# Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von Diplom-Biologe Stefan Günther Kreft aus Böblingen

> ..... mündliche Prüfung

# Identifizierung und partielle Charakterisierung eines neuen humanen RNA-Bindeproteins, RBP138, und seiner Isoformen

#### Gutachter:

- 1. Prof. Dr. Heinz Schaller
- 2. Prof. Dr. Michael Nassal

Die vorliegende Arbeit wurde vom 15. November 1996 bis zum 30. Juni 1997 am Zentrum für Molekulare Biologie in Heidelberg (ZMBH), und vom 1. Juli 1997 bis zum 5. September 2000 am Universitätsklinikum Freiburg in der Abteilung Innere Medizin II / Molekularbiologie unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Nassal angefertigt.

## **Danksagung**

Mein großer Dank gilt Prof. Dr. Michael Nassal für die Überlassung des überaus interessanten Themas, seine engagierte Betreuung und die vielen konstruktiven Diskussionen.

Besonderer Dank gebührt Prof. Dr. Heinz Schaller für die spontane Übernahme des Erstgutachtens.

Bedanken möchte ich mich für wertvolle Ratschläge und praktische Hilfestellung bei allen derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Nassal sowohl am ZMBH Heidelberg als auch innerhalb des Universitätsklinikums Freiburg.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Jürgen Beck für die exzellente Einführung in die Arbeiten mit RNA, für viele, sehr hilfreiche Diskussionen, sowohl über RNA-Bindungsassays als auch über die Zukunft (der Biologie) und, für seine große Hilfsbereitschaft im Labor.

Dr. Peter Kratz möchte ich an dieser Stelle ebenfalls für unzählige Tipps (und TIBS) danken. Dr. Ulla Schultz sei für ihre Hilfe bei Northern-Hybridisierungen gedankt. Bei Gertrud Beterams, Michael Radermacher, Dr. Susanne Schaaf, Dr. Shaotang Ren und allen übrigen B10- und B11-lern möchte ich mich ebenso für die angenehme Arbeitsatmosphäre bedanken, wie auch bei allen Kollegen aus den B-Labors.

Sabine Wellnitz und Dr. Stephan Urban sei für die Einführung in die Herstellung rekombinanter Baculoviren gedankt, Dr. Darius Moradpour für die Einführung in die Immunfluoreszenz-Mikroskopie.

Zum Schluss möchte ich mich auch noch bei allen Mitarbeitern des Boehringer Ingelheim Fonds bedanken, die sich bei der Betreuung ihrer Stipendiaten außerordentlich viel Mühe gegeben haben.



# Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitun	ıg	4
	1.1. Das	s Hepatitis-B-Virus (HBV)	4
	1.1.1.	Das Hepatitis-B-Virus und seine medizinische Bedeutung	
	1.1.2.	Morphologie des Hepatitis-B-Virus	
	1.1.3.	Genomorganisation	
	1.1.4.	Der hepadnavirale Infektionszyklus im Überblick	7
	1.1.5.	Der Lebenszyklus des RNA-Prägenoms	8
	1.1.6.	Interaktion des RNA-Prägenoms mit zellulären Proteinen	
	1.2. Isol	lierung der NIII-cDNA — ein Rückblick	
	1.3. Ziel	lsetzung der Arbeit	13
2.	_	sse	
	2.1. Seq	uenzierung und Komplettierung der NIII-cDNA	14
	2.1.1.	Sequenzierung	14
	2.1.2.	Identifizierung unterschiedlicher 3'-Enden	14
	2.2. RB	P138 und seine Isoformen	18
	2.3. Kar	tierung des neuen RNA-Bindungsmotivs innerhalb von RBP138	19
	2.3.1.	North-Western-Blots	19
	2.3.2.	RNA-Bindungsexperimente in Lösung	
	2.4. Unt	tersuchungen zur Spezifität der RNA-Bindung durch RBP138	25
	2.4.1.	NW-Blot-Bindungsstudien mit unterschiedlich strukturierten RNAs	26
	2.4.2.	Bindungsstudien in Lösung	28
	2.4.2.	1. Bindungsstudien mit unterschiedlich strukturierten RNAs	28
	2.4.2.2	2. Kompetition der RNA-Bindung von RBP138 mit homo-	
		polymeren RNAs	29
	2.4.2.	3. Direkter Vergleich der Bindung zweier verschiedener RNA-Sonden	31
	2.5. Nor	rthern-Blot-Analyse zur Untersuchung des Expressionsmusters	
	von	RBP138 und RBP35	33
	2.6. Nac	chweis von endogenem RBP138 in Huh7 Zellen	35
	2.7. Par	tielle genomische Sequenz des rbp138 Gens	38
	2.8. Unt	tersuchungen zur subzellulären Lokalisation von RBP138 und RBP35	44
	2.8.1.	Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit RBP-eGFP-Fusionsproteinen	44
	2.8.2.	Nur ein kleiner Teil des RBP1128AS-eGFP-Fusionsproteins	
		ist löslich in der cytoplasmatischen Fraktion	47
	2.8.3.	Untersuchung der Assoziation der RBP-eGFP Proteine	
		mit Actin-Filamenten	
	2.8.4.	Untersuchung auf mögliche Assoziation von RBP138 mit Membranen	51
	2.9. RB	P138 homologe Sequenzen in der SWISS-PROT Datenbank	53
		st die K-reiche Region von SBP2 beteiligt an der spezifischen	
	S	SECIS-RNA-Bindung?	55

3.	Disk	cussion	61
	3.1.	Identifizierung der RBP138 und RBP35 ORFs und der partiellen	
		genomischen Sequenz des rbp138 Gens	61
	3.2.	Identifizierung der K-reichen Region als neues RNA-Bindungsmotiv	64
	3.3.	Geringe Spezifität der RNA-Bindung durch RBP138 und RBP510-878 ?	66
	3.4.	Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisation von RBP138 und RBP35	
	3.5.	Domänen von RBP138 und RBP35	
	3.6.	Aktuelle Arbeitshypothese zur Funktion von RBP138 und RBP35 und	
		mögliche Vorgehensweisen zur Aufklärung der Funktion der RBP Proteine	78
4.	Mate	erial	84
5.	Met	hoden	92
٦.	5.1.	Plasmid-DNA Präparationen aus <i>E. coli</i>	
	5.2.	RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen	
	5.3.	Polymerase-Kettenreaktion/PCR (polymerase chain reaction)	
		1. Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)	
		2. Speziellere Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion	
		3.2.1. PCR-Screening von Bakterienkolonien	
		3.2.2. Mutagenese mittels Megaprimer-PCR	
	5.4.	Herstellung unmarkierter und markierter Nukleinsäuren	
	5.4.		
	5.4.2		
	5.4.3		
	5.4.4		
		4.4.1. Detektion und Quantifizierung Digoxygenin-markierter RNA	
		über Chemilumineszenz	95
	5.5.	Sequenzierungen	
	5.6.	Northern-Blotting	
	5.7.	Expression und Aufreinigung von Proteinen in <i>E. coli</i>	
	5.7.		
		in <i>E.coli</i>	96
	5.7.2		
		7.2.1. Aufreinigung HIS- <i>getaggter</i> Proteine über IMAC unter	
		nativen Bedingungen	98
	5.	7.2.2. Aufreinigung HIS- <i>getaggter</i> Proteine über IMAC unter	
		denaturierenden Bedingungen	98
	5.7.3		
	5.8.	Gekoppelte <i>in vitro</i> Transkription und Translation	
	5.9.	RNA-Protein-Bindungsstudien	
	5.9.	_	
	5.9.2		
	5.9.3		
	5.10.	Zellkultur eukaryontischer Zellen und deren Transfektion	
	5.11.	Herstellung rekombinanter Baculoviren	

#### Inhaltsverzeichnis 3

	5.12.	Proteinextrakte eukaryontischer Zellen	102
	5.12	•	
	5.12	2.2. Cytoplasmatische Zellextrakte	103
	5	.12.2.1. Cytoplasmatischer Zellextrakt nach NP40-Lyse	
	5	.12.2.2. Cytoplasmatische Sf9-Insektenzellextrakte nach Lyse	
		mit Octylglucosid	103
	5.12		
	5.13.	Immunpräzipitationen	
	5.14.	Western-Blot	104
	5.15.	Immunfluoreszenz- und konfokale Laserscanning-Mikroskopie	104
	5.16.	Screening-Service des RZPD	
_	A 1		106
6.		ang	
	6.1.	Abkürzungen	
	6.2.	Prokaryontische Expressionsplasmide.	
	6.3.	Plasmide für die <i>in vitro</i> Transkription	
	6.4.	Eukaryontische Expressionsplasmide	11/
	6.5.	Konstrukt zur Transposition in das Baculovirusgenom in	110
		E. coli DH10BAC Zellen	119
7.	Lite	ratur	121
8.	Zus	ammenfassung	130

# 1. Einleitung

# 1.1. Das Hepatitis-B-Virus (HBV)

# 1.1.1. Das Hepatitis-B-Virus und seine medizinische Bedeutung

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist der Prototyp der Hepadnaviridae (hepatotrope DNA-Viren), einer Familie kleiner umhüllter DNA-Viren, die über einen reversen Transkriptionsschritt replizieren (Übersicht: Nassal, 1999 und 2000; Seeger & Mason, 2000). Weitere Merkmale der Hepadnaviren sind eine enge Wirtsspezifität und ein ausgeprägter Lebertropismus. So sind Mensch und Menschenaffen die einzigen Wirte des HBV. Die Replikation der übrigen bekannten Hepadnaviren, darunter das Hepatitis-B-Virus des Waldmurmeltieres (woodchuck; WHV; Summers et al., 1978), des Wollaffen (woolly monkey; WMHBV; Lanford et al., 1998), des Erdhörnchens (ground squirrel; GSHV; Marion et al., 1980), der Peking Ente (duck; DHBV; Mason et al., 1980) und des Graureihers (heron; HHBV, Sprengel et al., 1988), ist ebenfalls auf die natürlichen Wirte begrenzt. Aufgrund einer hohen Sequenzhomologie werden die Säugerhepadnaviren in der Gattung der Orthohepadnaviren zusammengefasst, während die Vogelhepadnaviren mit ähnlichem Genomaufbau aber geringer Sequenzhomologie die Gattung der Avihepadnaviren bilden. Gemeinsamkeiten mit den Retroviren, wie z.B. die über ein RNA-Intermediat verlaufende Replikation, führten zur Einordnung der Hepadnaviren in die Gruppe der Pararetroviren (Rothnie et al., 1994).

Als Erreger der B-Typ-Hepatitis stellt das HBV einen der am meisten verbreiteten Humanpathogene dar (Lok, 1994). Weltweit gibt es geschätzte 350 Mio. chronische Virusträger, wobei das Virus besonders in Ländern der dritten Welt endemisch ist. In etwa 90% der Fälle verläuft eine HBV-Infektion transient, während sie in 5-10% einen chronischen Verlauf annimmt. Diese führt bei rund 25% der Infizierten in der Folgezeit zur Entwicklung eines primären Leberzellkarzinoms (Beasley et al., 1988). In sehr wenigen Fällen (< 1%) kommt es nach einer HBV-Infektion zu einer fulminanten Hepatitis mit sehr hoher Mortalität. Der Übertragungsweg des HBV ist in hochendemischen Gebieten zumeist perinatal von der Mutter auf das Kind, während das Virus in den westlichen Ländern häufig horizontal, meist über kontaminierte Nadeln oder Sexualkontakte weitergegeben wird. Seit etwa 20 Jahren gibt es eine wirkungsvolle, aber aufgrund ihrer hohen Kosten nur bedingt eingesetzte Impfung. Für die Behandlung der chronischen Infektion steht momentan nur die begrenzt wirksame Therapie mit α-Interferon zur Verfügung, die in weniger als 50% zu einer Eliminierung des Virus führt (Hoofnagle & DiBisceglie, 1997). Seit kurzem werden auch Nukleosidanaloga, wie z.B. Lamivudin, zur Behandlung eingesetzt. Ihre Wirksamkeit ähnelt der von Interferon, allerdings scheint es relativ schnell zur Ausbildung resistenter Virusstämme zu kommen.

#### 1.1.2. Morphologie des Hepatitis-B-Virus

Im Serum HBV-infizierter Patienten finden sich die infektiösen, umhüllten *Dane*-Partikel (Dane et al., 1970) mit einem Duchmesser von 42 nm sowie die 22 nm großen leeren Virushüllen, die auch als subvirale Partikel (S-Partikel) bezeichnet werden. Die Konzentration an *Dane*-Partikeln im Blut kann bis zu  $10^{11}$  Partikel/ml betragen. Die S-Partikel liegen in einem etwa 100-1000fachen Überschuss gegenüber den *Dane*-Partikeln vor. Ein infektiöses Virion besteht aus einer Lipidhülle, die ein das DNA-Genom und die Reverse Transkriptase enthaltendes Nukleokapsid umschließt (Abb. 1.1.2.1.A).

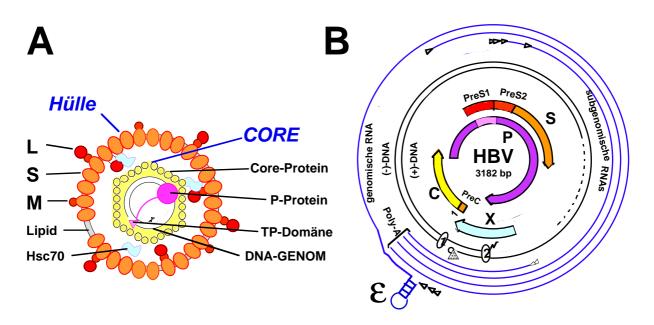


Abb. 1.1.2.1. (A) Schematischer Querschnitt durch ein HBV-Virion. (B) Die Genomorganisation des HBV. Die äußeren Linien repräsentieren die RNA-Transkripte, wobei die äußerste Linie dem RNA-Prägenom entspricht. Die innere, teilweise doppelte, Linie stellt das partiell doppelsträngige DNA-Genom dar. Die Pfeile im Zentrum symbolisieren die offenen Leseraster. Weitere Erläuterungen siehe Text. (Darstellung freundlicherweise von Dr. M. Nassal zur Verfügung gestellt.)

Die Lipidhülle stammt von der Wirtszelle und enthält u.a. die drei Virus-Oberflächenantigene, das große Hüllprotein L (*Large*; 39 kDa), das mittlere Hüllprotein M (*Middle*; 33 kDa) und das kleine Hüllprotein S (*Small*; 24 kDa). Die viralen Hüllproteine machen etwa 30% der in der Lipidhülle vorkommenden Proteine aus (Heermann et al., 1987). Alle drei Hüllproteine sind von dem PreS/S-Leseraster codiert (vgl. 1.1.3. Genomorganisation). Das M-Protein ist daher ein S-Protein mit einer zusätzlichen PreS2-Domäne am N-Terminus, während das L-Protein ein M-Protein mit zusätzlicher PreS1-Domäne ist. Eine Besonderheit des L-Proteins stellt dessen duale Topologie dar (Prange et al., 1995; Ostapchuk et al., 1994 und Bruss et al. 1994). Bei einem Teil der L-Proteine ist die PreS1-Domäne nach außen gerichtet und kann somit mit dem noch unbekannten Virus-Rezeptor auf der Wirtszellöberfläche interagieren, beim übrigen Teil

der L-Proteine ist die PreS1-Domäne nach innen gerichtet, was eine Interaktion mit dem Nukleokapsid erlaubt, die Voraussetzung für die Umhüllung des Nukleokapsids ist (Bruss et al., 1996). Möglicherweise kommt dabei dem zellulären Hitze-Schock-Protein Hsc70, das in umhüllten Viren zu finden ist und spezifisch mit der PreS1-Domäne interagiert (Loffler-Mary et al., 1997), eine Rolle zu. Das virale Kapsid ist aus 180 bzw. 240 Kopien des Core-Proteins (183 AS) aufgebaut (Crowther et al., 1994; Kenney et al., 1995). Das Innere des Kapsids enthält das partiell doppelsträngige DNA-Genom und die mit ihm über einen Tyrosinrest kovalent verknüpfte virale Reverse Transkriptase (P-Protein).

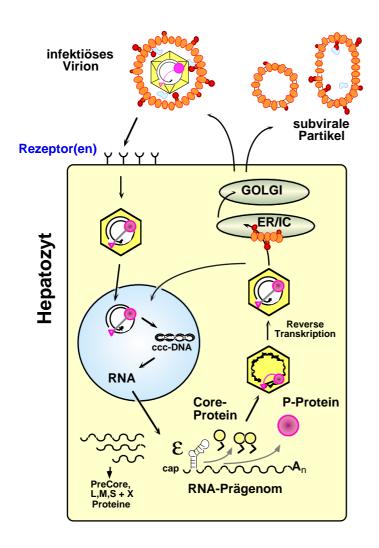
# 1.1.3. Genomorganisation

Mit einer Größe von nur knapp 3,2 kB gehört das HBV-Genom zu den kleinsten bekannten Animalviren (Abb. 1.1.2.1.B). Die sieben viralen Proteine werden von vier teilweise überlappenden Hauptleserastern kodiert. Da jedes Nukleotid innerhalb des Genoms kodierende Funktion hat, liegen auch alle regulatorischen Abschnitte in kodierenden Bereichen. Die vier Hauptleseraster (open reading frames; ORFs) sind in der Reihenfolge PreC/C, P, PreS1/PreS2/S und X angeordnet. Vom PreC/C-Leseraster wird das PreCore-Protein, welches nach Prozessierung sekretiert und als Hepatitis-B-Virus e-Antigen (HBeAg) bezeichnet wird, und das Kapsid-bildende Core-Protein codiert. Die Translation des Core-Proteins erfolgt von einem 3,5 kB langen Transkript, das später auch in Kapside verpackt wird und als Matrize für die Reverse Transkription dient, und daher auch als RNA-Prägenom oder prägenomische RNA (pgRNA) bezeichnet wird. Die Synthese des PreCore-Proteins erfolgt von einem etwas längeren, das Start-Codon des PreC-Leserasters enthaltende Transkript. Beinahe 80% des gesamten Genoms nimmt der ORF der Polymerase ein. Das P-Protein wird wie das Core-Protein auch durch Translation der pgRNA synthetisiert, wobei das Start-Codon des P-ORF in der kodierenden Region des Core-ORFs etwa 400 Nukleotide hinter dem Start-Codon des Core-Proteins liegt.

Die drei Oberflächenproteine L, M und S werden durch die PreS1-, PreS2- und S-Leseraster kodiert. Wie bei dem PreC/C-Leseraster werden dafür verschiedene Transkripte mit gemeinsamem 3´-Ende aber verschiedenen 5´-Enden synthetisiert. Das vierte Leseraster codiert für das X-Protein, ein nur bei den Orthohepadnaviren auftretendes Nicht-Struktur-Protein, dessen Vorhandensein für die Etablierung einer Infektion *in vivo* notwendig ist (Chen et al., 1993; Zoulim et al., 1994). Dem X-Protein werden eine Vielzahl an Transaktivatorfunktionen zugeschrieben, die jedoch meist auf *in vitro* Experimente zurückgehen. Die tatsächliche Funktion des X-Proteins *in vivo* ist bisher jedoch noch nicht geklärt (Übersicht: Seeger & Mason, 2000). Sämtliche virale Transkripte sind am 5´-Ende "gecappt", ungespleißt und am 3´-Ende polyadenyliert.

Das Genom der Avihepadnaviren kodiert nur für zwei Hüllproteine, zudem fehlt das Leseraster für das X-Protein. Interessanterweise tritt im DHBV eine gespleißte RNA auf, die ein zweites PreS-codierendes Transkript darstellt (Obert et al., 1996). Die Existenz einer gespleißten RNA rückt die Hepadnaviren etwas näher an die Retroviren, in deren Replikationszyklus dem Spleißen eine zentrale Rolle zukommt.

# 1.1.4. Der hepadnavirale Infektionszyklus im Überblick



**Abb. 1.1.4.1.** Der hepadnavirale Replikationszyklus im Überblick. Beschreibung der einzelnen Schritte innerhalb des Replikationszyklus siehe Text. ER: Endoplasmatisches Retikulum; IC: Intermediäres Kompartiment. (Darstellung freundlicherweise von Dr. M. Nassal zur Verfügung gestellt.)

Der hepadnavirale Replikationszyklus, in Abb. 1.1.4.1. schematisch dargestellt, beginnt mit der Bindung des infektiösen Virions an die Leberzelle. Dies geschieht vermutlich über eine Interaktion der PreS1-Domäne des großen Hüllproteins L mit einem noch nicht identifizierten Rezeptor/Rezeptorkomplex auf der Wirtszelloberfläche (Bruss et al., 1991). Für DHBV wurde die

Carboxypeptidase D, auch gp180 genannt, als primärer Rezeptor identifiziert (Kuroki et al., 1995; Tong et al., 1995; Breiner et al., 1998, Urban et al., 1998). Dessen ubiquitäres Auftreten spricht allerdings für die Existenz mindestens eines zweiten, die Spezifität vermittelnden Rezeptormoleküls. Die Virus-Aufnahme erfolgt höchstwahrscheinlich durch Rezeptor-vermittelte Endozytose. Nach Fusion der Virushülle mit der Membran der Endosomen gelangt das nackte Nukleokapsid ins Cytoplasma. Durch einen noch nicht im Detail verstandenen Vorgang wird das Nukleokapsid an den Kernporenkomplex dirigiert (Kann et al., 1997 und 1999) und fällt vermutlich im nukleären "Käfig" (nuclear basket) auf der Innenseite des Kernporenkomplexes auseinander (M. Kann, pers. Mitteilung). Von dort aus wird der Komplex aus viralem DNA-Genom und kovalent gebundenem P-Protein in den Nukleus entlassen. Das partiell doppelsträngige DNA-Genom dient nach Abspaltung des P-Proteins und Überführung in ein kovalentgeschlossenes zirkuläres DNA-Molekül (covalently closed circular DNA; ccc DNA) durch zelluläre DNA-Polymerasen (Köck & Schlicht, 1993) als Matrize für die Synthese der vier Klassen genomischer und subgenomischer RNAs. Die Synthese der viralen Proteine erfolgt nach Export der Transkripte im Cytoplasma. Eine Besonderheit stellt die prägenomische RNA dar, die als Matrize für die Translation des Core-Proteins und des P-Proteins dient, und zudem auch Matrize für die Reverse Transkription ist. Nach der Translation von 200-300 Kopien des Core-Proteins führt die Translation des P-Proteins von der bi-cistronischen pgRNA zu deren Verpackung und Reversen Transkription. Dabei stellt die Bindung des P-Proteins in cis an die am 5'-Ende der RNA liegende Kopie des Verpackungssignals ε (Junker-Niepman et al., 1990) das Signal für die Einleitung des Verpackungsprozesses und der Reversen Transkription dar (Bartenschlager & Schaller, 1992). Mit der während und nach der Verpackung ablaufenden (-)und (+)-Strang DNA-Synthese findet eine Reifung der Nukleokapside statt, die von einer Veränderung des Phosphorylierungsmusters das Kapsids begleitet ist. In Abhängigkeit vom Phosphorylierungsgrad des Kapsids und der Menge an verfügbarem L-Protein in der Membran des Endoplasmatischen Retikulums (ER) oder des Intermediären Kompartiments (IC), kommt es entweder zur Knospung des Nukleokapsids in das ER/IC, wobei es seine Hülle erhält und über den sekretorischen Weg aus der Zelle exportiert wird, oder zum Transport des Nukleokapsids zurück zur Kernmembran, wo es, wie bei der ursprünglichen Infektion, sein Genom in den Kern entläßt. Im Nukleus wird das DNA-Genom in ccc-DNA überführt und als Matrize für die Synthese neuer viraler Transkripte herangezogen (Tuttleman et al., 1986; Wu et al., 1990). Dieser intrazelluläre Zyklus dient der Erhöhung der Anzahl an ccc-DNA Molekülen.

# 1.1.5. Der Lebenszyklus des RNA-Prägenoms

Durch seine Doppelfunktion als mRNA und Vorlage für die Reverse Transkription des Virusgenoms nimmt das 3,5 kB RNA Prägenom (pgRNA) eine zentrale Stellung im hepadnaviralen Replikationszyklus ein. Die pgRNA geht aus der Transkription der ccc-DNA im Zellkern durch die zelluläre RNA-Polymerase II hervor. Dort unterliegt das Prägenom wie die übrigen viralen

Transkripte auch den für zelluläre Prä-mRNAs üblichen Modifikationen wie dem Anhängen einer [7mGpppN] *Cap*-Struktur am 5′-Ende und eines Poly-A-Schwanzes am 3′-Ende der RNA. Im Gegensatz zu den meisten zellulären Prä-mRNAs wird die intronlose pgRNA jedoch nicht gespleißt. Auch die Polyadenylierung der viralen RNAs unterscheidet sich in zwei Punkten von der Polyadenylierung zellulärer Prä-mRNAs. Zum einen weicht das hepadnavirale Polyadenylierungssignal UAUAAA an der ersten Position von der Hexanukleotid-Konsensussequenz AAUAAA zellulärer Prä-mRNAs ab, zum Anderen ist für eine effiziente Polyadenylierung zusätzlich ein stromaufwärts liegender Bereich notwendig (gezeigt für GSHV; Russnak & Ganem, 1990). Die beiden Abweichungen tragen möglicherweise dazu bei, eine ungewollte vorzeitige Polyadenylierung der terminal redundanten Transkripte hinter der am 5′-Ende liegenden zweiten Kopie des Polyadenylierungssignals zu verhindern.

Nach Prozessierung erfolgt der Export der ungespleißten pgRNA in das Cytoplasma. Dieser ist jedoch verglichen mit dem Export gespleißter zellulärer mRNA Moleküle (zur Übersicht: Nakielny & Dreyfuss, 1997; Nakielny et al., 1997) bisher nur unvollständig verstanden. Gespleißte mRNAs werden von zwischen Nukleus und Cytoplasma shuttelnden hnRNP Proteinen transportiert. Die Bindung der ein Nukleäres-Export-Signal (NES) aufweisenden hnRNP-Proteine an die zu exportierende RNA findet im Zellkern vermutlich bereits während des Spleißvorgangs statt. Nach dem Spleißen dissoziiert der Spleißapparat und es erfolgt der Export der mRNA-hnRNP-Komplexe. Der Transport der RNAs beruht dabei auf dem innerhalb der hnRNP-Proteine vorkommenden NES, so dass der RNA beim Export nur eine passive Rolle zukommt (Nakielny et al., 1997). Daneben wird ein Mechanismus diskutiert, in dem Export-inhibierende hnRNPs mit Export-fördernden hnRNPs konkurrieren (Übersicht: Stutz & Rosbash, 1998). Nach diesem Modell würde die Spleiß-Maschinerie die Bindung Exportinhibierender hnRNPs verhindern und vermutlich selbst, solange sie mit der RNA assoziiert ist, inhibierende Funktion aufweisen. Mit dem Ablösen des Spleiß-Apparats nach dem Spleißen ginge der Export-inhibierende Faktor verloren und die RNA könnte ins Cytoplasma transportiert werden. Dieses Modell könnte auch den ineffizienten Export unvollständig- und ungespleißter Prä-mRNAs erklären. Natürlicherweise intronlose zelluläre und virale Transkripte haben eigene Strategien für ihren Export entwickelt. Bei dem intronlosen ß-Globin-Transkript der Maus ist ein kleiner ca. 80 Nt Bereich auf der RNA für den Export essentiell (Huang & Carmichel, 1997). In diesem Zusammenhang wird ein zellulärer Faktor postuliert, dessen Bindung einen effizenten Transport ins Cytoplasma bewirkt. Eine vergleichbare Rolle könnte dem post-transkriptionellen regulatorischen Element (post transcriptional regulatory element; PRE; Huang & Liang, 1993) der Hepadnaviren zukommen, für das ein positiver Effekt auf den Export des Transkripts des kleinen Hüllproteins S nachgewiesen ist (Huang & Liang, 1993). Das aus zwei strukturierten Subelementen aufgebaute etwa 500 Nt umfassende PRE (Donello et al., 1996) kann zudem den Export heterologer intronloser und erstaunlicherweise auch intronhaltiger Transkripte verstärken (Huang & Yen, 1995; Zufferey et al., 1999). Nachdem für in der Vergangenheit als PRE-Bindeproteine beschriebene Proteine (u.a. Huang et al., 1996) keine Beteiligung am Export der viralen Transkripte nachgewiesen wurde, sind die Exportfördernden zellulären PRE-Bindeproteine weiter unbekannt. Ein der Funktionsweise nach dem PRE der Hepadaviren sehr ähnliches Element ist das konstitutive Transport-Element (constitutive transport element; CTE) des zu den Typ-D-Retroviren gehörenden Mason-Pfizer-Affenvirus (Mason-Pfizer Monkey Virus; MPMV). Dieses Element ist ebenfalls für einen effizienten Export ungepleißter viraler Transkripte notwendig und kann auch den Export heterologer RNAs positiv beeinflussen (Bray et al., 1994; Ernst et al., 1997). Vor Kurzem wurde die zelluläre RNA Helikase A (RHA) als CTE-bindendes Protein und am Export ungepleißter MPMV-RNA beteiligter Faktor identifiziert (Tang et al., 1997). In einer neuen Arbeit wird zudem die Beteiligung der RHA innerhalb des Rev/RRE vermittelten Transports ungespleißter HIV-1 RNA diskutiert (Li et al., 1999). In beiden Fällen ist die Funktion der RHA möglicherweise die Entfernung des Spleißapparats von der RNA noch vor Beginn der Spleißreaktion, wodurch die RNA der Exportmaschinerie zugänglich gemacht werden würde (Li et al., 1999).

Ob RHA auch beim Export hepadnaviraler Transkripte eine Rolle spielt, ist bisher noch nicht bekannt. Ebensowenig ist verstanden, warum das PRE trotz des Vorkommens in allen viralen Transkripten anscheinend nur den Transport des S-Transkripts und nicht der übrigen viralen RNAs positiv beeinflußt.

Im Cytoplasma dient die pgRNA zunächst als mRNA für die Translation von 200-300 Kopien des Core-Proteins. Bisher unverstanden kommt es dann zur Translation des P-Proteins, das vermutlich co-translational in cis die am 5'-Ende gelegene Kopie des Verpackungssignals ε bindet. Diese Bindung erfolgt im Komplex mit verschiedenen zellulären Chaperonen. Für die Polymerase des Enten-Hepatitis-B-Virus wurde eine Assoziation mit den Chaperonen Hsp90 und p23 gezeigt (Hu & Seeger, 1996; Hu et al., 1997), für die HBV-Polymerase konnte eine Assoziation mit p23 nachgewiesen werden (S. Schaaf, 1999). Vermutlich erfolgt die Aktivierung der Polymerase analog zur Aktivierung des Gluccocorticoid-Rezeptors (S. Schaaf, 1999). Die Bindung des P-Proteins an die Stem-Loop-Region des strukturierten Verpackungssignals ε (gezeigt für DHBV: Wang & Seeger, 1993; für HBV: Nassal & Rieger, 1996) leitet Verpackung des Prägenoms in Nukleokapside und dessen Reverse Transkription ein. Sie ist von einer drastischen Konformationsänderung auf Ebene der RNA (gezeigt für DHBV: Beck & Nassal, 1998) und des P-Proteins (gezeigt für DHBV: Tavis & Ganem, 1996) begleitet. Der Verpackungsvorgang selbst ist nur sehr unvollständig verstanden. Es wird angenommen, dass der ε/P-Protein-Komplex als Nukleationskeim für die Anlagerung von Core-Dimeren fungiert, die schließlich zur Bildung des Kapsids führt. Die Initiation der Reversen Transkription beginnt vermutlich bereits während des Verpackungsvorgangs mit der Synthese eines 3-4 Nt langen DNA-Primers, der kovalent an einen Tyrosinrest der TP-Domäne des P-Proteins angehängt wird. Anschließend erfolgt eine Translokation des Primer/P-Protein-Komplexes zu dem am 3'-Ende gelegenen *direct repeat* DR1\*, von wo aus die (-)-Strang DNA-Synthese bis zum 5'-Ende des Prägenoms weiterläuft. Dabei wird das Prägenom bis auf ein kleines, die DR1-Region enthaltendes RNA-Fragment durch die RNase H Domäne des P-Proteins abgebaut, das nach Translokation zu DR2 auf dem 3'-Ende des (-)-Strangs als Primer für die (+)-Strang Synthese (Loeb et al., 1991) dient. Nach einem Matrizenwechsel vom 3'-Ende zum 5'-Ende des (-)-Strangs, was zur Zirkularisierung führt, geht die (+)-Strang DNA Synthese weiter.

### 1.1.6. Interaktion des RNA-Prägenoms mit zellulären Proteinen

Das RNA-Prägenom hat einen komplexen Lebenszyklus, der wie bei den übrigen viralen und zellulären Transkripten im Wesentlichen von RNA-Bindungsproteinen gesteuert wird, die direkt oder indirekt an Prozessen wie Transport, Prozessierung, Lokalisation, Stabilität und Translation beteiligt sind. Die begrenzte Anzahl viraler Proteine einerseits, und die Komplexität des pgRNA-Lebenszyklus andererseits, legen eine Beteiligung zellulärer Faktoren an vielen, wenn nicht allen diesen Prozessen nahe. Erstaunlicherweise scheinen auch von dem Lebenszyklus normaler zellulärer RNAs abweichende Prozesse bei den Hepadnaviren, wie der Export intronloser ungespleißter RNA (siehe Kap. 1.1.5.), durch zelluläre Proteine gesteuert zu sein. Die vielschichtigen Interaktionen des RNA-Prägenoms mit Faktoren der Wirtszelle spiegeln sich bereits in einigen experimentellen Befunden wider.

Eine effiziente Polyadenylierung des Prägenoms ist abhängig vom Vorhandensein stromaufwärts von der zweiten Kopie des Poly-A-Signals liegender viraler Sequenzen, die vermutlich Bindestellen für zelluläre Proteine enthalten. Diese Sequenzen fehlen bei der ersten Kopie, weshalb sie nicht als Poly-A-Signal verwendet wird. Ein ähnliches Bild ergibt sich für den PRE-vermittelten Export des ungespleißten hepadnaviralen S-Transkripts (siehe 1.1.5.). Auch für diesen Fall wird die Existenz eines exportfördernden, zellulären PRE-bindenden Proteins postuliert, das bisher jedoch noch nicht identifiziert werden konnte. Die spezifische Interaktion des zellulären La Proteins mit dem 5'-Teil des PRE (91 Nt) scheint einen wesentlichen Einfluss auf die Halbwertszeit der pgRNA zu haben (Heise et al., 1999). Im Zellkern unbehandelter Hepatozyten HBV-transgener Mäuse ist das Prägenom vorwiegend mit Full-Length La Protein (45 kDa) oder einem 39 kDa La-Fragment assoziiert. Nach Stimulierung mit den Cytokinen IFN-gamma und TNF-alpha ist die pgRNA im Zellkern der Hepatozyten dagegen mit einem 26 kDa La-Fragment assoziiert, und ist nach kurzer Zeit nicht mehr nachweisbar. In diesem Zusammenhang ist vorstellbar, dass sowohl Full-Length La als auch das 39 kDa Spaltprodukt das Prägenom stabilisieren, indem sie dessen Abbau durch eine zelluläre Nuklease (u.U. sterisch) verhindern. Das vermutlich durch eine Cytokin-induzierte Spaltung aus den beiden großen La-Polypeptiden hervorgehende 26 kDa La-Fragment könnte diese protektive Eigenschaft verloren haben. Möglicherweise besteht aber auch keine

Korrelation zwischen dem Auftreten des 26 kDa Proteins und dem Abbau des Prägenoms. Auch wenn Letzteres nicht völlig ausgeschlossen werden kann, so spricht zum jetzigen Zeitpunkt doch vieles für eine Beteiligung des La Proteins an der Regulation der Stabilität der hepadnaviralen RNA. Neben dem La Protein wurde noch ein weiteres nukleäres Protein als HBV-pgRNA-Bindeprotein beschrieben. Für das 65 kDa Protein (p65) aus HepG2-Extrakten konnten zwei Bindungsregionen auf der pgRNA kartiert werden (Perri & Ganem, 1996). Die erste Bindungsstelle liegt am 5'-Ende des Verpackungssignals ε und beinhaltet einen Teil von dessen unterem Stamm (upstream binding site; UBS). Die zweite Bindungsstelle liegt stromabwärts vom Poly-A-Signal und der Poly-A-Spaltstelle in der Poly-A-U-reichen Region (downstream binding site; DBS), die beim Polyadenylierungsprozess eine essentielle Rolle spielt. Eine vermutete Beteiligung des p65 an der Polyadenylierung der hepadnaviralen Transkripte konnte nicht nachgewiesen werden (Perri & Ganem, 1996), so dass die Funktion des Proteins wie auch seine Aminosäuresequenz unbekannt bleiben. Evidenz für die Existenz zellulärer Proteine, die an das Verpackungssignal ε binden stammt von UV-Crosslinking-Experimenten mit cytoplasmatischen HeLa-S100 Extrakten (T. Knaus, Dissertation 1994). Darin konnte ε-RNA spezifisch an drei Proteine (ca. 19kDa, 29kDa, 41kDa) gebunden werden. Ein weiterer Hinweis für die Existenz solcher ε-bindenden Proteine ist das Auftreten von ε-Mutanten im DHBV-System, die zwar eine Bindung der Polymerase an ε erlauben, aber Verpackung und Reverse Transkription inhibieren (Pollack & Ganem, 1993). Dies könnte durch zelluläre Proteine, die an  $\varepsilon$  binden und für die Verpackung notwendig sind, erklärt werden.

# 1.2. Isolierung der NIII-cDNA — ein Rückblick

Im Rahmen meiner Diplomarbeit "Untersuchungen zur Interaktion des Hepatitis B Virus RNA-Verpackungssignals mit zellulären Proteinen" (S.G. Kreft, 1996) wurden zelluläre Bindungspartner eines das Verpackungssignal ε und benachbarte Regionen (ca. 100 Nt) enthaltenden Abschnitts des HBV-RNA-Prägenoms gesucht. Dazu wurde eine Humanleber-cDNA-Expressionsbank mit einer Digoxygenin-markierten ε-haltigen RNA-Sonde nach dem North-Western-(NW-) Protokoll *gescreent*. Mit einem ähnlichen Verfahren konnte schon zuvor das zelluläre TAR-Region-bindende-Protein (*TAR Region Binding Protein*; TRBP) als HIV-1 RNA-Bindungsfaktor identifiziert werden (Gatignol et al., 1991). Aus der Humanleber-cDNA-Bank konnte so eine 2,1 kB cDNA (mit dem vorläufigen Namen NIII) isoliert werden, die für ein Protein codiert, das in Anwesenheit unspezifischer Nukleinsäurekompetitoren obige RNA-Sonde zu binden vermag. Die Ansequenzierung beider Enden der NIII-cDNA ergab keinerlei Homologien zu bekannten Proteinen. Zusätzlich zeigte das Fehlen eines Stop-Codons und eines Poly-A-Signals, dass die cDNA am 3′-Ende unvollständig war.

# 1.3. Zielsetzung der Arbeit

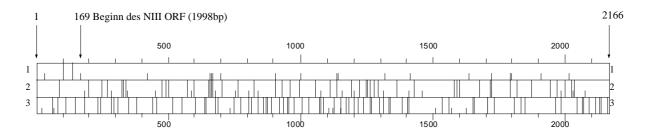
Ziel der Arbeit war die weitergehende Charakterisierung des neuen zellulären RNA-Bindeproteins, von dem die oben beschriebene NIII-cDNA offensichtlich ein Teilstück codierte. Mit der kompletten Sequenzierung der cDNA stellte sich heraus, dass sie für ein neues Protein codiert, das keines der bekannten RNA-Bindungsmotive (Burd & Dreyfuss, 1994a) enthält, und auch sonst keine offensichtlichen Homologien zu anderen Proteinen besitzt. Um in Kenntnis der Sequenz des kompletten neuen RNA-Bindeproteins zu gelangen, sollte deshalb zunächst das fehlende Ende der NIII-cDNA isoliert werden. Im weiteren Verlauf sollte die an der RNA-Bindung beteiligte Region innerhalb des Proteins identifiziert und funktionell charakterisiert werden. In diesem Zusammenhang sollte auch die Spezifität der RNA-Bindung wie das mögliche Auftreten des neuen RNA-Bindungsmotivs in anderen Proteinen untersucht werden. Da von dem Protein selbst noch gar nichts bekannt war, sollte zudem dessen Expression in unterschiedlichen Geweben, sowie die subzelluläre Lokalisation untersucht werden. Im Hinblick auf eine mögliche Rolle im HBV-Replikationszyklus war dabei die Expression in der Leber von besonderem Interesse. Mit den in der Zwischenzeit verfügbaren Sequenzen des Humangenoms sollte letztlich die genomische Struktur des Gens abgeleitet werden. Zusammengenommen sollten diese Untersuchungen Hinweise auf die Funktion(en) des neuen RNA-Bindeproteins in der Zelle, und eventuell im HBV-Replikationszyklus, geben. Eine direkte Untersuchung des Einflusses des Proteins auf die HBV-Replikation konnte in der zur Verfügung stehenden Zeit nicht angegangen werden.

# 2. Ergebnisse

# 2.1. Sequenzierung und Komplettierung der NIII-cDNA

## 2.1.1. Sequenzierung

Die zuvor nur am 3′- und 5′-Ende ansequenzierte NIII-cDNA (S.G. Kreft, Diplomarbeit 1996) wurde zu Beginn der Arbeit über *Primer Walking* mit insgesamt vier Primern vollständig sequenziert. Die cDNA ist 2166 Bp lang und enthält ein offenes Leseraster (*open reading frame*; ORF) von 1998 Bp (Abb. 2.1.1.1.). Am 5′-Ende befindet sich eine 168 Bp lange untranslatierte Region (5′-UTR), auf die ein durchgehender, bis an das 3′-Ende der cDNA reichender ORF folgt. Das Start-ATG dieses ORFs (= NIII-ORF) liegt in optimaler Kozak-Umgebung (5′-AGCATGG-; Kozak, 1986) und stellt daher mit großer Wahrscheinlichkeit eine authentische Translations-Startstelle dar. In den beiden anderen Leserastern treten keine längeren ORFs auf. Das Fehlen eines Stop-Codons im NIII-ORF sowie eines Polyadenylierungssignals innerhalb der NIII-cDNA zeigt, dass die isolierte cDNA am 3′-Ende unvollständig ist. Der in der NIII-cDNA auftretende NIII-ORF codiert für ein Protein mit 666 AS und einem theoretischen Molekulargewicht von 77 kDa.



**Abb. 2.1.1.1.** Karte der offenen Leseraster der NIII-cDNA (2166 Bp). Aus der Sequenz abgeleitete Verteilung von Start- und Stop-Codons in den 3 unterschiedlichen Leserastern. Raster 1 enthält einen langen durchgehenden offenen Leserahmen, den NIII-ORF, mit einem Start-Codon bei Position 169. Am 5'-Ende der NIII-cDNA ist eine 168 Bp lange 5'-UTR.

#### 2.1.2. Identifizierung unterschiedlicher 3´-Enden

Wie in Kap. 2.1.1. beschrieben enthielt die NIII-cDNA kein authentisches 3'-Ende. Es sollte daher der noch fehlende Abschnitt der NIII-cDNA isoliert werden. Dazu wurde zunächst in Datenbanken nach cDNA- oder *Expressed Sequence Tag* (EST-) Klonen gesucht, die mit dem 3'-Ende der NIII-cDNA überlappen und daher die potenziell noch fehlende Sequenz des NIII-ORFs hätten aufweisen können. Da keine solche Klone gefunden werden konnten, wurde versucht, die noch fehlenden Sequenzen experimentell über das *Screenen* verschiedener Human-cDNA-Banken zu isolieren. Insgesamt wurden vier Human-cDNA-Banken sowie eine Sammlung von Human- und Maus-cDNA-Klonen des IMAGE- (*integrated molecular* 

analysis of genomes and their expression) Konsortiums (Tab. 2.1.2.1.) über einen DNA/DNA-Hybridisierungsscreen durchsucht. Als NIII-spezifische Sonde diente die "NIII 3′-end" DNA, ein ca. 500 Bp großes, das 3′-Ende der NIII-cDNA (ORF Pos. 1497-1998) umfassendes Fragment. Das Screenen selbst wurde von dem vom Ressourcenzentrum/Primärdatenbank im Deutschen HumanGenomProjekt (RZPD) angebotenen Screening Service am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg) durchgeführt.

Im Rahmen des *Screenings* wurden vier positive, unabhängige cDNA-Klone identifiziert. Diese stammten aus drei unterschiedlichen cDNA-Banken (Tab. 2.1.2.1.). Die Klone H14173 und B2269 wurden aus der fötalen Humanleber-cDNA-Bank (RZPD Nr.: 512) isoliert, der dritte Klon, C1754, stammt aus der humanen Uterus-cDNA-Bank (RZPD Nr.: 586). Der vierte Klon (N0865) wurde aus der IMAGE-cDNA-Sammlung #998 (RZPD Nr.: 998 = *IMAGE cDNA clone collection* #998) isoliert. Interessanterweise geht dieser Klon auf die gleiche Humanleber-cDNA-Bank der Firma Stratagene zurück, aus der auch die NIII-cDNA isoliert worden war. In den beiden aus Pankreasgang- bzw. Milzzellen gewonnenen cDNA-Banken (RZPD Nr.:562 und 597) wurden keine positiven Klone gefunden.

**Tab. 2.1.2.1.** Liste mit der vom RZPD *Screening Service* mit einer das NIII 3'-Ende (ORF Pos. 1497-1998) enthaltende Sonde durchsuchten cDNA-Banken und Sammlungen, und der isolierten cDNA-Klone. Die Namen der aus den einzelnen cDNA-Banken isolierten Klone sind jeweils mit vollständigem Namen und Abkürzung (in Klammern) angegeben.

Ursprungsgewebe der cDNA- Bank	RZPD cDNA Bank Nr.	isolierte Klone (abgekürzter Klonname)
fötale Leber (human)	512	ICRFp512H14173Q2 (H14173)
		ICRFp512B2269Q2 (B2269)
Uterus (human)	586	DKFZp586C1754Q3 (C1754)
IMAGE-cDNA-Sammlung verschiedener	998	IMAGp998N0865Q6 (N0865)
Gewebe (human & murin)		
Pankreasgang (human)	562	keine positiven Klone isoliert
Milz (human)	597	keine positiven Klone isoliert

Die Sequenzierung der positiven Klone zeigte, dass alle vier isolierten Klone mit der Sequenz der verwendeten "NIII 3′-end"-Sonde überlappen und somit Sequenzhomologe der NIII-cDNA darstellen (Abb. 2.1.2.1.). Die Klone haben eine Größe von 2461 Bp bis 5167 Bp. Nur Klon H14173 weist alle Merkmalen eines authentischen cDNA 3′-Endes, wie dem Vorhandensein eines Stop-Codons, eines Poly-A-Signals sowie eines Poly-A-Schwanzes, auf. Alle übrigen Klone besitzen jeweils Stop-Codons, aber weder ein Poly-A-Signal noch einen Poly-A-Schwanz, und sind daher am 3′-Ende unvollständig.



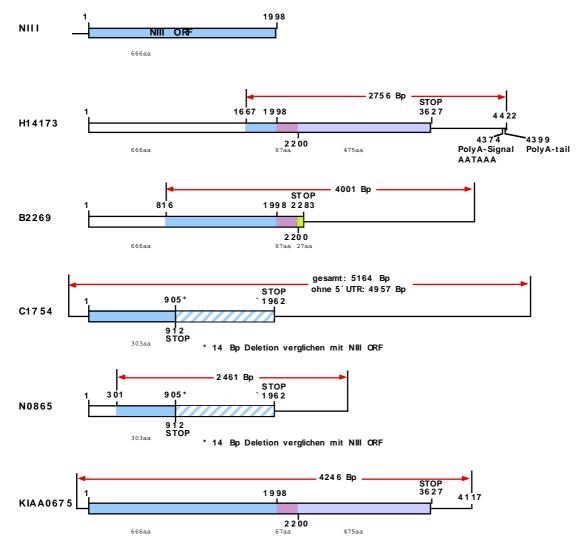


Abb. 2.1.2.1. Schematische Darstellung der NIII-cDNA und der aus dem Screening der cDNA-Banken isolierten Klone sowie der KIAA0675-cDNA. Die cDNA-Klone, mit Ausnahme von NIII, sind als rote Pfeile dargestellt und an der NIII-Sequenz ausgerichtet. Zusätzlich ist die Länge der einzelnen Klone angegeben. ORFs sind als Boxen dargestellt, 5'- und 3'- untranslanslatierte Regionen als Linien. Der NIII-ORF ist hellblau unterlegt, wie auch die dazu homologen Sequenzen der isolierten cDNAs. Der einem Klon fehlende NIII-ORF-Sequenzbereich ist als weiße Box gezeichnet. Die blau schraffierten Bereiche von Klon C1754 und N0865 symbolisieren zum NIII-ORF homologe Bereiche, die jedoch aufgrund eines vorangehenden Stop-Codons nicht translatiert werden. Die Nummerierung erfolgte nach dem NIII-ORF, der mit 1 beginnt und 1998 endet. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Der 2461 Bp große N0865-Klon ist vollständig in dem wesentlich größeren C1754-Klon enthalten. Im überlappenden Teil sind beide Klone zu 100% identisch. Die beiden Klone unterscheiden sich von der NIII-cDNA (und dem Klon B2269) durch das Fehlen eines 14 Bp langen Abschnitts (NIII-ORF Pos. 905-912). Der durch die 14 Bp Deletion verursachte Leserasterwechsel innerhalb der C1754- und N0865-Klone führt kurz hinter der Deletionsstelle zur Entstehung eines Stop-Codons. Wie später ausführlicher gezeigt (vgl. Kap. 2.7.), ist alternatives Spleißen die Ursache dieser Deletion.

Die größte Verlängerung des NIII-ORFs weist Klon H14173 mit dem kompletten 3'-Ende auf. Er verlängert den NIII-ORF um 1630 Bp auf eine Gesamtlänge von 3627 Bp. Klon B2269 führt dagegen nur zu einer Verlängerung des NIII-ORF um 286 Bp, wovon die ersten 203 Bp identisch mit der Sequenz des H14173-Klons sind, während sich der darauffolgende Teil unterscheidet. Der größte isolierte Klon C1754 hat eine Länge von 5164 Bp. Er besitzt ein komplettes 5′-Ende inklusive 5′-UTR, das länger als das der NIII-cDNA ist, im überlappenden Teil mit ihr aber zu 100% identisch ist. Abgesehen von der 14 Bp Deletion ist Klon C1754 sogar bis NIII-ORF Pos. 1962 identisch mit dem NIII-ORF. Dahinter schließen sich 805 Bp ohne offensichtliche Sequenzhomologie zu den anderen Klonen an. Dahinter folgt nochmals ein Bereich, der ebenfalls in Klon H14173 vorkommt. Die zwischen den Klonen beobachteten Sequenzunterschiede sind in den meisten Fällen durch alternatives oder unvollständiges Spleißen zu erklären, denn es treten an den Stellen, an denen die Sequenzen auseinandergehen, häufig Spleiß-Donor- oder Spleiß-Akzeptor-Konsensussequenzen auf. Diese Vermutung wurde mit der Kenntnis der partiellen genomischen RBP138-Sequenz in allen Fällen bestätigt (vgl. Kap. 2.7.).

Da H14173 der einzige Klon mit vollständigem 3'-Ende war und zudem noch den NIII-ORF am meisten verlängerte, wurde dieser Klon als das authentisches 3'-Ende der NIII-cDNA betrachtet. Der aus der Zusammensetzung des NIII-ORFs mit dem H14173-ORF resultierende ORF hat eine Gesamtlänge von 3627 Bp und kodiert für ein Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 138 kDa. Dieser ORF wurde nach Größe und Funktion des von ihm codierten Proteins RBP138-ORF genannt (Abkürzung für ORF des RNA-Bindeproteins mit einem Molekulargewicht von 138 kDa). Mehrere Monate nach der oben beschriebenen Isolierung des RBP138-ORFs wurde die Sequenz einer cDNA "KIAA0675" mit komplettem RBP138-ORF (> 99,9% Identität) veröffentlicht (Ishikawa et al., 1998; GenBank Accession: AB014575). Die Isolierung des KIAA0675-cDNA-Klons erfolgte am Kazusa DNA Research Institute in Japan im Rahmen eines Projekts zur Identifizierung der cDNAs großer (> 100 kDa), im menschlichen Gehirn exprimierter Proteine. Die Sequenz des KIAA0675-Klons unterscheidet sich lediglich in den untranslatierten Regionen von der aus den NIII- und H14173-cDNAs zusammengesetzten hypothetischen RBP138-cDNA. Die Sequenzen der 3'-UTRs des KIAA0675-Klons und der hypothetischen RBP138-cDNA gehen bereits 8 Bp hinter dem Stop-Codon auseinander. Im 5'-UTR sind die "ersten" 73 Bp beider cDNAs identisch, während sich die weiter stromaufwärts liegenden Sequenzen unterscheiden.

Das Auftreten einer zweiten unabhängigen cDNA mit der Sequenz des kompletten zusammengesetzten RBP138-ORFs ist ein starker Hinweis auf die Existenz des postulierten RBP138-ORF.

#### 2.2. RBP138 und seine Isoformen

Nach Zusammenfügen der ORFs der isolierten cDNA-Klone mit der jeweils "fehlenden" NIII-Sequenz ließen sich drei unterschiedliche ORFs ableiten (siehe Kap. 2.1.2.). Jeder der drei ORFs stellt eine RBP-Isoform dar. Aus der Kombination von NIII und H14173 geht der 3627 Bp große RBP138-ORF hervor, der für ein Proteinprodukt aus 1208 AS mit einem berechneten Molekulargewicht von 138 kDa codiert (Abb. 2.2.1.) Dieser ORF und das zugehörige Protein wurden als Full-Length NIII-ORF bzw. Protein angesehen und, wie zuvor beschrieben, als RBP138-ORF/Protein bezeichnet.

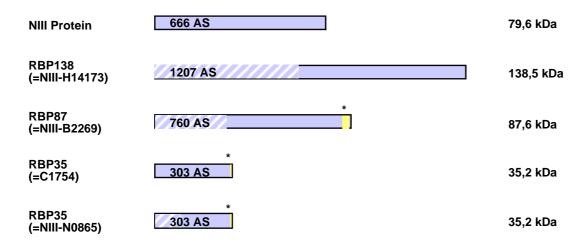


Abb. 2,2.1. Schematische Darstellung der aus den verschiedenen cDNAs abgeleiteten RBP138-Isoformen. Die von den zusammengesetzten ORFs (siehe Text & Abb. 2.1.2.1.) codierten Proteine sind als Rechtecke dargestellt. Der von NIII stammende Anteil der zusammengesetzten Proteine ist schraffiert. Lila Farbe (auch in Schraffur) und gleiche Lage stehen für identische Sequenzen. Der aus dem NIII- und H14173-ORF zusammengesetzte ORF wird als RBP138-ORF bezeichnet. Er codiert für ein 138 kDa Protein. Von der RBP138-Sequenz abweichende AS sind in gelber Farbe gezeichnet und mit "\*" gekennzeichnet. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Die Kombination des NIII-ORF mit dem des Klon B2269 führt zu einem ORF mit einer Gesamtlänge von 2283 Bp, der für ein 760 AS Protein mit einem vorhergesagten Molekulargewicht von 87 kDa codiert. Diese RBP-Isoform wurde aufgrund ihres Molekulargewichts RBP87 genannt. Während die ersten 733 AS von RBP87 und RBP138 identisch sind, unterscheiden sich die letzten 27 AS vom RBP138 Protein. Wie sich mit der Kenntnis der partiellen genomischen Sequenz des rbp138 Gens herausstellte (vgl. Kap. 2.7.), geht die B2269-cDNA höchstwahrscheinlich auf ein unvollständig gespleißtes Transkript zurück, weshalb die RBP87 Isoform vermutlich keine "echte" RBP138-Isoform darstellt.

Der Klon C1754 weist einen kompletten, zum RBP138 homologen ORF auf. Dieser endet jedoch aufgrund der zuvor beschriebenen 14 Bp Deletion bereits nach 912 Bp. Das von diesem kleinen ORF codierte Protein besteht aus 303 AS. Davon sind die ersten 301 AS mit denen des RBP138 Proteins identisch. Da das Protein ein berechnetes Molekulargewicht von 35 kDa aufweist, wurde es RBP35 genannt. Klon N0865, der komplett in Klon C1754 enthalten ist, aber kleiner ist, codiert nach Kombination mit dem NIII-ORF ebenfalls für die 35 kDa RBP138-Isoform.

# 2.3. Kartierung des neuen RNA-Bindungsmotivs innerhalb von RBP138

Wie bereits beschrieben, wurde das NIII Protein im Rahmen eines NW-*Screens* über die funktionelle Bindung einer 184 Nt langen HBV-ε-haltigen RNA-Sonde, die u.a. die strukturierte, 61 Nt lange HBV-ε-Sequenz enthält (siehe Kap. 6.4.4.), als RNA-bindendes Protein identifiziert. In Sequenzvergleichen wurde jedoch kein bekanntes RNA-Bindungsmotiv innerhalb des NIII-Polypeptids gefunden. Daher musste von dem Auftreten eines bisher unbeschriebenen RNA-Bindungsmotivs innerhalb von NIII (und RBP138) ausgegangen werden. Um das neue RNA-Bindungmotiv zu identifizieren, wurden verschiedene RBP-Fragmente NW-Blot-Bindungsstudien sowie RNA-Bindungsstudien in Lösung unterzogen.

#### 2.3.1. North-Western-Blots

Für eine erste grobe Kartierung der Bindungsdomäne wurde zunächst das RNA-Bindungsverhalten drei verschieden großer RBP-Fragmente im NW-Blot untersucht. Das Fragment RBP1-205 enthält die AS 1-205 des RBP138 Proteins. Die beiden Fragmente RBP1-499 und RBP1-666 (= NIII) bestehen dementsprechend aus den AS 1-499 bzw. 1-666 des RBP138 Proteins. Die Fragmente wurden als Fusionsproteine zusammen mit dem Maltose-bindenden-Protein (MBP; ca. 40,6 kDa), das eine Aufreinigung über eine Amylose-Matrix ermöglicht, in *E. coli* exprimiert. Nach Expression und partieller Aufreinigung der Proteine wurde deren RNA-Bindeverhalten im NW-Blot untersucht. Dazu wurden die Proteine nach SDS-PAGE auf eine Nylonmembran transferiert und auf der Membran de- und renaturiert. Anschließend wurde die Membran mit der DIG-markierten HBV-ε-haltigen RNA-Sonde in Anwesenheit eines ca. 100fachen Überschusses an unspezifischen Nukleinsäurekompetitoren wie Heringssperma-DNA und Hefe-tRNA inkubiert. Die gebundene DIG-markierte RNA wurde schließlich auf immun-chemischem Wege über Anti-DIG-Antikörper mit gekoppelter Alkalischer-Phosphatase und CDP\* (Roche), als Phosphatase-Substrat, nachgewiesen.

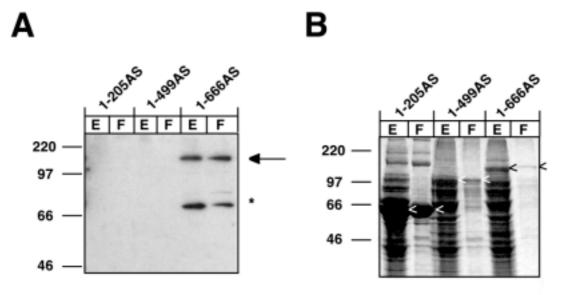


Abb. 2.3.1.1. (A) North-Western- (NW-) Blot mit HBV-ε-haltiger RNA und verschiedenen RBP-Fragmenten. Die RBP-Fragmente wurden als Fusionsproteine mit dem Maltose-bindende-Protein (MBP) in E. coli exprimiert, und im Anschluss partiell über eine Amylose-Matrix aufgereinigt. Sowohl die Durchfluss-Fraktion (F) als auch die Eluat-Fraktion (E) wurden im NW-Blot auf Bindung einer DIG-markierten HBV-ε-haltigen RNA getestet (in Anwesenheit eines ca. 100fachen Überschusses an unmarkierter Heringgsperma-DNA und Hefe-tRNA). Gebundene RNA-Sonden wurden über ein immun-chemisches Verfahren nachgewiesen. Die Lage des Full-Length MBP-RBP1-666 Proteins ist mit einem Pfeil gekennzeichnet, die mit einem Sternchen "\*" gekennzeichnete Bande stellt vermutlich ein prominentes, RNA-bindungskompetentes Abbauprodukt dar. MBP-RBP1-205 (1-205; 66,3 kDA); MBP-RBP1-499 (1-499; 100,7 kDa); MBP-RBP1-666 (1-666; 119,7 kDa). (B) Coomassie-Färbung des Gels zum NW-Blot. Das für den NW-Blot verwendete Gel wurde, nach erfolgtem Transfer der Proteine auf eine Nylonmembran, zum Nachweis der aufgetragenen Proteinmengen Coomassie gefärbt. Es ist zu erkennen, dass MBP-RBP1-205 in *E. coli* deutlich stärker exprimiert wurde als MBP-RBP1-499 und -1-666. Dass die verschiedenen MBP-RBP-Fusionsproteine in etwa gleich effizient transferiert wurden, zeigte ein Parallel-Gel mit identischem Auftragsschema, das ohne vorheriges Blotten direkt Coomassie gefärbt wurde und ein vergleichbares Proteinmuster ergab (Daten nicht gezeigt). Die MBP-RBP-Fusionsproteine sind durch Pfeilspitzen markiert. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Nur das MBP-RBP1-666 Protein konnte die RNA-Sonde binden, während die zwei Fragmente mit den größeren Deletionen am C-Terminus, MBP-RBP1-499 und -1-205, dazu nicht fähig waren (Abb. 2.3.1.1.). Dies zeigte, dass der Abschnitt zwischen AS 500 und 666 für die Bindung der RNA notwendig ist. Eine nähere Inspektion dieses Bereichs führte zur Identifizierung einer am unmittelbaren Ende der NIII-cDNA auftretenden Lysin-reichen Region (K-reiche Region). Sie ist durch das Auftreten von 7 Lysin-Resten und eines Arginin-Rests innerhalb von nur 11 AS gekennzeichnet. Im RBP138 Protein geht die K-reiche Region sogar noch weiter, so dass dort insgesamt 11 Lysin-Reste innerhalb eines Abschnitts von 19 AS auftreten. Aufgrund der hohen positiven Ladung dieser K-reichen Region, schien eine direkte Wechselwirkung dieses Abschnitts mit dem aufgrund der Phosphatgruppen negativ geladenem RNA-Rückgrat möglich. Um eine direkte Beteiligung der K-reichen Region an der RNA-Bindung zu testen, wurde eine Reihe von MBP-RBP-Fusionsproteinen mit kleinen Deletionen am C-Terminus im NW-Blot untersucht. Von der AS 666 ausgehend wurden dabei Deletionen in Schritten von jeweils drei AS am C-Terminus eingeführt. Die resultierenden Konstrukte codieren dementsprechend für die Fusionsproteine MBP-RBP1-657, -1-660, 1-663 (Abb. 2.3.1.2.B). Im Falle einer Beteiligung dieser Region an der RNA-Bindung sollten die verschiedenen Deletionen zu einer sichtbaren Reduzierung bzw. dem vollständigen Verlust der RNA-Bindung führen. Die beschriebenen Proteine wurden zusammen mit MBP-RBP1-666 als Positivkontrolle auf die Bindung der RNA-Sonde hin getestet. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente sind in Abb. 2.3.1.2.A dargestellt.

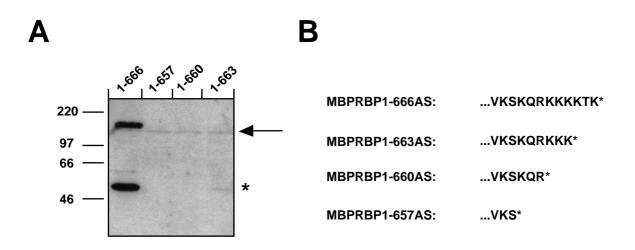


Abb. 2.3.1,2. (A) NW-Blot mit HBV-ε-haltiger RNA und MBP-RBP1-666 und dessen Derivaten mit kleinen C-terminalen Deletionen. Gesamtzellextrakte der die diversen Proteine exprimierender E. coli Zellen wurden im NW-Blot auf die Bindung einer DIG-markierten HBV-E-haltigen RNA hin untersucht. Die Lage des Full-Length MBP-RBP1-666 Proteins ist mit einen Pfeil markiert. Die mit einem Sternchen "\*" gekennzeichnete Bande stellt vermutlich ein prominentes, RNA-bindungskompetentes Abbauprodukt von MBP-RBP1-666 dar. MBP-RBP1-666 (1-666; 119,7 kDa); MBP-RBP1-663 (1-663); MBP-RBP1-660 (1-660); MBP-RBP1-657 (1-657). (B) Auflistung der getesteten Proteine mit Angabe der Sequenz des jeweiligen C-Terminus. Ausgehend von MBP-RBP1-666 wurde die am unmittelbaren C-Terminus auftretende K-reiche Domäne in drei Schritten um jeweils 3 AS verkürzt. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Nur MBP-RBP1-666 war in der Lage, die RNA-Sonde zu binden. Schon eine Deletion von nur drei Aminosäuren vom C-Terminus des MBP-RBP1-666 Proteins führte zum vollständigen Verlust der RNA-Bindungsaktivität. Ebenso vermochten die Fragmente MBP-RBP1-660 und 1657, mit Deletionen von 6 bzw. 9 AS, nicht mehr RNA zu binden. Der dramatische Effekt auf die RNA-Bindung, der bereits bei Deletion weniger AS-Reste innerhalb der K-reichen Region auftritt, spricht für eine Beteiligung dieser Region an der RNA-Bindung.

Zusätzlich zu Deletionen wurde die Auswirkung von Punktmutationen innerhalb der K-reichen Region auf die RNA-Bindung untersucht. Dazu wurde ein Protein mit mutierter K-reicher Region (BD(-)) exprimiert, innerhalb derer drei Lysin-Reste gegen Alanin oder Glycin ausgetauscht wurden (KKKTK → SGSTA). Die Auswirkung dieser subtileren Veränderung bezüglich des RNA-Bindungsverhaltens wurde erneut im NW-Blot studiert. Da sich das Full-Length RBP138 Protein nur sehr schlecht in E.coli exprimieren ließ, wurde für die Bindungsexperimente ein kleineres, aus den AS 510-878 bestehendes Fragment, das die K-reiche Region aufweist, eingesetzt. Als Negativkontrolle diente in diesem Versuch das die K-reiche Region nicht enthaltende RBP832-1176-Fragment. Im Gegensatz zu den zuvor verwendeten Proteinen wurden die in diesem Experiment eingesetzten Fragmente mit einem aus sechs Histidin-Resten bestehenden HIS-Tag exprimiert. Dieser erlaubt die Aufreinigung der Proteine über immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC). Die für die Bindungsstudien verwendeten HIS-getaggten Proteine wurden in der Folge stets über IMAC aufgereinigt. Die beiden HISRBP510-878-Fragmente mit Wildtypsequenz und mit BD(-) Sequenz wurden in etwa gleicher Menge in den Studien eingesetzt, während von der Negativkontrolle HISRBP832-1176, die sich deutlich besser als die anderen Fragmente exprimieren und aufreinigen ließ, wesentlich mehr Protein verwendet wurde. Nach Durchführung der NW-Blots wurde die Mengen der auf die Membran transferierten Proteine über einen Western-Blot mit dem polyklonalen "α-HISRBP1-205AS"-Antiserum ermittelt (Abb. 2.3.1.3.B). Das verwendete "α-HISRBP1-205AS"-Antiserum erkennt sowohl die AS-Sequenz 1-205 des RBP Proteins, als auch die allen verwendeten HIS-getaggten Proteinen gemeinsame 44 AS lange N-terminale *Leader*-Sequenz.

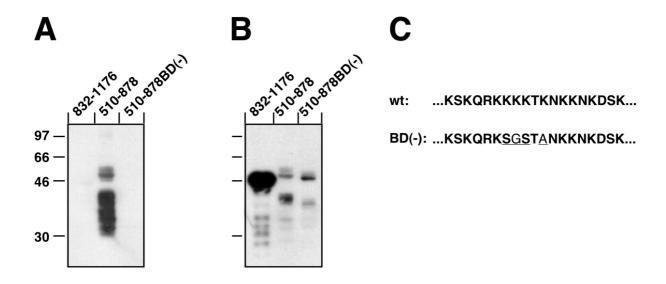


Abb. 2.3.1.3. Der Austausch weniger AS innerhalb der K-reichen Region führt zu einer dramatischen Verringerung der RNA-Bindung. (A) NW-Blot-Bindungsstudien mit DIG-markierter HBV-ε-haltiger RNA und Wildtyp HISRBP510-878, HISRBP510-878BD(-) mit mutierter K-reicher Region, sowie HISRBP832-1176. Die einzelnen HIS-RBP-Fragmente wurden nach IMAC-Aufreinigung im NW-Blot auf die Bindung der HBV-ε-haltigen RNA hin untersucht. Die Durchführung des NW-Blots sowie die Detektion der DIG-markierten RNA erfolgte wie zuvor beschrieben. (B) Western-Blot der zuvor im NW-Blot verwendeten Membran mit einem "α-HISRBP1-205AS"-Antikörper zur Detektion der auf der Membran enthaltenen Mengen der verschiedenen HIS-RBP-Proteine. (C) Sequenzen der Wildtyp (wt) und mutierten (BD(-)) K-reichen Region. Die in der BD(-)-Sequenz ausgetauschten AS sind unterstrichen. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der unterschiedlichen NW-Blot-Bindungsstudien mit RBP138-Fragmenten mit C-terminalen Deletionen oder internen AS-Austauschen innerhalb der K-reichen Region, dass die K-reiche Region von RBP138 für dessen RNA-Bindung absolut essentiell ist.

#### 2.3.2. RNA-Bindungsexperimente in Lösung

Die Beteiligung der K-reichen Region an der beobachteten RNA-Bindung durch RBP138 sollte neben den NW-Blot-Bindungsstudien in einem weiteren System untersucht werden. Dazu bot sich die Durchführung von Bindungsstudien in Lösung an, innerhalb derer sowohl die RNA-Sonde als auch das Protein gelöst vorliegen. Hierbei entfallen die in den NW-Blot Bindungsstudien "kritischen" Schritte wie denaturierende Gelelektrophorese, Transfer und Immobilisierung der Proteine auf einer Membran sowie deren anschließende De- und Renaturierung. Bei den In-Lösung-Bindungsstudien ist der erste Schritt die Bindung von radioaktiv-markierter RNA und Protein. Die gebildeten RNA-Protein-Komplexe werden im Anschluss über IMAC, durch Bindung der His-*getaggten* Proteine und der von ihnen gebundenen RNAs an eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrix, immobilisert. Ungebundene RNA-Moleküle sowie ungebundene Proteine werden durch mehrmaliges Waschen entfernt, und die Menge proteingebundener RNA schließlich im Szintillationszähler bestimmt.

Für die In-Lösung-Bindungsstudien wurden in *E. coli* exprimierte, IMAC-gereinigte HISgetaggte Proteine verwendet. Vor ihrer Verwendung in den RNA-Bindungsexperimenten wurden sie zur Entfernung des aus der ersten Aufreinigung stammenden Imidazols dialysiert, um eine erneute Aufreinigung über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose zu ermöglichen. Die RNA-Protein-Bindung und das Binden der Komplexe an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix erfolgte jeweils in Anwesenheit von 10 μg/ml Hefe-tRNA als unspezifischem Nukleinsäurekompetitor. In einem typischen Bindungssansatz lag die Proteinkonzentration bei rund 100 pM, die Konzentration an <sup>32</sup>P-markierter HBV-ε-haltiger RNA betrug etwa 300 pM.

In diesen Bindungsstudien sollte die RNA-Bindungkapazität der schon zuvor im NW-Blot untersuchten HIS-getaggten Proteine RBP510-878 mit Wildtyp K-reicher Region und mit mutierter K-reicher Region (vgl. Kap. 2.3.1.) miteinander verglichen werden. Als Negativ-kontrolle bzw. zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundbindung diente das die K-reiche Region nicht enthaltende RBP1-205-Fragment. Von den Proteinen mit Wildtyp oder mutiertem RNA-Bindungsmotiv wurden nach Gelabschätzung vergleichbare Proteinmengen für die

Bindungsstudien eingesetzt. Von der Negativkontrolle RBP1-205, das sich deutlich besser als die beiden übrigen Fragmente exprimieren und aufreinigen ließ, wurde eine gegenüber den zwei anderen Proteinen ca. 5-10x höhere Menge eingesetzt.

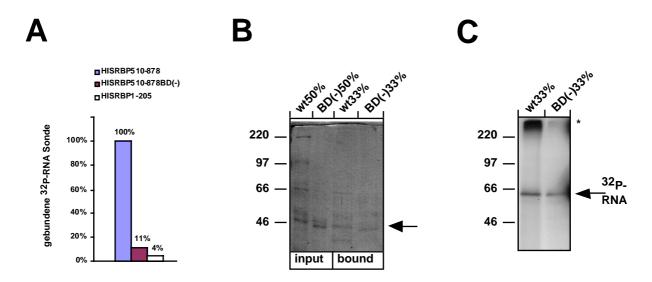


Abb. 2.3.2.1. In-Lösung-Bindungsstudien mit <sup>32</sup>P-markierter HBV-ε-haltiger RNA und Wildtyp HISRBP510-878 sowie HISRBP510-878BD(-) mit mutierter K-reicher Region und HISRBP1-205AS als Negativkontrolle. Aufgereinigte HISRBP-Fragmente (100 pM bei wt und BD(-); >500 pM bei HISRBP1-205AS) wurden in Lösung mit HBV-ε-haltiger RNA inkubiert, und die gebildeten RNA-Protein-Komplexe anschließend über IMAC aufgereinigt. (A) Vergleich der gebundenen RNA-Mengen. Die Bestimmung der Menge an gebundener markierter RNA, nach Immobilisierung der RNA-Protein-Komplexe über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose, erfolgte über die Messung der Cerenkov cpm im Szintillationszähler. Die von HISRBP510-878 gebundene RNA-Menge wurde als 100% definiert. (B) Bestimmung der Menge von an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gebundenem HISRBP501-878 (wt) und HISRBP510-878BD(-) (BD(-)). Nach Bestimmung der Cerenkov cpm wurden die immobilisierten HISRBP510-878 wt und BD(-) Proteine bzw. Protein-RNA-Komplexe durch Aufkochen in Proteinprobenpuffer von der Matrix und auch voneinander getrennt. Anschließend wurde ein Drittel jedes Ansatzes (bound) auf ein SDS-Gel aufgetragen und Coomassie gefärbt. Zum Vergleich wurde noch jeweils 50% der ursprünglich in einen Ansatz eingegangenen Proteinmenge auf das Gel aufgetragen (input). Der Pfeil markiert die Lage der (schwachen) Bande des HISRBP510-878 wt und BD(-). (C) Detektion der gebundenen markierten RNA innerhalb des Coomassiegefärbten SDS-Gels von (B) durch Autoradiographie. Der Pfeil markiert die Lage der intakten <sup>32</sup>P-markierten HBV-ε-haltigen RNA. In der Spur zum Bindungsansatz mit dem wt HISRBP510-878 ist der Großteil der RNA nicht in das Gel eingewandert (siehe "\*" Markierung). Der Grund dafür ist nicht bekannt.

Der Austausch der K-reichen Region hatte einen drastischen Effekt auf die RNA-Bindungskapazität des RBP510-878-Fragments (Abb. 2.3.2.1.). Verglichen mit dem Wildtyp (wt) wurde für das Protein mit mutierter K-reicher Region nur etwa 11% an gebundener Radioaktivität beobachtet. Die Hintergrundbindung, bestimmt durch RBP1-205, lag dabei bei rund 4%. Wie schon in den NW-Blot-Bindungsstudien führt somit die Veränderung der K-reichen Region auch in den In-Lösung-Bindungsstudien zu einer starken Verminderung der RNA-Bindungskapazität. Dieses Ergebnis bestätigt, dass die K-reiche Region eine zentrale Rolle bei der RNA-Bindung spielt.

Abschließend sollte bestimmt werden, welcher Anteil der eingesetzten RBP510-878 wt und BD(-) Proteine an die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gebunden hatte, und in welchem Zustand die gebunDie "ehemals" gebundene RNA-Sonde ist nach *SDS-PAGE* als distinkte Bande zu erkennen, was zeigte, dass die RNA während der Durchführung der Bindungsstudien nicht degradiert wurde. In der Spur mit dem wt RBP510-878 ist ein Großteil der RNA nicht in das Gel eingewandert. Der Grund hierfür ist nicht bekannt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die K-reiche Region auch in den In-Lösung-RNA-Bindungsexperimenten für eine effiziente RNA-Bindung notwendig ist. Der Austausch weniger Lysin-Reste innerhalb der Region führt zu einer drastischen Abnahme der RNA-Bindungskapazität. Diese Ergebnisse untermauern eine Funktion der K-reichen Region als RNA-Bindungsmotiv.

# 2.4. Untersuchungen zur Spezifität der RNA-Bindung durch RBP138

Nach der Identifizierung von RBP138 im NW-*Screen* mit der HBV-ε-haltigen RNA-Sonde stellte sich die Frage nach der Spezifität der RNA-Bindung durch RBP138. Erste Experimente dazu wurden bereits während der Diplomarbeit (S.G. Kreft, 1996) durchgeführt. Damals wurde beobachtet, dass Plaques der λ-Phagen mit dem NIII-cDNA-Insert neben der HBV-ε-haltigen RNA auch die eine *Stem-Loop*-Struktur ausbildende HIV-1 TAR-RNA binden konnten. Dieses Ergebnis ließ bereits auf eine relativ niedrige Selektivität seitens des NIII Proteins bei der Bindung von RNA schließen. Zu einer näheren Bestimmung der RNA-Bindungsspezifität von RBP138 wurde das Verhalten der bindungskompetenten MBP-RBP1-666- (= MBP-NIII) und HISRBP510-878-Fragmente gegenüber unterschiedlichen RNA-Sonden eingehender in NW-Blot-Bindungsstudien sowie in Bindungsstudien in Lösung untersucht.

# 2.4.1. NW-Blot-Bindungsstudien mit unterschiedlich strukturierten **RNAs**

In NW-Blots wurden RBP138-Fragmente (MBP-RBP1-666 und HISRBP510-878) hinsichtlich der Bindung verschiedener DIG-markierter RNA-Sonden untersucht. In einem ersten Experiment wurde zunächst die Bindung von drei verschiedenen Sonden, einer HBV-ε-haltigen RNA, einer HIV-1 TAR-RNA und einer Neomycin-antisense-RNA durch MBP-RBP1-666 getestet. Sowohl die HBV-RNA als auch die TAR-RNA stellen stark strukturierte RNA-Moleküle dar, während zur Struktur (der innerhalb des Roche DIG labeling kits als DIG-markierte Kontroll-RNA mitgelieferten) Neomycin-antisense-RNA keine Informationen vorlagen. Die Bindungsstudien wurden auch in diesem Fall in Anwesenheit eines 100fachen Überschusses an Heringssperma-DNA und Hefe-Gesamt-RNA als unspezifischen Nukleinsäurekompetitoren durchgeführt.

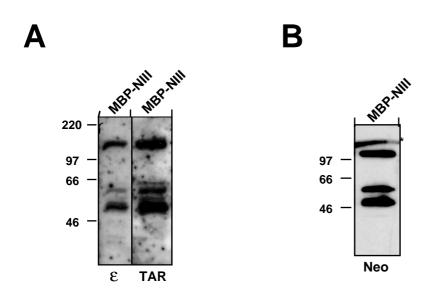
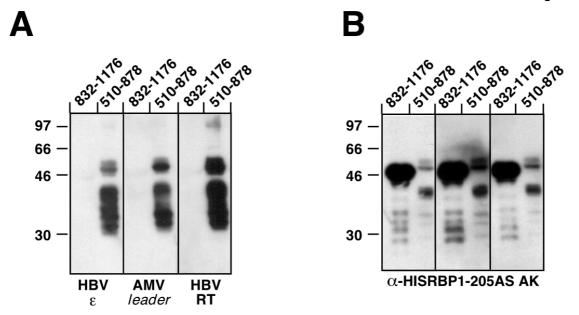


Abb. 2.4.1.1. NW-Blot-Bindungsstudien mit unterschiedlich strukturierten RNA-Sonden. Gesamtzellextrakte von MBP-RBP1-666 (120 kDa) exprimierenden E. coli Zellen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und im NW-Blot in Anwesenheit eines 100fachen Überschusses an unmarkierten Nukleinsäurekompetitoren (Heringssperma-DNA und Hefe-tRNA) auf die Bindung DIG-markierter RNAs hin untersucht. (A) NW-Blot mit HBV-ε-haltiger RNA (ε) und HIV-1 TAR-RNA (TAR). (**B**) NW-Blot mit Neo-*antisense*-RNA (Neo). Neben dem *Full-Length* MBP-RBP1-666 binden jeweils noch Degradationsprodukte von MBP-RBP1-666 die RNA-Sonden. Der in (B) mit einem "\*" gekennzeichnete Schweif stellt eine Verschmutzung der Membran oder des Films dar.

Mit allen drei RNA-Sonden war eine Bindung des 120 kDa MBP-NIII-Fragments zu beobachten (Abb. 2.4.1.1.). Neben dem kompletten MBP-RBP1-666 Protein traten noch Abbauprodukte auf, die ebenfalls in der Lage waren, die verschiedenen Sonden zu binden. Aus der Bindung der drei RNAs durch RBP1-666 wurde geschlossen, dass die RNA-Bindung nicht sequenzspezifisch ist. Um weiter zu untersuchen, ob bei der RNA-Bindung eine Selektivität gegenüber unstrukturierten oder strukturierten RNA-Molekülen erkennbar ist, wurden drei

Sonden mit teilweise unterschiedlicher Sekundärstruktur auf die Bindung von HISRBP510-878 hin getestet. Die 184 Nt lange HBV-ε-haltige RNA ("HBV-ε-haltige RNA"; 0,3 kcal/mol/Nt) enthält einen strukturierten Bereich, die HBV-ε-Sequenz, sowie einen vermutlich überwiegend unstrukturierten Bereich. Eine einzelsträngige, unstrukturierte RNA repräsentierte die 46 Nt lange AMV-*Leader*-Sequenz Sonde (0,05 kcal/mol/Nt). Bei der AMV-*Leader*-Sequenz handelt es sich um die 5′-nicht-translatierte Sequenz der Hüllprotein RNA 4 des Pflanzenvirus Alfalfa Mosaic Virus (AMV), die durch Abwesenheit einer stabilen Sekundärstruktur gekennzeichnet ist (Gehrke et al., 1983). Die HBV-RT-Sonde ("HBV-RT"; 0,28 kcal/mol/Nt) enthält die AMV-*Leader* Sequenz und zusätzlich noch die Nukleotide 938-1130 des HBV-RNA-Prägenoms. Die Sequenzen der HBV-ε-haltigen Sonde und der HBV-RT-Sonde überlappen nicht.

Das Bindungsverhalten von HISRBP510-878 gegenüber den drei Sonden wurde zunächst im NW-Blot untersucht. Wie Abb. 2.4.1.2. zu entnehmen ist, wurden alle drei verwendeten RNA-Sonden von dem RBP510-878 Proteinfragment gebunden. In diesen Versuchen waren neben der ca. 50 kDa Bande des Full-Length RBP510-878-Fragments noch weitere, höchstwahrscheinlich auf Degradationsprodukte zurückgehende, kleinere Banden zu beobachten. Als Negativkontrolle diente das HISRBP832-1176-Fragment, das keine K-reiche RNA-Bindungsdomäne aufweist, und daher auch nicht zu einer RNA-Bindung fähig ist. Auch wenn anhand der NW-Blot-Studien keine quantitativen Aussagen über die Bindungsstärken gemacht werden können, so wird dennoch deutlich, dass HISRBP510-878 in der Lage ist, alle verwendeten DIG-markierten RNAs zu binden. Da sowohl die strukturierten als auch die unstrukturierten RNAs gebunden werden, scheint die Spezifität der Interaktion des RBP510-878-Fragments, zumindest im NW-Blot, nicht besonders hoch zu sein. Auf der anderen Seite bleibt anzumerken, dass die in mindestens 100fachen Überschuss eingesetzten unspezifischen Nukleinsäurekompetitoren aber offensichtlich nicht die Bindung der DIG-markierten RNA-Sonden verhindern können, was wiederum auf eine gewisse Spezifität seitens des RBP510-878 Proteins schließen lässt.



**Abb. 2.4.1.2.** (A) NW-Blot-Bindungsstudien mit DIG-markierter HBV-ε-haltiger RNA, AMV-*Leader*-RNA und HBV-RT-RNA. Das RNA-bindungskompetente HISRBP510-878-Fragment (510-878) und das RNA-bindungsinkompetente HISRBP832-1176-Fragment (832-1176) wurden in NW-Blots jeweils auf Bindung der drei DIG-markierten RNA-Sonden hin untersucht. (B) Western-Blot der zuvor im NW-Blot verwendeten Membran mit einem "α-HISRBP1-205AS"-Antikörper zur Detektion der auf der Membran enthaltenen Mengen an HISRBP510-878 bzw. HISRBP832-1176 (vgl. auch Abb. 2.3.1.3.).

#### 2.4.2. Bindungsstudien in Lösung

#### 2.4.2.1. Bindungsstudien mit unterschiedlich strukturierten RNAs

Um die Spezifität der RNA-Bindung durch RBP138 bzw. RBP510-878 zusätzlich zu den NW-Blot-Bindungsstudien in einem weiteren System zu untersuchen, wurden Bindungsexperimente in Lösung durchgeführt. Im Gegensatz zu den innerhalb der NW-Blot-Studien verwendeten DIG-markierten RNA-Sonden wurden dabei <sup>32</sup>P-markierte RNAs eingesetzt. Neben den drei schon in den NW-Blots untersuchten RNA-Sonden wurde noch eine weitere, eine Stem-Loop-Struktur ausbildende HBV-ε-Sequenz-Sonde, "HBV-ε-only" (80 Nt; 0,41 kcal/mol/Nt), untersucht. Die Experimente wurden mit dem HISRBP510-878-Fragment durchgeführt, und als Negativkontrolle bzw. zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundbindung diente das bindungsinkompetente HISRBP1-205-Fragment.

Da nicht in jedem Fall eine gleiche Anzahl an RNA-Molekülen verwendet worden ist (bedingt durch die Verwendung unterschiedlicher RNAs) können keine streng quantitativen Angaben über die Stärke der Protein-RNA-Interaktion gemacht werden. Dennoch lassen sich offensichtliche Tendenzen hinsichtlich der Bindungsstärke ableiten. Die Ergebnisse der In-Lösung-Bindungsstudien sind in Tab. 2.4.2.1.1. aufgeführt.

**Tab. 2.4.2.1.1.** In-Lösung-Bindungsstudien mit RBP510-878 und verschiedenen, unterschiedlich strukturierten <sup>32</sup>P-markierten RNA-Sonden. Die Konzentration des RP510-878 lag in den Bindungsansätzen bei ca. 20 nM, die der jeweiligen RNA-Sonde bei ca. 3 nM. Die Bindungsansätze enthielten jeweils 10  $\mu$ g/ml Hefe-tRNA als unspezifischen Nukleinsäurekompetitor.

RNA-Sonde	Sekundärstruktur	Bindung
HBV-ε-haltige-RNA (184 Nt)	strukturiert u. unstrukturiert	++
HBV-ε-only-RNA (80 Nt)	strukturiert	+
AMV-Leader-RNA (49 Nt)	unstrukturiert	++
HBV-RT-RNA (250 Nt)	unbekannt	++

<sup>&</sup>quot;++": es wurden ca. 20-30% der eingesetzten RNA-Sonde gebunden

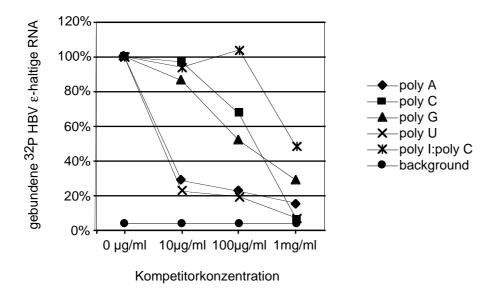
Es wurde für alle verwendeten RNA-Sonden eine Bindung an RBP510-878 beobachtet. Dabei traten allerdings Unterschiede in der Bindungsstärke auf. So wurde die überwiegend strukturierte, lediglich die HBV-\varepsilon-Sequenz enthaltende "HBV-\varepsilon-only-RNA" nicht so effizient wie die anderen Sonden gebunden. Die für diese Sonde beobachtete Bindung lag dennoch deutlich über der durch das RBP1-205-Fragment bestimmten Hintergrundbindung. Die unstrukturierte AMV-Leader-RNA wurde in diesen Studien in etwa gleich gut wie die HBV-ε-haltige und HBV-RT-RNA-Sonde gebunden. Dies deutete, wie bereits in den NW-Blots-Bindungsstudien beobachtet, auf eine relativ geringe Spezifität der RNA-Protein-Interaktion hin. Es kann aber zumindest festgehalten werden, dass die strukturierte "HBV-E-only"-Sonde schlechter als die übrigen Sonden gebunden wurde. In diesen Bindungsstudien wurde wie in allen In-Lösung-Bindungsexperimenten ein großer Überschuss (> 100fach) an unmarkierter Hefe-tRNA als unspezifischer Nukleinsäurekompetitor verwendet.

# 2.4.2.2. Kompetition der RNA-Bindung von RBP138 mit homopolymeren RNAs

Da in allen bisherigen Versuchen keine ausgewiesene Selektivität der RNA-Bindung durch HISRBP510-878 festgestellt werden konnte, wurde weiter untersucht, ob RBP138 bzw. HISRBP510-878 in der Lage ist, zwischen verschiedenen homopolymeren RNAs zu diskriminieren. Dazu wurde die Bindung von markierter HBV-E-haltiger RNA mit verschiedenen unmarkierten homopolymeren RNAs (Poly-A, Poly-C, Poly-G, Poly-U) kompetiert. Darüberhinaus wurde das Kompetitionsverhalten doppelsträngiger RNA (Poly-I: Poly-C) untersucht. Die Bindungsstudien wurden bei einer HISRBP510-878 Konzentration von 20 nM und einer Konzentration an HBV-E-haltiger RNA von etwa 3 nM durchgeführt. Die Konzentration an unmarkierter homopolymerer Kompetitor-RNA reichte von 10 µg/ml bis 1 mg/ml. Daneben enthielten alle Bindungsansätze noch 10 µg/ml Hefe-tRNA als unspezifischen

<sup>&</sup>quot;+": es wurden < 10% der eingesetzten RNA-Sonde gebunden

Kompetitor. Die Bestimmung der unspezifischen Hintergrundbindung erfolgte mit dem RNA-bindungsinkompetenten HISRBP1-205-Fragment.



**Abb. 2.4.2.2.1.** *In vitro* In-Lösung-Bindungsstudien mit homopolymeren Kompetitor-RNAs. In den Bindungsstudien wurde die Bindung (bei 30°C) von radioaktiv-markierter HBV-ε-haltiger RNA (ca. 3 nM) an HISRBP510-878 (ca. 20 nM) mit den jeweiligen Konzentrationen an unmarkierten homopolymeren RNAs kompetiert. Die gebildeten Protein-RNA-Komplexe wurden über IMAC aufgereinigt, und die Menge an proteingebundener radioaktiv-markierter RNA im Szintillationszähler bestimmt. Die Y-Achse gibt die Menge an gebundener HBV-ε-haltiger RNA an, wobei die in Abwesenheit von homopolymeren Kompetitoren gebundene Menge an markierter RNA 100% entspricht. Die unspezifische Hintergrundbindung (*background*) gibt die für das bindungsinkompetente HISRBP1-205-Fragment bestimmte Bindung an.

In den Bindungsexperimenten sind Unterschiede in dem Kompetitionsverhalten zwischen den verschiedenen homopolymeren RNAs zu beobachten (Abb. 2.4.2.2.1.). Sie lassen sich aufgrund ihrer Effizienz als Kompetitoren der Bindung der HBV-ε-haltigen RNA-Sonde in zwei Gruppen einteilen. Zur ersten Gruppe gehören die stärker kompetierenden Homopolymere Poly-A und Poly-U. Beide führen bereits bei einer Konzentration von 10 μg/ml zu einer Reduzierung der Bindung der markierten HBV-ε-haltigen RNA-Sonde um 70-80%. Zur zweiten Gruppe an Kompetitoren gehören Poly-C und Poly-G. Sie führen bei derselben Konzentration nur zu einer Verringerung der Bindung der HBV-ε-haltigen RNA von weniger als 20%. Auch die Poly-I: Poly-C Doppelstrang-RNA vermag bei dieser Konzentration die Bindung der HBV-ε-haltigen RNA nur geringfügig (< 10%) zu kompetieren.

Bei einer Konzentration von 100 μg/ml an Poly-A oder Poly-U binden nur noch etwa 20% der markierten RNA-Moleküle, im Falle von Poly-C und Poly-G sind es dagegen noch 40-60%. Bei dieser Konzentration führt die Verwendung von Poly-I: Poly-C zu keiner sichtbaren Kompetition. Bei einer Konzentration von 1 mg/ml an Poly-A oder Poly-U als Kompetitoren wird die Bindung beinahe bis auf Hintergrundniveau (ca. 5%) verringert. Dies gilt auch für

Poly-C, während bei Poly-G bei dieser Konzentration noch etwa 30% der markierten RNA-Sonde binden. Bei Verwendung von 1 mg/ml Poly-I: Poly-C wird die Menge an markierter RNA um 50% herabgesetzt.

Zusammengefasst kompetieren die beiden Homopolymere Poly-A und Poly-U deutlich stärker als Poly-C und Poly-G. Doppelstrang Poly-I: Poly-C RNA kompetiert am schwächsten mit der Bindung der HBV-ɛ-haltigen RNA an HISRBP510-878. Auch wenn sich hieraus keine unmittelbaren Schlüsse über die Spezifität der RNA-Bindung ziehen lassen, so bleibt dennoch festzuhalten, dass unterschiedliche Homopolymere ein unterschiedliches Kompetitionsverhalten zeigen.

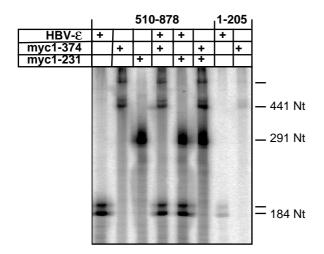
# 2.4.2.3. Direkter Vergleich der Bindung zweier verschiedener RNA-Sonden

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche RNA-Moleküle von HISRBP510-878 mit unterschiedlicher Affinität gebunden werden, wurden in einem Bindungsansatz gleichzeitig zwei markierte RNA-Sonden angeboten. Um dabei unterscheiden zu können, welche RNA in welchem Ausmaß von dem RBP510-878-Fragment gebunden wurde, wurden die proteingebundenen, immobilisierten RNAs durch Phenolextraktion und Ethanolfällung aufgereinigt und gelelektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt und anschließend über Autoradiographie detektiert.

In den Bindungsexperimenten wurden neben der HBV-ε-haltigen RNA noch zwei weitere, unterschiedlich lange Abschnitte der 3′-untranslatierten Region der humanen c-myc-mRNA aufweisende, Sonden verwendet. [Anmerkung: Das 3′-UTR der c-myc-mRNA enthält einen Sequenzabschnitt, der *in vivo* eine perinukleäre Lokalisation der mRNA vermittelt (Veyrune et al., 1996). Die Verwendung der 3′-UTR c-myc RNA-Sonden erklärt sich durch die kurzzeitig aufgestellte Arbeitshypothese, dass RBP138 (welches eine der c-myc-mRNA ähnliche Lokalisation aufweist, siehe Kap. 2.8.), an diese Sequenz bindet und möglicherweise an der Lokalisation der c-myc-mRNA beteiligt ist. In diesem Zusammenhang sollte u.a. untersucht werden, ob das RBP510-878-Fragment in der Lage ist, das 3′-UTR der c-myc-mRNA zu binden.]

Die Sonde "myc1-374" mit einer Gesamtlänge von 441 Nt enthielt den Bereich von Pos. 1-374 des c-myc 3′-UTRs sowie 67 Nt *Linker*-Sequenz des pBlsIISK(-) Vektors, und die Sonde "myc1-231" bestand aus der Sequenz von Pos. 1-231 des c-myc 3′-UTRs und 60 Nt *Linker*-Sequenz und hatte eine Gesamtlänge von 291 Nt. Es wurde sowohl die Bindung der einzelnen Sonden an HISRBP510-878, als auch das Bindungsverhalten bei der Verwendung von zwei Sonden untersucht. In letzterem Fall wurden die Sonden jeweils in äquimolaren Mengen eingesetzt. Zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundbindung diente, wie schon in den

vorherigen Experimenten, das RBP138-Fragment HISRBP1-205. Darüberhinaus enhielten alle Bindungsansätze 10 µg/ml Hefe-tRNA als unspezifischen Nukleinsäurekompetitor.



**Abb. 2.4.2.3.1.** Direkter Vergleich der Bindung jeweils zweier verschiedener RNA-Sonden in Bindungsstudien in Lösung. Die drei verwendeten  $^{32}P$ -markierten RNA-Sonden HBV-ε-haltige RNA (HBV-ε) und die das 3´-UTR der Ratten c-myc-mRNA von Pos. 1-374 enthaltende RNA (myc1-374) sowie die das 3´-UTR von Pos. 1-231 enthaltende RNA (myc1-231) wurden einzeln, oder zu zweit mit HISRBP510-878 (510-878) oder mit HISRBP1-205 (1-205) in Anwesenheit von 10 μg/ml Hefe-tRNA inkubiert. Danach wurden gebildete RNA-Protein-Komplexe über IMAC aufgereinigt, und proteingebundene RNA mit Phenol extrahiert und ethanolgefällt. Nach elektrophoretischer Auftrennung über ein 6% Polyacrylamid-Gel wurde die markierte RNA über den Phospho-Imager detektiert. Die 184 Nt HBV-ε-haltige RNA-Sonde sowie die 441 Nt lange myc1-374 RNA-Sonde erscheinen als Doppelbanden.

Nach Extraktion der gebundenen RNAs von der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix und gelelektrophoretischer Auftrennung der RNAs waren keine sichtbaren Präferenzen bezüglich einer der verwendeten Sonden zu erkennen (Abb. 2.4.2.3.1.). Unabhängig von der Zugabe einer zweiten RNA-Sonde wurden jeweils in etwa gleiche Mengen der unterschiedlichen RNA-Sonden gebunden. So sind die Signale der HBV-ε-haltigen RNA in den drei Ansätzen HBV-ε-haltige RNA allein, mit -"myc1-374" und mit -"myc1-231" gleich stark. Ebenso verhält es sich mit den Signalen der anderen RNA-Sonden. Hieraus kann abgeleitet werden, dass HISRBP510-878 keine der drei untersuchten RNAs mit deutlich unterschiedlicher Affinität bindet. Die anhand des HISRBP-1-205-Fragments bestimmte Hintergrundbindung war in diesen Experimenten sehr gering. Diese Ergebnisse sind ein weiterer Hinweis auf die breite Spezifität der RNA-Bindung durch HISRBP510-878.

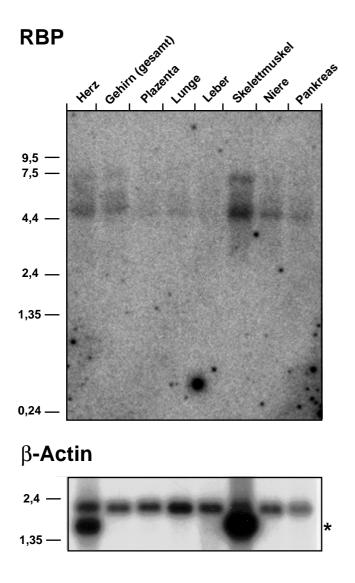
# 2.5. Northern-Blot-Analyse zur Untersuchung des Expressionsmusters von RBP138 und RBP35

Nachdem die verschiedenen RBP-cDNAs isoliert und daraus die beiden Proteine RBP138 und RBP35 abgeleitet worden waren (siehe Kap. 2.1. und 2.2.), sollte die Expression der postulierten Proteine in unterschiedlichen Geweben auf RNA-Ebene über einen Northern-Blot untersucht werden. Die Tatsache, dass neben den vier auf Lebergewebe zurückgehenden RBP-cDNA-Klonen (NIII, H14173, B2269, N0865) auch ein Klon aus Uterusgewebe (C1754) sowie ein weiterer aus Gehirngewebe (KIAA0675) stammten, ließ ein Auftreten der RBP Proteine in zusätzlichen Geweben bzw. Organen neben der Leber vermuten.

Über den Northern-Blot sollten sowohl die Gewebe identifiziert werden, in denen die beiden RBP138-Isoformen exprimiert sind, als auch die Mengenverhältnisse beider Isoformen untereinander in den Geweben. Die Durchführung des Northern-Blots erfolgte unter Verwendung einer vorgefertigten *Multiple Tissue Northern* (MTN) Blot Membran der Firma Clontech, die die Poly-A-RNA von insgesamt acht verschiedenen humanen Geweben bzw. Organen (Auflistung siehe Abb. 2.5.1.) enthält.

Zur Bestimmung der Expressionshöhe von RBP138 und RBP35 wurde die Membran mit der schon zuvor im Rahmen des *Screenings* nach dem authetischen 3´-Ende der NIII-cDNA eingesetzten "NIII 3´-end"-DNA-Sonde (siehe Kap. 2.1.2.) hybridisiert. Die durch *random priming* hergestellte Sonde enthält die Nukleotide 1497-1998 des RBP138-ORFs. Da dieser Sequenzabschnitt sowohl in der mRNA des RBP138 Proteins als auch in der des RBP35 Proteins (dort im 3´-UTR) vorkommt, erkennt die "NIII 3´-end"-Sonde die mRNAs beider Isoformen.

Nach Hybridisierung der Membran mit der "NIII 3´-end"-Sonde waren in den meisten Spuren zwei Banden, eine etwa 4,8 kB große und eine etwa 7,0 kB große, zu beobachten (Abb. 2.5.1.). Die 4,8 kB Bande stellt mit hoher Wahrscheinlichkeit das RBP138-Transkript dar, da die Größe der zusammengesetzten RBP138-cDNA, ohne 5´-UTR und ohne Poly-A-Schwanz, 4,4 kB beträgt (vgl. Abb. 2.1.2.1.), und somit eine Länge von rund 4,8 kB für die komplette mRNA realistisch zu sein scheint. Mit dem Auftreten der 4,8 kB Bande wurde zum ersten Mal die Existenz der zuvor ausschließlich postulierten RBP138-mRNA gezeigt. Die 7,0 kB Bande könnte möglicherweise die mRNA von RBP35 repräsentieren. Deren exakte Länge ist allerdings nicht bekannt. Sicher ist nur, dass die für die RBP35-Isoform codierende C1754-cDNA mit inkomplettem 5´-UTR und 3´-UTR eine Länge von 5,1 kB aufweist, und die RBP35-mRNA von daher zumindest größer als 5,1 kB sein muss.



**Abb. 2.5.1.** Northern-Blot-Expressionsanalyse von RBP138 und RBP35. Die vorgefertigte *MTN*-Membran (Clontech) mit Poly-A-RNA aus acht humanen Geweben bzw. Organen wurde mit der  $^{32}$ P-markierten "NIII 3′-end"-DNA-Sonde hybridisiert. Nach Hybridisierung und Detektion der gebundenen "NIII 3′-end"-Sonde wurde die Sonde entfernt, und die Membran nochmals mit einer β-Actin-spezifischen DNA-Sonde hybridisiert (siehe unterer Teil der Abb.). Neben der 2,0 kB Bande der β-Actin-mRNA tritt in Herz und Skelettmuskel zusätzlich die mRNA einer zweiten Actin-Isoform mit einer Größe von ca. 1,6-1,8 kB auf (\*). Die am Rand angegebenen Zahlen sind die RNA-Größenmarker in kB.

Insgesamt ist die beobachtete Expression beider RNAs sehr niedrig. So mußte der in Abb. 2.5.1. dargestellte Blot für 48 h exponiert werden, ehe die Signale mit dem Phospho-Imager detektiert werden konnten. Die Expressionshöhe der 4,8 kB RBP138-mRNA und der 7,0 kB mRNA variiert in den untersuchten Geweben stark, während das Verhältnis beider Transkripte zueinander weitgehend gleich bleibt. Die höchste Expression beider RNAs tritt in Skelettmuskel auf. Etwas schwächer sind die beiden RNAs in Herz, Gehirn, Niere und Pankreas exprimiert. In Lunge, Leber und Plazenta findet sich nur eine sehr schwache Expression der 4,8 kB mRNA, während die 7,0 kB mRNA in diesen Geweben nicht detektiert werden konnte.

Zusammenfassend bleibt zu sagen, dass in dem Northern-Blot in jedem der acht untersuchten Gewebe eine etwa 4,8 kB Bande zu detektieren war, die mit hoher Wahrscheinlichkeit RBP138-mRNA darstellt. Daneben war in einigen Geweben noch eine 7,0 kB Bande zu beobachten, die aber jeweils schwächer als die 4,8 kB Bande war. Diese 7,0 kB Bande stellt möglicherweise die mRNA von RBP35 dar. Insgesamt ist die Expression der beiden RNAs sehr niedrig. Während darüberhinaus die Expression der beiden RNAs in den einzelnen Geweben variiert, bleibt das Verhältnis der beiden Banden untereinander weitgehend gleich.

### 2.6. Nachweis von endogenem RBP138 in Huh7 Zellen

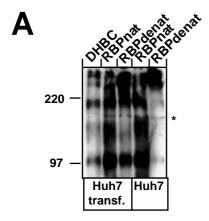
Nach Isolierung der NIII-cDNA und damit überlappender cDNAs wurde die Existenz von RBP138 und der RBP35-Isoform postuliert (vgl. Kap. 2.2.). Es sollte nun versucht werden, endogenes RBP138 und seine 35 kDa-Isoform erstmals im Western-Blot nachzuweisen. Dazu wurden die beiden polyklonalen Antiseren "α-HISRBP1-205ASnat" und "α-HISRBP1-205-ASdenat", die aus der Immunisierung von Kaninchen mit nativem (= nat) bzw. denaturiertem (= denat), rekombinant in *E. coli* exprimierten HISRBP1-205 Protein hervorgingen, verwendet. Beide Antiseren erkennen spezifisch die in beiden postulierten RBP138-Isoformen enthaltenen ersten 205 AS von RBP138, daneben auch die allen verwendeten HIS-*getagggten* Proteinen gemeinsame 44 AS lange N-terminale *Leader*-Sequenz (vgl. Kap. 2.3.1.).

Da viele der isolierten NIII/RBP-cDNAs auf Leber-cDNA-Banken zurückgehen, wurden zunächst Western-Blots mit Gesamtproteinextrakten der humanen Hepatomazellinie Huh7 durchgeführt. Innerhalb dieser war mit keinem der beiden Antiseren RBP138 oder eine RBP-Isoformen zu erkennen (Daten nicht gezeigt). Dies lies darauf schließen, dass die Proteine in dieser Zellinie nicht in ausreichender Menge vorkommen, um sie im Western-Blot detektieren zu können. Um die Menge an RBP138 und seiner Isoformen zu erhöhen, wurden diese vor der

Durchführung des Western-Blots spezifisch durch Immunpräzipitation angereichert. Es wurden Immunpräzipitationen mit drei verschiedenen Antikörpern durchgeführt. Neben den beiden bereits erwähnten RBP-spezifischen Antiseren, wurde, als Negativkontrolle bzw. zur Bestimmung der unspezifischen Hintergrundbindung der verwendeten polyklonalen Antiseren, noch ein gegen das Core-Protein des Enten-Hepatitis-B-Virus (DHBV) gerichtetes "α-DHBC"-Antiserum eingesetzt. Da alle drei verwendeten Antiseren auf ein identisches Immunisierungsschema zurückgehen und zudem im gleichen Kaninchenstamm generiert wurden, sollten sie die gleiche unspezifische Hintergrundbindung aufweisen.

Neben cytoplasmatischen Extrakten unbehandelter Huh7 Zellen wurden auch Extrakte nach Transfektion transient ein RBP35-eGFP-Fusionsprotein (62,7 kDa; siehe auch Kap. 2.8.1.) exprimierender Huh7 Zellen zur Immunpräzipitation herangezogen. Das RBP35-eGFP-Fusionsprotein enthält die ersten 302 AS des RBP138 und stellt somit ein Modell für die aus 303 AS bestehende RBP35-Isoform dar. Am C-Terminus des Fusionsproteins befindet sich das 238 AS umfassende, auf den menschlichen Codongebrauch optimierte "grün-fluoreszierende Protein" (enhanced green fluorescent protein, eGFP; Zolotukhin et al., 1996). Bei Bestrahlung mit Licht einer Wellenlänge von 488 nm emittiert es Licht mit einem Maximum bei einer Wellenlänge von 517 nm, und erscheint daher im Fluoreszenz-Mikroskop grün-fluoreszierend. Wie in Kap. 2.8. ausführlicher beschrieben, wird das RBP-eGFP-Fusionsprotein nach Transfektion in ausreichender Menge exprimiert, um in Western-Blots auch ohne vorherige Immunpräzipitation gut nachweisbar zu sein. Mit Hilfe der Extrakte der das RBP-eGFP-Fusionsprotein exprimierenden Zellen sollte überprüft werden, ob die verwendeten RBP-spezifischen Antiseren in der Lage sind, die RBP-Sequenz spezifisch zu erkennen und zu präzipitieren.

Nach der Immunpräzipitation mit den jeweiligen Antikörpern bzw. Antiseren wurden die Proteine im Western-Blot detektiert. Dabei wurde das "α-HISRBP1-205ASdenat"-Serum als Erstantikörper und ein polyklonaler Peroxidase-gekoppelter Ziege-Anti-Kaninchen-Antikörper als Zweitantikörper verwendet. Im Anschluss an die erste Detektion wurden die gebundenen Antikörper von der Membran entfernt (*stripping*) und eine zweite Detektion mit einem monoklonalen α-GFP-Mausantikörper und einem Peroxidase-gekoppelten Ziege-Anti-Maus-Antikörper durchgeführt. Dadurch sollte überprüft werden, ob das RBP-eGFP-Fusionsprotein aus den Extrakten der transfizierten Huh7 Zellen erfolgreich präzipitiert worden war. Die Ergebnisse der Immunpräzipitationen sind in Abb. 2.6.1. dargestellt.



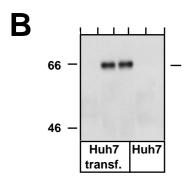


Abb. 2.6.1. Nachweis von endogenem RBP138 in Huh7 Zellen. (A) Western-Blot mit dem "α-HISRBP1-205ASdenat"-Antiserum und den verschiedenen Immunpräzipitationsansätzen. Cytoplasmatische Extrakte unbehandelter (Huh7), oder transfizierter, transient das RBP35-eGFP-Fusionsprotein exprimierender Huh7 Zellen (Huh7 transf.) dienten als Ausgangsmaterial für Immunpräzipitationen mit verschiedenen Antikörpern bzw. Antiseren (DHBC: polyklonales Kaninchen-Serum gegen das DHBV-Core-Protein; RBPnat: polyklonales Kaninchen-Serum gegen natives HISRBP1-205AS; RBPdenat: polyklonales Kaninchen-Serum gegen denaturiertes HISRBP1-205AS). Nach erfolgter Immunpräzipitation wurden die Proben im Western-Blot mit dem "α-HISRBP1-205ASdenat"-Antiserum untersucht. Die Bande des endogenen RBP138 ist mit einem "\*" markiert. (B) Nachweis der Spezifität der verwendeten RBP-spezifischen Antikörper. Die Membran von A) wurde gestrippt und eine neue Detektion mit einem monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper durchgeführt. Die Markierung "—" kennzeichnet das RBP35-eGFP-Fusionsprotein (62,7 kDa). (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

In dem Western-Blot der vier Immunpräzipitationsansätze mit den RBP-spezifischen Antiseren tritt jeweils eine Bande bei ca. 140-160 kDa auf. Da diese Bande nach Immunpräzipitation mit dem "α-DHBC"-Serum nicht zu beobachten ist, stellt sie mit großer Wahrscheinlichkeit endogenes RBP138 dar. Neben dieser distinkten Bande sind noch viele weitere, meist deutlich stärkere Banden zu erkennen. Diese treten allerdings auch nach Immunpräzipitation mit dem "α-DHBC"-Antiserum auf, und stellen daher unspezifischen Hintergrund dar. Dass es möglich ist, mit den RBP-spezifischen Antiseren RBP-Fragmente zu immunpräzipitieren, ist in Abb. 2.6.1.B gezeigt. Nach dem *Stripping* der Western-Blot-Membran und erneuter Detektion mit einem eGFP-spezifischen monoklonalen Mausantikörper treten bei den Immunpräzipitationen der transfizierten Huh7 Zellen mit den RBP-spezifischen Antikörpern Banden des RBP35-eGFP-Fusionsproteins auf. Bei der Immunpräzipitation der transfizierten Huh7 Zellen mit dem "α-DHBC"-Antiserum ist dagegen kein RBP-eGFP zu detektieren. Dies zeigt, dass die verwendeten RBP-spezifischen Antiseren mit dem N-Terminus von RBP138 interagieren und

für die Immunpräzipitation eingesetzt werden können. Das ist letztlich ein starker Hinweis dafür, dass die beobachtete 140-160 kDa Bande tatsächlich endogenes RBP138 darstellt.

Endogenes RBP35 konnte im Gegensatz zu RBP138 in den Immunpräzipitationen nicht nachgewiesen werden. Der Grund dafür ist der im Western-Blot auftretende hohe Hintergrund im unteren Teil des Gels (< 97 KDa; Daten nicht gezeigt). Dieser ist auf eine Kreuzreaktion des verwendeten Ziege-Anti-Kaninchen Zweitantikörpers mit den zur Immunpräzipitation verwendeten Kaninchen-Antikörpern zurückzuführen.

Neben der humanen Hepatomazellinie Huh7 wurden weitere Immunpräzipitationen mit cytoplasmatischen Extrakten der humanen Cervix-Karzinomzellinie HeLa, der Mausfibroblastenzellinie 3T3 sowie den beiden Affennierenzellinien COS-1 und CV-1 durchgeführt. Dabei konnte in keiner der Zellinien, abgesehen von Huh7, endogenes RBP138 oder die 35 kDa Isoform nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Tatsache, dass endogenes RBP138 im Western-Blot nur nach voriger Immunpräzipitation nachweisbar ist, deutet auf eine geringe Expression des Proteins hin. Diese Beobachtung wird nachhaltig durch die Ergebnisse des Northern-Blots zur Bestimmung der Expression von RBP138 und der 35 kDa Isoform unterstützt (vgl. Kap. 2.5.). Dabei konnte ebenfalls nur eine sehr schwache Expression der RBP138-Isoformen nachgewiesen werden, wobei die Expressionsrate in der Leber mit am schwächsten war. Den Nachweis von (endogenem) RBP138 und RBP35 über Immunpräzipitation erschweren könnte auch, dass nur ein kleiner Teil (< 10%), zumindest im Fall von RBP35- und RBP1128AS-eGFP, löslich ist (siehe Kap. 2.8.2.), und damit überhaupt immunpräzipitierbar ist. An dieser Stelle muss aber auch nochmals darauf hingewiesen werden, dass endogenes RBP138 und –35 auch nicht im Western-Blot von Gesamtzellysaten, in denen auch die unlösliche Proteinfraktion enthalten ist, detektiert werden konnte. Diese Beobachtung spricht wiederum für eine sehr niedrige Expression der endogenen RBP Proteine.

### 2.7. Partielle genomische Sequenz des rbp138 Gens

Die genomische Sequenz des rbp138 Gens ist bisher noch nicht in Datenbanken mit fertigen Sequenzen (Phase 3) des Humangenoms enthalten (Stand 01.07.2000). Aus diesem Grund wurde die HTGS- (*High Throughput Genomic Sequences*) Datenbank des NCBI (*The National Center For Biotechnology Information, USA*) mit der rekonstruierten RBP138-Nukleotidsequenz durchsucht. Die HTGS-Datenbank enthält neue, noch nicht vollständig assemblierte Sequenzen der Phasen 0-2 des Humangenomprojekts, die aufgrund ihrer Unvollständigkeit noch nicht in die Datenbanken mit den fertigen Sequenzen aufgenommen sind. Die Durchsuchung der Datenbank unter Verwendung des "blastn 2.0" Algorithmus

(Altschul et al., 1997) mit den vorgegebenen Standardeinstellungen führte zur Identifizierung des in einzelnen Bereichen mit der RBP138-Suchsequenz identischen Homo sapiens Bacmid-Klons RP11-161J9 (Genbank Accession Nr. AC019169). Da der Klon RP11-161J9 auf das Chromosom 3 zurückgeht, konnte das rbp138 Gen auf Chromosom 3 lokalisiert werden. Der sequenzierte Anteil des RP11-191J9 Klons besteht aus 27 nicht überlappenden Contigs und umfasst 180 kBp (Stand 01.07.2000). Aufgrund der zwischen den einzelnen Contigs auftretenden Lücken können die Contigs nicht geordnet werden, und sind daher in zufälliger Reihenfolge und Orientierung angegeben. Der Bacmid-Klon besitzt in dieser Phase daher nur den Status eines Working Drafts. Unter Berücksichtigung der Überschneidungen der RBP138-Sequenz mit einzelnen Contigs ließ sich die Reihenfolge einiger Contigs bestimmen (Abb. 2.7.1.).

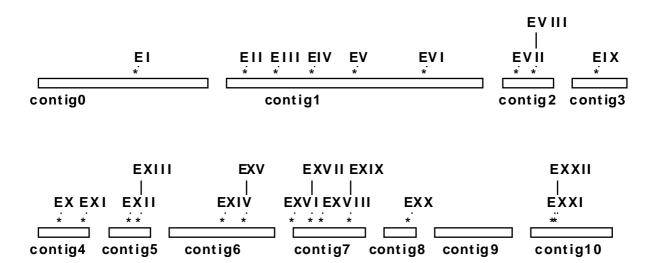


Abb. 2.7.1. Rekonstruktion der partiellen Sequenz des rbp138 Gens anhand der Sequenz des Bacmid-Klons RP11-161J9. Unter Berücksichtigung der Sequenzen der NIII-/RBP-cDNA-Klone konnten 11 *Contigs* (*Contigs* 0-10) der insgesamt 27 *Contigs* des Bacmids geordnet werden. Abgesehen von den Lücken zwischen den einzelnen Contigs stellt diese Anordnung die Sequenz des rbp 138 Gens bis zur ORF Pos. 2423 dar. Die Exons EI-EXXII sind an der Stelle ihres Vorkommens eingezeichnet (\*). Die Contigs sind durch Rechtecke symbolisiert, und sind im richtigen Größenverhältnis zueinander dargestellt. Anmerkungen zu den Exons: EI ist nur in C1754-cDNA enthalten. Das 5'-Ende des Exons konnte nicht bestimmt werden, da die C1754-cDNA in diesem Exon beginnt. **EII** ist nur im KIAA0675-cDNA-Klon enthalten. Das 5'-Ende des EII ist nicht genau zu bestimmen, da der KIAA0675-Klon im erst innerhalb des EII beginnt. Die ersten 72 Nt des EIII gehören noch zum 5'-UTR des rbp138 Gens, dann beginnt der ORF von RBP138 (bzw. RBP35). EXI ist aufgrund der Verwendung einer alternativen 5'-Spleiß-Stelle bei der C1754- und N0865-cDNA kleiner als bei H14173, B2269 und KIAA0675. Contig 9 weist kein Exon auf, überlappt aber mit dem, vermutlich unvollständig gepleißten, B2269-cDNA-Klon. Die genauen Größen der Exons sind in Tab. 2.7.1. aufgeführt.

Die RBP138-Sequenz inklusive der UTRs und Miteinbeziehung der cDNA-Sequenzen von B2269 und C1754 (vgl. Kap. 2.1.2. und 2.2.) überlappt mit 11 der insgesamt 27 Contigs (Contigs 0-10; Abb. 2.7.1. und Tab. 2.7.1.). Der bisher sequenzierte Bereich des RP11-161J9 Klons enthält jedoch nicht die komplette Sequenz des rbp138 Gens, sondern nur die des

5'-UTRs und des RBP138-ORFs bis einschließlich Position 2423. Dahintergelegene Bereiche fehlen bzw. sind bisher noch nicht sequenziert. Durch Vergleich des RP11-161J9-Klons mit den mit RBP138 zusammenhängenden cDNA-Klonen konnte die Exon-Intron-Struktur des rbp138 Gens abgeleitetet werden (Tab. 2.7.1.).

**Tab. 2.7.1.** Abgeleitete Exon-Intron-Struktur des rbp138 Gens aus dem Vergleich der NIII-, H14173-, KIAA0675-, B2269-, C1754 und N0865-cDNAs mit dem genomischen Homo sapiens Bacmid-Klon RP11-161J9 (Stand 01.07.2000).

Exon	Länge	RBP138-ORF	Intron	Länge
		Pos.		
I II	135 Bp + x 57 Bp + x	5′-UTR 5′-UTR	I II	6606 Bp + x 2425 Bp
III	104 Bp	5'-UTR + ORF 1-32	III	2650 Bp
IV	70 Bp	33-102	IV	3018 Bp
${f V}$	156 Bp	103-258	V	5201 Bp
VI	117 Bp	259-375	VI	5488  Bp + x
VII	81 Bp	376-456	VII	1319 Bp
VIII	125 Bp	457-581	VIII	2979  Bp + x
IX	115 Bp	582-696	IX	$3960 \; Bp + x$
X	120 Bp	697-816	X	1790 Bp
$\mathbf{XI}^{\S}$	102 Bp	817-918	ΧI <sup>§</sup>	1817 Bp + x
XII	93 Bp	919-1011	XII	786 Bp
XIII	53 Bp	1012-1064	XIII	$4821 \; Bp + x$
XIV	77 Bp	1065-1141	XIV	1649 Bp
XV	618 Bp	1142-1759	XV	$1539 \; Bp + x$
XVI	33 Bp	1760-1792	XVI	1292 Bp
XVII	170 Bp	1793-1962	XVII*	805 Bp
XVIII	45 Bp	1963-2007	XVIII	2174 Bp
XIX	26 Bp	2008-2033	XIX	2945 Bp
XX	166 Bp	2034-2199	XX**	$7418\;Bp+x$
XXI	96 Bp	2200-2295	XXI	157 Bp
XXII	128 Bp	2296-2423	XXII	3882 Bp

x Lücke unbekannter Länge (siehe Text)

Es besteht, bis RBP138-ORF Position 2423, aus 22 Exons und ebensovielen Introns. Das Start-Codon des RBP138-ORFs liegt im Exon III. Die postulierten Exons I und II liegen im 5'-UTR der rekonstruierten RBP138-cDNA bzw. des KIAA0675-cDNA-Klons, der sich im 5'-UTR von dem hypothetischen RBP138-Klon unterscheidet (vgl. Kap. 2.1.2. und 2.2.). Während jeweils die exakte Größe der Exons III bis XXII bestimmt werden konnte, ließ sich

alternative Verwendung von zwei Spleiß-Donor-Stellen innerhalb des Introns XI möglich

<sup>\*</sup> Intron XVII ist komplett in C1754-cDNA-Klon enthalten

<sup>\*\*</sup> das 5'- Ende des Introns XX ist teilweise in B2269-cDNA enthalten

die Größe der im 5'-UTR liegenden Exons I und II nicht genau vorhersagen, da die jeweiligen cDNA-Klone NIII, C1754 bzw. KIAA0675 innerhalb dieser Exons enden, und die 5'-Enden der beiden Exons somit nicht bekannt sind. Die Größe eines Introns konnte nur dann exakt bestimmt werden, wenn es komplett auf einem einzigen *Contig* vorkam. Von Introns, die sich über zwei *Contig*s erstreckten, konnte aufgrund der Lücke unbekannter Größe zwischen den *Contig*s lediglich eine Mindestgröße für das Intron angegeben werden.

Die Gesamtlänge aller in dem RP11-161J9-Klon vorkommenden Exons, inklusive der im 5'-UTR des rbp138 Gens liegenden Exons I und II, beträgt 2687 Bp. Die genomische Sequenz, die die Summe aus Exons und Introns darstellt, umfasst dagegen (bis RBP138-ORF Pos. 2423) mehr als 70 kBp. Die Größe der Exons reicht von 26 Bp (Exon XIX) bis 618 Bp (Exon XV). Sämtliche Introns, mit Ausnahme des unvollständigen Introns I, dessen 3'-Ende nicht genau bestimmt werden konnte (siehe oben), zeigen starke Homologie zu den Konsensus-Spleiß-Donor- und -Akzeptorsequenzen der "GT-AG"-Introns der Säugetiere (Spleiß-Stellen Konsensussequenzen siehe Abb. 2.7.2.A; Moore et al., 1993). In jedem der abgeleiteten Introns tritt an den Spleiß-Donor-Stellen stets die invariante "GT"-Dinukleotidsequenz auf. Darüberhinaus tritt noch eine starke Homologie zu den darauffolgenden nicht 100% konservierten Resten der Konsensussequenz auf. Für die Spleiß-Akzeptor-Stellen ergibt sich das gleiche Bild. Auch hier tritt immer die für Spleiß-Akzeptor-Stellen invariante "AG"-Sequenz, sowie eine starke Homologie zu davorliegenden weniger stark konservierten Resten innerhalb der Konsensussequenz auf. Diese Ergebnisse stützen die Richtigkeit der vorgenommenen Einteilung der genomischen Sequenz in die abgeleiteten 22 Introns und Exons.

Auf cDNA-Ebene lassen sich den Isoformen RBP138, -87 und -35 (vgl. Kap. 2.1.2. und 2.2.) die in Tab. 2.7.2. aufgelisteten Exons und Introns zuordnen. Die zusammengesetzte RBP138-cDNA enthält bis zur Position 2423 des RBP138-ORFs die Exons I und Exons III bis XXII, wobei der ORF innerhalb des Exons III beginnt. Die postulierte RBP87-cDNA setzt sich aus den Exons I und Exons III bis XX sowie einem Teil des Introns XX zusammen (Abb. 2.7.2.C). Wie zuvor beschrieben (vgl. 2.1.2.) ist die dem 3′-Ende des zusammengesetzten RBP87-ORFs zugrundeliegende B2269-cDNA unvollständig, d.h. ihr fehlt ein Poly-A-Signal und der Poly-A-Schwanz. Das Vorhandensein des Introns XX einerseits und das Fehlen eines authentischen 3′-Endes legen nahe, dass die postulierte RBP87-Isoform auf eine unvollständig gespleißte cDNA zurückgeht, und daher keine echte mRNA darstellt.

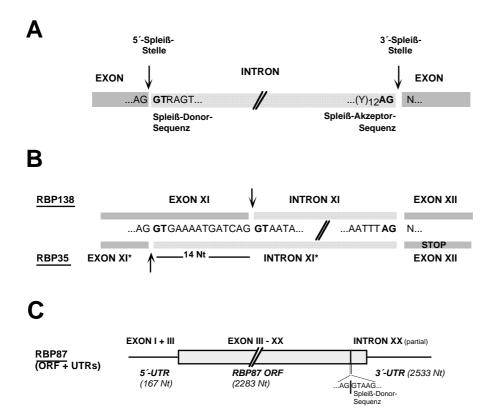


Abb. 2.7.2. (A) Konsensussequenz der Spleiß-Stellen von "GT-AG"-Introns. Fettgedruckte Nukleotide sind innerhalb der "GT-AG"-Introns zu 100% konserviert, normalgedruckte Nukleotide sind > 60% konserviert. R = Purinbase; Y = Pyrimidinbase. (B) Die Verwendung alternativer 5′-Spleiß-Stellen führt zur Expression zweier unterschiedlicher RBP-Isoformen. Das Herausspleißen des Intron XI führt zur mRNA der RBP138-Isoform, das des Intron XI\* zur mRNA der RBP35-Isoform. Die Introns XI und XI\* unterscheiden sich lediglich in der verwendeten 5′-Spleiß-Stelle. So ist die 5′-Spleiß-Stelle des Introns XI\* 14 Nt stromaufwärts von der des Introns XI gelegen. Die Verwendung der 5′-Spleiß-Stelle des Introns XI\* führt zu einem Leserasterwechsel, der schließlich im Exon XII, kurz hinter der Spleiß-Stelle, ein Stop-Codon herbeiführt. Die Pfeile symbolisieren die 5′-Spleiß-Stellen des Introns XI bzw. XI\*. (C) Schematische Darstellung des RBP87-ORFs und der UTRs. Das 5′-UTR besteht aus Exon I und dem 5′-Teil des Exon III, der RBP87-ORF aus dem restlichen Teil des Exon III sowie den Exons IV-XX und den ersten 84 Nt des Introns XX. Das 2533 Nt lange 3′-UTR enthält kein Poly-A-Signal und keinen Poly-A-Schwanz und ist daher unvollständig. Das Intron XX ist nur partial im RBP87-ORF und im 3′-UTR enthalten. Zwischen Exon XX und Intron XX tritt die Spleiß-Donor-Konsensussequenz der "GT-AG"-Introns auf. Der RBP87-ORF ist als Rechteck gezeichnet.

Im Gegensatz dazu wird die Existenz der RBP35-Isoform durch die genomische Sequenz gestützt. Interessanterweise führt die alternative Verwendung zweier 5′-Spleiß-Stellen innerhalb des Introns XI dazu, dass die RBP35-Isoform anstelle von RBP138 codiert wird (Abb. 2.7.2.B). Die aus der Verwendung der alternativen Spleiß-Stelle resultierende Verkürzung des Exons XI um 14 Bp führt zu einer Leserasterverschiebung im darauffolgenden Exon XII, die ein Stop-Codon wenige Nukleotide hinter dem Beginn des Exons XII generiert. Aus der Translation des ORFs bis zu diesem Stop-Codon geht das kleine 35 kDa RBP Protein hervor. Beide alternativ verwendeten Spleiß-Stellen des Introns XI weisen eine starke Homologie zu der Spleiß-Donor-Konsensussequenz auf (Abb. 2.7.2.B). Das Auftreten jeweils mehrerer unabhängiger Klone (NIII, KIAA0675, B2269 bzw. C1754, N0865; vgl. 2.1.2.), bei denen eine der beiden Spleiß-Donor-Stellen verwendet wurden, ist ein starkes Indiz für die alternative

Verwendung beider Spleiß-Stellen in vivo. Über die Effizienz der einen oder der anderen der beiden alternativen Spleiß-Donor-Stellen kann bislang keine Aussage getroffen werden. Interessanterweise enthält das kurze RBP35 Protein, wie schon an anderer Stelle erwähnt, nicht das Lysin-reiche RNA-Bindungsmotiv, und stellt damit eine RBP-Isoform dar, die nicht in der Lage ist, RNA zu binden.

**Tab. 2.7.2.** Zusammensetzung der postulierten mRNAs von RBP138, -87 und -35.

RBP138- Isoform (cDNAs)	5′-UTR	ORF	3′-UTR
<b>RBP138</b> (NIII +H14173)	Exon I + Exon III <sup>a)</sup>	Exon III <sup>a)</sup> – XXII (bis ORF Pos. 2423)	genom. Sequenz fehlt
<b>RBP87</b> (NIII + B2269)	$Exon \ I + Exon \ III^{a)}$	$\begin{aligned} &Exon~III^{a)}\!-XX\\ &+Intron~XX^{a)} \end{aligned}$	Intron XX <sup>a)</sup>
<b>RBP35</b> (C1754)	Exon I + Exon III <sup>a)</sup>	Exon III <sup>a)</sup> – XI* - Exon XII <sup>a)</sup>	Exon XII <sup>a)</sup> – XVII - Intron XVII – Exon EXVII - XXII; dahinter fehlt genom. Sequenz

nur ein Teil des Exons bzw. Introns

Zusammengefasst lässt sich aus dem sequenzierten Bereich des RP11-161J9 Klons und den isolierten NIII/RBP-cDNAs die partielle genomische Sequenz des rbp138 Gens ableiten. Die genomische Sequenz, die noch Lücken zwischen den einzelnen Contigs aufweist und nur bis zur Position 2423 des RBP138-ORF reicht, steht mit den zuvor isolierten cDNAs (siehe Kap. 2.1.2.) in Einklang. Es lassen sich insgesamt 22 Exons und Introns ableiten, die zusammen einen Bereich von > 70 kBp auf Chromosom 3 umfassen. Die Existenz der postulierten RBP138-Isoform wird durch die genomische Sequenz gestützt, während die postulierte RBP87-Isoform vermutlich auf eine unvollständig gespleißte mRNA zurückgeht, und somit wahrscheinlich keine existierende RBP-Isoform darstellt. Die Existenz der kleinsten Isoform, RBP35, wird wiederum durch die genomischen Daten gestützt. RBP35-mRNA entsteht interessanterweise durch die Verwendung einer zweiten, nur 14 Nt von der ersten Spleiß-Donor-Stelle entfernt liegenden, alternativen Spleiß-Donor-Stelle. Dieser alternative Spleißvorgang führt zu einem Lesersterwechsel, der ein Stop-Codon generiert. Das führt schließlich dazu, dass die kurze RBP35-Isoform codiert wird.

<sup>\* 14</sup> Bp verkürztes Exon XI, welches durch Verwendung einer alternativen Spleiß-Donor-Stelle entsteht (siehe Text)

## 2.8. Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation von RBP138 und RBP35

RBP138 und seine 35 kDa Isoform RBP35 sind neue Proteine. Die RNA-Bindekapazität des die Lysin-reiche Region aufweisenden RBP138 Proteins stellt die bisher einzig bekannte Funktion dar. Eine Größe von 138 kDa spricht für ein Auftreten zusätzlicher Funktionen innerhalb des RBP138-Polypeptids. Auch für die RBP35-Isoform, die im Wesentlichen aus den ersten 302 AS von RBP138 aufgebaut ist, müssen eine oder mehrere, noch nicht identifizierte, Funktionen angenommen werden. Da die Lokalisation eines Proteins erste Hinweise auf seine Funktion geben kann, bzw. die Anzahl der möglichen Funktionen eines Proteins durch Kenntnis der Lokalisation des Proteins in vielen Fällen enger eingegrenzt werden kann, sollte die subzelluläre Lokalisation von RBP138 und -35 untersucht werden. Dies erfolgte sowohl mikroskopisch über Immunfluoreszenz, als auch biochemisch über die Herstellung verschiedener Zellextrakte.

#### 2.8.1. Immunfluoreszenz-Mikroskopie mit RBP-eGFP-Fusionsproteinen

Zur Untersuchung der Lokalisation der RBP138-Isoformen mittels (Immun-)fluoreszenz-Mikroskopie wurden Fusionsproteine der RBP138-Isoformen mit dem *enhanced green fluorescent protein* (eGFP), das eine auf den menschlichen Codongebrauch optimierte GFP-Variante darstellt (Zolotukhin et al., 1996), eingesetzt. Die Verwendung des eGFP ermöglicht aufgrund seiner Fluoreszenzeigenschaften eine direkte Beobachtung der Lokalisation der Fusionsproteine in lebenden Zellen, also ohne vorheriges Fixieren und der Notwendigkeit einer indirekten immun-histochemischen Detektion. Dadurch ist u.a. eine genaue Abschätzung der Transfektionseffizienz und der Expressionsrate des Fusionsproteins in lebenden Zellen möglich. Eine Fixierung der Zellen war dennoch notwendig für die Durchführung der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie und der Öl-Immersions-Fluoreszenz-Mikroskopie. Bei der Fusion des eGFP an den C-Terminus ergibt sich zudem der Vorteil, dass das Auftreten der eGFP-Fluoresezenz zugleich ein Hinweis auf die Expression des kompletten Fusionsproteins ist.

Für die Lokalisationsstudien wurden zwei verschiedene RBP-eGFP-Fusionsproteine, RBP35-und RBP1128AS-eGFP, verwendet. RBP35-eGFP besteht aus den ersten 301 AS des RBP und dem über einen 3 AS langen *Linker* an den C-Terminus angehängten eGFP. RBP35-eGFP unterscheidet sich lediglich durch Fehlen der AS 302 und 303 von der kleinen RBP35-Isoform, und diente daher als Modell für RBP35. Das zweite Fusionsprotein RBP1128AS-eGFP besteht aus den AS 1-1128 des 1208 AS langen RBP138 Proteins und dem am C-Terminus über einen 19 AS *Linker* angehängten eGFP. Ein Fusionsprotein aus dem kompletten RBP138 und eGFP

Die einzelnen Fusionsproteine wurden in Huh7 Zellen exprimiert. Rund fünf Tage nach Transfektion wurden die Zellen fixiert, und die subzelluläre Verteilung der Fusionsproteine und des "ER-Trackers" untersucht (Abb. 2.8.1.1.A-B`).

RBP1128AS-eGFP ist ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Dabei ist die Fluoreszenz nicht diffus über das gesamte Cytoplasma verteilt, sondern in einer Zone um den Zellkern herum angereichert. Zwischen dieser Zone und der Zellmembran ist eine deutlich schwächere RBP1128AS-eGFP-Fluoreszenz zu beobachten. Ein kleiner Anteil der Proteine findet sich auch an der Plasmamembran bzw. nahe der Plasmamembran. Weitgehend ähnlich sieht auch das Fluoreszenzmuster des "ER-Trackers" aus. Es stellt sich als Zone, mit etwa gleicher Größe wie die für das RBP1128AS-eGFP beobachtete Zone, um den Zellkern dar. Zur Plasmamembran hin ist die Fluoreszenz des "ER-Trackers" deutlich schwächer. Dass die beobachtete GFP-Fluoreszenz ausschließlich auf das RBP-eGFP-Fusionsprotein selbst zurückgeht und nicht von dem Signal des "ER-Trackers" stammt, ist daran zu erkennen, dass nicht-transfizierte, aber mit dem "ER-Tracker" gefärbte Huh7 Zellen bei der Detektion der GFP-Fluoreszenz der transfizierten Zellen keine Hintergrundfluoreszenz geben (vgl. Abb. 2.8.1.1.A u. A`, B und B´). Ebenso stammt die Fluoreszenz des "ER-Trackers" ausschließlich von dem "ER-Tracker" selbst und nicht vom GFP (Daten nicht gezeigt).

Das kleinere RBP35-eGFP-Fusionsprotein ist ebenfalls fast ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert. Im Vergleich zu RBP1128AS-eGFP erscheint die Fluoreszenz im Cytoplasma allerdings etwas grobkörniger. In einigen der transfizierten Zellen ist zudem ein Teil der RBP35-eGFP-Fusionsproteine an einen Punkt aggregiert bzw. konzentriert (Abb. 2.8.1.1.D). Die Natur dieses im Mikroskop als heller Punkt erscheinenden, häufig zwischen zwei Zellkernen auftretenden Clusters an RBP35-eGFP ist jedoch bislang nicht näher bekannt. Im Gegensatz zu den beiden Fusionsproteinen ist das, deutlich stärker exprimierte, eGFP Protein alleine gleichermaßen im Zellkern und im Cytoplasma lokalisiert (Abb. 2.8.1.1.E).

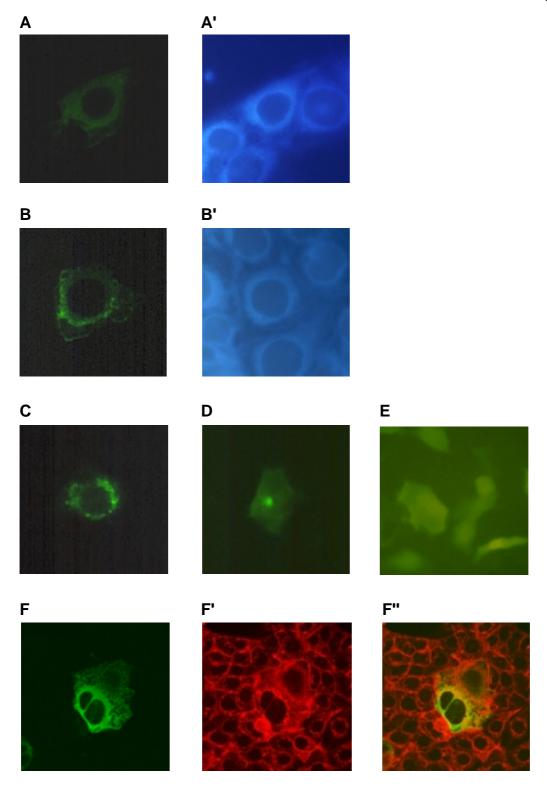


Abb. 2.8.1.1. Immunfluoreszenz-Lokalisationsstudien von RBP1128AS- und RBP35-eGFP in fixierten Huh7 Zellen. A-E: Öl-Immersionsmikroskopie. (A+B) Perinukleäre Lokalisation von RBP1128AS-eGFP. (A`+B`) Gleiche Ausschnitte wie A+B; Fluoreszenzmuster nach Färbung mit "ER-Tracker"-Fluoreszenz-Farbstoff (hellblau). (C) Perinukleäre Lokalisation von RBP35-eGFP. (D) Punktförmige Aggregation (Cluster) von RBP35-eGFP. (E) Lokalisation von eGFP allein. F-F´´: Konfokale Laserscanning-Mikroskopie (jeweils gleicher Ausschnitt in F-F´´). (F) RBP1128-eGFP. (F´) Färbung von Kernporenproteinen und des Golgi-Apparats durch fluoreszenzmarkiertes Weizenkeimagglutinin (WGA). (F´´) Overlay der Fluoreszenzmuster von F und F´. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

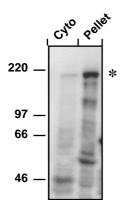
Zur weiteren Untersuchung der Lokalisation von RBP1128AS-eGFP wurden transfizierte Huh7 Zellen nach Fixierung mit Tetramethylrhodamin-gekoppelten Weizenkeim-Agglutinin (wheat germ agglutinin; WGA) gefärbt. WGA ist ein Lectin, das spezifisch Sialinsäure- und N-Acetylglucosamin-Reste bindet und daher spezifisch für Kernporenproteine und im Golgi-Apparat vorkommender Proteine ist. Die Fluroeszenz des eGFP-Fusionsproteins und des rotfluoreszierenden WGA-Konjugats wurde im konfokalen Laserscanning-Mikroskop beobachtet (Abb. 2.8.1.1.F-F``). RBP1128AS-eGFP ist wie bereits zuvor beschrieben ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert, wobei es überwiegend in einer Zone um den Zellkern zu finden ist. Die WGA-Fluoreszenz tritt um den Zellkern herum und auch in cytoplasmatischen Bereichen auf. Dabei sind die Grenzen der gefärbten Bereiche nicht immer eindeutig zu unterscheiden. Nach Übereinanderprojektion (Overlay) der eGFP- und der WGA-Fluoreszenz sind die Bereiche, in denen sich die beiden Fluoreszenzmuster überschneiden, erkennbar. Die aus einer Überlagerung der Grün- und der Rot-Fluoreszenz hervorgehenden gelben Bereiche sind überwiegend um den Zellkern herum zu beobachten. Neben den überlappenden Bereichen gibt es aber auch Bereiche im Cytoplasma, in denen sich die beiden Fluoreszenzmuster nicht überschneiden. RBP1128AS-eGFP ist also zumindest teilweise in Kompartimenten lokalsiert, die durch WGA-Konjugate anfärbbar sind.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das RBP1128AS-eGFP-Fusionsprotein ausschließlich cytoplasmatisch lokalisiert ist, wobei eine Anreicherung des Proteins in einer Zone um den Zellkern zu beobachten ist. Die Anfärbung des ERs mit dem "ER-Tracker" bzw. der Kernporen und des Golgi-Apparats mit WGA führt zu der RBP1128AS-eGFP Fluoreszenz ähnlichen, teilweise damit überlappenden Fluoreszenzmustern. Auch wenn die vorliegenden Fluoreszenzdaten keine endgültige Bestimmung der Lokalisation von RBP1128AS-eGFP zulassen, so scheint dennoch der Großteil des Proteins an der Kernmembran oder in kernnahen Bereichen des ER lokalisiert zu sein, aber eindeutig nicht im Kern. Auch das RBP35-eGFP-Fusionsprotein findet sich überwiegend im Cytoplasma. Es zeigt allerdings eine von dem RBP1128AS-eGFP leicht abweichende subzelluläre Verteilung. Zum einen ist die Fluoreszenz körniger und um den Zellkern nicht so distinkt, zum anderen ist ein Teil der Fusionsproteine bei manchen Zellen an einer einzigen Stelle des Nukleus angereichert. Die genaue Lokalisation dieses Punktes sowie dessen Funktion ist zur Zeit noch nicht klar.

## 2.8.2. Nur ein kleiner Teil des RBP1128AS-eGFP-Fusionsproteins ist löslich in der cytoplasmatischen Fraktion

Für die biochemische Untersuchung der Lokalisation der RBP-eGFP-Fusionsproteine wurden zunächst cytoplasmatische Extrakte von transfizierten RBP1128AS-eGFP exprimierenden Huh7 Zellen angefertigt. Nach Lyse der Zellen mit einem Puffer mit 1% Nonidet-P40 (NP40)

Zellbestandteilen wie Zellkernen, "membranöse" Strukturen, Cytoskelett usw. abgetrennt. Anschließend wurde die Verteilung der Fusionsproteine in der cytoplasmatischen- und der Pelletfraktion im Western-Blot analysiert (Abb. 2.8.2.1.). Weniger als 10% des RBP-eGFP-Fusionsproteins fanden sich dabei in der Cytoplasmafraktion, während der größte Teil des Proteins in der Pelletfraktion enthalten war. Dies deutete darauf hin, dass nur ein sehr geringer Teil des RBP1128AS-eGFP Proteins frei im Cytoplasma vorliegt, während der weitaus größere Teil mit zellulären Strukturen oder Organellen assoziiert ist und daher in der Pelletfraktion wiederzufinden ist. Diese Schlussfolgerung ist in Einklang mit der mit dem Fluoreszenz-Mikroskop beobachteten Lokalisation der Fusionsproteine in Huh7 Zellen (vgl. 2.8.1.). Dort war der Großteil der Proteine in einer definierten Zone um den Zellkern lokalisiert und nur ein kleiner Teil diffus im Cytoplasma verteilt.



2.8.2.1. Western-Blot eines cytoplasmatischen Extrakts das RBP1128AS-eGFP-Fusionsprotein exprimierender Huh7 Zellen. Die nach Transfektion das RBP1128AS-eGFP-Fusionsprotein exprimierenden Huh7 Zellen wurden durch Inkubation (10 min) in Lysepuffer (u.a. 1% NP40, 100 mM NaCl) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation (10 min, 13.000 Upm) stellt der Überstand die cytoplasmatische Fraktion (Cyto) mit den löslichen Proteinen dar. Die Pelletfraktion (Pellet) enthält den Zelldebris und die unlöslichen Proteine. Die Proteine der beiden Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, und, nach Transfer auf eine PVDF-Membran, im Western-Blot mit einem monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper detektiert. Die Bande des RBP1128AS-eGFP-Fusionsproteins (158,6 kDa) ist mit einem "\*" markiert.

### 2.8.3. Untersuchung der Assoziation der RBP-eGFP Proteine mit Actin-**Filamenten**

Die bisherigen Untersuchungen zur subzellulären Lokalisation der RBP-eGFP Proteine sprachen für eine Assoziation der Fusionsproteine mit zellulären Strukturen. Eine dem RBP1128AS-eGFP Protein ähnliche perinukleäre Verteilung wurde auch für die c-myc-mRNA der Ratte in in situ Hybridisierungsstudien beobachtet (Veyrune et al., 1996). Der Lokalisation der c-myc-mRNA liegt eine Assoziation mit Actin-Filamenten zugrunde. Dabei ist die c-mycmRNA selbst nicht direkt an Actin, sondern an Ribosomen, die wiederum mit dem Actin-Cytoskelett in Verbindung stehen, gebunden. Diese Interaktion wird höchstwahrscheinlich durch bisher unbekannte Proteinfaktoren vermittelt. Aufgrund der ähnlich erscheinenden Verteilung der RBP-eGFP Proteine und der c-myc-mRNA sollte daher untersucht werden, ob die RBP-Proteine ebenfalls mit dem Actin-Cytoskelett in Verbindung stehen.

Dazu wurden nach dem Protokoll von Hovland und Kollegen (1995) verschiedene Polysomenfraktionen hergestellt. Von den insgesamt vier Fraktionen enthält die erste die freien bzw. ungebundenen Polysomen (*free polysome fraction*; FP), die zweite die Cytoskelett-gebundenen
Polysomen (*cytoskeletal bound polysomes*; CBP), die dritte die Membran-gebundenen Polysomen (*membrane bound polysomes*; MBP) und die vierte alle bis dato unlöslichen Polysomen
und Proteine. Die c-myc-mRNA ist nach dieser Fraktionierung in der zweiten Fraktion, der
Fraktion mit den Cytoskelett-gebundenen Polysomen, angereichert (Hovland et al., 1995). Die
zur Herstellung der verschiedenen Fraktionen verwendeten Puffer enthalten ansteigende Salzund Detergenzkonzentrationen von der ersten Fraktion zur letzten Fraktion. Die Präparation der
CBP-Fraktion wird bei einer Salzkonzentration von 130 mM KCl durchgeführt, einer
Konzentration die eine Depolymerisierung von Actin-Filamenten in Monomere bewirkt, und
somit Actin wie auch Actin-assoziierte Proteine in Lösung bringt.

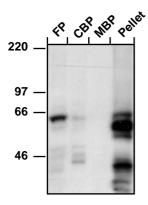
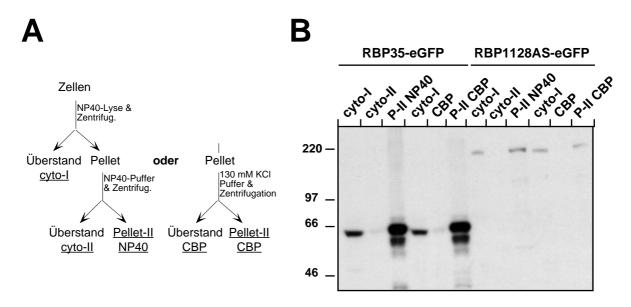


Abb. 2.8.3.1. Western-Blot verschiedener Polysomenfraktionen von transient das RBP35-eGFP-Fusionsprotein (62,7 kDa) exprimierender Huh7 Zellen. Es wurden insgesamt vier verschiedene Polysomenfraktionen gewonnen. Die Fraktion mit den freien, ungebundenen Polysomen (*free polysome fraction*; FP) ist der Überstand nach Zellyse (u.a. 25 mM KCl, 0,05% NP40) und Zentrifugation. Nach Resuspension (u.a. 130 mM KCl, 0,05% NP40) des Pellets und Zentrifugation stellt der Überstand die Fraktion mit den Cytoskelett-gebundenen Polysomen (*cytoskeletal bound polysome fraction*; CBP) dar. Eine erneute Resuspension des Pellets (u.a. 25 mM KCl, 0,5% NP40, 0,5% Deoxycholat) und Zentrifugation führt zu der Fraktion mit den Membran-gebundenen Polysomen (*membrane bound polysome fraction*; MBP). Die verbleibende Pelletfraktion (Pellet) enthält die bis dahin unlöslichen Proteine. Die Detektion des RBP35-eGFP Proteins erfolgte über einen monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper.

Die Verteilung von RBP35-eGFP in den unterschiedlichen Fraktionen wurde mit transfizierten, RBP35-eGFP exprimierenden Huh7 Zellen untersucht (Abb. 2.8.3.1.). Etwa 5-10% des Fusionsproteins sind in der FP-Fraktion, der Fraktion mit den ungebundenen Polysomen und

frei im Cytoplasma löslichen Proteinen zu finden. Der Rest ist in der letzten Fraktion, in der die unlöslichen Proteine enthalten sind, wiederzufinden. In der Fraktion der Cytoskelettassoziierten Polysomen, in der auch die Actin-assoziierten Proteine sein sollten, war RBP35eGFP dagegen nicht enthalten.

In einem weiteren Versuch sollte nochmals die Assoziation von RBP35- und RBP1128ASeGFP mit Actin-Filamenten untersucht werden. Dabei ging es im Wesentlichen um die Klärung der Frage, ob die nach der Herstellung eines cytoplasmatischen Extrakts in der Pelletfraktion auftretenden RBP-Fusionsproteine (vgl. Kap. 2.8.2.) durch Resuspension in einem 130 mM KCl haltigen Puffer in Lösung gebracht werden können. Dazu wurden cytoplasmatische Extrakte mit einem 1% NP40 und 100 mM NaCl enthaltenden Puffer von RBP35- bzw. RBP1128AS-eGFP exprimierenden Huh7 Zellen präpariert. Die nach Zentrifugation entstandenen Pellets wurden entweder erneut in dem NP40-haltigen und 100 mM NaCl aufweisenden Lysepuffer resuspendiert, oder in dem zuvor zur Herstellung der CBP-Fraktion verwendeten Puffer mit 130 mM KCl resuspendiert. Anschließend wurden die Extrakte nochmals abzentrifugiert und die resultierenden Pellets in Probenpuffer aufgenommen (Abb. 2.8.3.2.).



**Abb. 2.8.3.2.** Die RBP-eGFP-Fusionsproteine sind nicht in der Fraktion der Cytoskelett-gebundenen Polysomen (CBP) enthalten. (A) Schema zur Herstellung der verschiedenen (Polysomen)-Fraktionen. Transfizierte, das RBP35- bzw. RBP1128AS-eGFP exprimierende Huh7 Zellen wurden in NP40-haltigem Lysepuffer lysiert und anschließend zentrifugiert. Der daraus hervorgehende Überstand stellt die cytoplasmatische Fraktion (cyto-I) dar. Das Pellet wurde entweder nochmals in dem NP40-Lysepuffer oder in einem Puffer mit 130 mM KCl resuspendiert und erneut zenrifugiert. Der resultierende Überstand nach der Resuspension in NP40-Lysepuffer ist als cyto-II bezeichnet, der, der auf die Resuspension in dem 130 mM haltigen Puffer zurückgeht, als CBP. Die entsprechenden Pellets sind als Pellet-II NP40 bzw. Pellet-II CBP bezeichnet. Die Fraktionen, die im Western-Blot analysiert wurden (siehe Abb. Teil B) sind jeweils durch Unterstreichung hervorgehoben. (B) Western-Blot mit den einzelnen Fraktionen RBP35-eGFP (62,7 kDa) bzw. RBP1128AS-eGFP (158,6 kDa) exprimierender Huh7 Zellen. Die Namen entsprechen den unter (A) aufgeführten Fraktionen, mit Ausnahme von Pellet-II NP40 und Pellet-II CBP, die als P-II NP40 bzw. P-II CBP abgekürzt sind. Die Detektion der RBPeGFP-Fusionsproteine erfolgte über einen monoklonalen GFP-spezifischen Antikörper.

Auch in diesem Experiment sind die beiden RBP-eGFP-Fusionsproteine nicht in der CBP-Fraktion enthalten. Unabhängig davon, ob das erste Pellet nach NP40-Lyse erneut in dem NP40-Lysepuffer oder dem Puffer mit 130 mM KCl resuspendiert wurde, tritt ein Großteil (< 80%) von RBP35-eGFP nach der zweiten Zentrifugation in der Pelletfraktion auf. Der restliche Teil der RBP35-eGFP Proteine ist in der löslichen, cytoplasmatischen Fraktion zu finden. Ein vergleichbares Bild ergibt sich auch für das ungleich schwächer exprimierte RBP1128AS-eGFP-Fusionsprotein. Es ist ebenfalls nur in der cytoplasmatischen und der Pelletfraktion zu finden, nicht aber in der CBP-Fraktion.

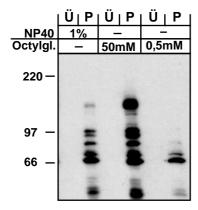
Aus diesen Experimenten lässt sich unmittelbar keine Assoziation der RBP-eGFP Proteine mit Actin-Filamenten ableiten. Da jedoch der Großteil der Proteine, auch unter Membranzerstörenden Bedingungen (MBP-Fraktion), besteht noch die Möglichkeit, dass die Proteine *in vivo* zwar mit dem Cytoskelett verbunden sind, jedoch möglicherweise zusammen mit anderen Proteinen in einem unlöslichen Multiprotein-Komplex auftreten. In diesem Fall würden die Proteine auch bei Depolymersierung der Actin-Filamente, trotz einer ursprünglich auftretenden Assoziation mit diesen, nicht in Lösung gehen (können). Da letzterer Fall zur Zeit nicht ausgeschlossen werden kann, bleibt festzustellen, dass anhand der vorliegenden Experimente kein direkter Hinweis auf eine Assoziation mit Actin-Filamenten gewonnen werden konnte, das Auftreten einer solchen Assoziation aber dennoch nicht ausgeschlossen ist.

### 2.8.4. Untersuchung auf mögliche Assoziation von RBP138 mit Membranen

Die Fluoreszenzdaten über die Lokalisation von RBP35- und RBP1128AS-eGFP sprechen für eine distinkte Lokalisation der Proteine um den Zellkern (vgl. Kap. 2.8.1.). Nachdem in diesem Zusammenhang keine Assoziation mit Actin-Filamenten gezeigt werden konnte, das Vorliegen einer solchen Assoziation aber auch nicht ausgeschlossen werden konnte (vgl. Kap. 2.8.3.), sollte getestet werden, ob RBP mit intrazellulären Membranen assoziiert ist. In diesem Fall sollten die RBP-Proteine durch Behandlung mit Detergenz in Lösung überführt werden können. Bei der zuvor beschriebenen Herstellung der cytoplasmatischen Extrakte durch Lyse der Zellen in einem 1% NP40 und 100 mM NaCl haltigen Lysepuffer waren die Proteine jedoch größtenteils in der unlöslichen Pelletfraktion zu finden (siehe Kap. 2.8.2.). Um neben NP40 ein weiteres Detergenz zu testen, wurden Extrakte mit Puffern angefertigt, die das nichtionische Detergenz Octylglucosid enthalten, das häufig zur schonenden Solubilisierung von Membran- und Membran-assoziierten Proteinen verwendet wird (Hjelmeland, 1990). Für die Solubilisierungsexperimente wurden Sf9 Insektenzellen verwendet, die zuvor mit rekombinanten, für ein HIS-getaggtes RBP138 Protein mit mutierter Lysin-reicher Domäne (HIS-RBP138BD(-); mutierte Lysin-reiche Domäne siehe Kap. 2.3.) codierenden Baculoviren

infiziert worden waren. Die Zellen wurden ca. 4-5 Tage nach Infektion geerntet und dann in einem Puffer mit NP40 (1%) oder Octylglucosid (0,5 oder 50 mM) aufgeschlossen. Nach kurzer Inkubation in dem Lysepuffer wurden die Lysate zentrifugiert. Aus der Zentrifugation ging die cytoplasmatische, lösliche Fraktion und das unlösliche Pellet hervor.

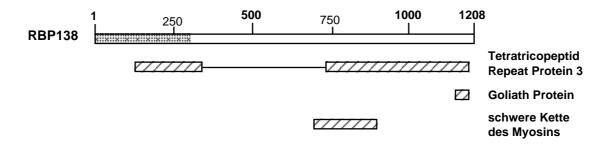
Wie zuvor schon in transfizierten, das RBP1128AS-eGFP-Fusionsprotein exprimierenden Huh7 Zellen beobachtet, geht auch das HIS-*getaggte* RBP138BD(-) oder dessen Abbauprodukte weder mit NP40 noch mit Octylglucosid in Lösung (Abb. 2.8.4.1.). Sowohl bei einer Octylglucosidkonzentration von 0,5 mM als auch von 50 mM finden sich RBP138 und dessen Abbauprodukte ausschließlich im unlöslichen Pellet wieder. Dass RBP138 durch keines der beiden nicht-ionischen Detergenzien in Lösung zu bringen ist, spricht zunächst gegen eine Assoziation von RBP138 mit zellulären Membranen. Andererseits besteht auch in diesem Fall die schon unter Kap. 2.8.3. diskutierte Möglichkeit, dass RBP138 mit anderen Proteinen zusammen in einem unlöslichen Multiprotein-Komplex vorliegt, der trotz vorliegender Membran-Assoziation nicht durch Detergenzien in Lösung gebracht werden kann. Somit bleibt festzuhalten, dass RBP138 nicht durch die beiden nicht-ionischen Detergenzien NP40 und Octylglucosid in Lösung gebracht werden konnte, aber eine Assoziation mit Membranen dennoch aus besagten Gründen nicht völlig ausgeschlossen werden kann.



**Abb. 2.8.4.1.** Versuche zur Solubilisierung von Baculovirus-exprimiertem HIS-RBP138BD(-). Mit rekombinanten Baculoviren infizierte, HIS-RBP138BD(-) (141,4 kDa) exprimierende Sf9 Zellen wurden in Lysepuffer mit NP40 (1%) oder Octylglucosid (0,5 mM oder 50 mM) lysiert und anschließend zentrifugiert. Der jeweilige Überstand (Ü) enthält die löslichen Proteine, und das Pellet (P) die unlöslichen Proteine. Die HIS-RBP138BD(-) Proteine bzw. Abbauprodukte davon wurden im Western-Blot mit einem HIS-*Tag*-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

## 2.9. RBP138 homologe Sequenzen in der SWISS-PROT Datenbank

Nach der Identifizierung des neuen RBP138-ORF wurde regelmäßig die SWISS-PROT Proteindatenbank nach homologen Sequenzen zum RBP138 Protein durchsucht. Damit war die Hoffnung verbunden, über Homologien zu bekannten Proteinen bzw. Proteindomänen Hinweise auf mögliche Domänen und letzten Endes die Funktion(en) von RBP138 zu erhalten. Die Durchsuchung der Datenbank erfolgte mit dem "blastp 2.0" Algorithmus (Altschul et al., 1997) unter den Standardeinstellungen und der kompletten RBP138-AS-Sequenz als Suchsequenz auf dem Server des NCBI (*The National Center For Biotechnology Information, USA*). Zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand 01.07.2000) konnten dabei drei Bereiche innerhalb RBP138 mit Homologien zu bekannten Proteinen identifiziert werden (Abb. 2.9.1.).

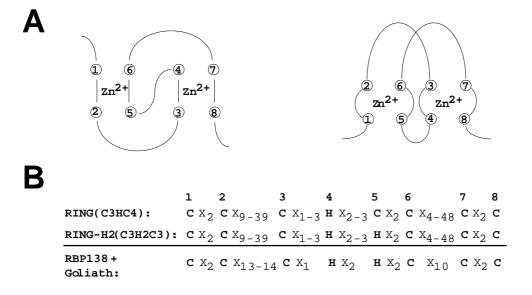


**Abb. 2.9.1.** Schematische Darstellung der Bereiche des RBP138 Proteins (1208 AS) mit Homologien zu anderen Proteinen. Die zwei Abschnitte AS 128-339 und AS 740-1203 sind homolog zu dem humanen Tetratricopeptid Repeat Protein 3. Der die AS 1148-1192 umfassende Bereich ist homolog zur RING-H2-Domäne des *Drosophila melanogaster* Goliath Proteins, und der Abschnitt von AS 700-900 ist homolog zum Cterminalen Teil der schweren Kette des Myosins von *Hydra vulgaris* (und anderen). Die Bereiche mit Homologien zu den jeweiligen Proteinen sind als schraffierte Rechtecke dargestellt. Die ersten 301 AS des RBP138 Proteins, die fast die gesamte RBP35-Isoform darstellen (bis auf zwei fehlende AS am C-Terminus), sind grau unterlegt. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Die stärkste Homologie zu RBP138 weist das 2025 AS große humane Tetratricopeptid Repeat Protein 3 (Accession: P53804) auf. Die homologen Bereiche zu diesem Protein umfassen die AS 128-339 und 740-1203 des RBP138 Proteins, wobei die beiden Bereiche jeweils 27% bzw. 25% AS Identität und 44% bzw. 40% identische oder ähnliche AS (*positives*) bei 4% bzw. 13% Lücken (*gaps*) zu RBP138 haben. Da jedoch die Funktion des Tetratricopeptid Repeat Proteins 3 selbst noch nicht bekannt ist, und auch die charakteristischen Tetratricopeptid Repeat Domänen in einem Abschnitt des Proteins ohne Homologie zu RBP138 liegen, können aus der beobachteten Homologie keine neuen Hinweise auf die mögliche Funktion von RBP138 gewonnen werden.

Der C-Terminus von RBP138 weist über einen Abschnitt von 46 AS eine signifikante Homologie zu dem Goliath Protein aus *Drosophila melanogaster* (Accession: Q06003) auf.

Dieser Bereich von AS 1148-1192 von RBP138, der durch 50% AS Identität, 65% identische oder ähnliche AS bei 2% Lücken gegenüber dem Goliath Protein charakterisiert ist, codiert für eine RING-H2-Zink-Finger-Domäne (Abb. 2.9.2.A), eine eng mit der RING-Domäne verwandte Domäne. Diese ist durch ein konserviertes Muster an Cystein- und Histidinresten und die Bindung von 2 Zink-Atomen gekennzeichnet, und stellt im Gegensatz zu den übrigen bekannten Zink-Finger-Domänen nicht primär eine DNA-Bindungsdomäne, sondern vielmehr eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne dar (Übersicht: Saurin et al., 1996; Borden, 2000). RING-Domänen sind vermutlich an der Ausbildung verschiedenster großer makromolekularer Strukturen, wie PML (promyelocytic leukemia) Nuclear Bodies und Ubiquitin-konjugierenden Komplexen beteiligt (Übersicht: Borden, 2000). Die über 200 beschriebenen Proteine mit einer RING-Domäne sind an vielen verschiedenen Vorgängen, wie RNA-Prozessierung, Transkription, Organellen-Transport und auch der Biogenese von Peroxisomen beteiligt. Die RING Proteine haben keine einheitliche Lokalisation, so sind einige ausschließlich im Nukleus zu finden, während andere cytoplasmatisch lokalisiert sind. Die Konsensussequenz der RING-H2-Domäne und der homologen RBP138 und Goliath Proteine sind in Abb. 2.9.2.B dargestellt. Neben der Homologie zur Goliath RING-H2-Domäne lassen sich inzwischen weitere homologe RING Proteine, allerdings mit einer etwas geringeren Homologie, in der Datenbank finden. Das Auftreten der RING-H2-Domäne innerhalb von RBP138 stützt weiter die Fähigkeit von RBP138 zur Interaktion mit anderen Proteinen.



**Abb. 2.9.2.** (A) Zwei schematische Darstellungen von RING-Domänen und der gebundenen Zink-Atome. Die umrahmten Nummern symbolisieren die charakteristischen, hochkonservierten AS-Reste der RING-Domänen (siehe auch B). Die Bindung des Zink-Atoms 1 wird in einer einzigartigen Anordnung von den Zink-Liganden 1, 2, 5 und 6 koordiniert, die des zweiten Zink-Atoms von den Liganden 3, 4, 7 und 8. (B) Konsensussequenzen der RING- und RING-H2-Domänen. Die innerhalb der Domänen konservierten Reste sind in Fettdruck hervorgehoben, des Weiteren sind die Abstände zwischen den konservierten Resten angegeben. Im unteren Teil der Abbildung sind die Gemeinsamkeiten der RING-H2-Domänen von RBP138 und des Goliath Proteins von *Drosophila melanogaster* aufgeführt (siehe dazu auch Abb. 3.5.1.). (Teil A der Abbildung nach Borden, 2000)

Der mittlere Teil von RBP138 um den Bereich von AS 700-900 zeigt Homologien zum C-terminalen Teil der schweren Kette des Myosins (*myosin heavy chain*; MyHC) des Polypen *Hydra vulgaris*, der einen Teil des Myosinschafts ausbildet. Der Myosinschaft eines Myosinmoleküls besteht aus zwei spiralig umeinander gewundenen α-Helix Strängen (*coiled coil* Struktur). In Abhängigkeit vom jeweiligen Myosin-Typ führt dieser Bereich entweder zur Multimerisierung von Myosinmolekülen (im Falle von Myosin II) oder zur Bindung an Membranen (Myosin I und Myosin V). Die funktionelle Bedeutung der Homologie von RBP138 mit einem Teil der MyHC ist nicht klar ersichtlich.

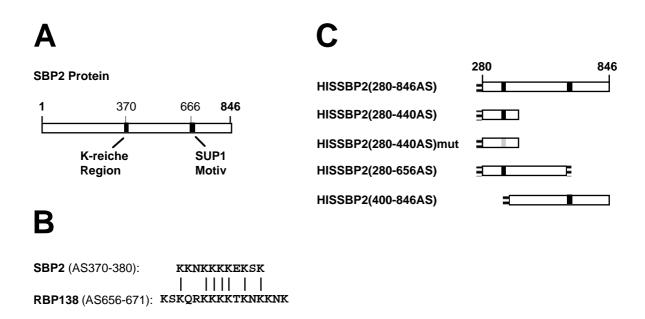
Abgesehen von der am C-Terminus von RBP138 auftretenden RING-H2-Domäne, geben die gefundenen Homologien zu anderen Proteinen keinen unmittelbaren Aufschluss über Funktionen von RBP138. Auf mögliche Funktionen der identifizierten RING-H2-Domäne wird im Diskussionsteil ausführlicher eingegangen werden.

# 2.10. Ist die K-reiche Region von SBP2 beteiligt an der spezifischen SECIS-RNA-Bindung?

Vor Kurzem wurde mit dem SECIS-bindenden Protein 2 (SECIS binding Protein 2, SBP2) ein neues spezifisches RNA-Bindungsprotein der Ratte kloniert (Copeland et al., 2000). Es ist bei Säugetieren an dem Einbau von Selenocystein (Sec) in Selenoproteine beteiligt. Der Einbau von Sec, dem in den häufig an Redoxreaktionen beteiligten Selenoproteinen eine zentrale Rolle bei der Katalyse zukommt (Übersicht: Stadtman, 1996), erfolgt co-translational an normalerweise als Stop-Codon fungierenden UGA-Codons und ist abhängig von zellulären Faktoren und ciswirkenden Sequenzen auf der mRNA der Selenoproteine selbst. Die cis-wirkende, stark strukturierte als Selenocysteine Insertion Sequence (SECIS) bezeichnete RNA-Sequenz liegt bei den Säugetieren im 3'-UTR der jeweiligen mRNA, und kann bis zu 5300 Nt von der eigentlichen Sec-Insertionsstelle entfernt liegen (Berry et al., 1991). Als Insertionsmechanismus des Sec wird die Bindung eines zellulären Faktors, vermutlich im Komplex mit weiteren Proteinen, (u.a. dem Ribosom und/ oder der Sec-tRNA<sup>Sec</sup>) an das SECIS-Element postuliert, der letztendlich dazu führt, dass das Ribosom beim Erreichen des als Sec-Insertionsstelle dienenden UGA-Codons eine Sec-tRNA<sup>Sec</sup> verwendet.

Das 846 AS lange SBP2 Protein ist als spezifisches SECIS-RNA-bindendes Protein beschrieben, welches im Kaninchen-Retikulozytenlysat notwendig für die Insertion von Sec in das Selenoprotein Phospholipid-Hydroxyperoxid-Glutathion-Peroxidase (PHGPx) der Ratte ist (Copeland et al., 2000). Der für die RNA-Bindung verantwortliche Abschnitt innerhalb des SBP2 Proteins ist bisher noch nicht bekannt, nicht zuletzt deshalb, weil das Protein

interessanterweise keines der bisher beschriebenen RNA-Bindungsmotive enthält. Es weist lediglich einen homologen Bereich zu dem postulierten RNA-Bindemotiv des Hefe-Translationsterminations-Suppressors SUP1 auf (Koonin et al., 1994). Das SUP1-Motiv ist ein aus Datenbanksuchen und Protein-*Alignments* abgeleitetes, hypothetisches RNA-Bindungsmotiv, für dessen RNA-Bindeaktivität es bisher keinen experimentellen Nachweis gibt. Neben dem SUP1-Motiv, das im SBP2 Protein die AS 666-687 umfasst, besitzt das Protein noch eine K-reiche Domäne, die aus 8 Lysin-Resten in einem Abschnitt aus 11 AS besteht und die AS 370-380 umfasst (Abb. 2.10.1.A u. B).



**Abb. 2.10.1.** (**A**) Schematische Darstellung des SBP2 Proteins (846 AS). Die K-reiche Region umfasst die AS 370-380, die zum postulierten SUP1-RNA-Bindungsmotiv homologe Region die AS 666-687. (**B**) Sequenzvergleich der K-reichen Regionen von SBP2 und RBP138. Die Positionen der ersten und letzten AS der K-reichen Region innerhalb des jeweiligen Proteins sind in Klammern angegeben. (**C**) Schematische Darstellung der verwendeten SBP2-Fragmente. Die K-reiche Region und die SUP1-homologe Region von SBP2 sind als schwarze Boxen dargestellt. Die mutierte K-reiche Region innerhalb des HISSBP2(280-440AS)mut ist als helle Box gezeichnet. Die horizontale Strichelung symbolisiert einen HIS-*Tag*.

Diese K-reiche Region wurde von Copeland und Kollegen als potenzielles Kernlokalisationssignal (*nuclear localization signal*; NLS) beschrieben. Sie weist Ähnlichkeiten mit der Kreichen Region von RBP138 auf, die im Rahmen dieser Arbeit als RNA-Bindungsdomäne identifiziert werden konnte (Abb. 2.10.1.B). Da die RNA-Bindungsdomäne von SBP2 nicht bekannt war, sollte experimentell untersucht werden, ob diese K-reiche Region von SBP2 an der SECIS-RNA-Bindung beteiligt ist. In diesem Fall würde die K-reiche Region des SBP2 ein neues Mitglied der K-reichen RNA-Bindungsmotiv-Familie darstellen.

Darüberhinaus sprachen weitere Punkte dafür, dass die K-reiche Region innerhalb von SBP2 kein NLS darstellt, sondern möglicherweise an der SECIS-RNA-Bindung beteiligt ist. Zum einen existierten keine experimentellen Daten, die auf eine Kernlokalisation des SBP2

hindeuteten, zum anderen konnte das SBP2 Protein vor seiner Klonierung aus cytoplasmatischen Extrakten aufgereinigt werden (Copeland et al., 1999), was für eine cytoplasmatische Lokalisation (neben der postulierten nukleären Lokalisation) des Proteins spricht.

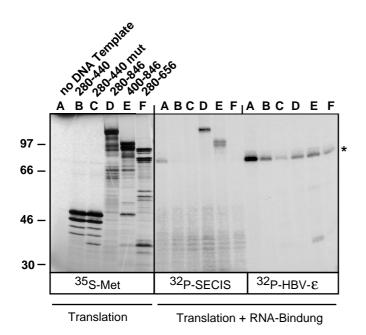
Um zu testen, ob die K-reiche Region an der Bindung der SECIS-RNA beteiligt ist, wurde das Bindungsverhalten von fünf unterschiedlichen SBP2-Fragmenten untersucht (Abb. 2.10.1.C). Sämtliche verwendeten SBP2-Fragmente begannen erst mit der AS 280 des SBP2 Proteins oder dahinter, denn die Arbeit von Copeland und Kollegen hatte gezeigt, dass die ersten 280 AS für die RNA-Bindung nicht notwendig sind (Copeland et al., 2000).

Die exprimierten SBP2-Proteinfragmente enthielten am N-Terminus einen HIS-*Tag* sowie eine 31-34 AS lange *Leader*-Sequenz. Das HISSBP2(280-656AS)-Fragment wies zusätzlich noch einen C-terminalen HIS-*Tag* auf. Das längste SBP2-Fragment, HISSBP2(280-846AS), besteht aus den AS 280-846 des SBP2 Proteins und enthält sowohl die K-reiche Region als auch das postulierte SUP1-RNA-Bindungsmotiv. Das HISSBP2(280-440AS)-Fragment enthält im wesentlichen die K-reiche Region. Das HISSBP2(280-440AS)mut-Fragment ist nahezu identisch mit HISSBP2(280-440AS), enthält jedoch eine mutierte K-reiche Region, in der die AS-Sequenz "KKKEK" durch die Sequenz "SGSEA" ersetzt ist. Ein vergleichbarer AS-Austausch führt in der K-reichen Region von RBP138 zu einer drastisch verminderten RNA-Bindungsaktivität (siehe Kap. 2.3.). Das vierte verwendete SBP2-Fragment, HISSBP2(280-656AS), reicht von AS 280 bis 656. Es enthält die K-reiche Region und endet unmittelbar vor dem putativen SUP1-RNA-Bindungsmotiv. Das HISSBP2(400-846AS)-Fragment beginnt dagegen erst kurz hinter der K-reichen Region und enthält den kompletten C-Terminus des SBP2 Proteins inklusive des SUP1-Motivs.

Die SBP2-Fragmente wurden zunächst durch gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation im Kaninchen-Retikulozytenlysat hergestellt, und anschließend weiter darin mit einer <sup>32</sup>P-markierten RNA-Sonde inkubiert. Als Sonden wurden dabei eine 218 Nt lange, aus 199 Nt des PHGPx-SECIS-Elements bestehende RNA (SECIS-RNA), oder die zuvor beschriebene 184 Nt lange HBV-ε-haltige RNA (HBV-ε-RNA) (siehe Kap. 2.3.1.) verwendet. Nach Inkubation der SBP2-Fragmente mit den RNA-Sonden wurden die Ansätze geteilt. Ein Teil jedes Ansatzes wurden für das UV-*Crosslinking* der RNA-Protein-Komplexe verwendet, der andere Teil zur Aufreinigung der HISSBP2-RNA-Komplexe aus dem Retikulozytenlysat über eine Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix durch immobilisierte Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC). Die Menge an gebundener markierter RNA wurde in den *Crosslinking*-Experimenten nach SDS-PAGE über Autoradiographie bestimmt, während die Quantifizierung der Menge an gebundener RNA in den aufgereinigten SBP2-RNA Komplexen über die Bestimmung der Cerenkov cpm im Szintillationszähler erfolgte. Zur Überprüfung der Translationseffizienz der verschiedenen HISSBP2-Fragmente wurden parallel zu den RNA-Bindungsansätzen *in vitro* Translationen in

Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin durchgeführt, wodurch die synthetisierten Proteine selbst markiert werden und die Menge an neusynthetisierten Proteinen bestimmt werden kann.

Die *Crosslinking*-Ansätze wurden nach UV-Bestrahlung einem RNase A Verdau zur Degradierung nicht-kovalent-proteingebundener RNA unterzogen. Anschließend wurden die kovalent durch die RNA markierten Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Autoradiographie nachgewiesen. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente mit anschließendem *Crosslinking* sind in Abb. 2.10.2. dargestellt.



**Abb. 2.10.2.** UV-*Crosslinking*-Bindungsexperimente mit SBP2-Fragmenten. Die SBP2-Fragmente wurden durch gekoppelte *in vitro* Transkription und Translation synthetisiert, und anschließend weiter mit einer <sup>32</sup>P-markierten RNA-Sonde (SECIS- bzw. HBV-ε-haltige RNA) im Kaninchen-Retikulozytenlysat inkubiert. Nach kovalenter Verknüpfung von Protein und gebundener RNA durch UV-Bestrahlung wurde nicht-kovalent-proteingebundene RNA degradiert. Die Proteine (mitsamt *gecrosslinkter* RNA) wurden im Anschluss über SDS-PAGE aufgetrennt, und autoradiographisch detektiert. Zur Bestimmung der Translationseffizienzen der einzelnen SBP2-Fragmente wurden parallel zu den Bindungsansätzen Translationen in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Met durchgeführt. Neben den Ansätzen mit den Abb. 2.10.1.C dargestellten SBP2-Fragmenten, diente ein Ansatz ohne DNA (no DNA Template) als Negativkontrolle. Ein endogenes, ca. 70 kDa großes, mit den RNA-Sonden interagierendes Retikulozytenlysat-Protein ist mit einem "\*" markiert.

Nur die zwei den kompletten C-Terminus inklusive des SUP1-Motivs aufweisenden SBP2-Fragmente, HISSBP2(280-846AS) und -(400-846AS), vermögen die SECIS-RNA-Sonde zu binden. Die drei anderen Proteinfragmente, die allesamt die K-reiche Region, aber nicht das SUP1-Motiv aufweisen, sind dagegen nicht zur Bindung der SECIS-RNA in der Lage. Dass dieses Ergebnis nicht auf unterschiedliche Mengen an HISSBP2-Fragmenten innerhalb der einzelnen Ansätze zurückgeht, zeigen die Translationsansätze mit <sup>35</sup>S-Methionin. Dabei ist zu erkennen, dass alle fünf SBP2-Fragmente in etwa gleicher Menge synthetisiert wurden, und somit auch in etwa gleiche Mengen der Fragmente in die Bindungsansätze eingingen. Neben der

Bande des *Full-Length* Proteins traten jeweils noch eine Vielzahl der für die *in vitro* Translation typischen Abbruchbanden auf, die keine (nachteiligen) Auswirkungen auf die Bindungsexperimente hatten.

Die beschriebenen UV-*Crosslinking* Bindungsstudien sprechen soweit gegen eine Beteiligung der K-reichen Region an der RNA-Bindung durch SBP2. Aus der Beobachtung, dass HISSBP2(400-846AS) SECIS-RNA-bindend ist, während HISSBP2(280-656AS) dazu nicht in der Lage ist, kann darüberhinaus ein Auftreten der RNA-Bindungsdomäne im C-terminalen Teil des SBP2-Polypeptids abgeleitet werden. In diesem Bereich des SBP2 Proteins befindet sich unter anderem das SUP1-Motiv (AS 666-687), das von Copeland und Kollegen als mögliches RNA-Bindungsmotiv von SBP2 beschrieben wurde. Die Daten der UV-*Crosslinking*-Experimente sprechen für eine Beteiligung dieses Abschnitts innerhalb von SBP2 an der SECIS-Bindung.

Im Gegensatz zu den Ansätzen mit der SECIS-Sonde tritt in den Ansätzen mit der HBV-E-RNA-Sonde keine RNA-Bindung durch die HISSBP2-Fragmente auf. Es ist lediglich eine Bindung der HBV-E-RNA durch ein endogenes, ca. 70 kDa Protein zu beobachten. Das Nichtbinden der HBV-E-RNA durch die SBP2-Fragmente unterstreicht zum einen die zuvor beschriebene die Spezifität der RNA-Bindung durch SBP2 (Copeland et al., 1999), und zum anderen die Spezifität des UV-*Crosslinking* Assays selbst.

In den zweiten durchgeführten RNA-Bindungsstudien, der Aufreinigung der HISSBP2-RNA-Komplexe über IMAC und anschließende Quantifizierung der gebundenen RNA im Szintillationszähler, ergab sich ein identisches Bild wie zuvor schon bei den Crosslinking-Experimenten. Nach Aufreinigung der Komplexe und mehreren Waschschritten war einzig bei den beiden Fragmenten HISSBP2(280-846AS) und -(400-846AS) gebundene SECIS-RNA nachzuweisen, während bei den übrigen drei Fragmenten keine über den unspezifischen Hintergrund hinausreichende RNA-Bindung nachweisbar war (siehe Tab. 2.10.1.). In den Ansätzen der beiden SECIS-bindenden Fragmente wurden jeweils rund 400.000 Cerenkov cpm gezählt, bei den Ansätzen der nicht-bindenden Fragemente waren es dagegen maximal 14.000. In dem als Negativkontrolle dienenden Ansatz ohne SBP2-Fragment, der die unspezifische Hintergrundbindung des Assays darstellt, wurden ebenfalls nur etwa 12.000 cpm gezählt. In diesem zweiten RNA-Bindungsassay findet sich auch die schon zuvor in den Crosslinking-Experimenten beobachtete Spezifität der RNA-Bindung durch die SBP2-Fragmente wieder. So führt auch hier die Verwendung von HBV-E-RNA in keinem Fall zu einer über den Hintergrund hinausgehenden RNA-Bindung. Für sämtliche SBP2-Fragmente einschließlich der Negativkontrolle blieben die Cerenkov cpm unter einem Wert von 12.000. Der der zweite eingesetzte Bindungsassay bestätigt somit vollständig alle in den Crosslinking-Experimenten erhaltenen Ergebnisse.

Beide Assays sprechen eindeutig gegen eine Beteiligung der K-reichen Region von SBP2 an der SECIS-RNA-Bindung. Es kann zudem abgeleitet werden, dass die RNA-Bindungsdomäne im hinteren Drittel des SBP2-Polypeptids lokalisiert sein muss. Es scheint daher als durchaus wahrscheinlich, dass das postulierte SUP1-RNA-Bindungsmotiv die RNA-Bindungsdomäne von SBP2 darstellt. Die bloße Anhäufung von Lysin-Resten führt also nicht "automatisch" zur RNA-Bindung, was umgekehrt für eine gewisse Spezifität des K-reichen Motivs im RBP138 Protein spricht.

**Tab. 2.10.1.** An die Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix gebundene Radioaktivität (in Cerenkov cpm) nach IMAC-Aufreinigung der HISSBP2-RNA-Komplexe aus dem Kaninchen-Retikulozytenlysat.

In vitro translatierte HISSBP2-Fragmente	gebundene SECIS-RNA (Cerenkov cpm)*	gebundene HBV-E-RNA (Cerenkov cpm)*
Ø	12230	8330
280-440AS	9360	9080
280-440AS mut	8870	6950
280-846	417060	9600
400-846	385190	8130
280-656	13930	10590

<sup>\*</sup> Input-RNA betrug ca. 1,9 x $10^6$  Cerenkov cpm pro Ansatz  $\varnothing$  Negativkontrolle: *in vitro* Transkription und Translation ohne DNA-Template

### 3. Diskussion

Den Ausgangspunkt der vorliegenden Arbeit stellte die im Rahmen der Diplomarbeit isolierte NIII-cDNA dar (S.G. Kreft, 1996). Sie war in einem NW-Screen einer Humanleber-cDNA-Phagenexpressionsbank zur Identifizierung zellulärer Interaktionspartner des HBV-RNA-Prägenoms aufgrund der Affinität des von ihr codierten Proteins gegenüber der verwendeten HBV ε-haltigen RNA-Sonde isoliert worden. Die cDNA enthielt ein kurzes 5′-UTR und einen 1998 Bp langen ORF und war am 3′-Ende unvollständig. Das NIII-Protein stellte ein neues Protein ohne offensichtliche Homologien zu bereits bekannten Proteinen dar. Aufgrund der Tatsache, dass das NIII-Protein im NW-Blot die HBV ε-haltige RNA-Sonde zu binden vermochte, konnte von dem Auftreten eines neuen, bisher unbeschriebenen RNA-Bindungsmotivs innerhalb des NIII-Proteins ausgegangen werden. Ein erstes Ziel war zunächst die Vervollständigung der am 3′-Ende inkompletten NIII-cDNA. Daneben wurde das erwartete neue RNA-Bindungsmotiv kartiert und eingehender charakterisiert. Darüberhinaus wurde das neue Protein hinsichtlich seiner subzellulären Lokalisation und seiner Expression in verschiedenen Geweben untersucht. Mit der Verfügbarkeit eines Teils der genomischen Sequenz konnte zudem die Intron-Exon Struktur des rbp138 Gens abgeleitet werden.

# 3.1. Identifizierung der RBP138 und RBP35 ORFs und der partiellen genomischen Sequenz des rbp138 Gens

Zu Beginn der Arbeit wurde zunächst die NIII-cDNA vervollständigt. Nachdem in den Datenbanken keine mit der NIII-cDNA überlappenden Sequenzen, die das fehlende 3′-Ende hätten enthalten können, zu finden waren, ergab das *Screenen* verschiedener Human-cDNA-Banken mit einer NIII-spezifischen Sonde vier unabhängige positive, mit der NIII-Sequenz überlappende cDNA-Klone. Davon stellte einer (H14173) eine cDNA mit komplettem 3′-Ende dar, und verlängerte den NIII-ORF um 1630 Bp zu einer Gesamtlänge von 3627 Bp. Dieser ORF wurde RBP138 (RNA-Bindungsprotein 138 kDa) genannt, nach der Größe des von ihm codierten Proteins und der Fähigkeit RNA zu binden. Die Existenz des postulierten 3627 Bp langen RBP138-ORF wurde kurz darauf durch die Veröffentlichung einer cDNA (KIAA0675) mit dem kompletten RBP138-ORF in der *GenBank*-Datenbank bestätigt. Wie die NIII-Sequenz, so wiesen auch die isolierten, mit der NIII-Sequenz überlappenden cDNA-Klone zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung keine ausgeprägten Homologien zu bekannten Sequenzen auf.

Zwei der vier isolierten cDNAs codierten für ein verkürztes, nur 303 AS langes Protein mit einem theoretischen Molekulargewicht von 35 kDa. Diese Isoform, die aus den ersten 301 AS des RBP138 sowie zwei weiteren AS besteht, wurde RBP35 genannt. Das Auftreten zwei voneinander unabhängiger, für die kurze Isoform codierender cDNA-Klone spricht dafür, dass es

sich dabei nicht um ein bei der Herstellung der cDNA entstandenes Artefakt handelt, sondern die RBP35 Isoform mit großer Wahrscheinlichkeit wirklich existiert.

Der letzte der isolierten cDNA-Klone (B2269) verlängert den NIII ORF um 286 Bp. Davon sind die ersten 203 Bp identisch mit RBP138, während sich die dahinterliegenden 83 Bp von der RBP138-Sequenz unterscheiden. Nach Größe des von diesem ORF codierten, postulierten Proteins wurde das Leseraster RBP87-ORF genannt. Ein Vergleich dieses cDNA-Klons mit der bisher bekannten, partiellen genomischen Sequenz legt allerdings nahe, dass dieser Klon auf ein unvollständig gespleißtes Transkript zurückgeht, und somit höchstwahrscheinlich das von diesem Transkript codierte 87 kDa Protein *in vivo* nicht existiert (siehe unten).

Im Rahmen des Projekts zur Sequenzierung des menschlichen Genoms (Human Genome Project) wurde mittlerweile die partielle genomische Sequenz des postulierten rbp138 Gens in der HTGS-Datenbank (High Throughput Genomic Sequences), die die noch nicht vollständig assemblierten Sequenzdaten enthält, veröffentlicht. Die Sequenz des rbp138 Gens ist teilweise, d.h. bis Position 2423 des RBP138-ORF, in dem in der HTGS-Datenbank veröffentlichten Sequenz des Bacmids RP11-161J9 enthalten. Da das Bacmid selbst auf einen Abschnitt des Chromosoms 3 zurückgeht, kann das rbp138 Gen somit Chromosom 3 zugewiesen werden. Das Bacmid ist bisher jedoch noch nicht vollständig sequenziert. Der sequenzierte Teil besteht aus 27 nicht-überlappenden Abschnitten (Contigs), die in zufälliger Reihenfolge und Orientierung zueinander angegeben sind. Mit Hilfe der Sequenzen der isolierten NIII/RBP-cDNAs und der KIAA0675-cDNA konnten die Contigs teilweise geordnet und ein Großteil der Sequenz des rbp138 Gens bis zur Pos. 2423 des ORFs abgeleitet werden. Die Sequenz des rbp138 Gens vom 5'-UTR bis zur Pos. 2423 besteht aus 22 Exons und ebensovielen Introns und umfasst mehr als 70 kBp. Die exakte Größe lässt sich nicht angeben, da die Größe der Lücken zwischen den einzelnen Contigs nicht bekannt ist. Alle zugewiesenen Exons sind vollständig auf den Contigs enthalten, während sich einige Introns über zwei Contigs erstrecken und daher eine Lücke unbekannter Größe aufweisen. Die Größe der Exons reicht von 26 Bp bis 618 Bp, die der Introns von 157 Bp bis mindestens 7418 Bp.

Die cDNA-Daten lassen sich sehr gut mit der genomischen RBP138-Sequenz in Einklang bringen. Alle abgeleiteten Introns besitzen jeweils Spleiß-Donor- und -Akzeptor-Konsensussequenzen. Der Vergleich des postulierten RBP87-ORF mit der genomischen Sequenz lässt vermuten, dass die RBP87-Isoform höchstwahrscheinlich keine eigene RBP-Isoform darstellt, da die für sie codierende cDNA (B2269) an ihrem Ende noch das Intron XX enthält. Da sie daher sehr wahrscheinlich auf eine unvollständig gespleißte RNA zurückgeht, ist die Existenz der RBP87-Isoform *in vivo* unwahrscheinlich.

Im Gegensatz dazu lässt sich die postulierte RBP35 Isoform vollständig aus der genomischen Sequenz ableiten. Das RBP35-Transkript mit dem kurzen RBP35-ORF entsteht durch die Verwendung einer alternativen 5'-Spleiß-Stelle, wodurch ein frühzeitiges Stop-Codon entsteht.

Interessanterweise enthalten die beiden isolierten, für den RBP35-ORF codierenden cDNAs (C1754 und N0865) beide noch das Intron XVII (im 3'-UTR). Es ist denkbar, dass sowohl die Verwendung der alternativen 5'-Spleiß-Stelle als auch das Nichtherausspleißen des Introns XVII miteinander in Zusammenhang stehen. Möglicherweise gehen die unterschiedlich gespleißten RBP35- und RBP138-mRNAs aus einer Prozessierung durch unterschiedlich zusammengesetzte Spleißosomen hervor.

Auch wenn die Funktion des kurzen RBP35 Proteins zur Zeit noch nicht verstanden ist, so ist dennoch vorstellbar, dass durch den alternativen Spleißvorgang, der zur Generierung der RBP35-mRNA anstelle der RBP138-mRNA führt, letztendlich die Menge an RBP138 Protein reguliert wird. Ein bekanntes Beispiel für die Regulation der Expression eines Proteins durch die Verwendung alternativer Spleiß-Stellen ist das Transformer (Tra) Protein von Drosophila, das eine essentielle Rolle bei der Geschlechtsdetermination spielt (Übersicht: Lopez, 1998). Diese verläuft bei Drosophila über eine Kaskade von alternativen Spleiß-Vorgängen bei verschiedenen Prä-mRNAs, die letztendlich zu einer geschlechtsspezifischen Expression das Geschlecht determinierender Gene führt. Die tra Prä-mRNA stellt ein solches geschlechtsspezifisch gespleißtes Transkript dar. In Embryos, die aufgrund der Zusammensetzung ihres Chromosomensatzes dazu bestimmt sind Männchen zu werden, wird das tra-Transkript so gespleißt, dass ein trunkiertes, inaktives Tra Protein codiert wird. In Embryos, die sich zu einem Weibchen entwickeln sollen, wird dagegen eine alternative 3'-Spleiß-Stelle auf der tra Prä-mRNA benutzt. Dadurch kommt es zu dem Herausspleißen eines ein Stop-Codon enthaltenden Exons (exon skipping), woraus schließlich ein Transkript hervorgeht, das für ein funktionsfähiges Tra Protein codiert. Die Verwendung der alternativen 3'-Spleiß-Stelle innerhalb der tra Prä-mRNA wird in *Drosophila* über das Weibchen-spezifische Sex-lethal (Sxl) Protein gesteuert.

Ähnlich wie in dem Fall des Tra Proteins bei *Drososphila* könnte auch die Expression von RBP138 durch das alternatives Spleißen der RBP138 Prä-mRNA reguliert sein. Hierbei ist zu erwähnen, dass die kleine RBP35-Isoform nicht die als RNA-Bindungsmotiv identifizierte K-reiche Region enthält, und somit, zumindest was die RNA-Bindungskapazität angeht, als inaktive RBP138-Isoform angesehen werden kann. Im Gegensatz zum *Drosophila* Tra Protein schließt sich die Expression der beiden RBP-Isoformen jedoch nicht gegenseitig aus. So war in Northern-Blots (vgl. Kap. 2.5.) ein Auftreten der Transkripte beider Isoformen nebeneinander im gleichen Gewebe zu beobachten. Dabei blieb das Verhältnis der beiden Transkripte untereinander in den untersuchten Geweben weitgehend unverändert. Dies würde bedeuten, dass ein festgelegter Anteil der RBP138 Prä-mRNAs *per se* alternativ gespleißt wird, und dass sich dieser Anteil in verschiedenen Geweben kaum ändert.

### 3.2. Identifizierung der K-reichen Region als neues RNA-Bindungsmotiv

Das NIII Protein (= RBP1-666) wurde aufgrund seiner Fähigkeit, HBV ε-haltige RNA zu binden, identifiziert. Da innerhalb des Proteins aber kein bekanntes RNA-Bindungsmotiv identifiziert werden konnte, könnte ein bisher unbeschriebenes Bindungsmotiv innerhalb des NIII-Polypeptids vorkommen. Über Kartierungsexperimente in Form von NW-Blots und Bindungsstudien in Lösung konnte eine am unmittelbaren C-Terminus von NIII auftretende K-reiche Region als für die RNA-Bindung absolut notwendige Region identifiziert werden. In den in diesem Zusamenhang durchgeführten Bindungsstudien führten sowohl C-terminale Deletionen, als auch AS-Austausche innerhalb dieser Region zu einer drastischen Verminderung der RNA-Bindeaktivität. Die K-reiche Region besteht in dem NIII Protein(fragment) aus sieben Lysin-Resten und einem Arginin-Rest in einem Abschnitt von 11 AS (Abb. 3.2.1.). In dem kompletten RBP138 Protein besteht die K-reiche Region aus insgesamt 11 Lysin-Resten innerhalb von 19 AS.

Über die Art der Interaktion dieses Motivs mit RNA kann in Abwesenheit experimenteller Daten nur spekuliert werden. Es ist vorstellbar, dass die Region durch die stark positiven Ladung über elektrostatische Wechselwirkungen mit dem negativ geladenen Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA interagiert. Ein Beispiel für eine Interaktion eines positiv geladenen AS-Motivs mit RNA stellt das HIV-1 Tat Protein dar. Es ist ein Transaktivatorprotein, das die virale Genexpression durch Bindung des am 5'-Ende jedes viralen Transkripts vorkommenden strukturierten TAR-RNA-Elements (*transactivation response element*) aktiviert (Berkhout et al., 1989). Im Tat Protein besteht die positiv geladene Region aus sechs Arginin- und zwei Lysin-Resten innerhalb eines 9 AS Abschnitts (Abb. 3.2.1.). Diese hochkonservierte basische Region gehört zur Familie der Arginin-reichen RNA-Bindungsmotive (*arginine-rich motif*; ARM), die durch ein vermehrtes Auftreten von Arginin-Resten innerhalb eines kurzen, 10-20 AS langen Sequenzabschnittes gekennzeichnet sind (Lazinski et al., 1989; Kurzübersicht: Burd & Dreyfuss, 1994a).

```
K-reiche Region RBP138: ...KSKQRKKKKTKNKKNK... (AS656-671)

ARM HIV-1 Tat Protein: ...RKKRRQRRR... (AS49-57)
```

**Abb. 3.2.1.** AS-Sequenzen der K-reichen Region von RBP138 und des Arginin-reichen RNA-Bindungsmotivs (ARM) des HIV-1 Tat Proteins. Der in dem NIII-Fragment (=RBP1-666) vorkommende Teil der K-reichen Region ist mit einer Linie gekennzeichnet.

Die verschiedenen bekannten ARM-Proteine weisen auf Strukturebene vermutlich keine Gemeinsamkeiten auf, und nehmen, zumindest im Fall des Tat Proteins, erst mit Bindung der RNA eine distinkte, stabile Konformation an. Peptide mit dem Tat ARM-Motiv zeigen in *in vitro* Bindungsstudien ein mit dem kompletten Tat Protein vergleichbares TAR-RNA-Bindungsverhalten (Churcher et al., 1993). Interessanterweise können in dem Peptidkontext beinahe alle Arginin-Reste innerhalb des Motivs gegen Lysin-Reste ausgetauscht werden, ohne dass sich die TAR-RNA-Bindung dabei dramatisch vermindert (Calnan et al., 1991a,b). Das Auftreten eines einzigen Arginin-Restes in einem stark basischen Kontext scheint das einzige Kriterium für eine spezifische Bindung der TAR-RNA durch das Tat-Peptid bzw. davon abgeleitete Peptide zu sein. Den basischen AS kommt dabei die Aufgabe zu, das RNA-Rückgrat über elektrostatische Wechselwirkungen mehr oder minder unspezifisch zu binden, wodurch wiederum eine (spezifische) Ausrichtung des Arginin-Restes unterstützt wird. Es spielt dabei keine große Rolle, ob der basische Kontext auf Arginin- oder Lysin-Reste zurückgeht.

Die Ergebnisse von Calnan und Kollegen zeigen prinzipiell, auch wenn sie auf die Untersuchung von Peptiden und nicht natürlicherweise vorkommender Sequenzen zurückgehen, dass eine K-reiche Region zur Bindung von RNA fähig ist. In Analogie zur TAR-RNA-Bindung durch Tat, kann für RBP138 und dessen K-reiche Region spekuliert werden, ob die Mehrzahl der Lysin-Reste der K-reichen Region auch eine eher unspezifische Bindung von RNA bewirkt, und die innerhalb der Region vorkommenden Nicht-Lysin AS, oder auch andere Teile des Proteins letztendlich für die (vermutete, aber noch nicht gezeigte) Spezifität verantwortlich zeichnen.

Auch wenn sich durch das Auftreten einer stark basischen Region Parallelen zwischen der K-reichen Region des RBP138 Proteins und dem ARM RNA-Bindungsmotiv ergeben, so bleibt festzustellen, dass in der Literatur bisher noch keine natürlich vorkommende K-reiche Region als RNA-Bindungsdomäne beschrieben wurde. Daher ist die K-reiche Region von RBP138 als ein neues RNA-Bindungsmotiv anzusehen.

Das Auftreten mehrerer Lysin-Reste innerhalb eines kurzen Sequenzabschnitts ist auch ein Kennzeichen von einteiligen (*monopartite*) Kernlokalisationssignalen (*nuclear localization signals*; NLS) (Übersicht: Dingwall & Laskey, 1991). Klassisches Beispiel für ein solches NLS stellt die basische Region ("KKKRK") des SV40 großen T-Antigens dar (Kalderon et al., 1984). Das aus vier Lysin- und einem Arginin-Rest aufgebaute Motiv weist aufgrund des Auftretens mehrerer Lysin-Reste hintereinander eine gewisse Ähnlichkeit mit der K-reichen Region von RBP138 auf. Es lag daher die Vermutung nahe, dass die K-reiche Sequenz auch als NLS fungieren könnte. So dient z.B. die bereits erwähnte basische Region des HIV-1 Tat Proteins sowohl als RNA-Bindungsdomäne, als auch als NLS (Hauber et al., 1989; Siomi et al., 1990). Die in Lokalisationsstudien in transfizierten Huh7 Zellen beobachtete, ausschließlich cytoplas-

matische Verteilung diverser RBP-eGFP-Fusionsproteine (vgl. Kap. 2.8.1.), ist jedoch ein eindeutiger Hinweis dafür, dass die K-reiche Region hier, zumindest im Kontext eines Fusionsproteins mit eGFP, kein funktionelles NLS darstellt.

Um herauszufinden, ob neben RBP138 weitere Proteine mit einem K-reichen RNA-Bindungsmotiv exisitieren, wurde das erst kürzlich identifizierte SBP2 Protein (SECIS RNA binding protein 2; Copeland et al., 2000) untersucht. SBP2 besitzt eine K-reiche Region ("KKNKKKKEKSK") und bindet spezifisch das im 3′-UTR von mRNAs einiger Selenoproteine vorkommende SECIS-RNA-Element (selenocysteine insertion sequence), wobei die Bindung von SBP2 an das SECIS-Element essentiell für den Einbau von Selenocystein ist. Da die an der Bindung der SECIS-RNA beteiligte Region innerhalb des SBP2-Polypeptids noch nicht bekannt war, und die K-reiche Region von SBP2 der von RBP138 zu einem gewissen Grad ähnelt, wurde untersucht, ob diese Region die RNA-Bindungsregion des SBP2 Proteins darstellt. Bindungsstudien im Retikulozytenlysat mit SBP2-Fragmenten mit und ohne K-reicher Region und SECIS-RNA zeigten allerdings eindeutig, dass diese Region nicht an der SECIS-RNA-Bindung beteiligt ist (vgl. Kap. 2.10.), und somit auch kein weiteres Beispiel für eine K-reiche RNA-Bindungsregion darstellt.

Dennoch bleibt festzuhalten, dass die K-reiche Region innerhalb des RBP138 Proteins ein neues RNA-Bindungsmotiv darstellt. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die K-reiche Region, trotz ihrer Ähnlichkeit mit den klassischen, basischen NLS Sequenzen, keine kernlokalisierende Eigenschaft besitzt.

# 3.3. Geringe Spezifität der RNA-Bindung durch RBP138 und RBP510-878 ?

Nach der auf der Bindung von HBV-E-haltiger RNA basierenden Identifizierung des NIII Proteins stellte sich die Frage nach der Spezifität der Interaktion von NIII (und später RBP138) mit RNA. Es wurde deshalb untersucht, ob das RBP138 Protein neben der HBV-E-haltigen RNA noch weitere RNAs bindet. Da sich das komplette RBP138 Protein von 138 kDa nur sehr schlecht in *E. coli* exprimieren ließ, wurde in den Bindungsstudien das NIII-Fragment (=RBP1-666) oder RBP510-878 (hier kurz: RBP) verwendet. Die Untersuchung der Bindungsspezifität erfolgte unter Verwendung verschiedener heterologer RNA-Sonden in NW-Blot als auch in Bindungsstudien in Lösung. Unter den getesteten Sonden befanden sich stark strukturierte RNAs, wie z.B. die HIV-1 TAR-RNA, und auch eine komplett unstrukturierte, einzelsträngige RNA, die AMV-*Leader*-Sequenz-RNA. Trotz der großen strukturellen Unterschiede der untersuchten RNAs wurden alle getesteten Sonden im NW-Blot von NIII gebunden, was auf eine geringe Spezifität der RNA-Bindung seitens des RBP138 Proteins schließen

ließ. Dennoch konnte die beobachtete Bindungsspezifität auch nicht völlig unspezifisch sein, da die Bindungsstudien bei einem ca. 100fachen Überschuss an unmarkierter Hefe-tRNA und Heringssperma-DNA durchgeführt wurden, wodurch sämtliche unspezifischen RNA-Bindungsstellen abgeblockt werden sollten.

Ergebnisse aus In-Lösung-Bindungsstudien bestätigen die in den NW-Blots beobachtete geringe Selektivität von RBP. So wurden auch in diesen Studien sämtliche getesteten RNA-Sonden von RBP gebunden, wobei kleine Unterschiede hinsichtlich des Bindungsverhaltens der einzelnen Sonden auftraten. Die ausschließlich in den Bindungsstudien in Lösung untersuchte, im Wesentlichen nur aus der HBV ε-Sequenz bestehende und damit stark strukturierte "HBV ε only" RNA wurde etwa 3-4fach schlechter gebunden als die übrigen Sonden. Dies deutet darauf hin, dass RNAs mit ausgeprägter Sekundärstruktur von RBP weniger effizient gebunden werden.

Es wurde weiter untersucht, ob bei der Bindung homopolymerer RNAs erkennbare Unterschiede hinsichtlich der Bindungsstärke auftreten. Dazu durchgeführte Kompetitionsexperimente in Lösung mit markierter HBV ε-haltiger RNA sowie unmarkierten homopolymeren RNAs als Kompetitoren zeigten deutlich, dass RBP präferenziell die beiden Homopolymere Poly-A und Poly-U bindet. Bei einer Kompetitorkonzentration von 10 μg/ml, was bereits einem großen Überschuss gegenüber der markierten HBV ε-haltigen RNA entspricht, kompetierten Poly-A und Poly-U etwa 10x stärker als Poly-C und Poly-G. Doppelsträngige Poly-I: Poly-C RNA erwies sich als schlechterer Kompetitor als sämtliche RNA-Homopolymere. Damit wurde deutlich, dass Doppelstrang-RNA von RBP weniger effizient gebunden wird als homopolymere RNAs. Diese experimentellen Daten zeigen, dass RBP in der Lage ist, zwischen verschiedenen homopolymeren RNAs zu diskriminieren, was für eine gewisse Spezifität bei der Bindung spricht.

Die Ergebnisse der Experimente zur Spezifitätsbestimmung zusammengefasst, scheint RBP nur eine relativ geringe Selektivität bei der Bindung von RNA-Molekülen aufzuweisen. Damit ist das RNA-Bindungsverhalten von RBP grundsätzlich dem vieler hnRNP Proteine ähnlich (Übersicht: Dreyfuss et al., 1993). Diese sind an Vorgängen wie der Prozessierung von PrämRNA sowie dem Export der mRNA beteiligt. Für die meisten hnRNP Proteine wurde *in vitro* ebenfalls die Bindung vieler unterschiedlicher RNAs nachgewiesen, woraus für sie eine eher unspezifische RNA-Bindung abgeleitet wurde. Bei stringenteren Bedingungen, wie z.B. einer Salzkonzentration von 2 M NaCl, zeigen die hnRNP Proteine eine Selektivität gegenüber einzelnen RNA-Homopolymeren. So bindet hnRNP F Protein z.B. Poly-G besser als die übrigen Homopolymere, während hnRNP P eine höhere Affinität zu Poly-A als zu den anderen Homopolymeren aufweist. Aus dem Bindungverhalten gegenüber einzelnen RNA-Homopolymeren

konnten von den einzelnen hnRNP Proteinen bestimmte Präferenzen bezüglich ihrer RNA-Bindung abgeleitet werden. Diese erlaubten zum Teil auch Vorhersagen über die Bindungsstelle eines hnRNPs auf einer Prä-mRNA. In vielen Fällen binden hnRNP Proteine eine bestimmte RNA-Sequenz präferenziell, darüberhinaus sind sie aber jeweils noch in der Lage, ein großes Spektrum an RNA-Molekülen, wenn auch mit stark unterschiedlichen Affinitäten, zu binden. Dies wird auch am Beispiel des hnRNP A1 Proteins deutlich: Das hnRNP A1 bindet die 5′- und 3′-Spleiß-Stellen auf der Prä-mRNA und ist an deren Prozessierung beteiligt. Es weist eine sehr hohe (1x 10-9 M) Affinität gegenüber einer synthetischen, in *in vitro* Selektionsexperimenten identifizierten RNA-Sequenz auf (Burd & Dreyfuss, 1994b). Im Vergleich dazu werden 5′- und 3′-Spleiß-Stellen mit 70fach geringerer Affinität (7x 10-8 M). gebunden, und eine intronische Sequenz weist eine etwa 300fach niedrigere Affinität (3x 10-7 M) gegenüber dem hnRNP A1 Protein auf. Dies zeigt deutlich, dass RNA-Bindungsspezifität nicht ausschließlich mit Binden oder Nicht-Binden eines RNA-Moleküls gleichgesetzt werden kann, sondern vielmehr graduelle Unterschiede in den Bindungsaffinitäten gegenüber unterschiedlichen RNAs angibt.

Ähnlich könnte RBP zu vielen unterschiedlichen RNA-Sequenzen eine relativ geringe Affinität aufweisen und daher auch in den in vitro Bindungsstudien eine Vielzahl unterschiedlicher RNAs binden. Darüberhinaus kann in Analogie zu den hnRNP Proteinen darüber spekuliert werden, ob eine (oder auch mehrere) RNA-Sequenzen existieren, die von RBP präferenziell und mit hoher Affinität gebunden werden. Die Identifizierung dieser postulierten RNA ist prinzipiell durch in vitro Selektionsexperimente (Tuerk & Gold, 1990) möglich. Dabei wird die optimale RNA-Bindungssequenz aus einem Pool randomisierter RNA-Sequenzen über mehrere Runden von Bindung der RNA und anschließender Reamplifikation der gebundenen RNA selektioniert. Hierbei wird die RNA-Sequenz mit der höchsten Bindungsaffinität selektioniert. In der Datenbank kann dann nach mRNAs mit identischem Sequenzmotiv gesucht werden, und im weiteren getestet werden, ob sie von RBP ebenfalls mit hoher Affinität gebunden werden. Ein Nachteil bei dieser Vorgehensweise ist jedoch, dass es auch zur Selektion nicht natürlich vorkommender Sequenzen kommen kann, die möglicherweise keine eindeutigen Hinweise auf die zelluläre Ziel-RNA eines Proteins geben. Die in vivo Ziel-RNA(s) könnten durch Co-Immunpräzipitation im Komplex mit RBP aus Zellextrakten isoliert, und nach Extraktion und RT-PCR-Amplifikation mit einem Pool an randomisierten Primern identifiziert werden (Methode: Trifillis et al., 1999; Brooks et al., 2000). Diese Vorgehensweise hat den Vorteil, dass sich die RNA-Proteinkomplexe unter in vivo Bedingungen in der Zelle bilden, und somit weitgehend die natürliche Situation wiedergeben.

Die in den zwei *in vitro* RNA-Bindungssystemen beobachtete geringe Selektivität der RNA-Bindung durch RBP kann mehrere Ursachen haben. So könnten für die Ausbildung der Spezifität das komplette RBP138 Protein und/oder zusätzliche akzessorische Proteine notwendig

sein. In diesem Zusammenhang könnte die Verwendung von Fragmenten von RBP138 anstelle des Full-Length Proteins einen Einfluss auf die Spezifität und/oder Stärke der RNA-Bindung genommen haben. So ist es möglich, dass innerhalb des RBP138 Polypeptids neben der Kreichen Region noch weitere, entfernt liegende Bereiche für die Ausbildung einer starken RNA-Protein-Interaktion notwendig sind. Eine deutlich stärkere RNA-Bindung (Affinität) eines Full-Length Proteins verglichen mit einem das RNA-Bindungsmotiv enthaltenden Proteinfragment wurde vor kurzem für die ausschließlich im Zentralnervensystem exprimierten und eng mit hnRNP K und hnRNP E Proteinen verwandten RNA-Bindungsproteine Nova-1 und -2 beschrieben (Jensen et al., 2000). So zeigten etwa 100 AS große, das von dem RNA-Bindungsmotiv von hnRNP K abgeleitete K-Homologie RNA-Bindungsmotiv (KH-Domäne) enthaltende Fragmente eine um den Faktor 200 verringerte Affinität gegenüber einer 21 Bp langen, aus einem Stem-Loop bestehenden RNA als die 510 bzw. 492 AS langen Full-Length Nova-1 und -2 Proteine. Dabei ist nicht geklärt, ob die Affinität gegenüber der RNA beim kompletten Protein erhöht ist, weil die KH-RNA-Bindungsdomäne im Kontext des kompletten Proteins per se eine höhere Affinität gegenüber der RNA aufweist, oder ob eine Dimerisierung der Nova-Proteine (die bei den Fragmenten aufgrund des Fehlens der Dimerisierungsdomäne nicht möglich ist) zu einer erhöhten Affinität führt. Gleiches könnte auch für das RBP138 Protein zutreffen und dazu führen, dass die Affinität des kompletten RBP138 Proteins höher ist als die in den Bindungsstudien beobachteten Affinitäten der verwendeten RBP-Proteinfragmente.

Darüberhinaus könnte die RNA-Bindungsspezifität des RBP138 Proteins von einem zusätzlichen akzessorischen Protein abhängig sein und erst in einem Komplex mit weiteren Proteinen vollständig ausgebildet werden. Die Abhängigkeit einer spezifischen RNA-Bindung von zusätzlichen Proteinen ist z.B. für die hepadnavirale Polymerase (P-Protein) gezeigt. So kann die hochspezifische Bindung der viralen Polymerase an die strukturierte E-Sequenz auf dem Virus RNA-Prägenom, die zugleich die Reverse Transkription des Prägenoms einleitet, nur erfolgen, wenn die Polymerase mit mehreren Chaperonen komplexiert ist (Hu & Seeger, 1996). In Abwesenheit der Chaperone liegt die Polymerase nicht in einer RNA-bindungskompetenten Konformation vor und kann deshalb auch nicht mit der E-Sequenz interagieren. Möglicherweise benötigt RBP138 ebenfalls einen oder mehrere zusätzliche zelluläre Faktoren für die Ausbildung seiner Spezifität. Hierbei ist zu erwähnen, dass die in vitro Bindungsstudien mit den RBP-Fragmenten mit bakteriell exprimierten Proteinen, also in Abwesenheit weiterer eukaryontischer Proteine, durchgeführt wurden. Um die Abhängigkeit der Spezifität von zellulären Co-Faktoren zu untersuchen, könnten RNA-Bindungsstudien in Zellextrakten, wie z.B. dem Kaninchen-Retikulozytenlysat oder Extrakten von Zellinien humanen Ursprungs durchgeführt werden.

Vielleicht ist die RNA-Bindungsspezifität der verwendeten RBP-Fragmente aber nicht tatsächlich so gering, wie es nach den durchgeführten Bindungsstudien den Anschein hat. Möglicherweise existieren doch deutliche Unterschiede in der Bindungsstärke der einzelnen verwendeten RNA-Sonden, die aber in den In-Lösung-Bindungsstudien nicht zum Vorschein kamen, da das RBP Protein in ca. 10fachen Überschuss gegenüber den markierten RNA-Sonden vorlag. Dies bedeutet, dass in einem Bindungsansatz mehr potenzielle Bindestellen vorhanden waren als RNA-Sonden. Aufgrunddessen wurden neben eventuellen hochaffinen Bindungen auch Interaktionen mit einer geringeren Affinität erfasst. Andererseits ist aber auch zu bedenken, dass sämtliche Experimente mit einem mindestens 100fachen Überschuss an Hefe-tRNA als unspezifischem RNA-Kompetitor gegenüber den markierten RNA-Sonden durchgeführt wurden, so dass wiederum von einer gewissen Spezifität bei der RNA-Bindung ausgegangen werden muss. Darüberhinaus wurden die In-Lösung-Bindungsstudien bei relativ stringenter Salzkonzentration (350 mM NaCl) durchgeführt, was ebenfalls niederaffine RNA-Protein-Interaktionen verhindern sollte.

Da letztendlich nur die Kenntnis der Affinität von RBP zu den einzelnen RNA-Sonden Aufschluss über die Spezifität von RBP gibt, sollten diese als nächstes experimentell bestimmt werden. Dazu müssten Bindungsstudien mit einer konstanten Menge an markierter RNA bei verschiedenen Proteinkonzentrationen durchgeführt werden (Methode u.a. Carey et al., 1983). Es ist gut möglich, dass die verschiedenen RNA-Sonden unterschiedliche Affinitäten gegenüber RBP besitzen, und die RNA-Bindung durch RBP in Wirklichkeit spezifischer ist, als es nach den NW-Blot- und In-Lösung-Bindungsstudien den Anschein hat. Daneben besteht aber auch immer noch die Möglichkeit, dass die Ziel-RNA, die von RBP138 spezifisch gebunden wird, nicht unter den untersuchten Sonden vertreten war und erst noch identifiziert werden muss.

# 3.4. Expressionsmuster und subzelluläre Lokalisation von RBP138 und RBP35

Die Expression von RBP138 und RBP35 wurde in verschiedenen Geweben mittels Northern-Blot untersucht (vgl. Kap. 2.5.). Dazu wurde eine vorgefertigte Northern-Blot-Membran (MTN Blot; Clontech) mit Poly-A-RNA aus insgesamt acht humanen Gewebetypen bzw. Organen mit einer DNA-Sonde, die beide RBP-Isoformen gleichermaßen erkennt, hybridisiert. Dabei konnte zunächst die Existenz der zuvor lediglich postulierten RBP138-mRNA nachgewiesen werden. So stellt die im Northern-Blot auftretende 4,8 kB Bande mit großer Wahrscheinlichkeit die RBP138-mRNA dar, zumal die rekonstruierte RBP138-cDNA ohne 5′-UTR und Poly-A-Schwanz eine Größe von 4,4 kBp besitzt. Darüberhinaus konnte in allen untersuchten Geweben eine Expression der RBP138-mRNA nachgewiesen werden. Die Höhe der RBP138-Expression variiert zwischen den verschiedenen Geweben, wobei die stärkste Expression im Skelettmuskel, eine etwas schwächere in Herz, Gehirn, Niere und Pankreas und eine äußerst

schwach in Lunge, Leber und Plazenta auftrat.Die Signale waren dabei insgesamt sehr schwach, so dass eine Detektion, selbst mit dem sensitiven Phospho-Imager, erst nach sehr langer Exposition (> 48 h) möglich war. Im Gegensatz dazu führte die Hybridisierung der Membran mit einer für β-Actin spezifischen DNA-Sonde zu sehr starken Signalen (vgl. Kap. 2.5.). Dieses spricht dafür, dass die geringe Intensität der Signale der RBP-mRNAs auf eine geringe Abundanz der RBP-mRNAs zurückgeht, und nicht durch technische Probleme bedingt ist. Die beobachtete niedrige Expressionsrate könnte einerseits bedeuten, dass die Proteine konstitutiv schwach exprimiert sind, andererseits besteht prinzipiell aber auch die Möglichkeit, dass die Expression dieser Proteine reguliert ist, bzw. induzierbar ist. Die im Northern-Blot beobachtete geringe Expression der RBP-mRNAs könnte dabei den uninduzierten Status widerspiegeln.

Eine zweite im Northern-Blot auftretende Bande von ca. 7,0 kB stellt möglicherweise die mRNA der RBP35 Isoform dar. Darüber kann aufgenblicklich jedoch nur spekuliert werden, da die exakte Größe der RBP35-mRNA aufgrund fehlender 5′- und 3′-Enden nicht genau rekonstruiert werden kann. Bekannt ist jedoch, dass die vorhergesagte Größe der unvollständigen RBP35-mRNA 5,1 kB beträgt, und die komplette mRNA somit zumindest größer als 5,1 kB sein muss. Die 7,0 kB Bande ist jeweils schwächer als die 4,8 kB Bande der RBP138-mRNA. In Geweben, in denen die RBP138-mRNA Bande selbst nur sehr schwach ist, war die 7,0 kB Bande überhaupt nicht zu detektieren. In den Geweben, in denen beide Banden detektierbar sind, ist das Verhältnis der Banden weitgehend konstant. Daraus lässt sich schließen, dass beide RBP-Isoformen in vielen Geweben nebeneinander exprimiert werden, und dabei anscheinend immer in etwa gleichem Mengenverhältis vorliegen. Die Frage, ob die 7,0 kB Bande tatsächlich die RBP35-mRNA darstellt, könnte anhand eines Northern-Blots mit einer RBP35-spezifischen Sonde, z.B. aus der Sequenz des bei RBP35 nicht-herausgespleißten Introns XVII, geklärt werden.

Die Northern-Blot Ergebnisse werden auch durch RT-PCR-Studien zur Expression des KIAA0675-Klons, der abgesehen von den UTRs identisch mit RBP138 ist, bestätigt (siehe HUGE Database: www.kazusa.or.jp/huge und Kikuno et al., 2000). Darin konnte ebenfalls nur eine schwache Expression der KIAA0675-mRNA beobachtet werden. Das auf RT-PCR-basierende Expressionsmuster stimmt weitestgehend mit dem im Northern-Blot beobachteten Muster von RBP138 überein. Eine geringe Expression von RBP138, zumindest in Leberzellen, wird zusätzlich durch die Tatsache unterstützt, dass endogenes RBP138 in der humanen Hepatomazellinie Huh7 erst nach vorgeschalteter Immunpräzipitation im Western-Blot nachweisbar war (vgl. Kap. 2.6.).

Neben dem Expressionsmuster von RBP138 und -35 wurde auch die subzelluläre Lokalisation der RBP-Isoformen in Huh7 Zellen sowohl mikroskopisch als auch biochemisch, über die Herstellung verschiedener Zellextrakte, untersucht (vgl. Kap. 2.8.). Damit war die Hoffnung verbunden, über die genaue Kenntnis der Lokalisation der Proteine Hinweise auf deren Funktion(en) zu erhalten. Als Modelle für RBP138 und -35 dienten dabei die Fusionsproteine RBP1128AS-eGFP und RBP35-eGFP, wobei es sich bei RBP1128AS um ein gegenüber RBP138 am C-Terminus um 80 AS verkürztes Protein handelt. Die Verwendung der eGFP-Fusionsproteine hatte zwei Vorteile: Zum Ersten kann die eGFP-Fluoreszenz in vivo, d.h. ohne vorheriges Fixieren, unter dem Fluoreszenz-Mikroskop beobachtet werden, was eine schnelle und einfache Bestimmung der Expression des jeweiligen Proteins zu jedem Zeitpunkt ermöglicht. Zum Zweiten ermöglicht die Verwendung von eGFP die Detektion der RBP-eGFP-Fusionsproteine mit GFP-spezifischen Antikörpern. Letzteres war vor allem deshalb wichtig, da zur Zeit der Durchführung der Lokalisationsstudien noch keine RBP-spezifischen Antikörper zur Verfügung standen. Die Untersuchung der Lokalisation erfolgte in transfizierten Huh7 Zellen. Während das 62,7 kDa große RBP35-eGFP in den Zellen gut exprimiert wurde, war die Expression des 158,6 kDa großen RBP1128AS-eGFP trotz Verwendung des starken CMV-Promotors nur sehr schwach. Das detektierbare RBP1128AS-eGFP war vom Kern ausgeschlossen und im Cytoplasma in einer Zone um den Zellkern (= perinukleär) lokalisiert. RBP35-eGFP zeigte ebenfalls eine ausschließlich cytoplasmatische Verteilung, wobei das Fluoreszenzmuster insgesamt grobkörniger aussah als das des RBP1128AS-eGFP. In einigen der Zellen war zudem ein Teil der RBP35-eGFP Proteine an einem Punkt, der häufig zwischen zwei Zellkernen in den teils mehrkernigen Huh7 Zellen auftrat, angereichert. Bislang konnte allerdings weder Ursache der Entstehung dieser Assoziation von RBP35-eGFP, noch die funktionelle Bedeutung davon herausgefunden werden. Da jeweils nur ein einziger solcher Punkt pro Zelle auftrat, scheint es unwahrscheinlich, dass es sich dabei lediglich um ein unlösliches Proteinaggregat ohne besondere Funktion handelt.

Zur näheren Untersuchung der Lokalisation wurden Co-Lokalisationsstudien von RBP1128-eGFP mit dem für das Endoplasmatische Retikulum (ER) spezifischen Fluoreszenzfarbstoff "ER-Tracker" und dem Kernporen und Golgi-Apparat anfärbenden, fluoreszenzmarkiertem Weizenkeimagglutinin (WGA) durchgeführt. In diesen Studien überlappte die Fluoreszenz von RBP1128AS-eGFP sowohl teilweise mit der des "ER-Trackers" als auch mit der des WGAs. Diese experimentellen Befunde zeigten, dass das RBP1128AS-Fusionsprotein zumindest teilweise mit zellulären Strukturen, möglicherweise Membranen des ER oder Golgi-Apparats, assoziiert vorliegt. Anhand der durchgeführten Immunfluoreszenz-Studien war aber eine endgültige Aufklärung der subzellulären Lokalisation der RBP1128AS- und RBP35-Fusionsproteine nicht möglich. Dazu sind weitergehende, systematische Co-Lokalisationsstudien, idealerweise mit einer Vielzahl verschiedener, jeweils spezifisch gegen eine bestimmte Zell-

struktur gerichteter Antikörper, notwendig. Im Zusammenhang mit den Lokalisationsstudien in transfizierten Huh7 Zellen besteht potenziell die Gefahr, dass die Lokalisation eines Proteins durch dessen Überexpression beeinflusst bzw. verändert wird. So kann in manchen Fällen möglicherweise nur eine begrenzte Menge eines bestimmten Proteins spezifisch lokalisiert werden, da z.B. die für die Lokalisation des Proteins notwendigen zusätzlichen Proteine selbst nur begrenzt verfügbar sind. Dies könnte zur Folge haben, dass in den Fluoreszenz-Studien neben der spezifischen Lokalisation auch noch eine unspezifische, durch Überexpression bedingte, Lokalisation eines Proteins untersucht wird, ohne eine Möglichkeit zwischen beiden zu unterscheiden. Da mittlerweile auch RBP-spezifische Antikörper zur Verfügung stehen (in Form polyklonaler Antiseren gegen natives und denaturiertes RBP1-205AS), könnte versucht werden, anstelle der RBP-eGFP-Fusionsproteine direkt die endogenen RBP Proteine zu untersuchen. Ein Problem könnte dabei jedoch die (eine Detektion wesentlich erschwerende) insgesamt sehr geringe Expression der RBP-Isoformen (siehe Ergebnisse des Northern-Blots Kap. 2.5.) darstellen. In diesem Zusammenhang wäre es daher sinnvoll, zunächst Zellinien mit einer vergleichsweise hohen (endogenen) RBP-Expression zu identifizieren, und diese für die Lokalisationsstudien zu verwenden.

Die Beobachtung, dass die RBP-Isoformen nicht diffus und frei löslich im Cytoplasma vorliegen, wurde durch einfache Zellfraktionierung bestehend aus Lyse der Huh7 Zellen in einem NP40-haltigen (1%) Puffer und anschließender Zentrifugation (bei 13.000 Upm) nochmals bestätigt. Nach dieser Fraktionierungsmethode fanden sich die RBP-eGFP Proteine größtenteils (> 90%) in dem unlöslichen Pellet, das Zellbestandteile wie Kerne, membranöse Strukturen und Teile des Cytoskeletts enthält. Nur ein kleiner Teil der RBP-eGFP Proteine war in der löslichen (cytoplasmatischen) Fraktion vertreten. Auch Versuche, Baculovirus-exprimiertes Full-Length RBP138 (mit mutierter K-reicher Region) ohne zusätzlichen eGFP-Tag mit dem nicht-ionischen Detergenz Octylglucosid, das häufig zu einer schonenden Solubilisierung von Membranproteinen verwendet wird, in Lösung zu bringen, blieben erfolglos. Im Fall des Baculovirusexprimierten RBP138 könnte die Unlöslichkeit auf die starke Überexpression des Proteins zurückzuführen sein. Darüberhinaus könnte die Unlöslichkeit des Full-Length RBP138 eventuell auch durch die an dessen unmittelbarem C-Terminus vorkommende RING-H2-Domäne bedingt sein, zumal Proteine mit RING-Domäne weithin für ihre Unlöslichkeit bekannt sind (Borden et al., 2000). Diese Erklärung trifft jedoch ausschließlich auf das Full-Length Protein zu, da die RING-H2-Domäne in allen übrigen, C-terminal verkürzten RBP Proteinen, einschließlich des RBP1128AS, nicht enthalten ist.

Alle Ergebnisse zeigten soweit, dass die RBP Proteine nicht frei löslich im Cytoplasma vorliegen und auch nicht durch Detergenzien in Lösung gebracht werden können. Eine mögliche Ursache für ein solches Verhalten könnte u.a. eine vorliegende Assoziation der Proteine mit

dem Cytoskelett sein. Eine solche Assoziation schien aus mehreren Gründen plausibel. Die bis dahin durchgeführten biochemischen Fraktionierungsexperimente wurden jeweils bei 100 mM NaCl durchgeführt, einer Salzkonzentration, bei der Actin-Filamente intakt bleiben und nach Zellyse und Zentrifugation im unlöslichen Pellet zu finden sind. Gleiches würde man auch für Actin-Filament assoziierte Proteine erwarten. Darüberhinaus ähnelt die Immunfluoreszenzstudien beobachtete subzelluläre Lokalisation von RBP1128-eGFP interessanterweise stark der perinukleären Verteilung der c-myc-mRNA der Ratte. So erscheint die c-myc-mRNA in in situ Hybridisierungsstudien mit einem fluorogenen Substrat ebenfalls in einer Zone um den Zellkern herum (Veyrune et al., 1996). Die perinukleäre Lokalisation der cmyc-mRNA geht nachgewiesenermaßen auf eine Assoziation der RNA mit Cytoskelettgebundenen Polysomen, genauer Actin-Filament-gebundenen Polysomen, zurück. Nicht zuletzt aufgrund der auftretenden Ähnlichkeit zur Lokalisation der c-myc-mRNA schien auch für RBP eine Assoziation mit Actin-Filamenten durchaus plausibel. In dazu unter gleichen Bedingungen durchgeführten Versuchen, unter denen zuvor die Assoziation der c-myc-mRNA mit Actin-Filament-gebundenen Polysomen gezeigt wurde (u.a. Hovland et al., 1995), konnte allerdings weder für RBP35-eGFP noch für RBP1128-eGFP eine solche Assoziation beobachtet werden. So war in den Experimenten der Großteil der RBP-eGFP Fusionsproteine auch unter Actin-Filament-depolymerisierenden Bedingungen, wie 130 mM KCl, unlöslich.

Die biochemischen Fraktionierungsexperimente geben bisher keine Anhaltspunkte für eine Assoziation von RBP138 und -35 mit Actin-Filamenten. Auf der anderen Seite kann aber das Auftreten einer solchen Assoziation nicht völlig durch die Ergebnisse der Fraktionierungsexperimente ausgeschlossen werden. So ist es möglich, dass die beobachtete Unlöslichkeit eine intrinsische Eigenschaft der RBP Proteine darstellt, und daher eine Salzkonzentration von 130 mM, trotz einer ursprünglichen Assoziation mit Actin-Filamenten, zu keiner Löslichkeit der Proteine führt. Um das Problem mit der Unlöslichkeit zu umgehen, könnten anstelle der Fraktionierungsexperimente in vivo Videomikroskopie-Studien zur Untersuchung einer Assoziation mit Actin-Filamenten durchgeführt werden. Dabei könnte die Lokalisation der eGFP-getaggten RBP-Isoformen in lebenden Zellen nach Behandlung mit Cytochalasin D, welches die Depolymerisierung der Actin-Filamente bewirkt, untersucht werden. Im Falle einer Assoziation mit Actin-Filamenten sollte sich die Lokalisation der RBP-Fusionsproteine nach einer Cytochalasin D Behandlung deutlich verändern. Eine solche Vorgehensweise wurde u.a. schon erfolgreich angewandt, um eine Actin-Filament abhängige Lokalisierung der Actin-mRNA in Fibroblasten zu zeigen (Sundell & Singer, 1991). Parallel dazu könnten auch vergleichbare Studien mit der Mikrotubuli-zerstörenden Substanz Colcemid durchgeführt werden, um eine mögliche Assoziation der RBP Proteine mit Mikrotubuli zu untersuchen. Im Falle einer Abhängigkeit der Lokalisation der Proteine von Mikrotubuli sollte der Einsatz von Colcemid zu einer deutlichen Veränderung der Lokalisation führen.

### 3.5. Domänen von RBP138 und RBP35

RBP138 stellt ein großes Protein dar. Allein seine Größe von 138 kDa lässt die Existenz mehrerer funktioneller Domänen innerhalb der Polypeptidkette vermuten. Nach der experimentellen Kartierung der die AS 656-671 umfassenden K-reichen Region als RNA-Bindungsmotiv (vgl. Kap. 2.3.) sollten anhand von Sequenzvergleichen bzw. Datenbanksuchen weitere Domänen von RBP138 identifiziert werden. Die Durchsuchung der SWISS-PROT Datenbank mit der RBP138 Sequenz führte schließlich zur Identifizierung dreier Abschnitte innerhalb von RBP138, die Homologien zu bekannten Proteinen bzw. Proteinmotiven aufweisen (vgl. Kap. 2.9.). Bei den gefundenen homologen Sequenzen handelt es sich um eine RING-H2 Zink-Finger-Domäne, den C-terminalen Bereich der schweren Ketten des Myosins und einen Abschnitt des Tetratricopeptid-Repeat-Proteins 3. Alle drei Abschnitte stellen homologe, aber nicht identische AS-Sequenzen dar. Im Folgenden werden die auftretenden Homologien sowie deren mögliche Bedeutung für RBP138 im Einzelnen diskutiert.

### RING-H2 homologe Domäne

Die C-terminale Region von RBP138 (AS 1148-1192) besitzt eine deutliche Homologie zur RING-H2-Domäne des Goliath Proteins von Drosophila melanogaster (Abb. 3.5.1.), sowie schwächere Homologien zu weiteren RING-H2 Proteinen. RING-Domänen sind durch ein Muster an konservierten Cystein- und Histidinresten, die die Bindung von zwei für die Ausbildung der nativen Struktur notwendigen Zink-Ionen koordinieren, charakterisiert. Die RING-H2-(C3H2C3)-Domänen stellen eine Untergruppe der RING-Domänen (C3HC4) dar (vgl. Abb. 2.9.2.). Beide unterscheiden sich nur durch den Austausch eines Cystein-Restes gegen einen Histidin-Rest innerhalb des konservierten Cys-His-Musters. Im Gegensatz zu den meisten übrigen Zink-Finger-Domänen sind RING-Domänen keine DNA-Bindungsdomänen, sondern spezifische Protein-Protein-Interaktionsdomänen (Übersicht: Borden, 2000). Dabei sind prinzipiell drei verschiedene Typen der Interaktion möglich: Die Bindung zweier gleicher RING-Domänen untereinander, die Bindung zweier unterschiedlicher RING-Domänen oder die Bindung einer RING-Domäne und einer nicht-RING-Domäne. Die auftretende hohe Spezifität der Interaktionen von RING-Domänen zeigen u.a. Versuche, in denen der Austausch der RING-Domäne des BRCA1 (breast/ovarian cancer susceptibility gene product ) gegen die zu 90% identische RING-Domäne der in regulatorischen Partikeln von Proteasomen vorkommenden ATPase RPT1 einen Verlust der Bindung der Ubiquitin-Ligase BAP1 durch das veränderte BRCA1 bewirkte (Jensen et al., 1998). Die Spezifität der RING-Domänen wird durch die variablen Bereiche der RING-Domänen festgelegt. Unterschiedliche Primärsequenzen innerhalb dieser Bereiche führen vermutlich zur Ausbildung unterschiedlicher Strukturen, was die jeweilige Spezifität einer RING-Domäne bewirkt (Borden, 2000). Interessanterweise sind einige der Proteine mit RING-Domäne an der Ausbildung makromolekularer Proteinkomplexe, wie z.B. der 1 µm großen PML nuclear bodies durch das PML (promyeolocytic leukemia)

Protein (u.a. Melnick & Licht, 1999) und des etwa 1 MDa großen, an der *Dosage*-Kompensation von *Drosophila* beteiligten Proteinkomplexes durch MSL- (*male specific lethal*) Proteine (Lucchesi, 1996), beteiligt. In beiden Fällen sind intakte RING-Domänen für die Ausbildung der Komplexe essentiell. Innerhalb der großen Proteinkomplexe wird den RING Proteinen jeweils die Funktion eines für den Zusammenbau der Komplexe notwendigen Gerüstproteins zugeschrieben.

```
RING-H2 RBP138: CVICHENLSP-ENLSVLPCKHEFHKNCIPP
RING-H2 GOLIATH: CAICIEAYKPTDTTRAFF
```

**Abb. 3.5.1.** Alignment der RING-H2-Domänen von RBP138 (AS 1146-1192) und dem *Drosophila melanogaster* GOLIATH Protein (AS 126-171). Die für die RING-H2-(C3H2C3)-Domänen charakteristischen, konservierten Cystein- und Histidinreste sind mit Sternchen (\*) gekennzeichet. Identische AS innerhalb der RING-H2-Domänen von RBP138 und GOLIATH sind durch eine Box gekennzeichnet. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Das Auftreten einer RING-H2-Domäne innerhalb von RBP138 legt eine Interaktion mit anderen RBP138-Polypeptiden bzw. mit anderen Proteinen nahe. Es kann in diesem Zusammenhang davon ausgegangen werden, dass RBP138 durch solche Interaktionen zusätzliche Funktionen und Eigenschaften erhält. Es ist daher von Interesse, herauszufinden welches die mit der RING-H2-Domäne interagierenden Proteine sind. Die beobachtete Homologie zur RING-H2-Domäne des Goliath Proteins geht über das für RING-H2-Domänen charakteristische konservierte C3H2C3 Motiv hinaus, d.h. die Homologie erstreckt sich auch über Teile der variablen, die Spezifität bestimmenden, Abschnitte (Abb. 3.5.1.). Da die RING-Domänen der beiden Proteine jedoch nicht zu 100% identisch sind, ist es sehr unwahrscheinlich, dass beide Proteine die gleiche Spezifität aufweisen, bzw. die gleichen Proteine binden. Da zudem der oder die Bindungspartner des Goliath Proteins selbst zur Zeit nicht bekannt sind, können aus der auftretenden Homologie des RBP138 Proteins zum Goliath Proteins keine Rückschlüsse auf potenzielle Interaktionspartner von RBP138 gezogen werden. Die RING-Domänen sind darüberhinaus bisher noch zu wenig verstanden, um allein anhand der Sequenz einer solchen Domäne Vorhersagen über potenzielle Interaktionspartner machen zu können. Eine Identifizierung potenzieller Interaktionspartner der RBP138 RING-H2-Domäne kann daher nur auf experimentellem Wege erfolgen. Dazu würde sich die Durchführung eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens mit der RBP138 RING-H2-Domäne als Köder anbieten. Mit dieser Methode wurde vor kurzem erfolgreich eine neue Ubiquitin-Ligase, BAP1, als spezifischer Bindungspartner der BRCA1 RING-Domäne identifiziert (Jensen et al., 1998). Die Kenntnis des oder der Bindungspartner von RBP138 könnte weitere wertvolle Hinweise auf die Funktion von RBP138 geben.

### Zur schweren Kette des Myosins homologe Domäne

Der die AS 700-900 umfassende Bereich von RBP138 ist homolog zu einem Bereich der schweren Kette des Myosins (*myosin heavy chain*; MyHC) des Polypen *Hydra vulgaris*. Dieser Abschnitt von RBP138 zeigt auch, allerdings etwas geringere, Homologien zu den MyHCs anderer Organismen, darunter der des im perinatalen Stadium exprimierten Skelettmuskels des Menschen. Welche Rolle dieser Domäne innerhalb des RBP138 Proteins zukommt, ist zur Zeit noch völlig unklar. In den MyHCs bilden diese Bereiche zusammen mit einer zweiten MyHC eine auf zwei α-Helices zurückgehende Doppelwendel-Struktur (*coiled coil*) aus, die den Schaft (*tail*) von Myosindimeren bildet. Üblicherweise sind diese Domänen der MyHCs deutlich größer als die sich über einen Bereich von nur 200 AS erstreckende homologe Region des RBP138. Es ist nicht klar, ob ein so kurzer Abschnitt ausreichend ist, damit sich eine solche Struktur ausbilden kann. Sollte sich herausstellen, dass diese Region dazu in der Lage ist, so würde sich als nächstes die Frage stellen, ob sie eine Homo-Dimerisierung von zwei RBP138 Proteinen oder eine Hetero-Dimerisierung zusammen mit (einem) anderen Protein(en) bewirkt. Momentan ist die Funktion dieses MyHC-homologen Abschnitts von RBP138 aber noch ungeklärt.

### Zum Tetratricopeptid-Repeat-Protein 3 homologe Domäne

In der Datenbanksuche wurden zwei Abschnitte (AS 128-339 und 740-1203) mit Homologien zum humanen Tetratricopeptid-Repeat-Protein 3 (TPRD 3) identifiziert. Der vordere homologe Abschnitt ist dabei größtenteils, d.h. bis zur AS 302, auch in der RBP35-Isoform enthalten. Keiner der beiden zu RBP homologen Abschnitte enthält jedoch die charakteristischen, den Proteinen ihren Namen verleihenden Repeat-Domänen. Das TPRD 3 wurde ursprünglich als ein Mitglied der Familie der Tetratricopeptid-Repeat-Proteine beschrieben, das in der für das Down-Syndrom kritischen q22.2 Region auf Chromosom 21 codiert ist (Tsukahara et al., 1996). Es wurde deshalb darüber spekuliert, ob eine Überexpression von TPRD 3 die Ursache einiger der beim Down-Syndrom auftretenden morphologischen Veränderungen ist. Allerdings wurde das Protein bisher weder biochemisch noch molekularbiologisch-genetisch eingehender untersucht, so dass sich aus der auftretenden Homologie des RBP138 zu einem Teil des TPRD 3 keine unmittelbaren Rückschlüsse hinsichtlich der Funktion dieses Bereichs innerhalb von RBP138 ziehen lassen.

Die Datenbanksuchen zusammengefasst, konnten drei Regionen innerhalb von RBP138 mit Homologien zu anderen Proteinen bzw. Proteinmotiven identifiziert werden. Aus den Homologien zum Tetratricopeptid-Repeat-Protein 3 und der schweren Kette des Myosins lassen sich unmittelbar keine neuen Erkenntnissse hinsichtlich der Funktion von RBP138 gewinnen. Die am C-Terminus von RBP138 auftretende RING-H2 Protein-Protein-Interaktionsdomäne dage-

gen lässt Interaktionen von RBP138 mit anderen Proteinen sehr wahrscheinlich erscheinen. Möglicherweise besteht die Funktion dieser Domäne in der Ausbildung großer Proteinkomplexe. Abgesehen von der RING-H2-Domäne sowie der experimentell kartierten K-reichen RNA-Bindungsdomäne ist über mögliche Domänen des RBP138-Polypeptids weiter nicht viel bekannt.

Die Ergebnisse der Datenbankrecherchen legen zudem die Vermutung nahe, dass das RBP138 Protein evolutionär betrachtet ein relativ neues Protein ist. Dies lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass kein RBP138-Homolog in einem der bereits vollständig sequenzierten Modell-Organismen, wie Saccharomyces cerevisiae, Caenorhabditis elegans und Drosophila melanogaster gefunden werden konnte. Ebensowenig sind bisher in (den noch unvollständigen) Datenbanken anderer Organismen RBP138-Homologe zu finden (mit Ausnahme der Maus-EST-Datenbank). Die Vermutung wird durch die Beobachtung, dass ein Großteil der Proteine mit einem Molekulargewicht > 100 kDa für Säugetiere spezifisch ist (O. Ohara, Kazusa Institut, Chiba, Japan; pers. Mitteilung), weiter gestützt. Nicht unbedingt erwartet ist jedoch die Tatsache, dass das Protein abgesehen von der RING-H2-Domäne keine weiteren Homologien zu anderen Domänen mit bekannter Funktion aufweist, da die großen Proteine meist aus Zusammenlagerung mehrerer bekannter, auch schon in den niedereren Organismen vorkommenden, Domänen entstehen. Das Auftreten nur weniger bekannter Domänen innerhalb von RBP138 macht das Protein zu etwas "wirklich" Neuem und Interessantem. Andererseits erschwert das Fehlen homologer Domänen mit bekannten Funktionen die Charakterisierung des RBP138 Proteins wesentlich.

# 3.6. Aktuelle Arbeitshypothese zur Funktion von RBP138 und RBP35 und mögliche Vorgehensweisen zur Aufklärung der Funktion der RBP Proteine

RBP138 ist ein neues großes RNA-bindendes Protein mit bisher noch weitgehend unverstandener Funktion. Die K-reiche RNA-bindende Region stellt die einzige funktionell charakterisierte Domäne dar. Daneben konnte durch Sequenzvergleiche mit einer RING-H2-Domäne eine potenzielle Protein-Protein-Interaktionsdomäne nachgewiesen werden. Eine Verknüpfung der RNA-Bindungsaktivität mit zusätzlichen Eigenschaften scheint aufgrund der Größe des Proteins von 138 kDa wahrscheinlich. Diesem Gedanken folgend und unter Berücksichtigung der beobachteten distinkten cytoplasmatischen Lokalisation des RBP138 Proteins wurde die Arbeitshypothese aufgestellt, dass RBP138 an dem innerhalb des Cytoplasmas ablaufenden Transport und/oder der Lokalisation spezifisch lokalisierter mRNA-Moleküle beteiligt ist. Die kleine RBP-Isoform ohne RNA-Bindungsmotiv, RBP35, könnte in diesem Zusammenhang eine regulatorische Funktion in Form eines kompetitiven Inhibitors von RBP138 erfüllen. Die Lokalisation von mRNAs ist eine Möglichkeit, die Proteine nahe an ihrem Wirkungsort zu synthetisieren

(Übersicht: Bassell et al., 1999) und trägt somit zur Ausbildung von Proteingradienten und Asymmetrien in der Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle bei.

Cytoplasmatischer mRNA-Transport und -Lokalisation finden in den meisten Fällen in engem Kontakt mit Komponenten des Cytoskeletts statt (Übersicht: Jansen, 1999), und sind häufig mit der Ausbildung großer Proteinkomplexe bzw. Ribonucleoprotein (RNP) Partikel verbunden (Übersicht: Bassell et al., 1999). Die Sequenzen, die die spezifische Lokalisation einer mRNA bewirken, liegen in der Regel im 3'-UTR der betreffenden mRNA. Diese Sequenzen sind experimentell leicht einzugrenzen und sind daher für die meisten lokalisierten mRNAs bekannt (Übersicht: Bashirullah et al., 1998). Weitaus weniger verstanden ist dagegen noch der Transportvorgang selbst. Er erfolgt in Form von RNP-Partikeln, die aus einer Vielzahl unterschiedlicher Proteine bestehen. Die genaue Zusammensetzung dieser Partikel ist in den wenigsten Fällen bekannt. Neben den die jeweilige RNA-Lokalisationssequenz spezifisch bindenden Proteinen sind zusätzliche Proteine, beispielsweise mit Adapterfunktion zwischen den RNA-Bindungsproteinen und dem Cytoskelett oder auch mit Motorfunktion, Bestandteile solcher Partikel (Übersicht: Bashirullah et al., 1998; Jansen, 1999). In letzter Zeit wurde dabei immer deutlicher, dass sowohl der Transport als auch die Lokalisation von mRNAs hochspezialisierte Vorgänge darstellen, die ein komplexes Zusammenspiel einer Vielzahl von Proteinen beinhalten.

Im Hinblick auf die aufgestellte Arbeitshypothese hinsichtlich der Funktion von RBP138 stellt sich die Frage nach einer Assoziation von RBP mit dem Cytoskelett. Eine solche Assoziation wäre ein Hinweis auf eine Beteiligung von RBP138 an mRNA-Transport- oder Lokalisationsvorgängen. Die in den Immunfluoreszenz-Studien beobachtete Verteilung des RBP1128ASeGFP-Fusionsproteins sieht der perinukleären Lokalisation der c-myc-mRNA (Veyrune et al., 1996) sehr ähnlich. Da letztere durch eine Assoziation der mRNA mit Actin-Filamentgebundenen Polysomen zustandekommt, wurde untersucht, ob RBP138 (und -35) ebenfalls mit Actin-Filamenten assoziiert sind. Es konnten jedoch keine Hinweise auf eine direkte oder indirekte Interaktion von RBP mit Actin-Filamenten gewonnen werden. Ein Grund für das Nichtauftreten von RBP in der Actin-haltigen Fraktion nach Fraktionierung des Zellysats, könnte in der weitgehenden Unlöslichkeit der RBP Proteine liegen. So könnten die RBP Proteine in vivo Bestandteil eines unlöslichen, mit Actin-Filamenten verbundenen RNP-Partikels oder Multi-Proteinkomplexes sein, der in den Fraktionierungsexperimenten nicht in der Fraktion der Actin-Monomere zu finden ist, da er auch nach Depolymerisierung der Actin-Filamente weiter unlöslich bleibt. Da die durchgeführten Experimente aufgrund der oben genannten Unlöslichkeit von RBP138 und -35 keine endgültige Aussage über eine Assoziation von RBP mit Actin-Filamenten erlauben, sind weitere Untersuchungen zur Klärung einer möglichen Assoziation mit Actin-Filamenten oder auch Mikrotubuli notwendig. Zur Umgehung der in den Fraktionierungsexperimenten auftretenden Probleme, könnten auch in vivo Video-Mikroskopie-Lokalisationsstudien mit Cytoskelett-zerstörenden Substanzen wie Cytochalasin D (führt zur Depolymerisierung von Actin-Filamenten) oder Colcemid (zerstört Mikrotubuli) durchgeführt werden (u.a. Sundell & Singer, 1991). Eine deutliche Veränderung der Lokalisation der RBP Proteine nach Behandlung mit einer dieser Substanzen wäre ein Hinweis für eine Assoziation mit der entsprechenden Cytoskelett-Komponente.

Eine weitere Möglichkeit zur Untersuchung einer Assoziation mit Bestandteilen des Cytoskeletts besteht in der Durchführung von Co-Lokalisationsstudien mit für die einzelnen Cytoskelett-Bestandteile spezifischen Markern. Für den Fall, dass RBP nicht mit Cytoskelett-Komponenten assoziiert ist, könnten zusätzlich noch Organell-spezifische Marker zur Aufklärung der Lokalisation von RBP138 herangezogen werden. Aufgrund eines möglichen Auftretens einer Assoziation mit verschiedenen Cytoskelett-Bestandteilen in unterschiedlichen Zelltypen, empfiehlt sich grundsätzlich die Durchführung der vorgeschlagenen Lokalisationsstudien in unterschiedlichen Zelltypen. Das an dem mRNA-Transport beteiligte Staufen Protein von *Drosophila melanogaster* ist beispielsweise in verschiedenen Zelltypen an dem Transport und der Lokalisation unterschiedlicher mRNAs beteiligt. In Oocyten ist die Lokalisation von bicoidmRNA durch Staufen an Mikrotubuli gekoppelt (Ferrandon et al., 1994), während die ebenfalls von Staufen abhängige Lokalisation von prospero-mRNA in Neuroblasten entlang von Actin-Filamenten verläuft (Broadus et al., 1998).

Ebenfalls Unabhängig von der aufgestellten Arbeitshypothese könnte die Kenntnis des von RBP138 *in vivo* gebundenen RNA-Moleküls (bzw. der gebunden Moleküle) entscheidende Hinweise bezüglich dessen Funktion geben. So wäre die Bindung einer bekanntermaßen lokalisierten mRNA ein starker Hinweis auf eine Beteiligung an deren Transport oder Lokalisation. Aber auch die Bindung einer bekannten, unlokalisierten mRNA, könnte Hinweise auf die tatsächliche Funktion von RBP138 geben. Wie bereits zuvor beschrieben (vgl. Kap. 3.3.), würde sich die Durchführung von Co-Immunpräzipitationen von RBP138 und der gebundenen RNA und die anschließende RT-PCR-Amplifikation der RNA mit einem Pool an Primern zur Identifizierung der gebundenen RNA-Moleküle anbieten (Trifillis et al., 1999; Brooks et al., 2000). Es wäre auch hier sinnvoll, solche Untersuchungen mit mehreren unterschiedlichen Zelltypen durchzuführen, da RNA-Bindungsproteine in unterschiedlichen Zellen teilweise unterschiedliche mRNAs binden. So bindet das bereits erwähnte Staufen Protein bicoid-mRNA in Oocyten (Ferrandon et al., 1994) und prospero-mRNA in Neuroblasten (Broadus et al., 1998).

Schließlich sollten auch noch mit RBP138 (und RBP35) interagierende Proteine identifiziert werden. Da der Transport von mRNAs sowie deren Lokalisation häufig die Ausbildung großer Proteinkomplexe beinhaltet, ist im Falle einer Beteiligung von RBP an diesen Prozessen dementsprechend auch eine Interaktion mit anderen Proteinen zu erwarten. Die Identifizerung von bekannten an Transportprozessen beteiligten Proteinen als Bindepartner von RBP würde die

aufgestellte Arbeitshypothese stützen. Eine Domäne, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an Interaktionen mit anderen Proteinen beteiligt ist, stellt die zuvor beschriebene RING-H2-Domäne am C-Terminus des RBP138-Polypeptids dar. Für die Identifizierung damit interagierender Proteine könnte ein Hefe-Zwei-Hybrid-*Screen* mit der RING-H2-Domäne als Köderprotein durchgeführt werden.

Auch wenn die Arbeitshypothese, nach der RBP138 an dem Transport oder der Lokalisation von mRNAs beteiligt ist, noch sehr spekulativ ist, so sollten die zur Überprüfung der Hypothese vorgeschlagenen Experimente in jedem Fall, auch im Falle der Widerlegung der Hypothese, zu wichtigen Hinweisen bezüglich der Funktion von RBP138 führen. So stellen die Kenntnis der genauen intrazellulären Lokalisation und der *in vivo* gebundenen RNAs sowie der mit RBP interagierenden Proteine zentrale Punkte auf dem Weg zur Aufklärung der Funktion von RBP 138 dar.

Ein von der aufgestellten Arbeitshypothese völlig losgelöster Ansatz, besteht in der Generierung einer RBP138 Knock-Out -Maus (RBP138-/-) zum Studium der Funktion von RBP. Da durch das Fehlen von RBP138-Homologen in den niederen Organismen wie der Bäckerhefe (S. cerevisiae), dem Fadenwurm (C. elegans) und der Fruchtfliege (D. melanogaster) diese einfachen Modellssysteme für RBP138 Knock-Out-Studien nicht zur Verfügung stehen, stellt die Maus das beste verbleibende System zur Durchführung solcher Studien dar. Für eine Existenz von RBP138-Homologen in der Maus spricht ein vor kurzem identifizierter Maus cDNA-Klon mit zu RBP138 homologer Sequenz (S.G. Kreft; unveröffentlichte Daten). Mit der Generierung einer 138-/- Maus verbindet sich in erster Linie die Hoffnung, dass das Fehlen von RBP138 und -35 zu einem detektierbaren Phänotyp führt. Dieser würde zwar zunächst keinen unmittelbar direkten Hinweis auf die Funktion von RBP auf molekularer Ebene geben, könnte dafür aber zumindest Aufschluss über die Gewebe geben, in denen RBP138 eine wichtige Rolle spielt. Eine genauere Untersuchung des auftretenden Phänotyps auf molekularer Ebene sollte letztendlich aber auch zur Aufklärung der Funktion von RBP138 führen. Allerdings kann in diesem Zusammenhang nicht ganz ausgeschlossen werden, dass die RBP138-/- Mäuse keinen detektierbaren Phänotyp entwickeln, da möglicherweise in diesen Mäusen andere Proteine die Funktion(en) von RBP138 übernehmen. Im anderen Extrem könnte das Ausschalten von RBP138 zur Infertilität führen oder letal sein. Dies würde nahelegen, dass dem Protein eine durchaus bedeutende Rolle zukommt. Möglicherweise müssten in diesem Fall konditionale RBP138-/- Mäuse generiert werden, bei dem das rbp138 Gen zu einem beliebigen Zeitpunkt, z.B. über die Induktion von Rekombinationsvorgängen abgeschaltet werden kann. Diese konditionalen Knock-Out-Mäuse hätten den großen Vorteil, dass sie auch im Fall eines letalen oder infertilen Phänotyps von RBP138-/- gezüchtet werden könnten.

Die Generierung einer RBP138 *Knock-Out* Maus stellt sicherlich einen großen Aufwand dar, dessen Ertrag im Vorfeld nur schwer abschätzbar ist. Im Hinblick auf eine Untersuchung der Funktion von RBP138 innerhalb des HBV-Replikationszyklus könnten RBP138-/- Mäuse auch mit HBV-transgenen Mäusen (Guidotti et al., 1995) gekreuzt werden, und in den daraus resultierenden HBV-transgenen RBP138-/- Mäusen die Effekte des Fehlens von RBP138 auf die HBV-Replikation untersucht werden (siehe unten).

### RBP138, RBP35 und HBV-Replikation

Für eine Funktion der RBP138 und -35 Proteine innerhalb des HBV-Replikationszyklus liegen zur Zeit keine experimentellen Hinweise vor. Bisher spricht lediglich die Bindung von HBV-RNA in diversen *in vitro* RNA-Bindungsstudien für eine Interaktion mit RBP138. Wie schon zuvor im Detail diskutiert, geben diese *in vitro* Bindungsstudien jedoch nur bedingten Aufschluss über die *in vivo* Situation. Nicht zuletzt deshalb ist die Untersuchung einer möglichen Beteiligung der RBP Proteine an der HBV-Replikation von großem Interesse.

Es könnte hierzu zunächst untersucht werden, ob RBP138 (oder -35) in gereinigten HBV-Virionen nachweisbar ist, und, ob es möglicherweise in HBV-infizierten Zellen mit HBV-RNA assoziiert vorliegt. Für das humane Homolog des RNA-bindenden und an der Lokalisation diverser zellulärer mRNAs beteiligten Staufen Proteins von *Drosophila melanogaster*, hStau, wurde interessanterweise kürzlich ein Vorkommen in HIV-1 Virionen nachgewiesen (Mouland et al., 2000). Da darüberhinaus noch eine Assoziation des hStau Proteins mit der HIV-1 genomischen RNA (und der RNA weiterer Retroviren) in Lysaten HIV-1 infizierter (bzw. mit anderen Retroviren infizierter) Zellen gezeigt werden konnte, wurde eine Beteiligung des hStau an der spezifischen Genom-Verpackung bei Retroviren postuliert. Das Beispiel des hStau Proteins zeigt, dass zelluläre RNA-Bindungsproteine, die an dem Transport oder der Lokalisation zellulärer mRNAs beteiligt sind, auch bei der Replikation von (Retro-)Viren eine wichtige Rolle spielen können. Ähnliches könnte möglicherweise für RBP138 im Hinblick auf die HBV-Replikation zutreffen.

Die Assoziation von RBP138 mit HBV-RNA könnte in Co-Lokalisationsstudien von RBP138 und HBV-RNA über kombinierte *in situ* Hybridisierungs- und Immunfluoreszenzexperimente untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit wäre die Untersuchung einer solchen Assoziation über Co-Immunpräzipitation und anschließende RT-PCR mit HBV-spezifischen Primern. Beide Vorgehensweisen erfordern die Transfektion eines Replikations-kompetenten HBV-Expressionsplasmids, sowie eventuell die Co-Transfektion eines RBP138-Expressionsplasmids (aufgrund des geringen Levels an endogenem RBP138 in Leberzell-Linien) in Hepatozyten. Im Falle des Auftretens eines RBP138-Homologs in der Maus könnten die gleichen Experimente, nach Generierung Maus-RBP138-spezifischer Antikörper, auch mit primären Leberzellen

HBV-transgener Mäuse durchgeführt werden, wodurch die Notwendigkeit einer Transfektion eines HBV-Expressionsplasmids entfallen würde. In Zellkultur könnte zusätzlich der Einfluss einer Überexpression verschiedener RBP Proteine, wie z.B. RBP138, einer RNA-Bindungsinkompetenten RBP138 Mutante oder RBP35, auf die HBV-Replikation untersucht werden. Dafür müssten die entsprechenden Leberzellen wiederum mit RBP und Replikationskompetenten HBV-Expressionsplasmiden co-transfiziert werden (oder zur Steigerung der Transfektionseffizienz über das HBV-Genom enthaltende Adenovirusvektoren transduziert werden). Ebenfalls interessant wäre eine Untersuchung der HBV-Replikation in Leberzellen in Abwesenheit von RBP. Das Abschalten der RBP-Expression könnte dabei über *Antisense*-Techniken erreicht werden. Im Zusammenhang mit der Generierung einer RBP138-/- Maus könnten durch Kreuzung mit HBV-transgenen Tieren schließlich HBV-transgene RBP138-/- Mäuse erzeugt werden. In diesen könnten ebenfalls die Auswirkungen eines Fehlens von RBP138 auf die Virus-Replikation studiert werden.

Eine wichtige Frage ist auch, ob es im Zuge einer HBV-Infektion in der Leber zu einer Veränderung des Expressionslevels von RBP138 und -35 kommt. Um dies zu untersuchen, könnte das Vorkommen der RBP Proteine in HBV-infizierten Lebern mit dem in nicht-infizierten Lebern miteinander verglichen werden. In diesem Zusammenhang ist die Untersuchung von Patientenmaterial der von in Zellkultur transfizierten Hepatozyten vorzuziehen, da eine Induktion oder Repression von RBP nicht direkt durch HBV-Proteine oder HBV-RNA vermittelt sein muss, sondern ebensogut indirekt über Effektorzellen bzw. von Effektorzellen sekretierten Cytokinen vermittelt sein kann.

Abschließend bleibt festzuhalten, dass bisher noch keine Untersuchungen im Hinblick auf eine mögliche funktionelle Beteiligung des RBP138 (und RBP35) an der HBV-Replikation durchgeführt wurden, diese aber in jedem Fall von allgemeinem Interesse wären.

### 4. Material

### Bakterienstämme

E. coli Top 10: F, mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) F80lacZDM15 DlacX74 deoR recA1 araD139

D(ara-leu)7679 galU galK rpsL(Str<sup>R</sup>) endA1 nupG (Grant et al., 1990) (Invitrogen)

E. coli BL21 (DE3): F- ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub>- m<sub>B</sub>-) gal dcm (DE3) (Novagen)

 $F^{\text{-}}$  ompT  $hsdSB(rB^{\text{-}}\,mB^{\text{-}})$   $dcm^{\text{+}}$   $Tet^{\text{r}}$  gal  $\lambda$  (DE3) endA Hte [argU ileY leuW  $Cam^{\text{r}}]$  (Weiner et al., 1994) (Stratagene) E. coli BL21-Codon Plus(DE3)RIL:

F- mcrA D(mrr-hsdRMS-mcrBC) Ø80dlacZDM15 ΔlacX74 deoR E. coli MAX EFFICIENCY DH10BAC:

recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ-rps L nupG /bMON14272 /pMON7124 (Life Technologies)

### Virusisolate/-subtypen

HBV: Subtyp: ayw (Galibert et al., 1979) Numerierung nach Pasek et al., 1979

DHBV: DHBV 16 (Mandart et al., 1984)

### Medien für prokaryontische Kulturen

Flüssigkulturen: Luria Broth Base Nährmedium (Gibco)

Feste Nährböden: Luria Broth Base Nährmedium (Gibco) + 1,5% (w/v) Agar (Difco Lab.)

Zu den Medien wurden die noch jeweils benötigten Antibiotika (Ampicillin (50µg/ml); Kanamycin (50µg/ml); Chloramphenicol (34µg/ml); Tetrazyklin (10µg/ml)) zugegeben.

### Medien für eukaryontische Kulturen

Huh7 Zellen wurden bei 37°C und 5% CO2 kultiviert in Dulbecco's MEM mit Glutamax-I (Gibco) mit 10% (v/v) inaktiviertem fötalem Kälberserum, nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco), 100 IE/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Gibco). Die Trypsinierung der Zellen erfolgte in einer 0,05% Trypsinlösung (Gibco).

Sowohl adhärent als auch in Suspension wachsende Sf9 Insektenzellen wurden bei 28°C kultiviert in SF900-II mit L-Glutamin Medium (Gibco) mit nicht-essentiellen Aminosäuren (Gibco), 50 μg/ml Penicillin, 50 μg/ml Streptomycin und 100 μg/ml Neomycin (alle Gibco). Das Ablösen der adhärent wachsenden Zellen erfolgte ohne die Verwendung von Trypsin durch mechanisches "Abklopfen" der Zellen.

### Zellinien

Huh7: menschliche Hepatoma-Zellinie (Nakabayashi et al., 1982)

HeLa: menschliche Cervix-Carcinom-Zellinie (ATCC CCL-2)

3T3: Fibroblasten-Zelline der Maus (embryonalen Urpsrungs) (Green & Kehinde, 1974)

CV-1: Affennieren-Zellinie der Grünen Meerkatze (Cercopithecus aethiops) (ATCC CCL-70)

COS: SV40 T transformierte Affennieren-Zellinie der Grünen Meerkatze (Cercopithecus

aethiops) (ATCC CRL-1650)

Sf9: Insektenzellinie (Spodoptera frugiperda) (ATCC CRL 1711)

### Lösungen & Puffer

TBE: 0,089 M Tris Base, 0,089 M Borsäure, 2 mM EDTA

TE für DNA: 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 1 mM EDTA (pH 8.0) TE für RNA: 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 1 mM EDTA (pH 8.0)

TNE: 10 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, pH 7.5

PBS (Zellkultur): 150 mM NaCl; 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.2

PBS (FPLC Laufpuffer): 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O,

1,4 mM KH2PO4; pH ca. 7.3

Proteinauftragspuffer: 200 mM Tris/HCl pH 8.8, 10% Sacharose, 5 mM EDTA,

0,1% Bromphenolblau, 3% SDS, 10% β-Mercaptoethanol

RNA-Auftragspuffer: 95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau,

0,05% Xylencyanol

Semi-dry-Transferpuffer: 48 mM Tris Base, 39 mM Glycin, 20% Methanol

### cDNA-Klone / EST-Klone

### RZPD-Klone aus dem Screen nach dem NIII 3'-Ende:

ICRFp512H14173Q2 (aus cDNA-Bank von fötalem Lebergewebe des Menschen)

ICRFp512B2269Q2 (aus cDNA-Bank von fötalem Lebergewebe des Menschen

DKFZp586C1754Q3 (aus cDNA-Bank von Uterusgewebe des Menschen)

IMAGp998N0865Q6 (aus cDNA-Bank von fötalem Lebergewebe des Menschen)

### RZPD-Klon zur Klonierung des 3'-UTRs der humanen c-myc-mRNA:

IMAGp998F08397 (aus cDNA-Bank von fötalem Leber- und Milzgewebe des Menschen)

### ATCC-Klon zur Klonierung des SBP2 Proteins der Ratte:

ATCC 2001105 (EST H31811) von PC-12 Zellen der Ratte

### ATCC-Klon zur Klonierung des 3 UTRs der PHGPx-mRNA der Ratte:

ATCC 2035200 (EST 223388) von Milzzellen der Ratte

### **Enzyme**

Es wurden Restriktionsendonukleasen der folgenden Hersteller verwendet:

AGS, Amersham Pharmacia Biotech, Roche Diagnostics, MBI Fermentas, New England Biolabs

T7-RNA-Polymerase: Roche Diagnostics; T3 RNA Polymerase: Roche Diagnostics; T4 DNA Polymerase: New England Biolabs; Pwo DNA Polymerase: Roche Diagnostics; Pfx DNA Polymerase: Gibco BRL, Life Technologies; Taq DNA Polymerase: MBI Fermentas; Klenow Fragment von DNA Polymerase I: Pharmacia; Sequenase 2.0 (DNA Polymerase): USB; T4 DNA Ligase: New England Biolabs; Alkalische Phosphatase aus Kälberdarm: New England Biolabs; RNase A: Roche Diagnostics; T1: Roche Diagnostics; RNasin: Promega; T4 Polynukleotidkinase: New England Biolabs; RNase freie DNase I: Roche Diagnostics; Proteinase K: Merck; Lysozym: Roche Diagnostics;

### Nukleinsäure- und Protein-Größenmarker

DNA-Größenmarker VII (Roche Diagnostics): 8576 Bp, 7427, 6106, 4899, 3639, 2799, 1953, 1882, 1515, 1482, 1164, 992, (718), 710, 492, 359

DNA-Größenstandard 50-2000 Bp (BioRad, München): 2000 Bp, 1500, 1000, 700, 500, 400, 300, 200, 100, 50

Phenylalanin tRNA der Bäckerhefe (S. cerevisiae) (Roche Diagnostics): 76 nt

Rainbow<sup>TM</sup> high gefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham Pharmacia Biotech): 220.0~kD/~97.4/~66.0/~46.0/~30.0/~21.5/~14.3

<sup>14</sup>C-markierter Rainbow<sup>™</sup> high Proteinmarker (Amersham Pharmacia Biotech): wie Rainbow<sup>™</sup> high gefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker, jedoch zusätzlich <sup>14</sup>C markiert

Rainbow<sup>TM</sup> low gefärbter Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham Pharmacia Biotech): 46.0~kD/~30.0/~21.5/~14.3/~6.5/~3.4/~2.35

### **RNA-Homopolymere**

Einzel- und Doppelsträngige RNA Homopolymere wurden als unmarkierte Kompetitoren in RNA-Bindungsexperimenten in Lösung eingesetzt. Dabei wurden die Kaliumsalze der Polyadenylsäure (Poly-A), Polycytidylsäure (Poly-C), Polygunanosylsäure (Poly-G), Polyuridinylsäure (Poly-U) und das Natriumsalz der Polyinosinylsäure Polycytidylsäure (Poly-I:Poly-C) der Firma ICN verwendet.

### Oligodesoxyribonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der AG Frank, ZMBH, Heidelberg und der Firma BIG-Biotech, Freiburg hergestellt. Bei degenerierten Olionukleotiden sind die an einer Position alternativ eingebauten Nukleotide in Klammern angegeben. Sämtliche Oligonukleotidsequenzen sind in 5′-3′ Orientierung angegeben.

#### Primer für Klonierung & Sequenzierung des humanen c-myc-mRNA 3'-UTRs

3 'UTR-myc-AfIII(-) (=BG10-13084); 33 Nt: GGGCTGCAGCTTAAGattagggtttatagtacc 3 'UTR-myc-NotI (=BG10-12280); 35 Nt: cccAAGCTTGCGGCCGCggaaaagtaaggaaaacg

### Primer für Klonierung & Sequenzierung des PHGPX 3'-UTRs und des SBP2 Proteins der Ratte

SBP2(1308-29)SalI(-) (=BG10-14120); 22 Nt: caggtcGaCctgcaccggaacc

SBP2 RNA BD(-) (=BG11-1108); 48 Nt:

CATAACTTGATTTAGACgcTTCggatccgcTCTTATTCTTTTTGGAGC

SBP2(836-854)-NcoI (=BG10-14119); 31 Nt: CCGGTACCATGGccagttcccctcgtgtac

SBP2end-SalI(-) (=BG10-14117); 28 Nt: gccGTCGACttataaattcaagttcatc

PHGPx 3'UTR-KpnI-NotI (=BG11-940); 35 Nt: ccgcggccgcggtaCCCTACAAGTGTtgGCCCCTG PHGPx 3'UTR-HindIII(-) (=BG11-941); 31 Nt: cgcgaagctTCCCACAAGGCaAGCCAAGGTG

### Primer für Klonierung & Sequenzierung der NIII- & RBP-Klone

C1754&H14173 3'(-) (=BG5531); 22 Nt: CACAAAGAAATTTTAGACAAGG C1754&H14173 SEQ(-) (=BG 5734); 22 Nt: CCTTGACTCTGAGACTTTTTGG

C1754 3´UTR(-) (=BG6043); 27 Nt: GCTCTAGATGAAGCAAACCAAAATCCC

B2269 3'UTR (-) (=BG6044); 23 Nt: GCAGTTTGCTCAGACTGCTGTGC ICRFH14173 3'seq (=BG5534); 19 Nt: GATAATGAAATCAAGAACC ICRFB2269 3'seq (=BG5533); 19 Nt: CCTGGCTTTAATATAGGGC

ICRF B2269 3'(-) (=BG5733); 23 Nt: CCCTTTCTGTTTGTTAGCTTTCC ICRF B2269 3'SEQII(+) (=BG6207); 21 Nt: CTATAGCCATGAGACTATGGG

GALatgNco (=#24167); 25 Nt:

GGGGCCATGGCCATGATTACGCCAA

DKFZ C1754 3'SEQ (+) (=BG6208); 24 Nt:

CCGTATTTCTTTACAAATAAGTGG

NIII ORF 1891-1911 (=BG5532); 21 Nt:

CCCATCTTTATTAATTTCTGC

NIII NcoI (=#24618); 25 Nt: GGGGCCATGGATTCTCTACCAGATG
NIII 3'end (-) (=#26195); 32 Nt: CCCGTCGACCTACTTCTTTT(at)CCTTTGTT(at)ACTCTTAAC

ICRFH14173 3'seq (=BG5534); 19 Nt: GATAATGAAATCAAGAACC
ICRFB2269 3'seq (=BG5533); 19 Nt: CCTGGCTTTAATATAGGGC
ICRF B2269 3'(-); 23 Nt: CCCTTTCTGTTTGTTAGCTTTCC

NIII 5'intern (=#24423); 17 Nt: CAATTATACCGCACACC
NIII 3'intern (=#24424); 17 Nt: TTATAAGAGCTAACAGG

RBP RNA BD(-) (=BG10-5099); 47 Nt: CTTTATTCTTTTTATTCgcagtggatccgcTTTTCCTTTGTTTACTC

RBP3511-3530NcoI(-) (=BG10-5100); 20 Nt: CAaGGTCTAATGCACTGAGC

### Standard Sequenzier- & PCR Primer

SK-primer; 20 Nt: CGCTCTAGAACTAGTGGATC
T3-primer (=#16934); 20 Nt: AATTAACCCTCACTAAAGGG

T3PROM (= BG 10-6777); 23 Nt: cgcgcaattaaccctcactaaag

T7 Primer; 22 Nt: GTAATACGACTCACTATAGGGC
T7promOLIGO (BG9652); 22 Nt: GAATTAATACGACTCACTATAG
pET-T7-terminator (=BG10-4451); 19 Nt: GCTAGTTATTGCTCAGCGG
CMVprimer (=#2862); 18 Nt: GCAAATGGGCGGTAGGCG

M13 forward sequencing primer; 23 Nt (aus Amersham Sequencing Kit): GTTTTCCCAGTCACGACGTTGTA

rev.INS Primer; 20 Nt: GTGGTTTCACATTagcTGcC

pmalE primer (=#25313); 24 Nt: GGTCGTCAGACTGTCGATGAAGCC

### Primer für Klonierung & Sequenzierung von eGFP

Y66HhGFPanti (=BG5927), 66 Nt (freundlicherweise von Dr. P. Kratz, Freiburg, zur Verfügung gestellt): CTTCATATGGTCTGGGTATCTCGCAAAGCACTGCACGCCGTGGGTCAGGGTAGTGACTAGTGTTGG hGFP-Kpn-low 2/98 (=BG3816), 27 Nt (freundlicherweise von Dr. P. Kratz, Freiburg, zur Verfügung gestellt): CACGAGAATTGGtACCACGCCAGTGAA

hGFP 5´Seq(-) (=BG9056); 28 Nt: CCCATTCACATCGCCATCCAGTTCCACG

### **Plasmide**

### Basiskonstrukte:

pBluescriptIISK(-) Basiskonstrukt Stratagene pET30a(+) Basiskonstrukt Novagen

pFASTBAC HTb Basiskonstrukt Life Technologies

### Expression in Bakterien:

pmalNIII-Serie (-1-657; -1-660; -1-663; -1-666(= -no linker); pmalRBP138) pMEKNIII-Serie (-1-499; -1-205 (= -HindIII fill-in)) pIH-TRBP (von K.T. Jeang, NIH zur Verfügung gestellt) pETRBP-Serie (-1-205; -510-878; -510-878BD(-); -832-1176) pETSBP2-Serie (-(836-2541); -(836-1329); -(836-1969); -(1196-2541))

(Anmerkung: pET-Konstrkte besitzen auch einen T7-Promotor, was eine Verwendung der Plasmide als DNA-Template für die *in vitro* Transkription erlaubt)

### in vitro Transkription (& in vitro Translation):

diverse pET-Konstrukte (siehe oben)

pBlsIISECIS

pBlsII-myc UTR

pT7HAMVRT178 (freundlicherweise von Dr. J. Beck, Freiburg, zur Verfügung gestellt)

pCT3101 (freundlicherweise von Dr. J. Beck, Freiburg, zur Verfügung gestellt)
T7 HIV CAT SV (freundlicherweise von Dr. K.T. Jeang, NIH Bethesda, zur Verfügung gestellt)
pBSeps-3124 (=pBSA1) (freundlicherweise von Dr. M. Nassal, Freiburg, zur Verfügung gestellt;
Knaus & Nassal, 1993)

```
<u>Transposition in Baculovirusgenom:</u>
```

pFBHISRBP138BD(-)

### Expression in Eukaryonten:

pRBP Serie (-35-eGFP; -(1128AS)-eGFP; -138-eGFP pTR-UF5 (Zolotukhin et al., 1996)

### Sonden

pT7HAMVRT178 (freundlicherweise von Dr. J. Beck, Freiburg, zur Verfügung gestellt)
pBlsIISECIS
pBlsII-myc UTR
pCT3101 (freundlicherweise von Dr. J. Beck, Freiburg, zur Verfügung gestellt)
T7 HIV CAT SV (freundlicherweise von Dr. K.T. Jeang, NIH Bethesda, zur Verfügung gestellt)

### Sonden

Die innerhalb der RNA-Bindungsstudien eingesetzten RNA-Sonden, sowie die zu Hybridisierungen verwendeten DNA-Sonden, sind in der folgenden Liste mit Namen, Länge und einer Kurzbeschreibung aufgeführt. Für die RNA-Sonden ist zusätzlich die jeweils zur Linearisierung der Matrizen-DNA verwendete Restriktionsendonuklease, sowie die Matrizen-DNA selbst, angegeben. Alle RNA-Sonden wurden durch Transkription mit T7-RNA-Polymerase synthetisiert. Für die durch *random priming* hergestellten DNA-Sonden ist jeweils noch das Plasmid, von der das als Matrize verwendete DNA-Fragment stammt inklusive der zur Herstellung verwendeten Restriktionsendonukleasen, angegeben.

TAR-RNA	82 nt	HIV TAR Sequenz +1-+82	T7HIVCATSV xHindIII
ε-RNA	184 nt	14 nt Spacer dann HBV Pos. 3101-+88	pCT3101 xBglII
€-only-RNA	80 nt	11 nt Spacer dann HBV Pos. 3124-+10	pBSeps-3124 xClaI
HBV-RT-RNA	250 nt	AMV-leader dann HBV Pos. 938-1130	pT7HAMVRT178 xStuI
AMV-leader-RNA	49 nt	AMV-leader dann 3 nt Spacer	pT7HAMVRT178 xNcoI
myc 1-374-RNA	441 nt	60 nt Spacer dann c-myc 3´UTR Pos. 1-374	pBlsII-mycUTR xPstI
myc 1-231-RNA	291 nt	60 nt Spacer dann c-myc 3 UTR Pos. 1-231	pBlsII-mycUTR xDraI
SECIS-RNA	218 nt	14 nt Spacer dann PHGPx 3´UTR Pos. 1-199	pBlsIISECIS xHindIII
NIII 3'end DNA	510 Bp	NIII-ORF Pos. 1497-1998 + 8 Bp Spacer	pmalNIII1-666 xPstI &SalI

### Antikörper und Antiseren

 $\alpha$ -Tetra-His Antikörper (Qiagen): monoklonaler Mausantikörper gegen Tetra-HIS-Tag  $\alpha$ -GFP Antikörper (Roche): Gemisch zweier monoklonaler Mausantikörper gegen GFP  $\alpha$ -MBP Antiserum (New England Biolabs): polyklonales Kaninchenantiserum gegen das

Maltose-bindende-Protein (MBP)

α-Actin (C-2) Antikörper (SCBT): monoklonaler Mausantikörper gegen verschiedene Actin-

Isoformen des Menschen

α-TRBP Antiserum: polyklonales Kaninchenantiserum gegen TAR Region

bindendes Protein (TRBP) (freundlicherweise von Dr.

K.T. Jeang, NIH Bethesda, erhalten)

α-DIG-AP Antikörper (Roche): polyklonale Schaf Fab-Fragmente mit gekoppelter

alkalischer Phosphatase gegen Digoxygenin

g-α-r-PO Antikörper (Dianova): gegen Kaninchen gerichteter Ziegen-AK mit gekoppelter

Peroxidase

g-α-m-PO Antiköper (Dianova): gegen Maus gerichteter Ziegen-AK mit gekoppelter

Peroxidase

Immunfluoreszenzantikörper:

s-α-m-Texas-Red (Stressgen): polyklonale Schaf Fab-Fragmente mit gekoppeltem

Texas-Red

### Radiochemikalien

[<sup>35</sup>S]Met/Cys ("Translabel") 1000 Ci/mmol (ICN)

 $\begin{array}{ll} [\alpha^{32}P] dATP & 3000 \ Ci/mmol \ (Amersham-Pharmacia) \\ [\alpha^{32}P] rCTP & 800 \ Ci/mmol \ (Amersham-Pharmacia) \\ \end{array}$ 

### Kits

BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System Gibco, Berlin

DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)

Boehringer, Mannheim

Boehringer, Mannheim

ECL-Plus-Western Blot Reagenzien Amersham-Pharmacia, Freiburg

High Prime DNA Labeling Kit

"MEGAshortscript™ - In vitro Transcription Kit"

Boehringer, Mannheim

Ambion, Austin, USA

Qiaprep Spin Miniprep Kit
Qiagen, Hilden
Qiaprep 8 Turbo Miniprep Kit
Qiagen, Hilden
Qia Plasmid Maxi Kit
Qiagen, Hilden
Qiafilter Plasmid Maxi Kit
Qiagen, Hilden
RNeasy Mini Kit
Qiagen, Hilden

Titan<sup>TM</sup> One Tube RT-PCR System

Boehringer, Mannheim

TNT® T7 Quick Coupled Transcription/

Translation System Promega, Mannheim Sequenase Version 2.0 Kit USB, Cleveland, USA

### Geräte

Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell **BioRad** Axiophot35 Fluoreszenzmikroskop mit Fluoreszenzlampe HBO100 Zeiss LSM 410 Laser-Scanning-Mikroskop Zeiss Entwickler Hyperprocessor RPN 1700 Amersham Stratalinker UV Crosslinker 1800 Stratagene Sonifier B-12 Cell Disrupter (mit Mikro- und Makrotip) Branson Sonifier 450 (mit Cup Horn) Branson Uno Thermoblock Biometra Ultrospec 3000 UV/visible Spectrophotometer Pharmacia **FPLC** Pharmacia

### **Firmenadressen**

AGS, Heidelberg; Ambion, Austin, USA; Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg; Amicon, Inc., Beverly, MA, USA; AppliChem; Darmstadt; Beckman Instruments, Inc., Palo Alto, CA, USA; Biometra, Göttingen; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA; Boehringer Mannheim, Mannheim; Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA; Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA, USA; Dianova, Hamburg; Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA; Eastman Kodak Co., Rochester, USA; Eurogentec, Seraing, Belgien; FMC BioProducts, Rockland, ME, USA; Gibco BRL, Life Technologies GmbH, Berlin; Greiner Labortechnik, Nürtingen; Heraeus GmbH, Hanau; Merck AG, Darmstadt; Millipore, Eschborn; Molecular Probes, Eugene, OR, USA; neoLab GmbH, Heidelberg; New Brunswick Scientific, Edison, NY, USA; New England Biolabs, Beverly, USA; Novagen, Schwalbach; Pierce Chemical Company, Rockford, Illinois, USA; Qiagen GmbH, Hilden; Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt; Roche Diagnostics, Basel, CH; Roth, Karlsruhe; Schleicher & Schüll, Dassel; Serva Feinbiochemika GmbH & Co. KG, Heidelberg; Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen; Stratagene GmbH, Heidelberg; Stressgen, Victoria, Kanada; Martinsried; United Technologies Packard, Frankfurt/Main; USB, Cleveland, USA; Whatman, Maidstone, GB;

### 5. Methoden

### Grundlegende Literatur & molekularbiologische Standardmethoden

Molekularbiologische Standardmethoden, die in diesem Kapitel nicht ausführlich beschrieben werden (wie z.B. Ligation, Agarose-Gelelektrophorese), wurden nach den in der grundlegenden Literatur beschriebenen Protokollen durchgeführt. Zur grundlegenden Literatur gehört:

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. (1989): Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Habor Laboratory Press, Cold Spring Habor New York (Sambrook et al., 1989).

Ausubel, F. M.; Frederick, M. (1996): Current protocolls in molecular biology. John Wiley & Sons. Inc. (Ausubel et al., 1996).

### Herstellung RNase-freier Lösungen

Zum Ansetzen von Lösungen und Puffern für Arbeiten mit RNA wurde RNase-freies  $H_2O$  verwendet. Dazu wurde vollentsalztes (VE-)  $H_2O$  zunächst über eine Milli-Q-Anlage (Millipore) gereinigt, mit DEPC (0,1%) versetzt und nach Durchmischen autoklaviert. DEPC inaktiviert Proteine (u.a. RNasen) durch kovalente Addition an Aminogruppen. Durch den Autoklavierschritt wird überschüssiges DEPC zersetzt.

## 5.1. Plasmid-DNA Präparationen aus E. coli

Die Aufreinigung von Plasmid-DNA aus Bakterienkulturen bis 1,5 ml (*Miniprep-Kulturen*) erfolgte unter Zuhilfenahme von *Qiaprep Spin Miniprep* oder *Qiaprep 8 Turbo Miniprep* Kits der Firma Qiagen. Zu Beginn der Arbeit wurde *Miniprep-DNA* zum Teil auch nach der *Lysis by Boiling* Methode (Holmes & Quigley, 1981) isoliert. Plasmid-DNA aus großen Kulturen (> 150 ml) (*Maxiprep-Kulturen*) wurde mittels *Qia Plasmid Maxi* oder *Qiafilter Plasmid Maxi* Kits (Qiagen) aufgereinigt.

# 5.2. RNA-Präparation aus eukaryontischen Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA und cytoplasmatischer RNA aus eukaryontischen Zellen erfolgte über das *RNeasy Mini Kit* (Qiagen).

# 5.3. Polymerase-Kettenreaktion/PCR (polymerase chain reaction)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR; Mullis et al., 1986) wurde innerhalb dieser Arbeit sowohl für Klonierungen als auch zu analytischen Zwecken eingesetzt. Die PCRs wurden dabei je nach Anwendung mit Taq- (Fermentas), Pwo- (Roche) oder Platinum Pfx-DNA-Polymerase (Gibco) durchgeführt. Für analytische PCRs wurde Taq DNA Polymerase verwendet, die durch eine hohe Ausbeute gekennzeichnet ist, aber aufgrund fehlender 3′-5′-Exonukleaseaktivität (*Proofreading*) eine vergleichsweise hohe Fehlerrate von ca. 2x 10<sup>-4</sup> Fehler/Base (Cha & Thilly, 1993) aufweist. Die Amplifikation von DNA-Fragmenten, die in Klonierungen verwendet werden sollten, erfolgte meist mit Pwo- oder Platinum Pfx-DNA-

Polymerase. Diese Polymerasen weisen aufgrund ihrer 3´-5´-Exonukleaseaktivität eine im Vergleich zur Taq-DNA-Polymerase eine 8-12fach geringere Fehlerrate auf. Als Matrizen-DNA für die PCRs diente sowohl DNA aus Mini- und Maxi-Plasmidpräparationen als auch von cDNA-Banken, Bakterien und kompletten  $\lambda$ -Phagen.

### 5.3.1. Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR ist das empfindlichste Verfahren zum Nachweis von RNA-Molekülen. Sie beruht im Wesentlichen auf der Reversen Transkription eines RNA-Moleküls in eine cDNA und deren anschließende Amplifikation mittels PCR (Veres et al., 1987). Innerhalb dieser Arbeit wurden RT-PCR-Reaktionen mit dem *Titan One Tube RT-PCR System Kit* (Roche) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei findet die Erststrang-Synthese mit AMV-DNA-Polymerase statt, während für die PCR ein Mix aus Taq- und Pwo-DNA-Polymerase verwendet wird.

### 5.3.2. Speziellere Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion

### 5.3.2.1. PCR-Screening von Bakterienkolonien

Bei Klonierungen wurden in einigen Fällen Bakterien nach Transformation direkt mittels PCR, auf die Anwesenheit eines bestimmten DNA-Fragments (*Inserts*) hin untersucht. Dazu wurden 2 ml Flüsssigkulturen mit einzelnen Bakterienkolonien angeimpft und unter Schütteln 5-6 h bei 37°C inkubiert. Für einen 50 µl Standard-PCR-Ansatz mit Taq-DNA-Polymerase (Fermentas) dienten 2 µl einer solchen Kultur als "Matrizen-DNA". Um die Bakterien möglichst vollständig aufzuschließen wurde dem PCR-Programm ein 4-minütiger Denaturierungsschritt bei 94°C vorangestellt, ansonsten erfolgte die Durchführung der PCR nach Standardbedingungen.

### 5.3.2.2. Mutagenese mittels Megaprimer-PCR

Die Mutagenese der Lysin-reichen Motive von RBP138 und SBP2 erfolgte über die von der normalen PCR abgeleiteten Megaprimer-PCR (Picard et al., 1994). Die Mutationen werden dabei durch ein Oligonukleotid mit entsprechend "mutierter" Sequenz eingefügt. Dieses Oligonukleotid (*Primer 1*) wird in einer ersten PCR zusammen mit einem zweiten ca. 200-400 Bp entfernt annealendem Primer (*Primer 2*) eingesetzt. Das Produkt aus dieser PCR dient wiederum in einer zweiten PCR mit einem weiteren Primer (*Primer 3*) als Megaprimer. Ein Großteil der dabei entstehenden PCR-Fragmente weisen die in dem *Primer 1* enthaltene mutierte Sequenz auf. Das amplifizierte Fragment kann schließlich über Standardklonierungstechniken in die gewünschte Ziel-DNA eingefügt werden.

Die Durchführung der Megaprimer-PCR erfolgte weitestgehend nach dem Protokoll von Picard et al., 1994. Da weder Pwo- noch Pfx-DNA-Polymerase in der Megaprimer-PCR zu Produkten führte, wurden die Megaprimer-PCRs schließlich mit Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Wegen der höheren Fehlerrate der Taq-DNA-Polymerase wurden nur möglichst kurze Megaprimer-PCR DNA-Fragmente für die Klonierungen verwendet.

# 5.4. Herstellung unmarkierter und markierter Nukleinsäuren

### 5.4.1. Herstellung unmarkierter RNA durch in vitro Transkription

Unmarkierte RNA-Molekülle wurden von einer linearisierten DNA-Matrize durch "run-off"-Transkription mit den RNA-Polymerasen der Bakteriophagen T3 und T7 mit dem *MEGAshortscript- In vitro Transcription Kit* der Firma Ambion hergestellt. Die Durchführung der Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers. Nach erfolgter Transkription

wurde die Matrizen-DNA durch Zugabe von DNaseI verdaut, und der komplette Transkriptionsansatz phenolextrahiert und mit Isopropanol gefällt. Die Bestimmung der Ausbeute und der Konzentration an synthetisierter RNA erfolgte nach deren Resuspension in DEPC-H2O durch Vergleich mit RNA-Standards bekannter Größe und Konzentration über Agarose-Gelelektrophorese und photometrischer Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm.

# 5.4.2. Herstellung radioaktiv-markierter RNA durch *in vitro* Transkription

Intern <sup>32</sup>P-radioaktiv-markierte RNA wurde als Sonde für die In-Lösung-Bindungsstudien mit RBP138 und SBP2 verwendet. Für die *in vitro* Transkription wurde T7-RNA-Polymerase (Roche) verwendet. Die Markierung der RNA erfolgte über den Einbau von  $[\alpha^{-32}P]rCTP$ , das von der T7-RNA-Polymerase gleichermaßen effizient in die RNA eingebaut wird wie unmarkiertes rCTP. Die spezifische Aktivität der zu synthetisierenden RNA kann über die das Verhältnis von markiertem zu unmarkiertem rCTP bestimmt werden. Transkriptionsansätzen wurde jeweils ein 10 facher Überschuss an unmarkiertem rCTP eingesetzt. Daraus ergab sich für die transkribierten RNAs eine spezifische Aktivität von ca. 10<sup>7</sup> cpm/pmol. Ein Standardreaktionsansatz hatte folgende Zusammensetzung: 40mM Tris/HCl (pH 8.0), 6mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM DTT, 2mM Spermidin, 1 U/µl RNasin, je 0,5µM rATP/ rGTP/ rUTP, 12,5 $\mu$ M rCTP, 1,25 $\mu$ M [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] rCTP, 0,05-0,075 $\mu$ g/ $\mu$ l linearisierte Matrizen-DNA und 1 U/µl T7-RNA-Polymerase. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion abgestoppt und die neusynthetisierte RNA über eine G-25 Sephadex Quick Spin Column (Boehringer Mannheim) von nichteingebauten Nukleosidtriphosphaten sowie RNA-Molekülen <12 Nukleotide abgetrennt. Anschließend wurde die RNA nochmals phenolextrahiert und nach Zugabe von Glykogen als Fällungshilfe einer Isopropanolfällung unterworfen. Die pelletierte RNA wurde schließlich in DEPC-H2O resuspendiert, und anschließend die Cerenvov cpm im Szintillationszähler bestimmt.

### 5.4.3. Herstellung radioaktiv-markierter DNA durch random priming

Die Markierung von DNA durch  $random\ priming\$ geht auf Feinberg & Vogelstein (1983, 1984) zurück. Sie basiert auf der Hybridisierung eines Pools an Oligonukleotiden, der alle möglichen Sequenzen umfasst, mit einer denaturierten Matrizen-DNA. Nach Bindung der Oligonukleotide an die DNA dienen diese als Primer für die Synthese des Gegenstrangs durch die Klenow-Polymerase. Durch Einbau dem Reaktionsmix zugegebener markierter Nukleosidtriphosphate wird die neusynthetisierte DNA markiert. Die in den Northern-Blots eingesetzten Sonden wurden nach der  $random\ priming\$ Methode mit dem  $High\ Prime\ DNA\ Labeling\ Kit\$ (Roche) hergestellt und jeweils mit [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dATP (3000 Ci/mmol) markiert. Die neusynthetisierten DNA-Moleküle wurden anschließend über Sephadex G-50  $mini\$ Quick  $Spin\$ Clolumns (Roche) von den nichteingebauten Nukleosidtriphosphaten abgetrennt, und anschließend die  $Cerenkov\ cpm$  im Szintillationszähler bestimmt.

# 5.4.4. Herstellung Digoxygenin-markierter RNA durch *in vitro* Transkription

Digoxygenin-markierte RNA (DIG-RNA) wurde mit dem *DIG RNA Labeling Kit (SP6/T7)* der Firma Roche synthetisiert. Die Herstellung der RNA erfolgte über *in vitro* "run-off"-Transkription einer linearisierten Matrizen-DNA mit einer T7-RNA-Polymerase. Neben den 4 authentischen Ribonukleosidtriphosphaten enthält der Reaktionsansatz DIG-markiertes UTP in einer Konzentration, die nach Herstellerangaben bei etwa jedem vierten Uracil zum Einbau eines

DIG-UTPs führt. Die Durchführung der *in vitro* Transkription erfolgte nach Angaben des Herstellers. Ein Standard-Transkriptionsansatz hatte die folgende Zusammensetzung:

```
2~\mu l~10x~Transkriptionspuffer 2~\mu l~NTP-Markierungsgemisch (je 10mM~ATP, CTP, GTP, UTP sowie 3,5mM DIG-UTP) <math display="inline">1~\mu g linearisierte Matrizen-DNA 2~\mu l~T7-RNA-Polymerase~(20~U/\mu l) ad 20~\mu l~H_2O bidest. optional: Zugabe von 1\mu l~RNase-Inhibitor~(20~U/\mu l)
```

Nach 2h Inkubation bei 37°C wurde die Matrizen-DNA durch Zugabe von RNase-freier DNaseI verdaut. Durch Zugabe von EDTA (pH 8.0) wurde die Reaktion abgestoppt. Durch Gelfitration mit *G-25 Sephadex Quick Spin Columns* der Firma Roche wurden nichteingebaute einzelne Nukleosidtriphosphate, darunter auch DIG-UTP, sowie RNA-Moleküle < 12 Nukleotide von längeren RNA-Transkripten abgetrennt.

Eine Abtrennung der Proteine von den RNA-Transkripten wird durch die Gelfiltration im Gegensatz zu einer Fällung der RNA, nicht erreicht. Es wurden jedoch keine nachteiligen Auswirkungen durch das Vorhandensein von Proteinen in der säulengereinigten RNA-Lösung für die Durchführung der Experimente erwartet.

Nach Abstoppen der Reaktion wurden die Ansätze mit STE-Puffer (10mM Tris/HCl pH 8.0, 100mM NaCl, 1mM EDTA pH 8.0) + 0,1% SDS auf ein Volumen von 50 µl aufgefüllt und auf die Säule aufgetragen. Das nach Zentrifugation resultierende Eluat enthielt die aufgereinigte DIG-markierte RNA. Die Zugabe von SDS in den STE-Puffer wird von der Firma Roche für die Aufreinigung von DIG-markierter RNA empfohlen. Die Quantifizierung von DIG-markierter RNA erfolgte in einen "Tüpfel-Test" über ein immun-chemische Detektionsverfahren (siehe 5.4.4.1.).

# 5.4.4.1. Detektion und Quantifizierung Digoxygenin-markierter RNA über Chemilumineszenz

DIG-markierte RNA wurde durch eine Immun-Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen. Die Bindung eines mit Alkalischer Phosphatase gekoppelten anti-DIG-Antikörpers an das Steroid-Hapten Digoxygenin und die anschließende Umsetzung eines geeigneten Substrats, CDP\* (Roche), das durch Dephosphorylierung in ein metastabiles Zwischenprodukt umgewandelt wird und spontan unter Lichtemission (Chemilumineszenz; Wellenlänge 477 nm) in ein stabiles Endprodukt zerfällt, wobei das emittierte Licht über einen photosensitiven Film detektiert werden kann. Die Detektion DIG-markierter RNA erfolgte mit dem *DIG Nucleic Acid Detection Kit* der Firma Roche. Die Durchführung der Detektion erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

Die Quantifizierung neusynthetisierter DIG-markierter RNA-Sonden erfolgte über einen "Tüpfel-Test" über immun-chemische Detektion der DIG-RNA (siehe oben). Dazu wurden unterschiedliche Verdünnungen einer RNA-Lösung und einer mitgelieferten DIG-markierten Referenz-RNA in Form von 1 µl "Tüpfeln" parallel auf eine Nylonmembran aufgetragen, und durch Bestrahlung mit UV-Licht (254 nm) in einem Stratalinker UV-*Crosslinker* 1800 im Autocrosslink-Modus (120 Millijoules/cm²; ca. 30 sec. Bestrahlungsdauer; Abstand 15 cm) kovalent an die Membran gebunden. Die markierten RNAs wurden wie zuvor beschrieben detektiert, und die Konzentration der zu quantifizierenden RNA durch Vergleich mit den Signalen der Referenz-RNA bestimmt.

# 5.5. Sequenzierungen

Zu Beginn der Arbeit wurden die Sequenzierungen mit dem Sequenase Version 2.0 DNA Sequencing Kit der Firma United States Biochemicals durchgeführt. Die dabei entstandenen

DNA-Fragmente wurden nach Denaturierung in einem denaturierendem 7 M Harnstoff/ 6% Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Detektion der radioaktiv-markierten Fragmente erfolgte nach Trocknen des Gels über das Phospho-Imager System der Firma Fuji.

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurden die Sequenzierungen von der Firma Toplab in Martinsried bzw. von der "Core Facility" des Universitätsklinikums Freiburg durchgeführt.

### 5.6. Northern-Blotting

Die RBP138-Expression und die von RBP35 wurde auf RNA-Ebene unter Verwendung einer vorgefertigten *Multiple Tissue Northern Blot Membran* (Clontech) untersucht. Die Membran enthält gelelektrophoretisch aufgetrennte Poly-A-RNA aus acht humanen Geweben. Dabei sind nach Herstellerangaben alle Spuren auf die gleiche Menge an β-Actin-mRNA normalisiert. Das Absättigen unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran erfolgte während einer 3 h Inkubation bei 42°C in der Prähybridisierungslösung (25 mM PIPES pH 6.8, 0,75 M NaCl, 25 mM EDTA, 5x Denhardts´ Lösung, 50% Formamid, 0,5% SDS, 200 μg/ml denaturierte

Heringssperma-DNA). Daran schloss sich unmittelbar die Hybridisierung mit der <sup>32</sup>P-markierten DNA-Sonde an (Herstelluung der DNA-Sonde über *random priming* siehe 5.4.3.). Nach Denaturierung der DNA-Sonde (95°C, 10 min) wurde diese in einer "Endkonzentration" von > 10<sup>6</sup> cpm/ml zu frischer, vorgewärmter (42°C) Prähybridisierungslösung zugegeben und üN bei 42°C mit der Membran inkubiert. Nach erfolgter Hybridisierung wurde die Membran 15 min bei RT mit Waschpuffer (2x SSC, 0,5%SDS) und 60 min bei 65°C in, auf 65°C vorgewärmten, Waschpuffer gewaschen. Nach Abtropfen der Membran auf 3MM Whatman-Papier wurde die Membran zwischen Folien gelegt und die gebundene radioaktive DNA-Sonde über den Phospho-Imager detektiert (Expositionszeiten zw. 1 h und 48 h).

Vor einer erneuten Hybridisierung der Membran wurden die gebundenen markierten DNA-Moleküle durch 10 min Inkubation bei 80-85°C in vorgewärmten (95°C) H<sub>2</sub>O/0,5% SDS entfernt (*stripping*). Anschließend wurde die Membran noch 10 min bei RT in der Lösung inkubiert. Dann wurde sie direkt weiter benutzt (Prähybridisierung und Hybridisierung), oder bis zur nächsten Verwendung bei –20°C eingefroren.

5x Denhardts' Lösung: 1% Ficoll 400, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA (Fraktion V)

20x SSC (pH 7.0): 3 M NaCl, 0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat

# 5.7. Expression und Aufreinigung von Proteinen in E. coli

# 5.7.1. Expression und Aufreinigung MBP-getaggter Fusionsproteine in *E.coli*

Für die initiale Kartierung der RNA-Bindungsdomäne von RBP138 wurden verschiedene Fragmente als Fusionsprotein mit dem Maltose-bindenden Protein (MBP) exprimiert. Der MBP-*Tag* ermöglicht eine Aufreinigung der Fusionsproteine durch Bindung an immobilisierte Amylose (Guan et al., 1988; Maina et al., 1988; Aitken et al., 1994).

Die Induktion der Expression der Fusionsproteine erfolgte bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5 durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,5 mM). Nach 3-4 h Inkubation bei 37°C wurden die Bakterien pelletiert (SS34 Rotor; 10 min; 5.000 Upm bei 4°C), in 1/20 Vol. Waschpuffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4; 200 mM NaCl; 1 mM EDTA pH 8.0) resuspendiert und bei –20°C (ÜN) eingefroren. Anschließend wurden die Zellen bei RT aufgetaut und durch Ultraschallbehandlung (8x15sec mit Cup Horn, maximale Leistung; Sonifier 450/ Firma Branson) aufgeschlossen. Nach Zentrifugation des Lysats (10 min; 13.000 Upm, 4°C) wurde der Überstand zu zuvor in Waschpuffer äquilibrierter Amylose-Matrix (ca. 40 μl Gelbett) pipettiert und für 30 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach Abnahme des Überstands (= flow-through) wurde die Matrix 4x mit je 300 μl Waschpuffer gewaschen. Die Elution der

gebundenen Proteine erfolgte nach Zugabe von 100 µl Elutionspuffer (= Waschpuffer + 10 mM Maltose) durch 10 min Inkubation bei RT. Darauf folgte noch ein weiterer Elutionsschritt mit 100 µl Elutionspuffer. Von den einzelnen Schritten der Aufreinigung wurden jeweils Aliquots entnommen, die später zusammen über SDS-PAGE analysiert wurden. Nach Coomassie-Proteinfärbung wurde der Gehalt an MBP-Fusionsprotein in den einzelnen Fraktionen durch den Vergleich mit einem parallel auf das Gel aufgetragenem Proteinmengen-Standard abgeschätzt. Die Eluatfraktionen wurden bei 4°C aufbewahrt.

In einigen Fällen wurden die Fusionsproteine nicht über Amylose aufgereinigt, sondern lediglich Gesamtproteinextrakte der jeweiligen Induktionskultur angefertigt. Dabei wurden 300 µl der Bakterienkultur entnommen, die Zellen durch Zentrifugation (3 min, 6000 Upm bei RT) pelletiert, und anschließend in 40 µl Proteinauftragspuffer resuspendiert. Die Verwendung von Gesamtlysaten in North-Western-Blots hatte keine großen Nachteile, da während des Gelelektrophoreseschritts die Proteine der Größe nach aufgetrennt und somit auch zu einem gewissen Grad aufgreinigt werden.

### 5.7.2. Expression und Aufreinigung HIS-getaggter Proteine in E. coli

Die Expression eines Proteins als Fusion mit einem aus sechs aufeinanderfolgenden Histidinresten bestehenden Aminosäuremotiv (HIS-Tag) erlaubt aufgrund der Affinität der Histidine zu zweiwertigen Metallionen die Aufreinigung über Ni²+-NTA-Agarose. Um Proteine mit einem HIS-Tag zu exprimieren wurden die entsprechenden Genabschnitte in pET Vektoren der Firma Novagen kloniert. Die Expression HIS-getaggter Proteine erfolgte in E.coli BL21 (DE3) (Novagen) oder E.coli BL21-Codon Plus(DE3)RIL (Stratagene). In diesem bakteriellen Expressionssystem steht die Expression des rekombinanten Gens unter Kontrolle der T7-RNA-Polymerase, deren Expression selbst durch einen lac Promotor reguliert ist und durch IPTG induziert werden kann. Der Vorteil dieses Systems gegenüber anderen Systemen, bei denen die Expression des rekombinanten Proteins direkt unter der Kontrolle des lac Promotors steht, liegt in der strengeren Regulation der Proteinexpression. In Abwesenheit des Induktors IPTG findet keine Expression des rekombinanten Proteins statt, so dass auch Plasmide, die für E.coli toxische Proteine codieren, stabiler propagiert werden können.

20-250 ml Induktionskulturen wurden mit einer Vorkultur in einem Verhältnis 1:50 angeimpft und bei 37°C unter Schütteln bis zum Erreichen einer OD<sub>600nm</sub>= 0,5-0,7 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 1 mM IPTG für 3-4 h bei 37°C (HIS-RBP Konstrukte) bzw. bei 30°C (HIS-SBP2 Konstrukte). Zur Kontrolle der Induktion wurden Aliquots kurz vor IPTG Zugabe sowie am Ende der Induktion entnommen und die Proteinexpression über ein SDS-PAGE nach Coomassie-Färbung analysiert

Die Zellen der Induktionskultur wurden durch Zentrifugation (10 min; 6000 Upm; 4°C; GSA-oder SS34-Rotor) sedimentiert und, zum effizienteren Aufschluss, bei –20°C eingefroren (ÜN) und wieder aufgetaut (bei RT). Anschließend wurden die Zellen in 1/10 Vol. kaltem (4°C) Lysepuffer (50 mM Tris/HCl pH 8.0, 0,2 mM EDTA pH 8.0, 1% Triton X-100) resuspendiert. Zusätzlich erfolgte eine Zugabe von Lysozym (100 μg/ml bzw. 1 mg/ml) und eine anschließende Inkubation für 15 min bei 30°C (bei niedriger Lysozymkonzentration) bzw. für 1 h auf Eis (bei hoher Lysozymkonzentration). Je nach Volumen des Lysats erfolgte eine Ultraschallbehandlung mit 8 Intervallen von je 15 sec Dauer im Cup Horn (Volumen <1 ml; maximale Leistung; Sonifier 450 / Branson) oder mit dem Mikro- (< 20 ml; Stufe 7; Sonifier B-12 / Branson). Nach Zentrifugation (30min; 13.000 Upm; 4°C; Tischzentrifuge oder SS34-Rotor) sind die löslichen Proteine im Überstand, während unlösliche Proteine und Zelltrümmer im Pellet enthalten sind. Von den einzelnen Schritten des Zellaufschlusses wurden Aliquots entnommen, die später zusammen über SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung oder im Western-Blot analysiert wurden.

# 5.7.2.1. Aufreinigung HIS-getaggter Proteine über IMAC unter nativen Bedingungen

Lag nach Zellaufschluss eine ausreichende Menge an rekombinantem HIS-getaggtem Protein in löslicher Form vor, so wurde dieses unter nativen Bedingungen über immobilisierende Metallaffinitäts-Chromatographie (IMAC) aufgereinigt. Der unter 5.7.2. beschriebene Überstand wurde dazu zunächst in einem Dialyserähmchen mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa (Slide-A-Lyzer; Pierce) gegen 20 mM Tris/HCl pH 8.0 bei 4°C dialysiert, um in der Überstandsfraktion enthaltenes EDTA (ca. 1,8 mM) zu entfernen. EDTA ist ein Ni<sup>2+</sup>-Chelator und würde daher mit der Aufreinigung der HIS-getaggten Proteine über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose interferieren. Die Aufreinigung der Proteine erfolgte über eine mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gepackte Säule oder in einem Eppendorf-Tube mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (in batch Verfahren). Die dialysierte Proteinlösung wurde zu in Waschpuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 50mM NaCl, 20 mM Imidazol pH 7.9) äquilibrierter Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose gegeben, und bei der *in batch* Aufreinigung zusammen mit der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose für 30-60 min unter Schütteln bei 4°C inkubiert. Nach Abnahme des Überstandes bzw. des Durchflusses wurde die Agarose-Matrix 3x mit Waschpuffer gewaschen und die gebundenen Proteine anschließend in je 3 Elutionsschritten mit Elutionspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) mit ansteigender Imidazolkonzentration (100 mM, 200 mM und 880 mM) eluiert. Anschließend wurden Aliquots der einzelnen Fraktionen über SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western-Blot analysiert. Die Proteinfraktionen wurden bei 4°C aufbewahrt.

# 5.7.2.2. Aufreinigung HIS-getaggter Proteine über IMAC unter denaturierenden Bedingungen

Lag nach Zellaufschluss nicht genügend rekombinantes Protein in löslicher Form vor, so wurde der unlösliche Anteil über IMAC unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und anschließend über mehrere Dialyseschritte wieder renaturiert.

Das Pellet nach Zellaufschluss und Zentrifugation (siehe 5.7.2.), welches die unlöslichen Proteine enthält, wurde in 1/20 Vol. Bindungspuffer (20 mM Tris/HCl pH 8.0, 500 mM NaCl) mit 8 M Harnstoff resuspendiert. Weiterhin unlösliche Proteine und Zellreste wurden durch Zentrifugation (10 min; 13.000 Upm; 4°C) sedimentiert und die im Überstand enthaltenen in 8 M Harnstoff löslichen Proteine über IMAC unter denaturierenden Bedingungen im *in batch* Verfahren aufgereinigt. Die Aufreinigung erfolgte im Prinzip wie unter 5.7.2.1 beschrieben. Einzige Änderung war, daß alle verwendeten Puffer zusätzlich 8M Harnstoff enthielten.

Nach erfolgter Aufreinigung wurden die Fraktionen mit dem höchten Proteingehalt gepoolt, und die Proteine durch Dialyse schrittweise gegen 20 mM Tris/HCl pH 8.0 mit 3 M, 2 M, 1 M und 0,5 M Harnstoff renaturiert.

# 5.7.3. Aufreinigung nativer Proteine über Gelfiltrationschromatographie

Zur Gewinnung eines Antiserums gegen den N-Terminus von nativem RBP1-205 Protein wurden Kaninchen mit bakteriell exprimiertem HIS-RBP1-205 Protein, das nach einem Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose Aufreinigungsschritt nochmals über Gelfiltrationschromatographie gereinigt wurde, immunisiert. Dazu wurden die Peak-Fraktion von HIS-RBP1-205 Protein nach Aufreinigung Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose (ca. 500μl) über eine in PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 1,4 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; pH. 7.3) äquilibrierte Superdex 75 HR 10/30 Gelfiltrationssäule (Pharmacia) bei einer Flußrate von 750 μl/min bei 4°C aufgetrennt. Dabei sind insgesamt 40 Fraktionen von je 500μl gesammelt worden. Die einzelnen Fraktionen wurden anschließend über SDS-PAGE untersucht, und die Fraktion mit der höchsten Konzentration an HIS-RBP1-205 Protein zur Immunisierung eines Kaninchens verwendet.

### 5.8. Gekoppelte in vitro Transkription und Translation

Zur *in vitro* Synthese von Proteinen wurde das *TNT T7 Quick Coupled Transcription/ Translation System* der Firma Promega eingesetzt. Dabei handelt es sich um ein modifiziertes Kaninchenretikulozyten-Lysat, in dem die *in vitro* Transkription eines Gens mit T7-Promotor und die Translation der neusynthetisierten RNA parallel abläuft. Dadurch entfällt die normalerweise für die Durchführung einer *in vitro* Translation notwendige separate Herstellung der zu translatierenden RNA. In Ansätzen in denen die neusynthetisierte Proteine radioaktivmarkiert werden sollten wurde ein Mix aus <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein (<sup>35</sup>S-*Trans-Label*) zugegeben. Dabei kommt es durch Einbau der radioaktiven Aminosäuren zu einer Markierung der neugebildeten Proteine. In Ansätzen in denen das neugebildete Protein nicht markiert werden sollte wurde anstelle des <sup>35</sup>S-*Trans-Labels* unmarkiertes Methionin zugegeben. Ein Standard-Transkriptions- & Translationsansatz hatte folgende Zusammensetzung:

25μl Ansatz mit  $^{35}$ S-Markierung: 20,0 μl TNT T7 Master Mix 1,0 μl  $^{35}$ S-Trans-Label (1000Ci/mmol; 10μCi/μl) -2,0 μl Matrizen-DNA (0,2μg/μl) Ad 25 μl DEPC-H $_2$ O

25μl Ansatz ohne <sup>35</sup>S-Markierung: 20,0 μl TNT T7 Master Mix -0,5 μl Methionin (1mM) 2,0 μl Matrizen-DNA (0,2μg/μl) Ad 25 μl DEPC-H<sub>2</sub>O

In einigen Fällen wurde das Volumen der Ansätze variiert. Dabei wurden jeweils die für den Standardansatz angegebenen Konzentrationen der einzelnen Komponenten beibehalten. Die Reaktionsansätze wurden auf Eis zusammenpipettiert und anschließend für 60-90 min bei 30°C inkubiert.

## 5.9. RNA-Protein-Bindungsstudien

### 5.9.1. RNA-Bindung im North-Western-Blot

Ein Verfahren zum Nachweis RNA-bindender Proteine stellt die North-Western-(NW)Methode dar. Es basiert auf der Bindung markierter RNA-Moleküle an auf einer Membran immobilisierten Proteine. Bei der Durchführung eines NW-Blots werden Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Membran transferiert, auf dieser de- und renaturiert und anschließend mit einer markierten RNA inkubiert. Die von dem Protein gebundene RNA kann dann über spezifische Detektionsverfahren nachgewiesen werden.

Die Durchführung der NW-Blots richtete sich im Wesentlichen nach den Protokollen von Gatignol et *al.*, 1991 und Gatignol & Jeang, 1994. Einzige Änderung war die Verwendung DIG-markierter RNA-Sonden anstelle von <sup>32</sup>P-markierten RNAs. Nach SDS-PAGE erfolgte der Transfer der Proteine auf eine Nylon- (Roche) oder PVDF-Membran (Amersham) unter Benutzung einer *Semi-Dry*-Blot-Apparatur (BioRad). Die Membran wurde anschließend an der Luft getrocknet. Danach erfolgte die De- und Renaturierung der Proteine durch eine 5 min Inkubation der Membran in 6 M Guanidin-Hydrochlorid in 1x Bindungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM DTT) und sich daran anschließende Inkubationen (ebenfalls jeweils 5 min) nach schrittweiser Verdünnung auf 3M, 1,5M, 0,75M, 0,375M und 0,1875M Guanidin-Hydrochlorid in 1x Bindungspuffer. Nach Äquilibrierung in Bindungspuffer wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation in Bindungspuffer mit 2,5% (w/v) Magermilchpulver abgesättigt. Nach zwei Waschschritten in Bindungspuffer erfolgte die Inkubation mit 50-100 ng/ml DIG-markierter RNA in Bindungspuffer (1-2 h bei RT). Als unspezifische Nukleinsäure-Kompetitoren wurden dem Bindungscocktail Heringssperma-DNA und tRNA der Bäckerhefe *S. cerevisiae* (je 10 μg/ml) zugegeben. Anschließend wurde die Membran nochmals in Bindungspuffer

gewaschen (3x 15 min) und erneut an der Luft getrocknet. Die Detektion DIG-markierter RNA erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

In einigen Fällen wurden Membranen ein zweites Mal einem NW-Protokoll unterworfen (reprobing). Dazu wurden sie nach Abklingen des von der DIG-Detektion stammenden Signals zunächst 2x 10 min in Bindungspuffer gewaschen und anschließend an der Luft getrocknet. Dann wurden sie der zuvor beschrieben De- und Renaturierungsprozedur unterzogen und nach Standard NW-Protokoll weiterprozessiert.

### 5.9.2. In vitro RNA-Bindung in Lösung

Bei den *in vitro* RNA-Bindungsexperimenten in Lösung wurde die Bindung einer <sup>32</sup>P-markierten RNA-Sonde an HIS-*getaggte* Proteine untersucht. Nach Bindung der RNA erfolgte die Aufreinigung der RNA-Protein-Komplexe über IMAC und die Bestimmung der Menge an gebundener RNA.

Die Bindung der <sup>32</sup>P-markierten RNA (ca. 2x10<sup>6</sup> cpm; 6x10<sup>7</sup> cpm/pmol) und dem HISgetaggtem Protein (0,2-2 μg) erfolgte bei 30°C während einer 1 h Inkubation in 100 μl
Bindungspuffer I (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 350mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol, 10
μg/ml Hefe-tRNA, 0,4 U/μl RNasin). Die Bindungsstudien wurde mit rekombinanten, in *E. coli* hergestellten Proteinen durchgeführt. Diese wurden vor Verwendung über IMAC
aufgereinigt und gegen 20 mM Tris/HCl dialysiert (siehe 5.7.2.1), um eine erneute
Aufreinigung über Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose zu ermöglichen. Nach 1 h Inkubation bei 30°C erfolgte
die Zugabe von ca.40 μl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrix in 400 μl Bindungspuffer II (20 mM
Imidazol pH 7.9, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 350 mM NaCl, 10 mM β-Mercaptoethanol,
10 μg/ml Hefe-tRNA). Die Bindung der RNA-Protein-Komplexe an die Matrix erfolgte
während einer 30 min Inkubation (4°C; unter Drehen). Danach wurden ungebundene RNA und
Proteine durch 4 Waschschritte mit jeweils 1 ml Bindungspuffer II entfernt. Die Menge der an
die Matrix gebundenen RNA(-Protein-Komplexe) wurde anschließend im Szintillationszähler
anhand der *Cerenkov cpm* bestimmt.

In manchen Fällen wurde die Agarose-Beads im Anschluss noch in Proteinauftragspuffer aufgekocht, und der Überstand nach 1 min Zentrifugation mit 13.000 Upm auf ein SDS-PAGE aufgetragen. Nach Coomassie-Färbung konnte auf diese Weise die Menge der ursprünglich an die Beads gebundenen Proteine bestimmt werden, während sich über Autoradiographie oder den PhosphoImager die Menge an gebundener RNA sowie deren Zustand bestimmen ließ.

Der Nachweis einer direkten Interaktion von RNA und Protein erfolgte über UV-Crosslinking. Dazu wurden die an die Beads gebundenen RNA-Protein-Komplexe mit UV-Licht bestrahlt (1x Autocrosslink Modus und 1x 5min cross-linking manuell, Abstand ca. 5 cm; Stratalinker UV Crosslinker 1800; Stratagene). und anschließend mit RNase A (1 µg/Ansatz) und T1 (100 U/Ansatz; beide Roche) für 15 min bei 37°C verdaut. Nach einem Waschschritt mit Bindungspuffer II wurde die Menge an das Protein*gecrosslinkter* RNA über Messung der Cerenkov-cpm im Szintillationszähler und/ oder nach SDS-PAGE über den Phosho-Imager bestimmt.

### 5.9.3. RNA-Bindung im Kaninchen-Retikulozytenlysat

Ein weiteres in dieser Arbeit verwendetes System in dem RNA-Protein Interaktionen untersucht wurden ist das Kaninchen-Retikulozytenlysat (RRL). Dabei erfolgt zuerst die Synthese des gewünschten HIS-*getaggten* Proteins im RRL. Danach wird markierte RNA zum RRL zugegeben und mit den neusynthetisierten Proteinen inkubiert. Die sich dabei bildenden RNA-Protein Komplexe können schließlich aufgrund der Affinität des HIS-*getaggten* Proteins zu Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose über IMAC aufgereinigt und anschließend die Menge an gebundener RNA bestimmt werden. Eine weitere Möglichkeit die RNA-Protein-Bindung im RRL zu untersuchen, besteht in dem kovalenten Verknüpfen der Protein mit der gebundener RNA durch UV-Bestrahlung (UV-Crosslinking). Die RNA-Protein-Komplexe können danach über SDS-PAGE und Autoradiographie oder den Phospho-Imager quantifiziert werden.

Die Bindungsexperimente im RRL wurden, bis auf wenige Änderungen, nach dem Protokoll von Beck & Nassal, 1996 und 1998 durchgeführt. Das zu untersuchende Protein wurde durch *in vitro* Translation in dem *TNT T7 Quick Coupled Transcription/ Translation System* der Firma Promega hergestellt (25 μl Ansatz; Inkubation 1 h bei 30°C; siehe auch 5.8.). Danach wurden 4μl [α-<sup>32</sup>P]-markierte RNA (4x10<sup>6</sup> cpm; ca. 5x10<sup>7</sup> cpm/pmol) zugegeben und der Reaktionsansatz für weitere 2 h bei 37°C inkubiert. Von den insgesamt 29 μl wurden 7 μl für das UV-Crosslinking verwendet, während die restlichen 22 μl zur Aufreinigung der RNA-Protein-Komplexe über IMAC herangezogen wurden. Vor dem UV-Crosslinking wurden die 7μl zunächst zur Verringerung der Gesamtproteinkonzentration mit 21 μl Bindungspuffer (50 mM KH2PO4 pH 7.2, 100 mM KCl, 20 mM Imidazol, 0,05% Tween-20, 10 μg/ml tRNA) verdünnt. Das Crosslinking erfolgte dann für 10 min (ca. 2,4 Joule/cm²) in einem offenem Eppendorf-Tube auf Eis (λ=254 nm; Abstand ca. 5 cm) in einem Stratalinker 1800 der Firma Stratagene. Nach anschließendem RNase A Verdau (1 mg/ml) für 30min bei 37°C wurden die Proben über SDS-PAGE und Autoradiographie bzw. den Phospho-Imager analysiert.

Zur Aufreinugung der RNA-Protein-Komplexe der verbliebenen 22 µl des Bindungsansatzes mittels IMAC wurden diese, nach Zugabe von 25 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Agarose-Matrix in 300 µl Bindungspuffer, zunächst für 1 h bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach drei Waschschritten mit jeweils 1 ml Bindungspuffer wurde die an die Matrix gebundene RNA-Menge im Szintillationszähler durch Messung der *Cerenkov cpm* bestimmt.

Parallel zu den RNA-Bindungsansätzen wurden zur Bestimmung der Translationseffizenz auch Translationsreaktionen ohne die spätere Zugabe von markierten RNA-Sonden, aber dafür mit einem Mix aus <sup>35</sup>S-Methionin und <sup>35</sup>S-Cystein (<sup>35</sup>S-*Trans-Label*), angesetzt. Anhand dieser Anätze ließ sich die Menge an synthetisiertem Protein bestimmen, und damit auch die in den Bindungsassays gemessene Menge proteingebundener RNA in Relation zur Menge an hergestelltem Protein setzen.

### 5.10. Zellkultur eukaryontischer Zellen und deren Transfektion

### Zellkultur

Die Kultivierung etablierter Säugetierzellinien erfolgte in Form von Einschichtkulturen (*Mono-Layer-Kulturen*) in einem Brutschrank bei konstant 37°C, 5% CO<sub>2</sub> und 95% Luftfeuchtigkeit in 75 cm²-Zellkulturflaschen, 10 cm-Zellkulturschalen oder Sechs-Lochplatten der Firma Greiner. Die verwendeten Zellinien wurden in dem im Materialteil (Kap. 4.) unter "Medien für eukaryontische Kulturen" beschriebenen Medium propagiert.

Die Zellen wurden bei Konfluenz im Verhältnis 1:3 bis 1:8 geteilt. Dazu wurden die Zellen nach zweimaligem Waschen mit 1x PBS (150 mM NaCl; 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7.2) durch Trypsinbehandlung vom Boden abgelöst und nach Zugabe von Medium durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt und in entsprechender Verdünnung neu ausgesäht.

Sf9 Insektenzellen wurden bei konstant 28°C im Inkubator (ohne zusätzliche Begasung) als adhärent wachsende Einschichtkulturen oder als Suspensionskulturen in dem im Materialteil unter "Medien für eukaryontische Kulturen" beschriebenen Medium kultiviert. Zur Transfektion der Sf9 Zellen mit DNA rekombinanter Baculoviren (siehe unten) wurden jeweils adhärent wachsende Zellen (in Sechs-Lochplatten) verwendet. Die Infektion der Sf9 Zellen mit rekombinanten Baculoviren erfolgte in 10-50 ml Suspensionskulturen. Suspensionskulturen uninfizierter Sf9 Zellen wurden unter Schütteln (140 Upm) inkubiert, und beim Erreichen einer Zelldichte von max. 2-3 x10<sup>6</sup> Zellen/ml wieder auf eine Zelldichte von ca. 3 x10<sup>5</sup> Zellen/ml verdünnt und anschließend weiterinkubiert.

### **Transfektion**

Zur Transfektion adhärent wachsender Säugetierzellen wurde das Transfektionsagenz *FuGENE* der Firma Roche verwendet. Die Durchführung der Transfektion erfolgte nach dem Protokoll

des Herstellers. *FuGENE* wurde auf RT gebracht und dann direkt in Serum-freies *DMEM*-Medium pipettiert und für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Medium/*FuGENE*-Gemisch tropfenweise zu der in einem Eppendorf-*Tube* vorgelegten DNA zugegeben und, nach vorsichtigem Mischen, für weitere 15 min bei RT inkubiert. Die Transfektion erfolgte durch die tropfenweise Zugabe des Gemisches zu den Zellen. *FuGENE* wurde jeweils in einem Verhältnis von 3:1 gegenüber DNA verwendet. Für die Transfektion der Zellen einer Sechs-Loch-Schale wurden üblicherweise 94 µl Serum-freies *DMEM*-Medium, 6 µl *FuGENE* und 2 µg DNA verwendet.

Die Transfektion der Insektenzellinie Sf9 mit der DNA rekombinanter Baculovirusgenome erfolgte ebenfalls unter Verwendung des *FuGENE*-Transfektionsagenz. Dazu wurde jeweils ca. 10% der rekombinanten Baculovirus-DNA aus dem Minipräp einer 2 ml Kultur von *E. coli* DH10BAC Zellen für die Transfektion von ca. 1 x10<sup>6</sup> Sf9 Zellen (in einer Sechs-Loch-Schale) eingesetzt. Im Prinzip erfolgte die Transfektion wie zuvor für die Säugetierzellen beschrieben. Allerdings wurde anstelle des *DMEM*-Mediums Antibiotika-freies, L-Glutamin-haltiges *SF900-II* Insektenzellmedium verwendet. Ein Mediumwechsel mit Antibiotika-haltigem Medium (siehe Materialteil "Medien für eukaryontische Zellkultur") wurde frühestens 24 h nach Transfektion vorgenommen. Ein Standardtransfektionsansatz zur Transfektion von 1 x10<sup>6</sup> adhärent wachsenden Sf9 Zellen innerhalb einer Sechs-Loch-Schale hatte die folgende Zusammensetzung: 94 μl Medium, 6 μl *FuGENE* und 5 μl Baculovirus-DNA.

### 5.11. Herstellung rekombinanter Baculoviren

Die Herstellung rekombinanter, das HISRBP138BD(-) Protein exprimierender Baculoviren erfolgte mit dem BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System der Firma Gibco (basierend auf: Luckow et al., 1993). Dabei findet die Generation des rekombinanten Baculovirusgenoms durch einen Transpositionsvorgang innerhalb von Baculovirusgenome-enthaltenden E. coli (E. coli DH10BAC; Gibco) statt, und nicht, wie sonst üblich, in Insektenzellen. Die E. coli DH10BAC Zellen enthalten episomal das Baculovirusgenom inklusive der notwendigen Transpositionssequenzen. Nach Transformation der Bakterien mit dem entsprechenden Transferplasmid (pFASTBAC mit "gewünschtem" Insert), das ebenfalls die entsprechenden Transpositionssequenzen aufweist, wird das Insert (inklusive des Polyhedrin-Promotors) in den Zellen in das Baculovirusgenom transponiert. Eine Blau-Weiß-Selektion erlaubt die Identifizierung der Bakterien, innerhalb derer eine Transposition stattgefunden hat. Die rekombinanten Baculovirusgenome können schließlich (über einen Minipräp) isoliert und über PCR verifiziert werden. Das "gewünschte" Baculovirusgenom wird dann über Transfektion in die Sf9 Zellen eingeschleust, was schließlich zur Produktion rekombinanter Baculoviren führt. Die Durchführung der Herstellung der rekombinanten Baculoviren erfolgte nach dem Protokoll zu dem BAC-TO-BAC Baculovirus Expression System Kit. Die Klonierung des verwendeten Transferplasmids pFBHISRBP138BD(-) ist im Anhang (Kap. 6.6.) beschrieben. Die Transfektion der Sf9 Zellen mit dem rekombinanten Baculovirusgenom erfolgte mit dem FuGENE Transfektionsagenz (siehe 5.10.).

# 5.12. Proteinextrakte eukaryontischer Zellen

Von den in dieser Arbeit verwendeten Zellinien wurden unterschiedliche Proteinextrakte für verschiedene Verwendungszwecke eingesetzt. Die Herstellung und Verwendung der einzelnen Extrakte sind in den nachfolgenden Abschnitten näher ausgeführt.

### 5.12.1. Gesamtzellextrakte

Ein Gesamtzellextrakt wurde hergestellt, wenn z.B. nach einer Transfektion bestimmt werden sollte in welcher Menge das gewünschte Protein exprimiert wurde. Konfluent bewachsene

Zellen einer Sechs-Loch-Schale (*6-well*) bzw. einer 10 cm Schale wurden zweimal in PBS gewaschen und dann in 200 µl bzw. 500 µl 4x Proteinauftragspuffer aufgenommen. Die Lysate sind nach Aufkochen über SDS-PAGE und/oder Western-Blotting oder NW-Blotting analysiert worden.

### 5.12.2. Cytoplasmatische Zellextrakte

### 5.12.2.1. Cytoplasmatischer Zellextrakt nach NP40-Lyse

Ein einfaches und schnelles Verfahren zur Herstellung eines cytoplasmatischen Zellextraktes stellt die Lyse der Zellen in einem NP40-haltigen Puffer und das Abtrennen der Kerne und des Zelldebris durch Zentrifugation dar. Zur Herstellung eines solchen Extrakts wurden die Zellen in PBS gewaschen und anschließend für 10 min bei 4°C in 200 μl (Sechs-Loch-Schale) bzw. 500 μl (10 cm Schale) kaltem Lysepuffer (1% NP-40, 50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) inkubiert. Nach Überführung des Zellysats in ein Eppendorf-Tube wurden Zellkerne und Zelldebris durch Zentrifugation (5 min bei 13.000 Upm oder 10 min bei 3.000 Upm; 4°C) sedimentiert. Der resultierende Überstand stellt den cytoplasmatischen Zellextrakt dar, der im weiteren für SDS-PAGE und/oder Western- oder NW-Blotting oder für Immunpräzipitationen eingesetzt wurde.

# 5.12.2.2. Cytoplasmatische Sf9-Insektenzellextrakte nach Lyse mit Octylglucosid

Mit verschiedenen Konzentrationen des nicht-ionischen Detergenz Octylglucosid wurde versucht Extrakte mit löslichem Baculovirus-exprimierten RBP herzustellen.

Dazu wurden die mit dem rekombinanten Baculovirus infizierten Sf9 Zellen einer 10 ml

Suspensionskultur durch Zentrifugation (900 Upm; 5 min; RT) sedimentiert und bei -20°C eingefroren (üN). Anschließend wurde das Zellpellet wieder auf Eis aufgetaut und in 100 µl kaltem (4°C) Resuspensionspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA) vorsichtig resupendiert. Nach Zugabe von Octylglucosid und Angleichen des Volumens auf 250 µl mit Resuspensionspuffer erfolgte eine Inkubation für 1 h auf Eis. Durch einen 10 min Zentrifugationsschritt mit 13.000 Upm bei 4°C wurden die löslichen Bestandteile von den unlöslichen Bestandteilen getrennt. Der Überstand nach Zentrifugation stellt den cytoplasmatischen Extrakt der jeweils verwendeten Octylglucosidkonzentration dar. Die Pelletfraktion wurde im Ausgangsvolumen (ca. 250 µl) 2x Proteinauftragspuffer unter Vortexen resuspendiert und parallel mit der Überstandfraktion analysiert.

### 5.12.3. Polysomenfraktionen

Um eine eventuelle Assoziation von RBP138 mit Actin-Filamenten bzw. eine Co-Lokalisation mit c-myc-mRNA zu untersuchen, wurden nach dem Protokoll von Hovland et al., 1995 von Huh7 Zellen verschiedene Polysomenfraktionen isoliert. Die Zellen wurden dazu zunächst 3x in PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte dann durch 5 min Inkubation in kaltem Lysepuffer I (10 mM Tris/HCl pH 7.6, 0,25 M Sucrose, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% NP40) bei 4°C. Nach Abschaben der Zellen vom Untergrund wurden diese in einem Eppendorf-Tube durch 5 min Zentrifugation mit 3350 Upm (=1000x g; 4°C) pelletiert. Der resultierende Überstand war die Fraktion mit den freien Polysomen (*free polysome fraction; FP*). Nach Waschen des Pellts in Lysepuffer I erfolgte die Resuspension in Lysepuffer II (10 mM Tris/HCl pH7.6, 0,25 M Sucrose, 130 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,05% NP40) und eine 10 min Inkubation bei 4°C. Der Überstand nach erneuter Zentrifugation (4700 Upm (=2000x g); 5 min; 4°C) enthielt die urprünglich mit dem Cytoskelett assoziierten Polysomen (*cytoskeletal bound polysome fraction; CBP*). Das Pellet wurde schließlich in

Lysepuffer III (10 mM Tris/HCl pH7.6, 0,25 M Sucrose, 25 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mM CaCl<sub>2</sub>, 0,5% NP40, 0,5% (w/v) Deoxycholat) resuspendiert und anschließend für 5 min mit 5800 Upm (=3000x g; 4°C) zentrifugiert. Während weiterhin unlösliche Bestandteile im Pellet wiederzufinden waren, enthielt der Überstand die gelösten, ehemals membrangebundenen Polysomen (membrane bound polysome fraction; MBP).

### 5.13. Immunpräzipitationen

Ausgangsmaterial für die Durchführung von Immunpräzipitationen waren cytoplasmatische Extrakte nach NP40-Lyse (siehe 5.12.2.1.) transfizierter oder untransfizierter eukaryontischer Zellen. In TNE (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0) gequollene Protein-A-Sepharose CL-4B (Amersham-Pharmacia) (ca. 25µl Bettvolumen/ Ansatz) und Antikörper wurden durch 30 min Inkubation bei 4°C (unter Drehen) gekoppelt. Nach mehreren Waschschritten in TNE erfolgte die Zugabe der Zellysate (ca. 1µg Protein) und BSA (Endkonzentration 0,5%), zum Absättigen unspezifischer Bindungsstellen. Die Ansätze wurden dazu üN unter Drehen bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Sepharose-Matrix mehrmals in TNE gewaschen, und schließlich in Proteinauftragspuffer resuspendiert. Nach Aufkochen der Ansätze wurde der Überstand nach Zentrifugation (1 min, 13.000 Upm) über SDS-PAGE und Western-Blot analysiert.

### 5.14. Western-Blot

Die Durchführung der Western-Blots richtete sich nach dem Standardprotokoll. Dabei wurden die Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mittels *Semi-dry*-Transfer auf eine Nylon- (Boehringer Mannheim) oder PVDF-Membran (Amersham-Pharrmacia) übertragen. Nach Absättigung unspezifischer Bindungsstellen auf der Membran durch 1 h Inkubation in 5% Magermilchpulver in TBST (10 mM Tris/HCl pH 8.8 100 mM NaCl, 0,2% Tween 20) folgte eine 2 h Inkubation in einer Verdünnung des Erstantikörpers (je nach Antikörper 1:1.000-1:100.000) in TBST. Unspezifisch gebundener Erstantikörper wurde durch 3x Waschen in TBST entfernt. Die Bindung des Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörpers erfolgte während einer 45 min Inkubation in einer 1:10.000 Verdünnung des Antikörpers in TBST. Nach mehrmaligem Waschen in TBST wurde die Membran kurz auf 3MM Whatman-Papier (3MM Whatman)getrocknet, dann mit einer 1:40 Mischung der ECL-Plus Lösungen (Amersham-Pharmacia) benetzt und für 5 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran erneut kurz auf einem Whatman-Papier abgetropft, bevor die Signale über einen lichtsensitiven Film (BioMax, Kodak) detektiert wurden.

In manchen Fällen wurden eine Membran, die schon nach der NW-Methode prozessiert worden war (siehe 5.9.1.), noch einem immun-chemischen Nachweis unterzogen. Dazu wurde die Membran, nach Abklingen der von der DIG-Detektion stammenden Signale, in TBST (2x 5min) gewaschen und im Anschluss direkt in einer Verdünnung des Erstantikörpers in 5% Magermilchpulver in TBST inkubiert. Von diesem Punkt an erfolgte die Weiterbehandlung der Membran wie zuvor für den "normalen" Western-Blot beschrieben.

# 5.15. Immunfluoreszenz- und konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Zur Untersuchung der subzellulären Verteilung der RBP-eGFP-Fusionproteine wurde die GFP-Eigenfluoreszenz oder die Fluoreszenz nach indirekter Immunfluoreszenzfärbung mit einem Fluoreszenz-Mikroskop (Axiophot M35; Firma Zeiss) bzw. einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (LSM 410; Firma Zeiss) beobachtet. Die Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenz und die konfokalen Laser-Mikroskopie erfolgte nach dem Protokoll von Moradpour et al., 1996. Die Zellen wurden dazu zunächst auf Deckgläsern ausgesäht, mit der

entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert und für 2-5 Tage inkubiert. Die Fixierung der Zellen erfolgte schließlich bei RT durch 30 min Inkubation in 2% Paraformaldehyd. Danach wurden die Zellen durch 10 min Inkubation in PBS/0,05% Saponin permeabilisiert und anschließend für 1 h mit dem Erstantikörper in PBS/3% BSA/0,05% Saponin inkubiert. Nach 3 Waschschritten in PBS/0,05% Saponin und einem weiteren in PBS/3% BSA/0,05% Saponin erfolgte die Inkubation mit dem Zweitantikörper in PBS/3% BSA/0,05% Saponin. Nach gründlichem Waschen wurden die Deckgläser nach Zugabe eines Tropfens Vectashield (Vector laboratories) auf Objektträgern befestigt und unter dem Mikroskop betrachtet.

Die Anfärbung von Strukturen des Endoplasmatischen Retikulums erfolgte in lebenden Zellen mit dem *ER-Tracker Blue-White DPX* der Firma Molecular Probes. Die Zellen wurden dazu 30 min in 1 µM *ER-Tracker* in serumfreien Medium (DMEM mit Glutamax-I; Gibco) bei 37°C inkubiert, und nach 3x Waschen in PBS wie zuvor beschrieben fixiert.

Durch Tetramthylrhodamine gekoppeltes *Wheat Germ Agglutinin* (WGA) der Firma Molecular Probes wurden Bestandteile der Kernporen und des Golgi Apparats spezifisch angefärbt. Zur Färbung wurden fixierte Zellen 60 min in 10 µg/ml *WGA* in PBS bei RT inkubiert. Nach Waschen der Zellen in PBS wurden die Deckgläser mit den fixierten Zellen auf ein Objektträger angebracht und unterm Mikroskop betrachtet.

# 5.16. Screening-Service des RZPD

Im Rahmen des Deutschen Human Genomprojekts (DHGP) wird vom "Ressourcenzentrum/ Primäre Datenbank im Deutschen HumanGenomprojekt" am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin (RZPD) ein für registrierte Mitglieder kostenloser *Screening*-Service für cDNA-Banken des RZPD angeboten. Dabei werden die gewünschten, auf Membranen gespotteten cDNA-Banken über Standard-Filterhybridisierungstechniken *gescreent*. Im Rahmen des *Screenings* identifizierte, positive cDNA-Klone werden in Form von Bakterien*stocks* vom RZPD zur weiteren Charakterisierung an den Auftragsgeber geschickt.

Für die Isolierung des fehlenden 3'-Endes der NIII-cDNA wurde beim RZPD ein solcher cDNA-Banken-*Screen* in Auftrag gegeben. Nach Übersenden der "pmalNIII no linker" Plasmid-DNA (=pmalRBP1-666) an den RZPD *Screening*-Service (am DKFZ in Heidelberg ansässig), wurde von diesem nach PstI & SalI Verdau des Plasmids die 510 Bp große "NIII 3'end" Sonde, die die Sequenz von Position 1497-1998 des NIII-ORFs enthält, hergestellt (siehe auch Materialteil Kap. 4. "Sonden"). Mit dieser Sonde wurden mehrere humane cDNA-Banken *gescreent*. Vier positive aus dem *Screening* hervorgegangene cDNAs wurden im Anschluss näher charakterisiert (siehe 2.1.2.).

# 6. Anhang

## 6.1. Abkürzungen

Abb. Abbildung
Ak Antikörper
Amp Ampicillin

AMV Alfalfa Mosaik Virus AP Alkalische Phosphatase APS Ammoniumpersulfat

AS Aminosäure

ATCC American Type Culture Collection

ATP Adenosintriphosphat

Bp Basenpaar

BSA bovine serum albumine (Serumalbumin aus Rindern)

bzw. beziehungsweise ccc covalent closed circular

Ci Curie

CMV Cytomegalievirus C-terminal carboxy-terminal

dATP Desoxyadenosintriphosphat dCTP Desoxycytidintriphosphat DEPC-Wasser Diethylpyrocarbonat-Wasser Desoxyguanosintriphosphat

DHBV *duck hepatitis B virus* = Hepatitis B Virus der Peking-Ente

DIG Digoxygenin

DNA Desoxyribonukleinsäure
DNase Desoxyribonuklease
ds doppelsträngig
DTT Dithiothreitol

DTP Desoxythymidintriphosphat

E RNA-Enkapsidierungssignal von Hepadnaviren

ECL enhanced chemiluminescence (verstärkte Chemilumineszenz)

E. coli Escherichia coli

EDTA Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP enhanced green fluorescent protein
ER Endoplasmatisches Retikulum
EST expressed sequence Tag

et al. und andere f femto g Gramm h Stunde(n)

HBV Humanes Hepatitis B Virus HIV humanes Immundefizienzvirus

IMAC immobilisierte Metall-Affinitätschromatographie

IP Immunpräzipitation IPTG Isopropylthiogalaktosid

 $\begin{array}{ccc} \text{Kap.} & \text{Kapitel} \\ \text{kB} & \text{Kilobasen} \\ \text{kDa} & \text{kiloDalton} \\ \text{l} & \text{Liter} \\ \lambda & \text{Lambda} \end{array}$ 

LB-Medium LURIA-BERTANI-Medium

m milli
M Molar
mA Milliampère

MBP Maltose-bindendes Protein

min Minute(n)
ml Milliliter
mM millimolar
mRNA messenger RNA

mikro μΜ mikroMolar nano n Nanometer nm Nonidet P40 NP40 Nt. Nukleotide N-terminal amino-terminal NW North-Western OD optische Dichte **ORF** offener Leserahmen **PAA** Polyacrylamid

PAGE Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

PBS Phosphate-buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PCR Polymerase-Kettenreaktion

pmol picoMol PO Peroxidase Pos. Position

RNA Ribonukleinsaäure RNase Ribonuklease RT Raumtemperatur

RT-PCR Reverse Transkription PCR

RZPD Ressourcenzentrum Primärdatenbank im deutschen

HumanGenomprojekt

sec Sekunde

SDS Natrium-Dodecylsulfat β-ME 2-Mercaptoethanol

Tab. Tabelle

TAE Tris-Acetat-EDTA
TBE Tris-Borat-EDTA Puffer
TE Tris-EDTA Puffer

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylendiamin
TNE Tris-Natriumchlorid-EDTA
Tris (hydroxymethyl)aminoethan

tRNA transfer RNA

U *unit* = Einheit für die Aktivität von Enzymen

u.a.unter anderemÜNüber NachtÜNKÜbernachtkultur

Upm Umdrehungen pro Minute

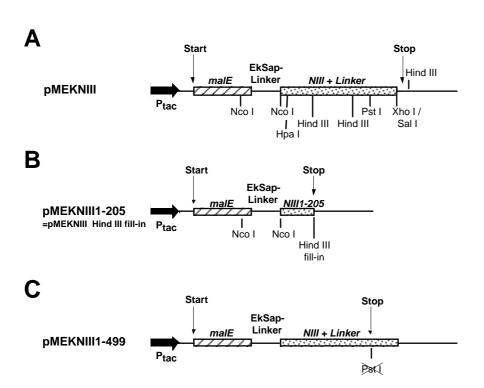
UTP Uridintriphophat
UV Ultraviolett
V Volt
vgl. vergleiche
wt Wildtyp

 $\begin{array}{ccc} \text{w/v} & \text{Gewicht/Volumen} \\ \text{w/w} & \text{Gewicht/Gewicht} \\ \text{z.B.} & \text{zum Beispiel} \\ \text{C} & \text{Grad Celsius} \end{array}$ 

## 6.2. Prokaryontische Expressionsplasmide

#### 6.2.1. Plasmide zur Expression unterschiedlicher MBP-NIII-Fragmente

Ausgangskonstrukt für die Klonierung der verschiedenen für die MBP-NIII- bzw. MBP-RBP138-Fusionsproteine codierenden Expressionskonstrukte war das für ein MBP-HBV-Core-Fusionsprotein codierende Plasmid pMEkC149(N) (Beterams, 1996). Es besteht aus einem pmal-c2-Rückgrat (New England Biolabs), und weist einen modifizierten Linker (EkSap-Linker; 78 Nt) hinter dem malE Gen auf, der von der Sequenz des HBV-Core-Proteins gefolgt wird. Durch Klonierung eines Fragments bestehend aus dem NIII-ORF und dem zur Herstellung der NIII-cDNA verwendeten Linkers in das pMEkC149(N) Plasmid entstand das Zwischenkonstrukt pMEKNIII (Abb. 6.2.1.1.A).



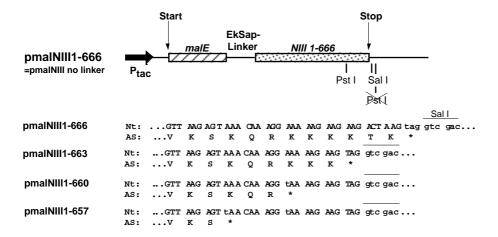
**Abb. 6.2.1.1.** Schematische Darstellung der verschiedenen pMEKNIII-Plasmide. (**A**) pMEKNIII (Zwischenkonstrukt). (**B**) pMEKNIII1-205. Konstrukt zur Expression des MBP-NIII1-205-Fusionsproteins (66,3 kDa) (**C**) pMEKNIII1-499. Konstrukt zur Expression des MBP-NIII1-499-Fusionsproteins (100,7 kDa). Die durchgestrichene Pst I Schnittstelle steht für einen Pst I Verdau mit anschließendem Verdau der Überhänge und Religation. Die Pst I Schnittstelle wird dadurch zertsört. Start und Stop geben Translations-Start und -Stop an.

Dazu wurde ein den NIII-ORF und den Linker enthaltendes 2017 Bp Fragment (x Nco I & Xho I) in den Nco I und Sal I geschnittenen pMEkC149(N) Vektor eingesetzt. Die Nco I Schnittstelle am Start des NIII-ORF war zuvor durch PCR mit den Primern "GalATGNcoI" (#24167) und "T7 Primer" und anschließender Klonierung des 147 Bp PCR-Fragments nach

Nco I und Hpa I Verdau generiert worden. Für die Klonierung von pMEKNIII musste das Plasmid pMEkC149(N) mit Nco I partialverdaut werden, da das 2017 Bp Fragment an die Nco I Schnittstelle am Ende des EkSap-*Linkers* und nicht an die Nco I Schnittstelle innerhalb des malE Gens einkloniert werden sollte.

Das **pMEKNIII-205** (=pMEKNIII Hind III fill-in) Plasmid (Abb. 6.2.1.1.B) codiert für das 66,3 kDa MBP-NIII1-205-Fusionsprotein. Das Konstrukt ging aus einem Hind III Verdau des pMEKNIII-Plasmids mit Auffüllen der 5′-Überhänge (*fill-in*) und anschließender Religation hervor. Das für das MBP-NIII1-499-Fusionsprotein (100,7 kDa) codierende **pMEKNIII1-499** Plasmid (Abb. 6.2.1.1.C) wurde durch Pst I Verdau von pMEKNIII mit Verdau der 3′-Überhänge und anschließender Religation hergestellt.

Das Konstrukt **pmalNIII1-666** (=pmalNIII no linker) (Abb. 6.2.1.2) codiert für das 119,7 kDa MBP-NIII-Fusionsprotein. Es enthält ein pmal-c2-Rückgrat, das mal E Gen, den EkSap-Linker und den NIII-ORF. Direkt hinter den NIII-ORF wurde ein Stop-Codon eingefügt. Dazu wurde eine PCR mit dem Primer "NIII 3'end(-)" (# 26195), der das Stop-Codon enthält, und dem Primer "NIII 5'intern" (#24423) mit dem Plasmid pMEKNIII als Matrize durchgeführt. Das Pst I und Sal I verdaute PCR-Fragment wurde schließlich eingesetzt. Die innerhalb des pmal-c2-Rückgrats vorkommende Pst I Schnittstelle wurde vor der Klonierung durch Pst I Verdau, Verdau der 3'-Überhänge und Religation zerstört. Dies hat zur Folge, dass die innerhalb des NIII-ORFs vorkommende Pst I Schnittstelle, die einzige Pst I Stelle ist.



**Abb. 6.2.1.2.** Schematische Darstellung des pmalNIII1-666 Plasmids sowie Ausschnitte aus den Sequenzen der pmalNIII1-666 bis -1-657 Plasmide und daraus abgeleiteten AS-Sequenzen. Die durchgestrichene Pst I Schnittstelle steht für einen Pst I Verdau, gefolgt von einem Exonuklease-Verdau der 3´-Überhänge und anschließende Religation. Die Pst I Schnittstelle wird dadurch zertsört. Start und Stop geben Translations-Start und -Stop an. In den AS-Sequenzen sind Stop-Codons als "\*" symbolisiert.

Die für die einzelnen MBP-NIII-Fusionsproteine mit kleinen C-terminalen Deletionen codierenden Konstrukte **pmalNIII1-663**, **-1-660 und -1-657** (Abb. 6.2.1.2) gehen auf das Plasmid pmalNIII1-666 zurück. Die Stop-Codons an den verschiedenen Stellen wurden durch eine PCR mit dem degenerierten Primer "NIII 3′(-) degen" (# 26543) und dem Primer "NIII 5′intern" (# 24423) und dem Plasmid pmalNIII1-666 als Matrize generiert. Die PCR-Fragmente wurde über die beiden Schnittstellen Pst I und Sal I in das Plasmid pmalNIII1-666 kloniert. Nach Sequenzierung wurden drei Plasmide pmalNIII1-663, -1-660 und -1-657 mit der in Abb. 6.2.1.2. aufgeführten, jeweils für das entsprechende MBP-NIII-Fusionsprotein codierenden Sequenz identifiziert. Die drei MBP-NIII-Fusionsproteine mit den kleinen C-terminalen Deletionen besitzen alle ein berechnetes Molekulargewicht von 119 kDa.

#### 6.2.2. Plasmide zur Expression HIS-getaggter RBP138-Fragmente

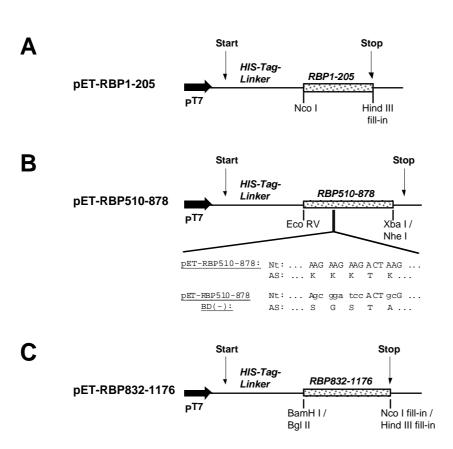
Ausgangspunkt für die Klonierung der Plasmide zur Expression HIS-*getaggter* RBP138-Fragmente war das Plasmid pET30a(+) der Firma Novagen. Die RBP138-Fragmente wurden dabei als Fusionsprotein mit einem N-terminalen, vom pET-Vektor codierten, ca. 45 AS langen AS-*Linker* exprimiert. Dieser *Linker* besteht aus einem HIS-*Tag* (6x HIS) am unmittelbaren N-Terminus, sowie aus einer Thrombin-Spaltstelle, einem S-*Tag* und einer Enterokinase-Spaltstelle.

Das Konstrukt **pET-RBP1-205** (Abb. 6.2.2.1.A) codiert für das 28,4 kDa HISRBP1-205 Fusionsprotein, das aus einem 44 AS *Linker* (inkl. HIS-*Tag*) und den ersten 205 AS des RBP138 Proteins besteht. Das Plasmid wurde durch das Einfügen eines 613 Bp großen, für die ersten 205 AS des RBP138 Proteins codierenden Fragments in den pET-Vektor generiert. Das Fragment wurde durch Nco I und Hind III Verdau und Auffüllen des 5′-Überhangs der Hind III Schnittstelle präpariert. Der pET-Vektor wurde ebenfalls Nco I und Hind III verdaut, und die Hind III Schnittstelle aufgefüllt. Die Ligation beider Fragmente führte zu dem Plasmid pET-RBP1-205.

Ausgangskonstrukt für die Klonierung des Plasmids **pET-RBP510-878** (Abb. 6.2.2.1.B), das für das HISRBP510-878 Fusionsprotein (49,9 kDa) codiert, stellte das Konstrukt pET-30a(+) Nhe I (freundlicherweise von Dr. A. Moebes zur Verfügung gestellt) dar. Das pET-30a(+) Nhe I Plasmid ist aus dem pET-30a(+) Plasmid durch Hind III Verdau und Auffüllen der Überhänge und anschließender Religation hervorgegangen. Es enthält im Polylinker anstelle der Hind III Schnittstelle daher eine Nhe I Schnittstelle. Das Konstrukt pET-RBP510-878 entstand durch Klonierung eines Eco RV und Xba I geschnittenen, für die AS 510-878 von RBP138 codierenden, 1103 Bp Fragments in den Eco RV und Nhe I geschnittenen pET-30a(+) Nhe I Vektor. Am C-Terminus des codierten HISRBP510-878 Proteins befinden sich 17 auf den Vektor zurückgehende AS.

Das Konstrukt **pET-RBP510-878BD(-)**, das für das 49,7 kDa HISRBP510-878BD(-) Protein mit mutierter K-reicher Region codiert, ist bis auf die durch eine Megaprimer-PCR (siehe Kap. 5..3.2.2) mit den Primern "T7", "RBP RNA BD(-)" (# BG10-5099) und "RBP3511-3530 NcoI(-)" (# BG10-5100) mutierte Sequenz innerhalb der K-reichen Region (KKKTK -> SGSTA), identisch mit dem Konstrukt pET-RBP510-878 (Abb. 6.2.2.1.B).

Das 43,6 kDa große Fusionsprotein HISRBP832-1176 wird von dem Konstrukt **pET-RBP832-1176** (Abb. 6.2.2.1.C) codiert. Dabei wurde ein durch Bgl II und Nco I Verdau, mit Auffüllen des 5´-Überhangs des Nco I Endes, generiertes 1035 Bp Fragment in den BamH I und Hind III verdauten pET-30a(+) Vektor (nach Auffüllen des 5´-Überhangs des Hind III Endes) kloniert.



**Abb. 6.2.2.1.** (A) Schematische Darstellung von pET-RBP1-205. Das davon codierte Fusionsprotein HISRBP1-205 endet mit AS 205 von RBP138. (B). Darstellung von pET-RBP510-878. Das codierte Fusionsprotein HISRBP510-878 enthält am C-Terminus 17 vom Vektor abgeleitete AS. Das Konstrukt pET-RBP510-878BD(-), das für ein Fusionsprotein mit mutierter K-reicher Region codiert, ist bis auf die angeführten Sequenzunterschiede innerhalb des für die K-reiche Region codierenden Bereichs, identisch mit pET-RBP510-878. (C) Darstellung von pET-RBP832-1176. Das codierte Fusionsprotein endet mit AS 1176 von RBP138. Start und Stop geben Translations-Start und -Stop an.

### 6.2.3. Plasmide zur Expression HIS-getaggter SBP2-Fragmente

Ausgangspunkt für die Klonierung der Plasmide zur Expression HIS-*getaggter* SBP2-Fragmente war das Plasmid pET30a(+) der Firma Novagen (siehe auch 6.2.2.). Dabei wurden die verschiedenen SBP2-Fragmente so in den pET-Vektor einkloniert, dass ein ca. 41 AS langer *Linker* am N-Terminus des jeweiligen SBP2-Fragments codiert wird. Der *Linker* besteht aus einem HIS-*Tag*, einer Thrombin-Spaltstelle und einem S-*Tag*. Im Gegensatz zu den pET-RBP Konstrukten (siehe 6.2.2.) weist der *Linker* jedoch keine Enterokinase-Spaltstelle mehr auf. Die für die Klonierung verwendeten SBP2-Sequenzen wurden mittels PCR aus einer MATCHMAKER Rattenleber-cDNA-Bank (Clontech) bzw. von dem Ratten-cDNA *EST*-Klon "H31811" (ATCC Nr.: 2001105) amplifiziert.

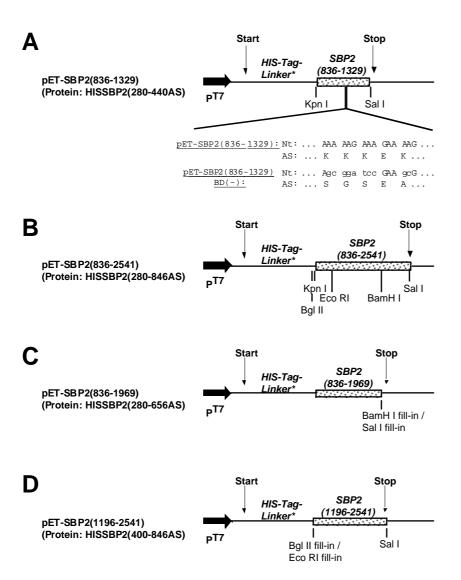
Das für das aus 216 AS bestehende HISSBP2(280-440) Protein codierende **pET-SBP2(836-1329)** Plasmid (Abb. 6.2.3.1.A) entstand durch Klonierung eines die Sequenz der AS 280-440 von SBP2 enthaltenden PCR-Fragments über Kpn I und Sal I in den pET-30a(+) Vektor. Das verwendete PCR-Fragment ging aus einer PCR mit den Primern "SBP2(836-854)-NcoI" (# BG10-14119) und "SBP2(1308-29)SalI(-)" (# BG10-14120) und der MATCHMAKER Rattenleber-cDNA-Bank (Clontech) hervor. Das HISSBP2(280-440) Protein weist hinter der SBP2-Sequenz am C-Terminus 15 vom Vektor codierte AS auf. Darunter befindet sich u.a. ein zweiter HIS-*Tag*.

Das für das SBP2-Fragment mit mutierter K-reicher Region codierende **pETSBP2**(836-1329)**BD**(-) Konstrukt ist bis auf die in Abb. 6.2.3.1.A angeführten Sequenzunterschiede identisch mit dem Konstrukt pET-SBP2(836-1329). Die Mutationen wurden, ähnlich wie schon zuvor für das pET-RBP510-878BD(-) Konstrukt beschrieben, über eine Megaprimer-PCR (siehe Kap. 5..3.2.2) mit den Primern "SBP2(836-854)-NcoI" (# BG10-14119), "SBP2 RNA BD(-)" (# BG11-1108) und "SBP2(1308-29)SalI(-)" (# BG10-14120) und mit der SBP2-Wildtypsequenz als Matrize generiert. Das Asp 718 (= Iso-Kpn I) und SalI verdaute PCR-Fragment wurde in den Asp718 und Sal I geschnittenen pET-30a(+) eingesetzt.

Das Protein 607 AS lange HISSBP2(280-846) weist den authentischen C-Terminus des SBP2 Proteins auf. Das dafür codierende Konstrukt **pET-SBP2(836-2541)** (Abb. 6.2.3.1.B) entstand durch Klonierung eines SBP2-PCR Fragments in das pET-SBP2(836-1329) Plasmid. Mittels PCR mit den beiden Primern "T3PROM" (# BG10-6777) und "SBP2end-SalI(-)" (# BG10-14117) und dem Ratten-EST-Klon "H31811" als Matrize wurden in etwa die hinteren zwei Drittel des SBP2-ORFs amplifiziert. Das nach Eco RI und Sal I Verdau entstandene 1347 Bp Fragment, das für die AS 400-846 von SBP2 codiert, wurde über Eco RI und Sal I in das pET-SBP2(836-1329) Konstrukt kloniert.

Das für das 432 AS lange HISSBP2(280-656) Protein codierende **pET-SBP2(836-1969)** Konstrukt (Abb. 6.2.3.1.C) stellt ein Deletionsvariante des pET-SBP2(836-2541) Plasmids

dar. Das pET-SBP2(836-2541) Plasmid wurde BamH I und Sal I verdaut, wodurch die für die SBP2 AS 657-846 codierende Sequenz herausfiel. Nach Auffüllen der Überhänge der BamH I und Sal I Enden und Religation entstand das Plasmid pET-SBP(836-1969). Das dadurch codierte HISSBP2(280-656) Protein besitzt am C-Terminus 15, SBP2-unabhängige, vom Vektor codierte AS. Diese enthalten u.a. einen zweiten HIS-*Tag*.



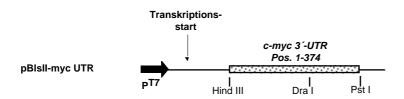
**Abb. 6.2.3.1.** (**A**) Schematische Darstellung von pET-SBP2(836-1329). Das davon codierte Fusionsprotein HISSBP2(280-440) enthält am C-Terminus 15 zusätzliche, vom Vektor abgeleitete AS. Das Konstrukt pET-SBP2(836-1329)BD(-) ist bis auf die angeführten Sequenzunterschiede innerhalb des für die K-reiche Region codierenden Bereichs identisch mit pET-SBP2(836-1329). (**B**) Darstellung von pET-SBP2(836-2541). Das Fusionsprotein HISSBP2(280-846) endet mit AS 846 des SBP2 Proteins. (**C**) Darstellung von pET-SBP2(836-1969). Das HISSBP2(280-656) Protein enthält am C-Terminus 15 zusätzliche AS. (**D**) Darstellung von pET-SBP2(1196-2541). Das HISSBP2(400-846) Protein endet mit AS 846 des SBP2 Proteins. – *HIS-Tag-Linker\** steht für den HIS-*Tag*, die Thrombin-Spaltstelle und den S-*Tag* codierenden Abschnitt. Start und Stop geben Translations-Start und -Stop an.

Das Konstrukt **pET-SBP2(1196-2541)** (Abb. 6.2.3.1.D) codiert für das HISSBP2(400-846) Protein, das aus 483 AS besteht. Das Konstrukt ist eine Deletionsvariante des pET-SBP2(836-2541) Plasmids. Durch Bgl II und Eco RI Verdau wurde der für die AS 280-399 codierende Bereich des Plasmids deletiert. Die Religation nach Auffüllen der Überhänge der Bgl II und Eco RI Enden führte zu dem pET-SBP(1196-2541) Plasmid.

## 6.3. Plasmide für die in vitro Transkription

#### 6.3.1. Plasmidkonstrukte zur Herstellung der c-myc 3'-UTR-Sonden

Als Matrize für die *in vitro* Transkription der beiden RNA-Sonden "myc 1-374" und "myc 1-231" (vgl. Kap. 2.4.2.3.) diente das Plasmid **pBlsII-myc UTR** (Abb. 6.4.1.1.). Es besteht aus einem pBlsIISK(-) Rückgrat und der humanen c-myc 3′-UTR-Sequenz von Position 1-374. Die c-myc-3′-UTR-Sequenz wurde von dem IMAGp998F08397 cDNA-Klon über PCR mit den Primern "3′-UTR-myc-Not I" (# BG10-12280) und "3′-UTR-myc-AflII(-)" (# BG10-13084) amplifiziert, und nach Hind III und Pst I Verdau in Hind III und Pst I geschnittenen pBlsIISK(-)-Vektor einkloniert. Die Transkription vom T7-Promotor aus führt zu Transkripten mit *Sense*-Orientierung. Zwischen Transkriptionsstart und Beginn der c-myc-3′-UTR-Sequenz liegen 60 Nt, die überwiegend auf das pBlsIISK(-) Plasmid zurückgehen. Die Transkription von pBlsII-myc UTR nach Linearisierung mit Pst I führt zur Sonde "myc 1-374", die Transkription nach Linearisierung mit Dra I zur Sonde "myc 1-231".

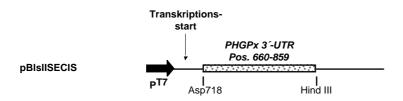


**Abb. 6.4.1.1.** Schematische Darstellung von pBlsII-myc UTR. Die PCR-amplifizierte human c-myc-3′-UTR-Sequenz von Position 1-374 wurde über Hind III und Pst I in den pBlsIISK(-) Vektor kloniert.

#### 6.3.2. Plasmidkonstrukt zur Herstellung der SECIS-Sonde

Das **pBlsIISECIS** Plasmid (Abb. 6.4.2.1.) diente nach Linearisierung mit Hind III als Matrize für die Herstellung der aus dem SECIS-Element des Ratten-PHGPx-3′-UTRs bestehenden SECIS-RNA-Sonde (siehe Kap. 2.10.). Durch Transkription von pBlsIISECIS x Hind III vom T7-Promotor aus entsteht eine 214 Nt lange, die PHGPx-3′-UTR von Pos. 660-859 (= SECIS Element) enthaltende RNA. Das Plasmid entstand durch Klonierung eines die SECIS-Sequenz enthaltenden PCR-Fragments über Asp 718 und Hind III in den pBlsIISK(-)

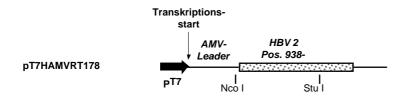
Vektor. Das verwendete 203 Bp große PCR-Fragment ging aus einer PCR mit den Primern "PHGPx 3'UTR-KpnI-NotI" (# BG11-940) und "PHGPx 3'UTR-HindIII(-)" (# BG11-941) und dem aus einer Ratten-Milz-cDNA-Bank stammenden, das PHGPx-3'-UTR enthaltenden EST 223388 cDNA-Klon (ATCC Nr.: 2035200) hervor.



**Abb. 6.4.2.1.** Schematische Darstellung von pBlsIISECIS. Die PCR-amplifizierte Ratten-PHGPx-3'-UTR-Sequenz (=SECIS-Element) von Position 660-859 wurde über Asp 718 und Hind III in den pBlsIISK(-) Vektor kloniert.

#### 6.3.3. Plasmidkonstrukt zur Herstellung der HBV-RT-Sonde

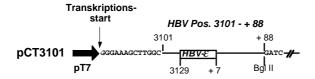
Als Matrize für die Herstellung der HBV-RT-Sonde sowie der AMV-*Leader*-Sonde (siehe Kap. 2.4.1.) diente das Plasmid **pT7HAMVRT178** (Abb. 6.4.3.1.), das freundlicherweise von Dr. J. Beck (Freiburg) zur Verfügung gestellt wurde. Es enthält die AMV-*Leader*-Sequenz und die für die HBV-Polymerase codierende Sequenz ab AS 178 (= HBV Sequenz ab Pos. 938 nach Galibert et al., 1979). Die Transkription vom T7-Promotor aus führt zu Transkripten mit *Sense*-Orientierung. Zwischen Transkriptionsstart und Beginn der HBV-Sequenz liegt die 44 Nt AMV-*Leader*-Sequenz, ein 11 Nt langer *Linker*, inklusive einer Not I Schnittstelle. Die Transkription des mit Nco I linearisierten Plasmids führt zur 49 Nt langen AMV-*Leader*-RNA-Sonde, die Transkription nach Stu I Linearisierung zur 248 Nt lange HBV-RT-RNA-Sonde.



**Abb. 6.4.3.1.** Schematische Darstellung von pT7HAMVRT178 (Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. J. Beck, Freiburg, zur Verfügung gestellt). Nach Transkription vom T7-Promotor aus entsteht nach Linearisierung des Plasmids mit Nco I die 49 Nt AMV-*Leader*-RNA-Sonde, nach Linearisierung mit Stu I die 248Nt lange HBV-RT-RNA, die neben einer 46 Nt AMV-*Leader*-Sequenz und einem 11 Nt *Linker* die HBV-Sequenz von Pos. 938 bis 1130 enthält.

#### 6.3.4. Plasmidkonstrukt zur Herstellung der HBV-ε-haltigen Sonde

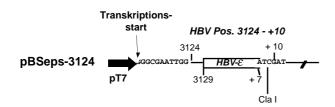
Das **pCT3101** Plasmid (freundlicherweise von Dr. J. Beck, Freiburg, zur Verfügung gestellt; Abb. 6.4.4.1.) diente nach Linearisierung mit Bgl II als Matrize für die Herstellung der HBV- $\varepsilon$ -haltigen RNA-Sonde. Diese 184 Nt lange, aus der Transkription vom T7-Promotor aus hervorgehende RNA enthält einem 14 Nt *Linker*, die HBV- $\varepsilon$ -Sequenz (HBV Pos. 3129 bis +7; 61 Nt) und benachbarte HBV-Sequenzen (HBV Pos. 3101-3128 und +8 - +88; 28 bzw. 81 Nt).



**Abb. 6.4.4.1.** Schematische Darstellung von pCT3101 (Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. J. Beck, Freiburg, zur Verfügung gestellt). Nach Transkription vom T7-Promotor aus entsteht nach Linearisierung des Plasmids mit Bgl II die 184 Nt lange HBV- $\epsilon$ -haltige RNA-Sonde.

#### 6.3.5. Plasmidkonstrukt zur Herstellung der HBV-ε-only Sonde

Das **pBSeps-3124** Plasmid (T. Knaus, Dissertation 1994; freundlicherweise von Dr. M. Nassal, Freiburg, zur Verfügung gestellt; Abb. 6.4.5.1.) enhthält ein pBlsIISK(-)-Rückgrat und diente nach Linearisierung mit Cla I als Matrize für die Herstellung der HBV-\varepsilon-only RNA-Sonde (siehe Kap. 2.4.2.). Diese 80 Nt lange, aus der Transkription vom T7-Promotor aus hervorgehende RNA enthält einem 11 Nt *Linker* und die HBV-Sequenz (HBV Pos. 3124 bis +10; 69 Nt), wobei die 61 Nt HBV-\varepsilon-Sequenz von HBV Pos. 3129- +7 reicht.

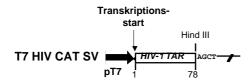


**Abb. 6.4.5.1.** Schematische Darstellung von pBSeps-3124 (Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. M. Nassal, Freiburg, zur Verfügung gestellt). Nach Transkription vom T7-Promotor aus entsteht nach Linearisierung des Plasmids mit Cla I die 80 Nt lange HBV-ε-only RNA-Sonde.

#### 6.3.6. Plasmidkonstrukt zur Herstellung der HIV-1 TAR-RNA-Sonde

Das **T7 HIV CAT SV** Plasmid (freundlicherweise von Dr. K.T. Jeang, NIH Bethesda, USA, zur Verfügung gestellt; Abb. 6.4.6.1.), welches ein pBR322-Rückgrat aufweist, diente nach Linearisierung mit Hind III als Matrize für die Herstellung der HIV-1 TAR-RNA-Sonde.

Diese 82 Nt lange, aus der Transkription vom T7-Promotor aus hervorgehende RNA enthält HIV-1 TAR-Sequenz von +1 bis + 82.

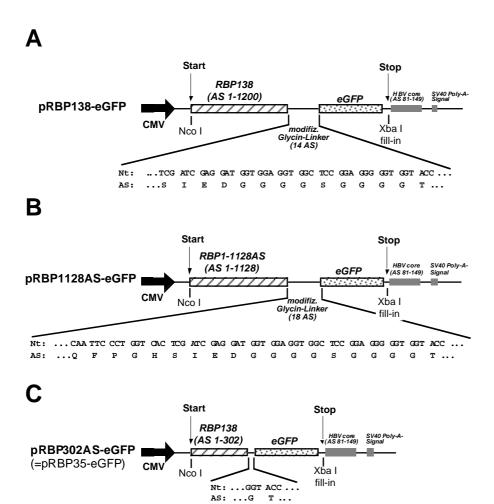


**Abb. 6.4.6.1.** Schematische Darstellung von "T7 HIV CAT SV" (Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. K.T. Jeang, NIH Bethesda, zur Verfügung gestellt). Nach Transkription vom T7-Promotor aus entsteht nach Linearisierung des Plasmids mit Hind III die 82 Nt lange HIV-1 TAR-RNA-Sonde.

## 6.4. Eukaryontische Expressionsplasmide

# 6.4.1. Plasmide zur Expression unterschiedlicher RBP-eGFP-Fusionsproteine

Die Plasmidkonstrukte **pRBP138-eGFP**, **pRBP1128AS-eGFP** und **pRBP302AS-eGFP** wurden zur Expression der Fusionsproteine RBP138-eGFP (166,2 kDa), RBP1128AS-eGFP (158,7 kDa) und RBP302AS-eGFP (62,7 kDa) unter Kontrolle des CMV-Promotors in Huh7 Zellen verwendet (Kap. 2.8.). Ausgangskonstrukt für die Klonierung von **pRBP138-eGFP** (Abb. 6.5.1.1.A) war das für ein HBV-Core-Protein mit einem in die antigene Schleife des Core-Proteins inseriertem GFP codierende Plasmid pChGFP(1-149) (freundlicherweise von Dr. P. Kratz zur Verfügung gestellt; Kratz, 1999). **pRBP138-eGFP** enthält den RBP138-ORF von AS 1-1200 (und ist damit 8 AS kürzer als das komplette RBP138 Protein), einen 14 AS Glycin-*Linker* und das eGFP Protein (238 AS), sowie weitere 12, vom zweiten Glycin-*Linker* des Core(1-80)-eGFP-Core(81-149)-ORF des Ausgangsplasmids pChGFPG(1-149) stammende AS. Im 3'-UTR liegt die Core(81-149)-Sequenz und das SV40 Poly-A-Signal.



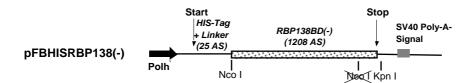
**Abb. 6.5.1.1.** Schematische Darstellung der Plasmide zur Expression unterschiedlicher RBP-eGFP-Fusionsproteine in Eukaryonten. (A) pRBP138-eGFP. (B) pRBP1128AS-eGFP. (C) pRBP302AS-eGFP (= pRBP35-eGFP). Start und Stop geben Translations-Start und -Stop an. (Weitere Erläuterungen siehe Text.)

Das Plasmid **pRBP1128AS-eGFP** (Abb. 6.5.1.1.B) codiert für die AS 1-1128 des RBP138 Proteins, einen 18 AS langen Glycin-*Linker* und das eGFP Protein inklusive der 12 AS des zweiten Glycin-*Linkers* (siehe oben). Das Plasmid stellt ein Deletionskonstrukt des pRBP138-eGFP dar. Es ist aus der Ligation des aus dem Xba I und EcoRI (Eco RI Ende wurde aufgefüllt) Verdau von pRBP138-eGFP hervorgehendem 7,8 kBp Fragment mit dem nach Xba I und PpuM I (PpuM I Ende wurde aufgefüllt) Verdau von pRBP138-eGFP entstehenden etwa 750 Bp Fragment, hervorgegangen.

Das Plasmid **pRBP302AS-eGFP** (= pRBP35-eGFP) (Abb. 6.5.1.1. C) stellt ebenfalls ein Deletionskonstrukt von pRBP138-eGFP dar. Es codiert für die ersten 302 AS des RBP138 Proteins, einen auf zwei AS verkürzten *Linker* und das eGFP Protein inklusive der zuvor beschriebenen 12 AS am C-Terminus. Es wurde durch Ligation des aus einem Spe I und Acc 65i (Acc 65i Enden wurden aufgefüllt) Verdau von pRBP138-eGFP entstehenden 4,5 kBp Fragments mit dem aus einem Spe I und BciV (BciV Enden wurden durch *Mung-Bean* Nuklease abgedaut) entstehenden 1,5 kBp Fragment generiert.

# 6.5. Konstrukt zur Transposition in das Baculovirusgenom in E. coli DH10BAC Zellen

Wie in Kap. 5.11. beschrieben wurden rekombinante Baculoviren über das BAC-TO-BAC Baculovirus-Expressionssystem (Life Technologies) hergestellt. Dabei wird die gewünschte Sequenz über einen Transpositionsvorgang in das Baculovirusgenom eingebracht. Die Transposition findet hierbei in E. coli DH10BAC Zellen (Life Technologies) statt, die das Baculovirusgenom episomal enthalten. Das zur Transposition in das Baculovirusgenom verwendete Transferplasmid pFBHISRBP138BD(-) (Abb. 6.6.1.), welches neben der RBP138BD(-) Sequenz noch die für die Transposition in das Baculovirusgenom notwendigen Sequenzen enthält, geht auf das Plasmid pFASTBAC HTb (Life Technologies) zurück. In dieses Ausgangsplasmid wurde zunächst über Nco I und Kpn I in zwei Klonierungsschritten der komplette RBP138-ORF einkloniert. Anschließend wurde die Sequenz der K-reichen RNA-Bindungsregion gegen die Sequenz der mutierten K-reichen Region ausgetauscht (vgl. Kap. 6.2.2.), sowie die zweite RBP138 interne Nco I Schnittstelle über einen Megaprimer-PCR Ansatz (Methode siehe Kap.5.3.2.2.), u.a. mit dem Primer "RBP3511-3530NcoI(-)" (# BG10-5100)), unter Beibehaltung der AS-Sequenz ausgeschaltet. Nach Transposition in das Baculovirusgenom führt die Expression vom Polyhedrin-Promotor aus zu einem 1233 AS langen HISRBP138BD(-) Protein (141,4 kDa), welches aus der 1208 AS RBP138 Protein mit mutierter K-reicher Region und einem 25 AS langen, N-terminalen Linker zusammengesetzt ist. Die Sequenz des 25 AS langen Linkers geht auf das pFASTBAC HTb Plasmid zurück und codiert u.a. einen HIS-Tag.



**Abb. 6.6.1.** Schematische Darstellung von pFBHISRBP138BD(-). Das Plasmid diente als Transferplasmid zur Transposition in das Baculovirusgenom in *E. coli* DH10BAC Zellen. Expression vom Polyhedrin-Promotor (Polh) aus führt zu dem HISRBP138BD(-) Protein (141,4 kDa), das aus einem 25 AS langen *Linker* inklusive eines HIS-*Tags*, sowie der RBP138-Sequenz mit mutierter K-reicher RNA-Bindungsregion besteht.

## 6.6. RBP-Sequenzen

#### RBP138 Protein (1208 AS)

 $\verb|MDSL|| possible to the continuous of the con$ SFOTMOREVAANSONGEEIVPALTLRFLITOLEAALRNIOAGNYTAHOINIGYYLTLLFLYGVALTERGKKEDYTEAENK FLVMKMMIQENEICENFMSLVYFGRGLLRCAQKRYNGGLLEFHKSLQEIGDKNDHWFDIDPTEDEDLPTTFKDLLNNFIK TTESNIMKQTICSYLDCERSCEADILKNTSYKGFFQLMCSKSCCVYFHKICWKKFKNLKYPGENDQSFSGKKCLKEGCTG  ${\tt DMVRMLQCDVPGIVKILFEVVRKDEYITIENLGASYRKLISLKITDTDIRPKISLKFNTKDEMPIFKLDYNYFYHLLHII}$ IISGTDIVRQIFDEAMPPPLLKKELLIHKNVLESYYNHLWTNHPLGGSWHLLYPPNKELPQSKQFDLCLLLALIKHLNVF PAPKKGWNMEPPSSDISKSADILRLCKYRDILLSEILMNGLTESQFNSIWKKVSDILLRLGMMQEDIDKVKENPIENISL DYHQLSVYLGIPVPEIIQRMLSCYQQGIALQSITGSQRIEIEELQNEEEELSPPLMEYNINVKSHPEIQFAEINKDGTSI  ${\tt PSESSTESLKDLQEVKSKQRKKKKTKNKKNKDSKEDQVPYVVEKEEQLRKEQANPHSVSRLIKDDASDVQEDSAMEDKFY}$ SLDELHILDMIEOGSAGKVTTDYGETEKERLAROROLYKLHYQCEDFKRQLRTVTFRWQENOMQIKKKDKIIASLNQQVA  ${\tt FGINKVSKLQRQIHAKDNEIKNLKEQLSMKRSQWEMEKHNLESTMKTYVSKLNAETSRALTAEVYFLQCRRDFGLLHLEQ}$  ${\tt TEKECLNQLARVTHMAASNLESLQLKAAVDSWNAIVADVRNKIAFLRTQYNEQINKVKQGFALSTLPPVQLPPPPPSPEI}$  ${\tt LMQOFLGRPLVKESFFRPILTVPOMPAVCPGVVSATGOPRAPLMTGIAWALPAPVGDAVPPSAGLRSDPSIMNWERITDR}$  ${\tt LKTAFPQQTRKELTDFLRKLKDAYGKSLSELTFDEIVCKISQFIDPKKSQSQGKSVSNVNCVSPSHSPSQPDAAQPPKPA}$ WRPLTSQGPATWEGASNPDEEEEEEEPCVICHENLSPENLSVLPCAHKFHAQCIRPWLMQQGTCPTCRLHVLLPEEFPGHPSRQLPKI\*

#### RBP35 Protein (303 AS)

MDSLPDEFFVRHPAVEDQRKEETENKLEKSSGQLNKQENDIPTDLVPVNLLLEVKKLLNAINTLPKGVVPHIKKFLQEDF SFQTMQREVAANSQNGEEIVPALTLRFLITQLEAALRNIQAGNYTAHQINIGYYLTLLFLYGVALTERGKKEDYTEAENK FLVMKMMIQENEICENFMSLVYFGRGLLRCAQKRYNGGLLEFHKSLQEIGDKNDHWFDIDPTEDEDLPTTFKDLLNNFIK TTESNIMKQTICSYLDCERSCEADILKNTSYKGFFQLMCSKSCCVYFHKICWKKFKNLKYPEF\*

#### RBP87 Protein (760 AS)

MDSLPDEFFVRHPAVEDQRKEETENKLEKSSGQLNKQENDIPTDLVPVNLLLEVKKLLNAINTLPKGVVPHIKKFLQEDF SFQTMQREVAANSQNGEEIVPALTLRFLITQLEAALRNIQAGNYTAHQINIGYYLTLLFLYGVALTERGKKEDYTEAENK FLVMKMMIQENEICENFMSLVYFGRGLLRCAQKRYNGGLLEFHKSLQEIGDKNDHWFDIDPTEDEDLPTTFKDLLNNFIK TTESNIMKQTICSYLDCERSCEADILKNTSYKGFFQLMCSKSCCVYFHKICWKKFKNLKYPGENDQSFSGKKCLKEGCTG DMVRMLQCDVPGIVKILFEVVRKDEYITIENLGASYRKLISLKITDTDIRPKISLKFNTKDEMPIFKLDYNYFYHLLHII IISGTDIVRQIFDEAMPPPLLKKELLIHKNVLESYYNHLWTNHPLGGSWHLLYPPNKELPQSKQFDLCLLLALIKHLNVF PAPKKGWNMEPPSSDISKSADILRLCKYRDILLSEILMNGLTESQFNSIWKKVSDILLRLGMMQEDIDKVKENPIENISL DYHQLSVYLGIPVPEIIQRMLSCYQQGIALQSITGSQRIEIEELQNEEEELSPPLMEYNINVKSHPEIQFAEINKDGTSI PSESSTESLKDLQEVKSKQRKKKKTKNKKNKDSKEDQVPYVVEKEEQLRKEQANPHSVSRLIKDDASDVQEDSAMEDKFY SLDELHILDMIEQVSMIREGACLLLLLSGFSCDSLNSITL\*

# 7. Literatur

Aitken, R., Gilchrist, J., und Sinclair, M.C. (1994). Vectors to facilitate the creation of translational fusions to the maltose-binding protein of E. coli. *Gene* 144: 69-73.

Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., und Lipman, D.J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Ausubel, I., Frederick, M. (1996). Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, Inc.

Bartenschlager, R., und Schaller, H. (1992). Hepadnaviral assembly is initiated in by polymerase binding to the encapsidation signal in the viral RNA genome. *EMBO J.* 11: 3413-3420.

Bashirullah, A., Cooperstock, R.L., und Lipshitz, H.D. (1998). RNA localization in development. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 335-394.

Bassell, G.J., Oleynikov, Y., und Singer, R.H. (1999). The travels of mRNAs through all cells large and small. *FASEB J.* 13: 447-454.

Beasley, R.P. (1988): Hepatitis B Virus. The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer* 61: 1942-1956.

Beck, J., und Nassal, M. (1996). A sensitive procedure for mapping the boundaries of RNA elements binding to in vitro translated proteins defines a minimal hepatitis B virus encapsidation signal. *Nucleic Acids Res.* 24: 4364-4366.

Beck, J., und Nassal, M. (1998). Formation of a Functional Hepatitis B Virus Replication Complex Involves a Major Structural Alteration in the RNA Template. *Mol. Cell. Biol.* 18: 6265-6272.

Berkhout, B., Silverman, R.H., und Jeang, K.-T. (1989). Tat transactivates the human-immunodeficiency virus through a nascent RNA target. *Cell* 59: 273-282.

Berry, M.J., Banu, L., Chen, Y.Y., Mandel, S.J., Kieffer, J.D., Harney, J.W., und Larsen, P.R.(1991). Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3´ untranslated region. *Nature* 353: 273-276.

Beterams, G. (1996). Expression und Charakterisierung von Fusionen des Hepatitis B Virus Coreproteins mit heterologen Polypeptid-Domänen. Diplomarbeit, Universität Heidelberg.

Blum, H.E., Zhang, Z.S., Galun, E., von Weizsäcker, W.F., Garner, B., Liang, T.J., und Wands, J. (1992). Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro. *J. Virol.* 66: 1223-1227.

Borden, K.L.B. (2000). RING Domains: Master Builders of Molecular Scaffolds? *J. Mol. Biol.* 295: 1103-1112.

Bray, M., Prasad, S., Dubay, J.W., Hunter, E., Jeang, K.T., Rekosh, D., und Hammarskjöld, M.L. (1994). A small element from the Mason-Pfizer monkey virus genome makes human immunodeficiency virus type 1 expression and replication Rev-independent. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 1256-1260.

- Breiner, K., Urban, S., und Schaller, H. (1998). Carboxypeptidase D (gp180), a Golgi-Resident Protein, Functions in the Attachment and Entry of Avian Hepatitis B Viruses. *J. Virol.* 72: 8098-8104.
- Broadus, J., Fuerstenberg, S., und Doe, C.Q. (1998). Staufen dependent localization of prospero mRNA contribtes to neuroblast daughter cell fate. *Nature* 391: 792-795.
- Brooks, S.A., und Rigby, F.C. (2000). Characterization of the mRNA ligands bound by the RNA binding protein hnRNP A2 utilizing a novel in vivo technique. *Nucleic Acids Res.* 28: e49.
- Bruss, V., und Ganem, D. (1991). The role of envelope proteins in hepatitis B virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 1059-63.
- Bruss, V., Lu, X., Thomssen, R., und Gerlich, W.H. (1994). Post translational alterations in transmembrane topology of the hepatitis B virus large envelope protein. *EMBO J.* 13: 2273-2279.
- Bruss, V., Gerhardt, E., Vieluf, K., und Wunderlich, G. (1996): Functions of the large hepatitis B virus surface protein in particle morphogenesis. *Intervirology* 39: 23-31.
- Burd, C.G., und Dreyfuss, G. (1994a). Conserved Structures and Diversity of Functions of RNA-Binding Proteins. *Science* 265: 615-621.
- Burd, C.G., und Dreyfuss, G. (1994b). RNA binding specificity of hnRNP A1: significance of hnRNP A1 high-affinity binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO J.* 13: 1197-1204.
- Calnan, B.J., Biancalana, S., Hudson, D., und Frankel, A.D. (1991a). Analysis of argininerich peptides from the HIV Tat proteins reveals unusual features of RNA-protein recognition. *Genes & Development* 5: 201-210.
- Calnan, B.J., Tidor, B., Biancalana, S., Hudson, D., und Frankel, A.D. (1991b). Arginine-Mediated RNA Recognition: The Arginine Fork. *Science* 252: 1167-1171.
- Carey, J., Cameron, V., de Haseth, P.L.und Uhlenbeck, O.C. (1983). Sequence-specific interaction of R17 coat protein with its ribonucleic acid binding site. *Biochemistry* 22: 2601-10.
- Cha, R.S. & Thilly, W.G. (1993) *PCR Methods Applic.* 3, 18-29.
- Chen, H.S., Kaneko, S., Girnes, R., Anderson, R.W., Hornbuckle, W.E., Tennant, B.C., Cote, P.J., Gerin, J.L., Purcell, R.H., und Miller, R.H. (1993). The woodchuck hepatitis X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks. *J. Virol.* 67: 1218-26.
- Churcher, M.J., Lamont, C., Hamy, F., Dingwall, C., Green, S., Lowe, A.D., Butler, P.D.G., Gait, M.J., und Karn, J. (1993). High affinity binding of TAR RNA by the human immunodeficiency virus type-1 tat protein requires base-pairs in the RNA stem and amino acid residues flanking the basic region. *J. Mol. Biol.* 230: 90-110.
- Copeland, P.R., und Driscoll, D.M. (1999). Purification, Redox Sensitivity, and RNA Binding Properties of SECIS-binding Protein 2, a Protein Involved in Selenoprotein Biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 274: 25447-25454.
- Copeland, P.R., Fletcher, J.E., Carlson, A.B., Hatfield, D.L., und Driscoll, D.M. (2000). A novel RNA binding protein, SBP2, is required for the translation of mammalian selenoprotein mRNAs. *EMBO J.* 19: 306-314.

- Crowther, R.A., Kiselev, N.A., Böttcher, B., Berriman, J.A., Borisova, G.P., Ose, V., und Pumpens, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy. *Cell* 77: 943-950.
- Dane, D.S., Cameron, D.H., und Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia antigen-associated hepatitis. *Lancet* 1: 695-698.
- Dingwall, C., und Laskey, R.A. (1991). Nuclear targeting sequences a consensus? *Trends Biochem. Sci.* 16: 478-481.
- Ernst, R.K., Bray, M., Rekosh, D., und Hammarskjöld, M.L. (1997). A structured retroviral RNA element that mediates nucleocytoplasmic export of intron-containing RNA. *Mol. Cell. Biol.* 17:135-144.
- Feinberg, A.P., und Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Feinberg, A.P., und Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Anal. Biochem.* 137: 266-267.
- Ferrandon, D., Elphick, L., Nusslein-Volhard, C., und St. Johnston, D. (1994). Staufen associates with the 3'UTR of bicoid RNA to form particles that move in a microtubule dependent manner. *Cell* 79: 1221-1232.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiolais, P., und Charney, P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) clones in E. coli. *Nature* 281: 646-650.
- Gatignol, A., Buckler-White, A., Berkhout, B., und Jeang, K.T. (1991). Characterization of a Human TAR RNA-Binding Protein That Activates the HIV-1 LTR. *Science* 251: 1597-1600.
- Gatignol, A., und Jeang, K.T. (1994). Expression Cloning of Genes Encoding RNA-Binding Proteins. *Methods Mol. Genet.* 4: 18-28.
- Gehrke, L., Auron, P.E., Quigley, G.Y., Rich, A., und Sonenberg, N. (1993). 5'-Conformation of capped alfalfamosaic virus ribonucleic acid 4 may reflectits independence of the cap structure or of cap-binding protein for efficient translation. *Biochemistry* 22: 5157-5164.
- Giovanna, P., Jardine, K., und McBurney, M.V. (1991). Multiple CArG boxes in the human cardiac actin gene promotor required for expression in embryonic cardiac muscle cells developing in vitro from embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell. Biol.* 11: 4796-4803.
- Green, H., und Kehinde, O. (1974). Sublines of mouse 3T3 cells that accumulate lipid. *Cell* 1: 113-116.
- Guan, C., Li, P., Riggs, P.D., und Inouye, H. (1988). Vectors that facilitate the expression and purification of foreign peptides in Escherichia coli by fusion to maltose-binding protein. *Gene* 67: 21-30.
- Guidotti, L.G., Matzke, B., Schaller, H., und Chisari, F.V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.* 69: 6158-6169.
- Hauber, J., Malim, M.H., und Cullen, B.R. (1989). Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol.* 63: 1181-1187.
- Heermann, K.H., Kruse, F., seifer, M., und Gerlich, W.H. (1987): Immunogenicity of the gene S and PreS domains in hepatitis B virions and HBsAg filaments. *Intervirology* 28: 14-25.

- Hjelmeland, L.M. (1990). Solubilization of native Membrane Proteins. In *Methods in Enzymology* Vol. 182, Editor M.P. Deutscher; Academic Press.
- Hovland, R., Campbell., G., Pryme, I., und Hesketh, J. (1995). The mRNAs for cyclin A, c-myc and ribosomal proteins L4 and S6 are associated with cytoskeletal-bound polysomes in HepG2 cells. *Biochem. J.* 310, 193-196.
- Holmes, D.S., und Quigley, M. (1981). A rapid boiling method for preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114: 193-197.
- Hoofnagle, J.H., und DiBisceglie, A.M. (1997). The treatment of chronic viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.* 336: 347-356.
- Hu, J., und Seeger, C. (1996). Hsp90 is required for the activity of a hepatitis B virus reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:1060-1064.
- Hu, J., Toft, O., und Seeger, C. (1997). Hepadnavirus assembly and reverse transcription require a multi-component chaperone complex which is incorporated into nucleocapsids. *EMBO J.* 16:59-68.
- Huang, J., und Liang, T.J. (1993). A novel hepatitis B virus genetic element with rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7476-7486.
- Huang,, Y., und Carmichael, G.C. (1997). The mouse histone H2a gene contains a small element that facilitates cytoplasmic accumulation of intronless gene transcripts and of unspliced HIV-1 related mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94:10104-10109.
- Huang, Z.M., und Yen, T.S.B. (1995). Role of the hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element in export of intronless transcripts. *Mol. Cell. Biol.* 15: 3864-3869.
- Ishikawa, K., Nagase, T., Suyama, M., Tanaka, A., Kotani, H., Nomura, N., und Ohara, O. (1998). Prediction of the coding sequences of unidentified human genes. X. The complete sequence of 100 new cDNA cloones from brain which can code for large proteins in vitro. *DNA Res.* 5 (3): 169-178.
- (Ohara, O., Suyama, M., Nagase, T., und Ishikawa, K. direct submission (26-MAY-1998) to the DBJ/ EMBL/ GenBank databases)
- Jansen, R.P. (1999). RNA-cytoskeletal associations. FASEB J. 13: 455-466.
- Jensen, D.E., Proctor, M., Marquis, S.T., Gardner, H.P., Ha, S.I., Chodosh, L.A., Ishov, A.M., Tommerup, N., Vissing, H., Sekido, Y., Minna, J., Borodovsky, A., Schultz, D.C., Wilkinson, K.D., Maul, G.G., Barlev, N., Berger, S.L., Prendergast, G.C., und Rauscher, F.J. 3rd. (1998). BAP1: a novel ubiquitin hydrolase which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression. *Oncogene* 16: 1097-1112.
- Jensen, K.B., Musunuru, K., Lewis, H.A., Burley, S.K., und Darnell, R.B. (2000). The tetranucleotide UCAY directs the specific recognition of RNA by the Nova K-homology 3 domain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 5740-5745.
- Junker-Niepmann, M., Bartenschlager, R., und Schaller, H. (1990). A short cis-acting sequence is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and packaging of foreign RNA. *EMBO J.* 9:3389-3396.
- Kalderon, D., Richardson, W.D., Markham, A.F., und Smith, A.E. (1984). Sequence requirements for nuclear location of Simian Virus 40 large T antigen. *Nature* 311: 33–38.

- Kann, M., Bischof, A., und Gerlich, W.H. (1997). In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J. Virol.* 71: 1310-1316.
- Kann. M., Sodeik, B., Vlachou, A., Gerlich, W.H., und Helenius, A. (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell. Biol.* 145: 45-55.
- Kenney, J.M., von Bonsdorff, C.H., Nassal, M., Fuller, S.D. (1995): Conformational flexibility and evolutionary conservation in the hepatitis B virus core structure. *Structure* 3: 1009-1019.
- Kikuno, R., Nagase, T., Suyama, M., Waki, M., Hirosawa, M., und Ohara, O. (2000). HUGE: a database for human large proteins identified by Kazusa cDNA sequencing project. *Nucleic Acids Res.* 28: 331-332.
- Knaus, T., und Nassal, M. (1993). The encapsidation signal on the hepatitis B virus RNA pregenome forms a stem-loop structure that is critical for its function. *Nucleic Acids Res.* 21: 3967-3975.
- Knaus, T. (1994). Funktionale Analys des Verpackungssignals des humanen Hepatitis B Virus (HBV) und des Hepatitis B Virus der Ente (DHBV). Dissertation, Universität Heidelberg.
- Köck, J., und Schlicht, H.J. (1993). Analysis of the earliest steps of hepadnaviral replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J. Virol.* 67: 4867-4874.
- Koonin, E.V., Bork, P., und Sander, C. (1994). A novel RNA-binding motif in omnipotent suppressors of translation termination, ribosomal proteins and a ribosome modification enzyme?. *Nucleic Acids Res.* 22: 2166-67.
- Kozak, M. (1986). Point Mutations definde a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates transcription by eukaryotic ribosomes. *Cell* 44: 283-292.
- Kratz, P.A. (1999). Versuche zur Beeinträchtigung der Hepatitis B Virus Replikation durch RNA Decoys und Entwicklung des Viruskapsids als ein Trägersystem für nativ gefaltete Fremdproteine. Dissertation, Universität Heidelberg.
- Kreft, S.G. (1996). Untersuchungen zur Interaktion des Hepatitis B Virus RNA-Verpackungssignals mit zellulären Proteinen. Diplomarbeit, Universität Heidelberg.
- Kuroki, K., Eng, F., Ishikawa, T., Turck, C., Harada, F., und Ganem, D. (1995) gp180, a host cell glycoprotein that binds duck hepatitis B virus particles, is encoded by a member of the carboxypeptidase gene family. *J. Biol. Chem.* 270: 15022-15028.
- Lamballe, F., Klein, R., und Barbacid, M. (1991). trkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66: 967-979.
- Lanford, R. E., Chavez, D., Brasky, K. M., Burns III, R. B., und Rico-Hesse, R. (1998): Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 95:5757-5761.
- Lazinski, D., Grzadzielska, E., und Das, A. (1989). Sequence-specific recognition of RNA hairpins by bacteriophage antiterminators requires a conserved arginine-rich motif. *Cell* 59: 207-218.
- Li, J., Tang, H., Mullen, T.M., Westberg, C., Reddy, T.R., Rose, D.W., und Wong-Staal, F. (1999). A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96: 709-714.

- Loeb, D.D., Hirsch, R.C., und Ganem, D. (1991). Sequence-independent RNA cleavages generate the primers for the plus strand DNA synthesis in hepatitis B viruses: implications for other reverse transcribing elements. *EMBO J.* 10: 3533-3540.
- Loffler-Mary, H., Werr, M., und Prange, R. (1997). Sequence specific repression of cotranslational translocation of the hepatitis B virus envelope proteins coincides with binding of heat shock protein Hsc70. *Virology* 235: 144-152.
- Lok, A.S.F. (1994). Treatment of chronic hepatitis B. J. Viral. Hepatitis 1: 105-124.
- Lopez, A.J. (1998). Alternative Splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* 32: 279-305.
- Lucchesi, J.C. (1996). Dosage compensation in Drosophila and the "complex" world of transcriptional regulation. *Bioessays* 18: 541-547.
- Luckow, V.A., Lee, S.C., Barry, G.F., und Olins, P.O. (1993): Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertions of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli.*. *J. Virol.* 67: 4566-4579.
- Maina, C.V., Riggs, P.D., Grandea III, A.G., Slatko, B.E., Moran, L.S., Tagliamonte, J.A., McReynolds, L.A., und di Guan, C. (1988). An Escherichia coli vector to express and purify foreign proteins by fusion to and separation from maltose-binding protein. *Gene* 74: 365-373.
- Mandart, E., Kay, A., und Galibert, F. (1984). Nucleotide sequence of a cloned duck hepatitis B virus genome: comparison with woodchuck and human hepatitis B virus sequences. *J. Virol.* 49: 782-792.
- Marion, P. L., Oshiro, L., Regnery, D., Scullard, G., und Robinson, W. (1980). A virus in beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 77:2941-2945.
- Mason, W. S., Seal, S., und Summers, J. (1980): Virus of Peking ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus. *J. Virol.* 36: 829-836.
- Melnick, A., und Licht, J.D. (1999). Deconstructing a disease: RARalpha, its fusion partners, and their roles in the pathogenesis of acute promyelocytic leukemia. *Blood* 93: 3167-3215.
- Moore, M.J., Query, C.C., und Sharp, P.A. (1993). Splicing of Precursors to mRNA by the Spliceosome. In *The RNA world*, Editoren Gesteland, R.F. und Atkins, J.F. (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview, NY), 303-358.
- Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T., und Wands, J.R. (1996). Characterization of cell lines allowing tightly regulated expression of hepatitis C virus core protein. *Virology* 222: 51-63.
- Mouland, A.J., Mercier, J., Luo, M., Bernier, L., DesGrosseillers, L, und Cohen, E.A. (2000). The Double-Stranded RNA-Binding Protein Staufen Is Incorporated in Human Immunodeficiency Virus Type 1: Evidence for a Role in Genomic RNA Encapsidation. *J. Virol.* 74: 5441-5451.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A., Scharf, S.J., Saiki, R.K., Horn, G.T., und Erlich, H.A. (1986). Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* 51, 263-273.
- Nakabayahi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., und Sato, J. (1982). ). Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* 24: 3858-3863.

Nakielny, S., und Dreyfuss, G. (1997). Nuclear export of proteins and RNAs. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9:420-429.

Nakielny, S., Fischer, U., Michael, W.M., und Dreyfuss, G. (1997). RNA transport. *Annu. Rev. Neurosci.* 20: 269–301.

Nassal, M. (2000). Macromolecular interactions in hepatitis B virus replication and particle assembly. In *Frontiers in Molecular Biology* (26): DNA Virus Replication. p. 1-40. Editor: A.J. Cann, Oxford University Press.

Nassal, M. (1999): Hepatitis B Virus Replication: Novel Roles for Virus-Host Interactions. *Intervirology* 42:100-116.

Nassal, M., und Rieger, A. (1996). A bulged region of the hepatitis B virus RNA encapsidation signal contains the replication origin for discontinuous first strand DNA synthesis. *J. Virol.* 70: 2764-2773.

Obert, S., Zachmann-Brand, B, Deindl, E., Bartenschlager, R., und Schaller, H. (1996). A spliced hepadnavirus RNA that is essentiell for virus replication. *EMBO J.* 15: 2565-2574.

Ostapchuk, P., Hearing, P., und Ganem, D. (1994). A dramatic shift in the transmembrane topology of a viral envelope proteins accompanies hepatitis B viral morphogenesis. *EMBO J*. 13: 1048-1057.

Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Schaller, H., MacKay, P., Leadbetter, G., und Murray, K. (1979). Hepatitis B virus genes and their expression in E. coli. *Nature* 282: 575-579.

Perri, S., und Ganem, D. (1996). A host factor that binds near the termini of Hepatitis B virus pregenomic RNA. *J. Virol.* 70: 6803-6809.

Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A., und Bock, S.C. (1994). A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.* 22: 2587-2591.

Pollack, J., und Ganem, D. (1993). An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J. Virol.* 67: 3254-3263.

Prange, R., und Streek, R.E. (1995). Novel transmembrane topology of the hepatitis B virus envelope proteins. *EMBO J.* 14: 247-256.

Rothnie, H.M., Chapdelaine, Y., und Hohn, T. (1994). Pararetroviruses and retroviruses: a comparative review of viral structure and gene expression strategies. *Adv. Virus Res.* 44: 1-67.

Russnak, R., und Ganem, D. (1990). Sequences 5' to the polyadenylation signal mediate differential poly(A) site use in hepatitis B viruses. *Genes & Development*. 4: 764-776.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd.ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor; New York.

Saurin, A.J., Borden, K.L.B, Boddy, M.N., und Freemont, P.S. (1996). Does this have a familiar RING? *Trends Biochem. Sci.* 21:208-214.

Schaaf, S. (1999). Charakterisierung der Wechselwirkung von Hepatitis B Virus P-Proteinen mit dem RNA-Verpackungssignal Epsilon und zellulärer Proteine. Dissertation, Universität Heidelberg.

- Seeger, C., und Mason, W.S. (2000). Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64: 51-68.
- Siomi, H., Shida, H., Maki, M., und Hatanaka, M. (1990). Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J. Virol.* 64: 1803-1807.
- Sundell, C.L., und Singer, R.H. (1991). Requirement of microfilaments in sorting of actin messenger RNA. *Science* 252: 1275-1277.
- Sprengel, R., Kaleta, E., und Will, H. (1988). Isolation and characterisation of a hepatitis B virus endemic in herons. *J. Virol.* 62: 932-937.
- Stadtman, T.C. (1996). Selenocysteine. Annu. Rev. Biochem. 65: 83-100.
- Stutz, F., und Rosbash, M. (1998). RNA export. Genes & Development 12: 3303-3319.
- Summers, J., Smolec, J., und Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 75: 4533-4537.
- Tang, H., Gaietta, G.M., Fischer, W.H., Ellisman, M.H., und Wong-Staal, F. (1997). A Cellular Cofactor for the Constitutive Transport Element of Type D Retrovirus. *Science* 276: 1412-1415.
- Tavis, J.E., und Ganem, D. (1996). Evidence for activation of the hepatitis B virus polymerase by binding of its RNA template. *J. Virol.* 70: 5741-5750.
- Tong, S., Li, J., und Wands, J.R. (1995). Interactions between duck hepatitis B virus and a 170-kilodalton cellular protein is mediated through a neutralizing epitope of the pre-S region and occurs during viral infection. *J. Virol.* 69: 7106-7112.
- Trifillis, P., Day, N., und Kiledjian, M. (1999). Finding the right RNA: Identification of cellular mRNA substrates for RNA-binding proteins. *RNA* 5: 1071-1082.
- Tsukahara, F., Hattori, M., Muraki, T., und Sakaki, Y. (1996). Identification and cloning of a novel cDNA belonging to tetratricopeptide repeat gene family from Down syndrome-critical region 21q22.2. *J. Biochem.* 120: 820-827.
- Tuttleman, J., Pourcel, C., und Summers, J. (1986). Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell* 47: 451-460.
- Urban, S., Breiner, K.M., Fehler, F., Klingmuller, U., und Schaller, H. (1998). Avian hepatitis B virus infection is initiated by the interaction of a distinct pre-S subdomain with the cellular receptor gp180. *J. Virol.* 72: 8089-8097.
- Veres, G., Gibbs, R.A., Scherer, S.E., und Caskey CT. (1987). The molecular basis of the sparse fur mouse mutation. *Science* 237: 415-417.
- Veyrune, J.L., Campbell, G.P., Wisemann, J., Blanchard, J.M., und Hesketh, J.E. (1996). A localisation signal in the 3′ untranslated region of c-myc mRNA targets c-myc mRNA and β-globin reporter sequences to the perinuclear cytoplasm and cytoskeletal-boung polysomes. *J. Cell Sci.* 109: 1185-1194.
- Weiner, M.P., Anderson, C., Jerpseth, B., Wells, S., Johnson-Browne, B., und Vaillancourt, P. (1994) *Strategies* 7(2): 41-43.
- Wang, G.H., und Seeger, C. (1993). Novel mechanism for reverse transcription in hepatitis B viruses. *J. Virol.* 67:6507-6512.

Wu, T.T., Coates, L., Aldrich, C., Summers, J., und Mason, W. (1990): In hepatocytes infected with duck hepatitis B virus, the template for viral RNA synthesis is amplified by an intracellular pathway. *Virology* 175: 255-261.

Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W.W., Guy, J., und Muzyczka, N. (1996). A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J. Virol.* 70: 4646-4654.

Zoulim, F., Saputelli, J., und Seeger, C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J. Virol.* 68: 2026-2030.

Zufferey, R., Donello, J.E., Trono, D., und Hope, T.J. (1999). Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors. *J. Virol.* 73: 2886-2892.

# 8. Zusammenfassung

Das Hepatitis-B-Virus (HBV) ist ein kleines, umhülltes DNA-Virus, das über reverse Transkription (RT) eines RNA-Intermediates, der prägenomischen RNA (pgRNA) repliziert. Die pgRNA dient einerseits als mRNA für das Core-Protein und die Reverse Transkriptase, andererseits wird sie als einziges Transkript spezifisch in Nukleokapside verpackt. Essentiell für die Einleitung von Verpackung und die daran gekoppelte Initiation der RT ist ein 5´-proximales strukturiertes RNA-Element, E. Aufgrund des komplexen Lebenszyklus der pgRNA, der sich von den meisten zellulären RNAs auch in fehlendem Spleißen unterscheidet, sowie der sehr begrenzten Anzahl HBV-codierter Proteine ist von einer engen Wechselwirkung der pgRNA mit zellulären Proteinen auszugehen.

Im Zuge eines North-Western-Screenings einer Humanleber-cDNA-Expressionsbank zur Identifizierung solcher Proteine war eine cDNA isoliert worden (NIII-cDNA), die für ein E-bindendes Protein codiert (S.G. Kreft, Diplomarbeit 1996). Nach kompletter Sequenzierung dieser cDNA zeigte sich, dass sie für ein neues 666 AS großes Protein codiert, das kein bekanntes RNA-Bindungsmotiv besaß und auch keine offensichtlichen Homologien zu anderen bekannten Proteinen aufwies. Zudem war die cDNA am 3'-Ende unvollständig. Da es sich bei dem codierten Protein um ein völlig neues RNA-Bindungsprotein ohne bekannte RNA-Bindungsdomäne handelte, sollte das Protein weitergehender charakterisiert werden, vor allem hinblicklich RNA-Bindung, gewebsspezifischer Expression und subzellulärer Lokalisation. Zunächst wurde das noch fehlende 3'-Ende der NIII-cDNA über ein Screening verschiedener humaner cDNA-Banken identifiziert (RZPD Screening Service). Dabei wurden verschiedene mit NIII-überlappende cDNAs isoliert. Anhand derer ließen sich 2 Isoformen des neuen Proteins ableiten, RBP138 und RBP35 (=RNA-Bindungsprotein von 138 bzw. 35 kDa). Die kürzere Isoform RBP35 besteht im Wesentlichen aus den ersten 301 AS des RBP138 Proteins. Mit dem mittlerweile verfügbaren Working Draft des Humangenoms konnte das rbp138 Gen auf Chromosom 3 lokalisiert werden. Darüberhinaus konnte anhand der verschiedenen cDNA-Klone die genomische Sequenz des rbp138 Gens bis zu etwa zwei Dritteln des RBP138-ORF abgeleitet werden. Daraus ergab sich, dass die mRNAs der beiden unterschiedlichen RBP-Isoformen vermutlich durch die alternative Verwendung zweier nahe beieinanderliegender 5'-Spleiß-Stellen entstehen.

Da das RBP138 Protein kein bekanntes RNA-Bindungsmotiv enthielt, wurde die RNA-Bindungsregion kartiert. Dabei konnte eine K-reiche Domäne (11 Lysin-Reste innerhalb 19 AS) als essentielle Region für die RNA-Bindung identifiziert werden. Sowohl in NW-Blot- als auch in In-Lösung-Bindungsstudien führte der Austausch nur weniger AS innerhalb der K-reichen Region zu einer drastischen Verminderung der RNA-Bindekapazität. Damit stellt die K-reiche Region ein neues RNA-Bindungsmotiv dar. In Zusammenhang damit wurde auch untersucht, ob eine ähnliche K-reiche Region eines kürzlich identifizierten neuen RNA-Bindungsproteins, SBP2, dessen RNA-Bindungsmotiv darstellt, was jedoch nicht der Fall war. Die Spezifität der RNA-Bindung durch RBP138 wurde in North-Western-Blot- und In-Lösung-Studien untersucht. Dabei wurde keine ausgeprägte Selektivität bezüglich der RNA-Bindung beobachtet. Die Bestimmung von Bindungskonstanten sollte in diesem Zusammenhang weiteren Aufschluss über die "tatsächliche" Spezifität des RBP138 Proteins geben. Da über das Protein noch gar nichts bekannt war, wurde zudem die subzelluläre Lokalisation und das Expressionsmuster untersucht. Dabei zeigte sich, dass RBP138 und -35 in allen untersuchten Geweben nur sehr schwach exprimiert sind. In Zellkultur konnte endogenes RBP138 nur nach voriger Immunpräzipitation nachgewiesen werden. Sowohl RBP138 als auch RBP35 sind ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert. Dabei weist RBP138 eine vorwiegend perinukleäre

Verteilung auf, während RBP35 etwas diffuser im Cytoplasma verteilt vorliegt. Das K-reiche RNA-Bindungsmotiv wirkt also nicht als Kernlokalisations-Signal. Während die Immunfluoreszenz-Studien eine Assoziation des RBP138 mit membranösen Strukturen nahelegten, konnte in biochemischen Fraktionierungs- und Solubilisierungsexperimenten keine Assoziation mit Membranen oder Actin-Filamenten nachgewiesen werden. Bei den biochemischen Untersuchungen stellte vor allem die Unlöslichkeit von RBP138 und seinen Derivaten ein Problem dar. Das Auftreten einer potenziellen Protein-Protein-Interaktionsdomäne (RING-H2-Domäne) legt eine Interaktion mit weiteren zellulären Proteinen nahe. Die verschiedenen Ergebnisse zusammengenommen, könnte RBP138 an cytoplasmatischen mRNA-Transportoder Lokalisisationsprozessen beteiligt sein. Für eine Aufklärung der Funktion des neuen, großen RNA-Bindeproteins müssten als nächstes eventuelle spezifische Ziel-RNA(s) identifiziert werden, sowie die exakte Lokalisation der Proteine bzw. mögliche Interaktionen mit Cytoskelett-Strukturen oder Organellen aufgeklärt werden. Das Verständnis der zellulären Funktion(en) von RBP138 könnte auch Erkenntnisse über eine mögliche Funktion des Proteins für die HBV-Replikation beisteuern.