraufhin dissoziieren die eIFs 1, 1A, 2, 3 und eventuell auch 5. Anschließend assoziieren eIF5B*GTP und die 60S-Untereinheit des Ribosoms. Diese katalysiert als GAP die Hydrolyse des GTP durch eIF5B. eIF5B*GDP dissoziiert aufgrund seiner geringeren Affinität zum Ribosom (Pestova *et al.*, 2000).

eIF2B fungiert als Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) für eIF2 und katalysiert das Recycling von eIF2*GDP zu eIF2*GTP (Amesz *et al.*, 1979; Konieczny und Safer, 1983). eIF3 vermittelt zusammen mit der assoziierten Untereinheit eIF3j, eIF1 und eIF1A die Dissoziation der 80S-Ribosomen vor einer erneuten Initiation der Translation und verhindert eine Re-Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten (Pisarev *et al.*, 2007). Auch eIF6 bindet an die 60S-Untereinheit des Ribosoms und verhindert eine Assoziation von 80S-Ribosomen (Russell und Spremulli, 1979; Ceci *et al.*, 2003).

1.2.2 Möglichkeiten der Regulation der Translation

Die Regulation der mRNA-Translation ermöglicht eine schnelle Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen. Außerdem spielt sie eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und bei zellulären Differenzierungsprozessen wie der Neurogenese oder der Erythropoese (Kuersten und Goodwin, 2003). Die Kontrolle der mRNA-Translation kann entweder global oder mRNA-spezifisch erfolgen.

Eine globale Translationskontrolle erfolgt zum Beispiel durch die Regulation der Aktivität oder Verfügbarkeit von Initiationsfaktoren.

Die Translationsinitiation kann durch die Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2 am Serin 51 (Colthurst *et al.*, 1987; Pathak *et al.*, 1988) inhibiert werden (Duncan und Hershey, 1987; Brostrom *et al.*, 1996). Phosphoryliertes eIF2 α wirkt als kompetitiver Inhibitor für den GEF eIF2B und inhibiert den GDP/GTP-Austausch (Sudhakar *et al.*, 2000). Hierdurch wird die Konzentration des ternären eIF2*GTP-tRNA^{Met}-Komplexes reduziert und die Translationsinitiation blockiert (Krishnamoorthy *et al.*, 2001). Die translational reprimierten mRNAs akkumulieren in sogenannten *stress granules* (Kedersha *et al.*, 1999). In Säugerzellen sind vier Kinasen bekannt, die eIF2 α am Serin 51 phosphorylieren: die Doppelstrang-RNA-aktivierte Proteinkinase PKR (Farrell *et al.*, 1977), GCN2 (Berlanga *et al.*, 1999; Sood *et al.*, 2000), die ER-lokalisierte Kinase PERK/PEK (Shi *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 1999) und der Häm-regulierte Inhibitor HRI (Levin *et al.*, 1976; Kramer *et al.*, 1976).

eIF4E-bindende Proteine (4E-BPs) stellen eine weitere Möglichkeit der globalen Translationskontrolle dar. 4E-BPs konkurrieren mit eIF4G um die identische Bindestelle in eIF4E und inhibieren so die 5'Cap-abhängige Translationsinitiation (Haghighat *et al.*, 1995; Mader *et al.*, 1995; Marcotrigiano *et al.*, 1999). Die Interaktion zwischen eIF4E und den 4E-BPs wird durch Phosphorylierung reguliert. Hypophosphorylierte 4E-BPs binden eIF4E effizient, während eine Hyperphosphorylierung die Interaktion aufhebt (Lin *et al.*, 1994; Pause *et al.*, 1994; Fadden *et al.*, 1997). Verschiedene extrazelluläre Signale wie Serum-Entzug, Aminosäuremangel, Picorna-Virusinfektion und Hitze- oder osmotischer Schock führen zu einer Abnahme der 4E-BP1-Phosphorylierung und damit einer Inhibierung der 5'Cap-abhängigen Translation. Wachstumsfaktoren, Cytokine, Hormone und Adenovirus-Infektion haben dagegen eine Steigerung der 5'Cap-abhängigen Translation durch Hyperphosphorylierung von 4E-BP1 zur Folge (Raught *et al.*, 2000).

Die Regulation der Translation kann auch mRNA-spezifisch erfolgen, in der Regel über Sequenzelemente, die in der 5'UTR oder 3'UTR der mRNA lokalisiert sind. Spezifisch bindende Proteine beeinflussen dann häufig die Effizienz der Translationsinitiation.

Während der Oozyten-Reifung und frühen Embryonalentwicklung wird die Translation vieler maternalen mRNAs über die Länge des poly(A)-Schwanzes kontrolliert. Viele der maternalen mRNAs wie die Mos- oder Cyclin B1-mRNA tragen in unreifen Oozyten einen sehr kurzen poly(A)-Schwanz. In ihrer 3'UTR ist ein cytoplasmatisches Polyadenylierungselement (CPE) lokalisiert, welches während der Entwicklung eine cytoplasmatische Polyadenylierung bewirkt. Hierdurch wird die Translation aktiviert (Mendez und Richter, 2001). Das CPE interagiert mit dem CPE-Bindeprotein (CPEB) (Hake und Richter, 1994). CPEB reguliert sowohl die Repression der Translation vor der Oozyten-Reifung als auch die cytoplasmatische Polyadenylierung und Translationsaktivierung im reifen Oozyten (Stebbins-Boaz *et al.*, 1996; de Moor und Richter, 1999). Im Stadium der Translationsrepression bindet CPEB das Protein Maskin, welches als mRNA-spezifisches 4E-BP fungiert, also mit eIF4G um die eIF4E-Bindung konkurriert (Stebbins-Boaz *et al.*, 1999).

In *Drosophila*-Männchen ist die Bildung des *dosage compensation complex* (DCC) essentiell für die Geschlechts-Festlegung. Eine wichtige Komponente des DCC ist das Protein *male specific lethal-2* (MSL-2) (Baker *et al.*, 1994). In *Drosophila*-Weibchen wird die Translation der *msl-2*-mRNA durch die Proteine *sex-lethal* (SXL) und *upstream of N-ras* (UNR) reprimiert (Gebauer *et al.*, 1998; Abaza *et al.*, 2006; Duncan *et al.*, 2006). Für eine effiziente Repression sind Sequenz-Elemente in der 5'UTR und der 3'UTR der *msl-2*-mRNA erforderlich (Gebauer *et al.*, 1999). SXL rekrutiert UNR an die 3'UTR. Dieser 3'UTR-Komplex inhibiert die stabile Assoziation der 40S-Untereinheit (Gebauer *et al.*,

2003; Beckmann *et al.*, 2005; Abaza *et al.*, 2006; Duncan *et al.*, 2006). Kommt es dennoch zur Bildung von 43S-Präinitiationskomplexen, verhindert SXL, gebunden an die 5'UTR-Elemente, ihre Bewegung zum Startcodon (Beckmann *et al.*, 2005). Die Inhibition der Translation ist unabhängig von der 5'Cap-Struktur und vom poly(A)-Schwanz (Gebauer *et al.*, 1999; Gebauer *et al.*, 2003).

Ein weiteres Beispiel für die Inhibierung der 40S-Bindung ist die Translation der Ferritin-mRNAs, die über den Eisenspiegel kontrolliert wird (Zähringer *et al.*, 1976). In der 5'UTR der Ferritin-mRNAs ist ein *iron response element* (IRE) lokalisiert (Aziz und Munro, 1987; Hentze *et al.*, 1987). Bei niedrigem Eisenspiegel binden die beiden regulatorischen Proteine IRP1 und IRP2 (*iron response protein*) (Walden *et al.*, 1989; Gray *et al.*, 1993) an das IRE und verhindern so durch sterische Blockade eine Assoziation des 43S-Präinitiationskomplexes (Gray und Hentze, 1994; Muckenthaler *et al.*, 1998).

Neben der Regulation der Assoziation der ribosomalen 40S-Untereinheit kann auch die Assoziation der 60S-Untereinheit reguliert werden. Erstmals konnte die Regulation der Translationsinitiation über eine Inhibierung der Bindung der 60S-Untereinheit für die r15-LOX-mRNA während der Reifung von roten Blutzellen gezeigt werden (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck *et al.*, 2001). Auf diesen Mechanismus der Translationsregulation wird unter 1.2.3 näher eingegangen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das *zipcode*-bindende Protein ZBP1 an die 3'UTR der β -Aktin-mRNA bindet und während der Lokalisierung der mRNA zum Wachstumskonus von Nervenzellen die Translationsinitiation durch die Blockierung der Assoziation der 60S-Untereinheit des Ribosoms inhibiert (Hüttelmaier *et al.*, 2005).

1.2.3 Die Regulation der r15-LOX mRNA-Translation

Einer der letzten Schritte der Erythropoese, der Abbau der Mitochondrien, wird durch die r15-LOX eingeleitet. r15-LOX katalysiert die Dioxygenierung von Phospholipiden in der Mitochondrienmembran (Rapoport und Schewe, 1986; van Leyen *et al.*, 1998; Grüllich *et al.*, 2001). Da eine vorzeitige Synthese der r15-LOX den Energiestoffwechsel stören würde, wird die Translation der r15-LOX-mRNA kontrolliert. Für Kaninchen wurde zuerst gezeigt, dass die r15-LOX-mRNA bereits in Erythroblasten nachweisbar ist, aber erst in reifen Retikulozyten translatiert wird (Thiele *et al.*, 1982; Höhne *et al.*, 1988).

Die Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation erfolgt über das *differentiation control element* (DICE), welches in der 3'UTR der mRNA lokalisiert ist (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). Im Kaninchen besteht das DICE aus 10 Wiederholungen eines 19 nt-langen CU-reichen Sequenzmotivs (Fleming *et al.*, 1989). Die humane r15-LOX-mRNA-3'UTR enthält vier Kopien dieses Sequenzmotivs (Sigal *et al.*, 1988, siehe Abb. 1.2). Es konnte gezeigt

werden, dass die Proteine *heterogeneous nuclear ribonucleoprotein* (hnRNP) K und hnRNP E1, die zunächst als LOX-BP-Fraktion isoliert wurden (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994), die Translation der r15-LOX-mRNA durch Bindung an das DICE inhibieren (Ostareck *et al.*, 1997).

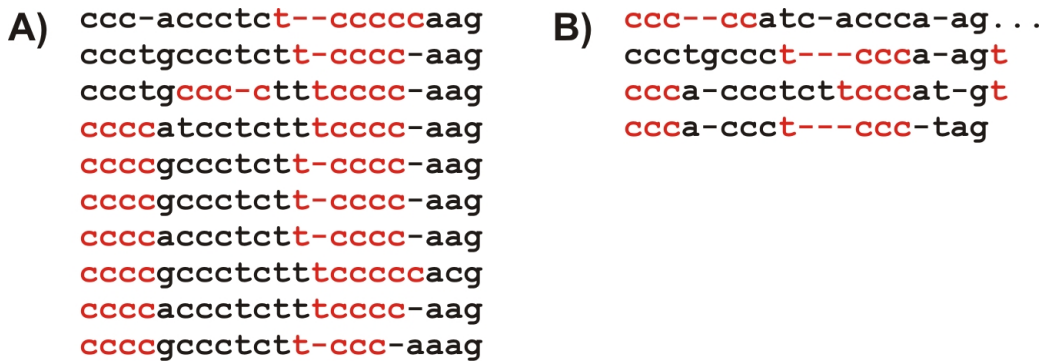


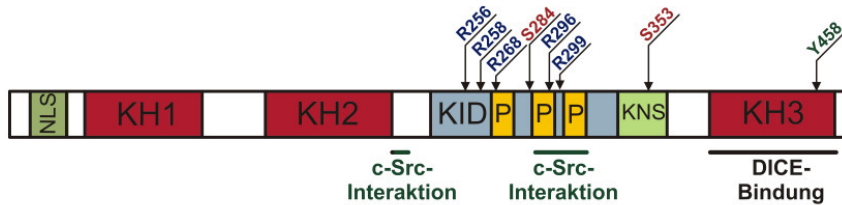
Abb. 1.2: Sequenz der DICE-Elemente in der r15-LOX-mRNA aus Kaninchen und Mensch.

Das DICE (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) besteht in der Kaninchen-r15-LOX- (rr15-LOX)-mRNA aus 10 19nt-langen CU-reichen repetitiven Elementen (A, Fleming *et al.*, 1989). Die 3'UTR der humanen r15-LOX- (hr15-LOX)-mRNA enthält vier dieser Sequenzelemente (B, Sigal *et al.*, 1988). Potentielle Interaktionsstellen für hnRNP K und hnRNP E1 sind rot markiert (Backe *et al.*, 2005).

Die RNA-Bindung der beiden Proteine erfolgt über die hnRNP K-Homologie (KH)-Domänen (Abb. 1.3). Die KH-Domäne wurde in hnRNP K als konservierte Region von 45-55 Aminosäuren definiert (Siomi *et al.*, 1993; Gibson *et al.*, 1993). Aufgrund von Strukturanalysen und Bindungsstudien wurde die Länge später auf 65-70 Aminosäuren korrigiert (Dejgaard und Leffers, 1996; Musco *et al.*, 1996). An das DICE binden die KH-Domänen 1 und 3 in hnRNP E1 sowie die KH-Domäne 3 von hnRNP K (Messias *et al.*, 2006, Abb. 1.3).

hnRNP K und hnRNP E1 können die Translation der r15-LOX-mRNA einzeln oder zusammen inhibieren, als optimal wurde ein hnRNP K-hnRNP E1-Verhältnis von 3:1 ermittelt (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck *et al.*, 2001). Für eine effiziente Inhibition der Translation sind zwei Kopien des Sequenzelements (2R) erforderlich (Ostareck *et al.*, 1997). Es konnte außerdem gezeigt werden, dass ein hnRNP E1-Molekül in der Lage ist, an ein einzelnes DICE-Element zu binden (Reimann *et al.*, 2002). Dies deutet darauf hin, dass für die Inhibition der Translation mindestens zwei hnRNP K/E1-Moleküle pro mRNA benötigt werden. Die Inhibition der Translation erfolgt unabhängig vom 5'Cap und vom poly(A)-Schwanz (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994; Ostareck *et al.*, 1997).

hnRNP K



hnRNP E1



Abb. 1.3: Schematische Darstellung der Struktur von hnRNP K und hnRNP E1.

hnRNP K und hnRNP E1 enthalten drei KH-Domänen, zwei sind am N-Terminus lokalisiert, die dritte am C-Terminus. KH1 in hnRNP K sowie KH1 und KH3 in hnRNP E1 binden das DICE (Messias *et al.*, 2006). hnRNP K enthält außerdem ein nukleäres Lokalisierungssignal (NLS) (Michael *et al.*, 1995) und das hnRNP K-spezifische nukleäre *shuttling* Signal (KNS) (Michael *et al.*, 1997). Zwischen der zweiten und dritten KH-Domäne liegt die *kinase interaction domain* (KID), die Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. In diesem Bereich sind die prolinreichen Motive lokalisiert, über die hnRNP K mit SH3-Domänen interagieren kann (Weng *et al.*, 1994; van Seuning *et al.*, 1995; Adolph *et al.*, 2007). Eine zweite Interaktionsstelle konnte auf die Aminosäuren 216-226 eingegrenzt werden (Adolph *et al.*, 2007). hnRNP K wird durch PRMT1 an den Argininen 256, 258, 268, 296 und 299 quantitativ asymmetrisch dimethyliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung der Serine 284 und 353 durch die Serin-/Threonin-Kinase Erk resultiert in der cytoplasmatischen Akkumulation von hnRNP K (Habelhah *et al.*, 2001). Die Phosphorylierung des Tyrosin 458 durch c-Src hebt die DICE-Bindung auf (Messias *et al.*, 2006).

Der Mechanismus der Translations-Regulation konnte in zellfreien Systemen (Kaninchen-Retikulozyten-Lysat, Weizenkeim-Lysat) und in transfizierten HeLa-Zellen weitgehend aufgeklärt werden. hnRNP K und hnRNP E1 inhibieren die Translations-Initiation durch Blockierung der 80S-Ribosomen-Assemblierung auf einer 2R-tragenden mRNA (Ostareck *et al.*, 1997). Die Bildung von 48S-Initiationskomplexen ist dagegen nahezu unbeeinflusst, hnRNP K und hnRNP E1 verhindern also eine Assoziation der 60S-Untereinheit. Durch die Verwendung von mRNAs, die eine 5'Cap-unabhängige Translationsinitiation über *internal ribosome entry sites* (IRES) vermitteln, konnten eIF4F (bestehend aus eIF4A, eIF4E und eIF4G) sowie eIF4B als mögliche Angriffspunkte ausgeschlossen werden (Ostareck *et al.*, 2001). In die Regulation einbezogene Proteine könnten demnach eIF2, eIF5 oder eIF5B sein. Auch weitere noch nicht identifizierte Faktoren könnten an der Inhibition der Translationsinitiation beteiligt sein.

Im reifen Retikulozyten wird die Inhibition der Translation aufgehoben. hnRNP K enthält prolinreiche Motive, die *in vitro* mit der isolierten Src-Homologie-Domäne 3 (SH3) der Tyrosinkinase c-Src interagieren (Weng *et al.*, 1994; van Seuning *et al.*, 1995; Adolph *et al.*, 2007, Abb. 1.3). hnRNP K ist in der Lage, c-Src zu aktivieren und wird seinerseits von der Kinase an mehreren Tyrosinen phosphoryliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Werden die prolinreichen Motive in hnRNP K deletiert, ist das Protein nicht mehr in der Lage, c-Src zu aktivieren und wird nicht durch die Kinase phosphoryliert. Eine

Phosphorylierung durch aktives c-Src ist jedoch möglich (Adolph *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung des Tyrosins 458 in der KH-Domäne 3 inhibiert die Bindung von hnRNP K an das DICE (Messias *et al.*, 2006). Es wurden bislang keine posttranslationalen Modifikationen beschrieben, welche die DICE-Bindung von hnRNP E1 beeinflussen (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). TGF β vermittelt die Phosphorylierung von hnRNP E1 durch Akt2 am Serin 43. Diese Phosphorylierung hat jedoch keinen Einfluss auf die DICE-Bindung (Chaudhury *et al.*, 2010). Daher wird angenommen, dass hnRNP E1 im Komplex mit hnRNP K vom DICE dissoziiert.

Die Interaktion zwischen c-Src und hnRNP K wird während der erythroiden Reifung auf mehreren Ebenen kontrolliert. Die Expression von c-Src ist auf späte Reifungsstadien beschränkt. In Knochenmarkszellen aus Kaninchen kann c-Src im Western Blot nicht nachgewiesen werden, erst in Retikulozyten-Lysat ist die Tyrosin-Kinase detektierbar (Ostareck-Lederer, unpubliziert). Außerdem wird hnRNP K an fünf Argininen quantitativ asymmetrisch dimethyliert. Die Protein-Arginin-Methyltransferase 1 (PRMT1) ist die einzige Arginin-Methyltransferase, die diese Methylierung katalysiert. Die quantitativ methylierten Arginine (256, 258, 268, 296, 299) liegen im Bereich der prolinreichen Motive, über die hnRNP K mit c-Src interagiert (siehe Abb. 1.3). Die Methylierung führt zu einer reduzierten Interaktion von hnRNP K und c-Src, wodurch die Aktivierung von c-Src inhibiert wird (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die reduzierte, jedoch noch vorhandene Interaktion kann dadurch erklärt werden, dass auch nicht aktiviertes c-Src mit hnRNP K interagiert. Der Interaktionsbereich konnte für hnRNP K auf die Aminosäuren 216-226 eingegrenzt werden, ist also verschieden von den prolinreichen Motiven (Adolph *et al.*, 2007).

Im reifen Retikulozyten wird die Blockade der hnRNP K-c-Src-Interaktion aufgehoben. Hier sind verschiedene Szenarien denkbar. Zum einen könnte die Methylierung reversibel sein. Bislang konnte jedoch keine Demethylase für hnRNP K identifiziert werden. Zum anderen wäre es möglich, dass das in der Zelle vorhandene methylierte hnRNP K durch neu synthetisiertes unmethyliertes hnRNP K ersetzt wird. Außerdem ist denkbar, dass eine Interaktion erst möglich ist, wenn c-Src ein bestimmtes Expressionsniveau erreicht hat (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006).

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass hnRNP K die Tyrosin-Kinase c-Src im reifen Retikulozyten aktivieren kann und von dieser dann an mehreren Tyrosinen, darunter dem Tyrosin 458 in der KH-Domäne 3, phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung verhindert die Bindung von hnRNP K an das DICE und erlaubt so eine Translation der r15-LOX-mRNA. Ein weiterer Mechanismus bei der Aktivierung der Translation könnte auf einer

verringerten Expression von hnRNP K und hnRNP E1 beruhen. In Western Blot-Analysen konnten hnRNP K und hnRNP E1 in Knochenmarkszellen und deutlich reduziert in Retikulozyten aus Kaninchen nachgewiesen werden, nicht aber in Erythrozyten (Ostareck-Lederer, unpubliziert). Dies deutet darauf hin, dass hnRNP K und hnRNP E1 während der Erythropoese abgebaut werden. Bislang ist aber nicht bekannt, wie dieser Abbau erfolgt.

1.3 Abbau von Proteinen

Der Abbau von Proteinen ist neben der Kontrolle der mRNA-Translation und -Stabilität ein weiterer wichtiger Mechanismus, der dem Organismus die schnelle Anpassung an veränderte Umweltbedingungen erlaubt. Extrazelluläre Proteine werden in der Regel durch Pinozytose oder Rezeptor-vermittelte Endozytose aufgenommen und in den Lysosomen durch unspezifische saure Proteasen abgebaut. Der Abbau intrazellulärer Proteine kann auf mehreren Wegen erfolgen. Am besten charakterisiert ist der Abbau durch das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS), es sind aber auch weitere intrazelluläre Proteasen wie Caspasen und Calpaine bekannt. Im Folgenden werden die wichtigsten Mechanismen des intrazellulären Proteinabbaus beschrieben.

1.3.1 Das Ubiquitin-Proteasom-System

Der Abbau intrazellulärer Proteine muss spezifisch erfolgen. Außerdem muss dieser Abbau streng reguliert werden, da Protease und Substrat im gleichen zellulären Kompartiment lokalisiert sind. Das UPS bietet die Möglichkeit eines spezifischen intrazellulären Protein-Abbaus. Den klassischen Abbau durch das UPS kann man in zwei Teilschritte trennen: die Polyubiquitinierung des Substratproteins sowie die Proteolyse durch das 26S-Proteasom (siehe Abb. 1.4).

Ubiquitin ist ein kleines Protein, das aus 76 Aminosäuren besteht (Ciechanover *et al.*, 1978; Wilkinson *et al.*, 1980). Die Ausbildung einer kovalenten Verknüpfung zwischen Ubiquitin und Substratprotein, die sogenannte Ubiquitinierung, ist der erste Schritt des Abbaus durch das UPS (Ciechanover *et al.*, 1980; Hershko *et al.*, 1980). Die Ubiquitinierung von Proteinen wird durch eine Kaskade von drei Enzymen katalysiert. Im ersten Schritt aktiviert das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 (Uba1) Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion (Ciechanover *et al.*, 1981). Es wird eine Thiolesterbindung zwischen Uba1 und dem C-terminalen Glycin von Ubiquitin gebildet (Hershko *et al.*, 1981; Haas *et al.*, 1982). Eines von mehreren Ubiquitin-konjugierenden Enzymen (E2s) überträgt den Ubiquitin-Rest dann entweder auf das Substratprotein, welches an eine Ubiquitin-Ligase

(E3) gebunden ist, oder zunächst auf die Ubiquitin-Ligase, die dann den Transfer auf das Substratprotein katalysiert (Hershko *et al.*, 1983; Pickart und Rose, 1985). Ubiquitin wird in der Regel auf die ϵ -Aminogruppe eines internen Lysins übertragen, es entsteht also eine Isopeptidbindung (Goldknof und Busch, 1977). In manchen Fällen wird auch eine Bindung zum freien N-Terminus ausgebildet, so wie im Falle des Transkriptionsfaktors MyoD (Breitschopf *et al.*, 1998). Die meisten Proteine, die für den Abbau markiert werden sollen, werden polyubiquitiniert (Hershko und Heller, 1985), die Verknüpfung erfolgt dabei über das Lysin 48 von Ubiquitin (Chau *et al.*, 1989). Für eine effiziente Polyubiquitinierung ist ein weiterer Faktor, E4, notwendig (Koegl *et al.*, 1999).

Bislang wurde eine große Anzahl an Ubiquitin-Ligasen beschrieben, die in mehrere Klassen unterteilt werden können. RING (*really interesting new gene*)-Finger-Ubiquitin-Ligasen bilden einen Komplex mit dem Ubiquitin-konjugierenden Enzym und dem Substratprotein. Durch die Vermittlung der räumlichen Nähe erlauben sie einen effizienten Transfer des Ubiquitins vom Ubiquitin-konjugierenden Enzym auf das Substratprotein. RING-Finger-Ubiquitin-Ligasen sind durch ein konserviertes Muster von Cysteinen und Histidinen charakterisiert, welches zwei Zink-Kationen bindet (Freemont *et al.*, 1991; Lovering *et al.*, 1993; Lorick *et al.*, 1999). Sie fungieren wahrscheinlich als eine Art Gerüst, welches Ubiquitin-konjugierendes Enzym und Substrat räumlich orientiert (Zheng *et al.*, 2000). Bei HECT (*homologous to the E6-AP Carboxyl terminus*)-Domänen-Ubiquitin-Ligasen (Huang *et al.*, 1999) wird der Ubiquitin-Rest zunächst auf die Ubiquitin-Ligase und von dort auf das Substratprotein übertragen (Scheffner *et al.*, 1995). Das prototypische Mitglied der HECT-Domänen-Ubiquitin-Ligasen ist das E6-assoziierte Protein (E6-AP). Gemeinsam ist diesen Ubiquitin-Ligasen die 350 Aminosäuren-lange C-terminale Domäne (Huibregtse *et al.*, 1995), die auch das konservierte Cystein enthält, auf welches zunächst der Ubiquitin-Rest übertragen wird (Scheffner *et al.*, 1995). Die N-terminale Domäne ist variabel und vermutlich wichtig für die Erkennung des Substrates.

Die Ubiquitinierung von Proteinen muss reguliert werden, damit ein spezifischer Abbau erfolgen kann. Dies kann entweder über eine Modulierung der Aktivität der Ubiquitin-Ligase oder über eine Modifizierung des Substrats erfolgen.

Häufig ist die Phosphorylierung des Substrats Voraussetzung für die Ubiquitinierung. So wird der Transkriptionsfaktor NF- κ B durch die Bindung an I κ B α im Cytoplasma lokalisiert und inhibiert. NF- κ B wird durch den proteolytischen Abbau von I κ B α aktiviert. Voraussetzung für die Erkennung durch die Ubiquitin-Ligase SCF ist die Phosphorylierung von zwei Serinen in I κ B α (Yaron *et al.*, 1998). Andererseits inhibiert die Phosphorylierung des Serin 3 durch c-Mos den Abbau durch das UPS (Nishizawa *et al.*, 1992).

Die Ubiquitin-Ligase APC kann durch verschiedene Phosphorylierungen entweder aktiviert oder inhibiert werden: eine Cdc2-abhängige Phosphorylierung führt zur Aktivierung von APC (Lahav-Baratz *et al.*, 1995), während Proteinkinase A-Phosphorylierung das Enzym inhibiert (Kotani *et al.*, 1998).

Die Regulation der Proteinstabilität kann auch über bestimmte Sequenzelemente erfolgen. So sollen bestimmte Aminosäuren am N-Terminus destabilisierend wirken (N-Ende-Regel). Bislang konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass dieser Mechanismus auch physiologisch relevant ist (Varshavsky *et al.*, 2000). Mitotische Cycline haben eine *destruction box*, die wahrscheinlich die Bindestelle für eine Untereinheit der Ubiquitin-Ligase ist (Yamano *et al.*, 1996).

Auch die Bindung an verschiedene Interaktionspartner kann die Erkennung durch das UPS verhindern, so wurde zum Beispiel für p53 und MyoD gezeigt, dass DNA-Bindung eine Ubiquitinierung verhindert (Molinari und Milner, 1995; Abu Hatoum *et al.*, 1998).

Polyubiquitinierte Proteine werden meist durch das 26S-Proteasom abgebaut, einem ca. 2,5 MDa-großen Komplex. Das 26S-Proteasom kann in zwei Subkomplexe unterteilt werden: das 20S-Proteasom mit proteolytischer Aktivität und den 19S-regulatorischen Komplex. Das 20S-Proteasom hat eine fassförmige Struktur und besteht aus 28 Untereinheiten, die in vier Ringen aus je sieben Untereinheiten angeordnet sind: zwei äußere identische α -Ringe und zwei innere identische β -Ringe. Die sieben Untereinheiten eines Rings sind homolog, aber nicht identisch. Die beiden inneren β -Ringe enthalten die proteolytisch aktiven Untereinheiten (Loewe *et al.*, 1995; Groll *et al.*, 1997). Es handelt sich hierbei um Threonin-Proteasen, bei denen die Hydroxyl-Gruppe des N-terminalen Threonins als Nucleophil für den Angriff der Peptidbindung dient (Seemüller *et al.*, 1995). Meist spaltet das Proteasom die Substrate in Peptide einer Länge von 3-23 Aminosäuren, die mittlere Länge beträgt 7-9 Aminosäuren (Nussbaum *et al.*, 1998; Kisselev *et al.*, 1999). Sie akkumulieren nicht in der Zelle und werden vermutlich von cytoplasmatischen Peptidasen abgebaut. Das 20S-Proteasom ist in der Lage, nach jeder Aminosäure zu schneiden, die drei proteolytisch aktiven Untereinheiten zeigen aber unterschiedliche Substrat-Spezifitäten: $\beta 1$ spaltet nach sauren oder kleinen hydrophoben Aminosäuren (Caspase-ähnlich), $\beta 2$ nach basischen oder kleinen hydrophoben Resten (Trypsin-ähnlich) und $\beta 5$ nach hydrophoben Aminosäuren (Chymotrypsin-ähnlich) (Dick *et al.*, 1998).

20S-Proteasomen können Peptide und bestimmte ungefaltete Proteine abbauen, für den Abbau polyubiquitinerter Proteine wird jedoch das 26S-Proteasom benötigt. Der 19S-regulatorische Komplex kann seinerseits in einen Deckel und eine Basis unterteilt werden (Glickman *et al.*, 1998). Sechs der neun Untereinheiten der Basis zeigen ATPase-

Aktivität. Ihre Funktion ist vermutlich die Entfaltung des Substratproteins und seine Führung in das 20S-Proteasom (Braun *et al.*, 1999; Köhler *et al.*, 2001). Der Deckel des 19S-regulatorischen Komplexes besteht aus acht Untereinheiten, die keine ATPase-Aktivität haben. Die Rolle des Deckels ist noch weitgehend unklar, er wird aber für den effizienten Abbau polyubiquitinerter Proteine benötigt (Glickman *et al.*, 1998).

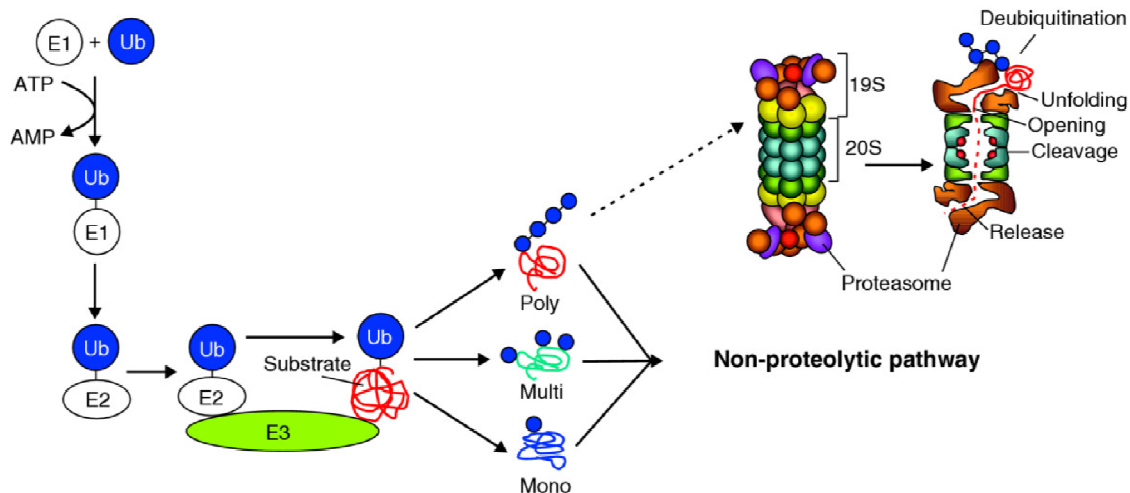


Abb. 1.4: Das Ubiquitin-Proteasom-System.

Der erste Schritt des Proteinabbaus durch das UPS ist die Ubiquitinierung, die durch eine Kaskade von drei Enzymen katalysiert wird. Zunächst aktiviert das Ubiquitin-aktivierende Enzym E1 Ubiquitin in einer ATP-abhängigen Reaktion. Dann wird der Ubiquitin-Rest auf ein Ubiquitin-konjugierendes Enzym E2 übertragen. Eine Ubiquitin-Ligase E3 katalysiert den Transfer des Ubiquitins auf das Substratprotein. Voraussetzung für den Abbau durch das 26S-Proteasom ist normalerweise eine Polyubiquitinierung. Das 26S-Proteasom, bestehend aus dem 19S-regulatorischen Komplex und dem 20S-Proteasom deubiquitiniert und entfaltet das Substratprotein und katalysiert die Proteolyse in Oligopeptide (nach Kaiser und Huang, 2005).

Der klassische Weg des Abbaus durch das Proteasom erfordert eine vorherige Polyubiquitinierung. Es gibt aber auch Beispiele dafür, dass nicht-ubiquitinierte Proteine durch das Proteasom abgebaut werden, so wie die Ornithin-Decarboxylase (Murakami *et al.*, 2000). Das Y-Box-Bindeprotein (YB-1), ein DNA- und RNA-bindendes Protein, wird spezifisch durch das 20S-Proteasom gespalten. Hierbei wird das cytoplasmatische Retentionssignal entfernt. Die Spaltung ist Ubiquitin- und ATP-unabhängig (Sorokin *et al.*, 2005).

Es konnte gezeigt werden, dass die meisten fehlerhaft synthetisierten Proteine sowie Proteine mit einer kurzen Halbwertszeit durch das UPS abgebaut werden (Finley *et al.*, 1984; Ciechanover *et al.*, 1984). Das Proteasom soll auch am Abbau von Proteinen mit einer längeren Halbwertszeit beteiligt sein (Rock *et al.*, 1994), jedoch hat die Inhibition von Uba1 keinen Einfluss auf deren Abbau (Gropper *et al.*, 1991).

1.3.2 Caspasen

Die Hauptaufgabe von Caspasen wird im programmierten Zelltod, der Apoptose, gesehen. Kennzeichen der Apoptose sind DNA-Fragmentierung, Chromatin-Kondensierung, Bildung von Membranbläschen, Schrumpfen der Zellen und Disassemblierung in Vesikel (Kerr *et al.*, 1972). Die Apoptose ist ein essentieller Prozess für die Embryonalentwicklung und Gewebehomeostase (Prindull, 1995; Meier *et al.*, 2000). Caspasen sind eine große Familie zellulärer Proteasen, die diverse Funktionen in Entzündungsprozessen und der Apoptose haben. Aufgrund ihrer Funktion können Caspasen in drei Gruppen eingeteilt werden: die Entzündungs-Caspasen (Caspase-1, -4, -5), die apoptotischen Initiator-Caspasen (Caspase-2, -8, -9, -19) und die apoptotischen Effektor-Caspasen (Caspase-3, -6, -7) (Jin und El-Deiry, 2005). Alle Caspasen werden als Proenzyme exprimiert, die Aktivierung erfolgt proteolytisch. Caspasen bestehen aus einer N-terminalen Domäne und einer Protease-Domäne, die wiederum in eine große und eine kleine Untereinheit unterteilt werden kann. Kleine und große Untereinheit bilden nach der proteolytischen Aktivierung ein Heterodimer, welches für die Ausbildung des aktiven Zentrums essentiell ist (Thornberry *et al.*, 1992). Die für die Regulation wichtige N-terminale Domäne unterscheidet sich sehr zwischen den Mitgliedern der Caspase-Familie (Chang und Yang, 2000).

Caspasen sind Cystein-Proteasen (Thornberry *et al.*, 1992), die immer C-terminal von Aspartat spalten (Sleath *et al.*, 1990; Howard *et al.*, 1991). Für die Erkennung des Substrats sind außerdem die drei Aminosäuren N-terminal des Aspartats wichtig. Die verschiedenen Caspasen unterscheiden sich in der Erkennungssequenz, die durch das Tetrapeptid gebildet wird (Thornberry *et al.*, 1997). Eine Aufgabe von Caspasen während der Apoptose ist die Spaltung antiapoptotischer Proteine wie Bcl2 (Cheng *et al.*, 1997) oder ICAD (Sakahira *et al.*, 1998).

Neben den Funktionen in Entzündung und Apoptose scheinen Caspasen auch Aufgaben bei der Proliferation und Differenzierung von Zellen zu haben. Caspase 8 ist für die Proliferation von T-, B- und NK-Zellen wichtig (Chun *et al.*, 2002). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Caspasen an der terminalen Differenzierung vieler Zelltypen beteiligt sind. Caspase-Inhibitoren blockieren die terminale Differenzierung von Linsen-Epithelzellen (Ishizaki *et al.* 1998). Auch die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen, jedoch nicht in dendritische Zellen, wird durch Caspase-Inhibitoren blockiert (Sordet *et al.*, 2002). Zu den Substraten gehören Cytoskelettproteine wie α -Tubulin und Vinculin aber auch hnRNP C1/C2 und Nucleophosmin (Cathelin *et al.*, 2006). Einige der morphologischen Veränderungen während der Erythropoese ähneln denen in apoptotischen Zellen (Zamzami und Kroemer, 1999). Erythropoetin verhindert jedoch die

Apoptose erythroider Vorläuferzellen durch die Aktivierung der Bcl-X_L-Transkription (Motoyama *et al.*, 1999; Hristoskova *et al.*, 2007). Die Aktivierung von Caspasen ist jedoch auch für die terminale erythroide Differenzierung notwendig, unter anderem wird Caspase-3 proteolytisch aktiviert. Caspase-Inhibitoren blockieren die Differenzierung bereits auf der Stufe des basophilen Erythroblasten (Zermati *et al.*, 2001). Außerdem führt die Reduktion der Caspase-3-Menge in erythroiden Vorläuferzellen auch zu einer 50%-igen Verringerung der Zellen, die Kernausschluss zeigen (Carlile *et al.*, 2004).

1.3.3 Weitere zelluläre Proteasen

Neben dem UPS und den Caspasen existieren weitere intrazelluläre Proteasen wie die Calpaine und die Tripeptidyl-Peptidase II. Ihre physiologische Funktion ist bislang jedoch nur eingeschränkt untersucht worden.

Tripeptidyl-Peptidase II (TPPII) ist eine Serin-Protease vom Subtilisin-Typ, die Tripeptide vom N-Terminus von Oligopeptiden entfernen kann (Balów *et al.*, 1986). Es konnte gezeigt werden, dass TPPII in murinen EL-4-Zellen bei vollständiger Inhibition des Proteasoms einige der Aufgaben des UPS übernehmen kann, zum Beispiel den Abbau von ubiquitinierten Proteinen und die Generierung von Peptiden für die Präsentation durch MHC I-Komplexe (Glas *et al.*, 1998; Geier *et al.*, 1999). Die Spaltung von Polypeptiden erfolgt dabei sowohl exo- als auch endoproteolytisch (Trypsin-ähnlich) (Geier *et al.*, 1999). Unter physiologischen Bedingungen scheint eine Hauptaufgabe von TPPII die Prozessierung von Peptiden vor der Präsentation durch MHC I zu sein (Reits *et al.*, 2004).

Calpaine sind Calcium-abhängige neutrale Proteasen (Guroff, 1964). Es wurden zwei Calpaine beschrieben, die sich in ihrer Calcium-Abhängigkeit unterscheiden: Calpain-I benötigt für seine Aktivität mikromolare Calciumkonzentrationen, während Calpain-II bei millimolaren Calciumkonzentrationen aktiv ist (Dayton, 1982). Ein durch Autoproteolyse entstehendes Fragment von Calpain-II benötigt ebenfalls nur mikromolare Calciumkonzentrationen (Suzuki *et al.*, 1981). Calpaine sind Heterodimere, die aus einer großen Untereinheit von ca. 80 kD sowie einer kleinen Untereinheit von ca. 30 kD bestehen. Die kleine Untereinheit ist für Calpain-I und Calpain-II identisch (Croall und DeMartino, 1984). Calpaine sind Cystein-Proteasen (Suzuki, 1983), die keine ausgeprägte Sequenzspezifität zeigen (Croall und DeMartino, 1991). Dennoch werden viele Substratproteine wie Talin, die Proteinkinase C und p73 limitiert gespalten (Fox *et al.*, 1985; Kishimoto *et al.*, 1989; Munarriz *et al.*, 2005). Calpaine können durch das ubiquitär exprimierte Protein Calpastatin spezifisch inhibiert werden (Nishiura *et al.*, 1978;

Emori *et al.*, 1987). Die physiologische Funktion der Calpaine ist noch weitgehend ungeklärt (Croall und DeMartino, 1991; Carafoli und Molinari, 1998).

1.4 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit sollten posttranskriptionelle Mechanismen der Regulation der Genexpression während der erythroiden Reifung untersucht werden.

Hierzu war es zunächst erforderlich, ein Modellsystem zur erythroiden Reifung zu etablieren und charakterisieren. Basierend auf Vorarbeiten (Naarmann, 2006) wurden humane K562-Zellen für die Etablierung des induzierbaren Zellsystems verwendet und ihre erythroide Reifung charakterisiert. Insbesondere sollte die Eignung als Modellsystem für die weitere Analyse der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation überprüft werden. Die erythroide Reifung von K562-Zellen wurde mit der von isolierten primären humanen CD34⁺-Zellen verglichen.

Unter Verwendung des K562-Zellsystems sollten verschiedene Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression während der erythroiden Reifung untersucht werden.

Ein Aspekt war hierbei die Identifizierung weiterer mRNAs, die während der erythroiden Reifung translational reguliert werden. hnRNP K ist ein multifunktionales Protein, welches neben der r15-LOX-mRNA auch die Translation anderer mRNAs beeinflusst. Zusammen mit hnRNP E1 und hnRNP E2 inhibiert hnRNP K die Translation der RNA des humanen Papillomavirus Typ16 L2 (Collier *et al.*, 1998). Die IRES-vermittelte Translation der c-myc-mRNA wird dagegen durch diese Proteine erhöht (Evans *et al.*, 2003). Daher sollten in dieser Arbeit mRNAs identifiziert werden, die mit hnRNP K interagieren, und untersucht werden, ob hnRNP K an der Regulation der mRNA-Translation beteiligt ist.

Außerdem sollte das K562-Zellsystem für die weitergehende Analyse des Mechanismus der r15-LOX-mRNA-Translationsregulation genutzt werden. So ist bislang nicht bekannt, wie der hnRNP K-hnRNP E1-DICE-Komplex an der 3'UTR die Translationsinitiation am 5'Ende der mRNA inhibiert. Daher sollten weitere Komponenten des inhibitorischen Komplexes identifiziert und ihre Funktion analysiert werden. Diese Arbeiten basieren auf affinitätschromatographischen Reinigungen mit DICE-tragender RNA, die von Christiane Harnisch durchgeführt wurden (Harnisch, 2010).

Die Menge an hnRNP K und hnRNP E1 nimmt während der erythroiden Reifung ab (Naarmann, 2006; Ostareck-Lederer, unpubliziert), wahrscheinlich kommt es zu einem Abbau der beiden Proteine, die die Translation der r15-LOX-mRNA inhibieren. Bislang ist nicht bekannt, welche Proteasen an diesem Abbau beteiligt sind. Daher sollte das induzierbare K562-System für die Analyse der Abbauwege von hnRNP K und hnRNP E1 genutzt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

2.1.1 K562-Zellen

Humane K562-Zellen wurden aus einer Patientin mit chronisch-myeloischer Leukämie (CML) isoliert (Lozzio und Lozzio, 1975, siehe 1.1.2). Sie wurden bei 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640-Medium (Invitrogen), welchem 10% fötales Kälberserum (Biochrom) und 1x Penicillin/ Streptomycin-Mix (Invitrogen) zugesetzt wurden, kultiviert. Zum Passagieren wurde die Zellzahl der Suspensionskulturen alle zwei Tage mittels einer Zählkammer nach Thoma bestimmt (siehe 2.1.7) und auf 0,75x10⁵ Zellen/ ml eingestellt.

2.1.2 CD34⁺-Zellen

Für einen Teil der Experimente wurden primäre humane CD34⁺-Zellen verwendet. Die aus Wachstumsfaktor-mobilisiertem peripheren Blut gewonnenen CD34⁺-Zellen wurden über CellSystems bezogen. 2x10⁵ Zellen wurden bei 37°C, 5% CO₂ in StemPro-34 SFM (Invitrogen) mit den folgenden Zusätzen kultiviert: 2 U/ ml Erythropoetin (PromoKine), 1 µM Dexamethason (Sigma-Aldrich), 40 ng/ ml IGF-1 (CellSystems), 100 ng/ ml SCF (CellSystems) und 40 µg/ ml Lipiden (Sigma-Aldrich) (Leberbauer *et al.*, 2005). Täglich wurden 50% des Mediums gegen frisches Medium ausgetauscht.

2.1.3 Induktion der erythroiden Reifung

Die erythroide Reifung wurde sowohl in der K562-Zelllinie als auch in primären CD34⁺-Zellen induziert.

K562-Zellen reagieren nicht auf den natürlichen Induktor der Erythropoese, Erythropoetin. Daher wurde die erythroide Reifung durch die Zugabe von 1,5 mM Natrium-Butyrat (Sigma-Aldrich) zum Zellkulturmedium induziert (Andersson *et al.*, 1979; Cioe *et al.*, 1981; Naarmann, 2006). Die Induktionszeit betrug in der Regel 8 Tage. Alle zwei Tage wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen wurden abzentrifugiert (350 g, 5 min, Raumtemperatur (RT)) und in neuem Medium mit 1,5 mM Natrium-Butyrat resuspendiert.

Die erythroide Reifung der primären CD34⁺-Zellen wurde nach 10 Tagen Kultur induziert. Hierzu wurde das StemPro-34-Medium wie folgt ergänzt: 10 U/ ml Erythropoetin, 10 ng/ ml Insulin (Biochrom), 1 mg/ ml *holo*-Transferrin (Sigma-Aldrich), 1 µM T₃ (Sigma-Aldrich) und 3% humanes Serum (*off-the-clot*, PromoCell) (Leberbauer *et al.*, 2005). An den Tagen 0, 3 und 6 wurden Immunfluoreszenz-Färbungen (siehe 2.10.1) mit ca. 5x10³ Zellen durchgeführt. 3x10⁴ Zellen wurden an den Tagen 0 und 6 der Induktion für die Isolierung von Gesamt-RNA (siehe 2.6.1) verwendet.

2.1.4 Inhibition der proteasomalen Aktivität

Um den Abbau von hnRNP K und hnRNP E1 während der erythroiden Reifung zu analysieren, wurde das Proteasom mit verschiedenen spezifischen Inhibitoren (Biomol) blockiert. Tab. 2.1 fasst die dominierenden Spezifitäten für die verschiedenen katalytischen Untereinheiten und die verwendeten Konzentrationsbereiche zusammen.

Inhibitor	Spezifität	Konzentration	Referenz
Epoxomicin	1	0,1 – 1 μ M	Meng <i>et al.</i> , 1999
Ac-Ala-Pro-Nle-Asp-al	2	0,1 – 1 μ M	Kisselev <i>et al.</i> , 2003
<i>Clasto</i> -Lactacystin- β -lacton	1,3	0,1 – 1 μ M	Craiu <i>et al.</i> , 1997
MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al)	1,2	0,1 – 1 μ M	Rock <i>et al.</i> , 1994
Ada-(Ahx) ₃ -(Leu) ₃ -Vinylsulfon	1,2,3	0,01 – 0,1 μ M	Kessler <i>et al.</i> , 2001

Tab. 2.1: Verwendete Proteasom-Inhibitoren. Spezifität: 1) Chymotrypsin-ähnlich, 2) Caspase-ähnlich, 3) Trypsin-ähnlich

K562-Zellen wurden 24 Stunden mit den oben genannten Inhibitoren behandelt. In einigen Fällen wurde die Inhibition des Proteasoms mit der Induktion der erythroiden Reifung kombiniert, dann betrug die maximale Inkubationszeit vier Tage. Die Inhibition des Proteasoms wurde durch einen Western Blot mit α -Ubiquitin-Antikörper (siehe 2.5) überprüft.

2.1.5 Inhibition der Translation in K562-Zellen

Um die Stabilität von hnRNP K und hnRNP E1 in K562-Zellen zu bestimmen, wurde die Translation *in vivo* durch verschiedene Inhibitoren der Proteinsynthese blockiert. Emetin bindet an die 40S-Untereinheit des Ribosoms und inhibiert die Translokation (Grollman, 1968; Jimenez *et al.*, 1977). Cycloheximid stabilisiert 80S-Ribosomen und inhibiert die Peptidyl-Transferase-Reaktion (Munro *et al.*, 1968; Baliga *et al.*, 1969). Puromycin bewirkt eine vorzeitige Termination der Polypeptidkette, da es als Analog des 3'Endes von Aminoacyl-tRNAs fungiert (Yarmolinsky und Haba, 1959; Morris *et al.*, 1962; Nathans, 1964).

Um die Proteinsynthese zu inhibieren, wurden K562-Zellen bis zu 50 Stunden mit 10 μ M Emetin, 300 μ g/ml Cycloheximid oder 5 μ g/ml Puromycin (alle Sigma-Aldrich) inkubiert.

2.1.6 Induktion von oxidativem Stress

Bei der Behandlung von Zellen mit Natrium-Arsenit werden reaktive Sauerstoff-Spezies gebildet, wodurch oxidativer Stress entsteht (Wang *et al.*, 1996). Außerdem wird die Translationsinitiation durch die Phosphorylierung der α -Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 am Serin 51 inhibiert (siehe 1.2.2). Die translational reprimierten mRNAs akkumulieren in *stress granules* (Kedersha *et al.*, 1999). Durch die Behandlung von Zellen mit Natrium-Arsenit wird die eIF2 α -Kinase HRI aktiviert (McEwen *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2001).

Die Bildung von *stress granules* wurde in K562-Zellen nach dem folgenden Protokoll induziert: K562-Zellen wurden zunächst auf poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen zentrifugiert (siehe 2.10.1) und anschließend 30 min mit 1,5 mM Natrium-Arsenit (Sigma-Aldrich) inkubiert. Hierzu wurde das Natrium-Arsenit direkt vor der Verwendung in RPMI 1640-Medium gelöst. Anschließend erfolgte der Nachweis von *stress granules* mittels Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.10.1). Als Markerprotein wurde G3BP1 verwendet (Tourrière *et al.*, 2003).

2.1.7 Bestimmung der Zellzahl

Für die Bestimmung von Zellzahl und Viabilität der Kulturen wurde die Zellsuspension 1:1 mit 0,4% Trypanblau in PBS verdünnt. Trypanblau kann nur in tote Zellen eindringen, wodurch die Vitalität der Zellkulturen bestimmt werden kann (Phillips, 1973). Die Auszählung erfolgte in einer Zählkammer nach Thoma.

2.1.8 Benzidin-Färbung

Die Benzidin-Färbung wurde zum Nachweis Hämoglobin-positiver Zellen während der erythroiden Reifung verwendet. Benzidin (Sigma-Aldrich) wird in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und Hämoglobin oxidiert. Dies führt zu einer Blaufärbung der Zellen, die lichtmikroskopisch detektiert werden kann (Lepehne, 1919).

Die Benzidin-Färbung wurde nach Belhacène *et al.*, 1998 durchgeführt. Hierzu wurden 50 μ l Zellsuspension mit 10 μ l Benzidin-Reagenz 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Benzidin-positiven Zellen lichtmikroskopisch in einer Zählkammer nach Thoma ausgezählt.

Benzidin-Reagenz

0,2% Benzidin-Dihydrochlorid

0,6% H₂O₂

3% Essigsäure

2.1.9 Präparation von Triton-Lysat

K562-Zellen wurden abzentrifugiert (350 g, 5 min, 4°C) und zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Lysepuffer pro 10×10^6 Zellen resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20.800 g, 10 min, 4°C) und der Überstand bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Proteinkonzentration der Lysate wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.3.2)

<u>PBS, pH 7,4</u>	<u>Lysepuffer</u>
137 mM NaCl	300 mM NaCl
2,7 mM KCl	20 mM Tris/ HCl, pH 7,4
10 mM Na ₂ HPO ₄	1% Triton X-100
2 mM KH ₂ PO ₄	1 mM DTT
	1 mM PMSF
	1 µg/ ml Leupeptin
	2 µg/ ml Pepstatin A

2.1.10 Präparation von cytoplasmatischem Extrakt

Cytoplasmatischer Extrakt wurde durch hypotonische Lyse in einem Homogenisator nach Dounce gewonnen. Die Präparation von cytoplasmatischem K562-Extrakt erfolgte in Anlehnung an Bader und Sarre, 1986.

K562-Zellen wurden abzentrifugiert (350 g, 5 min, 4°C) und zweimal mit eiskaltem isotonischem Waschpuffer (*MOPS buffered saline with glucose*, MBSG) gewaschen. Nach vollständiger Entfernung des Waschpuffers wurde das Zellpellet gewogen und in 1,5 ml hypotonischem Puffer pro 1 g Zellen resuspendiert. Um ein Quellen der Zellen zu erlauben, wurden sie 15 min auf Eis inkubiert und anschließend durch ca. 30 Züge im Homogenisator nach Dounce lysiert. Die Zelltrümmer wurden abzentrifugiert (20.800 g, 30 min, 4°C), die Überstände in flüssigem Stickstoff eingefroren und in der Stickstoff-Dampfphase gelagert.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach Bradford (siehe 2.3.2).

<u>MBSG</u>	<u>hypotonischer Puffer</u>
20 mM MOPS pH 7,2	10 mM MOPS pH 7,2
130 mM NaCl	10 mM Kaliumacetat
5 mM KCl	1,5 mM Magnesiumacetat
7,5 mM Magnesiumacetat	2 mM DTT
5 mM Glucose	2 µg/ ml Pepstatin A
	1 µg/ ml Leupeptin
	24 µg/ ml Antipain
	1 µg/ ml Pefabloc SC

2.2 Plasmide und deren Klonierung

2.2.1 Methoden und Reagenzien

Die Klonierung von Plasmiden erfolgte nach molekularbiologischen Standardmethoden (Sambrook und Russell, 2001). Zur Plasmidvermehrung wurden die *E.coli*-Stämme XL1blue und XL10gold verwendet.

Die verwendeten Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase und das Klenow-Fragment (exo⁻) wurden über NEB bezogen, Pfu-DNA-Polymerase von Fermentas und alkalische Phosphatase von Roche. Die Aufreinigung von PCR-Produkten und die Elution von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem *PCR purification kit* (Roche). Zur Mini-Präparation von DNA wurde das peqGOLD Plasmid Miniprep Kit (peqlab) verwendet, für Midi- bzw. Maxipräparationen die Kits Plasmid Midi & Maxi (Qiagen).

Die verwendeten Klonierungs- und Sequenzierprimer sind in den Tabellen 7.1.1 und 7.1.2 aufgeführt. Sequenzierungen wurden durch MWG durchgeführt.

2.2.2 Plasmide für die *in vitro*-Transkription

pBSIISK-DICE (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994) und pBSIISK-β-globin (Weinlich *et al.*, 2009) wurden bereits beschrieben.

2.2.3 Plasmide für K562-Transfektionen

GFP-NLS-MS2BP und V2-HA-MS2BP wurden bereits beschrieben (Stöhr *et al.*, 2006).

Für die Klonierung von ORF-ctrl-6MS2 und ORF-DICE-6xMS2 wurde Luc-Δzip-6MS2 (Stöhr *et al.*, 2006) mit *Bam*HI linearisiert, die überhängenden Enden durch Behandlung mit dem Klenow-Fragment aufgefüllt und dephosphoryliert. Anschließend wurde der Vektor mit dem *Xho*I-Fragment aus pBSIISK-β-globin, welches ebenfalls mit Klenow behandelt wurde, ligiert um ORF-ctrl-6MS2 zu generieren. Für die Klonierung von ORF-DICE-6MS2 wurde das DICE durch Verdau mit *Bam*HI und *Pst*I aus pBSIISK-DICE

ausgeschnitten, mit Klenow behandelt und mit Luc- Δ zip-6MS2 (siehe oben) ligiert. Die Klonierungen wurden durch Sequenzierung mit „Luc-DICE-MS2-seq“ überprüft.

Um V1-FLAG zu generieren, wurde der Vektor Venus1C (Stefan Hüttelmaier) mit *XhoI* und *EcoRI* gespalten und mit einem FLAG-Oligonukleotid ligiert, das die entsprechenden komplementären Überhänge der Restriktionsenzyme trug. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung mit „Venus1 sequencing“ überprüft.

V1-FLAG-hnRNP K wurde wie folgt kloniert: die für hnRNP K kodierende Sequenz wurde mit den Primern „Venus-GTG-hnRNP K fw“ und „hnRNP K-*NotI* rv“ aus pSG5-hnRNP K (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit *NotI* verdaut, Klenow-behandelt, mit *KpnI* verdaut und mit V1-FLAG ligiert, welcher zuvor mit *SmaI* und *KpnI* gespalten wurde. Die Klonierung wurde mit den Primern „Venus1 sequencing“, „hnRNP K Seq 251“, „hnRNP K Seq 641“ und „hnRNP K Seq 1051“ in Sequenzierungen überprüft.

Für die Klonierung von V1-FLAG-DDX6, V1-FLAG-DDX6 D1 und V1-FLAG-DDX6 D2 wurde die *KpnI*-Schnittstelle von V1-FLAG genutzt. Für die Amplifikation der kodierenden Sequenzen aus pBSIIKS-DDX6 (Harnisch, 2010) wurden die folgenden Primer verwendet. DDX6: DDX6 *KpnI* fw und DDX6 *KpnI* rv. DDX6 D1: DDX6 *KpnI* fw und DDX6 D1 *KpnI* rv. DDX6 D2: DDX6 D2 *KpnI* fw und DDX6 *KpnI* rv. Die PCR-Produkte wurden mit *KpnI* verdaut und mit *KpnI*-gespaltenem und dephosphoryliertem V1-FLAG ligiert. Die Identitätsüberprüfung erfolgte durch Sequenzierung mit „Venus1 sequencing“, „DDX6 Seq 260“, „DDX6 Seq 643“ und „DDX6 Seq 1041“.

2.3 Konzentrationsbestimmungen

2.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde durch eine Absorptionsmessung bei 260 nm bestimmt. Zur Messung wurde eine Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm verwendet. Eine Absorption von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l bzw. einer RNA-Konzentration von 40 ng/ μ l.

Die Messungen wurden entweder mit 100 μ l einer 1:100-Verdünnung an einem U3000-Spektrophotometer (Hitachi) oder an einem BioPhotometer plus (Eppendorf) durchgeführt. Letzteres war mit einer LabelGuard-Mikroliterzelle (Implen) ausgestattet, die durch eine Schichtdicke von 0,2 mm eine 1:50-Verdünnung simuliert und lediglich ein Volumen von 1 μ l zur Messung benötigt.

2.3.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration in Triton-Lysaten und cytoplasmatischen Extrakten wurde nach Bradford bestimmt (Bradford, 1976).

Das Bradford-Reagenz (Carl Roth) wurde nach Herstellerangaben 1:5 mit ddH₂O verdünnt. Zur Messung wurde 1 µl einer 1:10-Verdünnung der Proben mit 1 ml Bradford-Verdünnung 5 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Auswertung erfolgte mittels Eichgeraden, die mit BSA erstellt wurden.

2.4 Gelelektrophorese

2.4.1 Agarose-Gelelektrophorese

Agarose-Gelelektrophorese wurde zur Auftrennung von Nukleinsäuren eingesetzt. Die Agarose wurde durch Aufkochen in TBE-Puffer gelöst. Beim Gießen des Gels wurden zur Detektion der Nukleinsäuren entweder 0,001% Ethidiumbromid (Carl Roth) oder 1x GelRed (10.000x-Stocklösung, Biotium) zugesetzt. Beide Farbstoffe können unter UV-Licht angeregt werden.

Die Proben wurden, soweit erforderlich, mit 4x DNA-Ladepuffer versetzt und bei 120 V elektrophoretisch aufgetrennt.

Je nach Größe der aufzutrennenden Nukleinsäuren wurden Gele mit einer Konzentration von 0,8-2% Agarose verwendet. Als Größenstandard wurden eine 1 kb-Leiter (Invitrogen) oder ein 50 bp-Marker (NEB, Fermentas) verwendet.

<u>TBE-Puffer</u>	<u>4x DNA-Ladepuffer</u>
90 mM Tris-Base	0,2% Bromphenolblau
90 mM Borsäure	0,2% Xylen-Cyanol FF
2 mM EDTA	20% Glycerin

2.4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde zur denaturierenden Auftrennung von Proteinen eingesetzt.

Vor der Elektrophorese wurden die Proteinlösungen in Probenpuffer aufgekocht, der SDS und β-Mercaptoethanol enthält. SDS ist ein ionisches Detergenz, welches Proteine denaturiert. Durch die Bindung von SDS erhalten die Proteine eine negative Nettoladung sowie ein identisches Ladungs-Masse-Verhältnis und können nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Durch β-Mercaptoethanol werden vorhandene Disulfidbrücken reduziert.

Die Auftrennung der Proteine wurde in einem diskontinuierlichen System bestehend aus Sammelgel und Trenngel durchgeführt (Laemmli, 1970). Die Elektrophorese erfolgte bei 200 V, bis die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte. Um eine Zuordnung der Proteinbanden zu einem bestimmten Molekulargewicht zu ermöglichen, wurde ein bereits gefärbter Proteinstandard (PageRuler, Fermentas) mitgeführt.

Sammelgel

5% Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)

125 mM Tris-HCl, pH 6,8

0,1% APS

0,4% TEMED

Trenngel

8-15% Acrylamid/ Bisacrylamid (37,5:1)

375 mM Tris-HCl, pH 8,7

0,1% APS

0,4% TEMED

2x Probenpuffer

250 mM Tris-HCl, pH 6,8

4% SDS

20% Glycerin

10% β -Mercaptoethanol

0,02% Bromphenolblau

Laufpuffer

250 mM Glycin

25 mM Tris

3,5 mM SDS

2.4.3 Silberfärbung von Polyacrylamidgelen

Die Silberfärbung von SDS-Gelen erfolgt nach Nesterenko *et al.*, 1994:

Nach der Elektrophorese wurde das Polyacrylamidgel in 50% (v/v) Aceton, 1,25% (w/v) Trichloressigsäure, 0,04% (v/v) Formaldehyd 5 min fixiert. Nach dem Waschen mit ddH₂O erfolgte die Vorbehandlung in 50% (v/v) Aceton (5 min) und anschließend 0,03% (w/v) Natriumthiosulfat (1 min). Das Gel wurde erneut mit ddH₂O gewaschen und mit 0,2% (w/v) Silbernitrat, 1% (v/v) Formaldehyd 8 min imprägniert. Die Entwicklung des Gels erfolgte durch die Inkubation in 2% (w/v) Natriumcarbonat, 0,04% (v/v) Formaldehyd, 0,008% (w/v) Natriumthiosulfat. Nach 10-60 sec wurde die Reaktion mit 1% (v/v) Essigsäure abgestoppt.

2.4.4 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen

Für die Färbung von SDS-Gelen mit Coomassie Brilliantblau G-250 wurde folgendes Protokoll nach Neuhoff *et al.*, 1988 verwendet:

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 30% Ethanol, 10% Essigsäure für 1 h fixiert. Anschließend erfolgte die Färbung über Nacht mit Färbelösung (80 ml Colloidal-Coomassie-Stocklösung, 20 ml Methanol). Der Gelhintergrund wurde durch Waschen in ddH₂O entfärbt.

Colloidal-Coomassie-Stocklösung

0,1% Coomassie G-250

2% Phosphorsäure

10% Ammoniumsulfat

2.5 Western Blot

Für den spezifischen Nachweis von Proteinen mittels Western Blot wurden die Proteinlösungen zunächst mittels SDS-PAGE (siehe 2.4.2) aufgetrennt. Anschließend erfolgte der elektrophoretische Transfer (25 V, 4 °C, über Nacht) auf eine PVDF-Membran (Millipore). Der Transfer wurde in einer Nass-Blot-Apparatur (Bio-Rad) in Western-Puffer (25 mM Tris, 200 mM Glycin) durchgeführt.

Nach dem Transfer wurde die Membran mit 5% Milchpulver (Sucofin) in TBST geblockt (1 h, RT). Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem Primär-Antikörper, soweit nicht anders angegeben in 5% Milch/ TBST für 1 h bei RT. Die für Western Blot verwendeten Antikörper und Verdünnungen sind in Tab 7.2.1 zusammengefasst. Nach dem Waschen mit TBST (5x 5 min) wurde die Membran mit dem entsprechenden Sekundär-Antikörper inkubiert (5% Milch/ TBST, 1 h, RT). Die verwendeten Sekundär-Antikörper (Tab. 7.2.2) sind mit Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt. Die Detektion erfolgte nach fünfmaligem Waschen mit TBST (je 5 min) über das Luminol-Peroxid-System (WestPico, Fisher). Das Lumineszenzsignal wurde auf einem Röntgenfilm (GE Healthcare) oder mit dem LAS4000-System (Fuji) detektiert.

TBST

50 mM Tris-HCl pH 7,4

150 mM NaCl

0,05% Tween 20

2.6 Isolierung von RNA und RT-PCR

2.6.1 Isolierung von RNA mit der Trizol-Methode

Das Trizol-Reagenz (Invitrogen) wurde zur Isolierung von Gesamt-RNA aus K562- und CD34⁺-Zellen und zur Isolierung co-immunopräzipitierter RNAs (siehe 2.11.2) verwendet. Die Isolierung erfolgte entsprechend des Protokoll des Herstellers.

Für die Isolierung von RNA aus K562-Zellen wurden ca. 10×10^6 Zellen eingesetzt, bei CD34⁺-Zellen konnten lediglich 3×10^4 Zellen eingesetzt werden. Das RNA-Pellet wurde in 25-40 μ l DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

Um co-immunopräzipitierte RNAs zu isolieren, wurde die Sepharose-Matrix nach dem Waschen in 0,75 ml Trizol-Reagenz resuspendiert. Weiter wurde nach Hersteller-Protokoll verfahren. Die isolierten RNAs wurden in 25 μ l DEPC-H₂O aufgenommen und bei -80 °C gelagert.

2.6.2 RT-PCR

RT-PCR wurde zur Detektion der Expressionslevel verschiedener zellulärer mRNAs in K562- und CD34⁺-Zellen sowie zum Nachweis co-immunopräzipitierter mRNAs eingesetzt.

Zunächst wurde die mit Trizol isolierte RNA (siehe 2.6.1) durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Hierfür wurde die M-MLV-Reverse Transkriptase (M-MLV-RT, Promega) verwendet. Die RNA wurde in einem Volumen von 10 μ l mit 20 pmol *random*-Primer einer Länge von sechs Nukleotiden (NEB) vorinkubiert (70 °C, 5 min). Es wurden entweder 2 μ g (RNA aus K562-Zellen) oder gleiche Volumen (4 μ l RNA aus CD34⁺-Zellen, 3 μ l RNA aus Immunopräzipitationen) der isolierten RNA eingesetzt.

Der Reaktionsansatz wurde entsprechend Tab. 2.2 vervollständigt und 1 h bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym denaturiert (20 min, 70 °C).

Komponente	Volumen	Endkonzentration
RNA-Primer-Mix	10 μ l	
5x RT-Puffer	5 μ l	1x
10 mM dNTPs	1,25 μ l	0,5 mM
M-MLV-RT (200 U/ μ l)	0,75 μ l	6 U/ μ l
DEPC-H ₂ O	8 μ l	
Endvolumen	25 μl	

Tab. 2.2: Reaktionsansatz für die Reverse Transkription

Danach wurde eine semiquantitative PCR mit GoTaq-Polymerase (Promega) durchgeführt. Alle Primer wurden so entworfen, dass sie Exon-Exon-Grenzen überspannen. Um eine Amplifikation kontaminierender genomischer DNA zu verhindern, sollte das dazwischenliegende Intron mindestens 2 kb groß sein. Die entstehenden PCR-

Produkte hatten eine Größe von 100-350 bp. Der GC-Gehalt der verwendeten Primer (Invitrogen, MWG) betrug 50%. Sie sind in Tab. 7.1.3 zusammengefasst. Der Reaktionsansatz für die PCR ist in Tab. 2.3 dargestellt.

Komponente	Volumen	Endkonzentration
5x Taq-Puffer, grün	5 μ l	1x
25 mM MgCl ₂	1,5 μ l	1,5 mM
10 mM dNTPs	0,5 μ l	200 μ M
10 μ M Primer Hin	2,5 μ l	1 μ M
10 μ M Primer Rück	2,5 μ l	1 μ M
GoTaq-Polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l	0,04 U/ μ l
RT-Reaktion	2 μ l	
DEPC-H ₂ O	10,8 μ l	
Endvolumen	25 μl	

Tab. 2.3: Reaktionsansatz für die semiquantitative PCR

Es wurde das folgende PCR-Programm verwendet:

- 3 min, 94 °C
- x Reaktionszyklen:
 - 30 sec, 94 °C
 - 45 sec, 57 °C
 - 30 sec, 72 °C
- 5 min, 72 °C

Die Anzahl der Reaktionszyklen richtete sich dabei nach der Abundanz der jeweiligen mRNA. Nach drei unterschiedlichen Zyklenzahlen wurden jeweils Proben genommen und auf einem 2% Agarose-Gel analysiert. Der verwendete Reaktionspuffer enthält bereits Glycerin und Farbstoffe, daher mussten die Proben vor dem Auftragen nicht mit DNA-Ladepuffer versetzt werden.

2.7 *in vitro*-Transkription

Für die *in vitro*-Transkription wurde pBSIIISK-DICE mit *EcoRI*, pBSIIKS- β -globin mit *HindIII* linearisiert.

1 μ g der linearisierten DNA wurde für die Transkription mit dem T₃-MEGAscript Kit (Ambion) eingesetzt. Die Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die *in vitro*-transkribierte RNA wurde mittels Phenol-Chloroform-Extraktion und anschließender Fällung aufgereinigt (Sambrook und Russell, 2001) und in 60 μ l DEPC-H₂O gelöst. Die Reinheit wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft (siehe 2.4.1).

2.8 Dichtegradienten-Zentrifugation

Cytoplasmatische K562-Extrakte wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation fraktioniert. Durch diese Methode der Vorreinigung konnten 48S-Komplexe und RNP-enhaltende Fraktionen von 80S-Ribosomen-haltigen Fraktionen getrennt und separat für die Immunopräzipitation von hnRNP K (siehe 2.11.2) eingesetzt werden.

Je 100 µl Extrakt (2 mg Gesamtprotein) aus nicht-induzierten und für 8 Tage induzierten K562-Zellen wurden auf 150 mM Kaliumacetat und 5 mM MgCl₂ eingestellt, auf einen 5-25%igen Saccharose-Gradienten (12 ml) geladen und 2 h bei 4°C und 40.000 rpm in einem Beckmann SW40Ti-Rotor zentrifugiert. Die Gradienten wurden vom Boden des Röhrchens abgepumpt. Es wurden 20 Fraktionen á 600 µl aufgefangen. Die Verteilung der Nukleinsäuren wurde photometrisch über einen an die Pumpe angeschlossenen UV-Monitor detektiert.

2.9 Transfektionen

2.9.1 Transfektion von siRNAs

RNA-Interferenz (RNAi) ist ein sequenz-spezifischer, posttranskriptioneller *gene silencing*-Mechanismus, der durch doppelsträngige RNA (dsRNA) ausgelöst wird und einen Abbau der mRNAs bewirkt, die komplementär der dsRNA sind (Fire *et al.*, 1998; Montgomery *et al.*, 1998). RNA-Interferenz kann als Methode genutzt werden, um die Mengen bestimmter Transkripte in Säuger-Zellen spezifisch zu reduzieren (Elbashir *et al.*, 2001b; Elbashir *et al.*, 2002). Hierzu werden dsRNAs einer Länge von 21-23 Nukleotiden, die *small interfering RNAs* (siRNAs,) transfiziert (Elbashir *et al.*, 2001a). Natürlich vorkommende siRNAs werden aus längeren dsRNA-Molekülen durch Dicer, einer RNase III-Endonuklease prozessiert. Die dabei entstehenden Produkte tragen ein 5'-Phosphat und haben ein 3'-Hydroxylende mit einem Überhang von 2 Nukleotiden am 3' Ende (Hutvagner *et al.*, 2001; Elbashir *et al.*, 2001a). Zur Erhöhung der Stabilität der transfizierten siRNAs bestand der Überhang aus zwei desoxy-Thymidinen (Elbashir *et al.*, 2001c).

1x10⁶ K562-Zellen wurden in RPMI 1640-Medium ohne Zusätze durch Elektroporation mit 500 pmol siRNA transfiziert. Die Transfektion wurde in Elektroporationsküvetten mit einem Elektrodenabstand von 0,4 cm mit einem GenePulser II oder dem GenePulser XCell-Elektroporationssystem (Bio-Rad) bei 0,36 kV, 100 µF durchgeführt. Für den *knock down* von hnRNP K und hnRNP E1 wurde eine Mischung aus drei verschiedenen siRNAs verwendet, für den *knock down* von DDX6 und Uba1 wurden parallel drei individuelle siRNAs transfiziert. Die verwendeten siRNAs (MWG) sind unter 7.3 aufgeführt.

48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und mittels RT-PCR, Western Blot und Immunfluoreszenz-Mikroskopie analysiert.

2.9.2 Transfektion von Plasmid-DNA

Die Transfektion von Plasmid-DNA wurde in Anlehnung an Delgado-Cañedo *et al.*, 2006 durchgeführt. Für die Transfektion wurden 5×10^6 Zellen in RPMI 1640-Medium ohne Zusätze resuspendiert und mit der zu transfizierenden DNA (siehe unten) gemischt. Die Elektroporation wurde in Elektroporationsküvetten (Elektrodenabstand 0,4 cm) mit dem GenePulser XCell-Elektroporationsystem (Bio-Rad) bei 0,36 kV, 950 μ F durchgeführt. Nach der Elektroporation wurden die Zellen abzentrifugiert (10.000 g, 20 sec, RT) und 20 min pelletiert bei 37°C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Zellen wurden in 3 ml Kulturmedium (siehe 2.1.1), welchem 80 μ M ZnSO₄ (Merck) zugesetzt wurden, resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation im Brutschrank wurde das Volumen der Kultur auf 10 ml erhöht.

Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mittels (Immun-) Fluoreszenzmikroskopie analysiert (siehe 2.10).

Trimolekulare Fluoreszenzkomplementierung

Bei der Trimolekularen Fluoreszenzkomplementierung (TriFC) handelt es sich um eine Weiterentwicklung der Bimolekularen Fluoreszenzkomplementierung (BiFC) (Hu *et al.*, 2002; Hu und Kerppola, 2003). Dieser Assay beruht auf der Tatsache, dass viele fluoreszierende Proteine wie das gelb-fluoreszierende Venus-Protein (Nagai *et al.*, 2002) in einen N-terminalen und einen C-terminalen Teil gesplittet werden können, die keine Eigenfluoreszenz zeigen. Die beiden Teile des Venus-Proteins werden als Venus1 (V1, Aminosäuren 1-154) und Venus2 (V2, Aminosäuren 155-238) bezeichnet (Rackham und Brown, 2004; Stöhr *et al.*, 2006). Werden die beiden Teile des Proteins in räumliche Nähe zueinander gebracht, kommt es zu einer Rekonstitution des Proteins und damit des Fluoreszenzsignals.

Indem man Fusionskonstrukte der beiden Teile des fluoreszierenden Proteins mit potentiellen Interaktionspartnern herstellt, kann man den BiFC-Assay nutzen, um Protein-Protein-Interaktionen in lebenden Zellen zu verfolgen (Hu *et al.*, 2002).

Ziel des TriFC-Assays ist es, spezifische Protein-RNA-Interaktionen *in vivo* zu detektieren. Hierzu wird Venus2 mit dem Hüllprotein des MS2-Bakteriophagen MS2BP fusioniert. Die Immunodetektion erfolgt über einen HA-*tag* (V2-HA-MS2BP). Außerdem wird eine Fusion von Venus1 mit dem potentiellen RNA-Bindeprotein (RBP) hergestellt, zur Detektion des überexprimierten Proteins wird hier ein FLAG-*tag* verwendet (V1-FLAG-RBP). Der dritte Interaktionspartner ist eine Reporter-mRNA. Diese besteht aus einem offenen

Leserahmen (*open reading frame*, ORF), 6 MS2-*repeats* sowie einer spezifischen RNA-Sequenz (ORF-x-6MS2). Bindet das RBP spezifisch an die eingefügte RNA-Sequenz, so kommt es in räumliche Nähe zum MS2BP, welches die MS2-*repeats* bindet (Peabody, 1993). Hierdurch wird auch eine räumliche Nähe der beiden Teile des Venus-Proteins erzeugt, die eine Rekonstitution des fluoreszierenden Proteins ermöglicht (Rackham und Brown, 2004; Stöhr *et al.*, 2006). Der TriFC-Assay ist schematisch in Abb. 3.18 dargestellt. Es wurden folgende Konstrukte transfiziert: 40 µg ORF-ctrl-6MS2 oder ORF-DICE-6MS2, 10 µg V2-HA-MS2BP und 10 µg V1-FLAG-RBP.

Lokalisierung exogener Reporter-mRNAs

Um die Lokalisierung exogener mRNAs in Abhängigkeit von bestimmten Sequenzelementen in K562-Zellen zu untersuchen, wurde folgendes Experiment durchgeführt (Stöhr *et al.*, 2006). Die Konstrukte ORF-ctrl-6xMS2 bzw. ORF-DICE-6xMS2 wurden mit GFP-NLS-MS2BP co-transfiziert. Durch die Fluoreszenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) kann die Lokalisierung der exogenen RNA verfolgt werden, da das MS2BP die MS2-*repeats* bindet. Das nukleäre Lokalisierungssignal (NLS) dient der Reduktion des Hintergrunds im Cytoplasma: GFP-NLS-MS2BP, das nicht an RNA gebunden ist, lokalisiert im Zellkern. Dies war aufgrund der Verwendung von K562-Zellen besonders wichtig, da der große Zellkern nur von einem schmalen Cytoplasmasaum umgeben wird. Es wurden jeweils 20 µg der Konstrukte transfiziert.

2.10 Fluoreszenz-Mikroskopie

2.10.1 Immunfluoreszenz-Färbung

Mittels Immunfluoreszenz-Färbungen kann man mit Hilfe spezifischer Antikörper Proteine innerhalb von Zellen nachweisen und so Aussagen über die Lokalisierung und die Abundanz des Proteins in der Zelle treffen.

Sowohl K562-Zellen als auch CD34⁺-Zellen wachsen in Suspension. Zur Färbung wurden sie daher auf Deckgläschen zentrifugiert, die zunächst mit rauchender Salzsäure vorbehandelt und dann mit 0,01%iger poly-L-Lysin-Lösung (Sigma-Aldrich) beschichtet wurden (30 min, 37°C) um die Haftung der Zellen zu verbessern. K562-Zellen wurden 5 min bei 500 g, RT abzentrifugiert, CD34⁺-Zellen 5 min bei 700 g, RT. Um eine optimale Anheftung der Zellen zu gewährleisten, wurden sie 30 min bei 37°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS (siehe 2.1.9) wurden die Zellen fixiert (4% PFA in PBS (Sigma-Aldrich), 30 min, RT). Das Fixativ wurde durch zwei Waschschrte mit PBS entfernt und die Zellen mit Triton X-100 permeabilisiert (5 min, RT). Für die Permeabilisierung von K562-Zellen wurden 0,2% Triton X-100 verwendet, für CD34⁺-

Zellen 0,5%. Nach dem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2% BSA in PBS geblockt (25 min, RT). Anschließend erfolgte die Inkubation mit den primären Antikörpern (siehe Tab 7.2.1) in 0,2% BSA in PBS (1 h, 37°C). Unspezifisch gebundener Antikörper wurde durch vier Waschschriffe mit PBS entfernt, bevor die Inkubation mit Fluoreszenzmarkierten Sekundär-Antikörpern erfolgte (1 h, 37°C in 0,2% BSA in PBS, siehe Tab. 7.2.3). Danach wurden die Deckgläschen gewaschen, getrocknet und mit *ProLong Gold Antifade reagent with DAPI* (Invitrogen) auf Objektträgern fixiert.

DAPI (4,6-Diamidino-2-phenylindol) ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der an Chromatin bindet und so eine Anfärbung des Zellkerns ermöglicht (Schweizer und Nagl, 1976). DAPI interkaliert vor allem in die AT-reichen Regionen der DNA (Müller und Gautier, 1975).

2.10.2 Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung

Die Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) dient der Detektion spezifischer mRNAs innerhalb von Zellen. Hierzu wurden sequenzspezifische DNA-Sonden einer Länge von 30 Nukleotiden verwendet, die am 5'- und 3'-Ende mit einem Biotin-Molekül markiert sind (MWG). Pro mRNA wurden drei Sonden verwendet (siehe Tab. 7.4). Polyadenylierte RNAs wurden mittels biotinyliertem dT₃₀ nachgewiesen. Über die spezifische Interaktion von Biotin mit FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-markiertem Streptavidin wurden die Sonden detektiert.

Nach der Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen erfolgte eine erneute Fixierung (4% PFA in PBS, 10 min, RT). Anschließend wurde je zweimal mit PBS und 2xSSC gewaschen. Die Hybridisierung mit den DNA-Sonden wurde über Nacht bei 42°C durchgeführt (Tab. 2.4).

Komponente	Volumen	Endkonzentration
10 mg/ ml Hefe-tRNA	6 µl	1 mg/ ml
10% BSA	6 µl	1%
20x SSC	6 µl	2x
12,5% Dextransulfat	12 µl	2%
Formamid	21 µl	35%
100 ng/ µl Sonde	2 µl	3,3 ng/ µl
DEPC-H ₂ O	7 µl	
Endvolumen	60 µl	

Tab. 2.4: Hybridisierungs-Ansatz

Nach dem Waschen mit 2xSSC wurden die Deckgläschen mit zunächst in 0,1% Triton X-100/ 4xSSC vorbehandelt (5 min, RT) und dann mit ExtrAvidin-FITC (Sigma-Aldrich, 1:400 in 1%BSA/ 4xSSC, 1 h, RT) inkubiert. Nach mehreren Waschschriffen (4xSSC, 2xSSC, PBS) wurden die Deckgläschen getrocknet und mit *ProLong Gold Antifade reagent with DAPI* auf Objektträgern fixiert.

20x SSC

3 M NaCl

300 mM Natriumcitrat

pH 7,0

2.10.3 Weitere Fluoreszenz-Färbungen

Färbung funktionaler Mitochondrien

Funktionale Mitochondrien wurden mit MitoTracker Orange CM-H₂TMRos (Invitrogen) gefärbt. Es handelt sich hierbei um einen Farbstoff, der in aktiven Mitochondrien konzentriert und während der Fixierung der Zellen zurückgehalten wird. Die reduzierte Form des MitoTrackers fluoresziert nicht. Nach der Aufnahme in eine Zelle, die aktiv Respiration betreibt, wird der Mitotracker in die oxidierte, fluoreszierende Form umgewandelt und in die Mitochondrien aufgenommen (Poot *et al.*, 1996).

250 nM MitoTracker Orange wurde 45 min bei 37°C mit K562-Zellen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen in Kulturmedium resuspendiert, auf poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen zentrifugiert und für weitere Färbungen verwendet (siehe 2.10.1).

Färbung des Aktin-Cytoskeletts

Phalloidin-TRITC (Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat) (Sigma-Aldrich) wurde verwendet um das Aktin-Cytoskelett anzufärben. Phalloidin ist eines der Toxine des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*). Phalloidin bindet an F-Aktin und stabilisiert die Aktin-Filamente (Lengsfeld *et al.*, 1974; Dancker *et al.*, 1975).

Die Inkubation mit Phalloidin-TRITC erfolgte zusammen mit den sekundären Antikörpern (siehe 2.10.1). Hierzu wurde Phalloidin-TRITC 1:1000 verdünnt.

2.10.4 Analyse der Fluoreszenz-Färbungen

Bei den verschiedenen Fluoreszenz-Färbungen wurde mit Fluorophoren gearbeitet, die unterschiedliche Anregungs- und Emissionsmaxima haben. Diese sind in Tab. 2.5 zusammengefasst:

Fluorophor	Anregung	Emission
DAPI	358 nm	461 nm
GFP	488 nm	508 nm
FITC	495 nm	528 nm
Alexa488	499 nm	520 nm
Venus	515 nm	528 nm
MitoTracker Orange	554 nm	576 nm
Cy3	553 nm	565 nm
TRITC	552 nm	577 nm
Cy5	648 nm	666 nm

Tab. 2.5: Anregungs- und Emissionsmaxima verwendeter Fluorophore

Für Epi-Fluoreszenz-Aufnahmen der Färbungen wurden entweder ein Axiovert 200M- oder ein AxioStar-Mikroskop (beide Carl Zeiss) ausgestattet mit den entsprechenden Filtern und digitalen Kameras verwendet. Die Dokumentation der Aufnahmen erfolgte mit der Software AxioVision 4.7.

Für konfokale Aufnahmen wurde ein LSM 710 (Carl Zeiss) mit den folgenden Laserlinien und Filtereinstellungen verwendet:

Fluorophor	Laser	Detektion
DAPI	405 nm	410-492 nm
FITC	488 nm	493-542 nm
Cy3	514 nm	552-650 nm
Cy5	633 nm	638-759 nm

Tab. 2.6: Einstellungen am LSM 710

Die Aufnahme der einzelnen Kanäle erfolgte separat. Die Dicke der optischen Schnitte betrug 1 μm . Für die Erfassung der Bilder wurde die Software ZEN 2009 verwendet.

Die Zusammenstellung der Aufnahmen erfolgt mit Corel Technical Suite 12/14.

2.11 Immunopräzipitation

Für die Immunopräzipitation von hnRNP K aus cytoplasmatischem K562-Extrakt wurden ein α -hnRNP K (Santa Cruz, D-6)- sowie ein Kontroll-Antikörper (α -Fyn, Santa Cruz, 15) zunächst kovalent an Protein A-Sepharose gekoppelt. Anschließend erfolgte die eigentliche Immunopräzipitation.

2.11.1 Kovalente Kopplung von Antikörpern an Protein A-Sepharose

Die kovalente Kopplung der α -hnRNP K- und α -Fyn-Antikörper an Protein A-Sepharose (CL-4B, GE Healthcare) wurde in Anlehnung an Schneider *et al.*, 1982 durchgeführt. Pro μ g Extrakt, das in der Ipp eingesetzt werden sollte, wurden 10 ng Antikörper gekoppelt. Alle Inkubationsschritte erfolgten bei RT auf einem Drehrad.

Der Antikörper wurde zunächst an 40 μ l Protein A-Sepharose-Suspension (1:1) gebunden (1 h). Die Suspension wurden anschließend zweimal mit 0,2 M Natriumborat, pH 9,15 gewaschen und in 0,2 M Natriumborat, pH 9,15 resuspendiert. Zur kovalenten Kopplung des Antikörpers wurde Dimethylpimelimidat (Sigma-Aldrich) mit einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben (30 min). Anschließend wurde die Sepharose mit 0,2 M Ethanolamin gewaschen und 2 h mit 0,2 M Ethanolamin inkubiert, um alle Bindestellen abzusättigen. Die Antikörper-gekoppelte Protein A-Sepharose wurde mit einem Volumen PBS versetzt und bis zur weiteren Verwendung bei 4°C gelagert.

2.11.2 Immunopräzipitation von hnRNP K

hnRNP K wurde sowohl aus cytoplasmatischen K562-Extrakten als auch aus Saccharose-Gradienten-Fractionen immunopräzipitiert. Alle Schritte wurden im Kühlraum durchgeführt, die Inkubationen fanden auf einem Drehrad statt.

40 μ l Protein A-Sepharose-Suspension, gekoppelt mit hnRNP K- oder Kontroll-Antikörper, wurden in 500 μ l Ipp-Puffer mit cytoplasmatischem Extrakt inkubiert (90 min). Saccharose-Gradienten-Fractionen wurden für die Immunopräzipitation 1:1 mit Verdünnungs-Puffer verdünnt, um die Pufferbedingungen anzupassen und die Saccharose-Konzentration zu reduzieren. Anschließend wurde die Protein A-Sepharose zweimal mit Ipp-Puffer gewaschen. Für massenspektrometrische Analysen wurde außerdem zweimal mit Ipp-Puffer ohne Triton X-100 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose entweder in SDS-Probenpuffer aufgenommen oder die co-immunopräzipitierte RNA mittels Trizol isoliert (siehe 2.6.1).

<u>Ipp-Puffer</u>	<u>Verdünnungs-Puffer</u>
20 mM HEPES pH 7,4	20 mM HEPES pH 7,4
100 mM KCl	50 mM KCl
5 mM Magnesiumacetat	5 mM Magnesiumacetat
0,025% Triton X-100	0,05% Triton X-100
1 mM DTT	1 mM DTT
1 mM PMSF	1 mM PMSF
1 µg/ ml Leupeptin	1 µg/ ml Leupeptin

2.11.3 *Micrococcus*-Nuklease-Behandlung

Zur Analyse der RNA-Abhängigkeit der detektierten Interaktionen wurde die Immunopräzipitation mit einem Verdau der endogenen RNAs durch *Micrococcus*-Nuklease (MN) kombiniert.

Nach der Immunopräzipitation wurde die Protein A-Sepharose in 500 µl Ipp-Puffer resuspendiert und CaCl₂ mit einer Endkonzentration von 1 mM zugegeben. Der Verdau der RNA erfolgte durch die Inkubation mit 1,5 µl MN (300 U/ µl, Fermentas) (10 min, RT). Das Enzym wurde anschließend mit 2,5 mM EGTA inaktiviert und RNA-Fragmente durch Waschen mit Ipp-Puffer entfernt.

Parallel wurde auch cytoplasmatischer Extrakt, der 1:1 mit 2x Ipp-Puffer verdünnt wurde, mit MN verdaut. Pro 50 µl Extrakt wurden 1,5 µl Enzym eingesetzt. Der MN-behandelte Extrakt wurde zusammen mit 10 µg *in vitro*-transkribierter RNA (siehe 2.7) 30 min in Ipp-Puffer mit den MN-behandelten *beads* inkubiert, anschließend zweimal gewaschen und mittels Western Blot (siehe 2.5) analysiert.

2.12 Reinigung des hnRNP K-Spaltprodukts

Zur Identifizierung des hnRNP K-Spaltprodukts (siehe 3.4) sollte dieses aus cytoplasmatischem K562-Extrakt gereinigt werden. Vor der Extraktpräparation wurden K562-Zellen 16 h mit 5 µg/ ml Puromycin inkubiert. Western Blot-Analysen deuten darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt hnRNP K und das Spaltprodukt im Verhältnis 1:1 vorliegen (siehe 3.4), vorausgesetzt, dass der Antikörper beide Proteine in gleichem Maße erkennt. Für die Reinigung wurden 5 Extraktpräparationen vereinigt, die für die Reinigung eingesetzte Gesamt-Proteinmenge betrug ca. 250 mg. Bei allen Präparationen war das erwartete Verhältnis von hnRNP K und Spaltprodukt vorhanden (siehe Abb. 7.1). Die Aufreinigung des Spaltprodukts erfolgt in Anlehnung an die bereits etablierte Reinigung von hnRNP K aus murinen ES-Zellen (Moritz, unpubliziert).

Der cytoplasmatische Extrakt wurde 30 min bei 20.800 g, 4°C zentrifugiert und auf eine DEAE-Sepharose-Säule geladen (GE Healthcare, 9 ml Säulenvolumen). Die gebundenen Proteine wurden mit einem Gradienten von 50 mM bis 500 mM KCl in Puffer A eluiert. Es wurden 40 Fraktionen á 1,75 ml gesammelt und in Western Blot-Analysen auf die Menge an hnRNP K-Spaltprodukt überprüft (siehe Abb. 7.2).

Die hnRNP K-Spaltprodukt-enthaltenden Fraktionen 6-9 wurden vereinigt und 1:1 mit 75 mM KCl, 20 mM Tris pH 8,0, 10% Saccharose verdünnt. Hierdurch wurde die KCl-Konzentration auf ca. 100 mM eingestellt. Außerdem wurden 1 mM DTT und 1x Protease-Inhibitoren inkl. EDTA (Roche) zugesetzt. Die gepoolten Fraktionen wurden auf eine Heparin-Sepharose-Säule (GE Healthcare, 5 ml Säulenvolumen) geladen und die gebundenen Proteine mit einem Gradienten von 100 mM bis 640 mM KCl in Puffer A eluiert. Die Elution erfolgte in 36 Fraktionen á 0,75 ml, die mittels Western Blot auf hnRNP K-Spaltprodukt untersucht wurden (siehe Abb. 7.3).

Fraktionen 10-14 wurden gepoolt und auf eine Hydroxyapatit-Säule (Biorad, 6 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Die Säule wurde mit Puffer B gewaschen und die gebundenen Proteine mit einem Gradienten von 0% auf 50% Puffer C eluiert. Es wurden 25 Fraktionen á 1 ml gesammelt und das hnRNP K-Spaltprodukt im Western Blot detektiert (Abb. 7.4).

Fraktionen 6 und 7 wurden 1:1 mit Puffer D verdünnt und auf eine MonoQ-Säule (GE Healthcare, 1 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem Gradienten von 100 mM auf 500 mM KCl in Puffer D (31 Fraktionen á 0,3 ml) (siehe Abb. 7.5).

Fraktionen 9 und 10 wurden in NuPAGE-Probenpuffer aufgenommen, tryptisch verdaut und mittels Massenspektrometrie analysiert (siehe 2.14).

Puffer A

20 mM Tris pH 8,0
10% Saccharose

Puffer B

150 mM KCl
20 mM Imidazol pH 8,0 (20°C)
5% Saccharose

Puffer C

500 mM Kalium-Phosphat pH 8,0 (20°C)
5% Saccharose

Puffer D

10 mM HEPES pH 7,5 (bei 15°C)
10 mM Tris
10% Saccharose

2.13 hnRNP K-Spaltungs-Assay

Um die Spaltung von hnRNP K weiter zu untersuchen, wurde ein *in vitro*-Spaltungs-Assay etabliert. 100 ng His-hnRNP K (Bodo Moritz) wurden mit 40 µg cytoplasmatischem K562-Extrakt inkubiert. Der verwendete Extrakt wurde aus K562-Zellen präpariert, die 16 h mit 5 µg/ml Puromycin behandelt wurden. Die Reaktionen wurden in Ipp-Puffer (siehe 2.10.2) bei 30°C oder 37°C inkubiert und nach unterschiedlichen Zeitpunkten durch die Zugabe von 2x SDS-Probenpuffer (siehe 2.4.2) abgestoppt. In einigen Fällen wurde außerdem ein ATP-regenerierendes System zugesetzt (0,8mM ATP, 0,1 mM GTP, 20 mM Kreatinphosphat, 40 ng/µl Kreatin-Kinase).

Der Nachweis des hnRNP K-Spaltprodukts erfolgte mittels eines Western Blots gegen den N-terminalen His-tag des rekombinanten hnRNP K.

2.14 Massenspektrometrische Analyse

Die massenspektrometrischen Analysen wurden im Labor von Henning Urlaub (Max-Planck-Institut für Biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt.

Nach der Elution von der MonoQ-Säule wurde das hnRNP K-Spaltprodukt in NuPAGE-Probenpuffer (Invitrogen) aufgenommen und auf einem 4-12% NuPAGE Bis-Tris-Gel (Invitrogen) aufgetrennt. Nach der Färbung mit Colloidal Coomassie (siehe 2.3.2) wurde die Bande von ca. 48 kD ausgeschnitten, mit Trypsin (Roche) verdaut und nach Shevchenko *et al.*, 1996 extrahiert. Die extrahierten Peptide wurden mittels HPLC-Kapillarelektrophorese gekoppelt mit ESI-Q-TOF (Ultima, Waters) analysiert. Die Zuordnung der Peptide und Datenanalyse erfolgte mit Mascot (www.matrixscience.com).

2.15 Microarray-Analyse

Die Microarray-Analysen wurden im Labor von Vladimir Benes (EMBL, Heidelberg) von Tomi Bähr-Ivacevic durchgeführt.

RNA, die mit hnRNP K co-immunopräzipitierte, wurde mittels Trizol isoliert. Nach einer Qualitätskontrolle wurde sie in cDNA umgeschrieben und für zwei Runden *in vitro*-Transkription in Anwesenheit biotinylierter Nukleotide eingesetzt. Die Biotin-markierte RNA wurde anschließend fragmentiert und mit einem Human Genome U133 Plus 2.0-Microarray-Chip (Affymetrix) hybridisiert. Nach dem Waschen und Färben wurden die Chips gescannt und die Daten mittels GeneSpring und ArrayStar (DNASStar) analysiert.

Die Microarray-Analyse wurde in Triplikaten durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1 Etablierung und Charakterisierung des K562-Zellsystems

3.1.1 Charakterisierung der erythroiden Reifung von K562-Zellen

In initialen Experimenten wurden bereits Hämin und Natrium-Butyrat als mögliche Induktoren einer erythroiden Reifung von K562-Zellen getestet. Es konnte gezeigt werden, dass die Behandlung von K562-Zellen mit 1,5 mM Natrium-Butyrat zur Synthese von Globin, einer Inhibition der Zellteilung und einer Abnahme der Menge an hnRNP K und hnRNP E1 führt (Naarmann, 2006). Im Folgenden wird die erythroide Reifung Natrium-Butyrat-induzierter K562-Zellen weitergehend charakterisiert.

Ein wichtiges Merkmal der Erythropoese ist die Synthese von Hämoglobin. In früheren Untersuchungen wurde gezeigt, dass induzierte K562-Zellen embryonales und fetales Hämoglobin, bestehend aus ϵ -, γ - und ζ -Globin, exprimieren (Rutherford *et al.*, 1981; Cioe *et al.*, 1981). Daher wurde mittels RT-PCR die Expression der Globin-mRNAs während der mit Natrium-Butyrat induzierten erythroiden Reifung über einen Zeitraum von acht Tagen analysiert (Abb. 3.1A). Die Expression der meisten untersuchten Globin-mRNAs nimmt während der Induktionszeit stark zu. Die Menge an β -Globin-mRNA bleibt jedoch konstant niedrig, in Übereinstimmung mit Beobachtungen, nach denen K562-Zellen kein adultes Hämoglobin, bestehend aus α - und β -Ketten, produzieren, obwohl das β -Globin-Gen intakt ist (Fordis *et al.*, 1984). Die Analyse von Tritonlysaten mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung zeigt, dass während der Induktion auch die Synthese von Proteinen mit einem Molekulargewicht von ca. 14 kD induziert wird. Vermutlich handelt es sich hierbei um Globine (Abb. 3.1B). Mit Hilfe der Benzidin-Färbung können Hämoglobin-positive Zellen detektiert werden (Lepehne, 1919, siehe 2.1.8). In nicht-induzierten K562-Zellen enthält ca. 1,4% der Zellen Hämoglobin, während der Induktion steigt der Anteil auf 85% am Tag 8 (Abb. 3.1C). Während der Induktion kann ab Tag 4 außerdem eine Rotfärbung der K562-Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt), ebenfalls ein Hinweis auf die Synthese von Hämoglobin.

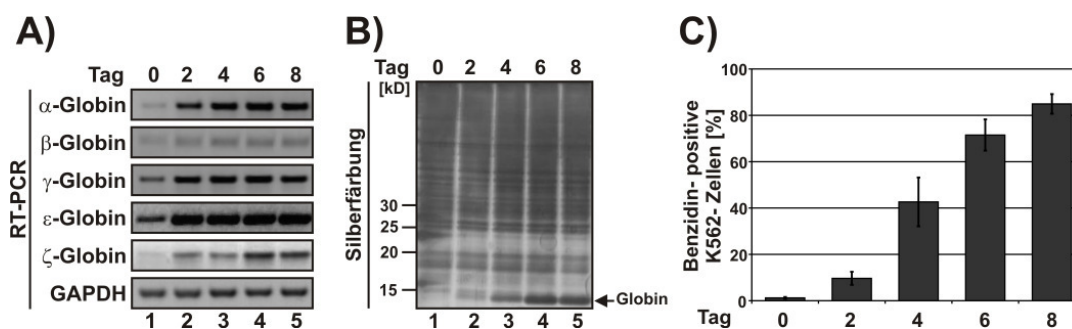


Abb. 3.1: Expression von Hämoglobin während der erythroiden Reifung von K562-Zellen.

Induktion der erythroiden Reifung von K562-Zellen mit 1,5 mM Natrium-Butyrat über einen Zeitraum von acht Tagen. A) Analyse der Expression von Globin-mRNAs sowie der GAPDH-mRNA mittels RT-PCR. B) Silberfärbung von K562-Lysaten, 15% SDS-PAGE. Globin als Marker für die erythroid-spezifische Genexpression ist markiert. C) Benzidin-Färbung Hämoglobin-positiver Zellen. Auszählung von je 200 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten. (Naarmann *et al.*, 2008).

Neben der Synthese von Hämoglobin sind der Kernausschluss und der Abbau der Mitochondrien weitere wichtige Kennzeichen der Erythropoese in Säugern. Modellsysteme zur erythroiden Reifung rekapitulieren häufig nur die frühen Stadien der Differenzierung vor dem Ausschluss des Zellkerns. Der Abbau der Mitochondrien, welcher durch das Enzym r15-LOX initiiert wird (Rapoport und Schewe, 1986; van Leyen *et al.*, 1998; Grüllich *et al.*, 2001), ist jedoch einer der letzten Schritte der Erythropoese. Daher wurde untersucht, ob während der induzierten erythroiden Reifung von K562-Zellen der Ausschluss des Zellkerns und ein Abbau der Mitochondrien detektiert werden können. Hierzu wurde das Cytoplasma mit einem Antikörper, der gegen α -Tubulin gerichtet ist, angefärbt. Die Zellkerne wurden durch DAPI-Färbung sichtbar gemacht, funktionale Mitochondrien durch die Inkubation der Zellen mit MitoTracker Orange (Abb. 3.2). Ab Tag 4 der Reifung konnten kernlose Zellen detektiert werden (Abb. 3.2, Pfeile). Die Auszählung von 700 K562-Zellen aus drei unabhängigen Experimenten ergab, dass am Tag 8 der erythroiden Reifung der Anteil kernloser Zellen 29% betrug. In weiteren 6% der Zellen war der Zellkern fragmentiert. Desweiteren konnten ab Tag 6 der Induktion Zellen detektiert werden, die keine Färbung funktionaler Mitochondrien mehr zeigten (Abb. 3.2, Pfeilspitzen). 22% der kernlosen Zellen enthielten am Tag 8 der erythroiden Reifung keine anfärbbaren Mitochondrien mehr (Naarmann *et al.*, 2008). Dies deutet darauf hin, dass mit Natrium-Butyrat induzierte K562-Zellen eine terminale erythroide Reifung durchlaufen.

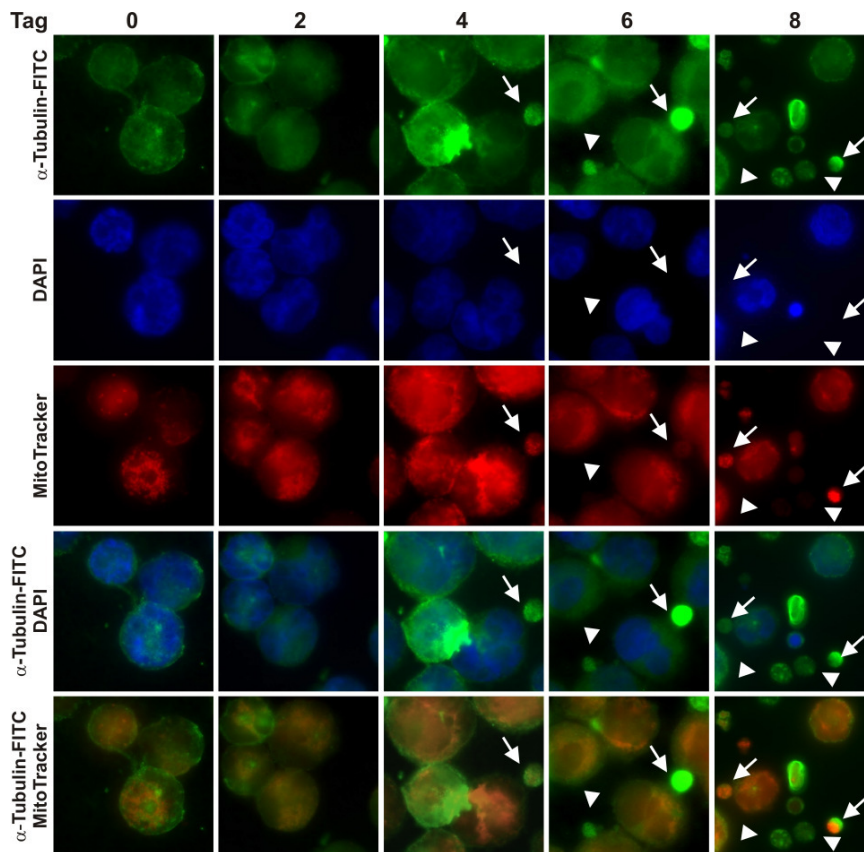


Abb. 3.2: Verlust von Zellkern und Mitochondrien während der induzierten erythroiden Reifung von K562-Zellen.

Immunfluoreszenzfärbung von K562-Zellen während der erythroiden Reifung, die mit 1,5 mM Natrium-Butyrat induziert wurde. Das Cytoplasma wurde mit einem α -Tubulin-Antikörper gefärbt, die Zellkerne mit DAPI und funktionale Mitochondrien mit MitoTracker Orange. Kernlose Zellen sind durch einen Pfeil gekennzeichnet; Zellen, die weder einen Zellkern noch Mitochondrien enthalten, durch eine Pfeilspitze. (Naarmann *et al.*, 2008).

Erythropoese und Apoptose ähneln sich in vielen morphologischen Veränderungen (Zamzami und Kroemer, 1999). Um auszuschließen, dass Natrium-Butyrat Apoptose in K562-Zellen induziert, wurde die Viabilität während der Induktion durch Trypanblau-Färbung bestimmt (Abb. 3.3). Die Viabilität der K562-Zellen ist während der Induktionszeit nicht beeinflusst (Naarmann *et al.*, 2008). Dies deutet daraufhin, dass keine Apoptose stattfindet, sondern K562-Zellen eine terminale erythroide Reifung durchlaufen.

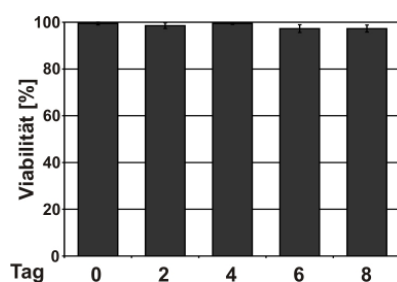


Abb. 3.3: Viabilität von K562-Zellen während der Behandlung mit Natrium-Butyrat.

Trypanblau-Färbung von K562-Zellen, die bis zu acht Tage mit 1,5 mM Natrium-Butyrat behandelt wurden. Auszählung von je 200 Zellen aus drei unabhängigen Experimenten.

3.1.2 Expression der r15-LOX während der erythroiden Reifung von K562-Zellen

K562-Zellen, die mit Natrium-Butyrat induziert wurden, zeigen eine terminale erythroide Reifung. Ein Abbau der Mitochondrien konnte ab Tag 6 detektiert werden (siehe 3.1.1). Daher wurde die Expression der humanen r15-LOX (hr15-LOX), die den Abbau der Mitochondrien initiiert, während der Reifung von K562-Zellen mittels RT-PCR und Western Blot analysiert (Abb. 3.4). Die hr15-LOX-mRNA kann bereits in nicht-induzierten K562-Zellen detektiert werden (Abb. 3.4A, oben), ihre Menge bleibt während der erythroiden Reifung konstant. Das hr15-LOX-Protein ist erst an den Tagen 6 und 8 nachweisbar (Abb. 3.4A, unten). Zu diesen Zeitpunkten kann auch ein Abbau der Mitochondrien beobachtet werden (siehe Abb. 3.2). Das glykolytische Enzym Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein sogenanntes *house keeping*-Gen, kann dagegen während der gesamten erythroiden Reifung nachgewiesen werden (Abb. 3.4A, unten). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Expression der hr15-LOX während der erythroiden Reifung von K562-Zellen translational kontrolliert wird (Naarmann *et al.*, 2008).

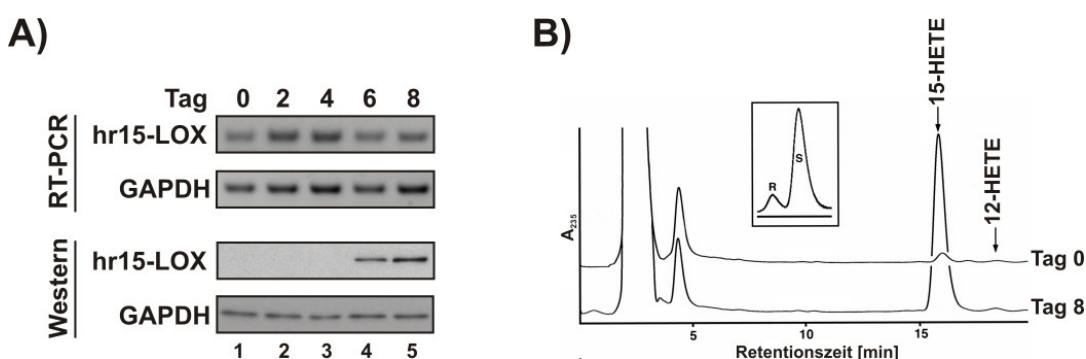


Abb. 3.4: Expression und enzymatische Aktivität von hr15-LOX während der erythroiden Reifung von K562-Zellen.

A) Oben: Detektion der endogenen hr15-LOX- und GAPDH-mRNA durch RT-PCR-Analyse. Unten: Detektion von hr15-LOX- und GAPDH-Protein in cytoplasmatischem Extrakt aus K562-Zellen in Western Blot-Analysen. B) Cytoplasmatischer Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen und Zellen am Tag 8 der Induktion wurde mit Arachidonsäure inkubiert. Die primären Reaktionsprodukte wurden mit Natrium-Borhydrid reduziert, um 15-Hydro(peroxy)-eicosatetraensäure als 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) zu stabilisieren und mittels HPLC auf einer Nucleosil C-18-Säule aufgetrennt. Die Detektion erfolgte durch Absorptionsmessung bei 235 nm. Kasten: Die Enantiomer-Zusammensetzung von 15-HETE wurde durch Chiralphasen-HPLC analysiert (Hartmut Kühn, Naarmann *et al.*, 2008).

Um zu überprüfen, ob die hr15-LOX in reifen K562-Zellen auch enzymatisch aktiv ist, wurde cytoplasmatischer K562-Extrakt aus nicht-induzierten Zellen und Zellen am Tag 8 der Induktion mit Arachidonsäure inkubiert und die Reaktionsprodukte mittels HPLC analysiert. In diesem Aktivitätstest, der von Hartmut Kühn (Charité, Berlin) durchgeführt wurde, konnte das hr15-LOX-Produkt 15-HETE nur am Tag 8 der Reifung detektiert werden (Abb. 3.4B, Naarmann *et al.*, 2008). Um auszuschließen, dass die Bildung von 15-HETE unspezifisch durch Häm katalysiert wird, wurde die Enantiomerzusammensetzung

mittels Chiralphasen-HPLC untersucht. Da der Anteil an 15(S)-HETE, dem erwarteten Produkt einer r15-LOX-katalysierten Reaktion, dominierte, konnte eine unspezifische Katalyse durch Häm ausgeschlossen werden (Abb. 3.4B, Kasten, Naarmann *et al.*, 2008).

Die Analyse der Expression von hr15-LOX-mRNA und Protein während der erythroiden Reifung von K562-Zellen legt nahe, dass die Regulation der Expression auf Translationsebene erfolgt. Es konnte gezeigt werden, dass die Translation von Reporter-mRNAs, die in ihrer 3'UTR humanes DICE (hDICE) bzw. Kaninchen-DICE (rDICE) tragen, in cytoplasmatischem Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen verglichen mit einer Kontroll-mRNA auf 42% bzw. 25% reduziert ist (Harnisch, 2010; Naarmann *et al.*, 2008; Naarmann *et al.*, 2010). Die Analyse von Translationsinitiationsreaktionen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation ergab, dass die Assemblierung von 80S-Ribosomen inhibiert ist, während die Bildung von 48S-Initiationskomplexen nicht beeinflusst wird (Harnisch, 2010; Naarmann *et al.*, 2010). In früheren Untersuchungen mit Kaninchen-Retikulozytenlysate (RRL) konnte gezeigt werden, dass hnRNP K und hnRNP E1 einzeln oder zusammen die Translation einer DICE-tragenden-mRNA durch die Blockade der Bindung der 60S-Untereinheit des Ribosoms inhibieren (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck *et al.*, 2001). Um zu analysieren, ob hnRNP K und hnRNP E1 auch in K562-Zellen die Translation der hr15-LOX-mRNA regulieren, wurde die Menge der beiden Proteine durch RNA-Interferenz (RNAi) reduziert. Der individuelle *knock down* von hnRNP K oder hnRNP E1 hat keinen Einfluss auf die hr15-LOX-Expression. Der simultane *knock down* von hnRNP K und hnRNP E1 führt jedoch zu einer De-Repression der hr15-LOX-Synthese in nicht-induzierten K562-Zellen (Abb. 3.5). Dies deutet darauf hin, dass hnRNP K und hnRNP E1 gemeinsam die Translation der r15-LOX-mRNA auch während der erythroiden Reifung von K562-Zellen kontrollieren (Naarmann *et al.*, 2008).

Diese Experimente zeigen, dass K562-Zellen ein geeignetes Modellsystem zur Untersuchung der erythroiden Reifung sind, welches wichtige Merkmale der Erythropoese wie Ausschluss des Zellkerns, Abbau der Mitochondrien und Regulation der hr15-LOX-mRNA-Translation durch hnRNP K und hnRNP E1 rekapituliert.

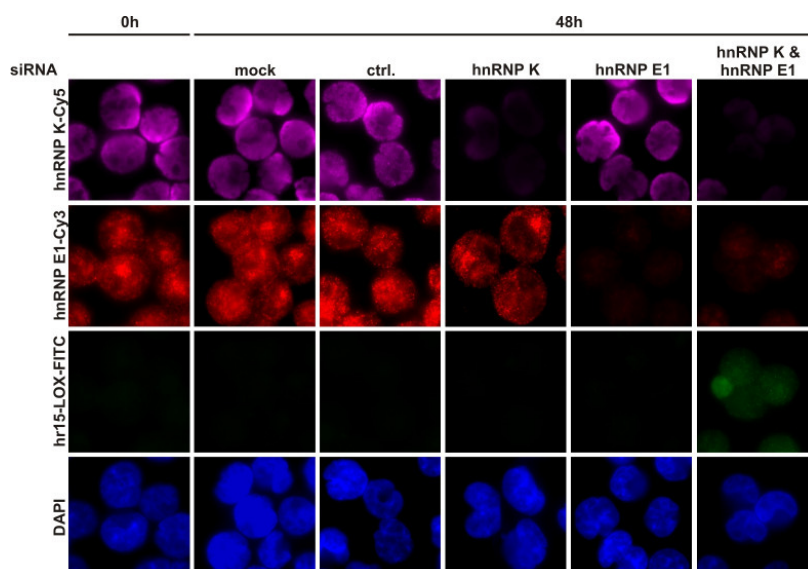


Abb. 3.5: Effekt des *knock downs* von hnRNP K und hnRNP E1 auf die hr15-LOX-Synthese. Nicht-induzierte K562-Zellen wurden mit einer Kontroll-siRNA (ctrl.) oder siRNAs gegen hnRNP K und hnRNP E1 transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen hnRNP K, hnRNP E1 und hr15-LOX analysiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. (Naarmann *et al.*, 2010).

3.1.3 Analyse der Expression bekannter Regulatoren der r15-LOX-Translation

In Western Blot-Analysen mit isolierten Knochenmarkszellen, Retikulozyten und Erythrozyten aus Kaninchen konnte eine Abnahme der Menge an hnRNP K und hnRNP E1 während der Erythropoese detektiert werden (Ostareck-Lederer, unpubliziert). Bisher ist nicht bekannt, wie die Expression der Proteine, die die r15-LOX-mRNA-Translation kontrollieren, während der humanen erythroiden Reifung reguliert wird. Daher wurden sowohl Expression als auch Änderungen post-translationaler Modifikationen in induzierten K562-Zellen analysiert.

Western Blot-Analysen zeigen, dass die Menge hnRNP K und hnRNP E1 während der erythroiden Reifung von K562-Zellen abnimmt (Abb. 3.6A). Dies deutet darauf hin, dass beide Proteine während der erythroiden Reifung abgebaut werden.

Die Aktivität von hnRNP K als Inhibitor der r15-LOX-mRNA-Translation ist unter anderem abhängig von seinem Methylierungsstatus. hnRNP K wird durch PRMT1 an fünf Argininen quantitativ asymmetrisch dimethyliert (siehe 1.2.3). Nicht-methyliertes hnRNP K interagiert mit der Kinase c-Src und aktiviert sie effizienter als die methylierte Form (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006; Adolph *et al.*, 2007). Um den Methylierungsstatus von hnRNP K während der erythroiden Reifung von K562-Zellen zu analysieren, wurde ein Peptid-Antikörper generiert, der spezifisch das nicht-methylierte Protein erkennt (non-R^{met} K, Naarmann *et al.*, 2008). Während der Reifung von K562-Zellen nimmt die Menge an nicht-methyliertem hnRNP K zu, obwohl die hnRNP K-Gesamtmenge abnimmt (Abb. 3.6A). Auch für die Methyltransferase PRMT1 kann eine Abnahme während der erythroiden Reifung detektiert werden (Abb. 3.6A). Die Methylierungsaktivität des

cytoplasmatischen Extraktes gegenüber hnRNP K ist am Tag 8 der Reifung im Vergleich zu Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen deutlich reduziert (Naarmann *et al.*, 2008). Die hnRNP K-mRNA wird während der gesamten erythroiden Reifung exprimiert. (Abb. 3.6B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die hnRNP K-mRNA während der erythroiden Reifung von K562-Zellen translatiert wird, das neu synthetisierte Protein jedoch aufgrund des Fehlens von PRMT1 nicht methyliert werden kann (Naarmann *et al.*, 2008).

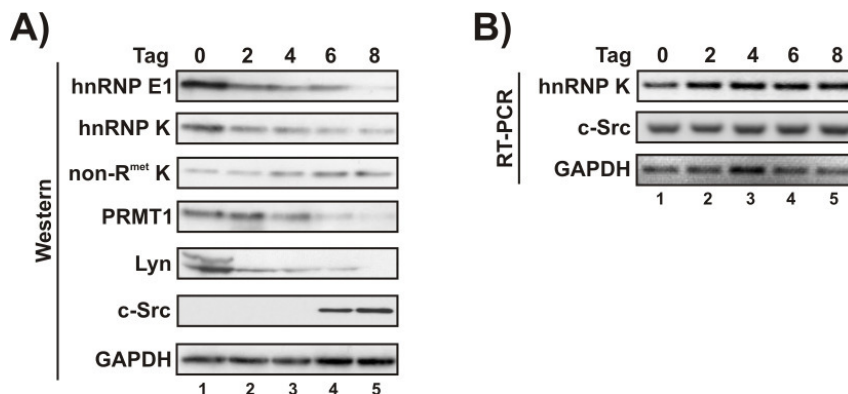


Abb. 3.6: Expression von Proteinen, die die r15-LOX-mRNA-Translation regulieren, während der induzierten erythroiden Reifung von K562-Zellen.

A) Cytoplasmatischer Extrakt aus K562-Zellen von Tag 0 bis 8 der erythroiden Reifung wurde durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Expression von hnRNP E1, hnRNP K, nicht-methyliertem hnRNP K (non-R^{met} K), PRMT1, Lyn, c-Src und GAPDH als Ladekontrolle wurde in Western Blot-Analysen untersucht. B) RT-PCR-Analyse der Expression der hnRNP K-, c-Src- und GAPDH-mRNA während der erythroiden Reifung von K562-Zellen. (Naarmann *et al.*, 2008).

Die Tyrosin-Kinase Lyn wird während der erythroiden Reifung von K562-Zellen abgebaut (Abb. 3.6A). Dies steht in Übereinstimmung mit früheren Beobachtungen, nach denen Lyn in Erythroblasten exprimiert, jedoch während der Erythropoese abgebaut wird (Ingley *et al.*, 2006). Die Tyrosin-Kinase c-Src kann jedoch nur an den Tagen 6 und 8 der Reifung detektiert werden (Abb. 3.6A). Da die c-Src-mRNA bereits zu Beginn der Induktion nachweisbar ist (Abb. 3.6B), besteht auch hier die Möglichkeit, dass die c-Src-mRNA-Translation reguliert wird. Nicht-methyliertes hnRNP K aktiviert c-Src und wird wiederum von der Tyrosin-Kinase phosphoryliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung des Tyrosin 458 inhibiert die DICE-Bindung von hnRNP K (Messias *et al.*, 2006) und ermöglicht so die Translation der r15-LOX-mRNA. Um zu untersuchen, ob hnRNP K durch c-Src phosphoryliert wird, wurde hnRNP K aus cytoplasmatischem K562-Extrakt von Tag 0 bis 8 der Reifung immunopräzipitiert und im Western Blot mit einem Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin (p-Tyr) analysiert (Abb. 3.7). Eine Phosphorylierung von hnRNP K konnte nur an den Tagen 6 und 8 der Reifung detektiert werden, an denen auch die Tyrosin-Kinase c-Src mit hnRNP K immunopräzipitiert (Abb. 3.7, Bahn 5 und 6).

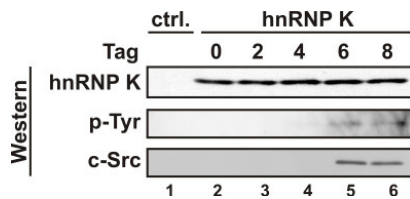


Abb. 3.7: Analyse der Tyrosin-Phosphorylierung und c-Src-Interaktion von hnRNP K während der erythroiden Reifung von K562-Zellen.

Immunopräzipitation mit einem Antikörper gegen hnRNP K (Bahn 2-5) oder einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (Bahn 1, ctrl.). Die immunopräzipitierten Proteine wurden mit Antikörpern gegen hnRNP K, phosphoryliertes Tyrosin (p-Tyr) und c-Src in Western Blot-Analysen untersucht. (Naarmann *et al.*, 2008).

3.1.4 Untersuchung der Expression der hr15-LOX und ihrer Translations-Regulatoren während der erythroiden Reifung von CD34⁺-Zellen

Bei K562-Zellen handelt es sich um Krebszellen, die aus einer Patientin mit CML isoliert wurden (Lozzio und Lozzio, 1975, siehe 1.1.2). Ihre erythroide Reifung wird nicht mit Erythropoetin, sondern durch die Inkubation mit 1,5 mM Natrium-Butyrat induziert. Daher sollte überprüft werden, ob das K562-Zellsystem physiologisch relevant und geeignet ist, die Regulation der hr15-LOX-mRNA-Translation weitergehend zu untersuchen. Hierzu wurde die Expression von hr15-LOX und der bekannten Regulatoren der r15-LOX-mRNA-Translation während der erythroiden Reifung von K562-Zellen mit der Expression während der erythroiden Reifung von primären humanen CD34⁺-Zellen verglichen. Die erythroide Reifung von CD34⁺-Zellen *in vitro* kann mit Erythropoetin induziert werden (Leberbauer *et al.*, 2005).

Vor Induktion der Reifung enthielten 2% der CD34⁺-Zellen Hämoglobin. Am Tag 6 der erythroiden Reifung stieg der Anteil Benzidin-positiver Zellen auf 78% (Abb. 3.8).

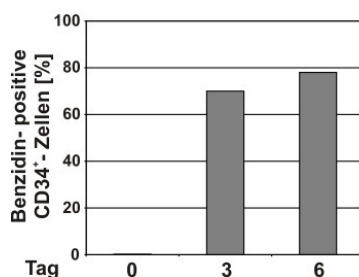


Abb. 3.8: Hämoglobin-Synthese während der erythroiden Reifung humaner CD34⁺-Zellen.

Der Anteil Hämoglobin-positiver Zellen wurde an den Tagen 0, 3 und 6 der erythroiden Reifung primärer humaner CD34⁺-Zellen durch Benzidin-Färbung bestimmt. (Naarmann *et al.*, 2008).

Da die isolierten CD34⁺-Zellen in Kultur nur wenige Zellteilungen durchliefen und so nur wenige differenzierte Zellen zur Verfügung standen, wurde die Expression der α -Globin-, hr15-LOX- und c-Src-mRNAs lediglich in nicht-induzierten Zellen und am Tag 6 der erythroiden Reifung bestimmt (Abb. 3.9). Während die Menge α -Globin-mRNA während

der Reifung deutlich zunimmt, bleibt die hr15-LOX- und c-Src-mRNA-Expression, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die für die induzierte erythroide Reifung von K562-Zellen gewonnen wurden, konstant (vgl. Abb. 3.1, 3.4 und 3.6).

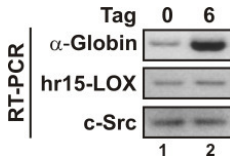


Abb. 3.9: Expression von α -Globin-, hr15-LOX und c-Src-mRNA während der erythroiden Reifung humaner CD34⁺-Zellen.

Die Expression der α -Globin-, hr15-LOX- und c-Src-mRNA wurde in nicht-induzierten primären humanen CD34⁺-Zellen und am Tag 6 der induzierten erythroiden Reifung mittels RT-PCR analysiert. (Naarmann *et al.*, 2008).

Aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Zellzahlen wurden die Expression der hr15-LOX und der Regulatoren der mRNA-Translation mittels Immunfluoreszenzmikroskopie analysiert. Als Marker für die erythroide Reifung wurden CD34 und Glycophorin A (GPA) genutzt. Die Expression von CD34 nimmt während der erythroiden Reifung ab (Kie *et al.*, 2003), während die Menge an Glycophorin A zunimmt (Kie *et al.*, 2003; Gahmberg *et al.*, 1978). Hr15-LOX ist in nicht-induzierten CD34⁺-Zellen und am Tag 3 der erythroiden Reifung nicht detektierbar. Erst am Tag 6, an dem auch kernlose Zellen detektiert werden können (Abb. 3.10, Pfeile), wird hr15-LOX-Protein exprimiert (Abb. 3.10).

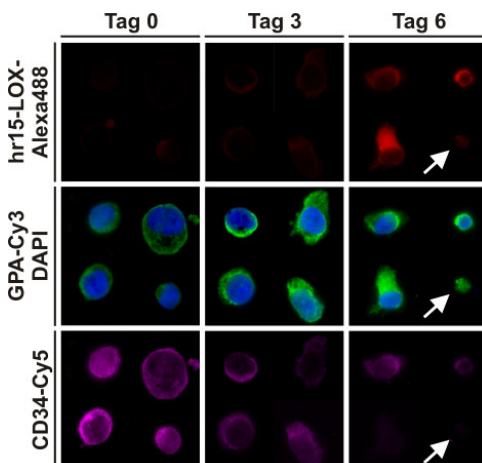


Abb. 3.10: Expression von hr15-LOX während der erythroiden Reifung von CD34⁺-Zellen.

Immunfluoreszenzfärbung von CD34⁺-Zellen an den Tagen 0, 3 und 6 der induzierten erythroiden Reifung mit Antikörpern gegen hr15-LOX, Glycophorin A (GPA) und CD34. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt. Aufgrund der geringen Zelldichte auf den Deckgläschen sind für jeden Zeitpunkt vier repräsentative Zellen gezeigt. Kernlose Zellen sind durch einen Pfeil markiert. (Naarmann *et al.*, 2008).

Weitere Immunfluoreszenzfärbungen zeigen, dass die Menge der beiden Inhibitoren der r15-LOX-mRNA-Translation hnRNP E1 (Abb. 3.11A) und hnRNP K (Abb. 3.11B) während

der erythroiden Reifung von primären humanen CD34⁺-Zellen abnimmt. Da sowohl der PRMT1- als auch der CD34-Antikörper in Kaninchen generiert wurden, wurde bei der Färbung von PRMT1 als Marker für die erythroide Reifung die Abnahme von hnRNP K detektiert. Auch die Menge an PRMT1 ist am Tag 6 der erythroiden Reifung deutlich geringer als in nicht induzierten CD34⁺-Zellen (Abb. 3.12A). Im Gegensatz dazu kann c-Src nur in späten Reifungsstadien detektiert werden (Abb. 3.12B).

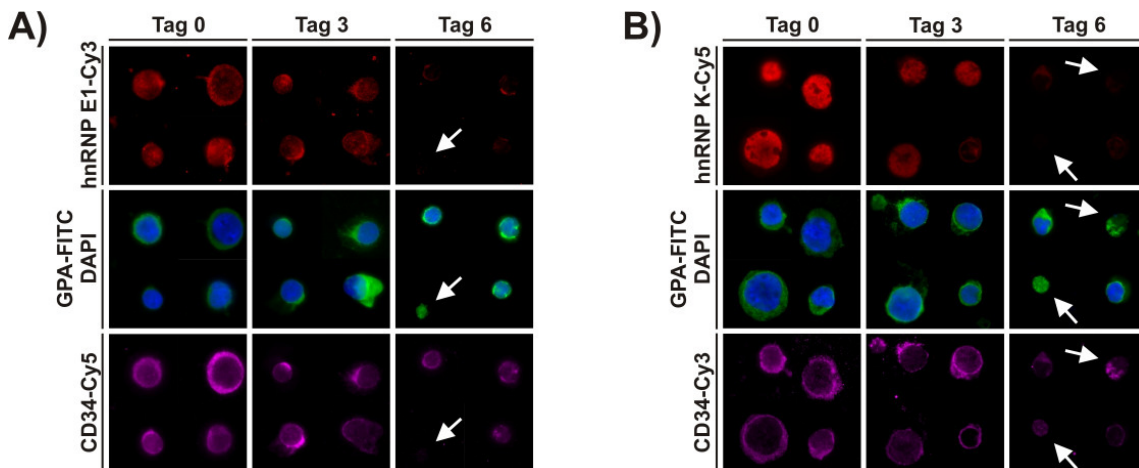


Abb. 3.11: Expression von hnRNP E1 und hnRNP K während der erythroiden Reifung von CD34⁺-Zellen.

Immunfluoreszenzfärbung während der erythroiden Reifung von CD34⁺-Zellen. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Die erythroide Reifung wurde durch Färbung von Glycophorin A (GPA) und CD34 verfolgt. Detektion von hnRNP E1 (A) und hnRNP K (B) mit spezifischen Antikörpern. Kernlose Zellen sind durch Pfeile markiert. (Naarmann *et al.*, 2008).

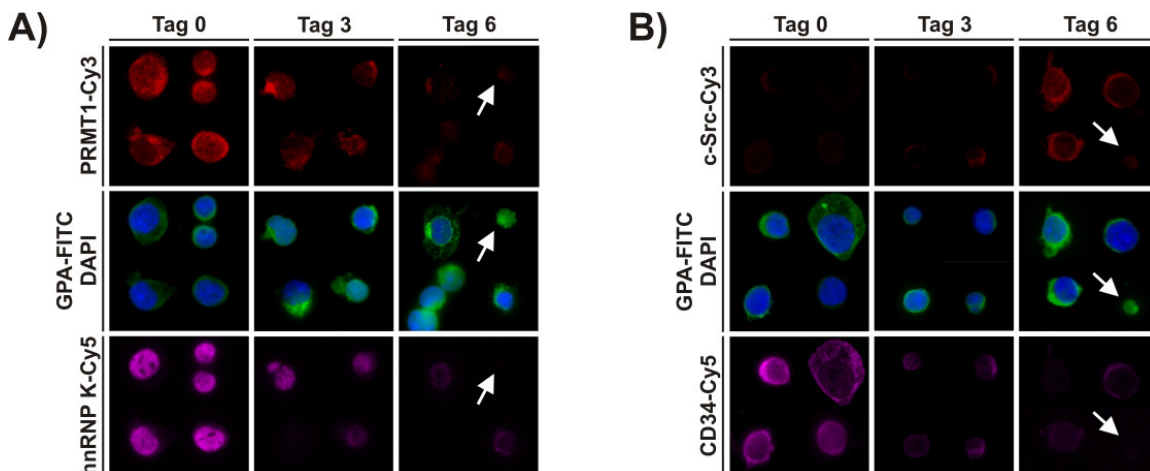


Abb. 3.12: Expression von PRMT1 und c-Src in CD34⁺-Zellen während der erythroiden Reifung.

Immunfluoreszenzfärbung von CD34⁺-Zellen an den Tagen 0, 3 und 6 der induzierten erythroiden Reifung. Färbung der Zellkerne mit DAPI. A) Detektion von PRMT1, Glycophorin A (GPA) und hnRNP K mit spezifischen Antikörpern. B) Detektion von c-Src, GPA und CD34 mit spezifischen Antikörpern. Kernlose Zellen sind durch einen Pfeil markiert. (Naarmann *et al.*, 2008).

Während der erythroiden Reifung von CD34⁺-Zellen konnten kernlose Zellen detektiert werden. Die Detektion von Zellen ohne Mitochondrien war nicht möglich, da der

Hintergrund bei der Färbung von CD34⁺-Zellen mit MitoTracker Orange sehr hoch war (nicht gezeigt). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die Induktion der erythroiden Reifung von primären humanen CD34⁺-Zellen die Ergebnisse bestätigt, die mit K562-Zellen gewonnen wurden.

3.2 Identifizierung neuer durch hnRNP K regulierter mRNAs

3.2.1 Regulation der Translation der c-Src-mRNA

Die Tyrosin-Kinase c-Src wird nur in späten Stadien der erythroiden Reifung exprimiert (siehe Abb. 3.6A, Abb. 3.12). Andererseits kann die c-Src-mRNA während der gesamten erythroiden Reifung von K562-Zellen detektiert werden (siehe Abb. 3.6B, Abb. 3.9). Dies lässt vermuten, dass die Expression von c-Src während der Erythropoese ebenfalls translational reguliert wird.

Die c-Src-mRNA-3'UTR enthält UCCC-Motive, die als potentielle RNA-Interaktionsstellen in hnRNP K identifiziert wurden (Backe *et al.*, 2005; Messias *et al.*, 2006). Daher wurde eine mögliche Funktion von hnRNP K in der posttranskriptionellen Regulation der c-Src-Expression analysiert. Hierzu wurde hnRNP K aus Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen und Zellen von Tag 8 der erythroiden Reifung immunopräzipitiert und die co-immunopräzipitierten mRNAs mittels RT-PCR analysiert. Die hr15-LOX-mRNA co-immunopräzipitiert mit hnRNP K am Tag 0, jedoch nicht am Tag 8 der erythroiden Reifung (Abb. 3.13, Bahn 2 und 5). Dies deutet daraufhin, dass hnRNP K nicht mit der translational aktiven hr15-LOX-mRNA interagiert.

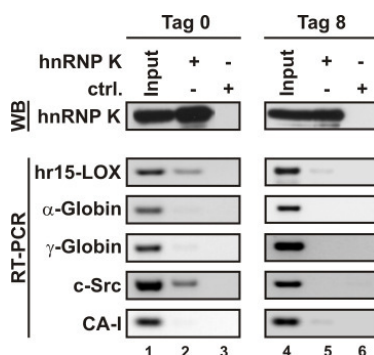


Abb. 3.13: Co-Immunopräzipitation der hr15-LOX- und c-Src-mRNA mit hnRNP K.

Immunopräzipitation mit einem α -hnRNP K- oder einem unspezifischen Kontroll-Antikörper (ctrl.) an den Tagen 0 und 8 der erythroiden Reifung von K562-Zellen. Detektion von hnRNP K in Western Blot-Analysen. Isolierung der co-immunopräzipitierten mRNAs mit Trizol und Detektion mittels RT-PCR. (Naarmann *et al.*, 2008).

Andere erythroid-spezifische mRNAs wie die α -Globin-, γ -Globin- und Carboanhydrase I (CA-I)-mRNA co-immunopräzipitieren nicht mit hnRNP K. Interessanterweise interagiert die c-Src-mRNA mit hnRNP K am Tag 0, jedoch nicht am Tag 8 der erythroiden Reifung

(Abb. 3.13).

Um eine mögliche direkte Interaktion von hnRNP K mit der c-Src-3'UTR zu untersuchen, wurde die 2000 nt-lange 3'UTR in drei Fragmente (Src1, Src2 und Src3) unterteilt (Abb. 3.14, Naarmann *et al.*, 2008). UV-Crosslink-Experimente mit [³²P]-markierter RNA und rekombinatem hnRNP K zeigten, dass hnRNP K spezifisch mit Fragment Src3 interagiert. Nur Src3 und das DICE, nicht aber Src1 und Src2 konnten die hnRNP K-Src3-Interaktion kompetitieren (Naarmann *et al.*, 2008).



Abb. 3.14: Schematische Darstellung der c-Src-mRNA.

Die c-Src-mRNA-3'UTR wurde in drei Fragmente unterteilt: Src1 (Nukleotide 1-600), Src2 (Nukleotide 601-1200) und Src3 (Nukleotide 1201-2038). (Naarmann *et al.*, 2008).

In vitro-Translationsexperimente in cytoplasmatischem Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen zeigten, dass die Translation einer Src3-tragenden Reporter-mRNA verglichen mit einer Kontroll-mRNA auf 49% reduziert ist. Diese Reduktion der Translation ist nicht auf eine verringerte Stabilität der Src3-tragenden mRNA zurückzuführen (Naarmann *et al.*, 2008). Bei der Analyse von Translationsinitiationsreaktionen mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation wurde festgestellt, dass die Bildung von 80S-Ribosomen inhibiert ist (Naarmann *et al.*, 2008).

Da hnRNP K die c-Src-mRNA-3'UTR bindet und die Translation der c-Src-mRNA auf der Stufe der Initiation in cytoplasmatischem K562-Extrakt aus nicht-induzierten Zellen inhibiert ist, wurde die Funktion von hnRNP K als Regulator der c-Src-mRNA-Translation mittels RNA-Interferenz *in vivo* analysiert. Der *knock down* von hnRNP K, nicht aber von hnRNP E1 führt zu einer De-Repression der c-Src-Synthese, wie Western Blot- und Immunfluoreszenz-Analysen zeigen (Abb. 3.15). Dies deutet darauf hin, dass im Gegensatz zur Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation nur hnRNP K, nicht aber hnRNP E1 einen inhibitorischen Effekt hat.

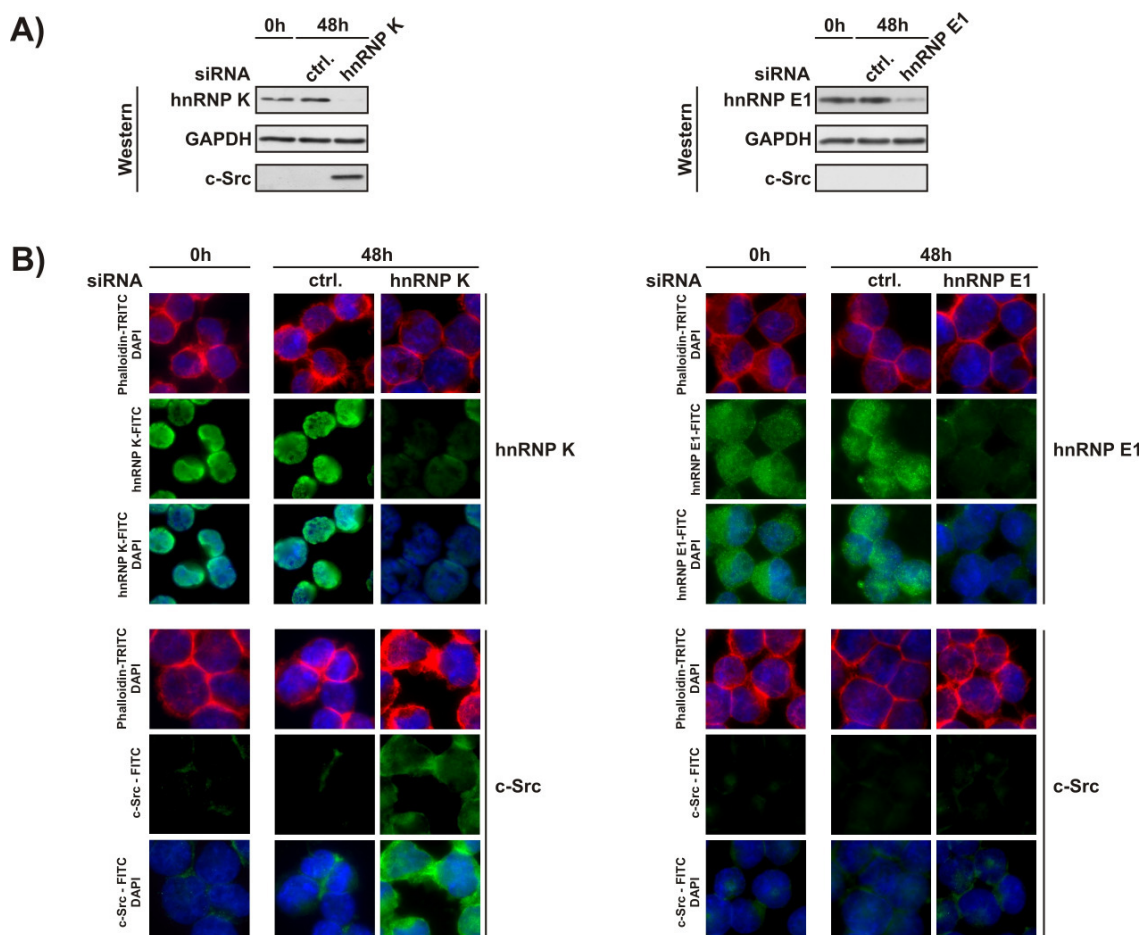


Abb. 3.15: Einfluss der Reduktion von hnRNP K und hnRNP E1 durch RNA-Interferenz auf die c-Src-Synthese.

Nicht-induzierte K562-Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl.) oder siRNAs gegen hnRNP K und hnRNP E1 transfiziert. A) Detektion von hnRNP K, hnRNP E1, c-Src und GAPDH als Ladekontrolle in Western Blot-Analysen in nicht-transfizierten K562-Zellen und 48 Stunden nach der Transfektion. B) Analyse von nicht-transfizierten K562-Zellen und 48 Stunden nach der Transfektion mittels Immunfluoreszenzfärbung. Färbung des Cytoplasmas mit Phalloidin-TRITC. Detektion der Zellkerne mit DAPI. Immunfluoreszenzfärbung von hnRNP K, hnRNP E1 und c-Src mit spezifischen Antikörpern. (Naarmann *et al.*, 2008).

3.2.2 Identifizierung weiterer durch hnRNP K regulierter mRNAs

hnRNP K konnte als Regulator der c-Src-mRNA-Translation während der erythroiden Reifung identifiziert werden. Sowohl die c-Src-mRNA als auch die hr15-LOX-mRNA co-immunopräzipitieren mit hnRNP K (siehe 3.2.1). Zur Identifizierung neuer Interaktionspartner wurde daher die Immunopräzipitation von hnRNP K mit einer Microarray-Analyse kombiniert.

Die Immunopräzipitation wurde je dreimal mit K562-Extrakten aus nicht-induzierten Zellen und Zellen am Tag 8 der erythroiden Reifung mit einem hnRNP K-spezifischen sowie einem Kontroll-Antikörper durchgeführt und die co-immunopräzipitierte RNA mit der Trizol-Methode (siehe 2.6.1) isoliert. Input, hnRNP K- und Kontroll-Immunopräzipitation wurden mit Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0-Microarraychips hybridisiert. Die Microarray-Analysen wurden im Labor von Vladimir Benes (EMBL, Heidelberg)

durchgeführt.

Die Rohdaten wurden zunächst auf ihre statistische Signifikanz überprüft. Für die weitere Analyse wurden nur Gene berücksichtigt, deren p -Wert $< 0,05$ betrug. Es konnten 159 Gene identifiziert werden, welche eine mindestens zweifache Anreicherung in der hnRNP K-Immunopräzipitation gegenüber der Kontroll-Immunopräzipitation zeigten (Abb. 3.16).

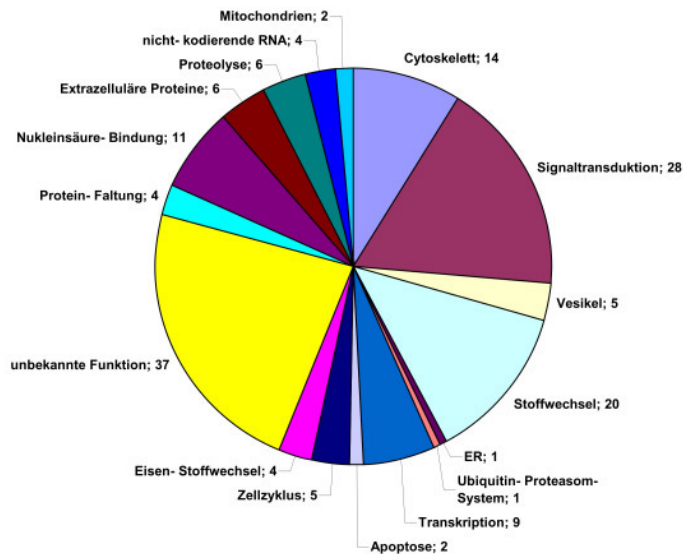


Abb. 3.16: Microarray-Analyse zur Identifizierung von mRNAs, die mit hnRNP K interagieren. Den 159 identifizierten Genen, die in der hnRNP K-Immunopräzipitation spezifisch angereichert waren, wurden zelluläre Funktionen zugeordnet.

Unter den identifizierten Genen waren unter anderem die 5-Lipoxygenase und die 12-Lipoxygenase. Auch vier mRNAs, die für Proteine kodieren, die eine Funktion im Eisenstoffwechsel haben, konnten identifiziert werden (Hydroxymethylbilan-Synthase, Coproporphyrinogen-Oxidase (Jordan, 1994), Biliverdin-Reduktase A (Maines, 2005) und Hephaestin (Conrad und Umbreit, 2000)). Interessanterweise haben 28 Proteine für die die identifizierten mRNAs kodieren, eine Funktion in der Signal-Transduktion, ebenso wie die bereits bekannte mit hnRNP K interagierende c-Src-mRNA. Unter diesen mRNAs sind die Inositolpolyphosphat-1-phosphatase (INPP1) (Inhorn *et al.*, 1987), das *RAS guanyl releasing protein 2* (RASGRP2) (Clyde-Smith *et al.*, 2000) und die Serin-Threonin-Kinase 11 (STK11) (Boudeau *et al.*, 2003). Die mögliche Regulation der Translation identifizierter mRNAs durch hnRNP K soll in einem weiterführenden Projekt untersucht werden.

3.3 Analyse der r15-LOX-Translationsregulation

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, den Mechanismus der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation weitergehend zu untersuchen. hnRNP K und hnRNP E1 inhibieren den letzten Schritt der Translationsinitiation, die Bindung der 60S-Untereinheit des Ribosoms an die 40S-Untereinheit, die am AUG lokalisiert ist, durch Bindung an das DICE-Element (siehe 1.2.3). Bisher ist nicht bekannt, wie der hnRNP K-hnRNP E1-DICE- Komplex, der in der 3'UTR lokalisiert ist, die Translations-Initiation am 5'Ende der mRNA kontrolliert.

Um weitere Komponenten des inhibitorischen Komplexes zu identifizieren, wurde von Christiane Harnisch eine RNA-Affinitätschromatographie, die sogenannte GRNA-Chromatographie (Czaplinski *et al.*, 2005; Duncan *et al.*, 2006), durchgeführt. Die GRNA-Chromatographie beruht auf der spezifischen Interaktion der BoxB-Elemente mit dem N-Terminus des Antiterminationsproteins N des Bakteriophagen λ (λ N) (Cilley und Williamson, 1997). λ N wurde als Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsprotein exprimiert und an Glutathion-Sepharose immobilisiert. Die verwendeten *in vitro*-transkribierten mRNAs enthielten sechs BoxB-Elemente sowie das DICE oder eine Kontroll-Sequenz in der 3'UTR. Die mRNAs wurden unter Translations-Bedingungen mit cytoplasmatischem K562-Extrakt inkubiert, um die Assemblierung von RNA-Protein-Komplexen zu erlauben. In Western Blot-Analysen konnte gezeigt werden, dass hnRNP K und hnRNP E1 nur mit der DICE-tragenden mRNA interagieren (Harnisch, 2010; Naarmann *et al.*, 2010). Nach der Elution der Komplexe mit Glutathion wurde eine hnRNP K-Immunopräzipitation als zweiter Reinigungsschritt angeschlossen. In massenspektrometrischen Analysen, die im Labor von Henning Urlaub (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) durchgeführt wurden, konnten 47 Proteine identifiziert werden, die spezifisch von der DICE-tragenden mRNA eluierten. Unter diesen waren wie erwartet hnRNP K und hnRNP E1 sowie DEAD-Box-Proteine und weitere RNA bindende bzw. prozessierende Proteine (Harnisch, 2010; Naarmann *et al.*, 2010).

3.3.1 DDX6 ist ein neuer Regulator der hr15-LOX-mRNA-Translation

Im Folgenden wird die Analyse einer möglichen Funktion der DEAD-Box-RNA-Helikase DDX6 in der Regulation der hr15-LOX-mRNA-Translation beschrieben. DDX6 wurde in massenspektrometrischen Analysen als ein DICE-abhängiger Interaktionspartner von hnRNP K identifiziert. DEAD-Box-RNA-Helikasen sind an verschiedenen RNA-abhängigen zellulären Prozessen, darunter Splicing, Ribosomen-Biogenese, RNA-Transport, RNA-Abbau und mRNA-Translation beteiligt. Außerdem können sie RNA-Strukturen und Protein-RNA-Interaktionen modulieren (Linder *et al.*, 1989; Linder, 2006; Linder und Lasko, 2006; Jankowsky und Bowers, 2006).

Um die in massenspektrometrischen Analysen nachgewiesene Interaktion zu verifizieren,

wurden zunächst Co-Immunopräzipitations-Analysen mit cytoplasmatischem Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen durchgeführt (Abb. 3.17). hnRNP K konnte spezifisch mit dem hnRNP K-Antikörper, nicht aber mit dem Kontroll-Antikörper immunopräzipitiert werden. DDX6 co-präzipitierte spezifisch, während das RNA-bindende Protein *TIA1-related protein* (TIAR) nicht in der hnRNP K-Immunopräzipitation detektiert werden konnte (Abb. 3.17, Bahn 4). Nach der Behandlung mit *Micrococcus*-Nuklease (MN) konnte keine Interaktion zwischen hnRNP K und DDX6 detektiert werden (Abb. 3.17, Bahn 6). Nach Inaktivierung der Nuklease konnte die Interaktion durch Zugabe von *in vitro*-transkribierter DICE-RNA, nicht aber Kontroll-RNA wiederhergestellt und sogar verstärkt werden. Auch eine spezifische Interaktion von hnRNP K mit hnRNP E1, nicht jedoch mit TIAR, wurde in Gegenwart der DICE-RNA detektiert (Abb. 3.17, Bahn 8-11).

In Filterbindungs-Experimenten wurde außerdem gezeigt, dass rekombinantes DDX6 direkt die DICE-RNA bindet (Moritz, unpubliziert).

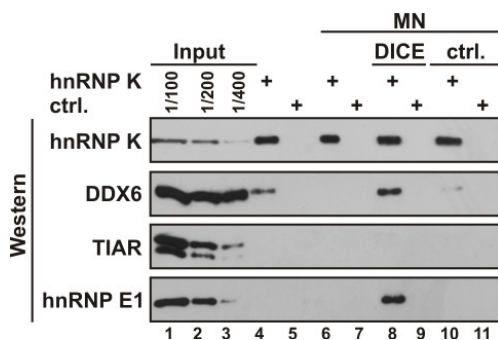


Abb. 3.17: Immunopräzipitation von hnRNP K und Detektion co-präzipitierter Proteine.

Immunopräzipitation mit einem hnRNP K- oder einem Kontroll-Antikörper aus cytoplasmatischem Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen. Bahn 6-11: Das Immunopräzipitat wurde mit *Micrococcus*-Nuklease (MN) behandelt, die anschließend mit EGTA inaktiviert wurde. Bahn 8 und 9: Zugabe von *in vitro*-transkribierter DICE-RNA und MN-behandeltem K562-Extrakt. Bahn 10 und 11: Zugabe von *in vitro*-transkribierter Kontroll-RNA und MN-behandeltem K562-Extrakt. Die gebundenen Proteine wurden in Western Blot-Analysen mit spezifischen Antikörpern untersucht. (Naarmann *et al.*, 2010).

Die DICE-Bindung von DDX6 sollte auch *in vivo* in K562-Zellen untersucht werden. Hierzu wurde die Trimolekulare Fluoreszenz-Komplementierung (TriFC) genutzt (siehe 2.9.2, Abb. 3.18).

Der TriFC-Assay wurde zunächst mit dem bekannten DICE-bindenden Protein hnRNP K etabliert. Eine Rekonstitution des Venus-Proteins konnte nur detektiert werden, wenn die DICE-tragende RNA co-transfiziert wurde, nicht aber mit der Kontroll-RNA (Abb. 3.19A). Anschließend wurde V1-FLAG-DDX6 für den TriFC-Assay verwendet. Eine spezifische Venus-Fluoreszenz konnte nur mit ORF-DICE-6MS2, nicht jedoch mit der Kontroll-RNA beobachtet werden. V1-FLAG-DDX6 ist hierbei in granulären Strukturen lokalisiert (Abb. 3.19B).

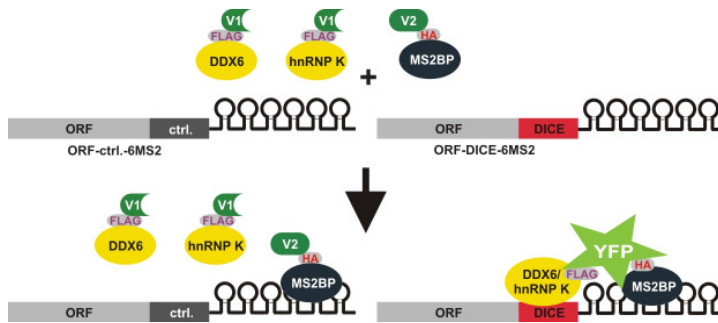


Abb. 3.18: Prinzip der Trimolekularen Fluoreszenz-Komplementierung (TriFC).

K562-Zellen wurden mit jeweils drei Plasmiden transfiziert. V2-HA-MS2BP kodiert für die C-terminale Hälfte des fluoreszierenden Venus-Proteins, die über einen HA-tag an das MS2BP fusioniert ist. V1-FLAG-RBP ist eine Fusion aus der N-terminalen Hälfte des Venus-Proteins, einem FLAG-tag, sowie dem potentiell RNA-bindenden Protein (V1-FLAG-hnRNP K, V1-FLAG-DDX6). Das dritte Konstrukt kodiert für eine Reporter-mRNA, die aus einem ORF und sechs MS2-repeats sowie dem DICE (ORF-DICE-6MS2) oder einer Kontroll-RNA-Sequenz (ORF-ctrl.-6MS2) besteht. V2-HA-MS2BP bindet an die Reporter-mRNA. Binden hnRNP K oder DDX6 ebenfalls an die mRNA, werden V1 und V2 in räumliche Nähe zueinander gebracht, was eine Rekonstitution des fluoreszierenden Venus-Proteins erlaubt. (Rackham und Brown, 2004; Stöhr *et al.*, 2006; Naarmann *et al.*, 2010).

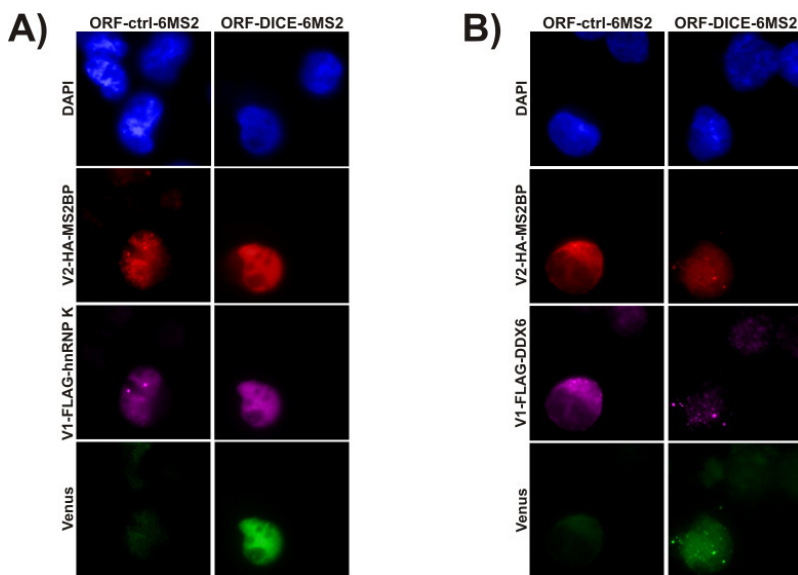


Abb. 3.19: Trimolekulare Fluoreszenz-Komplementierung in nicht-induzierten K562-Zellen.

Nicht-induzierte K562-Zellen wurden mit V1-FLAG-hnRNP K (A), V1-FLAG-DDX6 (B), V2-HA-MS2BP sowie ORF-ctrl.-6MS2 oder ORF-DICE-6MS2 transfiziert und 48 Stunden nach der Transfektion mittels Immunfluoreszenz-Färbung mit Antikörpern gegen FLAG oder HA analysiert. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Die Fluoreszenz des rekonstituierten Venus-Proteins ist in der letzten Reihe gezeigt. (Naarmann *et al.*, 2010).

DDX6 besteht aus zwei RecA-ähnlichen Domänen. Die N-terminale Domäne (D1) enthält das Q-Motiv, gefolgt von den Motiven I-III, Motiv II ist das namensgebende DEAD-Motiv. Die C-terminale Domäne (D2) enthält die Motive IV-VI (Banroques *et al.*, 2008; Cordin *et al.*, 2006). Mittels eines *tethering*-Assays konnte in *Xenopus*-Oozyten gezeigt werden, dass D2 für die Translations-Repression ausreichend ist (Minshall *et al.*, 2009). Um die DICE-Bindung von DDX6 weiter zu charakterisieren, wurden die DDX6-Domänen D1 und

D2 einzeln im TriFC-Assay untersucht. Nach Transfektion von D1 und D2 konnte jeweils ein diffuses Venus-Signal detektiert werden, unabhängig von dem co-transfizierten RNA-Konstrukt. Die charakteristische granuläre Venus-Fluoreszenz konnte jedoch nur für DDX6 wt und D2 detektiert werden, wenn ORF-DICE-6MS2 co-transfiziert wurde. Dies deutet darauf hin, dass D2 die Bindung von DDX6 an das DICE und die Lokalisierung in cytoplasmatische granuläre Strukturen vermittelt (Abb. 3.20).

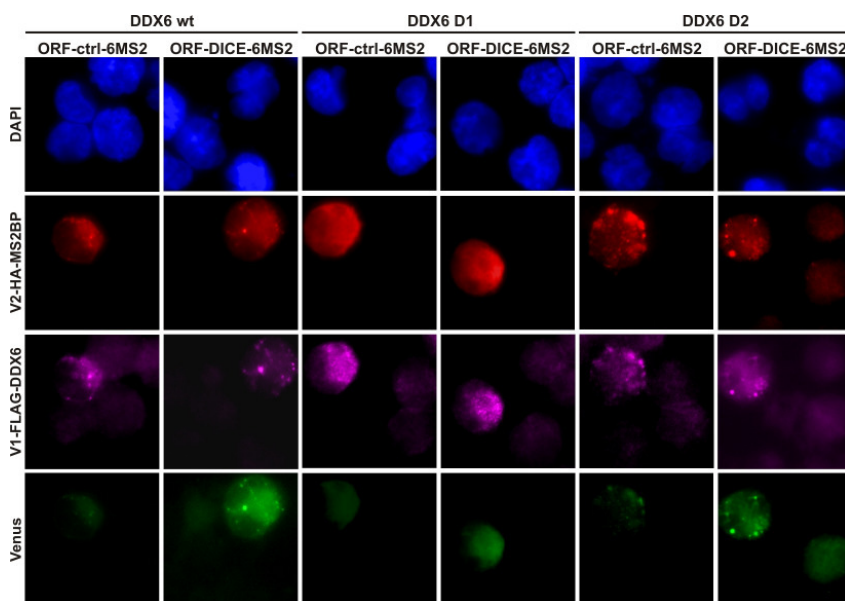


Abb. 3.20: TriFC-Analyse von DDX6 und den Domänen 1 und 2.

Transfektion von nicht-induzierten K562-Zellen mit Plasmiden, die für V1-FLAG-DDX6 wt, V1-FLAG-DDX6 D1 oder V1-FLAG DDX6 D2, V2-HA-MS2BP und ORF-ctrl-6MS2 oder ORF-DICE-6MS2 kodieren. Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen FLAG und HA. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Die Fluoreszenz des rekonstituierten Venus-Proteins ist in der letzten Reihe gezeigt. (Naarmann *et al.*, 2010).

DDX6 bindet das DICE *in vitro* und *in vivo*. Daher wurde eine mögliche Funktion von DDX6 in der Regulation der hr15-LOX-mRNA-Translation untersucht. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die hr15-LOX-mRNA in nicht-induzierten K562-Zellen vorhanden ist, die Proteinsynthese aber auf späte Stadien der erythroiden Reifung beschränkt ist (siehe Abb. 3.4, Naarmann *et al.*, 2008). In nicht-induzierten K562-Zellen kann die hr15-LOX-Expression durch den simultanen *knock down* von hnRNP K und hnRNP E1 induziert werden (siehe Abb. 3.5, Naarmann *et al.*, 2008). Um den Einfluss von DDX6 auf die Repression der hr15-LOX-mRNA-Translation zu untersuchen, wurde die DDX6-Menge in nicht-induzierten K562-Zellen durch drei verschiedene siRNAs reduziert. Der *knock down* von DDX6 hat, ebenso wie die Reduktion von hnRNP K und/ oder hnRNP E1 keinen Einfluss auf die Menge an hr15-LOX-mRNA (Abb. 3.21).

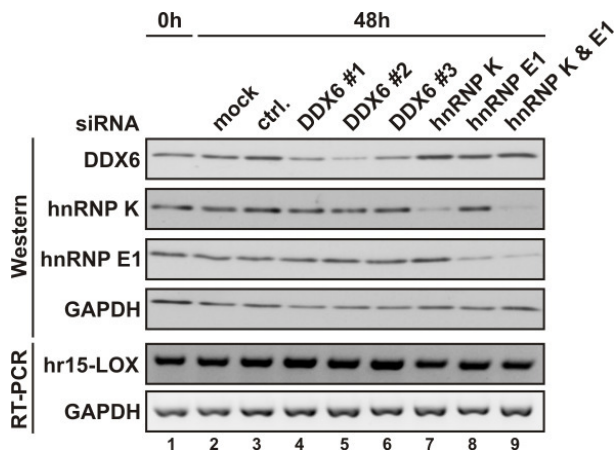


Abb. 3.21: Einfluss des knock downs von DDX6, hnRNP K oder hnRNP E1 auf die hr15-LOX-mRNA-Menge.

Nicht-induzierte K562-Zellen wurden ohne siRNA (mock), mit einer Kontroll-siRNA (ctrl.), drei unterschiedlichen siRNAs gegen DDX6 oder siRNAs gegen hnRNP K und hnRNP E1, einzeln oder in Kombination transfiziert. Analyse 48 Stunden nach der Transfektion mittels Western Blot und RT-PCR. (Naarmann *et al.*, 2010).

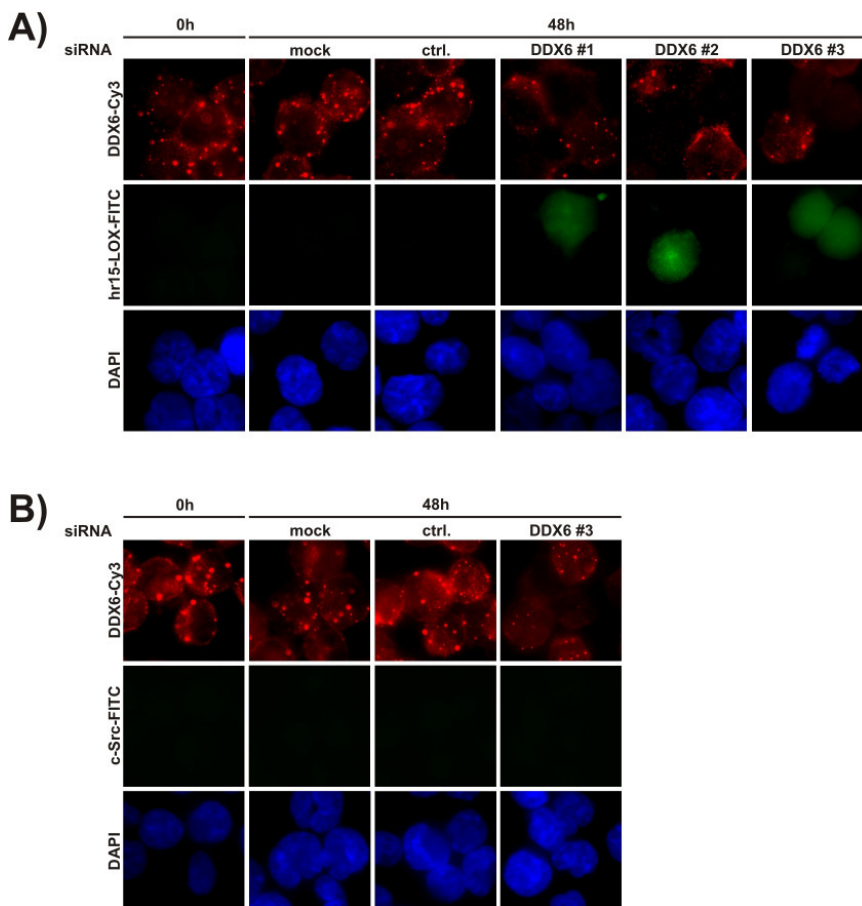


Abb. 3.22: Analyse der Reduktion der DDX6-Menge durch RNAi in nicht-induzierten K562-Zellen mit Immunfluoreszenzfärbungen.

Transfektion von nicht-induzierten K562-Zellen ohne siRNA (mock), mit einer Kontroll-siRNA (ctrl.) oder siRNAs gegen DDX6. Analyse durch Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern spezifisch für DDX6, hr15-LOX (A) und c-Src (B) 48 Stunden nach der Transfektion. Färbung der Zellkerne mit DAPI. (Naarmann *et al.*, 2010).

Der Effekt des DDX6-*knock downs* auf die hr15-LOX-Expression wurde in Immunfluoreszenzfärbungen untersucht. Die verwendeten siRNAs führten zu einer Verringerung der DDX6-Expression in 54% der Zellen. In 90% der DDX6-*knock down*-Zellen konnte eine De-Repression der hr15-LOX-Expression detektiert werden (Abb. 3.22A). Die Expression von c-Src wurde durch die Reduktion der DDX6-Menge durch die DDX6-spezifische siRNA #3 jedoch nicht beeinflusst (Abb. 3.22B). Dies deutet darauf hin, dass die Reduktion der DDX6-Menge nicht zu einer allgemeinen Aktivierung der Translation führt, sondern dass DDX6 ein spezifischer Regulator der hr15-LOX-mRNA-Translation ist.

3.3.2 DDX6 rekrutiert die hr15-LOX-mRNA in cytoplasmatische granuläre Strukturen

In Immunfluoreszenz-Analysen des TriFC-Assays konnte DDX6 in cytoplasmatischen granulären Strukturen detektiert werden (Abb. 3.19). Eine Funktion von DDX6 in der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation könnte die Lokalisierung in granuläre RNP-Strukturen sein, in denen translational reprimierte mRNAs gespeichert werden. Daher wurde untersucht, ob Reporter-mRNAs in Abhängigkeit vom DICE-Element in DDX6-enthaltende cytoplasmatische Strukturen rekrutiert werden. Hierzu wurden entweder ORF-ctrl-6MS2 oder ORF-DICE-6MS2 zusammen mit GFP-NLS-MS2BP in nicht-induzierte K562-Zellen transfiziert. Bindet das MS2BP-Fusionsprotein die RNA-Reporterkonstrukte, kann die Lokalisierung der Reporter-mRNAs durch die GFP-Fluoreszenz detektiert werden. Das NLS dient der Reduktion des Hintergrundsignals im Cytoplasma. Dies war besonders wichtig, da die verwendeten K562-Zellen einen sehr großen Zellkern haben, der nur von einem schmalen Cytoplasmasaum umgeben ist. Endogenes DDX6 wurde mit Hilfe eines DDX6-spezifischen Antikörpers angefärbt. Die Analyse erfolgte mittels konfokaler Laser-*scanning*-Mikroskopie. Die Intensitätsprofile zeigen eine Co-Lokalisierung von GFP und DDX6, wenn die DICE-tragende Reporter-mRNA co-transfiziert wurde, jedoch nicht, wenn die Kontroll-RNA co-transfiziert wurde (Abb. 3.23). Dies ist ein erster Hinweis darauf, dass eine DICE-tragende mRNA in DDX6-enthaltenden granulären Strukturen lokalisiert sein könnte.

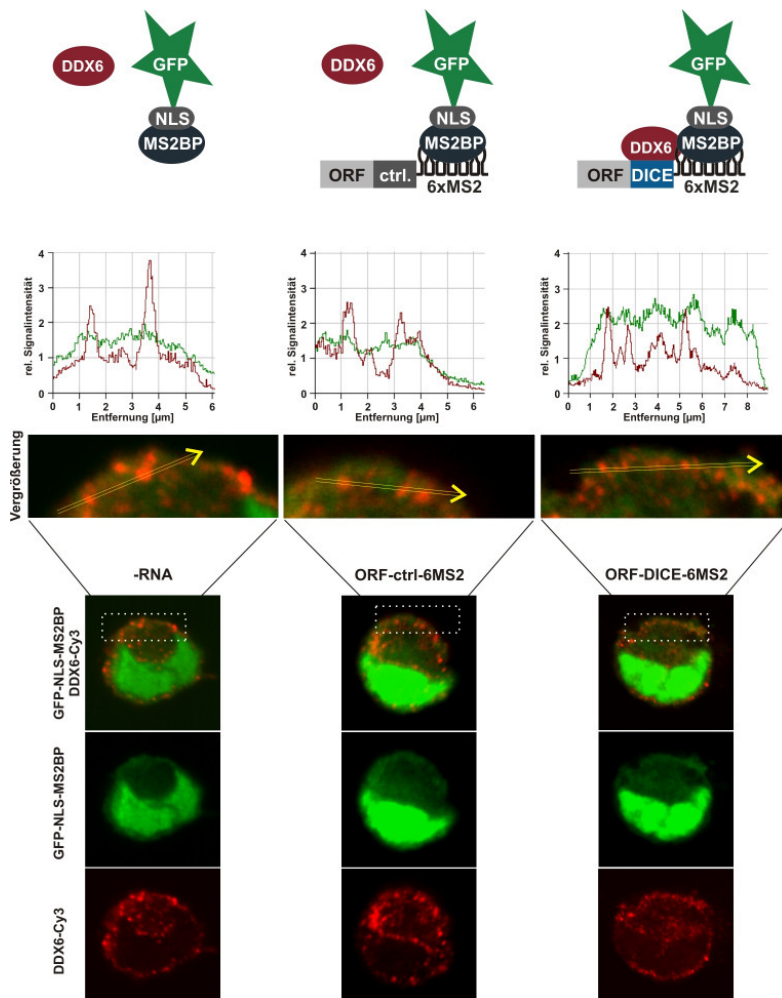


Abb. 3.23: Lokalisierung DICE-tragender Reporter-mRNAs in DDX6-enhaltenden granulären Strukturen.

Oben: Schematische Darstellung des Experiments. Unten: GFP-NLS-MS2BP wurde ohne Reporter-RNA-Konstrukt (links), mit ORF-ctrl-6MS2 (Mitte) oder ORF-DICE-6MS2 (rechts) in nicht-induzierte K562-Zellen transfiziert. Endogenes DDX6 wurde mit einem spezifischen Antikörper gefärbt. Analyse mit konfokaler Mikroskopie. Der markierte Bereich ist in der Vergrößerung dargestellt. Die DDX6-Cy3- (rot) und GFP-Fluoreszenz (grün) wurde entlang der Pfeile analysiert, die relativen Fluoreszenzintensitäten sind in den Diagrammen dargestellt. (Naarmann *et al.*, 2010).

Es konnte gezeigt werden, dass maternale mRNAs während der Entwicklung in cytoplasmatischen RNA-Protein-Aggregaten akkumulieren, die als *RNP-granules* oder *germ granules* bezeichnet werden (Anderson und Kedersha, 2006; Rajyaguru und Parker, 2009; Schisa *et al.*, 2001). Diese dynamischen granulären Strukturen sind mit *stress granules* und *processing bodies (P-Bodies)* verwandt. *Stress granules* werden gebildet, wenn die Translationsinitiation blockiert ist, zum Beispiel unter oxidativem Stress (siehe 1.2.2). In *stress granules* werden nicht-translatierte mRNAs gespeichert. Zunächst wurde untersucht, ob DDX6 die hr15-LOX-mRNA in *stress granule*-ähnliche Strukturen rekrutiert. Um die Bildung von *stress granules* zu induzieren, wurden K562-Zellen mit Natrium-Arsenit behandelt. G3BP1 wurde als Markerprotein für die Bildung von *stress granules* verwendet (Tourrière *et al.*, 2003). Zunächst wurde untersucht, ob die Regulatoren der hr15-LOX-mRNA-Translation hnRNP K, hnRNP E1 und DDX6 in *stress granules* rekrutiert

werden (Abb. 3.24). Die Analyse der Immunfluoreszenzfärbungen von nicht-behandelten und mit Natrium-Arsenit behandelten K562-Zellen zeigte, dass weder hnRNP K (Abb. 3.24A) oder hnRNP E1 (Abb. 3.24B) noch DDX6 (Abb. 3.24C) in G3BP1-positiven granulären Strukturen detektiert werden können.

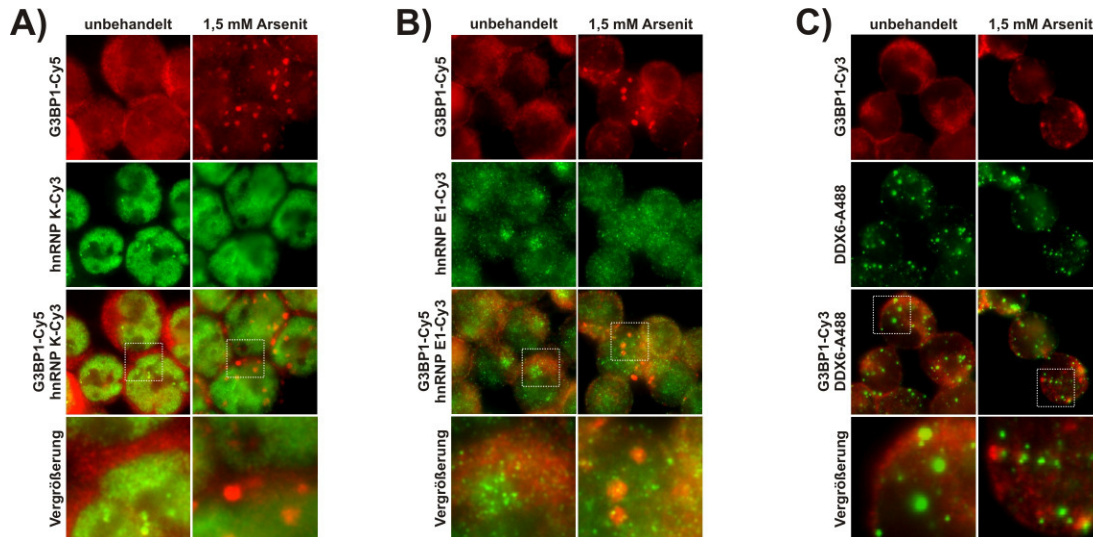


Abb. 3.24: Lokalisierung von hnRNP K, hnRNP E1 und DDX6 unter oxidativem Stress.

Nicht-induzierte K562-Zellen wurden für 30 min mit 1,5 mM Natrium-Arsenit behandelt und anschließend für Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern gegen G3BP1 und hnRNP K (A), hnRNP E1 (B) oder DDX6 (C, Naarmann *et al.*, 2010) verwendet. Die durch Rechtecke markierten Bereiche sind in der Vergrößerung dargestellt.

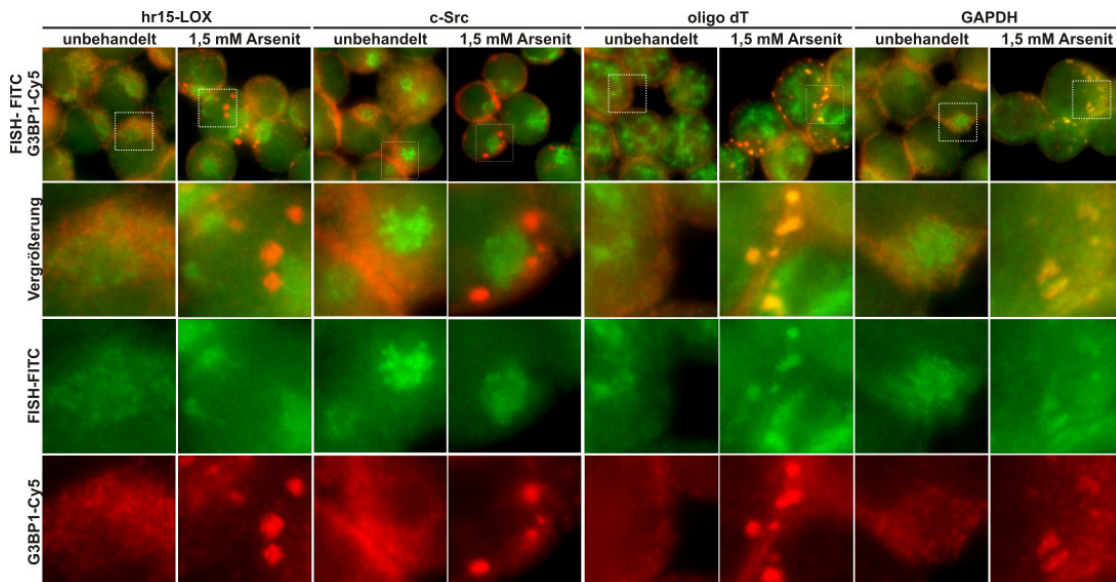


Abb. 3.25: Immunfluoreszenz-FISH-Analyse von Arsenit-behandelten K562-Zellen.

Nicht-induzierte K562-Zellen wurden für 30 min mit 1,5 mM Natrium-Arsenit behandelt. Analyse mittels IF-FISH-Färbung mit einem G3BP1-spezifischen Antikörper und Sonden spezifisch für die hr15-LOX-, c-Src-, GAPDH-mRNA und polyadenylierte RNA (oligo dT). Markierte Quadrate sind in der Vergrößerung dargestellt. (Naarmann *et al.*, 2010)

Auch die Lokalisierung der endogenen hr15-LOX-mRNA in Arsenit-induzierte *stress granules* wurde untersucht. Mittels Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) konnte nach der Induktion von oxidativem Stress eine Co-Lokalisierung von polyadenylierter RNA und GAPDH-mRNA mit G3BP1 detektiert werden (Abb. 3.25). Jedoch wurden weder die hr15-LOX-mRNA noch die c-Src-mRNA, deren Translation in nicht-induzierten K562-Zellen ebenfalls reprimiert ist, in *stress granules* nachgewiesen (Abb. 3.25).

Weder die hr15-LOX-mRNA noch hnRNP K, hnRNP E1 oder DDX6 lokalisieren in nicht-induzierten K562-Zellen in *stress granules*. Es wäre aber denkbar, dass während der induzierten erythroiden Reifung von K562-Zellen *stress granules* auftreten. In Immunfluoreszenzfärbungen mit Antikörpern spezifisch für G3BP1 und DDX6 konnten jedoch keine *stress granules* während der erythroiden Reifung detektiert werden (Abb. 3.26). DDX6 ist jedoch in cytoplasmatischen granulären Strukturen lokalisiert, deren Zahl während der erythroiden Reifung abnimmt. An den Tagen 6 und 8 der Reifung, wenn die hr15-LOX synthetisiert wird, sind nur noch sehr wenige DDX6-positive granuläre Strukturen zu detektieren (Abb. 3.26). Western Blot-Analysen zeigten, dass auch die Menge an DDX6 während der erythroiden Reifung von K562-Zellen abnimmt (Abb. 3.27). Die Analyse von Knochenmarkszellen, Retikulozyten und Erythrozyten aus Kaninchen zeigte, dass die Menge an DDX6 hier ebenfalls während der Erythropoese abnimmt (nicht gezeigt).

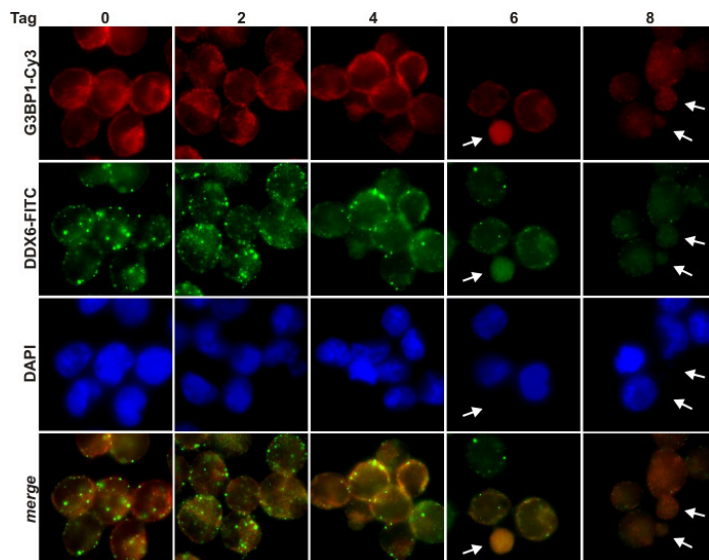


Abb. 3.26: Immunfluoreszenz-Detektion von DDX6 und G3BP1 während der erythroiden Reifung von K562-Zellen.

Die erythroide Reifung von K562-Zellen wurde mit 1,5 mM Natrium-Butyrat über einen Zeitraum von acht Tagen induziert. Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern spezifisch für DDX6 und G3BP1. Färbung der Kerne mit DAPI. Die Pfeile markieren kernlose Zellen. Die Überlagerung (merge) zeigt das DDX6- und G3BP1-Signal. (Naarmann *et al.*, 2010).

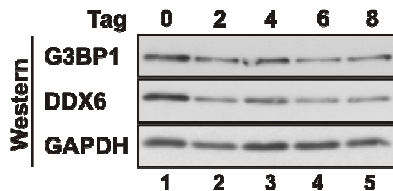


Abb. 3.27: Expression von DDX6 und G3BP1 während der erythroiden Reifung von K562-Zellen.

Western Blot-Analyse von Extrakten aus nicht-induzierten K562-Zellen und an den Tagen 2 bis 8 der erythroiden Reifung mit Antikörpern gerichtet gegen G3BP1, DDX6 und GAPDH. (Naarmann *et al.*, 2010).

Während der erythroiden Reifung kommt es nicht zur Bildung von *stress granules*. Daher wurde untersucht, ob es sich bei den DDX6-enthaltenden cytoplasmatischen granulären Strukturen um *P-body*-ähnliche RNP-*granules* handelt. Die Färbung des *P-body*- und *germ granule*-Markers Dcp1A (Ingelfinger *et al.*, 2002; Lall *et al.*, 2005) zeigte eine Co-Lokalisierung mit DDX6. Im Gegensatz zu DDX6 nimmt weder das Dcp1A-Signal noch die Zahl der Dcp1A-positiven granulären Strukturen während der erythroiden Reifung von K562-Zellen deutlich ab (Abb. 3.28). Auch der *knock down* von DDX6 hat keinen starken Einfluss auf das Dcp1A-Signal (Abb. 3.29). Es kann jedoch eine Reduktion der Zahl der Dcp1A-positiven-*granules* detektiert werden.

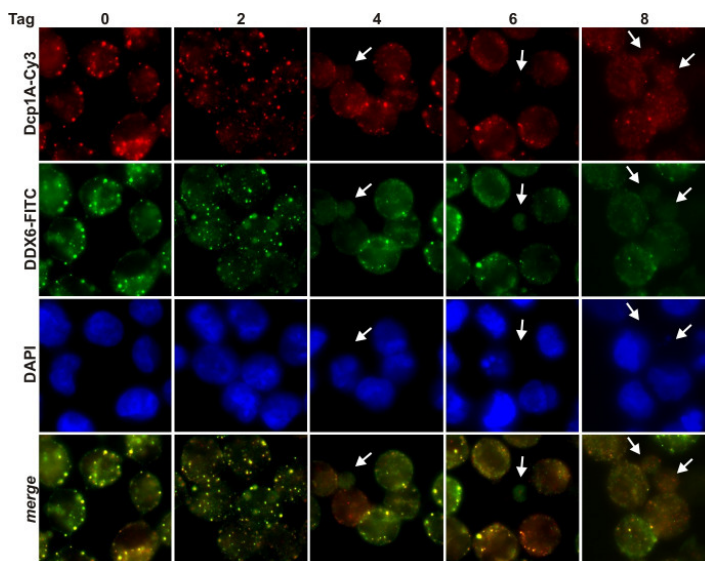


Abb. 3.28: Co-Lokalisierung von DDX6 und Dcp1A in K562-Zellen.

K562-Zellen wurden mit 1,5 mM Natrium-Butyrat induziert. Färbung von DDX6 und Dcp1A mit spezifischen Antikörpern in nicht-induzierten K562-Zellen und an den Tagen 2 bis 8 der erythroiden Reifung. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Kernlose Zellen sind durch Pfeile markiert. Die Überlagerung (*merge*) zeigt das DDX6- und das Dcp1A-Signal. (Naarmann *et al.*, 2010).

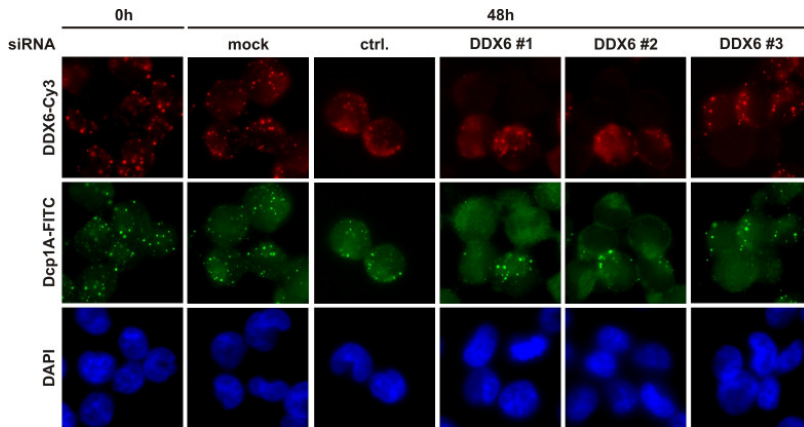


Abb. 3.29: Einfluss der Reduktion von DDX6 mittels RNAi auf das Dcp1A-Signal und die Menge Dcp1A-positiver granules.

Nicht-induzierte K562-Zellen wurden ohne siRNA (mock), mit einer Kontroll-siRNA (ctrl.) oder drei verschiedenen DDX6-spezifischen siRNAs transfiziert. Färbung von nicht-transfizierten Zellen und 48 Stunden nach der Transfektion mit Antikörpern spezifisch für DDX6 und Dcp1A. DAPI-Färbung der Zellkerne. (Naarmann *et al.*, 2010).

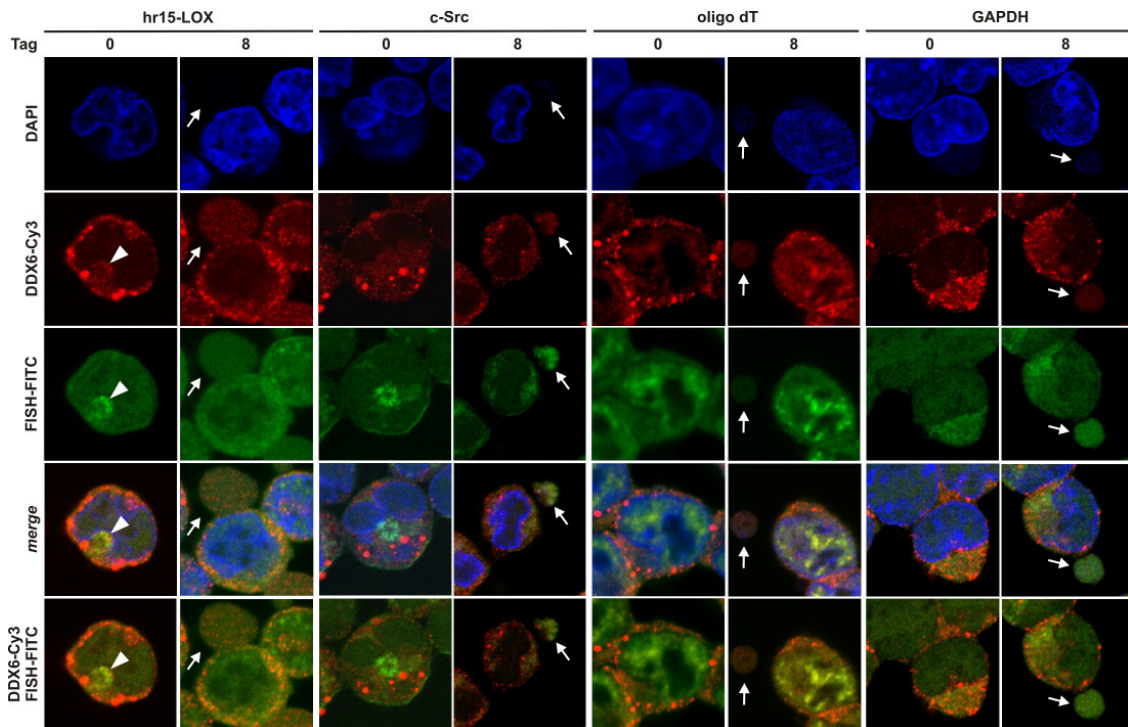


Abb. 3.30: Co-Lokalisierung von DDX6 und der hr15-LOX-mRNA in cytoplasmatischen granulären Strukturen.

Analyse der IF-FISH-Färbung nicht-induzierter K562-Zellen und Zellen, die acht Tage mit 1,5 mM Natrium-Butyrat induziert wurden, mit konfokaler Mikroskopie. Die Zellen wurden mit hr15-LOX-, c-Src-, oligo(dT)- und GAPDH-Sonden hybridisiert. Die Kerne wurden mit DAPI gefärbt, DDX6 mit einem spezifischen Antikörper. Die Pfeilspitzen markieren DDX6- und hr15-LOX-mRNA-positive granuläre Strukturen. Kernlose Zellen sind durch Pfeile markiert. In der Überlagerung (merge) sind alle drei Färbungen dargestellt. (Naarmann *et al.*, 2010).

Die Lokalisierung der endogenen hr15-LOX-mRNA wurde mit FISH untersucht. Die Analyse mit konfokaler Mikroskopie zeigte, dass die hr15-LOX-mRNA in nicht-induzierten K562-Zellen in DDX6-haltigen granulären Strukturen lokalisiert ist (Abb. 3.30). Die Translation der c-Src-mRNA wird DDX6-unabhängig reprimiert (siehe Abb. 3.22B). Sie co-

lokalisiert im Gegensatz zur hr15-LOX-mRNA nicht mit DDX6 (Abb. 3.30). Auch die aktiv translatierte GAPDH-mRNA ist nicht in DDX6-haltigen granulären Strukturen lokalisiert. Polyadenylierte mRNA, die durch eine oligo(dT)-Sonde detektiert wurde, wird ebenfalls hauptsächlich außerhalb dieser Strukturen detektiert (Abb. 3.30). Dies deutet darauf hin, dass nur die hr15-LOX-mRNA, deren Translation spezifisch durch DDX6 reguliert wird, mit DDX6 in *P-body*-ähnlichen RNP-*granules* co-lokalisiert. Am Tag 8 der erythroiden Reifung ist die hr15-LOX-mRNA dispers im Cytoplasma verteilt, ein Hinweis darauf, dass sie aus den DDX6-*granules* freigesetzt wird (Abb. 3.30).

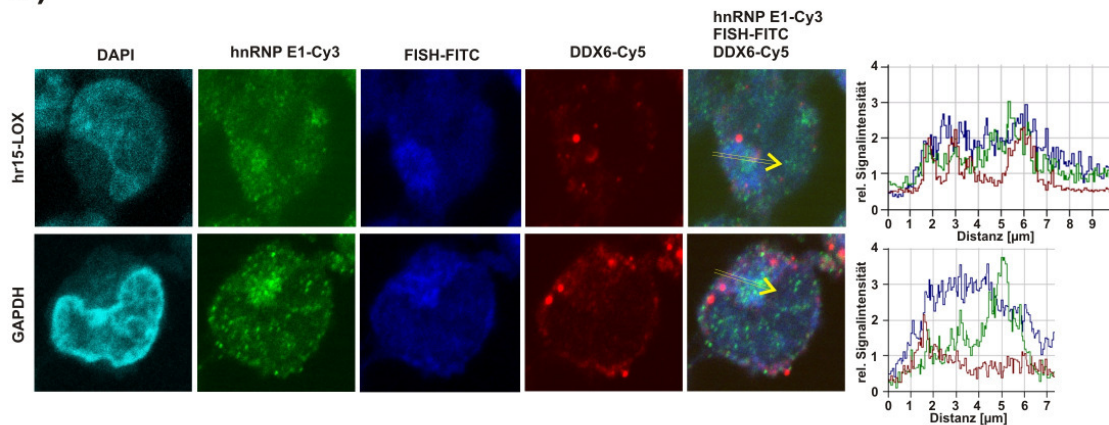
Die DDX6- und hr15-LOX-mRNA-haltigen *granules* wurden durch weitere Färbungen charakterisiert. Als Kontrolle diente die aktiv translatierte GAPDH-mRNA (Naarmann *et al.*, 2008; Naarmann *et al.*, 2010). Um eine bessere Aussage über eine mögliche Co-Lokalisierung treffen zu können, wurden Intensitätsprofile erstellt. Es wurde eine mögliche Co-Lokalisierung der hr15-LOX- bzw. GAPDH-mRNA (dargestellt in blau) und DDX6 (rot) mit hnRNP E1 (Abb. 3.31A), rpS19 (Abb. 3.31B) und rpL19 (Abb. 3.31C) untersucht. Die Intensitätsprofile zeigen eine Co-Lokalisierung des Inhibitors der hr15-LOX-mRNA-Translation hnRNP E1 mit DDX6 und der hr15-LOX-mRNA, die nicht für die GAPDH-mRNA nachweisbar ist (Abb. 3.31A). Da hnRNP K, der weitere Inhibitor der hr15-LOX-mRNA-Translation, hauptsächlich im Kern von K562-Zellen lokalisiert ist (Naarmann *et al.*, 2008), war eine Co-Lokalisierung mit der hr15-LOX-mRNA schwer zu detektieren (nicht gezeigt).

Frühere Analysen zeigten, dass der hnRNP K/E1-DICE-Komplex die Translations-Initiation auf der Stufe des 48S-Initiationskomplexes inhibiert, also die Assoziation der 60S-Untereinheit verhindert (Ostareck *et al.*, 2001). Auch in Translationsinitiationsreaktionen mit Extrakten aus nicht-induzierten K562-Zellen assemblierten 48S-Initiationskomplexe auf einer DICE-tragenden mRNA (Naarmann *et al.*, 2010). Daher wurde analysiert, ob ribosomale 40S-Untereinheiten mit der hr15-LOX-mRNA in den DDX6-haltigen *granules* co-lokalisieren. Hierzu wurde eine Co-Färbung der hr15-LOX-mRNA mit DDX6 und einem Protein der 40S-Untereinheit des Ribosoms, rpS19, durchgeführt (Abb. 3.31B). Als Kontrolle wurde ein Protein der 60S-Untereinheit des Ribosoms, rpL19, gefärbt (Abb. 3.31C). In nicht-induzierten K562-Zellen konnte eine Co-Lokalisierung von rpS19 mit der hr15-LOX-mRNA und DDX6 beobachtet werden, verdeutlicht durch die Intensitätsprofile. Die GAPDH-mRNA dagegen zeigte Co-Lokalisierung mit rpS19 und rpL19, nicht aber mit DDX6 (Abb. 3.31B und C). Eine gemeinsame Co-Lokalisierung von rpL19, DDX6 und der hr15-LOX-mRNA konnte in nicht-induzierten K562-Zellen nicht detektiert werden.

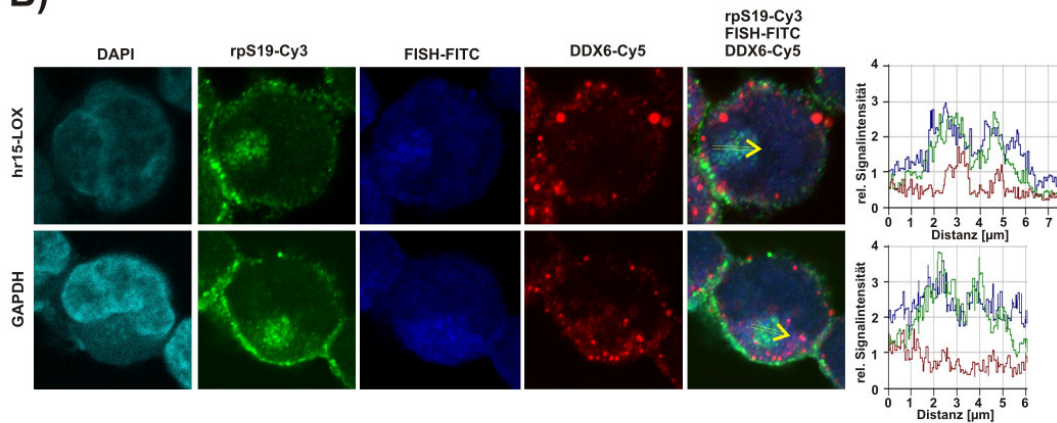
Am Tag acht der Reifung, an dem die hr15-LOX-mRNA translatiert wird, ist die Färbung der hr15-LOX-mRNA im Cytoplasma verteilt, was darauf hindeutet, dass sie aus den

RNP-*granules* freigesetzt wird (siehe Abb. 3.30 und Abb. 7.6).

A)



B)



C)

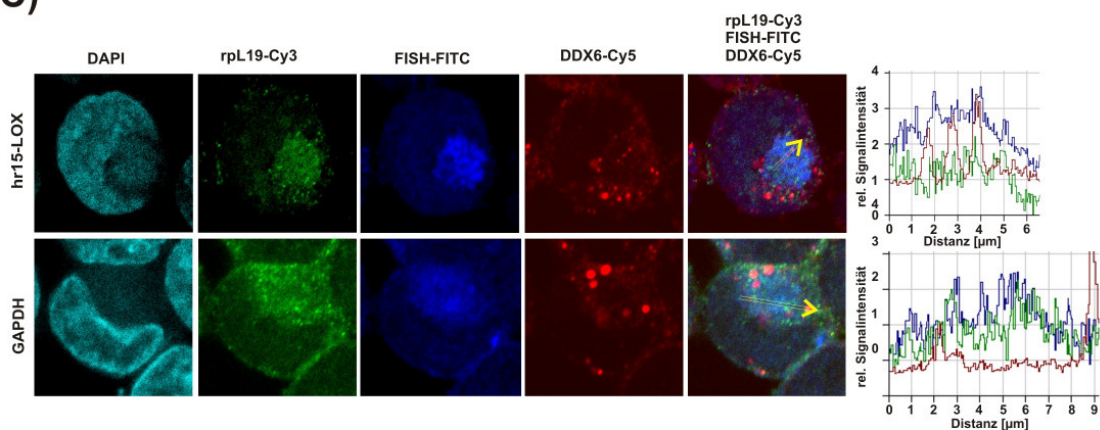


Abb. 3.31: Analyse der Co-Lokalisierung von hnRNP E1, rpS19 und rpL19 mit DDX6 und der hr15-LOX-mRNA.

IF-FISH-Färbung nicht-induzierter K562-Zellen. Analyse mit konfokaler Mikroskopie. Hybridisierung der Zellen mit hr15-LOX- und GAPDH-mRNA-spezifischen Sonden (FITC, blau), Färbung der Zellkerne mit DAPI (cyan). Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen mit Antikörpern gerichtet gegen DDX6 (Cy5, rot) und hnRNP E1 (A), rpS19 (B) oder rpL19 (C, alle Cy3, grün). Die Cy3-, Cy5- und FITC-Fluoreszenz wurde entlang der Pfeile in den überlagerten Bildern (rechts) gemessen und ist in den Diagrammen dargestellt. (Naarmann *et al.*, 2010).

Zusammengefasst deuten die Daten darauf hin, dass DDX6 die Speicherung der translational reprimierten hr15-LOX-mRNA in *P-body*-ähnliche RNP-*granules* vermittelt, in denen keine 60S-Untereinheiten des Ribosoms enthalten sind.

3.4 Analyse des Abbaus von hnRNP K

3.4.1 Die Rolle des Ubiquitin-Proteasom-Systems

Die Menge an hnRNP K und hnRNP E1 nimmt während der erythroiden Reifung von humanen K562-Zellen (siehe Abb. 3.5) und CD34⁺-Zellen (siehe Abb. 3.11) sowie während der Erythropoese in Kaninchen (Ostareck-Lederer, unpubliziert) ab. Daraus ergab sich die Frage, wie hnRNP K und hnRNP E1 während der erythroiden Reifung abgebaut werden. Der Abbau vieler intrazellulärer Proteine erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS, siehe 1.3.1). Auch während der erythroiden Reifung wird das UPS aktiviert (Haas *et al.*, 1982).

Es konnte gezeigt werden, dass hnRNP K nach induzierten DNA-Schäden über das UPS abgebaut wird. HDM2 konnte als Ubiquitin-Ligase identifiziert werden (Moumen *et al.*, 2005). Es ist möglich, dass HDM2 auch während der erythroiden Reifung den Abbau von hnRNP K vermittelt. Daher wurde die Expression von HDM2 während der induzierten erythroiden Reifung von K562-Zellen mittels RT-PCR- und Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 3.32). Weder die HDM2-mRNA noch das Protein konnten in K562-Zellen nachgewiesen werden. In MCF-7-Zellen wurde jedoch HDM2 detektiert (Abb. 3.32).

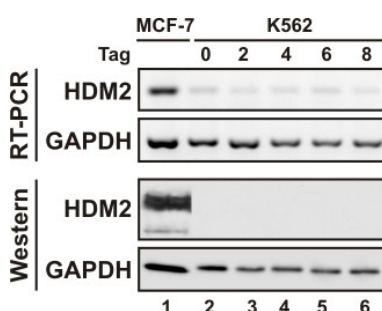


Abb. 3.32: Expression von HDM2 in K562-Zellen während der erythroiden Reifung.

Oben: RT-PCR-Analyse der Expression der HDM2- und GAPDH-mRNA mit spezifischen Primern in MCF-7-Zellen und K562-Zellen während der erythroiden Reifung. Unten: Western Blot-Analyse der Expression von HDM2- und GAPDH-Protein in MCF-7-Zellen und K562-Zellen während der erythroiden Reifung.

Der Abbau von hnRNP K während der erythroiden Reifung wird nicht durch die Ubiquitin-Ligase HDM2 vermittelt, da diese in K562-Zellen nicht exprimiert wird. Dennoch wäre ein Abbau über das UPS denkbar, falls eine andere Ubiquitin-Ligase hnRNP K für den Abbau markiert. Um dies zu analysieren, wurden K562-Zellen mit verschiedenen Proteasom-Inhibitoren behandelt. Die Inkubation mit den Proteasom-Inhibitoren Epoxomicin, MG132, Ac-Ala-Pro-Nle-Asp-CHO, *clasto*-Lactacystin- β -Lacton und Ada-(Ahx)₃-(Leu)₃-vinylsulfon

über einen Zeitraum von 24 Stunden führte nicht zu einer Stabilisierung von hnRNP K, obwohl eine starke Zunahme an ubiquitinierten Proteinen detektiert werden konnte (nicht gezeigt). Auch die Inhibition des Proteasoms mit MG132 während der erythroiden Reifung führte nicht zu einer Stabilisierung von hnRNP K (nicht gezeigt). Desweiteren konnten in einer hnRNP K-Immunopräzipitation aus diesen Zellen in Western Blot-Analysen mit einem hnRNP K-spezifischen Antikörper keine hochmolekularen hnRNP K-Ubiquitin-Konjugate detektiert werden (Abb. 3.33). Gleiche Ergebnisse wurden unter Verwendung eines α -Ubiquitin-Antikörpers für die Western Blot-Analysen erzielt (nicht gezeigt).

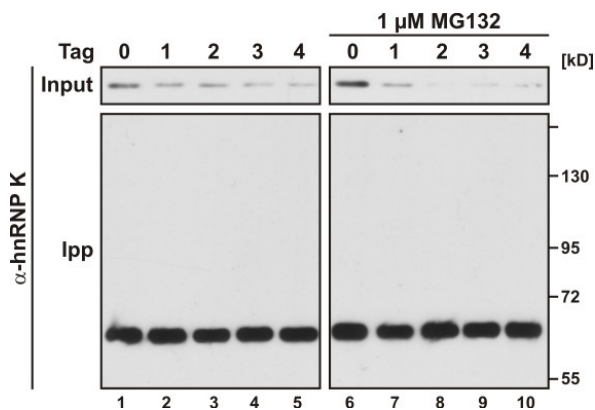


Abb. 3.33: hnRNP K-Immunopräzipitation aus K562-Zellen während der erythroiden Reifung und der Inhibition des Proteasoms.

Induktion der erythroiden Reifung von K562-Zellen über einen Zeitraum von vier Tagen. Rechts: Inhibition des Proteasoms mit 1 μ M MG132. Analyse mittels Western Blot mit einem Antikörper gerichtet gegen hnRNP K.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass hnRNP K während der erythroiden Reifung nicht durch das UPS abgebaut wird. Viele Proteasom-Inhibitoren hemmen jedoch nicht nur die Aktivität des Proteasoms, sondern haben auch Einfluss auf andere zelluläre Systeme (Ding *et al.*, 2006; Mazroui *et al.*, 2007). Daher wurde das UPS durch den *knock down* des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms Uba1 weitgehend ausgeschaltet. Nicht-induzierte K562-Zellen wurden mit drei verschiedenen gegen Uba1 gerichteten siRNAs transfiziert und 24 sowie 48 Stunden nach der Transfektion in Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 3.34). Jede der verwendeten siRNAs führt zu einer Reduktion der Uba1-Menge. Die hnRNP K-Menge wird durch den *knock down* nicht beeinflusst (Abb. 3.34).

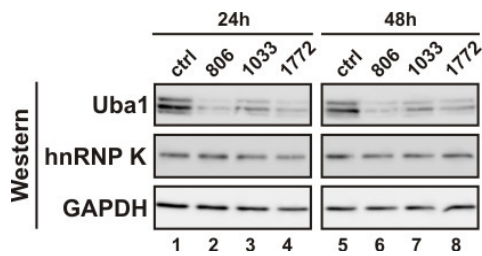


Abb. 3.34: Einfluss der Reduktion von Uba1 mit RNAi auf die hnRNP K-Menge.

Nicht-induzierte K562-Zellen wurden mit einer unspezifischen Kontroll-siRNA (ctrl) oder drei siRNAs gerichtet gegen Uba1 transfiziert. Analyse mittels Western Blot 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit Antikörpern spezifisch für Uba1, hnRNP K und GAPDH.

Der *knock down* von Uba1 wurde nun mit der Induktion der erythroiden Reifung kombiniert. Hierzu wurden K562-Zellen zunächst mit den siRNAs gegen Uba1 transfiziert. 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde die erythroide Reifung durch die Zugabe von Natrium-Butyrat induziert. 48 Stunden und 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion (also nach 24 bzw. 48 Stunden erythroider Reifung) erfolgte die Ernte (Abb. 3.35). Die Menge an Ubiquitin-aktivierendem Enzym Uba1 scheint während der erythroiden Reifung zuzunehmen (Abb. 3.35, Bahn 1-3), kann jedoch auch während der erythroiden Reifung durch die spezifischen siRNAs reduziert werden (Abb. 3.35, Bahn 14-18 und 24-28). Die Menge an hnRNP K nimmt während der erythroiden Reifung ab. Zwischen Zellen, die mit einer Uba1-spezifischen siRNA transfiziert wurden und Kontroll-Zellen konnte kein Unterschied detektiert werden; der Abbau von hnRNP K scheint nicht über das UPS zu erfolgen.

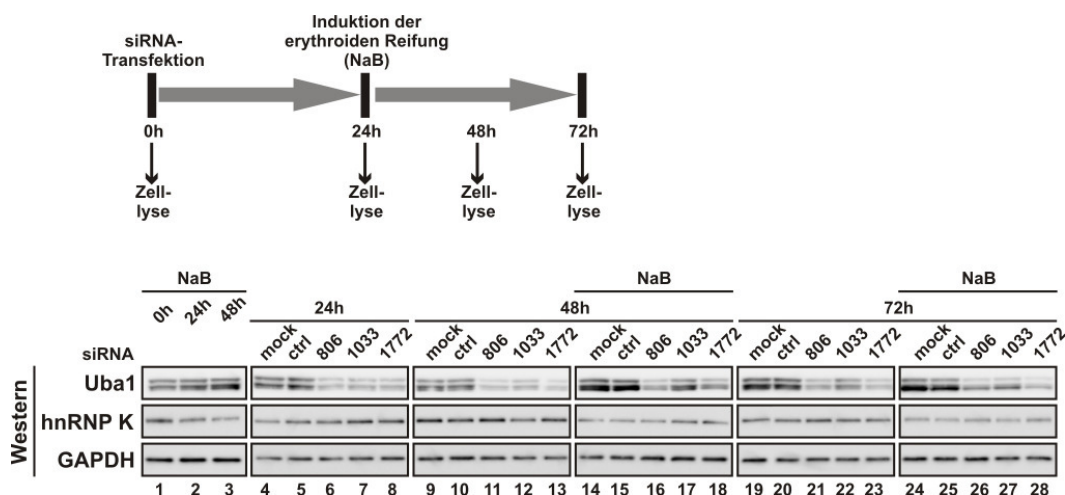


Abb. 3.35: Kombination des *knock downs* von Uba1 mit der erythroiden Reifung von K562-Zellen.

Oben: Schematische Darstellung des Experiments. Unten: Nicht-induzierte K562-Zellen wurden ohne siRNA (mock), mit einer Kontroll-siRNA (ctrl) oder drei verschiedenen siRNAs gerichtet gegen Uba1 transfiziert. Induktion der erythroiden Reifung mit 1,5 mM Natrium-Butyrat (NaB) 24 Stunden nach der Transfektion. Analyse nicht behandelter Zellen sowie von Zellen 24, 48 und 72 Stunden nach der Transfektion in Western Blots mit Antikörpern spezifisch für Uba1, hnRNP K und GAPDH als Ladekontrolle.

3.4.2 Der Abbau von hnRNP K erfolgt über ein Intermediat

Die bisherigen Ergebnisse deuten darauf hin, dass hnRNP K während der erythroiden Reifung von K562-Zellen nicht über das UPS abgebaut wird. Für die weiteren Analysen des Abbaus von hnRNP K sollte nun zunächst die Halbwertszeit von hnRNP K in K562-Zellen bestimmt werden. Hierzu wurden zunächst verschiedene Translationsinhibitoren getestet (siehe 2.1.5). Puromycin inhibierte dabei die Translation effizienter als Cycloheximid und Emetin (nicht gezeigt). Daher wurde Puromycin verwendet, um über einen Zeitraum von 24 Stunden die Translation in nicht-induzierten K562-Zellen zu inhibieren (Abb. 3.36).

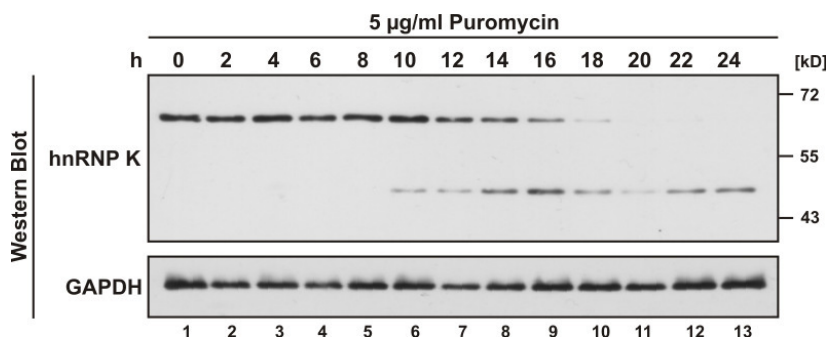


Abb. 3.36: Abbau von hnRNP K während der Inhibition der Translation.

K562-Zellen wurden bis zu 24 Stunden mit 5 µg/ml Puromycin behandelt. Western Blot-Analyse mit Antikörpern spezifisch für hnRNP K und GAPDH als Ladekontrolle.

Die quantitative Auswertung des Western Blots zeigte, dass die Halbwertszeit von hnRNP K ca. 14 Stunden beträgt. Interessanterweise kann neben der Abnahme der Menge an hnRNP K die Entstehung eines ca. 48 kD großen Spaltprodukts detektiert werden (Abb. 3.36). In Western Blot-Analysen der hnRNP K-Expression während der erythroiden Reifung von K562-Zellen konnte das Spaltprodukt nicht nachgewiesen werden (Abb. 3.37, Bahn 1-5). Nach der Anreicherung von hnRNP K durch eine Immunopräzipitation war das Spaltprodukt auch während der erythroiden Reifung nachweisbar (Abb. 3.37).

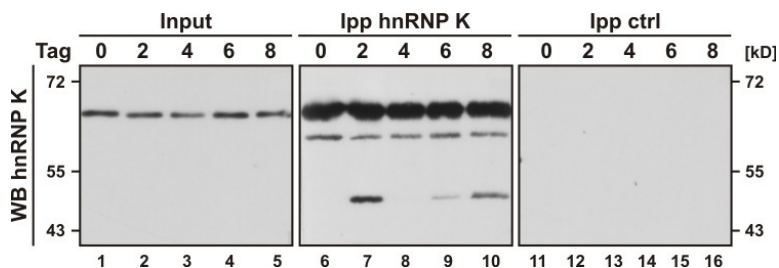


Abb. 3.37: Detektion des hnRNP K-Spaltprodukts nach Immunopräzipitation während der erythroiden Reifung von K562-Zellen.

Immunopräzipitation mit einem hnRNP K- und einem Kontroll- (ctrl) Antikörper aus nicht-induzierten K562-Zellen und Zellen von Tag 2 bis 8 der erythroiden Reifung. Detektion von hnRNP K in Input, hnRNP K-Immunopräzipitat (Ipp hnRNP K) und Kontroll-Immunopräzipitat (Ipp ctrl) mit einem spezifischen hnRNP K-Antikörper.

Das ca. 48 kD-große hnRNP K-Spaltprodukt kann in nicht-induzierten K562-Zellen nicht nachgewiesen werden. In Übereinstimmung mit der starken Reduktion von hnRNP K am Tag 2 der Induktion wird zu diesem Zeitpunkt auch das stärkste Signal bei 48 kD detektiert (siehe Abb. 3.6). Das hnRNP K-Abbau-Intermediat akkumuliert in Puromycin-behandelten K562-Zellen stärker als während der erythroiden Reifung. Es ist möglich, dass Puromycin den weiteren Abbau inhibiert.

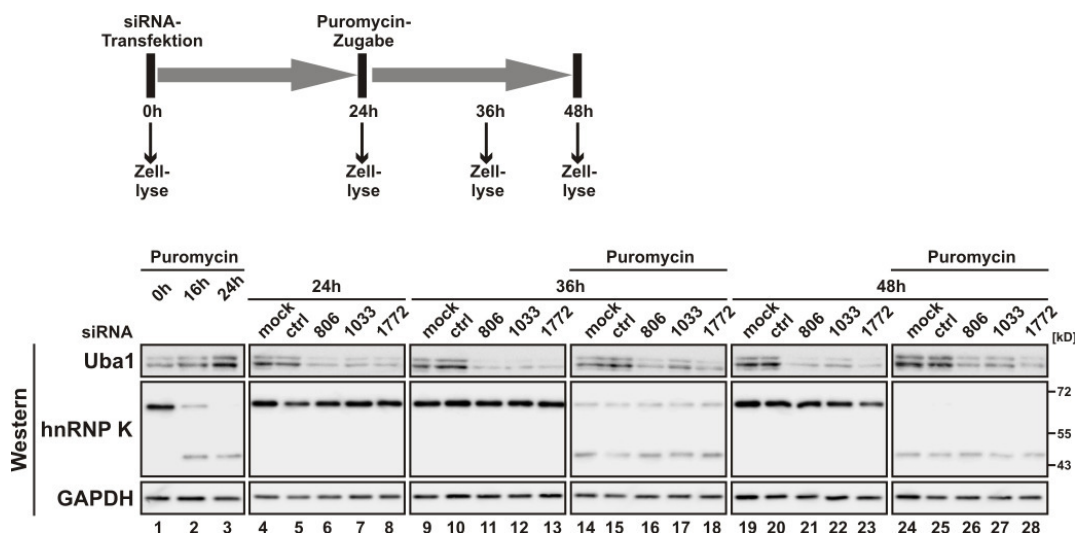


Abb. 3.38: Kombination von Puromycin-Behandlung und Uba1-knock down.

Oben: Schematische Darstellung des Experiments. Unten: Nicht-induzierte K562-Zellen wurden ohne siRNA (mock), mit einer Kontroll-siRNA (ctrl) oder drei verschiedenen siRNAs gerichtet gegen Uba1 transfiziert. Behandlung mit 5 µg/ml Puromycin 24 Stunden nach der Transfektion. Analyse nicht transfizierter Zellen sowie von Zellen 24, 36 und 48 Stunden nach der Transfektion in Western Blots mit Antikörpern spezifisch für Uba1, hnRNP K und GAPDH als Ladekontrolle.

Da das Intermediat in Puromycin-behandelten Zellen besser detektiert werden konnte, erfolgte die weitere Analyse mit diesem Reagenz. Die Bildung eines stabilen Intermediats ist ein weiterer Hinweis dafür, dass hnRNP K nicht über das UPS abgebaut wird. Die Proteolyse durch das Proteasom erfolgt in der Regel prozessiv, es entstehen kurze Oligopeptide (siehe 1.3.1). Wie zu erwarten, hatte die Kombination der Puromycin-Behandlung mit dem *knock down* von Uba1 keinen Einfluss auf die Entstehung des hnRNP K-Spaltprodukts (Abb. 3.38).

3.4.3 Identifizierung des hnRNP K-Spaltprodukts

Der Abbau von hnRNP K während der erythroiden Reifung von K562-Zellen erfolgt über ein ca. 48 kD-großes Intermediat. Der für die Western Blot-Analysen verwendete hnRNP K-Antikörper (D6, Santa Cruz) ist laut Hersteller-Angaben gegen die Aminosäuren 1-300 gerichtet. Unter Verwendung von rekombinant hergestellten hnRNP K-Deletionsvarianten konnte das Epitop weiter auf die Aminosäuren 1-121 eingegrenzt

werden (nicht gezeigt). Unter Verwendung weiterer hnRNP K-spezifischer Antikörper wurde das hnRNP K-Spaltprodukt weitergehend charakterisiert (Abb. 3.39).

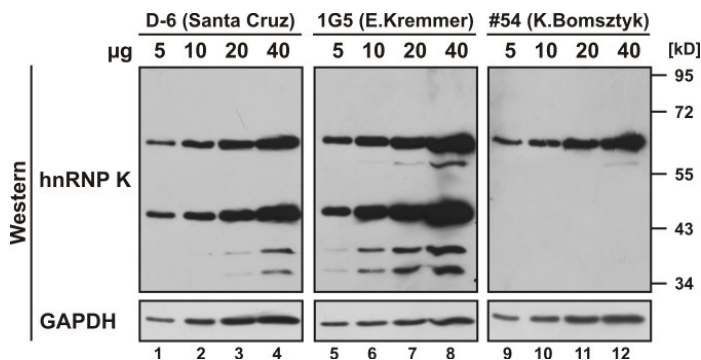


Abb. 3.39: Erkennung des hnRNP K-Spaltprodukts durch verschiedene Antikörper.

Western Blot-Analyse von cytoplasmatischem K562-Extrakt aus Zellen, die 16 Stunden mit 5 µg/ml Puromycin behandelt wurden, mit drei α -hnRNP K-Antikörpern. D6 erkennt die Aminosäuren 1-121, 1G5 ist gegen die Aminosäuren 255-272 gerichtet, #54 erkennt den C-Terminus, die Aminosäuren 454-464 (Van Seuning *et al.*, 1995).

Das 48 kD-große Abbauintermediat wird durch den Antikörper D6 erkannt, es handelt sich vermutlich um ein N-terminales Fragment. Der Antikörper 1G5 ist gegen das Peptid gerichtet, in dem sich die Arginine befinden, die methyliert werden. Auch er erkennt das Spaltprodukt. Nicht erkannt wird das Spaltprodukt jedoch durch den Antikörper #54 (Van Seuning *et al.*, 1995), der gegen den C-Terminus gerichtet ist (Abb. 3.39).

Um das hnRNP K-Spaltprodukt weiter zu charakterisieren, wurde es aus Puromycin-behandelten K562-Zellen gereinigt. Der cytoplasmatische Extrakt wurde über mehrere Chromatographie-Schritte (Abb. 3.40) fraktioniert.

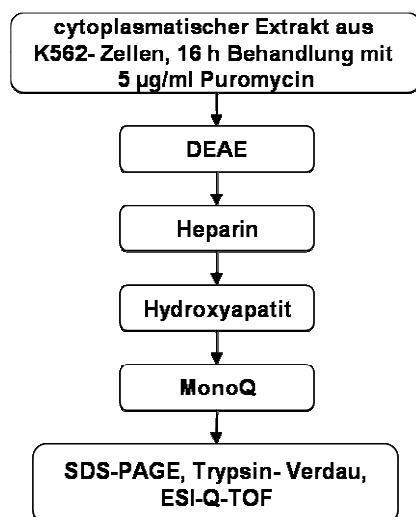


Abb. 3.40: Schematische Darstellung der Reinigung des hnRNP K-Spaltprodukts.

Cytoplasmatischer Extrakt aus K562-Zellen, die 16 Stunden mit 5 µg/ml Puromycin behandelt wurden, wurden über DEAE-Sepharose fraktioniert. Als weitere Reinigungsschritte wurden Heparin-Sepharose, Hydroxyapatit- und MonoQ-Chromatographie durchgeführt.

Das hnRNP K-Spaltprodukt wurde mittels Western Blot-Analysen unter Verwendung des Antikörpers D6 (siehe oben) verfolgt (siehe 8.5). Anschließend wurden die Spaltprodukt enthaltenden Fraktionen auf einem 4-12% NuPAGE-BisTris-Gel aufgetrennt, tryptisch verdaut und mittels ESI-Q-TOF analysiert. Die massenspektrometrische Analyse wurde im Labor von Henning Urlaub durchgeführt (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen). Die erhaltene Sequenzabdeckung ist in Abb. 3.41 dargestellt. Kein Peptid konnte für die Aminosäuren 1-21 detektiert werden. Ein solches Peptid konnte jedoch auch bei der Analyse des Gesamtproteins nicht detektiert werden (nicht gezeigt). Eine gute Sequenzabdeckung konnte für die Aminosäuren 22-326 erzielt werden, diese Region von hnRNP K ist also Teil des Spaltprodukts. Ab Aminosäure 327 konnte kein Peptid detektiert werden. Bei der massenspektrometrischen Analyse des Gesamtproteins konnten Peptide, die dem C-Terminus des Proteins entsprechen jedoch identifiziert werden (nicht gezeigt).

```

 1 METEQPEETF  PNTETNGEFG  KRPAEDMEEE  QAFKRSRNTD  EMVELRILLQ
51 SKNAGAVIGK  GGKNIKALRT  DYNASVSVPD  SSGPERILSI  SADIETIGEI
101 LKKIIP TLEE  GLQLPSPTAT  SQLPLESDAV  ECLNYQH YKG  SDFDCELRL L
151 IHQSLAGGII  GVKGAKIKEL  RENTQTTIKL  FQECPPHSTD  RVVLIGGKPD
201 RVVECIKIIL  DLISESPIKG  RAQPYDPNFY  DETYDYG GFT  MMFDDRRGR P
251 VGFPMRGRGG  FDRMPPGRGG  RPMPPSRRDY  DDMSPRRGPP  PPPPGRGGRG
301 GSRARNLPLP  PPPPPRGDDL  MAYDRRGRPG  DRYDGMVGFS  ADETWDSAID
351 TWSPSEWQMA  YEPQGGSGYD  YSYAGGRGSY  GDLGGPIITT  QVTIPKDLAG
401 SIIGKGGQRI  KQIRHESGAS  IKIDEPLEGS  EDRIITITGT  QDQIQNAQYL
451 LQNSVKQYSG  KFF

```

Abb. 3.41: Sequenzabdeckung der tryptischen Peptide des hnRNP K-Spaltprodukts.

Das aus Puromycin-behandelten K562-Zellen gereinigte hnRNP K-Spaltprodukt wurde über ein 4-12% NuPAGE Bis-Tris-Gel aufgetrennt, tryptisch verdaut und mittels ESI-Q-TOF analysiert. Alle identifizierten Peptide, die hnRNP K zugeordnet werden konnten, sind rot markiert.

Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass hnRNP K während der erythroiden Reifung über ein ca. 48 kD-großes N-terminales Spaltprodukt abgebaut wird. Ein Spaltprodukt gleicher Größe kann auch in Puromycin-behandelten K562-Zellen nachgewiesen werden. Weitere Ergebnisse deuten darauf hin, dass der Abbau nicht über das UPS erfolgt. Um die bislang unbekannte Protease zu identifizieren, sollte ein *in vitro*-Spaltungsassay etabliert werden. Hierzu wurde hnRNP K rekombinant mit einem N-terminalen Hexahistidin-tag in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt (Bodo Moritz). Das rekombinante Protein wurde zusammen mit cytoplasmatischem Extrakt aus Puromycin-behandelten K562-Zellen inkubiert und in Western Blot-Analysen mit einem α -His-Antikörper untersucht (Abb. 3.42).

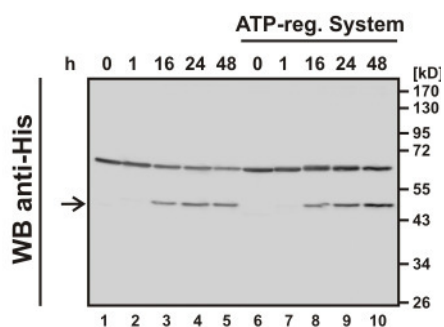


Abb. 3.42: hnRNP K-Spaltungsassay

100 ng His-hnRNP K wurden bis zu 48 Stunden mit 20 μ g cytoplasmatischem K562-Extrakt (16 h Puromycin-behandelt) bis 37°C inkubiert. Bahn 6-10: Zugabe eines ATP-regenerierenden Systems. Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gerichtet gegen den His-tag des rekombinanten Proteins.

Das hnRNP K-Spaltprodukt kann nach 16 Stunden Inkubation detektiert werden, unabhängig davon, ob ein ATP-regenerierendes System zugesetzt wurde. Der etablierte hnRNP K-Spaltungsassay wird in weiteren Analysen zur Identifizierung der unbekannt proteolytischen Aktivität während einer chromatographischen Reinigung genutzt.

4. Zusammenfassung und Diskussion

Die posttranskriptionelle Regulation der Genexpression spielt eine wichtige Rolle während der Embryonalentwicklung und Differenzierung von Zellen (siehe 1.2). So findet während der frühen Entwicklung keine Transkription statt. Für die Proteinsynthese werden maternale mRNAs verwendet (Kuersten und Goodwin, 2003). Während der Erythropoese wird der Zellkern beim Übergang vom polychromatischen zum orthochromatischen Normoblasten ausgeschleust (Castoldi und Beutler, 1988; Simpson und Kling, 1967). Nach dem Übergang in die Blutbahn reifen die kernlosen Retikulozyten weiter zu Erythrozyten. Eine transkriptionelle Regulation der Genexpression ist hier nicht mehr möglich. Die Synthese einiger Proteine, wie der r15-LOX, wird daher auf Translationsebene reguliert.

In der vorliegenden Arbeit konnte ein induzierbares erythroides Zellsystem etabliert werden, welches eine weitere Analyse posttranskriptioneller Regulationsmechanismen während der erythroiden Reifung ermöglichte. So konnte der Mechanismus der Inhibition der r15-LOX-mRNA-Translation weiter aufgeklärt werden. Auch die Identifizierung weiterer mRNAs, deren Translation während der erythroiden Reifung reguliert wird, war möglich.

4.1 Zur Etablierung und Charakterisierung des K562-Zellsystems

Wichtige Charakteristika der Erythropoese in Säugern sind neben der Synthese von Hämoglobin der Ausschluss des Zellkerns, der Abbau der Mitochondrien und eine Umstrukturierung der Zellmembran, die in einer bikonkaven Form der reifen Erythrozyten resultiert (Castoldi und Beutler, 1988). Der Abbau der Mitochondrien, einer der letzten Schritte der Erythropoese, wird durch die r15-LOX initiiert, welche die Dioxygenierung von Phospholipiden in der Mitochondrienmembran katalysiert (Rapoport und Schewe, 1986; van Leyen *et al.*, 1998; Grüllich *et al.*, 2001). Bisherige Untersuchungen unter Verwendung von Weizenkeim- oder Retikulozytenlysat sowie transfizierten HeLa-Zellen ergaben, dass die Regulation der Translation der Kaninchen-r15-LOX-mRNA über das *differentiation control element* (DICE), welches in der 3'UTR der mRNA lokalisiert ist, erfolgt (Ostareck-Lederer *et al.*, 1994). hnRNP K und hnRNP E1 binden an das DICE und inhibieren die Assoziation der 60S-Untereinheit des Ribosoms (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck *et al.*, 2001). Bislang ist nicht bekannt, wie die Interaktion zwischen dem 5'- und dem 3'-Ende der mRNA vermittelt wird. Es wäre daher denkbar, dass weitere Proteine Bestandteil des inhibitorischen Komplexes sind.

Für weitere Analysen des Translationsregulations-Mechanismus, wie die Identifizierung neuer Komplexkomponenten war die Etablierung eines induzierbaren erythroiden Zellsystems erforderlich. Dieses Zellsystem sollte nicht nur die charakteristischen morphologischen Veränderungen der späten Stadien der Erythropoese, den Ausschluss des Zellkerns und den Abbau der Mitochondrien, sondern auch die Kontrolle der Expression der (endogenen) r15-LOX durch (endogenes) hnRNP K und hnRNP E1 rekapitulieren. Außerdem sollte es möglich sein, große Mengen induzierter Zellen zu gewinnen, die eine Reinigung neuer regulatorischer Faktoren ermöglichen. Bislang existierte ein solches Zellsystem, welches alle Bedingungen erfüllt, nicht (siehe 1.1.2).

In Vorarbeiten konnten bereits humane K562-Zellen, die aus einer CML-Patientin isoliert wurden (Lozzio und Lozzio, 1975), als mögliche Basis für das induzierbare erythroide Zellsystem identifiziert werden (Naarmann, 2006). K562-Zellen werden in Suspension kultiviert (siehe 2.1.1), ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 14 Stunden (Naarmann, 2006). Dies ermöglicht das Anzüchten großer Zellmengen. Die erythroide Reifung von K562-Zellen kann durch die Inkubation mit Natrium-Butyrat induziert werden (Andersson *et al.*, 1979a; Naarmann, 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde die Natrium-Butyrat-induzierte erythroide Reifung von K562-Zellen weitergehend charakterisiert. K562-Zellen exprimieren Hämoglobin (siehe Abb. 3.1) und es kommt zum Erliegen der Zellteilung (Naarmann, 2006). Außerdem wurden der Ausschluss des Zellkerns (29% der Zellen an Tag 8 der Induktion) und ein Abbau der Mitochondrien (22% der kernlosen Zellen an Tag 8 der Induktion) detektiert (siehe Abb. 3.2). Die Expression der endogenen hr15-LOX wird durch endogenes hnRNP K und hnRNP E1 reguliert (siehe Abb. 3.4 und Abb. 3.5). Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Translation einer DICE-tragenden Reporter-mRNA in cytoplasmatischem Extrakt aus nicht-induzierten K562-Zellen ohne die Zugabe von exogenem hnRNP K und hnRNP E1 inhibiert wird. Translationsinitiationsstudien ergaben, dass die Bildung des 48S-Initiationskomplexes nicht beeinflusst wird (Harnisch, 2010; Naarmann *et al.*, 2010). Diese Resultate zeigen, dass K562-Zellen ein geeignetes System zur weiteren Analyse der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation während der erythroiden Reifung sind (Naarmann *et al.*, 2008).

Die Menge der beiden r15-LOX-Translationsinhibitoren hnRNP K und hnRNP E1 nimmt während der erythroiden Reifung von K562-Zellen ab (siehe Abb. 3.6). Auch bei der Analyse von Knochenmarkzellen, Retikulozyten und Erythrozyten aus Kaninchen wurde eine Abnahme der Menge beider Proteine detektiert (Ostareck-Lederer, unpubliziert). Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde auch die Expression weiterer Proteine, die an der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation beteiligt sind, untersucht (Abb. 4.1).

hnRNP K kann die Tyrosin-Kinase c-Src aktivieren und wird durch diese an mehreren Tyrosinen phosphoryliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung des

Tyrosin 458 inhibiert die DICE-Bindung von hnRNP K (Messias *et al.*, 2006) (Abb. 4.1). Interessanterweise wird c-Src nur an den Tagen 6 und 8 der erythroiden Reifung exprimiert (siehe Abb. 3.6A), wenn die hr15-LOX-mRNA translatiert wird (siehe Abb. 3.4). Zu diesen Zeitpunkten ist auch eine Tyrosin-Phosphorylierung von hnRNP K nachweisbar (siehe Abb. 3.7). Die Interaktion zwischen c-Src und hnRNP K wird durch die Arginin-Methylierung von hnRNP K kontrolliert. hnRNP K wird durch PRMT1 an fünf Argininen quantitativ asymmetrisch dimethyliert. Methyliertes hnRNP K zeigt eine reduzierte Interaktion mit c-Src, wodurch die Aktivierung von c-Src vermindert wird (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006, Abb. 4.1). Die PRMT1-Menge nimmt während der erythroiden Reifung von K562-Zellen ab (siehe Abb. 3.6A). Auch die Methylierungsaktivität des Extraktes gegenüber hnRNP K ist am Tag 8 der Reifung deutlich reduziert (Naarmann *et al.*, 2008). Während die Gesamtmenge an hnRNP K während der erythroiden Reifung deutlich abnimmt, kann eine Zunahme des nicht-methylierten Proteins detektiert werden (siehe Abb. 3.6A).

Im reifen Retikulozyten wird die Translation der r15-LOX-mRNA aktiviert. Voraussetzung hierfür ist eine effiziente Interaktion zwischen c-Src und nicht-methyliertem hnRNP K (siehe oben). Um diese zu realisieren, sind verschiedene Möglichkeiten denkbar. Zum einen könnte die Methylierung reversibel sein. Bislang wurde für hnRNP K jedoch keine Demethylase beschrieben. Lediglich eine Arginin-Demethylase ist bekannt: JMJD6 katalysiert die Demethylierung von Arginin 2 in Histon H3 sowie von Arginin 3 in Histon H4 (Chang *et al.*, 2007). Zum anderen wäre es denkbar, dass das in der Zelle vorhandene methylierte hnRNP K durch neu synthetisiertes, nicht-methyliertes Protein ersetzt wird, wie für das Histon H3.3 gezeigt (Ahmad und Henikoff, 2002; Janicki *et al.*, 2004). Da PRMT1 während der erythroiden Reifung von K562-Zellen abgebaut wird, die hnRNP K-mRNA während der gesamten Reifung vorhanden ist (siehe Abb. 3.6) und wahrscheinlich translatiert werden kann, trifft vermutlich die zweite Möglichkeit zu.

K562-Zellen rekapitulieren während der induzierten erythroiden Reifung den Mechanismus der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation vollständig. Es handelt sich jedoch um Krebszellen, die aus einer CML-Patientin isoliert wurden. K562-Zellen weisen große chromosomale Abnormalitäten wie das Philadelphia-Chromosom (siehe 1.1.2, Rowley, 1973) auf. Durch diese Translokation kommt es zur Expression der konstitutiv aktiven Tyrosin-Kinase Bcr-Abl (Ben-Neriah *et al.*, 1986, siehe 1.1.2). Außerdem wird die erythroide Reifung durch Natrium-Butyrat und nicht durch Erythropoetin induziert. Es war deshalb fraglich, ob die induzierte erythroide Reifung von K562-Zellen einer physiologischen erythroiden Reifung entspricht. Daher wurden einige Experimente mit humanen CD34⁺-Zellen, die aus peripherem Blut isoliert wurden, wiederholt. hr15-LOX

und die bekannten Regulatoren der hr15-LOX-mRNA-Translation zeigten während der Reifung von CD34⁺-Zellen ähnliche Expressionsmuster in K562-Zellen (siehe 3.1). Es kann davon ausgegangen werden, dass die Reifung von K562-Zellen bezüglich der Regulation der hr15-LOX-mRNA-Translation einer physiologischen Situation entspricht. Auch der Kernausschluss und der Abbau der Mitochondrien, wichtige morphologische Veränderungen während der Erythropoese, wurden beobachtet (siehe Abb. 3.2). In dieser Arbeit wurde jedoch zum Beispiel nicht untersucht, ob es auch zu einer Umstrukturierung der Zellmembran kommt, die in einer bikonkaven Form der reifen Zellen resultiert.

Zusammenfassung

Auf der Basis von humanen K562-Zellen konnte ein induzierbares erythroides Zellsystem etabliert werden, das wichtige Charakteristika der erythroiden Reifung rekapituliert: die Synthese von Hämoglobin, den Ausschluss des Zellkerns, die Regulation der hr15-LOX-mRNA-Translation durch hnRNP K und hnRNP E1 sowie den Abbau der Mitochondrien. Die Ergebnisse, die unter Verwendung von K562-Zellen erhalten wurden, konnten mit primären humanen CD34⁺-Zellen vollständig rekapituliert werden. Somit stellen K562-Zellen ein geeignetes System zur weiteren Analyse der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression während der erythroiden Reifung, insbesondere der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation, dar.

4.2 Zur Identifizierung neuer durch hnRNP K regulierter mRNAs

Bei der Charakterisierung der erythroiden Reifung von K562-Zellen wurde die interessante Beobachtung gemacht, dass die Tyrosin-Kinase c-Src erst an den Tagen 6 und 8 der Induktion detektiert werden kann (siehe Abb. 3.6A). Die c-Src-mRNA ist dagegen während der gesamten erythroiden Reifung nachweisbar (siehe Abb. 3.6B). Diese Ergebnisse legen eine posttranskriptionelle Kontrolle der c-Src-Expression während der erythroiden Reifung nahe.

hnRNP K wurde bereits für andere mRNAs als Regulator der Translation beschrieben. Neben der r15-LOX-mRNA inhibiert hnRNP K auch die Translation der RNA des menschlichen Papillomavirus Typ 16 L2 (Collier *et al.*, 1998). Die 5'cap-unabhängige Translation der c-Myc-mRNA wird dagegen durch hnRNP K verstärkt (Evans *et al.*, 2003). Daher wurde untersucht, ob hnRNP K auch eine Funktion in der Regulation der c-Src-mRNA-Translation hat. Co-Immunopräzipitationsanalysen zeigten, dass hnRNP K nur in nicht-induzierten K562-Zellen mit der c-Src-mRNA interagiert (siehe Abb. 3.13). In UV-Crosslink-Experimenten mit rekombinantem Protein konnte eine direkte Interaktion detektiert und auf das Fragment Src3 der c-Src-3'UTR eingegrenzt werden. Dieses mRNA-Element vermittelt die Inhibition der Translation von Reporter-mRNAs in

cytoplasmatischen Extrakten aus nicht-induzierten K562-Zellen (Naarmann *et al.*, 2008). Der *knock down* von hnRNP K, nicht aber von hnRNP E1 resultierte in einer De-Repression der c-Src-Synthese (siehe Abb. 3.15). Sowohl die Translation der hr15-LOX-mRNA als auch der c-Src-mRNA wird während der erythroiden Reifung von K562-Zellen durch hnRNP K kontrolliert (Abb. 4.1). Es scheint jedoch einige Unterschiede in den Regulationsmechanismen zu geben. So kann eine De-Repression der c-Src-Synthese durch den alleinigen *knock down* von hnRNP K erreicht werden, für eine Aktivierung der hr15-LOX-mRNA-Translation müssen dagegen sowohl die hnRNP K- als auch die hnRNP E1-Menge reduziert werden (siehe Abb. 3.5).

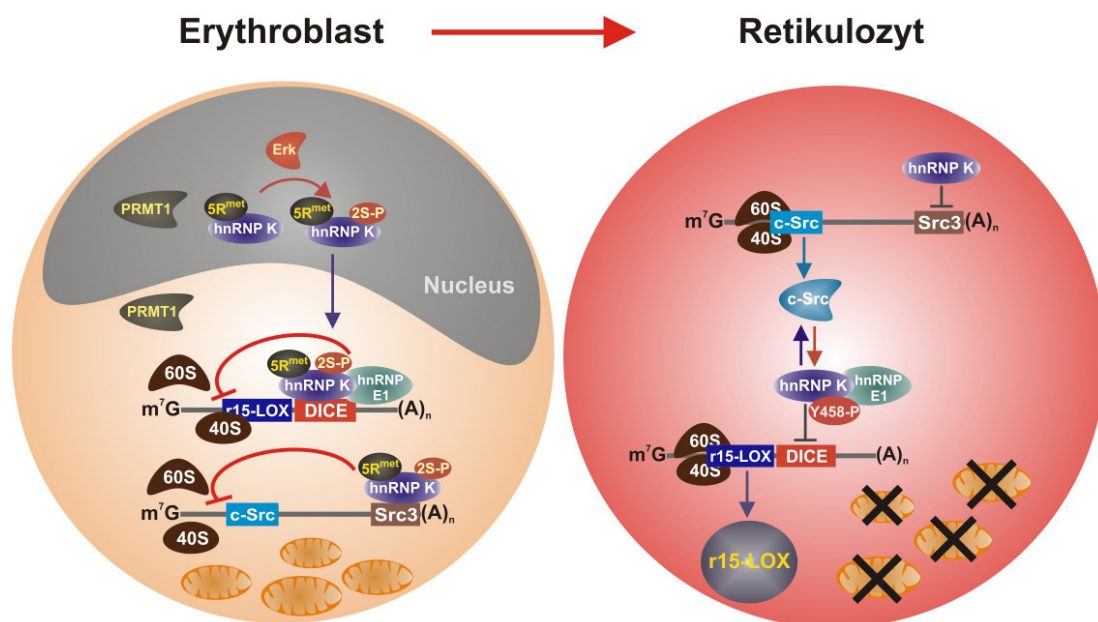


Abb. 4.1: Modell der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression während der erythroiden Reifung.

Die Synthese der r15-LOX ist auf reife Retikulozyten beschränkt. Hier initiiert das Enzym den Abbau der Mitochondrien (Rapoport und Schewe, 1986). Links: in Erythroblasten ist die Translation der r15-LOX-mRNA inhibiert, da die Bildung translationskompetenter 80S-Ribosomen durch hnRNP K und hnRNP E1, gebunden an das DICE in der 3'UTR, inhibiert wird. Dieser Komplex inhibiert die Assoziation der 60S-Untereinheit des Ribosoms (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck *et al.*, 2001). hnRNP K bindet auch an das c-Src-mRNA-3'UTR-Element Src3 und inhibiert die c-Src-mRNA-Translation durch die Blockierung der Bildung von 80S-Ribosomen (Naarmann *et al.*, 2008). hnRNP K wird quantitativ asymmetrisch an fünf Argininen durch PRMT1 dimethyliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2006). Die Phosphorylierung der Serine 284 und 353 in hnRNP K durch Erk führt zur cytoplasmatischen Akkumulation des Proteins (Habelhah *et al.*, 2001). Rechts: im reifen Retikulozyten bindet hnRNP K das Element Src3 in der c-Src-mRNA-3'UTR nicht mehr und die Kinase wird synthetisiert. Methyliertes hnRNP K wird während der erythroiden Reifung gegen nicht-methyliertes Protein ausgetauscht (Naarmann *et al.*, 2008). Das nicht-methylierte hnRNP K fungiert dann als spezifischer Aktivator von c-Src (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002; Adolph *et al.*, 2007). Die Phosphorylierung des Tyrosin 458 in der dritten KH-Domäne von hnRNP K durch c-Src führt zum Verlust der DICE-Bindungsaktivität von hnRNP K und damit seiner Rolle als Inhibitor der r15-LOX-mRNA-Translation (Messias *et al.*, 2006). Die r15-LOX-mRNA-Translation wird aktiviert und das neu synthetisierte Protein katalysiert die Dioxygenierung von Phospholipiden in der Mitochondrienmembran (Rapoport und Schewe, 1986; van Leyen *et al.*, 1998; Grüllich *et al.*, 2001). (aus Naarmann *et al.*, 2008).

Auch die Aktivierung der Translation während der erythroiden Reifung verläuft unterschiedlich: hnRNP K wird durch die Tyrosin-Kinase c-Src phosphoryliert (Ostareck-Lederer *et al.*, 2002). Die Phosphorylierung des Tyrosin 458 inhibiert die Bindung von hnRNP K an das DICE und ermöglicht so die Translation der r15-LOX-mRNA (Messias *et al.*, 2006). Auch die Aktivierung der c-Src-mRNA-Translation scheint mit einer Dissoziation von hnRNP K (siehe Abb. 3.13) einherzugehen, bislang ist der Mechanismus jedoch nicht bekannt. So wäre es möglich, dass nicht-methyliertes hnRNP K weniger effizient mit der c-Src-mRNA interagiert.

Röntgenkristallstrukturen und NMR-Studien zeigten, dass die dritte KH-Domäne von hnRNP K spezifisch UCCC- und CCCC-Sequenzen bindet (Backe *et al.*, 2005; Messias *et al.*, 2006). Das Kaninchen-DICE besteht aus 10 konsekutiv angeordneten 19nt-langen CU-reichen repetitiven Elementen (Fleming *et al.*, 1989). In jeder der Wiederholungen sind 1-2 der UCCC- bzw. CCCC-Motive lokalisiert. Die 3'UTR der hr15-LOX-mRNA verfügt über vier Wiederholungen, die ebenfalls hnRNP K-Interaktionsmotive enthalten (Sigal *et al.*, 1988). Auch im Element Src3 der c-Src-3'UTR sind 13 putative hnRNP K-Interaktionsstellen lokalisiert. Sie sind allerdings nicht wie beim DICE in repetitiven Sequenzelementen angeordnet (Naarmann *et al.*, 2008).

hnRNP K reguliert sowohl die Translation der hr15-LOX-mRNA als auch der c-Src-mRNA während der erythroiden Reifung. Zur Identifizierung weiterer durch hnRNP K regulierter mRNAs wurde daher eine hnRNP K-Immunopräzipitation durchgeführt, die co-immunopräzipitierten mRNAs isoliert und für Microarray-Analysen verwendet. Hierbei konnten 159 RNAs identifiziert werden, die eine mindestens zweifache Anreicherung im Vergleich zu der Kontroll-Immunopräzipitation zeigten (siehe Abb. 3.16). Alle RNAs zeigten eine deutlich stärkere Interaktion mit hnRNP K in nicht-induzierten K562-Zellen als am Tag 8 der erythroiden Reifung. Die Proteine, für die die identifizierten mRNAs kodieren, haben sehr diverse zelluläre Funktionen. Interessanterweise hat die größte Gruppe eine Funktion in der Signaltransduktion, ebenso wie die c-Src-mRNA.

Die durch Microarray-Analysen identifizierten neuen mRNAs, die mit hnRNP K interagieren, müssen durch weitere Experimente als hnRNP K-Interaktionspartner verifiziert werden. Anschließend wäre es interessant zu untersuchen, ob hnRNP K auch die Translation dieser mRNAs beeinflusst und ob die Interaktion in allen Fällen über die UCCC- bzw. CCCC-Motive erfolgt.

Zusammenfassung

hnRNP K konnte als Regulator der c-Src-mRNA-Translation identifiziert werden. Die c-Src-mRNA co-immunopräzipitiert mit hnRNP K am Tag 0, aber nicht am Tag 8 der erythroiden Reifung. hnRNP K interagiert mit dem Fragment Src3 der c-Src-3'UTR, welches die Inhibition der Translation auf der Ebene der Initiation vermittelt. In Microarray-Analysen wurden 159 RNAs als putative hnRNP K-Interaktionspartner identifiziert.

4.3 Zur Analyse der r15-LOX-Translationsregulation

DDX6 wurde durch die Kombination von GRNA-Chromatographie und hnRNP K-Immunopräzipitation als DICE-abhängiger Interaktionspartner von hnRNP K identifiziert (Harnisch, 2010; Naarmann *et al.*, 2010). In der vorliegenden Arbeit wurde eine mögliche Funktion von DDX6 in der Regulation der r15-LOX-mRNA-Translation untersucht.

DDX6, welches in Säugern auch als Rck oder p54 bezeichnet wird, gehört zur Familie der DEAD-Box-RNA-Helikasen. Die Familie der DEAD-Box-Helikasen (Linder *et al.*, 1989) wurde durch Goralenya *et al.*, 1988 basierend auf der Homologie zum Translations-initiationsfaktor eIF4A beschrieben. DEAD-Box-Proteine sind durch neun konservierte Motive charakterisiert (Abb. 4.2, Linder, 2006). Motiv II (Walker B, Walker *et al.*, 1982) ist das namensgebende DEAD-Motiv, welches zusammen mit Motiv I (Walker A), dem Q-Motiv und Motiv VI für die ATP-Bindung und -Hydrolyse notwendig ist (Tanner *et al.*, 2003; Blum *et al.*, 1992; Pause *et al.*, 1994; Pause und Sonenberg, 1992). Die Funktion der restlichen Motive ist weniger gut untersucht. DEAD-Box-RNA-Helikasen sind an diversen RNA-abhängigen zellulären Prozessen wie dem Splicing, der Ribosomen-Biogenese, dem RNA-Transport und -Abbau sowie der mRNA-Translation beteiligt. Sie sind in der Lage, RNA-Strukturen und Protein-RNA-Interaktionen zu modulieren (Linder *et al.*, 1989; Linder, 2006; Jankowsky und Bowers, 2006).

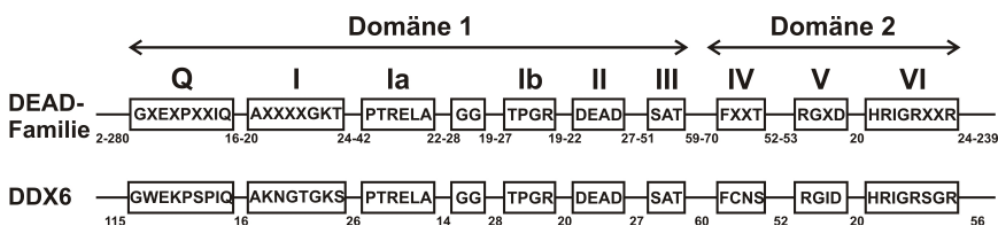


Abb. 4.2: Schematische Darstellung der Struktur von DEAD-Box-Proteinen.

Die konservierten Motive sind für die Familie der DEAD-Box-Proteine (oben) sowie DDX6 (unten) dargestellt. Motiv I wird auch als Walker A-Motiv, Motiv II als Walker B-Motiv bezeichnet (Walker *et al.*, 1982). Die Zahlen unterhalb der dargestellten Motive geben den Abstand zwischen den Motiven in Aminosäuren an. Nach Pause *et al.*, 1993; Cordin *et al.*, 2006; Weston und Sommerville, 2006.

Humanes DDX6 (Rck, p54) wurde als putatives Proto-Onkogen (Akao *et al.*, 1995) beschrieben, da das Gen an einer chromosomalen Bruchstelle in der B-Zell-Lymphomlinie RC-K8 gefunden wurde (Lu und Yunis, 1992). DDX6 wird in den meisten Geweben exprimiert, in vielen Tumorzelllinien kann eine erhöhte Expression detektiert werden (Akao *et al.*, 1995). Homologe Proteine sind unter anderem in *Xenopus laevis* (Xp54, Ladomery *et al.*, 1997), *Spisula solidissima* (p47, Minshall *et al.*, 2001), *Drosophila melanogaster* (Me31B, Nakamura *et al.*, 2001), *Caenorhabditis elegans* (CGH-1, Navarro *et al.*, 2001) und *Saccharomyces cerevisiae* (Dhh1, Coller *et al.*, 2001) beschrieben worden. DDX6 und seine Homologen sind hoch konserviert, so beträgt zum Beispiel die Identität zwischen Me31B und humanem DDX6 75%. Die größten Unterschiede kommen durch unterschiedliche N- und C-terminale Verlängerungen zustande. Es wird vermutet, dass diese Protein-Protein-Interaktionen vermitteln (Weston und Sommerville, 2006). DDX6 besteht aus zwei RecA-ähnlichen Domänen. Die N-terminale Domäne (D1) besteht aus dem Q-Motiv, gefolgt von den Motiven I-III. Die C-terminale Domäne (D2) beinhaltet die Motive IV-VI (Cheng *et al.*, 2005; Cordin *et al.*, 2006, Abb. 4.2). Am N-Terminus von DDX6 bzw. Xp54 sind sowohl ein NLS als auch ein nukleäres Exportsignal lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass das Protein in der Lage ist, zwischen Kern und Cytoplasma zu *shutteln* (Smillie und Sommerville, 2002).

DDX6 wurde durch die Kombination von GRNA-Chromatographie und hnRNP K-Immunopräzipitation als DICE-abhängiger Interaktionspartner von hnRNP K identifiziert (Harnisch, 2010; Naarmann *et al.*, 2010). Diese durch massenspektrometrische Analysen nachgewiesene Interaktion musste zunächst in weiteren Experimenten verifiziert werden. Sowohl GST-hnRNP K als auch GST-hnRNP E1 interagieren mit DDX6 aus cytoplasmatischem K562-Extrakt (Harnisch, 2010). Co-Immunopräzipitations-Studien zeigten, dass auch endogenes hnRNP K mit DDX6 interagiert (siehe Abb. 3.17). Nach der Behandlung des Immunopräzipitats mit *Micrococcus*-Nuklease wurde diese Interaktion nicht mehr detektiert, konnte jedoch spezifisch nach der Zugabe von DICE-RNA wiederhergestellt werden (siehe Abb. 3.17). Dies deutet darauf hin, dass DDX6 und hnRNP K nicht direkt, sondern über die DICE-RNA interagieren. Dies steht in Übereinstimmung mit Studien in anderen Organismen, in denen RNase-sensitive Protein-Protein-Interaktionen der DDX6-Orthologen gefunden wurden. So interagiert p47 in *Spisula solidissima* mit CPEB (Minshall *et al.*, 2001), Me31B in *Drosophila melanogaster* mit Exuperantia und Ypsilon-Schachtel (Wilhelm *et al.*, 2000; Nakamura *et al.*, 2001) und CGH-1 in *Caenorhabditis elegans* mit CAR-1 (Boag *et al.*, 2005). In Filterbindungsstudien wurde ein K_D von 70 nM für die Bindung von rekombinantem DDX6 an das DICE bestimmt (Moritz, unpubliziert). In UV-Crosslink-Experimenten konnte diese relativ

schwache Interaktion jedoch nicht detektiert werden, nur in Anwesenheit von hnRNP K wurde ein Crosslink-Signal für DDX6 erhalten. Auch die Bindung von hnRNP K und hnRNP E1 an das DICE wurde durch DDX6 verstärkt (Harnisch, 2010). Um die Interaktion von DDX6 mit einer DICE-tragenden RNA auch *in vivo* zu untersuchen, wurde die Methode der trimolekularen Fluoreszenzkomplementierung (TriFC) angewendet (siehe 2.9.2). Eine Rekonstitution des Venus-Proteins wurde beobachtet, wenn neben DDX6 eine DICE-tragende RNA co-transfiziert wurde, nicht aber bei der Co-Transfektion einer Kontroll-RNA (siehe Abb. 3.19). Eine spezifische Interaktion mit der Nos-2-mRNA und anderen RNAs, die während der Entwicklung reguliert werden, konnte für CGH-1 (Boag *et al.*, 2008; Noble *et al.*, 2008) und das *Trypanosoma*-Ortholog DHH1 (Kramer *et al.*, 2010) gezeigt werden. Weitere TriFC-Analysen zeigten, dass die Bindung an das DICE durch Domäne 2 (D2) vermittelt wird (siehe oben, Abb. 3.20). Außerdem vermittelt D2 die Lokalisierung von DDX6 in cytoplasmatische granuläre Strukturen (siehe Abb. 3.20). In *Xenopus laevis* ist D2 ausreichend für die Repression der Translation in *tethering*-Assays und die Akkumulation von Xp54 in *P-bodies* (Minshall *et al.*, 2009). Der TriFC-Assay ist eine Möglichkeit, RNA-Protein-Interaktionen *in vivo* zu untersuchen. Zur Rekonstitution des fluoreszierenden Venus-Proteins kommt es, wenn die beiden Teile in der richtigen Orientierung in räumliche Nähe zueinander gebracht werden (Hu *et al.*, 2002). Daher ist es möglich, dass DDX6 und das DICE nicht direkt, sondern indirekt über ein anderes Protein interagieren. Ein mögliches negatives TriFC-Ergebnis schließt andererseits eine Interaktion nicht aus: es ist möglich, dass sowohl MS2BP als auch das jeweilige RNA-bindende Protein die RNA binden, sich jedoch die beiden Teile des Venus-Proteins nicht in der richtigen räumlichen Orientierung zueinander befinden. Mit Hilfe des TriFC-Assays können also Aussagen darüber getroffen werden, ob sich Protein und RNA in direkter räumlicher Nähe in einem gemeinsamen Komplex befinden, während man in Co-Lokalisierungs-Studien nur eine gewisse räumliche Nähe detektieren kann.

Da DDX6 DICE-abhängig mit hnRNP K interagiert, wurde eine mögliche Funktion in der Regulation der hr15-LOX-mRNA-Translation untersucht. Daher wurde die DDX6-Expression durch spezifische siRNAs reduziert. Die verwendeten siRNAs reduzierten die DDX6-Expression nur in 54% der Zellen deutlich. Daher wurde der Effekt des *knock downs* mittels Immunfluoreszenzmikroskopie untersucht. Ein effizienter *knock down* von DDX6 führte zu einer De-Repression der hr15-LOX-Translation (siehe Abb. 3.22A). Die Menge an hr15-LOX-mRNA wurde durch die Reduktion der DDX6-Menge nicht beeinflusst (siehe Abb. 3.21). Bislang wurde eine Funktion in der Regulation einer spezifischen mRNA für die DDX6-Orthologen Me31B und CGH-1 gezeigt. Der Verlust von Me31B in *Drosophila melanogaster*-Keimzellen führt zu einer De-Repression der Oskar- und BicD-mRNA-Translation während ihres Transports zu den Oozyten (Nakamura *et al.*,

2001). Während der Oogenese in *Caenorhabditis elegans* wird die Nos-2-mRNA in Abwesenheit von CGH-1 vorzeitig translatiert (Gallo *et al.*, 2008).

Die TriFC- und Immunfluoreszenz-Analysen (siehe Abb. 3.19, 3.20, 3.22) zeigten, dass DDX6 in cytoplasmatischen granulären Strukturen lokalisiert ist. Daher wurde untersucht, ob sich die hr15-LOX-mRNA auch in diesen Strukturen befindet. Hierzu wurde zunächst die Lokalisierung der ORF-DICE-6MS2-RNA untersucht. Diese wurde durch die Co-Transfektion von GFP-NLS-MS2BP sichtbar gemacht (siehe Abb. 3.23). Die Analyse mit konfokaler *laser scanning*-Mikroskopie und Darstellung der Signale in Intensitätsprofilen zeigte, dass nur die DICE-tragende RNA, nicht aber die Kontroll-RNA mit DDX6 colokalisierte. Dies ist ein erster Hinweis auf eine mögliche Rekrutierung der hr15-LOX-mRNA in DDX6-haltige granuläre cytoplasmatische Strukturen. Hieraus ergab sich die Frage, um welchen Typ granulärer Strukturen es sich handelt. In somatischen Zellen wurden zwei Typen cytoplasmatischer granulärer Strukturen beschrieben. *Stress granules* werden gebildet, wenn die globale Translationsinitiation blockiert wird. Hier werden nicht-translatierte mRNAs gespeichert (siehe 1.2.2). In *P-bodies* findet der Abbau von mRNAs statt (Sheth *et al.*, 2003). Während der Embryonalentwicklung kommt es unter anderem in *Caenorhabditis elegans* zur Bildung von *germ granules* oder *P-granules*, in denen translational inaktive maternale mRNAs gespeichert werden (Anderson und Kedersha, 2006; Rajyaguru und Parker, 2009; Schisa *et al.*, 2001).

Nach der Applikation von oxidativem Stress wurden weder DDX6 noch die bereits bekannten Regulatoren der hr15-LOX-mRNA-Translation hnRNP K und hnRNP E1 in *stress granules* detektiert (siehe Abb. 3.24). Auch die hr15-LOX-mRNA lokalisiert im Gegensatz zur GAPDH-mRNA und den meisten polyadenylierten mRNAs nicht in *stress granules* (siehe Abb. 3.25). Es wäre jedoch möglich, dass es während der erythroiden Reifung von K562-Zellen zur Bildung von *stress granules* kommt. Immunfluoreszenz-Analysen zeigten jedoch, dass dies nicht der Fall ist (siehe Abb. 3.26). In Studien mit MTD-1 A- bzw. HeLa-Zellen wurde eine Lokalisierung von hnRNP K (Fukuda *et al.*, 2009) und DDX6 (Wilczynska *et al.*, 2005) in *stress granules* detektiert. Allerdings wurde hier auch die Lokalisierung von RFP-DDX6 unter Verwendung von eIF3 als *stress granules*-Marker untersucht (Wilczynska *et al.*, 2005). Desweiteren gibt es eventuell auch zelltyp-spezifische Unterschiede in der Rekrutierung von Proteinen in *stress granules*.

Da es sich bei den DDX6-positiven granulären Strukturen nicht um *stress granules* handelt, wurden Co-Färbungen mit dem *P-body*- und *germ granule*-Marker Dcp1A durchgeführt. Während der erythroiden Reifung von K562-Zellen wurde eine Co-Lokalisierung von DDX6 und Dcp1A detektiert (siehe Abb. 3.28). Der *knock down* von DDX6 hat nur einen geringen Einfluss auf das Dcp1A-Signal, die Zahl der Dcp1A-

positiven granulären Strukturen ist jedoch deutlich reduziert (siehe Abb. 3.29). Bei den verbleibenden Dcp1A-*granules* könnte es sich um *P-bodies* handeln. In Mausoozyten-Injektionsexperimenten wurden zwei Typen von Dcp1A-Foci gefunden, von denen DDX6 nur mit den kleineren co-lokalisierte (Swetloff *et al.*, 2009). IF-FISH-Analysen zeigten, dass die hr15-LOX-mRNA in nicht-induzierten K562-Zellen mit DDX6 in *P-body*-ähnlichen RNP-*granules* co-lokalisiert (siehe Abb. 3.30). Im Gegensatz hierzu sind die c-Src- und die GAPDH-mRNA nicht in den DDX6-haltigen granulären Strukturen lokalisiert. Am Tag 8 der erythroiden Reifung ist das hr15-LOX-mRNA-Signal im Cytoplasma verteilt (siehe Abb. 3.30). Dies deutet darauf hin, dass die aktiv translatierte hr15-LOX-mRNA aus den DDX6-haltigen granulären Strukturen freigesetzt wird. Die hr15-LOX-mRNA- und DDX6-positiven Strukturen wurden durch weitere Färbungen charakterisiert. Die hr15-LOX-mRNA und DDX6 co-lokalisieren mit hnRNP E1 und rpS19, nicht aber rpL19 (siehe Abb. 3.31). Dies deutet darauf hin, dass sich in den DDX6-*granules* 40S-Untereinheiten des Ribosoms, nicht aber 60S-Untereinheiten befinden. Dies ist in Übereinstimmung mit dem beschriebenen Mechanismus, nach dem hnRNP K und hnRNP E1 durch die Bindung an das DICE die Translations-Initiation auf der Stufe des 48S-Initiationskomplexes durch die Inhibierung der Assoziation der 60S-Untereinheit blockieren (Ostareck *et al.*, 1997; Ostareck *et al.*, 2001).

Bei den DDX6-positiven granulären Strukturen, die auch hr15-LOX-mRNA enthalten, scheint es sich weder um *stress granules* noch um *P-bodies* zu handeln. DDX6 co-lokalisiert zwar auch mit Dcp1A, einem *P-body*-Marker, jedoch werden in den DDX6-positiven granulären Strukturen mRNAs anscheinend gespeichert und nicht nur abgebaut. Diese Beobachtungen legen nahe, dass es sich bei den granulären Strukturen um RNP-*granules* handelt, die den *germ granules* in Keimbahnzellen ähneln (Rajyaguru und Parker, 2009).

Zusammenfassung

DDX6 wurde als neuer Regulator der hr15-LOX-mRNA-Translation identifiziert. DDX6 ist für die effiziente Repression der hr15-LOX-mRNA-Translation in nicht-induzierten K562-Zellen notwendig und rekrutiert die hr15-LOX-mRNA in cytoplasmatische granuläre Strukturen, die neben DDX6 auch hnRNP E1 und 40S-Untereinheiten des Ribosoms enthalten.

4.4 Zur Analyse des Abbaus von hnRNP K

Die Menge hnRNP K und hnRNP E1 nimmt während der erythroiden Reifung ab (siehe Abb. 3.5, Abb. 3.11 und Ostareck-Lederer, unpubliziert). Ein wichtiges System für den Abbau intrazellulärer Proteine ist das Ubiquitin-Proteasom-System (UPS) (siehe 1.3.1). Daher wurde untersucht, ob der Abbau von hnRNP K während der erythroiden Reifung über das UPS erfolgt.

Nach induzierten DNA-Schäden wird hnRNP K in U2OS-Zellen über das UPS abgebaut, die Ubiquitin-Ligase ist in diesem Fall HDM2 (Moumen *et al.*, 2005). Während der erythroiden Reifung von K562-Zellen wird HDM2 jedoch nicht exprimiert (siehe Abb. 3.32), scheint also nicht die verantwortliche Ubiquitin-Ligase zu sein. Es ist jedoch möglich, dass eine andere Ubiquitin-Ligase den Abbau von hnRNP K vermittelt.

Daher wurde der Effekt verschiedener Proteasom-Inhibitoren auf die hnRNP K-Expression untersucht. In nicht-induzierten K562-Zellen wurde hnRNP K durch keinen der fünf getesteten Inhibitoren stabilisiert (nicht gezeigt). Die Inhibitoren unterscheiden sich unter anderem in ihrer Spezifität für die proteolytisch aktiven Untereinheiten (siehe 2.1.4). Wurde das Proteasom während der erythroiden Reifung mit MG132 inhibiert, konnten keine hochmolekularen hnRNP K-Ubiquitin-Konjugate detektiert werden (siehe Abb. 3.33). Dies deutet darauf hin, dass hnRNP K nicht durch das Proteasom abgebaut wird. Da jedoch nicht sicher gestellt werden konnte, dass die Inhibition des Proteasoms vollständig ist, wurde eine mögliche Rolle des UPS beim Abbau von hnRNP K über einen weiteren Weg analysiert: die Menge des Ubiquitin-aktivierenden Enzyms E1, im Menschen Uba1, wurde mittels RNAi reduziert. Die Reduktion der Uba1-Menge mit drei verschiedenen siRNAs führte nicht zur Stabilisierung von hnRNP K (siehe Abb. 3.34). Auch die Kombination des Uba1-*knock downs* mit der erythroiden Reifung von K562-Zellen hatte keinen Einfluss auf die hnRNP K-Expression (siehe Abb. 3.35). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass hnRNP K während der erythroiden Reifung nicht durch das UPS abgebaut wird. Jedoch führt der *knock down* lediglich zu einer Reduktion der Uba1-Menge, es wäre möglich, dass die verbleibende Uba1-Menge ausreichend ist, um den Abbau von hnRNP K zu vermitteln. Desweiteren wurde neben Uba1 ein weiteres Ubiquitin-aktivierendes Enzym beschrieben, Uba6 bzw. Ube1L2 (Jin *et al.*, 2007; Pelzer *et al.*, 2007). In dieser Arbeit wurde nicht untersucht, ob Uba6 in K562-Zellen exprimiert wird. Sollte Uba6 in K562-Zellen exprimiert werden, könnte auch dieses Enzym Ubiquitin aktivieren und den Abbau von hnRNP K ermöglichen.

Um den Abbau von hnRNP K besser analysieren zu können, wurde zunächst die Halbwertszeit von hnRNP K in K562-Zellen bestimmt, nachdem die Translation mit Puromycin inhibiert wurde. Diese beträgt ca. 14 Stunden (siehe Abb. 3.36). Neben der

Abnahme des Signals für hnRNP K kann interessanterweise die Entstehung eines ca. 48 kD großen Spaltprodukts detektiert werden. Dieses Spaltprodukt scheint weiter abgebaut zu werden, da dessen Menge nicht in dem Maße zunimmt in dem die Menge hnRNP K abnimmt (siehe Abb. 3.36). Während der erythroiden Reifung von K562-Zellen kann das Spaltprodukt nur nach der Anreicherung von hnRNP K durch eine Immunopräzipitation nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.37). Das Spaltprodukt scheint durch Puromycin stabilisiert beziehungsweise sein weiterer Abbau verhindert zu werden. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass Puromycin als Aminoacyl-tRNA-Analog fungiert und ein Freisetzen der wachsenden Polypeptidkette bewirkt (Yarmolinsky und Haba, 1959; Morris *et al.*, 1962; Nathans, 1964). Hierdurch kommt es in der Zelle zur Akkumulation unvollständiger Proteine, die abgebaut werden müssen. Da das hnRNP K-Spaltprodukt auch während der erythroiden Reifung nachweisbar ist, scheint es ein Zwischenprodukt des physiologischen Abbaus von hnRNP K während der erythroiden Reifung zu sein. Aufgrund der besseren Nachweisbarkeit des Spaltprodukts wurden weitere Experimente zur Analyse des Abbaus von hnRNP K mit K562-Zellen durchgeführt, die 16 Stunden mit Puromycin behandelt wurden, da hier in etwa ein 1:1-Verhältnis zwischen hnRNP K und Spaltprodukt vorlag; vorausgesetzt, dass der Antikörper beide Proteine in gleichem Maße erkennt.

Normalerweise katalysiert das Proteasom den prozessiven Abbau von Proteinen zu kurzen Oligopeptiden (Nussbaum *et al.*, 1998; Kisselev *et al.*, 1999). Dennoch sollte eine mögliche Beteiligung des UPS an der Spaltung von hnRNP K ausgeschlossen werden. Die Kombination des *knock downs* von Uba1 mit der Inhibition der Translation durch Puromycin hatte keinen Einfluss auf die Entstehung des Spaltprodukts (siehe Abb. 3.38), das UPS vermittelt daher wahrscheinlich nicht die Spaltung von hnRNP K. Es wäre jedoch möglich, dass das 20S-Proteasom Ubiquitin- und ATP-unabhängig die Spaltung katalysiert, wie für YB-1 gezeigt (Sorokin *et al.*, 2005). Um dies zu untersuchen, müsste die Inhibition des Proteasoms mit der Inhibition der Translation kombiniert werden. Proteasom-Inhibitoren haben jedoch häufig auch Effekte auf andere zelluläre System wie den mRNA-Abbau oder die Translation (Ding *et al.*, 2006; Mazroui *et al.*, 2007). Dies erschwert die Auswertung eines solchen Experiments.

Das hnRNP K-Spaltprodukt wird durch den Antikörper D6 (Santa Cruz), der für die Western Blot-Analysen in dieser Arbeit verwendet wurde, erkannt (siehe Abb. 3.36, 3.37, 3.38). Das Epitop dieses Antikörpers konnte auf die Aminosäuren 1-121 eingegrenzt werden (nicht gezeigt). Auch der Antikörper 1G5 (E. Kremmer), der die Aminosäuren 255-272 erkennt, detektiert das Spaltprodukt. Der Antikörper #54 (K. Bomsztyk, Aminosäuren 454-464 (Van Seuning *et al.*, 1995)) erkennt das Spaltprodukt dagegen nicht (siehe

Abb. 3.39). Dies deutet darauf hin, dass es sich um ein N-terminales Fragment handelt. Um das 48 kD-große Spaltprodukt weitergehend zu charakterisieren, wurde es aus Puromycin-behandelten K562-Zellen gereinigt. Die massenspektrometrische Analyse ergab ebenfalls, dass es sich bei dem Spaltprodukt um ein N-terminales Fragment handelt. Ab Aminosäure 327 wurde im tryptischen Verdau kein Peptid identifiziert (siehe Abb. 3.41). Dies deutet darauf hin, dass dem Spaltprodukt die dritte KH-Domäne fehlt. Die Analyse des tryptischen Verdau mit ESI-Q-TOF kann jedoch keinen Aufschluss über die genaue Spaltstelle geben, da evtl. nicht alle generierten Peptide detektiert werden können. Die Bestimmung des Molekulargewichts des Fragments durch eine MALDI-TOF-Analyse wäre zur Identifizierung der Spaltstelle geeignet.

Die bisherigen Daten deuten darauf hin, dass der Abbau von hnRNP K durch eine proteolytische Spaltung eingeleitet wird, bei der ein ca. 48 kD-großes N-terminales Fragment entsteht. Bislang ist nicht bekannt, welche Protease diese Spaltung katalysiert. Für die Identifizierung der Protease ist ein *in vitro*-Spaltungsassay erforderlich. Dieser beruht auf der Inkubation von rekombinantem His-hnRNP K mit cytoplasmatischem Extrakt aus Puromycin-behandelten K562-Zellen und erlaubt den Nachweis des Fragments in Western Blot-Analysen mit einem α -His-Antikörper (siehe Abb. 3.42). Die Effizienz der Proteolyse ist im Vergleich zur Spaltung *in vivo* deutlich reduziert, zeigt jedoch keine Abhängigkeit von der Anwesenheit eines ATP-regenerierenden Systems.

Zusammenfassung

hnRNP K wird während der erythroiden Reifung nicht durch das Ubiquitin-Proteasom-System abgebaut. Nach der Behandlung von K562-Zellen mit Puromycin und während der erythroiden Reifung kann die Entstehung eines ca. 48 kD großen Fragments detektiert werden. Massenspektrometrische Analysen ergaben, dass es sich um ein N-terminales Fragment handelt, dem vermutlich die dritte KH-Domäne fehlt. Die Spaltung von hnRNP K kann auch in einem *in vitro*-Spaltungsassay nachvollzogen werden.

4.5 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurde die c-Src-mRNA unter Verwendung des zur erythroiden Reifung induzierbaren K562-Zellsystems als neue hnRNP K-Ziel-mRNA identifiziert. hnRNP K bindet die c-Src-mRNA und inhibiert ihre Translation in nicht-induzierten K562-Zellen. Die bisherigen Untersuchungen zeigten, dass die Assemblierung von 80S-Ribosomen inhibiert wird (Naarmann *et al.*, 2008). Bislang wurde nicht untersucht, welcher Schritt der Translations-Initiation blockiert wird. Mittels Microarray-Analysen wurden 159 weitere RNAs identifiziert, die durch hnRNP K gebunden werden. Diese Interaktion muss zunächst durch RT-PCR-Analysen der co-immunopräzipitierten RNAs verifiziert werden. Anschließend wäre es interessant zu untersuchen, ob hnRNP K auch die Translation der identifizierten mRNAs während der erythroiden Reifung von K562-Zellen reguliert. Hierzu könnte zunächst der Effekt eines *knock downs* von hnRNP K auf die mRNA-Mengen sowie die Expression der entsprechenden Proteine analysiert werden. Anschließend sollte sich die Identifizierung des RNA-Motivs anschließen, welches von hnRNP K gebunden wird und eine mögliche Inhibition der Translation vermittelt. Interessant wäre es zu analysieren, ob alle neu identifizierten hnRNP K-Ziel-mRNAs UCCC- bzw. CCCC-Motive enthalten und ob diese ähnlich wie im DICE-Element angeordnet sind. Eventuell ist es möglich, ein bzw. mehrere Konsensusmotive für die Bindung von hnRNP K zu identifizieren. Interessant wäre auch eine weitergehende Analyse der jeweiligen inhibitorischen Komplexe, insbesondere die Frage, ob hnRNP E1 und DDX6 ebenfalls Teil des Komplexes sind.

DDX6 wurde in dieser Arbeit als neuer Regulator der hr15-LOX-mRNA-Translation identifiziert und scheint die hr15-LOX-mRNA DICE-abhängig in cytoplasmatische granuläre Strukturen zu rekrutieren, die translational inaktiv sind, da sie nur kleine ribosomale Untereinheiten, nicht aber große ribosomale Untereinheiten enthalten. Die in dieser Arbeit durchgeführten Co-Immunopräzipitationsstudien zeigen, dass hnRNP K und DDX6 DICE-abhängig interagieren. Hieraus kann jedoch nicht geschlossen werden, ob DDX6 und die DICE-RNA direkt oder indirekt interagieren. Die bisherigen *in vitro*-Bindungsstudien sind widersprüchlich. So konnte in Filterbindungsstudien eine direkte Interaktion mit einem K_D von 70 nM detektiert werden (Moritz, unpubliziert), die jedoch in UV-Crosslink-Studien nicht nachgewiesen werden konnte (Harnisch, 2010). In weiteren RNA-Bindungs- Experimenten sollte diese Fragestellung abschließend geklärt werden. Bislang wurde der Effekt von DDX6 auf die Translation der hr15-LOX-mRNA *in vivo* untersucht. Um den Mechanismus der Inhibition genauer zu untersuchen, wären auch *in vitro*-Analysen sinnvoll. In *in vitro*-Translations-Studien mit K562-Extrakt könnte ein möglicher Effekt von rekombinantem DDX6 oder verschiedener DDX6-Varianten getestet

werden. Dazu zählen die vermutlich ATPase-inaktiven Varianten D249Q und R426Q (Minshall *et al.*, 2009; Harnisch, 2010) und die isolierten Domänen 1 und 2. Theoretisch wäre auch eine Depletion des endogenen DDX6 möglich. Dies wäre jedoch problematisch auszuwerten, da DDX6 in großen granulären Strukturen lokalisiert ist und vermutlich auch andere Proteine depletiert werden. Alle bislang getesteten DDX6-spezifischen siRNAs führen nur zu einem *knock down* von ca. 50%. Sollte es möglich sein, den *knock down* von DDX6 zu optimieren, könnte auch translational aktiver cytoplasmatischer Extrakt aus DDX6-*knock down*-Zellen generiert und für *in vitro*-Translationsstudien verwendet werden.

hnRNP K wird während der erythroiden Reifung von K562-Zellen über ein ca. 48 kD-großes Intermediat abgebaut. Die Spaltung von hnRNP K erfolgt wahrscheinlich nicht über das Proteasom. Um dies endgültig auszuschließen, wäre es sinnvoll, die Puromycin-Behandlung von K562-Zellen mit der Inkubation mit einem möglichst spezifischen Proteasom-Inhibitor zu verbinden. Auch im *in vitro*-Spaltungsassay könnte ein Proteasom-Inhibitor eingesetzt werden.

Im weiteren sollte die bislang unbekannte Protease, die hnRNP K spaltet, identifiziert und charakterisiert werden. Puromycin-behandelter K562-Extrakt könnte chromatographisch fraktioniert und die Protease-Aktivität mit Hilfe des *in vitro*-Spaltungsassay verfolgt werden. Nach der Identifizierung der proteolytischen Aktivität sollte es möglich sein, die Spaltung mit rekombinantem hnRNP K und rekombinanter Protease *in vitro* zu rekapitulieren und größere Mengen an Spaltprodukt zu generieren. Dessen exakte Größe könnte dann in MALDI-TOF-Analysen bestimmt und die Spaltstelle identifiziert werden.

In weiteren Analysen sollte die bislang unbekannte Protease weitergehend charakterisiert werden, so sollte die ATP-Abhängigkeit der Proteolyse und die Spezifität des Enzyms untersucht werden.

Bislang gibt es keine Hinweise darauf, wie der weitere Abbau des hnRNP K-Spaltprodukts erfolgt und sollte daher ebenfalls untersucht werden. Interessant wäre auch die Fragestellung, ob hnRNP E1 während der erythroiden Reifung über einen ähnlichen Weg abgebaut wird.

5. Literaturverzeichnis

- Abaza I, Coll O, Patalano S, Gebauer F (2006). Drosophila UNR is required for translational repression of male-specific lethal 2 mRNA during regulation of X-chromosome dosage compensation. *Genes Dev.* 20(3):380-389.
- Abu Hatoum O, Gross-Mesilaty S, Breitschopf K, Hoffman A, Gonen H, Ciechanover A, Bengal E (1998). Degradation of myogenic transcription factor MyoD by the ubiquitin pathway in vivo and in vitro: regulation by specific DNA binding. *Mol Cell Biol.* 18(10):5670-5677.
- Adamson JW (1968). The erythropoietin-hematocrit relationship in normal and polycythemic man: implications of marrow regulation. *Blood.* 32(4):597-609.
- Adolph D, Flach N, Mueller K, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2007). Deciphering the cross talk between hnRNP K and c-Src: the c-Src activation domain in hnRNP K is distinct from a second interaction site. *Mol Cell Biol.* 27(5):1758-1770.
- Ahmad K, Henikoff S (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol Cell.* 9(6):1191-200.
- Akao Y, Marukawa O, Morikawa H, Nakao K, Kamei M, Hachiya T, Tsujimoto Y (1995). The rck/p54 candidate proto-oncogene product is a 54-kilodalton D-E-A-D box protein differentially expressed in human and mouse tissues. *Cancer Res.* 55(15):3444-3449.
- Amesz H, Goumans H, Haubrich-Morree T, Voorma HO, Benne R (1979). Purification and characterization of a protein factor that reverses the inhibition of protein synthesis by the heme-regulated translational inhibitor in rabbit reticulocyte lysates. *Eur J Biochem.* 98(2):513-520.
- Anderson P, Kedersha N (2006). RNA granules. *J Cell Biol.* 172(6):803-808.
- Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG (1979a). Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature.* 278(5702):364-365.
- Andersson LC, Nilsson K, Gahmberg CG (1979b). K562 - a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer.* 23(2):143-147.
- Aziz N, Munro HN (1987). Iron regulates ferritin mRNA translation through a segment of its 5' untranslated region. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84(23):8478-8482.
- Backe PH, Messias AC, Ravelli RB, Sattler M, Cusack S (2005). X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure.* 13(7):1055-1067.
- Bader M, Sarre TF (1986). A (re)initiation-dependent cell-free protein-synthesis system from mouse erythroleukemia cells. *Eur J Biochem.* 161(1):103-109.
- Baker BS, Gorman M, Marín I (1994). Dosage compensation in Drosophila. *Annu Rev Genet.* 28:491-521.
- Baliga BS, Pronczuk AW, Munro HN (1969). Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. *J Biol Chem.* 244(16):4480-4489.

- Bålöw RM, Tomkinson B, Ragnarsson U, Zetterqvist O (1986). Purification, substrate specificity, and classification of tripeptidyl peptidase II. *J Biol Chem.* 261(5):2409-2417.
- Banroques J, Cordin O, Doère M, Linder P, Tanner NK (2008). A conserved phenylalanine of motif IV in superfamily 2 helicases is required for cooperative, ATP-dependent binding of RNA substrates in DEAD-box proteins. *Mol Cell Biol.* 28(10):3359-3371.
- Beckmann K, Grskovic M, Gebauer F, Hentze MW (2005). A dual inhibitory mechanism restricts msl-2 mRNA translation for dosage compensation in *Drosophila*. *Cell.* 122(4):529-540.
- Belhacène N, Maulon L, Guérin S, Ricci JE, Mari B, Colin Y, Cartron JP, Auburger P (1998). Differential expression of the Kell blood group and CD10 antigens: two related membrane metallopeptidases during differentiation of K562 cells by phorbol ester and hemin. *FASEB J.* 12(7):531-539.
- Ben-Neriah Y, Daley GQ, Mes-Masson AM, Witte ON, Baltimore D (1986). The chronic myelogenous leukemia-specific P210 protein is the product of the bcr/abl hybrid gene. *Science.* 233(4760):212-214.
- Berlanga JJ, Santoyo J, De Haro C (1999). Characterization of a mammalian homolog of the GCN2 eukaryotic initiation factor 2 α kinase. *Eur J Biochem.* 265(2):754-762.
- Blum S, Schmid SR, Pause A, Buser P, Linder P, Sonenberg N, Trachsel H (1992). ATP hydrolysis by initiation factor 4A is required for translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89(16):7664-7668.
- Boag PR, Atalay A, Robida S, Reinke V, Blackwell TK (2008). Protection of specific maternal messenger RNAs by the P body protein CGH-1 (Dhh1/RCK) during *Caenorhabditis elegans* oogenesis. *J Cell Biol.* 182(3):543-557.
- Boag PR, Nakamura A, Blackwell TK (2005). A conserved RNA-protein complex component involved in physiological germline apoptosis regulation in *C. elegans*. *Development.* 132(22):4975-4986.
- Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG (1978). Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem.* 253(10):3364-3366.
- Borden KL (2000). RING domains: master builders of molecular scaffolds? *J Mol Biol.* 295(5):1103-1112.
- Boudeau J, Sapkota G, Alessi DR (2003). LKB1, a protein kinase regulating cell proliferation and polarity. *FEBS Lett.* 546(1):159-165.
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Braun BC, Glickman M, Kraft R, Dahlmann B, Kloetzel PM, Finley D, Schmidt M (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat Cell Biol.* 1(4):221-226.

- Breitschopf K, Bengal E, Ziv T, Admon A, Ciechanover A (1998). A novel site for ubiquitination: the N-terminal residue, and not internal lysines of MyoD, is essential for conjugation and degradation of the protein. *EMBO J.* 17(20):5964-5973.
- Brostrom CO, Prostko CR, Kaufman RJ, Brostrom MA (1996). Inhibition of translational initiation by activators of the glucose-regulated stress protein and heat shock protein stress response systems. Role of the interferon-inducible double-stranded RNA-activated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase. *J Biol Chem.* 271(40):24995-25002.
- Candido EP, Reeves R, Davie JR (1978). Sodium butyrate inhibits histone deacetylation in cultured cells. *Cell.* 14(1):105-113.
- Carafoli E, Molinari M (1998). Calpain: a protease in search of a function? *Biochem Biophys Res Commun.* 247(2):193-203.
- Carlile GW, Smith DH, Wiedmann M (2004). Caspase-3 has a nonapoptotic function in erythroid maturation. *Blood.* 103(11):4310-4316.
- Castoldi GL, Beutler E (1988). *In Atlas of Blood Cells: Function and Pathology.* Edi-Ermes, Milano and Lea & Febiger, Philadelphia.
- Cathelin S, Rébé C, Haddaoui L, Simioni N, Verdier F, Fontenay M, Launay S, Mayeux P, Solary E (2006). Identification of proteins cleaved downstream of caspase activation in monocytes undergoing macrophage differentiation. *J Biol Chem.* 281(26):17779-17788.
- Ceci M, Gaviraghi C, Gorrini C, Sala LA, Offenhäuser N, Marchisio PC, Biffo S (2003). Release of eIF6 (p27BBP) from the 60S subunit allows 80S ribosome assembly. *Nature.* 426(6966):579-584.
- Chakrabarti A, Maitra U (1991). Function of eukaryotic initiation factor 5 in the formation of an 80 S ribosomal polypeptide chain initiation complex. *J Biol Chem.* 266(21):14039-14045.
- Chang B, Chen Y, Zhao Y, Bruick RK (2007). JMJD6 is a histone arginine demethylase. *Science.* 318(5849):444-447.
- Chang HY, Yang X (2000). Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64(4):821-846.
- Chau V, Tobias JW, Bachmair A, Marriott D, Ecker DJ, Gonda DK, Varshavsky A (1989). A multiubiquitin chain is confined to specific lysine in a targeted short-lived protein. *Science.* 243(4898):1576-1583.
- Chaudhury A, Hussey GS, Ray PS, Jin G, Fox PL, Howe PH (2010). TGF-beta-mediated phosphorylation of hnRNP E1 induces EMT via transcript-selective translational induction of Dab2 and ILEI. *Nat Cell Biol.* 12(3):286-293.
- Cheng EH, Kirsch DG, Clem RJ, Ravi R, Kastan MB, Bedi A, Ueno K, Hardwick JM (1997). Conversion of Bcl-2 to a Bax-like death effector by caspases. *Science.* 278(5345):1966-1968.
- Cheng Z, Collier J, Parker R, Song H (2005). Crystal structure and functional analysis of DEAD-box protein Dhh1p. *RNA.* 11(8):1258-1270.
- Chun HJ, Zheng L, Ahmad M, Wang J, Speirs CK, Siegel RM, Dale JK, Puck J, Davis J, Hall CG, Skoda-Smith S, Atkinson TP, Straus SE, Lenardo MJ (2002). Pleiotropic

- defects in lymphocyte activation caused by caspase-8 mutations lead to human immunodeficiency. *Nature*. 419(6905):395-399.
- Ciechanover A, Finley D, Varshavsky A (1984). Ubiquitin dependence of selective protein degradation demonstrated in the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*. 37(1):57-66.
- Ciechanover A, Heller H, Elias S, Haas AL, Hershko A (1980). ATP-dependent conjugation of reticulocyte proteins with the polypeptide required for protein degradation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77(3):1365-1368.
- Ciechanover A, Heller H, Katz-Etzion R, Hershko A (1981). Activation of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 78(2):761-765.
- Ciechanover A, Hod Y, Hershko A (1978). A heat-stable polypeptide component of an ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 81(4):1100-1105.
- Cilley CD, Williamson JR (1997). Analysis of bacteriophage N protein and peptide binding to boxB RNA using polyacrylamide gel coelectrophoresis (PACE). *RNA*. 3(1):57-67.
- Cioe L, McNab A, Hubbell HR, Meo P, Curtis P, Rovera G (1981). Differential expression of the globin genes in human leukemia K562(S) cells induced to differentiate by hemin or butyric acid. *Cancer Res*. 41(1):237-243.
- Clyde-Smith J, Silins G, Gartside M, Grimmond S, Etheridge M, Apolloni A, Hayward N, Hancock JF (2000). Characterization of RasGRP2, a plasma membrane-targeted, dual specificity Ras/Rap exchange factor. *J Biol Chem*. 275(41):32260-32267.
- Coller JM, Tucker M, Sheth U, Valencia-Sanchez MA, Parker R (2001). The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA*. 7(12):1717-1727.
- Collier B, Goobar-Larsson L, Sokolowski M, Schwartz S (1998). Translational inhibition in vitro of human papillomavirus type 16 L2 mRNA mediated through interaction with heterogeneous ribonucleoprotein K and poly(rC)-binding proteins 1 and 2. *J Biol Chem*. 273(35):22648-22656.
- Colthurst DR, Campbell DG, Proud CG (1987). Structure and regulation of eukaryotic initiation factor eIF-2. Sequence of the site in the alpha subunit phosphorylated by the haem-controlled repressor and by the double-stranded RNA-activated inhibitor. *Eur J Biochem*. 166(2):357-363.
- Conrad ME, Umbreit JN (2000). Iron absorption and transport-an update. *Am J Hematol*. 64(4):287-298.
- Cordin O, Banroques J, Tanner NK, Linder P (2006). The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*. 367:17-37.
- Craiu A, Gaczynska M, Akopian T, Gramm CF, Fenteany G, Goldberg AL, Rock KL (1997). Lactacystin and clasto-lactacystin beta-lactone modify multiple proteasome beta-subunits and inhibit intracellular protein degradation and major histocompatibility complex class I antigen presentation. *J Biol Chem*. 272(20):13437-13445.
- Croall DE, DeMartino GN (1984). Comparison of two calcium-dependent proteinases from bovine heart. *Biochim Biophys Acta*. 788(3):348-355.

- Croall DE, DeMartino GN (1991). Calcium-activated neutral protease (calpain) system: structure, function, and regulation. *Physiol Rev.* 71(3):813-847.
- Czaplinski K, Köcher T, Schelder M, Segref A, Wilm M, Mattaj IW (2005). Identification of 40LoVe, a *Xenopus* hnRNP D family protein involved in localizing a TGF-beta-related mRNA during oogenesis. *Dev Cell.* 8(4):505-515.
- Dai CH, Krantz SB, Zsebo KM (1991). Human burst-forming units-erythroid need direct interaction with stem cell factor for further development. *Blood.* 78(10):2493-2497.
- Dancker P, Löw I, Hasselbach W, Wieland T (1975). Interaction of actin with phalloidin: polymerization and stabilization of F-actin. *Biochim Biophys Acta.* 400(2):407-414.
- Dayton WR (1982). Comparison of low- and high-calcium-requiring forms of the calcium-activated protease with their autocatalytic breakdown products. *Biochim Biophys Acta.* 709(2):166-172.
- Dejgaard K, Leffers H (1996). Characterisation of the nucleic-acid-binding activity of KH domains. Different properties of different domains. *Eur J Biochem.* 241(2):425-431.
- Delgado-Cañedo A, Santos DG, Chies JA, Kvitko K, Nardi NB (2006). Optimization of an electroporation protocol using the K562 cell line as a model: role of cell cycle phase and cytoplasmic DNases. *Cytotechnology.* 51(3):141-148.
- de Klein A, van Kessel AG, Grosveld G, Bartram CR, Hagemeijer A, Bootsma D, Spurr NK, Heisterkamp N, Groffen J, Stephenson JR (1982). A cellular oncogene is translocated to the Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature.* 300(5894):765-767.
- de Moor CH, Meijer H, Lissenden S (2005). Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol.* 16(1):49-58.
- de Moor CH, Richter JD (1999). Cytoplasmic polyadenylation elements mediate masking and unmasking of cyclin B1 mRNA. *EMBO J.* 18(8):2294-2303.
- Dick TP, Nussbaum AK, Deeg M, Heinemeyer W, Groll M, Schirle M, Keilholz W, Stevanović S, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild H (1998). Contribution of proteasomal beta-subunits to the cleavage of peptide substrates analyzed with yeast mutants. *J Biol Chem.* 273(40):25637-25646.
- Ding Q, Dimayuga E, Markesbery WR, Keller JN (2006). Proteasome inhibition induces reversible impairments in protein synthesis. *FASEB J.* 20(8):1055-1063.
- Duncan K, Grskovic M, Strein C, Beckmann K, Niggeweg R, Abaza I, Gebauer F, Wilm M, Hentze MW (2006). Sex-lethal imparts a sex-specific function to UNR by recruiting it to the msl-2 mRNA 3' UTR: translational repression for dosage compensation. *Genes Dev.* 20(3):368-379.
- Duncan RF, Hershey JW (1987). Translational repression by chemical inducers of the stress response occurs by different pathways. *Arch Biochem Biophys.* 256(2):651-661.
- Elbashir SM, Lendeckel W, Tuschl T (2001a). RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 5(2):188-200.

- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T (2001b). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 411(6836):494-498.
- Elbashir SM, Martinez J, Patkaniowska A, Lendeckel W, Tuschl T (2001c). Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*. 20(23):6877-6888.
- Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods*. 26(2):199-213.
- Emori Y, Kawasaki H, Imajoh S, Imahori K, Suzuki K (1987). Endogenous inhibitor for calcium-dependent cysteine protease contains four internal repeats that could be responsible for its multiple reactive sites. *Proc Natl Acad Sci USA*. 84(11):3590-3594.
- Evans JR, Mitchell SA, Spriggs KA, Ostrowski J, Bomsztyk K, Ostareck D, Willis AE (2003). Members of the poly (rC) binding protein family stimulate the activity of the c-myc internal ribosome entry segment in vitro and in vivo. *Oncogene*. 22(39):8012-8020.
- Fadden P, Haystead TA, Lawrence JC Jr (1997). Identification of phosphorylation sites in the translational regulator, PHAS-I, that are controlled by insulin and rapamycin in rat adipocytes. *J Biol Chem*. 272(15):10240-10247.
- Farrell PJ, Balkow K, Hunt T, Jackson RJ, Trachsel H (1977). Phosphorylation of initiation factor eIF-2 and the control of reticulocyte protein synthesis. *Cell*. 11(1):187-200.
- Finley D, Ciechanover A, Varshavsky A (1984). Thermolability of ubiquitin-activating enzyme from the mammalian cell cycle mutant ts85. *Cell*. 37(1):43-55.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391(6669):806-811.
- Fleming J, Thiele BJ, Chester J, O'Prey J, Janetzki S, Aitken A, Anton IA, Rapoport SM, Harrison PR (1989). The complete sequence of the rabbit erythroid cell-specific 15-lipoxygenase mRNA: comparison of the predicted amino acid sequence of the erythrocyte lipoxygenase with other lipoxygenases. *Gene*. 79(1):181-188.
- Fordis CM, Anagnou NP, Dean A, Nienhuis AW, Schechter AN (1984). A beta-globin gene, inactive in the K562 leukemic cell, functions normally in a heterologous expression system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81(14):4485-4489.
- Fox JE, Goll DE, Reynolds CC, Phillips DR (1985). Identification of two proteins (actin-binding protein and P235) that are hydrolyzed by endogenous Ca²⁺-dependent protease during platelet aggregation. *J Biol Chem*. 260(2):1060-1066.
- Freemont PS, Hanson IM, Trowsdale J (1991). A novel cysteine-rich sequence motif. *Cell*. 64(3):483-484.
- Friend C, Patuleia MC, Nelson JB (1966). Antibiotic effect of tylosin on a mycoplasma contaminant in a tissue culture leukemia cell line. *Proc Soc Exp Biol Med*. 121(4):1009-1010.
- Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T (1971). Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 68(2):378-382.

- Fukuda T, Naiki T, Saito M, Irie K (2009). hnRNP K interacts with RNA binding motif protein 42 and functions in the maintenance of cellular ATP level during stress conditions. *Genes Cells*. 14(2):113-128.
- Gahmberg CG, Jokinen M, Andersson LC (1978). Expression of the major sialoglycoprotein (glycophorin) on erythroid cells in human bone marrow. *Blood*. 52(2):379-387.
- Gallo CM, Munro E, Rasoloson D, Merritt C, Seydoux G (2008). Processing bodies and germ granules are distinct RNA granules that interact in *C. elegans* embryos. *Dev Biol*. 323(1):76-87.
- Gebauer F, Corona DF, Preiss T, Becker PB, Hentze MW (1999). Translational control of dosage compensation in *Drosophila* by Sex-lethal: cooperative silencing via the 5' and 3' UTRs of msl-2 mRNA is independent of the poly(A) tail. *EMBO J*. 18(21):6146-6154.
- Gebauer F, Grskovic M, Hentze MW (2003). *Drosophila* sex-lethal inhibits the stable association of the 40S ribosomal subunit with msl-2 mRNA. *Mol Cell*. 11(5):1397-1404.
- Gebauer F, Hentze MW (2004). Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(10):827-835.
- Gebauer F, Merendino L, Hentze MW, Valcárcel J (1998). The *Drosophila* splicing regulator sex-lethal directly inhibits translation of male-specific-lethal 2 mRNA. *RNA*. 4(2):142-150.
- Geier E, Pfeifer G, Wilm M, Lucchiari-Hartz M, Baumeister W, Eichmann K, Niedermann G (1999). A giant protease with potential to substitute for some functions of the proteasome. *Science*. 283(5404):978-981.
- Géminard C, de Gassart A, Vidal M (2002). Reticulocyte maturation: mitoptosis and exosome release. *Biocell*. 26(2): 205-215.
- Gibson TJ, Thompson JD, Heringa J (1993). The KH domain occurs in a diverse set of RNA-binding proteins that include the antiterminator NusA and is probably involved in binding to nucleic acid. *FEBS Lett*. 324(3):361-366.
- Glas R, Bogyo M, McMaster JS, Gaczynska M, Ploegh HL (1998). A proteolytic system that compensates for loss of proteasome function. *Nature*. 392(6676):618-622.
- Glickman MH, Rubin DM, Coux O, Wefes I, Pfeifer G, Cjeka Z, Baumeister W, Fried VA, Finley D (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. 94(5):615-623.
- Goldknopf IL, Busch H (1977). Isopeptide linkage between nonhistone and histone 2A polypeptides of chromosomal conjugate-protein A24. *Proc Natl Acad Sci USA*. 74(3):864-868.
- Goodman JW, Hall EA, Miller KL, Shipcock SG (1985). Interleukin 3 promotes erythroid burst formation in "serum-free" cultures without detectable erythropoietin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82(10):3291-3295.

- Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM (1989). Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. *Nucleic Acids Res.* 17(12):4713-4730.
- Gray NK, Hentze MW (1994). Iron regulatory protein prevents binding of the 43S translation pre-initiation complex to ferritin and eALAS mRNAs. *EMBO J.* 13(16):3882-3891.
- Gray NK, Quick S, Goossen B, Constable A, Hirling H, Kühn LC, Hentze MW (1993). Recombinant iron-regulatory factor functions as an iron-responsive-element-binding protein, a translational repressor and an aconitase. A functional assay for translational repression and direct demonstration of the iron switch. *Eur J Biochem.* 218(2):657-667.
- Gregory CJ, Eaves AC (1978). Three stages of erythropoietic progenitor cell differentiation distinguished by a number of physical and biologic properties. *Blood.* 51(3):527-537.
- Grifo JA, Tahara SM, Morgan MA, Shatkin AJ, Merrick WC (1983). New initiation factor activity required for globin mRNA translation. *J Biol Chem.* 258(9):5804-5810.
- Groffen J, Stephenson JR, Heisterkamp N, de Klein A, Bartram CR, Grosveld G (1984). Philadelphia chromosomal breakpoints are clustered within a limited region, bcr, on chromosome 22. *Cell.* 36(1):93-99.
- Groll M, Ditzel L, Löwe J, Stock D, Bochtler M, Bartunik HD, Huber R (1997). Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution. *Nature.* 386(6624):463-471.
- Grollman AP (1968). Inhibitors of protein biosynthesis. V. Effects of emetine on protein and nucleic acid biosynthesis in HeLa cells. *J Biol Chem.* 243(15):4089-4094.
- Gropper R, Brandt RA, Elias S, Bearer CF, Mayer A, Schwartz AL, Ciechanover A (1991). The ubiquitin-activating enzyme, E1, is required for stress-induced lysosomal degradation of cellular proteins. *J Biol Chem.* 266(6):3602-3610.
- Grüllich C, Duvoisin RM, Wiedmann M, van Leyen K (2001). Inhibition of 15-lipoxygenase leads to delayed organelle degradation in the reticulocyte. *FEBS Lett.* 489(1):51-54.
- Guroff G (1964). A neutral, calcium-activated proteinase from the soluble fraction of rat brain. *J Biol Chem.* 239:149-155.
- Gusella JF, Weil SC, Tsiftoglou AS, Volloch V, Neumann JR, Keys C, Housman DE (1980). Hemin does not cause commitment of murine erythroleukemia (MEL) cells to terminal differentiation. *Blood.* 56(3):481-487.
- Haas AL, Warms JV, Hershko A, Rose IA (1982). Ubiquitin-activating enzyme. Mechanism and role in protein-ubiquitin conjugation. *J Biol Chem.* 257(5):2543-2548.
- Habelhah H, Shah K, Huang L, Ostareck-Lederer A, Burlingame AL, Shokat KM, Hentze MW, Ronai Z (2001). ERK phosphorylation drives cytoplasmic accumulation of hnRNP-K and inhibition of mRNA translation. *Nat Cell Biol.* 3(3):325-330.
- Haghighat A, Mader S, Pause A, Sonenberg N (1995). Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. *EMBO J.* 14(22):5701-5709.
- Hake LE, Richter JD (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell.* 79(4):617-627.

- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H, Ron D (2000). Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol Cell*. 5(5):897-904.
- Harnisch C (2010). Analyse der Regulation der Retikulozyten-15-Lipoxygenase-mRNA-Translation durch den 3'UTR-DICE-Komplex. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Hashimoto K, Nakagawa Y, Morikawa H, Niki M, Egashira Y, Hirata I, Katsu K, Akao Y (2001). Co-overexpression of DEAD box protein rck/p54 and c-myc protein in human colorectal adenomas and the relevance of their expression in cultured cell lines. *Carcinogenesis*. 22(12):1965-1970.
- Hentze MW, Caughman SW, Rouault TA, Barriocanal JG, Dancis A, Harford JB, Klausner RD (1987). Identification of the iron-responsive element for the translational regulation of human ferritin mRNA. *Science*. 238(4833):1570-1573.
- Hershko A, Ciechanover A, Heller H, Haas AL, Rose IA (1980). Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 77(4):1783-1786.
- Hershko A, Ciechanover A, Rose IA (1981). Identification of the active amino acid residue of the polypeptide of ATP-dependent protein breakdown. *J Biol Chem*. 256(4):1525-1528.
- Hershko A, Heller H, Elias S, Ciechanover A (1983). Components of ubiquitin-protein ligase system. Resolution, affinity purification, and role in protein breakdown. *J Biol Chem*. 258(13):8206-8214.
- Hershko A, Heller H (1985). Occurrence of a polyubiquitin structure in ubiquitin-protein conjugates. *Biochem Biophys Res Commun*. 128(3):1079-1086.
- Höhne M, Thiele BJ, Prehn S, Giessmann E, Nack B, Rapoport SM (1988). Activation of translationally inactive lipoxygenase mRNA particles from rabbit reticulocytes. *Biomed Biochim Acta*. 47(1):75-78.
- Hogg N, Horton MA (1987). Myeloid antigens: new and previously defined clusters. In: *Leucocyte typing III*. Oxford University Press, Oxford. 576-602.
- Holyoake TL, Alcorn MJ (1994). CD34+ positive haemopoietic cells: biology and clinical applications. *Blood Rev*. 8(2):113-124.
- Howard AD, Kostura MJ, Thornberry N, Ding GJ, Limjuco G, Weidner J, Salley JP, Hogquist KA, Chaplin DD, Mumford RA, et al (1991). IL-1-converting enzyme requires aspartic acid residues for processing of the IL-1 beta precursor at two distinct sites and does not cleave 31-kDa IL-1 alpha. *J Immunol*. 147(9):2964-2969.
- Hristoskova S, Holzgreve W, Hahn S, Rusterholz C (2007). Human mature erythroblasts are resistant to apoptosis. *Exp Cell Res*. 313(5):1024-1032.
- Hu CD, Chinenov Y, Kerppola TK (2002). Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*. 9(4):789-798.

- Hu CD, Kerppola TK (2003). Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol.* 21(5):539-545.
- Huang HK, Yoon H, Hannig EM, Donahue TF (1997). GTP hydrolysis controls stringent selection of the AUG start codon during translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.* 11(18):2396-2413.
- Huang L, Kinnucan E, Wang G, Beaudenon S, Howley PM, Huibregtse JM, Pavletich NP (1999). Structure of an E6AP-UbcH7 complex: insights into ubiquitination by the E2-E3 enzyme cascade. *Science.* 286(5443):1321-1326.
- Hüttelmaier S, Zenklusen D, Lederer M, Dichtenberg J, Lorenz M, Meng X, Bassell GJ, Condeelis J, Singer RH (2005). Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* 438(7067):512-515.
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92(7):2563-2567.
- Hunt RC, Marshall LM (1981). Membrane protein redistribution during differentiation of cultured human erythroleukemic cells. *Mol Cell Biol.* 1(12):1150-1162.
- Hutvagner G, McLachlan J, Pasquinelli AE, Bálint E, Tuschl T, Zamore PD (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science.* 293(5531):834-838.
- Imataka H, Sonenberg N (1997). Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol Cell Biol.* 17(12):6940-6947.
- Ingelfinger D, Arndt-Jovin DJ, Lührmann R, Achsel T (2002). The human LSm1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA.* 8(12):1489-1501.
- Ingle E, Schneider JR, Payne CJ, McCarthy DJ, Harder KW, Hibbs ML, Klinken SP (2006). Csk-binding protein mediates sequential enzymatic down-regulation and degradation of Lyn in erythropoietin-stimulated cells. *J Biol Chem.* 281(42):31920-31929.
- Inhorn RC, Bansal VS, Majerus PW (1987). Pathway for inositol 1,3,4-trisphosphate and 1,4-bisphosphate metabolism. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 84(8):2170-2174.
- Ishizaki Y, Jacobson MD, Raff MC (1998). A role for caspases in lens fiber differentiation. *J Cell Biol.* 140(1):153-158.
- Jackson RJ, Hellen CU, Pestova TV (2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11(2):113-127.
- Janicki SM, Tsukamoto T, Salghetti SE, Tansey WP, Sachidanandam R, Prasanth KV, Ried T, Shav-Tal Y, Bertrand E, Singer RH, Spector DL (2004). From silencing to gene expression: real-time analysis in single cells. *Cell.* 116(5):683-98.
- Jankowsky E, Bowers H (2006). Remodeling of ribonucleoprotein complexes with DExH/D RNA helicases. *Nucleic Acids Res.* 34(15):4181-4188.

- Jiménez A, Carrasco L, Vázquez D (1977). Enzymic and nonenzymic translocation by yeast polysomes. Site of action of a number of inhibitors. *Biochemistry*. 16(21):4727-4730.
- Jin J, Li X, Gygi SP, Harper JW (2007). Dual E1 activation systems for ubiquitin differentially regulate E2 enzyme charging. *Nature*. 447(7148):1135-1138.
- Jin Z, El-Deiry WS (2005). Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 4(2):139-163.
- Jordan PM (1994). Highlights in haem biosynthesis. *Curr Opin Struct Biol*. 4(6):902-911.
- Kaiser P, Huang L (2005). Global approaches to understanding ubiquitination. *Genome Biol*. 6(10):233.
- Kannourakis G, Johnson GR (1988). Fractionation of subsets of BFU-E from normal human bone marrow: responsiveness to erythropoietin, human placental-conditioned medium, or granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*. 71(3):758-765.
- Kedersha NL, Gupta M, Li W, Miller I, Anderson P (1999). RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*. 147(7):1431-1442.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR (1972). Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26(4):239-257.
- Kessler BM, Tortorella D, Altun M, Kisselev AF, Fiebiger E, Hekking BG, Ploegh HL, Overkleeft HS (2001). Extended peptide-based inhibitors efficiently target the proteasome and reveal overlapping specificities of the catalytic beta-subunits. *Chem Biol*. 8(9):913-929.
- Kie JH, Jung YJ, Woo SY, Ryu KH, Park HY, Chung WS, Seoh JY (2003). Ultrastructural and phenotypic analysis of in vitro erythropoiesis from human cord blood CD34+ cells. *Ann Hematol*. 82(5):278-283.
- Kipreos ET, Wang JY (1990). Differential phosphorylation of c-Abl in cell cycle determined by cdc2 kinase and phosphatase activity. *Science*. 248(4952):217-220.
- Kipreos ET, Wang JY (1992). Cell cycle-regulated binding of c-Abl tyrosine kinase to DNA. *Science*. 256(5055):382-385.
- Kishimoto A, Mikawa K, Hashimoto K, Yasuda I, Tanaka S, Tominaga M, Kuroda T, Nishizuka Y (1989). Limited proteolysis of protein kinase C subspecies by calcium-dependent neutral protease (calpain). *J Biol Chem*. 264(7):4088-4092.
- Kisselev AF, Akopian TN, Woo KM, Goldberg AL (1999). The sizes of peptides generated from protein by mammalian 26 and 20 S proteasomes. Implications for understanding the degradative mechanism and antigen presentation. *J Biol Chem*. 274(6):3363-3371.
- Kisselev AF, Garcia-Calvo M, Overkleeft HS, Peterson E, Pennington MW, Ploegh HL, Thornberry NA, Goldberg AL (2003). The caspase-like sites of proteasomes, their substrate specificity, new inhibitors and substrates, and allosteric interactions with the trypsin-like sites. *J Biol Chem*. 278(38):35869-35877.

- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S (1999). A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 96(5):635-644.
- Köhler A, Cascio P, Leggett DS, Woo KM, Goldberg AL, Finley D (2001). The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*. 7(6):1143-1152.
- Konieczny A, Safer B (1983). Purification of the eukaryotic initiation factor 2-eukaryotic initiation factor 2B complex and characterization of its guanine nucleotide exchange activity during protein synthesis initiation. *J Biol Chem*. 258(5):3402-3408.
- Kotani S, Tugendreich S, Fujii M, Jorgensen PM, Watanabe N, Hoog C, Hieter P, Todokoro K (1998). PKA and MPF-activated polo-like kinase regulate anaphase-promoting complex activity and mitosis progression. *Mol Cell*. 1(3):371-380.
- Koury MJ, Sawyer ST, Brandt SJ (2002). New insights into erythropoiesis. *Curr Opin Hematol*. 9(2): 93-100.
- Kozak M (1978). How do eucaryotic ribosomes select initiation regions in messenger RNA? *Cell*. 15(4):1109-1123.
- Kozak M (2002). Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation. *Gene*. 299(1-2):1-34.
- Kramer G, Cimadevilla JM, Hardesty B (1976). Specificity of the protein kinase activity associated with the hemin-controlled repressor of rabbit reticulocyte. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73(9):3078-3082.
- Kramer S, Queiroz R, Ellis L, Hoheisel JD, Clayton C, Carrington M (2010). The RNA helicase DHH1 is central to the correct expression of many developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. *J Cell Sci*. 123(Pt 5):699-711.
- Krantz SB (1991). Erythropoietin. *Blood*. 77(3):419-434.
- Krishnamoorthy T, Pavitt GD, Zhang F, Dever TE, Hinnebusch AG (2001). Tight binding of the phosphorylated alpha subunit of initiation factor 2 (eIF2alpha) to the regulatory subunits of guanine nucleotide exchange factor eIF2B is required for inhibition of translation initiation. *Mol Cell Biol*. 21(15):5018-5030.
- Kühn H, Borngreber S (1998). Mammalian 15-lipoxygenases. Enzymatic properties and biological implications. *Adv Exp Med Biol*. 447:5-28.
- Kuersten S, Goodwin EB (2003). The power of the 3' UTR: translational control and development. *Nat Rev Genet*. 4(8):626-637.
- Ladomery M, Wade E, Sommerville J (1997). Xp54, the Xenopus homologue of human RNA helicase p54, is an integral component of stored mRNP particles in oocytes. *Nucleic Acids Res*. 25(5):965-973.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685.
- Lahav-Baratz S, Sudakin V, Ruderman JV, Hershko A (1995). Reversible phosphorylation controls the activity of cyclosome-associated cyclin-ubiquitin ligase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 92(20):9303-9307.

- Lall S, Piano F, Davis RE (2005). Caenorhabditis elegans decapping proteins: localization and functional analysis of Dcp1, Dcp2, and DcpS during embryogenesis. *Mol Biol Cell*. 16(12):5880-5890.
- Lamphear BJ, Kirchweger R, Skern T, Rhoads RE (1995). Mapping of functional domains in eukaryotic protein synthesis initiation factor 4G (eIF4G) with picornaviral proteases. Implications for cap-dependent and cap-independent translational initiation. *J Biol Chem*. 270(37):21975-21983.
- Lawson TG, Lee KA, Maimone MM, Abramson RD, Dever TE, Merrick WC, Thach RE (1989). Dissociation of double-stranded polynucleotide helical structures by eukaryotic initiation factors, as revealed by a novel assay. *Biochemistry*. 28(11):4729-4734.
- Leberbauer C, Boulmé F, Unfried G, Huber J, Beug H, Müllner EW (2005). Different steroids co-regulate long-term expansion versus terminal differentiation in primary human erythroid progenitors. *Blood*. 105(1):85-94.
- Leder A, Leder P (1975). Butyric acid, a potent inducer of erythroid differentiation in cultured erythroleukemic cells. *Cell*. 5(3):319-322.
- Lengsfeld AM, Löw I, Wieland T, Dancker P, Hasselbach W (1974). Interaction of phalloidin with actin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 71(7):2803-2807.
- Lepehne G (1919). Zerfall der roten Blutkörperchen beim Ikterus infectiosus. *Beitr path Anat*. 65:163-226.
- Levin D, Ranu RS, Ernst V, London IM (1976). Regulation of protein synthesis in reticulocyte lysates: phosphorylation of methionyl-tRNA^f binding factor by protein kinase activity of translational inhibitor isolated from hemedeficient lysates. *Proc Natl Acad Sci USA*. 73(9):3112-3116.
- Linder P (2006). Dead-box proteins: a family affair--active and passive players in RNP-remodeling. *Nucleic Acids Res*. 34(15):4168-4180.
- Linder P, Lasko PF, Ashburner M, Leroy P, Nielsen PJ, Nishi K, Schnier J, Slonimski PP (1989). Birth of the D-E-A-D box. *Nature*. 337(6203):121-122.
- Lin TA, Kong X, Haystead TA, Pause A, Belsham G, Sonenberg N, Lawrence JC Jr (1994). PHAS-I as a link between mitogen-activated protein kinase and translation initiation. *Science*. 266(5185):653-656.
- Löwe J, Stock D, Jap B, Zwickl P, Baumeister W, Huber R (1995). Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science*. 268(5210):533-539.
- Lorick KL, Jensen JP, Fang S, Ong AM, Hatakeyama S, Weissman AM (1999). RING fingers mediate ubiquitin-conjugating enzyme (E2)-dependent ubiquitination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 96(20):11364-11369.
- Lovering R, Hanson IM, Borden KL, Martin S, O'Reilly NJ, Evan GI, Rahman D, Pappin DJ, Trowsdale J, Freemont PS (1993). Identification and preliminary characterization of a protein motif related to the zinc finger. *Proc Natl Acad Sci USA*. 90(6):2112-2116.
- Lozzio CB, Lozzio BB (1975). Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood*. 45(3):321-334.

- Lu D, Yunis JJ (1992). Cloning, expression and localization of an RNA helicase gene from a human lymphoid cell line with chromosomal breakpoint 11q23.3. *Nucleic Acids Res.* 20(8):1967-1972.
- Lu L, Han AP, Chen JJ (2001). Translation initiation control by heme-regulated eukaryotic initiation factor 2alpha kinase in erythroid cells under cytoplasmic stresses. *Mol Cell Biol.* 21(23):7971-7980.
- Mader S, Lee H, Pause A, Sonenberg N (1995). The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 gamma and the translational repressors 4E-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 15(9):4990-4997.
- Maines MD (2005). New insights into biliverdin reductase functions: linking heme metabolism to cell signaling. *Physiology.* 20:382-389.
- Malinin GI, Ebert PS (1980). Induction of erythroid differentiation in murine erythroleukemic cells by short chain aliphatic carbonyl compounds and their corresponding precursors. Evidence for common inducing signal. *FEBS Lett.* 109(2):264-266.
- Marcotrigiano J, Gingras AC, Sonenberg N, Burley SK (1999). Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Mol Cell.* 3(6):707-716.
- Marks PA, Rifkind RA (1978). Erythroleukemic differentiation. *Annu Rev Biochem.* 47:419-448.
- Mazroui R, Di Marco S, Kaufman RJ, Gallouzi IE (2007). Inhibition of the ubiquitin-proteasome system induces stress granule formation. *Mol Biol Cell.* 18(7):2603-2618.
- McEwen E, Kedersha N, Song B, Scheuner D, Gilks N, Han A, Chen JJ, Anderson P, Kaufman RJ (2005). Heme-regulated inhibitor kinase-mediated phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 2 inhibits translation, induces stress granule formation, and mediates survival upon arsenite exposure. *J Biol Chem.* 280(17):16925-16933.
- McGrath KE, Bushnell TP, Palis J (2008). Multispectral imaging of hematopoietic cells: where flow meets morphology. *J Immunol Methods.* 336(2):91-97.
- Meier P, Finch A, Evan G (2000). Apoptosis in development. *Nature.* 407(6805):796-801.
- Mendez R, Richter JD (2001). Translational control by CPEB: a means to the end. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2(7):521-529.
- Meng L, Mohan R, Kwok BH, Elofsson M, Sin N, Crews CM (1999). Epoxomicin, a potent and selective proteasome inhibitor, exhibits in vivo antiinflammatory activity. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96(18):10403-10408.
- Merrick WC (1979). Evidence that a single GTP is used in the formation of 80 S initiation complexes. *J Biol Chem.* 254(10):3708-3711.
- Messias AC, Harnisch C, Ostareck-Lederer A, Sattler M, Ostareck DH (2006). The DICE-binding activity of KH domain 3 of hnRNP K is affected by c-Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Mol Biol.* 361(3):470-481.

- Michael WM, Choi M, Dreyfuss G (1995). A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway. *Cell*. 83(3):415-422.
- Michael WM, Eder PS, Dreyfuss G (1997). The K nuclear shuttling domain: a novel signal for nuclear import and nuclear export in the hnRNP K protein. *EMBO J*. 16(12):3587-3598.
- Migliaccio AR, Migliaccio G (1998). The making of an erythroid cell. Molecular control of hematopoiesis. *Biotherapy*. 10(4):251-268.
- Migliaccio AR, Migliaccio G, Mancini G, Ratajczak M, Gewirtz AM, Adamson JW (1993). Induction of the murine "W phenotype" in long-term cultures of human cord blood cells by c-kit antisense oligomers. *J Cell Physiol*. 157(1):158-163.
- Minshall N, Kress M, Weil D, Standart N. Role of p54 RNA helicase activity and its C-terminal domain in translational repression, P-body localization and assembly (2009). *Mol Biol Cell*. 20(9):2464-2472.
- Minshall N, Thom G, Standart N (2001). A conserved role of a DEAD box helicase in mRNA masking. *RNA*. 7(12):1728-1742.
- Molinari M, Milner J (1995). p53 in complex with DNA is resistant to ubiquitin-dependent proteolysis in the presence of HPV-16 E6. *Oncogene*. 10(9):1849-1854.
- Montgomery MK, Xu S, Fire A (1998). RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(26):15502-15507.
- Morris A, Favelukes S, Arlinghaus R, Schweet R (1962). Mechanism of puromycin inhibition of hemoglobin synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 7:326-330.
- Motoyama N, Kimura T, Takahashi T, Watanabe T, Nakano T (1999). bcl-x prevents apoptotic cell death of both primitive and definitive erythrocytes at the end of maturation. *J Exp Med*. 189(11):1691-1698.
- Muckenthaler M, Gray NK, Hentze MW (1998). IRP-1 binding to ferritin mRNA prevents the recruitment of the small ribosomal subunit by the cap-binding complex eIF4F. *Mol Cell*. 2(3):383-388.
- Müller W, Gautier F (1975). Interactions of heteroaromatic compounds with nucleic acids. A - T-specific non-intercalating DNA ligands. *Eur J Biochem*. 54(2):385-394.
- Munarriz E, Bano D, Sayan AE, Rossi M, Melino G, Nicotera P (2005). Calpain cleavage regulates the protein stability of p73. *Biochem Biophys Res Commun*. 333(3):954-960.
- Munro HN, Baliga BS, Pronczuk AW (1968). In vitro inhibition of peptide synthesis and GTP hydrolysis by cycloheximide and reversal of inhibition by glutathione. *Nature*. 219(5157):944-946.
- Murakami Y, Matsufuji S, Hayashi S, Tanahashi N, Tanaka K (2000). Degradation of ornithine decarboxylase by the 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 267(1):1-6.
- Musco G, Stier G, Joseph C, Castiglione Morelli MA, Nilges M, Gibson TJ, Pastore A (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*. 85(2):237-245.

- Naarmann IS (2006). Untersuchungen zur Stabilität von hnRNP K und hnRNP E1 während der erythroiden Reifung von MEL- Zellen und K562- Zellen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Naarmann IS, Harnisch C, Flach N, Kremmer E, Kühn H, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2008). mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem.* 283(26):18461-18472.
- Naarmann IS, Harnisch C, Müller-Newen G, Urlaub H, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH (2010). DDX6 recruits translational silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA.* 16(11):2189-2204.
- Nagai T, Ibata K, Park ES, Kubota M, Mikoshiba K, Miyawaki A (2002). A variant of yellow fluorescent protein with fast and efficient maturation for cell-biological applications. *Nat Biotechnol.* 20(1):87-90.
- Nakamura A, Amikura R, Hanyu K, Kobayashi S (2001). Me31B silences translation of oocyte-localizing RNAs through the formation of cytoplasmic RNP complex during *Drosophila* oogenesis. *Development.* 128(17):3233-3242.
- Nathans D (1964). Puromycin inhibition of protein synthesis: incorporation of puromycin into peptide chains. *Proc Natl Acad Sci USA.* 51:585-592.
- Navarro RE, Shim EY, Kohara Y, Singson A, Blackwell TK (2001). cgh-1, a conserved predicted RNA helicase required for gametogenesis and protection from physiological germline apoptosis in *C. elegans*. *Development.* 128(17):3221-3232.
- Nesterenko MV, Tilley M, Upton SJ (1994). A simple modification of Blum's silver stain method allows for 30 minute detection of proteins in polyacrylamide gels. *J Biochem Biophys Methods.* 28(3):239-242.
- Neuhoff V, Arold N, Taube D, Ehrhardt W (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9(6):255-262.
- Nishiura I, Tanaka K, Yamato S, Murachi T (1978). The occurrence of an inhibitor of Ca²⁺-dependent neutral protease in rat liver. *J Biochem.* 84(6):1657-1659.
- Nishizawa M, Okazaki K, Furuno N, Watanabe N, Sagata N (1992). The 'second-codon rule' and autophosphorylation govern the stability and activity of Mos during the meiotic cell cycle in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 11(7):2433-2446.
- Noble SL, Allen BL, Goh LK, Nordick K, Evans TC (2008). Maternal mRNAs are regulated by diverse P body-related mRNP granules during early *Caenorhabditis elegans* development. *J Cell Biol.* 182(3):559-572.
- Nussbaum AK, Dick TP, Keilholz W, Schirle M, Stevanović S, Dietz K, Heinemeyer W, Groll M, Wolf DH, Huber R, Rammensee HG, Schild H (1998). Cleavage motifs of the yeast 20S proteasome beta subunits deduced from digests of enolase 1. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95(21):12504-12509.

- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Shatsky IN, Hentze MW (2001). Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*. 104(2):281-290.
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW (1997). mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*. 89(4):597-606.
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomszyk K, Superti-Furga G, Hentze MW (2002). c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol*. 22(13):4535-4543.
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Rucknagel KP, Schierhorn A, Moritz B, Huttelmaier S, Flach N, Handoko L, Wahle E (2006). Asymmetric arginine dimethylation of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K by protein-arginine methyltransferase 1 inhibits its interaction with c-Src. *J Biol Chem*. 281(16):11115-11125.
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Standart N, Thiele BJ (1994). Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J*. 13(6):1476-1481.
- Parmeggiani A, Sander G (1981). Properties and regulation of the GTPase activities of elongation factors Tu and G, and of initiation factor 2. *Mol Cell Biochem*. 35(3):129-158.
- Pathak VK, Schindler D, Hershey JW (1988). Generation of a mutant form of protein synthesis initiation factor eIF-2 lacking the site of phosphorylation by eIF-2 kinases. *Mol Cell Biol*. 8(2):993-995.
- Pause A, Belsham GJ, Gingras AC, Donzé O, Lin TA, Lawrence JC Jr, Sonenberg N (1994). Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. *Nature*. 371(6500):762-767.
- Pause A, Méthot N, Sonenberg N (1993). The HRIGRXXR region of the DEAD box helicase eukaryotic translation initiation factor 4A is required for RNA binding and ATP hydrolysis. *Mol Cell Biol*. 13(11):6789-6798.
- Pause A, Méthot N, Svitkin Y, Merrick WC, Sonenberg N (1994). Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. *EMBO J*. 13(5):1205-1215.
- Pause A, Sonenberg N (1992). Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *EMBO J*. 11(7):2643-2654.
- Peabody DS (1993). The RNA binding site of bacteriophage MS2 coat protein. *EMBO J*. 12(2):595-600.
- Pelzer C, Kassner I, Matentzoglou K, Singh RK, Wollscheid HP, Scheffner M, Schmidtke G, Groettrup M (2007). UBE1L2, a novel E1 enzyme specific for ubiquitin. *J Biol Chem*. 282(32):23010-23014.
- Pestova TV, Borukhov SI, Hellen CU (1998). Eukaryotic ribosomes require initiation factors 1 and 1A to locate initiation codons. *Nature*. 394(6696):854-859.

- Pestova TV, Kolupaeva VG (2002). The roles of individual eukaryotic translation initiation factors in ribosomal scanning and initiation codon selection. *Genes Dev.* 16(22):2906-2922.
- Pestova TV, Lomakin IB, Lee JH, Choi SK, Dever TE, Hellen CU (2000). The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B. *Nature.* 403(6767):332-335.
- Pickart CM, Rose IA (1985). Functional heterogeneity of ubiquitin carrier proteins. *J Biol Chem.* 260(3):1573-1581.
- Pisarev AV, Hellen CU, Pestova TV (2007). Recycling of eukaryotic posttermination ribosomal complexes. *Cell.* 131(2):286-299.
- Poot M, Zhang YZ, Krämer JA, Wells KS, Jones LJ, Hanzel DK, Lugade AG, Singer VL, Haugland RP (1996). Analysis of mitochondrial morphology and function with novel fixable fluorescent stains. *J Histochem Cytochem.* 44(12):1363-1372.
- Prindull G (1995). Apoptosis in the embryo and tumorigenesis. *Eur J Cancer.* 31A(1):116-123.
- Rackham O, Brown CM (2004). Visualization of RNA-protein interactions in living cells: FMRP and IMP1 interact on mRNAs. *EMBO J.* 23(16):3346-3355.
- Rajyaguru P, Parker R (2009). CGH-1 and the control of maternal mRNAs. *Trends Cell Biol.* 19(1):24-28.
- Rapoport SM, Schewe T (1986). The maturational breakdown of mitochondria in reticulocytes. *Biochim Biophys Acta.* 864(3-4): 471-495.
- Raught B, Gingras AC, Sonenberg N (2000). Regulation of Ribosomal Recruitment in Eukaryotes. In *Translational Control of Gene Expression*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 245-293.
- Reimann I, Huth A, Thiele H, Thiele BJ (2002). Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'-UTR control element DICE. *J Mol Biol.* 315(5):965-974.
- Reits E, Neijssen J, Herberts C, Benckhuijsen W, Janssen L, Drijfhout JW, Neefjes J (2004). A major role for TPP1 in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity.* 20(4):495-506.
- Reuben RC, Wife RL, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1976). A new group of potent inducers of differentiation in murine erythroleukemia cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73(3):862-866.
- Rock KL, Gramm C, Rothstein L, Clark K, Stein R, Dick L, Hwang D, Goldberg AL (1994). Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell.* 78(5):761-771.
- Rowlands AG, Panniers R, Henshaw EC (1988). The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2. *J Biol Chem.* 263(12):5526-5533.
- Rowley JD (1973). A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 243(5405):290-293.

- Rozen F, Edery I, Meerovitch K, Dever TE, Merrick WC, Sonenberg N (1990). Bidirectional RNA helicase activity of eucaryotic translation initiation factors 4A and 4F. *Mol Cell Biol.* 10(3):1134-1144.
- Russell DW, Spremulli LL (1979). Purification and characterization of a ribosome dissociation factor (eukaryotic initiation factor 6) from wheat germ. *J Biol Chem.* 254(18):8796-8800.
- Rutherford T, Clegg JB, Higgs DR, Jones RW, Thompson J, Weatherall DJ (1981). Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(1):348-352.
- Rutherford TR, Clegg JB, Weatherall DJ (1979). K562 human leukaemic cells synthesise embryonic haemoglobin in response to haemin. *Nature.* 280(5718):164-165.
- Sakahira H, Enari M, Nagata S (1998). Cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis. *Nature.* 391(6662):96-99.
- Sambrook J und Russell DW (2001). Molecular Cloning - A Laboratory Manual. *CSHL Press*, New York.
- Sawada K, Krantz SB, Dai CH, Koury ST, Horn ST, Glick AD, Civin CI (1990). Purification of human blood burst-forming units-erythroid and demonstration of the evolution of erythropoietin receptors. *J Cell Physiol.* 142(2):219-230.
- Sawada K, Krantz SB, Dessypris EN, Koury ST, Sawyer ST (1989). Human colony-forming units-erythroid do not require accessory cells, but do require direct interaction with insulin-like growth factor I and/or insulin for erythroid development. *J Clin Invest.* 83(5):1701-1709.
- Scheffner M, Nuber U, Huibregtse JM (1995). Protein ubiquitination involving an E1-E2-E3 enzyme ubiquitin thioester cascade. *Nature.* 373(6509):81-83.
- Schewe T (2002). 15-lipoxygenase-1: a prooxidant enzyme. *Biol Chem.* 383(3-4):365-374.
- Schisa JA, Pitt JN, Priess JR (2001). Analysis of RNA associated with P granules in germ cells of *C. elegans* adults. *Development.* 128(8):1287-1298.
- Schneider C, Newman RA, Sutherland DR, Asser U, Greaves MF (1982). A one-step purification of membrane proteins using a high efficiency immunomatrix. *J Biol Chem.* 257(18):10766-10769.
- Schweizer D, Nagl W (1976). Heterochromatin diversity in *Cymbidium*, and its relationship to differential DNA replication. *Exp Cell Res.* 98(2):411-423.
- Sealy L, Chalkley R (1978). The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell.* 14(1):115-121.
- Seemüller E, Lupas A, Stock D, Löwe J, Huber R, Baumeister W (1995). Proteasome from *Thermoplasma acidophilum*: a threonine protease. *Science.* 268(5210):579-582.
- Sheth U, Parker R (2003). Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science.* 300(5620):805-808.

- Shevchenko A, Wilm M, Vorm O, Mann M (1996). Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels. *Anal Chem.* 68(5):850-858.
- Shi Y, Vattam KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L, Wek RC (1998). Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol Cell Biol.* 18(12):7499-7509.
- Sieff CA, Emerson SG, Mufson A, Gesner TG, Nathan DG (1986). Dependence of highly enriched human bone marrow progenitors on hemopoietic growth factors and their response to recombinant erythropoietin. *J Clin Invest.* 77(1):74-81.
- Sigal E, Craik CS, Highland E, Grunberger D, Costello LL, Dixon RA, Nadel JA (1988). Molecular cloning and primary structure of human 15-lipoxygenase. *Biochem Biophys Res Commun.* 157(2):457-464.
- Simpson CF, Kling JM (1967). The mechanism of denucleation in circulating erythroblasts. *J Cell Biol.* 35(1):237-245.
- Siomi H, Matunis MJ, Michael WM, Dreyfuss G (1993). The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21(5):1193-1198.
- Sleath PR, Hendrickson RC, Kronheim SR, March CJ, Black RA (1990). Substrate specificity of the protease that processes human interleukin-1 beta. *J Biol Chem.* 265(24):14526-14528.
- Smillie DA, Sommerville J (2002). RNA helicase p54 (DDX6) is a shuttling protein involved in nuclear assembly of stored mRNP particles. *J Cell Sci.* 115(Pt 2):395-407.
- Sonenberg N, Morgan MA, Merrick WC, Shatkin AJ (1978). A polypeptide in eukaryotic initiation factors that crosslinks specifically to the 5'-terminal cap in mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 75(10):4843-4847.
- Sood R, Porter AC, Olsen DA, Cavener DR, Wek RC (2000). A mammalian homologue of GCN2 protein kinase important for translational control by phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha. *Genetics.* 154(2):787-801.
- Sordet O, Rébé C, Plenchette S, Zermati Y, Hermine O, Vainchenker W, Garrido C, Solary E, Dubrez-Daloz L (2002). Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood.* 100(13):4446-4453.
- Sorokin AV, Selyutina AA, Skabkin MA, Guryanov SG, Nazimov IV, Richard C, Th'ng J, Yau J, Sorensen PH, Ovchinnikov LP, Evdokimova V (2005). Proteasome-mediated cleavage of the Y-box-binding protein 1 is linked to DNA-damage stress response. *EMBO J.* 24(20):3602-3612.
- Sudhakar A, Ramachandran A, Ghosh S, Hasnain SE, Kaufman RJ, Ramaiah KV (2000). Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 alpha (eIF2 alpha) promotes complex formation between eIF2 alpha(P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. *Biochemistry.* 39(42):12929-12938.
- Suzuki K (1983). Reaction of calcium-activated neutral protease (CANP) with an epoxysuccinyl derivative (E64c) and iodoacetic acid. *J Biochem.* 93(5):1305-1312.
- Suzuki K, Tsuji S, Kubota S, Kimura Y, Imahori K (1981). Limited autolysis of Ca²⁺-activated neutral protease (CANP) changes its sensitivity to Ca²⁺ ions. *J Biochem.* 90(1):275-278.

- Stebbins-Boaz B, Cao Q, de Moor CH, Mendez R, Richter JD (1999). Maskin is a CPEB-associated factor that transiently interacts with eIF-4E. *Mol Cell*. 4(6):1017-1027.
- Stebbins-Boaz B, Hake LE, Richter JD (1996). CPEB controls the cytoplasmic polyadenylation of cyclin, Cdk2 and c-mos mRNAs and is necessary for oocyte maturation in *Xenopus*. *EMBO J*. 15(10):2582-2592.
- Stöhr N, Lederer M, Reinke C, Meyer S, Hatzfeld M, Singer RH, Hüttelmaier S (2006). ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol*. 175(4):527-534.
- Swetloff A, Conne B, Huarte J, Pitetti JL, Nef S, Vassalli JD (2009). Dcp1-bodies in mouse oocytes. *Mol Biol Cell*. 20(23):4951-4961.
- Tanner NK, Cordin O, Banroques J, Doère M, Linder P (2003). The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell*. 11(1):127-138.
- Tarun SZ Jr, Wells SE, Deardorff JA, Sachs AB (1997). Translation initiation factor eIF4G mediates in vitro poly(A) tail-dependent translation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 94(17):9046-9051.
- Tarun SZ Jr, Sachs AB (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J*. 15(24):7168-7177.
- Thiele BJ, Andree H, Höhne M, Rapoport SM (1982). Lipoxxygenase mRNA in rabbit reticulocytes. Its isolation, characterization and translational repression. *Eur J Biochem*. 129(1):133-141.
- Thompson B, Wickens M, Kimble J (2007). Translational control in Development. *in Translational Control in Biology and Medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. pp. 507-544.
- Thornberry NA, Bull HG, Calaycay JR, Chapman KT, Howard AD, Kostura MJ, Miller DK, Molineaux SM, Weidner JR, Aunins J, et al (1992). A novel heterodimeric cysteine protease is required for interleukin-1 beta processing in monocytes. *Nature*. 356(6372):768-774.
- Thornberry NA, Rano TA, Peterson EP, Rasper DM, Timkey T, Garcia-Calvo M, Houtzager VM, Nordstrom PA, Roy S, Vaillancourt JP, Chapman KT, Nicholson DW (1997). A combinatorial approach defines specificities of members of the caspase family and granzyme B. Functional relationships established for key mediators of apoptosis. *J Biol Chem*. 272(29):17907-17911.
- Tourrière H, Chebli K, Zekri L, Courselaud B, Blanchard JM, Bertrand E, Tazi J (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol*. 160(6):823-831.
- van Leyen K, Duvoisin RM, Engelhardt H, Wiedmann M (1998). A function for lipoxxygenase in programmed organelle degradation. *Nature*. 395(6700):392-395.
- Van Seuningen I, Ostrowski J, Bustelo XR, Sleath PR, Bomsztyk K (1995). The K protein domain that recruits the interleukin 1-responsive K protein kinase lies adjacent to a cluster of c-Src and Vav SH3-binding sites. Implications that K protein acts as a docking platform. *J Biol Chem*. 270(45):26976-26985.

- Varshavsky A, Turner G, Du F, Xie Y (2000). The ubiquitin system and the N-end rule pathway. *Biol Chem.* 381(9-10):779-789.
- Walden WE, Patino MM, Gaffield L (1989). Purification of a specific repressor of ferritin mRNA translation from rabbit liver. *J Biol Chem.* 264(23):13765-13769.
- Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J.* 1(8):945-951.
- Wang TS, Kuo CF, Jan KY, Huang H (1996). Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species. *J Cell Physiol.* 169(2):256-268.
- Weinlich S, Hüttelmaier S, Schierhorn A, Behrens SE, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH (2009). IGF2BP1 enhances HCV IRES-mediated translation initiation via the 3'UTR. *RNA.* 15(8):1528-1542.
- Wells SE, Hillner PE, Vale RD, Sachs AB (1998). Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell.* 2(1):135-140.
- Weng Z, Thomas SM, Rickles RJ, Taylor JA, Brauer AW, Seidel-Dugan C, Michael WM, Dreyfuss G, Brugge JS (1994). Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol Cell Biol.* 14(7):4509-4521.
- Weston A, Sommerville J (2006). Xp54 and related (DDX6-like) RNA helicases: roles in messenger RNP assembly, translation regulation and RNA degradation. *Nucleic Acids Res.* 34(10):3082-3094.
- Wilczynska A, Aigueperse C, Kress M, Dautry F, Weil D (2005). The translational regulator CPEB1 provides a link between dcp1 bodies and stress granules. *J Cell Sci.* 118(Pt 5):981-992.
- Wilhelm JE, Mansfield J, Hom-Booher N, Wang S, Turck CW, Hazelrigg T, Vale RD (2000). Isolation of a ribonucleoprotein complex involved in mRNA localization in *Drosophila* oocytes. *J Cell Biol.* 148(3):427-440.
- Wilkinson KD, Urban MK, Haas AL (1980). Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes. *J Biol Chem.* 255(16):7529-7532.
- Yamano H, Gannon J, Hunt T (1996). The role of proteolysis in cell cycle progression in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO J.* 15(19):5268-5279.
- Yarmolinsky MB, Haba GL (1959). Inhibition by puromycin of amino acid incorporation into protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* (12):1721-1729.
- Yaron A, Hatzubai A, Davis M, Lavon I, Amit S, Manning AM, Andersen JS, Mann M, Mercurio F, Ben-Neriah Y (1998). Identification of the receptor component of the I κ B α -ubiquitin ligase. *Nature.* 396(6711):590-594.
- Zähringer J, Baliga BS, Munro HN (1976). Novel mechanism for translational control in regulation of ferritin synthesis by iron. *Proc Natl Acad Sci USA.* 73(3):857-861.
- Zamzami N, Kroemer G (1999). Condensed matter in cell death. *Nature.* 401(6749):127-128.

Zermati Y, Garrido C, Amsellem S, Fishelson S, Bouscary D, Valensi F, Varet B, Solary E, Hermine O (2001). Caspase activation is required for terminal erythroid differentiation. *J Exp Med.* 193(2):247-254.

Zheng N, Wang P, Jeffrey PD, Pavletich NP (2000). Structure of a c-Cbl-UbcH7 complex: RING domain function in ubiquitin-protein ligases. *Cell.* 102(4):533-539.

6. Abkürzungsverzeichnis

4E-BP	eIF4E-bindendes Protein
α - Abb.	anti- (Antikörper) Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BiFC	bimolekulare Fluoreszenzkomplementation
BFU-E	<i>burst forming unit-erythroid</i>
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	komplementäre DNA
CFU-E	<i>colony forming unit-erythroid</i>
CML	chronisch-myeloische Leukämie
CPE	cytoplasmatisches Polyadenylierungsexperiment
CPEB	CPE-Bindeprotein
ctrl.	<i>control</i> , Kontrolle
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindol
DCC	<i>dosage compensation complex</i>
dd	doppelt destilliert
D1	Domäne 1
D2	Domäne 2
DDX	DEAD-Box-Polypeptid
DEAE	Diethylaminoethylcellulose
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DICE	<i>differentiation control element</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dsRNA	doppelsträngige RNA
DTT	Dithiothreitol
E6-AP	E6-assoziiertes Protein
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
ESI	Elektrospray-Ionisierung
ES- Zellen	embryonale Stammzellen
<i>et al.</i>	<i>et altera</i>
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
G3BP1	Ras-GAP-SH3-Domänen-bindendes Protein 1
GAP	GTPase-aktivierendes Protein
GCN2	<i>general control non- derepressible-2</i>
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein

GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
GTP	Guanosintriphosphat
HA	Hämagglutinin
HECT	<i>homologous to E6-AP-Carboxyl terminus</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
hnRNP	<i>heterogeneous nuclear ribonucleoprotein</i>
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HRI	Häm-regulierter Inhibitor
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
HSC	hämatopoetische Stammzellen
IGF-1	<i>Insulin-like growth factor-1</i> , Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor
Ipp	Immunopräzipitation
IRE	<i>iron response element</i>
IRES	<i>internal ribosome entry sites</i>
IRP	<i>iron response protein</i>
kb	kilo-Basen
kD	kiloDalton
KH	hnRNP K-Homologie
KID	<i>kinase interaction domain</i>
KNS	hnRNP K-spezifisches nukleäres <i>shuttling</i> -Signal
Luc	Luciferase
MBSG	<i>MOPS buffered saline with glucose</i>
MEL- Zellen	murine Erythroleukämiezellen
MN	<i>Micrococcus</i> -Nuklease
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MS2BP	MS2-Bindeprotein
MSL-2	<i>male specific lethal-2</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NLS	nukleäres Lokalisierungssignal
ORF	<i>open reading frame</i> , offener Leserahmen
PABP	poly(A)-bindendes Protein
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
PERK	<i>PKR-like ER kinase</i>
PMSF	Phenyl-methyl-sulfonylfluorid
PKR	<i>protein kinase, double-stranded RNA-dependent</i>
PRMT1	Protein-Arginin-Methyltransferase 1
PVDF	Polyvinylidendifluorid
r15-LOX	Retikulozyten-15-Lipoxygenase
RBP	RNA-Bindeprotein
RING	<i>really interesting new gene</i>
RPMI	<i>Rosewell Park Memorial Institute</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
ROS	<i>reactive oxygen species</i>

RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
SCF	<i>stem cell factor</i> , Stammzellefaktor
SDS	Sodiumdodecylsulfat
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SH	Src-Homologie
SSC	<i>saline-sodium citrate</i>
SXL	<i>sex-lethal</i>
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween</i>
TOF	<i>time of flight</i>
TPPII	Tripeptidyl-Peptidase II
TriFC	trimolekulare Fluoreszenzkomplementation
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRITC	Tetramethylrhodamin-Isothiocyanat
tRNA	Transfer-RNA
U	<i>unit</i>
UNR	<i>upstream of N-ras</i>
UPS	Ubiquitin-Proteasom-System
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V1	Venus1
V2	Venus2
YB-1	Y-Box-Bindeprotein 1
ZBP1	<i>zipcode</i> -bindendes Protein 1

7. Anhang

7.1 Primer

7.1.1 Primer für Klonierungen

Primer	Sequenz
FLAG XhoI EcoRI fw	TCGAGCGGATTACAAGGATGACGACGATAAGAAG
FLAG XhoI EcoRI rv	AATTCTTCTTATCGTTCGTCATCCTTGTAATCCGC
Venus-GTG-hnRNP K fw	GCAGTCGACGGTACCGTGGAAACTGAACAGC
hnRNP K-Nofl rv	TTTTTCCTTTTGCGGCCGCTTAGAAAACTTCCAGAATACTGCTTCACAC
DDX6 Kpnl fw	TATAGGTACCATGAGCACGGCCAGA
DDX6 Kpnl rv	CGCGGGTACCTTAAGGTTTCTCATC
DDX6 D1 Kpnl rv	CGCGGGTACCCTACTCCATCAGGTTAAT
DDX6 D2 Kpnl fw	TATAGGTACCACTCTGAAGGGAGTAACC

7.1.2 Sequenzier-Primer

Primer	Sequenz
Luc-DICE-MS2	CCTCATAAAGGCCAAGAAGG
Venus1 sequencing	GCACAAGCTGGAGTACAAC
hnRNP K Seq 251	CCGAGCGCATATTGAGTATC
hnRNP K Seq 641	CTGAGTCTCCCATCAAAGGA
hnRNP K Seq 1051	ACATGGAGCCCATCAGAATG
DDX6 Seq 260	CTTCGGATGTGACCTCCACA
DDX6 Seq 643	GATGATACAGTGCACGTGGT
DDX6 Seq 1041	GCGAGTTGAATTGCTAGCCA

7.1.3 RT-PCR-Primer

mRNA	Primer		Produktgröße
α-globin	Hin	GAGAGGATGTTTCTGTCCTT	224 bp
	Rück	CAGTGGCTTAGGAGCTTGAA	
β-globin	Hin	GTGGATGAAGTTGGTGGTGA	258 bp
	Rück	TTGCCCAGGAGCCTGAAGTT	
CA-I	Hin	AACCGATCAGTGCTGAAAGG	324 bp
	Rück	CGTGAAGCTCGGCAGAATAT	
c-<i>Src</i>	Hin	ACTATGAGTCTAGGACGGAG	274 bp
	Rück	CCTTTCGTGGTCTCACTTTC	
ϵ-globin	Hin	TGGGCAGACTCCTCGTTGTT	240 bp
	Rück	TACCCAGGAGCTTGAAGTTC	
γ-globin	Hin	AAACCCTGGGAAGGCTCCT	246 bp
	Rück	TTCCCAGGAGCTTGAAGTTC	
GAPDH	Hin	ACAGTCAGCCGCATCTTCTT	280 bp
	Rück	CTGGAAGATGGTGATGGGAT	
Hdm2	Hin	AGGAGCAGGCAAATGTGCAA	110 bp
	Rück	ATGGCTTTGGTCTAACCAGG	
hnRNP E1	Hin	ATGTGACTCTCACCATTCCG	141 bp
	Rück	GATTCTCTCCGGACAAATTCC	
hnRNP K	Hin	TTAAGGCTCTCCGTACAGAC	199 bp
	Rück	TCCACAGCATCAGATTCCGAG	

Hr15-LOX	Hin	TGAGCTGCAGTCTCATCTTC	197 bp
	Rück	CAGTGCTCATTATCTGGTCG	
Uba1	Hin	CCTCTGTTGATGACAGTCGT	213 bp
	Rück	AATCAGCTTGCTCTTGTGCC	
ζ-globin	Hin	TCTGGAGAGGCTCTTCCTCA	223 bp
	Rück	GGACAGGAGCTTGAAGTTGA	

7.2 Antikörper

7.2.1 Primär-Antikörper

Antigen	Wirt	Quelle/ Klon	Verd. (WB)	Verd. (IF)
hnRNP K	Maus	Santa Cruz/ D-6	1:5000	1:400
	Ratte	E. Kremmer/ 4A8	1:10	
	Kaninchen	K. Bomsztyk/ #54 (Van Seuningen <i>et al.</i> , 1995)	1:5000	
hnRNP E1	Ziege	Santa Cruz/ T-18	1:500	1:200
	Huhn	B. Thiele	1:5000	
	Kaninchen	SA4554 (Naarmann <i>et al.</i> , 2008)	1:5000	1:200
GAPDH	Maus	Abcam/ 6C5	1:5000	
α-Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich/ DM1A	1:5000	1:800
Ubiquitin	Maus	Cell Signaling/ P4D1	1:1000 ¹	
CD34	Kaninchen	Santa Cruz/ H-140		1:200
Glycophorin A	Ratte	Santa Cruz/ YTH89.1		1:200
PRMT1	Kaninchen	Upstate/ 07-404	1:5000	1:200
c-Src	Kaninchen	Abcam/ 7950-1	1:500	1:200
v-Src	Maus	Oncogene/ Ab-1	1:500	1:200
r15-LOX	Meer- schweinchen	H. Kühn (Rapoport <i>et al.</i> , 1979)	1:1000	1:200
HDM2	Maus	Santa Cruz/ D-12	1:200	
pY	Maus	Santa Cruz/ PY-99	1:1000 ²	
Lyn	Maus	Santa Cruz/ H-6	1:500	
Fyn	Maus	Santa Cruz/ 15	1:500	
hnRNP K^{met}	Ratte	E. Kremmer/ 3D1 (Naarmann <i>et al.</i> , 2008)	1:10	
TIAR	Maus	BD Transduction/ 610352	1:1000	1:500
G3BP1	Maus	Santa Cruz/ TT-Y	1:5000	1:400
DDX6	Kaninchen	Novus Biologicals/ NB200-191	1:5000	1:400
rpS19	Ziege	Abcam/ 40833		1:200
rpL19	Maus	Santa Cruz/ K-12		1:400
Dcp1A	Maus	Abnova/ M06		1:400
His	Kaninchen	Santa Cruz/ H-6	1:500	
Uba1	Maus	Santa Cruz/ 2G2	1:200	
FLAG	Maus	Sigma-Aldrich/ M-2		1:400
HA	Kaninchen	Sigma-Aldrich/ H6908		1:400

¹⁾ Inkubation in 5% BSA/TBST, 4 °C, üN. ²⁾ Blocken und Antikörperinkubation in 1% BSA, 1% Milchpulver in TBST

7.2.2 Sekundär-Antikörper für Western Blot-Analysen

Antikörper	Wirt	Quelle	Verd.
α-Maus-HRP	Schaf	GE Healthcare/ NA931V	1:5000
α-Kaninchen-HRP	Esel	GE Healthcare/ NA934V	1:2000
α-Meerschweinchen-HRP	Kaninchen	Abcam/ 6771-1	1:5000
α-Ziege-HRP	Esel	Santa Cruz/ sc-2020	1:5000
α-Huhn-HRP	Kaninchen	Promega/ G135A	1:5000

7.2.3 Sekundär-Antikörper für Immunfluoreszenzen

Antikörper	Quelle	Verd.
α-Maus-FITC	Dianova	1:400
α-Maus-Cy3	Dianova	1:800
α-Maus-Cy5	Dianova	1:400
α-Kaninchen-FITC	Dianova	1:400
α-Kaninchen-Alexa488	Invitrogen	1:300
α-Kaninchen-Cy3	Dianova	1:800
α-Kaninchen-Cy5	Dianova	1:400
α-Meerschweinchen-Alexa488	Invitrogen	1:400
α-Meerschweinchen-FITC	Dianova	1:400
α-Ziege-Cy3	Dianova	1:800
α-Ratte-FITC	Dianova	1:400
α-Ratte-Cy3	Dianova	1:800

7.3 siRNAs

hnRNP K

AGACUACAAUGCCAGUGUUdTdT
 CUGUGGAAUGCUUAAAUUAdTdT
 GGAACAAGCAUUUAAAAGdTdT

hnRNP E1

CUACUCGAUUCAAGGACAAdTdT
 UGAACCAGGUGGCAAGACAdTdT
 UCACCAUUCCAAUAACUUdTdT

DDX6

#1: GUACAGAAGUUCAUGAAUUdTdT
 #2: CUGUGAAUGUGGUAUUAAAAdTdT
 #3: GCAGAAACCCUAUGAGAUUUdTdT

Uba1

#1: GCUAUGGUUUCUAUGGUUAdTdT

#2: GGUCAAAGUACCUAAGAAGdTdT

#3: CCACAUAUCCGGGUGACAAdTdT

Kontrolle (ctrl.)

AGGUAGUGUAAUCGCCUUGdTdT

7.4 FISH-SondenHr15-LOX:

TGGCCACAACAATGACCTCAGCCATCAAGT

CCACTATAAGACAGACGTGGCTGTGAAAGA

ATCTCAATTTCTTATCCAGGGCAGCCAGC

GAPDH:

ACCAAATCCGTTGACTCCGACCTTCACCTT

TACCAGAGTTAAAAGCAGCCCTGGTGACCA

TCTCATGGTTCACACCCATGACGAACATGG

c-Src:

TGTCCGAGGAGTTGAAGCCTCCGAACAGCT

ATGCCTCAGCTTCTTCATGACCTGGGCCTC

TTTGTGGTGAGCTCAGTCAGCAGGATCCCG

7.5 Abbildungen zur Reinigung des hnRNP K-Spaltprodukts

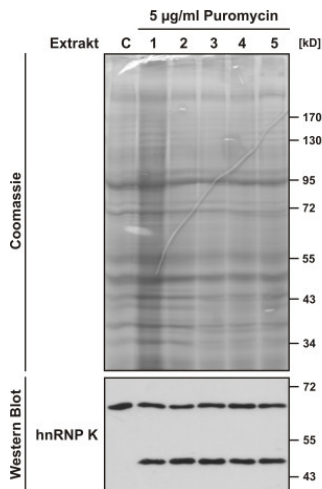


Abb. 7.1: Nachweis des hnRNP K-Spaltprodukts in K562-Extrakten.

Analyse von K562-Extrakt aus Zellen, die 16 h mit 5 µg/ml Puromycin behandelt wurden (1-5) C = Extrakt aus nicht behandelten Kontrollzellen. 12% SDS-PAGE. Oben: Coomassie-Färbung der Extrakte. Unten: Western Blot-Analyse mit α -hnRNP K-Antikörper.

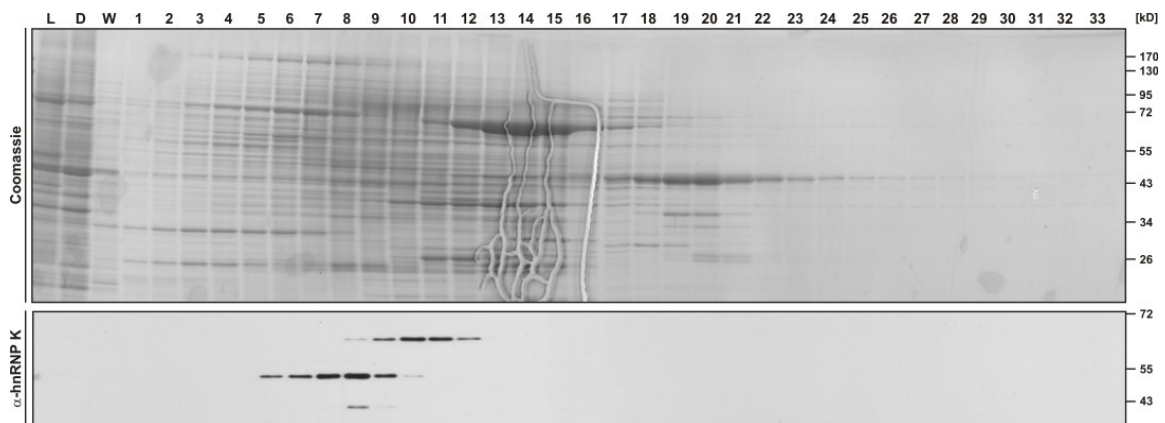


Abb. 7.2: DEAE-Sepharose von cytoplasmatischem K562-Extrakt aus Zellen nach 16 h Puromycin-Behandlung.

Analyse von *Load* (L), *Durchfluss* (D), *Wasch* (W) sowie der Fraktionen 1-33. 12% SDS-PAGE. Oben: Coomassie-Färbung. Unten: Western Blot mit α -hnRNP K-Antikörper.

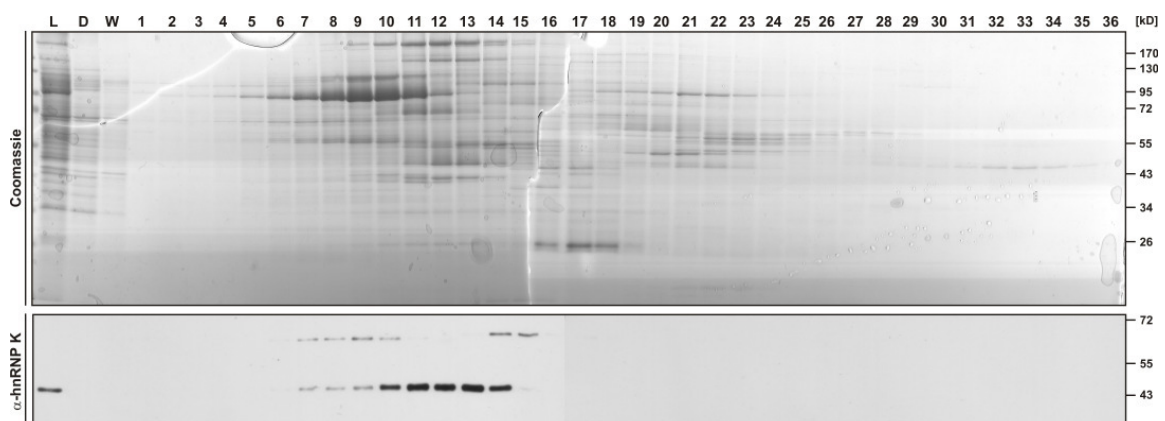


Abb. 7.3: Heparin-Sepharose der Fraktionen 6–9 der DEAE-Sepharose.

Analyse von *Load* (L), *Durchfluss* (D), *Wasch* (W) sowie der Fraktionen 1-36. 12% SDS-PAGE. Oben: Coomassie-Färbung. Unten: Western Blot mit α -hnRNP K-Antikörper.

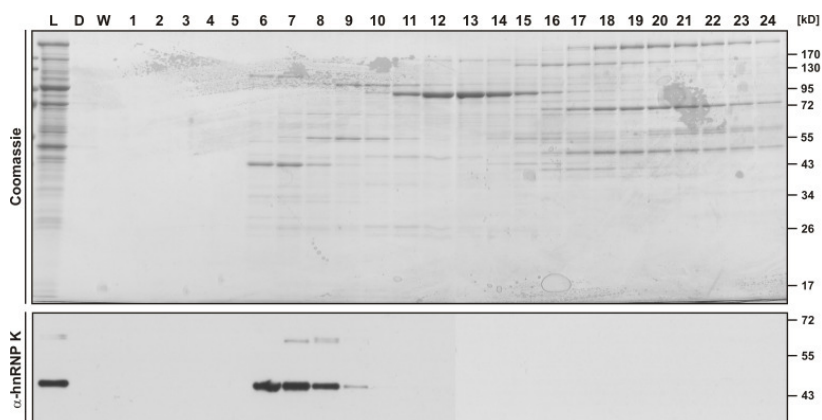


Abb. 7.4: Hydroxyapatit-Chromatographie der Fraktionen 10-14 der Heparin-Sepharose. Analyse von *Load* (L), *Durchfluss* (D), *Wasch* (W) sowie der Fraktionen 1-24. 12% SDS-PAGE. Oben: Coomassie-Färbung. Unten: Western Blot mit α -hnRNP K-Antikörper.

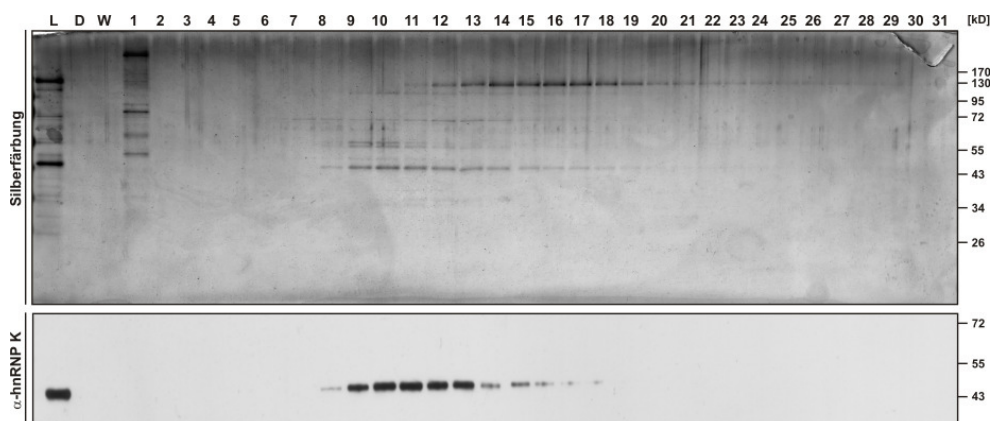
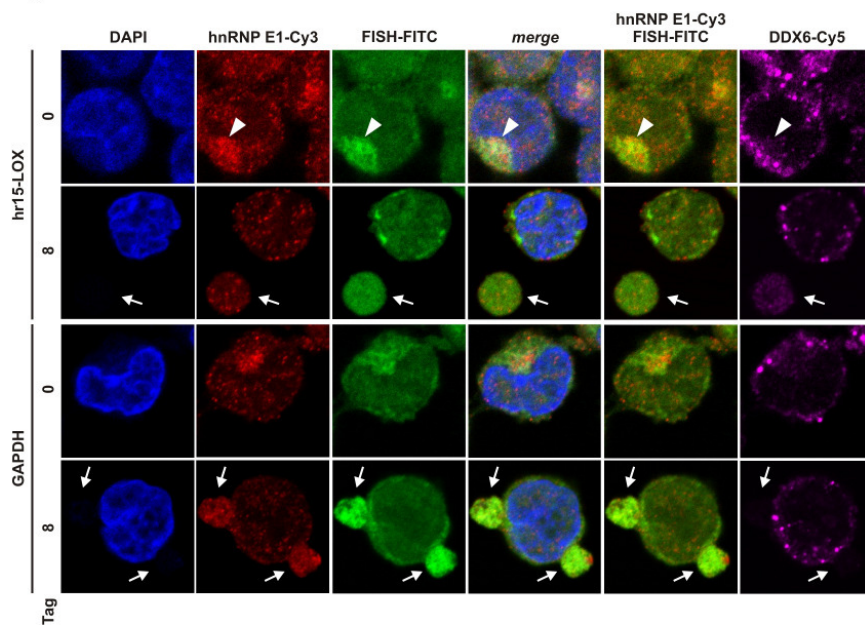
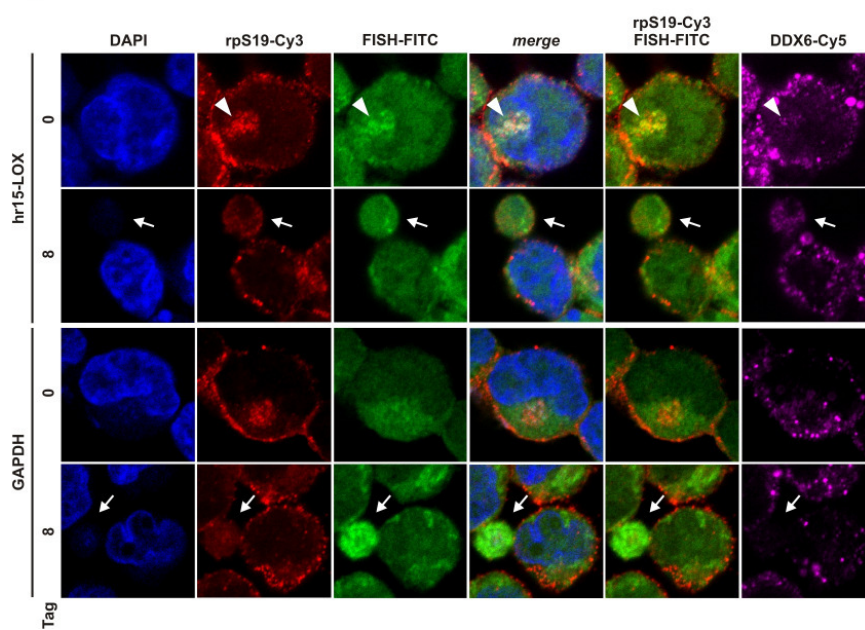


Abb 7.5: MonoQ-Sepharose der Fraktionen 6 und 7 der Hydroxyapatit-Chromatographie. Analyse von *Load* (L), *Durchfluss* (D), *Wasch* (W) sowie der Fraktionen 1-31. 12% SDS-PAGE. Oben: Silberfärbung. Unten: Western Blot mit α -hnRNP K-Antikörper.

7.6 Analyse der IF-FISH-Färbung an den Tagen 0 und 8 der erythroiden Reifung

A)**B)**

B)

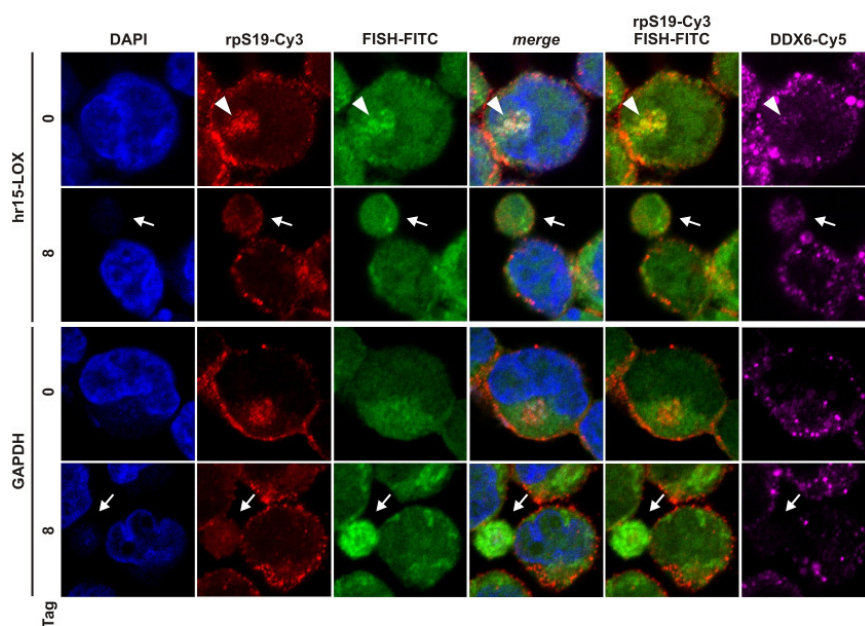


Abb. 7.6: IF-FISH-Färbung der hr15-LOX- und GAPDH-mRNA sowie der Proteine DDX6, hnRNP E1, rpS19 und rpL19 an den Tagen 0 und 8 der erythroiden Reifung von K562-Zellen. Analyse der IF-FISH-Färbung von nicht-induzierten K562-Zellen und am Tag 8 der erythroiden Reifung mit konfokaler Mikroskopie. Hybridisierung der Zellen mit hr15-LOX- und GAPDH-mRNA-Sonden. Färbung der Zellkerne mit DAPI. Färbung von DDX6, hnRNP E1 (A), rpS19 (B) und rpL19 (C) mit spezifischen Antikörpern. Kernlose Zellen sind durch Pfeile markiert. Pfeilspitzen markieren hr15-LOX- mRNA-, DDX6- und hnRNP E1-positive granuläre Strukturen.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name Isabel Sophie Naarmann
Geburtsdatum 30. August 1982
Geburtsort Solingen
Familienstand ledig, ein Kind

Schulbildung

1988-1992 Grundschule Yorckstraße, Solingen
1992-2001 Gymnasium Vogelsang, Solingen
Abschluss: Abitur

Studium und wissenschaftliche Ausbildung

10/2001-08/2006 Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Studiengang Biochemie
Abschluss: Diplom

10/2005-08/2006 Diplomarbeit bei PD Dr. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk Ostareck, Institut für Biochemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zum Thema „Untersuchungen zur Stabilität von hnRNP K und hnRNP E1 während der erythroiden Reifung von MEL-Zellen und K562-Zellen“

09/2006-06/2009 Doktorandin am Institut für Biochemie und Biotechnologie Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Abteilung Allgemeine Biochemie (Prof. Dr. Elmar Wahle)
Arbeitsgruppe Ostareck (PD Dr. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk Ostareck)

10/2006-06/2009 Assoziiertes Mitglied des DFG Graduiertenkollegs GRK 1026 „Conformational transitions in macromolecular interactions“

07/2009-06/2010 Doktorandin in der Experimentellen Arbeitsgruppe Intensivmedizin (PD Dr. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk Ostareck)
Fachübergreifende Klinik für Operative Intensivmedizin Erwachsene
Universitätsklinikum RWTH Aachen

Publikationen

Naarmann IS (2006). Untersuchungen zur Stabilität von hnRNP K und hnRNP E1 während der erythroiden Reifung von MEL- Zellen und K562- Zellen. Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.

Naarmann IS, Harnisch C, Flach N, Kremmer E, Kühn H, Ostareck DH, Ostareck-Lederer A (2008). mRNA silencing in human erythroid cell maturation: heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K controls the expression of its regulator c-Src. *J Biol Chem.* 283(26):18461-18472.

Naarmann IS, Harnisch C, Müller-Newen G, Urlaub H, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH (2010). DDX6 recruits translational silenced human reticulocyte 15-lipoxygenase mRNA to RNP granules. *RNA.* 16(11):2189-2204.

Danksagung

Bei PD Dr. Antje Ostareck-Lederer und PD Dr. Dirk Ostareck bedanke ich mich für die Überlassung des interessanten, vielseitigen Themas, die Unterstützung während der Promotion und die vielen Möglichkeiten, mich weiterzubilden, auf Konferenzen und Tagungen, aber auch in der Zusammenarbeit mit anderen Wissenschaftlern.

Dr. Christiane Harnisch danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Allen Mitgliedern der Abteilung Allgemeine Biochemie (Prof. Dr. Elmar Wahle) an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Insbesondere möchte ich mich bei meinen Kollegen aus dem Labor 412; Dr. Claudia Temme, Bodo Moritz und Dr. Simona Cuzic-Feltens; für viele hilfreiche Diskussionen und das nette Laborklima bedanken.

Auch allen Mitgliedern der experimentellen Arbeitsgruppe Intensivmedizin am Uniklinikum RWTH Aachen danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Bei Prof. Dr. Gernot Marx möchte ich mich für die freundliche Aufnahme in Aachen bedanken.

Bei Nadine Flach (Halle) bedanke ich mich für hervorragende technische Assistenz. Auch bei Nadine Simons (Aachen) möchte ich mich für ihre Hilfe in den letzten Monaten meiner Promotion bedanken.

Der Forschergruppe DFG FOR855 sowie dem Graduiertenkolleg 1026 danke ich für viele hilfreiche Anregungen und Diskussionen.

Prof. Dr. Hartmut Kühn (Charité, Berlin) danke ich für die Durchführung des r15-LOX-Aktivitätsassays.

Dr. Henning Urlaub und seinen Mitarbeitern (MPI für Biophysikalische Chemie, Göttingen) danke ich für die Durchführung der massenspektrometrischen Analysen.

Dr. Vladimir Benes und Tomi Bähr-Ivacevic (EMBL, Heidelberg) danke ich für die Durchführung der Microarray-Analysen.

Prof. Dr. Gerhard Müller-Newen (UK Aachen) danke ich für die Durchführung der konfokalen Mikroskopie.

Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier und Dr. Nadine Stöhr danke ich für die Überlassung vieler Plasmide und viele Tipps zur Verbesserung der mikroskopischen Daten.

Bei meiner Familie und Sebastian möchte ich mich für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion bedanken.

Eidesstattliche Erklärung

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

Halle (Saale),