

Sonja Schreiber  
Dr. med.

## **Untersuchung regulatorischer RNA-Strukturen am Beispiel des Rev-Reaktionselementes und der Eisen-Reaktionselemente**

Geboren am 02. 12 1973 in Mannheim  
Reifeprüfung am 17. 05. 1993 in Hemsbach  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1993/94 – SS 2000  
Physikum am 29. 08. 1995 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Mannheim  
Praktisches Jahr in Mannheim  
Staatsexamen am 24. 05. 2000 an der Universität Heidelberg - Mannheim

Promotionsfach: Biochemie  
Doktorvater: PD Dr. med. Thomas Dandekar

Gegenstand dieser Arbeit ist die Charakterisierung neuer RNA-Motive. Der erste Teil beschäftigt sich mit der Suche nach den ersten prokaryontischen Eisen-Reaktionselementen (IRE-Motiven), wobei auf Erfahrungen mit bekannten eukaryontischen Motiven zurückgegriffen werden konnte. In einem zweiten Teil wurde ein zum Rev-Bindeelement homologes humanes Motiv experimentell überprüft.

Im Rahmen der Arbeit wurden zunächst die Ergebnisse einer im Vorfeld durchgeführten Datenbanksuche analysiert und die besten Motive zur weiteren Überprüfung ausgewählt. Der Hauptteil besteht in der experimentellen Überprüfung dieser ausgewählten Motive.

Die im ersten Teil betrachteten Eisen-Reaktionselemente (IREs) sind als regulatorische RNA-Motive an der Aufrechterhaltung der Eisenhomöostase beteiligt. Sie werden durch Bindung eines sog. eisenregulativen Proteins (IRP) aktiviert und wirken durch Translationsregulation. Diese Motive sind bei Eukaryonten bereits gut charakterisiert. Durch datenbankgestützte Motivsuche wurden entsprechende Motive auch bei *E. coli* gefunden. Die drei besten Motive wurden ausgewählt und in Bandshift-Versuchen experimentell auf Bindung an *E. coli* Proteine und menschliches IRP untersucht.

Die drei untersuchten Motive liegen in der mRNA der Gene der Fumaratreduktase (*frdB*), der Glutamyl-tRNA Reduktase (*hemA*) sowie des periplasmatischen Bindeproteins des Ferrierobaktin-Rezeptorkomplexes (*fepB*). Während das IRE aus der *hemA* mRNA nur eine geringe Affinität zum verwendeten *E. coli* Lysat sowie zum IRP aufwies, konnte für die anderen beiden Motive eine Bindung nachgewiesen werden. Beide Motive binden an ein im *E. coli* Lysat vorhandenes Protein sowie an das menschliche IRP-1. Es konnte gezeigt werden, daß diese Bindung in Abhängigkeit vom Eisenspiegel erfolgt und durch spezifische Kompetitoren inhibiert werden kann. Umgekehrt waren die Motive in der Lage, mit einem IRE der humanen Ferritin mRNA um die Bindung an menschliches IRE zu konkurrieren.

Durch die Existenz der Motive in der *frdB* und *fepB* mRNA ergeben sich interessante Regulationsmöglichkeiten für die betroffenen Gene: Die Fumaratreduktase spielt eine Schlüsselrolle im anaeroben Energiestoffwechsel vieler Bakterien und ist gleichzeitig eine der wichtigsten Superoxidquellen der Bakterienzellen. Da IRE-Motive auch durch oxidativen Streß aktiviert werden, könnte ein in der *frdB* mRNA gelegenes IRE-Motiv die Synthese des Enzyms stoppen, sobald das Bakterium in ein aerobes Medium gerät und so die Intoxikation mit Superoxidradikalen verhindern. Eine Blockade des IREs könnte diesen unter Umständen sehr wichtigen Adaptationsmechanismus an veränderte Umweltbedingungen stören.

Der Enterobaktin-Rezeptorkomplex ist für die Aufnahme des eisenbindenden Proteins Enterobaktin verantwortlich. Durch ein IRE in einem zentralen Bestandteil des Transporters könnte eine Feinregulation des Eisenspiegels erfolgen. Darüber hinaus existieren bei Bakterien weitere eisenbindende Proteine, die in eisenarmer Umgebung, beispielsweise im Serum eines Wirtes, bevorzugt werden. Durch ein IRE-Motiv könnte eventuell ein Umschalten auf eines dieser anderen Systeme ermöglicht werden. Somit stellt auch dieses IRE möglicherweise ein interessantes Ziel für therapeutische Ansätze dar.

Das Rev-Bindeelement (RBE), ein RNA-Motiv, ist eines der zentralen regulatorischen Elemente des HI-Virus. Es koordiniert durch Bindung des viralen Rev-Proteins den viralen Replikationszyklus. Im Gen der humanen DNA-Ligase I wurde ein RNA-Motiv gefunden, das dem RBE weitgehend gleicht. Eine Bindung des Rev-Proteins an diese Sequenz könnte die Translation des Ligase Gens behindern und aufgrund der Bedeutung der DNA-Ligase für die Immunabwehr eine weitere immunschwächende Komponente im Verlauf der HIV-Infektion darstellen. Umgekehrt ist zu befürchten, daß gegen das Rev-Protein oder das RBE gerichtete therapeutische Ansätze auch das Ligase I Gen treffen. Aus diesen Gründen wurde die Interaktion zwischen Rev und dem neuen RNA-Motiv durch Bandshift-Versuche experimentell untersucht. Es zeigte sich dabei, daß die Affinität von Rev zum Motiv der Ligase I mRNA nicht sehr groß ist, eine Interaktion jedoch nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann. Weiterhin wurde untersucht, ob in Zellkernextrakt menschlicher Zellen ein Protein nachzuweisen ist, das an das Motiv der Ligase mRNA oder an das RBE bindet. Es wurden zwei derartige Proteine gefunden. Während das erste mit geringer Affinität und Spezifität sowohl an das Motiv der Ligase, als auch an das RBE bindet, interagiert das zweite nur mit dem Motiv der Ligase mRNA. Es wäre denkbar, daß es sich beim zweiten Protein um den regulativen zellulären Faktor des Ligase-RNA Motivs handelt.

Vorläufig kann aufgrund der geringen Affinität zwischen humanem RNA-Motiv und viralem Protein davon ausgegangen werden, daß es durch eine gegen Rev oder das RBE gerichtete antivirale Therapie nicht zu einer Beeinträchtigung der Ligase I Synthese kommt. Weitergehende Untersuchungen zur endgültigen Klärung dieser Frage sowie zur vollständigen Charakterisierung des RNA-Motivs sind jedoch notwendig.