



Die Charakterisierung der RNA-Bindungseigenschaften und mRNP-Assoziation der IGF2BP Proteine

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Kristin Wächter

geboren am 09.04.1983 in Lutherstadt Eisleben

Halle, Januar 2016

Meiner Tochter,

Marie

"Was man zu verstehen gelernt hat, fürchtet man nicht mehr."

Marie Curie

Tag der Verteidigung:

07.06.2016

Gutachter:

Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier

Prof. Dr. Sven-Erik Behrens

Prof. Dr. Dierk Niessing

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Die Proteine der VICKZ-Familie.....	1
1.1.1	Die Bedeutung der VICKZ-Proteine in der Entwicklung	2
1.1.2	Die Rolle der IGF2BPs in Krebserkrankungen.....	3
1.1.3	Struktur und funktionelle Einheiten der IGF2BPs	7
1.1.3.1	<i>In vitro</i> Bindungsstudien der IGF2BPs	9
1.1.3.2	Die RNA-Bindemotive der IGF2BPs	10
1.1.4	Die Lokalisation der ACTB mRNA.....	12
1.1.5	Die Stabilisierung der C-MYC mRNA.....	13
1.1.6	Die Organisation von mRNA-assoziierten Ribonukleoprotein-Komplexen (mRNPs).....	14
1.2	Die funktionelle Rolle von IGF2BP2.....	15
1.3	Zielstellung der Arbeit	18
2	Material und Methoden	19
2.1	Material	19
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Größenstandards	19
2.1.2	Bakterien.....	19
2.1.3	Zelllinien.....	19
2.1.4	Antikörper.....	20
2.1.5	Oligonukleotide	21
2.1.6	Vektoren und Konstrukte	22
2.1.7	Systeme	23
2.1.8	Sonstiges.....	23
2.1.9	Standardpuffer	23
2.2	Methoden	24
2.2.1	Zellbiologische Techniken.....	24
2.2.1.1	Transfektion.....	24
2.2.1.2	Lentivirale Transduktion	24
2.2.1.3	Die Induktion von zellulärem Stress.....	25
2.2.1.4	Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie	25

2.2.2	Molekularbiologische Methoden.....	25
2.2.2.1	Ortsgerichtete Mutagenese.....	25
2.2.2.2	Klonierung.....	26
2.2.2.3	Isolierung von DNA.....	26
2.2.2.4	Präparation von RNA.....	26
2.2.2.5	Reverse Transkription.....	27
2.2.2.6	Quantitative <i>Real-Time-PCR</i> (qRT-PCR).....	27
2.2.2.7	<i>In vitro</i> Transkription.....	28
2.2.2.8	SDS-PAGE und Western Blot.....	28
2.2.3	Biochemische Methoden.....	30
2.2.3.1	Co-Immunopräzipitation.....	30
2.2.3.2	<i>m⁷GTP-Cap-Sepharose Pulldown</i>	31
2.2.3.3	Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen.....	31
2.2.3.4	<i>Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)</i>	33
2.2.3.5	Filterbindung.....	34
2.2.3.6	Saccharose-Grandienten.....	34
2.2.3.7	Aufarbeitung von Proteinproben für die Massenspektrometrie.....	35
2.2.3.8	SELEX (<i>Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment</i>).....	36
2.2.4	Immunohistologische Methoden.....	38
2.2.4.1	Immunofluoreszenz.....	38
2.2.5	Metabolische Analysen.....	39
2.2.5.1	Glukoseaufnahme-Assay.....	39
2.2.5.2	Glykogen-Assay.....	39
3	Ergebnisse.....	41
3.1.1	Die Aufreinigung der rekombinanten IGF2BP Proteine.....	41
3.1.2	Alle KH-Domänen sind beteiligt an der IGF2BP-RNA-Bindung <i>in vitro</i>	44
3.1.3	Die KH1+2 Didomäne von ZBP1 ist wichtig für die Komplex-Stabilität.....	48
3.1.4	Die RNA-Bindung vermittelt die subzelluläre Lokalisation der IGF2BPs.....	50
3.1.5	Die KH-Domänen beeinflussen die Protein-Assoziation der IGF2BPs.....	52
3.1.6	Die KH-Domänen vermitteln die RNA-abhängige Oligomerisierung der IGF2BPs... 54	
3.1.7	Die KH-Domänen vermitteln die Lokalisierung der IGF2BPs in „ <i>Stress Granules</i> “ .. 55	
3.2.	Identifizierung von RNA-Bindemotiven mittels SELEX.....	58

3.2.1	Validierung der SELEX-Pools mittels Wettbewerbsassay	59
3.2.2	Validierung selektierter RNA-Aptamere mittels Filterbindungsassay.....	62
3.2.3	Bestimmung der Nukleotid-Zusammensetzung selektierter Aptamere	63
3.2.4	<i>Alignment</i> selektierter Aptamere und putative Konsensusmotive.....	63
3.2.5	Konsensusmotive in Ziel-RNAs von IGF2BP1.....	67
3.2.6	Konsensusmotive in Ziel-RNAs von IGF2BP2.....	69
3.2.7	Konsensusmotive in Ziel-RNAs von IGF2BP3.....	70
3.2.8	Die Identifikation eines SELEX-Konsensusmotivs für alle IGF2BPs.....	72
3.3.	Zusammensetzung der IGF2BP-mRNPs	73
3.3.1	IGF2BP1 ist eine Komponente von Pionier-mRNPs.....	77
3.3.2	Sedimentation von IGF2BP1 im 5-20 % Saccharose Gradienten	81
3.3.3	Analyse der IGF2BP1 enthaltenen RNPs.....	82
3.4.	Die Rolle von IGF2BP2 im Metabolismus	87
3.4.1	Die Überexpression von IGF2BP2 resultiert in einer gesteigerten Glukoseaufnahme	87
3.4.2	Die Überexpression von IGF2BP2 resultiert in einem gesteigerten Glykogengehalt	88
3.4.3	Die Überexpression von IGF2BP2 im transgenen Mausmodell resultiert ebenfalls in einem gesteigerten Glykogengehalt.....	89
3.4.4	Der <i>Knockdown</i> von IGF2BP2 inhibiert den mTORC-Signalweg.....	90
4	Diskussion.....	93
4.1	Die Rolle der KH-Domänen der IGF2BPs	93
4.2	Die Bindemotive der IGF2BPs.....	98
4.3	Die Zusammensetzung der IGF2BP-RNPs.....	101
4.4	Die Rolle von IGF2BP2 im Glukose-Metabolismus	106
5	Zusammenfassung und Ausblick	109
6	Literatur.....	112
7	Anhang	128
7.1	Abkürzungsverzeichnis	128

7.2	SELEX-Aptamer-Sequenzen mit Konsensusmotiven.....	130
7.3	SELEX-Motive in Ziel-RNAs	133
7.3.1	Motive in IGF2BP1 Ziel-RNAs	133
7.3.2	Motive in IGF2BP2 Ziel-RNAs	135
7.3.3	Motive in IGF2BP3 Ziel-RNAs	136
7.4	Daten der MS-Analysen	138

1 Einleitung

1.1 Die Proteine der VICKZ-Familie

RNA-bindende Proteine können Einfluss auf die Transkription, Translation, Lokalisation und Stabilität assoziierter RNAs nehmen (*reviewed* (Dreyfuss et al., 2002; Ross 1995)). Zahlreiche Erkrankungen von Alzheimer bis Krebs stehen im Zusammenhang mit der Überexpression RNA-bindender Proteine oder mit Mutationen in Genen RNA-bindender Proteine (Oleana et al., 1998; Mueller-Pillasch et al., 1997).

Eine fundamentale Rolle in der Modulation der posttranskriptionellen Genregulation spielen die Mitglieder der VICKZ-Protein-Familie. Es existieren mehrere Synonyme für die Proteine dieser Familie. Dabei orientierte man sich für die Namensgebung am Modellorganismus, in dem diese Proteine erforscht wurden oder an der Ziel-mRNA, welche sie binden. Im Menschen existieren drei Paraloge (IGF2BP1, 2 und 3), welche ursprünglich aufgrund ihrer Fähigkeit die IGF2 mRNA (*Insulin-like growth factor 2*) zu binden und translationell zu regulieren, identifiziert wurden (J. Nielsen et al., 1999). Im Huhn trägt es den Namen *zipcode*-bindendes Protein (ZBP1), da das *zipcode*-Element in der 3'-UTR der β -Aktin (ACTB) mRNA gebunden und somit der RNA-Transport ermöglicht wird (Ross et al., 1997). Dabei ist anzumerken, dass ZBP1 und IGF2BP1 eine beträchtliche Sequenzidentität (> 94%) aufweisen (Abb. 1.1). In Mäusen zum Beispiel wird es CRD-BP genannt, da es innerhalb der kodierenden Region an die CRD (*Coding Region instability Determinant*) der MYC mRNA (*v-myc avian myelocytomatosis viral oncogene homolog*) bindet und diese vor endonukleolytischem Abbau schützt (Bernstein et al., 1992; Prokipcak et al., 1994; Doyle et al., 1998). In *Xenopus laevis* sorgt es als Vg1RBP/Vera für den Transport der Vg1 mRNA (*growth differentiation factor 1*) zum vegetalen Pol von Oozyten (Elisha et al., 1995). Als ein homologes Protein zu Vg1RBP wurde das humane KOC (*KH domain containing protein overexpressed in cancer*) identifiziert, welches sowohl in der Plazenta als auch in Krebsgeweben exprimiert wird (Mueller-Pillasch et al., 1997).

Die Bezeichnung, VICKZ-Protein-Familie, setzt sich demnach aus den Mitgliedern Vg1RBP, IGF2BPs, CRD-BP, KOC und ZBP1 zusammen.

Einleitung

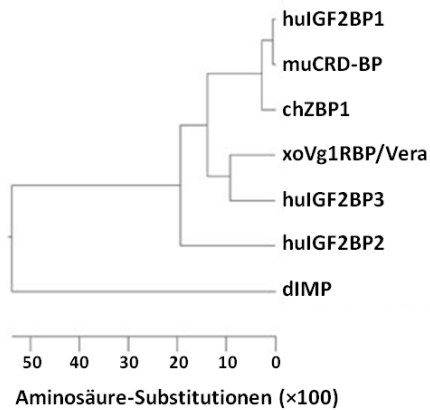


Abb. 1.1: Darstellung verwandtschaftlicher Beziehungen der VICKZ-Protein-Familie. Abgebildet sind die Aminosäure-Substitutionen der Proteine der VICKZ-Familie aus verschiedenen Organismen (hu-*Homo sapiens*, mu-*Mus musculus*, ch-*Gallus gallus*, xo-*Xenopus laevis*, d-*Drosophila melanogaster*; aus Bell et al., 2013 übernommen und modifiziert).

1.1.1 Die Bedeutung der VICKZ-Proteine in der Entwicklung

Modellorganismen stellen ein ideales Werkzeug dar, um Informationen über die Funktionsweise von Genprodukten zu erhalten. In allen bisher analysierten Organismen wurden die VICKZ-Proteine als essentielle Regulatoren des Zellwachstums und der Zelldifferenzierung während der Embryogenese identifiziert. Untersuchungen in *Mus musculus* ergaben, ein biphasisches Expressionsmuster von CRD-BP in Oozyten und Zygoten sowie während der frühen Embryonalentwicklung (F. C. Nielsen et al., 2001; Yaniv und Yisraeli, 2002). Am embryonalen Tag 12,5 (E12.5) erreicht die Expression schließlich ihren Höhepunkt und nimmt bis zur Geburt hin stetig ab (Nielsen et al., 1999; Runge et al., 2000). Große Mengen des Proteins konnten in sich entwickelnden Geweben des Gehirns, der Muskulatur, den heranreifenden Gliedmaßen sowie in den Epithelien zahlreicher Organe nachgewiesen werden (Hansen et al., 2004). Der *knockout* von CRD-BP in Mäusen äußert sich in einer stark reduzierten Überlebensrate, einem Zwergwachstum und einer beeinträchtigten Entwicklung des Darmes (Hansen et al., 2004). Die Ursachen für diese Phänotypen sind jedoch weitgehend unbekannt.

Untersuchungen an *Xenopus laevis* zeigten, dass Vg1RBP in allen Stadien der Oogenese gebildet wird und nach der Aktivierung der zygotischen Transkription im gesamten neuronalen Epithel exprimiert wird (Zhang et al., 1999). Durch nähere Analysen konnte nachgewiesen werden, dass Vg1RBP die Vg1 RNA bindet und zum vegetativen Pol von Oozyten transportiert (Havin et al., 1998; Deshler et al., 1998). *Xenopus* Embryonen, in denen die Vg1RBP Expression durch eine Injektion von AMOs (*Morpholino Antisense-Oligonukleotides*) reduziert wurde, weisen Neuralrohr-Defekte und eine verringerte Neuralleisten-Migration auf (Yaniv et al., 2003).

Einleitung

Forschungsarbeiten in *Drosophila melanogaster* ergaben, dass das orthologe dIMP (*Drosophila melanogaster IGF2 mRNA binding protein*) während der Embryogenese in der gesamten Zellschicht des zellulären Blastoderms sowie den Polzellen detektiert werden kann, und in späteren Entwicklungsstadien im sich entwickelnden Nervensystem exprimiert wird (Adolph et al., 2009). Überdies ist das Protein während der Oogenese und Spermatogenese abundant (Boylan et al., 2008; Fabrizio et al., 2008). Mutationen, die zum Funktionsverlust des Proteins führen sind zygotisch lethal und die Überexpression von dIMP resultiert in Störungen der dorsal-ventralen-Polarität (Boylan et al., 2008). Des Weiteren steuert dIMP das Schicksal der lokalisierten RNAs *oskar* und *gurken* in *Drosophila* Oozyten (Munro et al., 2006; Geng et al., 2006). Diese Forschungsergebnisse verdeutlichen, dass die VICKZ-Proteine Entwicklungsprozesse der frühen Embryogenese modulieren sowie an der Reifung des Nervensystems beteiligt sind.

1.1.2 Die Rolle der IGF2BPs in Krebserkrankungen

Neben der bedeutenden Funktion der IGF2BPs während der Embryonalentwicklung ergaben Analysen von Krebsgeweben, dass die Proteine IGF2BP1 und IGF2BP3 erneut hoch exprimiert werden. Zudem scheinen die IGF2BPs am Fortschreiten von Krebserkrankungen wesentlichen Anteil zu haben, da bei der Untersuchung von Karzinomen des Dick- und Mastdarmes festgestellt wurde, dass die IGF2BP Proteine besonders stark in invasiven Bereichen, wie Zellfortsätzen, exprimiert werden, was mit der Bildung von Lymphknoten-Metastasen einher geht (Vainer et al., 2008). Diese Studie lässt vermuten, dass die IGF2BP Proteine das metastatische Potential von Tumorzellen fördern, obwohl unbekannt bleibt, welches Paraloge der IGF2BP Familie diese Invasivität reguliert.

Während für IGF2BP2 nur wenige Studien in Liposarkomen, Leberkrebs und Karzinomen des Endometriums existieren, gibt es für IGF2BP1 und IGF2BP3 eine Vielzahl von Publikationen, die das onkogene Potential belegen (Cleyne et al., 2007; Lu et al., 2001; Zhang et al., 2011; Bell et al., 2013). So konnte die Neusynthese von IGF2BP1 durch RT-PCR Analysen in Krebsgeweben der Brust, des Gehirns, des Dick- und Mastdarms sowie in mesenchymalen Tumoren nachgewiesen werden (*reviewed* (Bell et al., 2013)). Immunohistochemische Methoden führten zudem zur Identifikation von IGF2BP1 in Karzinomen der Lunge, des Eierstocks, des Darmes und des Hodens (*reviewed* (Bell et al., 2013)). Das onkogene Potential von IGF2BP1 wird außerdem durch eine Studie untermauert,

Einleitung

in der CRD-BP unter Kontrolle eines WAP-Promotors (*whey acidic protein*) in epithelialen Zellen der Milchdrüsen von Mäusen exprimiert wurde, was die Bildung metastasierender Tumore zur Folge hatte (Tessier et al., 2004). Überdies konnten Köbel und Kollegen nachweisen, dass eine gesteigerte *de novo* Synthese von IGF2BP1 in Karzinomen des Eierstocks mit einer erhöhten Sterblichkeit von Patienten einher ging (Kobel et al., 2007). In einer kürzlich publizierten Studie konnte IGF2BP1 zudem als prognostischer Marker in Neuroblastom-Krebserkrankungen identifiziert werden (Bell et al., 2015). In diesem Zusammenhang wurde eine für Onkogene typische Genamplifikation von IGF2BP1 festgestellt. Weiterhin ging die verstärkte Expression von IGF2BP1 in Neuroblastomen, mit einer verringerten Überlebensrate von Patienten einher und äußerte sich in erhöhten N-MYC mRNA Mengen. Übereinstimmend dazu fördert IGF2BP1 das Überleben von Zellen *in vitro*, die von Neuroblastomen abgeleitet sind (Bell et al., 2015).

Für IGF2BP3 wurden in den vergangenen Jahren zahlreiche Arbeiten publiziert, in denen die Aggressivität von Tumoren mit der Expression von IGF2BP3 korreliert (*reviewed* (Lederer et al., 2014)). Es wird postuliert, dass die IGF2BPs eine bedeutende Rolle in Krebserkrankungen und der Tumorgenese spielen, indem die Expression von Onkogenen moduliert wird. Neben der bereits erwähnten posttranskriptionellen Regulation von MYC, wird zudem das KRAS Transkript (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) durch IGF2BP1 gebunden und stabilisiert, was in einer erhöhten Expression von KRAS und gesteigerten Proliferation von Krebszellen des Dickdarmes resultiert (Mongroo et al., 2011). Des Weiteren wurde anhand eines Maus-Modells für die Darm-Wundheilung aufgedeckt, dass IGF2BP1 die Expression der Prostaglandin-Endoperoxid Synthase 2 (PTGS2) in mesenchymalen Stammzellen des Darmes fördert (Manieri et al., 2012). PTGS2 fungiert als wichtiges Enzym zur lokalisierten Prostaglandin-Synthese bei Schäden der Darmschleimhaut sowie fortschreitenden Darmkrebserkrankungen (Wang et al., 2005). Daher wird vorgeschlagen, dass IGF2BP1 den effizienten Wundverschluss ermöglicht. Dieses Ergebnis stützt zudem die entscheidende Rolle der IGF2BPs bei der Zellmigration.

Ein Regulationsmechanismus, der bei der Entstehung maligner Melanome eine Rolle spielt, besteht in der Bindung von IGF2BP1 an die 3'-UTR der MITF RNA (*Microphthalmia-associated transcription factor*). Durch diese Assoziation werden die Bindestellen für die microRNA-340, welche den Abbau der MITF mRNA vermittelt, abgeschirmt. Daraus resultiert eine Stabilisierung des MITF Transkripts sowie eine gesteigerte Expression von MITF, und

Einleitung

folglich eine erhöhte transkriptionelle Aktivierung von Zielgenen (Goswami et al., 2010). In Osteosarkom- und Eierstockkarzinom-Zellen wurde beobachtet, dass IGF2BP1 die Migration dieser Zellen fördert, indem es die Aktin-Dynamik in Abhängigkeit von HSP27 (*Heat shock protein 27*) moduliert (Stohr et al., 2012). Dabei inhibiert IGF2BP1 die Translation der MAPK4 mRNA (*mitogen-activated protein kinase 4*), wodurch die MK5 Kinase nicht aktiviert werden kann und somit die MK5 gerichtete Phosphorylierung von HSP27 unterbleibt. Dies führt zu einer reduzierten HSP27-ACTB Assoziation, was die Mobilisierung von monomerem G-Aktin (globuläres Aktin) nach sich zieht. Dieses steht wiederum für die Polymerisierung zu F-Aktin (filamentäres Aktin) zur Verfügung und steigert damit die Zellmigration (Stohr et al., 2012).

Zudem erhält IGF2BP1 mesenchymale Tumorzelleigenschaften aufrecht, indem es die Expression des Transkriptionsfaktors LEF1 (*lymphoid enhancer-binding factor 1*) erhöht (Zirkel et al., 2013). LEF1 steigert seinerseits die Transkription des mesenchymalen Markers Fibronektin sowie die Synthese von SNAI2 (*snail family zinc finger 2*), einem Transkriptionsfaktor, welcher die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) fördert. Der EMT-Prozess ist ein Kennzeichen für das Fortschreiten von Krebserkrankungen, indem dieser die Metastasierung von Tumoren fördert.

Für IGF2BP3 konnte gezeigt werden, dass durch die Stabilisierung der CD164, MMP-9 und PDPN kodierenden mRNAs das invasive Potential von Tumorzellen *in vitro* gesteigert wird (Samanta et al., 2012; Li et al., 2014; Hwang et al., 2012). CD164 (*Sialomucin*) ist ein Rezeptor, welcher an der Vermittlung von Adhäsionsprozessen beteiligt ist (*reviewed* (Watt und Chan, 2000)). Die Kollagenase MMP-9 (*matrix metalloproteinase 9*) trägt zum Abbau der Basalmembran bei, während PDPN (*podoplanin*) die Reifung von Invadopodien reguliert (Zeng et al., 1999; Martin-Villar et al., 2015). Invadopodien sind Aktin-reiche Vorsprünge von Tumorzellen, welche über den Verdau der extrazellulären Matrix die Invasivität dieser Zellen fördern (*reviewed* (Murphy und Courtneidge, 2011)). Eine Ziel RNA, die sowohl von IGF2BP1 als auch von IGF2BP3 gebunden und stabilisiert wird, ist CD44, dessen gesteigerte Expression ebenfalls mit der Bildung von Invadopodien einher geht (Vikesaa et al., 2006).

Des Weiteren wird vermutet, dass die IGF2BPs Tumorzell-Resistenzen vermitteln können, indem sie das Überleben von Zellen fördern, die bestrahlt oder chemotherapeutisch behandelt wurden (Liao et al., 2011; Boyerinas et al., 2012). Diese Hypothese wird zum einen gestützt durch die Feststellung, dass IGF2BP1 die kodierende Region der MDR1 RNA

Einleitung

(*multidrug resistance protein*) bindet und vor endonukleolytischem Abbau schützt (Sparanese et al., 2007). Zum anderen stabilisiert IGF2BP3 die ABCG2 RNA (*breast cancer resistance protein*) in Brustkrebszellen (Samanta et al., 2013). Beide RNAs kodieren für Membrantransporter, die über den ATP-abhängigen Efflux von Antikrebsmitteln, das Überleben von Krebszellen gewährleisten.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass die IGF2BP-Familienmitglieder 1 und 3 über die Regulation spezifischer Ziel-mRNAs (Abb. 1.2), die Proliferation und Migration von Zellen modulieren und damit maßgeblich an der Entstehung und dem Fortschreiten von Krebserkrankungen beteiligt sind.

Ziel-mRNA	cis-Element	IGF2BP	Regulation	Referenz
C-MYC	CRD	1	Inhibierung des CRD-abhängigen Abbaus	Bernstein et al., 1992; Prokipcak et al., 1994; Doyle et al., 1998
N-MYC	nicht bekannt	1	fördert die Expression	Bell et al., 2015
KRAS	CR, 3'-UTR	1	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Mongroo et al., 2011
PTGS2	nicht bekannt	1	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Manieri et al., 2012
MITF	3'-UTR	1	Inhibierung des microRNA-abhängigen Abbaus	Goswami et al., 2010
MAPK4	3'-UTR	1	Inhibierung der mRNA-Translation	Stohr et al., 2012
LEF1	3'-UTR	1	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Zirkel et al., 2013
CD164	nicht bekannt	3	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Samanta et al., 2012; Watt und Chan, 2000
MMP-9	nicht bekannt	3	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Samanta et al., 2012; Li et al., 2014; Zeng et al., 1999
PDPN	nicht bekannt	3	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Hwang et al., 2012; Martin-Villar et al., 2015
CD44	3'-UTR	1, 3	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Vikesaa et al., 2006
MDR1	CR	1	Inhibierung des mRNA-Abbaus	Sparanese et al., 2007
ABCG2	nicht bekannt	3	nicht bekannt	Samanta et al., 2013

Abb. 1.2: Überblick krebsrelevanter Ziel-mRNAs von IGF2BP1 und IGF2BP3. Das durch IGF2BP1/3 gebundene cis-Element, die Regulation der Ziel-mRNA und die Referenz wurden aufgelistet.

1.1.3 Struktur und funktionelle Einheiten der IGF2BPs

Die Struktur der IGF2BP Paralogen ähnelt sich sehr stark hinsichtlich der Anordnung und des Abstandes der Protein-Domänen zueinander (Abb. 1.3). Die Aminosäure-Sequenz-Identität zwischen den IGF2BPs beträgt über 56%, wobei der Grad der Konservierung innerhalb der Protein-Domänen am höchsten ist (*reviewed* (Bell et al., 2013)). Die konservierten Bereiche der IGF2BP Paralogen sind in drei Didomänen angeordnet (Abb. 1.3). Im N-terminalen Bereich der Proteine befinden sich zwei RRM-Domänen (*RNA Recognition Motif*) und im C-terminalen Bereich sind vier KH-Domänen (*hnRNPk homology domains*) lokalisiert.



Abb. 1.3: Schematische Darstellung der konservierten Didomänen-Organisation der IGF2BPs. Im N-terminalen Bereich der Proteine sind zwei RRM-Domänen (*RNA Recognition Motif*; dunkelgrau markiert) und im C-terminalen Bereich sind vier KH-Domänen (*hnRNPk homology domains*; hellgrau markiert) lokalisiert (übernommen aus Wächter und Köhn et al., 2013).

Die funktionelle Einheit im Hinblick auf die Bindung der verschiedenen Ziel-mRNAs stellen die KH-Domänen dar, für die RRM-Domänen konnte dagegen bisher keine Bindungsaktivität nachgewiesen werden (F. C. Nielsen et al., 2002; Git und Standart, 2002; Farina et al., 2003; J. Nielsen et al., 2004). Die KH-Domäne wurde ursprünglich als konservierte Region in hnRNPk (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K*) identifiziert (Siomi et al., 1993a). Diese umfasst etwa 70 Aminosäuren und ist in zahlreichen Proteinen von Archaeen, Bakterien und Eukaryoten zu finden (Siomi et al., 1993a; Grishin 2001). Wie auch bei den IGF2BPs, treten diese Domänen zumeist in mehreren Kopien innerhalb eines Proteins auf. Zum Beispiel hat FMRP (*Fragile X Mental Retardation Protein*) zwei KH-Domänen, während in Vigilin sogar 14 Motive gefunden wurden (Siomi et al., 1993b; Currie und Brown 1999). Die KH-Domäne weist im Allgemeinen eine $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Topologie auf (Musco et al., 1996) mit einem charakteristischem Muster aliphatischer Reste und einem typischen GXXG-Loop [(Adinolfi et al., 1999; Grishin, 2001); (Abb. 1.4)].

Einleitung



Abb. 1.4: Stilisierte Darstellung der KH-Domänen Faltung. Die Kennzeichnung der Sekundärstruktur-Elemente ($\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$) erfolgte nach der Standard-KH-Nomenklatur nach (Grishin, 2001). Die gepunktete Linie, welche das β_2 -Faltblatt und β' -Faltblatt verbindet repräsentiert den variablen *Loop*. Die helle Linie, welche die α_1 -Helix und die α_2 -Helix verbindet repräsentiert den GXXG-*Loop* (übernommen aus Valverde et al., 2008).

Bereits im Jahre 2000 konnte anhand von Kristallstrukturanalysen gezeigt werden, wie die KH-Domäne eines Proteins das RNA-Substrat bindet. Dazu wurde die KH3 Domäne des Proteins Nova 2 (*Neuro-oncological ventral antigen 2*) untersucht, welche eine kurze RNA von 20 Nukleotiden gebunden hat. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass der GXXG-*Loop* kritisch ist für die Interaktion mit dem Nukleinsäure-Rückgrat und als eine Bindungseinheit fungiert, während der variable *Loop* die andere Bindungseinheit darstellt (Lewis et al., 2000). Valverde et al. (2008) konkretisierte die KH-Domänen-RNA-Bindung weiter und postulierte, dass die typische Bindungsoberfläche der KH-Domänen einen Spalt darstellt, welcher von der α_1 -, α_2 -Helix und dem GXXG-*Loop* auf der einen Seite sowie dem β_2 -Faltblatt und dem variablen *Loop* auf der anderen Seite gebildet wird. Diese KH-Domänen Architektur erlaubt daher lediglich die Erkennung kurzer RNA-Abschnitte. Dabei tragen Van der Waals Kräfte, Hydrophobe Interaktionen und zum geringeren Teil elektrostatische Wechselwirkungen zur Nukleinsäure-Bindung bei.

Schließlich gelang es einer Arbeitsgruppe im Jahr 2010 durch Röntgenkristallographie die Struktur der KH-Domänen 3 und 4 von ZBP1 aufzuklären [(Chao et al., 2010); (Abb. 1.5)]. Dabei sind beide Domänen in einer intramolekularen, antiparallelen Pseudodimer-Konformation angeordnet, sodass sich die RNA-bindenden Bereiche an den gegenüberliegenden Enden des Moleküls befinden. Die systematische Deletion von Nukleotiden innerhalb des ACTB *zipcode* Elementes (1-28), führte zur Identifikation von zwei RNA-Sequenzen, die von ZBP1 gebunden werden. Damit eine Bindung des Pseudodimers an beide RNA-Elemente erfolgen kann, wird postuliert, dass die RNA eine Loopstruktur ausbildet (Abb. 1.5 B). Diese Hypothese beruht jedoch lediglich auf Modellierungen der RNA zur Proteinstruktur.

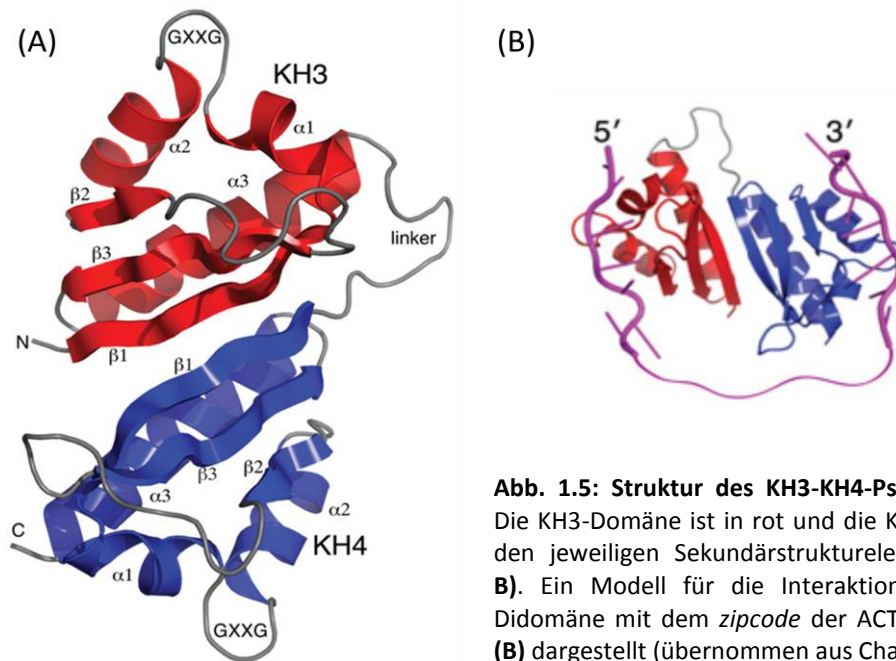


Abb. 1.5: Struktur des KH3-KH4-Pseudodimers von ZBP1. Die KH3-Domäne ist in rot und die KH4-Domäne in blau mit den jeweiligen Sekundärstrukturelementen dargestellt **(A, B)**. Ein Modell für die Interaktion zwischen der KH3+4 Didomäne mit dem *zipcode* der ACTB RNA (1-28; lila) ist in **(B)** dargestellt (übernommen aus Chao et al., 2010).

1.1.3.1 *In vitro* Bindungsstudien der IGF2BPs

Es gibt mehrere Arbeitsgruppen, die bereits *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt haben, um die RNA-Bindungsspezifität, vermittelt über die vier KH-Domänen der IGF2BPs, aufzuklären. Pionierarbeit auf diesem Gebiet leistete die Gruppe um J. Nielsen et al. im Jahr 2003. Diese Arbeitsgruppe mutierte einen Bereich im GXXG-Loop der KH-Domänen 1, 2 und 3 (XX zu EL), welcher zu einer 50-fach reduzierten RNA-Bindungsaffinität führte. Weitere Arbeiten dieser Gruppe zeigten, dass für die Assoziation von IGF2BP1 an die lange, nicht-kodierende H19 RNA alle vier KH-Domänen benötigt werden und die drei verkürzten Didomänen-Proteine (RRM1-2, KH1-2 und KH3-4) keine Bindung vermitteln (Runge et al., 2000; F. C. Nielsen et al., 2002). Kinetische Analysen der Bindung von IGF2BP1 an den 3'-UTR der IGF2 RNA (*Insulin-like growth factor II*) zeigten, dass es sich dabei vermutlich um einen sequentiellen, kooperativen Dimerisierungs-Mechanismus handelt. Dabei wird zwischen zwei Reaktionsschritten unterschieden. Neben dem ersten, schnellen Reaktionsschritt, welcher ein Protein-RNA-Intermediat geringer Stabilität hervorbringt, ist das Ergebnis des zweiten, langsamen Schrittes ein „geschlossener“, stabiler Ribonukleoprotein-Komplex, bestehend aus zwei Proteinen und einem RNA-Molekül (J. Nielsen et al., 2004). In diesem Zusammenhang konnte zudem die Bildung von RNA-abhängigen Heterodimeren zwischen IGF2BP1, 2 und 3 nachgewiesen werden (J. Nielsen et al., 2004).

Einleitung

Weitere Studien verdeutlichten, dass für die Bindung von Vg1RBP an den 3'-UTR der Vg1 mRNA ebenfalls alle vier KH-Domänen essentiell sind, während auch hier keine Bindung für die RRM-Domänen nachgewiesen werden konnte (Git und Standart, 2002). Farina et al., analysierten die Interaktion zwischen ZBP1 und dem 3'-UTR *zipcode* von ACTB mittels verkürzter Didomänen-Proteine (RRM1-2, KH1-2 und KH3-4). Im Ergebnis wurde festgestellt, dass für die *zipcode*-Bindung die KH3-4 Domäne von ZBP1 verantwortlich ist, die RRM1-2 und KH1-2 Domänen dagegen keine Assoziation mit dem *zipcode* vermittelt (Farina et al., 2003).

In unserer Arbeitsgruppe wurden ebenfalls mehrere ZBP1-Mutanten generiert und hinsichtlich ihrer RNA-Bindungseigenschaften und subzellulären Lokalisation untersucht (Diplomarbeit, M. Köhn, 2008). Diese Vorarbeiten bieten eine wesentliche Grundlage für die vorliegende Arbeit.

1.1.3.2 Die RNA-Bindemotive der IGF2BPs

Zu Beginn meiner Arbeit war sehr wenig zu RNA-Bindemotiven und genauen Konsensus-Sequenzen der IGF2BP-Ziel-RNAs bekannt. So postulierte man im Jahre 1999 anhand der IGF2BP Bindung an bekannte Ziel-mRNAs, wie den 5'-UTR von IGF2, dass die Proteine präferentiell an cytidinreiche Bereiche der RNA binden (J. Nielsen et al., 1999). Des Weiteren ließen *in vivo UV-cross-linking* Analysen vermuten, dass ZBP1 an die ACACCC-Sequenz im *zipcode* der 3'-UTR von ACTB bindet (Ross et al., 1997). Anhand von Strukturanalysen (Abb. 1.5) von ZBP1 und Bindungsstudien mit dem ACTB *zipcode*, in welchem einzelne Nukleotide deletiert oder punktmutiert wurden, konnten die genauen Bindebereiche von ZBP1 identifiziert werden [(Abb. 1.6); (Chao et al., 2010; Patel et al., 2012)].

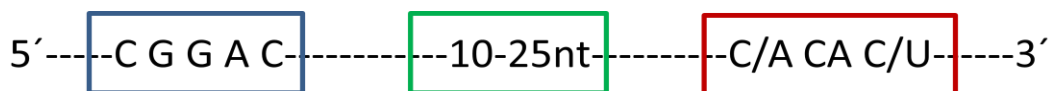


Abb. 1.6: Schematische Darstellung der Bindebereiche im *zipcode* der 3'-UTR von ACTB. Das 5'-Erkennungselement (blau eingerahmt) und das 3'-Erkennungselement (rot eingerahmt) werden durch ZBPKH3+4 gebunden. Zwischen beiden Elementen sollten sich 10-25 Nukleotide befinden, damit ein Ausloop der RNA und damit die Bindung beider Elemente durch das KH3+4 Pseudodimer erfolgen kann (Chao et al., 2010; Patel et al., 2012).

Einleitung

Eine vielfach genutzte Methode zur Identifizierung von Bindemotiven stellt der SELEX-Prozess dar (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*; Tuerk und Gold, 1990; Ellington und Szostak, 1990). Mit dessen Hilfe konnte zum Beispiel die Konsensus-Sequenz UUUAY (Y = C, U) für dIMP ermittelt werden, welche 13-mal im 3'-UTR der *oskar* RNA lokalisiert ist (Munro et al., 2006).

Jonson und Kollegen wandten RIP-Chip Analysen (RNA-Immunpräzipitations-Microarray) mit überexprimierten IGF2BP1 in HEK293 Zellen an, um Sequenzmotive in IGF2BP1 Ziel-mRNAs zu ermitteln. Durch Sequenzvergleiche angereicherter RNAs konnte folgendes IGF2BP1-Motiv identifiziert werden: 5'-C C Y H H C C-3' (Y = C, U und H = A, C, U); (Jonson et al., 2007). Im Jahre 2010 wurde mit dem PAR-CLIP (*Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*) eine neue Methode entwickelt, um RNA-Bindestellen von RBPs zu bestimmen. Als Resultat dieser Methode wurde ein RNA-Konsensus-Motiv für die drei IGF2BP Paralogen erhalten (Abb. 1.7); (Hafner et al., 2010). Dieses CAUH-Motiv (H=A, U, oder C) wurde in 75% der besten 1000 Sequenzcluster identifiziert. Dabei wurden in über 30% der Ziel-Transkripte benachbarte CAUH-Elemente festgestellt, die in einem Abstand von 3-5 Nukleotiden lokalisiert sind. Zudem wird von dieser Arbeitsgruppe postuliert, dass über 100.000 Sequenzcluster durch die IGF2BP Familie erkannt werden, davon sind 8.400 Protein kodierende Transkripte. Weitere Untersuchungen der identifizierten Sequenzcluster ergaben eine Präferenz der IGF2BPs für die codierende Region und die 3'-UTR der gebundenen mRNAs (Hafner et al., 2010).

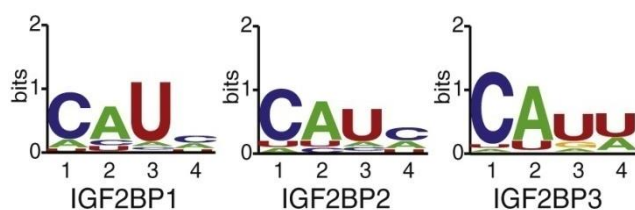


Abb. 1.7: Die RNA-Konsensus-Motive der IGF2BP Paralogen, generiert mittels PhyloGibbs-Analyse (übernommen aus Hafner et al., 2010).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass trotz zahlreich bekannter Ziel-mRNAs der IGF2BPs, noch relativ wenig über die jeweiligen Erkennungsmotive bekannt ist.

1.1.4 Die Lokalisation der ACTB mRNA

Die Lokalisation von mRNAs in verschiedenen subzellulären Kompartimenten erlaubt die räumliche Regulation der Genexpression, welche zur Etablierung und Aufrechterhaltung der Zellpolarität nötig ist (Martin und Ephrussi, 2009). Eine globale Analyse der mRNA Lokalisierung während der frühen Embryogenese von *Drosophila melanogaster* zeigte, dass 71% der analysierten, exprimierten Gene (2314) für subzellulär lokalisierte mRNAs kodieren (Lecuyer et al., 2007). Diese Studie lässt erahnen, welche bedeutende Rolle die mRNA Lokalisation auf die Organisation der Zellarchitektur hat. Die Lokalisation der ACTB mRNA zur Führungslamelle von embryonalen Fibroblasten im Huhn, diente dabei als ein Modellsystem zum Verständnis dieses Prozesses (Lawrence und Singer 1986). Studien zeigten, dass ZBP1 bereits während der Transkription mit der ACTB pre-mRNA assoziiert (Oleynikov und Singer, 2003). Nach dem Export des RNA-ZBP1 Komplexes ins Zytoplasma, erfolgt der Transport entlang der Aktin-Filamente und Mikrotubuli (Latham et al., 1994; Oleynikov und Singer, 2003). Dieser Transport wird ermöglicht, indem ZBP1 die Interaktion zu verschiedenen Motorproteinen vermittelt (Ma et al., 2011; Nalavadi et al., 2012; Song et al., 2015). Dabei wird die Translation der ACTB mRNA solange inhibiert bis der Komplex den Bestimmungsort, wie die Zellperipherie oder die Wachstumskronen primärer Neuronen, erreicht hat (Bassel et al., 1999; Farina et al., 2003; Hüttelmaier et al., 2005). Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus, der räumlichen Regulation der ACTB Translation, konnte im Jahre 2005 aufgeklärt werden. Dabei erfolgt eine Phosphorylierung von ZBP1 in der Linker-Region, welche die KH2-Domäne mit der KH3-Domäne verbindet (Y396), durch die Src Protein Kinase. Infolge dessen wird die Bindung zu ACTB und die damit einhergehende Translationsinhibierung aufgehoben (Hüttelmaier et al., 2005). Die räumlich begrenzte Translation von ACTB spielt damit eine entscheidende Rolle beim Neuriten-Wachstum sich entwickelnder Neuronen (Yao et al., 2006).

Da ZBP1 über die Assoziation mit der ACTB mRNA essentielle Entwicklungsprozesse des Nervensystems reguliert, ist es wichtig, den zugrunde liegenden Bindungsmechanismus zu verstehen. Für die Interaktion von ZBP1 mit dieser mRNA ist das eingangs erwähnte 54 Nukleotid lange *cis*-Element im 3'-UTR der ACTB mRNA entscheidend, welches auch als *zipcode* bezeichnet wird (Kislauskis et al., 1994). Durch nähere Untersuchungen der Bindestellen im *zipcode*, gepaart mit Strukturanalysen, wird postuliert, dass zwei

Erkennungselemente (5' und 3' *recognition element*) durch die KH3+4 Domäne gebunden werden, und der Abstand zwischen beiden Elementen für das „Ausloopen“ der RNA wichtig ist [(Abb. 1.5); (Chao et al., 2010; (Abb. 1.6); Patel et al., 2012)]. In einer kürzlich publizierten Studie wird postuliert, dass der Sekundärstruktur des ACTB *zipcode* Elementes, eine entscheidende Rolle für die Bindung von ZBP1 zukommt. Denn die Substitution bzw. Deletion von Nukleotiden im ACTB *zipcode* zeigte keinen Einfluss auf die Bindungsfähigkeit von ZBP1, solange die strukturelle Integrität der RNA gewährleistet blieb (Kim et al., 2015).

Bisher ist jedoch nicht vollständig geklärt, ob der ACTB *zipcode* von allen IGF2BP Paralogen gebunden wird. Dieser Frage sollte im Rahmen dieser Arbeit mittels Bindungsanalysen nachgegangen werden.

1.1.5 Die Stabilisierung der C-MYC mRNA

C-MYC (fortan MYC) wurde ursprünglich als das zelluläre Homolog zum retroviralen Onkogen v-MYC identifiziert (Duesberg et al., 1977; Sheiness et al., 1978; Bister und Jansen, 1986). Wie seine Familienmitglieder N-MYC und L-MYC aktiviert dieses Protein als Transkriptionsfaktor eine Vielzahl von Zielgenen (Levens, 2003) und nimmt damit Einfluss auf die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose. Um DNA zu binden und die Genexpression zu regulieren, dimerisiert MYC mit dem Protein MAX (*reviewed* (Conacci-Sorrell et al., 2014)). Schätzungen ergaben, dass 10% aller Protein-kodierenden Gene im Menschen in ihrer Expression durch MYC beeinflusst werden können (Levens, 2003). Des Weiteren werden MYC-Transkriptionsfaktoren in den meisten Krebserkrankungen überexprimiert und fördern die Tumorgenese, indem eine transkriptionelle Reprogrammierung induziert wird (Nesbit et al., 1999). Bereits im Jahre 1983 konnte mittels *in vitro* Studien mit primären, embryonalen Ratten-Fibroblasten gezeigt werden, dass MYC zusammen mit aktiviertem RAS die tumorigene Umwandlung normaler Zellen vermitteln kann (Land et al., 1983). Das onkogene Potential konnte später ebenfalls durch *in vivo* Studien mit Mäusen belegt werden (Morton und Sansom, 2013). Darüber hinaus fungiert MYC als positiver Effektor in Gewebe-Entzündungen, wie rheumatoider Arthritis (Pap et al., 2004). Unter diesem Aspekt ist es von enormer Bedeutung, die Regulation von MYC zu verstehen. Die Expression von MYC kann auf verschiedenen Ebenen kontrolliert werden. Eine Möglichkeit besteht darin, die mRNA zu stabilisieren (Herrick und Ross, 1994; Shiu et al., 1993; Bernstein et al., 1992).

Bereits im Jahre 1994 wurde die Interaktion zwischen der C-terminalen kodierenden Region (CRD) der humanen MYC mRNA und IGF2BP1/CRD-BP identifiziert (Prokipcak et al., 1994; Doyle et al., 1998). *In vitro* Experimente zeigten, dass durch diese Bindung der Abbau der MYC mRNA durch Endoribonukleasen verhindert wird (Lemm und Ross, 2002; Sparanese et al., 2007). Dabei wurde postuliert, dass die Translation von MYC aufgrund eines seltenen Kodon-Bereiches, in Abhängigkeit von tRNA- und Aminosäure-Verfügbarkeit, pausiert (Lemm und Ross, 2002). Damit entsteht eine Ribosomen-freie Region, welche endonukleolytischen Angriffen ausgesetzt sein kann. Bindet dagegen CRD-BP an die CRD von MYC, sind die Spaltstellen für Endonukleasen nicht zugänglich und die mRNA vor Abbau geschützt (Lemm und Ross, 2002). Für diese Hypothese sprechen mehrere Studien aus anderen Laboren. So wurde eine Überexpression von CRD-BP in kolorektalem Krebs nachgewiesen, welche mit einer moderaten Erhöhung der MYC mRNA Menge korreliert (Ross et al., 2001). Zudem konnte nach dem *knockdown* von CRD-BP in MCF-7 (Brustkrebs), ES-2 (Ovarkarzinom) und kolorektalen Zellen eine verringerte Expression der MYC mRNA nachgewiesen werden (Ioannidis et al., 2005; Kobel et al., 2007; Noubissi et al., 2006). Gegen diese Hypothese spricht allerdings, dass in transgenen Mäusen, welche CRD-BP im epithelialen Brustgewebe überexprimieren, keine erhöhte MYC mRNA Menge festgestellt werden konnte (Tessier et al., 2004). Überdies führte der *knockdown* von CRD-BP in K562 Zellen zu keiner veränderten MYC mRNA Menge (Liao et al., 2004).

1.1.6 Die Organisation von mRNA-assozierten Ribonukleoprotein-Komplexen (mRNPs)

Es wurde postuliert, dass das Zurückhalten der MYC mRNA in zytoplasmatischen Multiprotein-Komplexen eine weitere, wesentliche Schutzseinheit vor Abbau darstellt (Weidensdorfer et al., 2009). So konnte gezeigt werden, dass die Proteine hnRNPU, SYNCRIP, DHX9 und YBX1 im Komplex mit IGF2BP1 die MYC mRNA über die CRD stabilisieren (Weidensdorfer et al., 2009). Grundsätzlich bestehen solche RNPs (Ribonukleoprotein-Komplexe) aus einzelnen Transkripten, welche von einem sich ständig ändernden Protein-Repertoire gebunden werden und posttranskriptionelle Ereignisse der Genexpression vermitteln (*reviewed* (Hieronymus und Silver, 2004)). Im Jahre 2007 gelang es einer Arbeitsgruppe, IGF2BP1 enthaltene RNPs aus HEK293 Zellen näher zu charakterisieren. Die

Einleitung

100-300 nm großen mRNP-Partikel enthalten *exon junction complex*-Komponenten (UPF3B, ALY/REF, Y14, eIF4A3), heterogene nukleäre RNPs (HNRNPA1, A2/B1, D, L, Q, R, U), YBX1, NFAR2 und 3, Nukleolin, RNA Helikase A, CBP80, RPS6, PABPs (PABP1, 2 und 4) und ribosomale Proteine der 40S-Untereinheit. Dagegen fehlen den mRNP-Partikeln Translationsinitiations-Faktoren (eIF4E und G, eIF2 α) und Proteine der 60S-Untereinheit, was darauf schließen lässt, dass die enthaltenen mRNAs nicht translatiert sind. Zudem wurden von dieser Arbeitsgruppe etwa 300 verschiedene Transkripte identifiziert, welche von IGF2BP1-Partikeln gebunden werden (Jonson et al., 2007). Laut Schätzungen von Jonson und Kollegen, befinden sich jedoch nur 10-30 RNA Transkripte in einem mRNP. Dies lässt auf das Vorhandensein vieler heterogener IGF2BP1-Partikel in der Zelle schließen. Zudem kann die Zusammensetzung von IGF2BP1-Partikeln zelltypabhängig variieren. So konnten in differenzierten neuronalen P19 Zellen RNPs identifiziert werden, welche die Proteine HuD, IGF2BP1 und G3BP, sowie tau mRNA enthalten (Atlas et al., 2004).

Neben der Analyse IGF2BP1 enthaltener Komplexe wurden mRNPs des IGF2BP3 Paralogen untersucht. Dazu wurden von Jonson und Kollegen IGF2BP3 positive Tumorproben aus Lunge, Niere, Brust, Ovar und Rektum auf affizierte Transkripte untersucht. Dabei stellten sie eine Deregulation von Onkogenen wie HMGA2 fest, welche häufig von let-7 miRNA gerichtetem Abbau betroffen sind (Mayr et al., 2007). Da diesen mRNPs die Proteine AGO 1-4 sowie miRNAs fehlen, wird postuliert, dass in IGF2BP3-RNPs, die HMGA2 mRNA und andere let-7 Ziel-mRNAs vor miRNA-gerichtetem Abbau geschützt werden (Jonson et al., 2014). Dies scheint ein allgemeines Prinzip zu sein, da auch die BTRC mRNA (*beta-transducin repeat containing E3 ubiquitin protein ligase*) durch die Bindung von CRD-BP vor miR-183 vermitteltem Abbau geschützt wird (Noubissi et al., 2006; Elcheva et al., 2009). Dabei führt die Assoziation von CRD-BP mit Bereichen in der kodierenden Region der BTRC RNA dazu, dass die miR-183-abhängige Interaktion dieser RNA mit dem Protein AGO2 verhindert wird. Dadurch wird die BTRC mRNA stabilisiert, was schließlich in erhöhten BTRC-Proteinmengen resultiert (Elcheva et al., 2009).

1.2 Die funktionelle Rolle von IGF2BP2

IGF2BP2 wird im Vergleich zu seinen Paralogen IGF2BP1 und IGF2BP3 in verschiedenen adulten Geweben und Organen exprimiert (Yaniv et al., 2002; Yisraeli et al., 2005; Christiansen et al., 2009; Bell et al., 2013). Dabei ist bekannt, dass die IGF2BP2

Einleitung

Transkription durch HMGA2 (*high mobility group A2*) reguliert werden kann (Brants et al., 2004; Cleyne et al., 2007). Zudem werden IGF2BP2 und HMGA2 durch die let-7 miRNA Familie translationell reprimiert (Boyerinas et al., 2008; Mayr et al., 2007). Die Regulation von IGF2BP2 durch HMGA2 wurde zudem in Skelettmuskel-Myoblasten beschrieben, wo es seinerseits über die Bindung der MYC mRNA und dessen translationeller Kontrolle, die Zellproliferation und Myogenese gewährleistet (Li et al., 2012). Ebenfalls in diesem Zelltyp wurden die durch IGF2BP2 regulierten mRNAs MURF3 und LIMS2 identifiziert (Boudoukha et al., 2010). Dabei fungiert MURF3 als Mikrotubuli-Stabilisator während der Myogenese (Spencer et al., 2000) und LIMS2 als Modulator der fokalen Adhäsionskomplexe (Zhang et al., 2002). Zudem konnten in diesen Zellen die IGF2BP2 Proteinpartner MOV10, UPF1, HSPA2, 8, 9, HUR, HNRNPs, MATR3, DHX57, Nukleolin und YB1 gefunden werden (Boudoukha et al., 2010). Eine weitere IGF2BP2 Ziel-mRNA ist NRAS (*Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog*), welche in embryonalen Rhabdomyosarkom-Zellen (ERMS; Weichteilsarkom, welches aus undifferenzierten, mesenchymalen Zellen besteht) identifiziert wurde. Es wird postuliert, dass IGF2BP2 an den 3'-UTR der NRAS mRNA bindet und somit vor microRNA gerichtetem Abbau schützt. Dieser Regulationsmechanismus fördert schließlich die Produktion von NRAS-Protein, welches seinerseits Signalwege aktiviert, die maßgeblich am Fortschreiten dieser Krebserkrankung beteiligt sind (Li et al., 2013).

Genomweite Assoziationsstudien ergaben, dass SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), welche im zweiten Intron des IGF2BP2 Locus zu finden sind, mit einem erhöhten Typ 2 Diabetes (T2D) Risiko korrelieren (*reviewed* (Christiansen et al., 2009)). T2D ist eine komplexe Krankheit, welche gekennzeichnet ist durch eine reduzierte Insulinsensitivität sowie eine gestörte pankreatische Glukose-Antwort und Insulinsekretion. Die genannten Prozesse können zum einen durch Umweltfaktoren, wie körperliche Inaktivität oder Übergewicht und zum anderen durch genetische Faktoren beeinflusst werden (Kahn, 1994). Unter diesem Aspekt ist durchaus denkbar, dass IGF2BP2 Einfluss auf die Glukose Homöostase und Insulin Signalwege nimmt. Für diese Hypothese sprechen Studien zu P62, der Spleißvariante von IGF2BP2, welche eine verkürzte *Linker*-Region zwischen den Domänen KH1+2 und KH3+4 aufweist. Nach der Überexpression von P62 in der Leber transgener Mäuse wurde ein Fettleber-Phänotyp sowie eine gesteigerte Toleranz gegenüber Glukose beobachtet (Tybl et al., 2011).

Einen weiteren Hinweis lieferte eine Publikation aus dem Jahr 2011, in der aufgeklärt

Einleitung

wurde, dass IGF2BP2 durch mTOR (*mammalian target of rapamycin*) phosphoryliert wird (Dai et al., 2011). MTOR ist eine Protein Kinase, die in zwei unabhängig regulierten heterooligomeren Komplexen fungiert. Der Rapamycin-sensitive Komplex 1 (mTORC1), welcher die Polypeptide Raptor und mLst8 enthält, wird in seiner Aktivität durch Nährstoffe, Mitogene und Stress reguliert und steuert vorrangig Wachstumsprozesse (Wullschleger et al., 2006). Diese werden über die Stimulation der mRNA Translation realisiert (Ma und Blenis, 2009). Dai und Kollegen konnten zeigen, dass IGF2BP2 mit mTORC1 interagiert und an Serin-162 und Serin-164 phosphoryliert wird. Diese Phosphorylierung erleichtert die Assoziation von IGF2BP2 mit der 5'-UTR der IGF2 *leader* 3 mRNA und resultiert in einer gesteigerten IGF2 Proteinsynthese. Dabei erfolgt die Translationsinitiation über eine interne ribosomale Eintrittsstelle (IRES) und unabhängig von eIF4E und der 5'-Kappe (Dai et al., 2011). IGF2 spielt eine Schlüsselrolle in Wachstumsprozessen von Säugern, indem es metabolische und wachstumsfördernde Effekte vermittelt (F. C. Nielsen, 1992).

Des Weiteren wird postuliert, dass IGF2BP2 die Translation von mRNAs inhibiert, die für mitochondriale Proteine kodieren, wie zum Beispiel die UCP1 mRNA, und damit den Metabolismus reguliert (Dai et al., 2015). So zeigen Mäuse, die kein IGF2BP2 exprimieren (*Imp2*^{-/-}) erhöhte Mengen an UCP1, die in einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch des braunen Fettgewebes resultieren und die Tiere aufgrund des erhöhten Energieverbrauchs weniger empfänglich für Übergewicht machen.

Obwohl es zahlreiche Hinweise für eine Rolle von IGF2BP2 in der Regulation der Glukose Homöostase und Diabetes gibt, sind die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen nicht vollständig aufgeklärt.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Die IGF2 mRNA bindenden Proteine (IGF2BPs) umfassen eine Klasse von drei Proteinen, die eine bedeutende Rolle während der Embryonalentwicklung spielen. Während IGF2BP1 und IGF2BP3 in verschiedenen Krebsgeweben stark exprimiert werden, wird IGF2BP2 auch in nicht entarteten adulten Organen synthetisiert (Yaniv und Yisraeli, 2002; Yisraeli et al., 2005; Christiansen et al., 2009; Dai et al., 2011; Bell et al., 2013). Dabei erfolgt die Regulation zellulärer Prozesse, indem die IGF2BPs den Transport, die Translation und die Stabilität von Ziel-mRNAs modulieren. Zum Verständnis der Funktionsweise dieser Proteine ist es daher essentiell, die zu Grunde liegenden Bindungsmechanismen aufzuklären.

Im Rahmen dieser Dissertation sollte mittels Einführung von Punktmutationen im GXXG-Loop der KH-Domänen von ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3, vergleichende Bindungsanalysen zu den RNA-Substraten ACTB und MYC vorgenommen werden. Darüber hinaus sollte geprüft werden, inwieweit die KH-Domänen Einfluss auf die zytoplasmatische Lokalisation, Protein-Assoziation, Oligomerisierung und Rekrutierung der Proteine in *stress granules* (SGs) nehmen. Um zu untersuchen, ob die IGF2BPs verschiedene Bindungspräferenzen aufweisen und wie sich die RNA-Bindemotive im Detail zusammensetzen, sollte die systematische Evolution von Liganden durch exponentielle Anreicherung (SELEX) durchgeführt werden.

Überdies war von großem Interesse, Protein-Liganden von ZBP1 unter Anwendung massenspektrometrischer Analysen zu identifizieren und mittels Immunopräzipitation zu validieren. Diese Interaktionen sollten im Anschluss durch die Anwendung der Gradienten-Separation näher charakterisiert werden.

Schließlich sollte die postulierte metabolische Funktion von IGF2BP2 geprüft werden. Dazu sollte der Einfluss einer IGF2BP2-Überexpression sowohl im Zellsystem als auch im transgenen Mausmodell unter Verwendung metabolischer Untersuchungen erforscht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien, Enzyme, Größenstandards

Die genutzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders vermerkt, von den Firmen Sigma Aldrich, Roth und Merck bezogen. Enzyme, PCR-Master-Mixe und DNA-Größenstandards wurden bei den Firmen Promega und NEB gekauft. Transfektionsreagenzien, qRT-PCR-Master-Mixe und Protein-Marker wurden von Life Technologies bezogen. Zellkulturschalen wurden von TPP und Zellkulturlösungen (DMEM, HANKS, Trypsin, FBS und OptiMem) wurden von PAA Laboratories erhalten.

2.1.2 Bakterien

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	F- ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ M15 Δ (<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>recA1 endA1 hsdR17</i> (rk-, mk+) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1</i> λ -
BL21-Codon Plus-DE3 RIPL	F- <i>ompT hsdS</i> (rB- mB-) <i>dcm+</i> Tetr <i>gal</i> λ (DE3) <i>endA Hte</i> [<i>argU proL Camr</i>] [<i>argU ileY leuW Strep/Specr</i>]

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

Antibiotika: Kanamycin (30 μ g/ml), Ampicillin (100 μ g/ml), Chloramphenicol (40 μ g/ml)

2.1.3 Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien erfolgte in DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit 10% fetalem Kälberserum (FBS) und L-Alanyl-L-Glutamin (*GlutaMAX*, Life Technologies) bei 5% CO₂, 90% Luftfeuchte und 37°C. Die Zellen wurden mit HANKS-Puffer gewaschen und mittels Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer oder am Durchflusszytometer (2.2.1.4) bestimmt.

Zelllinie	Nummer	Gewebe	Publikation
HEK293	ACC-305	humane embryonale Nierenzellen	Graham et al., 1977b
U2OS	HTB-96	humane Osteosarcom-Zellen	Heldin et al., 1986
HUH7	CLS-300156	humanes Leberzellkarzinom	Nakabayashi et al., 1982

2.1.4 Antikörper

Tab. 2.1: Zusammenfassung der genutzten primären und sekundären Antikörper

primäre Antikörper	produziert in	Hersteller/ Firma
anti-ACTB	Maus	Sigma Aldrich
anti-AKT pan	Kaninchen	Cell signaling/ NEB
anti-eIF3A	Kaninchen	Bethyl
anti-eIF4A1-3	Kaninchen	Cell signaling/ NEB
anti-eIF4E	Kaninchen	Cell signaling/ NEB
anti-eIF4G	Kaninchen	Cell signaling/ NEB
anti-FLAG	Maus	Sigma Aldrich
anti-GFP	Maus	Roche
anti-HNRNPA2B1	Maus	Abcam
anti-HNRNPA3	Kaninchen	Abcam
anti-HNRNPE2	Maus	Abnova
anti-HNRNPM1-4	Maus	Santa Cruz
anti-HNRNPQ1-3	Maus	Sigma Aldrich
anti-HNRNPU	Maus	Sigma Aldrich
anti-HUR	Maus	Santa Cruz
anti-IGF2BP2 (6A12)	Maus	Auftragsimmunisierung (TU Braunschweig)
anti-IGF2BP2	Kaninchen	Mobitec
anti-IGF2BP3	Kaninchen	Mobitec
anti-LA	Maus	BD Transduction
anti-MATR3	Kaninchen	Bethyl
anti-MOV10	Kaninchen	Bethyl
anti-NCL	Maus	Santa Cruz
anti-PABPC1	Maus	Santa Cruz
anti-Phospho AKT S473	Kaninchen	Cell signaling/ NEB
anti-Phospho AKT T308	Kaninchen	Cell signaling/ NEB
anti-PTB	Maus	Auftragsimmunisierung (TU Braunschweig)
anti-PYM	Ratte	Zur Verfügung gestellt von Prof. Izaurrealde
anti-RHA	Kaninchen	Bethyl
anti-RO60	Maus	Santa Cruz
anti-RPL4	Maus	Sigma Aldrich
anti-RPS6	Maus	Cell signaling/ NEB
anti-TIA1	Ziege	Santa Cruz
anti-UPF1	Kaninchen	Zur Verfügung gestellt von Prof. Gehring
anti-YBX1	Maus	Santa Cruz
anti-TUBA	Maus	Sigma Aldrich
anti-ZBP1 (6A9)	Maus	Auftragsimmunisierung (TU Braunschweig)
sekundäre Antikörper	produziert in	Hersteller/ Firma
anti-IgG-Maus IRDye® 680	Esel	LI-COR Biosciences GmbH
anti-IgG-Kaninchen IRDye® 680	Esel	LI-COR Biosciences GmbH
anti-IgG-Maus IRDye® 800CW	Esel	LI-COR Biosciences GmbH
anti-IgG-Kaninchen IRDye®	Esel	LI-COR Biosciences GmbH
anti-IgG-Ratte IRDye® 800CW	Esel	LI-COR Biosciences GmbH
Cy™3-anti-Maus-IgG F(ab)2	Esel	Jackson ImmunoResearch
Cy™3-anti-Ziege-IgG F(ab)2	Esel	Jackson ImmunoResearch
dylight488™-anti-Maus-IgG	Esel	Jackson ImmunoResearch

2.1.5 Oligonukleotide

Oligonukleotide zur Klonierung und qRT-PCR wurden von MWG und Life Technologies bezogen. siRNAs wurden von MWG erhalten.

Tab. 2.2: Mutagenese-Oligonukleotide zur Herstellung der KH-Domänen-Mutanten

Nr.	Protein	KH	Mutation	sense-Primer	antisense-Primer
1	IGF2BP2	1	K211E	GTGCCATCATCGGAGAGGAG GGCTTGACC	GGTCAAGCCCTCTCTCCG ATGATGGCAC
2		2	K292E	GGTTGGAAGACTGATTGGAG AAGAAGGCAGAAATTTG	CAAATTTCTGCCTTCTCTC CAATCAGTCTTCCAACC
3		3	K445E, K446E	CGCCATCATCGGGGAGGAGG GGGCACACATC	GATGTGTGCCCCCTCTCC CCGATGATGGCG
4		4	K527E, G528E	CCGGGTGATTGGCGAAGAGG GCAAGACCGTGAACG	CGTTCACGGTCTTGCCCTC TTCGCCAATCACCCGG
5	IGF2BP3	1	K213E	GGAGCCATCATAGGAGAAGA AGGTGCCACC	GGTGGCACCTTCTTCTCCT ATGATGGCTCC
6		2	K294E	CTTTGTTGGACGTCTTATTGGT GAAGAAGGAAGAAATC	GATTTCTCCTTCTTACCA ATAAGACGTCCAACAAAG
7		3	K423E, Q424E	GCCATCATCGGCGAGGAGGG CCAGCACATC	GATGTGCTGGCCCTCTCG CCGATGATGGC
8		4	K505E, G506E	GCTGCTGGCAGAGTTATTGGA GAAG A AGGCAAACGGTG	CACCGTTTTGCCTTCTCTC CAATAACTCTGCCAGCAGC

Tab. 2.3: Oligonukleotide für qRT-PCR

Gen	sense (5' → 3')	antisense (5' → 3')
ACTB	AGAAAATCTGGCACCACACC	AGAGGCGTACAGGGATAGCA
MYC	AGCGACTCTGAGGAGGAAC	CGTAGTTGTGCTGATGTGTG
Y3	GGCTGGTCCGAGTGCAGTGG	AAAAGGCTAGTCAAGTGAAGCA
Y5	AGTTGGTCCGAGTGTTGTGG	AAAACAGCAAGCTAGTCAAGCGCG

Tab. 2.4: Oligonukleotide für *in vitro*-Transkription

Name	Sequenz (5' → 3')
234 hubactin stop T7 for	GTAATACGACTCACTATAGGGGCGGACTATGACTTAGTTGCG
235 huba 3UTR nt 100 rev	AAACAAAAAAACAAATAAAGCCATGCC
T7 CRD forw	TAATACGACTCACTATAGGGAACACACAACGTCTTGGAGCG
T7 CRD rev	TTACGCACAAGAGTTCCGTAGC

Tab. 2.5: SELEX-Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
N20	cTAATACGACTCACTATAGGGGAATTCC N20 GGAAGCTTCTCGAGACGCgg
N40	cTAATACGACTCACTATAGGGGAATTCC N40 GGAAGCTTCTCGAGACGCgg
Selex forw	cTAATACGACTCACTATAGGGGAATTCC
Selex rev	ccGCGTCTCGAGAAGCTTCC

Material und Methoden

Tab. 2.6: siRNAs

siRNA	Sequenz (5' → 3')
Kontrolle (si_K)	UUGUACUACACAAAAGUACUG
IGF2BP2 (1)	CCAUAAGAACAUCACUAA
IGF2BP2 (2)	GGGTAGATATCCATAGAAA

2.1.6 Vektoren und Konstrukte

pcDNA3.1 (+)-Flag (zeo) - Life Technologies
 pEGFP-C2 - Clontech
 pGEX6p1 - GE Healthcare

pGEMTeasy - Promega
 pLVX-puro - Clontech

Tab. 2.7: Konstrukte

Konstruktnamen	Vektor	Insertion über	Quelle/ Mutagenese-Oligonukleotid (Tab. 2.2)
GFP-ggZBP1	pEGFP-C2	EcoRI, Sall	Farina et al., 2003
Flag-ggZBP1	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	Farina et al., 2003
GST-ZBP1	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	Farina et al., 2003
ggZBP1K213E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	M. Köhn, Diplomarbeit, 2008
ggZBP1K294E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	M. Köhn, Diplomarbeit, 2008
ggZBP1K422E, K423E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	M. Köhn, Diplomarbeit, 2008
ggZBP1K504E, G505E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	M. Köhn
ggZBP1K213E, K294E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	M. Köhn, Diplomarbeit, 2008
ggZBP1K422E, K423E, K504E, G505E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	M. Köhn
ggZBP1K213E, K294E, K422E, K423E, K504E, G505E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	M. Köhn
GST-ZBP1K213E, K294E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-ZBP1 subkloniert
GST-ZBP1K422E, K423E, K504E, G505E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-ZBP1 subkloniert
GST-ZBP1K213E, K294E, K422E, K423E, K504E, G505E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-ZBP1 subkloniert
GFP-ggZBP1K213E, K294E, K422E, K423E, K504E, G505E	pEGFP-C2	EcoRI, Sall	M. Köhn
GFP-IGF2BP2	pEGFP-C2	EcoRI, Sall	aus Flag-IGF2BP2 subkloniert
Flag-IGF2BP2	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	S. Hüttelmaier
GST-IGF2BP2	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP2 subkloniert
IGF2BP2K211E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	1
IGF2BP2K292E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	2
IGF2BP2K445E, K446E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	3
IGF2BP2K527E, G528E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	4
IGF2BP2K211E, K292E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	1, 2
IGF2BP2K445E, K446E, K527E, G528E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	3, 4
IGF2BP2K211E, K292E, K445E, K446E, K527E, G528E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	1, 2, 3, 4
GST-IGF2BP2K211E, K292E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP2 subkloniert
GST-IGF2BP2K445E, K446E, K527E, G528E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP2 subkloniert
GST-IGF2BP2K211E, K292E, K445E, K446E, K527E, G528E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP2 subkloniert
GFP-IGF2BP2K211E, K292E, K445E, K446E, K527E, G528E	pEGFP-C2	EcoRI, Sall	aus Flag-IGF2BP2 subkloniert
GFP-IGF2BP3	pEGFP-C2	EcoRI, Sall	aus Flag-IGF2BP3 subkloniert

Material und Methoden

Flag-IGF2BP3	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	S. Hüttelmaier
GST-IGF2BP3	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP3 subkloniert
IGF2BP3K213E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	5
IGF2BP3K294E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	6
IGF2BP3K423E, Q424E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	7
IGF2BP3K505E, G506E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	8
IGF2BP3K213E, K294E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	5, 6
IGF2BP3K423E, Q424E, K505E, G506E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	7, 8
IGF2BP3K213E, K294E, K423E, Q424E, K505E, G506E	pcDNA 3.1	EcoRI, XhoI	5, 6, 7, 8
GST-IGF2BP3K213E, K294E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP3 subkloniert
GST-IGF2BP3K423E, Q424E, K505E, G506E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP3 subkloniert
GST-IGF2BP3K213E, K294E, K423E, Q424E, K505E, G506E	pGEX6p1	EcoRI, XhoI	aus Flag-IGF2BP3 subkloniert
GFP-IGF2BP3K213E, K294E, K423E, Q424E, K505E, G506E	pEGFP-C2	EcoRI, Sall	aus Flag-IGF2BP3 subkloniert
GFP-IGF2BP2	pLVX-puro	EcoRI, XhoI	M. Lederer

2.1.7 Systeme

<i>D_C-Protein-Assay Kit</i>	Biorad
<i>GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit</i>	Sigma Aldrich
<i>Plasmid Midi Kit (100)</i>	Qiagen
<i>Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System</i>	Promega
<i>Glucose (GO) Assay Kit</i>	Sigma Aldrich
<i>Glycogen Assay Kit</i>	Sigma Aldrich
<i>Colloidal Blue Staining Kit</i>	Life Technologies
<i>μMACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kit (GFP tagged)</i>	Miltenyi Biotech
<i>Silver Quest™ Staining Kit</i>	Life Technologies

2.1.8 Sonstiges

Agarose	peqLab
Hefeextrakt	AppChem
<i>Prolong-Antifade</i>	Life Technologies
Blotmembran	Amersham

2.1.9 Standard-Puffer

PBS	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4
PBS-T	137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na ₂ HPO ₄ ; 2 mM KH ₂ PO ₄ ; pH 7,4; 0,1% Tween-20
TAE	40 mM Tris; 20 mM Eisessig; 1 mM EDTA; pH 8,4
TBE (5×)	450 mM Tris; 450 mM Borsäure; 10 mM EDTA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Techniken

2.2.1.1 Transfektion

Zur Transfektion von Zellen mit Plasmiden wurde *Lipofectamine 2000* nach den Angaben des Herstellers genutzt. Die Transfektion von siRNAs erfolgte mittels *RNAiMax*. Dazu wurden die Zellen 15 Stunden vor der Transfektion ausgesät (siehe Tabelle 2.8). Die verwendeten Transfektionsansätze sind in Tabelle 2.8 zusammengefasst. Zehn Stunden nach der Transfektion wurde das Medium gewechselt.

Tab. 2.8: Transfektionsansätze

Art des Versuches	Platten- größe	Zellzahl	siRNA	Plasmid	<i>Lipofecta- mine</i>	<i>RNAiMax</i>	Zeit
Transiente Überexpression für Immunopräzipitation	6 well	4×10 ⁵		2 µg	5 µl		48 h
Transiente Überexpression für Immunofluoreszenz	24 well	1×10 ⁴		0,5 µg	1 µL		24 h
<i>knockdown</i>	6 well	4×10 ⁵	200 pmol			6 µl	72 h

2.2.1.2 Lentivirale Transduktion

Die stabile Überexpression von GFP-IGF2BP2 und der GFP-Kontrolle erfolgte mittels lentiviraler Transduktion. Dazu wurde zunächst Virus produziert, indem HEK293 Zellen (2×10⁶ Zellen/ 10 cm Schale) folgendermaßen transfiziert wurden:

Transfektionsansatz:

2x HEPES-buffered saline (HBS)

10 µg Transferplasmid (pLVX-puro GFP-IGF2BP2)
 30 µg Tet Repressor
 6 µg pMD2G (zur Verpackung des Virus)
 15 µg psPAX2
 auf 0,5 ml mit ddH₂O auffüllen

280 mM NaCl
 10 mM KCl
 1,5 mM Na₂HPO₄
 12 mM Glukose
 50 mM HEPES pH 7,05

Die DNA wurde mittels Kalzium-Phosphat-Präzipitation in die Zellen geschleust. Dazu wurde zum Transfektionsansatz 0,5 ml 2×HBS zugegeben, gemischt und 50 µl 2,5 M CaCl₂ beigemischt. Nach einer Inkubationszeit von 25 Minuten wurde der Ansatz tropfenweise auf die Zellen gegeben. Am zweiten und dritten Tag wurde das Virus enthaltende Medium

gesammelt, vereint und gefiltert. Zur Virustransduktion wurden U2OS Zellen ($1 \times 10^5/6$ well) ausgesät (1 ml) und 1 ml Virusüberstand für 3 Tage zugegeben. Im Anschluss wurden die Zellen fünfmal mit HANKS gewaschen und auf eine 6 cm Schale überführt. Um positive Zellen zu selektieren wurde Puromycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, Sigma Aldrich) für 3 Tage dem Zellkulturmedium zugeführt. Die stabil exprimierende Zellpopulation wurde dann in Medium kultiviert, welches 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Puromycin enthielt.

2.2.1.3 Die Induktion von zellulärem Stress

Um in U2OS Zellen oxidativen Stress zu erzeugen, wurde dem Zellkulturmedium für eine Stunde Natriumarsenat (2,5 mM Endkonzentration) zugeführt. Die Bildung von *stress granules* (SGs) wurde im Anschluss mittels Immunofluoreszenzanalyse (2.2.4.1) untersucht.

2.2.1.4 Bestimmung der Zellzahl mittels Durchflusszytometrie

Diese Methode wurde genutzt um die Zahl der in Lösung befindlichen Zellen zu bestimmen. Dazu wurden die zu untersuchenden Zellen durch tryptischen Verdau von der Zellkulturschale gelöst, mit HANKS gewaschen und im MACSQuant Durchflusszytometer (Miltenyi) vermessen.

2.2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.2.1 Ortsgerichtete Mutagenese

Zur Einführung von Punktmutationen innerhalb der KH-Domänen der IGF2BP Proteine wurden Mutagenese-Oligonukleotide generiert (Tab.2.2), welche keine perfekte Basenpaarung mit der Ziel-DNA aufweisen, aber dennoch an diese binden können. Mittels Pfu-Polymerase wurde das Mutagenese-Oligonukleotid in die neu synthetisierte DNA integriert.

Mutagenese-PCR:

5 μl Pfu-Puffer (10 \times)
1 μl Plasmid-DNA (100 ng)
0,5 μl *sense* Oligonukleotid (100 μM)
0,5 μl *antisense* Oligonukleotid (100 μM)
1 μl dNTPs (10 mM)
1 μl Pfu-Polymerase (2,5 U)
41 μl ddH₂O

PCR-Programm:

95°C, 30 s
95°C, 30 s
55°C, 60 s
68°C, 1 min/kb Plasmid
4°C

} 18 Zyklen

Im Anschluss erfolgte der Verdau der methylierten Ausgangs-DNA mit 1 μ l DpnI (2 U) für 1 h bei 37°C. Von diesem Ansatz wurden schließlich 15 μ l für die Transformation in chemokompetente Bakterien eingesetzt. Die Mutationen wurden mittels Sequenzierung von der Firma *Seqlab* (Göttingen) überprüft.

2.2.2.2 Klonierung

Für die Durchführung der verschiedenen funktionellen Analysen der IGF2BP-KH-Mutanten war die Klonierung in verschiedene Vektoren (2.1.6) erforderlich. Dazu wurde das entsprechende mutagenisierte Konstrukt aus dem pcDNA3.1 (+)-Flag (zeo) Vektor über EcoRI, XhoI-Restriktionsverdau in den Expressionsvektor pGEX6p1 oder über EcoRI, Sall in den pEGFP-C2 Vektor ligiert.

Zur Analyse der SELEX-Aptamere wurde die DNA in den pGEMTeasy Vektor inseriert und im Anschluss von der Firma *Seqlab* (Göttingen) sequenziert.

2.2.2.3 Isolierung von DNA

Zur Isolierung geringer DNA Mengen wurde der *GenElute™ HP Plasmid Miniprep Kit* verwendet. Größere Plasmid-DNA Mengen wurden mittels *Plasmid Midi Kit (100)* erhalten. Für die DNA-Präparation wurden die Angaben des Herstellers befolgt.

2.2.2.4 Präparation von RNA

Die Präparation der Gesamt-RNA aus Zellen oder aus Gradienten (2.2.3.6) erfolgte mittels Trizol und anschließender Extraktion durch Chloroform. Dazu wurden Zellen mit 1 ml Trizol von der 6 *well*-Platte geerntet und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nachdem die Zelltrümmer abzentrifugiert wurden (5 min, 13.000 rpm), erfolgte die RNA-Extraktion durch Zugabe von 200 μ l Chloroform. Zur RNA-Präparation aus Gradienten wurde das 4-fache Volumen an Trizol und dann 1/5 des Volumens an Chloroform zugegeben. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die darin enthaltene RNA durch Zugabe von Isopropanol (1:1, v/v) für 1 h bei Raumtemperatur präzipitiert. Die RNA wurde dann durch Zentrifugation pelletiert (10 min, 13.000 rpm) und zweimal mit 80% Ethanol gewaschen. Schließlich wurde das RNA-Pellet in RNase freiem Wasser gelöst und am Spektrometer (*infinite M200 pro spectrometer, TECAN*) auf Qualität und Konzentration untersucht.

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

2.2.2.5 Reverse Transkription

Für die Herstellung von cDNA aus Gesamt-RNA wurden zunächst 2 µg RNA zusammen mit 1 µl *random* Primer (50 ng/µl) für 5 min bei 65°C denaturiert und für weitere 5 min auf Eis gehalten, damit sich die Primer anlagern können. Im Anschluss wurde der RT-Ansatz zugegeben und 2 h bei 42°C inkubiert, gefolgt von der Inaktivierung der reversen Transkriptase für 15 min.

RT-Ansatz: 4 µl 5x RT-Puffer; 1 µl dNTPs (10 mM); 0,25 µl Rnasin; 0,5 µl M-MLV (reverse Transkriptase, 50 U)

2.2.2.6 Quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)

Zur Bestimmung relativer RNA-Mengen wurde die quantitative RT-PCR angewendet, die an einem *7900 HT Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) im *384 well*-Format durchgeführt wurde. Diese Methode basiert auf der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und ist an einen Fluoreszenz emittierenden Prozess gekoppelt. Dabei interkaliert der Farbstoff SYBR Green I in die doppelsträngige, neu synthetisierte DNA, wodurch sich dessen Fluoreszenzeigenschaften ändern. Dies äußert sich in der Steigerung der Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Konzentration an PCR-Produkt, was die Detektion und Quantifizierung des PCR-Produktes während der Reaktion ermöglicht. Aus dem Anstieg der Fluoreszenzintensität kann der C_t -Wert (*Cycle threshold*) bestimmt werden. Die während dieses Prozesses aufgezeichnete Schmelzkurve dient als Qualitätskontrolle, um sicher zu stellen, dass nur ein spezifisches Produkt synthetisiert wurde. Die verwendeten Primer (qPrimerDepot) wurden so generiert, dass sich diese über Exon-Exon Grenzen erstrecken, um sicher zu stellen, dass spezifisch cDNA detektiert wird.

Ansatz:

5 µl PCR Mix (2×)
0,2 µl SYBR Green I
0,02 µl Primer (100 µM)
5 µl cDNA

PCR-Programm:

95°C, 3 min
95°C, 30 s
60°C, 30 s
72°C, 30 s

} 40 Zyklen

Zur Bestimmung der RNA-Menge in den einzelnen Gradientenfractionen wurde die ΔC_t -Methode genutzt ($\Delta C_t = 2^{-(\text{Fraktion X} - \text{Fraktion 1})}$; Livak und Schmittgen, 2001).

2.2.2.7 *In vitro* Transkription

Für die Herstellung Atto 680 markierter RNA (Köhn et al., 2010) wurde folgender Ansatz pipettiert:

20 μ l *Transcription Optimized 5x Puffer* (Promega)
10 μ l DTT (Promega)
1 μ l RNasin
je 1 μ l rNTPs (rATP, rCTP, rGTP; finale Konzentration: je 1 mM; Promega)
0,2 μ l rUTP; 1,5 μ l Aminoallyl-UTP-Atto 680 (finale Konzentration: 15 μ M; Jena Bioscience)
1 μ g DNA
2 μ l T7 RNA Polymerase (Promega)

auf 100 μ l mit DEPC H₂O auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde zunächst 3 h bei 37°C inkubiert. Die Qualität der synthetisierten RNA wurde anschließend mittels Auftrennung im denaturierenden Harnstoffgel überprüft. Nach der erfolgten Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die Konzentration der RNA spektrometrisch, bei 260 nm, bestimmt.

Harnstoffgel: 14,4 g Harnstoff
8,3 ml H₂O
4,5 ml Acrylamid
3 ml TBE (5 \times)
150 μ l APS
15 μ l TEMED

Probenpuffer (3 \times):
300 μ l TBE (5 \times)
180 mg Saccharose
150 μ l Bromphenolblau (1%)
630 mg Harnstoff

2.2.2.8 SDS-PAGE und Western Blot

Die Analyse der Qualität und Abundanz von rekombinanten Proteinen sowie von Proteinen aus Zelllysaten erfolgte mittels Western Blot. Für letztere wurden zunächst Proteinextrakte aus Zellen hergestellt. Dazu wurden die Zellen je nach Versuch im entsprechenden Puffer resuspendiert (Tab. 2.9) und 10 min auf Eis inkubiert. Die verbleibenden Zelltrümmer wurden 10 min bei 13.000 rpm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Im Anschluss wurde die Proteinkonzentration, mittels *DC Protein Assay*, bestimmt. Das SDS-Polyacrylamidgel wurde

Material und Methoden

mit 20 µg Proteinprobe, welche zuvor mit 5×Probenauftragspuffer versetzt wurde, beladen. Zur elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden entweder selbst gegossene 10%ige SDS-Gele oder NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gele (Life Technologies; mit *NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer*) verwendet. Dann erfolgte der Protein-Transfer auf eine Nitrozellulose Membran über das „wet-Blot“ Verfahren mit NuPAGE Blot-Puffer. Der Transfer wurde anhand einer Färbung der Membran mit Ponceau S-Lösung überprüft. Danach wurde die Membran mit 5% (w/v) Mager-Milch in PBS-T 30 min geblockt, um unspezifische Bindungen zu minimieren. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper (Tab. 2.1) in der 5%igen Milchlösung unter leichtem Schwenken für 2 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS-T erfolgte die Inkubation mit dem sekundären IRDye-markierten Antikörper in 5%iger Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur. Nach mehrmaligem Waschen erfolgte die Detektion der Proteinbanden mittels *Odyssey Infrared Imaging System* (LI-COR Biosciences) bei 680 nm bzw. 800 nm. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe der *Odyssey software* durchgeführt.

Tab. 2.9: Puffer zur Herstellung von Proteinextrakten.

Analyse von	Puffer	Zusammensetzung
Gradienten	Gradienten-Puffer	10 mM Hepes; 150 mM KCl; 5 mM MgCl ₂ ; 0,5% NP-40; pH7,4; 1:200 <i>protease inhibitor cocktail</i> (Sigma Aldrich)
Phosphorylierten Proteinen	Phospho-Puffer	25 mM Tris; 150 mM NaCl; 2 mM EDTA; 1% NP-40; pH 7,6; 1:200 <i>protease inhibitor cocktail</i> (Sigma Aldrich), Phosphatase Inhibitor Cocktail 2, 3 (Sigma Aldrich)
Immunopräzipitationen	RIPA	50 mM Tris (pH 7,5); 150 mM NaCl; 1 mM EDTA; 1 mM EGTA; 1% NP-40; 1% C ₂₄ H ₃₉ NaO ₄ ; 2,5 mM Na ₄ P ₂ O ₇ ; 1 mM β-Glycerophosphat; 1 mM Na ₃ VO ₄

Tab. 2.10: Puffer und Lösungen für SDS-Gele und Western Blots.

5×Probenauftragspuffer	250 mM Tris/HCl, pH 6,8; 10 mM EDTA; 2% SDS; 15% Glycerin; 0,005 % Bromphenolblau; 5% β-Mercaptoethanol
Trenngel-Puffer	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% SDS
Sammelgel-Puffer	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4% SDS
Trenngel	12,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid; 7,5 ml Trenngel-Puffer; 9,9 ml bidest. Wasser; 10 µl TEMED; 100 µl APS (10%)
Sammelgel	1,3 ml Acrylamid/Bisacrylamid; 2,5 ml Sammelgel-Puffer; 6,2 ml bidest. Wasser; 10 µl TEMED; 200 µl APS (10%)
5×Elektrophoresepuffer	25 mM Tris; 250 mM Glycin; 0,1% SDS
Ponceau S-Lösung	0,1% Ponceau S (w/v); 5% Essigsäure
NuPAGE Blot-Puffer	50 mM Tris pH 8,5; 40 mM Glycin; 20% Methanol; 0,04% SDS

2.2.3 Biochemische Methoden

2.2.3.1 Co-Immunopräzipitation

Bei dieser Methode können Proteine spezifisch über eine mit Antikörper gekoppelte Matrix (Protein G Agarose; Thermo Scientific) aus dem Zelllysate immobilisiert werden. Mögliche Interaktionspartner des Proteins können dabei kopräzipitiert werden. Um zu testen, ob Interaktionen über die gemeinsam gebundene RNA vermittelt werden, wurde das Zelllysate (Tab.2.9) mit Ribonuklease A (RNase A, Roth) nach Herstellerangaben behandelt. Vom Zelllysate wurden zunächst 50 µl als Input abgenommen und mit den verbleibenden 450 µl erfolgte die Immunopräzipitation, indem das Zelllysate mit 50 µl *Flag-Agarose-Beads*-Lösung (Sigma Aldrich, 3 × mit RIPA gewaschen) versetzt und 1,5 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert wurde. Im Anschluss wurden die *beads* 15 s bei 13.000 rpm zentrifugiert und dreimal mit 500 µl RIPA gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte in 50 µl 1× NuPAGE-Puffer, indem die Probe 5 min bei 95°C inkubiert wurde. Zur Abtrennung der Proteinlösung von den *beads* wurden spezielle Zentrifugenröhrchen verwendet (Pierce; 0,8 ml *centrifuge columns*). Von der Proteinlösung wurden 20 µl auf eine SDS-PAGE geladen und mittels Western Blot analysiert (2.2.2.8), oder das SDS-Gel wurde einer Silberfärbung unterzogen (Life Technologies), bei der die Angaben des Herstellers befolgt wurden.

Für Co-Immunopräzipitationen aus Gradienten wurden Fraktionen des Gradienten vereint (siehe 3.3.3), 100 µl als Input abgenommen und die verbleibenden 3,5 ml mit 90 µl Protein G Agarose-Lösung (3 × mit Gradientenpuffer gewaschen) versetzt. Zur Immunopräzipitation von endogenem IGF2BP1 wurde spezifischer Antikörper gegen ZBP1 (6A9) zugesetzt, und um sowohl endogenes als auch Flag-IGF2BP1 zu präzipitieren, wurde eine Mischung aus Flag- und ZBP1-Antikörper verwendet (1 µl Antikörper/1 ml Proteinlösung). Aufgrund der Viskosität der Gradientenlösung, bedingt durch die Saccharose, erfolgte die Inkubation 1 h bei Raumtemperatur. Zur Elution präzipitierter Proteine wurden die *beads* nach dreimaligem Waschen mit 75 µl Gradientenpuffer und 1% SDS versetzt und 5 min bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µl 4×NuPAGE (Life Technologies) wurde die Probe 5 min bei 95°C inkubiert. Im Anschluss wurden 30 µl von den Immunopräzipitationsproben und 20 µl von den Inputproben auf die SDS-PAGE geladen und mittels Western Blot untersucht.

Für Co-Immunopräzipitationen von Proteinen, welche im Anschluss massenspektro-

Material und Methoden

metrisch analysiert werden sollten, wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Für die Immunopräzipitation von Flag-ZBP1 aus HEK293-Zelllysat wurden *Flag-Agarose-Beads* verwendet. Dazu wurden die Zellen in IP-Puffer lysiert, mit *beads* versetzt und 2 h bei 4°C inkubiert. Danach wurden die *beads* 5-mal mit TBS-Puffer gewaschen. Um eine schonende Elution zu gewährleisten und damit die Kontamination mit leichten und schweren Antikörper-Ketten zu vermeiden, erfolgte die Elution mittels Zugabe von Flag-Peptid in TBS-Puffer (600 ng/µl, Sigma Aldrich).

Für die Immunopräzipitation von GFP-ZBP1 aus U2OS-Zelllysat wurde der *µMACS™ Epitope Tag Protein Isolation Kit* verwendet. Dazu wurden die Zellen in IP-Puffer lysiert, mit *Micro beads* versetzt und 30 min bei 4°C inkubiert. Das Lysat wurde im Anschluss auf eine, sich im magnetischen Feld befindliche Säule überführt. Nach stringentem Waschen (4-mal mit IP-Puffer und einmal mit Tris-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH7,5)), wurden die Proteine mit dem im Kit enthaltenen Puffer eluiert.

Puffer	Zusammensetzung
IP-Puffer	20 mM Tris, pH7,5; 150 mM NaCl; 1,5 mM MgCl ₂ ; 8,7 % Glycerol; 0,05 % NP-40
TBS	10 mM Tris; 150 mM NaCl; pH 7,4

2.2.3.2 *m⁷GTP-Cap-Sepharose Pulldown*

Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass mit einer 7-Methyl-Guanosin-5'-Triphosphat Sepharose-Matrix, Proteine präzipitiert werden können, welche an die 5'Kappen-Struktur der mRNA binden und somit die Translation initiieren. Dazu wurden HEK293 Zellen (2 konfluente 10 cm Schalen) zunächst in 1 ml IP-Puffer (2.2.3.1) lysiert, auf 2 Eppendorfgefäße verteilt, mit jeweils 100 µl 7-Methyl GTP-Sepharose™ 4B (GE Healthcare) oder Sepharose 4B (Sigma Aldrich) versetzt und für 50 min bei 4°C inkubiert. Nach zweimaligem Waschen der *beads* mit IP-Puffer, erfolgte die Elution der Proteine durch Zugabe von 100 µl Probenauftragspuffer und Inkubation bei 64°C. Zur Analyse *Cap-Sepharose* assoziierter Proteine wurden 25 µl von der Elutionsprobe in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot untersucht.

2.2.3.3 *Expression und Reinigung von rekombinanten Proteinen*

Um rekombinante Proteine herzustellen, wurden zunächst RIPL-Zellen (siehe 2.1.2), in die zuvor das entsprechende Expressionsplasmid (pGEX6p1, Tab. 2.7) transformiert wurde, in einer Vorkultur (100 ml LB) schüttelnd herangezogen (über Nacht bei 37°C). Im

Material und Methoden

Anschluss wurden 2 l LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft (1:50, v/v), inkubiert und bei einer optischen Dichte (OD) von 0,6 wurden die Bakterien abzentrifugiert und in 1 l Minimalmedium überführt. Die Expression des gewünschten Proteins wurde mit 1 mM IPTG induziert und die Bakterien über Nacht bei 18°C wachsen gelassen. Die Ernte der Bakterien erfolgte durch Zentrifugation bei 4°C und 7500 rpm für 10 min. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Bakterienpellets wurden in Waschpuffer 1 resuspendiert, zentrifugiert und in 20 ml Lysispuffer aufgenommen. Um die Bakterien aufzuschließen wurden 80 ml Lysispuffer, welcher zuvor mit 0,3 g Lysozym versetzt wurde, zugegeben, 15 Minuten inkubiert und die Suspension 2-3-mal für 5 min sonifiziert (Sonoplus, Bandelin Electronic). Nachdem die Zelltrümmer abzentrifugiert wurden (bei 20.000 rpm, 25 min), erfolgte die Inkubation der im Überstand befindlichen GST-fusionierten Proteine mit *Glutathion SepharoseTM 4 Fast Flow* (GE-Healthcare) für 4 Stunden unter konstanter Bewegung. Danach wurden die *beads* auf eine PD10-Säule (GE-Healthcare) überführt, mehrmals mit Lysispuffer und PP-Puffer gewaschen, und über Nacht mit *PreScission* Protease inkubiert, welche das GST-Epitop vom Protein abspaltet. Um die *beads* von den Proteinen zu trennen wurde die Lösung auf eine PD10-Säule überführt und mit Waschpuffer 2 gespült. Die im Durchfluss enthaltenen Proteine wurden dann mittels Affinitäts- bzw. Anionenaustausch-Chromatographie weiter aufgereinigt. Dazu wurde ein ÄKTA FPLC-System genutzt und der Durchfluss zunächst auf eine *HiTrap Heparin HP* bzw. *HiTrap DEAE FF-Säule* (5 ml, GE-Healthcare) geladen. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen wurde mit 4 Säulen-Volumen Puffer A gewaschen. Die gewünschten Proteine wurden dann mittels Anwendung eines linearen Salz-Gradienten (Puffer B) von der Säule eluiert. Um eine Konzentrierung herbeizuführen, wurde die Proteinlösung in einen Dialyseschlauch gegeben und in eine PEG-Lösung überführt. Danach erfolgte die Umpufferung der Proteinlösung indem der Dialyseschlauch über Nacht in Bindungspuffer inkubiert wurde. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe des *D_c-Protein-Assay Kits*, welcher an die Proteinbestimmung nach Lowry angelehnt ist (Lowry et al., 1951). Nach jedem Reinigungsschritt wurde eine Protein-Probe entnommen und mittels SDS-PAGE und *Coomassie-Brillantblau*-Färbung analysiert. Die Proteine wurden in Bindungspuffer mit 15% Glycerol bei -80°C gelagert.

Tab. 2.11: Medien, Puffer und Lösungen zur Expression und Reinigung von Proteinen.

Medien, Puffer und Lösungen	Zusammensetzung
Minimalmedium	4 g Casein Hydrolysat in 889 ml H ₂ O (autoklaviert); 100 ml M9 (75 g/l Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O; 30 g/l KH ₂ PO ₄ ; 5 g/l NaCl; 10 g/l NH ₄ Cl); 10 ml 20% Glukose; 1 ml 1 M MgSO ₄ ; 300 µl 1 M CaCl ₂
Waschpuffer 1	10 mM PBS; 10 mM EDTA
Lysispuffer	10 mM PBS; 850 mM NaCl; 10 mM EDTA; 10 mM EGTA; 1% Triton X 100; 1:200 (v/v) <i>protease inhibitor cocktail</i> (Sigma Aldrich)
<i>PreScission</i> Protease-Puffer (PP-Puffer)	50 mM Tris, pH 8; 300 mM NaCl; 1 mM EDTA
Waschpuffer 2	50 mM NaPO ₄ , pH 7; 100 mM KCl; 200 mM NaCl; 1 mM DTT
Puffer A-Heparin	50 mM NaPO ₄ , pH 7; 100 mM KCl; 1 mM DTT
Puffer B-Heparin	50 mM NaPO ₄ , pH7; 1 M KCl; 1 mM DTT
Puffer A-DEAE	20 mM Tris, pH 8; 50 mM NaCl; 1 mM DTT
Puffer B-DEAE	20 mM Tris, pH 8; 1 M NaCl; 1 mM DTT
PEG-Lösung	10 mM PBS; 10% Glycerol; 0,5 M NaCl; 20% PEG
Bindungspuffer	200 mM C ₂ H ₃ KO ₂ ; 50 mM Tris-Acetat; 2 mM Mg(CH ₃ COO) ₂ ; pH 7,6
<i>Coomassie-Brillantblau</i> -Lösung	10% Essigsäure; 50% Methanol; 0,1% Coomassie-Brillant-Blau R-250
Entfärbelösung	10% Essigsäure; 30% Methanol

2.2.3.4 Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)

Um Protein-RNA-Interaktionen untersuchen zu können, wurde die EMSA-Methode angewendet, bei der es in Abhängigkeit von der Größe des Protein-RNA-Komplexes zu einer Laufweitenverschiebung während der nativen Gelelektrophorese kommt. Dazu wurde zunächst das zu analysierende Protein zusammen mit Atto 680 markierter RNA in Bindungspuffer (Tab. 2.11) für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Analyse der Komplex-Stabilität (3.1.3) wurden die gebildeten Komplexe aus ZBP1 oder ZBP1-KH1+2 Mutante (300 nM) und Atto 680 markierter ACTB *zipcode* RNA (100 nM) anschließend 1:6 (v/v) mit Bindungspuffer, welcher zuvor mit 10×Ladepuffer versetzt wurde, verdünnt. Direkt nach der Verdünnung bzw. 12, 20, 40, 70 und 90 min nach der Verdünnung wurde 1/12 von diesem Ansatz entnommen und auf ein natives 8% TBE-Gel geladen, während die Gelelektrophorese lief. Zur Untersuchung der Komplexbildung zwischen ZBP1 oder ZBP1-KH1+2 Mutante zur ACTB *zipcode* RNA (3.1.3) wurde die RNA (26,5 nM) mit verschiedenen Proteinkonzentrationen (20, 40, 80, 100 und 150 nM) inkubiert und anschließend auf ein 6% TBE-Gel geladen.

Für Kompetitionsanalysen (3.2.1) erfolgte eine Präinkubation des Proteins (150 nM) mit Atto 680 markierter Y3 RNA (50 nM) für 15 min. Danach erfolgte die Zugabe eines 10-

bzw. 30-fachen Überschuss an Kompetitor-RNA. Nach der Inkubationszeit von 15 min wurden die Proben auf ein 4-12% TBE-Gel (Life Technologies) geladen. Die Analyse der EMSA-Experimente erfolgte mittels Detektion der Atto 680 markierten RNA am Infrarot Scanner.

Puffer und Gele	Zusammensetzung	
natives 6% TBE-Gel	2 ml 5×TBE, 30 µl APS (10%), 15 µl TEMED	2 ml Acrylamid; 6 ml H ₂ O
natives 8% TBE-Gel		2,67 ml Acrylamid; 5,33 ml H ₂ O
10×Ladepuffer	250 mM Tris pH 7,4; 0,2% Bromphenolblau; 40% Saccharose	

2.2.3.5 Filterbindung

Zur Untersuchung der Bindungsspezifitäten der IGF2BP und KH-Mutanten Proteine zur Atto 680 markierten MYC CRD und ACTB *zipcode* RNA (3.1.2) wurden Filterbindungs-Studien durchgeführt. Mit dieser Methode werden Komplexe bestehend aus Protein und RNA auf einem Filter zurückgehalten und im Anschluss entweder vom Filter extrahiert (siehe 2.2.3.8) oder die Menge an gebundener RNA bestimmt, indem die Fluoreszenz der Atto 680 markierten RNA am Infrarot-Scanner detektiert wird. Zur Durchführung der Analyse wurde die jeweilige RNA (ACTB *zipcode*: 26,5 nM; MYC-CRD: 2,8 nM) zusammen mit Proteinen aufsteigender Konzentration 15 min in Bindungspuffer inkubiert und anschließend auf Nitrocellulosefilter (0,45 µm HA; Millipore) übertragen, welche zuvor in einer Vakuum-Filtrationsvorrichtung (12 Proben, Millipore) mit Bindungspuffer äquilibriert wurden. Nach 3-maligem waschen mit Bindungspuffer erfolgte die Detektion der RNA.

2.2.3.6 Saccharose-Gradienten

Um unterschiedliche Proteinkomplexe innerhalb eines Zelllysates zu untersuchen, wurde ein Verfahren genutzt, bei dem Moleküle aufgrund ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit innerhalb eines Dichtegradienten aufgetrennt werden können. Zur Erzeugung dieses Gradienten wurden Saccharose-Lösungen mit sinkender Dichte (20, 15, 10 und 5% Saccharose (w/v) in 1×Gradientenpuffer (Tab.2.9)) vorsichtig in ein Zentrifugenröhrchen (Beckman; 14×95 mm) übereinander geschichtet. Dieser 4-stufige Gradient (10 ml) wurde über Nacht bei 4°C inkubiert, sodass sich ein kontinuierlicher Gradient ausbildet. Von dem zu untersuchenden Zelllysate (siehe 2.2.2.8 und Tab.2.9) wurde zunächst die optische Dichte bei 260 nm bestimmt, dann wurden 800 µl vom Zelllysate auf die vorbereitete Gradientenlösung geschichtet und 2,5 h bei 40.000 rpm und 4°C

ultrazentrifugiert (Optima™ L-90K Ultracentrifuge, SW 40 TI). Im Anschluss erfolgte die Fraktionierung entweder per Hand, indem die Gradientenlösung mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze abgenommen wurde, oder am Gradientenfraktionierer (Brandl), welcher zugleich das Absorptionsprofil der einzelnen Fraktionen bei 254 nm aufzeichnet. Aus diesen 10 Fraktionen wurde dann zum einen die RNA präpariert (siehe 2.2.2.4) und zum anderen ein Teil abgenommen, mit 5×Probenauftragspuffer versetzt, in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot (2.2.2.8) analysiert. Die ribosomalen RNAs wurden in einem 1%igen Agarose-Gel aufgetrennt und die Quantifizierung verschiedener RNAs erfolgte mittels qRT-PCR (2.2.2.6).

2.2.3.7 Aufarbeitung von Proteinproben für die Massenspektrometrie

Um mögliche Interaktoren von ZBP1 zu identifizieren, sollten die Co-Immunopräzipitationen aus HEK293- und U2OS-Zelllysaten (2.2.3.1) massenspektrometrisch analysiert werden (in Kooperation mit Dr. Krüger, MPI Bad Nauheim). Zur Durchführung dieser Untersuchung bedarf es einer besonderen Aufarbeitung der Proteine, welche im folgendem detailliert beschrieben wird (Protokoll von Dr. Krüger). Zunächst wurden die Protein-Proben in der SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss mittels *Colloidal Blue Staining Kit* angefärbt. Aus jeder Spur des Proteingels wurden dann Gel-Fragmente ausgeschnitten (siehe Abb. 3.28 A, B), weiter zerkleinert ($\leq 1 \text{ mm}^3$) und in Eppendorff-Gefäße überführt. Nachdem die Gelstücke zweimal mit 100 μl Puffer 1 gewaschen wurden erfolgte ein Dehydrierungsschritt, bei dem die Gelstücke 10 min in 100 μl absolutem Alkohol inkubiert wurden und anschließend in einem Vakuum-Konzentrator (Eppendorf) für 5 min getrocknet wurden. Im nächsten Schritt erfolgte die Reduzierung der Proteine durch die Zugabe von 100 μl Puffer 2 und Inkubation für 45 min bei 56°C im Thermomixer (Eppendorf). Um freie Sulfhydrylgruppen zu blockieren erfolgte eine Alkylierung, indem Puffer 3 hinzugegeben wurde und die Gelstücke für 30 min bei Raumtemperatur und Dunkelheit inkubiert wurden. Danach wurden die Gelstücke abwechselnd mit 100 μl Puffer 4 gewaschen und mit 100 μl absolutem Alkohol dehydriert (Inkubation in der jeweiligen Lösung für 15 min bei Raumtemperatur). Beide Schritte wurden wiederholt und die Gelstücke abermals im Vakuum-Konzentrator getrocknet. Der Verdau der Proteine erfolgte durch Zugabe von 40 μl 12 ng/ μl Trypsin oder LysC über Nacht bei 37°C. Nach der Überführung des Überstandes in ein frisches Eppendorffgefäß wurden die Peptide extrahiert, indem die Gelstücke zunächst in

Material und Methoden

100 µl Lösung A, dann zweimal in 100 µl 70% Acetonitril und schließlich zweimal in 100 µl 100% Acetonitril für jeweils 20 min bei RT inkubiert wurden. Alle Überstände wurden zum Überstand des über Nacht Verdaut dazugegeben und in einem Vakuum-Konzentrator bis auf ein Volumen von etwa 80 µl aufkonzentriert. Anschließend wurde das gleiche Volumen an Puffer B zugeführt. Zur Beladung der aufgearbeiteten Protein-Probe wurden sogenannte „StageTips“ vorbereitet. Dazu wurden 2 Schichten C18 Festphasenextraktionsdisks (Empore, 3M) in die Spitze einer 0,2 ml Pipettenspitze geschoben. Danach wurden die „StageTips“ zuerst mit 20 µl Methanol, dann mit 20 µl Puffer C und mit 20 µl Puffer D gewaschen. Nach jedem Waschschrift erfolgte die Zentrifugation der „StageTips“ bei 2.600 rpm für 2 min. Im letzten Schritt wurde jede aufgearbeitete Probe auf eine „StageTip“ geladen, für 4 min bei 2.600 rpm zentrifugiert und mit 20 µl Puffer D gewaschen. Nach der Zentrifugation bei 2.600 rpm für 2 min wurden die „StageTips“ getrocknet, indem mit einer Spritze Luft durch die Pipettenspitze gedrückt wurde. Die beladenen „StageTips“ wurden dann bis zur weiteren massenspektrometrischen Analyse bei 4°C gelagert.

Tab. 2.12: Lösungen und Puffer zur Aufarbeitung der Proteinproben

Lösungen und Puffer	Zusammensetzung
Puffer 1	50 mM Ammoniumbicarbonat, 50% Ethanol
Puffer 2	50 mM Ammoniumbicarbonat, 10 mM DTT
Puffer 3	55 mM Iodacetamid
Puffer 4	50 mM Ammoniumbicarbonat
Lösung A	30% Acetonitril, 3% Trifluoressigsäure
Lösung B	5% Acetonitril, 1% Trifluoressigsäure
Lösung C	5% Essigsäure, 80% Acetonitril
Lösung D	5% Essigsäure

2.2.3.8 SELEX (Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment)

Diese Methode wurde genutzt, um herauszufinden wie sich mögliche RNA-Bindesequenzen der IGF2BP Proteine zusammensetzen bzw. voneinander unterscheiden. Dazu wurde zunächst eine Bibliothek aus RNA-Molekülen generiert, welche aus einem Bereich randomisierter Nukleotide (N20 oder N40) und flankierenden, konstanten 5' und 3' Enden bestehen. Die konstanten Bereiche enthalten zum einen Bindestellen für *Primer* und zum anderen eine Promotorsequenz für die *in vitro* Transkription. Die aus Zufallssequenzen bestehende RNA-Bibliothek wird dann zusammen mit dem Protein inkubiert, bindende Sequenzen isoliert, revers transkribiert, amplifiziert, *in vitro* transkribiert und einer erneuten

Material und Methoden

Protein-Bindung ausgesetzt. Dieser Prozess wurde 10-mal durchgeführt mit dem Ziel hoch affine, spezifische RNA-Aptamere für das entsprechende Protein zu gewinnen. Dabei wurde das Protokoll nach Perez et al. aus dem Jahr 1997 genutzt und wie folgt modifiziert. Zunächst wurde eine PCR durchgeführt um die Zufallssequenzen zu amplifizieren (Tab.2.5).

<u>PCR-Ansatz:</u>	250 pmol N20/N40	<u>PCR-Programm:</u>	94°C, 2 min	} 5 Zyklen
	je 2 nmol Selex S und R		94°C, 30 s	
	1 ml 2× PCR-Mix		55°C, 30 s	
	auf 2 ml mit ddH ₂ O auffüllen		72°C, 45 s	
			72°C, 5 min	

Nachdem die Amplifikate mittels Phenol-Chloroform extrahiert wurden, erfolgte die Fällung unter Zugabe von 0,5 M Ammoniumacetat und 3 Volumen 96%igen Ethanol für 1 h bei -80°C. Nach der Zentrifugation und dem Waschen des Pellet wurden die Amplifikate in DEPC-H₂O gelöst. Im Anschluss erfolgte die *in vitro* Transkription, indem der unten genannte Ansatz für 5 h bei 37°C inkubiert wurde.

In vitro Transkription: 100 µl *Transcription Optimized* 5x Puffer (Promega)
50 µl DTT (Promega)
4 µl RNasin
je 0,3 mM rNTPs (finale Konzentration)
5 µg DNA
240 U T7 RNA Polymerase

auf 500 µl mit DEPC H₂O auffüllen

Daran schloss sich ein DNA- und Protein-Verdau an, indem zunächst 5 U DNase 1 (Inkubation: 37°C, 30 min) und im Anschluss 40 µg ProteinaseK und 0,5% SDS zugegeben wurden (Inkubation: 50°C, 30 min). Nach der Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung der RNA folgte ein weiterer Reinigungsschritt. Dazu wurde die RNA im Harnstoffgel aufgetrennt (2.2.2.7), ausgeschnitten und die Gelstücke in Elutionspuffer zermörsert (Inkubation: 37°C, 4 h). Nachdem die RNA gefällt und in 30 µl Bindungspuffer (Tab. 2.11) gelöst wurde, erfolgte die Inkubation mit dem entsprechenden Protein für 20 min bei Raumtemperatur.

<u>Bindungsansatz:</u>	15 µl RNA	<u>Elutionspuffer:</u>	
	1 µM Protein		0,5 M Ammoniumacetat
	0,5 µl DTT		1 mM MgCl ₂
	30 µg/ml Hefe-t-RNA		0,2% SDS
	<hr/> auf 50 µl mit Bindungspuffer auffüllen		

Material und Methoden

Im Anschluss wurde der Ansatz, wie unter 2.2.3.5 beschrieben, auf Nitrocellulose Filter transferiert und ungebundene RNAs gewaschen. Um die affinen Aptamere von den Filtern zu extrahieren, wurden die Filter zerschnitten, mit Extraktionspuffer (200 µl 7 M Harnstoff, 400 µl RNA-Phenol, 130 µl Chloroform) versetzt und 45 min bei Raumtemperatur schüttelnd inkubiert. Die gefällte RNA wurde dann in 20 µl DEPC H₂O aufgenommen und 13 µl für die reverse Transkription (RT), unter Zugabe von 200 pmol Selex R, verwendet (2.2.2.5). Anschließend wurden die revers transkribierten Aptamere amplifiziert.

<u>PCR-Ansatz:</u> RT-Ansatz	<u>PCR-Programm:</u> 94°C, 2 min
100 pmol Selex S und R	94°C, 30 s
200 µl 2× PCR-Mix	60°C, 15 s
auf 400 µl mit ddH ₂ O auffüllen	72°C, 15 s

} 39 Zyklen

Nachdem die DNA extrahiert (Phenol-Chloroform), gefällt und in 50 µl DEPC-H₂O gelöst wurde, erfolgte die erneute *in vitro* Transkription (200 µl Ansatz) für die nächste Selektionsrunde. Dabei wurde wie oben beschrieben verfahren, allerdings wurde ab der 6. Selektionsrunde die verwendete Proteinkonzentration für die Bindung schrittweise herabgesetzt (Runde 6=0,8 µM; 7=0,6 µM; 8=0,4 µM; 9=0,2 µM; 10=0,1 µM), um stringenter Bindungsbedingungen zu schaffen.

Für die Sequenzanalyse der selektierten Aptamere wurde die DNA zunächst in den pGEMTeasy Vektor kloniert, in DH5α transformiert (2.1.2) und isoliert (2.2.2.3).

2.2.4 Immunohistologische Methoden

2.2.4.1 Immunofluoreszenz

Zur Analyse der subzellulären Lokalisation von Proteinen wurden Immunofluoreszenz-Färbungen vorgenommen und nachfolgend mikroskopisch ausgewertet. Dazu wurden transfizierte U2OS-Zellen in 24 *well*-Platten auf 12 mm Deckgläschen kultiviert (Tab. 2.8). Die Zellen wurden zunächst für 30 min mit einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung fixiert und anschließend für 5 min mit 0,5% (v/v) Triton X-100 in PBS permeabilisiert. Nachdem die Zellen mit PBS gewaschen wurden, folgte das blockieren unspezifischer Antikörperbindungen, indem die Zellen für 1 h in 1,5% BSA in PBS inkubiert wurden. Die primären Antikörper wurden in 1,5% BSA in PBS verdünnt und für eine Stunde zu den Zellen gegeben (Tab. 2.1). Nach einmaligem Waschen mit PBS erfolgte die einstündige Inkubation

mit den fluoreszenzmarkierten sekundären Antikörpern, welche ebenfalls in 1,5% BSA in PBS verdünnt wurden (Tab. 2.1). Überschüssige Antikörper wurden durch erneutes waschen der Zellen mit PBS entfernt und die DNA wurde mittels DAPI-Färbung markiert. Die Präparate wurden schließlich jeweils zweimal mit PBS und ddH₂O gewaschen und zur Dehydratation in 96%igen Ethanol getaucht. Nachdem die Deckgläschen getrocknet waren, wurden diese unter Verwendung von *Prolong-Antifade* auf Objektträgern fixiert und mehrere Stunden getrocknet. Die Analyse der Präparate erfolgte an einem Leica TCS-SP5X konfokalen Mikroskop unter Nutzung eines 100×Öl Plan Apo Objektives (NA=1,46).

2.2.5 Metabolische Analysen

2.2.5.1 Glukoseaufnahme-Assay

Um der Frage nachzugehen inwieweit IGF2BP2 eine Rolle im Metabolismus von Zellen spielt wurde zunächst untersucht, ob GFP-IGF2BP2 exprimierende U2OS Zellen im Vergleich zu GFP exprimierenden Zellen Unterschiede in der Aufnahme von Glukose aus dem Zellmedium aufweisen. Dazu wurden 2×10^4 Zellen auf eine 24 *well*-Platte ausgesät und 3 weitere *wells* wurden mit Kulturmedium befüllt. Nach 72 h wurde der Zellkulturüberstand bzw. das Kulturmedium ohne Zellen in Eppendorfgefäße überführt und die Zellen geerntet. Zur quantitativen Bestimmung der Glukose im Medium wurde der *Glucose (GO) Assay Kit* verwendet, bei dem die Angaben des Herstellers befolgt wurden. Die Glukoseaufnahme der Zellen wurde ermittelt, indem die Glukose im Kulturmedium ohne Zellen und im Zellkulturmedium (jeweils 1:100 in ddH₂O verdünnt), basierend auf einer Eichgeraden, bestimmt und die Differenz aus den Werten gebildet wurde. Im Anschluss wurden die erhaltenen Werte auf 1×10^5 Zellen normalisiert.

2.2.5.2 Glykogen-Assay

Um herauszufinden, ob sich die Speicherung von Glukose in Form von Glykogen in GFP-IGF2BP2 exprimierenden U2OS Zellen im Vergleich zu GFP exprimierenden Zellen unterscheidet, wurde ein Glykogen-Assay durchgeführt. Dazu wurden zunächst 1×10^5 Zellen auf eine 6 cm Schale ausgesät und 72 h kultiviert. Nach der Zellernte und Aufnahme in 1 ml HANKS wurden 90 µl für die Zellzahlbestimmung am Durchflusszytometer abgenommen und die verbleibende Zellsuspension zentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, erfolgte die Resuspension des Zellpellets in ddH₂O, sodass sich in jeder Probe 7300 Zellen/µl

Material und Methoden

befanden. Diese wurden im Anschluss für 5 min bei 95°C inkubiert, 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorfgefäß überführt. Von diesem Überstand wurden jeweils 20 µl für die enzymatische Bestimmung der Glykogenkonzentration mittels *Glycogen Assay Kit* eingesetzt, bei dem nach den Angaben des Herstellers verfahren wurde.

Unter Verwendung dieses Assays wurde ebenfalls der Glykogengehalt von Mäuse-Lebern bestimmt, welche BiPro-GFP, BiPro-IGF2BP1, BiPro-IGF2BP2 oder BiPro-IGF2BP3 transgen exprimieren. Dazu wurde ein zuvor entnommener Teil der Leber in ddH₂O aufgenommen (100 µg/µl), gevortext und 5 min bei 95°C inkubiert. Nach einer 10-minütigen Zentifugation bei 13.000 rpm und 4°C, wurden 7,5 µl vom Überstand entnommen und das enthaltene Glykogen mittels *Glycogen Assay Kit* bestimmt.

3 Ergebnisse

3.1.1 Die Aufreinigung der rekombinanten IGF2BP Proteine

Obwohl die Bindung der humanen IGF2BP Proteine an ihre jeweiligen Ziel-mRNAs die Funktion maßgeblich bestimmt, fehlten zu Beginn dieser Arbeit vergleichende RNA-Bindungsstudien der IGF2BP Paralogen. Außerdem ist noch nicht vollständig geklärt, welche KH-Domänen spezifische RNA-Assoziationen vermitteln. Jedoch wurden bereits *in vitro*-Bindungsstudien durchgeführt, um die RNA-Bindungsspezifität von IGF2BP1 und seinen Homologen aufzuklären. Dabei wurden zum einen verkürzte Proteine (RRM1-2, KH1-2 und KH3-4) genutzt, um die Interaktion zwischen ZBP1 und dem 3'-UTR *zipcode* von ACTB zu untersuchen (Farina et al., 2003). Zum anderen fügte die Arbeitsgruppe um Nielsen et al. Mutationen im Bereich des GXXG-Loop (XX zu EL) der KH-Domäne 1, 2 und 3 ein, welche zu einer 50-fach reduzierten RNA-Bindungsaffinität führten (J. Nielsen et al., 2003). Diese Herangehensweise hat den Vorteil, dass die Auswirkungen einzelner Mutationen im Kontext des gesamten Proteins verstanden werden können. Auch in unserer Arbeitsgruppe wurden bereits mehrere ZBP1-Mutanten generiert und hinsichtlich ihrer RNA-Bindungseigenschaften und subzellulären Lokalisation untersucht (Diplomarbeit, M. Köhn, 2008). Diese Vorarbeiten bieten eine wesentliche Grundlage für die folgenden Analysen.

Um die spezifischen Funktionen der KH-Domänen in den einzelnen IGF2BP Paralogen zu untersuchen, wurden zunächst mittels ortsgerechter Mutagenese die konservierten GXXG-Loops in den KH-Domänen zu GEEG umgewandelt (Abb. 3.1).



Abb. 3.1: Schematische Darstellung der konservierten KH-Domänen-Module der IGF2BPs (übernommen aus Wächter und Köhn et al., 2013). In jeder KH-Domäne wurde der GXXG-Loop zu GEEG konvertiert.

Anschließend wurden sowohl die Wildtyp-Proteine als auch die mutierten Proteine als GST-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert. Nach der Affinitätsreinigung mittels Glutathion Sepharose, erfolgte die Abspaltung des GST-tags mittels *PreScission* Protease und die

Ergebnisse

Reinigung der erhaltenen Proteine über Ionenaustausch-Chromatographie (Abb. 3.2 A). Nach jedem Reinigungsschritt wurden die Proteine über ein *Coomassie-Brillantblau* gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel auf ihre Aufreinigung überprüft. Die Abb. 3.2 B zeigt ein solches Gel am Beispiel der IGF2BP2 Expression und Reinigung. In der Abbildung 3.2 C sind schließlich alle gereinigten Wildtyp- und Mutanten-Proteine dargestellt.

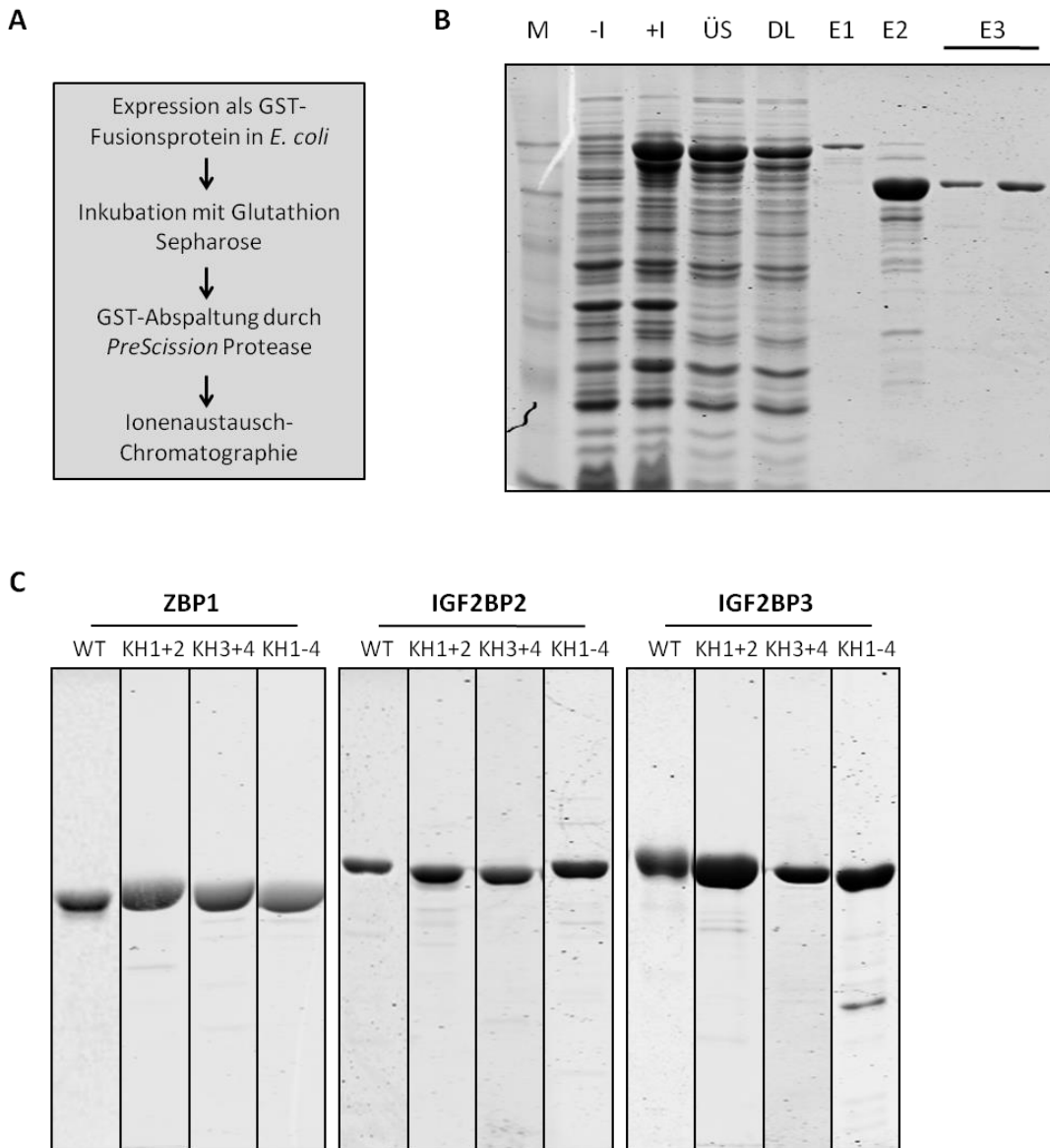


Abb. 3.2: Die Aufreinigung der rekombinanten IGF2BP Proteine. Das Reinigungsschema ist in (A) dargestellt. Im Anschluss erfolgten die Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE und die anschließende Färbung der Proteine mit *Coomassie-Brillantblau*. (B) Dargestellt sind die einzelnen Proteinfractionen der IGF2BP2 Expression und Aufreinigung. Dabei stellt (M) den Größenstandard/Marker, (-I) Gesamtprotein vor der Induktion, (+I) Gesamtprotein nach der Induktion (1 mM IPTG, über Nacht), (ÜS) den Überstand nach dem Zellaufschluss, (DL) die nicht an Glutathion Sepharose gebundenen Proteine, (E1) die Proteine nach der Test-Elution, (E2) die Proteine nach der Spaltung mit *PreScission* Protease und (E3) die vereinigten Proteine nach der Ionenaustausch-Chromatographie dar. (C) Die gereinigten Proteine ZBP1, IGF2BP2, IGF2BP3 und die jeweiligen KH-Domänen Mutanten wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Dabei ist die jeweilige KH-Domäne mit GEEG-Mutation durch eine Nummer gekennzeichnet (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

Ergebnisse

Im Anschluss an die Aufreinigung der Proteine, wurden die Präparationen auf Nukleinsäure-Rückstände untersucht. Dazu wurden für die rekombinanten Proteine Absorptionsspektren im Bereich von 240 nm bis 350 nm aufgenommen und mit dem Absorptionsspektrum von *in vitro* transkribierter ACTB *zipcode* RNA verglichen. Wie in Abbildung 3.3 exemplarisch für die einzelnen ZBP1 Wildtyp und Mutanten Proteine zu sehen ist, unterscheiden sich die RNA- und Protein-Absorptionsspektren deutlich voneinander. Dieses Kontrollexperiment zeigt, dass durch den Reinigungsprozess die Nukleinsäuren innerhalb der Proteinpräparationen sichtlich reduziert werden konnten.

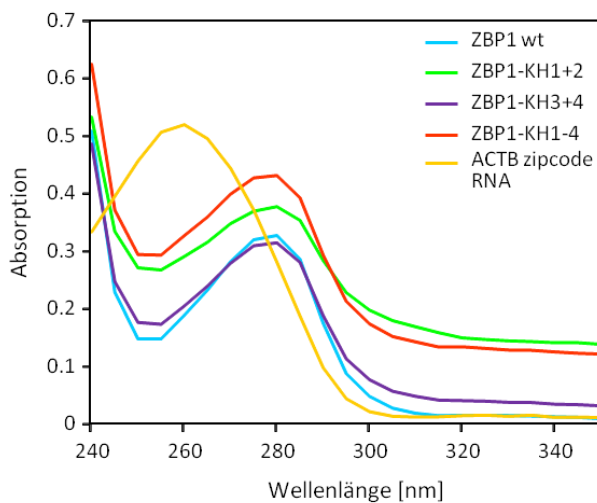


Abb. 3.3: Die Absorptionsspektren (240-350nm) der gereinigten rekombinanten ZBP1 Wildtyp und Mutanten Proteine und der *in vitro* transkribierten ACTB *zipcode* RNA (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

Für die Untersuchung der Bindungsspezifität der einzelnen IGF2BP Paralogen wurden die für IGF2BP1 (ZBP1) bekannten Ziel-mRNAs β -Actin (ACTB) und c-Myc (MYC) ausgewählt. Für die ACTB mRNA wurde in mehreren Studien gezeigt, dass die Bindung von ZBP1 über den *zipcode* im 3'-UTR dieser mRNA vermittelt wird (Kislauskis et al., 1994; Ross et al., 1997). Diese Bindung ermöglicht den Transport von ACTB zur Führungslamelle von embryonalen Fibroblasten und in die Wachstumskronen primärer Neuronen (Lawrence und Singer 1986; Bassell et al., 1999; Farina et al., 2003; Hüttelmaier et al., 2005). Die Interaktion zwischen der humanen MYC mRNA und IGF2BP1 wird dagegen über die kodierende Region (*coding region determinant-CRD*) von MYC vermittelt (Prokipcak et al., 1994; Doyle et al., 1998), wodurch deren Abbau durch Endoribonukleasen verhindert wird (Lemm und Ross, 2002; Sparanese et al., 2007). Um festzustellen welche KH-Domänen der IGF2BP Paralogen die Bindung an die ACTB und MYC mRNA vermitteln, wurden die *cis*-Elemente beider Ziel-RNAs

Ergebnisse

(Abb. 3.4) *in vitro* transkribiert und dabei mit dem Fluoreszenzfarbstoff Atto 680 markiert (Köhn et al., 2010).

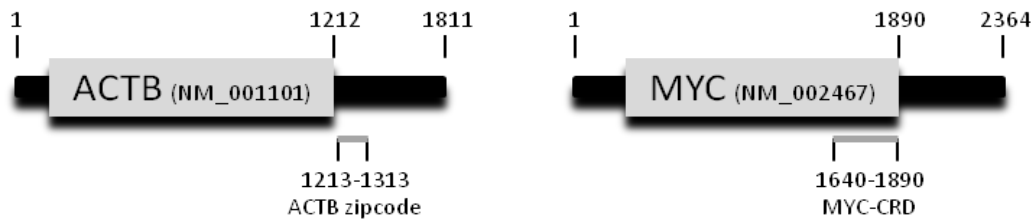


Abb. 3.4: Schematische Darstellung der für die Bindungsexperimente benutzten Bereiche der Ziel-RNAs (ACTB *zipcode* und MYC-CRD) im Vergleich zur Gesamt-RNA (übernommen aus Wächter und Köhn et al., 2013).

3.1.2 Alle KH-Domänen sind beteiligt an der IGF2BP-RNA-Bindung *in vitro*

Die Bindungsspezifität von ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 an die ACTB-RNA und MYC-CRD wurde anhand von Filterbindungsanalysen untersucht (Abb. 3.5). Dabei ist hervorzuheben, dass für ZBP1 bereits einige Bindungsstudien vorgenommen wurden [ZBP1-KH1, 2 (GEEG) und ZBP1-KH3 (GEEG); (Diplomarbeit, M. Köhn, 2008)], hier jedoch für alle Didomänen-Mutanten (KH1+2, KH3+4) erneut durchgeführt wurden, um ein vollständiges und einheitliches Bild zum Bindungsverhalten aller IGF2BPs zu erhalten.

Zunächst ist festzuhalten, dass alle drei Paralogen Proteine in der Lage sind den ACTB *zipcode* sowie die MYC-CRD *in vitro* zu binden. Betrachtet man die aus den Analysen ermittelten K_D -Werte (Abb. 3.6), fällt auf, dass die Affinität aller drei Paralogen zu beiden RNA Substraten ähnlich ist ($K_D=20-34$ nM). Um zu testen, ob an der Bindung beide KH-Didomänen beteiligt sind, wurde die Assoziation der zugehörigen KH1+2, KH3+4 und KH1-4 Mutanten-Proteine mit dem ACTB *zipcode* und der MYC-CRD bestimmt.

Die ZBP1-ACTB-Bindung ist für die KH1+2 Mutante nicht wesentlich beeinträchtigt, lediglich sinkt der Anteil an gebundener RNA etwas ab. Dagegen hat die KH3+4 Mutante eine ca. 18-fach verringerte Bindungsaffinität zum ACTB *zipcode*. Dennoch ist der KH1+2 Domäne eine Beteiligung an der ACTB-Bindung zuzuweisen, denn nur die Mutation des GXXG-Loops in allen KH-Domänen (KH1-4) führt zu einer signifikanten Reduktion der Bindungsaffinität (ca. 90-fach). Diese Feststellung wird dadurch gestützt, dass die Deletionsvariante von IGF2BP1, bestehend aus KH3-4, selbst bei 100 nM nicht in der Lage ist an die H19 RNA *in vitro* zu binden, während IGF2BP1 mit einem K_D von 0,4 nM an die H19 RNA bindet (J. Nielsen et al., 2002). Zudem zeigt dieses Ergebnis, dass die Versuche, welche mit verkürzten

Ergebnisse

Proteinen durchgeführt wurden (Farina et al., 2003) und die KH34 Domäne allein für die Bindung an den ACTB *zipcode* verantwortlich machen, überdacht werden sollten. Da die strukturelle Integrität des Gesamtproteins für die RNA-Assoziation offenbar wichtig ist, sollte die ortsgerichtete Mutation innerhalb der Domäne, einer Deletion ganzer Domänen vorgezogen werden.

Die Inaktivierung der KH1+2 Domäne in IGF2BP2 führt dagegen zu einer signifikanten Verringerung der Bindungsaffinität (10-fach) zum ACTB *zipcode*. Ähnlich wie beim Bindungsverhalten von ZBP1 hat die Inaktivierung der KH3+4 Domäne die größte Auswirkung auf die Bindung zu ACTB. Doch erst die Mutation aller vier KH-Domänen in IGF2BP2 führt zur signifikanten Reduktion der ACTB Bindung (>70-fach).

Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass alle KH-Domänen für die ACTB Bindung wichtig sind, der KH1+2 Domäne in IGF2BP2 jedoch eine größere Beteiligung an der Bindung des *zipcodes* zugeschrieben werden kann. Erstaunlicherweise haben die GXXG-Mutationen in den KH-Domänen von IGF2BP3 nur einen moderaten Einfluss auf die Assoziation zur ACTB-RNA (7-fach reduziert), wobei die Beteiligung beider Didomänen (KH1+2 und KH3+4) vergleichbar ist.

Betrachtet man die *in vitro* Bindung der IGF2BP Paralogen zur MYC-CRD, kann man sagen, dass auch bei diesem Substrat alle Proteine mit hoher Affinität binden ($K_D=20-26$ nM). Dabei beeinträchtigt die Mutation der jeweiligen Didomänen von ZBP1 das Bindungsverhalten nur moderat, es scheint als wäre eine intakte Didomäne (KH1+2 oder KH3+4) für die Bindung zur MYC-CRD ausreichend. Dagegen führt das Ausschalten aller KH-Domänen zur signifikanten Reduktion der Bindungsaffinität (ca. 50-fach). An der Assoziation von IGF2BP2 an die MYC-CRD ist hauptsächlich die KH3+4 Domäne beteiligt, da die Mutation in dieser Didomäne zu einer 20-fachen Verringerung der RNA-Affinität führt, die Mutation der KH1+2 Domäne dagegen nur eine 4-fache Verringerung der RNA-Affinität nach sich zieht. Jedoch führt hier ebenfalls erst die Mutation aller KH-Domänen zu einem Verlust der RNA-Bindung. Für die Assoziation von IGF2BP3 mit der MYC-CRD hat die Mutation in den GXXG-Loops der KH-Domänen 1-4 nur geringe Auswirkungen (4-fach reduziert).

Ob sowohl die ACTB als auch die MYC mRNA *in vivo* durch alle IGF2BP Paralogen gebunden wird, bleibt ungeklärt. Jedoch weist die Identifikation zahlreicher CLIP-Sequenzen (ACTB: IGF2BP1=13; IGF2BP2=11; IGF2BP3=11; MYC: IGF2BP1=3; IGF2BP2=2; IGF2BP3=1) auf eine *in vivo* Bindung hin (*starBase v2.0*; Li et al., 2014; Yang et al., 2011) .

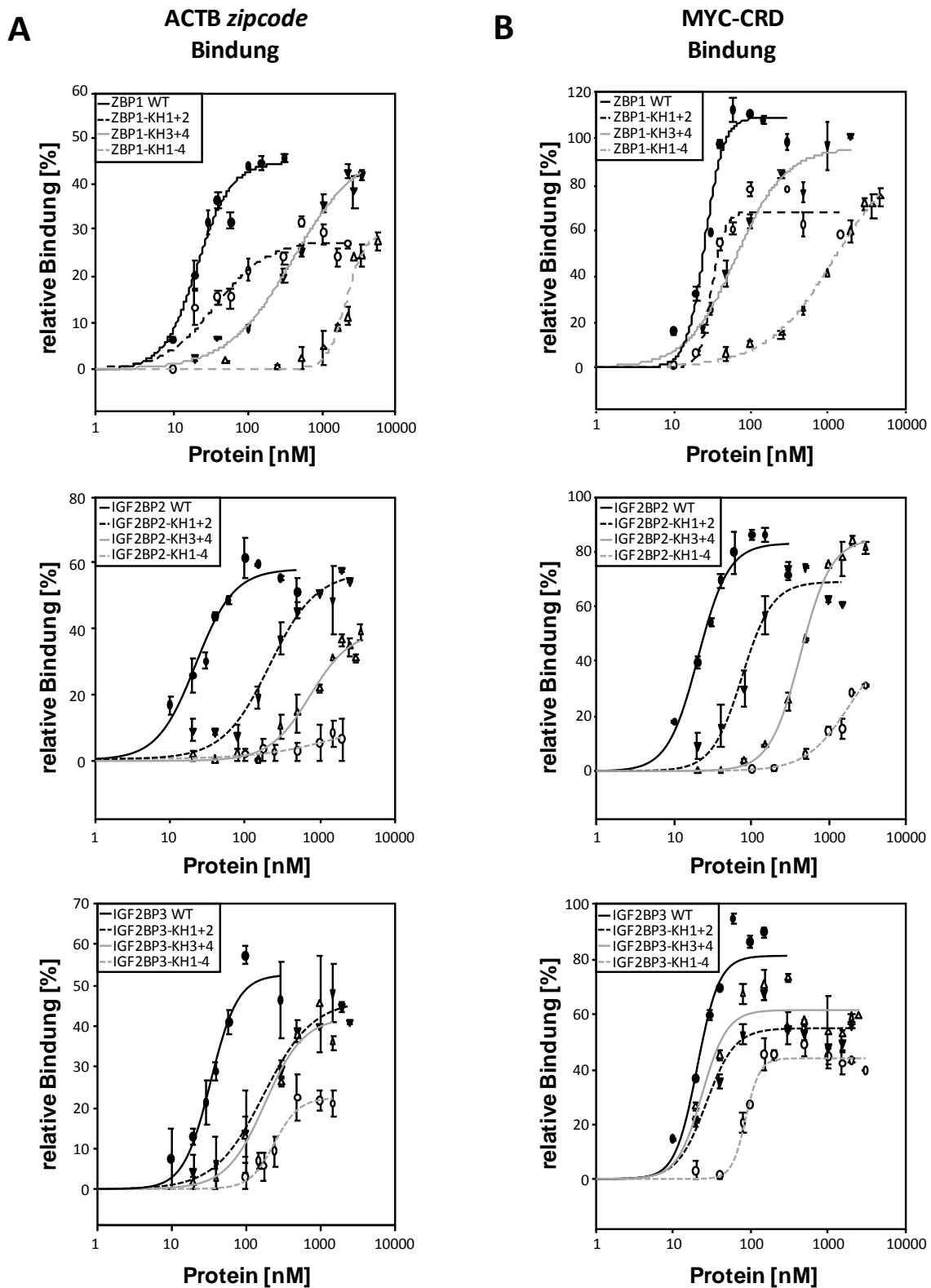


Abb. 3.5: Alle KH-Domänen vermitteln die IGF2BP-RNA-Bindung *in vitro*. (A, B) Filterbindungsanalyse von ZBP1, IGF2BP2, IGF2BP3 und die Mutanten-Proteine an (A) die ACTB *zipcode* und (B) die MYC-CRD RNA. Die Atto 680 markierte RNA (ACTB *zipcode*: 26,5 nM; MYC-CRD: 2,8 nM) wurde zusammen mit Proteinen aufsteigender Konzentration inkubiert. Der Prozentsatz an gebundener RNA wurde durch die zum Input normalisierten Fluoreszenzintensitäten bestimmt, indem die Filter nach der Immobilisierung der Protein-RNA-Komplexe und intensivem Waschen am Infrarot-Scanner eingelesen wurden. Die Hill-Ableitung wurde zum *fitten* und die Bestimmung des K_D -Wertes genutzt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung von drei unabhängigen Analysen (Daten bereits publiziert in Bell et al., 2013; Wächter und Köhn et al., 2013).

Ergebnisse

Protein	ACTB		MYC	
	K _D [nM]	Maximalbindung [%]	K _D [nM]	Maximalbindung [%]
ZBP1 WT	22 ± 3	45 ± 3	26 ± 2	109 ± 5 *
ZBP1-KH1+2	37 ± 9	28 ± 2	32 ± 2	68 ± 3
ZBP1-KH3+4	394 ± 88	48 ± 4	65 ± 12	96 ± 6
ZBP1-KH1-4	1963 ± 190	30 ± 3	1281 ± 351	96 ± 10
IGF2BP2 WT	22 ± 3	58 ± 3	20 ± 2	83 ± 4
IGF2BP2-KH1+2	216 ± 40	57 ± 4	78 ± 12	69 ± 4
IGF2BP2-KH3+4	734 ± 150	40 ± 4	433 ± 15	85 ± 1
IGF2BP2-KH1-4	1636 ± 6600	13 ± 23	1825 ± 1176	47 ± 21
IGF2BP3 WT	34 ± 5	53 ± 5	20 ± 4	81 ± 8
IGF2BP3-KH1+2	177 ± 30	46 ± 2	26 ± 5	55 ± 3
IGF2BP3-KH3+4	184 ± 46	42 ± 4	23 ± 4	62 ± 3
IGF2BP3-KH1-4	245 ± 34	23 ± 2	85 ± 4	44 ± 1

Abb. 3.6: Zusammenfassung der K_D-Werte und die maximale Prozentzahl gebundener RNA (* Schwankungen in Fluoreszenz) aus den Filterbindungsanalysen (übernommen aus Wächter und Köhn et al., 2013).

Die Ergebnisse der Filterbindungsanalysen legen nahe, dass die GXXG-GEEG Umwandlung beider KH-Didomänen in ZBP1 und IGF2BP2 die RNA-Bindung in substratabhängiger Weise beeinträchtigt. In IGF2BP3 dagegen hat diese Mutation nur geringen Einfluss auf die Bindung beider RNA-Substrate. Übereinstimmend mit den Studien anderer Arbeitsgruppen (Farina et al., 2003), scheint die KH3+4 Didomäne in ZBP1 und IGF2BP2 das Haupt-RNA-Bindungsmodul zu sein, doch die KH1+2 Domäne trägt ebenfalls zur Bindung bei, da nur ein Ausschalten aller KH-Domänen die RNA-Bindung entscheidend stört. Vermutlich sind für die RNA-Bindung von IGF2BP3 neben den KH-Domänen weitere Bereiche im Protein notwendig. Eine Beteiligung der RRM-Domänen an der RNA-Bindung der IGF2BPs konnte bisher nicht gezeigt werden (F. C. Nielsen et al., 2002; Git und Standart 2002; Farina et al., 2003; J. Nielsen et al., 2004). Dennoch wurden die RRM-Domänen in IGF2BP3 auf ihre Bindungsaktivität überprüft, indem die Affinität zum ACTB *zipcode* mit einer verkürzten Proteinvariante, welche nur die RRM-Domänen enthält, bestimmt wurde (Abb. 3.7). Die Bindung der RRM-Didomäne an den ACTB *zipcode* ist im Vergleich zum IGF2BP3 Wildtyp Protein deutlich verringert, daher kann man schlussfolgern, dass die RRM-Didomäne allein keine Bindung an den ACTB *zipcode* vermittelt. Welche Bereiche innerhalb der KH-Domänen neben den GXXG-Loops in IGF2BP3 für die RNA-Bindung kritisch sind, muss Gegenstand weiterer Analysen sein.

Ergebnisse

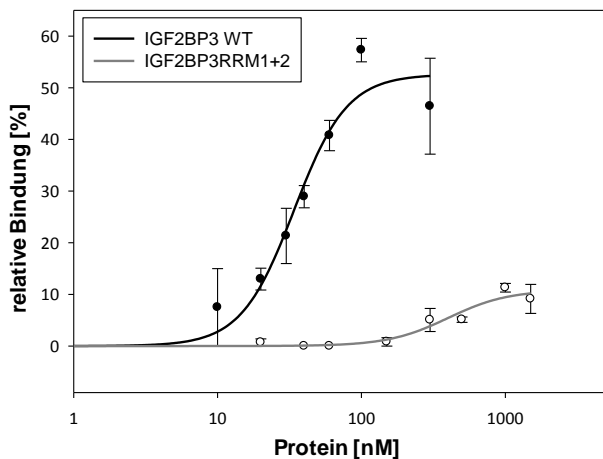


Abb. 3.7: Die RRM-Didomäne in IGF2BP3 vermittelt keine Bindung zum ACTB-*zipcode*. Filterbindungsanalyse von IGF2BP3 WT und einer verkürzten Variante von IGF2BP3, welche nur die beiden N-terminalen RRM-Domänen enthält, zum ACTB *zipcode* (Durchführung wie in 3.4. beschrieben). Es wurden folgende K_D -Werte ermittelt: IGF2BP3 WT $K_D=34\pm 5$ nM, IGF2BP3RRM1+2 $K_D=400\pm 116$ nM.

3.1.3 Die KH1+2 Didomäne von ZBP1 ist wichtig für die Komplex-Stabilität

Die Ergebnisse der Filterbindungsanalysen haben gezeigt, dass die KH1+2 Didomäne einen wesentlichen Beitrag zur Substratbindung leistet, da nur ein Ausschalten aller KH-Domänen zum Verlust der RNA-Bindungsaffinität führt (Abb. 3.5). Zudem zieht die Mutation der KH1+2 Didomäne eine Verringerung des Anteils an gebundener RNA nach sich (Abb. 3.5 und Abb. 3.6 siehe Totalbindung). Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass die KH1+2 Didomäne die Stabilität des Protein-RNA Komplexes vermittelt. Um dies zu testen, wurden die Komplexe von ZBP1-ACTB *zipcode* und ZBP1-KH1+2-ACTB *zipcode* verdünnt, und der Zerfall der Komplexe über die Zeit mittels EMSA-Studien (*electrophoretic mobility shift assay*) beobachtet (Abb. 3.8). Dabei wurde festgestellt, dass die Halbwertszeit (ermittelt durch lineare Regression) des ZBP1-KH1+2-ACTB Komplexes im Vergleich zum ZBP1-ACTB Komplex verringert ist (Abb. 3.8 B). Während die geschätzte Halbwertszeit des ZBP1-RNA Komplexes über vier Stunden beträgt, zerfällt der RNA-Protein Komplex bestehend aus KH1+2 Mutante und ACTB *zipcode* deutlich schneller (Halbwertszeit beträgt weniger als zwei Stunden). Dass es sich bei IGF2BP1-RNA Komplexen um stabile Assoziationen handelt, wurde bereits bei der Bindung von IGF2BP1 an die IGF2 *leader* 3 mRNA beobachtet. Dieser RNA-Protein Komplex besitzt *in vitro* eine geschätzte Halbwertszeit von über zwei Stunden (J. Nielsen et al., 2004). Die Stabilität der IGF2BP1-RNA Komplexe ist in Zellen sicherlich von großer Bedeutung, damit der zytoplasmatische Transport von RNAs, wie ACTB, innerhalb der assemblierten mRNP-Komplexe gewährleistet ist.

Ergebnisse

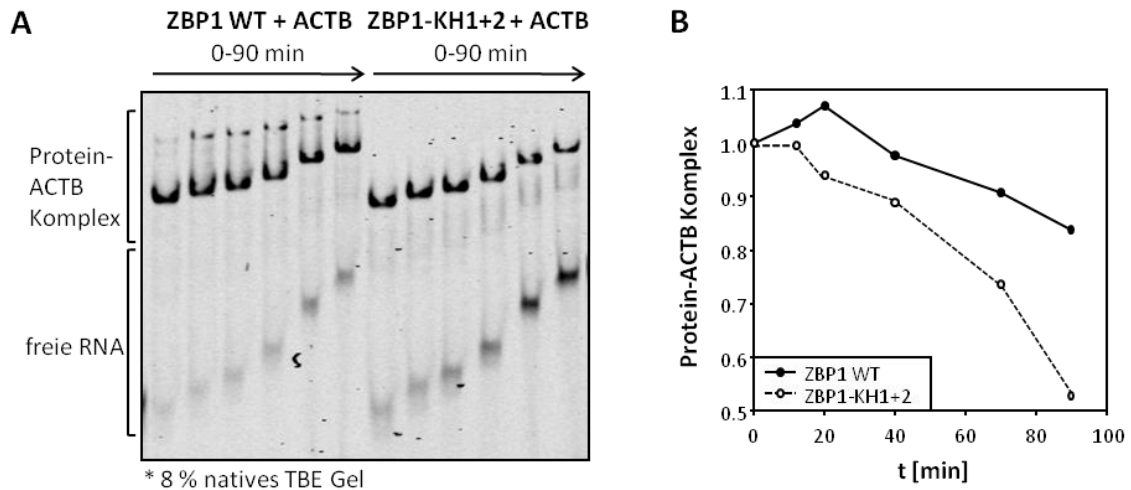


Abb. 3.8: Die KH1+2 Didomäne von ZBP1 vermittelt die Protein-RNA Komplex Stabilität. (A) EMSA-Analyse der ZBP1-ACTB und ZBP1-KH1+2-ACTB Assoziation. Die Komplexe aus ZBP1 oder ZBP1-KH1+2 Mutante (300 nM) und Atto 680 markierter ACTB *zipcode* RNA (100 nM) wurden 1:6 verdünnt und nach verschiedenen Zeiten (0-90 min.) auf ein natives 8 % TBE-Gel geladen. Der EMSA wurde mittels Infrarot Scanner analysiert. Die beobachteten Protein-ACTB Komplexe sowie die freie RNA sind auf der linken Seite markiert. (B) Quantifizierung des Komplex-Zerfalls über die Zeit im EMSA. Der Anteil der Protein-RNA Komplexe wurde mittels Infrarot Scanner bestimmt. Die relative Fluoreszenzintensität der RNA im ZBP1-Komplex wurde auf den ersten Zeitpunkt (t=0) normalisiert (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

In einem weiteren EMSA Experiment wurde die Komplexbildung von ZBP1 Wildtyp und der ZBP1-KH1+2 Mutante zur ACTB *zipcode* RNA beobachtet. Dazu wurde das RNA-Substrat mit ZBP1 in verschiedenen Proteinkonzentrationen inkubiert und die Komplexe anschließend in einem nativen Gel aufgetrennt (Abb. 3.9). Ab einer Konzentration von 80 nM kann man für das ZBP1 Wildtyp Protein größere Komplexe aus Protein und RNA (Oligomere angezeigt durch *) beobachten, welche mit geringerer Geschwindigkeit im Gel migrieren. Für Komplexe aus ZBP1-KH1+2 Protein und RNA kann man jedoch auch bei einer Proteinkonzentration von über 100 nM keine Oligomere beobachten. Auch dieser Versuch lässt darauf schließen, dass für die stabile Komplexbildung, bei der die Assemblierung weiterer Proteine den mRNP verdichtet, die KH1+2 Didomäne eine entscheidende Rolle spielt.

Ergebnisse

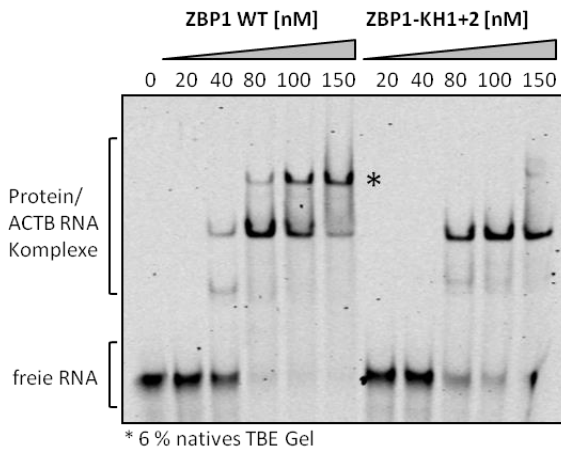


Abb. 3.9: Für die Bildung größerer Komplexe aus Protein und RNA ist die KH1+2 Domäne von ZBP1 essentiell. Die Komplexe aus Atto680 markierter ACTB *zipcode* mRNA (26,5 nM) und den unterschiedlich konzentrierten Wildtyp ZBP1 und ZBP1-KH1+2 Proteinen, wurden auf ein natives 6 % TBE-Gel geladen. Der EMSA wurde mittels Infrarot Scanner analysiert. Die Laufhöhen der Protein-ACTB Komplexe sowie der freien RNA sind links markiert (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

3.1.4 Die RNA-Bindung vermittelt die subzelluläre Lokalisation der IGF2BPs

Obwohl IGF2BP1 hauptsächlich zytoplasmatisch lokalisiert und in perinukleären Regionen sowie kortikalen Bereichen von Lamellipodien angereichert ist (J. Nielsen et al., 1999), wurde postuliert, dass IGF2BP1 in der Lage ist bereits während der Transkription mit seinen Ziel-mRNAs zu assoziieren (Oleynikov und Singer, 2003). In der Tat konnte in den Experimenten einer anderen Arbeitsgruppe in 15-20 % der mit GFP-IGF2BP1 transfizierten Zellen eine Kernlokalisation beobachtet werden. Diese Kernlokalisation konnte durch eine Mutation in der KH1, KH2 und KH3 Domäne (GXXG→GELG) noch verstärkt werden (J. Nielsen et al., 2003), was vermuten lässt, dass die subzelluläre Lokalisation von IGF2BP1 durch die KH-Domänen und damit die Fähigkeit RNA zu binden, vermittelt wird. Um die Beteiligung der KH-Domänen an der subzellulären Lokalisation der IGF2BPs zu untersuchen, wurden die Wildtyp und mutierten KH-Domänen Proteine mit einem N-terminalen Flag-Epitop versehen, in U2OS Zellen transfiziert und immunozytologisch mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert (Abb. 3.10). Dabei wurde ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 hauptsächlich im Zytoplasma von transfizierten Zellen beobachtet. Eine nukleäre Lokalisation konnte dagegen nur in 2-5 % der untersuchten Zellen festgestellt werden. Die Mutation im GXXG-Loop aller vier KH-Domänen führt dagegen zu einer Akkumulation von ZBP1 und IGF2BP2 im Zellkern in nahezu allen analysierten Zellen (>97 %). Überraschenderweise führte die Transfektion der Zellen mit der IGF2BP3-KH1-4 Mutante in nur 30-40 % der Zellen zu einer Kernakkumulation. Des Weiteren wiesen nur 30-40 % der mit ZBP1-KH1+2 transfizierten Zellen eine Lokalisation im Kern auf.

Ergebnisse

Dagegen konnte für 80-90 % der mit IGF2BP2-KH1+2 transfizierten Zellen eine Kernakkumulation ermittelt werden.

Die Mutation im GXXG-Loop der KH3+4 Domäne beeinflusst die Anreicherung im Kern für ZBP1 und IGF2BP2 gleichermaßen (70-95 %).

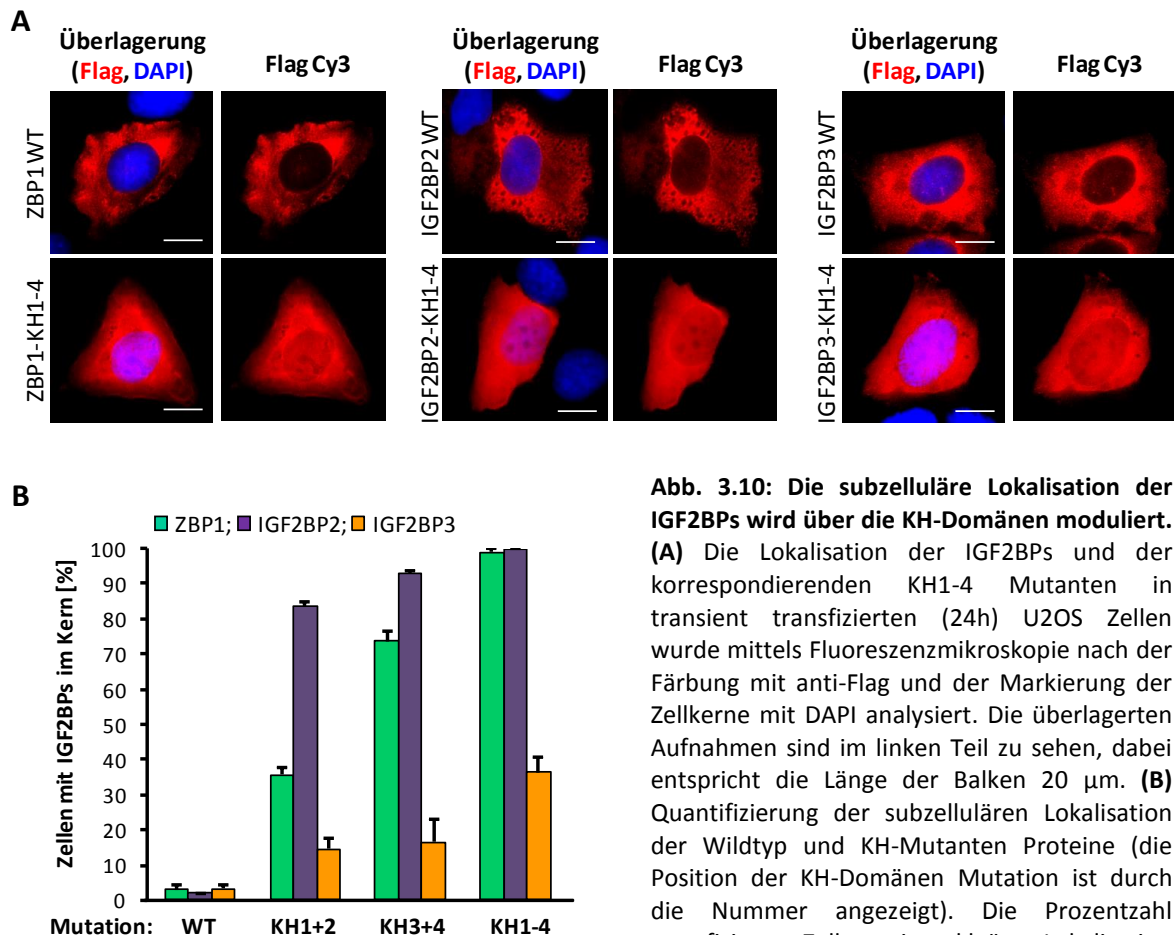


Abb. 3.10: Die subzelluläre Lokalisation der IGF2BPs wird über die KH-Domänen moduliert.

(A) Die Lokalisation der IGF2BPs und der korrespondierenden KH1-4 Mutanten in transient transfizierten (24h) U2OS Zellen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie nach der Färbung mit anti-Flag und der Markierung der Zellkerne mit DAPI analysiert. Die überlagerten Aufnahmen sind im linken Teil zu sehen, dabei entspricht die Länge der Balken 20 μm . **(B)** Quantifizierung der subzellulären Lokalisation der Wildtyp und KH-Mutanten Proteine (die Position der KH-Domänen Mutation ist durch die Nummer angezeigt). Die Prozentzahl transfizierter Zellen mit nukleärer Lokalisation wurde in drei unabhängigen Analysen bestimmt ($n > 90$ Zellen); (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

Um auszuschließen, dass die subzelluläre Lokalisation auf einer unterschiedlich starken Expression der verschiedenen Proteine beruht, wurde die Abundanz der Wildtyp IGF2BPs sowie der KH-Mutanten zusätzlich mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.11). Diese Untersuchung ergab lediglich leichte Expressionsunterschiede der einzelnen Proteine, die jedoch keine Lokalisationseffekte rechtfertigen.

Ergebnisse

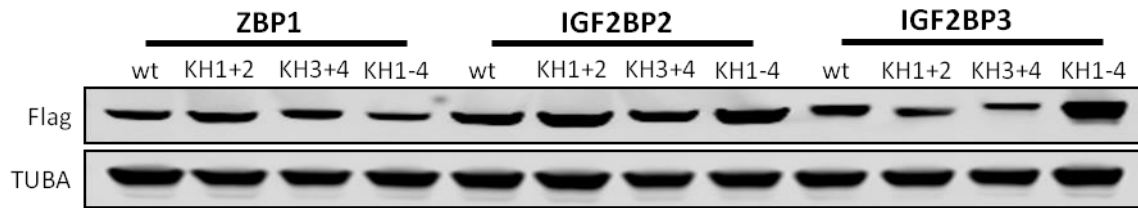


Abb. 3.11: Die Expression der Flag-markierten Proteine in transient transfizierten U2OS Zellen, wurde mittels Westernblot analysiert. Tubulin (TUBA) diente als Ladekontrolle (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die hier ermittelten Lokalisationsdaten mit den *in vitro* RNA-Bindungsstudien korrelieren (Abb. 3.5) und nahelegen, dass die RNA-Assoziation durch alle KH-Domänen vermittelt wird und damit eine Retention der IGF2BPs im Zytoplasma bewirkt.

3.1.5 Die KH-Domänen beeinflussen die Protein-Assoziation der IGF2BPs

Es ist bekannt, dass die IGF2BPs zusammen mit anderen RNA-bindenden-Proteinen (RBPs) in größeren funktionellen Einheiten, sogenannten Ribonukleoprotein-Komplexen (mRNPs) fungieren (Jonson et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2009; Jonson et al., 2014). Inwieweit die KH-Domänen Protein-Interaktionen der einzelnen Paralogen vermitteln, ist jedoch weitgehend unerforscht. Um dieser Frage nachzugehen, wurden HEK293 Zellen mit Flag-fusionierten IGF2BPs oder deren KH1-4 Mutanten transient transfiziert. Im Anschluss wurden die assoziierten Proteine co-immunopräzipitiert und mittels Westernblot untersucht. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Abb. 3.12 dargestellt und zeigen, dass die Inaktivierung aller vier KH-Domänen zum Verlust der Interaktion von ZBP1 und IGF2BP2 zu HUR, RHA und HNRNPU führt. Darüber hinaus ist die Protein-Assoziation von ZBP1 und IGF2BP2 im Allgemeinen beträchtlich reduziert (Abb. 3.12 B). Dagegen ist die Interaktion von IGF2BP3 zu anderen Proteinen durch die Mutation im GXXG-Loop aller KH-Domänen nicht bzw. nur wenig gestört.

Für IGF2BP1 konnte gezeigt werden, dass viele Proteine ausschließlich RNA-abhängig interagieren (Weidensdorfer et al., 2009). Um zu untersuchen, dass die hier betrachteten Protein-Assoziationen für alle IGF2BP Paralogen auch tatsächlich über RNA vermittelt werden, wurden die Lysate zunächst mit RNaseA behandelt und assoziierte Proteine co-immunopräzipitiert (Abb. 3.12 C). Im Ergebnis wurde festgestellt, dass die Interaktion zwischen ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 mit HUR, RHA und HNRNPU indirekt über RNA erfolgt.

Ergebnisse

Es ist also anzunehmen, dass die unveränderte Protein-Assoziation der IGF2BP3-KH1-4 Mutanten nicht auf direkte Protein-Interaktionen zurückgeführt werden kann. Demzufolge ist die Mutation in den GXXG-Loops der KH-Domänen nicht ausreichend, um die RNA-Bindung von IGF2BP3 vollständig zu zerstören.

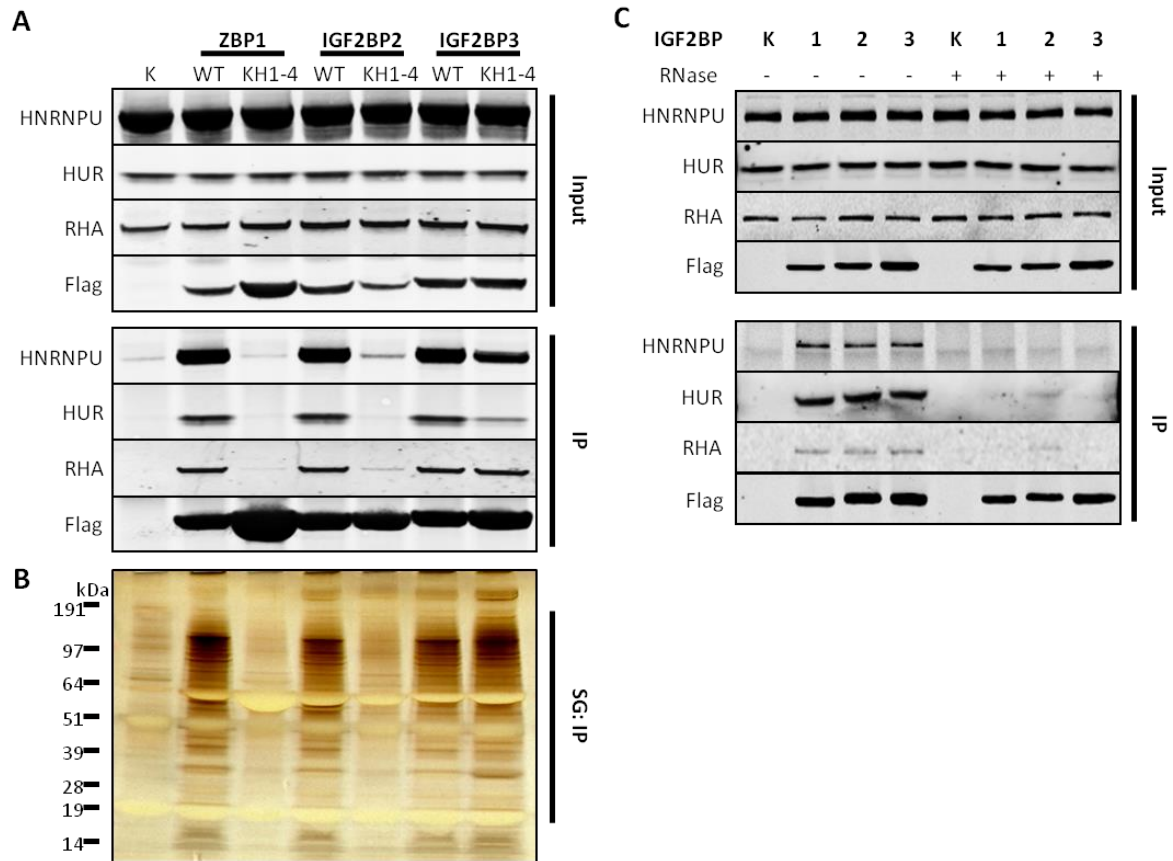


Abb. 3.12: Die KH-Domänen beeinflussen die Protein-Assoziation der IGF2BPs. (A) Immunopräzipitation der Wildtyp oder KH1-4 Mutanten Proteine mittels *Flag-Agarose-beads* aus transient transfizierten (24h) HEK293 Zellen. Die Co-Immunopräzipitation von Proteinen (IP, im unteren Teil) und die Proteinabundanz der Inputs wurden im Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Untransfizierte Zellen dienen als Kontrolle. (B) Auftrennung der Co-Immunopräzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung (SG: IP). (C) HEK293 Zellen wurden mit Flag fusioniertem Wildtyp ZBP1 (1), IGF2BP2 (2) und IGF2BP3 (3) transient transfiziert (24h). Die Co-Immunopräzipitation von Proteinen mit den IGF2BPs (IP) und die Proteinabundanz (Input) wurden im Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. Zelllysate, die vor der Immunopräzipitation mit RNaseA behandelt wurden sind mit (+) gekennzeichnet (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

Übereinstimmend zu den *in vitro* RNA-Bindungsanalysen und Lokalisationsstudien zeigte diese Untersuchung, dass die KH-Domänen in ZBP1 und IGF2BP2 entscheidend zur Funktion der Proteine beitragen. Überdies wurde auch in diesem Experiment deutlich, dass bei IGF2BP3 neben den GXXG-Loops zusätzliche Bereiche innerhalb der KH-Domänen eine funktionelle Rolle spielen.

3.1.6 Die KH-Domänen vermitteln die RNA-abhängige Oligomerisierung der IGF2BPs

Nach bisherigen Erkenntnissen sind die IGF2BPs in der Lage RNA-abhängige Heterodimere zu bilden. Für IGF2BP1 wurde sogar beschrieben, dass eine Homodimerisierung ohne RNA möglich ist (J. Nielsen et al., 2004). Zudem wurde für das Homologe Vg1RBP eine Selbstassoziation gezeigt, welche durch Vg1 mRNA stabilisiert wird (Git und Standart, 2002). Dabei wurde postuliert, dass die KH3+4 Didomäne für die Homodimerisierung von IGF2BP1 und Vg1RBP verantwortlich ist (Git und Standart, 2002; J. Nielsen et al., 2004). Nähere Untersuchungen für Vg1RBP deuten darauf hin, dass die letzte α -Helix der KH4 Domäne über die Bildung einer *coiled-coil* Struktur die Protein-Protein-Wechselwirkungen vermittelt (Oberman et al., 2007).

Um zu prüfen, inwieweit die KH-Domänen in den drei IGF2BP Paralogen für die Oligomerisierung nötig sind, wurde die Assoziation von GFP-markierten Wildtyp IGF2BPs mit Flag-markierten IGF2BPs und IGF2BP KH1-4 Mutanten Proteinen untersucht, indem die Zelllysate von stabil exprimierenden HEK293 Zellen (Flag-markierte Proteine) und U2OS Zellen (GFP-markierte Proteine) gemischt wurden. Übereinstimmend mit vorherigen Studien konnten alle drei IGF2BPs co-immunopräzipitiert werden (Abb. 3.13 A-C). Dagegen konnte keine Co-Immunopräzipitation mit mutiertem IGF2BP KH1-4 Protein oder GFP beobachtet werden. Diese Daten lassen darauf schließen, dass die Fähigkeit zur Bildung homooligomerer Protein-RNA-Komplexe von IGF2BP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 durch die Mutation im GXXG-Loop aller vier KH-Domänen verloren geht.

In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob die Oligomerisierung der IGF2BPs RNA-abhängig ist, indem die Assoziation Flag-markierter Wildtyp IGF2BPs mit GFP-markiertem ZBP1 in RNase behandelten Zelllysaten analysiert wurde (Abb. 3.13 D). Da die Einwirkung der RNase zu einem Verlust der Interaktion von GFP-ZBP1 mit Flag-IGF2BPs führt, kann man schlussfolgern, dass RNA für die Bildung oligomerer IGF2BP-Protein-Komplexe essentiell ist. Die hier durchgeführten Oligomerisierungsstudien mit den IGF2BP-RNA-Bindungsmutanten (IGF2BP KH1-4) und unter RNase-Behandlung, legen nahe, dass es keine stabile, direkte Assoziation der IGF2BP Paralogen untereinander gibt.

Ergebnisse

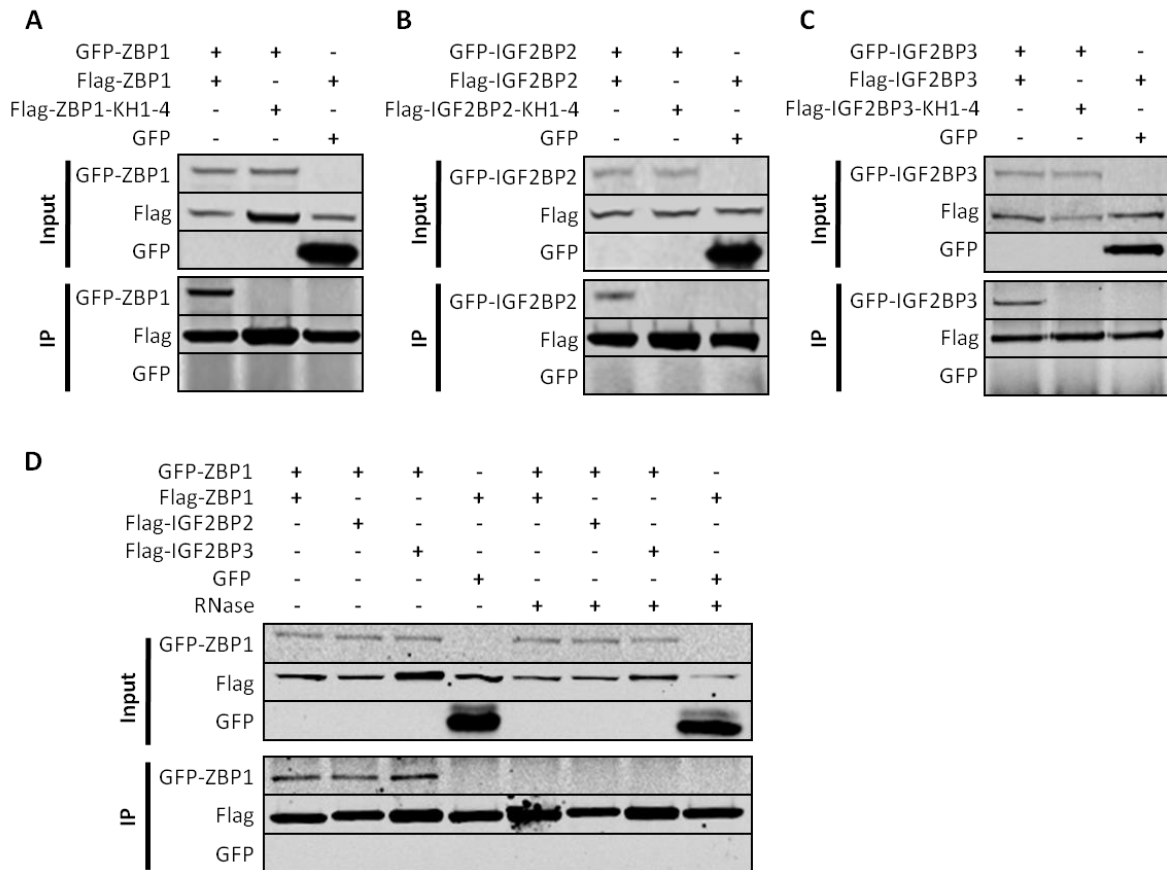


Abb. 3.13: Die KH-Domänen vermitteln die Oligomerisierung der IGF2BPs. (A-C) Die Assoziation der angezeigten Flag-markierten Proteine mit GFP-markierten Wildtyp IGF2BPs wurde analysiert, indem die Extrakte von HEK293 Zellen, welche die angezeigten Flag-markierten Proteine stabil exprimieren, mit Extrakten von U2OS Zellen, welche die angezeigten GFP-markierten Proteine stabil exprimieren, gemischt wurden. Die Protein-Komplexe wurden mittels Flag-Agarose immunopräzipitiert, anschließend wurden die Proteinabundanz (Input) und die co-immunopräzipitierten Proteine (IP) im Westernblot analysiert. Zellen, die GFP stabil exprimieren dienten dabei als Kontrolle. **(D)** Die Co-Immunopräzipitation von GFPZBP1 oder GFP mit den angezeigten Flag-markierten Proteinen wurde durchgeführt, wie in (A-C) beschrieben. Zellysate, die vor der Immunopräzipitation mit RNaseA behandelt wurden sind mit (+) gekennzeichnet (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

3.1.7 Die KH-Domänen vermitteln die Lokalisierung der IGF2BPs in „Stress Granules“

Auf Stresseinwirkungen reagiert die Zelle im Allgemeinen, indem mRNAs aus Polysomen in sogenannten *Stress Granules* (SGs) akkumulieren und dort translationell inhibiert werden (Kedersha et al., 1999, 2002; Anderson und Kedersha 2002). Diverse Studien legen nahe, dass die Assemblierung von SGs zudem durch RBPs, wie TIA1 und G3BP, induziert werden kann (Gilks et al., 2004; Tourriere et al., 2003). Schließlich konnte auch ZBP1 als Komponente von SGs identifiziert werden, was vermuten ließ, dass die Stabilisierung von Ziel-RNAs unter Stresseinwirkung in SGs gewährleistet wird (Stöhr et al.,

Ergebnisse

2006). Nähere Untersuchungen zeigten jedoch, dass sowohl die translationelle Inhibition als auch die Stabilisierung von mRNAs unabhängig von der SG-Bildung ist (Mokas et al., 2009; Hofmann et al., 2012; Bley et al., 2015). Vielmehr wird die Stabilisierung von mRNAs unter zellulärem Stress, durch die Bildung stabiler mRNPs postuliert, welche jedoch von TIA Proteinen und G3BP1 transient in SGs rekrutiert werden können (Bley et al., 2015).

Um zu untersuchen, ob auch IGF2BP2 und IGF2BP3 in SGs lokalisieren und inwieweit die GXXG-Mutation in den KH-Domänen die Rekrutierung in SGs beeinflusst, wurden U2OS Zellen mit den Wildtyp IGF2BPs und den IGF2BP KH1-4 Mutanten Proteinen transient transfiziert und die Bildung von SGs mittels Arsenat-Behandlung induziert. Die mikroskopische Analyse (Abb. 3.14, mit Unterstützung von Dr. N. Bley) zeigt, dass auch IGF2BP2 und IGF2BP3 in TIA1-positiven SGs zu finden sind. Dagegen führt die GXXG-Mutation in den KH-Domänen dazu, dass ZBP1 nicht mehr in SGs lokalisiert und IGF2BP2 nur noch sehr schwach in SGs akkumuliert, und beide Proteine gleichmäßig im Zytoplasma verteilt sind. Für die IGF2BP3-KH1-4 Mutante jedoch, war die Lokalisation in SGs im Vergleich zum IGF2BP3 Wildtyp Protein nur leicht reduziert. Zudem scheint das Protein, im Gegensatz zu ZBP1-KH1-4 und IGF2BP2-KH1-4, geringer im Zytoplasma angereichert zu sein. Dieser Befund stützt die Vermutung, dass IGF2BP3 trotz GXXG-Mutation in den KH-Domänen noch in der Lage ist gewisse Funktionen zu erfüllen, und somit im Vergleich zu ZBP1 und IGF2BP2 nicht die GXXG-Loops der KH-Domänen allein für die RNA-Bindung verantwortlich sind.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass alle KH-Domänen der IGF2BP Paralogen wichtige funktionelle Einheiten für die RNA-Bindung, zytoplasmatische Lokalisation, Protein-Assoziation, Oligomerisierung und Rekrutierung der Proteine in SGs darstellen.

Ergebnisse

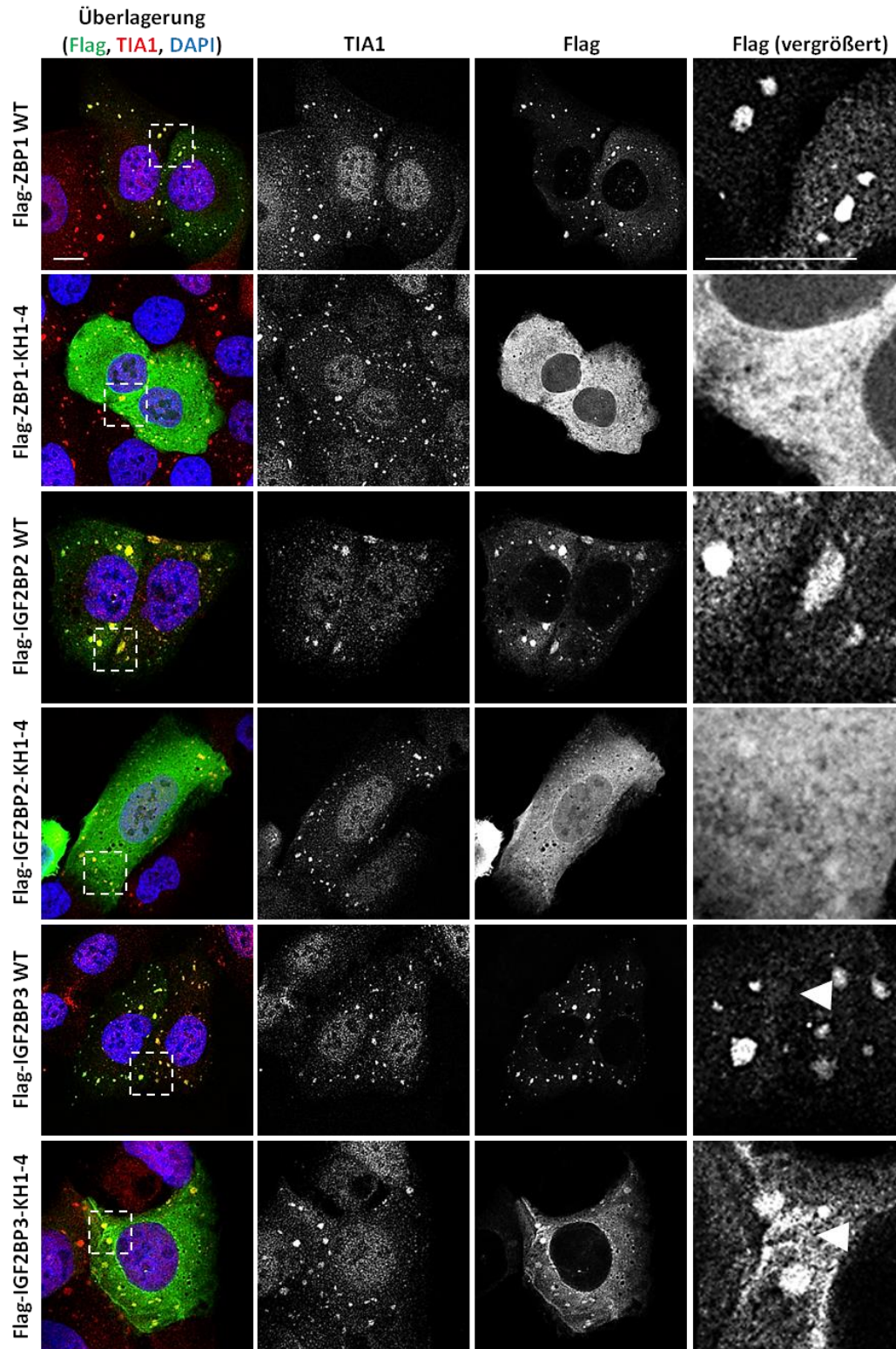


Abb. 3.14: Die Lokalisierung der IGF2BPs in SGs wird Paralog-abhängig durch die KH-Domänen vermittelt. Die Lokalisierung der angezeigten Flag-markierten Wildtyp und KH1-4 Mutanten Proteine wurde in transient transfizierten (24 h) U2OS Zellen untersucht. Die Bildung von SGs wurde durch Arsenat-Behandlung der Zellen (2,5 mM; 1 h) induziert. Die subzelluläre Lokalisierung wurde durch Immunfärbung bestimmt. Die SGs wurden durch die Immunfärbung von TIA1 Protein analysiert; Die Kerne wurden durch DAPI-Färbung markiert. Die Überlagerung ist jeweils im linken Teil der Abbildung zu sehen. Die Vergrößerung der eingerahmten Region in der Überlagerung ist jeweils im rechten Teil der Abbildung zu sehen. Die Länge der Balken entspricht 10 μ m (Daten bereits publiziert in Wächter und Köhn et al., 2013).

3.2. Identifizierung von RNA-Bindemotiven mittels SELEX

Die hier gezeigten Bindungsstudien verdeutlichen, dass die IGF2BPs viele Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer RNA-Bindung aufweisen, aber wie sich die einzelnen Bindemotive zusammensetzen und ob sich diese ähneln, bleibt fraglich. Zu Beginn meiner Arbeit gab es lediglich Hinweise auf mögliche RNA-Bindemotive für die IGF2BPs. So wurde postuliert, dass die Proteine präferentiell an cytidinreiche Bereiche von Ziel-RNAs binden (J. Nielsen et al., 1999) und ZBP1 mit der ACACCC Sequenz im *zipcode* der 3'-UTR von ACTB assoziiert (Ross et al., 1997). Im Verlauf meiner Arbeit wurde mittels PAR-CLIP Methode ein Konsensus-Erkennungsmotiv [CAUH (H=A, U, oder C)] für die IGF2BP Paralogen identifiziert (Hafner et al., 2010).

Für *chicken* ZBP2, ein homologes Protein zum humanen KSRP (*KH domain-containing splicing regulatory protein*), welches ebenfalls mit dem *zipcode* des 3'-UTR von ACTB assoziiert, konnte mit Hilfe des SELEX-Prozesses (**S**ystematic **E**volution of **L**igands by **EX**ponential enrichment) eine Bindung an CCCC- und GUCC-Motive gezeigt werden (Pan et al., 2007). Der SELEX-Prozess wurde im Jahre 1990 von Larry Gold und Andrew Ellington entwickelt und zielt darauf ab hoch affine, spezifische RNA-Aptamere für das entsprechende Protein zu gewinnen (Tuerk und Gold, 1990; Ellington und Szostak, 1990).

In der vorliegenden Arbeit konnte bereits eine Bindung der drei IGF2BP Paralogen an den ACTB *zipcode* und die MYC-CRD nachgewiesen werden (Abb. 3.5). Wie mögliche RNA-Bindesequenzen aussehen und ob sich die RNA-Bindemotive der drei IGF2BP Proteine voneinander unterscheiden, blieb jedoch unerforscht. Um diesen Fragen nachzugehen, wurde der SELEX-Prozess genutzt (Abb. 3.15 A). Dazu wurde zunächst eine Bibliothek aus RNA-Molekülen generiert, welche aus einem Bereich randomisierter Nukleotide (N20 oder N40) und flankierenden, konstanten 5' und 3' Enden bestehen (Abb. 3.15 B). Die RNA-Ausgangsbibliothek (N20/N40 RNA-Pool) wurde dann mit den Proteinen (ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3) inkubiert. Es folgte die Selektion bindender RNAs, deren Amplifikation, *in vitro* Transkription und schließlich die erneute Proteinbindung. Dieser Prozess wurde 10-mal wiederholt (Runde 1-10) und um den Selektionsdruck zu erhöhen, wurde ab der Runde sechs die Proteinkonzentration herabgesetzt.

Ergebnisse

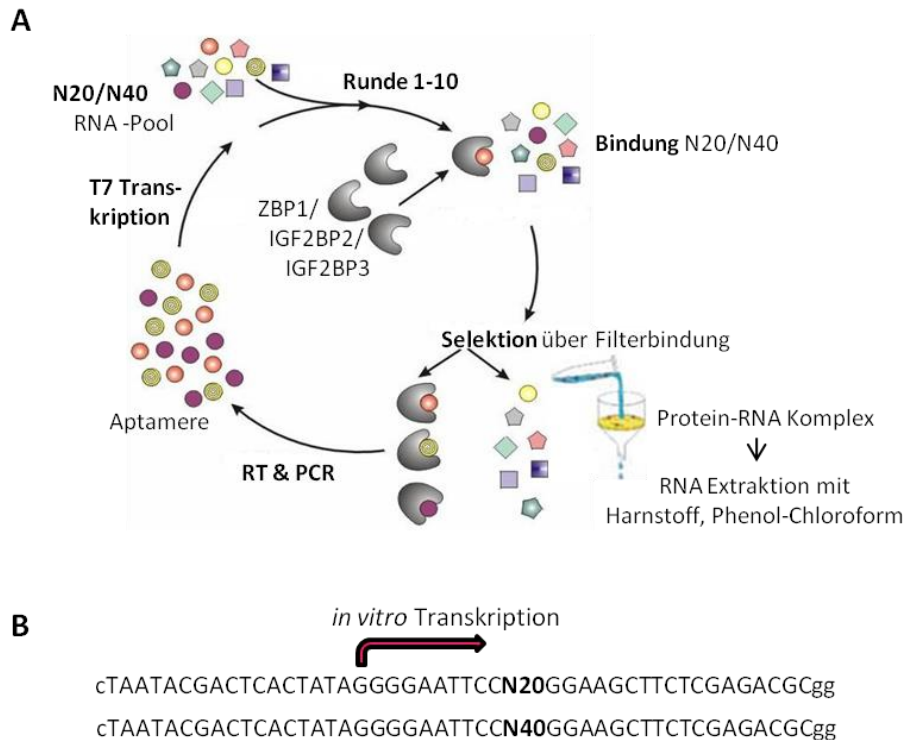


Abb. 3.15: (A) Schematische Darstellung des SELEX-Prozesses (*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*). Eine Bibliothek aus RNA-Molekülen (N20/N40 RNA-Pool) wurde mit den Proteinen (ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3) inkubiert. Über Filterbindung wurden bindende RNAs von restlichen RNAs separiert und anschließend mittels Harnstoff und Phenol-Chloroform vom Filter extrahiert. Es folgte die reverse Transkription, Amplifikation (RT & PCR) und *in vitro* Transkription. Dieser Prozess wurde 10-mal wiederholt (Runde 1-10). Diese Abbildung wurde modifiziert nach Ray und White, 2010. (B) Die RNA-Ausgangsbibliothek bestehend aus randomisierten Nukleotiden (N20 oder N40) und flankierenden, konstanten 5' und 3' Enden.

3.2.1 Validierung der SELEX-Pools mittels Wettbewerbsassay

Um die resultierenden RNA-Aptamere auf ihre Affinität zu prüfen, wurde versucht die Bindung der IGF2BP Paralogen zur Y3 RNA (Köhn et al., 2010) mit Pool-RNA aus den SELEX-Runden 1, 3, 5, 7 und 10 zu kompetitieren. Dazu wurden die einzelnen Proteine zunächst zusammen mit Atto 680 markierter Y3 RNA (von M. Köhn zur Verfügung gestellt) präinkubiert und anschließend ein 10- oder 30-facher Überschuss an Pool-RNA (unmarkiert) zugegeben. Eine erfolgreiche Konkurrenz ist anhand des *shiften* freier Y3 RNA in den unteren Bereich des EMSA-Gels (Pfeil in Abb. 3.16-3.18) erkennbar. Das Ergebnis der Konkurrenz für ZBP1, Y3 und SELEX-RNA-Pools mit 20 randomisierten Nukleotiden (N20) ist in Abbildung 3.16 A zu sehen. Dabei wurde festgestellt, dass die N20-RNA-Pools in der Lage sind die Bindung von ZBP1 zur Y3 RNA zu stören. Des Weiteren kann man beobachten, dass die Affinität der RNA zu ZBP1 von Runde zu Runde zunimmt, da Y3 RNA aus dem ZBP1-Komplex verdrängt werden kann und als freie RNA im EMSA zurück *shiftet*. Vergleicht man

Ergebnisse

die Komplexbildung zwischen Y3-ZBP1 und Y3-ZBP1 nach dem zusetzen der N20-Pool-RNA, so ist die Entstehung zusätzlicher Komplexe (Abb. 3.16 *) erkennbar. Diese Komplexe könnten zum einen aus Y3, ZBP1 und Pool-RNA bestehen oder aber auf Interaktionen zwischen Y3- und Pool-RNA hinweisen. Diese Komplexe sind in Runde 10 jedoch nur noch schwach zu sehen, was zeigt, dass auch intermediäre Komplexe zugunsten der ZBP1-Pool-RNA-Assoziation verdrängt werden. Komplexe aus Y3-ZBP1-N40 Pool konnten dagegen nicht beobachtet werden (Abb. 3.16 B). Betrachtet man jedoch die Konkurrenz mit der N40-Pool-RNA, ist schon nach der ersten Selektionsrunde eine effiziente Verdrängung der Y3 RNA zu sehen, die über die einzelnen SELEX-Runden bis hin zur Runde 10 nur leicht zunimmt. Daraus lässt sich schließen, dass die Affinität der N20-RNA-Aptamere zu ZBP1 durch den Selektionsprozess gesteigert werden konnte, dagegen wurden schon nach einer SELEX-Runde hoch affine N40-RNA-Aptamere gewonnen, deren Affinität sich durch den Selektionsprozess nur noch moderat erhöht hat.

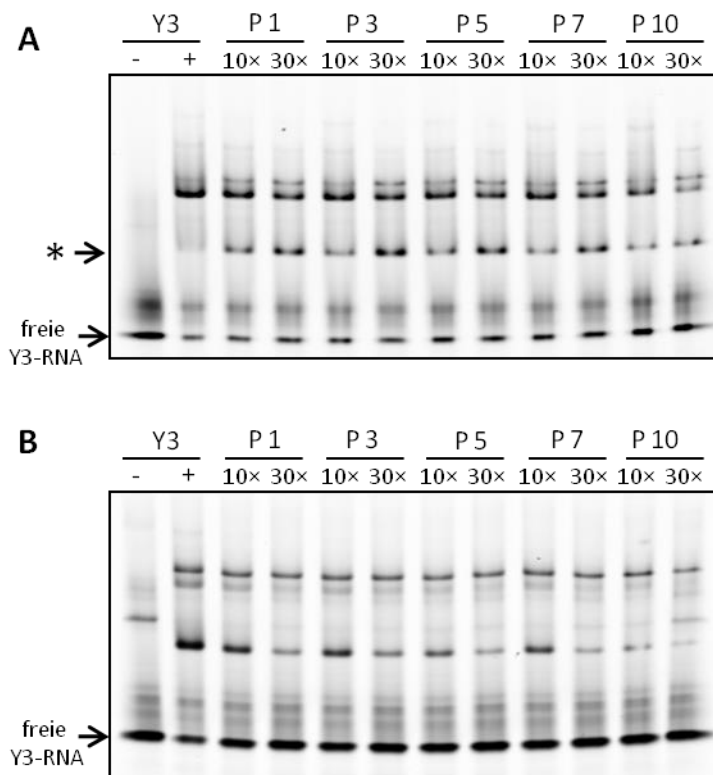


Abb. 3.16: Validierung der ZBP1 SELEX-Pools mittels Konkurrenz. (A) Für RNA-Pools mit 20 randomisierten Nucleotiden (N20) und (B) für RNA-Pools mit 40 randomisierten Nucleotiden (N40). Präinkubation von Atto680 markierter Y3 RNA (50 nM) ohne (-) oder mit (+) ZBP1 (150 nM) und anschließende Konkurrenz durch Zugabe eines 10- oder 30-fachen Überschusses an Pool-RNA verschiedener SELEX-Runden (P1, P3, P5, P7, P10). Die einzelnen Proben wurden im EMSA analysiert. Die freie Y3 RNA wird durch den Pfeil auf der linken Seite des Gels angezeigt; * deutet auf Y3-ZBP1-Pool-RNA Komplexe.

Das Ergebnis der Konkurrenz für IGF2BP2, Y3 und SELEX-RNA-Pools ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Zunächst ist festzuhalten, dass keine Komplexe aus Y3, IGF2BP2, und Pool-RNA, wie für ZBP1 (Abb. 3.16 *) beobachtet werden konnten. Vergleicht man die Konkurrenz von N20 und N40-Pool-RNA, kann man sehen, dass die N40-RNA-Aptamere aus

Ergebnisse

Runde 10 in der Lage sind die Bindung von IGF2BP2 zur Y3 RNA fast vollständig zu verdrängen, dabei konnte die Affinität zu IGF2BP2 über die einzelnen Selektionsrunden signifikant gesteigert werden. Dagegen weist die N20-Pool-RNA eine schwächere Konkurrenz auf, was auf weniger affine Aptamere hindeutet.

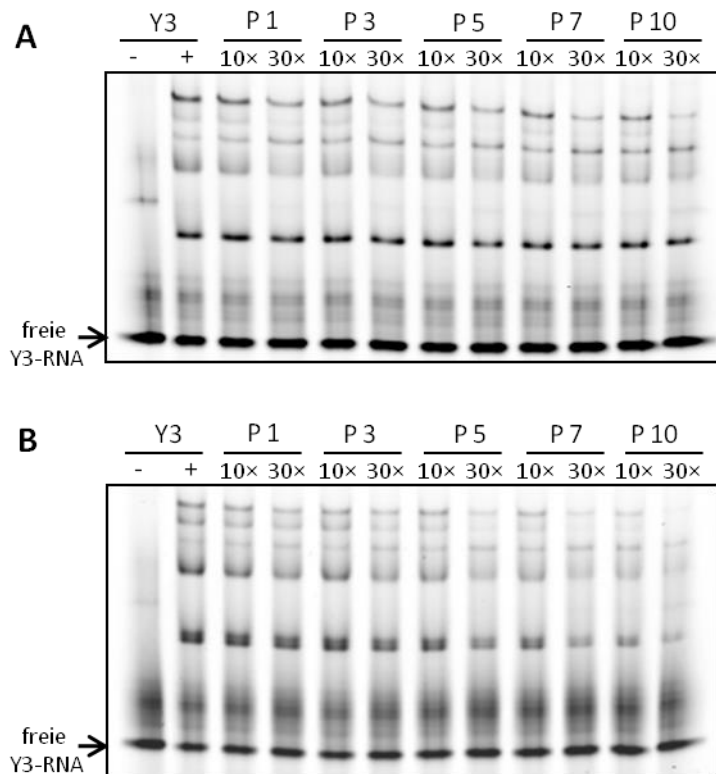


Abb. 3.17: Validierung der IGF2BP2 SELEX-Pools mittels Konkurrenz. (A) Für RNA-Pools mit 20 randomisierten Nucleotiden (N20) und **(B)** für RNA-Pools mit 40 randomisierten Nucleotiden (N40). Das Experiment wurde durchgeführt, wie in Abbildung 3.15. beschrieben. Die freie Y3 RNA wird durch den Pfeil auf der linken Seite des Gels angezeigt.

Das Resultat der Konkurrenz für IGF2BP3, Y3 und SELEX-RNA-Pools ist in Abbildung 3.18 dargestellt. Zunächst ist festzuhalten, dass auch hier keine Komplexe aus Y3, IGF2BP3, und Pool-RNA, wie für ZBP1 (Abb. 3.16 *) beobachtet werden konnten. Eine vergleichsweise schlechte Konkurrenz ist bei der Zugabe von N20-Pool-RNA zu beobachten, da die Bindung von IGF2BP3-Y3 nicht gestört werden kann. Dagegen ist die N40-Pool-RNA zumindest aus Runde 10 in der Lage Y3 zum größten Teil aus dem Komplex zu verdrängen.

Anhand der Konkurrenzanalysen kann man festhalten, dass der Selektionsprozess zur Gewinnung hoch affiner und spezifischer RNA-Aptamere zumindest für ZBP1 und IGF2BP2 erfolgreich war.

Ergebnisse

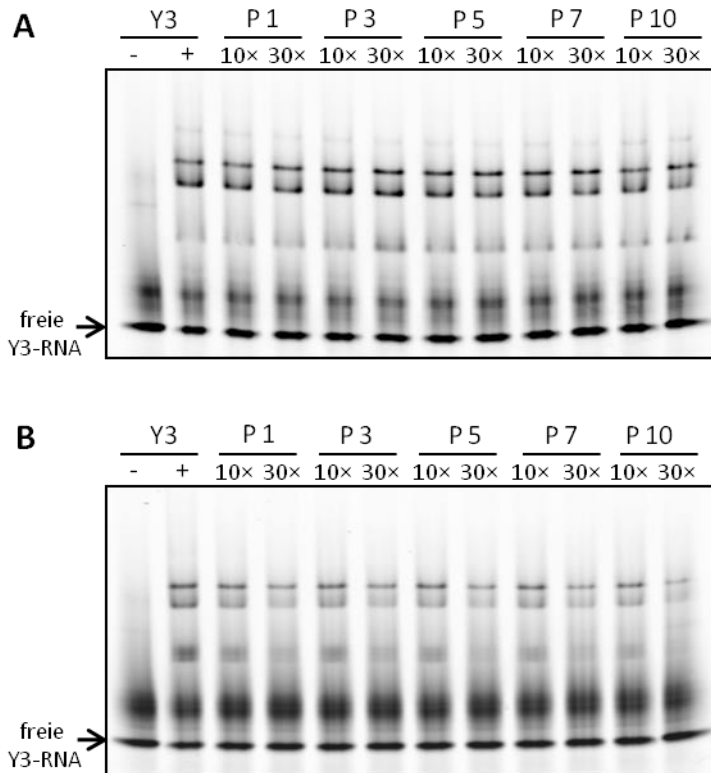


Abb. 3.18: Validierung der IGF2BP3 SELEX-Pools mittels Konkurrenz. (A) Für RNA-Pools mit 20 randomisierten Nucleotiden (N20) und (B) für RNA-Pools mit 40 randomisierten Nucleotiden (N40). Das Experiment wurde durchgeführt, wie in Abbildung 3.15. beschrieben. Die freie Y3 RNA wird durch den Pfeil auf der linken Seite des Gels angezeigt.

3.2.2 Validierung selektierter RNA-Aptamere mittels Filterbindungsassay

Eine weitere Möglichkeit, die Affinität der durch den SELEX-Prozess generierten RNA-Aptamere zum jeweiligen Protein zu prüfen, ist die Filterbindung. Dazu wurde die nach der letzten Selektionsrunde amplifizierte DNA kloniert und sequenziert (Sequenzen, siehe Anhang 7.2). Im Anschluss wurde für ausgewählte Klone das Atto 680 markierte RNA-Aptamer generiert und dessen Bindungsvermögen zum jeweiligen Protein über Filterbindung ermittelt. In Abbildung 3.19 sind die daraus ermittelten K_D -Werte tabellarisch zusammengefasst. Für ZBP1 weist das N20-RNA-Aptamer eine doppelt so hohe Affinität im Vergleich zum N40-RNA-Aptamer auf. Dagegen ist das Bindungsvermögen der jeweiligen N40-RNA-Aptamere für IGF2BP2 und IGF2BP3 besser. Um nähere Aussagen treffen zu können, müssten jedoch weitere RNA-Aptamere auf ihre Affinitäten geprüft werden.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass beide Validierungsmethoden, sowohl der Konkurrenzassay als auch die Filterbindung, ähnliche Tendenzen aufweisen. Diese zeigen, dass für ZBP1 hoch affine N20-RNA-Aptamere und für IGF2BP2 und IGF2BP3 hoch affine N40-RNA-Aptamere generiert werden konnten.

Ergebnisse

	ZBP1 (K_D [nM])	IGF2BP2 (K_D [nM])	IGF2BP3 (K_D [nM])
N20	23 ± 1 (2A1)	102 ± 44 (2B7)	74 ± 7 (1C9)
N40	40 ± 12 (2D8)	21 ± 5 (2E8)	30 ± 3 (3F8)

Abb. 3.19: Über Filterbindung ermittelte K_D -Werte der IGF2BPs zu selektierten RNA-Aptameren (N20 und N40). Die Filterbindung wurde wie in Abb.3.5. beschrieben, durchgeführt (N20- und N40-RNA: 10 nM).

3.2.3 Bestimmung der Nukleotid-Zusammensetzung selektierter Aptamere

Um die Bindungspräferenzen der einzelnen IGF2BPs abschätzen zu können, wurden im nächsten Schritt die sequenzierten Aptamere auf ihre Nukleotid-Zusammensetzung untersucht und mit Sequenzen des Initialpools verglichen (Abb. 3.20). Bei der Bestimmung des prozentualen Anteils selektierter Nukleotide fiel auf, dass die Aptamere aller IGF2BP Paralogen einen geringeren Anteil an Guanosen (14-20 %) im Vergleich zum Initialpool (25 %) aufweisen. Dagegen ist der Anteil an Cytidinen in den selektierten Aptameren angereichert (25-35 %). Dieses Ergebnis stimmt mit bisherigen Hypothesen überein, dass in den Bindemotiven der IGF2BP Ziel-RNAs wenig Guanosin auftritt (J. Nielsen et al., 2004). Zudem wird vermutet, dass die KH-Domänen vorrangig Pyrimidin-Nukleotide erkennen (Backe et al., 2005).

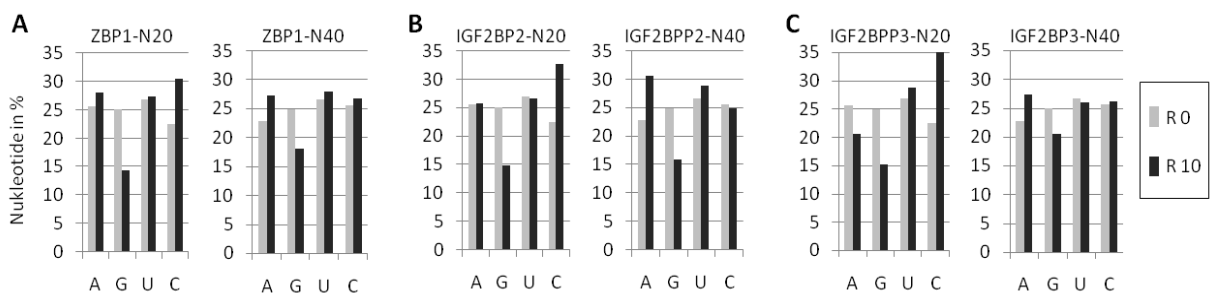


Abb. 3.20: Die Nukleotid-Zusammensetzung der RNAs des Initialpools und selektierter RNA-Aptamere aus Runde 10. Für (A) ZBP1-N20 und -N40, (B) IGF2BP2-N20 und -N40 und (C) IGF2BP3-N20 und -N40. Dazu wurde der Anteil an Adenosin, Guanosin, Uridin und Cytidin (in %) bestimmt.

3.2.4 Alignment selektierter Aptamere und putative Konsensusmotive

Zur Ermittlung möglicher RNA-Bindemotive aus den selektierten RNA-Aptameren, für die einzelnen IGF2BP Paralogen, wurden die Sequenzen aus Runde 10 (siehe Anhang, 7.2) miteinander verglichen und mittels *motif-finder* Programm (MEME) nach putativen

Ergebnisse

Konsensusmotiven gesucht (Bailey und Elkan, 1994). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.21 dargestellt. Für ZBP1-N20 wurden 28 Sequenzen ausgewertet und zwei Hauptmotive identifiziert (Abb. 3.21 A, AUUC ^C/_A und ^U/_C ACGA), welche jeweils in der Hälfte aller Sequenzen (Klone) zu finden sind. Eine weitere interessante Beobachtung konnte in einem Drittel der Klone gemacht werden, da dort beide Hauptmotive in einem Abstand von ein bis vier Nukleotiden vertreten sind (siehe Kasten in Abb. 3.21 A). In 13 von 30 ZBP1-N40 Klonen taucht das UCAU ^A/_U-Motiv auf, und in einem Drittel wurde das A ^U/_G ACG-Motiv gefunden. Um herauszufinden, ob es ein Konsensusmotiv in den für ZBP1 selektierten N20- und N40-Aptameren gibt, wurden alle Sequenzen miteinander verglichen. Es konnte tatsächlich ein sehr abundantes Motiv identifiziert werden, welches in 66 % der N20- und N40-Klone zu finden ist (rechts in Abb. 3.21 A). Dabei ist anzumerken, dass dieses ^A/_C AU ^A/_U C-Motiv in einigen Klonen zweimal enthalten ist. Zudem wurde ein GACU-Motiv identifiziert, das in etwa einem Drittel aller Klone auftritt.

Auch für die IGF2BP2 selektierten N20-Aptamere (n=28) konnten zwei Hauptmotive identifiziert werden, die zusammen in 30 % der Klone vorkommen (Abb. 3.21 B, UUCCC und AU ^A/_G C ^G/_A). In fast 90 % der N40-Aptamere (n=32) ist das AAU ^U/_A C-Motiv, und in 60 % das ^C/_G AU ^C/_G A-Motiv vertreten. Dabei ist anzumerken, dass das erste Motiv in einigen Klonen zweimal, das zweite bis zu dreimal auftritt und beide Motive zugleich in 56 % der Klone in einem Abstand von 3-21 Nukleotiden zu finden sind (siehe Anhang, 7.2 IGF2BP2, N40). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass durch den SELEX-Prozess hoch affine und spezifische Aptamere generiert werden konnten, die zum Teil mehrere Bindestellen aufweisen. In über der Hälfte aller IGF2BP2 selektierten N20- und N40-Klone (55 %) wurde das AU ^A/_G CG-Motiv, und in 43 % das AC ^G/_A AC-Motiv gefunden.

Durch das Alignment der IGF2BP3 selektierten N20-Aptamere (n=27) wurden ebenfalls zwei Hauptmotive identifiziert, die in 30 % der Klone kombiniert auftreten (Abb. 3.21 C, U ^U/_G CA und UCCC). Dabei handelt es sich jedoch, im Vergleich zu den ZBP1 und IGF2BP2 selektierten Klonen, um Motive die nur vier Nukleotide enthalten. Für die IGF2BP3-N40 Klone (n=29) konnte zum einen das AUACG-Motiv (72 %) und zum anderen das GUG ^A/_C ^U/_A (59 %) ermittelt werden. Weiterhin ist festzustellen, dass das erste Motiv in den Klonen jeweils nur einmal, das zweite in einigen Klonen zweimal auftritt und beide Motive zugleich in 55 % der Klone in einem Abstand von 2-14 Nukleotiden zu finden sind. Das erste Motiv ist dabei von größerer Bedeutung, da es keine Alternativ-Nukleotide enthält und ebenfalls in

Ergebnisse

einigen N20-Aptameren auftaucht (N20- und N40-Alignment: 43 %). Insgesamt ergab das Alignment aller IGF2BP3 selektierten Sequenzen jedoch im Vergleich zu den ZBP1- und IGF2BP2-Aptameren, weniger dominante Motive (AUACG: 43 % und UCCC^U/_A: 34 %).

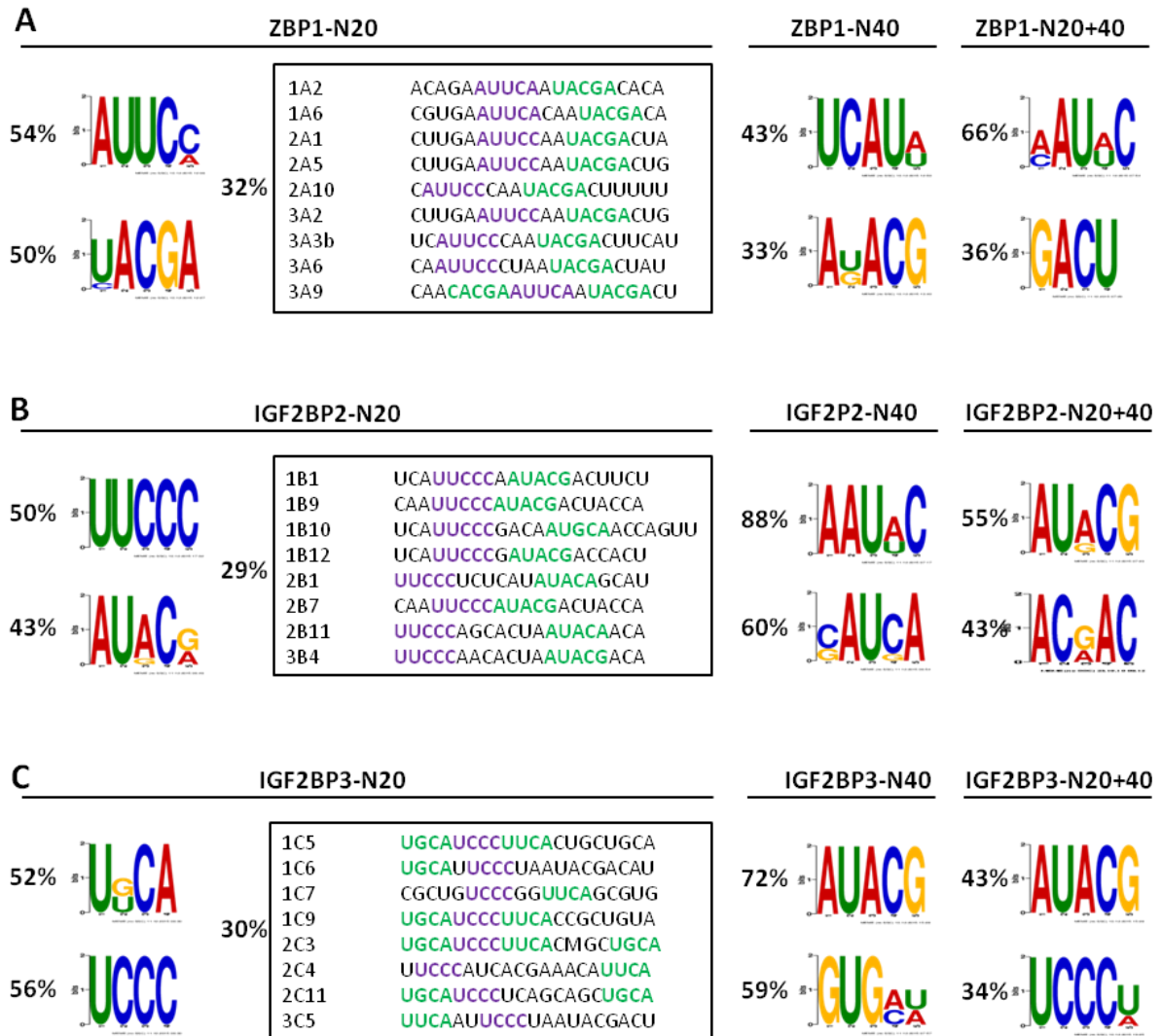


Abb. 3.21: Putative Konsensusmotive der RNA-Aptamere, spezifisch für (A) ZBP1, (B) IGF2BP2 und (C) IGF2BP3. Dazu wurden die sequenzierten Aptamere aus der SELEX Runde 10 mittels *motif finder*-Programm (MEME; Bailey und Elkan, 1994) *alignt* (ZBP1-N20: n=28, ZBP1-N40: n=30, IGF2BP2-N20: n=28, IGF2BP2-N40: n=32, IGF2BP3-N20: n=27, IGF2BP3-N40: n=29). Die Prozentzahl spiegelt die Abundanz der jeweiligen Motive in den RNA-Aptameren wider. Dabei enthalten einige N20-Aptamere eine Kombination aus zwei Motiven (Sequenzen im Kasten; Motiv 1 ist in lila, Motiv 2 ist in grün dargestellt; Prozentzahl links neben Kasten). Die Motive aus dem Alignment von N20 und N40 Aptameren sind im rechten Teil der Abbildung dargestellt.

Eine wichtige Voraussetzung für die Bindung der KH-Domäne an ein RNA-Motiv ist, dass dieses in einer einzelsträngigen Konformation vorliegt (Valverde et al., 2008). Um zu prüfen, ob die ermittelten, putativen Konsensusmotive zugänglich für die IGF2BP-Proteine sind, wurden die Aptamere aus der SELEX-Runde 10 mittels *RNAfold* Programm (*Vienna RNA*

Ergebnisse

Websuite; Gruber et al., 2008) einer Strukturanalyse unterzogen. Im Ergebnis wurde festgestellt, dass sich laut Sekundärstruktur-Vorhersage die Konsensusmotive zumeist in den einzelsträngigen *Loop*-Regionen der Aptamere befinden. Zur Veranschaulichung ist in Abbildung 3.22 die putative Sekundärstruktur repräsentativer N20- und N40-Aptamere spezifisch für ZBP1 (A, D), IGF2BP2 (B, E) und IGF2BP3 (C, F) dargestellt. Die aus den vorhergesagten Strukturen resultierende freie Energie der RNA Aptamere liegt zwischen -7,17 kcal/mol und -14,25 kcal/mol. Kürzlich erschien eine Publikation in der auf die Wichtigkeit der Sekundärstruktur der ACTB *zipcode* RNA für die ZBP1 Bindung verwiesen wurde (Kim et al., 2015). Jedoch besitzt die vorhergesagte Struktur dieser RNA eine freie Energie von -4,0 kcal/mol. Folglich konnten durch den hier durchgeführten SELEX-Prozess vergleichsweise faltungsstabilere Aptamere selektiert werden, wobei die N40-Aptamere vermutlich zu stärkeren Sekundärstrukturen neigen. Überdies ist eine wichtige Grundvoraussetzung für die Bindung der IGF2BPs an die selektierten Aptamere gegeben, da die Basen der meisten Konsensusmotive ungepaart vorliegen.

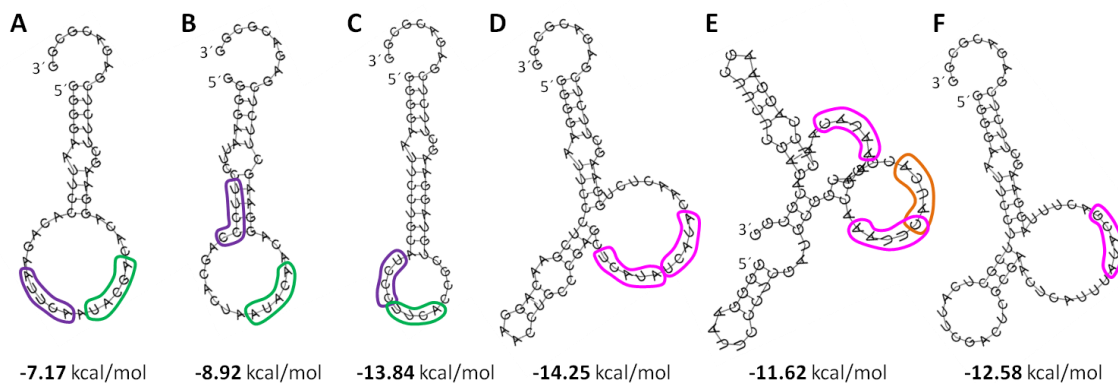


Abb. 3.22: Faltung der N20 (A-C) und N40 RNA-Aptamere (D-F), spezifisch für ZBP1 [(A) 1A2, (D) 2D6], IGF2BP2 [(B) 2B11, (E) 1E2] und IGF2BP3 [(C) 1C9, (F) 3F10]. Die putative Sekundärstruktur der sequenzierten Aptamere aus der SELEX Runde 10 wurde mittels *RNAfold* Programm (*Vienna RNA Websuite*; Gruber et al., 2008) generiert. Die putativen Konsensusmotive in jedem Aptamer sind farblich markiert. Im unteren Teil der Abbildung ist die resultierende freie Energie der vorhergesagten Struktur notiert.

3.2.5 Konsensusmotive in Ziel-RNAs von IGF2BP1

Um herauszufinden, ob die durch den *in vitro* Prozess ermittelten Konsensusmotive tatsächlich eine Rolle in der Vermittlung der Bindungsspezifität spielen und inwieweit „natürlich“ vorkommende Motive generiert werden konnten, wurde die Abundanz der Motive in einigen bekannten Ziel-RNAs der IGF2BPs bestimmt und mit dem erwarteten Auftreten verglichen (Abb. 3.24). Dabei ist anzumerken, dass lediglich die RNAs untersucht wurden, bei denen die *cis*-Elemente bekannt oder zumindest näher eingegrenzt sind (Sequenz-Bereiche, siehe Anhang 7.3.1). Die RNA-Sequenzinformation wurde mittels Nutzung der NCBI-Datenbank erhalten (NCBI Resource Coordinators, 2016; www.ncbi.nlm.nih.gov).

Das Motiv AUUC^C/_A ist im 3'-terminalen Bereich der untranslatierten H19 RNA, dem 3'-UTR der CD44 mRNA sowie in der kodierenden Region der MDR1 mRNA zu finden und tritt dabei jeweils häufiger als erwartet auf. Das U^U/_CACGA Motiv kommt in der H19 RNA, dem 3'-UTR der TAU mRNA, sowie in der lncRNA (*longnoncoding*) HULC vor, wobei lediglich in der H19 RNA eine Anreicherung beobachtet wurde (Abb. 3.24). Bei genauer Betrachtung des 3'-terminalen Bereiches der H19 RNA stellte sich heraus, dass sich beide Hauptmotive (AUUC^C/_A; U^U/_CACGA) in unmittelbarer Nähe zueinander befinden, ähnlich wie in den selektierten Aptameren (Abb. 3.23). Überdies konnte im 3'-UTR der ACTB mRNA diese Abfolge von Motiven gefunden werden. Diese befinden sich allerdings strangabwärts vom ACTB *zipcode*, weitere Bindestellen im 3'-UTR von ACTB sind neben dem *zipcode* also durchaus denkbar.

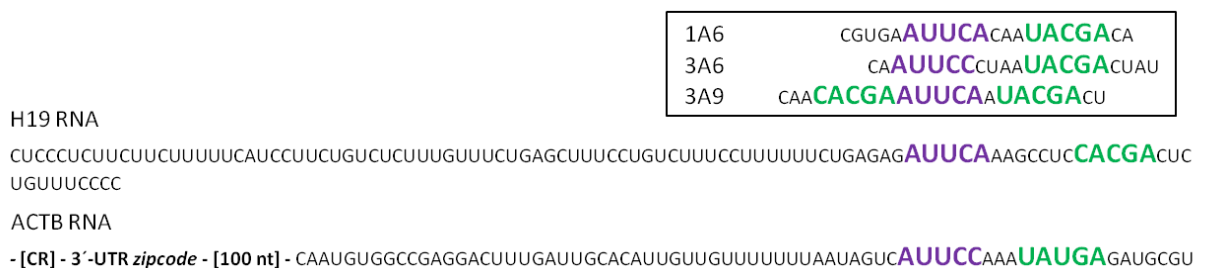


Abb. 3.23: Die ZBP1-SELEX-Konsensusmotive, in lila und grün dargestellt (siehe Kasten), sind in der H19 RNA (101 nt, im 3'-Bereich; J. Nielsen et al., 2004) und der ACTB RNA (im 3'-UTR, 148 nt strangabwärts vom *zipcode*) vertreten.

Das UCAU^A/_U Motiv ist in der CRD der MYC mRNA, dem 5'-UTR der IGF2 mRNA, dem 3'-UTR der TAU mRNA, dem 3'-UTR der CD44 mRNA sowie in der CR der MDR1 mRNA zu finden und kommt in den genannten mRNAs, mit Ausnahme der IGF2 mRNA, häufiger vor als erwartet

Ergebnisse

(Abb. 3.24). Dagegen wurde das A^U/G ACG Motiv nur im 5'-UTR der IGF2 mRNA gefunden, wobei keine Anreicherung festgestellt wurde. Das A^U/C AU A^U/U C Motiv tritt in den mRNAs MYC, IGF2 (5'-und 3'-UTR), TAU, CD44, MDR1 und der lncRNA HULC auf, ist jedoch lediglich im 3'-UTR der IGF2 mRNA, der CD44 mRNA sowie der MDR1 mRNA abundanter als erwartet.

In den mRNAs MYC, ACTB (*zipcode*), IGF2 (5'-UTR), TAU, CD44 (3'-UTR) sowie der nichtkodierenden Y3 und H19 RNA ist das Motiv GACU zu finden, allerdings ist es nur im ACTB *zipcode* und der CD44 mRNA sowie in der Y3 und H19 RNA häufiger vertreten als erwartet (Abb. 3.24). Jedoch ist anzumerken, dass sich dieses Motiv unmittelbar (5 nt) vor einem seltenen Kodon-Bereich (CGG, CGA, CGA; nach Zhang et al., 1991) innerhalb der MYC-CRD befindet. Das Auftreten eines putativen Bindemotives in diesen Bereichen stützt die Hypothese, dass IGF2BP1 an Ribosomen-freien Regionen der MYC-CRD bindet und diese damit vor endonukleolytischen Angriffen schützt (Lemm und Ross, 2002).

Ziel-mRNA	cis-Element [nt]	Referenz	SELEX-Motive (erwartete; tatsächliche Abundanz)					
			AUUC ^C /A	^U /C ACGA	UCAU ^A /U	A ^U /G ACG	A ^U /C AU ^A /U C	GACU
MYC	CRD [250 nt]	1, 2			0,5; 1		1,0; 1	1,0; 1
ACTB	3'-UTR [100 nt]	3, 2						0,4; 2 ^(*)
IGF2	5'-UTR [752 nt]	4			1,5; 1	1,5; 1	2,9; 2	2,9; 2
	3'-UTR [86 nt]	5					0,3; 1	
H19	3'-Bereich [101 nt]	5, 6	0,2; 1 ^(*)	0,2; 1 ^(*)				0,4; 1
TAU	3'-UTR [671 nt]	7, 8, 9		1,3; 1	1,3; 2		2,6; 2	2,6; 1
CD44	(1) 3'-UTR [325 nt]	10	0,6; 1		0,6; 1			
	(2) 3'-UTR [194 nt]	10	0,4; 1		0,4; 1			0,8; 1
	(3) 3'-UTR [309 nt]	10	0,6; 1		0,6; 1			
	(4) 3'-UTR [207 nt]	10			0,4; 2 ^(*)			0,8; 1
	(5) 3'-UTR [292 nt]	10	0,6; 3 ^(*)		0,6; 2		1,1; 3	1,1; 2
MDR1	CR [217 nt]	11	0,4; 1		0,4; 1		0,9; 2	
Y3	[102 nt]	12						0,4; 1
HULC	[500 nt]	13		1,0; 1			2,0; 1	

Abb. 3.24: Die Abundanz der SELEX-Motive in einigen bekannten Ziel-RNAs von IGF2BP1. Die Position und Größe des durch IGF2BP1 gebundenen cis-Elementes sowie die Literatur-Referenz [1.) Bernstein et al., 1992; 2.) Wächter und Köhn et al., 2013; 3.) Ross et al., 1997; 4.) J. Nielsen et al., 1999; 5.) J. Nielsen et al., 2004; 6.) Runge et al., 2000; 7.) Sadot et al., 1994; 8.) Behar et al., 1995; 9.) Atlas et al., 2004; 10.) Vikesaa et al., 2006; 11.) Sparanese et al., 2007; 12.) Köhn et al., 2010; 13.) Hämmerle et al., 2013] wurden aufgelistet. Zur Ermittlung der erwarteten Abundanz wurde eine Gleichverteilung jedes einzelnen Nukleotids angenommen und die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der die SELEX-Motive im jeweiligen cis-Element auftreten. Motive, die häufiger als erwartet vorkamen (tatsächliche Abundanz > erwartete Abundanz), sind grau markiert. Bei einem Anreicherungsfaktor (tatsächliche/erwartete Abundanz) ≥ 5 erfolgte die Hervorhebung durch ^(*).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die Motive AUUC^C/_A und UCAU^A/_U als die wahrscheinlichsten Bindemotive für IGF2BP1 herausgestellt haben, da diese in den bekannten *cis*-Elementen der IGF2BP1 Ziel-RNAs häufiger vertreten sind als erwartet.

3.2.6 Konsensusmotive in Ziel-RNAs von IGF2BP2

Die Abundanz der putativen IGF2BP2-Motive in einigen bekannten Ziel-RNAs, ist in Abb. 3.25 dargestellt (Sequenz-Bereiche, siehe Anhang 7.3.2). Das Motiv UUCCC ist im 3'-terminalen Bereich der untranslatierten H19 RNA, dem 5'-UTR der IGF2 mRNA, dem 3'-UTR der LIMS2 mRNA sowie im 3'-UTR der NRAS mRNA zu finden und tritt dabei jeweils häufiger als erwartet auf (Abb. 3.25). Dagegen wurde das AU^A/_G C^G/_A Motiv in der MYC-CRD, im 5'-UTR der IGF2 mRNA und im 3'-UTR der NRAS mRNA gefunden, wobei keine Anreicherung festgestellt wurde. Das AAU^U/_A C Motiv ist sowohl im 5'-UTR der IGF2 mRNA als auch im 3'-UTR der NRAS mRNA zu finden, aber lediglich in der letztgenannten mRNA abundanter als erwartet. In den RNAs ACTB (*zipcode*), Y3, H19, MURF3 (5'-UTR) sowie NRAS ist das Motiv^C/_G AU^C/_G A zu finden, welches jedoch lediglich in der ACTB, Y3 und H19 RNA häufiger auftrat als erwartet (Abb. 3.25). Dagegen wurde das AU^A/_G CG Motiv nur im 5'-UTR der MURF3 mRNA und im 3'-UTR der NRAS mRNA gefunden, wobei keine Anreicherung festgestellt wurde.

Das AC^G/_A AC-Motiv ist in der MYC-CRD, der Y3 und H19 RNA sowie in der IGF2, LIMS2, MURF3 und NRAS mRNA zu finden, wobei es nur in der MYC, Y3, IGF2 und MURF3 RNA häufiger vorkommt als erwartet. Dabei ist anzumerken, dass sich dieses Motiv innerhalb der MYC-CRD in unmittelbarer Nähe zweier seltener Kodone (CGA- 4 nt -AC^G/_A AC- 9 nt -CGC) befindet und ein weiteres AC^G/_A AC-Motiv mit zwei seltenen Kodonen überlappt (**CGA**, **CGA**). Anhand dieses Befundes könnte man vermuten, dass IGF2BP2, ähnlich wie IGF2BP1, durch die Bindung Ribosomen-freier Regionen schützend auf die MYC mRNA wirkt. Ein ähnlicher Mechanismus wird für die Bindung der NRAS mRNA postuliert, bei der IGF2BP2 durch die Assoziation mit dem 3'-UTR der NRAS mRNA (3631 nt) vor microRNA gerichtetem Abbau schützt (Li et al., 2013). Im 3'-UTR dieser mRNA befinden sich zum Beispiel neun *let-7 complementary sites* [(LCS), (Johnson et al., 2005)] und in vier davon sind SELEX-Motive lokalisiert. In der zweiten LCS, die einen Bereich von 26 Nukleotiden umfasst, ist das AU^A/_G C^G/_A vertreten. Die vierte LCS (28 nt) trägt das^C/_G AU^C/_G A-Motiv und die sechste (24 nt) und achte (30 nt) LCS enthält jeweils das Motiv AAU^U/_A C. Die Bindung von IGF2BP2 an diese

Ergebnisse

Konsensusmotive könnte demnach die Assoziation der let-7 microRNA an die genannten LCS blockieren und damit vor Abbau schützen.

Ziel-mRNA	cis-Element [nt]	Referenz	SELEX-Motive (erwartete; tatsächliche Abundanz)					
			UUCCC	AU ^A /G ^G /A	AAU ^U /A ^C	^C /G ^{AU} ^C /G ^A	AU ^A /G ^{CG}	AC ^G /A ^{AC}
MYC	CRD [250 nt]	1		1,0; 1				0,5; 2
ACTB	3'-UTR [100 nt]	1				0,4; 1		
Y3	[102 nt]	2				0,4; 1		0,2; 2 ^(*)
H19	3'-Bereich [585nt]	3, 4	0,6; 1			2,3; 5		1,1; 1
IGF2	5'-UTR [752 nt]	5	0,7; 4 ^(*)	2,9; 1	1,5; 1			1,5; 2
LIMS2	3'-UTR [629 nt]	6	0,6; 1					1,2; 1
MURF3	5'-UTR [700 nt]	6				2,7; 2	1,4; 1	1,4; 6
NRAS	3'-UTR [3631nt]	7	3,5; 6	14,2; 6	7,1; 20	14,2; 13	7,1; 1	7,1; 2

Abb. 3.25: Die Abundanz der SELEX-Motive in einigen bekannten Ziel-RNAs von IGF2BP2. Die Position und Größe des durch IGF2BP2 gebundenen *cis*-Elementes sowie die Literatur-Referenz [1.) Wächter und Köhn et al., 2013; 2.) Köhn et al., 2010; 3.) Runge et al., 2000; 4.) Boudoukha et al., 2010; 5.) J. Nielsen et al., 1999; 6.) Boudoukha et al., 2010; 7.) Li et al., 2013] wurden aufgelistet. Zur Ermittlung der erwarteten Abundanz wurde eine Gleichverteilung jedes einzelnen Nukleotids angenommen und die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der die SELEX-Motive im jeweiligen *cis*-Element auftreten. Motive, die häufiger als erwartet vorkamen (tatsächliche Abundanz > erwartete Abundanz), sind grau markiert. Bei einem Anreicherungsfaktor (tatsächliche/erwartete Abundanz) ≥ 5 erfolgte die Hervorhebung durch ^(*).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass sich die Motive UUCCC und AC^G/A^{AC} als die wahrscheinlichsten Bindemotive für IGF2BP2 herausgestellt haben, da diese in den meisten bekannten *cis*-Elementen der IGF2BP2 Ziel-RNAs häufiger vertreten sind als erwartet.

3.2.7 Konsensusmotive in Ziel-RNAs von IGF2BP3

Die Abundanz der putativen IGF2BP3-Motive in einigen bekannten Ziel-RNAs, ist in Abb. 3.26 dargestellt (Sequenz-Bereiche, siehe Anhang 7.3.3). Das Motiv U^U/G^{CA} ist in der Y3 und H19 RNA sowie im 5'-UTR der IGF2 mRNA, dem 3'-UTR der HMGA2 mRNA, dem 3'-UTR der CCND1 mRNA und dem 3'-UTR der CCNG1 mRNA lokalisiert. Dabei ist eine Anreicherung dieses Motives in Y3, H19, HMGA2 und CCND1 zu verzeichnen. Das UCCC-Motiv tritt in allen untersuchten *cis*-Elementen der IGF2BP3 Ziel-mRNAs auf (siehe Abb. 3.26), mit Ausnahme des ACTB *zipcodes*. Wobei dieses Motiv sowohl in der Y3 und H19 RNA als auch in der IGF2 und CCNG1 mRNA häufiger auftrat als erwartet. Des Weiteren ist anzumerken, dass sich dieses Motiv innerhalb der MYC-CRD, sieben Nukleotide von einem seltenen Kodon befindet und direkt mit einem seltenen Kodon überlappt (CGU- 7 nt- UCCC-G). Diese Beobachtung lässt vermuten, dass auch IGF2BP3 durch die Bindung Ribosomen-

Ergebnisse

freier Regionen schützend auf die MYC mRNA wirkt.

Dagegen wurde das AUACG Motiv lediglich im 3'-UTR der HMGA2 mRNA gefunden, wobei eine Anreicherung festgestellt wurde. Das GUG^A/C^U/A-Motiv ist nur in der Y3 RNA, der IGF2 mRNA, der HMGA2 mRNA und der CCNG1 mRNA vertreten, jedoch in Y3 und HMGA2 angereichert. In der Y3 und H19 RNA sowie der IGF2, HMGA2 und CCNG1 mRNA konnte das UCCC^A/U Motiv identifiziert werden, welches zudem in allen genannten RNAs angereichert ist (Abb. 3.26).

Ziel-mRNA	cis-Element [nt]	Referenz	SELEX-Motive (erwartete; tatsächliche Abundanz)				
			U ^U /GCA	UCCC	AUACG	GUG ^A /C ^U /A	UCCC ^A /U
MYC	CRD [250 nt]	1		1,0; 1			
ACTB	3'-UTR [100 nt]	1					
Y3	[102 nt]	2	0,8; 2	0,4; 1		0,4; 1	0,2; 1 ^(*)
H19	3'-Bereich [173 nt]	3, 4	1,4; 3	0,7; 4 ^(*)			0,3; 2 ^(*)
IGF2	5'-UTR [752 nt]	5	5,9; 3	2,9; 20 ^(*)		2,9; 3	1,5; 6
HMGA2	(1) 3'-UTR [265 nt]	4	2,1; 7	1,0; 1	0,3; 1	1,0; 2	
	(2) 3'-UTR [296 nt]	4	2,3; 2	1,2; 1		1,2; 2	0,6; 1
CCND1	3'-UTR [293 nt]	6	2,3; 5	1,1; 1			
CCNG1	3'-UTR [305 nt]	6	2,4; 2	1,2; 2		1,2; 1	0,6; 2

Abb. 3.26: Die Abundanz der SELEX-Motive in einigen bekannten Ziel-RNAs von IGF2BP3. Die Position und Größe des durch IGF2BP3 gebundenen *cis*-Elementes sowie die Literatur-Referenz [1.) Wächter und Köhn et al., 2013; 2.) Köhn et al., 2010; 3.) Liao et al., 2005; 4.) Jonson et al., 2014; 5.) J. Nielsen et al., 1999; 6.) Rivera Vargas et al., 2014] wurden aufgelistet. Zur Ermittlung der erwarteten Abundanz wurde eine Gleichverteilung jedes einzelnen Nukleotids angenommen und die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der die SELEX-Motive im jeweiligen *cis*-Element auftreten. Motive, die häufiger als erwartet vorkamen (tatsächliche Abundanz > erwartete Abundanz), sind grau markiert. Bei einem Anreicherungsfaktor (tatsächliche/erwartete Abundanz) ≥ 5 erfolgte die Hervorhebung durch ^(*).

Schlussfolgernd kann man sagen, dass sich die Motive UCCC und UCCC^A/U als die wahrscheinlichsten Bindemotive für IGF2BP3 herausgestellt haben, da diese in den meisten bekannten *cis*-Elementen der IGF2BP3 Ziel-RNAs häufiger vertreten sind als erwartet.

Anhand dieser Daten kann man zusammenfassend sagen, dass für die IGF2BP Paralogen unterschiedliche RNA-Bindemotive gefunden werden konnten, jedoch auch einige Gemeinsamkeiten in Bezug auf die Bindungsspezifität festgestellt wurden. Betrachtet man zum Beispiel die N20-Aptamere, so wurden für alle IGF2BPs sehr pyrimidinhaltige Motive selektiert, besonders für IGF2BP2 und IGF2BP3. Dass die IGF2BPs sehr ähnliche Bindungspräferenzen aufweisen, wurde ebenfalls von Hafner und Kollegen gezeigt (Hafner et al., 2010).

3.2.8 Die Identifikation eines SELEX-Konsensusmotivs für alle IGF2BPs

Um ein mögliches Konsensus-Bindemotiv für alle IGF2BP Paralogen zu ermitteln, wurden alle durch den SELEX-Prozess erhaltenen Aptamere miteinander verglichen. Im Ergebnis wurde das AU^A/U^C-Motiv in 68 % der selektierten RNAs identifiziert (Abb. 3.27). Das eingangs erwähnte Konsensus-Motiv der IGF2BPs (CAU^U/C/A), welches mittels PAR-CLIP erhalten wurde, ist lediglich in 55 % der selektierten Aptamere zu finden (Hafner et al., 2010). Dagegen ist das durch Chao und Kollegen identifizierte ZBP1-Bindemotiv, das sich aus 5′-(CGGAC) und 3′-Erkennungselement (C/A CA^U/C) zusammensetzt, nicht vertreten (Chao et al., 2010; Patel et al., 2012).

Damit kommt das SELEX-Motiv verglichen mit dem PAR-CLIP-Motiv wesentlich häufiger in den selektierten IGF2BP-Aptameren vor, obwohl die Auftrittswahrscheinlichkeit des SELEX-Motivs im Vergleich zum PAR-CLIP-Motiv geringer ist. So würde man das SELEX-Motiv nur einmal in 128 Nukleotiden erwarten, während das PAR-CLIP-Motiv einmal in 85 Nukleotiden auftreten müsste. Des Weiteren kommt das SELEX-Motiv in einem Viertel der Aptamere jeweils zweimal vor, wobei der Abstand zwischen zwei aufeinanderfolgenden Motiven 0-23 Nukleotide beträgt. Auch das PAR-CLIP-Motiv ist in einem Fünftel der Aptamere jeweils zweimal in einem Abstand von 0-18 Nukleotiden vertreten. Der von Chao et al. ermittelte Abstand zwischen zwei Erkennungsmotiven beträgt übereinstimmend dazu 10-25 Nukleotide (Chao et al., 2010; Patel et al., 2012). Die Untersuchung der Abundanz beider Motive in den Ziel-RNAs der IGF2BPs ergab jedoch keine Anreicherung (Abb. 3.27).

Motive	Referenz	in SELEX-Aptameren	Abstand zw. 2 Motiven	erwartete; tatsächliche Abundanz in Ziel-RNAs (Anreicherungsfaktor)
SELEX: AU ^A /U ^C	vorliegende Arbeit	68 %	0-23 nt	86; 83 (1,0)
PAR-CLIP: CAU ^U /C/A	Hafner et al., 2010	55 %	0-18 nt	129; 135 (1,1)

Abb. 3.27: Vergleichende Analyse des SELEX- und PAR-CLIP-Motivs. Dazu wurde der prozentuale Anteil des jeweiligen Motivs in den SELEX-Aptameren, der Abstand zwischen 2 Motiven sowie die erwartete und tatsächliche Abundanz in den bekannten *cis*-Elementen der IGF2BP Ziel-RNAs bestimmt (zur Ermittlung der erwarteten Abundanz wurde eine Gleichverteilung jedes einzelnen Nukleotids angenommen und die Wahrscheinlichkeit errechnet, mit der die Motive in allen bekannten *cis*-Elementen der IGF2BP Ziel-RNAs auftreten). Überdies wurde der Anreicherungsfaktor (tatsächliche/erwartete Abundanz) beider Motive ermittelt.

Ergebnisse

Anhand dieser SELEX-Studien konnte gezeigt werden, dass alle drei IGF2BP Paralogen ihre Präferenz für Pyrimidine, im speziellen Cytidine, innerhalb der RNA-Bindemotive teilen (siehe 3.2.4.). Zudem konnte durch diesen SELEX-Prozess das AU^A/U C-Motiv für alle drei Paralogen identifiziert werden. Zum größten Teil jedoch unterscheiden sich die identifizierten Konsensusmotive der IGF2BPs voneinander. Es bleibt allerdings herauszufinden, ob KH-Domänen-spezifische Motive für die einzelnen IGF2BPs selektiert werden konnten.

3.3 Zusammensetzung der IGF2BP-mRNPs

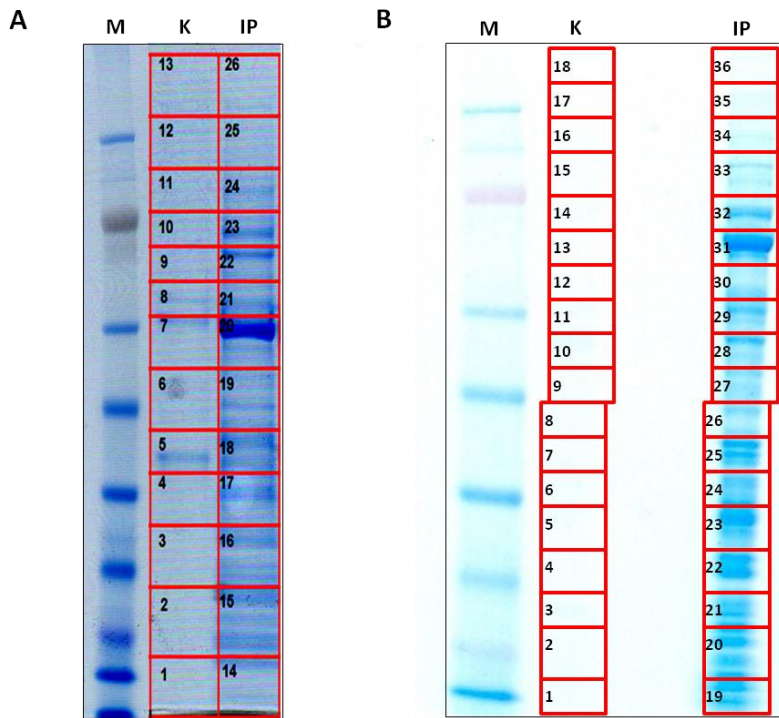
Die bisher präsentierten Ergebnisse geben einen Einblick in den molekularen Mechanismus der RNA-Bindung der IGF2BP Paralogen sowie in die Zusammensetzung möglicher Bindemotive. Im nächsten Schritt stellt sich die Frage, wie sich die funktionelle Einheit der IGF2BPs, der mRNP, zusammensetzen könnte. Das Verständnis über das Zusammenwirken der IGF2BPs mit anderen Proteinliganden könnte schließlich weitere Erkenntnisse zur posttranskriptionellen Genregulation liefern. Es existieren bisher einige Forschungsansätze zur Zusammensetzung IGF2BP enthaltener mRNPs. Pionierarbeit auf diesem Gebiet leistete Jonson et al. im Jahre 2007. Diese Arbeitsgruppe identifizierte etwa 100-300 nm große Partikel, welche *Exon-Junction-Komplex* (EJC) Komponenten (UPF3B, Aly/REF, Y14, eIF4A3), heterogene nukleäre mRNPs (HNRNPA1, A2/B1, D, L, Q, R, U), YB1, NFAR2 und 3, Nukleolin, RNA Helikase A, CBP80, RPS6, PABPs (PABP1, 2 und 4) und ribosomale Proteine der 40S-Untereinheit enthalten.

In weiterführenden Analysen unserer Arbeitsgruppe konnten zudem die RNA-abhängigen ZBP1-Liganden PTBP2, HNRNPE2, HUR, STAU1, STAU2 und DDX3X identifiziert werden. Außerdem wurde anhand von *knockdown*-Analysen gezeigt, dass die Proteine HNRNPU, HNRNPQ, RHA und YBX1 im Komplex mit IGF2BP1 die MYC mRNA über die CRD stabilisieren (Weidensdorfer et al., 2009).

Um ein vollständiges Bild von möglichen ZBP1-Interaktoren zu erhalten wurden zunächst massenspektrometrische-Analysen (MS-Analysen) von zwei unterschiedlichen Zelllinien vorgenommen (in Kooperation mit Dr. M. Krüger, MPI Bad Nauheim). Dazu wurde zum einen Flag-markiertes ZBP1 in HEK293 Zellen und zum anderen GFP-markiertes ZBP1 in U2OS Zellen stabil überexprimiert, aus zytoplasmatischem Zellextrakt immunopräzipitiert und im SDS-Gel aufgetrennt (Abb. 3.28 A und B). Für die MS-Analysen wurden die

Ergebnisse

vollständigen Gel-Spuren der jeweiligen ZBP1-IPs sowie der Kontroll-IPs (naive Zellen) fragmentiert und untersucht. Ein Teil der Ergebnisse ist tabellarisch in Abbildung 3.28 C dargestellt. Dabei wurden die erhaltenen mit den bereits bekannten Daten (Jonson et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2009) verglichen und Interaktoren hervorgehoben, die im Folgenden näher untersucht worden sind.



C

Name des Gens	Ref. Sequenz	HEK293				U2OS			
		Peptide		Intensität		Peptide		Intensität	
		K	IP	K	IP	K	IP	K	IP
IGF2BP1;ZBP1	NP_006537	11	21	3,7E+06	2,6E+07	1	20	0,00E+00	2,14E+07
NCL	NP_005372	8	32	3,8E+05	3,1E+07	1	21	0,00E+00	2,75E+06
HNRNPU;HNRPU	NP_114032	3	29	6,2E+05	8,2E+06	11	39	5,56E+05	7,80E+06
IGF2BP2;IMP2	NP_006539	1	4	2,2E+05	5,3E+06	9	22	2,26E+05	9,19E+06
DHX9;DDX9	NP_001348	0	34	0,0E+00	1,2E+07	14	60	3,53E+05	7,87E+06
IGF2BP3;IMP3	NP_006538	2	7	1,9E+05	7,9E+06	1	4	0,00E+00	4,08E+05
TROVE2;RO60	NP_004591	1	13	0,0E+00	4,4E+06	0	6	0,00E+00	1,16E+04
HNRNPA2B1	NP_112533					6	22	5,16E+04	6,08E+05
ILF3;NF90	NP_036350	1	21	0,0E+00	1,1E+07	6	31	6,03E+04	3,07E+06
MOV10	NP_001123551	1	17	0,0E+00	6,5E+05	0	47	0,00E+00	3,33E+06
HNRNPM;HNRPM	NP_005959					11	38	3,00E+05	5,87E+06
EIF3A;EIF3S10 *	NP_003741	1	27	0,0E+00	1,3E+07	1	61	0,00E+00	2,54E+06
PTBP1;PTB	NP_114368	0	7	0,0E+00	5,1E+05	7	20	9,23E+04	1,99E+06
SYNCRIP;HNRPQ	NP_006363	0	5	0,0E+00	1,5E+05	1	28	0,00E+00	6,66E+06
HNRNPR;HNRPR	NP_005817	1	9	0,0E+00	1,8E+06	2	27	0,00E+00	4,22E+06
YBX1;NSEP1;YB1	NP_004550	1	4	0,0E+00	7,7E+04	4	19	2,28E+05	1,46E+06
MATR3	NP_061322	0	8	0,0E+00	1,7E+05	8	36	2,88E+05	2,75E+06
ELAVL1;HUR	NP_001410	0	3	0,0E+00	8,7E+04	3	11	1,36E+04	8,37E+04

Ergebnisse

HNRNPA3	NP_919223	0	5	0,0E+00	2,1E+05	2	17	1,26E+04	2,28E+05
SSB;La protein	NP_003133	0	8	0,0E+00	1,2E+06	1	14	0,00E+00	8,82E+04
HNRNPE2;PCBP2	NP_114366	0	3	0,0E+00	6,9E+04				
UPF1 *	NP_002902					3	57	1,57E+05	4,31E+06
WIBG;PYM *	NP_001137325	0	3	0,0E+00	4,1E+03				
EIF4A3;DDX48 *	NP_055555	0	2	0,0E+00	2,1E+04				
PABPC1;PABP1 *	NP_002559	1	14	0,0E+00	1,3E+06	15	34	3,90E+05	1,14E+07
THOC4;ALY;BEF *	NP_005773					3	8	1,29E+04	4,41E+04
NXF1;TAP *	NP_006353					0	2	0,00E+00	2,91E+03
RNPS1 *	NP_006702					1	4	0,00E+00	7,87E+03
ACIN1;ACINUS *	NP_055792					1	8	0,00E+00	3,23E+04
ROD1;PTBP3 *	NP_005147					1	9	0,00E+00	2,21E+04
LRPPRC;LRP130	NP_573566	2	14	1,6E+05	7,2E+05	0	69	0,00E+00	1,48E+06
HNRNPD;AUF1	NP_112738	1	2	0,0E+00	1,3E+05	1	14	0,00E+00	4,08E+05
HNRNPAB;ABBP1	NP_112556	1	7	0,0E+00	4,8E+05	1	12	0,00E+00	6,96E+04
HNRNPK;HNRPK	NP_002131	1	11	0,0E+00	2,7E+06	7	21	1,29E+05	1,39E+06
CSDA;DBPA	NP_003642	1	3	0,0E+00	1,4E+05	1	15	0,00E+00	2,15E+05
QKI;HKQ	NP_996735					0	8	0,00E+00	1,01E+04
STAU1	NP_059347	0	3	0,0E+00	9,3E+04	2	26	0,00E+00	5,60E+05
STAU2	NP_055208					0	20	0,00E+00	8,09E+05
DDX3X;DDX3	NP_001347	1	3	0,0E+00	2,5E+04	0	8	0,00E+00	4,34E+04
PABPC4	NP_001129125	1	9	0,0E+00	3,6E+05	7	34	1,66E+04	2,18E+06
HNRNPL;HNRPL	NP_001524	0	5	0,0E+00	2,9E+05	0	19	0,00E+00	3,57E+06
HNRNPA1	NP_112420	4	12	4,6E+05	1,8E+06	1	19	0,00E+00	3,45E+05
ILF2;NF45	NP_004506					7	19	6,51E+04	5,50E+05
NCBP1;CBP80 *	NP_002477	0	9	0,0E+00	6,7E+05	0	17	0,00E+00	2,10E+05

Abb. 3.28: Identifikation von ZBP1 assoziierten Proteinen. (A, B) Kolloidal Coomassie Brillantblau-gefärbte SDS-PAGE von Proteinen, die aus (A) HEK293 Zellen, die Flag-ZBP1 stabil exprimieren, mittels *anti-Flag* Agarose und aus (B) U2OS Zellen, die GFP-ZBP1 stabil exprimieren, mittels *anti-GFP* Agarose kopräzipitiert wurden (IP). Als Kontrolle (K) dienen jeweils naive HEK293 und U2OS Zellen. MS-analytierte Bereiche sind durch rote Kästen angezeigt. (C) Spezifisch angereicherte Proteine der Flag-ZBP1-IP aus HEK293 Zellen und der GFP-ZBP1-IP aus U2OS Zellen (Bedingungen: identifizierte Peptide IP > K; Peak-Intensität IP > K; Peptide in IP \geq 2; Intensität in IP > 1E+03). Für jedes Protein wurden der Name des Gens, die Referenzsequenz, die Zahl identifizierter Peptide sowie die Peak-Intensität angegeben. Näher untersuchte Proteine sind dick hervorgehoben, Faktoren von Pionier-mRNPs sind mit Stern versehen (*), Liganden, die bereits in MS-Analysen identifiziert wurden sind lila (Jonson et al., 2007) und orange (Weidensdorfer et al., 2009) markiert.

Diese MS-Analysen liefern darüber hinaus weitere, wertvolle Informationen zu neuen, möglichen ZBP1-Liganden und somit neuen funktionellen Zusammenhängen (siehe Anhang 7.4., Tab. 1 und 2). So konnten eine Reihe von RNA-bindenden Proteinen wie das Zink-Finger Protein ZFR, Ossa (*oxidative stress-associated Src activator*), LARP1, HNRNPUL1 und 2, HNRNPC, HNRNPL, FMRP, NOVA2, PUM1 und 2 und SERBP1, Spleiß-Faktoren wie U2AF2, PUF60, PRPF31, HNRNPH3, SFRS14, SRm300, SRSF1, dessen Kinase SRPK1, zahlreiche DEAD/H box Helikasen sowie zytoskelettale Proteine wie CKAP5, IQGAP1, MYO1C, FLNC, TUBA3C identifiziert werden. Zudem waren unter den am stärksten in den ZBP1-IPs angereicherten Proteinen, viele Komponenten von RISC-Komplexen (*RNA-induced silencing complex*) und von RISC-assoziierten Funktionen, wie SND1, AGO2, GEMIN4, CKAP4, PUM1

Ergebnisse

und 2, DDX30, DDX36, DDX47 und DDX18. Dieser Befund überrascht wenig, da bereits im Jahr 2007 von Höck et al. eine RNA-abhängige Interaktion zwischen AGO1, AGO2 und ZBP1 sowie IGF2BP3 gezeigt werden konnte (Höck et al., 2007). Ebenso ist das Protein CNOT1, ein kürzlich identifizierter IGF2BP1 Interaktor, welcher den Abbau der bereits erwähnten HULC RNA vermittelt (Hämmerle et al., 2013), stark in den MS-Analysen angereichert (siehe Anhang 7.4., Tab. 2).

Ein interessanter, putativer Proteinligand von ZBP1 ist zum Beispiel das RNA-bindende Protein FAM120A/Ossa (*oxidative stress-associated Src activator*; siehe Anhang 7.4, Tab. 1 und 2), welcher Krebszellen vor Apoptose schützt, indem er Src Kinasen aktiviert (Tanaka et al., 2009). Dieser durch oxidativen Stress induzierte antiapoptotische Signalweg trägt dazu bei, dass Tumorzellen gegenüber klinischer Behandlung resistent werden. Es ist bekannt, dass die RNA-Bindungsaktivität von RBPs durch Phosphorylierung reguliert werden kann (Ostareck-Lederer et al., 2002; Hüttelmaier et al., 2005; Git et al., 2009). Für ZBP1 konnte eine durch Src Kinase vermittelte Tyrosin-Phosphorylierung nachgewiesen werden, welche die zeitliche und räumliche Freigabe der ACTB RNA moduliert (Hüttelmaier et al., 2005). Unter diesem Aspekt könnte man prüfen, ob Ossa mit ZBP1 interagiert und gegebenenfalls dessen Phosphorylierung beeinflusst. Die Feststellung, dass der C-Terminus des Proteins Ossa in der Lage ist die IGF2 mRNA zu binden und die extrazelluläre Sekretion von IGF2 fördert (Tanaka et al., 2009), spricht ebenfalls dafür eine mögliche Interaktion zwischen ZBP1 und Ossa zu untersuchen. Zudem wäre interessant herauszufinden, ob IGF2BP2 mit Ossa interagiert und unter diesem Aspekt ein Zusammenhang zur IGF2-Sekretion besteht. Ein weiterer putativer ZBP1-Proteinligand ist ZFR (*Zinc-finger protein associated with RNA*; Anhang 7.4, Tab. 1 und 2). Für dieses Protein konnte bereits die Interaktion zu NF45 nachgewiesen werden (Wolkowicz und Cook, 2012), wobei NF45 als ZBP1-Ligand bekannt ist (Weidensdorfer et al., 2009). Zudem zeigten jüngste Studien in *C. elegans*, dass ZFR zur Führung von Axonen beiträgt (Kjaergaard et al., 2015). Die Analyse dieser und weiterer putativer ZBP1-Interaktoren, könnte schließlich Ausgangspunkt neuer Forschungsprojekte zur Aufklärung funktioneller Zusammenhänge sein.

3.3.1 IGF2BP1 ist eine Komponente von Pionier-mRNPs

Zwischen einem neu synthetisierten Transkript und einer reifen mRNA für die Proteinsynthese liegen zahlreiche Prozessierungsschritte (Moore und Proudfoot, 2009). Die 5'-Enden dieser Transkripte besitzen eine 5'-m⁷Gppp-Kappen-Struktur, welche zunächst mit dem *cap-binding* Protein (CBP) Heterodimer CBP80-CBP20 assoziiert (Ishigaki et al., 2001). CBP80 und CBP20 bilden zusammen mit den Proteinen der *exon-junction* Komplexe (EJCs) sogenannte Pionier-mRNPs (Lejeune et al., 2002), in denen die mRNA das erste Mal translatiert wird. Dieser Mechanismus sichert die Qualität der Genexpression, da mRNAs mit vorzeitigem Stopp-Kodon (*premature termination codon-PTC*) identifiziert und eliminiert werden können. Dieser translationsabhängige Prozess wird als *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD) bezeichnet, an dem die UPF-Proteine (*nonsense-mediated mRNA decay factor, up-frameshift 1-3*) maßgeblich beteiligt sind (Sun et al., 1998; Lykke-Anderson et al., 2000). Dieser findet statt, wenn das Ribosom während der ersten Translationrunde ein Stopp-Kodon erreicht, welches etwa 50-55 Nukleotide strangaufwärts einer EJC-tragenden Exon-Exon Grenze liegt. Studien haben gezeigt, dass CBP80 direkt mit UPF1 interagiert (Hosoda et al., 2005) und den NMD in zweierlei Hinsicht fördert (Hwang et al., 2010). Zum einen ist diese Interaktion für die Bildung des SURF-Komplexes an einem PTC essentiell, welcher aus SMG1 (*UPF1 phosphoinositide 3-kinase (PIK)-related protein*), UPF1, eRF1 und eRF3 (*eukaryotic release factors*) besteht (Kashima et al., 2006). Zum anderen wird die Assoziation von SMG1 und UPF1 mit einem EJC gefördert, welche zur SMG1-vermittelten Phosphorylierung von UPF1 führt. Phosphoryliertes UPF1 ist schließlich in der Lage über die Bindung von eIF3, einer Komponente des 43S Präinitiations-Komplexes, die Translation zu reprimieren. Zudem fördert modifiziertes UPF1 die Rekrutierung der mRNA Abbau-Maschinerie (Isken et al., 2008).

Die Anwesenheit von CBP80 und EJC-Komponenten in IGF2BP1 enthaltenen mRNPs (Jonson et al., 2007), lässt vermuten, dass IGF2BP1 mit Transkripten assoziiert, welche die Pionier-Translationsrunde nicht durchlaufen haben (Sato et al., 2009). Um dieser Frage nachzugehen wurden zunächst die durchgeführten massenspektrometrischen Analysen auf das Vorhandensein von Komponenten des Pionier-mRNPs geprüft. Übereinstimmend mit den Ergebnissen aus Jonson et al., 2007 sind die Proteine CBP80, eIF4A3, REF/ALY und RPS6 zu finden, zusätzlich sind die Proteine TAP, ACINUS, RNPS1, PYM und UPF1 in den ZBP1

Ergebnisse

Immunopräzipitationen angereichert (Abb. 3.28 C *, Abb. 3.29). Die Proteine eIF3A und PABPC1, welche sowohl Teil von Pionier-mRNPs als auch von Translationskomplexen sind, konnten ebenfalls durch die MS-Analysen identifiziert werden (Abb. 3.28 C *). Zudem ist das RNA-bindende Protein ROD1 (PTBP3), ein UPF1-Interaktor, welcher NMD-Substrate destabilisiert, in der ZBP1 Immunopräzipitation von U2OS Zellen angereichert (Brazao et al., 2012).

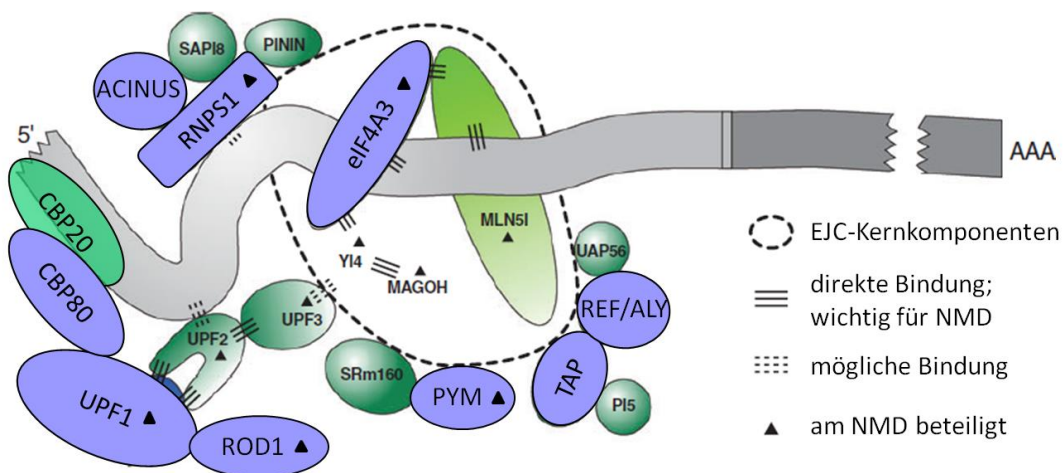


Abb. 3.29: Schematische Darstellung von Komponenten des Pionier-mRNPs (modifiziert nach Chang et al., 2007). Die Proteine eIF4A3, MAGOH, MLN51 und Y14 bilden den RNA-bindenden EJC-Hauptkomplex und interagieren mit anderen EJC-Faktoren und Proteinen, die am NMD beteiligt sind (gekennzeichnet durch schwarzes Dreieck). ZBP1 assoziierte Proteine, die mittels MS-Analysen identifiziert werden konnten sind in blau dargestellt.

In einem weiteren Experiment wurde ZBP1 aus HEK293 Zellen, die Flag-ZBP1 stabil exprimieren, immunopräzipitiert und die kopräzipitierten Proteine mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.30 A). Sowohl das bereits durch die MS-Analysen identifizierte NMD-Protein UPF1 als auch dessen Interaktor eIF3A konnte in Lysaten präzipitiert werden, die nicht mit RNase behandelt wurden. EIF3A bildet mit 12 weiteren Untereinheiten den Translationsinitiationsfaktor eIF3, welcher die Assemblierung des Präinitiationskomplexes fördert und essentiell für den NMD-Prozess ist (Sonenberg und Hinnebusch 2009; Morris et al., 2007). Die Helikase eIF4A, welche in EJC zu finden ist, konnten dagegen nicht präzipitiert werden. Das Protein PYM, welches zum einen mit den EJC-Komponenten Y14-Magoh, und zum anderen mit der 40S ribosomalen Untereinheit interagiert und damit die Translation während der Pionerrunde fördert (Diem et al., 2007), konnte ebenfalls nicht präzipitiert werden. Jedoch bestätigt die RNA-abhängige Interaktion von ZBP1 mit den NMD-

Ergebnisse

Komponenten UPF1 und eIF3A das Vorhandensein von ZBP1 in Pionier-mRNPs. Zudem legt dieses Ergebnis nahe, dass ZBP1 auch mit Transkripten assoziiert, die gerade die erste Translationsrunde durchlaufen. Jedoch sind weitere Untersuchungen nötig, um diese Hypothese abschließend zu belegen.

Der Übergang von der Pionier-Translationsrunde zur *steady-state* Translation ist gekennzeichnet durch eine Remodellierung des mRNPs, bei der die EJs entfernt werden und CBP20-CBP80 an der 5'-Kappe der mRNA durch eIF4E ersetzt wird (Gehring et al., 2009; Isken und Maquat 2008). Da den IGF2BP1 enthaltenen mRNPs Translationsinitiationsfaktoren (eIF4E und G, eIF2 α) und ribosomale Proteine der 60S Untereinheit fehlen, wird postuliert, dass IGF2BP1 nicht in *steady-state* Translationskomplexen zu finden ist (Jonson et al., 2007). Um diese Hypothese zu prüfen, wurde zunächst ein *m⁷GTP-cap-sepharose-pulldown* durchgeführt. Das Prinzip dieses *pulldowns* besteht darin, dass mit einer 7-Methyl-Guanosin-5'-Triphosphat Sepharose-Matrix, Proteine präzipitiert werden können, welche an die 5'-Kappen-Struktur der mRNA binden und somit die Translation initiieren. Der eIF4F Protein Komplex assoziiert mit dieser 5'-Kappen-Struktur der mRNA (Lamphear et al., 1995). Dieser Komplex besteht aus eIF4E, welcher die Kappen-Struktur bindet, der Helikase eIF4A und eIF4G, ein Gerüst-Protein, das mit eIF4E, eIF4A, eIF3 und PABP (*poly(A)-binding protein*) interagiert. Diese Translationsinitiationsfaktoren bilden zusammen mit der kleinen ribosomalen Untereinheit den 43S Präinitiationskomplex (Pestova et al., 2001; Preiss und Hentze, 2003).

Das Ergebnis des *m⁷GTP-cap-sepharose-pulldowns* von HEK293 Zelllysaten ist in der Westernanalyse in Abb. 3.30 B dargestellt. Der Translationsinitiationsfaktor eIF4E, welcher mit der 5'-Kappen-Struktur assoziiert, und dessen Interaktor eIF4G konnten präzipitiert werden. Zu einem geringen Teil konnte außerdem eIF3A in der *pulldown*-Fraktion nachgewiesen werden. Dagegen konnten die Proteine PABP und IGF2BP1 nicht präzipitiert werden. Was darauf schließen lässt, dass IGF2BP1 weder mit der Kappen-Struktur noch mit *cap*-bindenden Proteinen interagiert. Für die Interaktion zwischen PABP und eIF4G wird vermutet, dass es sich um eine schwache Assoziation handelt, welche aufgrund des Reinigungsvorgangs verloren gehen kann (Imataka et al., 1998). Tubulin diente bei diesem Experiment als Negativkontrolle und wurde ebenfalls nicht präzipitiert.

Ergebnisse

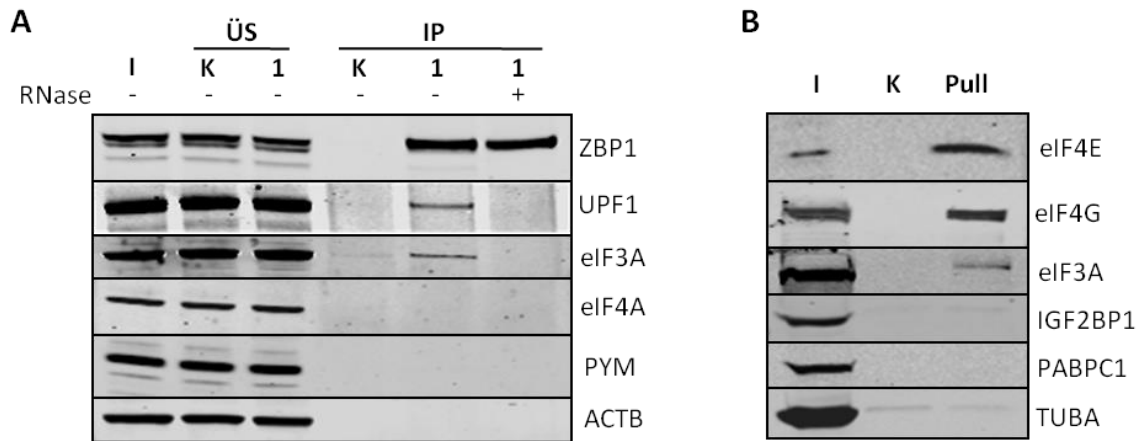


Abb. 3.30: IGF2BP1 ist eine Komponente von Pionier-mRNPs. (A) Immunopräzipitation von ZBP1 (1) aus HEK293 Zellen, die Flag-ZBP1 stabil exprimieren. Auftrennung der Proteine des Inputs (I), der Überstände nach der IP (Üs) und der Immunopräzipitation (IP) im SDS-Polyacrylamidgel und anschließende Analyse mittels Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern (rechts). Als Kontrolle (K) wurde die Immunopräzipitation mit *bead*-Material ohne Antikörper durchgeführt. (B) *m*⁷GTP-cap-sepharose-pulldown von HEK293 Zelllysaten. Gebundene Proteine wurden eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot mit den angezeigten Antikörpern analysiert. Als Kontrolle (K) wurde der *pulldown* mit unmarkierter Sepharose durchgeführt.

Anhand der Studien von Jonson et al. und der vorliegenden Arbeit kann man schlussfolgern, dass ZBP1 bereits in Pionier-mRNPs vorhanden ist und auch mit Transkripten assoziiert, welche gerade die erste Translationsrunde durchlaufen. Diese Vermutung wird zudem durch den Befund gestützt, dass in den durchgeführten MS-Analysen sowohl ribosomale Proteine der 60S als auch der 40S Untereinheit identifiziert wurden (siehe Anhang 7.4., Tab. 3). In den Studien von Jonson et al. dagegen wurden bis auf RPLP0 lediglich ribosomale Proteine der 40S Untereinheit identifiziert.

3.3.2 Sedimentation von IGF2BP1 im 5-20 % Saccharose Gradienten

Es ist bereits durch Arbeiten von Nielsen et al. bekannt, dass endogenes IGF2BP1 im 20-47% Saccharose Gradient im Bereich von 40S bis 150S sedimentiert und nicht mit Polysomen assoziiert ist (J. Nielsen et al., 1999). Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass die RNAs in IGF2BP1 enthaltenen mRNPs sich nicht in der *steady-state* Translation befinden. Um die nicht-translatierten mRNPs besser auflösen zu können, wurde mit einem 5-20 % Saccharose Gradienten gearbeitet, dessen Absorptionsprofil in Abb. 3.31 A dargestellt ist. Die Westernanalyse der einzelnen Gradienten-Fraktionen (Abb. 3.31 B) zeigt, dass IGF2BP1 hauptsächlich in den Fraktionen 5, 6 und 7 zu finden ist und teilweise mit dem ribosomalen Protein S6 (RPS6), eine Komponente der 40S Untereinheit, jedoch nicht mit dem ribosomalen Protein L4, eine Komponente der 60S Untereinheit kosedimentiert. Übereinstimmend dazu ist eine teilweise Kosedimentation von IGF2BP1 mit der 18S rRNA, die Bestandteil der 40S Untereinheit ist. Dagegen sind die 28S und 5,8S rRNA, welche der 60S Untereinheit zuzuordnen sind, nicht in den IGF2BP1-Fraktionen vertreten (Abb. 3.31 C). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den identifizierten ribosomalen Proteinen der 60S Untereinheit durch die MS-Analysen (siehe Anhang 7.4., Tab. 3). Um genaue Aussagen darüber treffen zu können, müsste daher durch Immunopräzipitation die mögliche Interaktion zwischen IGF2BP1 und Proteinen der 60S Untereinheit validiert werden.

Um zu prüfen, wo relevante Ziel-RNAs von IGF2BP1 sedimentieren, wurde die RNA aus jeder Fraktion mittels qRT-PCR vermessen. Das Ergebnis in Abb. 3.31 D zeigt, dass sich zwei RNP-Fraktionen voneinander abgrenzen. Zum einen kann man leichte RNPs, bestehend aus den nicht-kodierenden RNAs Y3 und Y5 [(Fraktion 1-3); (Dissertation, M. Köhn, 2015)] und zum anderen schwerere mRNPs, in denen sich die ACTB und MYC-mRNA befinden, beobachten.

Ergebnisse

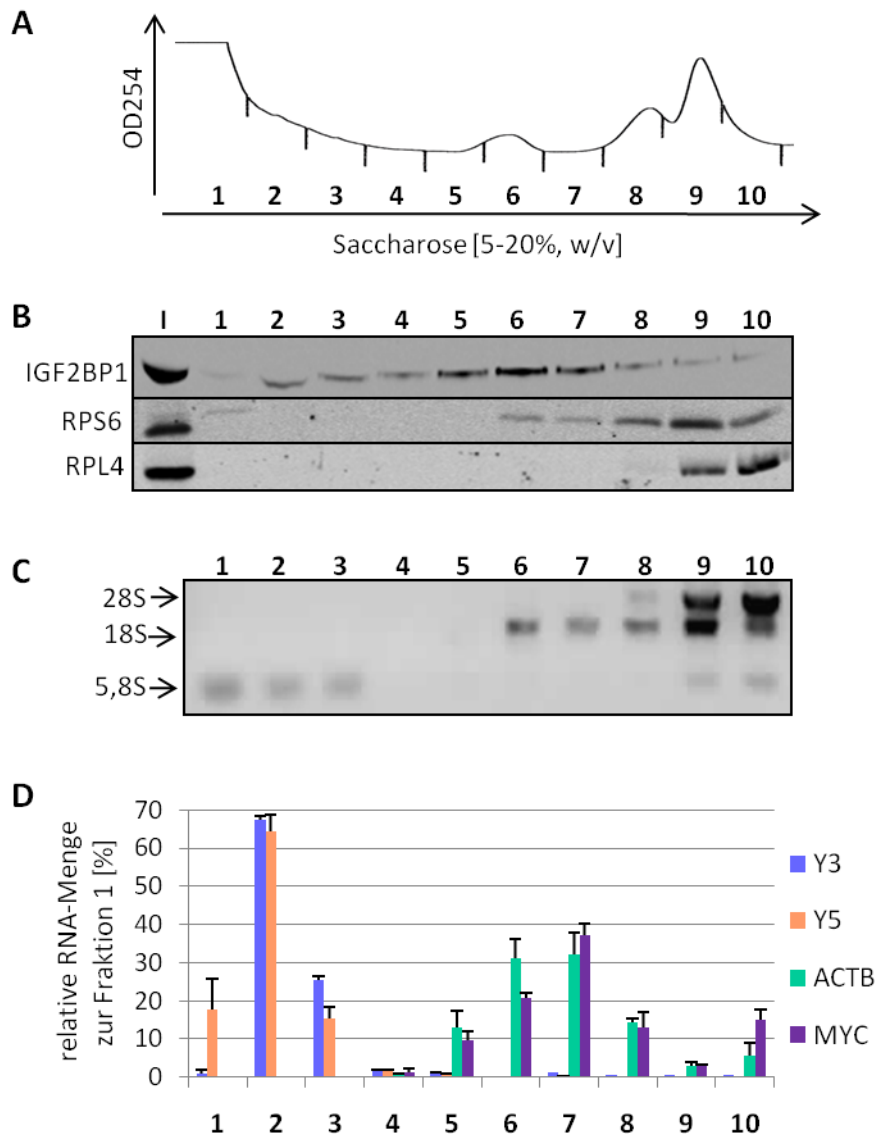


Abb. 3.31: Sedimentationsverhalten von IGF2BP1 im 5-20 % Saccharose Gradienten. Dazu wurde das Zellextrakt von HEK293 Zellen auf einen 5-20 % (w/v) Saccharose Gradienten geschichtet und ultrazentrifugiert (2,5 h). Es folgte die Fraktionierung (1-10) des Gradienten. **(A)** Das Absorptionsprofil der einzelnen Fraktionen wurde bei 254 nm gemessen. **(B)** Die Proteine des Inputs (I) sowie der Fraktionen 1-10 wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (links neben Blot). **(C)** Die ribosomalen RNAs wurden in einem Agarose-Gel aufgetrennt (durch die Pfeile links neben Gel angezeigt). **(D)** Nachdem die RNA aus den Gradienten-Fraktionen extrahiert wurde, erfolgte die Quantifizierung der angezeigten RNAs mittels qRT-PCR. Die RNA-Menge in den Gradientenfraktionen wurde mittels ΔC_t -Methode und Normalisierung auf Fraktion 1 bestimmt (Livak und Schmittgen, 2001). Das Diagramm zeigt die Abundanz der RNAs [%] in den einzelnen Fraktionen von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Analyse der IGF2BP1 enthaltenen RNPs

Um die Zusammensetzung der leichten und schweren RNPs genauer zu untersuchen, wurde ein Lysat aus HEK293 Zellen auf einen 5-20 % (w/v) Saccharose Gradienten geschichtet, ultrazentrifugiert und zunächst hinsichtlich der Verteilung von IGF2BP Protein-

Ergebnisse

Liganden untersucht (Abb. 3.32). Dabei wurde festgestellt, dass die analysierten Proteine HNRNPU, RHA, YBX1, HNRNPM1-4 (Datar et al., 1993), HUR, NCL und MATR3 ebenfalls in den Fraktionen des Gradienten sedimentieren, in denen IGF2BP1 zu finden ist. Die Proteine HNRNPE2 (mehrere Transkriptvarianten), HNRNPA2B1, Ro60 und LA dagegen sedimentieren ausschließlich in den leichten Fraktionen des Gradienten.

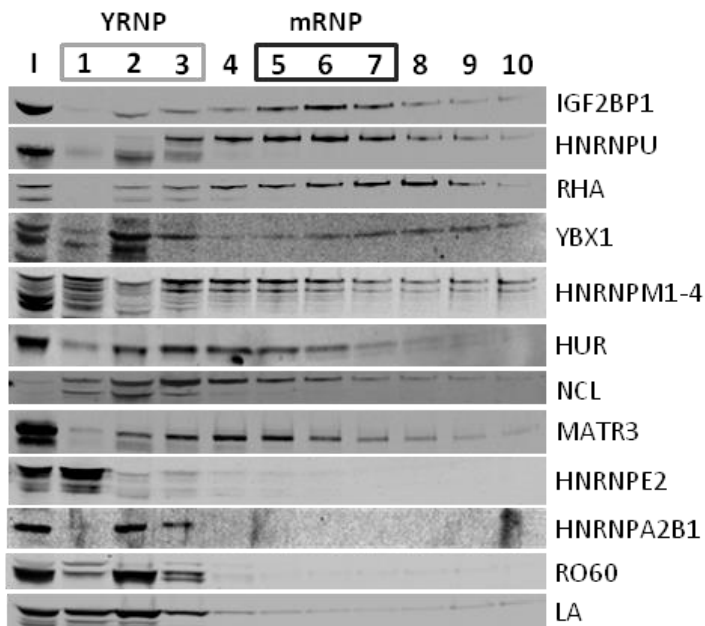


Abb. 3.32: Verteilung von IGF2BP1 Protein-Liganden im 5-20 % Saccharose Gradient. Dazu wurde das Zellextrakt von HEK293 Zellen auf einen 5-20 % (w/v) Saccharose Gradienten geschichtet und ultrazentrifugiert (2,5 h). Es folgte die Fraktionierung (1-10) des Gradienten. Die Proteine des Inputs (I) sowie der Fraktionen 1-10 wurden im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und mittels Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (rechts neben Blot). YRNP-Fraktionen sind durch den hellgrauen, mRNP-Fraktionen sind durch den dunkelgrauen Kasten gekennzeichnet.

Da das Sedimentationsverhalten noch keine Rückschlüsse auf tatsächliche Interaktionen in gemeinsamen RNPs zulässt, wurden die Fraktionen 1-3 sowie 5-7 vereint, endogenes IGF2BP1 mittels spezifischem Antikörper präzipitiert und kopräzipitierte Proteine im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.33). Die bekannten IGF2BP1-Liganden HNRNPU, RHA, YBX1 und HUR aber auch zwei neue IGF2BP1-Interaktoren NCL und MATR3 konnten durch die Immunopräzipitation von IGF2BP1 aus den Fraktionen 5-7 kopräzipitiert werden. Dagegen ist RO60 das einzige Protein, welches aus den Fraktionen 1-3 präzipitiert wurde. Schlussfolgernd kann man feststellen, dass mit Hilfe dieser Methode zwei IGF2BP1 enthaltene RNPs identifiziert werden konnten, die sich in ihrer Zusammensetzung deutlich unterscheiden. Zum einen gibt es Komplexe, bestehend aus nicht kodierenden Y-RNAs, IGF2BP1 und RO60, die fortan als YRNPs bezeichnet werden und zum anderen wurden mRNP-Komplexe identifiziert, welche die mRNAs ACTB und MYC sowie IGF2BP1 und weitere RBPs enthalten.

Ergebnisse

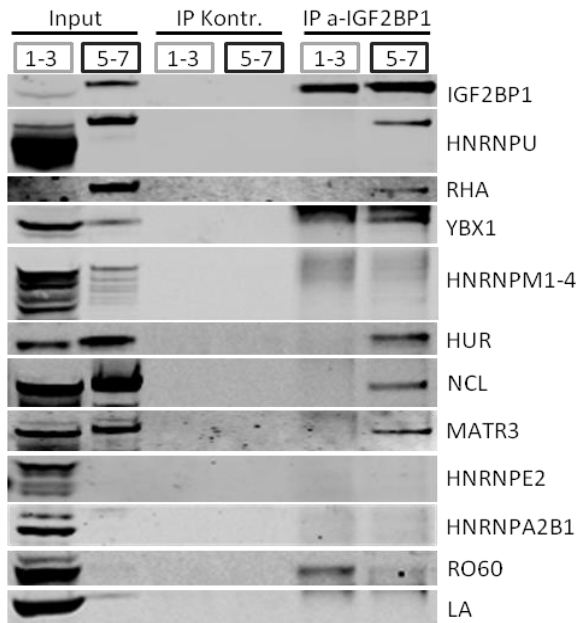


Abb. 3.33: Immunopräzipitation von IGF2BP1 aus den vereinten Fraktionen 1-3 und 5-7 des 5-20 % Saccharose Gradienten (sh. Abb. 3.32). Die Proteine der jeweiligen Inputs, Kontrollproben, in denen *bead*-Material ohne Antikörper genutzt wurde sowie der Immunopräzipitation von IGF2BP1 mit spezifischem Antikörper (6A9) wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. YRNP-Fraktionen sind durch den hellgrauen, mRNP-Fraktionen sind durch den dunkelgrauen Kasten gekennzeichnet.

Dennoch gestaltet sich die Immunopräzipitation von endogenem IGF2BP1 als äußerst ineffizient. Zusätzlich wird diese durch das Vorhandensein der zunehmenden Saccharose-Konzentration in den tiefer im Gradient liegenden Fraktionen erschwert. Aus diesem Grund könnten einige Interaktionen zwischen IGF2BP1 und anderen Proteinen nicht nachgewiesen werden. Um dieses Problem zu umgehen und die Ausbeuten kopräzipitierter Proteine zu steigern wurden in den folgenden Experimenten HEK293 Zellen genutzt, die Flag-markiertes ZBP1 stabil exprimieren. Zudem wurde die doppelte Menge an Zellmaterial lysiert und im 5-20 % Saccharose Gradienten aufgetrennt. Die Sedimentation des endogenen versus exogenen Flag-ZBP1 ist in Abbildung 3.34 A im oberen Teil der Westernanalyse der Fraktionen 1-10 ersichtlich. Da sich das Sedimentationsverhalten beider Proteine unterscheidet, wurde zunächst geprüft, ob sich das Sedimentationsverhalten anderer Proteinliganden von IGF2BP1 ebenfalls verändert. Dabei wurde festgestellt, dass sich die Proteine MATR3 und HNRNPM hauptsächlich in den leichten YRNP-Fraktionen befinden, ähnlich wie exogenes Flag-ZBP1. Dagegen sedimentieren beide Proteine in den Fraktionen 3-5, wenn man die Gradienten-Analyse naiver HEK293 Zellen betrachtet (Abb. 3.32). Alle anderen untersuchten Proteine werden in ihrem Sedimentationsverhalten nicht durch das exogene ZBP1 beeinflusst. Das Protein LA wurde in diesen Experimenten nicht untersucht, aber zusätzlich die bekannten IGF2BP1-Liganden IGF2BP2, IGF2BP3, HNRNPU, HNRNPM, HNRNPA3 und PTB. Überdies wurde die Interaktion zu MOV10 validiert, ein putativer ZBP1-Ligand, welcher durch die MS-Analysen identifiziert wurde. MOV10 zeigt eine ähnliche

Ergebnisse

Verteilung im Gradient wie endogenes IGF2BP1, 2 und 3, wobei MOV10 und IGF2BP3 auch in den beiden letzten Fraktionen angereichert sind. Die einzelnen HNRNPQ Isoformen (Q1-3) unterscheiden sich in ihrem Sedimentationsverhalten, so ist die kleinste Isoform (Q1) hauptsächlich in den leichten YRNP-Fraktionen zu finden. Die Verteilung von HNRNPR deutet auf das Vorhandensein von zwei Komplexen, da das Protein zum einen in den YRNP-Fraktionen (2, 3) und in den mRNP-Fraktionen (7-9) zu finden ist. Dagegen sedimentieren PTB und HNRNPA3 ausschließlich in den YRNP-Fraktionen.

Die Validierung der Zusammensetzung IGF2BP1 enthaltener RNPs ist in Abbildung 3.34 B dargestellt. Um die Ausbeuten an präzipitierten Liganden zu steigern, wurde sowohl das endogene IGF2BP1 als auch exogenes Flag-ZBP1 der Fraktionen 1-4 und 5-8 immunpräzipitiert. Wie im vorangegangenen Experiment, konnten auch mit dieser Methode die Liganden HNRNPU, RHA, YBX1, HUR, MATR3 aus den Fraktionen 5-8 und RO60 aus den Fraktionen 1-4 kopräzipitiert werden. Dagegen konnte die Interaktion mit NCL nicht bestätigt werden. Die Heterooligomerisierung zwischen den IGF2BPs wurde bereits gezeigt (3.1.6.), jedoch ist nicht bekannt, ob sie mit IGF2BP1 in den YRNP und, oder mRNP-Fraktionen interagieren. Die hier durchgeführten Sedimentationsanalysen gepaart mit den Immunopräzipitationsanalysen zeigen, dass sowohl IGF2BP2 als auch IGF2BP3 in den mRNP-Fraktionen mit IGF2BP1 zusammen wirken. Des Weiteren konnten die Liganden HNRNPM, MOV10, HNRNPQ und HNRNPR validiert werden. Für die Isoformen von HNRNPM (M1-4), die aus alternativ gespleißten Transkriptvarianten resultieren, ist zu sagen, dass alle Isoformen sowohl aus den Fraktionen 1-4 als auch 5-8 präzipitiert werden konnten. Auch MOV10 konnte sowohl aus den Fraktionen 1-4 als auch 5-8 kopräzipitiert werden. Zudem konnten mit dieser Methode die Proteine HNRNPQ1-3 als Komponenten von mRNPs identifiziert werden, während sich in den YRNPs lediglich eine oder zwei Varianten präzipitieren ließen, dies kann aufgrund der schlechten Auflösung nicht genau festgestellt werden. Da HNRNPQ eine starke Homologie zu HNRNPR aufweist, erkennt der hier genutzte Antikörper laut Hersteller beide Proteine. Daher könnte man schlussfolgern, dass ZBP1 zudem mit HNRNPR interagiert. Um dies jedoch eindeutig klären zu können, müsste ein spezifischer Antikörper gegen HNRNPR zur Validierung verwendet werden.

Ergebnisse

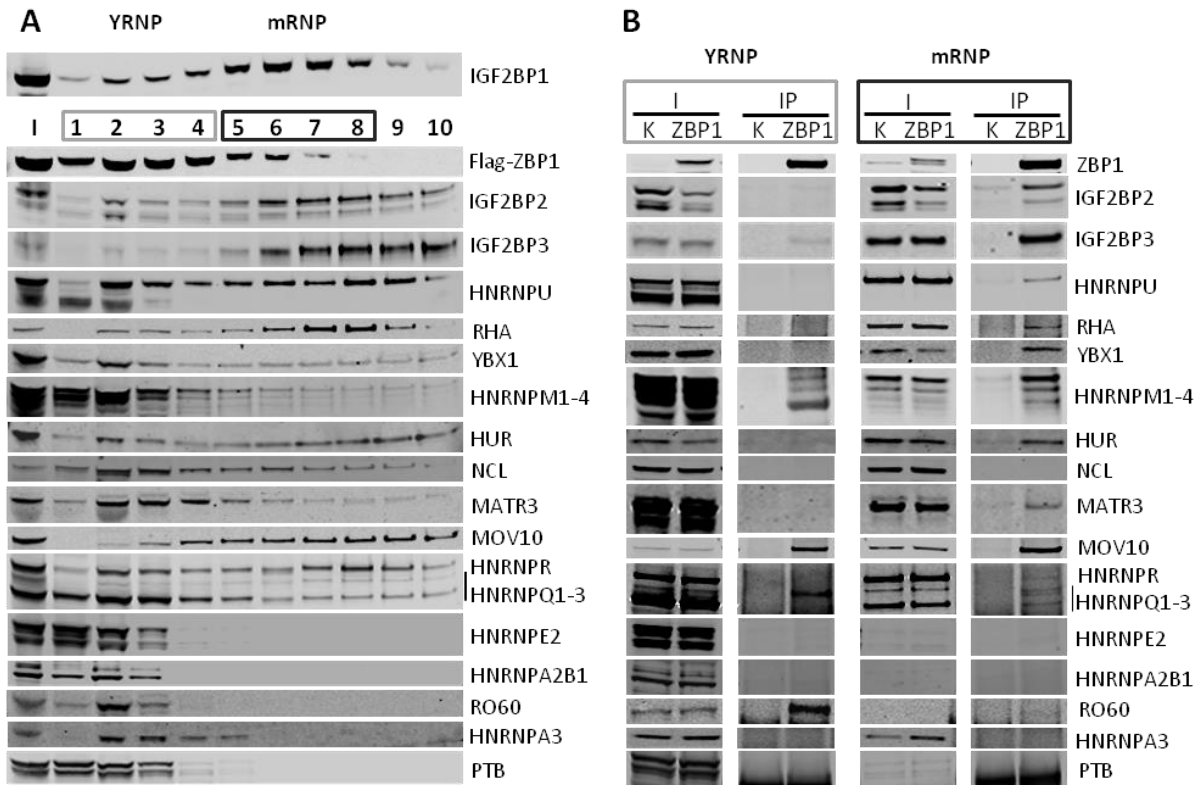


Abb. 3.34: Analyse IGF2BP1 enthaltener mRNPs. (A) Verteilung von endogenem IGF2BP1 und stabil exprimierten Flag-ZBP1, sowie der Proteine der Flag-ZBP1 exprimierenden Zellen im 5-20 % (w/v) Saccharose Gradienten. Dazu wurden die Zelllysate (HEK293 Zellen, Flag-ZBP1 exprimierende HEK293 Zellen) auf 5-20 % Saccharose Gradienten geschichtet und ultrazentrifugiert (2,5 h). Es folgte die Fraktionierung (1-10) beider Gradienten. Die Proteine des Inputs (I) sowie der Fraktionen 1-10 wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. (B) Immunopräzipitation von IGF2BP1 und Flag-ZBP1 aus den vereinten Fraktionen 1-4 und 5-8 des 5-20 % Saccharose Gradienten mittels einer Mischung aus spezifischem IGF2BP1- (6A9) und Flag-Antikörper. Als Kontrolle wurden naive HEK293 Zellen genutzt und die Immunopräzipitation mit Flag-Antikörper durchgeführt. Die Proteine der jeweiligen Inputs, Kontrollproben sowie der Immunopräzipitation von IGF2BP1 und Flag-ZBP1 wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert. YRNP-Fractionen sind durch den hellgrauen, mRNP-Fractionen durch den dunkelgrauen Kasten gekennzeichnet.

Zusammenfassend kann man festhalten, dass übereinstimmend mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten die Interaktion von IGF2BP1 mit HNRNPU, RHA, YBX1, HUR, HNRNPQ (Jonson et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2009) und RO60 (Jonson et al., 2007; Köhn et al., 2010) bestätigt wurde, jedoch die Interaktion zu HNRNPE2 (Weidensdorfer et al., 2009) und HNRNPA2B1 (Jonson et al., 2007) mit dieser Methode nicht gezeigt werden konnte. Dagegen liefert die hier durchgeführte Gradienten-IP-Analyse neue Erkenntnisse zur Zusammensetzung IGF2BP1 enthaltener RNPs. So wurden MOV10, RO60, HNRNPM und HNRNPQ als IGF2BP1 Interaktoren von YRNPs und IGF2BP2, IGF2BP3, HNRNPU, RHA, YBX1, HUR, HNRNPM, MATR3, HNRNPR, HNRNPQ und MOV10 als IGF2BP1 Interaktoren in mRNPs identifiziert.

3.4. Die Rolle von IGF2BP2 im Metabolismus

Obwohl die IGF2BPs zahlreiche Gemeinsamkeiten hinsichtlich ihrer RNA-Bindungsspezifitäten, Bindemotive, Ziel-RNAs sowie der mRNP-Zusammensetzung haben, gibt es einen entscheidenden Unterschied im Expressionsmuster der drei Paralogen, denn IGF2BP2 wird im Vergleich zu IGF2BP1 und IGF2BP3 in verschiedenen adulten Geweben und Organen exprimiert (Yaniv und Yisraeli, 2002; Yisraeli et al., 2005; Christiansen et al., 2009; Dai et al., 2011; Bell et al., 2013). Zudem wird eine metabolische Funktion von IGF2BP2 vermutet, da genomweite Assoziationsstudien ergaben, dass SNPs (*single nucleotide polymorphisms*), welche im zweiten Intron des IGF2BP2 Locus zu finden sind, mit einem erhöhten Typ 2 Diabetes Risiko (T2D) korrelieren (*reviewed* (Christiansen et al., 2009)). Ein weiteres Indiz für eine mögliche Metabolismus-Kontrolle lieferte eine Studie aus dem Jahr 2011, bei der aufgeklärt werden konnte, dass IGF2BP2 durch mTORC1 phosphoryliert wird, was die Assoziation von IGF2BP2 mit der IGF2 mRNA erleichtert und in einer gesteigerten IGF2 Proteinsynthese resultiert (Dai et al., 2011). Zu Beginn der vorliegenden Arbeit war jedoch wenig über die Funktion von IGF2BP2 bekannt. Daher wurde zunächst mittels metabolischer Analysen untersucht, welche Auswirkung die Überexpression von IGF2BP2 in Zellen hat.

3.4.1 Die Überexpression von IGF2BP2 resultiert in einer gesteigerten

Glukoseaufnahme

Um zu prüfen, ob IGF2BP2 in der Lage ist Einfluss auf den Metabolismus von Zellen zu nehmen, wurde GFP markiertes IGF2BP2 sowie GFP mittels Retroviren in U2OS Zellen transduziert. Es wurden durch eine FACS-Sortierung zwei Zell-Populationen erhalten, in beiden Populationen wurde in etwa 90 % der Zellen GFP bzw. GFP-IGF2BP2 exprimiert, wobei die erste Population eine schwächere Expression als die zweite Population aufweist (Sortierung wurde von M. Mrotzek vorgenommen). Die stabil exprimierenden Zellen wurden im Anschluss in einem Glukoseaufnahme-Assay miteinander verglichen. Dabei wurde der Gehalt an Glukose im Zellmedium nach einer bestimmten Zeit ermittelt und auf die Zellzahl normalisiert. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 3.35 dargestellt. Dabei konnte festgestellt werden, dass beide GFP-IGF2BP2 exprimierende Populationen über den

Ergebnisse

Zeitraum von drei Tagen etwa die doppelte Menge an Glukose aus dem Medium aufgenommen haben als die GFP exprimierenden Populationen.

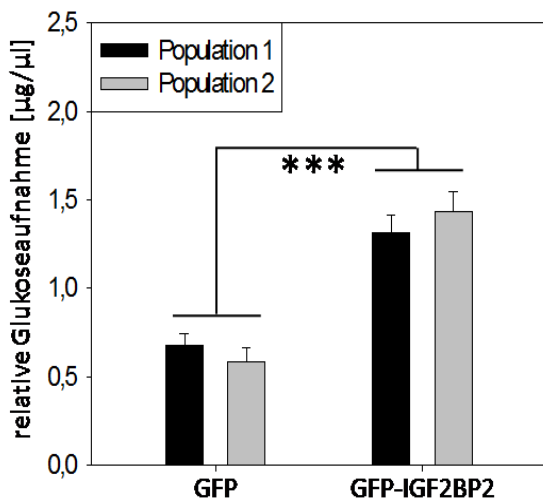


Abb. 3.35: Die Überexpression von IGF2BP2 resultiert in einer gesteigerten Glucoseaufnahme. U2OS Zellen, die GFP bzw. GFP-IGF2BP2 stabil exprimieren, wurden drei Tage kultiviert. Population 1 (dunkelgraue Balken) weist eine schwächere Expression von GFP und GFP-IGF2BP2 auf als Population 2 (hellgraue Balken). Die Glukoseaufnahme der Zellen wurde ermittelt, indem die Glukose im Zellkulturmedium und im Kulturmedium ohne Zellen mittels quantitativem, enzymatischem Assay bestimmt wurde und die Differenz aus den Werten gebildet wurde. Die erhaltenen Werte wurden auf 1×10^5 Zellen normalisiert. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von fünf unabhängigen Experimenten (***, $p \leq 0.001$; TTEST, 2 Seiten, Typ 2).

3.4.2 Die Überexpression von IGF2BP2 resultiert in einem gesteigerten Glykogengehalt

Die gesteigerte Glukoseaufnahme der GFP-IGF2BP2 exprimierenden Zellen im Vergleich zu den GFP-Kontrollzellen wirft die Frage zum Verbleib dieser Glukose auf. Zum einen kann diese in der Glykolyse abgebaut werden, wobei zwei Moleküle Pyruvat und zwei ATP gebildet werden, die der Zelle als nutzbare, freie Enthalpie zur Verfügung stehen (G. Embden, O. Meyerhof, J. Parnas). Zum anderen kann die Glukose im alternativen Pentosephosphatweg abgebaut werden, bei dem Vorläufer-Moleküle für weitere Biosynthesen entstehen. Eine gesteigerte Glukose-Aufnahme kann aber auch mit einer Erhöhung der Glykogensynthese einhergehen, die der Speicherung von Glukose dient, um diese später im Stoffwechsel einzusetzen. Um herauszufinden, ob die Überexpression von IGF2BP2 eine verstärkte Bildung von Glykogen nach sich zieht, wurde der Glykogengehalt von GFP und GFP-IGF2BP2 exprimierenden U2OS Zellen bestimmt (Abb. 3.36). Im Ergebnis dieser Analyse konnte gezeigt werden, dass die von GFP-IGF2BP2 exprimierenden Zellen verstärkt aufgenommene Glukose, in Form von Glykogen gespeichert wird, da der Glykogengehalt in diesen Zellen ebenfalls höher ist als in den Kontrollzellen.

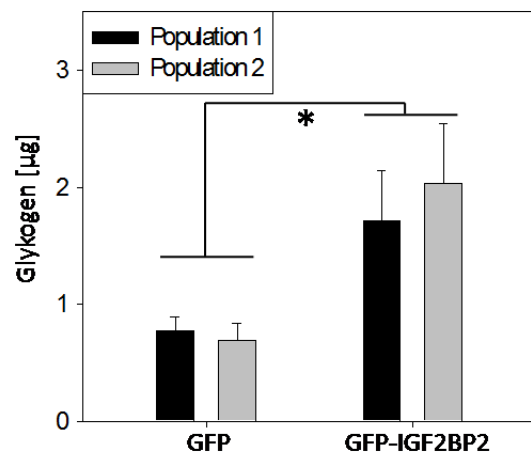


Abb. 3.36: Die Überexpression von IGF2BP2 resultiert in einem gesteigerten Glykogengehalt. U2OS Zellen, die GFP bzw. GFP-IGF2BP2 stabil exprimieren, wurden drei Tage kultiviert. Population 1 (dunkelgraue Balken) weist eine schwächere Expression von GFP und GFP-IGF2BP2 auf als Population 2 (hellgraue Balken). Der Glykogengehalt in den Zellen (7300 Zellen/ μ l) wurde mittels quantitativem, enzymatischem Assay bestimmt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung von drei unabhängigen Experimenten (*, $p \leq 0.05$; TTEST, 2 Seiten, Typ 2).

3.4.3 Die Überexpression von IGF2BP2 im transgenen Mausmodell resultiert ebenfalls in einem gesteigerten Glykogengehalt

Da Glykogen primär in der Leber und im Muskelgewebe synthetisiert wird und das vorrangig in der Leber gespeicherte Glykogen als wichtige Reserve zur Regulation des Blutglukose-Spiegels dient, wurde geprüft, ob die Lebern IGF2BP2 exprimierender Mäuse im Vergleich zu IGF2BP1 und IGF2BP3 exprimierenden Mäusen ebenfalls einen erhöhten Glykogengehalt aufweisen. Diese transgenen Mäuse wurden von Dr. M. Lederer, N. Pazaitis und B. Mühleck generiert und von B. Mühleck im Rahmen ihrer Dissertation umfassend charakterisiert (Dissertation, B. Mühleck, unveröffentlicht). Die Leberproben von Mäusen, welche die IGF2BP Paralogen unter Kontrolle eines Albumin Promotors exprimieren, wurden auf ihren Glykogengehalt untersucht (Leberproben von B. Mühleck zur Verfügung gestellt). Dabei wurde festgestellt, dass sich der Glykogengehalt der Leber von IGF2BP1 und IGF2BP3 exprimierenden Mäusen nicht von dem der Kontrolltiere unterscheidet (Abb. 3.37 A, C). Jedoch konnte in der Leber IGF2BP2 exprimierender Tiere, im Vergleich zur BiPro-GFP Kontrolle ein signifikant erhöhter Glykogengehalt ermittelt werden (Abb. 3.37 B).

Ergebnisse

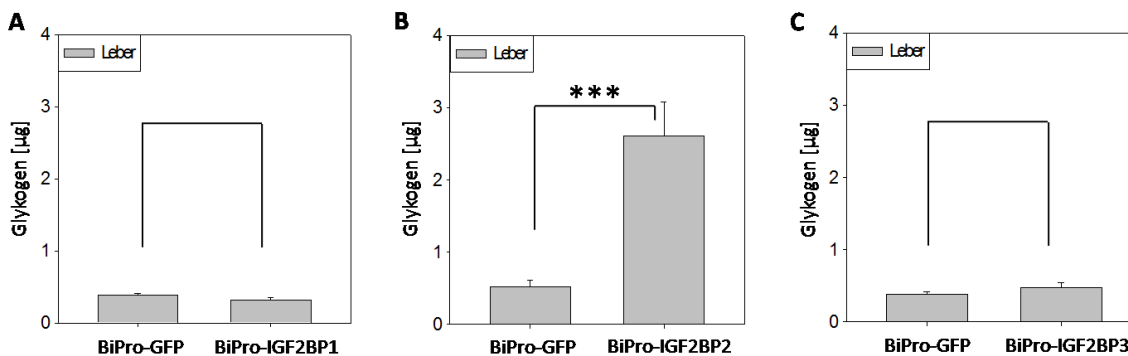


Abb. 3.37: Die Überexpression von IGF2BP2 im transgenen Mausmodell resultiert in einem gesteigerten Glykogengehalt. Der Glykogengehalt in den Leberproben (100 µg/µl) von **(A)** BiPro-GFP (n=5), BiPro-IGF2BP1 (n=9), **(B)** BiPro-GFP (n=14), BiPro-IGF2BP2 (n=15) und **(C)** BiPro-GFP (5), BiPro-IGF2BP3 (9) exprimierenden Mäusen wurde mittels quantitativem, enzymatischem Assay bestimmt. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardfehler der Mittelwerte (***, $p \leq 0.001$; TTEST, 2 Seiten, Typ 2).

3.4.4 Der Knockdown von IGF2BP2 inhibiert den mTORC-Signalweg

Die Glukosehomöostase wird in eukaryotischen Zellen durch vielfältige Regulationsvorgänge innerhalb des mTORC-Signalweges (*mammalian target of rapamycin complex*) gewährleistet. Ganz allgemein vermittelt dieser evolutionär konservierte Signalweg zwischen dem Vorhandensein von Nährstoffen und der Ausführung von Wachstumsprozessen der Zellen (*reviewed* (Zoncu et al., 2011)). Diese Funktion von mTORC wird wiederum über die Regulation wichtiger Kinasen, wie S6 Kinase (S6K) und AKT, bewerkstelligt. So fördert das Vorhandensein von Nährstoffen die Phosphorylierung von AKT am Serin 473 durch mTORC2, welche wiederum die Phosphorylierung von AKT am Threonin 308 durch PDK1 stimuliert und zur Aktivierung der AKT Kinase führt (Sarbasov et al., 2005; Scheid et al., 2002; Yang et al., 2002). Durch aktivierte AKT Kinase wird die GSK3 β (Glykogen Synthase Kinase-3) inhibiert, was die Aktivierung des Enzyms Glykogensynthase nach sich zieht und in der Akkumulation von Glykogen resultiert (Cross et al., 1995). Dagegen wird die Glukoneogenese durch die aktivierte AKT Kinase inhibiert, indem die Expression von PEPCK (Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase), ein essentielles Glukoneogenese-Enzym, supprimiert wird (Puigserver et al., 2003). Zudem fördert eine Aktivierung des mTOR-Signalweges die Glukoseaufnahme, indem die Expression entsprechender Gene moduliert wird (Duvel et al., 2010). So wird u. a. die Synthese des Glukose-Transporters GLUT1 reguliert (Buller et al., 2008), welcher ebenfalls in mehreren Krebszelllinien exprimiert wird (Ahrens et al., 2008; www.proteinatlas.org; Uhlen et al., 2015). Eine Aktivierung des mTORC-Signalweges vermittelt somit anabolische Prozesse, Energiespeicherung sowie den Verbrauch von

Ergebnisse

Nährstoffen. Jedoch kann eine anhaltende, übermäßige Nährstoffaufnahme zu einer Überstimulation des mTORC-Signalweges und damit zu Stoffwechselerkrankungen wie T2D führen. Da unter Überexpression von IGF2BP2 eine gesteigerte Glukoseaufnahme sowie ein erhöhter Glykogengehalt zu verzeichnen ist, könnte eine Aktivierung des mTORC-Signalweges zu beobachten sein. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Phosphorylierung der AKT Kinase, welche mit einer Aktivierung des Signalweges einhergeht, untersucht. Dazu wurde IGF2BP2 unter Verwendung zweier unterschiedlicher siRNAs depletiert. Dieses Experiment wurde in zwei verschiedenen Zelllinien durchgeführt, zum einen wurden U2OS Zellen genutzt, da in diesen Zellen unter IGF2BP2 Überexpression eine gesteigerte Glukoseaufnahme und ein erhöhter Glykogengehalt beobachtet werden konnte und zum anderen wurde die Leberzelllinie HUH7 genutzt. Der Phosphorylierungsstatus der AKT Kinase wurde im Anschluss mittels Westernblot analysiert (Abb. 3.38). Dabei wurde festgestellt, dass in den IGF2BP2 *knockdown*-Proben beider Zelllinien sowohl die Phosphorylierung am Serin 473 als auch am Threonin 308 im Vergleich zur Kontrolle um etwa 30 bis 50 % verringert ist. Übereinstimmend dazu wurde unter IGF2BP2 Überexpression in U2OS Zellen eine Erhöhung der AKT-Phosphorylierung beobachtet (M. Mrotzek, persönliche Information). Daher kann man vermuten, dass IGF2BP2 die Aktivität des mTORC-Signalweges steigert.

Ergebnisse

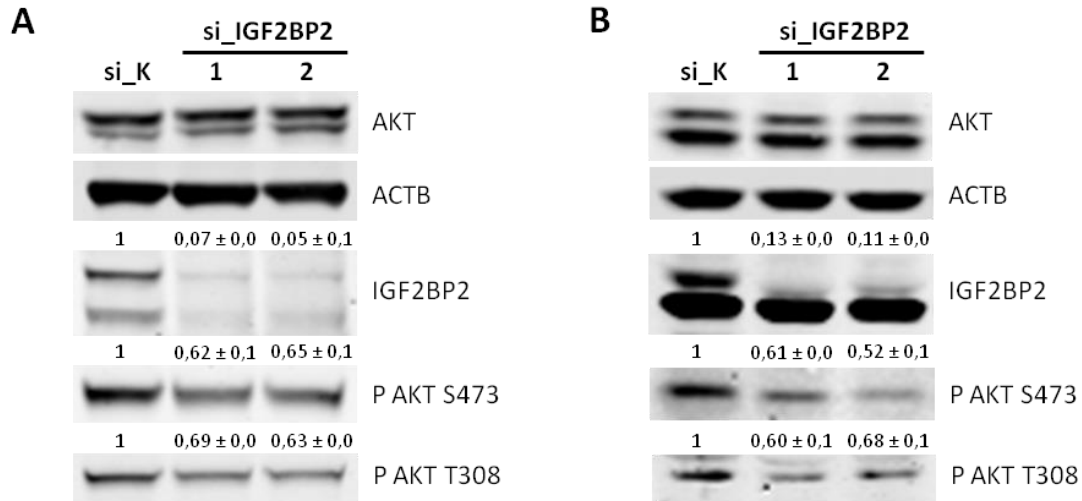


Abb. 3.38: Der Knockdown von IGF2BP2 inhibiert den mTORC-Signalweg. (A) U2OS- und **(B)** HUH7 Zellen wurden jeweils mit einer Kontroll-siRNA (si_K) und mit zwei gegen IGF2BP2 gerichteten siRNAs (1, 2) transfiziert und nach 72 h geerntet. Die Proteine wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Westernblot mit den entsprechenden Antikörpern analysiert (rechts vom Blot). Die Abundanz der Proteine nach IGF2BP2 *knockdown* wurde relativ zur Kontrolle von jeweils drei unabhängigen Analysen bestimmt (Mittelwert und Standardabweichung über den repräsentativen Blots). Zur Ermittlung relativer Proteinlevel von IGF2BP2 und phosphoryliertem AKT (an Serin 473 bzw. an Threonin 308) erfolgte eine Kreuznormalisierung auf ACTB und AKT (unphosphoryliert).

Die Ergebnisse der durchgeführten Analysen belegen, dass IGF2BP2 eine Rolle im Glukose-Metabolismus spielt, indem es aktivierend auf den mTORC-Signalweg wirkt sowie die Glukoseaufnahme und den Glykogengehalt moduliert.

4 Diskussion

4.1 Die Rolle der KH-Domänen der IGF2BPs

Zahlreiche Studien in Modellorganismen belegen, dass die IGF2BP Proteine eine kritische Rolle während der Embryonalentwicklung und Krebsentstehung spielen (Tessier et al., 2004; Yaniv et al., 2003; Hansen et al., 2004; Hamilton et al., 2013; Gutschner et al., 2014). Da die Fähigkeit zur Assoziation mit verschiedenen RNAs einen entscheidenden Beitrag zur Funktion der IGF2BPs leistet, ist es von besonderer Bedeutung zu verstehen, wie die IGF2BPs mit ihren RNA-Substraten interagieren.

Durch *in vitro* Filterbindungsanalysen konnte sowohl für ZBP1 als auch für IGF2BP2 und IGF2BP3 eine Bindung an den ACTB *zipcode* und zur MYC-CRD nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.5). Wobei die Assoziation von IGF2BP2 an die MYC RNA bereits in Myoblasten-Zellen des Skelettmuskels gezeigt wurde. Im Gegensatz zur Funktion von IGF2BP1 wird jedoch postuliert, dass IGF2BP2 die Translation der MYC RNA kontrolliert (Li et al., 2012). Um die RNA-Bindungsspezifität der IGF2BP Paralogen zu analysieren wurden negativ geladene Aminosäuren in den GXXG-Loops eingeführt (GXXG→GEEG). Dabei stellte sich heraus, dass diese Mutationen die RNA-Bindung von ZBP1 und IGF2BP2 stark beeinträchtigen (siehe Abb. 3.5). Diese Feststellung deckt sich mit Analysen anderer Proteine, wie SF1 (GXXG→GXEG; Liu et al., 2001) und KSRP (GXXG→GDDG; Hollingworth et al., 2012). Ein Nachteil von Punktmutationen in Proteinen kann darin bestehen, dass damit die Stabilität einer Domäne gestört wird. Strukturelle Veränderungen der Proteine, bedingt durch die hier eingeführten Mutationen, scheinen jedoch unwahrscheinlich, wie CD-spektroskopische Analysen zeigen (Diplomarbeit, M. Köhn, 2008). Überdies konnten Hollingworth und Kollegen anhand von NMR-Studien belegen, dass die Einführung saurer Aminosäuren im GXXG-Loop von KH-Domänen die Faltung und die Stabilität der Proteine nicht beeinflusst (Hollingworth et al., 2012).

Die Ergebnisse der Filterbindungsanalysen legen nahe, dass die GXXG-GEEG Umwandlung beider KH-Domänen (KH1+2 und KH3+4) in ZBP1 und IGF2BP2 die RNA-Bindung in substratabhängiger Weise beeinträchtigt (siehe Abb. 3.5). In IGF2BP3 dagegen hat diese Mutation nur geringen Einfluss auf die Bindung der ACTB und MYC RNA. Übereinstimmend mit anderen Studien (Farina et al., 2003), scheint die KH3+4 Didomäne in ZBP1 und IGF2BP2 das Haupt-RNA-Bindungsmodul zu sein, doch die KH1+2 Didomäne trägt ebenfalls zur

Diskussion

Bindung bei, da nur ein Ausschalten aller KH-Domänen die RNA-Bindung entscheidend stört. Konsistent dazu, wurde für die Bindung von Vg1RBP an die Vg1 RNA und von IGF2BP1 an die H19 RNA eine Beteiligung aller vier KH-Domänen festgestellt (Git und Standart, 2002; Nielsen et al., 2002). Die Ergebnisse der Filterbindung werden zudem durch eine kürzlich publizierte Studie bekräftigt, in der gezeigt wurde, dass für die Assoziation von CRDBP1 zur ACTB und MYC RNA in HeLa-Zellen alle KH-Domänen wichtig sind (Barnes et al., 2014).

Dieser Bindungsmechanismus erscheint durchaus von Vorteil, wenn man bedenkt, dass die KH-Domänen-Architektur nur die Erkennung kurzer Nukleinsäure-Bereiche erlaubt, was in einer schwachen Bindungsaffinität resultiert (Auweter et al., 2006; Valverde et al., 2008). Dennoch konnte in Versuchen von Farina und Kollegen keine Assoziation des KH1+2 Protein-Fragmentes von ZBP1 an den *zipcode* von ACTB ermittelt werden (Farina et al., 2003). Man könnte spekulieren, dass dies an der Verwendung verkürzter Proteine liegt, da die Deletion RNA-bindender Domänen nicht nur zur Störung der Proteinstruktur führen kann, sondern auch die Eliminierung intermolekularer Protein-Protein-Interaktionen nach sich ziehen kann. Was im Falle der Deletion der KH3+4 Didomäne sehr wahrscheinlich ist, da dieser Bereich offensichtlich für die Homodimerisierung von IGF2BP1 und Vg1RBP wichtig ist (Git und Standart, 2002; J. Nielsen et al., 2004). Ein weiterer Grund für die abweichenden Ergebnisse könnte die Verwendung unterschiedlicher RNA-Substrate sein. Für die hier durchgeführte *in vitro* Filterbindung wurden die ersten 100 Nukleotide vom 3'-UTR der humanen ACTB-RNA verwendet, dagegen nutzten Farina et al. lediglich die ersten 54 Nukleotide vom 3'-UTR der *chicken* ACTB-RNA. Dass die Unterschiede in der Verwendung von humaner bzw. *chicken* ACTB-RNA begründet liegen, scheint eher unwahrscheinlich, da die durch ZBP1 gebundenen Bereiche konserviert sind (CGGAC-10-25nt-ACAC; Patel et al., 2012). Vielmehr könnten die RNA-Fragmente aufgrund der Länge und Nukleotid-Zusammensetzung unterschiedliche Sekundärstrukturen ausbilden und damit andere Bindungserfordernisse hervorbringen. Diese Vermutung wird gestützt durch eine kürzlich veröffentlichte Studie, in der gezeigt wurde, dass die Sekundärstruktur des ACTB-RNA-Substrates für die Assoziation von ZBP1 von großer Bedeutung ist (Kim et al., 2015). Zudem könnte sich das *cis*-Element von ACTB, welches für die Assoziation der KH1+2 Didomäne wichtig ist, strangabwärts vom verwendeten 54 nt-Fragment befinden.

Vergleichende Stabilitätsanalysen der Komplexe bestehend aus Wildtyp ZBP1-ACTB *zipcode* und KH1+2 Mutante-ACTB *zipcode* legen nahe, dass die KH1+2 Didomäne von ZBP1

die Komplex-Stabilität vermittelt (siehe Abb. 3.8) und für die Bildung größerer Komplexe aus Protein und RNA essentiell ist (siehe Abb. 3.9). Aus diesen *in vitro* Analysen konnte eine geschätzte Halbwertszeit von über vier Stunden ermittelt werden, was mit den ermittelten Halbwertszeiten des IGF2BP1-IGF2 *leader* 3 mRNA Komplexes korreliert (J. Nielsen et al., 2004). Das synergistische Zusammenwirken aller KH-Domänen der IGF2BP Paralogen zur Steigerung der Affinität zum RNA-Substrat und zur Erhöhung der Komplex-Stabilität ist durchaus von Vorteil, um zum Beispiel den zytoplasmatischen Transport der ACTB mRNA zur Führungslamelle von embryonalen Fibroblasten und zu den Wachstumskronen primärer Neuronen zu gewährleisten (Lawrence und Singer 1986; Bassell et al., 1999; Farina et al., 2003; Hüttelmaier et al., 2005).

Interessanterweise reicht die GXXG-GEEG-Mutation in den KH-Domänen von IGF2BP3 nicht aus, um die RNA-Bindung entscheidend zu stören, wie die Filterbindungsanalysen in Abbildung 3.5 zeigen. Man könnte vermuten, dass noch andere RNA-bindende Domänen in IGF2BP3 eine Rolle spielen. Die IGF2BP Paralogen verfügen neben den KH-Domänen über zwei RRM-Domänen, welche in zahlreichen Proteinen RNA-Bindungen vermitteln. So konnte für die RNA bindenden Proteine PABP, HUD und Nucleolin gezeigt werden, dass jeweils beide RRM-Domänen und die Linker-Region kooperativ an RNA binden (Deo et al., 1999; Wang et al., 2001; Allain et al., 2000; Johansson et al., 2004). Innerhalb der RRM-Domäne wurden zwei Konsensus-Sequenzen identifiziert (RNP1; Adam et al., 1986; Swanson et al., 1987 und RNP2; Dreyfuss et al., 1988), welche für die spezifische RNA-Assoziation von Bedeutung sind (Bandziulis et al., 1989; Kenan et al., 1991; Birney et al., 1993). Sequenzvergleiche ergaben, dass RNP1 und RNP2 in der ersten RRM-Domäne der IGF2BP Paralogen, jedoch nicht in der zweiten RRM-Domäne zu finden sind. Dies könnte eine mögliche Ursache dafür sein, dass die RRM-Domäne von IGF2BP3 keine Bindung zum ACTB *zipcode* aufweist (siehe Abb. 3.7), da meist mehrere RRM-Domänen für die hoch affine Bindung der RNA nötig sind (Maris et al., 2005; Khanam et al., 2006). Y14 wurde ebenfalls als Protein identifiziert, was trotz vorhandener RRM-Domäne keine RNA bindet, jedoch konnte gezeigt werden, dass die RRM-Domäne die Interaktion zu dem Protein Magoh vermittelt (Fribourg et al., 2003). Eine ähnliche Funktion konnte auch den RRM-Domänen von ZBP1 zugeschrieben werden, da diese offenbar für die Assoziation von ZBP1 zu dem Motorprotein KIF11 wichtig sind (Song et al., 2015). Die Vermutung, dass die RRM-Domänen keine RNA-Assoziation der IGF2BPs vermitteln, wird zudem durch die Tatsache gestützt, dass den

Diskussion

orthologen Proteinen in *D. melanogaster* und *C. elegans* die N-terminalen RRM-Domänen fehlen (Nielsen et al., 2002).

Als eine alternative Punktmutation in den GXXG-Loops der KH-Domänen von IGF2BP3, wäre die Umwandlung des ersten Glycins in ein Aspartat denkbar, welche ebenfalls zu einer gestörten RNA-Bindung führt (Barnes et al., 2014). Jedoch muss man kritisch anmerken, dass diese Mutation nicht immer ausreichend ist, um die Funktion zu blockieren. Denn die Einführung der Punktmutation in beiden KH-Domänen des Proteins NusA, zeigte lediglich in der ersten KH-Domäne einen Effekt (Zhou et al., 2002). Weiterhin wäre denkbar, dass neben dem GXXG-Loop, der als eine Bindungseinheit fungiert (Lewis et al., 2000), auch der variable Loop sowie aliphatische Aminosäuren innerhalb der KH-Domäne für die Interaktion von IGF2BP3 mit dem RNA-Substrat eine Rolle spielen. In der Tat konnte eine natürlich vorkommende Mutation in der zweiten KH-Domäne (I304N) des FMR1 Proteins identifiziert werden, welche die RNA-Bindung des Proteins stark beeinträchtigt (Siomi et al., 1994). Äquivalente Mutationen in den KH-Domänen von Vg1RBP resultieren ebenfalls in einer gestörten RNA-Assoziation (KH1-I228; KH2-L309; KH3-I441; KH4-V523→N; Git und Standart, 2002). Man könnte diese Mutationen ebenfalls in IGF2BP3 einführen und prüfen, ob diese die RNA-Assoziation beeinflussen. Schließlich könnte der moderate Effekt der GXXG-GEEG-Mutation in den KH-Domänen von IGF2BP3 auch auf Unterschiede hinsichtlich struktureller Eigenschaften des Proteins hindeuten. Aufschluss darüber könnten jedoch nur vergleichende Strukturanalysen der IGF2BP Paralogen liefern, wie zum Beispiel mittels NMR-Spektroskopie (*nuclear magnetic resonance*).

Nielsen und Kollegen konnten zeigen, dass die Fähigkeit von IGF2BP1 RNA zu binden, Voraussetzung ist für die Assemblierung von Granula und die zytoplasmatische Retention des Proteins (Nielsen et al., 2002; Nielsen et al., 2003). Übereinstimmend dazu konnte anhand von Lokalisationsanalysen sowohl für ZBP1 als auch für IGF2BP2 die Beteiligung aller KH-Domänen an der subzytoplasmatischen Lokalisation der Proteine festgestellt werden (Abb. 3.10). Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass die beobachteten Lokalisationsunterschiede auf Expressionsunterschiede der einzelnen Proteine zurückzuführen sind (Abb. 3.11). Die *in vitro* ermittelten Filterbindungsdaten stehen in bemerkenswerter Korrelation zu den Lokalisationsdaten der IGF2BP Paralogen (Vergleich zu Abb. 3.5). Das Ausschalten der KH3+4 Didomäne von ZBP1 und IGF2BP2 führte zu einer Anreicherung im Kern beider Proteine (70-95 % der exprimierenden Zellen). Konsistent dazu

schwächt diese Mutation in ZBP1 und IGF2BP2 die Bindung an ACTB und MYC stärker als die der KH1+2 Domäne. Jedoch nimmt die Mutation in der KH1+2 Domäne auf die Kernlokalisierung von IGF2BP2 stärkeren Einfluss als von ZBP1. Diese Beobachtung gibt Grund zur Annahme, dass der KH1+2 Domäne in IGF2BP2 eine größere Bedeutung hinsichtlich der RNA-Bindung zukommen könnte. Diese Tendenz konnte in den Filterbindungsanalysen mit dem ACTB *zipcode* bestätigt werden. Allerdings könnte die festgestellte Kernakkumulation von 80-90% der mit IGF2BP2-KH1+2 transfizierten Zellen darauf hinweisen, dass die Beteiligung der KH1+2 Domäne von IGF2BP2 an der Assoziation zu anderen RNA-Substraten eine noch größere Rolle spielt.

Neben der RNA-Bindung steuern die KH-Domänen von ZBP1 und IGF2BP2 offenbar ebenfalls die Assoziation zu anderen Proteinen (Abb. 3.12 A und B). In Übereinstimmung zu anderen Arbeiten (Weidensdorfer et al., 2009) konnte bestätigt werden, dass die betrachteten Interaktionen von ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 zu HUR, RHA und HNRNPU indirekt über RNA vermittelt werden (Abb. 3.12 C). Daher ist vermutlich auch die Interaktion von IGF2BP3 zu anderen Proteinen nicht bzw. nur wenig gestört. Denn die durchgeführten Analysen zeigten, dass die unveränderte Protein-Assoziation der IGF2BP3-KH1-4 Mutanten nicht auf direkte Protein-Interaktionen zurückgeführt werden kann, sondern weitere Mutationen nötig sind um die RNA-Bindung von IGF2BP3 vollständig zu zerstören.

Untersuchungen an IGF2BP1 zur Dynamik der RNA-Erkennung zeigten eine RNA-abhängige sequentielle Dimerisierung, eine Heterodimerisierung der IGF2BP Paralogen untereinander sowie eine Homodimerisierung von IGF2BP1 ohne RNA (Nielsen et al., 2004). Übereinstimmend dazu, konnte die Homodimerisierung von ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 bestätigt werden. Jedoch geht diese Fähigkeit nach der Mutation in den GXXG-Loops aller 4 KH-Domänen in ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 verloren (Abb. 3.13 A-C). Überdies konnte ebenso die Heterooligomerisierung von ZBP1 mit IGF2BP2 und IGF2BP3 gezeigt werden, wobei sowohl die Heterooligomerisierung als auch die Homooligomerisierung von ZBP1 unter RNase-Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.13 D). Die durchgeführten Oligomerisierungsstudien mit den IGF2BP-RNA-Bindungsmutanten (IGF2BP KH1-4) und unter RNase-Behandlung, legen nahe, dass es keine stabile, direkte Assoziation der IGF2BP Paralogen untereinander gibt. Diese Annahme wird gestützt durch die Beobachtung, dass das orthologe Vg1RBP keine Selbstassoziation zeigt, wenn es keine RNA mehr binden kann (Git und Standart, 2002). Für IGF2BP3 stellt sich die Frage, warum die

GXXG-GEEG-Mutation die RNA-Bindung und Protein-Assoziation nur moderat beeinträchtigt, jedoch einen Einfluss auf die Oligomerisierung hat. Möglicherweise könnten diese Ergebnisse darauf hindeuten, dass die KH-Domänen in IGF2BP3 die Homooligomerisierung vermitteln. Denn auch für Vg1RBP wird eine direkte Selbstassoziation über die KH3+4-Domäne vermutet, die durch RNA stabilisiert wird (Git und Standart, 2002). Nähere Untersuchungen zeigten, dass die letzte α -Helix der KH4-Domäne von Vg1RBP vermutlich über die Bildung einer *coiled-coil* Struktur für Protein-Protein-Wechselwirkungen verantwortlich ist (Oberman et al., 2007). Vorstellbar wäre, dass die eingeführten GXXG-GEEG-Mutationen die Homooligomerisierung von IGF2BP3 direkt behindern (Abb. 3.13 C). Jedoch scheint für die Bildung heterooligomerer Komplexe zwischen ZBP1 und IGF2BP3, die Stabilisierung durch RNA unerlässlich zu sein (Abb. 3.13 D). Weiterhin könnte man spekulieren, dass die verringerte RNA-Bindung des mutierten IGF2BP3-KH1-4-Proteins bereits ausreicht, um die Homooligomerisierung entscheidend zu stören.

In der vorliegenden Arbeit konnten IGF2BP2 und IGF2BP3 erstmals in TIA1-positiven SGs nachgewiesen werden (Abb. 3.14). Die Rekrutierung in SGs wird dabei durch die KH-Domänen in ZBP1 und IGF2BP2, und damit der Fähigkeit RNA zu binden, vermittelt. Dieser Befund stützt die Hypothese, dass die Stabilisierung von mRNAs, unter zellulärem Stress, durch die Bildung stabiler mRNPs realisiert wird, welche von TIA-Proteinen und G3BP1 transient in SGs rekrutiert werden können (Bley et al., 2015).

4.2 Die Bindemotive der IGF2BPs

Da für alle IGF2BP-Paralogen *in vitro* eine Bindung sowohl an den ACTB *zipcode* als auch an die MYC-CRD festgestellt werden konnte, stellte sich die Frage, ob sich die RNA-Bindemotive der drei IGF2BP-Proteine voneinander unterscheiden. Die Selektion affiner und spezifischer RNA-Aptamere für ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 mittels SELEX-Prozess (siehe Abb. 3.15) ergab in der Tat unterschiedliche Bindemotive, welche zum Teil in den jeweils bekannten *cis*-Elementen der Ziel-RNAs vertreten sind. So stellten sich die ZBP1-Motive AUUC^C/_A und UCAU^A/_U, die IGF2BP2-Motive UUCCC und AC^G/_A AC sowie die IGF2BP3-Motive UUCC und UCCC^A/_U als die wahrscheinlichsten Bindemotive heraus, da diese in einigen bekannten *cis*-Elementen der jeweiligen Ziel-RNAs angereichert sind (siehe 3.24, 3.25, 3.26). Um abschließend zu klären, ob diese Konsensus-Motive durch die IGF2BPs gebunden werden, könnten selektive Punktmutationen innerhalb der Motive, verbunden mit *in vitro*

Bindungsanalysen, durchgeführt werden. Dies könnte schließlich Aufschluss darüber geben, ob zum Beispiel im Falle der Bindung der IGF2BPs an die MYC-CRD, tatsächlich Ribosomenfreie Regionen gegenüber endonukleolytischen Angriffen abgeschirmt werden (Lemm und Ross, 2002). Des Weiteren könnte damit gezeigt werden, ob IGF2BP2 wirklich über die Bindung der in LCS (*let-7 complementary sites*) befindlichen Konsensusmotive innerhalb der NRAS 3'-UTR, die Assoziation der let-7 microRNA blockieren und damit die NRAS mRNA vor Abbau schützen kann.

Die Sekundärstrukturanalyse der identifizierten Aptamere ergab, dass die Basen der meisten Konsensusmotive ungepaart vorliegen und somit eine wichtige Grundvoraussetzung für die Bindung der IGF2BPs gegeben ist (Valverde et al., 2008; siehe Abb. 3.22). Im Vergleich zum ACTB *zipcode* RNA-Fragment (Kim et al., 2015) erwiesen sich die selektierten Aptamere zudem als faltungsstabiler. Da sich die Aptamere darüber hinaus als hoch affine Bindungspartner der IGF2BPs herausstellten (Abb. 3.19), könnten sich die selektierten Aptamere vermutlich gut für Kristallisationsstudien zusammen mit den IGF2BP Proteinen eignen. Erfolgreiche Analysen, in denen SELEX-Aptamere eingesetzt wurden, existieren bereits für die KH3-Domäne von Nova-2 (Lewis et al., 2000).

Insgesamt wurden für alle IGF2BP Paralogen sehr pyrimidinhaltige Motive selektiert (siehe Abb. 3.21). Zudem enthalten die selektierten Aptamere im Vergleich zu RNAs des Initialpools einen geringeren Anteil an Guanosinen sowie einen höheren Anteil an Cytidinen (Abb. 3.20). Dieser Befund deckt sich mit bisherigen Hypothesen, denn in den Bindemotiven der IGF2BP Ziel-RNAs treten wenige Guanosine auf (J. Nielsen et al., 2004; Jonson et al., 2007). Außerdem wird vermutet, dass die KH-Domänen vorrangig Pyrimidin-Nukleotide erkennen (Backe et al., 2005). Durch den SELEX-Prozess konnte aber ebenso ein einheitliches Motiv für alle drei Paralogen identifiziert werden, das AU^A/_U C-Motiv. Dieses Ergebnis überrascht wenig, denn dass die IGF2BPs sehr ähnliche Bindungspräferenzen aufweisen, wurde ebenfalls von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt. Durch PAR-CLIP erhaltene Motive der IGF2BPs tragen zumeist eine Abfolge aus CAU^U/_{C/A} (Hafner et al., 2010). Jedoch muss man kritisch anmerken, dass die experimentelle Herangehensweise zur Ermittlung dieses Motives, einige Defizite aufweist. So basieren diese Studien auf der Überexpression Flagmarkierter Proteine in HEK293 Zellen, die jedoch im Vergleich zum endogenen Protein eine aberrante Sedimentation im Gradienten aufweisen (Bell et al., 2013). Zudem werden in diesen Zellen alle drei IGF2BPs exprimiert, was problematisch für die Identifikation

Diskussion

spezifischer Bindemotive sein kann, da eine Oligomerisierung der IGF2BPs möglich ist (J. Nielsen et al., 2004; Git und Standart, 2002; siehe Abb. 3.13). Im Gegensatz dazu konnte durch die hier angewandte SELEX-Methode eine Selektion bindender Aptamere für jedes einzelne Protein *in vitro* erfolgen. Dabei zeigte sich durch Wettbewerbsanalysen (siehe 3.2.1) und Filterbindung (Abb. 3.19), dass es sich in der Tat um affine Bindungspartner handelt. Ein Problem dieser Methode ist allerdings, dass nur besonders stabile Aptamere den Selektionsbedingungen standhalten, ungünstig gefaltete Aptamere jedoch nicht erhalten werden können, obwohl diese vielleicht bessere Bindemotive besitzen. Zudem muss man kritisch anmerken, dass die Selektion mit rekombinanten IGF2BP Proteinen aus *E. coli* durchgeführt wurde, die keine posttranslationalen Modifikationen, wie Phosphorylierungen aufweisen. Der Phosphorylierungsstatus der IGF2BPs ist jedoch für die Assoziation mit einigen Ziel-mRNAs essentiell. So fördert die Phosphorylierung von IGF2BP1 an Ser181 und von IGF2BP2 an Ser162 und Ser164, die Bindung an die 5'-UTR der IGF2 mRNA (Dai et al., 2013; Dai et al., 2011). Folglich kann auch diese Methode kein vollständiges Bild zu den RNA-Bindungsmotiven der IGF2BPs liefern.

Anhand struktureller Analysen der KH3+4 Didomäne von ZBP1 gepaart mit Modellierungen der ACTB *zipcode* RNA wird postuliert, dass sich die Bindemotive in einem bestimmten Abstand (10-25 Nukleotide) zueinander befinden, wodurch ein „ausloopen“ der RNA ermöglicht wird (Chao et al., 2010; Patel et al., 2012). Ein ähnlich großer Abstand wurde für benachbarte PAR-CLIP- und SELEX-Motive in den Aptameren ermittelt (Abb. 3.27). Um diese Hypothese abschließend zu belegen wären jedoch Protein-RNA-Strukturanalysen notwendig. Überdies müsste geprüft werden, ob dieses Modell auch auf andere Ziel-RNAs und auf das Bindungsverhalten der KH1+2 Didomäne übertragbar ist. Unter diesem Aspekt wäre interessant herauszufinden, wie beide Didomänen funktionell zusammenwirken und welche Konformation beide Didomänen einnehmen, wenn Ziel-RNAs über alle KH-Domänen gebunden werden. Das resultierende Wissen könnte man auf künftige SELEX-Analysen anwenden, indem man konstante Bereiche zwischen randomisierten Sequenzen platziert, welche die strukturellen Erfordernisse der Bindemotive, wie Zugänglichkeit und räumliche Anordnung, für die spezifische Assoziation der IGF2BPs gewährleisten.

4.3 Die Zusammensetzung der IGF2BP-RNPs

Das Schicksal der Transkripte, die von den IGF2BP Paralogen gebunden werden, sei es die translationelle Inhibierung oder der Schutz vor Abbau, könnte durch die Proteinzusammensetzung regulatorischer mRNPs mitbestimmt werden. Daher ist es von großer Bedeutung Protein-Interaktoren der IGF2BPs zu identifizieren. In der vorliegenden Arbeit konnte die Interaktion von ZBP1 mit HNRNPU, RHA, YBX1, HUR, HNRNPQ (Jonson et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2009) und RO60 (Jonson et al., 2007; Köhn et al., 2010) bestätigt werden. Außerdem liefern die hier durchgeführten Analysen neue Erkenntnisse zur Zusammensetzung ZBP1 enthaltener RNPs. Durch die Gradienten-Separation konnten die Proteine MOV10, RO60, HNRNPM und HNRNPQ, ZBP1 enthaltene YRNPs zugeordnet werden und IGF2BP2, IGF2BP3, HNRNPU, RHA, YBX1, HUR, HNRNPM, MATR3, HNRNPR, HNRNPQ und MOV10 als ZBP1 Interaktoren von mRNPs identifiziert werden (Abb. 3.34). Wie sich die einzelnen RNP-Komplexe im Detail zusammensetzen, könnte mit Hilfe von RNA-Pulldown-Experimenten gepaart mit Immunopräzipitationen, sowie mittels Gelfiltrationsstudien aufgeklärt werden. Mit dem erstgenannten Thema setzte sich A. Baude in ihrer Dissertation auseinander (Dissertation, A. Baude, unveröffentlicht). In weiterführenden *knockdown*- und *decay*-Analysen konnte sie zeigen, dass HNRNPM die MYC mRNA vermutlich stabilisiert. Da dies ebenso für IGF2BP1, HNRNPU, HNRNPQ, RHA und YBX1 postuliert wird (Weidensdorfer et al., 2009), kann man vermuten, dass diese Proteine zusammen mit der MYC mRNA in gemeinsamen oder verschiedenen Komplexen zusammenwirken. Wobei aufgrund der Lokalisation von HNRNPU (Pinol-Roma und Dreyfuss, 1991) die Assoziation mit dem MYC Transkript ausschließlich auf den Zellkern beschränkt wäre, ist für HNRNPQ eine Stabilisierung von MYC in zytoplasmatischen mRNPs denkbar, da bereits für die *c-fos* mRNA gezeigt wurde, dass die Assoziation von HNRNPQ mit der *c-fos*-CRD im Zytoplasma stabilisierend wirkt, indem die Deadenylierung der mRNA verhindert wird (Grosset et al., 2000). Für HUR ist bekannt, dass es im 3'UTR der MYC RNA bindet (Lafon et al., 1998), zum Regulationsmechanismus jedoch existieren konträre Hypothesen. So wird zum einen eine Stabilisierung durch HUR postuliert (Weidensdorfer et al., 2009), zum anderen wird die Inhibierung der MYC Expression durch die HUR vermittelte Rekrutierung des RISC Komplexes vorgeschlagen (Kim et al., 2009). Jonson und Kollegen beschrieben anhand von AFM-Studien (*atomic force microscopy*) die IGF2BP1 enthaltene Granula als

Diskussion

sphärisch, mit einer glatten Oberfläche und einem Durchmesser von etwa 100-300 nm. Aufgrund dieser Größenabschätzung, gepaart mit Proteom-Analysen wird postuliert, dass ein Granulum die IGF2BPs, YBX1 und 40S Untereinheiten zusammen mit 10-30 mRNA Transkripten enthalten könnte (Jonson et al., 2007). Analysen in HEK293 Zellen zeigten jedoch, dass etwa 300 Transkripte durch IGF2BP1 gebunden werden (Jonson et al., 2007). Auch die große Zahl putativer Protein-Liganden, welche durch die MS-Analysen identifiziert wurden, gibt Grund zur Annahme, dass die IGF2BP1 enthaltenen Granula sehr heterogen in ihrer Zusammensetzung sind. Zudem sollte man bedenken, dass die IGF2BPs in der Lage sind RNA-abhängige Homo- und Heterooligomere zu bilden (Git und Standart, 2002; Nielsen et al., 2004; Obermann et al., 2007). Ebenso wie YBX1, ein multifunktionales Protein, welches durch seine Fähigkeit zu multimerisieren sogar allein mRNPs bilden kann (Tafari et al., 1992; Skabkin et al., 2004). Für YBX1 ist seit langem bekannt, dass es als Hauptkomponente translationell inaktiver mRNPs (Minich et al., 1989) die mRNA verpackt, damit vor Abbau schützt, und für die Translationsmaschinerie unzugänglich macht (Evdokimova et al., 2001; Nekrasov et al., 2003; Skabkin et al., 2004). Dabei bindet die C-terminale Region von YBX1 sequenzunabhängig an RNA und vermittelt Protein-Protein Interaktionen (Wolffe et al., 1994; Sommerville und Lodomery et al., 1996). Für die N-terminale Domäne dagegen konnte eine Assoziation mit Aktin Mikrofilamenten gezeigt werden, die möglicherweise zur Lokalisation von mRNAs beiträgt (Ruzanov et al., 1999). YBX1 könnte somit zusammen mit IGF2BP1, neben der Stabilisierung der MYC mRNA, am Transport und der Lokalisation der ACTB mRNA beteiligt sein. In der Tat konnte anhand von SILAC-Analysen (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) eine Assoziation von YBX1 mit dem ACTB zipcode nachgewiesen werden (Butter et al., 2009). Studien zeigten, dass ZBP1 die Lokalisation der ACTB RNA, jedoch nicht dessen *steady-state level* beeinflusst (Farina et al., 2003). Die lange Halbwertszeit dieser RNA (Condeelis und Singer 2005) ist somit von anderen Faktoren abhängig. Als ein möglicher Stabilisator kommt HUR in Betracht, da gezeigt werden konnte, dass es einen Uracil-reichen Bereich in der 3'UTR der ACTB mRNA bindet und diese somit stabilisiert (Dormoy-Raclet et al., 2007). Für HNRNPQ und HNRNPR wurde ebenfalls publiziert, dass sie in ACTB mRNA bindenden Komplexen vorkommen (Rossoll et al., 2002). Zudem wurde für HNRNPR die Assoziation mit dem 3'UTR von ACTB belegt, welche für den Transport und die lokale Synthese der ACTB mRNA in Axonen essentiell ist (Glinka et al., 2010).

Jüngste Publikationen verdeutlichen, dass ZBP1 enthaltene Granula zelltypspezifische Unterschiede hinsichtlich ihrer Zusammensetzung aufweisen. Denn in neuronalen Zellen konnte sowohl die Interaktion von ZBP1 mit dem Aktin-basierenden Motorprotein MYO5A (Nalavadi et al., 2012) als auch mit dem Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein KIF5A (Ma et al., 2011) gezeigt werden, während in Fibroblasten und Krebszellen lediglich die Interaktion zwischen ZBP1 und dem Mikrotubuli-assoziierten Motorprotein KIF11 nachgewiesen werden konnte (Song et al., 2015).

Dem RNA-bindenden Protein MATR3, welches als neuer IGF2BP1-Interaktor von mRNPs identifiziert werden konnte, wird neben der Rolle im alternativen Spleißprozess auch eine Stabilisierung von RNA zugeschrieben (Coelho et al., 2015; Salton et al., 2011). Es bleibt jedoch herauszufinden, welche Funktionen MATR3 im Komplex mit IGF2BP1 ausübt.

Ein Protein, welches ausschließlich in YRNPs mit IGF2BP1 interagiert ist RO60. Es ist bekannt, dass RO60 im Zytoplasma an nichtkodierende RNAs (Y1, Y3, Y4, Y5) bindet und diese stabilisiert (Labbe et al., 1999; Sim et al., 2012). Es wird postuliert, dass IGF2BP1, YBX1, MOV10, IGF2BP2, IGF2BP3 und HNRNPQ mit RO60 durch die Bindung dieser RNAs assoziieren (Jonson et al., 2007; Köhn et al., 2010, Sim et al., 2012). In dieser Arbeit konnten MOV10, HNRNPQ, HNRNPM, RO60 und zu einem geringen Teil auch IGF2BP3 mit IGF2BP1 in YRNPs kopräzipitiert werden. Die funktionelle Rolle dieser zytoplasmatischen YRNP-Komplexe ist noch unbekannt, jedoch wäre denkbar, dass diese als eine Art Gerüst für Proteine dienen und Transportvorgänge koordinieren. Ähnliche Funktionen wurden bereits für andere nichtkodierende RNAs beschrieben. So vermittelt die 7SL RNA als Komponente des SRP (*signal recognition particle*) den Transport von Proteinen oder Peptiden zum Endoplasmatischen Retikulum (*reviewed* (Hu et al., 2012)). Dagegen wird für die 7SK snRNA (*small nuclear RNA*) postuliert, dass diese innerhalb von snRNPs regulatorisch auf gebundene Proteine wirkt. Die Kinase-Aktivität des assoziierten Proteins P-TEFb (*positive transcription elongation factor b*) wird beispielsweise inhibiert, sodass die Phosphorylierung und damit die transkriptionelle Aktivierung der RNA Polymerase II unterbleibt (Egloff et al., 2006).

Das ebenfalls in YRNPs identifizierte Protein HNRNPM ist ein kernlokalisiertes RBP, welches das Spleißen der pre-mRNA reguliert und zudem das alternative Spleißen moduliert (Hase et al., 2006; Lleres et al., 2010). Die hier durchgeführten Studien zeigten, dass ZBP1 in YRNP-Fraktionen vorwiegend mit der kleinsten Isoform von HNRNPM (M1) und in mRNP-Fraktionen mit der größten Isoform von HNRNPM (M4) interagiert, was auf unterschiedliche

Diskussion

Funktionen der HNRNPM Isoformen innerhalb der RNPs hindeutet. Obwohl die Existenz der HNRNPM Isoformen 1-4 bereits 1993 von Datar et al. durch 2-D-Gelelektrophorese ermittelt wurde, ist recht wenig über die einzelnen Isoformen bekannt. Jedoch wurde von Gattoni et al. beobachtet, dass HNRNPM1/2 nach einem Hitzeschock den HNRNP-Komplex verlassen, an die nukleäre Matrix binden und so möglicherweise das Spleißen an- und abschalten können (Mähl et al., 1989; Gattoni et al., 1996). Kürzlich erschien eine Publikation in der postuliert wird, dass HNRNPM 3/4 mit IGF2BP3 im Zellkern interagiert und zusammen mit verschiedenen Zyklin-RNAs einen RNP bildet (Rivera Vargas et al., 2014). Diese jedoch muss kritisch hinterfragt werden, da bereits in mehreren Studien festgestellt wurde, dass sich die IGF2BPs hauptsächlich im Zytoplasma befinden (Nielsen et al., 2003; Jonson et al., 2014). Dies konnte zudem durch die in dieser Arbeit durchgeführten Lokalisationsstudien bestätigt werden (Abb. 3.10). Die festgestellte Kernlokalisierung von IGF2BP3 könnte möglicherweise auf Unspezifitäten der genutzten kommerziellen Antikörper zurückgeführt werden (Lederer et al., 2014). Jedoch ist neben zytoplasmatisch lokalisierten IGF2BP3 enthaltenen mRNP-Komplexen durchaus denkbar, dass IGF2BP3 zu einem geringen Teil in kernlokalisierten Komplexen zu finden ist. Dafür spricht, dass bereits für das orthologe ZBP1 gezeigt werden konnte, dass es während der Transkription mit der ACTB pre-mRNA assoziiert (Oleynikov und Singer, 2003). Überdies ergaben vergleichende Proteom-Analysen humaner Spleißosomen, dass IGF2BP3 in funktionellen Spleißosomen vorkommt (Zhou et al., 2002).

Letztlich lassen die hier durchgeführten Analysen zusammen mit den aus der Literatur bekannten Daten, auf das Vorhandensein mehrerer heterogener IGF2BP-RNP-Komplexe schließen, deren Dynamik und Komplexität noch weitere Studien erfordert, um funktionelle Zusammenhänge aufzuklären.

Ein verbreitetes Problem ist, dass IGF2BP1 nur zu einem geringen Teil aus den Zelllysaten präzipitiert werden kann, was möglicherweise auf die feste Verankerung innerhalb der RNP-Komplexe zurückzuführen ist. Dies kann dazu führen, dass einige Protein-Interaktionen nicht nachgewiesen werden können. Mittlerweile gibt es Antikörper gegen IGF2BP1, mit denen eine Steigerung der Präzipitationseffizienz herbeigeführt werden kann (persönliche Information von M. Köhn). Eine mögliche Erklärung wäre, dass das von diesen Antikörpern erkannte C-terminale IGF2BP1-Epitop besser zugänglich ist. Das N-terminale Epitop, welches durch den hier genutzten Antikörper gebunden wird, jedoch maskiert wird. Da diese Antikörper ebenfalls für IGF2BP2 und IGF2BP3 erhältlich sind, könnten RNP-Analysen

basierend auf der Präzipitation dieser Proteine durchgeführt werden und noch ungeklärten Fragen nachgegangen werden. Beispielsweise existieren zum Vorhandensein von AGO-Proteinen in IGF2BP3 enthaltenen RNPs noch widersprüchliche Ergebnisse. Während eine Arbeitsgruppe die RNA-abhängige Interaktion von IGF2BP3 mit AGO1 und AGO2 nachweisen konnte (Höck et al., 2007), wird von Jonson et al. postuliert, dass IGF2BP3-RNPs keine AGO-Proteine enthalten und somit gebundene mRNAs, wie HMGA2, vor microRNA gerichteter Degradation schützen (Jonson et al., 2014).

Neben den in der vorliegenden Arbeit validierten Interaktoren beinhalten die MS-Analysen zahlreiche weitere putative Proteinliganden von ZBP1 (siehe 7.4, Tab. 1A und B). So stützt die Identifikation von SR-Proteinen (Serin/Arginin-reiche Proteine) wie SRRM2 und SFRS1 in den MS-Analysen die Hypothese, dass ZBP1 eine Komponente von Pionier-mRNPs ist. Da für SR-Proteine bekannt ist, dass diese mit EJs multimerisieren (Singh et al., 2012) und für SFRS1 gezeigt wurde, dass es den NMD-Prozess fördert, indem es vermutlich die Deposition des EJs stimuliert (Zhang und Krainer, 2004). Zudem konnte in der vorliegenden Arbeit neben der Identifikation weiterer Pionier-mRNP-Komponenten (MS-Analysen, Abb. 3.28 C und 3.29) erstmals die Assoziation von ZBP1 mit dem NMD-Faktor UPF1 nachgewiesen werden (Abb. 3.30 A). Dieses Ergebnis legt die Vermutung nahe, dass ZBP1 auch mit Transkripten assoziiert, die sich in der ersten Translationsrunde befinden. Dagegen scheint das Vorhandensein von ZBP1 in *steady-state* Translationskomplexen eher unwahrscheinlich, da endogenes IGF2BP1 im 20-47% Saccharose Gradient im Bereich von 40S bis 150S sedimentiert und nicht mit Polysomen assoziiert ist (J. Nielsen et al., 1999). Zudem fehlen den mRNP-Partikeln Translationsinitiations-Faktoren (eIF4E und G, eIF2 α) und ribosomale Proteine der 60S Untereinheit (Jonson et al., 2007). Jedoch wurden einige Proteine der 60S Untereinheit in den vorliegenden MS-Analysen identifiziert, was auf weitere IGF2BP1-Komplexe hindeuten könnte. Andererseits kann nicht ausgeschlossen werden, dass es sich dabei um falsch positive Interaktoren handelt, die aufgrund der starken Abundanz in den MS-Analysen identifiziert wurden. Aufschluss darüber könnten Immunopräzipitations-Analysen sowie Gradienten-Studien (15-45 % Saccharose Gradient) liefern.

4.4 Die Rolle von IGF2BP2 im Glukose-Metabolismus

Ein wichtiges Charakteristikum der IGF2BPs ist die hohe Expression während der Embryonalentwicklung (Hansen et al., 2004). IGF2BP1 und IGF2BP3 können als onkofetale Proteine bezeichnet werden, da diese kaum noch in adulten Organen nachweisbar sind, jedoch stark in verschiedenen Tumoren exprimiert werden (Yaniv et al., 2002; Yisraeli et al., 2005; Bell et al., 2013). Im Gegensatz dazu ist IGF2BP2 auch in verschiedenen adulten Geweben abundant (Christiansen et al., 2009; Dai et al., 2011; Bell et al., 2013). Genomweite Assoziationsstudien führten zur Identifizierung von SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) im zweiten Intron des IGF2BP2 Locus, welche mit einem erhöhten Typ 2 Diabetes Risiko (T2D) korrelieren (*reviewed* (Christiansen et al., 2009)). Aufgrund dieses Befundes wird für IGF2BP2 eine metabolische Funktion postuliert, jedoch ist ungeklärt, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen diesen SNPs und IGF2BP2 besteht. Es wäre zum einen denkbar, dass diese SNPs das Spleißen oder die Expression von IGF2BP2 beeinflussen, zum anderen könnte durch SNPs die Sequenz von miRNAs, lncRNAs oder antisense RNAs verändert sein und damit eine Regulation der transkriptionellen und posttranskriptionellen Expression noch unbekannter Gene erfolgen. Zur Aufklärung wären jedoch erneute Sequenzierungen und Feinkartierungen der betreffenden SNP-Region nötig. Ein weiterer Hinweis für eine mögliche Metabolismus-Kontrolle ist, dass die Phosphorylierung von IGF2BP2 durch mTORC1, die Assoziation von IGF2BP2 mit der IGF2 mRNA erleichtert und in einer gesteigerten IGF2 Proteinsynthese resultiert (Dai et al., 2011). Diesem wachstumsfördernden Polypeptid wird eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von T2D zugeschrieben. Die Überexpression von IGF2 induziert eine Fehlfunktion von pankreatischen β -Zellen und macht diese empfänglich für Schäden, wodurch die β -Zellen einen erhöhten Insulin-Bedarf nicht mehr kompensieren können (Casellas et al., 2015). Damit wird IGF2 eine entscheidende Rolle in der Entwicklung von T2D zugeschrieben. Da IGF2BP2 die Translation der IGF2 mRNA fördert und ebenfalls in pankreatischen β -Zellen exprimiert wird, könnte IGF2BP2 über diesen Regulationsmechanismus an pathologischen Veränderungen des T2D beteiligt sein (Dai et al., 2011). Um diese Hypothese zu prüfen, wurde in Zusammenarbeit mit B. Mühleck ein Protokoll für die Immunofluoreszenz-Färbung von Pankreas-Schnitten aus transgenen Mauslinien etabliert, welches im Rahmen der Doktorarbeit von J. Jaeckel zur Anwendung kommt (Dissertation, J. Jaeckel, unveröffentlicht).

Diskussion

Neben der Regulation der IGF2-Translation durch IGF2BP2 sind weitere molekulare Mechanismen denkbar, die zur Metabolismus-Modulation beitragen. So wird zudem postuliert, dass IGF2BP2 die Translation von mRNAs inhibiert, die für mitochondriale Proteine kodieren, wie zum Beispiel die UCP1 mRNA, und damit den Metabolismus reguliert (Dai et al., 2015). Denn Mäuse, die kein IGF2BP2 exprimieren (*Imp2^{-/-}*) weisen erhöhte UCP1-Mengen auf, welche in einem gesteigerten Sauerstoffverbrauch des braunen Fettgewebes resultieren und die Tiere aufgrund des erhöhten Energieverbrauchs weniger empfänglich für Übergewicht machen.

In der vorliegenden Arbeit konnte anhand metabolischer Analysen gezeigt werden, dass die Überexpression von GFP-IGF2BP2 im Vergleich zur Expression von GFP in U2OS Zellen zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme (Abb. 3.35) und einem erhöhten Glykogengehalt (Abb. 3.36) führt. Überdies konnte in den Lebern BiPro-IGF2BP2 exprimierender Mäuse im Vergleich zu BiPro-IGF2BP1, BiPro-IGF2BP3 und BiPro-GFP exprimierenden Mäusen ebenfalls ein signifikant erhöhter Glykogengehalt bestimmt werden (Abb. 3.37). Diese Ergebnisse bekräftigen die Hypothese, dass IGF2BP2 eine Rolle im Metabolismus spielt. Diese Hypothese wird zudem durch einen weiteren Befund gestützt. So wurde nach der Überexpression von P62, der Spleißvariante von IGF2BP2, in der Leber transgener Mäuse, ein Fettleber-Phänotyp sowie eine gesteigerte Toleranz gegenüber Glukose beobachtet (Tybl et al., 2011). Überdies wurden eine stärkere Expression von IGF2, eine erhöhte Aktivierung von AKT sowie verringerte PTEN-Level festgestellt. Wobei Tybl et al. vorschlagen, dass eine Reduktion von PTEN die Phosphorylierung und damit die Aktivierung von AKT fördert, da PTEN den AKT-Aktivator PIP-3 nicht mehr effektiv dephosphorylieren kann (Suzuki et al., 2008). Die verringerte PTEN Expression wiederum könnte auf die direkte Inhibierung durch IGF2 zurückgeführt werden, welche in Milchdrüsen der Maus nachgewiesen wurde (Moorehead et al., 2003). Übereinstimmend dazu wurde in IGF2BP2-*Knockdown* Zellen im Vergleich zur Kontrolle eine reduzierte AKT Phosphorylierung sowohl am Serin 473 als auch am Threonin 308 festgestellt (Abb. 3.38), welche mit leicht erhöhten PTEN-Level (U2OS; $1,3 \pm 0,1$; Daten nicht gezeigt) einher geht. Es ist bekannt, dass die Aktivierung des mTOR Signalweges die Glukoseaufnahme steigert, indem eine Modulation der Genexpression erfolgt (Duvel et al., 2010). So wird zum Beispiel die Synthese des Glukose-Transporters GLUT1 erhöht (Buller et al., 2008), welcher in mehreren Krebszelllinien exprimiert wird (Ahrens et al., 2008; www.proteinatlas.org; Uhlen et al.,

Diskussion

2015). Der erhöhte Glykogengehalt wiederum ist mit der Aktivierung von AKT erklärbar, da AKT die Glykogen Synthase Kinase-3 (GSK3 β) inhibiert, wodurch das Enzym Glykogensynthase aktiviert wird, was in der Akkumulation von Glykogen resultiert (Cross et al., 1995).

Ein RBP, welches neben IGF2BP2 die Translation der IGF2 mRNA fördert, ist LIN28A/B (Polesskaya et al., 2007). Für dieses Protein konnte gezeigt werden, dass es die Biogenese der let-7 microRNA inhibiert und damit die Translation von let-7-Ziel-mRNAs ermöglicht (Piskounova et al., 2008; Rybak et al., 2008; Viswanathan et al., 2008; Zhu et al., 2011). Darunter sind nicht nur Komponenten des mTOR-Signalweges, wie IGF1R (*Insulin-like growth factor 1 receptor*), INSR (*Insulin receptor*) und IRS2 (*insulin receptor substrate 2*), sondern auch IGF2BP2 (Wang et al., 2010; Zhu et al., 2011). Daher wird LIN28A/B eine Rolle als zentraler Regulator des Glukose-Metabolismus zugeschrieben (Zhu et al., 2011). Ähnlich wie hier für IGF2BP2 gezeigt, steigert LIN28 die Glukoseaufnahme in C2C12 Myoblasten, wahrscheinlich indem es mTORC-Komponenten dereprimiert und damit die Aktivität des Signalweges erhöht (Zhu et al., 2011). Interessanterweise werden ebenfalls unter IGF2BP2 *knockdown* in primären Maus Myoblasten, geringere Mengen an IGF1R Protein beobachtet (Li et al., 2012; Gong et al., 2015). Die simultane Regulation mehrerer Komponenten des mTORC Signalweges, wie IGF2 und IGF1R könnte erklären, wie mittels posttranskriptioneller Regulationsmechanismen eine koordinierte Regulation des Glukose-Metabolismus erfolgen kann. Anhand der beobachteten Phänotypen kann man schlussfolgern, dass IGF2BP2 neben anderen Faktoren, wie LIN28 und let-7, eine entscheidende Rolle im komplexen Regulationsnetzwerk des Metabolismus spielt. Weitere Untersuchungen sind jedoch notwendig, um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen aufzuklären. Unter diesem Aspekt wären zum einen IGF2BP2 *knockout*-Studien in Mäusen denkbar, in denen eine umfassende Charakterisierung des Metabolismus erfolgen könnte, zum anderen würde die Identifikation weiterer Ziel-mRNAs sowie Protein-Interaktionen von IGF2BP2 in entsprechenden Geweben sicherlich weitere Hinweise liefern.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Proteine der IGF2BP-Familie vermitteln über die Bindung ihrer Ziel-mRNAs wesentliche posttranskriptionelle Regulationsprozesse. Welche KH-Domänen für die Assoziation spezifischer mRNAs verantwortlich sind, und wie sich mögliche RNA-Bindungsmotive zusammensetzen, ist bisher nicht vollständig aufgeklärt.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten, vergleichenden *in vitro* Filterbindungsstudien der IGF2BP Paralogen geben erstmals einen Einblick in die Funktionsweise der KH-Domänen für die Assoziation mit den RNA-Substraten ACTB und MYC. Für ZBP1, IGF2BP2 und IGF2BP3 wurde eine Beteiligung aller vier KH-Domänen festgestellt. Nähere Untersuchungen zeigten, dass die KH1+2 Didomäne für die Komplex-Stabilität von Bedeutung ist. Da bisher lediglich Strukturanalysen zur KH3+4 Domäne von ZBP1 existieren sind künftige, vergleichende Kokristallisationsstudien der IGF2BP Proteine sowie der jeweiligen KH1+2 und KH3+4 Didomäne mit unterschiedlichen Ziel-RNAs notwendig, um die Bindungsmechanismen vollständig aufzuklären. Als geeignetes RNA-Substrat, hinsichtlich der notwendigen Stabilität und Affinität, wäre die Y3 RNA denkbar.

Zudem stellen die hier eingeführten Punktmutationen in den GXXG-Loops der KH-Domänen von ZBP1 und IGF2BP2 ein geeignetes Instrumentarium dar, um die Bindungsspezifität zu weiteren relevanten Ziel-mRNAs zu untersuchen. In diesem Zusammenhang könnte geprüft werden, ob die simultane Assoziation mit mehreren RNA-Substraten möglich ist. Dazu könnte man mehrere RNAs unterschiedlich markieren und die Assoziation der IGF2BPs über EMSA-Studien analysieren.

Weiterführende Analysen ergaben, dass alle KH-Domänen der IGF2BP Paralogen wichtige funktionelle Einheiten für die zytoplasmatische Lokalisation, Protein-Assoziation, Oligomerisierung und Rekrutierung der Proteine in SGs darstellen. Durch die Anwendung des SELEX-Prozesses konnten für die IGF2BP Paralogen pyrimidinhaltige Motive selektiert werden, die sich jedoch in ihrer Nukleotid-Zusammensetzung voneinander unterscheiden. Die generierten, hoch affinen RNA-Aptamere könnten Anwendung in künftigen Protein-RNA-Kokristallisationsstudien finden. Überdies könnte die spezifische Inhibierung der IGF2BP Proteine über die Applizierung dieser RNA-Aptamere erreicht werden, wodurch eine therapeutische Wirkweise möglich wäre. Diese könnte schließlich bei der Behandlung fortschreitender Krebserkrankungen zum Einsatz kommen. Voraussetzung dafür wäre, die

Spezifität der Aptamere zu kennen, damit die gezielte Blockierung einzelner KH-Domänen gewährleistet werden kann.

Unter diesem Aspekt wären vergleichende Studien zur Identifikation regulierter Transkripte aller IGF2BP Paralogen von Vorteil. Anhand von PAR-CLIP Untersuchungen, basierend auf der Überexpression Flag-markierter Proteine, werden mehrere Tausend Ziel-mRNAs der IGF2BPs vorgeschlagen. Jedoch legt die bereits erwähnte aberrante Sedimentation von exogenem ZBP1 gegenüber endogenem ZBP1 in Saccharose Gradienten nahe (Bell et al., 2013), dass das exogene Protein zum Teil ungebunden vorliegt und somit keine verlässlichen Aussagen zur Funktion des Proteins zulässt. Alternativ wäre denkbar von IGF2BP1, 2 und IGF2BP3 *Knockdown*- bzw. überexprimierenden Zellen, Gradienten-Analysen durchzuführen und die aus monosomalen und polysomalen Fraktionen präparierte RNA mittels *Microarray* bzw. *Deep-Sequencing* zu untersuchen. Dabei sollte die Überexpression besser unter Kontrolle eines Tetrazyklin induzierbaren Promotors durchgeführt werden, denn Jonson und Kollegen konnten zeigen, dass die Induktion der Expression mit 1 μ M Tetrazyklin, Mengen an Flag-IGF2BP1 liefert, die mit endogenem IGF2BP1 vergleichbar sind (Jonson et al., 2007). Diese Studie würde zugleich Informationen liefern, ob mögliche Ziel-mRNAs der IGF2BPs in ihrer Translation beeinflusst werden, indem die Anreicherung in mono- und polysomalen Fraktionen verglichen wird.

Eine künftige Herausforderung wird außerdem sein, die Nukleotid-Spezifität einzelner KH-Domänen zu untersuchen, um zu erforschen wie spezifische RNAs gebunden werden. Zu diesem Zweck könnten SELEX-Studien mit isolierten KH-Domänen erfolgen oder direkt gebundene RNA-Fragmente über iCLIP-Methoden (*individual nucleotide resolution cross-linking and immunoprecipitation*) gewonnen und im Anschluss über Hochdurchsatz-Sequenzierungen analysiert werden.

Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Erkenntnisse zur Protein-Zusammensetzung regulatorischer ZBP1-RNPs, leisten einen wesentlichen Beitrag zum Verständnis der Funktionsweise der IGF2BP Proteine. Unter diesem Aspekt konnte die Interaktion von ZBP1 mit HNRNPU, RHA, YBX1, HUR, HNRNPQ (Jonson et al., 2007; Weidensdorfer et al., 2009) und RO60 (Jonson et al., 2007; Köhn et al., 2010) bestätigt werden. Des Weiteren konnten die Proteine MOV10, RO60, HNRNPM und HNRNPQ, ZBP1 enthaltenen YRNPs zugeordnet werden und IGF2BP2, IGF2BP3, HNRNPU, RHA, YBX1, HUR, HNRNPM, MATR3, HNRNPR, HNRNPQ und MOV10 als ZBP1 Interaktoren in mRNPs

Zusammenfassung und Ausblick

identifiziert werden. Die Frage, wie sich YRNP- und mRNP-Komplexe im Detail zusammensetzen, könnte durch RNA-*pulldown* Experimente gepaart mit sequentiellen Immunopräzipitationen der identifizierten Proteine, aufgeklärt werden.

Für IGF2BP2 wird eine Rolle im Metabolismus postuliert. Diese Hypothese konnte im Rahmen dieser Arbeit bekräftigt werden, da die Überexpression von GFP-IGF2BP2 im Vergleich zur Expression von GFP in U2OS Zellen zu einer gesteigerten Glukoseaufnahme führt, sowie mit einem erhöhten Glykogengehalt einhergeht. Überdies konnte in den Lebern BiPro-IGF2BP2 exprimierender Mäuse im Vergleich zu BiPro-IGF2BP1, BiPro-IGF2BP3 und BiPro-GFP exprimierenden Mäusen ebenfalls ein signifikant erhöhter Glykogengehalt bestimmt werden.

Das Ziel künftiger Studien sollte sein, die IGF2BP Paralogen vergleichend in einem analogen Kontext zu analysieren, wie es in der vorliegenden Arbeit bereits *in vitro* begonnen wurde. Unter diesem Gesichtspunkt wären konditionale und gewebespezifische *knockout* bzw. *knock-in* Studien in Mäusen besonders aufschlussreich, um zu verstehen ob die IGF2BP Paralogen unabhängig voneinander oder in kooperativer Weise agieren.

6 Literatur

- Adam, S.A., T. Nakagawa, M.S. Swanson, T.K. Woodruff, and G. Dreyfuss. 1986. mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol.* 6:2932-2943.
- Adinolfi, S., C. Bagni, M.A. Castiglione Morelli, F. Fraternali, G. Musco, and A. Pastore. 1999. Novel RNA-binding motif: the KH module. *Biopolymers.* 51:153-164.
- Adolph, S.K., R. DeLotto, F.C. Nielsen, and J. Christiansen. 2009. Embryonic expression of Drosophila IMP in the developing CNS and PNS. *Gene Expr Patterns.* 9:138-143.
- Ahrens, W.A., R.V. Ridenour, 3rd, B.L. Caron, D.V. Miller, and A.L. Folpe. 2008. GLUT-1 expression in mesenchymal tumors: an immunohistochemical study of 247 soft tissue and bone neoplasms. *Hum Pathol.* 39:1519-1526.
- Allain, F.H., P. Bouvet, T. Dieckmann, and J. Feigon. 2000. Molecular basis of sequence-specific recognition of pre-ribosomal RNA by nucleolin. *EMBO J.* 19:6870-6881.
- Anderson, P., and N. Kedersha. 2002. Visibly stressed: the role of eIF2, TIA-1, and stress granules in protein translation. *Cell Stress Chaperones.* 7:213-221.
- Atlas, R., L. Behar, E. Elliott, and I. Ginzburg. 2004. The insulin-like growth factor mRNA binding-protein IMP-1 and the Ras-regulatory protein G3BP associate with tau mRNA and HuD protein in differentiated P19 neuronal cells. *J Neurochem.* 89:613-626.
- Auweter, S.D., F.C. Oberstrass, and F.H. Allain. 2006. Sequence-specific binding of single-stranded RNA: is there a code for recognition? *Nucleic Acids Res.* 34:4943-4959.
- Backe, P.H., A.C. Messias, R.B. Ravelli, M. Sattler, and S. Cusack. 2005. X-ray crystallographic and NMR studies of the third KH domain of hnRNP K in complex with single-stranded nucleic acids. *Structure.* 13:1055-1067.
- Bailey, T.L., and C. Elkan. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology.* pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California.
- Bandziulis, R.J., M.S. Swanson, and G. Dreyfuss. 1989. RNA-binding proteins as developmental regulators. *Genes Dev.* 3:431-437.
- Barnes, M., G. van Rensburg, W.M. Li, K. Mehmood, S. Mackedenski, C.M. Chan, D.T. King, A.L. Miller, and C.H. Lee. 2015. Molecular insights into the coding region determinant-binding protein-RNA interaction through site-directed mutagenesis in the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-K-homology domains. *J Biol Chem.* 290:625-639.
- Bassell, G.J., Y. Oleynikov, and R.H. Singer. 1999. The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* 13:447-454.
- Behar, L., R. Marx, E. Sadot, J. Barg, and I. Ginzburg. 1995. cis-acting signals and trans-acting proteins are involved in tau mRNA targeting into neurites of differentiating neuronal cells. *Int J Dev Neurosci.* 13:113-127.
- Bell, J.L., K. Wachter, B. Muhleck, N. Pazaitis, M. Kohn, M. Lederer, and S. Huttelmaier. 2013. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci.* 70:2657-2675.

Literatur

- Bell, J.L., R. Turlapati, T. Liu, J.H. Schulte, and S. Huttelmaier. 2015. IGF2BP1 harbors prognostic significance by gene gain and diverse expression in neuroblastoma. *J Clin Oncol.* 33:1285-1293.
- Bernstein, P.L., D.J. Herrick, R.D. Prokipcak, and J. Ross. 1992. Control of c-myc mRNA half-life in vitro by a protein capable of binding to a coding region stability determinant. *Genes Dev.* 6:642-654.
- Birney, E., S. Kumar, and A.R. Krainer. 1993. Analysis of the RNA-recognition motif and RS and RGG domains: conservation in metazoan pre-mRNA splicing factors. *Nucleic Acids Res.* 21:5803-5816.
- Bister, K., and H.W. Jansen. 1986. Oncogenes in retroviruses and cells: biochemistry and molecular genetics. *Adv Cancer Res.* 47:99-188.
- Bley, N., M. Lederer, B. Pfalz, C. Reinke, T. Fuchs, M. Glass, B. Moller, and S. Huttelmaier. 2015. Stress granules are dispensable for mRNA stabilization during cellular stress. *Nucleic Acids Res.* 43:e26.
- Boudoukha, S., S. Cuvellier, and A. Poleskaya. 2010. Role of the RNA-binding protein IMP-2 in muscle cell motility. *Mol Cell Biol.* 30:5710-5725.
- Boyerinas, B., S.M. Park, A.E. Murmann, K. Gwin, A.G. Montag, M. Zillhardt, Y.J. Hua, E. Lengyel, and M.E. Peter. 2012. Let-7 modulates acquired resistance of ovarian cancer to Taxanes via IMP-1-mediated stabilization of multidrug resistance 1. *Int J Cancer.* 130:1787-1797.
- Boyerinas, B., S.M. Park, N. Shomron, M.M. Hedegaard, J. Vinther, J.S. Andersen, C. Feig, J. Xu, C.B. Burge, and M.E. Peter. 2008. Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res.* 68:2587-2591.
- Boylan, K.L., S. Mische, M. Li, G. Marques, X. Morin, W. Chia, and T.S. Hays. 2008. Motility screen identifies *Drosophila* IGF-II mRNA-binding protein–zipcode-binding protein acting in oogenesis and synaptogenesis. *PLoS Genet.* 4:e36.
- Brants, J.R., T.A. Ayoubi, K. Chada, K. Marchal, W.J. Van de Ven, and M.M. Petit. 2004. Differential regulation of the insulin-like growth factor II mRNA-binding protein genes by architectural transcription factor HMGA2. *FEBS Lett.* 569:277-283.
- Brazao, T.F., J. Demmers, I.W. van, J. Strouboulis, M. Fornerod, L. Romao, and F.G. Grosveld. 2012. A new function of ROD1 in nonsense-mediated mRNA decay. *FEBS Lett.* 586:1101-1110.
- Buller, C.L., R.D. Loberg, M.H. Fan, Q. Zhu, J.L. Park, E. Vesely, K. Inoki, K.L. Guan, and F.C. Brosius, 3rd. 2008. A GSK-3/TSC2/mTOR pathway regulates glucose uptake and GLUT1 glucose transporter expression. *Am J Physiol Cell Physiol.* 295:C836-843.
- Butter, F., M. Scheibe, M. Morl, and M. Mann. 2009. Unbiased RNA-protein interaction screen by quantitative proteomics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106:10626-10631.
- Casellas, A., C. Mallo, A. Salavert, V. Jimenez, M. Garcia, J. Agudo, M. Obach, V. Haurigot, L. Vila, M. Molas, R. Lage, M. Morro, E. Casana, J. Ruberte, and F. Bosch. 2015. Insulin-like Growth Factor 2 Overexpression Induces Beta-cell Dysfunction and Increases Beta-cell Susceptibility to Damage. *J Biol Chem.*
- Chang, Y.F., J.S. Imam, and M.F. Wilkinson. 2007. The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway. *Annu Rev Biochem.* 76:51-74.
- Chao, J.A., Y. Patskovsky, V. Patel, M. Levy, S.C. Almo, and R.H. Singer. 2010. ZBP1 recognition of beta-actin zipcode induces RNA looping. *Genes Dev.* 24:148-158.
- Christiansen, J., A.M. Kolte, T. Hansen, and F.C. Nielsen. 2009. IGF2 mRNA-binding protein 2: biological function and putative role in type 2 diabetes. *J Mol Endocrinol.* 43:187-195.

Literatur

- Cleynen, I., J.R. Brants, K. Peeters, R. Deckers, M. Debiec-Rychter, R. Sciot, W.J. Van de Ven, and M.M. Petit. 2007. HMGA2 regulates transcription of the *Imp2* gene via an intronic regulatory element in cooperation with nuclear factor-kappaB. *Mol Cancer Res.* 5:363-372.
- Coelho, M.B., J. Attig, N. Bellora, J. Konig, M. Hallegger, M. Kayikci, E. Eyra, J. Ule, and C.W. Smith. 2015. Nuclear matrix protein Matrin3 regulates alternative splicing and forms overlapping regulatory networks with PTB. *EMBO J.* 34:653-668.
- Conacci-Sorrell, M., L. McFerrin, and R.N. Eisenman. 2014. An overview of MYC and its interactome. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 4:a014357.
- Condeelis, J., and R.H. Singer. 2005. How and why does beta-actin mRNA target? *Biol Cell.* 97:97-110.
- Cross, D.A., D.R. Alessi, P. Cohen, M. Andjelkovich, and B.A. Hemmings. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by protein kinase B. *Nature.* 378:785-789.
- Currie, J.R., and W.T. Brown. 1999. KH domain-containing proteins of yeast: absence of a fragile X gene homologue. *Am J Med Genet.* 84:272-276.
- Dai, N., J. Rapley, M. Angel, M.F. Yanik, M.D. Blower, and J. Avruch. 2011. mTOR phosphorylates IMP2 to promote IGF2 mRNA translation by internal ribosomal entry. *Genes Dev.* 25:1159-1172.
- Dai, N., J. Christiansen, F.C. Nielsen, and J. Avruch. 2013. mTOR complex 2 phosphorylates IMP1 cotranslationally to promote IGF2 production and the proliferation of mouse embryonic fibroblasts. *Genes Dev.* 27:301-312.
- Dai, N., L. Zhao, D. Wrighting, D. Kramer, A. Majithia, Y. Wang, V. Cracan, D. Borges-Rivera, V.K. Mootha, M. Nahrendorf, D.R. Thorburn, L. Minichiello, D. Altshuler, and J. Avruch. 2015. IGF2BP2/IMP2-Deficient mice resist obesity through enhanced translation of Ucp1 mRNA and Other mRNAs encoding mitochondrial proteins. *Cell Metab.* 21:609-621.
- Datar, K.V., G. Dreyfuss, and M.S. Swanson. 1993. The human hnRNP M proteins: identification of a methionine/arginine-rich repeat motif in ribonucleoproteins. *Nucleic Acids Res.* 21:439-446.
- Deo, R.C., J.B. Bonanno, N. Sonenberg, and S.K. Burley. 1999. Recognition of polyadenylate RNA by the poly(A)-binding protein. *Cell.* 98:835-845.
- Deshler, J.O., M.I. Highett, T. Abramson, and B.J. Schnapp. 1998. A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol.* 8:489-496.
- Diem, M.D., C.C. Chan, I. Younis, and G. Dreyfuss. 2007. PYM binds the cytoplasmic exon-junction complex and ribosomes to enhance translation of spliced mRNAs. *Nat Struct Mol Biol.* 14:1173-1179.
- Dormoy-Raclet, V., I. Menard, E. Clair, G. Kurban, R. Mazroui, S. Di Marco, C. von Roretz, A. Pause, and I.E. Gallouzi. 2007. The RNA-binding protein HuR promotes cell migration and cell invasion by stabilizing the beta-actin mRNA in a U-rich-element-dependent manner. *Mol Cell Biol.* 27:5365-5380.
- Doyle, G.A., N.A. Betz, P.F. Leeds, A.J. Fleisig, R.D. Prokipcak, and J. Ross. 1998. The c-myc coding region determinant-binding protein: a member of a family of KH domain RNA-binding proteins. *Nucleic Acids Res.* 26:5036-5044.
- Dreyfuss, G., V.N. Kim, and N. Kataoka. 2002. Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 3:195-205.
- Dreyfuss, G., M.S. Swanson, and S. Pinol-Roma. 1988. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles and the pathway of mRNA formation. *Trends Biochem Sci.* 13:86-91.

Literatur

- Duesberg, P.H., K. Bister, and P.K. Vogt. 1977. The RNA of avian acute leukemia virus MC29. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74:4320-4324.
- Duvel, K., J.L. Yecies, S. Menon, P. Raman, A.I. Lipovsky, A.L. Souza, E. Triantafellow, Q. Ma, R. Gorski, S. Cleaver, M.G. Vander Heiden, J.P. MacKeigan, P.M. Finan, C.B. Clish, L.O. Murphy, and B.D. Manning. 2010. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell.* 39:171-183.
- Egloff, S., E. Van Herreweghe, and T. Kiss. 2006. Regulation of polymerase II transcription by 7SK snRNA: two distinct RNA elements direct P-TEFb and HEXIM1 binding. *Mol Cell Biol.* 26:630-642.
- Elcheva, I., S. Goswami, F.K. Noubissi, and V.S. Spiegelman. 2009. CRD-BP protects the coding region of betaTrCP1 mRNA from miR-183-mediated degradation. *Mol Cell.* 35:240-246.
- Elisha, Z., L. Havin, I. Ringel, and J.K. Yisraeli. 1995. Vg1 RNA binding protein mediates the association of Vg1 RNA with microtubules in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* 14:5109-5114.
- Ellington, A.D., and J.W. Szostak. 1990. In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. *Nature.* 346:818-822.
- Evdokimova, V., P. Ruzanov, H. Imataka, B. Raught, Y. Svitkin, L.P. Ovchinnikov, and N. Sonenberg. 2001. The major mRNA-associated protein YB-1 is a potent 5' cap-dependent mRNA stabilizer. *EMBO J.* 20:5491-5502.
- Fabrizio, J.J., C.A. Hickey, C. Stabrawa, V. Meytes, J.A. Hutter, C. Talbert, and N. Regis. 2008. Imp (IGF-II mRNA-binding protein) is expressed during spermatogenesis in *Drosophila melanogaster*. *Fly (Austin).* 2:47-52.
- Farina, K.L., S. Huttelmaier, K. Musunuru, R. Darnell, and R.H. Singer. 2003. Two ZBP1 KH domains facilitate beta-actin mRNA localization, granule formation, and cytoskeletal attachment. *J Cell Biol.* 160:77-87.
- Fribourg, S., D. Gatfield, E. Izaurralde, and E. Conti. 2003. A novel mode of RBD-protein recognition in the Y14-Mago complex. *Nat Struct Biol.* 10:433-439.
- Gattoni, R., D. Mahe, P. Mahl, N. Fischer, M.G. Mattei, J. Stevenin, and J.P. Fuchs. 1996. The human hnRNP-M proteins: structure and relation with early heat shock-induced splicing arrest and chromosome mapping. *Nucleic Acids Res.* 24:2535-2542.
- Gehring, N.H., S. Lamprinaki, A.E. Kulozik, and M.W. Hentze. 2009. Disassembly of exon junction complexes by PYM. *Cell.* 137:536-548.
- Geng, C., and P.M. Macdonald. 2006. Imp associates with squid and Hrp48 and contributes to localized expression of gurken in the oocyte. *Mol Cell Biol.* 26:9508-9516.
- Gilks, N., N. Kedersha, M. Ayodele, L. Shen, G. Stoecklin, L.M. Dember, and P. Anderson. 2004. Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1. *Mol Biol Cell.* 15:5383-5398.
- Git, A., R. Allison, E. Perdiguero, A.R. Nebreda, E. Houliston, and N. Standart. 2009. Vg1RBP phosphorylation by Erk2 MAP kinase correlates with the cortical release of Vg1 mRNA during meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *RNA.* 15:1121-1133.
- Git, A., and N. Standart. 2002. The KH domains of *Xenopus* Vg1RBP mediate RNA binding and self-association. *RNA.* 8:1319-1333.
- Glinka, M., T. Herrmann, N. Funk, S. Havlicek, W. Rossoll, C. Winkler, and M. Sendtner. 2010. The heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-R is necessary for axonal beta-actin mRNA translocation in spinal motor neurons. *Hum Mol Genet.* 19:1951-1966.

Literatur

- Gong, C., Z. Li, K. Ramanujan, I. Clay, Y. Zhang, S. Lemire-Brachat, and D.J. Glass. 2015. A long non-coding RNA, LncMyoD, regulates skeletal muscle differentiation by blocking IMP2-mediated mRNA translation. *Dev Cell*. 34:181-191.
- Goswami, S., R.S. Tarapore, J.J. Teslaa, Y. Grinblat, V. Setaluri, and V.S. Spiegelman. 2010. MicroRNA-340-mediated degradation of microphthalmia-associated transcription factor mRNA is inhibited by the coding region determinant-binding protein. *J Biol Chem*. 285:20532-20540.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36:59-74.
- Grishin, N.V. 2001. KH domain: one motif, two folds. *Nucleic Acids Res*. 29:638-643.
- Grosset, C., C.Y. Chen, N. Xu, N. Sonenberg, H. Jacquemin-Sablon, and A.B. Shyu. 2000. A mechanism for translationally coupled mRNA turnover: interaction between the poly(A) tail and a c-fos RNA coding determinant via a protein complex. *Cell*. 103:29-40.
- Gruber, A.R., R. Lorenz, S.H. Bernhart, R. Neubock, and I.L. Hofacker. 2008. The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res*. 36:W70-74.
- Gutschner, T., M. Hammerle, N. Pazaitis, N. Bley, E. Fiskin, H. Uckelmann, A. Heim, M. Grobeta, N. Hofmann, R. Geffers, B. Skawran, T. Longerich, K. Breuhahn, P. Schirmacher, B. Muhleck, S. Huttelmaier, and S. Diederichs. 2014. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1) is an important protumorigenic factor in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 59:1900-1911.
- Hafner, M., M. Landthaler, L. Burger, M. Khorshid, J. Hausser, P. Berninger, A. Rothballer, M. Ascano, Jr., A.C. Jungkamp, M. Munschauer, A. Ulrich, G.S. Wardle, S. Dewell, M. Zavolan, and T. Tuschl. 2010. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell*. 141:129-141.
- Hamilton, K.E., F.K. Noubissi, P.S. Katti, C.M. Hahn, S.R. Davey, E.T. Lundsmith, A.J. Klein-Szanto, A.D. Rhim, V.S. Spiegelman, and A.K. Rustgi. 2013. IMP1 promotes tumor growth, dissemination and a tumor-initiating cell phenotype in colorectal cancer cell xenografts. *Carcinogenesis*. 34:2647-2654.
- Hammerle, M., T. Gutschner, H. Uckelmann, S. Ozgur, E. Fiskin, M. Gross, B. Skawran, R. Geffers, T. Longerich, K. Breuhahn, P. Schirmacher, G. Stoecklin, and S. Diederichs. 2013. Posttranscriptional destabilization of the liver-specific long noncoding RNA HULC by the IGF2 mRNA-binding protein 1 (IGF2BP1). *Hepatology*. 58:1703-1712.
- Hansen, T.V., N.A. Hammer, J. Nielsen, M. Madsen, C. Dalbaeck, U.M. Wewer, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 2004. Dwarfism and impaired gut development in insulin-like growth factor II mRNA-binding protein 1-deficient mice. *Mol Cell Biol*. 24:4448-4464.
- Hase, M.E., P. Yalamanchili, and N. Visa. 2006. The Drosophila heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M protein, HRP59, regulates alternative splicing and controls the production of its own mRNA. *J Biol Chem*. 281:39135-39141.
- Havin, L., A. Git, Z. Elisha, F. Oberman, K. Yaniv, S.P. Schwartz, N. Standart, and J.K. Yisraeli. 1998. RNA-binding protein conserved in both microtubule- and microfilament-based RNA localization. *Genes Dev*. 12:1593-1598.
- Heldin, C.H., A. Johnsson, S. Wennergren, C. Wernstedt, C. Betsholtz, and B. Westermarck. 1986. A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature*. 319:511-514.
- Herrick, D.J., and J. Ross. 1994. The half-life of c-myc mRNA in growing and serum-stimulated cells: influence of the coding and 3' untranslated regions and role of ribosome translocation. *Mol Cell Biol*. 14:2119-2128.

Literatur

- Hieronimus, H., and P.A. Silver. 2004. A systems view of mRNP biology. *Genes Dev.* 18:2845-2860.
- Hock, J., L. Weinmann, C. Ender, S. Rudel, E. Kremmer, M. Raabe, H. Urlaub, and G. Meister. 2007. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep.* 8:1052-1060.
- Hofmann, S., V. Cherkasova, P. Bankhead, B. Bukau, and G. Stoecklin. 2012. Translation suppression promotes stress granule formation and cell survival in response to cold shock. *Mol Biol Cell.* 23:3786-3800.
- Hollingworth, D., A.M. Candel, G. Nicastro, S.R. Martin, P. Briata, R. Gherzi, and A. Ramos. 2012. KH domains with impaired nucleic acid binding as a tool for functional analysis. *Nucleic Acids Res.* 40:6873-6886.
- Hosoda, N., Y.K. Kim, F. Lejeune, and L.E. Maquat. 2005. CBP80 promotes interaction of Upf1 with Upf2 during nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells. *Nat Struct Mol Biol.* 12:893-901.
- Hu, S., J. Wu, L. Chen, and G. Shan. 2012. Signals from noncoding RNAs: unconventional roles for conventional pol III transcripts. *Int J Biochem Cell Biol.* 44:1847-1851.
- Huttelmaier, S., D. Zenklusen, M. Lederer, J. Dichtenberg, M. Lorenz, X. Meng, G.J. Bassell, J. Condeelis, and R.H. Singer. 2005. Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1. *Nature.* 438:512-515.
- Hwang, J., H. Sato, Y. Tang, D. Matsuda, and L.E. Maquat. 2010. UPF1 association with the cap-binding protein, CBP80, promotes nonsense-mediated mRNA decay at two distinct steps. *Mol Cell.* 39:396-409.
- Hwang, Y.S., Z. Xianglan, K.K. Park, and W.Y. Chung. 2012. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis.* 33:2135-2146.
- Imataka, H., A. Gradi, and N. Sonenberg. 1998. A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* 17:7480-7489.
- Ioannidis, P., L.G. Mahaira, S.A. Perez, A.D. Gritzapis, P.A. Sotiropoulou, G.J. Kavalakis, A.I. Antsaklis, C.N. Baxevanis, and M. Papamichail. 2005. CRD-BP/IMP1 expression characterizes cord blood CD34+ stem cells and affects c-myc and IGF-II expression in MCF-7 cancer cells. *J Biol Chem.* 280:20086-20093.
- Ishigaki, Y., X. Li, G. Serin, and L.E. Maquat. 2001. Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell.* 106:607-617.
- Isken, O., Y.K. Kim, N. Hosoda, G.L. Mayeur, J.W. Hershey, and L.E. Maquat. 2008. Upf1 phosphorylation triggers translational repression during nonsense-mediated mRNA decay. *Cell.* 133:314-327.
- Isken, O., and L.E. Maquat. 2008. The multiple lives of NMD factors: balancing roles in gene and genome regulation. *Nat Rev Genet.* 9:699-712.
- Johansson, C., L.D. Finger, L. Trantirek, T.D. Mueller, S. Kim, I.A. Laird-Offringa, and J. Feigon. 2004. Solution structure of the complex formed by the two N-terminal RNA-binding domains of nucleolin and a pre-rRNA target. *J Mol Biol.* 337:799-816.
- Johnson, S.M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K.L. Reinert, D. Brown, and F.J. Slack. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 120:635-647.
- Jonson, L., J. Christiansen, T.V. Hansen, J. Vikesa, Y. Yamamoto, and F.C. Nielsen. 2014. IMP3 RNP safe houses prevent miRNA-directed HMGA2 mRNA decay in cancer and development. *Cell Rep.* 7:539-551.

Literatur

- Jonson, L., J. Vikesaa, A. Krogh, L.K. Nielsen, T. Hansen, R. Borup, A.H. Johnsen, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 2007. Molecular composition of IMP1 ribonucleoprotein granules. *Mol Cell Proteomics*. 6:798-811.
- Kahn, C.R. 1994. Banting Lecture. Insulin action, diabetogenes, and the cause of type II diabetes. *Diabetes*. 43:1066-1084.
- Kashima, I., A. Yamashita, N. Izumi, N. Kataoka, R. Morishita, S. Hoshino, M. Ohno, G. Dreyfuss, and S. Ohno. 2006. Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev*. 20:355-367.
- Kedersha, N., and P. Anderson. 2002. Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*. 30:963-969.
- Kedersha, N.L., M. Gupta, W. Li, I. Miller, and P. Anderson. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol*. 147:1431-1442.
- Kenan, D.J., C.C. Query, and J.D. Keene. 1991. RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci*. 16:214-220.
- Khanam, T., R.S. Muddashetty, A. Kahvejian, N. Sonenberg, and J. Brosius. 2006. Poly(A)-binding protein binds to A-rich sequences via RNA-binding domains 1+2 and 3+4. *RNA Biol*. 3:170-177.
- Kim, H.H., Y. Kuwano, S. Srikantan, E.K. Lee, J.L. Martindale, and M. Gorospe. 2009. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev*. 23:1743-1748.
- Kim, H.H., S.J. Lee, A.S. Gardiner, N.I. Perrone-Bizzozero, and S. Yoo. 2015. Different motif requirements for the localization zipcode element of beta-actin mRNA binding by HuD and ZBP1. *Nucleic Acids Res*. 43:7432-7446.
- Kislauskis, E.H., X. Zhu, and R.H. Singer. 1994. Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype. *J Cell Biol*. 127:441-451.
- Kjaergaard, T., R. Desdorf, A. Heuck, A. Olsen, and K. Lykke-Hartmann. 2015. The zinc finger RNA binding protein, ZFR, contributes to axon guidance in *Caenorhabditis elegans*. *Gene*. 557:11-18.
- Kobel, M., D. Weidensdorfer, C. Reinke, M. Lederer, W.D. Schmitt, K. Zeng, C. Thomssen, S. Hauptmann, and S. Huttelmaier. 2007. Expression of the RNA-binding protein IMP1 correlates with poor prognosis in ovarian carcinoma. *Oncogene*. 26:7584-7589.
- Kohn, A.D., S.A. Summers, M.J. Birnbaum, and R.A. Roth. 1996. Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J Biol Chem*. 271:31372-31378.
- Köhn, M., 2008. Charakterisierung funktioneller Domänen des RNA-bindenden Zipcode Binding Protein 1 (ZBP1). Diplomarbeit.
- Kohn, M., M. Lederer, K. Wachter, and S. Huttelmaier. 2010. Near-infrared (NIR) dye-labeled RNAs identify binding of ZBP1 to the noncoding Y3-RNA. *RNA*. 16:1420-1428.
- Köhn, M., 2015. The functional characterization of mammalian non-coding Y RNAs. Dissertation.
- Labbe, J.C., S. Hekimi, and L.A. Rokeach. 1999. The levels of the RoRNP-associated Y RNA are dependent upon the presence of ROP-1, the *Caenorhabditis elegans* Ro60 protein. *Genetics*. 151:143-150.
- Lafon, I., F. Carballes, G. Brewer, M. Poiret, and D. Morello. 1998. Developmental expression of AUF1 and HuR, two c-myc mRNA binding proteins. *Oncogene*. 16:3413-3421.

Literatur

- Lamphear, B.J., R. Kirchweger, T. Skern, and R.E. Rhoads. 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.* 270:21975-21983.
- Land, H., L.F. Parada, and R.A. Weinberg. 1983. Tumorigenic conversion of primary embryo fibroblasts requires at least two cooperating oncogenes. *Nature.* 304:596-602.
- Latham, V.M., Jr., E.H. Kislauskis, R.H. Singer, and A.F. Ross. 1994. Beta-actin mRNA localization is regulated by signal transduction mechanisms. *J Cell Biol.* 126:1211-1219.
- Lawrence, J.B., and R.H. Singer. 1986. Intracellular localization of messenger RNAs for cytoskeletal proteins. *Cell.* 45:407-415.
- Lecuyer, E., H. Yoshida, N. Parthasarathy, C. Alm, T. Babak, T. Cerovina, T.R. Hughes, P. Tomancak, and H.M. Krause. 2007. Global analysis of mRNA localization reveals a prominent role in organizing cellular architecture and function. *Cell.* 131:174-187.
- Lederer, M., N. Bley, C. Schleifer, and S. Huttelmaier. 2014. The role of the oncofetal IGF2 mRNA-binding protein 3 (IGF2BP3) in cancer. *Semin Cancer Biol.* 29:3-12.
- Lejeune, F., Y. Ishigaki, X. Li, and L.E. Maquat. 2002. The exon junction complex is detected on CBP80-bound but not eIF4E-bound mRNA in mammalian cells: dynamics of mRNP remodeling. *EMBO J.* 21:3536-3545.
- Lemm, I., and J. Ross. 2002. Regulation of c-myc mRNA decay by translational pausing in a coding region instability determinant. *Mol Cell Biol.* 22:3959-3969.
- Levens, D.L. 2003. Reconstructing MYC. *Genes Dev.* 17:1071-1077.
- Lewis, H.A., K. Musunuru, K.B. Jensen, C. Edo, H. Chen, R.B. Darnell, and S.K. Burley. 2000. Sequence-specific RNA binding by a Nova KH domain: implications for paraneoplastic disease and the fragile X syndrome. *Cell.* 100:323-332.
- Li, J.H., S. Liu, H. Zhou, L.H. Qu, and J.H. Yang. 2014. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 42:D92-97.
- Li, W., D. Liu, W. Chang, X. Lu, Y.L. Wang, H. Wang, C. Zhu, H.Y. Lin, Y. Zhang, and J. Zhou. 2014. Role of IGF2BP3 in trophoblast cell invasion and migration. *Cell Death Dis.* 5:e1025.
- Li, Z., J.A. Gilbert, Y. Zhang, M. Zhang, Q. Qiu, K. Ramanujan, T. Shavlakadze, J.K. Eash, A. Scaramozza, M.M. Goddeeris, D.G. Kirsch, K.P. Campbell, A.S. Brack, and D.J. Glass. 2012. An HMGA2-IGF2BP2 axis regulates myoblast proliferation and myogenesis. *Dev Cell.* 23:1176-1188.
- Li, Z., Y. Zhang, K. Ramanujan, Y. Ma, D.G. Kirsch, and D.J. Glass. 2013. Oncogenic NRAS, required for pathogenesis of embryonic rhabdomyosarcoma, relies upon the HMGA2-IGF2BP2 pathway. *Cancer Res.* 73:3041-3050.
- Liao, B., Y. Hu, and G. Brewer. 2011. RNA-binding protein insulin-like growth factor mRNA-binding protein 3 (IMP-3) promotes cell survival via insulin-like growth factor II signaling after ionizing radiation. *J Biol Chem.* 286:31145-31152.
- Liao, B., Y. Hu, D.J. Herrick, and G. Brewer. 2005. The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J Biol Chem.* 280:18517-18524.
- Liao, B., M. Patel, Y. Hu, S. Charles, D.J. Herrick, and G. Brewer. 2004. Targeted knockdown of the RNA-binding protein CRD-BP promotes cell proliferation via an insulin-like growth factor II-dependent pathway in human K562 leukemia cells. *J Biol Chem.* 279:48716-48724.

Literatur

- Liu, Z., I. Luyten, M.J. Bottomley, A.C. Messias, S. Hounginou-Molango, R. Sprangers, K. Zanier, A. Kramer, and M. Sattler. 2001. Structural basis for recognition of the intron branch site RNA by splicing factor 1. *Science*. 294:1098-1102.
- Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 25:402-408.
- Lleres, D., M. Denegri, M. Biggiogera, P. Ajuh, and A.I. Lamond. 2010. Direct interaction between hnRNP-M and CDC5L/PLRG1 proteins affects alternative splice site choice. *EMBO Rep*. 11:445-451.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193:265-275.
- Lu, M., R.M. Nakamura, E.D. Dent, J.Y. Zhang, F.C. Nielsen, J. Christiansen, E.K. Chan, and E.M. Tan. 2001. Aberrant expression of fetal RNA-binding protein p62 in liver cancer and liver cirrhosis. *Am J Pathol*. 159:945-953.
- Lykke-Andersen, J., M.D. Shu, and J.A. Steitz. 2000. Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*. 103:1121-1131.
- Ma, B., J.N. Savas, M.S. Yu, B.P. Culver, M.V. Chao, and N. Tanese. 2011. Huntingtin mediates dendritic transport of beta-actin mRNA in rat neurons. *Sci Rep*. 1:140.
- Ma, X.M., and J. Blenis. 2009. Molecular mechanisms of mTOR-mediated translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:307-318.
- Mahl, P., Y. Lutz, E. Puvion, and J.P. Fuchs. 1989. Rapid effect of heat shock on two heterogeneous nuclear ribonucleoprotein-associated antigens in HeLa cells. *J Cell Biol*. 109:1921-1935.
- Manieri, N.A., M.R. Drylewicz, H. Miyoshi, and T.S. Stappenbeck. 2012. Igf2bp1 is required for full induction of Ptg2 mRNA in colonic mesenchymal stem cells in mice. *Gastroenterology*. 143:110-121 e110.
- Maris, C., C. Dominguez, and F.H. Allain. 2005. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS J*. 272:2118-2131.
- Martin, K.C., and A. Ephrussi. 2009. mRNA localization: gene expression in the spatial dimension. *Cell*. 136:719-730.
- Martin-Villar, E., B. Borda-d'Agua, P. Carrasco-Ramirez, J. Renart, M. Parsons, M. Quintanilla, and G.E. Jones. 2015. Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability. *Oncogene*. 34:4531-4544.
- Mayr, C., M.T. Hemann, and D.P. Bartel. 2007. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*. 315:1576-1579.
- Minich, W.B., N.L. Korneyeva, and L.P. Ovchinnikov. 1989. Translational active mRNPs from rabbit reticulocytes are qualitatively different from free mRNA in their translatability in cell-free system. *FEBS Lett*. 257:257-259.
- Mokas, S., J.R. Mills, C. Garreau, M.J. Fournier, F. Robert, P. Arya, R.J. Kaufman, J. Pelletier, and R. Mazroui. 2009. Uncoupling stress granule assembly and translation initiation inhibition. *Mol Biol Cell*. 20:2673-2683.
- Mongroo, P.S., F.K. Noubissi, M. Cuatrecasas, J. Kalabis, C.E. King, C.N. Johnstone, M.J. Bowser, A. Castells, V.S. Spiegelman, and A.K. Rustgi. 2011. IMP-1 displays cross-talk with K-Ras and modulates colon cancer cell survival through the novel proapoptotic protein CYFIP2. *Cancer Res*. 71:2172-2182.

Literatur

- Moore, M.J., and N.J. Proudfoot. 2009. Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell*. 136:688-700.
- Moorehead, R.A., C.V. Hojilla, I. De Belle, G.A. Wood, J.E. Fata, E.D. Adamson, K.L. Watson, D.R. Edwards, and R. Khokha. 2003. Insulin-like growth factor-II regulates PTEN expression in the mammary gland. *J Biol Chem*. 278:50422-50427.
- Morris, C., J. Wittmann, H.M. Jack, and P. Jalinot. 2007. Human INT6/eIF3e is required for nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO Rep*. 8:596-602.
- Morton, J.P., and O.J. Sansom. 2013. MYC- γ mice: from tumour initiation to therapeutic targeting of endogenous MYC. *Mol Oncol*. 7:248-258.
- Mueller-Pillasch, F., U. Lacher, C. Wallrapp, A. Micha, F. Zimmerhackl, H. Hameister, G. Varga, H. Friess, M. Buchler, H.G. Beger, M.R. Vila, G. Adler, and T.M. Gress. 1997. Cloning of a gene highly overexpressed in cancer coding for a novel KH-domain containing protein. *Oncogene*. 14:2729-2733.
- Munro, T.P., S. Kwon, B.J. Schnapp, and D. St Johnston. 2006. A repeated IMP-binding motif controls oskar mRNA translation and anchoring independently of *Drosophila melanogaster* IMP. *J Cell Biol*. 172:577-588.
- Murphy, D.A., and S.A. Courtneidge. 2011. The 'ins' and 'outs' of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:413-426.
- Musco, G., G. Stier, C. Joseph, M.A. Castiglione Morelli, M. Nilges, T.J. Gibson, and A. Pastore. 1996. Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell*. 85:237-245.
- Nakabayashi, H., K. Taketa, K. Miyano, T. Yamane, and J. Sato. 1982. Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*. 42:3858-3863.
- Nalavadi, V.C., L.E. Griffin, P. Picard-Fraser, A.M. Swanson, T. Takumi, and G.J. Bassell. 2012. Regulation of zipcode binding protein 1 transport dynamics in axons by myosin Va. *J Neurosci*. 32:15133-15141.
- NCBI Resource Coordinators. 2016. Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Res*. 44(D1):D7-19.
- Nekrasov, M.P., M.P. Ivshina, K.G. Chernov, E.A. Kovrigina, V.M. Evdokimova, A.A. Thomas, J.W. Hershey, and L.P. Ovchinnikov. 2003. The mRNA-binding protein YB-1 (p50) prevents association of the eukaryotic initiation factor eIF4G with mRNA and inhibits protein synthesis at the initiation stage. *J Biol Chem*. 278:13936-13943.
- Nesbit, C.E., J.M. Tersak, and E.V. Prochownik. 1999. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene*. 18:3004-3016.
- Nielsen, F.C. 1992. The molecular and cellular biology of insulin-like growth factor II. *Prog Growth Factor Res*. 4:257-290.
- Nielsen, F.C., J. Nielsen, and J. Christiansen. 2001. A family of IGF-II mRNA binding proteins (IMP) involved in RNA trafficking. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 234:93-99.
- Nielsen, F.C., J. Nielsen, M.A. Kristensen, G. Koch, and J. Christiansen. 2002. Cytoplasmic trafficking of IGF-II mRNA-binding protein by conserved KH domains. *J Cell Sci*. 115:2087-2097.
- Nielsen, J., S.K. Adolph, E. Rajpert-De Meyts, J. Lykke-Andersen, G. Koch, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 2003. Nuclear transit of human zipcode-binding protein IMP1. *Biochem J*. 376:383-391.

Literatur

- Nielsen, J., J. Christiansen, J. Lykke-Andersen, A.H. Johnsen, U.M. Wewer, and F.C. Nielsen. 1999. A family of insulin-like growth factor II mRNA-binding proteins represses translation in late development. *Mol Cell Biol.* 19:1262-1270.
- Nielsen, J., M.A. Kristensen, M. Willemoes, F.C. Nielsen, and J. Christiansen. 2004. Sequential dimerization of human zipcode-binding protein IMP1 on RNA: a cooperative mechanism providing RNP stability. *Nucleic Acids Res.* 32:4368-4376.
- Noubissi, F.K., I. Elcheva, N. Bhatia, A. Shakoory, A. Ougolkov, J. Liu, T. Minamoto, J. Ross, S.Y. Fuchs, and V.S. Spiegelman. 2006. CRD-BP mediates stabilization of betaTrCP1 and c-myc mRNA in response to beta-catenin signalling. *Nature.* 441:898-901.
- Oberman, F., K. Rand, Y. Maizels, A.M. Rubinstein, and J.K. Yisraeli. 2007. VICKZ proteins mediate cell migration via their RNA binding activity. *RNA.* 13:1558-1569.
- Oleana, V.H., A. Salehi, and D.F. Swaab. 1998. Increased expression of the TIAR protein in the hippocampus of Alzheimer patients. *Neuroreport.* 9:1451-1454.
- Oleynikov, Y., and R.H. Singer. 2003. Real-time visualization of ZBP1 association with beta-actin mRNA during transcription and localization. *Curr Biol.* 13:199-207.
- Ostareck-Lederer, A., D.H. Ostareck, C. Cans, G. Neubauer, K. Bomsztyk, G. Superti-Furga, and M.W. Hentze. 2002. c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol Cell Biol.* 22:4535-4543.
- Pan, F., S. Huttelmaier, R.H. Singer, and W. Gu. 2007. ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription. *Mol Cell Biol.* 27:8340-8351.
- Pap, T., M. Nawrath, J. Heinrich, M. Bosse, A. Baier, K.M. Hummel, P. Petrow, S. Kuchen, B.A. Michel, R.E. Gay, U. Muller-Ladner, K. Moelling, and S. Gay. 2004. Cooperation of Ras- and c-Myc-dependent pathways in regulating the growth and invasiveness of synovial fibroblasts in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 50:2794-2802.
- Patel, V.L., S. Mitra, R. Harris, A.R. Buxbaum, T. Lionnet, M. Brenowitz, M. Girvin, M. Levy, S.C. Almo, R.H. Singer, and J.A. Chao. 2012. Spatial arrangement of an RNA zipcode identifies mRNAs under post-transcriptional control. *Genes Dev.* 26:43-53.
- Perez, I., C.H. Lin, J.G. McAfee, and J.G. Patton. 1997. Mutation of PTB binding sites causes misregulation of alternative 3' splice site selection in vivo. *RNA.* 3:764-778.
- Pestova, T.V., and C.U. Hellen. 2001. Functions of eukaryotic factors in initiation of translation. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 66:389-396.
- Pinol-Roma, S., and G. Dreyfuss. 1991. Transcription-dependent and transcription-independent nuclear transport of hnRNP proteins. *Science.* 253:312-314.
- Piskounova, E., S.R. Viswanathan, M. Janas, R.J. LaPierre, G.Q. Daley, P. Sliz, and R.I. Gregory. 2008. Determinants of microRNA processing inhibition by the developmentally regulated RNA-binding protein Lin28. *J Biol Chem.* 283:21310-21314.
- Poleskaya, A., S. Cuvellier, I. Naguibneva, A. Duquet, E.G. Moss, and A. Harel-Bellan. 2007. Lin-28 binds IGF-2 mRNA and participates in skeletal myogenesis by increasing translation efficiency. *Genes Dev.* 21:1125-1138.
- Preiss, T., and W.H. M. 2003. Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation. *Bioessays.* 25:1201-1211.

Literatur

- Prokipcak, R.D., D.J. Herrick, and J. Ross. 1994. Purification and properties of a protein that binds to the C-terminal coding region of human c-myc mRNA. *J Biol Chem.* 269:9261-9269.
- Puigserver, P., J. Rhee, J. Donovan, C.J. Walkey, J.C. Yoon, F. Oriente, Y. Kitamura, J. Altomonte, H. Dong, D. Accili, and B.M. Spiegelman. 2003. Insulin-regulated hepatic gluconeogenesis through FOXO1-PGC-1alpha interaction. *Nature.* 423:550-555.
- Ray, P. and R. R. White. 2010. Aptamers for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceuticals.* 3(6):1761-1778.
- Rivera Vargas, T., S. Boudoukha, A. Simon, M. Souidi, S. Cuvellier, G. Pinna, and A. Polesskaya. 2014. Post-transcriptional regulation of cyclins D1, D3 and G1 and proliferation of human cancer cells depend on IMP-3 nuclear localization. *Oncogene.* 33:2866-2875.
- Ross, A.F., Y. Oleynikov, E.H. Kislauskis, K.L. Taneja, and R.H. Singer. 1997. Characterization of a beta-actin mRNA zipcode-binding protein. *Mol Cell Biol.* 17:2158-2165.
- Ross, J. 1995. mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol Rev.* 59:423-450.
- Ross, J., I. Lemm, and B. Berberet. 2001. Overexpression of an mRNA-binding protein in human colorectal cancer. *Oncogene.* 20:6544-6550.
- Rossoll, W., A.K. Kroning, U.M. Ohndorf, C. Steegborn, S. Jablonka, and M. Sendtner. 2002. Specific interaction of Smn, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for Smn in RNA processing in motor axons? *Hum Mol Genet.* 11:93-105.
- Runge, S., F.C. Nielsen, J. Nielsen, J. Lykke-Andersen, U.M. Wewer, and J. Christiansen. 2000. H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J Biol Chem.* 275:29562-29569.
- Ruzanov, P.V., V.M. Evdokimova, N.L. Korneeva, J.W. Hershey, and L.P. Ovchinnikov. 1999. Interaction of the universal mRNA-binding protein, p50, with actin: a possible link between mRNA and microfilaments. *J Cell Sci.* 112 (Pt 20):3487-3496.
- Rybak, A., H. Fuchs, L. Smirnova, C. Brandt, E.E. Pohl, R. Nitsch, and F.G. Wulczyn. 2008. A feedback loop comprising lin-28 and let-7 controls pre-let-7 maturation during neural stem-cell commitment. *Nat Cell Biol.* 10:987-993.
- Sadot, E., R. Marx, J. Barg, L. Behar, and I. Ginzburg. 1994. Complete sequence of 3'-untranslated region of Tau from rat central nervous system. Implications for mRNA heterogeneity. *J Mol Biol.* 241:325-331.
- Salton, M., R. Elkon, T. Borodina, A. Davydov, M.L. Yaspo, E. Halperin, and Y. Shiloh. 2011. Matrin 3 binds and stabilizes mRNA. *PLoS One.* 6:e23882.
- Samanta, S., B. Pursell, and A.M. Mercurio. 2013. IMP3 protein promotes chemoresistance in breast cancer cells by regulating breast cancer resistance protein (ABCG2) expression. *J Biol Chem.* 288:12569-12573.
- Samanta, S., V.M. Sharma, A. Khan, and A.M. Mercurio. 2012. Regulation of IMP3 by EGFR signaling and repression by ERbeta: implications for triple-negative breast cancer. *Oncogene.* 31:4689-4697.
- Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, and D.M. Sabatini. 2005. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science.* 307:1098-1101.
- Sato, H., and L.E. Maquat. 2009. Remodeling of the pioneer translation initiation complex involves translation and the karyopherin importin beta. *Genes Dev.* 23:2537-2550.
- Scheid, M.P., P.A. Marignani, and J.R. Woodgett. 2002. Multiple phosphoinositide 3-kinase-dependent steps in activation of protein kinase B. *Mol Cell Biol.* 22:6247-6260.

Literatur

- Sheiness, D., L. Fanshier, and J.M. Bishop. 1978. Identification of nucleotide sequences which may encode the oncogenic capacity of avian retrovirus MC29. *J Virol.* 28:600-610.
- Shiu, R.P., P.H. Watson, and D. Dubik. 1993. c-myc oncogene expression in estrogen-dependent and -independent breast cancer. *Clin Chem.* 39:353-355.
- Sim, S., J. Yao, D.E. Weinberg, S. Niessen, J.R. Yates, 3rd, and S.L. Wolin. 2012. The zipcode-binding protein ZBP1 influences the subcellular location of the Ro 60-kDa autoantigen and the noncoding Y3 RNA. *RNA.* 18:100-110.
- Singh, G., A. Kucukural, C. Cenik, J.D. Leszyk, S.A. Shaffer, Z. Weng, and M.J. Moore. 2012. The cellular EJC interactome reveals higher-order mRNP structure and an EJC-SR protein nexus. *Cell.* 151:750-764.
- Siomi, H., M. Choi, M.C. Siomi, R.L. Nussbaum, and G. Dreyfuss. 1994. Essential role for KH domains in RNA binding: impaired RNA binding by a mutation in the KH domain of FMR1 that causes fragile X syndrome. *Cell.* 77:33-39.
- Siomi, H., M.J. Matunis, W.M. Michael, and G. Dreyfuss. 1993a. The pre-mRNA binding K protein contains a novel evolutionarily conserved motif. *Nucleic Acids Res.* 21:1193-1198.
- Siomi, H., M.C. Siomi, R.L. Nussbaum, and G. Dreyfuss. 1993b. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell.* 74:291-298.
- Skabkin, M.A., O.I. Kiselyova, K.G. Chernov, A.V. Sorokin, E.V. Dubrovin, I.V. Yaminsky, V.D. Vasiliev, and L.P. Ovchinnikov. 2004. Structural organization of mRNA complexes with major core mRNP protein YB-1. *Nucleic Acids Res.* 32:5621-5635.
- Sommerville, J., and M. Lodomery. 1996. Masking of mRNA by Y-box proteins. *FASEB J.* 10:435-443.
- Sonenberg, N., and A.G. Hinnebusch. 2009. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. *Cell.* 136:731-745.
- Song, T., Y. Zheng, Y. Wang, Z. Katz, X. Liu, S. Chen, R.H. Singer, and W. Gu. 2015. Specific interaction of KIF11 with ZBP1 regulates the transport of beta-actin mRNA and cell motility. *J Cell Sci.* 128:1001-1010.
- Sparanese, D., and C.H. Lee. 2007. CRD-BP shields c-myc and MDR-1 RNA from endonucleolytic attack by a mammalian endoribonuclease. *Nucleic Acids Res.* 35:1209-1221.
- Spencer, J.A., S. Eliazar, R.L. Ilaria, Jr., J.A. Richardson, and E.N. Olson. 2000. Regulation of microtubule dynamics and myogenic differentiation by MURF, a striated muscle RING-finger protein. *J Cell Biol.* 150:771-784.
- Stohr, N., M. Kohn, M. Lederer, M. Glass, C. Reinke, R.H. Singer, and S. Huttelmaier. 2012. IGF2BP1 promotes cell migration by regulating MK5 and PTEN signaling. *Genes Dev.* 26:176-189.
- Stohr, N., M. Lederer, C. Reinke, S. Meyer, M. Hatzfeld, R.H. Singer, and S. Huttelmaier. 2006. ZBP1 regulates mRNA stability during cellular stress. *J Cell Biol.* 175:527-534.
- Sun, X., H.A. Perlick, H.C. Dietz, and L.E. Maquat. 1998. A mutated human homologue to yeast Upf1 protein has a dominant-negative effect on the decay of nonsense-containing mRNAs in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:10009-10014.
- Suzuki, A., T. Nakano, T.W. Mak, and T. Sasaki. 2008. Portrait of PTEN: messages from mutant mice. *Cancer Sci.* 99:209-213.
- Swanson, M.S., T.Y. Nakagawa, K. LeVan, and G. Dreyfuss. 1987. Primary structure of human nuclear ribonucleoprotein particle C proteins: conservation of sequence and domain structures in heterogeneous nuclear RNA, mRNA, and pre-rRNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 7:1731-1739.

Literatur

- Tafuri, S.R., and A.P. Wolffe. 1992. DNA binding, multimerization, and transcription stimulation by the *Xenopus* Y box proteins in vitro. *New Biol.* 4:349-359.
- Tanaka, M., K. Sasaki, R. Kamata, Y. Hoshino, K. Yanagihara, and R. Sakai. 2009. A novel RNA-binding protein, Ossa/C9orf10, regulates activity of Src kinases to protect cells from oxidative stress-induced apoptosis. *Mol Cell Biol.* 29:402-413.
- Tessier, C.R., G.A. Doyle, B.A. Clark, H.C. Pitot, and J. Ross. 2004. Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer Res.* 64:209-214.
- Tourriere, H., K. Chebli, L. Zekri, B. Courselaud, J.M. Blanchard, E. Bertrand, and J. Tazi. 2003. The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J Cell Biol.* 160:823-831.
- Tuerk, C., and L. Gold. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science.* 249:505-510.
- Tybl, E., F.D. Shi, S.M. Kessler, S. Tierling, J. Walter, R.M. Bohle, S. Wieland, J. Zhang, E.M. Tan, and A.K. Kiemer. 2011. Overexpression of the IGF2-mRNA binding protein p62 in transgenic mice induces a steatotic phenotype. *J Hepatol.* 54:994-1001.
- Uhlen, M., L. Fagerberg, B.M. Hallstrom, C. Lindskog, P. Oksvold, A. Mardinoglu, A. Sivertsson, C. Kampf, E. Sjostedt, A. Asplund, I. Olsson, K. Edlund, E. Lundberg, S. Navani, C.A. Szgyarto, J. Odeberg, D. Djureinovic, J.O. Takanen, S. Hober, T. Alm, P.H. Edqvist, H. Berling, H. Tegel, J. Mulder, J. Rockberg, P. Nilsson, J.M. Schwenk, M. Hamsten, K. von Feilitzen, M. Forsberg, L. Persson, F. Johansson, M. Zwahlen, G. von Heijne, J. Nielsen, and F. Ponten. 2015. Proteomics. Tissue-based map of the human proteome. *Science.* 347:1260419.
- Vainer, G., E. Vainer-Mosse, A. Pikarsky, S.M. Shenoy, F. Oberman, A. Yeffet, R.H. Singer, E. Pikarsky, and J.K. Yisraeli. 2008. A role for VICKZ proteins in the progression of colorectal carcinomas: regulating lamellipodia formation. *J Pathol.* 215:445-456.
- Valverde, R., L. Edwards, and L. Regan. 2008. Structure and function of KH domains. *FEBS J.* 275:2712-2726.
- Vikesaa, J., T.V. Hansen, L. Jonson, R. Borup, U.M. Wewer, J. Christiansen, and F.C. Nielsen. 2006. RNA-binding IMPs promote cell adhesion and invadopodia formation. *EMBO J.* 25:1456-1468.
- Viswanathan, S.R., G.Q. Daley, and R.I. Gregory. 2008. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science.* 320:97-100.
- Wachter, K., M. Kohn, N. Stohr, and S. Huttelmaier. 2013. Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA-binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biol Chem.* 394:1077-1090.
- Wang, D., J.R. Mann, and R.N. DuBois. 2005. The role of prostaglandins and other eicosanoids in the gastrointestinal tract. *Gastroenterology.* 128:1445-1461.
- Wang, X., and T.M. Tanaka Hall. 2001. Structural basis for recognition of AU-rich element RNA by the HuD protein. *Nat Struct Biol.* 8:141-145.
- Wang, Y.C., Y.L. Chen, R.H. Yuan, H.W. Pan, W.C. Yang, H.C. Hsu, and Y.M. Jeng. 2010. Lin-28B expression promotes transformation and invasion in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis.* 31:1516-1522.
- Watt, S.M., and J.Y. Chan. 2000. CD164--a novel sialomucin on CD34+ cells. *Leuk Lymphoma.* 37:1-25.

Literatur

- Weidensdorfer, D., N. Stohr, A. Baude, M. Lederer, M. Kohn, A. Schierhorn, S. Buchmeier, E. Wahle, and S. Huttelmaier. 2009. Control of c-myc mRNA stability by IGF2BP1-associated cytoplasmic RNPs. *RNA*. 15:104-115.
- Wolffe, A.P. 1994. Structural and functional properties of the evolutionarily ancient Y-box family of nucleic acid binding proteins. *Bioessays*. 16:245-251.
- Wolkowicz, U.M., and A.G. Cook. 2012. NF45 dimerizes with NF90, Zfr and SPNR via a conserved domain that has a nucleotidyltransferase fold. *Nucleic Acids Res.* 40:9356-9368.
- Wullschleger, S., R. Loewith, and M.N. Hall. 2006. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*. 124:471-484.
- Yang, J., P. Cron, V. Thompson, V.M. Good, D. Hess, B.A. Hemmings, and D. Barford. 2002. Molecular mechanism for the regulation of protein kinase B/Akt by hydrophobic motif phosphorylation. *Mol Cell*. 9:1227-1240.
- Yang, J.H., J.H. Li, P. Shao, H. Zhou, Y.Q. Chen, and L.H. Qu. 2011. starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 39:D202-209.
- Yaniv, K., A. Fainsod, C. Kalcheim, and J.K. Yisraeli. 2003. The RNA-binding protein Vg1 RBP is required for cell migration during early neural development. *Development*. 130:5649-5661.
- Yaniv, K., and J.K. Yisraeli. 2002. The involvement of a conserved family of RNA binding proteins in embryonic development and carcinogenesis. *Gene*. 287:49-54.
- Yao, J., Y. Sasaki, Z. Wen, G.J. Bassell, and J.Q. Zheng. 2006. An essential role for beta-actin mRNA localization and translation in Ca²⁺-dependent growth cone guidance. *Nat Neurosci*. 9:1265-1273.
- Yisraeli, J.K. 2005. VICKZ proteins: a multi-talented family of regulatory RNA-binding proteins. *Biol Cell*. 97:87-96.
- Zeng, Z.S., A.M. Cohen, and J.G. Guillem. 1999. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis*. 20:749-755.
- Zhang, L., Y. Liu, S. Hao, B.A. Woda, and D. Lu. 2011. IMP2 expression distinguishes endometrioid from serous endometrial adenocarcinomas. *Am J Surg Pathol*. 35:868-872.
- Zhang, Q., K. Yaniv, F. Oberman, U. Wolke, A. Git, M. Fromer, W.L. Taylor, D. Meyer, N. Standart, E. Raz, and J.K. Yisraeli. 1999. Vg1 RBP intracellular distribution and evolutionarily conserved expression at multiple stages during development. *Mech Dev*. 88:101-106.
- Zhang, S.P., G. Zubay, and E. Goldman. 1991. Low-usage codons in Escherichia coli, yeast, fruit fly and primates. *Gene*. 105:61-72.
- Zhang, Y., K. Chen, L. Guo, and C. Wu. 2002. Characterization of PINCH-2, a new focal adhesion protein that regulates the PINCH-1-ILK interaction, cell spreading, and migration. *J Biol Chem*. 277:38328-38338.
- Zhang, Z., and A.R. Krainer. 2004. Involvement of SR proteins in mRNA surveillance. *Mol Cell*. 16:597-607.
- Zhou, Y., T.F. Mah, J. Greenblatt, and D.I. Friedman. 2002a. Evidence that the KH RNA-binding domains influence the action of the E. coli NusA protein. *J Mol Biol*. 318:1175-1188.
- Zhou, Z., L.J. Licklider, S.P. Gygi, and R. Reed. 2002b. Comprehensive proteomic analysis of the human spliceosome. *Nature*. 419:182-185.

Literatur

- Zhu, H., N. Shyh-Chang, A.V. Segre, G. Shinoda, S.P. Shah, W.S. Einhorn, A. Takeuchi, J.M. Engreitz, J.P. Hagan, M.G. Kharas, A. Urbach, J.E. Thornton, R. Triboulet, R.I. Gregory, D. Altshuler, and G.Q. Daley. 2011. The Lin28/let-7 axis regulates glucose metabolism. *Cell*. 147:81-94.
- Zirkel, A., M. Lederer, N. Stohr, N. Pazaitis, and S. Huttelmaier. 2013. IGF2BP1 promotes mesenchymal cell properties and migration of tumor-derived cells by enhancing the expression of LEF1 and SNAI2 (SLUG). *Nucleic Acids Res*. 41:6618-6636.
- Zoncu, R., A. Efeyan, and D.M. Sabatini. 2011. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 12:21-35.

7 Anhang

7.1. Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ARE	<i>AU-rich elements</i>
APS	Ammoniumperoxidisulfat
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CR	<i>coding region</i>
CRD	<i>coding region instability determinant</i>
CRD-BP	<i>CRD binding protein</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTPs	<i>deoxyribonucleotide triphosphates</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis(2-aminoethyl)-tetraessigsäure
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
et al.	<i>et altera</i>
FB	Filterbindung
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
g	Erdbeschleunigung, Zentrifugationsgeschwindigkeit
g	Gramm
gg	<i>Gallus gallus</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH	reduziertes Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
hnRNP	<i>heterogenous nuclear ribonucleoprotein</i>
IF	Immunfluoreszenz
IGF2BP1-3	<i>insulin-like growth factor 2-mRNA binding protein1-3</i>
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Infrarot
kb	Kilo-Basen
kDa	Kilo-Dalton
KH	<i>hnRNP K homology</i>
l	Liter
LB	Luria Bertani
m	milli

Anhang

M	Molar
min	Minute
mind.	mindestens
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mRNP	<i>messenger Ribonukleoprotein</i>
μ	mikro
n	nano
NA	numerische Apertur
NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
nm	Nanometer
nt	Nukleotide
ORF	<i>open reading frame</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAR-CLIP	<i>Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation</i>
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>potentium Hydrogenii</i>
qRT-PCR	<i>quantitative real-time PCR</i>
RBP	RNA bindendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNasin	RNase Inhibitor
rpm	<i>rounds per minute</i> , Zentrifugationsgeschwindigkeit
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
RT	reverse Transkription
S	Svedberg-Einheit
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SELEX	<i>systematic evolution of ligands by exponential enrichment</i>
SG	<i>stress granule</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurylsäure
u.a.	und andere
UTR	untranslatierte Region
V	Volt
WB	Western Blot
w/v	<i>weight per volume</i>
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZBP1	<i>zipcode binding protein 1</i>

7.2. SELEX-Aptamer-Sequenzen mit Konsensusmotiven

ZBP1

AUUC ^C / _A	lila	UCAU ^A / _U	pink	^A / _C AU ^A / _U C	rot unterstrichen
^U / _C ACGA	grün	A ^U / _G ACG	orange	GACU	blau unterstrichen

N20 (n=28)

N40 (n=30)

1A1 UCACGUCAUCCAAUACGACA
 1A2 ACAGAAAUUCAUACGACACA
 1A4 CACUUGUCGAGGAGCUAUUG
 1A6 CGUGAAAUUCACAAUACGACA
 1A7 UUCCUCUGGUAACGCUUUG
 1A10 UCACCAGGAUACACGCUAU
 2A1 CUUGAAAUCCAAUACGACUA
 2A2a CAUUCAAAGAGGUGAGGUUUAU
 2A2b UUUCGAAAUUCGACUCACA
 2A3 UCCAUGGAGGUUGUGAUUGGCG
 2A4 CGCCUCGGUCAUUCGUGA
 2A5 CUUGAAAUCCAAUACGACUG
 2A7 UCACCACAACCUAGGACCCA
 2A10 CAUUCCAUACGACUUUUU
 2A11 UUCUGAAUCCAAUACGACU
 2A12 UUUCGUUCAUAAUCUGCGU
 3A1 UGCGUCCACUCAUACCGUGU
 3A2 CUUGAAAUCCAAUACGACUG
 3A3 UUCCCAUACGAACACACUAC
 3A3b UCAUUCCAAAUACGACUUCAU
 3A4 GACUGCUCGAUUCGCACAAU
 3A5 UCAAAUUCCGACUCACAACA
 3A6 CAAUUCCUAAUACGACUAU
 3A7 UUCCUCAAAUUCCAUCCUA
 3A8 UUCCUCAAAUUCCAUCCUA
 3A9 CAACGAAUUCCAUACGACU
 3A11 CUUCAUCUGGCAUUGGCAU
 3A12 CACUACUUCAGCACCGUCAU

1D1 ACAUUCCCACAAGCCUCUAGUUCGUGAUAAUGCUGUUUA
 1D3 CACAAUCAUGUAACGUGUAGCUGUUUCUUAUGUGCGGUGA
 1D4 CGUCUAAGGCUCCAACUCAUUGACGAUUUCAUACGGUACA
 1D5 UGAAAUUCCCAGUUGGCUAAUACGACUUUGGAAACGUUUAU
 1D6 CUCGAACAGGAACCGCCGAGCUCAUUAUCAUCAACUCU
 1D7 UGUCCAAAUUCCCUCGUUAUACUGGAUACAUGCGGUAAUGUG
 GAAGCUUCUCGAGACGCGG
 1D9 UCCUUAACCGAAUUCGUCAUACUACACUCACUGGAUUUU
 1D10 CAUAGAAUCCCACAUUCUGGUUGCUAAUACGUACUGUUA
 1D11 ACAACAAUUCCCUGAUUGCACAGAAUAUCUUGUCGUGUUA
 1D12 CGUGUGCUAGGAAUACGCGGAACAUGUUUGGAGUGUUC
 1D12b ACCACUAGACGAAUUGGUGGAUGGGUAAUUGUGCCGUU
 2D1 ACUCAUACCUCACUGUGCAAAGCCACAUUGGCUACGAGUU
 2D2 UCAUUCCCGCAUCAUCUUAACCAAGACAGACUACGGCAU
 2D3 UCGACAUUGCGGAUCACAACAUCGAUGAAUGGACUAAUAC
 2D4 AACGCUCGAGUACCCUCACACUUAACGUCACACCACCAG
 2D5 CUACUCAGUUAACCGAUCGACUGCAGUCAUUCGUGG
 2D6 CUCGAACAGGAACCGCCGAGCUCAUUAUCAUCAACUCU
 2D7 CGAUAAACCAUGUACCGUCAACUAAUUAUGCACAUAAGCC
 2D8 CUCGAACAGGAACCGCCGAGCUCAUUAUCAUCAACUCU
 2D10 UCCGAAAGUCUACGUCAUUCUACACUAAUACAGACUGCUU
 2D11 CAGGUGCCACCUCUUAACAUCUUAUCUACAACAGUGCG
 3D1 CACACGUCGUACCUUAUCUUCGUCGGCAGAAACGGUUUUAU
 3D2 UCCAGUGUGACAUUGUACACUGGACUCAUUAGACGACUAU
 3D3 GAAUAUCCCUUACAUGAUGGGCAAAAUACGACUUAU
 3D4 UCCAGUGUGACAUUGUACACUGGACUCAUUAGACGACUAU
 3D5 CAAACUACGAUUUGCUCAUUCGACUCACUGUUUC
 3D7 CUCGAACAGGAACCGCCGAGCUCAUUAUCAUCAACUCU
 3D8 UCGUGAAUGGGUGUGUAGACCUGGUUGAUGUUGUUGUU
 3D10 CGACAUCGCGAAAAUUCCAUUGACUAAUACGGUGCCUGUUUU
 3D12 UCUCUUGGUCGUUGGUUAUCGUCGAUUGUGAAAGGGCCAU

Anhang

IGF2BP2

UUCCC	lila	AAU ^U / _A C	pink	AU ^A / _G CG	rot unterstrichen
AU ^A / _G C ^G / _A	grün	^C / _G AU ^C / _G A	orange	AC ^G / _A AC	blau unterstrichen

N20 (n=28)

1B1 UCAUUCCCAUACGACUUCU
 1B2 ACGAUGCGAUUU
 1B4 UUCCCAUCGAGUGCGGUACA
 1B6 ACGAUGCGAUUU
 1B7 UUCCCAACUCACAACUCACA
 1B8 CAUUGAAGGCCAAUACGACA
 1B9 CAAUUCCCAUACGACUACCA
 1B10 UCAUUCCCGACAAUGCAACCAGUU
 1B12 UCAUUCCGAUACGACCACU
 2B1 UUCCCUCUCAUAUACAGCAU
 2B2 UUCCCAUUCUCGNUGUGCCN
 2B4 CUUGGACCUCGAGAGCUGCA
 2B6 UCCGACCUGUGGCGG
 2B7 CAAUUCCCAUACGACUACCA
 2B9 UCGACUCAUCAGCAUUUACA
 2B10a AUUCCACUUAAUACGACAUA
 2B10b UCAUUCCCGACAACUCACU
 2B11 UUCCCAGCACUAAUACACA
 3B1 CUCGUCGCCUUCACCGUUU
 3B2 UCGACUCAUCAGCAUUUACA
 3B3 CUUCGAGGAGCUGGUGUACA
 3B4 UUCCCAACACUAAUACGACA
 3B5 CUUCUUGGUCAUCCUGGUGC
 3B6 CACACGGGACGGUUGAUUUAU
 3B7 CUCCAACCGUGCCUGGUGG
 3B8 UAUUGCAUUCCCGACUCACA
 3B9 CUUCGAGGAGCUGGUGUACA
 3B10 UUCCCUCUCAUAUACGCAU

N40 (n=32)

1E1 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 1E2 CUCGAUGCGGCAAAUUCCAUCACGGGCAAAAUACAACUCCA
 1E3 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 1E4 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 1E5 CUGCACAUGCGCAUGAAUUCGCACUAAUACGACGGAUUG
 1E6 CACUGCUAGCACAACCACAUCAACCCUUACCUGUUUAUGC
 1E7 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 1E8 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 1E9 UACUGAAUCCCGUCAUGGGUUGGACUAAUUACGACUAAUU
 1E10 CUACAGUCAUUCACAACUAAUACGACGUUUGUCCGGUU
 1E11 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 1E12 UACUGAAUCCCGUCAUGGGUUGGACUAAUUACGACUAAUU
 2E1 UUACUGAAAAUUCCACACCCAUGUGACUAAUACGACUGCA
 2E2 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 2E3 UCAAUGAAUUCCAAAGUGGUUUGGCUAAUACGGUGUGGUUA
 2E4 CGACAACGGNAGGAAUUCCUNNAGNUAANANGACGGUNUA
 2E5 UCCAGUGGACAUUGUACACUGGACUCAUAGACGACUUAU
 2E6 CUGCACAUGCGCAUGAAUUCGCACUAAUACGACGGGAUGA
 2E8 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 2E9 UUGUAAUUCCCAACUGGUUUGUUGUUCACUAAUACUCCU
 2E10 UCAUCCGAUGGACUUCCUCGCUCAUACAAAUUCAACUGU
 3E1 CUACAGUCAUUCACAACUAAUACGACGUUUGUCCGGUUU
 3E2 UGAAAUUCCCAGUUGGCUAAUACGACUUUGGAAACGUUAU
 3E3 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 3E4 CUGCACAUGCGCAUGAAUUCGCACUAAUACGACGGGAUGA
 3E6 CUGCACAUGCGCAUGAAUUCGCACUAAUACGACGGGAUGA
 3E7 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 3E8 CUACAGUCAUUCACAACUAAUACGACGUUUGUCCGGUUUCU
 3E9 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 3E10 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 3E12 CUCGUGUUUCAUAAAACAUCAGCUCAUCAAUACGAUCAU
 3E12b CUUAGAAUUCCGCACAAAAGUUGCAUGCUAAUACGACU

Anhang

IGF2BP3

U ^U / _G CA	lila	AUACG	pink	AUACG	rot unterstrichen
UCCC	grün	GUG ^A / _C ^U / _A	orange	UCCC ^A / _U	blau unterstrichen

N20 (n=27)

1C1 UCUCGCUCAUCAUGUUGCAC
 1C3 CGCUCUUCGAUCAUCUACCA
 1C5 UGCAUCCCUUACACUGCUGCA
 1C6 UGCAUUCCCUAAUACGACAU
 1C7 CGCUGUCCCGGUUCAGCGUG
 1C8 UUCCCACAUUCUUGCUUGAGC
 1C9 UGCAUUCCCUUCACCGCUGUA
 1C11 UGCUCCCUCAUCUGCGCA
 1C12 UUUCCCAAUACUACACCA
 2C1 CGACUCGAUACCACC
 2C2 UCUCGCUCAUCAUGUUGCAC
 2C3 UGCAUUCCCUUCACMGUGCA
 2C4 UUCCCAUCAGAAACAUUCA
 2C5 CUCGCAGCUGUU
 2C7 UUCCCACAUCUUGCUUGAGC
 2C8a UUCCCGAUAUGUAGCUUCCA
 2C8b UCCGUAUUCACGACUCACA
 2C10 UAUCGUAUUCAAGCUUUGU
 2C11 UGCAUUCCCUUCAGCAGCUGCA
 2C12 CUACACAGCGAGGUUGUGCA
 3C1 UGUCUCCCUUCAGCUGUGACA
 3C3 CGAGAACGUCCAUUCAUUCA
 3C4 CUCGAUCGGUGCCUCACA
 3C5 UUCAAAUUCCCUAAUACGACU
 3C8 UUCCCUCAUCUACUNAUUAC
 3C10 CAUUCGAACUAAAUACGACCG
 3C12 CGCUCAUUCUUCAUAUCGCC

N40 (n=29)

1F1 AGGUUAUACACGCGCAGUCCAUUAUCAUCGAGCACAGACN
 1F2 UAUCACAAUUCCGCACUGGGAACUAAUACGAUAU
 1F3 CGAUUCACGCGAAUUUCCCUGUUUUGUCGGUGUACAAUGG
 1F4 UAACCAUGCUAUACACCUUGGUAACGGCACCUUUACUUCGG
 1F5 ACAUCACGACGAAUUCCCUUGUCAGUUUUAAUCAGCCUAA
 1F7 UGUCCCACAUACAACAUGGGCCAAGAAUUGGGACUCACAU
 1F9 CAAUUCCCAUGCAAUGCUAAUACGAUAGGAGACUGGCGAA
 2F1 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUAU
 2F2 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUAU
 2F3 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUUA
 2F4 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUAU
 2F6 UGUCCCACAUACAACAUGGGCCAAGAAUUGGGACUCACAU
 2F7 CGAACCAUCUGAUCGGUUCGCUCAUACAUACGACAAUU
 2F9 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUAU
 2F10 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUUU
 2F11 CGUACAGCGUGCAAAGCAAUCACACUCUCCGGUACACAUG
 2F12 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUAU
 3F1 UAACGAAUCCCGCAUUACGUGCUAAUACGACUUGUUUUU
 3F2 UACCAACUUUGUGUGGAGCGUGUGGUAAUGAUUGCUUGUU
 3F3 CGAACCAUCUGAUCGGUUCGCUCAUACAUACGACAAUU
 3F4 CAACACCGGCUUGGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUAU
 3F4b AACAAUUCCCUUGAUGAAUGCUUGUGAACUAAUACGAACA
 3F6 CGAACCAUCUGAUCGGUUCGCUCAUACAUACGACAAUU
 3F7 CGAACCAUCUGAUCGGUUCGCUCAUACAUACGACAAUU
 3F8 CAACACCGGCCGCCAGUGCUGUGAAUGGAUACGACUUAU
 3F9 CGAACCAUCUGAUCGGUUCGCUCAUACAUACGACAAUU
 3F10 UUCGCUCAUUCGACUCGCGAACUCAUUUAUACGACUUUA
 3F11 UUCGCUCAUUUCGACUCGCGAACUCAUUUAUACGACUA
 3F12 UUCGCUCAUUUCGACUCGCGAACUCAUUUAUACGACUUUA

Anhang

CD44 Fragmente im 3'-UTR (Nummerierung beginnt beim Startkodon)

Vikesaa et al., 2006

(1) 2303-2627 (325 nt)

GAUGCAAUGUGCUACUGAUUGUUUCAUUUGCGAAUCUUUUUAGCAUAAAAUUUCUACUCUUUUUGUUUUUUGUGUUUUUGUUUUAAAGUC
AGGUCCAUUUUUGAAAAACAGCAUUGCUUUCUGAAUUAGGGCCCAAUUAAUUAUCAGCAAGAAUUUGAUCGUUCCAGUUCCACUUUGGAGGCC
UUUCAUCCUCGGUGUGCUAUGGAUGGCUUCUACAAAAACUACACAUAGUUAUCCUGAUCGCCAACCUUCCCCACCAGCUAAGGACAUUU
CCCAGGUAAUAGGGCCUGGUCCUGGGAGGAAUUUGAAUGG

(2) 2862-3055 (194 nt)

GUCAGAGGCACAAAAGGGUUUAAACUGAUUCAUAUAAAUAUCUGUACUUCUUCGAUCUUCACCUUUUGUGCUGUGAUUCUUCAGUUUCUAAAC
CAGCACUGUCUGGGUCCUACAAUGUAUCAGGAAGAGCUGAGAAUGGUAAGGAGACUCUUAAGUCUUAUCUCAGAGACCCUGAGUCCACU
CAGAC

(3) 3928-4236 (309 nt)

GCACUAUCCAGCCUCUGCUCCUCCUGUCUACCCUCUCCUCCUCCUCUCCUCCUCCACUUCACCCACAAUCUUGAAAAUCUCCUUCUCUUCU
GUGAACAUCAUUUGCCAGAUCCAUUUUCAGUGGUCUGGAUUUCUUUUUAUUUCUUAACUUGAAAGAACUGGACAUUAGGCCACUAGU
GUUGUUACUGCCACUAGUUAAGUGCCUUCUUGUUUUCCAGAGAUUCCUGGGUCUGCCAGAGGCCAGACAGGCUCACUCAAGCUCUUUAAC
UGAAAGCAACAAGCCACUCCAGG

(4) 4567-4773 (207 nt)

AUUCUCACUCCUUGAUCUCAAGGGCGAACUCUGGAAGCACAGCUUGACUACACGUAUUUUUACCAUGAUUUUCAGGUGACCGGGCUAAG
UCAUUUAAACUGGGUCUUUAUAAAAGUAAAAGGCCAACUUUAAUUUUUUUGCAAAGCAACCUAAGAGCUAAAGAUGUAAUUUUUCUUGCAAUU
GUAAUUCUUUUUGUGUCUCC

(5) 4749-5040 (292 nt)

GCAAUUGUAAAUCUUUUUGUGUCUCCUGAAAGACUCCUUAUUUAGCUCUGAGUGAAAAUCAAAAGAGACAAAAGACAUUCGAAUCCAUAU
UUAAGCCUGGUAAGAAUUGGCUUUUCUAGCAGAACCUUCCAAAAGUUUUUAUUUGAGAUUCAACAACACCAAGAAUUGAUUUUGUAGCCAA
CAUUCAUUCAUAUCAGAGGAGUAGGAGAGAGGAAACAUUUGACUUAUCUGGAAAAGCAAAUUGUACUUAAGAAUAGAAUAAACAU
GGUCCAUC

MDR1 (in CR, 217 nt)

Sparanese et al., 2007

UUAGAAGAUUCUGAUGUCAACAUCACUAAUAGAAGUGAUUAUCAAUGAUACAGGGUUCUUAUGAAUUCUGGAGGAAAGACAUACAGGUAUGCCU
AUUAUACAGUGGAAUUGGUGCUGGGUGCUGGUUGCUGCUUCAUUCAGGUUCAUUUCAUUCAGGUUUCAUUUUGGUGCCUGGCAGCUGGAAGACAUAUCACAAA
UUAGAAAACAGUUUUUAUGCUAUAUAGC

Y3 (noncoding RNA, 102 nt)

Köhn et al., 2010

GGCUGGUCCGAGUGCAGUGGUGUUACAACUAAUUGAUCACAACCAGUUAACAGAUUUUCUUGUUCUUCACUCCACUCCACUGCUUCACUUGACU
AGCCUUUU

HULC (long, noncoding RNA; 500 nt)

Hämmerle et al., 2013

AUGGGGGUGGAACUAGAUUGGAAUUGGAGCCUUACAAGGGAAUGAAGAGACAAGAGCUCUCUUUAUGCCACGUGAGGAUACAGCAAGGCCCC
AAUCUGCAAGCCAGGAAGAGUCGUACGAGAACCAUGCAGGAACUCUGAUCGUGGACAUUUAACCUCCAGAACUGGAUCCAAAUGCA
UAUGUAUCUUUGGAAAGAACUCUGAAGUAAAAGGCCGAAUAUUCUUUGUUUUAAAACAUAUAAAACAAAACAGACCAAAGCAUCAAGCAAGAAGUU
UCCUGGCAUAAACUAGCACAGCAUUAUUUUUAAGGAACACAAAUAAGUGUUAACCUUGGGCAAAUUAUUAUUCUCCUGAAUUAUGU
UGUUUAUCAAAGAAAAAAUUGGGAAGCAUGGCAAAUAUCAUAAAACUGAAACUAGAUAUAAACAAAACUAAAUAUAAAUGAAUAAAUGAUG
UCAUUCUUAAAAAAAAAAAAAAAAA

Anhang

7.3.2 Motive in IGF2BP2 Ziel-RNAs

UUCCC	lila	AAU ^U / _A C	pink	AU ^A / _G CG	rot
AU ^A / _G C ^G / _A	grün	^C / _G AU ^C / _G A	orange	AC ^G / _A AC	blau

MYC-CRD (250 nt in CR; für FB genutzt; siehe 3.1.2.)

Wächter und Köhn et al., 2013

GAACAC**ACAAC**GUUCUUGGAGCGCCAGAGGAGGAACGAGCUAAAACGGAGCUUUUUUGCCUGCGUGACCAGAUCCCGAGUUGGAAAACAUGAA
AAGGCCCCCAAGGUAGUUAUCCUUA AAAAAGCCACAGCA**AUCA**UCCUGUCCGUAAGCAGAGGAGCAAAGCUCAUUUUCUGAAGAGGACUUGUU
GCGGAA**ACGAC**GAGAACAGUUGAAACACAAACUUGAACAGCUACGGAACUCUUGUGCGUAA

ACTB (*zipcode* in 3'-UTR; 100 nt; für FB genutzt; siehe 3.1.2.)

Wächter und Köhn et al., 2013

GCGGACUAUGACUUAUUGCGUACACCCUUUCUUGACAAAACCUAACUUGCGCAGAAAACA**GAUGA**GAUUGGCAUGGCCUUUUUUUUUUUU
UUGUUUU

Y3 (*noncoding RNA*, 102 nt)

Köhn et al., 2010

GGCUGGUCGAGUGCAGUGGUGUU**ACAAC**UAAU**GAUCA****CAAC**CAGUUACAGAUUUUCUUGUUCUCCACUCCACUGCUUCACUUGACU
AGCCUUUU

H19 (1701-2285; 585 nt)

Runge et al., 2000; Boudoukha et al., 2010

GGAACCAGACCU**CAUCA**GCCCAA**CAUCA**AAGACACCAUCGGAACAGCAGCGCCCGCAGCACCCACCCCGACCCGGCGACUCCAUCUUAUGGCCACCC
CCUGCGGGGACGGUUGACCACCAGCCACCA**CAUCA**UCCAGAGCUGAGUCUCCAGCGG**GAUGA**CGCCGUCCCCACCACCUCCUUCUUCUUCUU
UUCAUCCUUCUGUCUUCUUGUUUCUGAGCUUUCUUCUUCUUUUUUUCUGAGAGAUUCAAGCCUCC**ACGAC**UCUGU**UUC**CCCGUCCUUC
UGAAUUUAAUUUGCACUAAGUCAUUUGCACUGGUUGGAGUUGUGGAGACGGCCUUGAGUCUCAGUACGAGUGUGCGUGAGUGAGCCACCUU
GGCAAGUGCCUGUGCAGGGCCCGCCGCCUCCAUUCUGGCGGGUGACUGGGCGCCGGCUGUGGCCGAGGCCUACCCUCCUCCUCCUAGUC
UGGAAGCUCGACCGA**CAUCA**CGGAGCAGCCUUAAGCAUUCUACGCCCAUCUCGUCUGUGCCCUCCCCACCGAGGCCUUCAGCAGGAGCC
UGGACUCAUC

5'-UTR der IGF2 mRNA (752 nt)

J. Nielsen et al., 1999

CGCCUGUCCCCUCCGAGGCCCGGGUCGCGACGGCAGAGGGUCUCCGUCGGCCAAACCGAGCUGGGCGCCCGGGUCCGGGUGCAGCCUCCACUC
CGCCCCCAGUACCCGCCUCCCCGGCCCCUGCAGUGGGCCCC**UUC**CCUCCGCUUCUCUGUCUCCCCCGCCCCUUGGGGUCUGGCCCGGCC
CCGCUUCUUCUCCCGCAACCU**UUC**CUUCGUCUCCUCCCGUCCCCCAGCUCUAGCCUCCGACUCCUCCCCCUACGCCCCGCCUUCGCCUUCG
CCGAACCAAGUGGAAUAAUACACGCUUCUUGUUUCUCCGUGCUGUUCUCCCGCUGUGGCCUCCUCCUCCUUCGCGUCCUUCUCCCCC
UCGCCUUCUCUJCGGCCCCCCCUUUCACGUCACUCUGUCUCCACUAUCUCUCCCCCUUACUCCUUG**AUACA**ACAGCUGACCUCAU**UUC**
GAUACCU**UUC**CCCCGAAAAGU**ACAAC**AUCUGGCCCGCCCCAGCCGAAAGACAGCCGUCUCCUCCUGGACAAUACAGC**AUUC**UCCCCCCCC
CAAAAAAAGCAUCCCCCGCUCUGCCCCGUCGACAUUCGGCCCCCGCAGUCGGCCAGAGCGCGUGGCGAGGAGUGUCCGGCAGGAGGGCC
AACCCCCGCUUGUCGGUUCGCGACAGCAGGGAGGUGGGCGGAGCUCGCCGGUCCAGACCA

3'-UTR der LIMS2/PINCH2 mRNA (629 nt)

Boudoukha et al., 2010

AGGUCCCGGCCUGGCCUGCCUGCAGUACCUUAGCACUCAUCCCCUCCCCAGGUCCUGCUAGCCACCUCACUUCUGCUCCAGCCCAGCCC
GUUCCUCCGGUAGCCAUCCUUCUGUCUCCAGUCCACCUCCGGGCUAUGUAGCCUUUCCUUCUGUCUGAGGCCUAGCCACCUCACAGGCAUUU
CCUCCCGGCC**ACAAC**CUCCAGGGACAGGAACAACUUGGAGCAGGAUUUUUGUCACUUGCUUGACCCGAGAUCCCAACCCGAGUCCUCCUCC
UCCACUCCAGGAGAUUUCAGCCUCCGUGGACCCUUGGGCUUGGCUGAGAAGCUGUCCCAACCCAGGGCCAGCACCCAGCAUAGAGGCCU
UCAUGGAAGCACCCUUCUCAGUUUUUCGAGCACAGUAGGUCCUUGUCUUAACUUGUCAGCAAACCCACCUUGGGGUGAAGCAGCCGAGAG
CCCUCAGCCUACUACUACAGGAGACCUAUGAAAGUUCUCAGCUGCCACCAAGUGGGGGUCCAC**UUC**AGGGGCACAUUGCCUGGC
CAUCGAAGACCCACAAGUGGUCACAUACUACAAUGAAGGCUCAUUCACAU

5'-UTR der TRIM54/MURF3 mRNA (700 nt)

Boudoukha et al., 2010

AGUGCUGCCCAAAGAGUACCAAGAGGGUGGUUUUGGGGGACAGGAGGAGAAUUCACAGGGCAAGAUAAGCUCACAAGCGCCUGGUGAGGGUU
CUGAGCAAGGAGUAGACAGAGUUCUGGAAUAGACAGGGGUGAGAGGAGCUGUUAGGGGAAGGACAGGACUCUCCAAGAGGGAGCAAU
AGCCGGGAUCCCAAGAAUCCAGUCAGCCUAAACUGACCCGAGGAAGGGUGCACAGGCAGGGGAGAAGGCC**ACGAC**AGGGCCACAGCGAGGCAAGCU
CCAGAGCGCCCGG**GAUGA**ACUUCACGGUUGGUUUCAAGCCGUCUAGGGG**AUGCG****CACAAC**AUGG**ACAAC**UUGGAGAAGCAGCUCAUUUGCC
CCAUCUGCCUGGAGAUUUCUCAAAGCCGUGGUAUCUUGCCUUGCCAA**ACAAC**CUUGCCGCAAGUGUGCCA**ACGAC**GUCUCCAGGCCUCUA
AUCCUUCUGGCAAUCCCGGGCCUCC**ACAAC**GGUGUCUUCAGGAGGACGUUUCCGAGUCCCAUCUUGUAGGCACGAGGUUGUCCUGGACAGGCA
UGGUGUCUUAUGGCCUGCAGCGGAACCUUCUAGUGGAGAA**CAUCA**UUGACAUUCAAGCAGGAGUCCUCCGGCCACUACGACGCAAGGCUGAAC
AGCACCUCAUGUGGAGGACGACGAGGACGAGAAGAU

Anhang

H19 (1836-2008; 173 nt)

Liao et al., 2005; Jonson et al., 2014

CCCAGAGCUGAGCUCCUCCAGCGGAUGACGCCGUCCCCACCACCUCCCUCUUCUUCUUUUUUCAUCCUUCUGUCUCUUUGUUUCUGAGCUUCCU
GUCUUUCCUUUUUCUGAGAGAUUCAAAGCCUCCACGACUCUGUUUCCCCGUCCCUUCUGAAUUUAUUUGCACUAA

5'-UTR der IGF2 mRNA (752 nt)

J. Nielsen et al., 1999

CGCCUUCCCCUCCCGAGGCCGGGUCGCGACGGCAGAGGGUCUCCGUCGGCCAAACCGAGCUGGGCGCCCGGGUCCGGUGCAGCCUCCACUC
CGCCCCCAGUCACCGCCUCCCCCGCCCCUCGACGUGGCGCCCUUCCCUCCGCUUCUCUGUGCUUCCCCGCGCCCUUCUGGCUCUGGCCCGGCC
CCGCUCUUUCUCCCGCAACCUUCCCUUCGCUCCCUCCCUCCCCCCAGCUCCUAGCCUCCGACUCCCUCCCCCCCUCACGCCCGCCUCUCGCCUUCG
CCGAACCAAAGUGGAUUAAUACACGCUUCUGUUUCUCUCCUGGCUGUUCUCUCCCGUCUGCGCCUCCCGCCUCUCGUGUCCUCUUCCCC
UCGCCUCUCUCUGGCCCCCCCUUUCACGUUCACUCUCUCUUCCCACUAUCUCUGCCCCUCUAUCUUGAUACAACAGCUGACCUCAUUCCC
GAUACCUUUUCCCCCGAAAGUACAACAUCUGGCCCGCCCCAGCCGAAGACAGCCCGUCCUCCCUGGACAUCAGACGAUUUCCCCCCCCC
CAAAAAAAGCCAUCCCCCGCUCUGCCCGUCGCAUUCGGCCCCGCGACUCGCCAGAGCGGCGCUGGCAGAGGAGUGUCCGGCAGGAGGGCC
AACGCCCGCUGUUCGGUUUGCGACACGACAGGGAGGUGGGCGCAGCUGCCGGCUUCCAGACACCA

HMG2 Fragmente im 3'-UTR (Nummerierung beginnt im 3'-UTR)

Jonson et al., 2014

(1) 1088-1352 (265 nt)

GAAAGACCUGAAUACCACUACCUCAAAUAAGCAUUGUGUACUUCAAGUAAUACGUUUUGACAUAAGAUGGUUGACCAAGGUGCUUUUCU
CGGCUUGAGUUCACCAUCUCUUCAUUCAAAACUGCACUUUUAGCCAGAGAUGCAAUAUAUCCCCACUACUAUACUACCUCUGAAUGUACAACG
AAUUUACAGUCUAGUACUUAUACAUGCUGCUAUACACAAGCAAUGCAAGAAAAAACUACUGGGUAGGUGAUUC

(2) 2397-2692 (296 nt)

CAUUGCCAGCUCUAAAAUUGGAAGCAAUUGCUCUAGUUGGCCAAACAUGUGCACCGAGGUGAUUCCAUCUCUGGUAAAGUUACACUUUUUU
UCCUGUAGUUGUACAAUCAAACACACUACUACCUCUUAAGUCCCAGUUAUCCUCAUUUUUUCAUACUGAAAAAAAGCUUGUGCCAAUGGAA
CAGUAAAGACAUCAAAAAUUUUUAUAUAUAUAGUUUUUUUGUGGGAGAUAAAAUUUAUAGGACUGUUCUUUGCUGUUGUUGGUCGACG
UACUAAGACUGGAC

CCND1 (3'-UTR; 2452-2746; 293 nt)

Rivera Vargas et al., 2014

AGAUGUUUCACACCGGAAGGUUUUUAAACACUAAAAUAUAUUUUUAUAGUUAAGGCUAAAAAGUAUUUUUGCAGAGGAUGUUCUAAAGG
CCAGUAGAUUUUAAAUGCAAUCUCCCUUGAUUUAAACACACAGAUACACACACACACACACACAAACCUUCUGCCUUUGAUGUACA
GAUUUAAUACAGUUUUUUUAAAGAUAGAUCUUUUUAUAGGUGAGAAAAAACAAUCUGGAAGAAAAAACACACAAAGACAUUGAUUCAGC
CUGUUUGGCG

CCNG1 (3'-UTR; 1840-2144; 305 nt)

Rivera Vargas et al., 2014

GCCUCAACUGAAUCCCAUCAAGAAAACUAGUUUCUUAUGUUAUAGUAACUAAAAUAAAUAUCACUUCGAAAACUUGCUUCCCACACUAAGG
UAAGUUCAGACUAGAUUGAACACUCCAGAAUUUUUACUACAGACUGUUUUUAGUUAGAAGUGAUGGCAAUUUUUAUUAAUAGAGAAUUAUCU
UCCACUGAUGCCUUCUGUGCCAAAACAAAAUCUUAAGAAAAGCAAGUAGACACUUCAUAACUUGAAUGAAGCUGCUGAAGUAGUGUUUAG
GAUCCUCAUGGCAGUUAGUGA

7.4. Daten der MS-Analysen

Tab. 1: Spezifisch angereicherte Proteine in der Flag-ZBP1 Immunopräzipitation aus HEK293 Zellen ($\Sigma=74$). Als Kontrolle (K) dienen naive HEK293 Zellen. Für jedes Protein wurden der Name des Gens, die Referenzsequenz, die Zahl identifizierter Peptide und die Peak-Intensität angegeben (Bedingungen: identifizierte Peptide IP > K; Peak-Intensität IP > K; Peptide in IP ≥ 2 ; Intensität in IP $\geq 1E+03$). Proteine, die ebenfalls in der MS-Analyse mit U2OS Zellen zu finden sind, wurden grau markiert.

HEK293		Peptide		Intensität	
Name des Gens	Ref. Sequenz	K	IP	K	IP
ABCF1;ABC50	NP_001020262	0	4	0,0E+00	1,1E+05
ACAD11	NP_115545	0	2	0,0E+00	9,6E+04
ACOT9;CGI-16	NP_001032248	0	2	0,0E+00	4,8E+04
BYSL	NP_004044	0	7	0,0E+00	2,9E+05
CCDC124	NP_001129675	0	2	0,0E+00	1,3E+04
CDKN2AIP;CARF	NP_060102	0	2	0,0E+00	5,6E+03
CKAP5	NP_001008938	0	5	0,0E+00	1,7E+05
DAP3;MRPS29	NP_004623	0	3	0,0E+00	3,5E+05
DDX1	NP_004930	0	2	0,0E+00	8,5E+04
DDX17	NP_006377	0	3	0,0E+00	2,7E+04
DDX21	NP_004719	0	21	0,0E+00	4,5E+06
DDX24	NP_065147	0	4	0,0E+00	3,5E+04
DDX27	NP_060365	0	3	0,0E+00	6,8E+04
DDX50	NP_076950	0	8	0,0E+00	3,3E+05
DDX55	NP_065987	0	2	0,0E+00	1,1E+04
DDX56;DDX21	NP_061955	0	2	0,0E+00	3,7E+03
DHX30;DDX30	NP_619520	0	12	0,0E+00	9,8E+05
DHX36;DDX36	NP_065916	0	6	0,0E+00	8,6E+04
DHX57	NP_945314	0	10	0,0E+00	2,1E+06
EIF2S1;EIF2A	NP_004085	0	3	0,0E+00	1,3E+04
EIF2S3;EIF2G	NP_001406	0	7	0,0E+00	6,2E+05
EIF3EIP	NP_057175	0	5	0,0E+00	9,2E+04
EIF5B;IF2	NP_056988	0	6	0,0E+00	9,2E+05
EXOSC10;PMSCL	NP_001001998	0	3	0,0E+00	9,3E+04
FAM120A	NP_055427	0	6	0,0E+00	2,2E+05
GNB2L1;HLC7	NP_006089	0	4	0,0E+00	4,8E+04
HNRNPC;HNRPC	NP_001070910	0	5	0,0E+00	6,1E+05
HNRNPL;HNRPL	NP_001524	0	5	0,0E+00	2,9E+05
HNRNPUL1	NP_008971	0	4	0,0E+00	8,3E+03
HNRNPUL2	NP_001073027	0	3	0,0E+00	3,4E+03
HP1BP3	NP_057371	1	4	0,0E+00	5,9E+04
HSP90AB1;HSP90B	NP_031381	0	2	0,0E+00	6,2E+04
HSPA4;APG2	NP_002145	0	2	0,0E+00	2,3E+05
HSPD1;HSP60	NP_002147	0	4	0,0E+00	3,4E+04
IQGAP1	NP_003861	0	7	0,0E+00	7,3E+05
IVNS1ABP;ARA3	NP_006460	0	4	0,0E+00	2,1E+04
LARP1;LARP	NP_291029	0	20	0,0E+00	3,5E+06
LTV1	NP_116249	0	2	0,0E+00	1,7E+04
LYAR;PNAS-5;ABCA13	NP_060286	0	2	0,0E+00	3,9E+03
MTPAP;PAPD1	NP_060579	0	2	0,0E+00	2,0E+04
MYBBP1A;P160	NP_001099008	0	28	0,0E+00	8,8E+06
NAT10;ALP	NP_078938	0	3	0,0E+00	2,1E+03
NOL6	NP_075068	0	3	0,0E+00	9,7E+03
NOP2;NOL1	NP_001028886	0	18	0,0E+00	2,2E+06
NOP58;NOL5;NOP5	NP_057018	0	2	0,0E+00	5,6E+03
PARP1;ADPRT;PPOL	NP_001609	0	22	0,0E+00	1,2E+06
PDCD11	NP_055791	0	6	0,0E+00	2,1E+05
PES1	NP_055118	0	3	0,0E+00	1,7E+04
POLR1A	NP_056240	0	3	0,0E+00	3,2E+05

Anhang

POP1	NP_055844	1	14	0,0E+00	3,9E+05
PRPF31;PRP31	NP_056444	0	5	0,0E+00	2,2E+05
PUF60;FIR;ROBPI	NP_510965	0	2	0,0E+00	9,6E+03
PURB	NP_150093	0	4	0,0E+00	1,9E+04
PWP1	NP_008993	0	4	0,0E+00	6,0E+04
RBM28	NP_060547	0	7	0,0E+00	1,0E+05
RBMX;HNRPG	NP_002130	0	2	0,0E+00	1,1E+05
RRP12	NP_055994	0	3	0,0E+00	1,2E+05
RSL1D1;CATX11	NP_056474	0	6	0,0E+00	6,3E+05
SDCCAG1	NP_004704	0	2	0,0E+00	9,0E+04
SND1;TDRD11	NP_055205	0	4	0,0E+00	6,9E+04
SRPK1	NP_003128	0	4	0,0E+00	2,1E+05
SRRT;ARS2	NP_056992	0	3	0,0E+00	2,4E+04
TOP1	NP_003277	0	9	0,0E+00	2,9E+05
TOP2A;TOP2	NP_001058	0	17	0,0E+00	7,2E+06
TRIM28;KAP1	NP_005753	0	4	0,0E+00	3,1E+04
TRM1L	NP_112196	0	3	0,0E+00	2,8E+04
TSR1	NP_060598	0	11	0,0E+00	4,6E+05
U2AF2;U2AF65	NP_009210	0	4	0,0E+00	4,7E+05
XRCC5;G22P2	NP_066964	0	9	0,0E+00	1,4E+06
XRN2	NP_036387	0	4	0,0E+00	7,0E+04
YTHDC2	NP_073739	0	6	0,0E+00	5,2E+05
ZFR	NP_057191	0	7	0,0E+00	2,8E+05
ZNF326	NP_892021	0	2	0,0E+00	8,4E+03

Tab. 2: Spezifisch angereicherte Proteine in der GFP-ZBP1 Immunopräzipitation aus U2OS Zellen ($\Sigma=92$). Als Kontrolle dienten naive U2OS Zellen. Für jedes Protein wurden der Name des Gens, die Referenzsequenz, die Zahl identifizierter Peptide und die Peak-Intensität angegeben (Bedingungen: identifizierte Peptide IP > K; Peak-Intensität IP > K; Peptide in IP \geq 8; Intensität in IP > 1E+04). Proteine, die ebenfalls in der MS-Analyse von HEK293 Zellen zu finden sind, wurden grau markiert.

U2OS Name des Gens	Ref. Sequenz	Peptide		Intensität	
		K	IP	K	IP
ABCF1;ABC50	NP_001020262	0	8	0,00E+00	3,15E+04
AP2M1;CLAPM1	NP_004059	0	12	0,00E+00	2,65E+04
APOBEC3B	NP_004891	0	12	0,00E+00	1,54E+04
APOBEC3F	NP_660341	0	9	0,00E+00	1,12E+04
C22orf28;HSPC117	NP_055121	1	13	0,00E+00	4,83E+04
CAD	NP_004332	0	11	0,00E+00	2,79E+04
CKAP4	NP_006816	0	22	0,00E+00	3,82E+05
CNOT1;CDC39	NP_057368	0	17	0,00E+00	4,08E+04
CPSF1;CPSF160	NP_037423	0	20	0,00E+00	1,36E+05
DAP3;MRPS29	NP_004623	0	13	0,00E+00	1,90E+04
DDX1	NP_004930	0	20	0,00E+00	2,33E+05
DDX17	NP_006377	2	16	0,00E+00	1,29E+05
DDX18	NP_006764	0	10	0,00E+00	9,89E+04
DDX21	NP_004719	1	26	0,00E+00	5,93E+05
DDX28;MDDX28	NP_060850	0	16	0,00E+00	5,22E+04
DDX47	NP_057439	0	9	0,00E+00	2,96E+04
DDX50	NP_076950	0	21	0,00E+00	1,15E+05
DDX6;HLR2;RCK	NP_004388	0	21	0,00E+00	3,22E+05
DDX60L	NP_001012985	1	9	0,00E+00	1,71E+04
DHX29;DDX29	NP_061903	0	30	0,00E+00	2,46E+05
DHX30;DDX30	NP_619520	0	62	0,00E+00	2,53E+06
DHX36;DDX36	NP_065916	1	16	0,00E+00	7,26E+04
DHX57	NP_945314	0	19	0,00E+00	7,43E+04
EDC4;HEDLS	NP_055144	0	11	0,00E+00	2,02E+05
EIF2C2;AGO2	NP_036286	1	18	0,00E+00	1,22E+05
EIF3C;EIF3S8;EIF3CL	NP_001032897	0	19	0,00E+00	3,18E+05

Anhang

EIF3H;EIF3S3	NP_003747	1	9	0,00E+00	1,05E+04
EIF3M;HFLB5	NP_006351	0	11	0,00E+00	2,09E+04
EIF4G1;EIF4F	NP_937887	0	46	0,00E+00	1,09E+06
EIF5B;IF2	NP_056988	0	28	0,00E+00	3,85E+05
ELAVL2;HUB	NP_004423	0	12	0,00E+00	2,74E+04
ERLIN1	NP_001094096	0	10	0,00E+00	2,46E+04
FAM120A	NP_055427	1	36	0,00E+00	1,76E+06
FARSB;FARSLB	NP_005678	0	10	0,00E+00	9,05E+04
FASTKD2	NP_001129665	0	13	0,00E+00	1,50E+05
FLNC;ABPL	NP_001449	0	14	0,00E+00	1,82E+05
FMR1	NP_002015	0	10	0,00E+00	7,54E+04
FUBP3;FBP3	NP_003925	0	21	0,00E+00	6,93E+05
FXR1	NP_005078	1	26	0,00E+00	1,96E+06
FXR2;FMR1L2	NP_004851	1	12	0,00E+00	1,70E+05
G3BP1;G3BP	NP_005745	0	10	0,00E+00	2,67E+05
G3BP2	NP_036429	0	13	0,00E+00	1,39E+05
GEMIN4	NP_056536	0	25	0,00E+00	1,79E+05
HDLBP;HBP	NP_005327	0	39	0,00E+00	3,41E+05
HELZ;DRHC	NP_055692	0	10	0,00E+00	3,79E+04
HNRNPA0;HNRPA0	NP_006796	0	9	0,00E+00	4,37E+04
HNRNPH2;FTP3	NP_001027565	5	15	0,00E+00	2,75E+04
HNRNPH3;HNRPH3	NP_036339	0	12	0,00E+00	1,59E+04
HNRNPUL1;E1BAP5	NP_008971	1	18	0,00E+00	3,33E+05
HNRNPUL2;HNRPUL2	NP_001073027	0	25	0,00E+00	4,94E+05
HNRPDL;JKTBP	NP_112740	1	12	0,00E+00	6,98E+04
KIAA1967;DBC1	NP_066997	0	21	0,00E+00	1,37E+05
KIF1B	NP_904325	0	12	0,00E+00	9,60E+04
LARP1;LARP	NP_291029	1	32	0,00E+00	9,23E+05
LSM14B;FAM61B	NP_653304	0	9	0,00E+00	6,29E+04
MAGED1;NRAGE	NP_001005333	0	9	0,00E+00	4,78E+04
MTERFD1	NP_057026	0	11	0,00E+00	2,08E+04
MYO1C	NP_001074248	0	13	0,00E+00	5,29E+04
NAT10;ALP	NP_078938	0	13	0,00E+00	4,03E+04
NOVA2;ANOVA	NP_002507	0	10	0,00E+00	1,53E+05
NPM1;NPM	NP_002511	1	9	0,00E+00	2,08E+04
ORF1		0	10	0,00E+00	1,31E+04
PA2G4;EBP1	NP_006182	0	17	0,00E+00	1,83E+05
PARP1;ADPRT	NP_001609	1	10	0,00E+00	3,85E+04
POLRMT	NP_005026	0	15	0,00E+00	1,04E+05
PRKDC;HYRC;HYRC1	NP_008835	0	152	0,00E+00	1,78E+07
PRKRA;PACT;RAX	NP_003681	0	12	0,00E+00	2,37E+04
PTCD1	NP_056360	0	17	0,00E+00	1,61E+05
PUM1	NP_001018494	0	11	0,00E+00	1,19E+05
PUM2	NP_056132	0	9	0,00E+00	5,45E+04
PURA;PUR1	NP_005850	0	11	0,00E+00	6,52E+04
PURB	NP_150093	0	13	0,00E+00	4,58E+04
RPN1	NP_002941	0	9	0,00E+00	6,19E+04
RRBP1	NP_001036041	0	21	0,00E+00	1,85E+05
RSL1D1;CATX11	NP_056474	0	8	0,00E+00	1,41E+05
SAFB;HAP;HET	NP_002958	0	12	0,00E+00	6,00E+04
SERBP1;PAIRBP1	NP_001018077	0	22	0,00E+00	4,56E+05
SFRS1;ASF;SF2	NP_008855	0	11	0,00E+00	1,52E+04
SFRS14	NP_001017392	1	9	0,00E+00	4,80E+04
SPATS2L	NP_001093894	0	11	0,00E+00	6,46E+04
SRPK1	NP_003128	0	11	0,00E+00	8,68E+04
SRRM2	NP_057417	0	9	0,00E+00	9,40E+04
TARDBP;TDP43	NP_031401	1	10	0,00E+00	4,45E+04
TOP1	NP_003277	1	9	0,00E+00	6,10E+04
TOP2A	NP_001058	0	64	0,00E+00	1,33E+06
TOP2B;topIib	NP_001059	0	31	0,00E+00	8,02E+04
TUBA3C;TUBA2	NP_005992	5	16	0,00E+00	4,65E+04

Anhang

U2AF2;U2AF65	NP_009210	1	9	0,00E+00	5,72E+04
XRCC5;G22P2	NP_066964	0	23	0,00E+00	7,22E+05
ZCCHC3	NP_149080	0	13	0,00E+00	2,05E+04
ZFR	NP_057191	0	16	0,00E+00	1,63E+05
ZNF326	NP_892021	0	13	0,00E+00	2,28E+05

Tab. 3: Spezifisch angereicherte ribosomale Proteine der Flag-ZBP1-IP aus HEK293 Zellen und der GFP-ZBP1-IP aus U2OS Zellen. Für jedes Protein wurden der Name des Gens, die Referenzsequenz die Zahl identifizierter Peptide und die Peak-Intensität angegeben (Bedingungen: identifizierte Peptide IP > K; Peak-Intensität IP > K; Peptide in IP ≥ 3; Intensität in IP > 1E+04). Als Kontrolle dienten jeweils naive HEK293 und U2OS Zellen. Proteine, die bereits in MS-Analysen von Jonson et al. identifiziert wurden, sind grau markiert (Jonson et al., 2007).

Name des Gens	Ref. Sequenz	HEK293				U2OS			
		Peptide		Intensität		Peptide		Intensität	
		K	IP	K	IP	K	IP	K	IP
RPL10	NP_542784					1	9	0,0E+00	4,44E+04
RPL10A	NP_009035	0	6	0,0E+00	4,6E+05				
RPL13	NP_000968	0	4	0,0E+00	1,5E+05	0	7	0,0E+00	8,80E+04
RPL13A	NP_036555					0	14	0,0E+00	3,40E+04
RPL14	NP_001030168					0	6	0,0E+00	4,48E+04
RPL15	NP_002939	1	5	0,0E+00	1,1E+05				
RPL18	NP_000970					1	7	0,0E+00	1,82E+05
RPL18A	NP_000971					0	8	0,0E+00	5,54E+04
RPLP21	NP_000973					0	7	0,0E+00	1,78E+04
RPL23	NP_000969					0	4	0,0E+00	3,40E+04
RPL23A	NP_000975					1	8	0,0E+00	3,57E+04
RPL24	NP_000977					0	6	0,0E+00	4,57E+04
RPL27	NP_000979					1	5	0,0E+00	1,66E+04
RPL27A	NP_000981					1	5	0,0E+00	6,35E+04
RPL30	NP_000980					0	6	0,0E+00	5,48E+04
RPL32	NP_001083496					0	5	0,0E+00	2,76E+04
RPL3	NP_000958	0	5	0,0E+00	8,3E+05	0	20	0,0E+00	6,05E+05
RPL36	NP_056229					1	6	0,0E+00	4,08E+04
RPL4	NP_000959	0	8	0,0E+00	1,8E+06				
RPL5	NP_000960					0	16	0,0E+00	1,04E+05
RPL6	NP_000961	0	3	0,0E+00	1,3E+05	1	16	0,0E+00	5,05E+05
RPL7	NP_000962					1	16	0,0E+00	1,87E+05
RPL7A	NP_000963	0	5	0,0E+00	2,8E+05	0	16	0,0E+00	1,42E+05
RPL8	NP_000964	0	4	0,0E+00	5,0E+04	1	11	0,0E+00	9,22E+04
RPL9	NP_000652	0	4	0,0E+00	9,1E+04				
RPLP2	NP_000995					0	7	0,0E+00	3,08E+04
RPS10	NP_001005					1	5	0,0E+00	8,69E+04
RPS11	NP_001006					1	11	0,0E+00	6,05E+04
RPS12	NP_001007					2	8	0,0E+00	6,49E+04
RPS17	NP_001012					2	9	0,0E+00	7,97E+04
RPS2;RPS4	NP_002943					1	14	0,0E+00	2,01E+05
RPS23	NP_001016					0	4	0,0E+00	5,61E+04
RPS24	NP_001135757					0	5	0,0E+00	5,35E+04
RPS5	NP_001000					1	8	0,0E+00	1,16E+05
RPS6	NP_001001	0	3	0,0E+00	4,5E+04				
RPS8	NP_001003	0	4	0,0E+00	7,1E+04	1	10	0,0E+00	8,45E+04

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, welcher mir die Möglichkeit gab diese Doktorarbeit an seinem Institut anzufertigen. Ich danke ihm für die Bereitstellung optimaler Arbeitsbedingungen und die ständige Diskussionsbereitschaft. Darüber hinaus ermöglichte er mir die Teilnahme am „Integrated Research Training – Protein Science“ des SFB 610 sowie an anregenden Konferenzen.

Im Voraus möchte ich mich auch ganz herzlich bei den beiden Gutachtern Prof. Dr. Sven-Erik Behrens und Prof. Dr. Dierk Niessing bedanken, welche die Aufgabe übernommen haben meine Doktorarbeit zu bewerten.

Meinen Dank möchte ich, für die gute Zusammenarbeit und das sehr angenehme Arbeitsklima, der gesamten AG Hüttelmaier aussprechen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Marcel Köhn für seine guten Ratschläge, die anregenden Diskussionen sowie das Korrekturlesen bedanken.

Bei Markus Glaß bedanke ich mich für die Unterstützung bei informatischen Belangen.

Britta, Markus, Hendrik, Marcel, Marlen und Anne danke ich, dass sie mir jederzeit zur Seite standen und sich um mein soziales Wohl sorgten.

Bedanken möchte ich mich auch bei Hendrik Täuber, welcher mir in der Endphase dieser Arbeit immer wieder Informationen per E-Mail zukommen ließ.

Insbesondere möchte ich meiner gesamten Familie danken - meinen Eltern und meiner Schwester für die jahrelange, uneingeschränkte Unterstützung.

Vor allem meinem Lebensgefährten Patrick danke ich für seine Hilfe und Geduld während der Promotionszeit.

Vielen Dank!

Lebenslauf

Name Kristin Wächter
Geburtsdatum/ -ort 09.04.1983, Lutherstadt Eisleben
Nationalität deutsch
Familienstand ledig
1 Kind, geb. im Dezember 2013

03/2009 - 05/2015 **Doktorandin, SFB-Studentin**
in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier, Martin-Luther-Universität Halle (Saale), Institut für Molekulare Medizin, Abteilung für Molekulare Zellbiologie

01/2014 - 01/2015 **Erziehungsjahr**

06/2008 - 02/2009 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin**
in der unabhängigen Nachwuchsgruppe von Prof. Dr. Marcus Fändrich, Abteilung für Proteinfaltung und Aggregation der Max-Planck Forschungsstelle für Enzymologie der Proteinfaltung, Halle (Saale)

02/2008 - 06/2008 **Hilfswissenschaftlerin**
in der unabhängigen Nachwuchsgruppe von Prof. Dr. Marcel Quint, Abteilung für Auxin-Signaltransduktion des Leibniz-Institutes für Pflanzenbiochemie

02/2007 - 12/2007 **Abschluss Diplom-Biologin**
Diplomarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der AG Entwicklungsgenetik von Prof. Dr. Gunter Reuter, Titel: „Die funktionelle Analyse der WHSC1 Histonmethyltransferase von *Drosophila melanogaster*“

12/2005 - 09/2006 **Hilfswissenschaftlerin**
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der AG Entwicklungsgenetik von Prof. Dr. Gunter Reuter

10/2002 - 12/2007 **Studiengang Biologie**
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

08/1995 - 06/2002 **Abschluss Allgemeine Hochschulreife**
am Gymnasium an der Bergmannsallee Lutherstadt Eisleben

Halle (Saale), Januar 2016

Publikationen

Wächter K, Köhn M, Stöhr N, Hüttelmaier S. Subcellular localization and RNP formation of IGF2BPs (IGF2 mRNA binding proteins) is modulated by distinct RNA-binding domains. *Biol Chem.* 2013 Aug; 394(8):1077-90. doi: 10.1515/hsz-2013-0111. Epub 2013 May 1. doi: 10.1515/hsz-2013-0111. PubMed PMID: 23640942.

Bell JL, **Wächter K**, Mühleck B, Pazaitis N, Köhn M, Lederer M, Hüttelmaier S. Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding proteins (IGF2BPs): post-transcriptional drivers of cancer progression? *Cell Mol Life Sci.* 2013 Aug; 70(15): 2657-75. doi: 10.1007/s00018-012-1186-z. Epub 2012 Oct 16. Review. PubMed PMID: 23069990; PubMed Central PMCID: PMC3708292.

Glaß M, Möller B, Zirkel A, **Wächter K**, Hüttelmaier S, Posch S. Cell migration analysis: Segmenting scratch assay images with level sets and support vector machines. *Pattern Recognition*, Volume 45, Issue 9, September 2012, Pages 3154-3165, ISSN 0031-3203, 10.1016/j.patcog.2012.03.00.

Glaß M, Möller B, Zirkel A, **Wächter K**, Hüttelmaier S, Posch S. Scratch assay analysis with topology-preserving level sets and texture measures. *Proc. of 5th Iberian Conference on Pattern Recognition and Image Analysis (IbPRIA '11)*, pages 100-108, Gran Canaria, Spain, 2011

Köhn M, Lederer M, **Wächter K**, Hüttelmaier S. Near-infrared (NIR) dye-labeled RNAs identify binding of ZBP1 to the noncoding Y3-RNA. *RNA.* 2010 Jul;16(7):1420-8. Epub 2010 May 21. PubMed PMID: 20494969; PubMed Central PMCID: PMC2885690.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Die Stellen, die anderen Werken wörtlich oder sinngemäß entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht. Ich versichere weiterhin, dass ich die Arbeit in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt habe.