

Aus dem Johannes-Müller-Institut für Physiologie  
der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

**Die Regulation der Synthese des  
translationell kontrollierten Tumorproteins  
(TCTP)**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité  
der Humboldt-Universität zu Berlin

von  
Juliane Halangk  
aus Magdeburg

Dekan: Prof. Dr. med. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:       1. Prof. Dr. B. J. Thiele  
                      2. Prof. Dr. Th. Gress  
                      3. Prof. Dr. B. Bonnekoh

Datum der Promotion: 26.09.2003

## **Zusammenfassung**

Das translationell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) ist ein hochkonserviertes, ubiquitär in Eukaryonten vorkommendes Protein. Seine Bezeichnung geht auf die erstmalige Beschreibung in Tumorzellen zurück und weist zugleich auf seine besondere translationelle Regulation hin. Das zugehörige Gen wird als *TPT1* bezeichnet und befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosom 13. Eine pathophysiologische Bedeutung für TCTP wurde bei Tumorerkrankungen, Erkrankungen des allergischen Formenkreises sowie bei Infektionen durch Parasiten beschrieben.

Für diese Arbeit wurde zur Untersuchung grundlegender Regulationsphänomene die TCTP-mRNA des Kaninchens als geeignetes Modell ausgewählt. Es wurden die volllangen TCTP-mRNA1 und 2, die sich in der Länge ihrer 3'UTR unterscheiden, sowie Deletionsvarianten, denen die UTR-Abschnitte fehlen, kloniert. In Proteinbindungsstudien (Electromobility Shift Assays, UV-Crosslinking-Experimente, RNA-Affinitätschromatographie) wurden potentielle Bindungsfaktoren der TCTP-UTRs analysiert. Die an der mRNA des Kaninchens erarbeiteten Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an humanen Melanomzellen ergänzt.

In *in vitro* Translationsexperimenten wurde gezeigt, dass die Regulation der TCTP-mRNA durch ihre 5'UTR und 3'UTR2 vermittelt wird. In RNA-Bindungsstudien konnte eine Reihe potentieller Bindungsfaktoren der UTRs charakterisiert werden. Bei Verwendung von Extrakten aus verschiedenen Kaninchengeweben zeigten sich deutliche gewebsspezifische Unterschiede.

Frühere Untersuchungen hatten gezeigt, dass es in der Melanomzelllinie MeWo bei der Ausbildung einer Chemoresistenz zu einer Expressionssteigerung des TCTP kommt. In einem ersten Schritt wurde der Beitrag von Transkription und Translation in vergleichenden Northern und Western Blot Analysen untersucht. Auf mRNA-Niveau findet man in den resistenten Zellen eine deutliche Steigerung der Expression im Vergleich zu den sensiblen Zellen. Der mRNA-Menge in den chemosensiblen Zellen steht eine vergleichsweise geringe Menge an Protein gegenüber. Folglich liegt die mRNA in diesen Zellen in einem inaktiven Zustand vor. Es konnten drei Cytoskelettproteine  $\gamma$ -Actin,  $\beta$ -Tubulin und  $\alpha$ -Actinin als Bindungspartner der TCTP-3'UTR in den Melanomzellen identifiziert werden.

Eine Bedeutung von TCTP für die Entstehung der Chemoresistenz lässt sich aufgrund seiner anti-apoptischen Wirkung vermuten. Die Regulation der TCTP-Translation stellt bei durch Cytostatika hervorgerufener Hemmung der Transkription einen wichtigen Pathomechanismus in chemoresistenten Melanomzellen dar.

Schlagwörter: TCTP, Translation, Malignes Melanom, Chemoresistenz

## Abstract

The translationally controlled tumor protein (TCTP) is a highly conserved protein expressed in all eukaryotic organisms. It was first described in tumor cells showing a special regulation of translation. The chromosomal localisation of the respective human gene *TPT1* has been determined (13q14). TCTP has been implicated in cellular processes such as cell growth and apoptosis. Its medical importance has been shown in malignant transformation, allergic reactions and immunity against parasitic organisms.

In order to investigate basic mechanisms of translational regulation the rabbit TCTP-mRNA was chosen due to its high homology to its human counterpart. The *TPT1* gene is transcribed into two TCTP-mRNAs differing in the length of their 3'untranslated regions. These two mRNAs and variants missing the untranslated regions were cloned into expression vectors. In Electro mobility shift assays, UV-crosslinking assays and RNA affinity purification several TCTP-mRNA binding factors were characterised. Furthermore, the role of TCTP in human chemoresistant melanoma cells was investigated.

In cell-free translation assays the importance of the 5'UTR and 3'UTR2 was shown. However, in wheat germ extracts the regulation of the TCTP-mRNA mediated by its 5'UTR is less important. In Electro mobility shift assays and UV-crosslinking assays with radiolabelled transcripts of the untranslated regions great variations in tissue-specific protein binding were found.

Recently, TCTP had been implicated in the development of chemoresistance in the human melanoma cell line MeWo. As a first step, the contribution of transcriptional and translational regulation was analysed by comparing TCTP-expression in Northern and Western blot assays. Transcription of the *TPT1* gene is increased in chemoresistant melanoma cells whereas translation is inhibited in those cells susceptible to chemotherapeutic agents. Three proteins,  $\gamma$ -actin,  $\beta$ -tubulin and  $\alpha$ -actinin, were identified as factors binding to the TCTP-3'UTR in melanoma cells.

For the interaction of these cytoskeleton components their ability to bind intracellular calcium ions could be of great importance. The role of TCTP in the development of chemoresistance can be explained by its anti-apoptotic function. In conclusion, the regulation of TCTP-translation when transcription is blocked by inhibitors of DNA-function is an important mechanism to overcome the effect of these anti-proliferative agents.

Keywords: TCTP, translation, malignant melanoma, chemoresistance

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Das translationell kontrollierte Tumorprotein.....</b>	<b>1</b>
1.1.1 Struktur und Funktion des TCTP.....	1
1.1.2 Regulation der Expression des TCTP.....	5
1.1.3 Pathophysiologische Bedeutung des TCTP.....	8
1.1.4 TCTP und Chemoresistenz in Tumorzellen .....	11
<b>1.2 Die Regulation der Translation in Eukaryonten.....</b>	<b>12</b>
1.2.1 Die Ebenen der Genregulation .....	12
1.2.2 Ausgewählte Mechanismen der translationellen Regulation.....	14
1.2.3 RNA-bindende Proteine als Regulatoren der Genexpression.....	19
<b>2 Aufgabenstellung.....</b>	<b>21</b>
<b>3 Material und Methoden.....</b>	<b>23</b>
<b>3.1 Material.....</b>	<b>23</b>
3.1.1 Geräte.....	23
3.1.2 Chemikalien.....	23
3.1.3 Radiochemikalien .....	25
3.1.4 Synthetische Oligonukleotide.....	25
3.1.5 Enzyme, Kits und Sonstiges .....	26
3.1.6 Software und Internetressourcen .....	26
<b>3.2 Methoden .....</b>	<b>27</b>
3.2.1 Plasmidkonstruktionen .....	27
3.2.2 Klonierung und Präparation der Plasmide.....	28
3.2.3 <i>In vitro</i> Transkription.....	28
3.2.4 <i>In vitro</i> Translation .....	29
3.2.5 Electromobility Shift Assays und UV-Crosslinking-Experimente.....	30
3.2.6 RNA-Affinitätschromatographie.....	31
3.2.7 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie.....	31
3.2.8 Northern Blots .....	32
3.2.9 Western Blots .....	33
3.2.10 Melanomzellkulturen.....	33
3.2.11 Präparation von S10-Lysaten aus Kaninchengewebe und Melanomzellkulturen.....	34
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Die Regulation der Translation der TCTP-mRNA.....</b>	<b>36</b>
4.1.1 Verhalten der TCTP-mRNA1 und 2 und ihrer Deletionsvarianten in der <i>in vitro</i> Translation .....	36
4.1.2 Proteinbindungsstudien an den untranslatierten Regionen der TCTP- mRNA.....	44
4.1.3 Anreicherung von UTR-bindenden Proteinen in der RNA- Affinitätschromatographie.....	53
<b>4.2 Translationelle Regulation der TCTP-mRNA in Melanomzellen .....</b>	<b>56</b>
4.2.1 Nachweis der veränderten TCTP-Expression in chemosensiblen und chemoresistenten Melanomzellen.....	56
4.2.2 Proteinbindungsstudien an der TCTP-3'UTR mit Melanomzelllysaten .....	58
4.2.3 Identifizierung von 3'UTR-bindenden Proteinen.....	61

---

<b>5</b>	<b><i>Diskussion</i></b> .....	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Die Regulation der Translation der TCTP-mRNA</b> .....	<b>63</b>
5.1.1	Die Bedeutung der untranslatierten Regionen für die Translation der TCTP-mRNA.....	63
5.1.2	Die Bedeutung allgemeiner Translationsfaktoren für die Translation der TCTP-mRNA.....	66
5.1.3	Die Wechselwirkungen von RNA-bindenden Proteinen mit den UTRs der TCTP-mRNA .....	68
5.1.4	Ausgewählte Signalwege bei der TCTP-Induktion .....	72
<b>5.2</b>	<b>Die veränderte Expression des TCTP in Melanomzellen</b> .....	<b>74</b>
5.2.1	Die Bedeutung von TCTP als anti-apoptotischer Faktor.....	74
5.2.2	Der Einfluss der translationellen Regulation auf die TCTP-Expression in Melanomzellen .....	75
<b>5.3</b>	<b>TCTP-ein rätselhaftes Protein?</b> .....	<b>76</b>
<b>5.4</b>	<b>Ausblick</b> .....	<b>79</b>
<b>6</b>	<b><i>Zusammenfassung</i></b> .....	<b>82</b>
	<b><i>Literaturverzeichnis</i></b> .....	<b>84</b>
	<b><i>Danksagung</i></b> .....	<b>94</b>
	<b><i>Erklärung</i></b> .....	<b>95</b>
	<b><i>Lebenslauf</i></b> .....	<b>96</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis**

Ak	Antikörper
ARE	„AU-rich element“
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
AUF1	„AU-binding factor 1“
AUG	Startcodon
bp	Basenpaare
BP	„binding protein“
Ca	Karzinom
cDNA	„complementary DNA“
cpm	„counts per minute“
CTP	Cytidin-5'-Triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DICE	„differentiation control element“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	„desoxyribonucleic acid“
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
eEF	„eukaryotic elongation factor“
eIF	„eukaryotic initiation factor“
EMSA	Electromobility Shift Assay
GDP	Guanosin-5'-Diphosphat
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
hnRNP	„heterogeneous nuclear ribonucleoprotein“
HRF	„histamine-releasing factor“
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

---

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid
IRE	„iron responsive element“
IRES	„internal ribosome entry site“
IRP	„iron regulatory protein“
JNK	„c-Jun-N-terminal kinase“
KAc	Kaliumacetat
kb	„kilobases“
kD	„kilo Dalton“
KH-Domäne	hnRNP K homologe Domäne
LOX	Lipoxygenase
LPS	Lipopolysaccharid
LUC	Luciferase
MALDI-TOF	„matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight“
MAP	„microtubule-associated protein“
MAPK	„mitogen-activated protein kinase“
Mnk	„MAPK-interacting protein kinase“
MOPS	3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure
mRNA	„messenger ribonucleic acid“
mRNP	„messenger ribonucleic acid protein particle“
mTOR	„mammalian target of rapamycin“
NaAc	Natriumacetat
nt	Nukleotid
PABP	„poly(A)-binding protein“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	„polymerase chain reaction“
PKR	„RNA-dependent protein kinase“
Plk	„polo-like kinase“
POD	Peroxidase
PTB	„polypyrimidine tract binding protein“
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RNA	„ribonucleic acid“



RNase	Ribonuklease
rpm	„rounds per minute“
rRNA	ribosomale RNA
RT	„reverse transcriptase“
S10	Cytosolischer Überstand nach 10 000 x g Zentrifugation
S100	Cytosolischer Überstand nach 100 000 x g Zentrifugation
S300	Cytosolischer Überstand nach 300 000 x g Zentrifugation
SAPK	„stress-activated protein kinase“
SDS	„sodium dodecyl-sulfate“
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgel-elektrophorese
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TCTP	„translationally controlled tumor protein“
TE	Tris-EDTA-Puffer
TFA	Trifluoressigsäure
TNF $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor $\alpha$
TOP	Terminaler Oligopyrimidintract
TPT1	Gen für das translationell kontrollierte Tumorprotein
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit
UTP	Uridin-5' -Triphosphat
UTR	„untranslated region“
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl $\beta$ -D –galactopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Das translationell kontrollierte Tumorprotein

### 1.1.1 Struktur und Funktion des TCTP

Das translationell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) wurde erstmals in Experimenten nachgewiesen, die sich mit der Identifizierung von wachstumsregulierten Proteinen in stimulierten Zellkulturen befassten. In der Fibroblasten-Tumorzelllinie Swiss 3T3 der Maus kommt es nach Stimulation mit Serum zur veränderten Expression von etwa 20 Proteinen (Thomas *et al.* 1981, Thomas und Thomas 1986). Nach Behandlung dieser Zellen mit Actinomycin D, einem Hemmstoff der Transkription zeigt sich, dass es bei einem Teil dieser Proteine nicht zu einem Abfall der Syntheserate kommt. Das legt eine Regulation auf translationeller Ebene nahe. Eines dieser Proteine wurde entsprechend seines Molekulargewichts als Q23 bezeichnet. In gleichartigen Experimenten an Maus-Erythroleukämie-Zellen wurde dieses Protein als p21 bezeichnet (Yenofsky *et al.* 1983, Chitpatima *et al.* 1988). Auch beim Wachstum von Ehrlich-Aszites-Tumorzellen der Maus und ihrer Stimulation mit Serum zeigte sich eine erhöhte Expression dieses Proteins, das hier p23 genannt wurde. Diese Arbeiten belegen darüber hinaus, dass es unter Behandlung mit Actinomycin D sogar zu einer zusätzlichen Induktion kommt. (Benndorf *et al.* 1988, Böhm *et al.* 1989, Böhm *et al.* 1991). Eine solche Regulation auf translationeller Ebene ist typisch für wachstumsregulierte Proteine, da somit potentiell eine schnelle Anpassung der Syntheserate an die Bedürfnisse der Zelle gewährleistet ist.

Die Bezeichnung TCTP (Gross *et al.* 1989) als Abkürzung für „translationally controlled tumor protein“ bringt zum Ausdruck, dass es sich um ein Protein handelt, dessen Synthese auf der Ebene der Translation reguliert wird und das in Tumorzellen erstmals nachgewiesen wurde. Eine Fülle von Arbeiten hat inzwischen gezeigt, dass TCTP keineswegs ein tumorspezifisches Protein ist, sondern ubiquitär in einzelligen, Hefen, Pflanzen, wirbellosen Tieren und Vertebraten zu finden ist. Das entsprechende Gen mit seinen Pseudogenen wird nach der GDB (genome database)-Nomenklatur (Zugangsnummer GDB 1060912) als *TPT1* bezeichnet (Cayanis *et al.* 1998). Im Folgenden beziehen sich daher *TPT1* auf Gen und Pseudogene und TCTP auf seine mRNA und das Protein.

Nach der Klonierung einer cDNA des Proteins und dem Vergleich der Aminosäuresequenz mit bekannten Sequenzen in Datenbanken zeigte sich keinerlei Ähnlichkeit zu einer bekannten Proteinfamilie (Böhm *et al.* 1989). Das berechnete Molekulargewicht liegt bei 19,4 kD.

**Struktur und Funktion des TCTP**

1	M I I Y R D L I S H D E M F S D I Y K I R E I A D G L C L E	Mensch
1	M I I Y R D L I S H D E M F S D I Y K I R E I A G G L C L E	Kaninchen
1	M I I Y R D L I S H D E L F S D I Y K I R E I A D G L C L E	Maus
1	M L L Y K D V I S G D E L V S D A V D L K E V D D I V - V E	Spaltheife
31	V E G K M V S R T E G N I D D L I G G N A S A E G P E G E	Mensch
31	V E G K M V S R T E G N I D D L I G G N A S A E G P E G E	Kaninchen
31	V E G K M V S R T E G A I D D L I G G N A S A E G P E G E	Maus
30	A D C Q M V T V K Q G G D V D - - I G A N P S A E D A E E N	Spaltheife
61	G T E T V I T G V D I V M N H H L Q E T S F T K E A V K K	Mensch
61	G T E T V I T G V D I V M N H H L Q E T S F T K E A V K K	Kaninchen
61	G T E T V V T G V D I V M N H H L Q E T S F T K E A V K K	Maus
58	A E E G T E T V N - N L V Y S F R L S P T S F D K K S V M S	Spaltheife
91	V I K D Y M K S I K G K L E E Q R P E R V K P F M T G A A E	Mensch
91	V I K D Y M K S I K G K L E E Q R P E R V K P F M T G A A E	Kaninchen
91	V I K D Y M K S L K G K L E E Q K P E R V K P F M T G A A E	Maus
87	V I K G Y M K A I K A R I Q E S N P E R V P V F E K N A I G	Spaltheife
121	Q I K H I L A N F K N Y Q F F I G E N M N P D G M V A L L D	Mensch
121	Q I K H I L A N F K N Y Q F Y I G E N M N P D G M V A L L D	Kaninchen
121	Q I K H I L A N F N N Y Q F F I G E N M N P D G M V A L L D	Maus
117	F V K K I L A N F K D Y D F Y I G E S M D P D A M V V L M N	Spaltheife
151	Y R E D G V T P Y M I F F K D G L E M E K C	Mensch
151	Y R E D G V T P F M I F F K D G L E M E K C	Kaninchen
151	Y R E D G V T P F M I F F K D G L E M E K C	Maus
147	Y R E D G I T P Y M I F F K D G L V S E K F	Spaltheife

**Abb. 1: Proteinsequenzvergleich des TCTP:**

Dargestellt ist ein Alignment der TCTP-Sequenzen von Mensch (P 13693), Kaninchen (R 43348), Maus (P 14701) und Spaltheife (Q 10344), Datenbank Expsy. Der grün markierte Abschnitt stellt den für die Tubulinbindung verantwortlichen Bereich dar (Position 74-123). Darin befindet sich die Ca<sup>2+</sup>-bindende Domäne (Aminosäuren 81-112). Gelb dargestellt sind die in allen bisher veröffentlichten TCTP-Sequenzen identischen Aminosäuren an den Positionen 12, 16, 53, 78, 93, 138 und 171. Die beiden beschriebenen Phosphorylierungsstellen an den Positionen 46 und 64 sind rot markiert. Eine potentielle Glykosylierungsstelle an Position 51 ist violett markiert.

Die in Abb. 1 dargestellten Vergleiche der Proteinsequenzen verschiedener Spezies zeigen ausgeprägte Homologien. Diese Konservierung spricht für eine wichtige physiologische Funktion dieses Proteins in der Zelle. So ist die Sequenz des TCTP von Ratte und Maus zu 100% identisch. Zwischen der humanen Sequenz und der des Kaninchens beträgt die Homologie 98%. Daher sollten die von uns am TCTP des Kaninchens erarbeiteten Ergebnisse zur translationellen Regulation mit hoher Relevanz auf das humane Homolog übertragbar sein. Identisch in allen untersuchten Spezies sind 7 der 172 Aminosäuren und zwar an den Positionen 12, 16, 53, 78, 93, 138 und 171. Diese Aminosäuren stehen vermutlich unter evolutionärem Erhaltungsdruck, und eine direkte Beteiligung an der physiologischen Funktion ist daher zu postulieren.

In der Tat erbrachte die Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des TCTP der Hefe

*Schizosaccharomyces pombe* mittels NMR-Spektroskopie hierzu neue interessante Erkenntnisse (Thaw *et al.* 2001). Danach besitzt TCTP strukturelle Ähnlichkeiten zu dem humanen Guanin-Nukleotid-freien Chaperon Mss4. Guanin-Nukleotid-freie Chaperone binden die GDP/GTP-freie Form von Rab-Proteinen, einer Unterfamilie der Ras-Proteine. Rab-Proteine spielen eine Rolle bei der Regulation von sekretorischen Vorgängen. Die in allen untersuchten Spezies konservierten Aminosäuren Glu 12, Leu 74 und Glu 134 (Positionen in *S. pombe*) bilden eine Triade in einer Region, die mit dem Bereich von Mss4 korrespondiert, in dem das Rab-Protein Sec4 gebunden wird.

Beschrieben ist eine Phosphorylierung des humanen TCTP an Serinen in Position 46 und 64 durch eine polo-like Kinase (Plk). Diese Kinasen phosphorylieren Cytoskelett-bindende Proteine und regulieren auf diese Weise Funktionen von Mikrotubuli wie zum Beispiel die Spindelbildung in der Mitose (Yarm 2002). Eine Regulation des Proteins durch Phosphorylierung würde das Auftreten von Isoformen in 2D-Gelelektrophoresen erklären (Sanchez *et al.* 1997, Kern *et al.* 1997).

Die Diskrepanz zwischen berechnetem und in SDS-Gelelektrophoresen beobachtetem Molekulargewicht könnte auch auf weitere posttranslationelle Modifikationen wie beispielsweise eine Glykosylierung zurückzuführen sein. Eine potentielle Glykosylierungsstelle besteht im konservierten Bereich Asn 51, Ala 52, Ser 53. Eine derartige posttranslationelle Modifikation wurde jedoch bisher nicht nachgewiesen.

Die genaue physiologische Funktion des TCTP konnte bisher nicht vollständig geklärt werden. Multi-Tissue-Dotblot-Analysen zeigten, dass es in allen 50 untersuchten humanen Geweben exprimiert wird (Thiele *et al.* 2000). Es handelt sich um ein cytoplasmatisches Protein, und Immunfluoreszenz-mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass TCTP in Zellen mit  $\alpha$ -Tubulin im Bereich der Mikrotubuli kolokalisiert ist und *in vitro* an  $\alpha$ -Tubulin und  $\beta$ -Tubulin bindet (Gachet *et al.* 1999). Neben den Actin-Filamenten und den intermediären Filamenten sind die Mikrotubuli Bestandteile des Cytoskeletts. In der Zelle bildet ein kleiner Teil des vorhandenen TCTP Heteromere mit  $\alpha$ -Tubulin von 100-150 kD. Während der G1, S, G2 und frühen M-Phase lässt sich eine Assoziation zu den Mikrotubuli zeigen. In der Metaphase bis zum Übergang in die Anaphase bindet TCTP an die Mitosespindel. Mit Hilfe von Mutationsanalysen wurde die Tubulin-bindende Domäne bestimmt, und es zeigte sich, dass sie Ähnlichkeit zur Tubulin-bindenden Domäne des Mikrotubuli-assoziierten Proteins MAP-1b besitzt. Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) sind ebenfalls Angriffspunkte der Plk, die auch TCTP phosphoryliert. Eine Überexpression von TCTP führt zur Verzögerung des Zellwachstums, zu

zellmorphologischen Veränderungen und zu einer größeren Stabilität der Mikrotubuli. Gleichsinnige Veränderungen, sowie mehrkernige Zellen und apoptotische Zellen, beobachtet man bei Expression eines veränderten Proteins, dem die Serinreste zur Phosphorylierung durch die Plk fehlen. Dies legt eine Veränderung der Affinität des TCTP zu den Mikrotubuli beim Übergang von der Metaphase zur Anaphase der Mitose durch Phosphorylierung nahe (Yarm 2002). Es häufen sich Befunde, die zeigen, dass TCTP in die große Gruppe der MAPs einzuordnen ist. MAPs stabilisieren Mikrotubuli und vermitteln darüber hinaus Wechselwirkungen mit anderen Proteinen in der Zelle. Neben der Ausbildung der Mitosespindel sind wesentliche Funktionen der Mikrotubuli der intrazelluläre Transport und die Bewegung von endo- und exocytotischen Vesikeln.

Nur ein Teil des TCTP assoziiert mit Mikrotubuli, und es stellt sich die Frage, welche weiteren Funktionen das Protein ausübt. Obwohl die Sequenz keinerlei Kernlokalisations-Signale enthält, wird neben der cytoplasmatischen auch eine nukleäre Lokalisation von TCTP beschrieben (Li *et al.* 2001, Guillaume *et al.* 2001). Guillaume *et al.* haben sich der Expression von TCTP in verschiedenen Keimzellstadien im Hoden der Ratte gewidmet. Dabei beschreiben sie eine vorrangige Lokalisation im Bereich des Zellkerns in den Keimzellstadien mit hoher mitotischer Aktivität. In den darauf folgenden Entwicklungsstadien findet man TCTP hauptsächlich im Cytoplasma.

Die Arbeit von Li *et al.* zeigt zudem eine Wirkung von TCTP als anti-apoptotischer Faktor, hier als Fortilin bezeichnet, durch Hemmung der Caspase-3-Aktivität. Die Überexpression schützt HeLa-Zellen vor einem durch Etoposid induzierten Zelltod. Eine TCTP-Depletion durch ein Antisense-Transkript führt in der Mamma-Ca-Linie MCF-7 zum programmierten Zelltod.

Mehrere Arbeiten belegen, dass TCTP verschiedener Spezies in der Lage ist, Calcium zu binden (Haghighat und Ruben 1992, Sanchez *et al.* 1997, Xu *et al.* 1999, Rao *et al.* 2002). Mit Hilfe von Deletionskonstrukten wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstelle im Bereich der Aminosäurereste 81-112 lokalisiert (Kim *et al.* 2000). Dieses  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsmotiv zeigte keinerlei Ähnlichkeit zu Motiven in bisher bekannten  $\text{Ca}^{2+}$ -bindenden Proteinen. Der Bereich der  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindung liegt in der von Gachet *et al.* beschriebenen Tubulin-bindenden Domäne.

Es wurde auch eine Einordnung in die Gruppe ribosomale Proteine/Proteinsynthese vorgeschlagen. So ordnet eine statistische Analyse von Transkriptionsprofil-Daten mehr als 5000 Hefe-Proteine in 45 Klassen. TCTP wird dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit der Protein-Synthese-Maschinerie zugeordnet (Moler *et al.* 2000). Induziert man in Spaltheefe eine Wachstumsverzögerung durch Ammoniummangel, korreliert die reduzierte Expression des

ribosomalen Proteins Rps6 mit einer verminderten TCTP-Expression (Bonnet *et al.* 2000).

### 1.1.2 Regulation der Expression des TCTP

Eine Induktion der TCTP-Expression wurde in sehr verschiedenen Zusammenhängen beschrieben. Neben den bereits erwähnten Induktionsmechanismen durch Serum und Actinomycin D wurde in Makrophagen eine gesteigerte Expression durch Phorbolster und Lipopolysaccharid hervorgerufen (Walsh *et al.* 1995). Bei Regenwürmern, die schwermetallbelasteten Böden ausgesetzt waren, induzierten Cadmium und Kupfer die TCTP-Expression (Stürzenbaum *et al.* 1998). Im Süßwasserpolypen *Hydra vulgaris* findet die TCTP-Expression vor allem in Regionen reger Zellproliferation statt (Yan *et al.* 2000). Eine erhöhte Expression wurde auch in Ratten-Gliom-Zellen beschrieben, die einem Vitamin-D-induzierten programmierten Zelltod ausgesetzt waren (Baudet *et al.* 1998). In der Pflanze *Pharbitis* tritt eine hell/dunkel-abhängige Induktion des TCTP auf (Sage-Ono *et al.* 1998). Diese Studien zeigen jeweils Veränderungen auf RNA-Niveau, so dass folglich die TCTP-Expression nicht ausschließlich auf translationeller Ebene reguliert wird.

Das authentische *TPT1*-Gen des Kaninchens hat eine Größe von 3,8 kb und enthält 5 Introns und 6 Exons (Thiele *et al.* 1998). Bei der Transkription des Gens werden zwei verschieden lange mRNAs generiert, eine kürzere mit einer Länge von 843 und eine längere von 1163 Nukleotiden. Sie unterscheiden sich in der Länge ihrer untranslatierten Regionen am 3'Ende (EMBL database AJ 131951). Die 3'UTR1 (211 Nukleotide) der mRNA1 ist bei der mRNA2 um 320 Nukleotide verlängert (3'UTR2). Grundsätzlich gibt es für die Entstehung unterschiedlich langer Messenger eines Gens zwei Möglichkeiten, das alternative Spleißen oder die Nutzung verschiedener Polyadenylierungssignale (Sureau *et al.* 1994). Da sowohl die 3'UTR1 als auch die 3'UTR2 ein Polyadenylierungssignal (AATAAA) enthält, ist für die Entstehung der beiden verschieden langen mRNAs die alternative Verwendung dieser beiden Polyadenylierungssignale wahrscheinlich. Beide UTRs liegen zudem im gleichen Exon, so dass keine Möglichkeit zum alternativen Spleißen besteht. Northern Blot-Analysen verschiedener Gewebe zeigten, dass beide Messenger-RNAs in allen Geweben mit einem Überwiegen der kurzen mRNA vorkommen. Das Verhältnis der kurzen zur langen mRNA schwankt von Gewebe zu Gewebe. Eine reifungsabhängige Veränderung des Verhältnisses kurzer zu langer mRNA lässt sich aus den Befunden von Guillaume *et al.* ableiten. In den Zellen mit hoher mitotischer Aktivität wird nur die kürzere mRNA gefunden, während das Auftreten des langen Messengers erst in den differenzierteren Zellen der Spermatogenese nachzuweisen ist (Guillaume *et al.* 2001).

Beim Menschen befindet sich das *TPT1*-Gen auf dem Chromosom 13 in der Bande q14. Ganz in

der Nähe liegt das Retinoblastoma-Gen, eines der bekanntesten Tumorsuppressorgene. Es gibt Tumoren, bei denen dieser Chromosomenabschnitt deletiert ist (Kalachikov *et al.* 1997). Ob sich durch das Fehlen des TCTP pathophysiologische Konsequenzen ableiten, wurde bisher nicht untersucht. TCTP-Knock-outs in Hefen erwiesen sich als nicht letal.

Im Genom von Säugerspezies sind mehrere prozessierte *TPT1* Pseudogene zu finden (Thiele *et al.* 2000). Pseudogene leiten sich durch Genduplikation von ihren Ursprungsgenen ab. In der ursprünglichen Definition handelt es sich um Sequenzen, die Ähnlichkeiten zu einem Gen aufweisen, jedoch in ihrer Expression gestört sind oder zur Synthese fehlerhafter Proteine führen (Vanin *et al.* 1985). Inzwischen wurde die Transkription einiger Pseudogene beschrieben (Mighell *et al.* 2000). Es gibt prozessierte und nicht-prozessierte Pseudogene. Die nicht-prozessierten Pseudogene enthalten wie funktionelle Gene Exons, Introns und Promotorstrukturen. Sie sind seltener als prozessierte Pseudogene und wahrscheinlich durch Mutation aus Genduplikationen funktioneller Gene hervorgegangen. Prozessierte Pseudogene hingegen sind intronlos und zeigen Homologien zur mRNA-Sequenz eines Gens. Sie weisen als typisches Merkmal eine A-reiche Sequenz am 3'Ende auf und werden beidseits von kurzen Wiederholungssequenzen flankiert. Diese Repeats liefern einen Hinweis auf den Entstehungsmechanismus. Aus mRNAs entstanden im Laufe der Evolution Abschriften komplementärer DNA durch Aktivität einer reversen Transkriptase, die durch Retrotransposition wieder ins Genom eingefügt wurden. Das häufigere Vorkommen von prozessierten Pseudogenen in Genomen von Säugern lässt sich möglicherweise auf die vergleichsweise lange Dauer der Meiose in Eizellen zurückführen. Durch zufälligen Einbau in das Genom ist es möglich, dass Pseudogene von einer Region im 5'Bereich flankiert werden, die in der Lage ist, eine Promotoraktivität zu entfalten. Für die 5'flankierende Region zweier Kaninchen-*TPT1*-Gene konnte eine Promotoraktivität gezeigt werden (Thiele *et al.* 2000). Das *in vitro* translatierte Produkt dieser Pseudogene unterscheidet sich in seinen Laufeigenschaften in der SDS-Gelelektrophorese nicht vom authentischen TCTP. Ob auch *in vivo* Produkte dieser Pseudogene synthetisiert werden und ob diese funktionell aktiv sind, ist derzeit noch ungeklärt. Interessanterweise findet man in den Genomen von Kaninchen, Maus, Ratte und Mensch jeweils unmutierte prozessierte *TPT1*-Pseudogene. Unklar ist dabei, ob diese Sequenzen unter einem evolutionären Erhaltungsdruck stehen, weil sie funktionell von Bedeutung sind.

Durch Vergleich der Sequenz mit prozessierten Pseudogenen konnte der Transkriptionsstart identifiziert werden, der durch Primer-Extension-Analysen von unvollständigen Klonen aus cDNA-Banken bestätigt wurde. Der Promotor enthält an Position -30 eine TATA-Box, die von

potentiellen Bindungsstellen verschiedener Transkriptionsfaktoren umgeben ist. Transfektionsstudien in glatten Muskelzellen mit Reporter-Gen-Konstrukten, die das Gen für die Chloramphenicol-Transferase enthielten, zeigten eine Aktivität des Promoters in Bereichen von potentiellen *cis*-Elementen der *trans*-aktivierenden Faktoren wie „activating protein 1“ (AP-1), „nuclear factor 1“ (NF-1), „myeloid-specific zinc finger protein 1“(MZF-1), „cAMP-response element binding protein“ (CREB), „stimulating protein 1“ (SP-1) und andere (Thiele *et al.* 1998). Als Vermittler von Serum- und Phorbol-ester-induzierten Änderungen der Transkription wurden AP1-, AP2- und SP1-ähnliche Proteine beschrieben (Descheemaker *et al.* 1992), und NF1 spielt eine Rolle bei Cytokin-vermittelten Antworten (Faisst *et al.* 1992).

Eine wichtige Rolle bei der Regulation der Expression des *TPT1*-Gens konnte für Calcium gezeigt werden (Xu *et al.* 1999). Erhöhte cytosolische  $Ca^{2+}$ -Spiegel führen zu einer vermehrten TCTP-Expression. Diese Regulation durch Calcium findet auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene statt. Die Autoren schlagen eine Wirkung des TCTP als  $Ca^{2+}$ -Speicher der Zelle beim stressinduzierten Zelltod vor, was zur Verzögerung oder Verhinderung der Apoptose führen kann.

Es gibt mehrere Hinweise, die auf eine Bedeutung der posttranskriptionellen Regulation des TCTP hindeuten:

1. Die Expression des TCTP steigt nach Stimulation durch Serum oder Zellstress sehr schnell an, und der Anstieg an neusynthetisiertem Protein geht dem Anstieg an mRNA voraus (Thomas *et al.* 1986, Böhm *et al.* 1989, Xu *et al.* 1999).
2. Transkriptioneninhibitoren wie Aktinomycin D haben keinen hemmenden Einfluss auf die Expression. Aktinomycin D wirkt im Gegenteil noch als zusätzlicher Induktor (Benndorf *et al.* 1988, Böhm *et al.* 1989, Böhm *et al.* 1991).
3. Dem zellzyklusabhängigen Anstieg auf Proteinniveau steht eine konstante Menge an mRNA gegenüber (Böhm *et al.* 1989).
4. Die TCTP-mRNA der Maus liegt proteingebunden in translationsinaktiven mRNP-Komplexen vor. Die Bildung dieser mRNP-Partikel lässt sich durch DMSO induzieren (Yenofsky *et al.* 1983).

Es erfolgten erste Experimente zur Aufklärung der Translationskontrolle. Es konnte gezeigt werden, dass die untranslatierten Regionen der TCTP-mRNA der Maus diese Translationsinaktivierung *in vitro* in zellfreien Translationssystemen und *in vivo* in *Xenopus*-Oocyten vermitteln (Böhm *et al.* 1991). Deletionsmutanten, denen 5'UTR bzw. 3'UTR fehlten,



erwiesen sich als effizienter translatierbar als die komplette mRNA mit ihren UTRs. Der größte inhibierende Effekt ging von der 5'UTR aus, wohingegen der Einfluss der 3'UTR geringer ausgeprägt war. Dieser Effekt scheint jedoch auf tierische Zellen beschränkt zu sein. Im zellfreien Translationssystem aus Weizenkeimlysat wird auch die vollständige TCTP-mRNA translatiert. Dies legt eine Regulation über spezifische Faktoren nahe, die in pflanzlichen Zellen entweder nicht vorhanden sind oder deren Aktivität sich darin nicht entfaltet.

Die TCTP-mRNA weist typische Merkmale von mRNAs auf, deren Übersetzung in die Aminosäuresequenz eines Proteins genau reguliert wird. Nicht nur die Proteinsequenz des TCTP ist hochkonserviert. Dies trifft auch für die Nukleotidsequenz der untranslatierten Regionen zu, was dafür spricht, dass auch diese Abschnitte unter einem hohen evolutionären Erhaltungsdruck stehen.

Computeranalysen mit Programmen, die aus einer RNA-Sequenz potentielle Sekundärstrukturen vorhersagen, zeigen dass die gesamte TCTP-mRNA in der Lage ist, komplexe Sekundärstrukturen auszubilden (Bommer *et al.* 2002). Es wurde eine Aktivierung der Proteinkinase PKR durch die TCTP-mRNA gezeigt. PKR ist eine Kinase, die durch doppelsträngige RNA aktiviert wird. Sie wurde ausführlich im Zusammenhang mit der antiviralen Wirkung von Interferonen untersucht. Nach Aktivierung durch doppelsträngige virale RNA wird die  $\alpha$ -Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2 durch PKR phosphoryliert. Dies führt zum generellen Translationsstop und somit auch zur Hemmung der weiteren Synthese viraler Proteine. Inzwischen wurde dieser Mechanismus auch für andere Signaltransduktionswege bei Zellwachstum und Apoptose beschrieben. Bommer *et al.* zeigten, dass die TCTP-mRNA nicht nur in der Lage ist, PKR zu aktivieren, sondern dass ihre Translation auch durch PKR reguliert wird.

Für eine effektive Translation ist die Entfaltung von Sekundärstrukturen in mRNAs notwendig. Neben der Bindung an die Cap-Gruppe der mRNA ist dies die wesentliche Aufgabe des Initiationsfaktors eIF4. Die Phosphorylierung dieses Initiationsfaktors führt zu einer gesteigerten Translation der TCTP-mRNA (Bommer *et al.* 1994). Es ist also wahrscheinlich, dass die phosphorylierte Form des Faktors eIF4 an der Aufwindung der Sekundärstrukturen der TCTP-mRNA beteiligt ist und so eine effektive Translation ermöglicht.

### **1.1.3 Pathophysiologische Bedeutung des TCTP**

In den letzten Jahren kristallisierten sich drei medizinische Schwerpunkte heraus, bei denen TCTP von besonderer Bedeutung ist. Zunächst betrifft dies Erkrankungen des allergischen

Formenkreises, bei denen TCTP als „Histamine-Releasing Factor“ (HRF) beschrieben wurde (MacDonald *et al.* 1995). Darüber hinaus wurde die Wirkung des TCTP in Parasiten wie Plasmodien, Filarien und Schistosomata ausführlich untersucht, und es scheint ein Zusammenhang zur Wirkung als histaminfreisetzender Faktor zu bestehen (Rao *et al.* 2002, MacDonald *et al.* 2001). Die dritte große Gruppe von Erkrankungen, bei denen eine erhöhte Expression des TCTP auf RNA- und Proteinniveau beschrieben ist, umfasst onkologische Erkrankungen.

Da TCTP offenbar ein intrazellulär lokalisiertes Protein ist, dessen Sequenz keinerlei Signale für eine Sekretion enthält, ist die Wirkung als extrazellulärer histaminfreisetzender Faktor überraschend. Insbesondere deshalb, weil es ubiquitär auch in Organismen wie Einzellern und Hefen vorkommt, bei denen diese Funktion wohl keine Rolle spielt. Möglich ist, dass es sich hierbei nicht um eine physiologische Form der Histaminfreisetzung, sondern um eine pathologische Reaktion von einer Subpopulation atopischer Patienten auf ein körpereigenes oder parasitäres Protein handelt. Die Histaminfreisetzung durch TCTP ist IgE-abhängig, wurde in den Untersuchungen aber nur bei der Hälfte der untersuchten Patienten gefunden. Sie spielt eine Rolle bei der verzögerten Antwort (late phase response, LPR) allergischer Reaktionen, wenn das Allergen schon eliminiert ist. An dieser Reaktion sind neben Mastzellen basophile und eosinophile Granulozyten beteiligt. TCTP führt neben der Freisetzung von Histamin auch zur IL-4 und IL-13 Sekretion aus basophilen Granulozyten (Schroeder *et al.* 1996). Die Synthese und Freisetzung von TCTP aus basophilen Granulozyten steht unter dem Einfluss von IL-3. Es scheint sich also um einen cytokin-gesteuerten autokrinen Mechanismus zu handeln (Nielsen *et al.* 1998). Zusätzlich konnte kürzlich eine durch TCTP hervorgerufene IL-8-Sekretion aus Eosinophilen gezeigt werden (Bheeka-Escura *et al.* 2000). In B-Lymphozyten kommt es zur Aktivierung, was eine vermehrte Expression von MHC-Komplexen und Immunglobulinen zur Folge hat (Kang *et al.* 2001). Die Induktion von TCTP durch Dioxin und die konsekutive Histaminfreisetzung könnte mit der Modulation allergischer Erkrankungen durch Umweltgifte in Verbindung stehen (Oikawa *et al.* 2002).

Im Erreger der Malaria tropica *Plasmodium falciparum* wurde TCTP als möglicher Angriffsort des neuen Malaria-Medikaments Artemisinin beschrieben (Bhisutthibhan *et al.* 1998). Diese Substanz, ursprünglich aus einem chinesischen Naturheilmittel isoliert, scheint unter Vermittlung von Hämin und Sauerstoffradikalen mit TCTP zu interagieren. Ob ein Zusammenhang zur Wirkung des Medikaments besteht oder ob diese Wechselwirkung ein Nebeneffekt ist, bleibt abzuwarten. Gut gezeigt hingegen ist die Bindung des Abbauprodukts des Hämoglobins, des

Hämings, an TCTP. Die Induktion von TCTP führt zur Ausbildung einer Resistenz gegenüber Artemisinin. (Walker *et al.* 2000). Eine weiterführende Arbeit (MacDonald *et al.* 2001) belegt, dass TCTP auch aus Plasmodien frei gesetzt wird und im Serum infizierter Individuen nachweisbar ist. Rekombinant hergestelltes Plasmodien-TCTP ist *in vitro* in der Lage, Histamin aus Basophilen und IL-8 aus Eosinophilen freizusetzen. Eine weitere Studie unterstützt die Vermutung, dass TCTP an antiparasitären Immunreaktionen beteiligt ist. Darin zeigen Rao *et al.*, dass TCTP aus *Schistosoma mansoni* neben der *in vitro* histaminfreisetzenden Wirkung auch *in vivo* bei Mäusen nach intraperitonealer Injektion lokal zu einer eosinophilen Infiltration führt (Rao *et al.* 2002). Einen weiteren interessanten Aspekt zur Wirkung als histaminfreisetzender Faktor fügte eine Arbeit hinzu, die verminderte TCTP-Konzentrationen im Hirn verstorbener Alzheimer-Patienten zeigte (Kim *et al.* 2001). Diese Krankheit ist durch einen Mangel an Histamin in den Hirnstrukturen gekennzeichnet, die für kognitive Fähigkeiten verantwortlich sind. Auch wenn es bezüglich der Wirkung als histaminfreisetzender Faktor noch offene Fragen gibt, ist diese Wirkung doch gut belegt, und weitere Experimente werden hierzu sicher noch wertvolle Erkenntnisse liefern.

Nahe liegender erscheint jedoch eine Rolle in der Pathogenese von Tumoren. Die zellzyklusabhängige Regulation und die Wirkung als anti-apoptotischer Faktor lassen dies vermuten. Schon die frühen Versuche, die schließlich auch zur Bezeichnung des Proteins führten, zeigten einen Anstieg der Expression beim Wachstum von kultivierten Tumorzellen. Mehrere Arbeitsgruppen konnten mit Hilfe von Proteom-Analysen zeigen, dass TCTP in bestimmten Tumoren zu den Proteinen gehören, deren Synthese am meisten ansteigt. Eine erhöhte Expression des *TPT1*-Gens in Colon-Ca-Zelllinien wurde auf mRNA-Niveau beschrieben (Chung *et al.* 2000). Nach Stimulation der Mamma-Ca-Zelllinie MCF-7 mit dem Fibroblasten-Wachstumsfaktor FGF-2 wurde eine verstärkte Expression des TCTP auf Proteinebene nachgewiesen (Vercoutter-Edouart *et al.* 2001). FGF-2 wirkt über die Aktivierung von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren und konsekutiver Aktivierung der MAP (mitogen-activated protein)-Kinase-Kaskade als potenter Wachstumsfaktor auf Brustkrebszellen.

Ein interessanter neuer Aspekt für diese Arbeit ergab sich aus einer Untersuchung von Sinha *et al.*, die sich mit den molekularen Veränderungen in chemoresistenten Melanomzellen beschäftigte (Sinha *et al.* 2000). In vergleichenden 2D-Gelelektrophoresen wurde ein bis zu zehnfacher Anstieg der TCTP-Expression in den resistenten Melanomzellen relativ zu den Zellen, die auf die Chemotherapeutika sensibel reagierten, nachgewiesen.

### 1.1.4 TCTP und Chemoresistenz in Tumorzellen

Bei der Behandlung von malignen Tumoren hat das Vorkommen natürlicher und cytostatika-induzierter Resistenzmechanismen einen entscheidenden Einfluss auf den Therapieerfolg. Grundsätzlich schützen diese Mechanismen gesunde Zellen vor schädlichen Noxen. Neben allgemeinen Mechanismen, wie beispielsweise DNA-Reparatursystemen oder Entgiftungssystemen wie MDR (multi drug resistance)-Membrantransportern oder dem Glutathion-System, findet man hochspezifische Resistenzmechanismen, die in Stoffwechsel und Wirkungsweise der jeweiligen Cytostatika eingreifen. Neben diesem Prinzip der Schadensbegrenzung gibt es ein bisher nur unvollkommen verstandenes offensichtlich in der Tumorzelle genetisch fixiertes Programm, das die Wirkung von Cytostatika auf den programmierten Zelltod moduliert. Das konnte für eine Überexpression des anti-apoptotischen Onkogens bcl-2 nachgewiesen werden (Fisher *et al.* 1993), und auch für TCTP gibt es erste Hinweise auf eine solche Wirkung (Li *et al.* 2001). Auf toxische Ereignisse reagiert die Zelle mit einer veränderten Genexpression, die Einfluss auf das komplexe Wechselspiel von Überleben und Zelltod hat. Die Komplexität und Redundanz dieser Netzwerke grenzen die Möglichkeiten des therapeutischen Eingreifens ein (Schmoll *et al.* 1999).

Das maligne Melanom gehört zu den häufigsten Tumorerkrankungen, und zudem lässt sich eine steigende Inzidenz beobachten, was in erster Linie auf ein verändertes Freizeitverhalten zurück zu führen ist. Die Therapie der Wahl stellt nach wie vor die chirurgische Entfernung des Tumors dar. Ein Problem bei adjuvanter oder palliativer Chemotherapie ist, dass maligne Melanome eine hohe intrinsische Chemoresistenz aufweisen und die Ansprechraten auf cytostatische Therapieschemata nur bei etwa 30% liegen. Das Ausbilden von Resistenzen unter Therapie führt dazu, dass langfristige Remissionen unter cytostatischer Therapie nur in seltenen Fällen zu beobachten sind. Ein Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge der Chemoresistenz ist notwendig, um den Patienten zukünftig effektivere Therapien anbieten zu können. Bisher beschrieben sind eine reduzierte Expression von DNA-mismatch-repair-Proteinen und eine verstärkte Aktivität der O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-Methyltransferase in resistenten Melanomzellen (Lage *et al.* 1999).

Sinha *et al.* untersuchten Expressionsunterschiede von Proteinen zwischen der chemosensiblen Melanomzelllinie MeWo im Vergleich zu resistenten Abkömmlingen dieser Zellen, die durch Zugabe von Cytostatika selektiert wurden. Die Zellen wurden mit vier verschiedenen Cytostatika (Cisplatin, Fotemustin, Etoposid, Vindesin) behandelt. Diese Medikamente weisen unterschiedliche Wirkmechanismen auf. Cisplatin und Fotemustin gehören zu den Alkylantien

und führen zur Alkylierung von DNA, RNA und Proteinen. Cisplatin löst zusätzlich Apoptose aus. Die wesentlichen Resistenzmechanismen gegenüber den Alkylantien bestehen in der Reparatur von DNA-Schäden und in der Entgiftung der Substanzen, z.B. durch Bindung an Glutathion. Etoposid hemmt die Zellteilung durch einen bisher nicht vollständig geklärten Mechanismus, bei dem die Hemmung der Topoisomerase II eine wesentliche Rolle spielt. Auch Etoposid wirkt Apoptose auslösend. Die Ursache für eine Resistenz gegenüber Etoposid wird in erster Linie in einer verminderten Expression und Aktivität der Topoisomerase II gesehen. Vindesin gehört zu den Spindelgiften. Durch fehlende Ausbildung der Mitose-Spindel kommt es zur Arretierung der Zellen in der Metaphase und zur Induktion von Apoptose. Wie bei anderen Vincaalkaloiden kommt es durch verstärkten Cytostatika-Efflux aus der Zelle, vermittelt durch den MDR-1-Transporter, zur Resistenz.

Die Analyse von 2D-Gelelektrophoresen zeigte, dass es in den chemoresistenten Melanomzellen zu einer Überexpression von TCTP und drei weiteren Proteinen kommt. Am stärksten ausgeprägt ist dieser Effekt bei den Cisplatin- und Etoposid-resistenten Zellen, wo es zu einer zehnfachen Expressionssteigerung kommt (Sinha *et al.* 2000). Diese Untersuchungen geben jedoch keinen Aufschluss darüber, ob dieser Effekt vornehmlich auf einer transkriptionellen oder translationellen Aktivierung beruht.

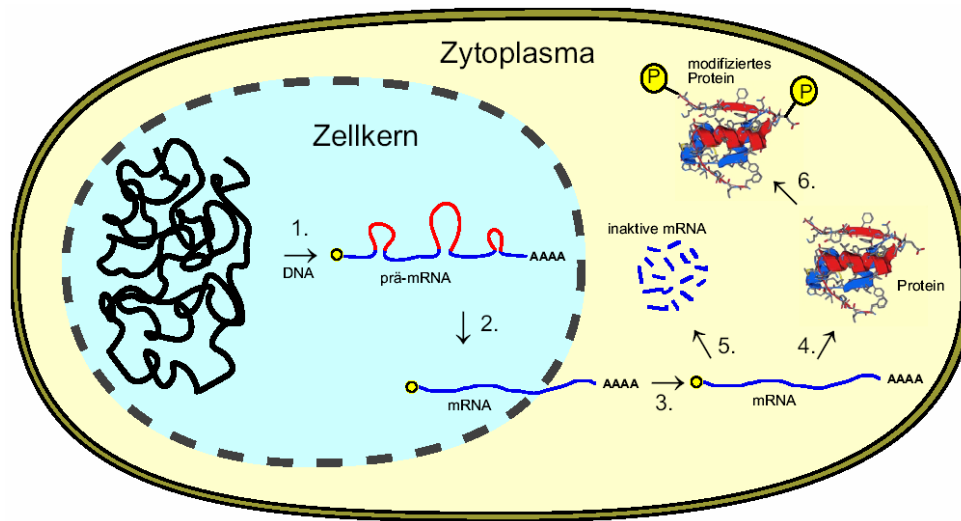
## **1.2 Die Regulation der Translation in Eukaryonten**

### **1.2.1 Die Ebenen der Genregulation**

Die Veröffentlichung der Sequenzdaten des menschlichen Genoms im Jahre 2001 war ohne Zweifel ein Meilenstein der biomedizinischen Forschung. Die Lösung einiger lang umstrittener Fragen, wie z.B. die Anzahl der menschlichen Gene, ihre Lokalisation und Organisation im Genom ist näher gerückt. Jedoch gibt die reine Abfolge der Nukleotidbausteine unzählige neue Rätsel auf. Derzeit sind etwa 31 000 menschliche Gene identifiziert, und man schätzt ihre Gesamtzahl auf etwa 35 000 (Lander *et al.* 2001). Das sind weitaus weniger als noch vor kurzem angenommen. Besonders überraschend ist dabei, dass das humane Genom offensichtlich nur für etwas mehr als doppelt so viele Gene wie das Genom der Fruchtfliege *Drosophila* kodiert. Daraus wird ersichtlich, dass die alleinige Anzahl der Gene wenige Erklärungen für die Komplexität eines Organismus liefern kann. Der entscheidende Schlüssel zu Komplexität und Differenzierung muss im Wechselspiel der Genprodukte und nicht zuletzt in der Regulation der Gene liegen.

Grundsätzlich kann man eine transkriptionelle und eine posttranskriptionelle Ebene der

Genregulation unterscheiden. In der Zelle sind diese Ebenen jedoch eng verflochten, und es kommt zur Ausbildung komplexer Netzwerke. Die wichtigsten Angriffspunkte von Regulationsmechanismen sind in Abb. 2 dargestellt.



**Abb. 2: Ebenen der Expressionskontrolle in der Zelle:**

1. Transkription, 2. RNA-Prozessierung, 3. RNA-Transport, 4. Translation, 5. mRNA-Stabilität, 6. Proteinaktivität (Alberts *et al.* 1995)

Angepasst an die jeweiligen Bedürfnisse der Zelle werden bestimmte Gene zunächst in eine unreife Prä-mRNA abgeschrieben. Die Transkriptionskontrolle wird von Transkriptionsfaktoren vermittelt, deren Aktivität über Signaltransduktionskaskaden beeinflusst wird. Während der Transkription wird am 5' Ende eine Kopfgruppe aus 7-Methyl-GTP und ein Schwanz aus etwa 100-200 Adenylresten am 3' Ende angefügt. Daran schließt sich die Reifung der mRNA durch Spleißen an. An dieser Stelle wirken Regulationsmechanismen wie alternatives Spleißen, alternative Polyadenylierung oder RNA-Editing (posttranskriptioneller Basenaustausch in der mRNA). Die reifen mRNAs werden aus dem Zellkern exportiert, und im Cytoplasma findet eine streng regulierte Kontrolle der Proteinsynthese statt. Die Gesamtheit der mRNAs einer Zelle bezeichnet man angelehnt an die Bezeichnung Genom als Transkriptom. Unter Proteom versteht man die Gesamtheit der synthetisierten Proteine einer Zelle.

In den letzten Jahren wurden zunehmend molekulare Ursachen von Krankheiten gefunden, die ihren Ursprung in einer gestörten Regulation bestimmter Gene haben. Es ist anzunehmen, dass in den nächsten Jahren weitere derartige Defekte beschrieben werden. Die Erforschung der Genregulation wird uns also in Zukunft nicht nur Einblicke in physiologische zelluläre Vorgänge geben, sondern auch zum besseren Verständnis von Pathomechanismen beitragen. Auf der

Grundlage solcher Erkenntnisse werden zukünftig Wirkstoffe, die in genregulatorische Vorgänge eingreifen, medizinische Anwendung finden, wie dies z.B. beim bereits angewandten Immunsuppressivum Rapamycin der Fall ist.

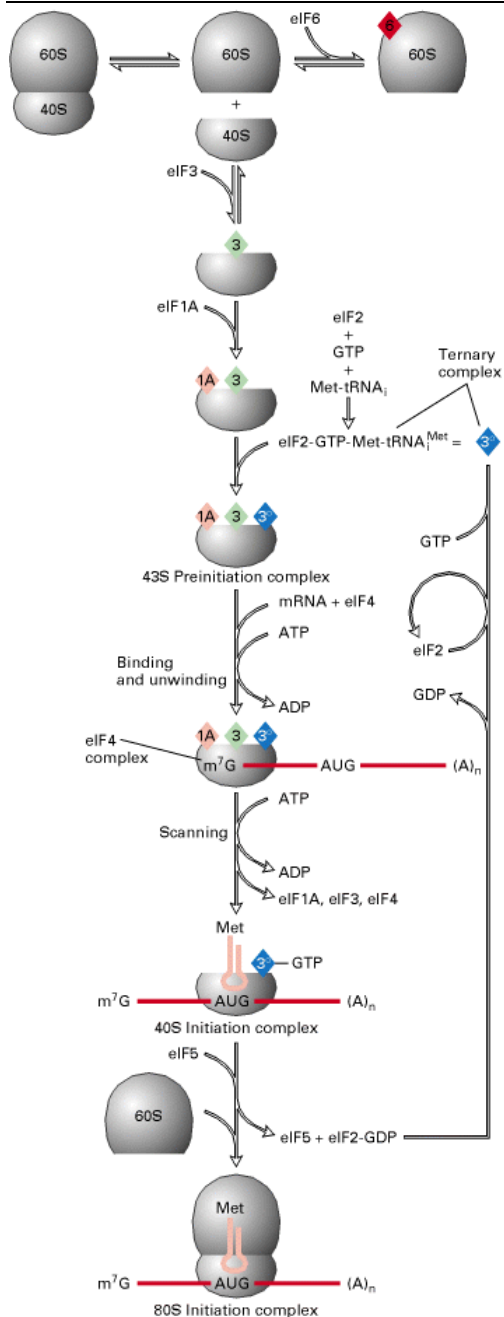
### **1.2.2 Ausgewählte Mechanismen der translationellen Regulation**

Veränderungen der Transkriptionsrate beeinflussen die Proteinsyntheserate erst mit einer gewissen Latenz. Unter bestimmten Umständen ist jedoch eine schnellere Steigerung der Proteinsynthese notwendig. An diesen Stellen greifen translationelle Regulationsmechanismen an. Diese Form der Regulation ist auch in den Fällen notwendig, in denen eine Aktivierung im Kern noch nicht, wie bei der Entwicklung einer befruchteten Eizelle, oder nicht mehr, wie beispielsweise im Retikulozyten nach Ausschleusung des Zellkerns, möglich ist (Hentze 1995).

In der Zelle liegen mRNAs nicht nackt vor, sondern werden von Proteinen mit enzymatischer oder regulatorischer Aktivität gebunden. Es kommt zur Bildung von Ribonukleoprotein (RNP)-Partikeln. Die eigentliche translationelle Kontrolle wird von allgemeinen und spezifischen Faktoren ausgeübt. Die wesentlichen Regulationsmechanismen sind die Beeinflussung von Translationseffizienz, mRNA-Stabilität und Lokalisation (Wickens 1993, Wickens *et al.* 1997, Kloc *et al.* 2002). Neben der für ein Protein codierenden Sequenz enthalten mRNAs an ihren 5' und 3'Enden unterschiedlich lange Sequenzen, die nicht in Protein übersetzt werden. Man bezeichnet diese Abschnitte als untranslatierte Regionen (UTRs). Sie sind durch Bindung von Proteinen maßgeblich an der Translationsregulation beteiligt. Schon während der Translation beginnt die Adressierung in die jeweiligen Zellkompartimente, und es finden Modifizierungen durch Anlagerung chemischer Gruppen oder durch Abspaltung von Fragmenten statt.

#### **Beeinflussung der Translationsinitiation durch allgemeine Translationsfaktoren**

Eine Übersicht über den Ablauf der Translationsinitiation ist in Abb. 3 dargestellt. Bei der Initiation der Translation wird zunächst ein 43S-Prä-Initiationskomplex aus der ribosomalen 40S Untereinheit, der Initiator-Methionin-tRNA und den Initiationsfaktoren eIF1A, eIF2 und eIF3 gebildet. An die 5'Cap-Struktur der mRNA bindet das Protein eIF4E, ein Bestandteil des Cap bindenden Komplexes eIF4F, der neben eIF4E die Faktoren eIF4B und eIF4G beinhaltet. Dieser Faktor windet auch vorhandene Sekundärstrukturen in der 5'UTR auf. Der 43S-Komplex interagiert mit eIF4E am 5'Ende der mRNA und die mRNA wird bis zum ersten AUG „gescannt“. Dort dissoziieren die Initiationsfaktoren ab, und unter Anlagerung der 60S-Untereinheit wird das komplette 80S-Ribosom unter Vermittlung des Faktors eIF5 zusammengesetzt (Preiss und Hentze 1999).



**Abb. 3: Translationsinitiation:**

Die kleine ribosomale Untereinheit bildet unter Vermittlung der Faktoren eIF1A, 2, 3 den 43S-Komplex mit der Starter-tRNA. An die Kopfgruppe bindet eIF4, der auch die Sekundärstrukturen in der 5'UTR aufwindet. Der Komplex scannt die mRNA bis zum Startcodon. Dort beginnt die Translation nach Bildung des kompletten 80S-Ribosoms (Alberts *et al.* 1995).

Es existiert auch ein Cap-unabhängiger Initiationsmechanismus an einer speziellen Sekundärstruktur der 5'UTR, der Internal Ribosome Entry Site (IRES), die vor allem in viralen mRNAs zu finden ist, aber auch in einigen wenigen zellulären mRNAs beschrieben wurde. Die Besonderheit dieses Mechanismus besteht darin, dass er teilweise unabhängig von den Translationsinitiationsfaktoren funktioniert und somit eine Möglichkeit bietet, den üblichen Weg



der Translationsinitiation zu umgehen.

Zwischen den oben genannten allgemeinen Translationsfaktoren kommt es zu Interaktionen, was die Geschwindigkeit und Genauigkeit des Translationsinitiationsprozesses gewährleistet und zugleich Angriffspunkte für Regulationsmechanismen schafft (Dever 2002). Ein besonders interessanter Aspekt der Translationsregulation durch allgemeine Initiationsfaktoren ist, dass sich nicht nur die globale Proteinsyntheserate beeinflussen lässt, sondern durch veränderte Aktivität der allgemeinen Translationsfaktoren auch eine genspezifische Regulation möglich ist. Es scheint also mRNAs zu geben, die auf geringgradige Veränderungen der Translationsmaschinerie empfindlicher reagieren als andere.

### **Beeinflussung der Translationsinitiation durch spezifische Translationsfaktoren**

Auch wenn hier in der Beschreibung eine inhaltliche Trennung der allgemeinen und spezifischen Translationsfaktoren vollzogen wird, sind diese Prozesse in der Zelle verknüpft, und die genspezifischen Faktoren üben ihre Wirkung letztlich durch Beeinflussung der allgemeinen Translationsmaschinerie aus.

Man nimmt an, dass der 5'UTR auf Grund ihrer Mitwirkung am Initiationsprozess engere Grenzen in Bezug auf individuelle Kontrollelemente gesetzt sind. Folglich finden sich viele *cis*-Elemente im Bereich von 3'UTRs. Was zunächst überraschend erschien, wurde plausibel, als physikalische und funktionelle Wechselwirkungen der beiden mRNA-Enden beschrieben wurden. So kommt es beispielsweise zur Interaktion des Poly(A)-bindenden Proteins PABP und des Initiationsfaktor eIF4G (Untereinheit von eIF4F) an der 5'Cap-Struktur. Dieser Mechanismus gewährleistet, dass nur regelrecht prozessierte mRNAs in Proteine übersetzt werden. Über Bindung an *cis*-Elemente in den 5' und 3'UTRs nehmen RNA-bindende Proteine spezifisch Einfluss auf die Translationsinitiation. Dabei spielt die Phosphorylierung der Faktoren eIF4E und eIF2 $\alpha$  eine wichtige Rolle. Selbst die kodierende Sequenz einer mRNA kann regulatorische Funktionen erfüllen. Dies ist jedoch vergleichsweise selten, da diese Abschnitte unter dem evolutionären Druck der Proteinkonservierung stehen (Grzybowska *et al.* 2001). Die Diversität dieser Prozesse wird noch gesteigert, da RNA-bindende Proteine sowohl eine Hemmung als auch eine Aktivierung der Translation bewirken können.

Ein gut untersuchtes Beispiel ist die translationelle Regulation der 15-Lipoxygenase (15-LOX) des Kaninchens in Vorläuferzellen von Erythrozyten. In den frühen Entwicklungsstadien roter Blutzellen liegt die 15-LOX in translationsinaktiven mRNP-Komplexen vor. An ein CU-reiches Element in der 3'UTR, das in zehnfacher Wiederholung vorliegt und als

Differenzierungskontrollelement (DICE) bezeichnet wird, binden die hnRNP-Proteine E1 und K und verhindern die Translation der mRNA. In den Retikulozyten wird diese Hemmung aufgehoben, und das Enzym kann seine Funktion, den Abbau der Membranen von Zellorganellen ausüben (Ostareck-Lederer *et al.* 1994, Ostareck *et al.* 1997). In anderen Geweben liegt ein zweiter längerer Messenger (mRNA2) vor. Dieser enthält ein zweites DICE und man geht davon aus, dass auf diese Weise der hemmende Effekt des ersten DICE aufgehoben wird (Reimann *et al.* 2001). Die Bindung von hnRNP K an DICE wird durch Phosphorylierung durch die c-Src-Kinase aufgehoben (Ostareck-Lederer *et al.* 2002). Der kritische Schritt der Hemmung der Translation durch hnRNP E1 und K ist die Assemblierung des 80S-Ribosoms durch Anlagerung der 60S-Untereinheit (Ostareck *et al.* 2001).

### **Stabilität von mRNAs**

Die Syntheserate eines Proteins kann außerdem über die Stabilität seiner mRNA reguliert werden. Die Länge des Poly(A)-Schwanzes einer mRNA nimmt im Laufe der Zeit ab. Wenn die kritische Länge für die Bindung des Poly(A)-bindenden Proteins PABP von 10 Adenosinresten erreicht ist, dissoziiert PABP von der mRNA ab und leitet damit die Abspaltung der Cap-Gruppe ein. Danach erfolgt der Abbau der mRNA durch 5'3'Exonukleasen. Die Wechselwirkung des Initiationsfaktors eIF4G mit PABP beeinflusst folglich nicht nur die Translationsinitiation, sondern schützt die mRNA gleichzeitig vor ihrem Abbau (Wickens *et al.* 1997). Darüber hinaus spielen Verlängerungen des Poly(A)-Schwanzes im Cytoplasma eine wichtige Rolle für die Anschaltung der Translation in der frühen Embryonalentwicklung, wenn der Zellkern noch inaktiv ist (Hentze 1995). Der Abbau von mRNAs kann ferner unabhängig von der Deadenylierung erfolgen und wird dann über die Bindung von Proteinen an *cis*-Elemente in 3'UTRs reguliert. Regulatorische Proteine wie Protoonkogene, Wachstumsfaktoren oder Cytokine zeichnen sich durch besonders kurzlebige mRNAs aus. Auf Grund von AU-reichen Elementen (ARE) in ihren 3'UTRs sind sie anfällig für einen Abbau, der von der Deadenylierung unabhängig ist. Der AU-bindende Faktor 1 (AUF1) bildet einen Komplex mit den Hitze-Schock-Proteinen Hsc70-Hsp70, dem Initiationsfaktor eIF4G und dem Poly(A)-bindenden Protein. Nach Abspaltung von eIF4G aus diesem Komplex, kommt es zur Ubiquitin-Markierung von AUF1 und konsekutiv zum Abbau des Faktors durch Proteasomen, was schließlich zum mRNA-Abbau führt (Grzybowska *et al.* 2001).

Die Bindung von Proteinen an Strukturen in UTRs kann mRNAs zudem vor dem Abbau durch Endonukleasen schützen, indem potentielle Spaltstellen maskiert werden. Ein Beispiel hierfür ist die Stabilisierung der mRNA des Transferrin-Rezeptors bei Eisenmangel. An ein Eisen-

responsives-Element (IRE) in der 3'UTR binden Eisen-regulatorische-Proteine (IRPs) und stabilisieren die mRNA. Dieses Beispiel verdeutlicht ebenfalls die Verknüpfung von mRNA-Stabilität und Translationshemmung, denn das gleiche Element führt in der 5'UTR der mRNA des Eisenspeicherproteins Ferritin zur Verhinderung der Proteinsynthese durch Hemmung der Interaktion des 43S-Komplexes mit eIF4F bei niedrigen Eisenspiegeln (Hentze 1996).

### **Lokalisation von mRNAs**

Für die morphologische Assymetrie einer Zelle ist eine ordnungsgemäße Verteilung der Proteine im Cytoplasma unentbehrlich. Eine effiziente Möglichkeit dies zu gewährleisten, ist die Lokalisation von mRNAs und die Synthese der Proteine an ihren entsprechenden Bestimmungsorten.

Besonders bedeutend ist dieser Mechanismus bei der Polarisation von befruchteten Eizellen. In *Drosophila*-Embryonen vermittelt das Produkt des Gens *Staufen* die Lokalisation der *Bicoid*-mRNA an den anterioren Pol und der *Oskar*-mRNA an den posterioren Pol der Zelle. *Staufen* ist ein RNA-bindendes Protein, das Strukturen in der 3'UTR von mRNAs erkennt und diese unter Mitwirkung von Mikrotubuli transportiert (St. Johnston und Nüsslein-Volhard 1992).

Auch in differenzierten Zellen wurden derartige Vorgänge beschrieben. In Oligodendrocyten, den Zellen, die im Gehirn die Markscheiden der Nervenzellen bilden, kommt es zur Lokalisation der mRNA des Myelin basic protein (MBP) in die Peripherie der Zellen. An cis-Elemente in der MBP-3'UTR bindet hnRNP A2 und vermittelt die Lokalisation der mRNA in die Zellperipherie (Oleynikov und Singer 1998).

In größeren Zellen wie Eizellen und Nervenzellen scheinen Mikrotubuli den Prozess zu vermitteln, wohingegen in den kleineren somatischen Zellen actin-haltige Mikrofilamente eine Rolle spielen. Die Motoren für die aktive und gerichtete Bewegung vermutet man in Kinesin (Mikrotubuli) bzw. Myosin (Actin-Filamente). Da diese Cytoskelettproteine keine RNA-bindenden Domänen besitzen, wird die Wechselwirkung höchstwahrscheinlich über RNA-bindende Proteine vermittelt und von Mikrotubuli-assoziierten Proteinen moduliert (Jansen 1999). Auch die mRNA-Lokalisation muss eng mit Translationshemmung und zeitgerechter Aktivierung verknüpft sein, um eine vorzeitige Translation während des Transportes zu verhindern (St. Johnston 1998).

### **Krankheitsrelevante Störungen der Translationsregulation**

In den letzten Jahren wurde für viele Erkrankungen eine Assoziation mit Mutationen in nicht-

codierenden Genabschnitten gefunden. Neben Mutationen im Promotor und Splice-Site-Mutationen sind dabei Mutationen in den untranslatierten Regionen von mRNAs von besonderer Bedeutung. Die gestörte Proteinsynthese kann dazu führen, dass entweder zu viel oder zu wenig Eiweiß gebildet wird, was unter Umständen im Organismus krankheitsauslösend wirkt (Conne *et al.* 2000).

So scheint beispielsweise die Akkumulation von Eisen im Gehirn von Alzheimer-Patienten an der Entstehung von oxidativem Stress beteiligt zu sein. Die Ferritin-Synthese wird durch Stabilisierung der Bindung der Eisen-regulatorischen Proteine (IRPs) an das Eisen-responsive Element (IRE) gehemmt, und folglich kann das Eisen nicht regelrecht gespeichert werden. Zusätzlich kommt durch verstärkte Stabilisierung der Transferrin-Rezeptor-mRNA ebenfalls durch die stabilere IRE/IRP-Wechselwirkung zur verstärkten Eisenaufnahme in die Hirnzellen (Guhaniyogi und Brewer 2001). Weiterhin kommt es bei diesen Patienten zur Ablagerung von  $\beta$ -Amyloid in bestimmten Hirnstrukturen. Die mRNA des Amyloid-Vorläufer Proteins (APP) wird durch Bindung von hnRNP C an die 3'UTR stabilisiert (Rajagopalan *et al.* 1998).

Medizinisch außerordentlich bedeutsam ist die Punktmutation G $\rightarrow$ A des letzten Nukleotids in der 3'UTR des Gerinnungsfaktors Prothrombin. Diese Mutation kommt in der Bevölkerung mit einer Häufigkeit von 1-2% vor und stellt neben der Faktor V Leiden-Mutation eine der wichtigsten Ursachen der Thrombophilie dar. Das Thromboserisiko ist bei Trägern der Prothrombin-Mutation auf das 2,5-fache erhöht. Die Mutation am 3'Ende führt zu einer effektiveren Prozessierung der Prä-mRNA und damit zu einer Akkumulation der Prothrombin-mRNA. In der Folge kommt es zu einer gesteigerten Synthese und zum Anstieg der Plasmaspiegel des Prothrombins, was zu einer vermehrten Aktivierung von Fibrinogen zu Fibrin führt (Gehring *et al.* 2001).

Es ist anzunehmen, dass bei der systematischen Suche nach krankheitsassoziierten Mutationen weitere genetische Veränderungen gefunden werden, die sich in den regulatorischen Bereichen von mRNAs befinden und denen über Beeinflussung von mRNA-Stabilität, Lokalisation und Translationseffizienz pathophysiologische Bedeutung zukommt.

### **1.2.3 RNA-bindende Proteine als Regulatoren der Genexpression**

Schon während der Transkription vermittelt die carboxyterminale Domäne der RNA-Polymerase II die Bindung von mRNA-prozessierenden Proteinen an die neusynthetisierte hnRNA. Die RNA liegt in Ribonucleoprotein-Komplexen vor, die entsprechend hn (heterogenous nuclear) RNP-Komplexe an der unreifen RNA im Kern bzw. mRNP-

Komplexe an der reifen exportierten Messenger-RNA genannt werden. Diese Einteilung wird jedoch zunehmend in Frage gestellt, da RNA-bindende Proteine mit der mRNA exportiert werden können und offensichtlich zwischen Kern und Cytoplasma ein Shuttle für diese Proteine existiert. RNPs sind komplexe und dynamische Gebilde aus RNA und einer Vielzahl von Proteinen. Für diese Interaktionen sind neben der Sequenz einer mRNA insbesondere Sekundärstrukturen der mRNA von Bedeutung (Dreyfuss *et al.* 2002).

RNA-bindende Proteine enthalten neben RNA-bindenden Domänen auch Bereiche, die für eine Interaktion mit weiteren Proteinen und die Lokalisierung des Proteins in der Zelle verantwortlich sind. Die am häufigsten zu findende RNA-bindende Domäne ist das RNP-Motiv, das auch als RNA-Bindungsdomäne (RBD) und RNA-Erkennungsmotiv (RRM) bezeichnet wird. Derzeit sind etwa 300 Proteine bekannt, die dieses Motiv enthalten. Das RNP-Motiv weist ein großes zentrales antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt auf, das von zwei Helices eingerahmt wird, und folgt dem allgemeinen Schema  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$ . Es kommt zu Adaptationen zwischen RNA und Protein im Sinne eines „induced-fit“ Mechanismus (Siomi und Dreyfuss 1997).

Ein anderes häufiges RNA-Bindungsmotiv ist die KH-Domäne. Dieses Motiv wurde zuerst in hnRNP K charakterisiert und nach diesem Protein benannt (KH-Domäne für hnRNP K homologe Domäne). Sie ist gekennzeichnet durch ein stabiles dreisträngiges antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, das von drei Helices umgeben ist, so dass sich folgende Struktur ergibt:  $\beta$ - $\alpha$ - $\alpha$ - $\beta$ - $\beta$ - $\alpha$ . RNA-bindende Proteine enthalten jeweils mehrere gleichartige oder verschiedene RNA-Bindungsdomänen. Wie schon am Beispiel von hnRNP K bei der Regulation der 15-LOX-Synthese beschrieben, wird die Affinität der bindenden Proteine an die RNA durch Phosphorylierung moduliert.

Die Wirkungen von RNA-bindenden Proteinen auf Translationsinitiation, mRNA-Stabilität und Lokalisation wurden bereits in den entsprechenden Abschnitten beschrieben. Insbesondere die Interaktion mit dem Initiationskomplex ist noch nicht vollständig geklärt und derzeit Gegenstand von Untersuchungen. Man nimmt an, dass Proteine spezifisch an Konsensus-Strukturen in der mRNA binden und mit den Initiationsfaktoren und/oder ribosomalen Untereinheiten wechselwirken (Ostareck *et al.* 2001).

## 2 Aufgabenstellung

In der Zelle findet eine regulierte Expression genetischer Information statt. Diese Regulation greift sowohl an der DNA in Form der transkriptionellen Kontrolle als auch an der mRNA in Form der posttranskriptionellen Kontrolle an. Die Regulation der cytoplasmatischen Proteinsynthese ist im Vergleich zu den Prozessen der Transkription und der Prozessierung der unreifen mRNA weniger gut charakterisiert. Zunehmend wird jedoch aus Vergleichen der Daten aus Transkriptom- und Proteom-Untersuchungen ersichtlich, dass eine ganze Reihe von mRNAs auf translationeller Ebene reguliert werden. Die Berichte über Erkrankungen, die mit Mutationen in den untranslatierten Regionen (UTRs) von mRNAs assoziiert sind, unterstreichen die Bedeutung dieser Regulationsmechanismen für den regelrechten Ablauf physiologischer Vorgänge.

Das translationell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) stellt ein aus medizinischer Sicht interessantes Modell zur Untersuchung von Regulationsphänomenen auf der Ebene der Translation dar. Seine zellzyklus-abhängige Assoziation mit Bestandteilen des Cytoskeletts und seine Fähigkeit, den programmierten Zelltod zu hemmen, legen eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und der malignen Transformation von Zellen nahe.

Auf Grund der hochgradigen Konservierung der TCTP-Sequenz unter den Säugetierspezies sollten grundlegende Regulationsmechanismen zunächst an einem ausgewählten Tiermodell, in diesem Falle am Kaninchen, untersucht werden. Zur Ergänzung sollten Untersuchungen zur Bedeutung der Translationsregulation des TCTP in chemoresistenten Melanomzellen an einer humanen Zelllinie durchgeführt werden. Der Vergleich konservierter Elemente in den UTRs verschiedener Spezies der TCTP-mRNA ermöglicht die Identifizierung potentieller Motive für RNA-bindende Proteine.

In den letzten Jahren wurde zunehmend die Bedeutung der UTRs für die Regulation von Translation, Stabilität und Lokalisation von mRNAs erkannt. Die TCTP-mRNA des TCTP gehört zu den mRNAs, deren Übersetzung in die Aminosäuresequenz eines Proteins einer besonderen Kontrolle unterliegen. Diese translationelle Regulation des TCTP ist bisher erst in Anfängen untersucht. Die TCTP-mRNA besitzt in ihrer 5'UTR eine charakteristische pyrimidinreiche Struktur. An derartige 5'terminale Oligopyrimidintrakte (5'TOPs) binden spezifische Proteinfaktoren, die regulatorische Wirkungen vermitteln. Es existieren zwei verschieden lange TCTP-mRNAs (mRNA1 und 2), die sich in der Länge ihrer 3'UTRs unterscheiden.

Zunächst sollte daher die Frage geklärt werden, welchen Einfluss die einzelnen Abschnitte der TCTP-mRNA auf die Translatierbarkeit haben. Dazu mussten zuerst aus unvollständigen cDNA-Bank-Klonen volllange cDNA-Klone der TCTP-mRNA1 und 2 sowie Konstrukte, bei denen die untranslatierten Regionen deletiert sind, hergestellt werden. Die Aufgabe umfasste insbesondere, Unterschiede in der Translationsrate der beiden verschiedenen langen mRNAs zu erarbeiten und die Translatierbarkeit der Konstrukte in den beiden *in vitro* Translationssystemen Retikulozytenlysat und Weizenkeimlysat zu vergleichen.

Anschließend sollte untersucht werden, ob eine Proteinbindung an *in vitro* Transkripte der untranslatierten Bereiche nachzuweisen ist und ob sich diese Proteinfaktoren anreichern und identifizieren lassen. Der Nachweis der Proteinbindung sollte in Electromobility Shift Assays (EMSAs) erbracht werden. Zur näheren Charakterisierung der bindenden Proteine sollten UV-Crosslinking Experimente durchgeführt werden. In der RNA-Affinitätschromatographie sollten Kandidatenproteine für eine spätere Identifizierung in der MALDI-TOF-Massenspektrometrie angereichert werden.

Der Nachweis einer vermehrten TCTP-Expression in chemoresistenten Melanomzellen von Sinha *et al.* mit Hilfe von 2D-Gelelektrophoresen erlaubte keine Aussagen darüber, ob diese erhöhte Expression auf transkriptioneller oder posttranskriptioneller Ebene reguliert wird (Sinha *et al.* 2000). Es sollte daher die Frage beantwortet werden, inwieweit eine translationelle Regulation für diesen Effekt verantwortlich ist. Im Anschluss an eine solche Zuordnung des Effekts an Hand von Northern und Western Blot-Analysen, sollte untersucht werden, ob in Proteinbindungsstudien Unterschiede zwischen Extrakten von sensiblen und resistenten Melanomzellen zu beobachten sind. Auch hier sollte eine Anreicherung und Identifizierung RNA-bindender Proteine angestrebt werden.

Im Ergebnis sollte ein Beitrag zum Verständnis grundlegender Regulationsphänomene auf translationeller Ebene am Beispiel der TCTP-mRNA unter physiologischen Umständen geleistet werden und eine Bedeutung dieser Vorgänge für die erhöhte TCTP-Expression in chemoresistenten Melanomzellen belegt werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte

Thermocycler	Biometra
Hybridisierungsofen	MWG BIOTECH
Stromversorgungsgeräte	Biometra, Consort, Biorad, Gibco BRL
Zentrifugen	Sigma, Sorvall, Heraeus, Eppendorf
Flüssigszintillationszähler	Wallac
Phosphorimager	Fuji
Transilluminator	AGS
Elektrophoresekammern	EMBL, Sigma, Biometra
Kamera	Polaroid
Laminarbox	Antair
Messerhomogenisator	Ultraturax T25, Janke & Kunkel, IKA-Labortechnik
Wasserbäder	MWG Biotech
Photometer	Shimadzu
UV-Lampe	VEB Quarzlampen

##### 3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien besaßen den Reinigungsgrad pro analysi.

Acrylamid/Bisacrylamid-Lsg.	Roth
Agarose	Serva
AgNO <sub>3</sub>	Merck
Ampicillin	Roth
Bacto Agar	Difco
Bacto Trypton	Difco
Bacto Hefeextrakt	Difco
Borsäure	Merck, Roth
Chloroform	Merck, Roth
Coomassie-Brilliant-Blau	Merck
Dextransulfat	Merck



---

DTT	Sigma, Stratagene
EDTA	Roth
Ethanol	Roth, Baker
Ethidiumbromid	Roth
Essigsäure	Roth, Baker
Formaldehyd	Roth
Formamid	Merck
Glucose	Merck, Roth
Glycerol	Merck
Glycin	Merck, Roth
Harnstoff	Roth
HCl	Merck
Heparin	Sigma
HEPES	Sigma
IPTG	AppliChem, Roth
Isopropanol	Merck, Roth
KAcetat	Promega
Kanamycin	Sigma
KCl	Roth
LiCl	Roth
Methanol	Roth, Baker
MgCl <sub>2</sub>	Sigma
β-Mercaptoethanol	Sigma
MOPS	Roth
NaAcetat	Roth
NaCl	Merck
NaCitrat	Merck, Roth
NaOH	Roth
NH <sub>4</sub> OH	Roth
Phenol	Roth
SDS	Roth

TRIS	Merck, Roth
Trichloressigsäure	Roth
X-Gal	AppliChem

### 3.1.3 Radiochemikalien

[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-rUTP (800 Ci/mmol)	ICN
[ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP (1000 Ci/mmol)	ICN
[ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin (1000 Ci/mmol)	Amersham

### 3.1.4 Synthetische Oligonukleotide

Tabelle 1: Verwendete TCTP-Primer

Hinprimer Kaninchen			Rückprimer Kaninchen		
Name	5'Sequenz 3'	Position	Name	5'Sequenz 3'	Position
<b>P23 01H</b>	CTTTCCGCCCGCTCCCC	1 (5'UTR)	<b>HMO-TAP-R2</b>	TCTGTAGATGTCGGAGAAC	375 (Exon 2)
<b>P23 5'Nco</b>	TACCAGCCGCCACCATGGTT	103 (5'UTR)	<b>P23 98R</b>	GATGGCGGCTGGTAGGAG	98 (5'UTR)
<b>P23 636H</b>	CAAAGTTGGCAATTGGATC	636 (3'UTR1)	<b>P23 635R</b>	TTAACATTTTCCATCTCTAA	615 (cod.)
<b>P23 H4</b>	GAGAGAATGCCTATTAGT	844 (3'UTR2)	<b>P23 823R</b>	GAATTAAATGCATTTTATTT	823 (3'UTR1)
			<b>P23 R3</b>	CAACTCAATCAGTCTCTC	1146 (3'UTR2)

Alle Oligonucleotide wurden von der Firma TIB Mol-Biol (Berlin) im Synthesemaßstab 0,2  $\mu\text{mol}$  bezogen.

### 3.1.5 Enzyme, Kits und Sonstiges

BioMax MR Filme	Kodak
Biotin-14-CTP	Gibco BRL
Chromaspin S100 Säulen in DEPC-H <sub>2</sub> O	Clontech
Desoxyribo-/Ribonukleotide	Biolabs, Promega, Roche
E. coli rRNA	Roche
Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate System	Promega
Heringssperma-DNA	Roche
Hexalabel DNA Labeling Kit	MBI Fermentas
Micro BCA Protein Assay Kit	Pierce
Mini Complete Protease Inhibitor	Roche
Nucleasefreies H <sub>2</sub> O	Promega
Restriktionendonukleasen, Ligasen, Polymerasen	AGS, Biolabs, Boehringer, MBI, Promega, Stratagene, Gibco BRL
Polaroid Polapan PRO 100 Filme	Polaroid
Poly dA/ Poly dC	Sigma
Proteinase K	Promega
QIAEX II Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Mini/ Midi/ Maxi Kits	QIAGEN
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN
QIAquick Nucleotide Removal Kit	QIAGEN
RNA Clean System	AGS
RNasin, RNA Guard	Promega, Pharmacia
RNase A, RNase T1	Roche, Gibco BRL, Sigma
RQ1 DNase	Promega
Streptavidin-Agarose-Partikel	Gibco BRL, Sigma Aldrich
Taq Polymerase	Invitex, Rapidozym
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen
Wheat Germ Extract	Promega

### 3.1.6 Software und Internetressourcen

Zum Analysieren von DNA-, RNA- und Proteinsequenzen wurden die Programme DNA-Strider

und DNA-Star verwendet. Auf folgende Internetressourcen wurde zurückgegriffen:

<a href="http://www.ebi.ac.uk">http://www.ebi.ac.uk</a>	Sequenzvergleiche, Zugang zu EMBL- und GeneBank-Datenbanken
<a href="http://bighost.area.ba.cnr.it/BIG/UTRscan">http://bighost.area.ba.cnr.it/BIG/UTRscan</a>	Zugang zu UTR-Datenbanken, Suche nach potentiellen <i>cis</i> -Elementen in mRNAs
<a href="http://www.expasy.ch">http://www.expasy.ch</a>	Zugang zu Proteinsequenz-Datenbanken
<a href="http://www.ncbi.nlm.nih/BLAST">http://www.ncbi.nlm.nih/BLAST</a>	Homologie-Suche in Nukleotid- und Protein-Datenbanken

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Plasmidkonstruktionen

Um eine Beteiligung der untranslatierten Regionen der TCTP-mRNA an der Translationsregulation zu untersuchen, wurden Deletionsvarianten der mRNA1 und 2 für *in vitro* Translationsexperimente kloniert. Die vollständige TCTP-cDNA1 (843bp) und die vollständige cDNA2 (1163bp) des Kaninchens wurden zunächst aus zwei unvollständigen cDNA-Bank-Klonen (33/34, 31/1) und einem PCR-Fragment aus einem Klon, der das *TPT1* Gen enthält, hergestellt. Den beiden unvollständigen Klonen fehlten jeweils 34 Nukleotide am 5'Ende. Aus dem genomischen *TPT1* Klon (H2 EcoRI) wurde mittels PCR ein Fragment amplifiziert (Hinprimer: 01H, Rückprimer: HMO-TAP-R2) und in den Stratagene PCR-Script-Vektor kloniert. Die cDNA wurde dann durch Einfügen eines *NheI/ApaI*-Fragments aus den unvollständigen cDNA1- und cDNA2-Klonen komplettiert.

Nachfolgend wurden dann jeweils die mRNA1 (Hinprimer: 01H, Rückprimer: 823R), die mRNA2 (Hinprimer: 01H, Rückprimer: R3), die mRNA1 ohne 5'UTR (Hinprimer: 5'Nco, Rückprimer: 823R), die mRNA2 ohne 5'UTR (Hinprimer: 5'Nco, Rückprimer: R3), die mRNA ohne 3'UTR (Hinprimer: 01H, Rückprimer: 635R) und die mRNA ohne 5'UTR und ohne 3'UTR (Hinprimer: 5'Nco, Rückprimer: 635R) mittels PCR amplifiziert und anschließend nach dem Protokoll des TOPO TA Cloning Kits von Invitrogen in den PCRII-TOPO-Vektor kloniert.

Für Proteinbindungsstudien wurden die 5'UTR (Hinprimer: 01H, Rückprimer: 98R), die 3'UTR1 (Hinprimer: 636H, Rückprimer: 823R), die 3'UTR2 (Hinprimer: H4, Rückprimer: R3) sowie die gesamte 3'UTR (Hinprimer: 636H, Rückprimer: R3) der TCTP-mRNA mittels PCR aus dem cDNA2-Klon amplifiziert und ebenfalls in den PCRII- TOPO-Vektor kloniert.

Die humane TCTP-cDNA wurde mittels RT-PCR aus Leukozyten-mRNA kloniert und dann wurden analog zu den Kaninchen-Konstrukten Subklone der verschiedenen UTRs hergestellt. Ich danke Irina Schmidt für die Überlassung dieser Plasmide.

Ein Standard-PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen: 18,75 µl H<sub>2</sub>O, 0,75 µl 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µl 10xPCR-Puffer, 1 µl 10 µM Hinprimer, 1 µl 10 µM Rückprimer, 0,25 µl dNTP Mix (je 20 mM), 0,5µl Template-DNA, 0,25µl Taq-Polymerase (1U/µl). Die Annealing-Temperaturen wurden unter Verwendung der Formel  $T_m = 69,3^\circ\text{C} + 0,41 \times (\text{GC}\%) - 650 / \text{Primerlänge} + 3^\circ\text{C}$  abgeschätzt. Die weiteren PCR-Bedingungen wurden angelehnt an das Protokoll von Kramer und Coen (Kramer und Coen, 1995).

### **3.2.2 Klonierung und Präparation der Plasmide**

Die unter 3.2.1. beschriebenen Plasmidkonstruktionen wurden nach Standardmethoden kloniert (Sambrook *et al.* 1989). Die Ausgangsplasmide wurden mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten, die Fragmente im Agarose-Gel aufgetrennt, ausgeschnitten und mit den Gelextraktions-Kits von QIAGEN isoliert. Anschließend wurden die kompatiblen Enden mit Hilfe der T4-DNA Ligase (1-2 U pro Ansatz mit 100-200 ng DNA) über Nacht bei 16°C ligiert.

In Eis aufgetaute kompetente Zellen *E. coli* DH5α (Sambrook *et al.*, 1989) wurden für 30 min auf Eis mit dem Ligationsansatz inkubiert. Nach einem kurzen Hitzeschock von 90 s bei 42°C wurden die Zellen für 1 h bei 37°C in 900 µl LB und 20 mM Glucose geschüttelt. Die auf LB-Agar mit dem entsprechendem Antibiotikum, IPTG und X-Gal gewachsenen Einzelklone wurden mittels PCR sowie Restriktionsspaltung nach Plasmidpräparation getestet. Die Konstrukte wurden durch Sequenzierung überprüft.

Die Plasmidpräparationen erfolgten mit den QIAGEN Plasmid-DNA-Mini/Midi oder Maxi-Kits, die auf dem Prinzip der Anionen-Austauschchromatographie beruhen.

### **3.2.3 *In vitro* Transkription**

Zur Herstellung von *in vitro* transkribierter TCTP-mRNA für *in vitro* Translationsexperimente wurden die cDNA-Plasmide zunächst mit geeigneten Restriktionsendonukleasen linearisiert. Die DNA wurde daraufhin mittels Phenol/Chloroform-Extraktion isoliert, mit Ethanol gefällt und schließlich in 1x TE-Puffer aufgenommen. Danach folgte eine einstündige Behandlung mit Proteinase K mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml in 0,5% SDS, 50 mmol NaCl, 5 mM EDTA pH 8, 10 mM Tris pH 8 sowie eine erneute Phenol/Chloroform-Extraktion, Alkoholfällung und Aufnahme in 1x TE-Puffer.

Ein 75 µl-Transkriptionsansatz enthielt 15 µl 5x Transkriptionspuffer; ca. 2 µg linearisiertes Plasmid; 7,5 µl Ribonukleotidmix (je 10 mM); 5,6 µl 0,5 M DTT; ca. 40 U RNase-Inhibitor; ca. 50 U T7, T3 oder SP6-Polymerase sowie nucleasefreies Wasser. Nach einstündiger *in vitro* Transkription bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 15 µl 0,2 M EDTA und fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur gestoppt und die mRNA anschließend durch Zugabe von 15 µl 4 M LiCl und 250 µl 96% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Aufnahme in 50 µl nucleasefreiem Wasser wurden die Transkripte elektrophoretisch und UV-spektrophotometrisch analysiert. Auf diese Weise wurden auch die nicht radioaktiv-markierten Transkripte zur Kompetition in Electromobility Shift Assays hergestellt.

Für Proteinbindungsstudien wurden ca. 200 ng der linearisierten UTR-Subklone in 4 µl 5x Transkriptionspuffer, 2 µl 0,1 M DTT, ca. 40 U Ribonucleaseinhibitor, 4 µl Mix aus rATP; rCTP, rGTP (je 2,5 mM), 2,4 µl 100 mM rUTP, 4 µl [ $\alpha^{32}\text{P}$ ] rUTP, ca. 20 U T7 oder SP6-Polymerase und nucleasefreiem Wasser (Gesamtvolumen=20 µl) 1h bei 37°C *in vitro* transkribiert. Nach DNase-Behandlung (2 U) für 15 min bei 37°C wurden die markierten Transkripte mittels Phenol/Chloroform-Extraktion und Chromaspin-Säulen gereinigt. Die spezifische Aktivität der Transkripte wurde in einem Flüssigszintillationsmesser bestimmt und betrug nach Ethanolfällung ~70000 cpm/ng.

Für die Proteinisolierung mittels RNA-Affinitätschromatographie wurden Biotin-14-CTP markierte Transkripte wie folgt hergestellt: ~4 µg linearisiertes Plasmid, 20 µl 5x Transkriptionspuffer, 37,5 µl 0,1 M DTT, 10 µl rNTP-Mix (je 10 mM rATP, rGTP, rUTP); 5 µl 10 mM CTP, 5 µl 10 mM Biotin-14-CTP, ~80 U Ribonucleaseinhibitor; ~100 U T7 oder SP6-Polymerase sowie nucleasefreies Wasser (Gesamtvolumen=100 µl) wurden 1 h bei 37°C transkribiert, die Reaktion mit 20 µl 0,2 M EDTA gestoppt (25°C, 5 min) und die Transkripte anschließend mit 20 µl 4 M LiCl und 600 µl 96% Ethanol über Nacht bei -20°C gefällt. Nach Zentrifugation und Aufnahme in 50 µl nucleasefreiem Wasser wurden die Transkripte in einem Agarosegel analysiert.

### **3.2.4 *In vitro* Translation**

Die Translation der *in vitro* transkribierten TCTP-mRNAs (~40-120 ng nach 3 min 65°C) erfolgte in einem mit Mikrokokken-Nuklease behandelten Kaninchen-Retikulozytenlysat oder Weizenkeimlysat der Firma Promega. Ein Ansatz (12,5 µl) enthielt 9,2 µl Flexi Rabbit Reticulocyte Lysate, 0,3 µl [ $^{35}\text{S}$ ]-Methionin, 0,5 µl proteinogene Aminosäuren ohne Methionin

(1mM), 0,2 µl 2,5 M KCl (Endkonzentration=40 mmol/l) und 0,3 µl (~10 U) RNase-Inhibitor. Nach einer Inkubation der Ansätze für 60 min bei 30°C wurden die Proben in 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen, 4 min in einem Wasserbad gekocht und anschließend in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Visualisierung der *in vitro* translatierten Proteine erfolgte mittels Autoradiographie bei -80°C.

Ein Translationsansatz (12,5 µl) mit 6,5 µl Weizenkeimextrakt enthielt: 1 µl proteinogene Aminosäuren ohne Methionin (1 mM), 0,5 µl 1 M KAc (Endkonzentration=40 mmol/l), 0,25 µl (~10U) RNase-Inhibitor, 0,2 µl [<sup>35</sup>S]-Methionin, ~200 ng mRNA sowie nucleasefreies Wasser. Diese Ansätze wurden für 2 h bei 25°C inkubiert und anschließend analog zu den Proben mit Retikulozytenlysate analysiert.

### 3.2.5 Electromobility Shift Assays und UV-Crosslinking-Experimente

Für Electromobility Shift Assays (Konarska und Sharp 1986, Leibold und Munro 1988) wurden ~0,15 ng (~10000 cpm) des [<sup>32</sup>P]-markierten *in vitro* Transkripts nach einer zehnmütigen Vorbehandlung bei 65°C mit 3,5 µl Zell- bzw. Gewebeextrakt (Proteinkonzentration=20-80µg/µl) oder 3,5 µl nucleasefreiem H<sub>2</sub>O für 15 min bei Raumtemperatur in 10 mM HEPES pH 7,2, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 5% Glycerol; 1 mM DTT; 100 mM KCl, *E. coli* rRNA in einer Endkonzentration von 50 µg/ml und ~20 U RNase- Inhibitor inkubiert. Nach Zusatz von Heparin in einer Endkonzentration von 5 mg/ml wurden die Ansätze für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Den Proben wurden jeweils 2 µl Ladepuffer (0,5 % Bromphenolblau; 0,5 % Xylencyanol; 48,5 % Glycerol) zugegeben und anschließend 4 µl jeder Probe in einem 4%igen nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel in 0,5x TBE-Puffer elektrophoretisch getrennt und die Banden mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

In den Ansätzen für die UV-Crosslinking-Experimente (Leibold und Munro 1988) wurden ~1,5ng (~100000 cpm) wie bei den Electromobility Shift Assays beschrieben 15 min bei Raumtemperatur mit den Proteinextrakten bzw. mit H<sub>2</sub>O inkubiert. Nach der Zugabe des Heparins wurden die Proben dann 15 min auf Eis mit UV- Licht (254 nm, 25 W, Abstand: 4-5cm) bestrahlt. Daran schloss sich ein 15-minütiger RNase-Verdau mit 4 µl eines RNase-Mix bei 37°C an (RNase-Mix: 320 µl Aqua bidest, 40 µl 10x RNase-Puffer: 100 mM Tris, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 M KCl, pH 7,4, 40 µl RNase A c=10 mg/ml, 0,6 µl RNase T1 ~1400 U). Nach Zugabe von 15 µl 2x Laemmli-Probenpuffer wurden die Ansätze für 3 min bei 80 °C inkubiert und nachfolgend jeweils 10 µl pro Ansatz in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Analyse der Banden erfolgte wiederum mittels Autoradiographie.

### 3.2.6 RNA-Affinitätschromatographie

Das Protokoll für diese Versuche wurden angelehnt an die Beschreibungen von Rouault *et al.* und Ostareck *et al.* (Rouault *et al.* 1989, Ostareck *et al.* 1997). Die Streptavidin-Agarose-Partikel (600  $\mu$ l) wurden zunächst für 2 min bei 4°C und 3500 rpm abzentrifugiert. Die verbleibenden ~300  $\mu$ l dicht gepackten Partikel wurden dann zunächst mit 1 ml 1 M KCl-Elutionspuffer (1 M KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM DTT) voreluert und dann viermal mit jeweils 1 ml Waschpuffer (150 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM DTT) gewaschen.

Das in 3.2.3. beschriebene Biotin-14-CTP markierte Transkript (~10  $\mu$ g) wurde daraufhin mit 50  $\mu$ l Waschpuffer und 10  $\mu$ l (~400 U) RNase-Inhibitor gemischt und während 100 min bei 4°C unter vorsichtiger Rotation an die Streptavidin-Agarose-Partikel gebunden. Nach kurzer Zentrifugation (2 min, 4°C, 3500 rpm) und großzügigem Abnehmen des Überstandes wurde dann 1 ml des mit 27  $\mu$ l  $\beta$ -Mercaptoethanol und 4  $\mu$ l (~160 U) RNase-Inhibitor für 10 min bei 4°C vorinkubierten Proteinextraktes zugegeben. Die Inkubation von den an die Streptavidin-Agarose gebundenen Biotin-Transkripten mit den Proteinextrakten erfolgte bei 4°C unter Rotation für 1 h.

Die Partikel wurden dann wiederum abzentrifugiert und fünfmal mit jeweils 1 ml Waschpuffer für 5 min bei 4°C unter Rotation gewaschen. Die Elution der an das Transkript gebundenen Proteine erfolgte zweimal mit je 100  $\mu$ l 1 M KCl- Elutionspuffer (1 M KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM DTT) und einmal mit 100  $\mu$ l 3 M KCl-Elutionspuffer (3 M KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,5 mM DTT) für 10 min bei 4°C unter Rotation. Ein weiteres Mal wurde mit 100  $\mu$ l 8 M Harnstoff-Elutionspuffer (8 M Harnstoff, 1 M KCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) für 20 min bei Raumtemperatur unter Rotation eluiert.

Von den Waschschritten und Eluaten wurden jeweils 20  $\mu$ l mittels SDS-PAGE (15%iges Gel) und nachfolgender Silberfärbung (Wray *et al.* 1981) analysiert. Nach Auftragen von 80  $\mu$ l der Eluate wurden die SDS-Gele mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbt. Banden wurden zur Identifizierung mittels Massenspektrometrie ausgeschnitten.

### 3.2.7 Proteinidentifizierung mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie

Diese Daten wurden in einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Thilo Kähne, Universitätsklinikum Magdeburg, erhoben. Die Proteinbanden wurden aus den mit Coomassie-Brilliant-Blau gefärbten Gelen ausgeschnitten und jeweils mehrmals mit 0,1 M NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> und



Acetonitril gewaschen bis kein Farbstoff mehr sichtbar war. Anschließend wurden die Gelpartikel in einer Vakuum-Zentrifuge eingedampft und schließlich in 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  mit 10 mM DTT resuspendiert. Es folgte eine 45-minütige Inkubation bei 56°C. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur wurde der Überstand durch 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  mit 55 mM Jodacetamid ersetzt. Nach 30-minütiger Inkubation in Dunkelheit wurden die Gelpartikel nochmals dreimal in 0,1 M  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ : Acetonitril (1:1 v/v) gewaschen und wiederum in der Vakuumzentrifuge eingedampft. Die Proben wurden in frisch angesetzter 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ -Lösung mit 12,5 ng/ $\mu\text{l}$  Trypsin (Roche) aufgenommen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

Die entstandenen Peptide wurden durch jeweils mehrmaliges Waschen mit 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  und Acetonitril, unterstützt durch Ultraschallbehandlung, aus dem Gel gelöst. Die Extrakte wurden zusammengeführt und durch Vakuumzentrifugation getrocknet. Für die Massenspektrometrie wurden die Peptide in 5  $\mu\text{l}$  0,1% TFA resuspendiert und mit einer 200 nl „reversed-phase (C18)-nanocolumn“ aufgereinigt. Die Peptide wurden in 5  $\mu\text{l}$  70% Acetonitril eluiert und anschließend mit  $\alpha$ -Cyano-4-Hydroxy-Zimtsäure (20 mg/ml) in 70% Acetonitril an einem SCOUT 384-600  $\mu\text{m}$  Anchor-Target kokristallisiert. Die Massenspektrometrie wurde in einem MALDI-TOF-MS (Reflex III, Bruker Daltonics, Deutschland) mit externer Kalibrierung durchgeführt. Die Analyse der tryptischen Fragmente erfolgte mit der BioTools 2.0 Software (Bruker Daltonics, Deutschland), und für die Datenbanksuche wurde die Mascot-Software (Matrix Science, USA) verwendet.

### **3.2.8 Northern Blots**

Zur RNA-Extraktion wurden die etwa 100mg schweren Melanomzell-Pellets mit 1 ml RNA Clean versetzt und die weiteren Schritte gemäß des Protokolls des Herstellers ausgeführt.

In einem formaldehydhaltigen Agarose-Gel (Laufpuffer=1x MOPS) wurden je 10  $\mu\text{g}$  Melanomzell-RNA elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Photographie des Gels wurde die RNA über Nacht in 20x SSC mittels Kapillartransfer auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Quervernetzung von RNA und Membran erfolgte bei 80°C für 2 h.

Aus dem Plasmid, das die vollständige humane TCTP-cDNA2 enthält, wurde zunächst mit *EcoRI* das Insert herausgeschnitten und das Fragment dann mit dem Hexalabel DNA Labeling Kit von MBI Fermentas mit [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-dCTP markiert. Das Abtrennen der verbliebenen freien Radioaktivität erfolgte mit dem Nucleotide Removal Kit von QIAGEN.

Der Blot wurde mit 10 ml Prähybridisierungslösung (50 % Formamid; 5x SSC; 5x Denhardt's,

250 µg/ml Heringssperma-DNA, 10 µg/ml Poly dA, 10µg/ml Poly dC) für 4 h bei 42°C prähybridisiert. Zu 10 ml Hybridisierungslösung (50 % Formamid, 10 % Dextransulfat, 5x SSC, 1x Denhardt's, 100 µg/ml Heringssperma-DNA, 10 µg/ml Poly dA, 10 µg/ml Poly dC) wurde markierte Sonde mit einer spezifischen Aktivität von  $\sim 10^7$ cpm nach zehnmütiger Inkubation bei 99°C zugegeben und die Membran über Nacht bei 42°C hybridisiert. Der Blot wurde anschließend mehrmals (50°C, 55°C) in Waschpuffern mit absteigender Salzkonzentration (2x SSC, 0,2x SSC/2% SDS) von unspezifisch gebundener Radioaktivität befreit. Die Anzahl der Waschschrte richtete sich nach der detektierbaren Hintergrundaktivität. Die Membran wurde dann über Nacht bei -80°C auf einen Röntgenfilm exponiert.

### **3.2.9 Western Blots**

Je 20 µg der Melanomzell-Proteinlysate wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt. Die Proteine wurden nach einem Semi-Dry-Verfahren (Biometra) auf hydrophobe PVDF-Membranen (Immobilon P, Millipore) geblottet (15 min, 15 V). Die Membran wurde mit 5%igen Magermilchpulver in 1xTBS-T-Puffer (20 mM TRIS, 137 mM NaCl, 0,1% Tween 20) über 1 h blockiert.

Der Blot wurde 1 h bei Raumtemperatur mit einem Kaninchen-Anti-Maus-TCTP-Antikörper, Verdünnung 1:2000 in TBS-T/2% Magermilchpulver (D 24, überlassen von Dr. U. Bommer, London), der mit humanem TCTP kreuzreagiert, inkubiert. Nicht gebundener Primär-Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit 1x TBS-T entfernt. Es folgte eine einstündige Inkubation mit einem POD-markierten Schwein-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Ak, Verdünnung 1:10000 in TBS-T/2% Magermilchpulver (Dako, Deutschland). Die Detektion der positiven Proteinbanden erfolgte nach erneuten Waschschrten mit dem „ECL Western Blotting Detection Reagent“ der Firma Amersham Pharmacia Biotech. und anschließender Röntgenfilm-Exposition über 5-10 min.

### **3.2.10 Melanomzellkulturen**

Die Melanomzelllinien wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. Hermann Lage, Charité Berlin, kultiviert. Verwendet wurde die Zelllinie MeWo, die aus einer Lymphknotenmetastase eines Patienten mit malignem Melanom im Sloan Kettering Krebszentrum, New York, etabliert wurde.

Die Zellen wuchsen in Leibovitz L 15 Medium, dem 10% fetales Kälberserum, 1 mM L-Glutamin, 6,25 mg/l Fetuin, 80 IE/l Insulin, 2,5 mg/l Transferrin, 1 g/l Glucose, 1,1 g/l NaHCO<sub>3</sub>, 1% essentielle Vitamine und 20000 kIE/l Trasolyl zugefügt wurde, in einer

Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C. Die Zellen wurden mit TBS/EDTA von den Schalen geerntet.

Durch Zugabe von Etoposid (0,1 und 1,0 µg/ml) oder Cisplatin (0,01 und 1,0 µg/ml) wurden die gegen diese Chemotherapeutika resistenten Zelllinien selektiert. Die Bezeichnungen der resistenten Zelllinien ergeben sich jeweils aus dem zugesetzten Cytostatikum und dessen Konzentration. Eine Übersicht der verwendeten Zelllinien und ihrer Bezeichnungen ist in Tab. 2 enthalten.

**Tabelle 2 Übersicht der verwendeten Melanomzelllinien**

Bezeichnung der Zelllinie	Resistenz	Konzentration des Cytostatikums
MeWo	Keine Resistenz	Kein Zusatz eines Cytostatikums
MeWo+CIS 1	Keine Resistenz	Zusatz von 1µg/ml Cisplatin
MeWo+ETO 1	Keine Resistenz	Zusatz von 1µg/ml Etoposid
CIS 0,01	Resistenz gegen	Zusatz von 0,01µg/ml Cisplatin
CIS 1	Resistenz gegen	Zusatz von 1µg/ml Cisplatin
ETO 0,1	Resistenz gegen	Zusatz von 0,1µg/ml Etoposid
ETO 1	Resistenz gegen	Zusatz von 1µg/ml Etoposid

### 3.2.11 Präparation von S10-Lysaten aus Kaninchengewebe und Melanomzellkulturen

Um Gewebeextrakte für Proteinbindungsstudien zu gewinnen wurden die Kaninchengewebe (Leber, Niere, Lunge) in flüssigem Stickstoff zermörsert und nach Aufnahme in zweifachem Volumen Puffer A (10 mM HEPES, pH 7,2, 1,5 mM MgCl, 10 mM LiCl, 0,56 mM DTT) mit einem Messerhomogenisator homogenisiert. Um den Abbau der Proteine zu verhindern, wurde dem Puffer A der Mini Complete Protease Inhibitor von Roche zugesetzt. Durch zweimalige Zentrifugation von 10 min bzw. 30 min bei 4°C bei 10000x g wurden Membranen und Organellen entfernt, so dass schließlich die Proteinfraction S10 gewonnen wurde, die sowohl Polysomen als auch mRNP-Komplexe enthält.

Für Proteinbindungsstudien wurden die Pellets der Melanomzellen in einem zweifachen Volumen Puffer A (mit Mini Complete Protease Inhibitor) lysiert, ebenfalls mit einem Messerhomogenisator homogenisiert und anschließend zweimal 10 min bei 4°C und 10000x g zentrifugiert.

Für die Western Blots wurden die Melanomzell-Pellets in Lyse-Puffer (10 mM TRIS, pH 7,5;

140 mM NaCl, 1mM EDTA, 25% Glycerol, 0,5% SDS, 0,1 mM DTT, Mini Complete Protease Inhibitor) aufgenommen. Nach Homogenisation wurden die Überstände durch einmalige Zentrifugation für 10min 10000x g bei 4°C gewonnen.

Zur Bestimmung der Proteinkonzentrationen wurde der Micro BCA Protein Assay Kit von Pierce mit BSA als Proteinstandard verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Die Regulation der Translation der TCTP-mRNA

#### 4.1.1 Verhalten der TCTP-mRNA1 und 2 und ihrer Deletionsvarianten in der *in vitro* Translation

Die mRNA des translationell kontrollierten Tumorproteins (TCTP) stellt einen interessanten Gegenstand zur Untersuchung von Regulationsmechanismen auf der Stufe der Translation dar. Das Ziel dieser Arbeit war es, die an dieser Kontrolle beteiligten Faktoren genauer zu charakterisieren. Für eine solche translationelle Regulation sind die Abschnitte einer mRNA von Bedeutung, die nicht für die Aminosäuresequenz eines Proteins kodieren und daher als untranslatierte Regionen (UTRs) bezeichnet werden. Spezifische RNA-bindende Proteine binden an *cis*-Elemente in diesen untranslatierten Regionen und beeinflussen dadurch überwiegend die Translationseffizienz und Stabilität der mRNA. Im Vergleich zur Transkriptionskontrolle durch DNA-bindende Transkriptionsfaktoren weist die Translationsregulation einige wesentliche Unterschiede auf. Die RNA-bindenden Proteine sind derzeit noch vergleichsweise weniger gut charakterisiert.

Für die Bindung von Proteinen an Elemente in mRNAs scheinen neben der Konsensussequenz die räumlichen Strukturen der mRNA von besonderer Bedeutung zu sein. Die einsträngige RNA bildet durch Basenpaarungen innerhalb des Moleküls komplexe Sekundärstrukturen aus. An ein ähnliches *cis*-Element können in verschiedenen mRNAs unterschiedliche Proteine binden, so dass sich aus einer mRNA-Sequenz nicht ohne weiteres voraussagen lässt, welche Proteine daran binden, zumal es hierbei auch gewebespezifische Unterschiede gibt. Darüber hinaus kann ein RNA-bindendes Protein an einer mRNA die Translation hemmen, während es an einer anderen durch Stabilisierung der mRNA eine erhöhte Proteinsyntheserate bewirkt. Dadurch kann eine Zelle schnell und reversibel auf veränderte Anforderungen reagieren und gleichzeitig und koordiniert die Syntheserate mehrerer Proteine verändern.

Im Vergleich zum *TPT1*-Gen des Kaninchens (3,8 kb) ist das humane *TPT1*-Gen länger (4,4 kb). Sämtliche Exon-Intron-Übergänge sind konserviert. Der Größenunterschied kommt hauptsächlich durch mehrere Insertionen im Intron 5 des humanen Gens zustande. In den Exons 2 bis 5, die den kodierenden Bereich der mRNA umfassen, findet man eine hochgradige Homologie von 94-98%. Das entspricht einer Sequenzhomologie auf Proteinniveau von 98,3%. In Exon 1 und 6, die die UTRs der mRNA beinhalten, liegt die Homologie bei 85% und ist damit noch vergleichsweise hoch. Das spricht dafür, dass nicht nur die kodierende Sequenz, sondern auch die UTRs der mRNA unter einem evolutionären Erhaltungsdruck stehen. Eine Bedeutung

der UTRs für die Regulation der TCTP-Synthese liegt somit nahe.

Bei der vergleichenden Betrachtung der TCTP-mRNA von Kaninchen und Mensch, in Abb. 4 dargestellt, sind strukturelle Besonderheiten augenfällig, die in diesen und weiteren Spezies eine große Homologie aufweisen.

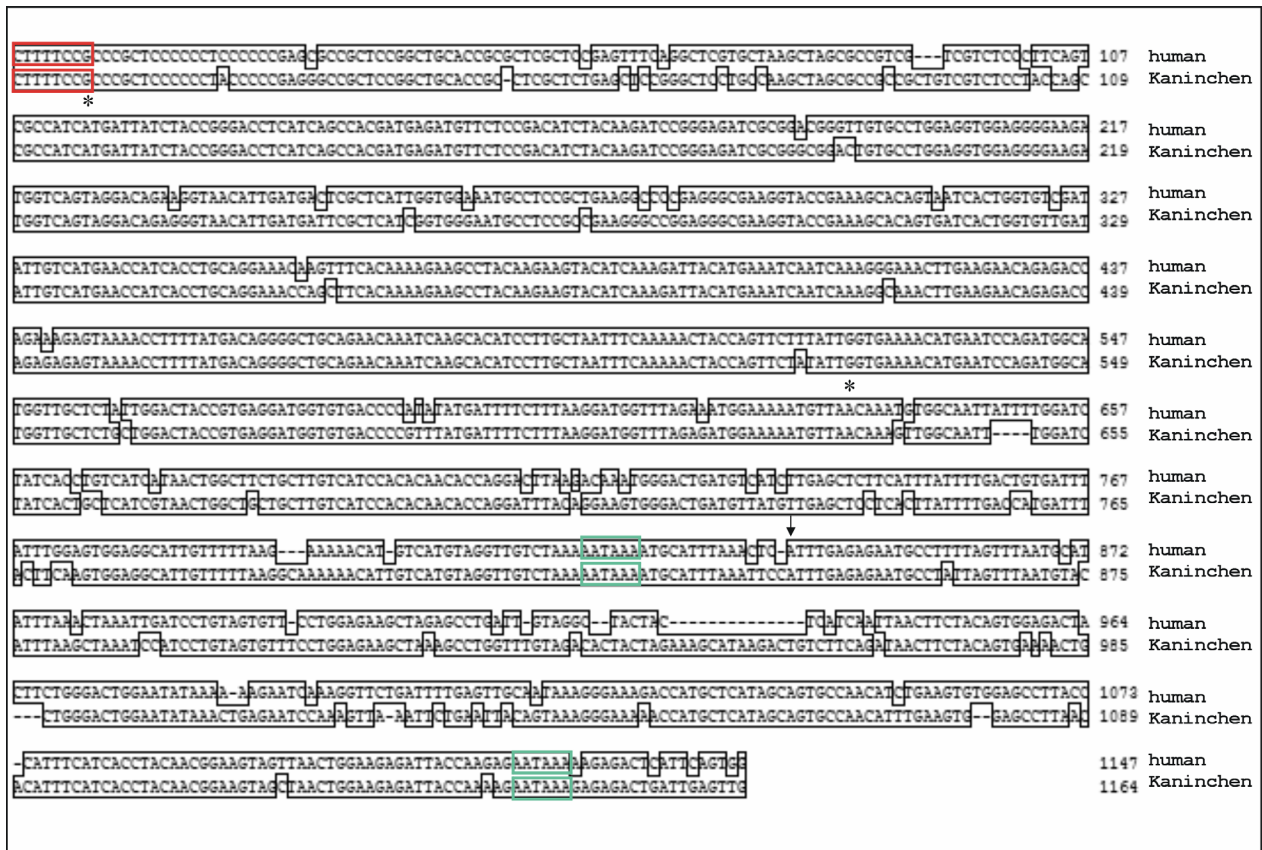


Abb. 4: Sequenz-Alignment der TCTP-mRNA von Mensch (AJ 400717) und Kaninchen (AJ 131951):

Übereinstimmende Nukleotide sind durch Boxen hervorgehoben. In der 5'UTR ist der 5'terminale Oligopyrimidintrakt rot markiert, der identisch ist bei Mensch und Kaninchen. Beginn und Ende des Leserahmens sind durch Sternchen markiert. Der Beginn der 3'UTR 2 ist mit einem Pfeil hervorgehoben. In der 3'UTR sind die beiden Polyadenylierungssignale grün markiert.

Eine Reihe von mRNAs, die für wachstumsregulierte Proteine kodieren, darunter TCTP, weisen an ihrem 5'terminale Ende einen Oligopyrimidintrakt (5'TOP) auf. Die charakteristische Konsensus-Sequenz beginnt mit einem Cytidin, auf das 5 bis 14 weitere Pyrimidine folgen (Avni et al. 1994). Bei einem Wachstumsarrest der Zelle wird über diese 5'TOPs eine Hemmung der Translation vermittelt. Die Sequenz des 5'TOP der TCTP-mRNA (CTTTTCCG) ist konserviert und identisch bei Kaninchen und Mensch. Die entsprechende Struktur bei der Maus ist CTTTTTCC.

Für die Wirkung der 5'TOPs ist nicht nur der Pyrimidintrakt von Bedeutung, sondern auch seine Lokalisation unmittelbar am 5'Ende sowie ein GC-Reichtum in der gesamten 5'UTR. Diese Voraussetzungen sind in der TCTP-mRNA gegeben, und Untersuchungen belegen, dass es im Bereich der 5'UTR zur Ausbildung von komplexen Sekundärstrukturen kommt (Chitpatima *et al.* 1988, Bommer *et al.* 2002).

Aus dem *TPT1*-Gen werden bei der Transkription und bei der nachfolgenden mRNA-Prozessierung durch Verwendung alternativer Polyadenylierungssignale, zwei verschieden lange mRNAs gebildet, die mRNA1 mit einer Länge von 843 Nukleotiden und die mRNA2 mit einer Länge von 1163 Nukleotiden beim Kaninchen. Aus Voruntersuchungen war bekannt, dass die untranslatierten Regionen der TCTP-mRNA die Translationsrate der mRNA beeinflussen (Böhm *et al.* 1991). Zunächst sollte daher untersucht werden, ob sich diese Effekte auch an der TCTP-mRNA des Kaninchens nachweisen lassen. Dabei war insbesondere das Translationsverhalten der mRNA2 von besonderem Interesse, da diese längere mRNA kürzlich erstmals beschrieben wurde (Thiele *et al.* 1998).

Das Translationsverhalten sollte an der *in vitro* transkribierten TCTP-mRNA1 (843 nt) und 2 (1163 nt) des Kaninchens sowie deren Deletionsvarianten, denen die untranslatierten Regionen deletiert wurden, in zellfreien Translationssystemen untersucht werden. Dazu mussten zunächst volllange cDNA-Klone der mRNA1 und der mRNA2 hergestellt werden. Es lagen bereits für beide mRNAs Klone aus cDNA-Banken vor: für die mRNA1 Klon 33/34 und für die mRNA2 Klon 31/1 (Berger, Promotion 1998).

Bedingt durch die Klonierungstechnologie stellt das 5'Ende von Klonen aus cDNA-Banken bekanntermaßen eine Schwachstelle dar. Aus Vergleichen mit prozessierten Pseudogenen ließ sich der Transkriptionsstart und damit das 5'Ende der TCTP-mRNA exakt rekonstruieren, und es zeigte sich, dass den beiden cDNA-Bank-Klonen 5'terminal jeweils 34 Nukleotide fehlten. Für die Herstellung der vollständigen cDNA-Klone standen grundsätzlich zwei Möglichkeiten zur Verfügung: die Klonierung eines PCR-Fragments aus Kaninchen-mRNA mittels Reverser Transkriptase oder die Vervollständigung der cDNA-Bank-Klone mit einem geeigneten durch Restriktionsendonukleasen hergestellten Fragment. Es wurde hierbei der letztere Weg bevorzugt. Die angewandte Klonierungsstrategie ist in Abb. 5 dargestellt.

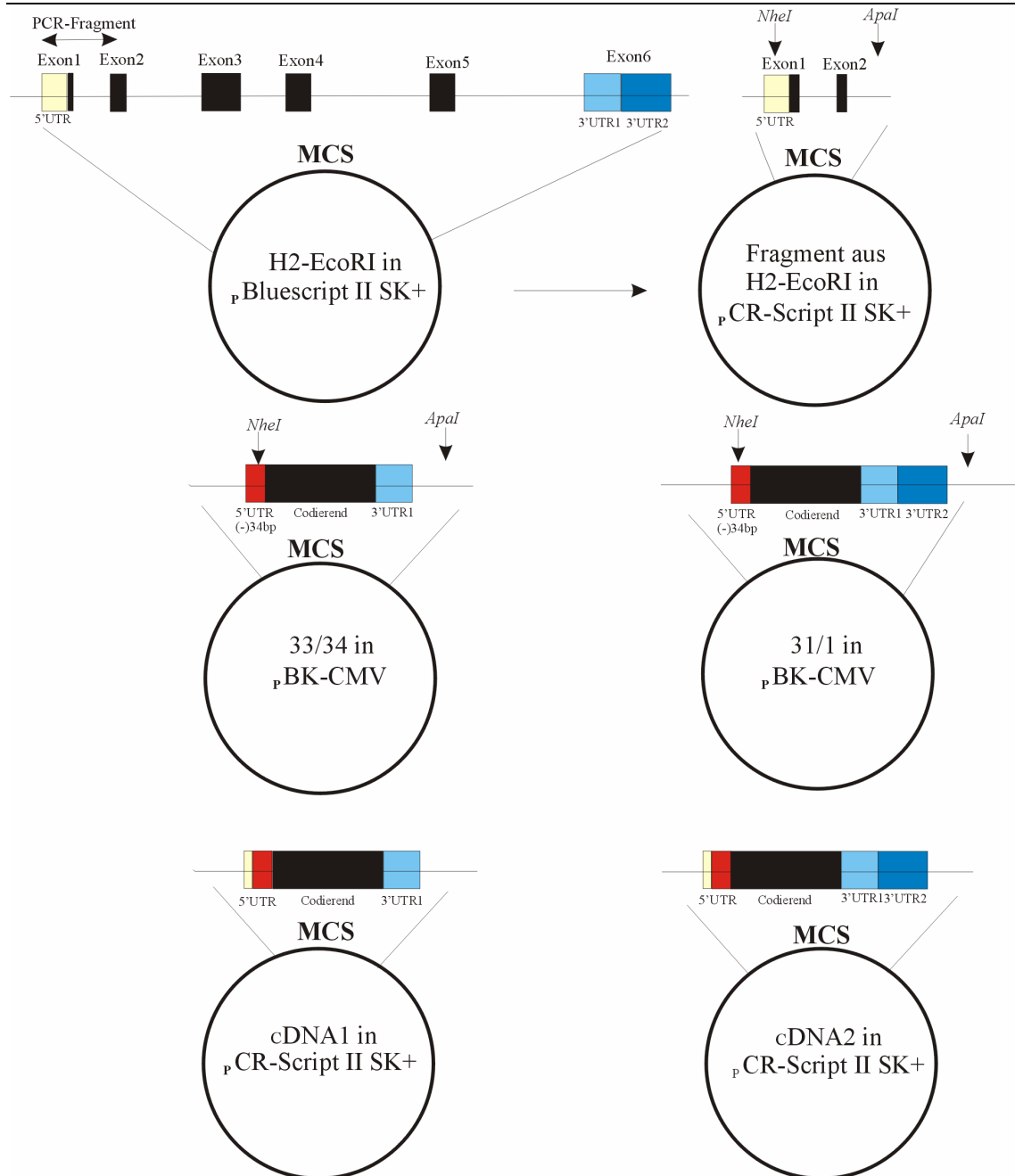


Abb. 5: Aufbau der vollständigen TCTP-cDNA1 und 2:

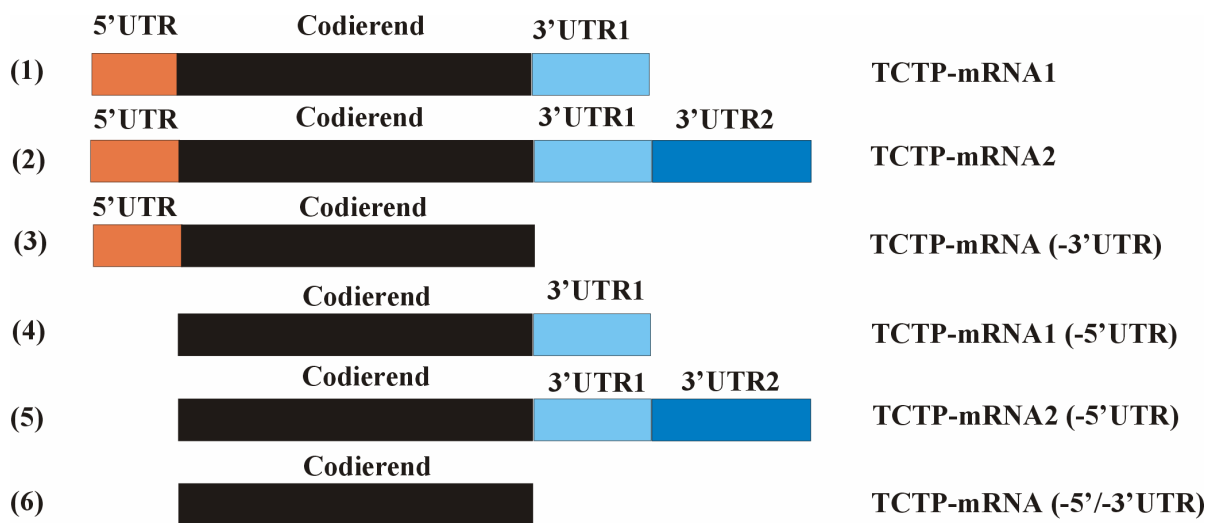
Aus einer cDNA-Bank lagen die Klone 33/34 und 31/1 vor, die jeweils die unvollständige TCTP-cDNA1 bzw. 2 enthielten. Diesen beiden Klonen fehlten am 5'Ende jeweils 34 Nukleotide. Mit den beiden Restriktionsendonukleasen *NheI* und *ApaI* wurde aus diesen Klonen jeweils ein Fragment generiert, das an ein gleichermaßen geschnittenes Fragment aus dem genomischen *TPT1*-Klon (H2-Eco RI) im pCR ScriptII SK+-Vektor ligiert wurde. Somit lagen schließlich die vollständige cDNA1 und 2 im pCR ScriptII SK+-Vektor vor.

Um ein entsprechendes Restriktionsfragment herstellen zu können, wurde zunächst ein PCR-Fragment aus dem Klon hergestellt, der das *TPT1*-Gen enthielt. Dieses PCR-Fragment erstreckte sich vom Transkriptionsstart bis in Exon 2 hinein und wurde in den pCR-Script-Vektor (Stratagene) einkloniert. Dieses Konstrukt wurde dann, ebenso wie die unvollständigen



cDNA-Klone mit den beiden Restriktionsendonukleasen *NheI* und *ApaI* ebenso gespalten. Die Fragmente aus den cDNA-Klonen wurden dann an das 5'terminale Fragment im pCR-Script-Vektor ligiert, so dass schließlich die vollständigen cDNAs der mRNA1 und 2 im pCR-Script-Vektor vorlagen.

Die Deletionsvarianten wurden als PCR-Fragmente aus diesen beiden Klonen in den PCRII-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Zur Vereinheitlichung wurden auch die beiden vollständigen cDNAs per PCR amplifiziert und ebenfalls in den PCRII-TOPO-Vektor kloniert. In Abb. 6 sind die mRNA1 und 2 sowie ihre Deletionsvarianten graphisch dargestellt.



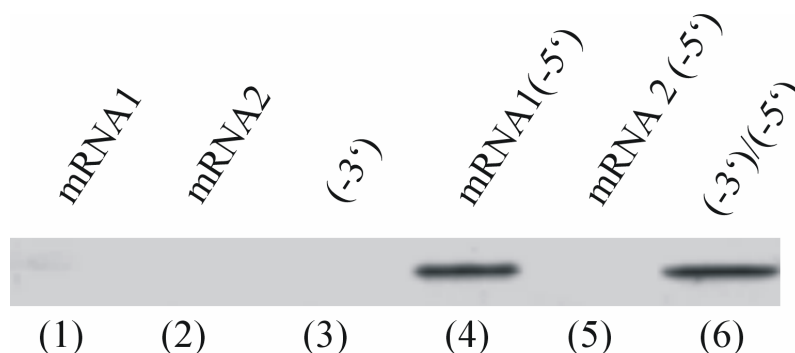
**Abb. 6: TCTP-mRNA1 und 2 und ihre Deletionsvarianten:**

Die vollständige mRNA1 und 2 sowie ihre Deletionsvarianten wurden mittels PCR aus den cDNA-Klonen im pCR ScriptII SK+-Vektor amplifiziert und in den PCRII-TOPO-Vektor kloniert. Für die *in vitro* Translationsversuche wurden Konstrukte verwendet, denen entweder die 3'UTR (3), die 5'UTR (4) und (5) oder sowohl 5'UTR als auch 3'UTR (6) deletiert wurden.

Mit Hilfe von zellfreien Translationssystemen lässt sich *in vitro* das Translationsverhalten von mRNAs untersuchen. Es stehen hierfür kommerziell erhältliche Zelllysate zur Verfügung. Lysate aus Weizenkeim und Kaninchen-Retikulozyten haben sich für derartige Untersuchungen als besonders geeignet erwiesen, weil sie einerseits in großen Mengen herzustellen sind und andererseits eine geringe endogene Nuklease-Aktivität besitzen (Pelham and Jackson 1976, Anderson CW *et al.* 1983). In beiden Systemen werden auch geringe Mengen zugegebener mRNA effektiv translatiert, so dass sich diskrete Veränderungen der Syntheserate eines Proteins nachweisen lassen. Die in den Lysaten vorhandene mRNA wird durch Behandlung mit Nuklease aus Mikrokokken und  $\text{CaCl}_2$  zerstört. Nachfolgend werden die  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Zugabe von EDTA gebunden und die Nuklease somit inaktiviert. Untersuchungen an diesen Systemen haben

zeigt, dass bei dieser Behandlung die für die Proteinsynthese erforderlichen Strukturen erhalten bleiben (Dasso and Jackson 1989, Kozak 1990). Es wird bei derartigen Experimenten zudem vorausgesetzt, dass neben den allgemeinen Translationsfaktoren auch die für die jeweilige mRNA spezifischen Faktoren wirksam sind. Die Darstellung und Auswertung der neusynthetisierten Proteine erfolgt durch den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin und die nachfolgende Autoradiographie.

Die TCTP-mRNA1 und 2 sowie ihre Deletionsvarianten wurden *in vitro* transkribiert, um nachfolgend im Weizenkeim- und im Retikulozytenlysat *in vitro* translatiert zu werden. Für die *in vitro* Translation wurden äquimolare Mengen dieser Transkripte eingesetzt. Auch *in vitro* ist die Regulation der Translation abhängig von den vorhandenen Proteinfaktoren. Durch Vergleich der Translationsmuster in beiden Systemen lassen sich erste Hinweise auf Unterschiede in der Translation der mRNAs in pflanzlichen und tierischen Zellen erarbeiten. Die Abb. 7 zeigt das Verhalten der TCTP-mRNA und ihrer Deletionsvarianten in der *in vitro* Translation im Retikulozytenlysat. Die Reihenfolge der aufgetragenen Ansätze entspricht der Reihenfolge der dargestellten Konstrukte in Abb. 6.



**Abb. 7: *In vitro* Translation der TCTP-mRNA1 und 2 und ihrer Deletionsvarianten im Retikulozytenlysat:**

In Bahn (1) und (2) sind die Proben mit den beiden vollständigen mRNAs aufgetragen. Es folgt in Bahn (3) die Translation der (-3'UTR)-Deletionsvariante. Bahn (4) und (5) zeigen die Translation der (-5'UTR)-Konstrukte und in Bahn (6) das Ergebnis des Konstrukts, das nur noch den kodierenden Bereich darstellt.

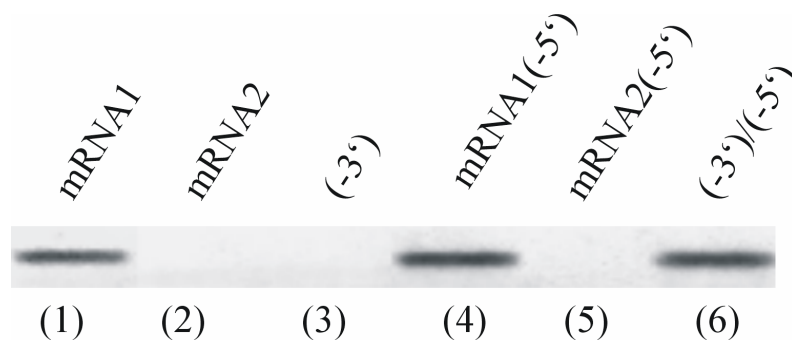
Die vollständige mRNA1 und mRNA2 sind im Retikulozytenlysat *in vitro* nicht translatierbar (Bahn 1 und 2). Das Entfernen der 3'UTR verbessert die Translatierbarkeit der mRNA nicht (Bahn 3). Entfernt man jedoch die 5'UTR der mRNA1, findet eine effektive Translation statt (Bahn 4). Die mRNA2 wird jedoch bei auch fehlender 5'UTR im Gegensatz zur mRNA1 nicht translatiert (Bahn 5). Dies deutet darauf hin, dass die 3'UTR2 im Gegensatz zur 3'UTR1 einen markanten hemmenden Einfluss auf die Translatierbarkeit der mRNA hat. Die Menge an neusynthetisiertem TCTP bei fehlender 5' und 3'UTR (Bahn 6) entspricht der Menge bei

fehlender 5'UTR der mRNA1.

Das Translationsverhalten der mRNA 1 wird somit hauptsächlich durch ihre 5'UTR bestimmt. Die 3'UTR1 allein scheint keinen hemmenden Einfluss auf die Translation zu haben. Ein so genannter Ribosomen-Run-off ist ausgeschlossen, da das Transkript noch einige Nukleotide (73nt bzw. 82nt je nach Verwendung von T7 oder SP6-Polymerase) der Vektorsequenz enthält. Des Weiteren wird das Konstrukt, dem sowohl die 5' als auch die 3'UTR fehlen und das dasselbe 3'Ende aufweist, effektiv translatiert. Die mRNA2 ist bei fehlender 5'UTR weiterhin translationell inaktiv. Dies spricht für einen eigenständigen regulatorischen Einfluss der 3'UTR2 auf die Translationseffektivität.

Die dargestellten Untersuchungen wurden mit *in vitro* Transkripten durchgeführt, die weder eine 5'cap-Struktur noch einen Poly(A)-Schwanz am 3'Ende enthielten. Das Einfügen einer 7-Methyl-Guanosin-Gruppe am 5'-Ende führte bei allen Konstrukten gleichermaßen zu einer leichten Erhöhung der Translationseffektivität. Bei den Konstrukten, denen die 5'UTR deletiert wurde, ermöglichen Nukleotide (42nt bzw. 33nt je nach Verwendung von T7 oder SP6-Polymerase) der Vektorsequenz eine effektive Bindung der Ribosomen. Von diesen Vektorsequenzen ist keine Beeinflussung der Translationsrate bekannt.

In Abb. 8 ist die *in vitro* Translation der Konstrukte im Weizenkeimlysat dargestellt. Die Reihenfolge der aufgetragenen Ansätze entspricht der in Abb.7.



**Abb. 8: *In vitro* Translation der TCTP-mRNA1 und 2 und ihrer Deletionsvarianten im Weizenkeimlysat:**

In Bahn (1) und (2) sind die Proben mit den beiden vollständigen mRNAs aufgetragen. Es folgt in Bahn (3) die Translation der (-3'UTR)-Deletionsvariante. Bahn (4) und (5) zeigen die Translation der (-5'UTR)-Konstrukte und in Bahn (6) das Ergebnis des Konstrukts, das nur noch den kodierenden Bereich darstellt.

Die mRNA1 wird im Weizenkeimlysat gut translatiert (Bahn 1). Eine Translation der mRNA2 findet jedoch auch hier nicht statt (Bahn 2). Das trifft auch für die (-3'UTR)-Variante zu (Bahn 3). Die (-5'UTR)-Variante der mRNA1 (Bahn 4) ist wiederum gut translatierbar, wohingegen

das gleiche Konstrukt der mRNA2 (Bahn 5) nicht translatiert wird. Bei Fehlen aller UTRs findet auch im Weizenkeimsystem eine gute Translation statt (Bahn 6). Die Hemmung der Translation der mRNA1 durch ihre 5'UTR ist im Weizenkeimsystem nicht zu beobachten. Die Proteinfaktoren, die diese Hemmung im Retikulozytenlysat vermitteln, scheinen im Weizenkeim nicht enthalten bzw. nicht aktiv zu sein. Jedoch ist auch hier die Bindung von Faktoren an die 3'UTR2 von Bedeutung, denn die mRNA2 ist hier ebenso wie im Retikulozytenlysat translationell inaktiv. Das trifft auch für die (-5'UTR)-Variante dieser mRNA zu.

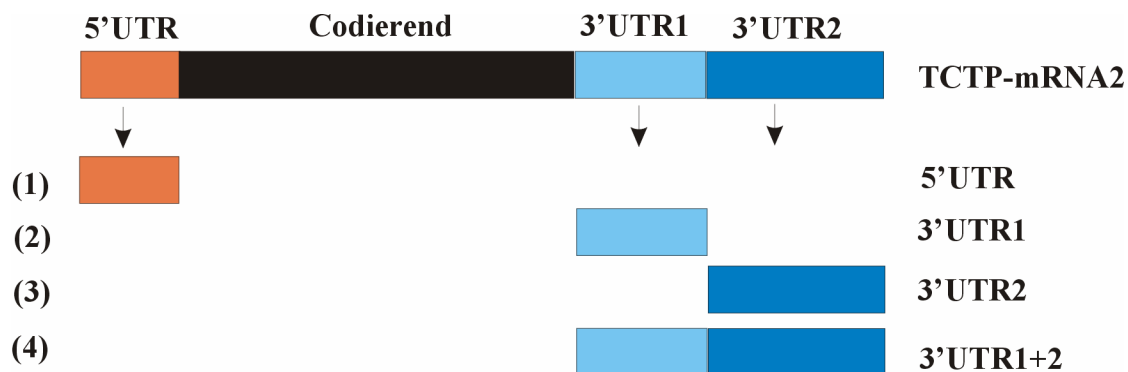
Bei derartigen *in vitro* Translationsexperimenten betrachtet man die Übersetzung einer exogen zugeführten mRNA. Da die verwendeten Zelllysate mit Nuklease behandelt wurden, kann es nicht zu Wechselwirkungen verschiedener mRNAs kommen, die intrazellulär vorkommen und die Translationsrate beeinflussen. Zudem sind diese Untersuchungen auf die beiden verwendeten Zellsysteme limitiert. Um Aussagen über das Verhalten der TCTP-mRNA und ihrer Deletionsvarianten *in vivo* zu treffen, wären an dieser Stelle weiterführende Untersuchungen in kultivierten Zellen möglich. Hierfür eignen sich insbesondere *Xenopus*-Oocyten, in die sich aufgrund ihrer Größe mRNA gut injizieren lässt. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, mit Hilfe von Reporter-Gen-Konstrukten den Einfluss von einzelnen Abschnitten einer mRNA auf die Translation des Reporter-Gens, wie zum Beispiel der Luciferase, zu untersuchen. Dazu werden Kulturzellen (z.B. HeLa-Zellen) mit dem entsprechenden Plasmid transfiziert und die Höhe der Luciferase-Expression durch Bestimmung ihrer enzymatischen Aktivität ermittelt.

Die hauptsächliche thematische Ausrichtung dieser Arbeit lag jedoch in der genaueren Untersuchung und Identifizierung von Proteinen, die über eine Bindung an die untranslatierten Regionen der TCTP-mRNA an der Beeinflussung der Translationseffektivität beteiligt sind. Daher dienen die oben gezeigten Experimente in erster Linie dazu, den Einfluss der einzelnen UTR-Abschnitte auf die Hemmung der Translation der TCTP-mRNA zu bestimmen. Besonders hervorzuheben ist in diesem Zusammenhang die besondere Bedeutung der 3'UTR2 für die Translation der TCTP-mRNA2. Die 3'UTR2 stellt folglich zusammen mit der 5'UTR einen Bereich dar, dem in den im Folgenden dargestellten Untersuchungen ein besonderes Interesse zuteil wurde.

## 4.1.2 Proteinbindungsstudien an den untranslatierten Regionen der TCTP-mRNA

### Electromobility Shift Assays

Nachdem die *in vitro* Translationsexperimente gezeigt hatten, dass für die translationelle Repression der TCTP-mRNA ihre untranslatierten Regionen von Bedeutung sind, sollte geklärt werden, ob sich in diesen Sequenzbereichen die Bindung von Proteinen nachweisen lässt. Hierfür mussten zunächst wieder Plasmidkonstruktionen hergestellt werden, die die jeweiligen untranslatierten Abschnitte der mRNA enthalten. Die untranslatierten Bereiche der Kaninchen-TCTP-mRNA (5'UTR, 3'UTR1, 3'UTR2, 3'UTR1+2) wurden mittels PCR amplifiziert und in den PCRII-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. In Abb. 9 sind die entsprechenden Konstrukte dargestellt.



**Abb. 9: Subklonierung der untranslatierten Regionen der TCTP-mRNA:**

Die untranslatierten Bereiche der TCTP-mRNA des Kaninchens wurden aus der TCTP-mRNA2 per PCR amplifiziert und in den PCRII-TOPO-Vektor kloniert. (1)=5'UTR (116 nt), (2)=3'UTR1 (211 nt), (3)=3'UTR2 (320 nt), (4)=3'UTR1+2 (531 nt)

Die durchgeführten Proteinbindungsstudien wurden angelehnt an das Protokoll von Leibold und Munro (Leibold und Munro 1988) durchgeführt. Für Electromobility Shift Assays (EMSA) wurden die [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierten *in vitro* Transkripte der untranslatierten Regionen mit Proteinextrakten ausgewählter Kaninchengewebe inkubiert. Zur Vermeidung unspezifischer RNA-Protein-Wechselwirkungen wurde den Ansätzen eine RNA aus einem heterologen System (*E. coli*) zugesetzt, die sich durch eine hohe Proteinaffinität (ribosomale RNA) auszeichnet (Ostareck-Lederer et al. 1994). Im Anschluss an die Inkubation wurde zudem Heparin zugesetzt, das unspezifisch gebundene Proteine von der RNA freisetzt. Die RNA-Proteinkomplexe wurden anschließend in einer nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt (Konarska und Sharp 1986). Die Bildung eines Komplexes aus RNA und Protein ist im Autoradiogramm sichtbar durch eine Verzögerung der

Laufgeschwindigkeit dieses Komplexes (Shift) im Vergleich zur nicht an Protein gebundenen freien RNA.

Das TCTP war in allen bisher untersuchten Geweben nachweisbar. Es bestehen jedoch Unterschiede in der Höhe der Expression. Besonders interessant erscheint hierbei wiederum der Aspekt, dass in allen Geweben beide verschieden lange mRNAs vorliegen. Ihr Verhältnis zueinander variiert jedoch von Gewebe zu Gewebe. Somit sollte geprüft werden, ob sich derartige Differenzen der Expression auch in der Bindung unterschiedlicher Proteinfaktoren an die beiden Abschnitte der 3'UTR widerspiegeln. Für die Proteinbindungsstudien wurden daher Extrakte aus Kaninchen-Leber, -Lunge, -Niere und -Retikulozyten verwendet. Nach der Homogenisation wurden Zellorganellen und Membranbruchstücke bei 10 000x g abzentrifugiert. Für die Proteinbindungsstudien wurden die cytosolischen Überstände (S10) verwendet, in denen sowohl Polysomen als auch mRNP-Komplexe enthalten sind. Die Abb. 10 zeigt das Autoradiogramm eines solchen Experiments.

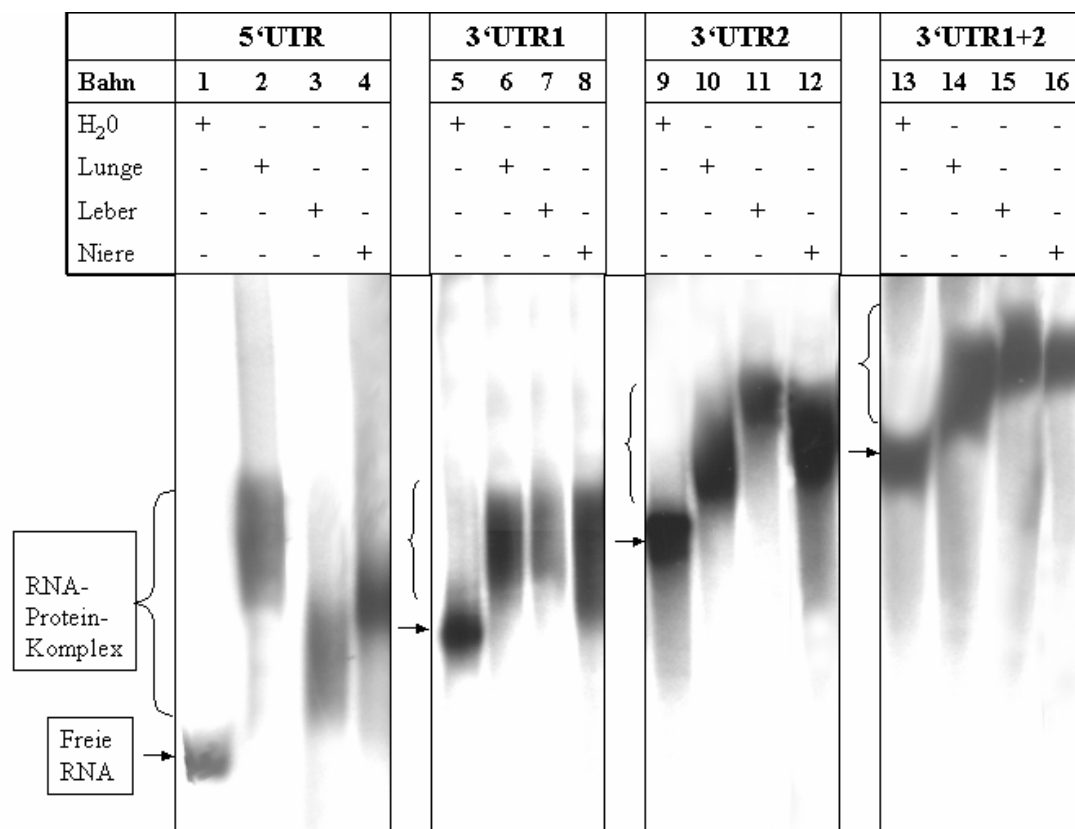


Abb. 10: EMSA der UTRs der TCTP-mRNA:

[ $\alpha^{32}$ P]-markierte *in vitro* Transkripte der vier UTRs der TCTP-mRNA wurden mit S10-Lysaten verschiedener Kaninchen-Gewebe inkubiert. Die Bildung von RNA-Protein-Komplexen ist sichtbar durch die verzögerte Laufgeschwindigkeit der Komplexe im Vergleich zur freien ungebundenen RNA (Bahn 1, 5, 9, 13). 1-4=5'UTR,

Bahn 5-8=3'UTR1, Bahn 9-12=3'UTR2, Bahn 13-16=3'UTR1+2, Inkubation mit Lungenextrakt (Bahn 2, 6, 10, 14), Leberextrakt (Bahn 3, 7, 11, 15), Nierenextrakt (Bahn 4, 8, 12, 16)

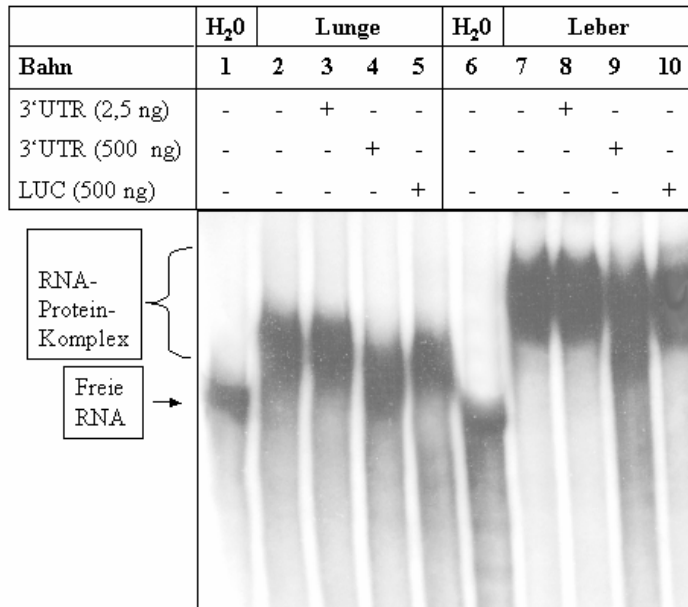
Im Vergleich zum Transkript der 5'UTR ohne Zugabe eines Proteinextrakts (Bahn 1) zeigt sich bei Zugabe eines Extrakts aus Kaninchenlunge ein deutlicher Shift (Bahn 2). Auch bei Zugabe eines Leberextrakts (Bahn 3) bzw. eines Nierenextrakts (Bahn 4) zeigt sich eine Komplexbildung. Die Unterschiede in der Gestalt der RNA-Protein-Komplexe sind ein starker Hinweis auf eine verschiedenartige Zusammensetzung der Komplexe in den einzelnen Geweben. Das kann zum einem durch unterschiedliche Proteine, die mit der mRNA wechselwirken, bedingt sein. Zum anderen haben auch die molaren Verhältnisse von RNA zu Protein einen Einfluss auf die Gestalt der Shift-Komplexe, so dass auch Differenzen in der Höhe der Expression der RNA-bindenden Proteine die unterschiedliche Konfiguration der Komplexe hervorrufen können.

Die Komplexe der 3'UTR1 mit Proteinen aus Lunge (Bahn 6), Leber (Bahn 7) und Niere (Bahn 8) im Vergleich zur freien Probe (Bahn 4) stellen sich in etwa gleich dar, was auf eine ähnliche Zusammensetzung in diesen Geweben hindeutet. Die Inkubation der 3'UTR2 mit einem Leberextrakt (Bahn 11) führt zu einer stärkeren Verzögerung der Laufgeschwindigkeit als die Inkubation mit einem Lungenextrakt (Bahn 10), verglichen mit der ungebundenen RNA (Bahn 9). Der Komplex aus Nierenextrakt und 3'UTR2 (Bahn 12) entspricht in seiner Ausprägung dem in Bahn 10 (Inkubation mit Lungenextrakt). Die RNA-Protein-Komplexe aus der gesamten 3'UTR und den Proteinen aus Lunge (Bahn 14), Leber (Bahn 15) und Niere (Bahn 16) grenzen sich deutlich zum ungebundenen Transkript in Bahn 13 ab. Die Abgrenzung der einzelnen Komplexe zueinander ist jedoch aufgrund der Länge des Transkriptes und der damit verbundenen kurzen Laufstrecke in der Elektrophorese schwierig. Somit zeigt sich, dass an alle untranslatierten Regionen der TCTP-mRNA ein oder mehrere Proteine binden. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Zusammensetzung der Shift-Komplexe sich zwischen den einzelnen Geweben stark unterscheidet.

Um die Sequenzspezifität der Proteinbindung in den Shift-Komplexen nachzuweisen, wurden Konkurrenzexperimente durchgeführt, bei denen dem EMSA-Ansatz verschiedene Mengen nicht-markierten Transkripts zugegeben werden. An das im Überschuss vorhandene nicht-markierte Transkript binden ebenfalls die spezifischen Proteinfaktoren, so dass für die Bindung an die radioaktiv markierte RNA nicht mehr genügend Protein zur Verfügung steht. Im Autoradiogramm zeigt sich dann eine Veränderung der Shift-Komplexe.

Die Konkurrenzexperimente in Abb. 11 wurden beispielhaft für die 3'UTR der TCTP-mRNA

mit Extrakten aus Kaninchen-Lunge und Leber durchgeführt. In den Verdrängungsversuchen wurde eine dem markierten Transkript äquimolare Menge (2,5ng) und in einem weiteren Ansatz ein Überschuss (500ng) des nicht-markierten Transkripts der 3'UTR beigemischt. Eine weitere Probe enthielt eine heterologe Kompetitor-RNA der Glühwürmchen-Luciferase im Überschuss.



**Abb. 11: EMSA-Kompetitions-Experiment an der 3'UTR:**

Ein radioaktiv markiertes Transkript der 3'UTR wurde mit Extrakten aus Lunge (Bahn 1-5) und Leber (Bahn 6-10) sowie verschiedenen unmarkierten Transkripten als Kompetitor inkubiert. Bahn 1 und 6=freie Probe, Bahn 2 und 7=RNA-Protein-Komplexbildung ohne Kompetitor, Bahn 3 und 8=äquimolare Menge unmarkiertes 3'UTR-Transkript als Kompetitor, Bahn 4 und 9=200-fache Menge an unmarkiertem 3'UTR-Transkript als Kompetitor, Bahn 5 und 10=200fache Menge Luciferase-Transkript als Kompetitor

In der Abbildung zeigen Bahn 1 und 6 die freie Probe der 3'UTR ohne Zugabe von Proteinextrakt und Kompetitor-RNA. In Bahn 2 und 7 sind jeweils deutliche Shift-Komplexe nach Zugabe von Proteinen aus Lunge und Leber zu sehen. Diese Bahnen entsprechen den Bahnen 14 und 15 der Abb. 10. In Abb. 11 wurden die Elektrophorese-Bedingungen für die verhältnismäßig lange 3'UTR (531 nt) optimiert, so dass sich hier deutlichere Unterschiede der Shift-Komplexe mit Proteinen aus Lunge und Leber darstellen.

Die Zugabe einer äquimolaren Menge des nicht-markierten Transkripts führt nicht zu einer Veränderung der Shift-Komplexe (Bahn 3 und 8). Gibt man jedoch nicht-markierte RNA im Überschuss hinzu, verändert sich der Komplex und es kommt zu einer unvollständigen Unterdrückung der Komplexbildung, sichtbar durch eine Veränderung der Shift-Komplexe (Bahn 4 und 9). Nach Zugabe derselben Menge der heterologen Kompetitor-RNA ändert sich die



Konfiguration der Shift-Komplexe nicht in dieser Weise. Somit lässt sich aus diesen Versuchen ableiten, dass die Bindung von Proteinfaktoren aus Kaninchen-Lunge und Leber an die 3'UTR der TCTP-mRNA sequenzspezifisch ist.

Die Aussagekraft des Experiments bezüglich eines Vergleichs der Komplexe aus verschiedenen UTRs und ihren gebundenen Proteinen ist auf Grund der Größenunterschiede der UTRs und den daraus folgenden Laufeigenschaften eingeschränkt. Um hier weitere Aussagen treffen zu können, ist die Darstellung der bindenden Proteine in UV-Crosslinking-Experimenten notwendig.

Vergleicht man Electromobility Shift Assays von radioaktiv markierten DNA- und RNA-Abschnitten, ist augenfällig, dass die Banden aus RNA-Proteinkomplexen sich unschärfer begrenzt und insgesamt diffuser darstellen. Das ist zum Teil durch stärkere Abbauvorgänge durch RNasen zu erklären. Dieser Effekt lässt sich jedoch durch den Einsatz von RNase-Inhibitoren minimieren. Die verwendeten UTR-Transkripte der TCTP-mRNA hatten eine erhebliche Länge (116-531nt), so dass Sekundärstrukturen innerhalb der RNA-Moleküle einen besonderen Einfluss auf die Gestalt der Shift-Komplexe hatten. Durch einen Denaturierungsschritt vor der Inkubation mit Proteinextrakt ließ sich dieser Einfluss verringern. Jedoch war die erhaltene native Struktur durchaus beabsichtigt, da die Sekundärstruktur einer RNA wichtig für die Erkennung durch RNA-bindende Proteine ist. Größe und Gestalt der RNA-Protein-Komplexe lassen vermuten, dass in den Komplexen jeweils mehrere Proteine enthalten sind. Dies lässt sich ebenfalls durch UV-Crosslinking-Experimente klären. So genannte Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern zur Identifizierung von Proteinfaktoren sind für RNA-bindende Proteine derzeit noch schwer zu konzipieren, da die Vorhersage von RNA-Protein-Wechselwirkungen aus Sequenzmotiven nur selten möglich ist.

### **UV-Crosslinking-Experimente**

In UV-Crosslinking-Experimenten (Leibold und Munro 1988, Ostareck-Lederer *et al.* 1994) wurden [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierte *in vitro* Transkripte der untranslatierten Regionen analog zu den Electromobility Shift Assays mit S10-Extrakten aus Kaninchengewebe inkubiert. Während der Heparin-Inkubation wurden die Proben mit einer UV-Lampe ( $\lambda=254\text{nm}$ ) bestrahlt, was zu einer kovalenten Vernetzung der RNA-Protein-Bindungen führt. Diese Bindungen schützen den bindenden Bereich der RNA nach dem UV-Crosslinking vor dem Abbau durch RNase A und T1. Die durch die gebundene RNA markierten Proteine werden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt. Proteine, die

unspezifisch an die RNA binden, führen nicht in dem Maße zu einer stabilisierenden Wechselwirkung, und der betroffene RNA-Abschnitt ist somit nach dem UV-Crosslinking nicht vor einem RNase-Abbau geschützt. Mit dieser Art von Versuchen kann man die RNA-bindenden Proteine der Shift-Komplexe bezüglich Anzahl und Molekulargewicht charakterisieren. Diese Experimente lassen daher auch Aussagen über die bindenden Proteine an die verschiedenen Bereiche der TCTP-mRNA sowie über gewebespezifische Unterschiede zu.

In Abb. 12 sind die Ergebnisse eines UV-Crosslinking-Experiments an die vier untranslatierten Abschnitte der TCTP-mRNA mit Extrakten aus verschiedenen Kaninchengeweben dargestellt. Die Proteinmuster der verschiedenen UTRs und der eingesetzten Extrakte zeigen deutliche Unterschiede. Wie schon nach den Electromobility Shift Assays vermutet, binden jeweils mehrere Proteine an die UTRs.

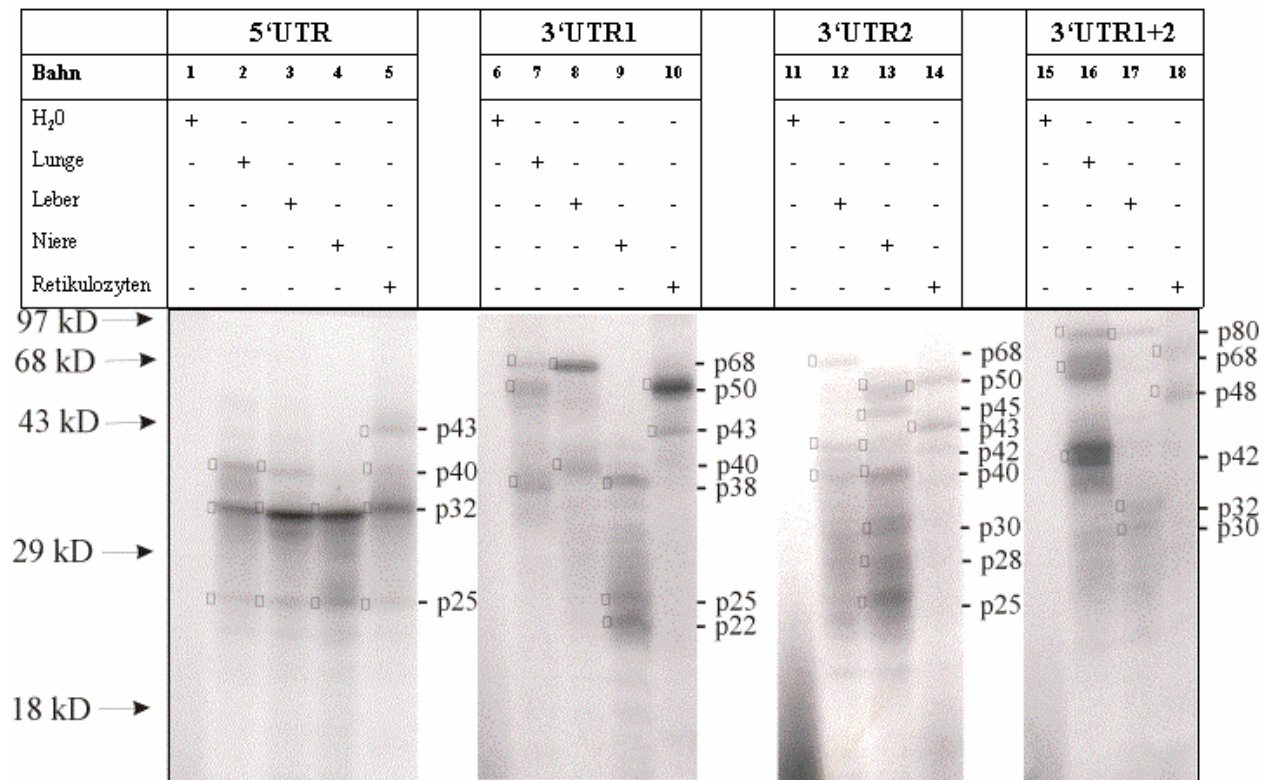


Abb. 12: UV-Crosslinking Experiment der vier UTRs der TCTP-mRNA:

[ $\alpha^{32}$ P]-markierte Transkripte der 5'UTR (Bahn 1 bis 5), 3'UTR1 (Bahn 6-10), 3'UTR2 (Bahn 11-14) und 3'UTR1+2 (Bahn 15-18) wurden mit S10-Extrakten aus Kaninchengeweben inkubiert: Lunge Bahn 2, 7, 16; Leber Bahn 3, 8, 12, 17; Niere Bahn 4, 9, 13; Retikulozyten Bahn 5, 10, 14, 18. Ohne Zusatz eines Proteinextraktes (Bahn 1, 6, 11, 15) sind keine Proteine darstellbar. Das Molekulargewicht der kreuzvernetzten Proteine wurde durch Vergleich mit einem Proteinmarker abgeschätzt, und die Proteine wurden entsprechend ihrer Größe als p22 bis p80 bezeichnet.

Ohne Zugabe eines Proteinextraktes zum [ $\alpha^{32}\text{P}$ ]-markierten *in vitro* Transkript der 5'UTR (Bahn 1), der 3'UTR1 (Bahn 6), der 3'UTR2 (Bahn 11) und der 3'UTR1+2 (Bahn 15) kommt es nicht zum Auftreten von Banden im Autoradiogramm. Nach Inkubation des *in vitro* Transkripts der 5'UTR mit Proteinextrakten aus Kaninchen-Lunge (Bahn 2), Leber (Bahn 3), Niere (Bahn 4) und Retikulozyten (Bahn 5) sind in allen vier Bahnen drei Proteine von 25 kD, 32 kD und 40 kD (p25-p40) nachweisbar. Das Protein von 40 kD ist nach Zugabe des Nierenextraktes (Bahn 4) nur sehr schwach nachweisbar. Das deutet auf eine geringere Konzentration oder Aktivität dieses Proteins in der Niere hin. Im Retikulozyten-Lysat (Bahn 5) wird noch ein weiteres Protein von 43 kD (p43) gebunden.

An die 3'UTR1 binden im Lungenextrakt (Bahn 7) drei Proteine p38, p50 und p68. Nach Inkubation dieser UTR mit einem Leberextrakt (Bahn 8) binden Proteine mit einem Molekulargewicht von 40 kD und 68 kD (p40 und p68). Nach Zugabe des Nierenextrakts zu diesem Bereich der 3'UTR (Bahn 9) sind drei Proteine von 22 kDa, 25 kD und 38 kD (p22-p38) nachweisbar. In Bahn 10 stellen sich nach Zugabe von Retikulozytenlysate zwei Proteine p43 und p50 dar.

Die Inkubation der 3'UTR2 mit einem Extrakt aus Kaninchen-Leber (Bahn 12) zeigen sich drei Proteinbanden (p40, p42 und p68), mit einem Extrakt aus Lunge zeigen sich 6 Banden (p25, p28, p30, p40, p42, p50) und mit einem Extrakt aus Retikulozyten sind zwei Proteine (p43 und p50) nachweisbar.

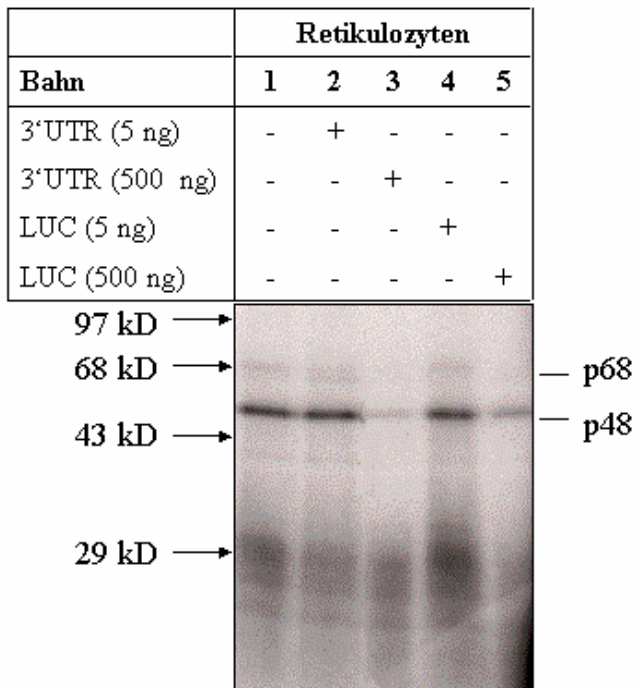
Inkubiert man die Transkripte der kompletten 3'UTR mit Lysaten aus Lunge (Bahn 16) und Retikulozyten (Bahn 18), ähneln die Bandenmuster denen nach Inkubation der 3'UTR1 (Bahn 6, 10 und 14), jedoch stellen sich die an die komplette 3'UTR bindenden Proteine mit einem höheren Molekulargewicht dar (Lunge: p42, p68 und p80, Retikulozyten: p48 und p68). Aus Leberextrakt binden an dieses Transkript drei Proteine (p30, p32 und p80).

Der Nachweis der Sequenzspezifität und Stabilität der Proteinbindung erfolgte in Konkurrenzexperimenten analog zu den Electromobility Shift Assays. In Abb. 13 ist ein solches Experiment dargestellt.

Es wurde das radioaktiv markierte Transkript der 3'UTR und Retikulozytenlysate verwendet. Die Bahn 1 der Abb. 13 entspricht somit Bahn 18 in der Abb. 12. Aufgrund der für diese Banden optimierten Belichtungszeit sind die Banden im Konkurrenz-Experiment deutlicher zu erkennen.

Es stellen sich wiederum die beiden Proteine p48 und p68 dar, deren Auftreten sich durch

Zugabe des unmarkierten Transkripts der 3'UTR im Überschuss weitgehend unterdrücken lässt (Bahn 3). Eine äquimolare Menge des unmarkierten Transkripts (Bahn 2) sowie der heterologen Kompetitor-RNA (Luciferase-mRNA) rufen diesen Effekt nicht hervor (Bahn 4). Bei Zugabe der Luciferase-mRNA im Überschuss (Bahn 5) lässt sich das Auftreten der Banden nicht in dem Maße unterdrücken. Eine Sequenzspezifität ist somit wahrscheinlich.



**Abb. 13: UV-Crosslinking-Kompetitions-Experiment an der 3'UTR:**

Ein radioaktiv markiertes Transkript der 3'UTR wurde mit Retikulozytenlysat und verschiedenen unmarkierten Transkripten als Kompetitor inkubiert. Bahn 1=RNA-Protein-Komplexbildung ohne Kompetitor, Bahn 2=äquimolare Menge unmarkiertes 3'UTR-Transkript als Kompetitor, Bahn 3=100-fache Menge an unmarkiertem 3'UTR-Transkript als Kompetitor, Bahn 4=äquimolare Menge unmarkiertes Luciferase-Transkript als Kompetitor, Bahn 5=100fache Menge Luciferase-Transkript als Kompetitor

Diese UV-Crosslinking Experimente erlauben lediglich Aussagen über die Anzahl der RNA-bindenden Proteine und über ihr ungefähres Molekulargewicht. Eine Identifizierung der bindenden Faktoren ist mit diesem Verfahren nicht möglich. Die Proteine sind durch die gebundene radioaktiv markierte RNA dargestellt, die nur in geringem Maße (~2kD) zum Molekulargewicht beiträgt. Es ist auch nicht auszuschließen, dass es sich bei Proteinen, die sich in diesen Experimenten mit demselben Molekulargewicht darstellen, um unterschiedliche Proteine handelt. Auf der anderen Seite ist es auch möglich, dass es sich bei Banden, die sich unterschiedlich darstellen, um ein Protein handelt, das durch posttranslationelle Modifizierung,

wie zum Beispiel eine Phosphorylierung, verändert wurde. Genauere Aussagen hierüber sind letztlich nur über eine Proteinidentifizierung möglich.

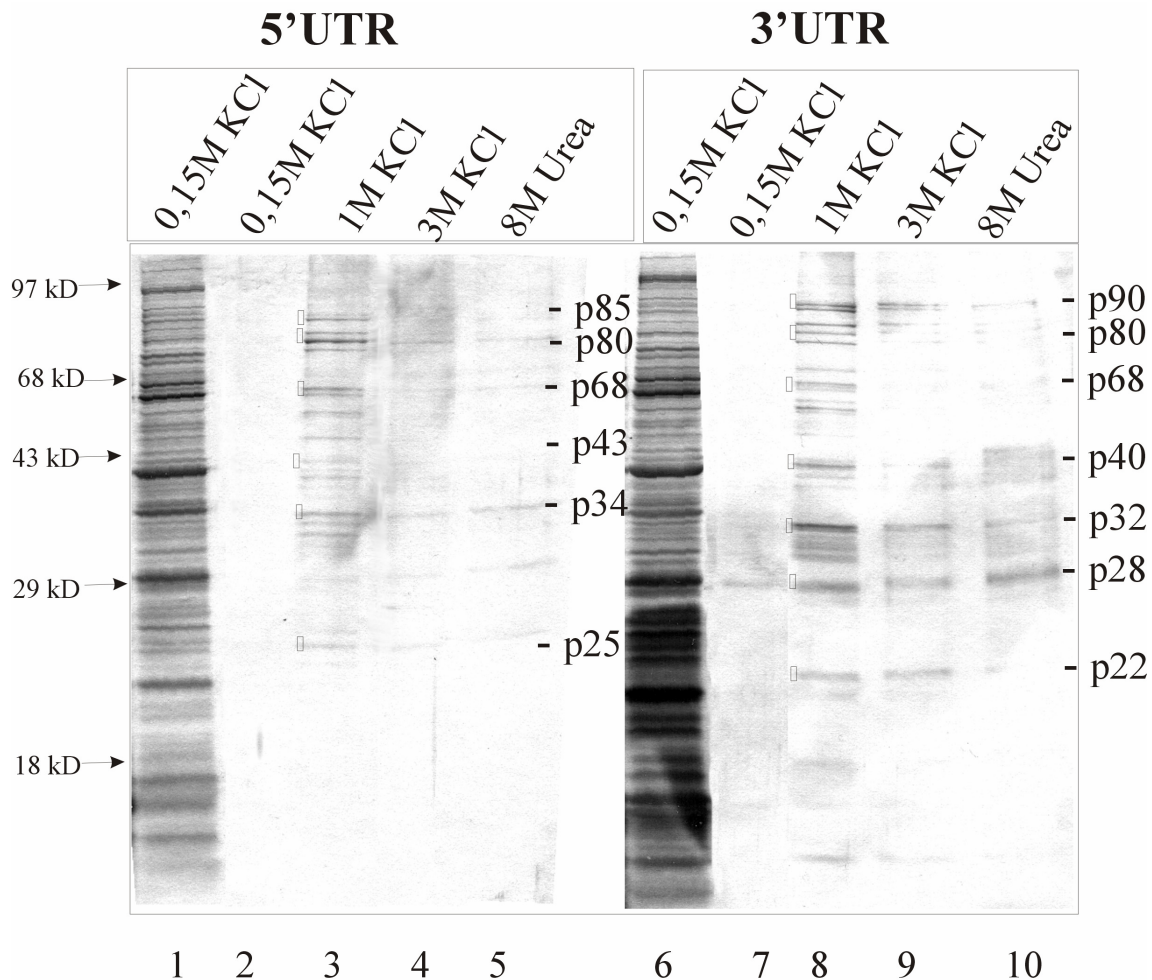
### 4.1.3 Anreicherung von UTR-bindenden Proteinen in der RNA-Affinitätschromatographie

Um die an die TCTP-mRNA bindenden Proteine identifizieren zu können, wurde für ihre Anreicherung und Isolierung ein affinitätschromatographischer Ansatz gewählt (Rouault *et al.* 1989, Ostareck *et al.* 1997). Dazu wurden Biotin-markierte Transkripte der 5'UTR und 3'UTR an Streptavidin-Agarose gebunden und anschließend mit Kaninchen-Retikulozytenlysat inkubiert. Danach wurden die Streptavidin-Agarose-Partikel mehrfach mit einem Puffer niedriger Salzkonzentration (0,15 M KCl) gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Die Elution der spezifisch an den jeweiligen UTR-Abschnitt gebundenen Proteine erfolgte schließlich mit Hochsalzpuffern (1 M KCl, 3 M KCl, 8 M Urea).

Das für die RNA-Affinitätschromatographie verwendete Kaninchen-Retikulozytenlysat wurde im Gegensatz zu dem Lysat, das bei den *in vitro* Translationsexperimenten eingesetzt wurde, nicht mit Mikrokokken-Nuklease vorbehandelt. Die Proteinfaktoren, die in den *in vitro* Translationsexperimenten eine Hemmung hervorgerufen haben, sind in dem für die RNA-Affinitätschromatographie verwendeten Lysat somit vorhanden und sollten sich mit dem affinitätschromatographischen Verfahren anreichern lassen. Wechselwirkungen zwischen verschiedenen mRNAs und Konkurrenz um bindende Faktoren, wie sie in der Zelle auftreten, sind wegen der endogen im Retikulozytenlysat vorhandenen mRNAs durchaus möglich.

Da die *in vitro* Translationsexperimente einen ausgeprägten hemmenden Einfluss der 5'UTR und der langen 3'UTR auf die Translation der TCTP-mRNA gezeigt hatten, wurden in der RNA-Affinitätschromatographie Biotin-markierte Transkripte dieser UTR-Bereiche eingesetzt (Konstrukt 1 und 4 in Abb. 9). In der Abb. 14 ist die Analyse der gewonnenen Proteinfractionen in einem mit Silber gefärbten SDS-Polyacrylamid-Gel dargestellt.

Da es sich bei der Silberfärbung um eine sehr sensitive Färbemethode handelt, sind in der Abbildung sehr viele Proteinbanden zu sehen. Bei der Analyse wurden daher die deutlichsten Kandidaten ausgewählt. Nach dem letzten Waschschrift (Bahn 2 und 5) sind im Eluat nur noch Spuren von Proteinen nachweisbar. Unspezifisch gebundene Proteine wurden somit entfernt. Im Vergleich zum Proteinmuster des Retikulozytenlysates in Bahn 1 und 6 zeigen sich nach der Elution mit 1 M KCl einige neue und deutliche Banden, die sich auch in den Eluaten mit 3 M KCl und 8 M Urea nachweisen lassen. Keine der Banden des Retikulozytenlysats (Bahn 1 und 6) sind in den eluierten Proteinfractionen (Bahn 3-5 und Bahn 8-10) wieder zu finden. Das spricht für eine Elution spezifisch an die UTRs gebundener Proteine.



**Abb. 14: Anreicherung der TCTP-mRNA bindenden Proteine durch RNA-Affinitätschromatographie:**

Biotin-markierte *in vitro* Transkripte der 5'UTR (Bahn 1-5) und 3'UTR (Bahn 6-10) wurden an Streptavidin-Agarose gebunden und mit Retikulozytenlysat inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 0,15 M KCl-Puffer, Bahn 1 und 6=Waschschritt 1, Bahn 2 und 7=Waschschritt 5, wurden die gebundenen Proteine mit 1 M KCl (Bahn 3 und 8), 3 M KCl (Bahn 4 und 9) und 8 M Urea eluiert. Die Proteinfractionen wurden in einem 15%igen SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mit Silber gefärbt. Die spezifisch gebundenen Proteine sind hervorgehoben und entsprechend ihrem Molekulargewicht als p22-p90 bezeichnet.

In der Silberfärbung lassen sich eine Reihe von Proteinen anfärben, die an die 5'UTR binden. Die sechs markantesten Banden wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht als p25, p34, p43, p68, p80 und p85 bezeichnet. In den Eluaten, die nach Bindung an die 3'UTR gewonnen wurden, stellen sich sieben wesentliche Proteine dar: p22, p28, p32, p40, p68, p80 und p90. Dabei stellen sich einige dieser Banden als Doppelbanden dar. Es kann sich dabei um verschiedene Proteine mit ähnlichem Molekulargewicht oder um posttranslational modifizierte Formen eines Proteins handeln.

Ein direkter Vergleich mit den UV-Crosslinking-Experimenten ist aus verschiedenen Gründen

nur bedingt möglich. Ein wesentlicher Unterschied besteht in den molaren Verhältnissen von Transkript zu Proteinen. Während beim UV-Crosslinking nur sehr geringe Mengen Transkript (~15ng) eingesetzt werden, verwendet man in der RNA-Affinitätschromatographie einen Überschuss an Transkript (~3-5µg). Das Bindungsgleichgewicht verschiebt sich zu Gunsten des RNA-Protein-Komplexes, so dass sich mehr Protein für eine spätere Identifizierung isolieren lässt.

Im Gegensatz zu den UV-Crosslinking-Experimenten kommt es bei der RNA-Affinitätschromatographie nicht zu einer kovalenten Vernetzung von RNA und Proteinen. Es kann bei der RNA-Affinitätschromatographie auch zur Anreicherung von Proteinen kommen, die nicht unmittelbar an die RNA binden, sondern vielmehr mit den direkt bindenden Proteinen in Wechselwirkung treten. Das Auftreten von zusätzlichen Banden lässt sich auf diese Weise erklären. Beim UV-Crosslinking werden die Laufeigenschaften der Proteine zudem, wenn auch nur zu einem geringen Anteil (~2kD), durch die kovalent gebundenen radioaktiv markierten Nukleotide beeinflusst. Die Intensität der Banden ist beim UV-Crosslinking neben der Proteinmenge auch abhängig davon, wie viel Radioaktivität gebunden wird, d.h. wie groß das Motiv in der mRNA ist, an dem die Bindung stattgefunden hat. Eine zusätzliche Schwierigkeit der RNA-Affinitätschromatographie besteht weiterhin darin, dass durch den Einsatz der Streptavidin-Agarose-Partikel die Wahrscheinlichkeit unspezifisch gebundener Proteine zunimmt. Die Abgrenzung der spezifisch gebundenen Proteine ist jedoch durch Vergleich der Eluate verschiedener UTR-Abschnitte möglich.

Unter Berücksichtigung dieser Überlegungen ist anzunehmen, dass es sich bei den in der RNA-Affinitätschromatographie isolierten Proteinen p25, p34 und p43 um die beim UV-Crosslinking an die 5'UTR bindenden Proteine p25, p32 und p43 handelt. Ebenso trifft dies für das Protein p68 zu, das an die 3'UTR bindet.

Da die *in vitro* Translationsexperimente erstmals einen markanten Einfluss der 3'UTR auf die Translation der TCTP-mRNA gezeigt hatten, wurden die Coomassie-gefärbten Banden der 3'UTR bindenden Proteine p68 und p90 aus dem Gel ausgeschnitten. Um Aufschluss über ihre Identität zu erhalten, wurden ihre Fragmente nach tryptischen Verdau mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie analysiert. Allerdings ließen sich die Spektren der tryptischen Fragmente der angereicherten Proteine nach Suchen in Datenbanken keiner bekannten Proteinsequenz zuordnen. Leider sind die vorhandenen Daten zu Kaninchen-Proteinen nicht so umfangreich wie beispielsweise für humane Proteine. Es erwies sich daher als sinnvoll, zur Identifizierung der bindenden Proteine diese Ergebnisse durch Experimente mit humanen Zellextrakten zu ergänzen.

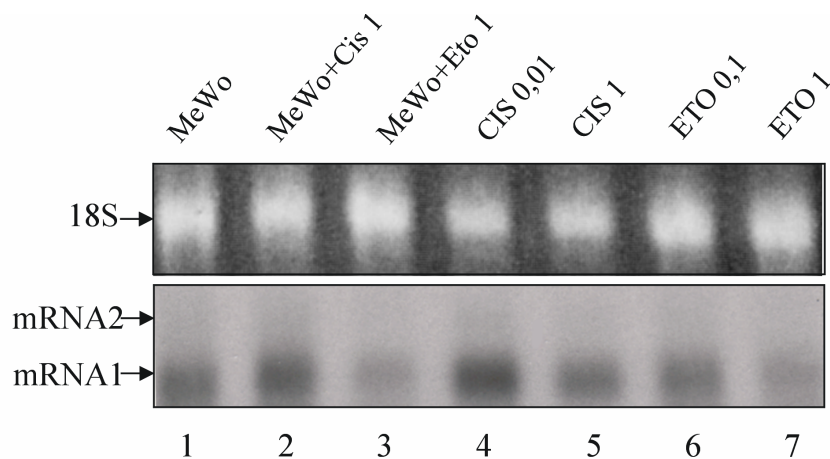


## 4.2 Translationelle Regulation der TCTP-mRNA in Melanomzellen

### 4.2.1 Nachweis der veränderten TCTP-Expression in chemosensiblen und chemoresistenten Melanomzellen

Die Untersuchungen von Sinha *et al.* haben gezeigt, dass es bei der Ausbildung einer Chemoresistenz der Melanomzelllinie MeWo zu einer ausgeprägten Expressionssteigerung des TCTP kommt (Sinha *et al.* 2000). Diese Ergebnisse beruhten auf der Analyse von 2D-Gelelektrophoresen, so dass die Expressionsunterschiede somit auf Proteinniveau beschrieben wurden. Die Menge an vorhandenem Protein ist das Ergebnis eines Zusammenspiels von Synthese- und Abbauvorgängen. Die Synthese wiederum kann sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf der Ebene der Translation beeinflusst werden. In einem ersten Schritt wurde daher die Bedeutung dieser beiden Regulationsebenen für die beobachtete Expressionssteigerung untersucht.

Zu diesem Zweck eignete sich die vergleichende Analyse von parallel durchgeführten Northern und Western Blot-Untersuchungen. Dazu wurden diejenigen Cytostatika (Cisplatin und Etoposid) ausgewählt, die in der Arbeit von Sinha *et al.* zu den markantesten Expressionsanstiegen führten. Die Analyse des Northern Blots in Abb. 15 zeigt Expressionsunterschiede zwischen sensiblen und resistenten Melanomzellen auf mRNA-Ebene.



**Abb. 15: Northern Blot mit mRNA aus chemosensiblen und chemoresistenten Melanomzellen:**

Die Hybridisierung wurde mit einer Sonde durchgeführt, die den gesamten Bereich der TCTP-mRNA2 umfasste. Die Positionen der mRNA1 (843nt) und der mRNA2 (1163nt) sind mit Pfeilen markiert. Zur Kalibrierung wurde die Ethiumbromid gefärbte 18S-Bande verwendet. Eine ausführliche Beschreibung der Zelllinien und ihrer Bezeichnungen findet sich im Abschnitt 3.2.10.

Man erkennt jeweils ein deutliches Signal bei rund 0,8 kb und ein sehr schwaches Signal bei etwa 1,2 kb, die den beiden alternativen Transkripten der TCTP-mRNA entsprechen.

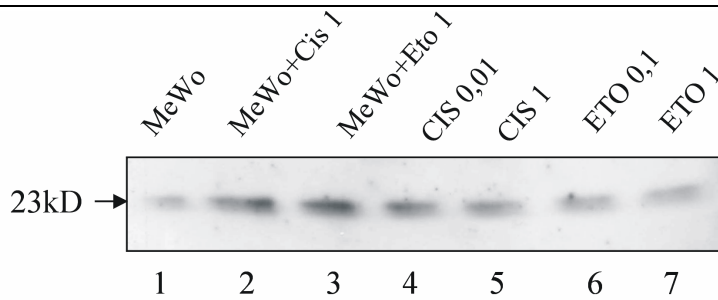
Interessanterweise ist die mRNA2 in den Melanomzelllinien nur in geringem Maße nachzuweisen. Gleicht man die Signale nach der Hybridisierung mit der Ethiumbromid gefärbten 18S-Bande ab, findet man ausgeprägte quantitative Unterschiede der mRNA1 zwischen den einzelnen Melanomzelllinien.

Der Zusatz von Cisplatin führt bei der sensiblen Zelllinie MeWo zu einer Steigerung der TCTP-Transkription (Bahn 2) im Vergleich zu unbehandelten MeWo-Zellen (Bahn 1). Selbst wenn der Cisplatin-resistente Abkömmling MeWo CIS in einem Medium wächst, das nur soviel Cisplatin enthält wie zur Aufrechterhaltung der Resistenz notwendig ist, ist die TCTP-mRNA-Menge (Bahn 4) deutlich erhöht. Dieser Effekt lässt sich nicht allein durch eine allgemeine Reaktion auf einen Stimulus, in diesem Falle das Cytostatikum erklären, sondern spricht für eine konstitutionelle Veränderung auf Transkriptionsebene bei der Ausbildung der Chemoresistenz. Bei einer höheren Cisplatin-Konzentration (Bahn 5) ist kein weiterer Anstieg der mRNA-Menge zu beobachten.

Bei Etoposid verhält es sich ähnlich. In einem Medium mit hoher Konzentration an Cytostatikum ist sowohl bei den sensiblen (Bahn 3) als auch bei den resistenten Zellen (Bahn 7) vergleichsweise wenig mRNA nachzuweisen. Beim Etoposid-resistenten Abkömmling (Bahn 6) kommt es jedoch ebenfalls zu einer gesteigerten Transkription. Die Abnahme der Transkriptionsrate bei Zusatz einer größeren Menge an Etoposid ist möglicherweise durch eine Beeinträchtigung der DNA-Funktion durch den Topoisomerase II-Hemmer zu erklären.

Die vorhandene mRNA-Menge, die in Northern Blots nachgewiesen werden kann, spiegelt nicht nur eine Steigerung der Transkription wider, sondern kann auch durch eine Stabilisierung der mRNA bedingt sein. Auch wenn für die TCTP-mRNA bisher keine besondere Stabilisierung beschrieben wurde, sollte man diesen Aspekt nicht außer Acht lassen. Aufschluss hierüber kann man letztlich nur durch die genaue Aufklärung der Regulationsvorgänge auf transkriptioneller und posttranskriptioneller Ebene erhalten.

Für Western Blot-Untersuchungen wurden Proteinextrakte derselben Zellen verwendet, aus denen auch die RNA für den Northern Blot extrahiert wurde. Die Abb. 16 präsentiert die Darstellung der Expressionsunterschiede auf Proteinniveau. Die Reihenfolge der aufgetragenen Proben ist dieselbe wie in Abb. 15. Man erkennt bei allen untersuchten Zelllinien ein deutliches TCTP-Signal bei rund 23 kD. Es wurde von jeweils gleichen Gesamtproteinmengen ausgegangen. Zu berücksichtigen ist dennoch, dass die Aussagekraft des Western Blots limitiert ist, da keine Kalibrierung mit Antikörpern gegen Haushaltsgene durchgeführt wurde.



**Abb. 16: Western Blot mit Proteinen aus chemosensiblen und chemoresistenten Melanomzellen:**

Der TCTP-Nachweis wurde mit einem Kaninchen-Anti-Maus-TCTP-Antikörper durchgeführt, der auch mit humanem TCTP reagiert. Es zeigt sich ein deutliches TCTP-Signal bei etwa 23 kD.

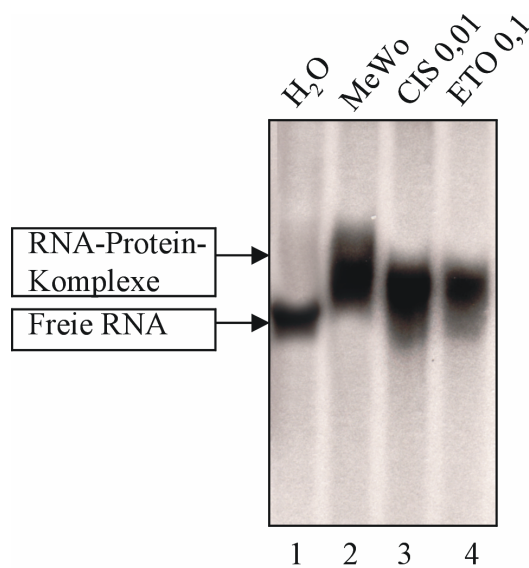
Augenfällig ist, dass die Expression auf Proteinebene nicht so große Unterschiede zeigt wie auf mRNA-Niveau. Analog zu den Ergebnissen von Sinha *et al.* ist die TCTP-Expression in der chemosensiblen Zelllinie MeWo am geringsten. Die TCTP-Konzentration in den anderen Zelllinien liegt deutlich darüber. Im Gegensatz zum Northern Blot lassen sich bei den chemoresistenten Abkömmlingen auf Proteinniveau keine wesentlichen Expressionsunterschiede mehr nachweisen. Die TCTP-Konzentration in den Etoposid-resistenten Zellen ist etwas geringer als in den Cisplatin-resistenten Zellen.

Im Vergleich zum präsentierten Northern Blot sind zwei wesentliche Unterschiede augenfällig. Erstens steht der mRNA-Menge in den chemosensiblen Zellen ohne Cytostatikum (Bahn 1) eine vergleichsweise geringe Menge an Protein im Western Blot gegenüber. Die vorhandene mRNA scheint in diesen Zellen in einem translationsinaktiven Zustand vorzuliegen. Zweitens ist der Unterschied an vorhandener mRNA bei den resistenten Zellen mit und ohne Cytostatikum auf Proteinebene nicht mehr nachweisbar. Neben der Regulation auf transkriptioneller Ebene, die in den Northern Blots gezeigt wurde, trägt also in den Melanomzellen auch die posttranskriptionelle Kontrolle zur TCTP-Expression bei. Eine translationelle Inhibition scheint dabei vor allem bei den chemosensiblen Zellen vorzuliegen.

#### **4.2.2 Proteinbindungsstudien an der TCTP-3'UTR mit Melanomzelllysaten**

Es sollte der Versuch unternommen werden, in Analogie zu den Untersuchungen an der Kaninchen-TCTP-mRNA, in den Melanomzellen Faktoren anzureichern und zu identifizieren, die an die TCTP-mRNA binden und an einer translationellen Regulation beteiligt sein könnten. Der erste Schritt hierbei war wiederum der Nachweis einer RNA-Protein-Wechselwirkung in Electromobility Shift Assays.

Unter Berücksichtigung des besonderen Einflusses der 3'UTR2 auf die Regulation der Translation wurden die folgenden Experimente mit einem [ $\alpha^{32}$ P] markierten *in vitro* Transkript der langen 3'UTR (517 nt) durchgeführt. Dieses Transkript wurde mit Lysaten der chemosensiblen Linie MeWo sowie ihrer resistenten Abkömmlinge MeWo CIS und MeWo ETO inkubiert. Die beiden resistenten Zelllinien wuchsen in einem Medium, das nur die Konzentration des Cytostatikum enthielt, die für das Aufrechterhalten der Chemoresistenz notwendig war. Damit entsprechen die verwendeten Lysate in der Abb. 17 den Bahnen 1, 4 und 6 der Abb. 15.



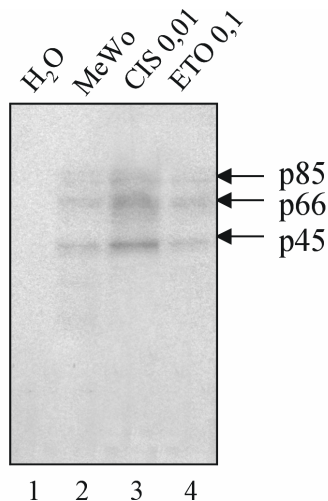
**Abb. 17: EMSA der TCTP-3'UTR:**

Das [ $\alpha^{32}$ P]-markierte *in vitro* Transkript der 3'UTR wurde mit S10-Lysaten der verschiedenen Melanomzelllinien inkubiert. Bahn 1=freie RNA ohne Zugabe eines Proteinextraktes, Bahn 2=Inkubation mit dem S10-Lysat der chemosensiblen Linie MeWo, Bahn 3=Inkubation mit dem S10-Lysat des Cisplatin-resistenten Abkömmlings MeWo CIS, Bahn 4=Inkubation mit dem S10-Lysat des Etoposid-resistenten Abkömmlings MeWo ETO. Es wurden dem Medium jeweils 0,01  $\mu$ g/ml Cisplatin bzw. 0,1  $\mu$ g/ml Etoposid zugesetzt, um die Chemoresistenz aufrecht zu erhalten.

Bei Zusatz von S10-Lysaten der chemosensiblen Linie MeWo sowie ihrer chemoresistenten Abkömmlinge MeWo CIS und MeWo ETO kommt es zur Ausbildung von RNA-Protein-Komplexen. In der nicht-denaturierenden Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese ist dies sichtbar durch das verzögerte Wandern der Komplexe im Vergleich zur freien ungebundenen RNA (Bahn 1). Während sich die Shift-Komplexe nach Zugabe von Extrakten der resistenten Zellen (Bahn 3 und 4) in etwa gleich darstellen, ist die Laufgeschwindigkeit der Komplexe aus RNA und Proteinen der sensiblen Zellen stärker verzögert (Bahn 2). Hierfür kommen verschiedene Ursachen in Frage. Zum einen können aus den einzelnen Extrakten unterschiedliche Proteine an

die TCTP-3'UTR binden. Weiterhin kann die Konzentration der bindenden Proteine in den einzelnen Zelllinien variieren oder die RNA-bindenden Proteine können durch posttranslationelle Modifizierung in ihrer Bindungsfähigkeit verändert werden. Weitere Erkenntnisse hierzu wurden in UV-Crosslinking-Experimenten gewonnen.

In der Abb. 18 ist das Autoradiogramm eines UV-Crosslinking-Experiments dargestellt, das analog zu den Electromobility Shift Assays durchgeführt wurde. Die Proben wurden in gleicher Reihenfolge aufgetragen.



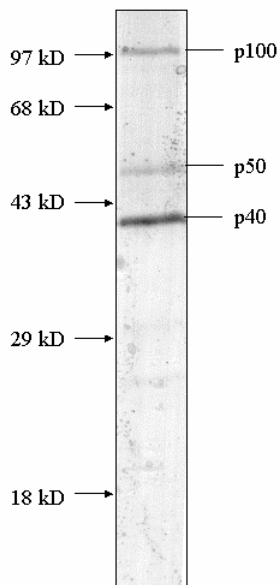
**Abb. 18: UV-Crosslinking-Experiment der TCTP-3'UTR:**

Das [ $\alpha^{32}$ P]-markierte *in vitro* Transkript der 3'UTR wurde mit S10-Lysaten der Melanomzellen inkubiert. Bahn 1=ohne Zugabe eines Proteinextraktes, Bahn 2=Inkubation mit dem S10-Lysat der chemosensiblen Linie MeWo, Bahn 3=Inkubation mit dem S10-Lysat des Abkömmlings MeWo CIS, Bahn 4=Inkubation mit dem S10 Lysat des Abkömmlings MeWo ETO. Es wurden dem Medium jeweils 0,01  $\mu$ g/ml Cisplatin bzw. 0,1  $\mu$ g/ml Etoposid zugesetzt, um die Chemoresistenz aufrecht zu erhalten. Das Molekulargewicht der Proteine wurde durch Vergleich mit einem Proteinstandard abgeschätzt. Die drei Proteine wurden mit p45, p66 und p85 bezeichnet.

Ohne Zugabe eines Proteinextraktes sind keine Banden nachweisbar (Bahn 1). Nach Inkubation der 3'UTR mit den Lysaten aus chemoresistenten und chemosensiblen Melanomzellen sind in allen drei Bahnen gleichermaßen drei Proteinbanden sichtbar. Entsprechend ihrem Molekulargewicht sind diese Proteine als p45, p66 und p85 bezeichnet. Es binden folglich in allen drei Zelllinien die gleichen Proteine an die 3'UTR. Es sind jedoch quantitative Unterschiede der drei gebundenen Proteine zu beobachten. Die intensiveren Banden in Bahn 3 können entweder durch eine höhere Konzentration oder eine posttranslationelle Modifizierung dieser Proteine, beispielsweise durch eine Phosphorylierung, in den Cisplatin resistenten Zellen zu Stande kommen.

### 4.2.3 Identifizierung von 3'UTR-bindenden Proteinen

Für die Identifizierung der 3'UTR-bindenden Proteine wurde das biotin-markierte *in vitro* Transkript der 3'UTR mit dem S10-Lysat der chemosensiblen Melanomzelllinie MeWo inkubiert, da die TCTP-mRNA in diesen Zellen in einem translationsinaktiven Zustand vorliegt. Die angereicherten Proteine wurden in einer SDS-PAGE analysiert und die Coomassie-gefärbten Banden sind in Abb. 19 dargestellt.



**Abb. 19: Anreicherung 3'UTR-bindender Proteine:**

Mit RNA-Affinitätschromatographie wurden aus Lysaten der chemosensiblen Melanomzelllinie MeWo drei Proteine angereichert, die an die 3'UTR der TCTP-mRNA binden. Dargestellt sind die Coomassie-gefärbten Banden der mit 8 M Urea eluierten Proteine. Die Proteine wurden entsprechend ihrem Molekulargewicht als p40, p50 und p100 bezeichnet. Die Banden wurden ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert.

Im Vergleich zu den verschiedenen mit der RNA-Affinitätschromatographie aus Kaninchen-Retikulozytenlysat isolierten Proteinen stellen sich in Abb. 19 nur drei markante Proteine dar. Dieser Unterschied ist im Wesentlichen auf die verschiedenen Färbetechniken zurück zu führen. Die Coomassie-Färbung ist deutlich weniger empfindlich und folglich werden nur Proteine angefärbt, die in einer größeren Menge vorliegen. Nach der Elution mit einem Puffer hoher Salzkonzentration (8 M Urea) sind drei deutliche Proteinbanden von 40 kD, 50 kD und 100 kD erkennbar. Diese drei Banden wurden aus dem Gel ausgeschnitten und ihre Fragmente nach dem tryptischen Verdau in einem MALDI-TOF-Massenspektrometer analysiert. Alle drei Proteine konnten eindeutig identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die drei Cytoskelettproteine  $\gamma$  Actin (42 kD),  $\beta$ 2-Tubulin (49 kD) und  $\alpha$ -Actinin (103 kD).

### **Translationelle Regulation der TCTP-mRNA in Melanomzellen**

In der Zelle sind RNP-Komplexe und Polysomen mit Mikrotubuli und Mikrofilamenten assoziiert und diese Bestandteile des Cytoskeletts erfüllen wichtige Funktionen bei der Translation und intrazellulären Lokalisation von mRNAs (Jansen 1999). Die Cytoskelettproteine treten unter Vermittlung von RNA-bindenden Proteinen mit mRNAs in Wechselwirkung. Die Frage nach diesen Adapterproteinen an der TCTP-mRNA bleibt offen und muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Die Bedeutung der Wechselwirkungen mit den identifizierten Cytoskelettproteinen für die Translation und intrazelluläre Lokalisation der TCTP-mRNA muss in funktionellen Untersuchungen geklärt werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Die Regulation der Translation der TCTP-mRNA

#### 5.1.1 Die Bedeutung der untranslatierten Regionen für die Translation der TCTP-mRNA

Die Kontrolle der Genexpression in Eukaryonten erfolgt durch komplexe ineinander greifende Regulationsvorgänge. Klassischerweise werden neue Erkenntnisse auf diesem Gebiet zunächst durch die isolierte Betrachtung eines Schrittes auf dem Weg vom Gen zum Protein untersucht. Durch experimentelle *in vitro* Ansätze mit zellfreien Lysaten ist es möglich, die jeweiligen Nukleinsäuresequenzen und die interagierenden Proteinfaktoren zu charakterisieren. In den letzten Jahren wurde jedoch mehr und mehr erkannt, dass es sich bei den einzelnen Schritten der Expression eines Gens nicht um eine reine lineare Abfolge von einzelnen Phasen handelt. Vielmehr sind die einzelnen Schritte zeitlich und räumlich gekoppelt und werden koordiniert über Signaltransduktionskaskaden reguliert. Selbst die ehemals strikte Unterscheidung von nukleären und cytoplasmatischen Vorgängen wird zunehmend in Frage gestellt. Diese Erkenntnisse wurden nicht zuletzt durch die Anwendung neu entwickelter Untersuchungsmethoden insbesondere auf dem Gebiet der Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglicht. Die Anwendung moderner Fluoreszenz-Techniken erlaubt sogar das direkte Studium von Makromolekülen und ihrer Wechselwirkungen in lebenden Zellen (Orphanides und Reinberg 2002).

Die grundsätzliche Regulation der Neusynthese eines Proteins findet auf der Ebene der Transkription statt. Daher schien die transkriptionelle Regulation eines Gens lange Zeit der attraktivere Forschungsgegenstand zu sein. Demgegenüber eröffnet die Regulation der Translation zusätzliche Möglichkeiten, Einfluss auf die Expression eines Gens zu nehmen. Die Untersuchungen zur Translationskontrolle konzentrierten sich zunächst auf Differenzierungsvorgänge wie die Entwicklung befruchteter Eizellen oder die Reifung roter Blutzellen, bei denen translationelle Regulationsvorgänge offensichtlich eine besondere Bedeutung haben. Intensiv untersucht wurde auch die Translation von mRNAs, die in translationsinaktiven RNP-Komplexen vorliegen oder deren UTRs besondere Strukturmerkmale aufweisen. In diese Gruppe von mRNAs lässt sich auch die TCTP-mRNA einordnen. Die intensive Untersuchung von gewebespezifischen Expressionsprofilen mit Micro-Array- und 2D Gelelektrophorese-Techniken identifiziert weitere Gene, deren Expression auf translationeller Ebene reguliert wird. Hinzu kommt die Assoziation von Erkrankungen mit Mutationen, die nicht den codierenden Bereich eines Gens betreffen. Funktionelle Studien



belegen hier die Bedeutung der Genregulation für die Entstehung von Krankheiten.

Das Interesse der vorliegenden Arbeit bestand darin, zum Verständnis der Mechanismen beizutragen, die auf der Ebene der Translation die Expression des Gens für das translationell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) steuern. Es konnte gezeigt werden, dass die Translation der TCTP-mRNA1 hauptsächlich durch ihre 5'UTR reguliert wird. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Untersuchungen von Böhm *et al.* (Böhm *et al.* 1991). Ebenfalls übereinstimmend ist die Beobachtung, dass im Weizenkeimlysat der Faktor, der durch Wechselwirkung mit der 5'UTR die translationelle Inhibition vermittelt, nicht vorhanden ist bzw. in einem inaktiven Zustand vorliegt.

Zusätzliche und weiterführende Ergebnisse konnten für die 3'UTR erarbeitet werden. Bei der kürzlich beschriebenen mRNA2 (Thiele *et al.* 2000) übt die 3'UTR2 einen zusätzlichen markanten hemmenden Einfluss auf die Translation aus. Diese Hemmung ist auch im Weizenkeimlysat zu beobachten, d. h. der an der 3'UTR2 angreifende translationshemmende Faktor ist in diesem Zellsystem vorhanden und aktiv. Im Unterschied zu Böhm *et al.* konnte der geringe untergeordnete Einfluss der TCTP-3'UTR1 auf die Translation nicht bestätigt werden. Die Entfernung der 3'UTR1 verbesserte die Translatierbarkeit weder im Retikulozytenlysate noch im Weizenkeimsystem. Möglicherweise lässt sich durch optimierte Bedingungen, z.B. veränderte Ionenkonzentrationen, die Sensitivität der Methode noch steigern, so dass auch sehr geringe Translationsunterschiede nachweisbar sind.

Die Ergebnisse zum unterschiedlichen Translationsverhalten von mRNA1 und 2 können als ein Hinweis auf die physiologische Funktion der Bildung der beiden alternativen Transkripte gedeutet werden. Die mRNA2 besitzt im Vergleich zur mRNA1 ein weiteres Kontrollelement in der längeren 3'UTR. So kann bei TCTP-Induktion durch vornehmliche Bildung der mRNA1 während der Transkription Einfluss auf die Translationsrate der TCTP-mRNA ausgeübt werden. Das deckt sich mit den Befunden von Guillaume *et al.*, die ein Dominieren der mRNA1 in Zellen mit hoher Proliferationsrate beschreiben (Guillaume *et al.* 2001). Eine interessante Fragestellung in diesem Zusammenhang ist, ob sich durch Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation von mRNA1 und 2 die TCTP-Lokalisation im Bereich des Zellkerns und des Cytoplasmas in Abhängigkeit von der Proliferationsrate erklären lässt.

Grundsätzlich lässt sich die Translationseffektivität entweder über eine mRNA-Stabilisierung oder eine gesteigerte Translation der vorhandenen mRNA-Menge beeinflussen. Die im Cytoplasma vorhandenen mRNA-Spiegel, wie sie in Northern Blot-Untersuchungen oder durch quantitative RT-PCR-Techniken gemessen werden, sind das Ergebnis eines Zusammenspiels von

Transkription, mRNA-Prozessierung, mRNA-Export ins Cytoplasma und mRNA-Abbau. Die Halbwertszeiten eukaryoter mRNAs liegen zwischen wenigen Minuten und mehreren Tagen. Besonders kurzlebig sind beispielsweise die mRNAs regulatorischer Cytokine und Protoonkogene, die bereits nach wenigen Minuten abgebaut werden. Dahingegen liegt die Lebensdauer von mRNAs, die für kontinuierlich exprimierte Haushaltsgene codieren, deutlich darüber.

Die Stabilität einer mRNA wird wie ihre Translationseffektivität durch Bindung von spezifischen Proteinen an *cis*-Elemente in den UTRs reguliert (Guhaniyogi *et al.* 2001). Für die Kurzlebigkeit einiger mRNAs sind AU-reiche Regionen (ARE) von besonderer Bedeutung. Das Sequenzmotiv (UUAUUUAU) wurde zuerst in der TNF $\alpha$ -mRNA entdeckt. Sequenzvergleiche zeigten dann, dass auch andere strukturell unterschiedliche Proteine, wie Interferone und Interleukine, dieses Sequenzmotiv in ihrer 3'UTR besitzen (Caput *et al.* 1986). In den letzten Jahren sind verschiedene ARE-bindende Proteine beschrieben worden. Ein gut charakterisierter Faktor ist AUF-1, auch bezeichnet als hnRNP D, von dem verschiedene Isoformen (p37, p40, p42, p45) durch alternatives Spleißen generiert werden. Die Isoformen bilden Homo- und Heterodimere und üben ihre destabilisierende Wirkung in Interaktion mit anderen Faktoren, darunter der Translationsinitiationsfaktor eIF4G, das Poly(A)-bindende Protein PABP und die Hitze-Schock-Proteine Hsc70-Hsp70, aus. Die Destabilisierung der mRNAs wird durch proteasomalen Abbau des AUF-1 vermittelt (Grzybowska *et al.* 2001). Ein anderes ARE-bindendes Protein ist HuR, das jedoch im Gegensatz zu AUF-1 in der Lage ist, mRNAs zu stabilisieren. Interessanterweise wurde auch die Bindung von Stoffwechsellzymen wie der Lactat-Dehydrogenase (LDH) und der Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) an AREs beschrieben (Gouble und Morello 2000).

Sowohl in der 3'UTR1 als auch in der 3'UTR2 der TCTP-mRNA finden sich AU-reiche Motive (AUUUA). Deren Umgebung entspricht jedoch nicht der Konsensus-Sequenz. Die Bedeutung dieser AU-reichen Motive der TCTP-3'UTR ist derzeit noch ungeklärt. Mit Sicherheit erfüllen diese Motive nicht die Funktionen wie bei den kurzlebigen mRNAs. Die TCTP-mRNA gehört im Gegenteil zu den langlebigen mRNAs. Für die mRNA1 konnte gezeigt werden, dass ihre verminderte Translation nicht durch einen beschleunigten Abbau hervorgerufen wird (Böhm *et al.* 1991). Bisher nicht untersucht wurde, ob sich die Stabilität der mRNA1 und mRNA2 unterscheiden. Offen ist auch, ob AU-bindende Proteine möglicherweise den hemmenden Effekt der 3'UTR2 auf die Translationsinitiation vermitteln.

Von besonderer Bedeutung für die transkriptionelle und posttranskriptionelle Regulation des

TCTP sind  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen (Xu *et al.* 2001). Für divalente Kationen konnte gezeigt werden, dass sie zu einer Stabilisierung von Sekundärstrukturen im Bereich der  $\text{TNF}\alpha$ -3'UTR führen. Diese Konformationsänderung beeinflusst die Bindung von AUF-1 an die AREs in der  $\text{TNF}\alpha$ -mRNA (Wilson *et al.* 2001). Es ist folglich möglich, dass die gesteigerte Translation der TCTP-mRNA bei erhöhter intrazellulärer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration durch eine direkte elektrostatische Wechselwirkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen an die mRNA bedingt ist und dadurch die Bindung von translationshemmenden Proteinen vermindert wird.

Während sich in der TCTP-3'UTR keines der wenigen bisher gesicherten *cis*-Elemente findet, besitzt die 5'UTR einen typischen 5'terminalen Oligopyrimidintrakt (5'TOP). Es wurden verschiedene Signalwege beschrieben, die Einfluss auf die Translation der TCTP-mRNA nehmen und vorrangig im Bereich der 5'UTR wirken (Jefferies *et al.* 1994, Bommer *et al.* 1994, Bommer *et al.* 2002).

Eine Bedeutung des 5'TOP für die translationelle Regulation verschiedener Transkripte, neben TCTP ribosomale Proteine und Elongationsfaktoren, konnte in Untersuchungen mit dem Immunsuppressivum Rapamycin gezeigt werden. Rapamycin hemmt selektiv die Translation dieser mRNAs durch verminderte Phosphorylierung des 40S ribosomalen Proteins S6 durch die  $\text{p70}^{\text{s6k}}$ -Kinase. Rapamycin bildet einen Komplex mit einem Protein, das als „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) bezeichnet wird, und dieser Komplex bedingt wiederum eine verminderte Phosphorylierung der  $\text{p70}^{\text{s6k}}$ -Kinase. Die S6-Aktivierung führt zu einer Verschiebung der TOP-mRNAs aus translationsinaktiven mRNP-Komplexen zu den Polysomen. Die Translationshemmung durch Rapamycin ist nicht vollständig und andere Mechanismen müssen zusätzlich beteiligt sein. Auch ist weiterhin offen, welche Faktoren direkt mit der mRNA wechselwirken und somit die Hemmung vermitteln (Jefferies *et al.* 1994, Jefferies *et al.* 1997).

### **5.1.2 Die Bedeutung allgemeiner Translationsfaktoren für die Translation der TCTP-mRNA**

Verschiedene Untersuchungen belegen, dass die TCTP-mRNA zu den mRNAs gehört, die besonders empfindlich auf geringfügige Veränderungen der allgemeinen Translationsmaschinerie reagieren. So konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF4E zu einer gesteigerten Translation der TCTP-mRNA führt (Bommer *et al.* 1994). Bei der Translationsinitiation bindet eIF4E an die 7-Methyl-GTP-Kopfgruppe der mRNA und ermöglicht somit eine effektivere Ribosomenbindung. Die Phosphorylierung von eIF4E ist essentiell für den regelrechten Ablauf von Wachstumsvorgängen (Lachance *et al.* 2001). Bei eIF4E-Überexpression kommt es zur malignen Transformation und

diese Überexpression stimuliert vor allem die Translation von mRNAs, die komplexe Sekundärstrukturen in ihren 5'UTRs aufweisen. Für die Phosphorylierung von eIF4E ist der ras/src-Kinase-Signaltransduktionsweg von Bedeutung, der über eine Aktivierung der MAP („mitogen-activated protein“-)-Kinase zur Aktivierung der „MAPK-interacting protein kinase“ (Mnk1) führt, die schließlich eIF4E phosphoryliert.

Die eIF4E-bindenden Proteine (eIF4E-BPs) sind in der Lage, die Wechselwirkung von eIF4E mit dem Adapterprotein eIF4G des Komplexes eIF4F zu verhindern und damit die Initiation der Translation zu hemmen. Die Affinität der eIF4E-BPs wird durch Phosphorylierung vermindert und der vollständige Komplex eIF4F kann wieder assembliert werden. Externe Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Mitogene führen zur Phosphorylierung der eIF-BPs und steigern dadurch die Translation, wohingegen verschiedene Stresszustände einen gegenteiligen Effekt hervorrufen. Der Einfluss der eIF-BPs kann durch Überexpression von eIF4E vermindert werden. Die Phosphorylierung von eIF-BP1 wird ebenfalls durch Rapamycin gehemmt. Rapamycin beeinflusst somit synergistisch verschiedene Mechanismen der Translationshemmung, was eine besondere Bedeutung von eIF4E für die Translation von 5'TOP-mRNAs impliziert (Dennis *et al.* 1999).

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden mit *in vitro* Transkripten erarbeitet, die keine Kopfgruppe enthielten. Das Einfügen einer solchen Kopfgruppe verbesserte erwartungsgemäß die Translation durch effektivere Ribosomenbindung, jedoch bei allen Konstrukten in gleichem Maße. Das deutet darauf hin, dass für den Mechanismus der Translationshemmung durch die 5'UTR und die 3'UTR2 die Kopfgruppe von untergeordneter Bedeutung ist. Diese Hypothese wird durch eine Arbeit unterstützt, die zeigt, dass für die Bindung von Proteinen an 5'TOPs die Kopfgruppe nicht unbedingt notwendig ist (Biberman und Meyuhas 1999). Alle Experimente wurden mit Transkripten ohne Poly(A)-Schwanz durchgeführt. Offensichtlich ist auch diese mRNA-Modifizierung für die translationelle Hemmung der TCTP-mRNA nicht essentiell.

Der AU-Reichtum der 3'UTR legt nahe, dass es bei der TCTP-mRNA innerhalb des Moleküls zu einer Wechselwirkung mit der GC-reichen 5'UTR kommt. In der Tat haben Untersuchungen gezeigt, dass es innerhalb der TCTP-mRNA zur Bildung komplexer Sekundärstrukturen kommt (Chitpatima *et al.* 1988, Bommer *et al.* 2002). Die Untersuchungen von Bommer *et al.* belegen zudem, dass die TCTP-mRNA in der Lage ist, die durch doppelsträngige RNA aktivierbare Proteinkinase PKR zu aktivieren. Die PKR wiederum hemmt die Translation der TCTP-mRNA, so dass die TCTP-mRNA letztendlich durch einen Feedback-Mechanismus ihre eigene

Translation hemmen kann.

PKR gehört neben anderen (HRI, PERK, GCN2) zu den Kinasen, die die eIF2 $\alpha$ -Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF2 phosphorylieren und somit zu einer allgemeinen Translationshemmung führen. Der Initiationsfaktor eIF2 wird regeneriert, indem mit Hilfe des Faktors eIF2B das zu GDP hydrolysierte GTP wieder erneuert wird. Dieser Guanin-Nukleotid-Austausch wird durch Phosphorylierung von eIF2 behindert. Die PKR ist durch Interferon induzierbar und spielt eine wichtige Rolle bei der Abwehr von viralen Infektionen. Darüber hinaus ist sie auch an einer Regulation von Zellwachstum und Apoptose beteiligt.

Ein weiterer interessanter Aspekt der Regulation der TCTP-mRNA ist, dass sie nicht nur besonders empfindlich auf Veränderungen der Translationsmaschinerie reagiert, sondern zudem mit dem 5'TOP ein charakteristisches *cis*-Element von mRNAs allgemeiner Translationsfaktoren besitzt. Dies ermöglicht die optimale Anpassung der TCTP-Expression an die Wachstumsbedingungen der Zelle.

Die oben beschriebenen Mechanismen belegen, dass die Translation der TCTP-mRNA auf sehr komplexe und so in der Literatur bisher für keine andere mRNA gezeigte Weise reguliert wird. Es ist anzunehmen, dass darüber hinaus noch weitere Signalwege beteiligt sind, da die translationelle Hemmung bei keinem der bisher gezeigten Mechanismen vollständig war. Hierbei ist wiederum die Bedeutung der 3'UTR2 zu unterstreichen, für die der Mechanismus der Translationshemmung ebenfalls noch ungeklärt ist. Weiterhin ist offen, welche Proteine durch unmittelbare Bindung an *cis*-Elemente der TCTP-mRNA die Wechselwirkungen mit den allgemeinen Translationsfaktoren vermitteln. Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Proteinbindungsstudien sollten einen Beitrag zur Charakterisierung von Kandidatenproteinen leisten.

### **5.1.3 Die Wechselwirkungen von RNA-bindenden Proteinen mit den UTRs der TCTP-mRNA**

In der vorliegenden Arbeit konnten eine Reihe von Proteinen ermittelt werden, die an die UTRs der TCTP-mRNA binden. Die gewebespezifischen Unterschiede in den UV-Crosslinking-Experimenten sind bei den 3'UTR-bindenden Proteinen deutlicher ausgeprägt als bei den 5'UTR-bindenden Proteinen.

Es ließen sich durch UV-Crosslinking insgesamt vier Kandidatenproteine darstellen, die mit der 5'UTR in Wechselwirkung treten. Entsprechend ihrem Molekulargewicht wurden diese Proteine als p25-p43 bezeichnet. Mit einem Affinitätschromatographischen Verfahren ließen sich drei

zusätzliche Proteine mit höherem Molekulargewicht (p68, p80, p85) darstellen. Dies ist nicht ungewöhnlich, da es sich bei den beiden Verfahren um experimentell unterschiedliche Ansätze handelt. So lassen sich zusätzliche Banden in der RNA-Affinitätschromatographie durch Protein-Protein-Wechselwirkungen erklären. Durch Anreicherung von RNA-bindenden Proteinen aus dem Retikulozytenlysat konnten außerordentlich interessante Kandidatenproteine isoliert werden. Die Spezifität der Bindung wird belegt durch differenzielle Betrachtung der Ergebnisse von 5'UTR und 3'UTR. Unspezifisch an RNA oder Streptavidin-Agarose bindende Proteine müssten jeweils in beiden Ansätzen auftreten. Die nachgewiesenen Proteinbanden traten jedoch nur bei jeweils einem der eingesetzten Transkripte auf.

Die Identifizierung der TCTP-mRNA-bindenden Proteine aus Kaninchen-Retikulozytenlysat durch Massenspektrometrie ist bisher nicht gelungen. Mit diesem Verfahren können nur bereits bekannte und in Datenbanken enthaltene Proteine identifiziert werden. In diesen Datenbanken sind hauptsächlich Proteine von Maus und Mensch zu finden, so dass die Identifizierung der isolierten Kaninchenproteine nicht möglich war.

In der TCTP-5'UTR ist mit dem 5'TOP eines der gut charakterisierten *cis*-Elemente von UTRs vorhanden. Es ist somit wahrscheinlich, dass einige der angereicherten Proteine in diesem Bereich der 5'UTR binden. In den letzten Jahren sind einige Proteine beschrieben worden, die mit 5'TOPs verschiedener mRNAs wechselwirken (Meyuhas 2000). Pellizzoni *et al.* konnten zeigen, dass das *Xenopus* Homolog des humanen Proteins La an die 5'UTR von *Xenopus* ribosomalen Proteinen bindet (Pellizzoni *et al.* 1996). Dieses Protein ist medizinisch interessant, da Antikörper (SS-B-Antikörper) gegen dieses Protein bei bestimmten Autoimmunkrankheiten, insbesondere beim Sjögren-Syndrom, auftreten. Es konnte gezeigt werden, dass humanes La in der Lage ist, durch Bindung an den 5'TOP die Translation eines Reporter-Gens *in vitro* zu hemmen (Zhu *et al.* 2001). Für La sind noch weitere Wechselwirkungen mit mRNAs beschrieben worden, darunter die Beteiligung an der Translation viraler mRNAs, die ein IRES besitzen.

Für ein weiteres Protein, Ro60, gegen das ebenfalls Autoantikörper (SS-A-Antikörper) gebildet werden, konnte die Wechselwirkung mit 5'TOPs gezeigt werden. Die Bindung von Ro und La scheint abhängig zu sein von einem weiteren Faktor CNBP („cytoplasmic nucleic acids binding protein“), der an die angrenzenden Bereiche von 5'TOP-mRNAs bindet (Pellizzoni *et al.* 1996). Weiterhin wurde für hnRNP I, auch bezeichnet als PTB („pyrimidine tract binding protein“), eine Wechselwirkung mit 5'TOPs beschrieben.

Die Molekulargewichte der oben genannten Proteine CNBP, La, PTB und Ro60 beträgt jeweils

19 kD, 47 kD, 57 kD und 60 kD, so dass sich keines der in den UV-Crosslinking-Experimenten und der RNA-Affinitätschromatographie nachgewiesenen Proteine direkt einem dieser bekannten Faktoren zuordnen lässt. Es ist somit wahrscheinlich, dass es sich bei den in der vorliegenden Arbeit charakterisierten Proteinen um bisher nicht bekannte Faktoren handelt, die an den 5'TOP und die angrenzenden Bereiche binden. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass es sich bei den nachgewiesenen Faktoren um Bruchstücke, alternativ gespleißte Isoformen, posttranslational modifizierte Formen oder Kaninchen-Homologe mit abweichendem Molekulargewicht der bekannten 5'TOP-bindenden Proteine handelt.

In der 5'UTR der TCTP-mRNA ist neben dem 5'TOP noch ein weiteres potentielles Bindungsmotiv vorhanden. Es handelt sich dabei um das Differenzierungskontrollelement (DICE), das erstmals in der 3'UTR der 15-Lipoxygenase des Kaninchens entdeckt wurde. CU-reiche Motive dieses Typs wurden inzwischen in vielen eukaryoten mRNAs gefunden (Pesole *et al.* 2001). Daran binden die beiden KH-Domänen-Proteine hnRNP E1 und K und regulieren auf diese Weise Translationseffektivität und mRNA-Stabilität. Dieses Motiv liegt typischerweise in mehrfacher Wiederholung vor. Für eine effiziente Translationsregulation sind mindestens zwei dieser CU-reichen Motive erforderlich (Reimann *et al.* 2001). In der TCTP-mRNA ist das DICE-Motiv nur einfach vorhanden. Die Ergebnisse von UV-Crosslinking und RNA-Affinitätschromatographie legen jedoch eine Bindung von hnRNP E1 an die 5'UTR nahe. Bei Verwendung von Retikulozytenlysat ist jeweils eine Bande von 43 kD nachweisbar, die sich hnRNP E1 zuordnen lässt. In der RNA-Affinitätschromatographie stellt sich auch eine Bande bei 68 kD dar, bei der es sich um hnRNP K handeln könnte. In Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern und rekombinant hergestellten Proteinen, derzeit nur für E1 verfügbar, ließe sich überprüfen, ob tatsächlich eine Bindung an die TCTP-5'UTR stattfindet. Zudem müsste überprüft werden, inwieweit diese Proteine Einfluss auf die Translation der TCTP-mRNA ausüben.

Auch für die aus Kaninchen-Retikulozytenlysat angereicherten 3'UTR-bindenden Proteine war eine Identifizierung der angereicherten Proteine mittels Massenspektrometrie bisher nicht möglich. Die Zuordnung zu beschriebenen RNA-bindenden Proteinen gestaltet sich hier schwieriger, da in der 3'UTR kein bekanntes *cis*-Element zu finden ist. Wie bereits im Kapitel 5.1.1. erwähnt, finden sich AU-reiche Motive in beiden Abschnitten der 3'UTR, die nicht der Konsensussequenz entsprechen. Es ist jedoch möglich, dass AU-bindende Proteine mit diesen Bereichen wechselwirken, zumal sich das in der RNA-Affinitätschromatographie angereicherte Protein p40 einer der vier Isoformen des AU-bindenden Faktors 1 (AUF1) zuordnen lässt. Von

AUF-1 ist eine Wechselwirkung mit hnRNP E1 bekannt, so dass hier eine Wechselwirkung von 5'UTR- und 3'UTR-bindenden Proteinen stattfinden könnte (Misquitta *et al.* 2001).

Es ist zudem gelungen, aus der humanen Melanomzelllinie MeWo drei 3'UTR-bindende Proteine zu identifizieren. Es handelt sich dabei um die Cytoskelettproteine  $\alpha$ -Actinin,  $\beta$ -Tubulin und  $\gamma$ -Actin. Zahlreiche mRNAs (etwa 15-30%) sind intrazellulär mit Cytoskelett-Proteinen assoziiert. Die von Xu *et al.* beschriebene Regulation der TCTP-mRNA durch  $\text{Ca}^{2+}$  kann über eine Vermittlung durch Calcium-bindende Proteine und eine direkte Wechselwirkung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen mit der mRNA zu Stande kommen. Im Hinblick auf die Bindung von TCTP an  $\beta$ -Tubulin wäre eine Assoziation seiner mRNA mit diesem Cytoskelettprotein nicht ungewöhnlich, ähnlich wie dies bei der Bindung von  $\text{Ca}^{2+}$  an TCTP und TCTP-mRNA der Fall ist. Hinzu kommt, dass zwei der isolierten Proteine,  $\alpha$ -Actinin und  $\beta$ -Tubulin, in der Lage sind, Calcium zu binden. In jedem Fall sind weitere Untersuchungen erforderlich, bei denen die Bedeutung der isolierten Proteine für die Translation und Lokalisation der TCTP-mRNA näher beleuchtet wird. Unklar ist auch, welche Adapterproteine an der Wechselwirkung der 3'UTR mit den Cytoskelettproteinen beteiligt sein könnten. In der Regel sind mRNAs in Form von RNP-Komplexen mit Cytoskelettbestandteilen assoziiert.

Theoretisch betrachtet sollten solche Zellen für die Anreicherung eines hemmenden Faktors besonders gut geeignet sein, die sich nicht in einem Zustand hoher Proliferation befinden. Diese Voraussetzung ist im Retikulozytenlysat besser erfüllt als in malignen Zellen wie den Melanomzellen. Für die RNA-Affinitätschromatographie wurde das Lysat der chemosensiblen Linie MeWo verwendet, bei der durch Vergleich der Northern und Western Blot Ergebnisse eine Hemmung der Translation gezeigt werden konnte. Weiterführende Untersuchungen müssen klären, ob sich aus den Melanomzellen 5'TOP bindende Faktoren und weitere RNA-bindende Proteine isolieren lassen, die diese Translationshemmung vermitteln.

Zusammenfassend ist anzunehmen, dass die TCTP-mRNA in Zellen mit geringer mitotischer Aktivität in inaktiven mRNP-Komplexen vorliegt, in denen 5'UTR- und 3'UTR-bindende Faktoren mit der mRNA assoziiert sind und dass sich diese mRNP-Komplexe an Cytoskelettbestandteile anlagern. Hervorgerufen durch verschiedene externe Stimuli kommt es über die Aktivierung von Signalkaskaden zu einer veränderten Bindungsfähigkeit der RNA-bindenden Proteine, so dass die mRNA an den Polysomen translatiert werden kann.

Bei gleichen Motiven in mRNAs und gleichen RNA-bindenden Proteinen wird die Individualität der Regulation eines Messengers über die Zusammensetzung des jeweiligen mRNP-Komplexes



erreicht (Dreyfuss *et al.* 2002). Durch Bildung von Homomeren und Heteromeren RNA-bindender Faktoren lässt sich eine große Diversität im Proteinbesatz von mRNAs erreichen. Zur vollständigen Aufklärung der individuellen Zusammensetzung des mRNP-Komplexes einer mRNA stehen jedoch bislang keine geeigneten Techniken zur Verfügung.

#### 5.1.4 Ausgewählte Signalwege bei der TCTP-Induktion

Seit der Erstbeschreibung des Proteins wurde eine ganze Reihe von Induktoren der TCTP-Synthese identifiziert. Die wesentlichen Daten hierzu wurden in der Einleitung ausführlich dargestellt. Für einige dieser Induktoren sind die Signalkaskaden, über die der Einfluss auf Transkription und Translation vermittelt wird, bekannt. Interessanterweise lassen sich für die meisten der beobachteten Induktionsmechanismen gemeinsame Wirkungsmechanismen finden. Folglich stellt sich die Frage, ob von diesen Signalwegen Wechselwirkungen mit den oben beschriebenen Mechanismen der translationellen Regulation bekannt sind. Diese Induktoren wirken selbstverständlich nicht ausschließlich auf translationeller Ebene. Vielmehr kommt es in der Zelle parallel zum Anschalten von Transkription und Translation. Die im Folgenden beschriebenen Signalwege beeinflussen auch die Bindung von Transkriptionsfaktoren an Promotorstrukturen des *TPT1*-Gens. Da das wesentliche Interesse dieser Arbeit auf den translationellen Regulationsmechanismen lag, sind diese vorrangig dargestellt.

Typischerweise wirken Induktoren gleichzeitig auf mehrere intrazelluläre Signalwege. An dieser Stelle soll eine Auswahl beteiligter Mechanismen präsentiert werden. Eine zentrale Rolle bei der Regulation der Translation spielt die MAP-Kinase p38. Die beiden Subtypen der MAP-Kinasen p38 und JNK werden auch zusammenfassend als Stress-aktivierte Proteinkinasen (SAPKs) bezeichnet. Ihre Aktivierung, ausgelöst durch extrazelluläre Stimuli wie Wachstumsfaktoren und Zellstress, wird über membranständige Rezeptoren vermittelt. So bewirkt beispielsweise Lipopolysaccharid über eine Interaktion mit dem Toll-like-Rezeptor 4 eine p38-Aktivierung. Die Wirkung von LPS wurde ausführlich im Zusammenhang mit der Stabilisierung von AU-reichen mRNAs durch p38 untersucht (Frevel *et al.* 2003). Die p38-Aktivierung hat eine Aktivierung der Proteinkinase Mnk1 zur Folge, die den Translationsinitiationsfaktor eIF4E phosphoryliert und damit die Translation, vor allem von mRNAs mit komplexen Sekundärstrukturen, steigert (Meyuhas 2000).

Der TCTP-Induktor IL-3 bewirkt eine Hemmung der PKR (Williams 1999). Die somit verminderte inhibitorische Wirkung der PKR auf die Translation der TCTP-mRNA könnte zur beobachteten TCTP-Induktion durch IL-3 beitragen. Des Weiteren ist die PKR in der Lage p38 zu aktivieren (Goh *et al.* 2000), so dass es zwischen den verschiedenen Signalwegen zu einer

Vernetzung kommt.

Die Wirkung von Wachstumsfaktoren wird zusätzlich über Tyrosinkinase-Rezeptoren und die Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3-Kinase) vermittelt. Durch die konsekutive Aktivierung des „mammalian target of rapamycin“ (mTOR) kommt es zur Phosphorylierung der 4E-BPs und des ribosomalen Proteins S6, was eine Steigerung der Translation insbesondere von 5' TOP-mRNAs zur Folge hat (Dennis *et al.* 1999, Meyuhas 2000). Ein Überblick über die oben beschriebenen Induktionsmechanismen auf translationeller Ebene ist in Abb. 20 dargestellt.

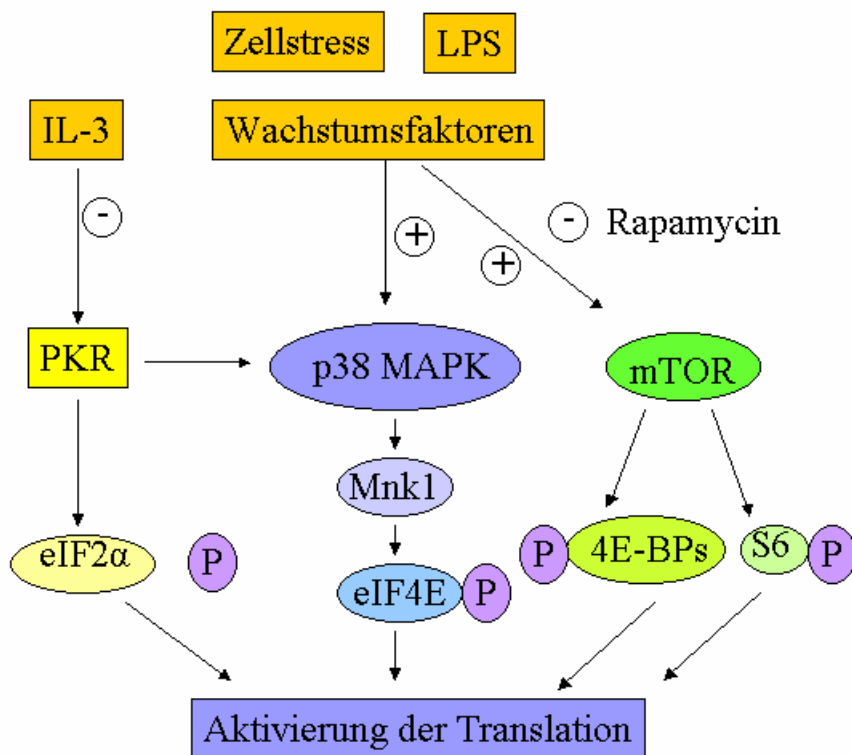


Abb. 20: Potentielle Signalkaskaden bei der Aktivierung der TCTP-Synthese

Bei einer Stimulation von Zellen durch Wachstumsfaktoren, Zellstress und LPS kommt es zur Aktivierung von mTOR. In der Folge kommt es zur Phosphorylierung des ribosomalen Proteins S6, was eine Verschiebung von 5' TOP-mRNAs aus inaktiven mRNP-Komplexen zu translationsaktiven Ribosomen bewirkt. Zusätzlich werden 4E-BPs phosphoryliert, was ihre Wechselwirkung mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF-4E behindert und dadurch die Translationsrate steigert. Über eine Aktivierung der MAP-Kinase p38 wird eIF-4E selbst phosphoryliert und seine Aktivität dadurch gesteigert. Eine verminderte Aktivität der PKR hervorgerufen durch IL-3 hat eine verminderte Phosphorylierung von eIF-2α und damit ebenfalls eine Steigerung der Translationsrate zur Folge.

## 5.2 Die veränderte Expression des TCTP in Melanomzellen

### 5.2.1 Die Bedeutung von TCTP als anti-apoptotischer Faktor

Als Reaktion auf verschiedene extrazelluläre Stressfaktoren konnte eine gesteigerte TCTP-Expression nachgewiesen werden. Es war lange Zeit ungeklärt, ob dieser Effekt eine allgemeine Reaktion von Zellen auf bestimmte Stimuli ist oder sich dahinter ein besonderer Schutzmechanismus der Zellen verbirgt.

Die Charakterisierung von TCTP als anti-apoptotischer Faktor favorisiert die letztere Variante (Li *et al.* 2001). Die Autoren zeigen klar, dass TCTP in der Lage ist, den durch Etoposid ausgelösten Zelltod in transfizierten HeLa-Zellen zu unterdrücken. Ferner führt eine TCTP-Depletion, hervorgerufen durch ein entsprechendes Antisense-Transkript in der Mamma-Ca-Linie MCF-7 zu einem massiven Zelltod. Einen weiteren Hinweis auf eine Bedeutung von TCTP in der Pathophysiologie maligner Zellen liefert die Beobachtung von Tuynder *et al.*, dass es bei Tumorreversion zu einer verminderten TCTP-Expression kommt (Tuynder *et al.* 2002).

Offen ist nach wie vor die Frage, auf welche Weise TCTP die Apoptose hemmt. Von besonderer Bedeutung ist hierbei sicher die Sequestrierung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen durch Bindung an TCTP. Unklar bleibt jedoch, ob das die alleinige Ursache der beobachteten Caspase-3-Hemmung ist. Einen weiteren Hinweis auf die Bedeutung der Apoptosehemmung für die Entwicklung der Chemoresistenz ist die Identifizierung eines weiteren anti-apoptotischen Proteins 14-3-3 $\gamma$  als überexprimierter Faktor in den chemoresistenten Melanomzellen durch Sinha *et al.* Die Proteine der 14-3-3-Familie interagieren mit verschiedenen Proteinen an phosphorylierten Serinresten und beeinflussen so eine Reihe von Signaltransduktionswegen und tragen dadurch unter anderen zur Regulation von Zellwachstum und Apoptose bei (Xing *et al.* 2000).

Sollte es gelingen, pharmakologisch in Signalwege einzugreifen, die bei der Regulation der TCTP-Expression auf transkriptioneller oder translationeller Ebene involviert sind, ergäben sich möglicherweise neue Angriffspunkte für eine cytostatische Therapie. Rapamycin und neuentwickelte Medikamente mit gleichem Wirkmechanismus werden nicht nur zur Immunsuppression eingesetzt, sondern besitzen auch eine proliferationshemmende Wirkung auf Tumorzellen (Hidalgo und Rowinsky 2000, Law BK *et al.* 2002). Eine interessante Fragestellung wäre, wie sich die TCTP-Expression unter diesen Bedingungen verändert und inwieweit die Aufhebung der Translationshemmung über die 5'UTR daran beteiligt ist. Für die proliferationshemmende Wirkung von Rapamycin kommen sicher noch eine ganze Reihe weiterer Proteine mit 5'TOP-mRNAs als potentielle Effektoren in Frage. Interessanterweise war

ein weiteres der in den chemoresistenten Melanomzellen überexprimierten Proteine der Translationselongationsfaktor 1 $\delta$  (Sinha *et al.* 2000). Das könnte ein weiteres Indiz für die Bedeutung einer veränderten Proteinsyntheserate auf die Proliferation maligner Zellen sein.

### **5.2.2 Der Einfluss der translationellen Regulation auf die TCTP-Expression in Melanomzellen**

Die vergleichenden Northern und Western Blot Analysen zeigen in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Sinha *et al.* eine deutliche Expressionssteigerung des TCTP in den chemoresistenten Abkömmlingen der Melanomzellen auf mRNA- und Proteinniveau. Es zeigt sich zudem, dass der Zusatz von hohen Konzentrationen des jeweiligen Cytostatikums nicht zu einer weiteren Steigerung der TCTP-Synthese führt. Die mRNA-Menge nimmt unter diesen Umständen sogar noch ab, was wahrscheinlich durch eine unspezifische Störung der DNA-Funktion durch die Cytostatika bedingt ist. Die Tatsache, dass es in den sensiblen Zellen unter Cisplatin-Belastung zu einer deutlichen transkriptionellen Induktion kommt, spricht gegen eine spezifische Hemmung der *TPT1*-Transkription durch das Cytostatikum.

Für Etoposid kommt durchaus ein spezifischer hemmender Effekt auf die Transkription des *TPT1*-Gens in Frage, da auch in den sensiblen Zellen bei Etoposid-Zugabe eine verminderte TCTP-mRNA-Menge nachzuweisen ist. Unter Berücksichtigung der deutlichen Erhöhung der Proteinmenge in diesen Zellen erscheint dies jedoch unwahrscheinlich. Offensichtlich wird eher ein Signalweg initiiert, der zu einer effektiveren Translation der verminderten mRNA-Menge führt. Eine entscheidende Rolle bei dieser translationellen Aktivierung könnte hierbei wiederum dem intrazellulären Calcium zukommen, das in Folge der Zellschädigung durch das Cytostatikum ansteigt.

Verglichen mit der relativen Menge an mRNA ist in den chemosensiblen Melanomzellen nur sehr wenig TCTP nachweisbar. Möglicherweise, und diese Hypothese war Ausgangspunkt für die Verwendung der sensiblen Zellen in der RNA-Affinitätschromatographie, ist die Translation der mRNA in diesen Zellen durch die Bindung hemmender Proteine unterdrückt. Zu bedenken ist dabei jedoch, dass es sich bei den sensiblen MeWo-Zellen bereits um eine Tumorzelllinie handelt, die sich durch eine hohe Proliferationsrate auszeichnet.

In UV-Crosslinking-Experimenten waren die drei dargestellten an die 3'UTR bindenden Proteine identisch trotz unterschiedlichem Erscheinungsbild der Shift-Komplexe in den EMSA-Versuchen. Die unterschiedliche Konfiguration der Shift-Komplexe mit Proteinen aus chemosensiblen und chemoresistenten Zellen deutet auf eine veränderte Wechselwirkung der

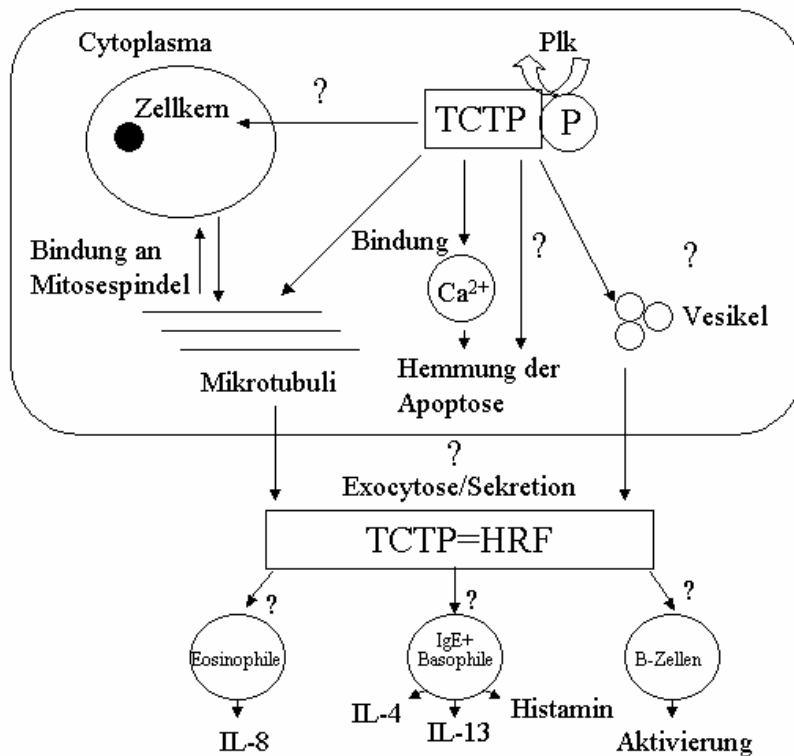
bindenden Proteine mit der mRNA hin. Die erhöhte TCTP-Synthese, die in den chemoresistenten Zellen zu beobachten ist, lässt sich auf diese Weise erklären. Eine Regulation der bindenden Proteine entweder über deren Konzentration oder Aktivität lässt sich mit dieser Art von Experimenten jedoch nicht ausmachen. Der Vergleich mit einer nicht-malignen humanen Zelllinie könnte hier hilfreich sein.

Für alle in dieser Arbeit vorgestellten RNA-Proteinbindungsstudien wurden S10-Extrakte der jeweiligen Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um die cytoplasmatischen Überstände nach Zentrifugation bei 10000 x g, in denen sowohl Polysomen als auch mRNP-Komplexe enthalten sind. Durch Zentrifugation bei höheren Geschwindigkeiten lassen sich Polysomen- und mRNP-Fraktionen gewinnen (S100 und S300). Mit Hilfe dieser Verfahren könnte man untersuchen, ob es bei Entwicklung der Chemoresistenz zu einer Verschiebung der TCTP-mRNA aus den translationsinaktiven mRNP-Komplexen hin zu den Polysomen kommt. Das wäre ein weiterer Hinweis für die Bedeutung der Translationsregulation in den Melanomzellen.

Die Ergebnisse der Northern Blot-Untersuchungen an den Melanomzellen weisen in die gleiche Richtung wie die Beobachtungen von Guillaume *et al.*, dass die mRNA2 in Zellen hoher mitotischer Aktivität kaum nachzuweisen ist. Unter Berücksichtigung der besonderen Translationsinhibition der mRNA2 unterstützt das die These, dass die TCTP-Expression in den Melanomzellen spezifisch hochreguliert wird. Die Frage ist dabei hier, ob die mRNA2 in diesen Zellen instabiler ist oder ob bevorzugt das erste Polyadenylierungssignal verwendet wird. Grundsätzlich ist anzunehmen, dass die TCTP-Expression sowohl auf transkriptioneller als auch auf translationeller Ebene in den malignen Melanomzellen gesteigert ist und sich dieser Effekt in den chemoresistenten Zellen noch verstärkt.

### 5.3 TCTP-ein rätselhaftes Protein?

Durch neue Erkenntnisse über das TCTP hat sich in den letzten Jahren ein vielschichtiges Bild entwickelt. Insbesondere bezüglich seiner Funktionen sind wertvolle Informationen hinzugekommen, auch wenn dieses Protein so manche Besonderheit aufweist und weiterhin das eine oder andere neue Rätsel aufgibt. Eine besondere Schwierigkeit war von Anfang an, dass es sich keiner bekannten Proteinfamilie zuordnen lässt. Die einzelnen Arbeiten über TCTP stehen häufig für sich und viele Zusammenhänge sind noch ungeklärt. Die Abb. 21 vermittelt einen Überblick über die vielfältigen Funktionen des TCTP und damit verbundene offene Fragen.



**Abb. 21: Funktionen des TCTP:**

Für TCTP wurde eine Lokalisation sowohl im Cytoplasma als auch im Zellkern beschrieben. Unklar ist dabei, wie das Protein in den Kern gelangt. TCTP ist mit Mikrotubuli assoziiert und es kommt zu einer Wechselwirkung mit Mitosespindeln in der Metaphase der Mitose. Die Assoziation mit dem Cytoskelett wird über eine Phosphorylierung des TCTP an Ser 46 und Ser 64 durch die Plk reguliert. Die Hemmung der Apoptose ist möglicherweise auf die Bindung von Ca<sup>2+</sup>-Ionen und die konsekutive Hemmung der Caspase-3 zurückzuführen. In Frage steht, ob an der anti-apoptotischen Wirkung von TCTP noch weitere Mechanismen beteiligt sind. Völlig ungeklärt ist, wie TCTP, auch als „histamine-releasing factor“ bezeichnet, aus der Zelle gelangt. Eventuell handelt es sich dabei um einen akzidentiellen Vorgang, der durch die Interaktion mit Cytoskelettproteinen und Vesikeln zu Stande kommt. Es sind Effekte an B-Lymphozyten, eosinophilen und basophilen Granulozyten bekannt. Ob und über welche Rezeptoren TCTP auf diese Zellen wirkt, ist umstritten.

Die Homologie der Proteinstruktur zu dem Guanin-Nukleotid-freien Chaperon Mss4 hat zwar einerseits neue Aspekte zur TCTP-Funktion eingebracht, andererseits ergibt sich die Frage wie diese neuen Erkenntnisse mit den anderen beschriebenen Funktionen, Apoptosehemmung und Zellzyklusregulation, in Einklang zu bringen ist. Die durch die Mss4-Homologie implizierte Verbindung zum Vesikeltransport liefert zumindest eine mögliche Erklärung für das Auftreten von TCTP im Serum. Am wahrscheinlichsten für das extrazelluläre Auftreten dieses intrazellulären Proteins ist ein unspezifischer Transport im Rahmen von Vesikelbewegung.

Die Rolle von TCTP als ubiquitär vorkommendes, hochkonserviertes Protein, das in die

Regulation von Zellwachstum und Zelltod eingreift, ist plausibel. Wie aber ist es zu erklären, dass ein solches Protein einen so spezifischen Effekt wie die Histaminfreisetzung hervorrufen kann? Diese Frage ist derzeit nicht zu beantworten. Die Histaminfreisetzung aus isolierten Immunzellen ließ sich nur bei einem Teil der Patienten nachweisen (MacDonald *et al.* 1995). Das spricht dafür, dass gewisse weitere Voraussetzungen für die histaminfreisetzende Wirkung erfüllt sein müssen. Auch wenn nicht auszuschließen ist, dass es an der Zelloberfläche von Immunzellen spezifische Rezeptoren gibt, mit denen TCTP interagiert, so ist es doch wahrscheinlicher, dass es sich um eine Wechselwirkung mit IgE-Molekülen handelt. Im Hinblick auf die beschriebenen Immunphänomene durch TCTP aus Parasiten wie Plasmodien (MacDonald *et al.* 2001) kann man spekulieren, dass die Sensibilisierung gegen ein nicht-humanes TCTP eine Rolle spielt. In der Folge käme es durch die große Homologie zu einer Reaktion gegen körpereigenes TCTP. Mit großer Wahrscheinlichkeit handelt es sich bei der histaminfreisetzenden Wirkung nicht um eine spezifische und physiologische Reaktion, sondern eher um einen Nebeneffekt.

Die Daten bezüglich der intrazellulären TCTP-Lokalisation zeigen abweichende Ergebnisse. Neben einer cytoplasmatischen Lokalisation wurde in mehreren Studien auch eine Kernlokalisierung für dieses Protein belegt, obwohl in der Proteinsequenz keinerlei Kernlokalisierungssignale vorhanden sind (Gachet *et al.* 1999, Guillaume *et al.* 2001, Li *et al.* 2001, Zhang *et al.* 2002). Einen Hinweis auf die mögliche Ursache dieser Diskrepanzen liefert die Beobachtung von Guillaume *et al.*, dass die Kernlokalisierung in den Keimzellstadien dominiert, die sich durch eine hohe mitotische Aktivität auszeichnen. Möglicherweise sind die Unterschiede durch die verschiedenen Proliferationsraten der verwendeten Zelllinien zu erklären. Eine Unterstützung dieser These wäre der Nachweis einer bevorzugten Kernlokalisierung in den proliferationsaktiven Melanomzellen. Eventuell handelt sich nicht um eine klassische Kernlokalisierung, sondern um eine Assoziation mit Cytoskelettproteinen im Bereich des Zellkerns während der Mitose. Ein weiterer denkbarer Weg ist die zellzyklusabhängige Wechselwirkung von TCTP mit Proteinen der Kernporen oder mit Proteinen, für die ein Shuttle in den Kern existiert.

Letztlich stellt sich die Frage, warum es ausgerechnet für ein Protein mit den oben beschriebenen Funktionen Sinn macht, auf translationeller Ebene reguliert zu werden. Erscheint es ökonomisch sinnvoll eine mRNA zu synthetisieren, um sie dann in translationsinaktiven mRNP-Komplexen zu lagern? Diese Art der Regulation ist attraktiv, da sie eine schnelle Anpassung an veränderte Wachstumsbedingungen ermöglicht. Der zeit- und energieaufwendige Vorgang der

Transkription wird umgangen. Zudem können mRNAs angepasst an die Bedürfnisse der Zelle aktiviert und wieder inaktiviert werden. Das ist weitaus schneller und effektiver als eine Regulation über mRNA-Neusynthese und Abbau. Hinzu kommt, dass ein anti-apoptotischer Faktor auch bei Zellschädigung noch aktivierbar sein sollte. Das ist über eine translationelle Regulation eher zu realisieren als über Transkriptionskontrolle. Die ansteigende intrazelluläre Calciumkonzentration als potentieller Modulator ist in diesem Zusammenhang überaus interessant.

Ist in Anbetracht der dargestellten Ergebnisse die Bezeichnung als translationell kontrolliertes Tumorprotein gerechtfertigt? Meiner Ansicht nach ist diese Bezeichnung, die sich aus den frühen Erkenntnissen zu diesem Protein ableitete, auch unter Berücksichtigung der neueren Erkenntnisse für dieses Protein passend. Einerseits weist sie darauf hin, dass es sich um ein Protein handelt, für dessen Synthese die translationelle Regulation eine besondere Bedeutung hat. Andererseits deutet der Name auf eine wichtige Funktion in der Regulation von Zellwachstum und Zelltod hin, die für die Pathophysiologie maligne transformierter Zellen von Bedeutung ist. Dessen ungeachtet spiegelt diese Bezeichnung nicht alle Aspekte wider. In jedem Fall ist TCTP ein prägnantes Beispiel für die Komplexität und Verflechtung biologischer Regulationsvorgänge.

#### **5.4 Ausblick**

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse leisten einen Beitrag zum Verständnis der molekularen Prozesse bei der translationellen Regulation des TCTP und können Ausgangspunkt für weiterführende Untersuchungen sein. An erster Stelle steht hierbei die Identifizierung und funktionelle Charakterisierung von weiteren UTR-bindenden Proteinen. Das vorgestellte humane Melanomzellsystem hat sich für diese Zwecke als geeignet erwiesen. Insbesondere stellt sich die Frage, welche Proteine in diesen Zelllysaten an die 5'UTR binden. Ihre Anreicherung und Identifikation mittels RNA-Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie würde den Vergleich mit anderen 5'TOP-mRNAs und ihren bindenden Proteinen zulassen bzw. zur Entdeckung neuer bislang unbekannter 5'TOP-bindender Proteine führen. Die an der Kaninchen-TCTP-mRNA erarbeiteten Ergebnisse können hierfür eine wertvolle Hilfestellung sein. Die Bindungsmotive der RNA-bindenden Proteine können durch weitere Zerlegung der UTRs in einzelne Abschnitte und gezieltes Einfügen von Mutationen ermittelt werden.

Wichtige funktionelle Untersuchungen sind der Nachweis der gefundenen Proteine in RNA-Protein-Komplexen, beispielsweise durch Supershift-Experimente mit spezifischen Antikörpern, und das Testen der translationshemmenden Wirkung in *in vitro* Translationsexperimenten.



Neben den 5'UTR-bindenden Proteinen sind die Proteine von besonderem Interesse, die den starken translationshemmenden Effekt der 3'UTR2 vermitteln. Die Untersuchung von Polysomen und mRNP-Komplexen zusätzlich zu den cytoplasmatischen Fraktionen kann den Anteil translationsinaktiver TCTP-mRNA in den jeweiligen Zelllinien abschätzen. Letztlich müssen die *in vitro* erarbeiteten Ergebnisse an *in vivo* Systemen durch Zelltransfektion und Proteinexpressionsstudien überprüft werden.

Die Assoziation der TCTP-mRNA mit Cytoskelettproteinen und in Frage kommenden Adapterproteinen kann durch parallele Untersuchungen von Zellen mit Immunhistochemie und *in situ* Hybridisierung untersucht werden. Interessant ist auch die Frage, ob sich die beiden Messenger in ihrer intrazellulären Lokalisation unterscheiden und ob sich die zellzyklusabhängige Lokalisation des Proteins auch in der mRNA-Lokalisation widerspiegelt.

Der Einfluss des Calciums auf die Translationseffektivität kann durch Zugabe eines  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionophors zu den Zellkulturen untersucht werden. In diesem Zusammenhang ist auch die Frage interessant, inwieweit Rapamycin, das bekanntermaßen die Translation von 5'TOP-mRNAs hemmt, die Translation der TCTP-mRNA einerseits und das Wachstumsverhalten der Tumorzellen andererseits beeinflusst. Schließlich gilt es, die Frage zu beantworten, wie die RNA-bindenden Proteine mit der allgemeinen Translationsmaschinerie in Wechselwirkung treten und welche Signalkaskaden für die Regulation dieser Interaktionen verantwortlich sind. Die daran beteiligten Signaltransduktionswege können durch den Einsatz spezifischer Hemmstoffe untersucht werden.

Bezüglich der Funktion des TCTP bleiben weiterhin viele Fragen offen. Es muss geklärt werden, ob der anti-apoptotische Effekt allein durch eine Verminderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu Stande kommt oder ob hier die Interaktion des TCTP mit anderen Proteinen eine wesentliche Rolle spielt. Durch Untersuchung von Protein-Protein-Wechselwirkungen können potentielle Bindungspartner des TCTP identifiziert werden.

Unklar ist weiterhin auch, wie die histaminfreisetzende Wirkung des TCTP zu erklären ist und ob dieser Effekt bei der Pathogenese von Allergien tatsächlich eine wichtige Rolle spielt. Wie kann es zur Wechselwirkung eines körpereigenen Proteins mit IgE-Antikörpern auf Mastzellen und Basophilen kommen? Wie und aus welchen Zellen gelangt dieses intrazelluläre Protein ins Serum?

Bedingt durch den regen Fortschritt auf den Gebieten von Genom- und Proteomforschung eröffnen sich eine Reihe interessanter Perspektiven. Vergleiche von Expressionsmustern von

---

Zellen, die verschiedenen Stimuli ausgesetzt wurden, gestatten Rückschlüsse auf gleichermaßen regulierte Gene und beteiligte Regulationsmechanismen.

## 6 Zusammenfassung

Das translationell kontrollierte Tumorprotein (TCTP) ist ein hochkonserviertes ubiquitär in Eukaryonten vorkommendes Protein. Seine Bezeichnung geht auf die erstmalige Beschreibung in Tumorzellen zurück und weist zugleich auf seine besondere Regulation auf der Ebene der Translation hin. Das zugehörige Gen wird entsprechend der „human genome database“ Nomenklatur mit *TPT1* bezeichnet und befindet sich beim Menschen auf dem langen Arm des Chromosom 13.

TCTP spielt eine wichtige Rolle bei der Regulation von Zellwachstum und Zelltod. Es interagiert zellzyklusabhängig mit Cytoskelettproteinen und hemmt die Apoptose durch Hemmung der Caspase 3. Von besonderer Bedeutung ist seine Fähigkeit,  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen zu binden, und eine wesentliche Funktion wird in der Sequestrierung von intrazellulärem Calcium gesehen.

Eine medizinische Bedeutung des TCTP wurde im Zusammenhang mit Tumorerkrankungen, Erkrankungen des allergischen Formenkreises und Infektionen durch Parasiten beschrieben. In chemoresistenten Melanomzellen kommt es zu einer ausgeprägten TCTP-Expressionssteigerung, die auf eine Bedeutung der anti-apoptotischen Wirkung bei der Entwicklung der Chemoresistenz hindeuten.

Eine weitere Besonderheit dieses Proteins ist, dass es neben der Kontrolle auf der Ebene der Transkription einer außergewöhnlichen Kontrolle auf Translationsebene unterliegt. Bei einer erhöhten Zellwachstumsrate kommt es zur Verschiebung der mRNA aus translationsinaktiven mRNP-Komplexen zu aktiven Polysomen. Als potentielle Bindungsstellen für RNA-bindende Proteine sind die untranslatierten Bereiche der mRNA von Bedeutung. Durch Verwendung alternativer Polyadenylierungssignale werden zwei verschieden lange TCTP-mRNAs gebildet, die mRNA1 mit einer Länge von 843 nt und die mRNA2 mit einer Länge von 1163 nt beim Kaninchen, die sich in der Länge ihrer 3'UTR unterscheiden. Die 5'UTR beinhaltet einen typischen 5'terminaler Oligopyrimidintrakt (5'TOP) und zeichnet sich durch einen besonderen GC-Reichtum aus, wohingegen in beiden Abschnitten der 3'UTR kein potentielles Bindungsmotiv zu finden ist.

Für diese Arbeit wurde zur Untersuchung grundlegender Regulationsphänomene die TCTP-mRNA des Kaninchens als geeignetes Tiermodell ausgewählt. Aufgrund der großen Homologien nicht nur im codierenden Bereich, sondern auch im Bereich der UTRs sind die an diesem Modellsystem erarbeiteten Ergebnisse auch für die Regulation der humanen TCTP-mRNA von hoher Relevanz. In *in vitro* Translationsexperimenten wurde gezeigt, dass die translationelle

Hemmung der TCTP-mRNA vor allem durch die 5'UTR vermittelt wird. Die 3'UTR1 hat keinen Einfluss auf die Translation, während die 3'UTR2 eine ausgeprägte inhibitorische Wirkung hat.

In RNA-Proteinbindungsstudien konnten eine Reihe von potentiellen Bindungspartnern der UTRs charakterisiert werden. Bei Verwendung von Extrakten verschiedener Kaninchengewebe ließen sich in Electromobility Shift Assays und UV-Crosslinking-Experimenten deutliche gewebespezifische Unterschiede bezüglich der RNA-bindenden Faktoren nachweisen. Bei Anreicherung und Untersuchung der interagierenden Proteine mittels RNA-Affinitätschromatographie und Massenspektrometrie ließen sich die isolierten Proteine aus Kaninchen-Retikulozytenlysat keinen bekannten Proteinen zuordnen. Bei dem angereicherten 5'UTR-bindenden Protein mit einem Molekulargewicht von 43 kD (p43) handelt es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit um hnRNP E1. In der 5'UTR der TCTP-mRNA befindet sich mit dem CU-reichen Differenzierungskontrollelement (DICE), das erstmals in der 3'UTR der 15-Lipoxygenase beschrieben wurde, ein typisches Bindungsmotiv für hnRNP E1.

Die am Tiermodell erarbeiteten Ergebnisse wurden durch Untersuchungen an chemosensiblen und chemoresistenten Melanomzellen ergänzt. An diesem medizinisch bedeutsamen System konnte gezeigt werden, dass die TCTP-Expression auf transkriptioneller und translationeller Ebene gesteigert ist. Eine Bedeutung dieses Proteins für die Entstehung der Chemoresistenz lässt sich in seiner anti-apoptotischen Wirkung vermuten.

Die besondere Bedeutung der translationellen Regulation in den Melanomzellen wurde durch die Charakterisierung von Kandidatenproteinen in RNA-Protein-Bindungsstudien belegt. Es ist gelungen, drei Cytoskelettproteine,  $\gamma$ -Actin,  $\beta$ -Tubulin und  $\alpha$ -Actinin, als Bindungspartner der TCTP-3'UTR zu identifizieren. Für die Wechselwirkung von  $\beta$ -Tubulin und  $\alpha$ -Actinin mit der TCTP-mRNA könnte insbesondere die Fähigkeit dieser beiden Proteine bedeutsam sein, Calciumionen zu binden. Potentielle Adapterproteine sollten in weiterführenden Untersuchungen identifiziert werden. Der Mechanismus der Translationshemmung und die Beteiligung der isolierten Faktoren können in funktionellen Studien untersucht werden. Die an *in vitro* Modellen erarbeiteten Ergebnisse sollten schließlich in *in vivo* Systemen überprüft werden.

---

**Literaturverzeichnis**

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD: *Molekularbiologie der Zelle*. 3. Auflage Weinheim, New York, Basel, Cambridge, Tokyo, VCH, 1995
- Anderson CW, Straus JW, Dudock BS: Preparation of a cell-free protein-synthesizing system from wheat germ. *Methods Enzymol.* . 1983, **101**: S.635-644
- Avni D, Shama S, Loreni F, Meyuhas O: Vertebrate mRNAs with a 5'-terminal pyrimidine tract are candidates for translational repression in quiescent cells: characterization of the translational cis-regulatory element. *Mol. Cell. Biol.* . 1994, **14**: S.3822-3833
- Baudet C, Perret E, Delpech B, Kaghad M, Brachet P, Wion D, Caput D: Differentially expressed genes in C6.9 glioma cells during vitamin D-induced cell death programm. *Cell Death Differ.*. 1998, **5**: S.116-125
- Benndorf R, Nürnberg P, Bielka H: Growth phase-dependent proteins of the Ehrlich Ascites Tumor analyzed by one- and two-dimensional electrophoresis . *Exp. Cell Res.*. 1988, **174**: S.130-138
- Bhisutthibhan J, Pan XQ, Hossler PA, Walker DJ, Yowell CA, Carlton J, Dame JB, Meshnick SR: The Plasmodium falciparum translationally controlled tumor protein and its reaction with the antimalarial drug artemisinin. *J. Biol. Chem.*. 1998, **273**: S.16192-16198
- Biberman Y, Meyuhas O: TOP mRNAs are translationally inhibited by a titratable repressor in both wheat germ extract and reticulocyte lysate. *FEBS Lett.* . 1999, **456**: S.357-360
- Böhm H, Benndorf R, Gaestel M, Gross B, Nürnberg P, Kraft R, Otto A, Bielka H: The growth-related protein p23 of the Ehrlich Ascites Tumor: Translational control, cloning and primary structure. *Biochem. Int.* . 1989, **19**: S.277-286
- Böhm H, Gross B, Gaestel M, Bommer UA, Ryffel G, Bielka H: The 5'-untranslated region of p23 mRNA from the Ehrlich Ascites Tumor is involved in translation control of the growth related protein p23. *Biomed. Biochem. Acta.* 1991, **50**: S.1193-1203
- Bommer UA, Borovjagin AV, Greagg MA, Jeffrey IW, Russell P, Laing KG, Lee M, Clemens MJ: The mRNA of the translationally controlled tumor protein p23/TCTP is a highly structured RNA which activates the dsRNA-dependent protein kinase PKR. *RNA.* 2002, **8**: S.1-19

- Bommer UA, Lazaris-Karatzas A, De Benedetti A, Nürnberg P, Benndorf R, Bielka H, Sonenberg N: Translational regulation of the mammalian growth-related protein p23: involvement of eIF-4E phosphorylation. *Cell. Mol. Biol. Res.* 1994, **40**: S.633-641
- Bonnet C, Perret E, Dumont X, Picard A, Caput D, Lenaers G: Identification and transcription control of fission yeast genes repressed by an ammonium starvation growth arrest. *Yeast*. 2000, **16**: S.23-33
- Caput D, Beutler B, Hartog K, Thayer R, Brown-Shimer S, Cerami A: Identification of a common nucleotide sequence in the 3'-untranslated region of mRNA molecules specifying inflammatory mediators. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1986, **83**: S.1670-1674
- Cayanis E et al.: High-resolution YAC-cosmid-STS map of human chromosome 13. *Genomics*. 1998, **47**: S.26-43
- Chitpatima ST, Brawerman G: Shifts in configuration of the 5'-noncoding region of a mouse messenger RNA under translational control. *J. Biol. Chem.* 1988, **263**: S.7164-7169
- Chitpatima ST, Makrides S, Bandyopadhyay R, Brawerman G: Nucleotide sequence of a major messenger RNA for a 21 kilodalton polypeptide that is under translational control in mouse tumor cells. *Nucl. Acids Res.* 1988, **16**: S.2350
- Chung S, Kim M, Choi W, Chung J, Lee K: Expression of translationally controlled tumor protein mRNA in human colon cancer. *Cancer Lett.* 2000, **156**: S.185-190
- Clemens MJ, Bommer UA: Translational control: the cancer connection. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 1999, **31**: S.1-23
- Conne B, Stutz A, Vassalli JD: The 3' untranslated region of messenger RNA: A molecular 'hotspot' for pathology. *Nat. Med.* . 2000, **6**: S.637-641
- Dasso MC, Jackson RJ: On the fidelity of mRNA translation in the nuclease-treated rabbit reticulocyte lysate system. *Nucleic Acids Res.* . 1989, **17**: S.3129-3144
- Dennis PB, Fumagalli S, Thomas G: Target of rapamycin (TOR): balancing the opposing forces of protein synthesis and degradation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 1999, **9**: S.49-54
- Descheemaeker KA, Wyns S, Nelles L, AuwerX J, Ny T, Collen D: Interaction of AP-1, AP-2 and SP-1-like proteins with two distinct sites in the upstream regulatory region of the plasminogen activator inhibitor-1 gene mediates the the phorbol 12-myristate 13-acetate response. *J. Biol. Chem.* 1992, **267**: S.15086-15091

- Dever TE: Gene-specific regulation by general translation factors. *Cell*. 2002, **108**: S.545-556
- Dreyfuss G, Kim VN, Kataoka N: Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*. 2002, **3**: S.195-205
- Faisst S, Meyer S: Compilation of vertebrate-encoded transcription factors. *Nucleic Acids Res.*. 1992, **20**: S.3-26
- Fisher TC, Milner AE, Gregory CD, Jackman AL, Aherne GW, Hartley JA, Dive C, Hickman JA: bcl-2 modulation of apoptosis induced by anticancer drugs: resistance to thymidylate stress is independent of classical resistance pathways. *Cancer Res.* . 1993, **53**: S.3321-3326
- Frevel M, Bakheet T, Silva AM, Hissong JG, Khabar K, Williams B: p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element containing transcripts. *Mol. Cell. Biol.*. 2003, **23**: S.425-436
- Gachet Y, Tournier S, Lee M, Lazaris-Karatzas A, Poulton T, Bommer UA: The growth-related, translationally controlled protein p23 has properties of a tubulin binding protein and associates transiently with microtubules during the cell cycle. *J. Cell Science*. 1999, **112**: S.1257-1271
- Gehring NH, Frede U, Neu-Yilik G, Hundsdoerfer P, Vetter B, Hentze MW, Kulozik AE: Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat. Genet.* . 2001, **28**: S.389-392
- Goh KC, de Veer MJ, Williams B: The protein kinase PKR is required for p38 MAPK activation and the innate immune response to bacterial endotoxin. *EMBO J*. 2000, **19**: S.4292-4297
- Gouble A, Morello D: Synchronous and regulated expression of two AU-binding proteins, AUF1 and HuR, throughout murine development. *Oncogene*. 2000, **19**: S.5377-5384
- Gross B, Gaestel M, Böhm H, Bielka H: cDNA sequence coding for a translationally controlled human tumor protein. *Nucl. Acids Res.*. 1989, **17**: S.8367
- Grzybowska EA, Wilczynska A, Siedlecki JA: Regulatory functions of 3'UTRs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* . 2001, **288**: S.291-295
- Guhaniyogi J, Brewer G: Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene*. 2001, **265**: S.11-23
- Guillaume E, Pineau C, Evrard B, Dupaix A, Moertz E, Sanchez JC, Hichstrasser DF, Jegou B:

- 
- Cellular distribution of translationally controlled tumor protein in rat and human testes. *Proteomics*. 2001, **1**: S.880-889
- Haghighat NG, Ruben L: Purification of novel calcium binding proteins from *Trypanosoma brucei*: properties of 22-, 24- and 38-kilodalton proteins. *Mol. Biochem. Parasit.*. 1992, **51**: S.99-110
- Hentze MW: Translational regulation: versatile mechanisms for metabolic and developmental control. *Curr. Opin. Cell Biol.* . 1995, **7**: S.393-398
- Hentze MW, Kuhn LC: Molecular control of vertebrate iron metabolism: mRNA-based regulatory circuits operated by iron, nitric oxide, and oxidative stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*. 1996, **93**: S.8175-8182
- Hidalgo M, Rowinsky EK: The rapamycin-sensitive signal transduction pathway as a target for cancer therapy. *Oncogene*. 2000, **19**: S.6680-6686
- Jansen RP: RNA-cytoskeletal associations. *FASEB J.*. 1999, **13**: S.455-466
- Jefferies HB, Fumagalli S, Dennis PB, Reinhard C, Pearson RB, Thomas G: Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J.*. 1997, **16**: S.3693-3704
- Jefferies HB, Reinhard C, Kozma SC, Thomas G: Rapamycin selectively represses translation of the "polypyrimidine tract" mRNA family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994, **91**: S.4441-4445
- Kalachikov S et al.: Cloning and gene mapping of 13q14 region deleted in chronic lymphocytic leukemia. *Genomics*. 1997, **42**: S.369-377
- Kang HS, Lee MJ, Song H, Han SH, Kim YM, Im JY, Choi I: Molecular identification of IgE-dependent histamine-releasing factor as a B cell growth factor. *J. Immunol.*. 2001, **166**: S.6545-6554
- Kern MA, Helmbach H, Artuc M, Karmann D, Jurgovsky K, Schadendorf D: Human melanoma cell lines selected in vitro displaying various levels of drug resistance against cisplatin, fotemustine, vindesine or etoposide: modulation of proto-oncogene expression. *Anticancer Res.*. 1997, **17**: S.4359-4370
- Kim M, Jung Y, Lee K, Kim C: Identification of the calcium binding sites in translationally controlled tumor protein. *Arch. Pharm. Res.*. 2000, **23**: S.633-636



- Kim SH, Cairns N, Fountoulakis M, Lubec G : Decreased brain histamine-releasing factor protein in patients with Down syndrome and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2001, **300**: S.41-44
- Kloc M, Zearfoss NR, Etkin LD: Mechanisms of subcellular mRNA localization. *Cell.* 2002, **108**: S.533-544
- Konarska MM, Sharp PA: Electrophoretic separation of complexes involved in the splicing of precursors to mRNA. *Cell.* 1986, **46**: S.845-855
- Kramer M und Coen DM: *Current protocols in molecular biology*. John Wiley & Sons, Inc., 1995
- Lachance P, Miron M, Raught B, Sonenberg N, Lasko P: Phosphorylation of eukaryotic translation factor 4E is critical for growth. *Mol. Cell. Biol.* 2002, **22**: S.1656-1663
- Lage H, Christmann M, Kern MA, Dietel M, Pick M, Kaina B, Schadendorf D: Expression of DNA repair proteins hMSH2, hMSH6, hMLH1, O6-methylguanine-DNA methyltransferase and N-methylpurine-DNA glycosylase in melanoma cells with acquired drug resistance. *Int. J. Cancer* . 1999, **80**: S.744-750
- Lander ES et al.: Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* . 2001, **409**: S.860-921
- Law BK, Chytil A, Dumont N, Hamilton EG, Waltner-Law ME, Aakre ME, Covington C, Moses HL: Rapamycin potentiates transforming growth factor beta-induced growth arrest in nontransformed, oncogene-transformed, and human cancer cells. *Mol. Cell. Biol.* . 2002, **22**: S.8184-8198
- Leibold EA, Munro HN: Cytoplasmic protein binds in vitro to a highly conserved sequence in the 5' untranslated region of ferritin heavy- and light-subunit mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988, **85**: S.2171-2175
- Li F, Zhang D, Fujise K: Characterization of fortilin, a novel antiapoptotic protein. *J. Biol. Chem.* . 2001, **276**: S.47542-47549
- MacDonald S, Bhisutthibhan J, Shapiro TA, Rogerson SJ, Taylor TE, Tembo M, Langdon JM, Meshnick SR: Immune mimicry in malaria: Plasmodium falciparum secretes a functional histamine-releasing factor homolog in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001, **98**: S.10829-10832

- MacDonald S, Rafner T, Langdon J, Lichtenstein L: Molecular identification of an IgE-dependent histamine-releasing factor. *Science*. 1995, **269**: S.688-690
- Meyuhas O: Synthesis of the translational apparatus is regulated at the translational level. *Eur. J. Biochem.* 2000, **267**: S.6321-6330
- Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF: Vertebrate pseudogenes. *FEBS Lett.* 2000, **468**: S.109-114
- Misquitta CM, Iyer VR, Werstiuk ES, Grover AK: The role of 3'-untranslated region (3'-UTR) mediated mRNA stability in cardiovascular pathophysiology. *Mol. Cell. Biochem.* 2001, **224**: S.53-67
- Moler EJ, Chow ML, Mian IS: Analysis of molecular data using generative and discriminative methods. *Physiol. Genomics*. 2000, **18**: S.109-126
- Morris DR, Kakegawa T, Kaspar RL, White MW: Polypyrimidine tracts and their binding proteins: Regulatory sites for posttranscriptional modulation of gene expression. *Biochemistry*. 1993, **32**: S.2931-2937
- Nielson HV, Johnson AH, Sanchez JC, Hochstrasser DF, Schiøtz PO: Identification of a basophil leukocyte interleukin-3-regulated protein that is identical to IgE-dependent histamine-releasing factor. *Allergy*. 1998, **53**: S.642-652
- Oikawa K, Ohbayashi T, Mimura J, Fujii-Kuriyama Y, Teshima S, Rokutan K, Mukai K, Kuroda M: Dioxin stimulates synthesis and secretion of IgE-dependent histamine-releasing factor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002, **290**: S.984-987
- Oleynikov Y, Singer RH: RNA localization: different zipcodes, same postman. *Trends Cell Biol.* 1998, **8**: S.381-383
- Orphanides G, Reinberg D: A unified theory of gene expression. *Cell*. 2002, **108**: S.439-451
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Shatsky IN, Hentze MW: Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining. *Cell*. 2001, **104**: S.281-290
- Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW: mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end. *Cell*. 1997, **89**: S.597-606
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Cans C, Neubauer G, Bomsztyk K, Superti-Furga G, Hentze

- 
- MW: c-Src-mediated phosphorylation of hnRNP K drives translational activation of specifically silenced mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* . 2002, **22**: S.4535-4543
- Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Standart N, Thiele BJ: Translation of 15-lipoxygenase mRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region. *EMBO J.* 1994, **13**: S.1476-1481
- Pelham HR, Jackson RJ: An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* . 1976, **67**: S.247-256
- Pellizzoni L, Cardinali B, Lin-Marq N, Mercanti D, Pierandrei-Amaldi P: A *Xenopus laevis* homologue of the La autoantigen binds the pyrimidine tract of the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs in vitro: implication of a protein factor in complex formation. *J. Mol. Biol.* . 1996, **259**: S.904-915
- Pellizzoni L, Lotti F, Rutjes SA, Pierandrei-Amaldi P: Involvement of the *Xenopus laevis* Ro60 autoantigen in the alternative interaction of La and CNBP proteins with the 5'UTR of L4 ribosomal protein mRNA. *J. Mol. Biol.* . 1998, **281**: S.593-608
- Pesole G, Mignone F, Gissi C, Grillo G, Licciulli F, Liuni S: Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions. *Gene* . 2001, **276**: S.73-81
- Preiss T, Hentze MW: From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes. *Curr. Opin. Genet. Dev.*. 1999, **9**: S.515-521
- Rajagopalan LE, Westmark CJ, Jarzembowski JA, Malter JS: hnRNP C increases amyloid precursor protein (APP) production by stabilizing APP mRNA. *Nucleic Acids Res.* . 1998, **26**: S.3418-3423
- Rao K, Chen L, Gnanasekar M, Ramaswamy K: Cloning and characterization of a calcium-binding, histamine-releasing protein from *Schistosoma mansoni*. *J. Biol. Chem.*. 2002, **277**: S.31207-31213
- Reimann I, Huth A, Thiele H, Thiele BJ: Suppression of 15-lipoxygenase synthesis by hnRNP E1 is dependent on repetitive nature of LOX mRNA 3'-UTR control element DICE. *J. Mol. Biol.*. 2002, **315**: S.965-974
- Rouault TA, Hentze MW, Haile DJ, Harford JB, Klausner RD: The iron-responsive element binding protein: a method for the affinity purification of a regulatory RNA-binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, **86**: S.5768-5772

- Sage-Ono K, Ono M, Harada H, Kamada H: Dark-induced accumulation of mRNA for a homolog of translationally controlled tumor protein (TCTP) in Pharbitis. *Plant Cell Physiol.* 1998, **39**: S.357-360
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning - A laboratory manual*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- Sanchez JC, Schaller D, Ravier F, Golaz O, Jaccoud S, Belet M, Wilkins MR, James R, Deshusses J, Hochstrasser D : Translationally controlled tumor protein: A protein identified in several nontumoral cells including erythrocytes. *Electrophoresis*. 1997, **18**: S.150-155
- Schmoll HJ, Höffken K, Possinger K: *Kompendium Internistische Onkologie*. 3. Auflage Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag, 1999
- Schroeder JT, Lichtenstein LM, MacDonald S: An immunoglobulin E-dependent recombinant histamine-releasing factor induces interleukin-4 secretion from human basophils. *J. Exp. Med.* 1996, **183**: S.1265-1270
- Sinha P, Kohl S, Fischer J, Hütter G, Kern M, Köttgen E, Dietel M, Lage H, Schnölzer M, Schadendorf D: Identification of novel proteins associated with the development of chemoresistance in malignant melanoma using two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*. 2000, **21**: S.3048-3057
- Siomi H, Dreyfuss G: RNA-binding proteins as regulators of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* . 1997, **7**: S.345-353
- St Johnston D, Nüsslein-Volhard C: The origin of pattern and polarity in the Drosophila embryo. *Cell*. 1992, **68**: S.201-219
- Stolovich M, Tang H, Hornstein E, Levy G, Cohen R, Bae SS, Birnbaum MJ, Meyuhas O: Transduction of growth or mitogenic signals into translational activation of TOP mRNAs is fully reliant on the phosphatidylinositol 3-kinase-mediated pathway but requires neither S6K1 nor rpS6 phosphorylation. *Mol. Cell. Biol.* . 2002, **22**: S.8101-8113
- Stürzenbaum SR, Kille P, Morgan AJ: Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumor protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus* . *Biochim. Biophys. Acta*. 1998, **1398**: S.294-304
- Sureau A, Perbal B: Several mRNAs with variable 3'untranslated regions and different stability

- 
- encode the human PR264/SC35 splicing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, **91**: S.932-936
- Thaw P, Baxter NJ, Hounslow AM, Price C, Waltho JP, Craven CJ: Structure of TCTP reveals unexpected relationship with guanine nucleotide-free chaperones. *Nat. Struct. Biol.* . 2001, **8**: S.701-704
- Thiele H, Berger M, Lenzner C, Kühn H, Thiele BJ: Structure of the promoter and complete sequence of the gene coding for the rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP) p23. *Eur. J. Biochem.* . 1998, **257**: S.62-68
- Thiele H, Berger M, Skalweit A, Thiele BJ: Expression of the gene and processed pseudogenes encoding the human and rabbit translationally controlled tumor protein (TCTP). *Eur. J. Biochem.*. 2000, **267**: S.5473-5481
- Thomas G, Thomas G: Translational control of mRNA expression during the early mitogenic response in Swiss mouse 3T3 cells. *J. Cell Biol.*. 1986, **103**: S.2137-2144
- Thomas G, Thomas G, Luther H: Transcriptional and translational control of cytoplasmic proteins after stimulation of quiescent Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*. 1981, **78**: S.5712-5716
- Tuynder M, Susini L, Prieur S, Besse S, Fiucci G, Amson R, Telerman A: Biological models and genes of tumor reversion: Cellular reprogramming through tpt1/TCTP and SIAH-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, **99**: S.14976-81
- Vanin EF: Processed pseudogenes-characteristics and evolution. *Ann. Rev. Genet.* . 1985, **19**: S.253-272
- Vercoutter-Edouart AS, Czeszak X, Crepin M, Lemoine J, Boilly B, Le Bourhis X, Peyrat JP, Hondermarck H: Proteomic detection of changes in protein synthesis induced by fibroblast growth factor-2 in MCF-7 human breast cancer cells. *Exp. Cell. Res.* . 2001, **262**: S.59-68
- Walker DJ, Pitsch JL, Peng MM, Robinson BL, Peters W, Bhisutthibhan J, Meshnick SR: Mechanisms of artemisinin resistance in the rodent malaria pathogen *Plasmodium yoelii*. *Antimicrob. Agents Chemother.*. 2000, **44**: S.344-347
- Walsh BJ, Gooley AA, Williams KL, Breit SN: Identification of macrophage activation association proteins by two-dimensional gel electrophoresis and microsequencing. *J.*

- 
- Leukocyte Biol.* 1995, **57**: S.507-512
- Wickens M: Springtime in the desert. *Nature* . 1993, **363**: S.305-306
- Wickens M, Anderson P, Jackson RJ: Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. *Curr. Opin. Genet. Dev.* . 1997, **7**: S.220-232
- Williams B: PKR; a sentinel kinase for cellular stress. *Oncogene*. 1999, **18**: S.6112-6120
- Wilson GM, Sutphen K, Moutafis M, Sinha S, Brewer G: Structural remodeling of an A + U-rich RNA element by cation or AUF1 binding. *J. Biol. Chem.* . 2001, **276**: S.38400-38409
- Wray W, Bouliskas T, Wray VP, Hancock R: Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* . 1981, **118**: S.197-203
- Xing H, Zhang S, Weinheimer C, Kovacs A, Muslin AJ: 14-3-3 proteins block apoptosis and differentially regulate MAPK cascades. *EMBO J.* 2000, **19**: S.349-358
- Xu A, Bellamy AR, Taylor JA: Expression of translationally controlled tumor protein is regulated by calcium at both the transcriptional and post-transcriptional level. *Biochem. J.* 1999, **342**: S.683-689
- Yan L, Fei K, Bridge D, Sarras MP: A cnidarian homologue of translationally controlled tumor protein (p23/TCTP). *Dev. Genes Evol.* 2000, **210**: S.507-511
- Yarm FR: Plk phosphorylation regulates the microtubule-stabilizing protein TCTP. *Mol. Cell. Biol.* 2002, **22**: S.6209-6221
- Yenofsky R, Cereghini S, Krowczynska A, Brawerman G: Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide. *Mol. Cell. Biol.* 1983, **3**: S.1197-1203
- Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjoyan ZH, Fujise K: Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J. Biol. Chem.* . 2002, **277**: S.37430-37438
- Zhu J, Hayakawa A, Kakegawa T, Kaspar RL: Binding of the La autoantigen to the 5' untranslated region of a chimeric human translation elongation factor 1A reporter mRNA inhibits translation in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* . 2001, **1521**: S.19-29

---

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Bernd-Joachim Thiele für die sehr gute Betreuung dieser Arbeit und die Möglichkeit, die Thematik selbständig in seinem Labor bearbeiten zu können. Ebenso möchte ich ihm für die Unterstützung bei meiner wissenschaftlichen Ausbildung und die vielen anregenden und wertvollen Diskussionen danken.

Ich danke Frau Dr. Antje Huth, Frau Dr. Iris Reimann, Frau Dr. Angela Skalweit und Herrn Alexander Kloss dafür, dass sie mir den Einstieg in die molekularbiologische Forschungsarbeit erleichterten. Dr. Holger Thiele und Holger Andree danke ich für die gemeinsame Erarbeitung neuer Erkenntnisse über das translationell kontrollierte Tumorprotein und die vielen hilfreichen Diskussionen zu diesem Thema. Frau Irina Schmidt danke ich für die Bereitstellung von Plasmidkonstruktionen. Frau Dr. Anke Doller danke ich für die zahlreichen wertvollen Tipps bei der täglichen Laborarbeit.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Hermann Lage und seinen Mitarbeitern im Institut für Pathologie der Charité für die Bereitstellung und Anzucht der Melanomzellen.

Herrn Dr. Thilo Kähne danke ich sehr herzlich für die massenspektrometrischen Untersuchungen und für die freundlichen Erläuterungen zu dieser Methode.

Ich danke allen Mitarbeitern der Institute für Biochemie und Physiologie der Charité, die mir mit wertvollen Hinweisen und freundlicher Unterstützung zur Seite standen. Besonders danke ich Frau Bürger für die Sequenzierung meiner Plasmidkonstruktionen.

Mein herzlicher Dank gilt meinen Eltern für ihre ständige Unterstützung. Meiner Familie und allen Freunden sei herzlich gedankt für ihr Interesse und ihre ständige Anteilnahme an meiner Arbeit. Meinem Freund Florian danke ich für seine Hilfe und sein liebevolles Verständnis.

---

**Erklärung**

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, den 03. März 2003



---

## Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name: Juliane Halangk  
 Geburtsdatum: 09.04.1977  
 Geburtsort: Magdeburg

### Schulbildung

06/1995 Abitur, Johann-Gottfried-Herder-Gymnasium, Magdeburg

### Hochschulstudium

10/1995-06/2002 Studium der Humanmedizin, Humboldt-Universität zu Berlin  
 09/1997 Ärztliche Vorpüfung  
 09/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 06/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 04/1999-03/2002 Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes

### Famulaturen

13.03.-12.04.1998 Klinik für Kardiologie, Pulmologie und Angiologie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg  
 22.02.-21.03.1999 Kurs „Molekulare Medizin in der Inneren Medizin“, Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité Berlin  
 25.07.-24.08.1999 Praxis Dr. Bauer/ Dr. Strohbach, Schwerpunkt: Hämatologie/Onkologie/HIV, Berlin  
 30.08.-16.10.1999 Gastrointestinal Unit, Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School, Boston, USA

### Praktisches Jahr

24.04.-12.08.2001 Klinik für Viszerale und Transplantationschirurgie, Inselspital, Universität Bern, Schweiz  
 13.08.-30.11.2001 Medizinische Klinik mit Schwerpunkt Hepatologie und Gastroenterologie der Charité Berlin

---

03.12.01- 25.03.02 Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin der Charité  
Berlin

Berlin, den 03. März 2003