

Universitätsklinikum Ulm
Institut für Humangenetik
Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. Guntram Borck

**Zur Bedeutung
der Interaktion von Proteinen
mit 3' nicht-translatierten Sequenzen
der Neurofibromin mRNA**

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Humanbiologie (Dr. biol. hum.)
der Medizinischen Fakultät der Universität Ulm

vorgelegt von

Andrea Maria Striebel
Ulm

2015

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Thomas Wirth

1. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. Günter Assum

2. Berichterstatter: apl. Prof. Dr. Pamela Fischer-Posovszky

Tag der Promotion: 22.04.2016

INHALTSVERZEICHNIS

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
1. EINLEITUNG	1
1.1 Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1 (NF1)	1
1.2 Molekulare Daten der NF1	2
1.2.1 Das <i>NFI</i> -Gen.....	2
1.2.2 Homologie zwischen Mensch und Maus.....	3
1.2.3 Mutationen im <i>NFI</i> -Gen	5
1.3 Das <i>NFI</i>-Gen als Tumorsuppressor-Gen	7
1.4 Neurofibromin, das <i>NFI</i>-Genprodukt und seine Funktionen	8
1.5 Die Regulation des <i>NFI</i>-Gens	9
1.6 Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen	11
1.6.1 Subzelluläre Lokalisation der mRNA	11
1.6.2 Stabilität der mRNA	12
1.6.3 Beeinflussung der Translationsrate	13
1.7 Die Protein-binde Regionen innerhalb der NF1-3'UTR	14
1.8 Zielsetzung	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1 Material	18
2.1.1 Chemikalien.....	18
2.1.2 Enzyme	19
2.1.3 Längenstandards und Molekulargewichtsmarker	20
2.1.4 Plasmide, Bakterien- und Hefestämme	21
2.1.5 Proteinfiler und cDNA Bank	21
2.1.6 Untersuchtes Patientenmaterial	22
2.1.7 Standardlösungen	22
2.1.8 Kulturmedien und Antibiotika.....	23
2.1.9 Primersequenzen.....	24
2.1.10 Reagentiensysteme (KITs)	27
2.1.11 Software und Datenbanken.....	28
2.2 Methoden	31
2.2.1 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	31
2.2.2 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration	32
2.2.3 Sequenzierung von Plasmiden.....	33
2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten mit ALFexpress	34
2.2.5 Analyse von Sequenzveränderungen.....	35
2.2.6 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten	35
2.2.7 In vitro-Mutagenese.....	36

2.2.8 <i>In vitro</i> -Transkription	37
2.2.9 Electrophoretic mobility shift assay	38
2.2.10 Untersuchung von RNA-Protein Interaktionen im Hefe 3-Hybrid-System	40
2.2.11 Hybridisierung der filtergebundenen Proteine mit RNA.....	48
2.2.12 Gewinnung und Analyse rekombinanter Proteine aus <i>E.coli</i>	49
2.2.13 Zellkultur	52
2.2.14 Transiente Transfektion von Eukaryontenzellen.....	52
2.2.15 Northern-Blot	53
3. ERGEBNISSE.....	57
3.1 Mutationsanalysen der 3'-nicht-translatierten Region des <i>NF1</i>-Gens.....	57
3.1.1 Untersuchungen zur Expression beider <i>NF1</i> -Allele.....	57
3.1.2 Analyse von Sequenzveränderungen.....	60
3.2 Funktionelle Analysen der <i>NF1</i>-3'UTR.....	69
3.2.1 Charakterisierung von <i>NF1</i> -PBR5 auf RNA Ebene	69
3.2.3 Identifikation interagierender Proteine mit Teilbereichen der <i>NF1</i> -3'UTR.....	77
3.2.4 Einfluss auf die RNA-Stabilität durch Proteinbindung an die <i>NF1</i> -3'UTR.....	92
4. DISKUSSION	99
4.1 Mutationssuche innerhalb der <i>NF1</i> 3'UTR	100
4.2 Funktionelle Analysen der <i>NF1</i>-3'UTR.....	104
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	116
6. LITERATURVERZEICHNIS	118

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

3-AT	3-Amino-1,2,4-Triazol
3'UTR	3'-nicht-translatierte Region (3' untranslated region)
5-FOA	5-Fluoroorotic Säure
5'UTR	5'-nicht-translatierte Region (5' untranslated region)
AD	Aktivierungsdomäne
APS	Ammoniumpersulfat
Amp	Ampicillin
ARE	AU-reiche Elemente
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumine)
CALF	Café-au-lait-Fleck
cDNA	copy-DNA
Ci	Curie ($1\mu\text{Ci}=3,7\times 10^4\text{ Bq}$)
CTP	Cytidintriphosphat
DBD	DNA-Bindedomäne
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphate
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotide
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure (Ethylenediaminetetraacetic acid)
EGTA	Ethylen Glycol-bis- β -aminoethyl Ether
EMSA	electrophoretic mobility shift assay (syn.: Bandshift)
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
FCS	foetales Kälberserum (fetal calf serum)
FR	Fragment
g	Gravitationskonstante (Erdbeschleunigung)
GAP	GTPase aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin
Gly	Glycin
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor (granulocyte macrophage colony-stimulating factor)
GRD	GAP-related domain
GTP	Guanosintriphosphat
his3	drittes Enzym der Histidinbiosynthese
hnRNP	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein
HP	Hybridprotein
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactosid
IRE	iron responsive element
IRP	iron regulatory element
kb	Kilobasenpaare
Konz.	Konzentration
<i>lacZ</i> -Gen	Gen des Lactose Operons, kodiert für das Enzym β -Galactosidase

LB	Luria Bertani
LOH	Heterozygotieverlust (loss of heterozygosity)
mA	Milliampere (SI-Einheit der elektrischen Stromstärke)
MAP	Mikrotubuli assoziiertes Protein
miR	microRNA
mRNA	messenger ribonucleic acid
NF	Neurofibromatose
NFAR	nuclear Factor associated with double-stranded RNA
nt	Nukleotide
OD	optische Dichte (Extinktion)
ORF	offenes Leseraster (open reading frame)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBR	Protein-Binde Region
PBS	isotonischer Phosphatpuffer
PCR	Polymerase chain reaction
PKR	Proteinkinase R
PMSF	Phenylmethansulfon-säurechlorid
PTT	Protein truncation Test
PVDF	Polyvinylidenfluorid (Membrankunststoff)
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RZPD	Resource Center German Human Genome Project
rCTP	Ribocytidintriphosphat
rNTP	Ribonukleotide
RAS	Proto-Onkogen (Rat sarcoma)
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-PCR
SD-Medium	synthetic dropout Medium für Hefen
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodium dodecyl sulfate)
Ser	Serin
SNP	single nucleotide polymorphism
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
trp1	erstes Enzym der Tryptophansynthese
Tyr	Tyrosin
ura3	drittes Enzym der Uracilbiosynthese
U	unit (Einheit für die Enzymaktivität)
UV	Ultraviolett
V	Volt
VT	Volumenanteil
v/v	volume/volume
w/v	weight/volume
ZNS	Zentralnervensystem

1. EINLEITUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit ist die 3'-nicht-translatierte Region (3'UTR) der Neurofibromatose Typ 1 (NF1) mRNA sowie die Funktion der dort lokalisierten Protein-Binderegionen. Die NF1 wird auch nach dem deutschen Pathologen Friedrich Daniel von Recklinghausen (1882), der als erster den Zusammenhang zwischen Nervensystem und Hauttumoren herstellte, als „von Recklinghausen'sche Neurofibromatose“ bezeichnet. Die Erkrankung folgt einem autosomal dominanten Erbgang und NF1 ist mit einer Inzidenz von etwa 1:3500 Lebendgeburten weltweit eine der häufigsten autosomal dominanten Erbkrankheiten des Menschen (Huson et al. 1994; Riccardi 1992). Auffällig dabei ist die relativ hohe Anzahl an sporadisch auftretenden Fällen, etwa 40-50 % der Erkrankungen werden auf Neumutationen zurückgeführt. Neben der bisher erwähnten NF1 werden heute nach einer Einteilung, die Riccardi 1992 aufgrund des klinischen Erscheinungsbildes vornahm, acht verschiedene Typen der Neurofibromatosen berücksichtigt. Lediglich die zentrale Form (Typ 2) lässt sich von der peripheren Neurofibromatose (Typ 1) auf molekulargenetischer Ebene sicher unterscheiden.

1.1 Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1 (NF1)

Die Diagnose der NF1 wird durch ein extrem variables Krankheitsbild erschwert. Selbst für erkrankte Mitglieder einer Familie ist eine Vorhersage des Krankheitsverlaufs bei erblichen Fällen bisher nicht möglich. Aus diesem Grund wurden 1987 auf einer Konferenz des National Institute of Health (NIH) der USA Diagnosekriterien erarbeitet (Stumpf et al. 1987). Diese Kriterien werden auch heute einer Diagnose auf NF1 zugrunde gelegt (Huson 2008). Mindestens zwei oder mehr der nachfolgenden Kriterien müssen bei einem Patienten für die Diagnose erfüllt sein:

- Zwei oder mehr Neurofibrome jeglichen Typs, oder ein plexiformes Neurofibrom
- Das Auftreten von 6 oder mehr milchkaffee-farbenen, hyperpigmentierten Hautarealen, sogenannte Café-au-lait Flecken (CALF)
- Axilläres und inguinales Freckling
- Gliome des Nervus opticus
- Zwei oder mehr Lischknötchen (Iris-Hamartome)

- Skelettanomalien wie Keilbein-Flügeldysplasie, Dysplasie langer Röhrenknochen bzw. Knochenversmälnerungen oder Pseudoarthrose
- Ein Verwandter ersten Grades mit gesicherter Diagnose für NF1

Neben diesen diagnostisch relevanten Symptomen können bei NF1-Patienten weitere Komplikationen, wie z.B. Bluthochdruck, Neurofibrome des Magen-Darm-Trakts oder Buckelbildung bei gleichzeitiger seitlicher Verkrümmung auftreten. Ferner besteht ein erhöhtes Risiko, maligne Tumore wie Glioblastome und Neurofibrosarkome auszubilden. Außerdem neigen Betroffene zu Krampfanfällen und Lernschwierigkeiten bis hin zu geistiger Retardierung (Kayl und Moore III. 2000). Die Übersicht von Williams und Kollegen (Williams et al. 2009) zeigt, dass das Auftreten sowie die Ausprägung der Symptome auch altersabhängig ist, was eine Diagnose zusätzlich erschwert. Neuere Untersuchungen zeigen, dass einige der Diagnosekriterien für NF1, wie veränderte Pigmentierung, auch bei anderen Krankheitsbildern wie dem Legius-Syndrom vorkommen (Brems et al., 2007; Spurlock et al. 2009) und damit eine sichere Diagnose von NF1 besonders bei Patienten mit leichten Formen der NF1 schwierig sein kann. Vor diesem Hintergrund wird von Experten vorgeschlagen, das Vorliegen einer krankheitsauslösenden Mutation im *NF1*-Gen als weiteres Diagnosekriterium aufzunehmen (Huson 2008).

1.2 Molekulare Daten der NF1

1.2.1 Das *NF1*-Gen

Das für die Erkrankung NF1 verantwortliche Gen wurde im Jahr 1989 in einer internationalen kooperativen Studie auf Chromosom 17q11.2 lokalisiert. Da zwei NF1-Patienten gefunden werden konnten, die balancierte Translokationen mit jeweils einem Bruchpunkt in 17q11.2 aufwiesen (Schmidt et al. 1987; Ledbetter et al. 1989), konnten drei unabhängige Gruppen Teile eines Gens aus der Bruchpunktregion klonieren, das bei NF1-Patienten tatsächlich Mutationen aufwies (Cawthon et al. 1990a; Viskochil et al. 1990; Wallace et al. 1991; Marschuk et al. 1991).

Bei der ursprünglichen Suche nach NF1-Kandidatengenen fanden sich in einem großen Intron - dem Intron 27b - drei Gene, die in entgegengesetzter Leserichtung transkribiert werden (Cawthon et al. 1990b; Cawthon et al. 1991; Viskochil et al. 1990). Bei zweien

dieser Gene, EVI2A und EVI2B (Ecotropic virus integration site), handelt es sich um menschliche Homologe zu Mausgenen. Diese Sequenzen wurden bei der Maus als bevorzugte virale Integrationsstellen bei Retrovirus-induzierter myeloischer Leukämie identifiziert (Buchberg et al. 1990a). Das dritte dieser Gene kodiert für das Oligodendrozyten-Myelin-Glykoprotein (OMGP), das in den Oligodendrozyten des ZNS exprimiert wird. Unklar ist noch, ob diese Gene im Zusammenhang mit NF1 eine Rolle spielen. Ebenso ist noch offen, ob im bisher nur teilweise untersuchten Intron 1 mit ca. 140 kb weitere Gene liegen (Li et al. 1995).

Das *NF1*-Gen erstreckt sich über einen Bereich von über 350 kb genomischer DNA und ist in mindestens 61 Exons organisiert. Von diesen werden vier alternativ, zum Teil gewebsspezifisch, eingespleißt (Upadhyaya 2008). Aufgrund von Northern-Blot Analysen besitzt die NF1-mRNA eine Länge von etwa 11-13 kb (Wallace et al. 1991), wobei das offene Leseraster nur 8571 Nukleotide (im Falle der größten Spleißvariante) umfaßt, die für ein Protein mit 2857 Aminosäuren kodieren. Von den verbleibenden Nukleotiden entfallen 484 Basen auf die 5'-nicht-translatierte-Region (5'UTR) und die Mehrzahl überspannt die auffällig lange 3'UTR. Die 3'-nicht-translatierte-Region des *NF1*-Gens umfasst damit 3497 Basen und es liegt kein weiteres Intron in diesem Bereich. In der NF1-3'UTR konnten insgesamt fünf mögliche Polyadenylierungssignale gefunden werden. Allerdings scheinen nur zwei beim Menschen von Bedeutung zu sein. Damit lässt sich der oben erwähnte Längenunterschied von etwa 2 kb auf ein alternativ verwendetes Polyadenylierungssignal in der 3'UTR zurückführen (Bernards et al. 1993; Cowley et al. 1998). Das beim Menschen am weitesten 3'-gelegene Signal AGUAAA ist von Bedeutung, obwohl es nur etwa 30 % der Polyadenylierungsaktivität des Konsenssignals AAUAAA zu haben scheint (Wickens 1990). Positionsangaben beziehen auf die Sequenz mit der GenBank Accession Nummer L05367 (Humneurof).

1.2.2 Homologie zwischen Mensch und Maus

Das *NF1*-Gen ist phylogenetisch hoch konserviert. Bernards et al. zeigten 1993, dass die codierende Sequenz zwischen Maus und Mensch auf Proteinebene zu über 98 % homolog ist. Vergleichbare Homologie-Werte für Neurofibromin ergaben sich ebenfalls zwischen Mensch und Hund bzw. Ratte (Assum und Schmegner 2008). Auch die 484 bp der 5'UTR und die etwa 3,5 kb der 3'-nicht-translatierten Region zeichnen sich durch einen hohen

Grad an Homologie aus (Hajra et al. 1994; Bernards et al. 1993). Auffällig ist, dass sich die Homologie zwischen Mensch und Maus nicht über die gesamte 3'UTR erstreckt, sondern auf zwei Bereiche, zum einen den etwa 1,7 kb langen Teilbereich unmittelbar nach der kodierenden Region und zum anderen einen 500 Basen umfassenden Bereich, kurz vor dem Polyadenylierungssignal. Diese beiden Teilbereiche zeigen eine Homologie zwischen Mensch und Maus von über 75 %. In Abbildung 1 ist dieser Vergleich zwischen Mensch und Maus grafisch dargestellt, wobei die durchschnittliche Homologie zwischen beiden Spezies in der NF1-3'UTR durch die gestrichelte Linie symbolisiert wird.

Shabalina und Mitarbeiter lieferten Hinweise, dass konservierte Bereiche innerhalb 3'UTRs wichtige regulatorische Funktionen wahrnehmen, wobei genspezifische Informationen in diesen Bereichen genutzt werden (Shabalina et al. 2003). Außerdem zeigten mehrere Gruppen, dass posttranskriptionelle Regulationsmechanismen über konservierte Elemente in 3'UTRs vermittelt werden (Mignone et al. 2002). Diese Befunde legen nahe, dass auch die konservierten Bereiche innerhalb der NF1-3'UTR eine regulatorische Bedeutung besitzen.

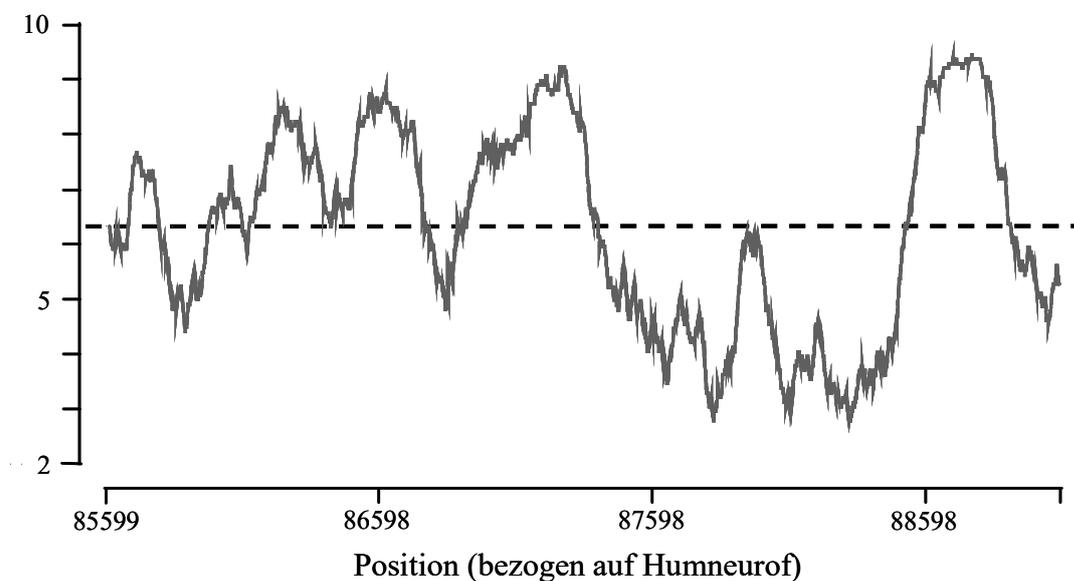


Abb. 1: Grafische Darstellung der Homologie zwischen Mensch und Maus innerhalb der NF1-3'UTR, sowie der Durchschnittswert (gestrichelte Linie).

1.2.3 Mutationen im *NF1*-Gen

Die Mutationsrate des *NF1*-Gens wurde von Huson et al. (1994) auf $3,1 \times 10^{-5}$ bis 1×10^{-4} pro Gamete und Generation geschätzt und liegt damit deutlich höher als bei anderen krankheitsauslösenden Genen. Durch Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) und PCR konnten bis jetzt zahlreiche *NF1* verwandte Sequenzen im menschlichen Genom gefunden sowie deren Homologie untersucht werden (Regnier et al. 1997; Luijten et al. 2001). Marchuk et al. (1992) und Cummings et al. (1993) halten diese Pseudogene, neben der Größe des *NF1*-Gens, für die Ursache der hohen Mutationsrate, da durch diese *NF1*-homologen Bereiche die Möglichkeit von interchromosomalen Genkonversionen erhöht wird. Auffällig ist die relativ hohe Anzahl an sporadisch auftretenden Fällen: etwa 40-50 % der Erkrankungen werden auf Neumutationen zurückgeführt (Riccardi und Eichner 1986; Stumpf et al. 1987; Upadhyaya und Copper 1998). Die Suche nach Mutationen gestaltet sich aufgrund der enormen Gengröße, der Pseudogene und der unterschiedlichen Mutationstypen als schwierig. Neben Nonsense-Mutationen treten andere Mutationstypen, wie Deletionen, Insertionen, Spleiß-Mutationen und Missense-Mutationen auf, wobei die Mehrzahl (~80 %) der *NF1*-Mutationen zu einem vorzeitigen Stopp-Codon und damit zu einem trunkeierten Protein führen (Esposito et al. 2015). Erst die Etablierung des "protein truncation test" (PTT), einem Verfahren zur Identifizierung von direkten und indirekten Stoppmutationen, erleichterte die Mutationssuche im *NF1*-Gen und lieferte Detektionsraten von 50–85 % (Upadhyaya et al. 2003). Zahlreichen Studien beschäftigen sich mit der Identifizierung von Mutationen im *NF1*-Gen, wobei eine Umfangreiche von Fahsold und Kollegen durchgeführt wurde, die 521 nicht verwandte Patienten untersuchten. Trotz Einsatz verschiedener Mutationsdetektionsverfahren wie PTT, Temperatur-Gradient-Gelelektrophorese (TGGE) und direkter Sequenzierung (DGS) konnten in dieser Studie nur 301 Sequenzveränderungen im *NF1*-Gen gefunden werden, von denen 278 als pathogen angesehen werden können (Fahsold et al. 2000). Es zeigte sich auch hier, dass ein eindeutiger "Hotspot", also ein Genort bevorzugter Mutationsereignisse bislang nicht ausgemacht werden kann. In den letzten Jahren stieg die Anzahl der im *NF1*-Gen gefundenen Mutationen kontinuierlich an. Von mehr als 900 Mutationen im Jahr 2012 (Barron und Lou 2012), die in der „Human Gene Mutation Database“ aufgeführt sind, bis etwa 1.500 Mutationen nur 2 Jahre später (Abramowicz und Gos 2014). Neben einem fehlenden „Hotspot“ lässt sich im Fall der *NF1* keine eindeutige Phänotyp-Genotyp Korrelation nachweisen. Lediglich zwei Beispiele einer solchen Korrelation wurden

bislang beschreiben (Jouhilahti et al. 2011). Einerseits zeigen NF1-Patienten, die eine Deletion des gesamten *NF1*-Gens aufweisen, einen schwereren Krankheitsverlauf. Zum anderen führt eine Deletion von 3 Basen in Exon 17 zu einem mild ausgeprägten Phänotyp, der durch fehlende Neurofibrome gekennzeichnet ist.

Bisher konzentrierten sich fast alle Bemühungen im Rahmen der Mutationssuche auf die kodierende Region des *NF1*-Gens. Allerdings kann nicht ausgeschlossen werden, dass krankheitsauslösende Mutationen auch im nicht-kodierenden Bereich zu finden sind, vor allem wenn der Grad der Konservierung zwischen Mensch und Maus berücksichtigt wird. Bislang konnten in der Promotorregion des *NF1*-Gens fünf Sequenzveränderungen gefunden werden, die aber keine Bindestellen für Transkriptionsfaktoren betreffen und alle als Polymorphismen angesehen werden. Allerdings führen drei davon, alle in der 5'UTR gelegen, zu einer um 60-70 % gesteigerten Expression von Reporter-gen-Konstrukten (Osborn et al. 2000). Das 3'-Ende der NF1-mRNA bezogen bislang zwei Gruppen in die Mutationssuche ein (Upadhyaya et al. 1995; Cowley et al. 1998). In Abbildung 2 sind die identifizierten Sequenzveränderungen schematisch dargestellt, wobei sich die Positionsangaben in Klammern auf die Lage innerhalb der 3'UTR, beginnend mit dem ersten Nukleotid nach dem Stopp-Codon, beziehen. Zusätzlich ist, soweit bekannt, die entsprechende Referenznummer der Sequenzveränderung angegeben. Bei der Mehrzahl der Sequenzveränderungen handelt es sich um Polymorphismen (A7AT, C3Δ, C3GC und C7CT) oder unterschiedliche Varianten in cDNA Klonen (9 bp und 1 bp Insertion). Lediglich die beiden Basenaustausche G nach A (Position 126, Cowley et al. 1998) und A nach G (Position 3257 (blau), Upadhyaya et al. 1995) scheinen patientenspezifisch und damit die einzig möglichen Mutationen in der NF1-3'UTR zu sein. Deshalb wurde im Rahmen einer Diplomarbeit in unserer Arbeitsgruppe in der NF1-3'UTR von Patienten mit bisher unbekannter konstitutioneller Mutation nach Sequenzveränderungen gesucht (Axmann 1999). Mit der eingesetzten, enzymbasierten Methode (EMD) sollten Einzelbasenaustausche sowie kleine Insertionen und Deletionen mit einer Sensitivität von 100 % im Vergleich zur Sequenzierung detektiert werden können (Del Tito et al. 1998). Im Rahmen dieser Diplomarbeit ergaben sich nach der Etablierung des EMD erste Hinweise auf Sequenzveränderungen, die in der hier vorliegenden Arbeit genauer analysiert wurden.

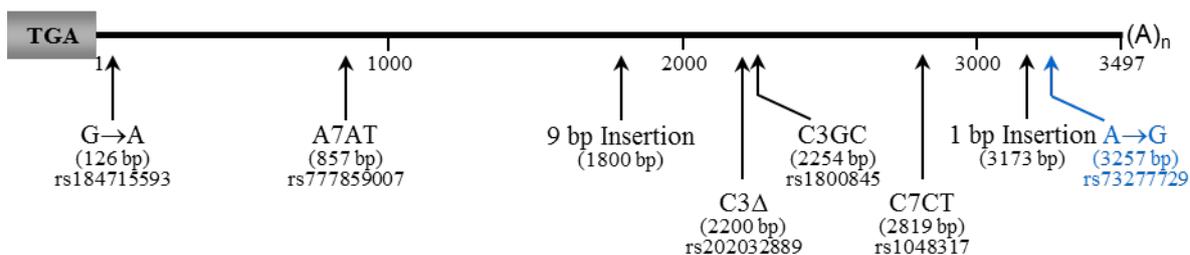


Abb. 2: Schematische Darstellung der von Upadhyaya et al. (1995, blau) und Cowley et al. (1998, schwarz) identifizierten Sequenzveränderungen innerhalb der NF1-3'UTR. Positionsangaben in Klammern beziehen sich auf die Lage innerhalb der 3'UTR, beginnend mit dem ersten Nukleotid nach dem Stopp-Codon. Soweit bekannt ist die Referenznummer zusätzlich angegeben.

1.3 Das *NF1*-Gen als Tumorsuppressor-Gen

Eine der ersten Modellvorstellungen zur Entstehung der Symptome bei NF1-Patienten stammt von Wallace und Collins (1991). Sie postulierten für das NF1-Protein (Neurofibromin) die Funktion als Tumorsuppressor, wobei die Entstehung von Tumoren dem „Zwei-Treffer-Modell“ nach Knudson folgt. Bei einem NF1-Patienten enthalten alle Zellen aufgrund einer Keimbahnmutation, entweder vererbt oder eine *de novo* Mutation, ein defektes *NF1*-Gen. Verlieren nun Zellen durch eine, zu einem späteren Zeitpunkt auftretende somatische Mutation auch das zweite intakte *NF1*-Allel, so trägt dies zur Entstehung eines Tumors bei. Im Rahmen systematischer Untersuchungen an den bei NF1-Patienten häufig auftretenden benignen Tumoren zeigte sich, dass in diesen Heterozygotieverluste (LOH) als somatische Mutation nachgewiesen werden konnten (John et al. 2000; Eisenbarth et al. 2000). Kinzler und Vogelstein (1996) zeigten, dass zur malignen Entartung weitere Mutationen auch in anderen Genen notwendig sind. Dieses Modell der progressiven Tumor-Genese wird von mehreren Arbeitsgruppen unterstützt. Ihnen gelang in NF1-assoziierten Sarkomen der Nachweis zusätzlicher Mutationen im *p53*-Gen auf Chromosom 17 (Menon et al. 1990; Glover et al. 1991; Legius et al. 1994, Rasmussen et al. 2000). An Neurofibrosarkom-Zelllinien wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, um zu zeigen, ob tatsächlich beide *NF1*-Allele durch Mutationen inaktiviert sind. Bei einem NF1-Patienten wurde in einem dieser Tumoren neben dem Heterozygotieverlust auch eine 200 kb umfassende Deletion im verbleibenden Wildtyp-Allel nachgewiesen (Legius et al. 1993). Hier konnte zum ersten Mal der vollständige Funktionsverlust beider *NF1*-Allele belegt werden. Auch wurde an Phäochromocytomen, ebenso wie in Tumorzellen von an juveniler myeloischer Leukämie erkrankten NF1-Patienten, Heterozygotieverlust am *NF1*-Locus gezeigt (Gutmann et al. 1994; Shannon et al. 1994).

Weitere Hinweise auf die Funktion des *NF1*-Gens als Tumorsuppressor ergaben sich aus Untersuchungen an malignen Tumoren von nicht an Neurofibromatose Typ 1 erkrankten Personen, die den Verlust eines *NF1*-Allels aufwiesen (Johnson et al. 1993; Seizinger 1993; Andersen et al. 1993; The et al. 1993). Jacks und Mitarbeiter fanden 1994 auch bei transgenen Mäusen, die für den *NF1*-Gen-Defekt heterozygot waren, eine erhöhte Tumorneigung.

Analysen von Wiest et al. zum somatischen Mutationenspektrum bei NF1-Patienten innerhalb einer Familie lieferten Hinweise auf eine Beteiligung von weiteren Faktoren, sogenannten Modifier-Genen, die an der Tumorentstehung beteiligt sein könnten (Wiest et al. 2003). Diese Möglichkeit wird durch Untersuchungen von Sabbagh und Kollegen zur Phänotyp-Genotyp Korrelation bei verwandten NF1-Patienten unterstützt. Diese Untersuchungen legen den Schluss nahe, dass genetische Faktoren an der unterschiedlichen Ausprägung der NF1 beteiligt sein könnten (Sabbagh et al. 2009). Zusätzlich zeigte die Arbeitsgruppe um Chai in neueren Untersuchungen, dass neben häufig auftretenden Heterozygotieverlusten auch andere Mechanismen bei der Tumorentstehung beteiligt sein könnten. Dabei wurde durch überexprimierte MicroRNA-10b (miR-10b) die Bildung von Neurofibromin gehemmt und damit die Expression von RAS gesteigert. Ob allerdings die miR-10b allein die Tumorentstehung bei NF1-Patienten beeinflussen kann, muss noch weiter geklärt werden (Chai et al. 2010).

1.4 Neurofibromin, das *NF1*-Genprodukt und seine Funktionen

Aus dem offenen Leseraster des *NF1*-Genes konnte ein Protein mit 2818 Aminosäuren, als Translationsprodukt der häufigsten Spleißisoform der NF1-mRNA (Marchuk et al. 1991), abgeleitet werden. Für das als Neurofibromin bezeichnete Protein ergab sich nach Western-Blot-Analyse ein Molekulargewicht von ca. 250 kDa (DeClue et al. 1991), was aufgrund der Aminosäuresequenz dem errechneten Molekulargewicht von 277 kDa nahe kommt.

Der am besten untersuchte Bereich des Neurofibromins umfasst etwa 360 Aminosäuren und zeigt Sequenzhomologien zur Genfamilie der GTPase aktivierenden Proteine (GAP) (Buchberg et al. 1990b; Xu et al. 1990). Der Arbeitsgruppe um Ahmadian gelang es 1996, für diesen Bereich die sogenannte NF1-GRD (GAP-related domain), eine 26 %ige Sequenzhomologie zur katalytischen Domäne des humanen Protein p120-GAP zu finden.

Dieses Protein kann die intrinsische GTPase Aktivität von Ras-Proteinen aktivieren, wodurch die Umwandlung der aktiven GTP-bindenden in die inaktive GDP-bindende Form erfolgt (Trahey und McCormick 1987). Außerdem weist Neurofibromin Sequenzhomologien zu IRA1 und IRA2 auf, zwei Ras-GTPase aktivierende Proteine bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, die bei der Wachstumskontrolle eine Rolle spielen. Aufgrund der oben angesprochenen Sequenzhomologien wurde schon früh spekuliert, dass Neurofibromin, neben p120-GAP ein zweiter negativer Regulator von Ras ist. Diese Annahme wurde mehrfach, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* belegt (Xu et al. 1990; Ballester et al. 1990; Martin et al. 1990).

Aufgrund dieser Ergebnisse kann Neurofibromin als negativer Regulator in den Ras-Signaltransduktionsweg eingestuft werden. Damit gehört NF1 zur Klasse der „RASopathies“. Dazu werden Syndrome gezählt, die auf Keimbahnmutationen in Proteinen der Ras/Map-Kinase Signalkaskade zurückzuführen sind (Rauen 2013).

Da die NF1-GRD lediglich 10 % der kodierenden Region umfasst liegt es nahe, dass Neurofibromin noch weitere Funktion besitzen könnte. Im Rahmen weiterer Untersuchungen konnten weitere funktionelle Domänen gefunden werden (Trovo-Marqui et al. 2006). Dazu gehören die Regulierung der Adenylat-Cyclase (Guo et al. 1997) oder auch die Kontrolle der Ausbildung des Zytoskeletts bei der Entstehung von Zell-Zell-Kontakten durch Neurofibromin (Koivunen et al. 2000). Diese Hypothese wird dadurch gestützt, dass NF1-Keratinocyten einen veränderten Calcium²⁺-Stoffwechsel im Vergleich zu Wildtyp-Keratinocyten aufweisen, da ein intaktes Zytoskelett eine wichtige Voraussetzung für eine funktionierende, Calcium-vermittelte Signalkaskade ist (Korkiamäki et al. 2002). Weitere Untersuchungen zeigen außerdem, dass Neurofibromin - wie viele andere Genprodukte von Tumorsuppressor-Genen - aktiv in den Zellkern transportiert werden kann. Daraus könnten sich weitere, bisher unbekannt Funktionen ergeben (Vandenbroucke et al. 2004).

1.5 Die Regulation des *NF1*-Gens

Ursächlich für das Auftreten der Neurofibromatose Typ 1 sind inaktivierende Mutationen im *NF1*-Gen. Alle Zellen eines NF1-Patienten besitzen daher nur noch eine intakte Kopie dieses Gens und mit dem oben unter 1.3 beschriebenen Modell lässt sich die Entstehung von benignen und malignen Tumoren erklären.

Interindividuelle Variabilität in der Expression des verbliebenen *NFI*-Gens könnte die Variabilität im Phänotyp erklären. Inwieweit hier Modifier-Gene beteiligt sind ist noch nicht geklärt. Unabhängig davon ist für das Verständnis des variablen Auftretens der NF1-Symptome die Kenntnis der Regulation des *NFI*-Gens von entscheidender Bedeutung. Auf dem Weg von der DNA über die RNA zum Protein gibt es verschiedene Möglichkeiten, regulatorisch einzugreifen. Die meisten Regulationsmechanismen, welche auf das komplexe Gefüge von räumlich und zeitlich aufeinander abgestimmten Verhältnissen der Genprodukte einwirken, sind auf die Beeinflussung der RNA zurückzuführen. Prozesse, in die eingegriffen werden könnte, sind einerseits die Transkriptionsrate und der anschließende posttranskriptionelle Reifungsprozess, wodurch eine Regulierung der im Zellkern gebildeten mRNA-Menge erreicht werden kann. Andererseits bieten auch der nachfolgende Transport ins Zytoplasma sowie die subzelluläre Lokalisation Regulationsmöglichkeiten. Über die Stabilität dieser im Zytoplasma lokalisierten mRNA und der Effizienz, mit der sie in Protein umgeschrieben wird, besteht eine weitere Möglichkeit, regulatorisch einzugreifen. Auch die Regulation des *NFI*-Gens erfolgt auf verschiedenen Ebenen und einige der oben Mechanismen konnten bereits nachgewiesen werden (Jouhilahti et al. 2011).

Arbeiten in unserer Abteilung (Hoffmeyer et al. 1994 und 1995) zeigten bei 80 % der untersuchten NF1-Patienten eine Unterrepräsentanz des Transkripts eines Allels. Die Ursache der ungleichen Expression konnte auf die zytoplasmatische Instabilität der jeweiligen mRNA zurückgeführt werden, wobei nicht in allen Fällen eine vorzeitige Stopp-Mutation verantwortlich gemacht werden konnte. Unter der Voraussetzung, dass alle Stopp-Mutationen gefunden wurden, muss ein anderer Mechanismus auf posttranskriptioneller Ebene für die Instabilität verantwortlich sein. Besonderes Augenmerk sollte dabei auf die mRNA- und Proteinstabilität einschließlich deren Degeneration gelegt werden, da nicht unbedingt eine Korrelation zwischen Transkript- und Genprodukt-Menge bestehen muss. Weitere Hinweise auf eine posttranskriptionelle Regulation des *NFI*-Gens lieferten Korkiamäki und Mitarbeiter. Sie beobachteten in mechanisch verletzten Keratinozyten einen Anstieg der Neurofibromin-Menge in nur 0,5 bis 2 Stunden. Berücksichtigt man die Größe des Gens und legt eine Transkriptionsrate von 30 Basen pro Sekunde zugrunde, würde die vollständige Transkription etwa 3 Stunden benötigen (Korkiamäki et al. 1999). Ähnliches beobachteten Gutmann et al. bereits 1993 an Ratten-Schwanzzellen. Eine Stunde nach Induktion der Zelldifferenzierung durch Forskolin ließ sich ein starker Anstieg der mRNA Menge beobachten, der auf Grund der

kurzen Reaktionszeit nicht über die Variation der Transkriptionsrate erklärt werden kann. Diese Beobachtungen lassen sich jedoch durch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen des *NFI*-Gens erklären.

1.6 Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen

Im Zuge der posttranskriptionellen Aufbereitung („processing“) von mRNAs wird an das 3'-Ende ein Poly(A)-Schwanz synthetisiert. In dieser Form gelangt die mRNA vom Zellkern ins Zytoplasma, dem Ort der Translation. Auf Grund der Entdeckung von regulatorischen Elementen in der 3'UTR, die für die Polyadenylierung wichtig sind, und der Tatsache, dass durch den Poly(A)-Schwanz die mRNA-Stabilität im Zytoplasma positiv beeinflusst werden kann, ergaben sich erste Hinweise auf eine regulatorische Funktion der 3'UTRs (Bernstein und Ross 1989). Im Laufe der Zeit zeigte sich, dass viele Gene im Vergleich zum Leseraster eine ungewöhnlich lange und auch über Speziesgrenzen hinweg konservierte 3'UTR besitzen. Innerhalb dieser Bereiche können bestimmte Sequenzmotive, sogenannte *cis*-Elemente, lokalisiert sein, die mit Proteinen, den *trans*-wirkenden Faktoren, interagieren können. Über solche Interaktionen kann auch die Expression verschiedener Gene beeinflusst werden. Dabei können Veränderungen der Translationsrate über Mutationen dieser *cis*-Elemente ausgelöst werden, die auch im Zusammenhang mit Erkrankungen stehen können (Chatterjee und Pal 2009).

Die unter 1.5 beschriebenen Regulationsmechanismen werden über solche RNA-Protein-Interaktionen vermittelt. Im Folgenden sollen diese Mechanismen an ausgewählten, gut untersuchten Beispielen gezeigt werden. Außerdem werden mögliche Prozesse der posttranslationalen Modifikation, welche viele Eigenschaften des Proteins entscheidend beeinflussen können, nicht berücksichtigt.

1.6.1 Subzelluläre Lokalisation der mRNA

Die zytoplasmatische Lokalisation der mRNA ist wahrscheinlich eine der Hauptaufgaben der zugehörigen 3'UTRs. Dieser Mechanismus lässt sich sowohl im Einzeller als auch in tierischen und pflanzlichen Geweben beobachten (Kloc et al. 2002). Der korrekten Lokalisation von maternalen mRNAs kommt vor allem während der frühen Embryonalentwicklung beispielweise bei *Drosophila* eine wichtige Aufgabe zu. Dies ist nötig, um die richtige Polarität und die anschließende Segmentierung der Fliegen-

Embryonen zu gewährleisten. Nicht nur bei embryonalen Vorgängen in *Drosophila* und *Xenopus*, sondern auch bei humanen somatischen Zellen konnte die spezifische Lokalisation von mRNAs im Zytoplasma gezeigt werden. Die genaue Positionierung bestimmter mRNAs ist vor allem bei polaren Zellen, wie beispielsweise Neuronen wichtig. Das Transkript des mit den Mikrotubuli assoziierten Proteins MAP2 lässt sich vor allem in den Dendriten und im Soma nachweisen, dagegen ist die mRNA des ebenfalls mit Mikrotubuli assoziierten Proteins Tau hauptsächlich im proximalen Axon zu finden. (Bruckenstein et al. 1990; Litmann et al. 1993). Für diese, wie auch die zytoplasmatische Verteilung verschiedener Aktin-Isoformen konnte die wichtige Rolle, welche die 3'UTR für die exakte Lokalisation der mRNA spielt, gezeigt werden. Allerdings sind die Mechanismen die zu diesen Steuerungseffekten führen noch nicht vollständig geklärt. Es scheinen jedoch die Sekundärstrukturen der mRNAs eine Rolle zu spielen. Die Bedeutung solcher Strukturen für die korrekte Lokalisation konnte bereits für die Hefe *ash1* mRNA gezeigt werden (Gonzalez et al. 1999).

1.6.2 Stabilität der mRNA

Zahlreiche Beispiele zeigen, dass die Stabilität von mRNAs über *cis*-wirkende Elemente, lokalisiert in den zugehörigen 3'UTRs, beeinflusst werden kann (Fontes et al., 1999), wobei die Wirkung sowohl stabilisierend als destabilisierend sein kann. Das humane α -globin Gen besitzt eine der stabilsten mRNAs, mit einer Halbwertszeit von bis zu 60 Stunden. Dabei geht das Transkript einen protektiven Ribonukleoprotein-Komplex mit mehreren Proteinen ein (Kiledjian et al. 1995). Russell und Mitarbeiter zeigten 1998, dass durch Austausch der α -globin 3'UTR durch die von ζ -globin, einer deutlich instabileren mRNA, die α -globin mRNA ihre Stabilität verliert. Beide 3'UTR Fragmente enthalten identische, Pyrimidin-reiche Abschnitte die allerdings im Fall von ζ -globin durch eine einzelne Purin-Base unterbrochen werden. Durch diesen Unterschied wird der Ribonukleoprotein-Komplex weniger effizient aufgebaut (Russel et al. 1998) und das chimäre Transkript instabiler.

Im Jahr 1986 fanden Shaw und Kamen in der 3'-nicht-translatierten Regionen von Cytokinen, Lymphokinen, Wachstumsfaktoren und Protoonkogenen ein konserviertes Sequenzmotiv, bestehend aus sich wiederholenden AUUUA-Pentameren. Diese AU-reichen Elemente, die sog. AREs, führen zu einer schnellen Degradation der entsprechenden Transkripte, beispielsweise der mRNA von *GM-CSF* (granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor). Durch Versuche mit chimären RNA Konstrukten, bestehend aus einer Reporter-mRNA und den AREs aus der GM-CSF 3'UTR zeigte sich, dass die destabilisierende Wirkung an die Translation gekoppelt ist (Aharon und Schneider 1993). Dies setzt allerdings die Assoziation dieser RNA mit Ribosomen voraus. Publikationen mehrerer Gruppen zeigen aber auch, dass nicht zwingend diese Verbindung zwischen Translation und Destabilisierung vorhanden sein muss (Koeller et al. 1991; Chen et al. 1994). Darüber hinaus haben immer auch die intrazellulären Bedingungen und/oder der Zellkontext Einfluss darauf, inwieweit diese Signalsequenzen den schnellen Abbau der Transkripte fördern, da einzelne AREs auch in 3'UTRs von stabilen globin-mRNAs nachgewiesen werden konnten (Rajagopalan und Malter 1997).

Diese Befunde zeigen, dass der RNA-turnover nicht nur über die Länge des Poly(A)-Schwanzes und die Deadenylierungsrate gesteuert wird, sondern vielmehr über *cis*- und *trans*-wirkende Motive und Faktoren aktiv gesteuert wird.

1.6.3 Beeinflussung der Translationsrate

Auch die Translation kann über *cis*-wirkende Elemente in 3'UTRs und den zugehörigen Interaktionspartnern zeitlich und räumlich exakt gesteuert werden (Kuersten und Goodwin 2003). Wird die Translation einer mRNA über ihre 3'UTR reguliert, so erfolgt diese Regulation meist negativ, als Inhibition. Dabei interagiert ein Protein mit den regulatorischen Sequenzen der 3'UTR und verhindert („maskiert“) die Translation der mRNA. Ein Beispiel für eine derartige Regulation ist die der 15-Lipoxygenase (15-LOX), einem Schlüsselenzym der Zelldifferenzierung bei Erythrozyten. Dieses Enzym, das intakte Phospholipide zerstört, entfaltet seine Wirkung erst in den letzten Schritten der Retikulozyten-Reifung, indem es mitochondriale und andere interne Membranen abbaut. Da 15-LOX diese zerstörerische Funktion besitzt, muss die Enzymaktivität zeitlich genau reguliert werden. Von Ostareck und Mitarbeitern konnten 1997 die bindenden Proteine, hnRNP K und hnRNP E1, identifiziert werden. Diese Proteine interagieren mit einem Pyrimidin-reichen, repetitiven Sequenzmotiv (differentiation control element, DICE) der LOX-mRNA und unterdrücken die Translation über einen Mechanismus, der die Ausbildung der 80S Ribosomen verhindert. (Ostareck-Lederer et al. 1994; Ostareck et al. 1997). Es sind noch weitere Beispiele von Transkripten bekannt, deren Translation ebenfalls von Teilen der eigenen 3'UTR maskiert werden kann. Dazu gehören

beispielsweise der myocyte enhancer factor 2 (MEF2) und der bekannte Tumorsuppressor p53 (Black et al. 1997; Fu et al. 1996).

Wie eng Translation und mRNA Stabilität miteinander verflochten sind, zeigt eindrucksvoll das Beispiel der Kontrolle des Eisenstoffwechsels in der Zelle (Übersicht: Klausner et al. 1993). Die Regulation der beiden mRNAs des Transferrin-Rezeptors und des Ferritins erfolgt posttranskriptionell in Abhängigkeit von der intrazellulären Eisenkonzentration. Der Rezeptor sorgt für den Eiseneinstrom in die Zelle, Ferritin stellt das Hauptspeicherprotein für intrazelluläres Eisen dar. Bei dem Regulationselement auf RNA-Ebene handelt es sich um ein genau definiertes Sequenzmotiv (iron responsive element, IRE), das einen Stemloop ausbildet, der im Stamm variabel sein kann, in den sechs Basen der Schleife allerdings hochkonserviert ist (Sequenz: CAG(A/U)G(A/U)). Eine Besonderheit dieser Struktur ist ein einzelnes, ungepaartes C im Stamm, fünf Basenpaare vor der Schleife. Das IRE kommt sowohl einmal in der 3'UTR der Transferrin-Rezeptor mRNA als auch fünfmal in der 5'UTR der Ferritin mRNA vor. Der Interaktionspartner dieses Elements ist das Eisen-regulatorische Protein (IRP-1 oder IRE-BP). Über ihre Wechselwirkung wird der Eisengehalt der Zelle gesteuert. Die Menge an intrazellulärem Eisen und Rezeptor-mRNA sind invers korreliert. Tritt Eisenmangel auf, stabilisiert IRP-1 die Transferrin mRNA durch die Bindung an das IRE in der 3'UTR des Rezeptors. Umgekehrt führt Eisenüberschuss zur Komplexauflösung und zum raschen Abbau der Rezeptor-mRNA. Die Translation der Ferritin-mRNA wird durch die Bindung des IRP-1 an das IRE in der 5'UTR erhöht. Aus diesem Mechanismus wird deutlich, dass eine identische Struktur nur durch ihre relative Lage zum offenen Leseraster Effekte sowohl auf die mRNA-Stabilität als auch auf ihre Translation ausüben kann.

1.7 Die Protein-binde Regionen innerhalb der NF1-3'UTR

Da sich einerseits aus mehreren Arbeiten Hinweise auf eine posttranskriptionelle Regulation des *NF1*-Gens ergaben und andererseits das hohe Maß der Konservierung zwischen Mensch und Maus eine regulatorische Funktion der 3'UTR nahe legte, begann Herr Dr. Häußler im Rahmen seiner Dissertation mit ersten Untersuchungen in diesem Bereich des *NF1*-Gens. In Abbildung 3 ist die gesamte NF1-mRNA schematisch dargestellt. Da posttranskriptionelle Regulationsmechanismen wie oben beschrieben über Proteinbindung an entsprechenden Motiven vermittelt werden, wurde die gesamte 3'UTR

in 13 überlappende Fragmente unterteilt und auf ihre Proteinbindefähigkeit getestet. Insgesamt konnten fünf Protein-binde Regionen (NF1-PBR1-5) gefunden werden (Häußler 1998; Striebel 1998), deren Lage innerhalb der NF1-3'UTR in Abbildung 3 dargestellt ist. Auffällig ist, dass fast alle PBRs innerhalb der beiden, zwischen Mensch und Maus hoch konservierten Bereiche (gepunktete Linien) lokalisiert sind.

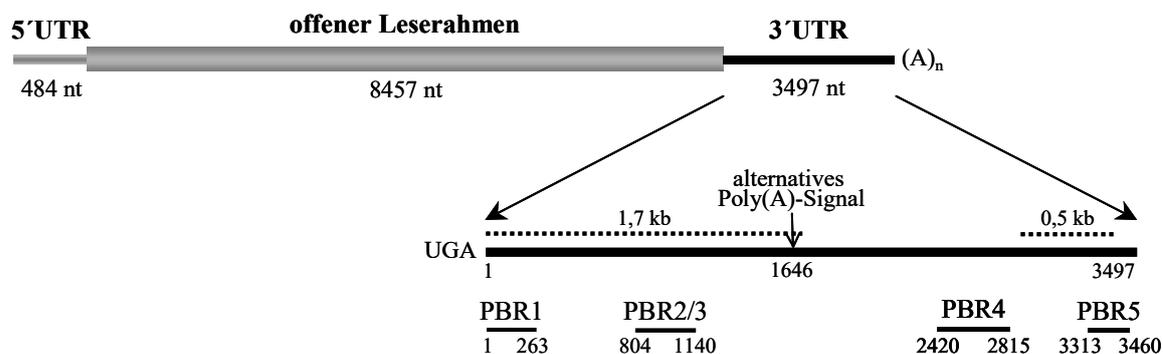


Abb. 3 Schematische Darstellung der NF1-mRNA mit detaillierteren Angaben zu ihrer 3'UTR. Die Positionsangaben der fünf protein-bindenden Regionen (PBR1-5) beziehen sich auf ihre Lage innerhalb der 3'UTR, wobei die Zählung mit der ersten Base nach dem Stopp-Codon UGA beginnt.

Eine nähere Charakterisierung von PBR1 lieferte ein für die Proteinbindung wichtiges Kernmotiv von 38 nt (Position 193-230), das überwiegend Uracil als Base enthält. (Haeussler et al. 2000). Ebenso enthalten PBR2 und 3 AU-reiche Sequenzen als Proteinbindende Motive, die sich auf die Positionen 820 bis 908 bzw. 1004 bis 1116 weiter eingrenzen ließen. Betrachtet man den hohen Gehalt an Adenin- und Uracil-Resten in den Sequenzen von BPR 1 bis 3 von 68 %, 73 % und 79 %, so können diese Motive zu den bekannten AU-reichen Elementen (ARE) gezählt werden. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei PBR5 um einen 34 nt langen RNA-Abschnitt der unmittelbar vor dem Polyadenylierungssignal AGUAAA lokalisiert ist und Konkurrenzexperimente zeigten, dass Cytosin die relevante Base für die Protein/RNA-Komplexbildung ist. In diesem Teilbereich der NF1-3'UTR sind drei Pyrimidin-reiche Motive lokalisiert und erste Experimente mit an diesen Stellen veränderten RNA-Fragmenten lassen vermuten, dass die beiden 5'-liegenden C-reichen Motive an der Protein/RNA-Komplexbildung beteiligt sind (Striebel, 1998). Die Protein-binde Region 4 (Position 2420-2815) ist bisher noch nicht näher charakterisiert.

Weitergehende Untersuchungen in Bezug auf die interagierenden Proteine konzentrierten sich auf die Protein-binde Regionen 1 und 5. Crosslink-Experimente ergaben für den bislang noch nicht identifizierten Interaktionspartner von NF1-PBR5 ein Molekulargewicht

von etwa 46 kDa. Die Interaktion dieses zytoplasmatischen Proteins mit PBR5 erfolgt mit großer Wahrscheinlichkeit über Sulfhydrylgruppen. Drei Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten (40, 68 und 97 kDa) zeigten eine Bindung an PBR1, wobei zwei dieser Proteine bisher näher charakterisiert werden konnten. Die 68 kDa Komponente ließ sich sowohl *in vitro* als auch *in vivo* als Proteinkinase R (PKR) identifizieren (Häußler 1998). Dieses Enzym bindet spezifisch doppelsträngige RNA und wird dadurch via Autophosphorylierung aktiviert (Tayler et al. 1996; Zhang et al. 1998). Es spielt eine wichtige Rolle bei der Virenabwehr. Außerdem ist überexprimierte PKR in der Lage die Zellproliferation in Säugerzellen zu hemmen und könnte möglicherweise auch als Tumorsuppressor wirken. (Barber et al. 1993; Koromilas et al. 1992; Meurs, et al. 1993). PKR ist demnach ein Sensor für doppelsträngige RNA und kann dadurch die Translation und/oder Apoptose regulieren (Saunders und Barber, 2003). Bandshift-Experimente ergaben, dass ein anderer Interaktionspartner der NF-PBR1 (40 kDa) zu der Gruppe der Hu-Proteine gehört. Diese Proteine sind die humanen Vertreter der ELAV (embryonic lethal abnormal vision)-ähnlichen Proteine, die AU- und U-reiche Elemente in 3'UTRs binden und so an posttranskriptionellen Regulationmechanismen wie beispielsweise der RNA-Stabilität, beteiligt sind (Übersicht in Antic und Keene 1997; Keene 1999). Bislang zeigte sowohl HuR, der ubiquitär exprimierte Vertreter, als auch HuD, welcher Neuronen spezifisch exprimiert wird, die Fähigkeit mit PBR1 *in vitro* zu interagieren (Haeussler et al. 2000; Bader 2000). Die physiologische Bedeutung dieser Interaktion muss allerdings noch durch weitere, *in vivo* Experimente abgesichert werden.

1.8 Zielsetzung

Publizierte Ergebnisse verschiedener Arbeitsgruppen zeigen, dass posttranskriptionelle Prozesse bei der Regulation der zellulären Konzentration sowohl der NF1-mRNA als auch des Proteins eine essentielle Rolle spielen könnten. Da posttranskriptionelle Regulationsmechanismen häufig über Interaktionen spezifischer Proteine mit nicht-translatierten Regionen vermittelt werden. Die 3'UTR der NF1-mRNA ist, wie oben dargestellt, ungewöhnlich lang und phylogenetisch hochkonserviert. Daher liegt nahe, dass diese Region eine wichtige Rolle bei der Regulation spielt. Innerhalb der NF1-3'UTR sind 5 Protein-binde Regionen lokalisiert, wobei bislang nur 2 der interagierenden Proteine gefunden wurden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die 3'UTR der NF1-mRNA unter verschiedenen Blickwinkeln weiteruntersucht werden. Diese Untersuchungen lassen sich in zwei Gruppen einteilen.

NF1-Patienten, bei denen bislang keine Mutation im kodierenden Bereich zu finden war, sollten weitergehenden Mutationsanalysen unterzogen werden. Dabei war die Frage zu klären, ob beide *NF1*-Allele in gleicher Weise exprimiert werden und ob sich krankheitsauslösende Sequenzveränderungen in der 3'UTR nachweisen lassen.

Der zweite Punkt hatte die 3'UTR und deren Bedeutung für von posttranskriptionelle Regulationsmechnismen des *NF1*-Gens im Fokus. Dabei sollte PBR5 auf RNA-Ebene weiter untersucht werden und der zur Bindung relevante Abschnitt weiter eingegrenzt werden. Ob die RNA-Protein Interaktion möglicherweise die Stabilität der NF1-mRNA beeinflusst war ein zusätzlicher Aspekt. Durch die Identifikation weiterer Interaktionspartner von NF1-PBR1 und 5 sollten sich weitere Hinweise auf möglich posttranskriptionelle Regulationsmechanismen ergeben.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Acrylagel (30 % Acrylamid-Lösung)	National Diagnostics, Atlanta (USA)
3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ammoniumpersulfat (APS)	Carl Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Aprotinin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Bis-Acrylagel (2 % N;N'-Methylbisacrylamid)	National Diagnostics, Atlanta (USA)
5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galaktosid (X-Gal)	Carl Roth, Karlsruhe
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
Carrier-DNA	BD Biosciences, Heidelberg
Desoxyribonukleotridiphosphate (dNTP)	Thermo Scientific, Schwerte (ehemals: MBI Fermentas)
Diethylenpyrocarbonat (DEPC)	Fluka, Neu-Ulm
Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM	Biochrom, Berlin
Ethylen Glycol-bis- β -aminoethyl Ether (EGTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Fötale Kälberserum	Biochrom, Berlin
5-Fluoroorotik Säure (5-FOA)	BTS, St. Leon-Rot
Gentamycin	Biochrom, Berlin
Glass Beads (425-600 microns)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gluthation-Sepharose	Amersham Biosciences, Freiburg
Hefe tRNA	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
Heparin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
HEPES	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Isopropyl- β -D-thiogalactosid (IPTG)	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Serva, Heidelberg
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Lysozym (Muramidase)	Roche Applied Science, Mannheim
Natrium-Orthovanadat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen

N,N,N',N'-Tetraethylendiamin (TEMED)	Fluka, Neu-Ulm
Pepstatin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phenylmethansulfon-Säurechlorid (PMSF)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Reduziertes Glutathion	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ribonukleotidtriphosphate (rNTP)	Promega, Mannheim
Rinderserum-Albumin (BSA), Fraktion V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
RNasin [®] (Ribonuclease Inhibitor)	Promega, Mannheim
SERVA blue R	Serva, Heidelberg
Sephadex G-50	Amersham Biosciences, Freiburg
Sucrose	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Triton X-100	Merck, Darmstadt
Tween 20	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Fluka, Neu-Ulm

Weitere, hier nicht näher aufgeführte Standard-Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham Biosciences (Freiburg), Fluka (Neu-Ulm), J.T. Baker (Niederlande) Merck (Darmstadt), Roche Applied Science (Mannheim), Carl Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Taufkirchen).

Radiochemikalien

Folgende Radiochemikalien wurden von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen:

[α -³²P] dCTP, spezifische Aktivität ~ 3000 Ci/mmol (10 Ci/ μ l)

[α -³²P] rCTP, spezifische Aktivität ~ 800 Ci/mmol (20 Ci/ μ l)

Rainbow[™] [¹⁴C] methylated protein molecular weight marker, spezifische Aktivität ~ 10 - 100 μ Ci/mg Protein (0,004 μ Ci/ μ l), enthaltene Proteine: Myosin (200 kDa), Phosphorylase B (97,4 kDa), BSA (67 kDa), Ovalbumin (46 kDa), Carboanhydrase (30 kDa), Trypsininhibitor (21,5 kDa) und Lysozym (14,3 kDa).

2.1.2 Enzyme

Alkalische Phosphatase (<u>C</u> alf <u>I</u> ntestinal <u>A</u> lkaline <u>P</u> hosphatase)	Roche Applied Science, Mannheim
DNA-Poymerase I (Klenow-Fragment)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T4-DNA-Ligase	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte

DNase I	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
DNase RQ 1	Promega, Mannheim
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Thermo Scientific, Schwerte (ehemals: MBI Fermentas)
Restriktionsendonukleasen	New England Biolabs, Frankfurt a. M. Thermo Scientific, Schwerte (ehemals: MBI Fermentas)
RNase T1	Roche Applied Science, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs, Frankfurt a. M.
T7-RNA-Polymerase	Promega, Mannheim
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Amersham Biosciences, Freiburg

2.1.3 Längenstandards und Molekulargewichtsmarker

DNA-Längenstandards

100 Bp-Leiter (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
Fragmentlängen in bp: 1517; 1200; 1000; 900; 800; 700; 600; 517; 500; 400; 300;
200; 100

9ZBD: Plasmid pGEM9Zf⁻ gespalten mit *Bgl*I und *Dra*I,
Fragmentlängen in Bp: 1121; 822; 457; 271; 235

1 Kb-Leiter (New England Biolabs, Frankfurt a. M.)
Fragmentlängen in Kb: 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2; 1,5; 1; 0,5

λ-HindIII: λ-DNA (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) gespalten mit *Hind*III,
Fragmentlängen in Kb: 27491; 23130; 9416; 6628; 4361; 2322; 2027; 560

HyperladderI (BioCat, Heidelberg)
Fragmentlängen in Kb: 10; 8; 6; 5; 4; 3; 2,5; 2; 1,5; 1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2

RNA-Längenstandards

0,16-1,77 Kb RNA-Leiter (Thermo Scientific, Schwerte (Invitrogen))
Fragmentlängen in Kb: 1,77; 1,52; 1,28; 0,78; 0,53; 0,4; 0,28; 0,155

0,24-9,5 Kb RNA-Leiter (Thermo Scientific, Schwerte (Invitrogen))
Fragmentlängen in Kb: 9,49; 7,46; 4,4; 2,37; 1,35; 0,24

Protein-Molekulargewichtsmarker

peqGold Protein-Marker II (peQLab, Erlangen)
Markerbanden in kDa: 200; 150; 120; 100; 90; 70; 60; 50; 40; 30; 25; 20; 15; 10

Polypeptide SDS-PAGE Molecular Weight Standard (Bio Rad, München)
Markerbanden in kDa: 26,625; 16,950; 14,437; 6,512; 3,496; 1,423

BOA – Best of All – Protein Marker (Biomol, Hamburg)

Markerbanden in kDa: 120; 110; 100; 90; 80; 70; 60; 50; 40; 30; 20

Full Range Rainbow™ Recombinant protein molecular weight marker
(Amersham Biosciences Freiburg)

Markerbanden in kDa: 220; 160; 105; 75; 50; 35; 30; 25; 15; 10

2.1.4 Plasmide, Bakterien- und Hefestämme

Plasmide

pGEM9Zf	Promega, Mannheim
pGEX-6P-1	Amersham Biosciences, Freiburg
pRL-SV40	Promega, Mannheim
pUC18	Amersham Biosciences, Freiburg
pRH3'	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
pRH3'/IRE	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
pRH5'	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
pYESTrp2	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
pYESTrp2/IRP	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
P5 NF1-cDNA Sonde	Dr. Francis Collins, University of Michigan, Michigan (USA)

Bakterien

<i>E. coli</i> BL21	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
<i>E. coli</i> XL1-blue	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
<i>E. coli</i> JM109	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
<i>E. coli</i> TOP10f	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte

Hefen

<i>Saccharomyces cerevisiae</i> L40uraMS2	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> R40-coat	Dr. Marvin Wickens, University of Wisconsin, Madison (USA)

2.1.5 Proteinfiler und cDNA Bank

high-density Proteinfiler

bezogen vom Resource Center German Human Genome Project (RZPD, Berlin):

Bank Nummer: 800, Library Human Fetal Brain Protein Expression

cDNA-Bank (für Hefe 3-Hybrid-System):

cDNA Bank generiert aus HeLa Zellen im Vektor pYESTrp (Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte).

Für detailliertere Spezifikationen siehe jeweiliger Vertreter.

2.1.6 Untersuchtes Patientenmaterial

Ausgehend von Herrn Axmanns Befunden (1999) wurden mehrere Patienten auf Mutationen in der NF1-3'UTR untersucht. Bei allen Patienten wurde entsprechend der Diagnosekriterien, festgelegt vom National Institute of Health (NIH) im Juli 1987, eine NF1 Erkrankung diagnostiziert. Allerdings konnte keine krankheitsauslösende Sequenzveränderung im kodierenden Bereich des *NF1*-Gens gefunden werden. Für die Mutationsanalysen wurde sowohl RNA als auch genomische DNA benötigt. Es standen dafür Kulturen fibroblastenartiger Zellen des jeweiligen Patienten zur Verfügung.

2.1.7 Standardlösungen

Ammoniumpersulfat (APS) Lösung (10 %)	100 mg/ml in H ₂ O
DEPC-Wasser	0,1 % Diethylphyrocarbonat in H ₂ O
5x Elektrodenpuffer (SDS-PAGE)	72 g Glyzin, 5 g SDS, 15 g Tris H ₂ O ad 1000 ml (pH 8,3)
Ethidiumbromid-Lösung	10 mg EtBr in H ₂ O
IPTG-Stammlösung	100 mM in H ₂ O
5x Ladepuffer (SDS-PAGE)	300 mM Tris/HCl (pH6,8), 0,1 % Bromphenolblau (w/v), 35 % Glycerin (v/v), 25 % β-Mercaptoethanol (v/v), 15 % SDS (w/v)
5x Ladepuffer (native Agarosegele)	10 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 % Brom- phenolblau (w/v), 0,25 % Xylencyanol (w/v), 50 % Glycerin (v/v)
5x Ladepuffer (EMSA)	0,25 % Bromphenolblau (w/v), 40 % Sucrose
dNTP-Stammlösung (PCR)	1,25 mM dATP, 1,25 mM dCTP, 1,25 mM dGTP, 1,25 mM dTTP

rNTP-Stammlösung (für nicht radioaktive Transkription)	2,5 mM rATP, 2,5 mM rCTP, 2,5 mM rGTP, 2,5 mM rUTP
rNTP (ohne rCTP)-Stammlösung (für radioaktive Transkription)	2,5 mM rATP, 2,5 mM rGTP, 2,5 mM rUTP
rCTP-Stammlösung (für radioaktive Transkription)	100 µM in DEPC-Wasser
10x PCR-Puffer (15mM bzw. 20mM)	15 bzw. 20 mM MgCl ₂ , 500 mM KCl, 100 mM Tris/HCl (pH 8,3)
PBS (isotonischer Phosphatpuffer)	0,2 g KCl, 0,2 g KH ₂ PO ₄ , 8 g NaCl, 42 g Na ₂ HPO ₄ , H ₂ O ad 1000 ml (pH 7,2)
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	1 M Tris/HCl (pH 6,8)
5x TBE-Puffer	89 mM Borsäure, 2 mM EDTA (pH 8,3), 89 mM Tris
1x TE-Puffer (10/1)	1 mM EDTA (pH 8,0), 10 mM Tris/HCl
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8)
X-Gal-Stammlösung	20 mg/ml in Dimethylformamid

2.1.8 Kulturmedien und Antibiotika

Ampicillin-Stammlösung	25 mg/ml in H ₂ O
DMEM-Medium (Zellkultur)	0,5 g Glucose, 20 ml NaHCO ₃ (7,5 %ig), 5 ml Penicillin-Strepto- mycin, 50 ml foetales Kälberserum, 10 ml L-glutamin, 50 ml DMEM I (Dulbeccos modified Eagle medium, 10x konzentriert) ad 500 ml H ₂ O
Einfriergemisch für Bakterien/Hefen	50 % Glycerin (v/v) im entsprechenden Medium
Kanamycin-Stammlösung	25 mg/ml in H ₂ O
LB-Medium (Bakterien)	1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 250 mM NaCl, pH 7-7,5 für Platten: +1,5 % Select-Agar (w/v)

LB/Amp ⁺ (Bakterien)	LB-Medium, 50 µg/ml Ampicillin-Stammlösung
SOC-Medium	2 % Bacto-Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl ₂ , 10 mM MgSO ₄ , 10 mM NaCl, 20 mM Glucose
YPD-Medium (Hefen)	2 % Difco-Pepton, 2 % Glucose, 1 % Hefeextrakt, pH 5,8 für Platten: +1,5 % Select-Agar (w/v)

Für Hefe-Selektionsmedien wurden Minimal SD (synthetic dropout) (Agar) Base-Medien und entsprechende Aminosäuremischungen der Firma BD Biosciences (Heidelberg) verwendet.

2.1.9 Primersequenzen

Die aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Hybaid (Ulm) bezogen. Positionsangaben beziehen sich auf die Lage innerhalb der 3'UTR, beginnend mit dem ersten Nukleotid nach dem Stopp-Codon UGA. Position 1 entspricht der Base 85599 der genomischen *NFI*-Sequenz (GenBank Nr.: L05367). Base 85599 entspricht der Position 31.374.156 der humanen Sequenz GRCh38.p2 (Annotation Release 107).

Folgende Primer wurden verwendet für:

a) Verschiedene 3'UTR Fragmente

Ein Teil der Hinprimer wurde am 5'-Ende mit der T7-RNA-Polymerase Erkennungssequenz ausgestattet. Aus Klonierungsgründen (Nukleaseschutz) und um die optimale Funktion der Polymerase zu gewährleisten wurden an das 5'-Ende der T7-Sequenz mehrere Basen (hier: *Bam*HI-Erkennungssequenz) synthetisiert, die nicht zum T7-Promotor zählen.

T7=5'-GGATCCTTTA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'

<i>Primer</i>	<i>Position</i>	<i>Sequenz (5'→3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>
T7/1c hin PBR1 rück	167-183 280-257	(T7 -)AGT AAA TTT AAT GCT GC AGT TTC CTG ACC TCC CAC TTT CTT	48°C
PBR1 hin ohne T7 PBR1 rück	145-168 280-257	TGA TCA ACT CTT CGA AGC CTT GCC AGT TTC CTG ACC TCC CAC TTT CTT	59°C

PBR2 hin ohne T7	800-820	AGG TGG TTT TTT TGT GTT TTG	48°C
PBR2 rück b	980-961	GCT AAT GCA AAC ATC TAT GA	
PBR3 hin ohne T7	978-1001	AGC TCC ATA GCA AAA TGG AAT GGT	56°C
PBR3 rück	1147-1123	GAG GTT TCT GAT TTT TTT GGA GAG G	
FRn, b (hin) *	3313-3328	(T7 -)CTA CAA CCT TGT TAA	48°C
FRn, z (rück) *	3460-3441	TAC ATA CAC AAG GAG GAA AA	
FRg (hin)	1841-1863	GTA GAG GCTGCA TTA GAA GAA AA	52°C
FRg (rück)	2130-2110	GGG AAG AGC AAA ATA GCA TAA	

*(FRn = PBR5)

b) Analyse von Sequenzveränderungen in der NF1-3'UTR

Primer zur Klonierung

<i>Primer</i>	<i>Position</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>
NF 85555 (hin)	-32--43	GCG CTG GCA GTT TCA AAC GTA	48°C
NF 86723 (rück)	1125-1104	AGG AGG AGG AAG ATT AAA AGA C	
NF 86646 (hin)	1048-1070	CCA AGA ATA GAG TAT GGT GTA TA	50°C
NF 87729 (rück)	2131-2110	GGG AAG AGC AAA ATA GCA TAA	
NF 87440 (hin)	1841-1863	GTA GAG GCT GCA TTA GAA GAA AA	50°C
FRj (rück)	2815-2795	AGG ACA CAG GAT AGA AGC TGA	
NF 88019 (hin)	2420-2439	TAT GTG TCC CTT GAG AAA TG	48°C
NF 89154 (rück)	3556-3536	GAA AAC AGA GCC GAT ACA TCT	

Primer zur Verifizierung von möglichen Sequenzveränderungen

<i>Primer</i>	<i>Position</i>	<i>Sequenz (5' → 3')</i>	<i>Annealing-temperatur</i>
NF 85555 (hin)	-32--43	GCG CTG GCA GTT TCA AAC GTA	59°C
3'UTR 924 (rück)	924-907	CAC TGA TTA CCC TGC TCA	
3'UTR 406 (hin) *	406-420	AGT GTT AGT CCT ATT TAT ACA TTT T	----
3'UTR 1809 (hin)	1809-1832	GCA ATT TAC TAA ACT TTT GTT TTT	53°C
3'UTR 2041 (mut;T) (rück) *	2061-2040	TCG AAC TAA AGT TAT CAA ATG C	
3'UTR 1809 (hin)	1809-1832	GCA ATT TAC TAA ACT TTT GTT TTT	53°C
3'UTR 2211 (mut;C) (rück)	2211-2191	AAT ACT ACA CCC TTG GTA AGC	
FRm (hin)	3143-3162	CTG CAC ATG GAT AAC AAC AA	55°C
FRn y neu (rev)	3425-3399	ATA AAG ATC TGA AAT GGA TTT CTA TG	
SNAP 6 A-T *	3345-3362	GTA TTT TTC CTG CTG GCG	----

*(Primer für SNaPshot™ (Primer Extension) verwendet, Reaktionsbedingungen gemäß Herstellerangaben)

c) *In vitro*-Mutagenese

Primer	Sequenz (5' → 3')
PBR5 Mut1/2 (hin)	CCATTTTCAGATCTTTATTGTTCTTCACCCCATTTTCTCCTTGTG
PBR5 Mut1/2 (rück)	CACAAGGAGGAAAATGGGGTGAAGAACAATAAAGATCTGA AATGG
PBR5 Mut1/2+1 (hin)	CCATTTTCAGATCTTTATTGTTGTTTCACCCCATTTTCTCCTTGTG
PBR5 Mut1/2+1 (rück)	CACAAGGAGGAAAATGGGGTGAACAACAATAAAGATCTGA AATGG
PBR5 Mut2/3 (hin)	CAGATCTTTATTGTTCTCCTCACCTCATTTCCTCCTTGTGTATC
PBR5 Mut2/3 (rück)	GATACACAAGGAGGAAAATGAGGTGAGGAACAATAAAGATC TG
PBR5 Mut2/3+2 (hin)	CAGATCTTTATTGTTCTCCTCACGTCATTTCCTCCTTGTGTATC
PBR5 Mut2/3+2(rück)	GATACACAAGGAGGAAAATGACGTGAGGAACAATAAAGATC TG

d) Klonierung der Fragmente für Transfektionsexperimente (Primer für NF1-3'UTR s.o.)

Primer	Sequenz (5' → 3')	Annealing- temperatur
alpha2-Globin 3'UTR (hin)	GCT GGA GCC TCG GTA GCC GTT	55°C
alpha2-Globin 3'UTR (rück)	CCC ACT CAG ACT TTA TTC AAA GAC	
GM-CSF 3'UTR (hin)	TGA GAC CGG CCAGAT GAG GCT GGC	57°C
GM-CSF 3'UTR (rück)	AGA AGC ATA TTT TTA ATA ATA ATT ATT	
puc18univ.PCR-Primer	CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCC AGT	40°C
puc18rev.PCR-Primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC	
P5 (hin)	CAC AGA TGA GTT TGA TCA ACG A	45°C
P5 Xba (rück)	CTA GTA GGG GAG AGT TCA ACG TTC T	
P5 Xba (hin)	CTA GCA CAG ATG AGT TTG ATC AAC GA	45°C
P5 (rück)	TAG GGG AGA GTT CAA CGT TCT	

e) Umklonierung/Analyse der cDNA von Klonen auf den Proteinfiltren

Primer	Sequenz (5' → 3')	Annealing- temperatur
Umklonier (Filter) hin	ATC CTA TTT AGG TGA CAC TAT AGA A	53°C
Umklonier (Filter) + rev	GGC CAA GCT TAA TAC GAC TCA CTA TAG	(<i>Pfu</i> -Polymerase)
Umklonier (Filter) + hin	AAT TAT CCT ATT TAG GTG ACA CTA TAG	53°C
Umklonier (Filter) rev	AAG CTT AAT ACG ACT CAC TAT AGG	(<i>Pfu</i> -Polymerase)
NFAR-1_B_rev	CAA CGT CAT TCA GGA TAA CTA T	59°C
NFAR-1_Y_rev	TGA CCC GCT GCA CCT	59°C
NFAR-1_Z_rev	GTC TAC ATT CAG CTT AAT TCA GAT	59°C
pGEX hin	GTG GCG ACC ATC CTC CAA AA	59°C
hnRNPA1_B_rev	TTG ATT ACA CAT GAT AAT GGA TAC	59°C

f) Sonstige Primer

Primer	Sequenz (5'→3')	Verwendung bei
Ex5H	CAT GTG GTT CTT TAT TTA TAG GC	Polymorphismus in Exon 5 (Primer für DNA)
Ex5RII	CCA AGT CAA ATA GCT TTT CTG C	
672 hin *	TAG TCG CAT TTC TAC CAG GTT	Polymorphismus in Exon 5 (Primer für cDNA)
755-731+RsaI rück*	GTC AAA TAG CTT TTC TGT ACA TTC	
pRH Forward *	CTG TCT CTA TAC TCC CCT ATA G	Hefe 3-Hybrid-System
pRH Reverse *	CAA AAT TCA ATA GTT ACT ATC GC	Hefe 3-Hybrid-System
pYESTrp Forward *	GAT GTT AAC GAT ACC AGC CTC	Hefe 3-Hybrid-System
pYESTrp Reverse *	GCG TGA ATG TAA GCG TGA C	Hefe 3-Hybrid-System

*(Primer mit und ohne Cy5-Markierung am 5'-Ende)

2.1.10 Reagentsysteme (KITs)

Folgende Kits wurden, wenn nicht gesondert vermerkt, gemäß den Herstellerangaben verwendet:

ABI PRISM [®] BigDye [™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
ABI PRISM [®] SnaPshot [™] ddNTP Primer Extension Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
Coomassie [®] Plus Protein Assay Reagent Kit	Pierce Rockford (USA)
DC-Protein Assay	BioRad, München
Effectene [™] Transfection Reagent	Qiagen, Hilden
GFC [™] Micro Plasmid Prep Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
DNA and Gel GFC [™] PCR Band Purification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
High Pure PCR Template Preparation Kit	Roche Applied Science, Mannheim
QIAfilter Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAfilter Plasmid Mega Kit	Qiagen, Hilden
QuikChange [™] Site Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, Heidelberg
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNA-Protein Hybrid Hunter [™] Kit	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
Sure Clone Ligation Kit	Amersham Biosciences, Freiburg
SUPER SCRIPT [™] First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Thermo Scientific (Invitrogen), Schwerte
TempliPhi Amplification Kit	Amersham Biosciences, Freiburg

Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Biosciences, Freiburg
YEASTMAKER™ Yeast Transformation System	BD Biosciences, Heidelberg

2.1.11 Software und Datenbanken

AIDA V3.12	raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
ALF Manager™ V3.0	Amersham Biosciences, Freiburg
ALF Fragment Manager™ V1.2	Amersham Biosciences, Freiburg
BAS Reader V3.14	raytest Isotopenmeßgeräte GmbH, Straubenhardt
Deutsches Ressourcen Zentrum für Genomforschung	http://www.rzpd.de
Gene Scan Analysis Software™ V3.7	Applied Biosystems, Foster City, USA
GCG 6.0	Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, USA
Jmol	Jmol: an open–source Java viewer for chemical structures in 3D. http://jmol.sourceforge.net/
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
OMIM	http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/omim/
RNAdraw	www.rnadraw.com
RNAComposer	http://rnacomposer.cs.put.poznan.pl
UCSC Browser (PhyloP, PhastCons)	http://genome.ucsc.edu
Variation Viewer	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/variation/view/
Virtual Genome Center (T _M Determination)	http://alces.med.umn.edu/rawtm.html

UCSC Gene Browser (Kent et al., 2002 und Rosenbloom et al., 2015):

Verwendete Referenzsequenzen

<i>Organismus</i>	<i>Spezies</i>	<i>Algorithmen (PhyloP bzw. PhastCons)</i>		<i>DNA Sequenzvergleich (Basenebene)</i>	
		<i>Freigabedatum Sequenz</i>	<i>UCSC Version</i>	<i>Freigabedatum Sequenz</i>	<i>UCSC Version</i>
Mensch	Homo sapiens	Feb. 2009	zhg19/ GRCh37	Feb. 2009	zhg19/ GRCh37
Alpaka	Vicugna pacos	Juli 2008	vicPac1	März 2013	Vicugna_pacos- 2.01/VicPac2
Delphin	Tursiops truncatus	Feb. 2008	turTru1	Okt.2011	Baylor Ttru_1.4/turTru 2
Erd- hörnchen	Spermophilus tridecemlineatus	Feb. 2008	speTri1	Nov. 2011	Broad/speTri2
Eidechse	Anolis carolinensis	Feb. 2007	anoCar1	Mai 2010	Broad AnoCar2.0/ano Car2
Elefant	Loxodonta africana	Juli 2009	loxAfr3	Juli 2009	Broad/loxAfr3
Faultier	Choloepus hoffmanni	Juli 2008	choHof1	Juli 2008	choHof1
Flughund	Pteropus vampyrus	Juli 2008	pteVam1	Juli 2008	Broad/pteVam1
Fugu	Takifugu rubripes	Okt. 2004	fr2	Okt.2011	FUGU5/fr3
Gorilla	Gorilla gorilla gorilla	Okt. 2008	gorGor1	Mai 2011	gorGor3.1/gorG or3
Gürteltier	Dasypus novemcinctus	Juli 2008	dasNov2	Dez. 2011	Baylor/ dasNov3
Huhn	Gallus gallus	Mai 2006	galGal3	Nov. 2011	ICGSC Gallus_gallus- 4.0/galGal4
Hund	Canis lupus familiaris	Mai 2005	canFam2	Sep. 2011	Broad CanFam3.1/can Fam3
Igel	Erinaceus europaeus	Juni 2006	eriEur1	Mai 2012	EriEur2.0/eriEur 2
Känguru- ratte	Dipodomys ordii	Juli 2008	dipOrd1	Juli 2008	dipOrd1
Kaninchen	Oryctolagus cuniculus	Apr. 2009	oryCun2	Apr. 2009	Broad/oryCun2
Katze	Felis catus	März 2006	felCat3	Sep. 2011	ICGSC Felis_catus6.2/f elCat5
Kobold- maki	Tarsier syrichta	Aug. 2008	tarSyr1	Aug. 2008	tarSyr1
Krallenaffe	Callithrix jacchus	Juni 2007	calJac1	März 2009	WUGSC 3.2/calJac3
Kugelfisch	Tetraodon nigroviridis	März 2007	tetNig2	März 2007	Genoscope 8.0/tetNig2
Maus	Mus musculus	Juli 2007	mm9	Dez. 2011	GRCm38/mm10
Mausmaki	Microcebus murinus	Juli 2007	micMur1	Juli 2007	micMur1

Mausohrfl edermaus	Myotis lucifugus	März 2006	myoLuc1	Juli 2010	Broad Institute Myoluc2.0/myo Luc2
Meerschw einchen	Cavia porcellus	Feb. 2008	cavPor3	Feb. 2008	Broad/cavPor3
Neunauge	Petromyzon marinus	März 2007	petMar1	Sep. 2010	WUGSC 7.0/petMar2
Opossum	Monodelphis domestica	Okt. 2006	monDom 5	Okt. 2006	Broad/monDom 5
Orang- Utan	Pongo pygmaeus abelii	Juli 2007	ponAbe2	Juli 2007	WUGSC 2.0.2/ponAbe2
Pavian	Papio hamadryas	Nov. 2008	papHam 1	Nov. 2008	papHam1
Pfeifhase	Ochotona princeps	Juli 2008	ochPri2	Mai 2012	OchPri3.0/ochPr i3
Pferd	Equus caballus	Sep. 2007	equCab2	Sep. 2007	Broad/equCab2
Ratte	Rattus norvegicus	Nov. 2004	rn4	März 2012	RGSC 5.0/rn5
Reis- kärpfling	Oryzias latipes	Okt. 2005	oryLat2	Okt. 2005	NIG/UT MEDAKA1/ory Lat2
Rhesusaffe	Macaca mulatta	Jan. 2006	rheMac2	Okt.2010	BGI CR_1.0/rheMac 3
Riesen- galago	Otolemur garnettii	Dez. 2006	otoGar1	März 2011	Broad/otoGar3
Rind	Bos taurus	Okt. 2007	bosTau4	Okt. 2011	Baylor Btau_4.6.1/bosT au7
Schimp- panse	Pan troglodytes	März 2006	panTro2	Feb. 2011	CASC 2.1.4/panTro4
Schliefer	Procapia capensis	Juli 2008	proCap1	Juli 2008	proCap1
Schnabel- tier	Ornithorhynch us anatinus	März 2007	ornAna1	März 2007	WUGSC 5.0.1/ornAna1
Spitz- hörnchen	Tupaia belangeri	Dez. 2006	tupBel1	Dez. 2006	tupBel1
Spitzmaus	Sorex araneus	Juni 2006	sorAra1	Aug. 2008	Broad/sorAra2
Stichling	Gasterosteus aculeatus	Feb. 2006	gasAcu1	Feb. 2006	Broad/gasAcu1
Tenrek	Echinops telfairi	July 2005	echTel1	Nov. 2012	Broad/echTel2
Tropischer Krallen- frosch	Xenopus tropicalis	Aug. 2005	xenTro2	Sep. 2012	JGI 7.0/xenTro7
Wallaby	Macropus eugenii	Nov. 2007	macEug1	Sep. 2009	TWGS Meug_1.1/macE ug2
Zebrafink	Taeniopygia guttata	Juli 2008	taeGut1	Feb. 2013	WashU taeGut324/taeG ut2
Zebrafisch	Danio rerio	Dez. 2008	danRer6	Juli 2010	Zv9/danRer7

2.2 Methoden

Alle gebräuchlichen molekularbiologischen Methoden wie DNA- (RNA-) Isolierung, deren Fällung, Aufreinigung, Restriktion und elektrophoretische Auftrennung sowie die Vervielfältigung (PCR) und Klonierung von DNA-Fragmenten erfolgten nach allgemein gültigen Standardvorschriften und werden im Folgenden nicht explizit dargestellt. Ebenso wird bei der Verwendung von Reagentiensystemen auf eine genaue Erläuterung biochemischer Hintergründe verzichtet und auf die jeweiligen Herstellerangaben verwiesen. Lediglich auf Abweichungen und Besonderheiten wird näher eingegangen. Außerdem sind solche Methoden ausführlicher dargestellt, die für die Arbeit spezifisch erscheinen.

2.2.1 Gewinnung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen

2.2.1.1 Isolierung verschiedener Plasmid-Mengen

Um Plasmide oder einklonierte DNA-Fragmente für weitere Arbeitsschritte (z.B. *in vitro*-Transkription, *in vitro*-Mutagenese) zur Verfügung zu haben, war eine qualitativ und quantitativ hochwertige Isolierung rekombinanter Plasmid-DNA notwendig. Die Wahl des Kits richtete sich nach der benötigten Plasmid-Menge. Um kleinere Plasmid-DNA Mengen zu gewinnen, kam der GFCTM Micro Plasmid Prep Kit der Firma Amersham Biosciences zum Einsatz. Wurden größere Mengen an Plasmid-DNA benötigt, war der Plasmid-Midi-Kit der Firma Qiagen sinnvoll. Die Präparationen wurden jeweils nach Herstellerangaben durchgeführt. Quantität und Qualität der so gewonnenen Lysate konnte sowohl durch elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots im Agarosegel als auch durch Extinktionsmessung bestimmt werden.

2.2.1.2 Isolierung von Plasmiden einer cDNA Bank

Im Hefe 3-Hybrid-System (s. 2.2.10) sollte eine cDNA-Bank nach möglichen RNA-Interaktionspartnern gescreent werden. Hierfür war es nötig, die cDNA tragenden Plasmide aus *E.coli* zu isolieren. Um Selektionsvorteile und somit eine Anreicherung einzelner Plasmide zu verhindern, wurde die Bank nicht in Flüssigkultur vermehrt, sondern auf Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert. Die hier verwendete HeLa cDNA-Bank der Firma Invitrogen wurde so ausplattiert, dass noch einzelne Kolonien auf den über Nacht bei 37°C inkubierten Platten zu sehen waren. Bei einem

Plattendurchmesser von 14,5 cm waren das 30.000 Klone pro Platte. Insgesamt wurden 100 Platten beimpft. Die Klone wurden mit Hilfe von 5 ml LB-Medium und eines Trigalskispatels von den Platten gelöst und die Suspension anschließend abpipettiert. Durch einen 10 min Zentrifugationsschritt bei 1.000 rpm und 4°C wurden die Bakterien pelletiert. Die anschließende Plasmidisolierung erfolgte mit dem QIAfilter Plasmid Mega Kit (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben. Die maximal einsetzbaren Bakterienmengen und die benötigten Puffervolumina wurden über das Feuchtgewicht des Bakterienpellets ermittelt. Die Plasmid-DNA wurde in 10 mM Tris/HCl (pH 8,5) gelöst und stand dann für weitere Versuche zur Verfügung.

2.2.1.3 Gewinnung von Plasmid-DNA mittels TempliPhiTM Amplification Kit

Dieses Kit dient zur Amplifikation zirkulärer einzel- oder doppelsträngiger DNA ausgehend von geringsten Mengen Template DNA (z.B. einer Bakterienkolonie). Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben. Die so gewonnene DNA wurde als Template in Sequenzreaktionen eingesetzt. Die Bestimmung der Quantität erfolgte photometrisch.

2.2.2 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration

2.2.2.1 Abschätzung der DNA-Konzentration im Agarosegel

Zum Aliquot der zu untersuchenden DNA wurden parallel entweder verschiedene Mengen ungespaltener λ -DNA oder eine Massenleiter (HyperladderI, BioCat) auf ein geeignetes Agarosegel mit Ethidiumbromid aufgetragen. Nach erfolgter Elektrophorese konnte durch Vergleich der Intensitäten unter UV-Licht die Konzentration der DNA-Lösung abgeschätzt werden.

2.2.2.2 Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration durch Extinktionsmessung

Durch Extinktionsmessung bei 260 nm (OD_{260}) im Spektrophotometer konnte die Konzentration einer DNA (RNA) Lösung bestimmt werden. Einer OD_{260} von 1 (Küvettdicke 1 cm) entsprach eine DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ Lösung. Bei RNA entsprach die Extinktion bei 260 nm von 1 einer Konzentration von 40 $\mu\text{g/ml}$ Lösung. Der Quotient OD_{260}/OD_{280} gibt Auskunft über die Qualität der DNA oder RNA: Werte $\leq 1,6$

deuten auf einen hohen Proteingehalt hin, während Werte $\geq 2,0$ auf einzelsträngige DNA schließen lassen (hyperchromer Effekt).

2.2.3 Sequenzierung von Plasmiden

Die DNA-Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Da im Rahmen dieser Arbeit unterschiedliche Klonierungsvektoren verwendet wurden, kamen unterschiedliche Sequenzprimer zum Einsatz. Das Plasmid pUC 18 enthält die zu den M13- und Revers-Sequenzprimern komplementären Sequenzen, für alle anderen Vektoren wurden jeweils sequenzspezifische Primer eingesetzt. Die Sequenzreaktionen wurden unter Verwendung des Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP (Amersham Biosciences, Freiburg) oder des ABI PRISM[®] BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Auftrennung und Detektion der Produkte erfolgte im ersten Fall mittels der automatischen Sequenziereinheit ALFexpress (Automatisierte-Laser-Fluoreszenz-Detektion) und im anderen Fall durch den ABI PRISM[®] 3100 Genetic Analyzer.

2.2.3.1 Sequenzierung mittels ALFexpress

In vier getrennten Reaktionen wurden jeweils etwa 1-1,5 μg zu sequenzierendes Plasmid, Cy5-markierte Sequenzprimer, T7-DNA-Polymerase und Nukleosidtriphosphate (dNTPs) gemischt sowie jeweils eine Sorte von Didesoxynukleotiden (ddNTPs) zupipettiert. Die Polymerase synthetisierte nun, nach Hitzedenaturierung des Plasmids und Anheften der Primer, den zur Matrize komplementären Gegenstrang. Der Einbau eines ddNTPs in einen neu synthetisierten Strang führte zum Stillstand der Synthesereaktion. Die daraus resultierenden unterschiedlich langen DNA-Fragmente zeichneten sich durch ihre 3'-Enden aus, die eines der vier möglichen ddNTPs trugen. Die 5'-Enden unterschieden sich dagegen nicht und waren auf Grund der verwendeten Primer mit dem Fluorophor Cy5 markiert.

Die DNA-Fragmente wanderten durch das Gel, an den fest montierten Photodetektoren und einem Laserstrahl (Helium-Neon-Laser) vorbei. Das Laser-Licht (632 nm) regte die fluoreszenzmarkierte DNA an, die emittierte Strahlung wurde von den Photodetektoren gemessen. Das Auftragen der Sequenzreaktionen in definierter Reihenfolge (A,C,G,T) für jeden Klon ermöglicht die automatisierte Erfassung und Auswertung der Emissionswerte

durch eine Computersoftware. Wurde zu einem bestimmten Zeitpunkt, dieser korrelierte mit einer bestimmten Fragmentlänge, nur in einer der vier Spuren Fluoreszenz gemessen, deutete dies auf das entsprechende Nukleotid an der betreffenden Stelle des DNA-Fragmentes hin. Durch die ansteuernde Computersoftware wurde dann die gesamte Sequenz errechnet.

2.2.3.2 Sequenzierung mittels ABI PRISM[®]3100 Genetic Analyzer

Diese Sequenzreaktionen unterscheiden sich etwas von denen, die auf dem ALFexpress aufgetrennt wurden. Die Sequenzprimer tragen keine Markierung, sondern die vier ddNTPs waren mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Dies ermöglichte, dass die Sequenzreaktion nicht in vier unterschiedlichen Ansätzen durchgeführt werden musste. Damit war nur ein Ansatz nötig, der auch in einer Spur aufgetrennt werden konnte. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte beim ABI PRISM[®]3100 Genetic Analyzer in mit Polymer gefüllten Kapillaren. Durch die ansteuernde Computersoftware wurde dann aus den Fluoreszenzsignalen die Sequenz errechnet.

Die genaue Durchführung erfolgte - bis auf kleine Änderungen - wie im ABI PRISM[®]BigDye[™] Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit angegeben. Lediglich die Menge des Terminator Ready Reaction Mixes wurde auf 2 µl reduziert und ein Temperaturschritt während der Cycle Sequencing Reaktion von 50°C auf 55°C erhöht. Außerdem musste die Template DNA vor der eigentlichen Sequenzreaktion durch eine Ethanol-Fällung gereinigt und anschließend in Ultrapur Wasser (Merck) gelöst werden.

2.2.4 Elektrophoretische Auftrennung von PCR-Produkten mit ALFexpress

Mit dem oben beschriebenen ALFexpress-System wurden auch PCR-Produkte mit hoher Auflösung auf einem Acrylamidgel getrennt. Damit die Photodetektoren die vorbeiwandernden DNA-Fragmente erkennen konnten, mussten diese Cy5-markiert sein.

Die zu untersuchenden DNA-Abschnitte wurden in einer PCR mit unmarkierten Primern amplifiziert und anschließend mit dem DNA and Gel GFC[™] PCR Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt. Die Markierung der PCR-Produkte erfolgte in einem weiteren PCR-Zyklus, bei dem von den ursprünglich verwendeten Primern einer jetzt Cy5-markiert war. Ein Aliquot dieser Produkte und gegebenenfalls interne Standards (PCR-Produkte definierter Länge) wurden mit ALF-Ladepuffer (Amersham Biosciences, Freiburg) versetzt und vor dem Auftrag bei 90°C für 3 min

denaturiert. Gelzusammensetzung und Laufbedingungen wurden gemäß Herstellerangaben gewählt. Die Auswertung erfolgte mittels der ALF Fragment Manager™ V1.2 Software.

2.2.5 Analyse von Sequenzveränderungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Sequenzveränderungen (meist Einzelbasenaustausche) entweder mittels Restriktionsanalyse oder durch Primer-Extension untersucht. Die zweite Möglichkeit bot den Vorteil, dass sie vom Vorhandensein von Erkennungssequenzen geeigneter Restriktionsenzyme unabhängig war. Das Prinzip der Primer-Extension Methode ist mit der Sequenzierung durch Kettenabbruch vergleichbar. Ein unmarkiertes Oligonukleotid, das unmittelbar vor der polymorphen Stelle endete, wurde in einer thermischen Reaktion um die gesuchte Base verlängert. Durch das ausschließliche Angebot von ddNTPs wird eine weitere Verlängerung des Stranges verhindert. Die Markierung der Didesoxynukleotide mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen erlaubt die Detektion und Identifikation des eingebauten Nukleotids durch den ABI PRISM® 310 Genetic Analyser.

2.2.5.1 Durchführung einer Primer-Extension

Für Primer-Extension Reaktionen kam der ABI PRISM® SnaPshot™ ddNTP Primer Extension Kit der Firma Applied Biosystems zum Einsatz. Jedoch musste vor der eigentlichen Reaktion das PCR-Produkt, welches als Template diente, aufgereinigt werden. Durch einen 60 min Inkubationsschritt mit Shrimp Alkaline Phosphatase (SAP) und Exonuklease I wurden nicht eingebaute Nukleotide dephosphoryliert und die ursprünglichen Primer verdaut. Nach Inaktivierung der Enzyme konnte die eigentliche Reaktion durchgeführt werden. Sämtliche Mengenangaben und Reaktionsbedingungen wurden dem Kit-Handbuch entnommen. Nicht-eingebaute ddNTPs wurden enzymatisch dephosphoryliert. Vor Auftrennung und Analyse der Produkte auf den ABI PRISM® 310 mussten die Proben noch mit Formamid versetzt und denaturiert werden.

2.2.6 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Proteinlysaten

2.2.6.1 Protein-Isolierung aus humanen Zellen

Die Proteinisolierung aus humanen fibroblastenartigen Zellen oder HeLa Zellen erfolgte nach dem von Gutmann et al. (1991) beschriebenen Verfahren, allerdings mit

geringfügigen Modifikationen. Hierfür wurden die Zellen in DMEM-Medium, dem 10 % foetales Kälberserum (FCS) zugesetzt waren, mit der Dichte von 20.000 Zellen/cm² ausgesät und vor Gebrauch 30 Stunden kultiviert. Nach Absaugen des Kulturmediums schlossen sich drei Waschschrte mit kaltem PBS an, bevor die Zellen abgeschabt und in Eppendorfgefäße überführt wurden. Die Lyse der Zellen erfolgte für 30 min auf Eis mit dem dreifachen Volumen Lysispuffer, dem vor Gebrauch Protease-Inhibitoren zugesetzt worden waren. Ein Zentrifugationsschritt (10.000x g, 10 min, 4°C) diente zur Entfernung von Zellresten. Der Überstand, das Protein-Lysat wurde mit Glycerin (Endkonzentration 25 %) versetzt und stand für die Proteinbestimmung zur Verfügung.

Lysispuffer: 50 mM Tris/HCl (pH7,5), 150 mM NaCl, 1 mM EGTA, 0,25 % Natrium-desoxycholat, 0,1 % Nonidet P-40, Protease-Inhibitor Cocktail (Roche Applied Science, Mannheim)

2.2.6.2 Proteinbestimmung

Zur Proteinbestimmung wurde der *DC* Protein-Assay der Firma Bio-Rad (München) verwendet. Die Reaktion war identisch mit der bekannten Lowry-Methode (Lowry et al. 1951; Peterson 1979). Dieser Test eignete sich besonders für die Bestimmung von Proteingehalten in detergenzienhaltigen Proben. Allerdings war er inkompatibel mit β -Mercaptoethanol und reduziertem Gluthation. Waren diese Substanzen in der zu untersuchenden Proteinlösung vorhanden, wurde der Coomassie[®]Plus Protein Assay Reagent Kit der Firma Pierce (Rockford, USA) verwendet. Dieser Test beruhte auf der Methode von Bradford (Bradford, 1976). Die Durchführungen erfolgten gemäß Herstellerangaben, wobei mit steigender Proteinmenge die Farbintensität der Probe (Komplexbildung) zunahm. Abschließend erfolgte eine OD Messung beim jeweiligen Absorptionsmaximum der beiden Testsysteme. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte durch Vergleich der Messwerte mit einer Eichgeraden, die jeweils parallel mit BSA hergestellt wurde.

2.2.7 *In vitro*-Mutagenese

Mit dem QuikChange[™] Site Directed Mutagenesis Kit der Firma Stratagene war es möglich, gezielt einzelne Basen in doppelsträngigen Plasmiden auszutauschen. Dies lies sich beispielsweise bei funktionellen Untersuchungen von RNA-Protein Interaktionen nutzen. Es konnten gezielt einzelne Nukleotide in dem zur Protein-Bindung relevanten RNA Motiv mutiert werden. Hierfür wurde das Plasmid, welches die zu verändernde DNA

Sequenz trug, in *E.coli* vermehrt und isoliert (siehe 2.2.1.3). In die eigentliche Reaktion, vergleichbar mit einer PCR, wurden 10 ng Plasmid-DNA als Template eingesetzt. Als Primer dienten zwei komplementäre Oligonukleotide, die eine veränderte Base im Vergleich zur Template DNA trugen. Die Länge der Oligonukleotide sowie die Amplifikationsbedingungen wurden gemäß Herstellerangaben gewählt. Während der zyklischen Reaktion lagerten sich die Primer an die komplementären Plasmid-Sequenzen an. Die Synthese der neuen DNA erfolgte durch eine *Pfu*-DNA-Polymerase, die beide Stränge des Plasmids amplifizieren konnte, ohne dabei die einzuführende Mutation zu korrigieren. In dieser Reaktion entstanden Hybride aus Template-Plasmid und neu-synthetisierter, ringförmiger DNA, die eine Mutation im Vergleich zum Template trug. Vor Transformation dieser DNA in *E.coli* XL1-Blue Zellen musste das Template-Plasmid entfernt werden. Da sich neu-synthetisierte DNA und Template-DNA in ihrem Methylierungs-Status unterschieden war es möglich, nur das Template-Plasmid (methyliert) zu entfernen. Deshalb wurde der gesamte Ansatz mit der Restriktionsendonuklease *Dpn I* inkubiert, da dieses Enzym nur methylierte DNA-Erkennungssequenzen schneidet. Nach Transformation und Vermehrung in Bakterienzellen stand das mutationstragende Plasmid für weitere Experimente (z.B. *in vitro*-Transkription) zur Verfügung.

2.2.8 *In vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription stellt ein Verfahren dar mit dem es möglich war, zellfreie RNA zu synthetisieren. In dieser Arbeit wurden zwei unterschiedliche Möglichkeiten zur Gewinnung der Transkripte gewählt. Bei dem ersten Verfahren war der zu transkribierende DNA-Abschnitt, welcher die Promotorsequenz für die T7-RNA-Polymerase des entsprechenden Bakteriophagen trug, in einen Vektor kloniert. Bei der zweiten Möglichkeit konnte der Klonierungsschritt entfallen, da bereits der 5'-Primer, demzufolge auch das mit diesem Primer amplifizierte PCR-Produkt mit der Promotorsequenz ausgestattet war. Die eigentliche Transkription erfolgte modifiziert nach dem von Melton et al. (1984) eingeführten Verfahren, wobei die Plasmide zunächst 3' des Inserts mit einer geeigneten Restriktionsendonuklease linearisiert wurden. Dies war nötig, um RNA Fragmente definierter Länge zu erhalten.

2.2.8.1 Radioaktive *in vitro*-Transkription

Die Markierung erfolgte durch den Einbau radioaktiv markierter Nukleosidtriphosphate (^{32}P - αCTP).

Ein 10 μl Standardreaktionsansatz (leicht modifiziert nach Promega) setzte sich zusammen aus:

2 μl	5x Transkriptionspuffer
1 μl	100 mM DTT
0,2 μl	RNasin (40 U/ μl)
2 μl	2,5 mM rNTPs (ohne rCTP)
1 μl	100 μM rCTP
0,5 μl	^{32}P - αCTP (20 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$)
2,8 μl	linearisiertes Plasmid oder PCR-Produkt
0,5 μl	T7-RNA Polymerase (20 U/ μl)

Die RNA-Synthese erfolgte für 1-2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde die RNA 15 min DNase-behandelt (1 U DNase RQ1). Anschließend wurde der Ansatz mit DEPC-Wasser auf 200 μl aufgefüllt und zur Entfernung von nicht eingebauten Nukleosidtriphosphaten über eine Sephadex HR-200-Säule (Amersham Biosciences, Freiburg) aufgereinigt. Durch Messung der Aktivität vor und nach der Aufreinigung konnte der Einbau von ^{32}P - αCTP in die RNA überprüft und Rückschlüsse auf die Menge der neu synthetisierten RNA gezogen werden. Die Lagerung bei -70°C war für maximal zwei Wochen möglich.

2.2.9 Electrophoretic mobility shift assay

Die Retentionsanalyse (Syn.: Bandshift, electrophoretic mobility shift assay „EMSA“) ist ein elektrophoretisches Untersuchungsverfahren, mit dem mögliche Interaktionen zwischen Nukleinsäure-bindenden Proteinen und einem DNA- bzw. RNA-Molekül nachgewiesen und analysiert werden können. Dieses Verfahren beruht auf einer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von Protein/Nukleinsäure-Komplexen im Vergleich zu freier, ungebundener DNA bzw. RNA. Da der resultierende Komplex im Vergleich zu proteinfreier Nukleinsäure größer ist, kommt es zur Verlangsamung der Wanderungsgeschwindigkeit. Bei der Elektrophorese auf einem nativen Polyacrylamidgel macht sich dies als sog. „Shift“ bemerkbar. Da radioaktiv markierte Nukleinsäure eingesetzt wird, lässt sich das Ergebnis über Autoradiographie visualisieren.

In der vorliegenden Arbeit sollte eine mögliche Interaktion zwischen Proteinen und der 3'UTR der NF1-mRNA untersucht werden. Wie unter 2.2.8.1 beschrieben, wurde die RNA

durch *in vitro*-Transkription unter Einbau von radioaktiv markierten CTPs synthetisiert. Die Isolierung des Proteinlysats für die Bindereaktion erfolgte wie unter 2.2.6.1 beschrieben. Bei diesem Untersuchungsverfahren, der Gelretentionsanalyse, sind unspezifische Wechselwirkungen zwischen Proteinen und Ribonukleinsäuren sehr problematisch. Dem kann durch Zugabe des Polyanions Heparin, das mit dem Rückgrat der Nukleinsäure interagiert, und durch einen Überschuss an unspezifischer Hefe-tRNA begegnet werden. Zur Unterdrückung zu starken Hintergrundes dient die einzelstrangspezifische RNase T1, von der nur nicht im Proteinkomplex gebundene RNA angegriffen wird. Die aus *Aspergillus oryzae* isolierte Endoribonuklease spaltet spezifisch die einem Guanosin-Nukleotid folgende Phosphodiesterbindung.

a) Probenvorbereitung

Die einzelnen Reaktionsansätze wurden nach folgender Anleitung präpariert: Vor der eigentlichen Bindereaktion von radioaktiv markierter RNA an ein Protein erfolgte die Vorinkubation einiger Komponenten bei 30°C für 10-15 min. Dieser Ansatz enthielt:

3 µl	5x Bindepuffer
1 µl	2 mg/ml Hefe tRNA
0,1 µl	40 U/µl RNasin
je nach Ansatz: eventl. Proteinlysat	
ad 13 µl DEPC-H ₂ O	

Die Inkubation der 1:10 verdünnten radioaktiven RNA (Herstellung wie unter 2.2.8.1 beschrieben) für 10 min bei 65°C bewirkte ihre Denaturierung, die anschließende Lagerung auf Eis verhinderte ein erneutes Ausbilden der Sekundärstruktur. 1-2 µl dieser RNA ($1-2 \times 10^4$ cpm) wurden mit einem vorinkubierten Ansatz (s.o.) gemischt und für 20 min bei 37°C inkubiert. Der Abbau nicht-gebundener RNA erfolgte durch 0,5 µl RNase T1 (10 U/µl) während einer 10 minütigen Inkubation bei RT. In einem abschließenden identischen Inkubationsschritt mit 2 µl 50 mg/ml Heparin (Endkonzentration 5 mg/ml) sollten weitere unspezifische Wechselwirkungen unterdrückt werden.

Die Proben wurden mit 2 µl Ladepuffer versetzt und bis zum Beladen des Gels auf Eis gelagert.

5x Bindepuffer: 5 mM DTT, 25 % Glycerin, 75 mM HEPES (pH 8,0), 250 mM KCl, 5 mM MgCl₂

b) Gelzusammensetzung und Gellauf

Für den Gellauf kam eine vertikale Elektrophorese Apparatur zum Einsatz. Bei dem Gel handelte es sich um ein natives Acrylamidgel mit folgender Zusammensetzung:

6 %iges EMSA-Gel (Vernetzung 60:1)	
22,23 ml	0,25x TBE
6 ml	30 % Acylamid
1,44 ml	2 % Bisacrylamid
300 µl	10 % APS
30 µl	TEMED

Nach dem Auspolymerisieren wurde das Gel auf 4°C gekühlt und anschließend für den Gellauf vorbereitet. Dieser erfolgte bei 4°C und 175 V für etwa 2 Stunden, 0,25x TBE-Puffer diente als Laufpuffer. Dem schloss sich die Trocknung des Gels im Vakuum bei 80°C für 1-2 Stunden an. Mittels Autoradiographie konnten die Proben sichtbar gemacht werden. Die Exposition auf Röntgenfilm wurde für 1 bis 5 Tage bei -70°C durchgeführt.

2.2.10 Untersuchung von RNA-Protein Interaktionen im Hefe 3-Hybrid-System

2.2.10.1 Allgemeine Grundlagen

Das Hefe 3-Hybrid-System (yeast three hybrid system) ist eine Weiterentwicklung des 2-Hybrid-Systems und dient zur Untersuchung von RNA-Protein Interaktionen *in vivo* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses von SenGupta et al. (1996) erstmals beschriebene System macht sich ebenfalls den modulartigen Aufbau von eukaryontischen Transkriptionsfaktoren zunutze, wobei sich die einzelnen Domänen ohne Verlust ihrer Funktion experimentell trennen lassen. Eine der Domänen bindet an bestimmte Enhancer-Elemente im Promotorbereich (DNA-Bindedomäne, DBD). Die andere, die sog. Aktivierungsdomäne (AD), initiiert durch Interaktion mit der RNA-Polymerase die Transkription. Zwei Komponenten des 3-Hybrid-Systems bestehen jeweils aus einer dieser Domänen fusioniert mit einem Protein (Hybridprotein 1 und 2), der dritte Bestandteil des Systems ist die Hybrid-RNA.

In Abbildung 4 sind das Prinzip und die Komponenten des Hefe 3-Hybrid-Systems schematisch dargestellt. Hybridprotein 1 (HP 1, gelb) ist ein Fusionsprotein bestehend aus der LexA-DBD, die einen Teil eines Transkriptionsfaktors darstellt, fusioniert mit dem MS2 coat-Protein. Dieses Protein stammt aus dem Bakteriophagen MS2 und besitzt die Fähigkeit, mit hoher Affinität Haarnadel-Strukturen der MS2-RNA zu binden. Diese RNA ist ein Teil der Hybrid-RNA, in Abbildung 4 schwarz dargestellt. Der andere Bestandteil

dieser Komponente ist die auf Protein-Interaktion zu testende RNA (Test-RNA, rot). Hybridprotein 2 (HP 2, grün) besteht aus der Aktivierungsdomäne des eukaryontischen Transkriptionsfaktors (B42-AD), fusioniert mit dem zu untersuchenden Protein (Protein X oder Y). Abbildung 4 A zeigt, dass Protein Y nicht mit der Test-RNA interagieren kann, die beiden Domänen des Transkriptionsfaktors nicht in räumliche Nähe kommen können und so die funktionelle Rekonstitution des Faktors ausbleibt. Damit ist die Aktivierung der Transkription von Reporter genen nicht möglich. Protein X dagegen (Abb. 4 B) ist in der Lage, die Test-RNA zu binden. In diesem Fall fungiert die Hybrid-RNA als Brücke zwischen den beiden relevanten Domänen des Transkriptionsfaktors, dieser wird dadurch wieder funktionsfähig und es kommt zur Initiation der Transkription von Reporter genen. Als Reporter dient sowohl ein Gen der Histidinbiosynthese (*his3*) der Hefe als auch das bakterielle *lacZ* Gen. Interaktionen lassen sich durch Wachstum auf dem entsprechenden Minimalmedium bzw. durch einen Farbttest auf β -Galactosidase Aktivität nachweisen. Zwei der drei Hybrid-Komponenten (Hybrid-RNA und HP2) müssen in Form von Expressionsplasmiden in die Hefe transformiert werden. Da die dritte Komponente, HP1, immer konstant ist, sind die Sequenzen, welche für die LexA-DBD und das MS2 coat-Protein kodieren, stabil ins Genom des Hefestammes *L40uraMS2* integriert. Hybridprotein 2 ist ein Fusionsprodukt aus der Aktivierungsdomäne eines Transkriptionsfaktors und des zu untersuchenden Proteins. Im Hefe 3-Hybrid-System kann entweder gezielt ein einzelnes Protein auf RNA-Interaktion mit der Test-RNA untersucht werden oder nach potentiellen Bindungspartnern in einer cDNA-Bank gesucht werden.

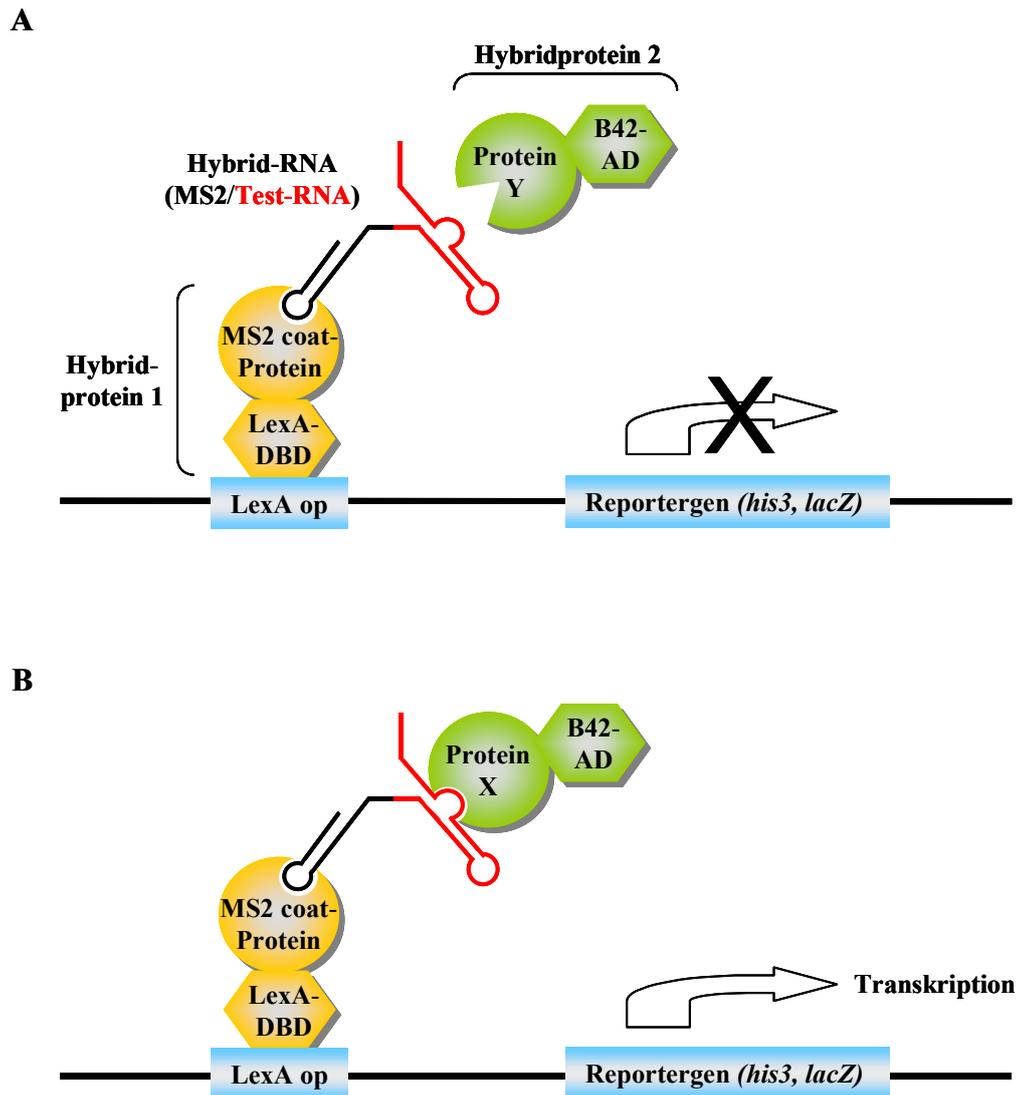


Abb. 4: Schematische Darstellung des Hefe 3-Hybrid-Systems zum Nachweis von RNA-Protein Interaktionen *in vivo*. Ist eine Interaktion zwischen RNA und Protein Y nicht möglich, bleibt auch die Initiation der Transkription aus (A). Über die Interaktion der Test-RNA mit Protein X kommt es zur Aktivierung der Transkription der Reportergene *his* und *lacZ* (B). Hybridprotein 1 (HP1, gelb) ist die konstante Komponente des Systems und stellt ein Fusionsprodukt aus der DNA-Bindedomäne (DBD) eines Transkriptionsfaktors, die an den LexA-Operator (LexA op) binden kann, und dem viralen MS2 coat-Protein dar. Die für HP1 kodierenden Sequenzen sind stabil ins Genom des Hefestammes integriert. Die cDNA der zu untersuchenden Proteine X oder Y ist mit der cDNA der Aktivierungsdomäne (AD) eines Transkriptionsfaktors fusioniert. Dieses Konstrukt, kloniert in einen Expressionsvektor, wird in die Hefe transformiert. Das Expressionsprodukt, Hybridprotein 2 (HP2), ist grün dargestellt. Die Hybrid-RNA, ein dafür kodierender Vektor muss ebenfalls in die Hefe transformiert werden, besteht aus der MS2 coat-RNA (schwarz), die in jedem Fall mit dem HP1 interagieren kann. Wenn die Test-RNA (rot) an die variable Komponente des HP2 kann, dann kommt es durch funktionelle Neubildung des Transkriptionsfaktors zur Expression der Reportergene.

2.2.10.2 Komponenten des Hefe 3-Hybrid-Systems

Alle verwendeten Vektoren sind als Binäre Vektoren (Schaukelvektoren, Pendelvektoren) konzipiert und erlauben sowohl in *E.coli* als auch in *Saccharomyces cerevisiae* eine stabile Transformation und Vermehrung. Sie haben einen Replikationsursprung (origin of replication, ori) und einen Marker zu Selektion in *E.coli*. Als Selektionsmarker dient das β -Laktamase-Gen, welches eine Ampicillinresistenz vermittelt. Neben diesen bakteriellen Komponenten müssen die Schaukelvektoren auch ein Markergen zur Selektion transformierter Hefen tragen. Als solche Gene dienen Auxotrophiemarker der Nukleosid- oder Aminosäurebiosynthese, wie *ura3* (kodiert das dritte Enzym der Uracilbiosynthese) oder *trp1* (erstes Enzym der Tryptophansynthese). Nach Einklonierung gewünschter DNA-Abschnitte, Transformation und Vermehrung in *E.coli* können diese Pendelvektoren in einen auxotrophen Hefewirt transfiziert werden. Eine Selektion prototropher Hefeklonen, die auf Minimalmedium wachsen können, ermöglicht die Selektion der mit eingebrachten Hefemarkern. Die im Folgenden aufgeführten Komponenten stammen aus dem RNA-Protein Hybrid HunterTM Kit der Firma Invitrogen, das zusätzlich Kontrollplasmide enthält, auf die aber hier nicht näher eingegangen wird.

a) Hybridprotein 1 (HP1)

Der Expressionsvektor, welcher im 3-Hybrid-System das HP1 kodiert, enthält als Insert zum Einen die cDNA der DNA-bindenden Domäne des bakteriellen LexA Repressors. Das LexA-Protein (lambda exon) wirkt normalerweise als Repressor mehrerer Gene, die nur im Fall einer sog. SOS-Antwort nach DNA-Schädigung aktiviert werden. Zum Anderen beinhaltet das Insert die cDNA des viralen MS2 coat-Proteins. Dieses Hüllprotein des Bakteriophagen MS2 zeigt hohe Affinität zu einer 21 Basen langen Haarnadel-Struktur der entsprechenden MS2-RNA. Das gesamte cDNA-Konstrukt, bestehend aus LexA und MS2 coat wurde hinter einen ADH-Promotor kloniert und kann in der Hefe als Fusionsprotein exprimiert werden. Da dieses Plasmid ein fester Bestandteil des 3-Hybrid-Systems ist, wurde es bereits von den Vertreibern des Systems stabil ins Genom des Hefestamms L40-*ura3* integriert (=Hefestamm L40*ura*MS2). Damit beschränkt sich der Transformationsaufwand auf zwei Plasmide.

b) Hybridprotein 2 (HP2)

Der Expressionsvektor pYESTrp2 ist für die Synthese des HP2 verantwortlich. Die für das zu untersuchende Protein kodierende cDNA oder eine Sequenz aus einer cDNA-Bank ist unmittelbar hinter die Sequenz für die B42-Aktivierungsdomäne kloniert. Dieses Konstrukt steht unter der Kontrolle des konstitutiven GAL1-Promotors, unmittelbar gefolgt von einer NLS-Sequenz (nuclear localization signal), da die RNA-Protein Interaktion im Kern stattfinden soll. Neben dem Ampizillinresistenzgen zur Selektion in Bakterien trägt der Vektor pYESTrp2 den Hefemarker *trp1* (kodiert für das erste Enzym der Tryptophansynthese).

c) Hybrid-RNA

Zur Synthese der Hybrid-RNA wird entweder der Vektor pRH3' oder pRH5' verwendet. Diese beiden Plasmide unterscheiden sich lediglich in der Lage der MS2-Bindestelle zur *SmaI* Schnittstelle, in welche die Sequenz der zu untersuchenden RNA (Test-RNA) kloniert wurde. Bei der Klonierung in pRH3' liegt die MS2-Sequenz 3' zur Schnittstelle, im Fall von pRH5' entsprechend 5'. Die MS2-Erkennungssequenz ist ein Tandemrepeat, bestehend aus je 21 Basen, die mit der MS2 coat-Domäne des HP1 interagieren können. Durch jeweils einen Einzelbasenaustausch in den Bindestellen soll laut Herstellerangaben die Bindekapazität deutlich erhöht werden. Die Vektoren enthalten den RPR1-Promotor (RNase P Ribonucleoprotein 1) sowie entsprechende Leader- und Terminationssequenzen. Dieser Promotor liefert hohe Ausbeuten an Hybrid-RNA, die zudem keiner Prozessierung unterliegt. Die Plasmide tragen ebenfalls das Ampicillinresistenzgen und einen Hefemarker, in diesem Fall *ura3* (drittes Enzym der Uracilbiosynthese).

d) Hefestamm L40uraMS2

Dieser Hefestamm ist vom Stamm *L40-ura3* abgeleitet und hat das LexA/MS2 coat-Fusionskonstrukt für die Expression des HP1 stabil ins Genom integriert. Außerdem hat er Mutationen, welche unter anderem die Biosynthese von Histidin, Tryptophan und Uracil unterbinden. Als Reportergene zum Nachweis der Interaktion zwischen Hybrid-RNA und Hybridprotein 2 dienen Konstrukte aus dem LexA-Operator und dem *his3*-Gen oder dem *lacZ*-Gen, wobei die LexA Operatoren mehrmals inseriert wurden (vier im *his3* Promotor, acht im *lacZ* Promotor).

2.2.10.3 Chemische Transformation von Hefen

Die Transformation der Hefen erfolgte leicht modifiziert nach der von Gietz et al. 1992 beschriebenen Lithiumacetat-Methode, unter Verwendung des YEASTMAKER™ Yeast Transformation System der Firma BD Biosciences (Heidelberg). Dieses Kit enthält alle benötigten Stammlösungen, die nach Herstellerangaben für den Gebrauch angesetzt wurden. Aufgrund der eingesetzten Volumina, Zellen und DNA-Mengen unterscheidet man zwischen „small-scale transformation“ und „large-scale transformation“. Letztere wird bei dem Screening einer cDNA-Fusionsbank nach RNA-bindenden Proteinen angewendet. Im folgenden beziehen sich die Angaben in Klammern ([]) auf einen large-scale Ansatz, das Prinzip der Transformation ist jedoch für beide Ansätze gleich.

a) Herstellung kompetenter Hefezellen

Vor der eigentlichen Transformation mussten die Hefen für die Aufnahme von Fremd-DNA kompetent gemacht werden. Dafür wurde[n] eine [2-3] maximal vier Wochen alte Einzelkolonie[n] in 1 ml [4 ml] Medium überimpft und darin resuspendiert. Nach Überführung dieser Hefesuspension in 50 ml [200 ml] Medium (je nach Selektionsbedarf SD-Minimalmedium oder YPD-Vollmedium) erfolgte ihr Wachstum für etwa 20-24 Stunden bei 30°C unter Schütteln (250 rpm). In dieser Zeit sollten die Hefen die stationäre Phase erreicht haben, was durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm ($OD_{600} > 1,5$) überprüft werden konnte. Mit etwa 30 ml [150 ml] dieser Kultur wurden 300 ml [1,5 l] Medium so inokuliert, dass die OD_{600} 0,2-0,3 betrug. Durch einen weiteren Inkubationsschritt für etwa 3 Stunden unter obigen Bedingungen erreichte die Kultur die logarithmische Wachstumsphase (OD_{600} 0,4-0,6). Nach Zentrifugation für 5 min bei RT und 1.000x g wurde das Hefesediment in 25 ml [250 ml] H₂O resuspendiert, erneut zentrifugiert und abschließend in 1,5 ml [8 ml] frischem TE/LiAc aufgenommen. Eine Lagerung der so gewonnenen kompetenten Zellen für maximal zwei Stunden bei RT war, ohne Abnahme der Transfektionseffizienz, möglich.

b) Transformation kompetenter Hefen

Für die Transformation wurden 100 ng zirkuläre Plasmid-DNA [750 µg Plasmid-DNA der cDNA-Fusionsbank] mit 100 µg [20 mg] Carrier-DNA (Heringsspermien-DNA) vermischt. Nach Zugabe von 100 µl [8 ml] kompetenter Zellen wurden deren Zellwände in Gegenwart von 600 µl [60 ml] PEG/LiAc während eines 30-minütigen Inkubationsschritt

(30°C, 200 rpm) durchlässig gemacht. Die Aufnahme der Plasmid-DNA erfolgte durch einen 42°C Hitzeschock für 15 min, nachdem der Ansatz mit 70 µl [7 ml] DMSO (10 % Endkonzentration) versetzt und vorsichtig gemischt worden war. Nach Inkubation der transformierten Zellen für 1-2 min auf Eis wurden diese durch einen Zentrifugationsschritt (5 Sekunden, 14.000 rpm [5 min, 1.000x g]) sedimentiert. Nach sorgfältigem Entfernen des Überstandes konnten die Hefen in 500 µl [10 ml] frischem 1x TE-Puffer resuspendiert werden. 1/5 [1/50] dieses Ansatzes wurde auf entsprechende SD-Minimalmedium-Agarplatten (85 mm [140 mm] Durchmesser) ausplattiert. Das Wachstum der Hefen erfolgte bei 30°C für maximal 6 Tage, wobei nach etwa 3 Tagen die ersten Klone sichtbar waren. Die Transformationseffizienz lag bei etwa 10⁴ bis 10⁵ Transformanten pro µg eingesetzter Plasmid-DNA.

2.2.9.4 Vorgehen und Screening einer cDNA-Bank im Hefe 3-Hybrid-System

Zunächst wurde der Hefestamm L40uraMS2 mit den Hybrid-RNA-Plasmiden transformiert, wobei der Test-RNA Anteil aus verschiedenen 3'UTR-Fragmenten der NF1-mRNA bestand. Positive Klone konnten durch Wachstum auf Uracil-defizientem SD-Medium (SD^{-Ura}) identifiziert werden. Die Plasmid-Aufnahme konnte darüber hinaus durch eine „Pick-PCR“ mit Hefeklonen als Template überprüft werden, wobei der erste Denaturierungsschritt von 3 min auf 6 min verlängert werden musste um die Hefezellwand zu zerstören. Dieser Hybrid-RNA-haltige Hefestamm wurde anschließend mit dem HP2-Expressionsplasmid bzw. einer cDNA-Fusionsbank transformiert und auf selektivem SD-Medium^{-Ura, -Trp} oder SD-Medium^{-Ura, -Trp, -His} bzw. SD-Medium^{-Trp, -His} ausplattiert. Auf ersterem Medium können nur die Transformanten wachsen, die beide Plasmide aufgenommen haben. Die beiden anderen Medien selektionieren auf Hefeklone mit potentieller RNA-Protein Interaktion. Diesen Medien wurde zusätzlich 3-Aminotriazol (3-AT) zugesetzt, um vorhandene Basalexpression von *his3* zu unterbinden. Klone, die auf diesen Medien Wachstum zeigten, wurden im Kolonie-Filter Assay auf β-Galactosidase Aktivität untersucht. War eine cDNA-Fusionsbank transformiert worden, schlossen sich weitere Selektionsschritte an, die im Ergebnis-Teil dargestellt sind.

2.2.10.5 Nachweis der β-Galaktosidase Expression (Kolonie-Filter Assay)

Der Kolonie-Filter Assay dient zum Nachweis der Enzymaktivität der β-Galactosidase, dem Produkt des Reportergens *lacZ*. Dieses Enzym setzt die farblose Substanz X-Gal in

die blaue Verbindung 3-Brom-4-Chlor-Indigo um. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben der Firma BD Biosciences (Heidelberg).

Dabei wurde ein Rundfilter (Größe zur jeweiligen Petrischale passend) etwas befeuchtet und einige Sekunden auf die zu untersuchende, mit Hefen bewachsenen Agarplatte gelegt. Der Filter wurde mit der Hefe-tragenden Seite nach oben für mindestens 10 Sekunden in flüssigen Stickstoff überführt. Durch den Stickstoff werden die Zellwände der transferierten Hefen zerstört. Nach dem Auftauen des Filters wurde dieser luftblasenfrei auf einen zweiten, mit X-Gal/Z-Puffer getränkten Filter gelegt (in einer Petrischale). Zeigte sich während einer 1-8 stündigen Inkubationszeit bei 30°C eine Blaufärbung des Filters, so exprimierte der untersuchte Hefeklon das Reportergen *lacZ*.

Z-Puffer: 5,55 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2,75 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 10,123 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,375 g KCl, ad 500 ml H_2O , pH 7,0

X-Gal/Z-Puffer (immer frisch angesetzt): 100 ml Z-Puffer, 270 μl β -Mercaptoethanol, 1,67 ml X-Gal (20 mg/ml)

2.2.10.6 Isolierung von Plasmiden aus Hefe

Um interagierende Proteine bzw. die zugrunde liegende cDNA weiter analysieren zu können, war die Isolierung des cDNA-tragenden Plasmids aus dem Hefeklon nötig. Dies erfolgte nach einem Protokoll von Hoffman et al. (1987), allerdings mit geringfügigen Modifikationen.

Dafür wurde eine einzelne Hefekolonie (3-4 Tage alt) in 50 μl Lysispuffer resuspendiert. Nach Zugabe von 50 μl Phenol:Chloroform (50:50) und etwa 0,1 g Glass Beads (425-600 microns) wurde der gesamte Ansatz 2 min lang gemischt. Dies bewirkte eine mechanische Zerstörung der Hefezellwände. Durch einen 2-minütigen Zentrifugationsschritt bei 14.000 rpm kam es zur Phasentrennung. Die obere, wässrige Phase (enthält die Plasmid-DNA) wurde mit Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) versetzt, gemischt und nochmals zur Trennung der Phasen zentrifugiert. Aus der wässrigen Phase konnte schließlich die Plasmid-DNA mittels einer Ethanol-Fällung gewonnen werden. Abschließend wurde die DNA in 10 μl H_2O gelöst und 1 μl dieser Lösung in *E.coli* Zellen transformiert. Durch Vermehrung des Plasmids in Bakterien stand für weitere Untersuchungen (z.B. Sequenzierung) genügend Material zur Verfügung.

Lysispuffer: 10 mM EDTA, 100 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 8,0), 2 % Triton X-100, 1 % SDS

2.2.11 Hybridisierung der filtergebundenen Proteine mit RNA

Eine weitere Möglichkeit, RNA-bindende Proteine zu identifizieren stellte die Hybridisierung von filtergebundenen Proteinen mit radioaktiv markierter RNA dar. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit entwickelt. Die verwendeten high-density Proteinfiler (Bank Nummer: 800, Library Human Fetal Brain Protein Expression) wurden vom Resource Center German Human Genome Project (RZPD, Berlin) bezogen. Sie enthielten insgesamt 37.200 cDNA-Klone, wobei die cDNA aus RNA generiert wurde, die aus fötalem Hirn isoliert worden war. Um filtergebundene Proteine zu erhalten, wuchsen die Bakterienklone auf PVDF-Membranen. Da Vektor und Bakterienstamm entsprechend gewählt worden waren, konnte die Proteinexpression mittels IPTG induziert werden. Nach Lyse der Bakterien standen dann filtergebundene, rekombinante Proteine für weitere Experimente zur Verfügung (Proteinfiler). Die genaue Herstellung der verwendeten Filter ist bei Büsow et al. (1998) beschrieben. Wurden für Rescreening-Experimente Proteinfiler mit bestimmten Klonen benötigt, mussten diese selbst hergestellt werden.

a) Vorbehandlung der Filter

Die trockenen Proteinfiler wurden zuerst mit Ethanol befeuchtet und anschließend auf TBST-T getränktes Blot-Papier überführt. Wenn der Filter erstmalig in Gebrauch war, mussten die Bakterienreste entfernt werden. Anschließend wurde der Filter zweimal für je 10 min in TBST-T gewaschen. Diesen Waschschritten folgten drei weitere, allerdings mit TBS. Nun stand der Filter für die Hybridisierung zur Verfügung.

b) Hybridisierung

Freie Bindungsstellen auf dem Filter wurden durch eine 3-stündige Inkubation bei 37°C in Blockingpuffer abgedeckt. Anschließend wurde der Filter für 1 Stunde bei RT mit ³²P-markierter RNA (Herstellung s. 2.2.8.1) hybridisiert. Nach zwei Waschschritten, je 10 min mit TBS, wurde ungebundene RNA durch eine RNase T1 Behandlung für 10 min bei RT verdaut (50 µl RNase T1 (10 U/µl) in 30 ml TBS). Die Entfernung von RNA-Resten erfolgte durch einen weiteren Waschschriff mit TBS für 10 min bei 40°C. Der Nachweis positiver Klone erfolgte mittels Autoradiographie. Diese Klone konnten dann beim RZPD bestellt und die entsprechenden cDNA tragenden Plasmide isoliert werden.

TBS: 150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5)

TBST-T: 150 mM NaCl, 20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,05 % Tween 20, 0,5 % Triton X-100

Blockingpuffer: 10 % BSA in 20 ml TBS, 10 mg Hefe tRNA

Hybridisierungspuffer: 3 % BSA in 15 ml TBS, 10 mg Hefe tRNA, 12 µl RNasin (40 U/µl), 100 µl ³²P-markierte RNA (etwa 1x10⁵ cpm)

2.2.12 Gewinnung und Analyse rekombinanter Proteine aus *E.coli*

Für weitere Experimente (Bandshift-Experimente) war es nötig, Proteinlysate zur Verfügung zu haben. Durch diese Versuche sollte eine mögliche RNA-Protein Interaktion zwischen den filtergebundenen Proteinen und einer spezifischen RNA verifiziert werden. In Bandshift-Experimenten (2.2.9) sollte möglichst natives Proteinlysate eingesetzt werden, da auch die Sekundärstruktur der Proteine bei einer RNA-Bindung eine Rolle spielen kann. Da allerdings mit der ursprünglichen Vektor/Bakterien-Kombination keine Aufreinigung unter nativen Bedingungen möglich war, wurden die zu untersuchenden cDNAs in frame in den Vektor pGEX-6P-1 umklontiert. Dieser Vektor besitzt neben dem Ampicillin-Resistenzgen einen durch IPTG induzierbaren Promotor und liefert als Expressionsprodukt ein GST-(Glutathion-S-Transferase-) Fusionsprotein. Die rekombinanten Plasmide wurden anschließend in den *E.coli* Expressionsstamm BL21 transformiert. Diese Bakterien können aufgrund ihres Genotyps keine OmpT-Protease (outer membrane protease) synthetisieren, was zu einer erhöhten Ausbeute an intaktem, rekombinantem Protein führte.

2.2.12.1 Proteinisolierung unter nativen Bedingungen

Zunächst wurden die zu untersuchenden Bakterien-Klone mit Fusionsplasmid in je 5 ml LB/Amp⁺ über Nacht bei 37°C inkubiert. Diese Kultur diente dann zum Animpfen von 200 ml LB/Amp⁺ am nächsten Tag. Hatte die Kultur eine OD₆₀₀ von etwa 0,6 erreicht, erfolgte die Induktion der Proteinexpression mit 0,1 mM IPTG. Die Kulturen wurden wieder über Nacht, allerdings bei 18-20°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Induktionskontrolle erfolgte mittels SDS-PAGE. Dafür wurde von jeder Kultur 1 ml abgenommen, abzentrifugiert und das Pellet in 50 µl 1x Ladepuffer resuspendiert. Zusammen mit nicht induzierten Kontrollansätzen und einer Induktionskultur mit dem Ursprungsplasmid pGEX-6P-1 erfolgte die Analyse eines Aliquots auf einem SDS-Gel. Durch die anschließende Coomassie-Färbung des Gels konnten die Proteine sichtbar gemacht werden. Die restlichen Bakterienkulturen wurden in je etwa 100 ml Aliquots 5 min bei 3.000 rpm abzentrifugiert und einmal mit 5 ml 1x PBS gewaschen. Die Bakterienpellets konnten bis zur weiteren Aufarbeitung bei -70°C gelagert werden.

Konnten die Fusionsproteine nach erfolgter Induktion nachgewiesen werden, wurde mit der Lyse der Bakterien und Aufreinigung der rekombinanten Proteine begonnen. War das Bakterienpellet aufgetaut, wurde es in 10 ml TX-Lysispuffer resuspendiert und 1 h im Über-Kopf-Taumler bei RT inkubiert. Durch die anschließende Ultraschall-Behandlung (20 Sekunden) und einem Gefrier-Auftau-Zyklus sollten die Zellwände der Bakterien geöffnet werden und die Proteine in löslicher Form vorliegen. Diese Inkubationsschritte zur Zerstörung der Bakterienzellwände wurden insgesamt 3x wiederholt. Ein Zentrifugationsschritt bei 500 g für 5 min und die folgende Filtration des Überstandes (Porengröße 0,8 µm) dienten der Entfernung von Zelltrümmern. Die resultierende Protein-Lösung wurde mit 1 ml Gluthation-Sepharose (äquilibriert mit 1x PBS) 30 min bei RT im Über-Kopf-Taumler inkubiert. Dieser Inkubationsschritt sollte den Fusionsproteinen ermöglichen, mit ihren GST-Resten über Disulfidbrücken an die Gluthation-Sepharose zu binden. Durch zwei Waschschrte mit 10 ml 1x PBS sollten ungebundene Proteine entfernt werden. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 300 µl 10 mM reduziertem Glutathion in Tris/HCl (pH 8,0) zur pelletierten Sepharose. Der Ansatz wurde 20 min unter Schütteln inkubiert und anschließend abzentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde noch zweimal durchgeführt. Im Überstand sollte jeweils das aufgereinigte Fusionsprotein durch SDS-PAGE nachweisbar sein. Die so gewonnen Proteinlysate konnten, nach Zugabe von Glycerin (Endkonzentration 10 %) und Protease-Inhibitoren, bei -70° C gelagert werden.

TX-Lysispuffer: 1 mM EGTA, 10 % Glycerin, 30 mM Hepes (pH 7,5), 150 mM NaCl, 2 mM PMSF, 5 mM MgCl₂, 25 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumorthovanadat, 1 % Triton X-100, 0,1 % β-Mercaptoethanol, 10 µg/ml Pepstatin, 10 µg/ml Aprotinin, 10 µg/ml Leupeptin, 1 mg/ml Lysozym

2.2.12.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung

a) Gelzusammensetzung und Gellauf

SDS-Page (Polyacrylamid-Gelelektrophorese) ist die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen, wobei die diskontinuierliche Gelelektrophorese nach Lämmli et al. (1970) gewählt wurde. Für den Gellauf kam eine vertikale Elektrophorese Apparatur zum Einsatz, bei der die Glasplatten durch 2 mm dicke Spacer getrennt wurden. Die verwendeten Acrylamidgele setzten sich aus einem Sammel- und einem Trenngelanteil zusammen, wobei die Prozentigkeit des Trenngels in Abhängigkeit der aufzutrennenden Proteine variierte. Zuerst wurde das Trenngel bis etwa 3 cm unterhalb der oberen Kante zwischen die beiden Platten gegossen.

Der Ansatz für ein 10 %iges Trenngel setzte sich zusammen aus:

3,32 ml	H ₂ O
3,13 ml	Trenngelpuffer
4,17 ml	30 % Acrylamid
1,69 ml	2 % Bisacrylamid
62,5 µl	20 %SDS
125 µl	APS
12,5 µl	TEMED

War das Trenngel auspolymerisiert, konnte das Sammelgel bis kurz unterhalb der Oberkante eingefüllt und der Taschenformer luftblasenfrei eingesetzt werden.

Ein 4 %iges Sammelgel setzte sich zusammen aus:

3,49 ml	H ₂ O
630 µl	Sammelgelpuffer
530 µl	30 % Acrylamid
270 µl	2 % Bisacrylamid
25 µl	20 %SDS
50 µl	APS
5 µl	TEMED

Vor dem Auftragen der Proteinlysate wurden diese mit 5x Ladepuffer versetzt (Endkonzentration in der Probe: 1x Ladepuffer) und für 5 min bei 95°C denaturiert. Der Gellauf erfolgte zunächst bei 20 mA, bis die Lauffront die Sammelgel-Trenngel-Grenze erreicht hatte. Die eigentliche Trennung fand dann bei 30-40 mA für etwa 2 Stunden statt. Als Laufpuffer diente 1x Elektrodenpuffer.

b) Coomassie-Färbung

Durch diese Färbung lassen sich Proteine in einem Acrylamidgel anfärben. Für die Färbung wurde das Gel vorsichtig von den Glasplatten gelöst und der Sammelgel-Anteil entfernt. Die Färbung des Gels erfolgte durch Inkubation (etwa 30 min, unter leichtem Schütteln) in der Coomassie-Färbelösung. Das Gel wurde anschließend solange entfärbt, bis sich die Proteinbanden deutlich zeigten. Das gefärbte Gel konnte in einem 2 % Glycerin/ 10 % Essigsäure-Gemisch in Plastikfolie eingeschweißt aufbewahrt werden.

Färbelösung: 45 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,15 % SERVA blue R in H₂O

Entfärber: 30 % Ethanol, 10 % Essigsäure in H₂O

2.2.13 Zellkultur

Für Transfektionsexperimente mit HeLa Zellen wurden diese bei 37°C und 5 % CO₂ kultiviert. Als Medium diente DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) mit 10 % FCS (fetal calf serum). Um optimales Wachstum zu gewährleisten fanden regelmäßige Mediumswechsel statt. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen niemals die maximale Konfluenz erreichten, da zu dichtes Wachstum zur Kontakt-Inhibition führen könnte. Daher war es nötig, die Zellen regelmäßig zu splitten. Hierfür wurden die Zellen mit Hilfe von Trypsin-Lösung vom Boden der Kulturflasche abgelöst, die Reaktion mit Medium abgestoppt und die Zellsuspension abzentrifugiert. Nach einem oder zwei Waschschrritten mit 1x PBS wurden die Zellen in Medium resuspendiert und in mehrere, neue Zellkulturflaschen verteilt. Für Transfektionsexperimente war es nötig, eine definierte Zellzahl pro Flasche auszusäen. Deshalb wurde vorher die Zellzahl pro ml mit einer Zählkammer (Helberkammer) ermittelt.

2.2.14 Transiente Transfektion von Eukaryontenzellen

Wird proteinfreie DNA in eukaryontische Zellen eingeschleust und integriert dabei die Fremd-DNA nicht ins Genom, handelt es sich um eine transiente Transfektion. Die Expression des transfizierten Gens kann bereits nach 24-48 Stunden analysiert werden. Sollen quantitative Untersuchungen durchgeführt werden, muss im Allgemeinen neben der zu untersuchenden DNA auch ein Referenzplasmid in die Zellen cotransfiziert werden. Die transiente Transfektion ist mit Plasmid-DNA in der supercoiled Konformation am effizientesten.

Es wurde eine HeLa-Zelllinie mittels des Effectene™ Transfection Reagenz der Firma Qiagen transfiziert. Dieses Reagenz basierte auf einem Lipid in Kombination mit einem Enhancer und erlaubte die Transfektion in serumhaltigem Medium. Am Tag vor der Transfektion wurden für jeden Ansatz 600.000 HeLa-Zellen in einer 60 mm Zellkulturschale ausgesät und über Nacht inkubiert. Nach etwa 24 Stunden wurden pro Schale insgesamt 1 µg Plasmid-DNA transfiziert, wobei sich das Verhältnis DNA zu Effectene Reagenz mit 1:25 als optimal erwies. Die genaue Durchführung der Transfektion erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Konstruktion der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide ist im Ergebnisteil beschrieben.

2.2.15 Northern-Blot

Der Northern-Blot ist ein Verfahren, bei dem nach elektrophoretischer Auftrennung von RNA die Moleküle aus dem Gel auf eine geeignete Membran übertragen und immobilisiert werden. Durch Hybridisierung der Filter mit einer markierten Sonde lässt sich nachweisen, ob und in welcher Menge eine bestimmte RNA-Sequenz in der Probe vorhanden ist.

Da RNA leicht durch Ribonukleasen (RNasen) abgebaut werden kann, musste dies durch spezielle Vorsichtsmaßnahmen, die über das Tragen von Handschuhen hinausgingen, verhindert werden. Aus diesem Grund wurden Glasgeräte und alle Gegenstände aus Metall 4 Stunden bei 175°C im Trockensterilisator „gebacken“. RNasen in Elektrophoresekammern konnten durch eine 30-minütige Behandlung mit 0,5 M NaOH unschädlich gemacht werden. Lösungen wurden zum Schutz der RNA entweder mit DEPC-Wasser angesetzt oder nach ihrer Herstellung mit 0,1 % DEPC versetzt, über Nacht bei 37°C inkubiert und anschließend autoklaviert.

2.2.15.1 Gewinnung von RNA

Um RNA aus eukaryontischen Zellen zu gewinnen, wurde der RNeasy[®] Mini Kit (Qiagen) verwendet. Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte 24-48 Stunden nach Transfektion der HeLa-Zellen (s. 2.2.14). Nach zweimaligem Waschen der Zellen mit kaltem 1x PBS wurden 400 µl Puffer RLT (mit β-Mercaptoethanol) auf die Zellen gegeben. Mit Hilfe eines Zellschabers wurden die Zellen von der Zellkulturschale gelöst und die Zellsuspension in ein Eppendorfgefäß überführt. Das weitere Vorgehen erfolgte nach Herstellerangaben. Die Quantität und Qualität der isolierten RNA konnte anschließend photometrisch und auf einem Gel überprüft werden (siehe 2.2.2).

2.2.15.2 Denaturierende RNA Gelelektrophorese und Blot

a) Gelherstellung

Soll RNA gut getrennt werden, sind neben der geeigneten Agarosekonzentration auch denaturierende Bedingungen nötig. Diese verhindern das Ausbilden von Sekundärstrukturen der RNA und werden durch Zugabe von Formaldehyd erreicht. Die RNA-Gele hatten folgende Zusammensetzung:

x g	Agarose (je nach zu trennender Fragmentgröße, meist 1,2 g)
72,2 ml	DEPC-Wasser

10 ml	10x MOPS-Puffer
17,8 ml	Formaldehyd (min. 37 %ig)

Zuerst wurde die Agarose mit DEPC-Wasser aufgeköcht und danach im Wasserbad auf 50-55°C abgekühlt. Anschließend wurden die weiteren Bestandteile zugegeben, kurz durchmischt und die Gellösung in die Gelkammer gegossen.

b) Probenvorbereitung und Gellauf

Pro Spur wurden Aliquots mit 8-10 µg RNA mit ¼ des Gesamtvolumens gebrauchsfertigem, denaturierenden Ladepuffer versetzt. Die Denaturierung der Proben erfolgte für 10 min bei 65°C. Bis zum Auftragen auf das Gel blieben die Proben auf Eis, um die Renaturierung der RNA zu verhindern. Die Elektrophorese wurde im Kühlraum bei 4°C durchgeführt mit 1x MOPS-Puffer als Laufpuffer. Die Trennung erfolgte bei 30 V für etwa 20 Stunden.

c) Blotting

Nach der Elektrophorese wurde das Gel kurz in DEPC-Wasser geschwenkt und anschließend 8-15 min mit 0,5 M NaOH inkubiert. Dadurch wird die RNA partiell hydrolysiert, was den nachfolgenden Transfer, insbesondere hochmolekularer RNA verbesserte. Im Anschluss daran wurde das Gel mit 20x SSC neutralisiert (mehrmals Pufferwechsel, pH-Kontrolle). Die Übertragung der RNA auf eine ungeladene Nylonmembran (Machery-Nagel (Düren), Porendurchmesser: 0,2 µm) erfolgte durch Kapillartransfer über Nacht bei 4°C. Als Transferpuffer diente 20x SSC.

Nach erfolgtem Transfer wurde der Blot abgebaut und die RNA durch UV-Bestrahlung (150 00 µJ/cm²) des noch feuchten Filters fixiert. Der Filter konnte nun entweder sofort hybridisiert oder bei -70°C aufbewahrt werden.

10x MOPS-Puffer: 20,9 g MOPS, 3,28 g Na-Acetat (wasserfrei), 10 ml 0,5 M EDTA, ad 500 ml DEPC Wasser, pH 7,0

Ladepuffer (denaturierend): 40 µl 0,5 M EDTA (pH 8,0), 360 µl Formaldehyd, 1,548 ml Formamid, 1 ml Glycerin, 8 µl gesättigte Bromphenolblau- und Xylencyanol-Lösung, vor Gebrauch: 6 Teile Ladepuffer mit 4 Teilen 10x MOPS-Puffer mischen

20x SSC: 88,2 g Na-Citrat, 175,2 g NaCl, ad 1000 ml DEPC-Wasser, pH 7,0

2.2.15.3 Sondenmarkierung

Die Markierung der Sonde erfolgte nach der von Feinberg und Vogelstein (1983) beschriebenen Methode. Dabei wurde zuerst die doppelsträngige DNA denaturiert. Die so entstandenen Einzelstränge dienten dem Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I als Matritze. Als Startpunkt für die Synthese wurden Random-Hexamere, 6 Basen lange Oligonukleotide mit zufälliger Sequenz, verwendet. Durch Zugabe von radioaktiv markiertem Nukleosid-Triphosphat wurde eine *in vitro* Markierung der Sonde erzielt.

Ein Standard-Ansatz enthielt:

20-50 ng	DNA (ausgeschnitten aus Plasmid oder PCR-Produkt)
11,6 µl	LS-C Puffer
ad 20µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde gemischt, bei 95°C 5 min denaturiert und auf Eis gestellt. Folgende Reagenzien wurden anschließend zupipettiert:

1 µl	BSA (10 mg/ml)
1 µl	Klenow-Enzym (5 U/µl)
2 µl	³² P-αdCTP

Der gesamte Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Die nicht eingebauten Nukleotide konnten mittels eines Zentrifugationsschritts (5 min, 3000 rpm) durch eine Sephadex G-50 Säule von der markierten Sonde getrennt werden. Bevor die Sonde (Eluat) zur Hybridisierungslösung gegeben wurde, musste sie bei 95°C für 5 min denaturiert werden.

2x TM: 0,05 M MgCl₂, 0,1 M β-Mercaptoethanol, 0,5 M Tris/HCl (pH8,0)

OLigos pd(N)₆ (Amersham Biosciences): lösen in 550 µl 1 mM Tris (pH 7,5)/1 mM EDTA

LS-C Puffer: 550 µl OLigos pd(N)₆-Lösung, 1,95 µl dATP (100 mM), 1,95 µl dCTP (100 mM), 1,95 µl dGTP (100 mM), 1,95 µl dTTP (100 mM), 1944,5 µl 2x TM, 1964 µl 1 M HEPES (pH6,6)

2.2.15.4 Hybridisierung und Detektion

Vor der Hybridisierung musste der Filter kurz in 2x SSC geschwenkt werden, um restliche Salzkristalle zu entfernen. Durch einen anschließenden Prähybridisierungsschritt konnten freie Bindungsstellen auf dem Filter blockiert werden, was eine Reduktion des Hintergrundes bewirken sollte. Der Filter wurde für etwa 4 h in Hybridisierungslösung bei 50-60°C inkubiert. Die eigentliche Hybridisierung mit frisch denaturierter, ³²P-markierter

Sonde erfolgte über Nacht bei 56°C. Nicht hybridisierte Sonde wurde durch mehrere Waschschrte bei 50-56°C entfernt. Ausgehend von Waschmix 0 konnte, falls nötig mit steigender Stringenz gewaschen werden (Waschmix I und II).

Nach Abschluss der Waschschrte wurde der Filter in Folie eingeschweißt und über Nacht oder länger bei -70°C auf Röntgenfilm exponiert. War eine Quantifizierung der Hybridisierungssignale nötig, erfolgte die Exposition für einige Stunden oder über Nacht auf spezielle Platten, die dann im Fluorescent Image Analyzer (FLA-3000 series, Fuji) eingelesen werden konnten (Software: BAS Reader V3.14). Die Auswertung und Quantifizierung der Hybridisierungssignale erfolgte mittels der Software AIDA V3.12 der Firma raytest.

Hybrisisierungslösung: 1 %BSA, 1 mM EDTA (pH 8,0), 0,25 mM Na₂HPO₄ (pH 7,2), 7 % SDS

Waschmix 0: 0,1 % SDS, 2x SSC

Waschmix I: 0,1 % SDS, 1x SSC

Waschmix II: 0,1 % SDS, 0,5x SSC

3. ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 3'-nicht-translatierte Region (3'UTR) der Neurofibromin mRNA unter mehreren Gesichtspunkten untersucht, wobei sich die Untersuchungen in zwei Gruppen einteilen lassen. Einerseits wurde die Bedeutung der 3'UTR für posttranskriptionelle Regulationsmechanismen weiter untersucht. Andererseits wurde auch nach krankheitsauslösenden Sequenzveränderungen in diesen Bereich der mRNA gesucht.

3.1 Mutationsanalysen der 3'-nicht-translatierten Region des *NF1*-Gens

Im Rahmen der Mutationsanalysen wurden nur Patienten untersucht, bei denen bislang noch keine konstitutionelle Mutation im kodierenden Bereich des *NF1*-Gens gefunden werden konnte. Zur Anonymisierung der Patienten werden im Folgenden die Nummern verwendet, unter welcher der jeweilige NF1-Patient im Patientenregister des Instituts für Humangenetik, Universitätsklinikum Ulm, geführt wird. Die Mutationssuche lässt sich in zwei Teilbereiche untergliedern; zum einen wurde die Expression beider Allele des *NF1*-Gens untersucht. Würde ein Allel schwächer oder gar nicht exprimiert werden, so wäre dies ein indirekter Hinweis auf einen Funktionsverlust einer der beiden *NF1*-Genkopien einschließlich ihrer 3'UTR. Zum anderen wurde gezielt nach Sequenzveränderungen in der NF1-3'UTR gesucht.

3.1.1 Untersuchungen zur Expression beider *NF1*-Allele

Für diese Analysen mussten von den Patienten sowohl genomische DNA als auch Kulturen fibroblastenartiger Zellen, aus denen RNA gewonnen wurde, zur Verfügung stehen. Deshalb konnten lediglich 20 Patienten in diese Untersuchungen einbezogen werden. Um die beiden Allele auf RNA-Ebene unterscheiden zu können, wurden die NF1-Patienten in Bezug auf einen Polymorphismus in Exon 5 (Referenznummer: rs778975931) des *NF1*-Gens genotypisiert. Dieser von Hoffmeyer et al. (1994) erstmalig beschriebene Einzelbasenaustausch hat eine polymorphe *Rsa* I Schnittstelle zur Folge. Zunächst wurde an genomischer DNA ein entsprechendes DNA-Fragment amplifiziert (Primer: Ex5H und Ex5RII). Die PCR-Produkte wurden nach dem Verdau mit *Rsa* I auf einem Agarosegel analysiert.

Folgende Übersicht zeigt die 20 NF1-Patienten die genotypisiert wurden sowie deren Allelstatus (hetero- oder homozygot für den Exon 5 Polymorphismus).

<u>Allelstatus</u>	<u>NF1-Patienten</u>
homozygot	NF17, NF29, NF124-2, NF170, NF181, NF188, NF191, NF194, NF229, NF268, NF275
heterozygot	NF48, NF97, NF121, NF148, NF232, NF264, NF271, NF279, NF289

Da nur NF1-Patienten, die auf DNA-Ebene heterozygot für den Polymorphismus in Exon 5 sind, für weitere Analysen geeignet waren, wurden lediglich diese 9 heterozygoten Personen weiter untersucht. Die 11 NF1-Patienten, welche homozygot für den untersuchten Polymorphismus waren, kamen für eine weitergehende Untersuchung zur Allelexpression nicht in Frage. Aus Kulturen fibroblastenartiger Zellen der 9 heterozygoten NF1-Patienten wurde RNA isoliert, die dann in einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben werden konnte. Die Amplifikation des Exon 5 beinhaltenden DNA Fragments erfolgte mit cDNA spezifischen, unmarkierten Primern (672 hin, 755-731+RsaI rück). Die Cy5-Markierung der PCR-Produkte, die eine Auswertung der Allelexpression mittels ALFexpress ermöglichte, erfolgte in einem weiteren PCR-Zyklus mit den entsprechenden, allerdings Cy5-markierten Primern. Nur einen PCR-Zyklus mit markierten Primern durchzuführen sollte verhindern, dass markierte Heteroduplices entstanden. Da diese nur einen Strang mit Restriktionsschnittstelle enthielten und deshalb nicht geschnitten werden konnten, wäre das Verhältnis von geschnittenen hin zu unverdauten PCR-Produkten verschoben worden. Nach Restriktion der markierten Produkte mit *Rsa I* erfolgte ihre Auftrennung auf einem denaturierenden Polyacrylamid-Gel und Auswertung mittels ALFexpress.

In Abbildung 5 ist das Ergebnis dieser Analyse an einigen Patienten exemplarisch gezeigt. Die 291 bp langen PCR-Produkte, amplifiziert an cDNA, haben eine konstitutionelle *Rsa I* Schnittstelle. Dadurch entstehen entweder zwei (keine zweite Schnittstelle existent) oder drei Spaltprodukte, falls die polymorphe Schnittstelle aufgrund des Einzelbasenaustausches vorhanden ist. Ein Peak bei 248 Basen (Allel 1) bedeutet, dass *Rsa I* das PCR-Produkt zweimal geschnitten hat. Allel 2 kennzeichnet das Spaltprodukt (278 Basen), welches entsteht, wenn nur die konstitutionelle Schnittstelle existiert. Bei allen untersuchten NF1-Patienten sind beide Peaks erkennbar, lediglich bei der

homozygoten Kontrollperson fehlt wie erwartet ein Peak. Bei den Patienten NF121, NF232 und NF279 (Spuren 1, 2 und 5) unterscheiden sich die Peak-Höhen der beiden Allele deutlich, bei allen anderen, auch hier nicht gezeigten Patienten, ist kein signifikanter Unterschied erkennbar.

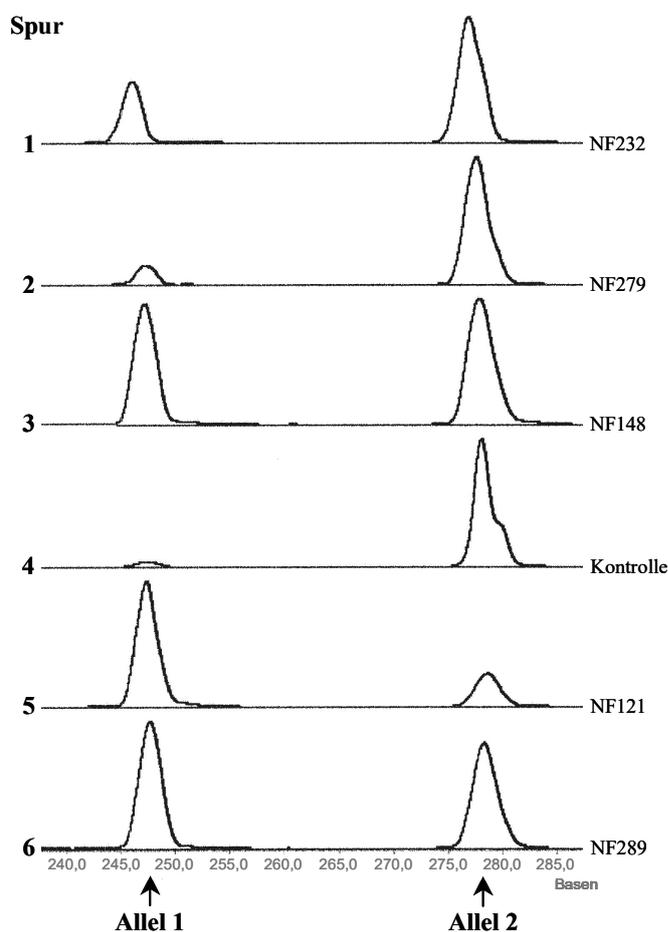


Abb. 5: Elektropherogramm zur Überprüfung der Expression beider *NF1*-Allele exemplarisch für 5 heterozygote *NF1*-Patienten (Spuren 1-3, 5, 6) und als Kontrolle einer homozygoten Person (Spur 4).

Die verwendete Software erlaubte nicht nur die qualitative sondern auch die quantitative Auswertung der Signale. Es wurde für jeden Peak Höhe und Fläche bestimmt. Um die Daten beider Allele jedes Patienten vergleichen zu können wurde, die Höhe bzw. Fläche des größeren Peaks zu 100 % gesetzt. Daraus konnte dann der relative Größenunterschied des kleineren Peaks bestimmt werden. Diese Werte sind für die oben gezeigten Allele der *NF1*-Patienten in Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Quantitative Analyse der relativen Allelexpression

<i>Patient</i>	<i>Allel 1</i> <i>relative Peak-</i>		<i>Allel 2</i> <i>relative Peak-</i>	
	<i>Höhe</i>	<i>Fläche</i>	<i>Höhe</i>	<i>Fläche</i>
NF232	0,49	0,39	1,00	1,00
NF279	0,15	0,12	1,00	1,00
NF148	0,96	0,80	1,00	1,00
Kontrolle	0,04	0,05	1,00	1,00
NF121	1,00	1,00	0,26	0,32
NF289	1,00	1,00	0,83	0,95

Abbildung 5 und Tabelle 1 zeigen, dass bei den NF1-Patienten NF121, NF232 und NF279 jeweils ein Allel auf RNA-Ebene deutlich schwächer exprimiert wird, wobei es sich sowohl um Allel 1 (NF232 und NF279) als auch um Allel 2 (NF121) handeln kann. Der funktionelle Verlust einer *NF1*-Genkopie einschließlich ihrer 3'UTR bei den drei Patienten lässt vermuten, dass die unterschiedliche Expression eines Allels aus der konstitutionellen Mutation resultiert, die bislang noch nicht gefunden werden konnte.

Da nicht in allen untersuchten NF1-Patienten Unterschiede in der Allel-Expression gezeigt werden konnten bzw. die Ursache noch unklar ist und nicht alle Patienten in diese Analysen einbezogen werden konnten, wurde in einem weiteren Schritt gezielt nach Sequenzveränderungen innerhalb der NF1-3'UTR gesucht.

3.1.2 Analyse von Sequenzveränderungen

Die 3'UTR der NF1-mRNA ist mit knapp 3,5 kb sehr lang, deshalb musste sie für die Mutationssuche unterteilt werden. Abbildung 6 zeigt eine schematische Darstellung der NF1-mRNA und die Lage der untersuchten Teilbereiche (Fragment 1 bis 4, blau). Positionsangaben beziehen sich auf die Lage innerhalb der NF1-3'UTR, beginnend mit dem ersten Nukleotid nach dem Stopp-Codon UGA.

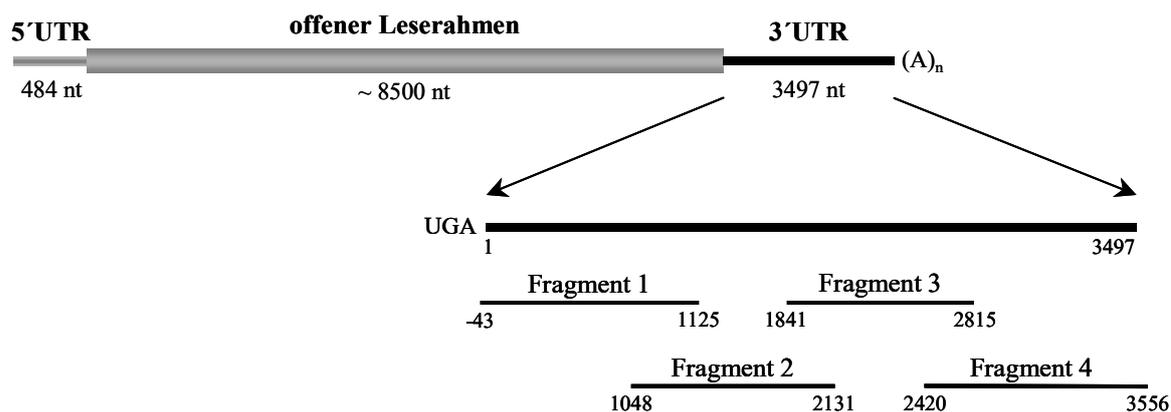


Abb. 6: Schematische Darstellung der NF1-mRNA sowie die Lage der vier 3'UTR Fragmente, die nach PCR Amplifikation und Klonierung näher untersucht wurden. Positionsangaben beziehen sich auf die Lage innerhalb der 3'UTR, beginnend mit dem ersten Nucleotid nach dem Stopp-Codon. (Referenzsequenz L05367).

Durch ein enzymatisches Mutationsdetektions-Verfahren (PassportTM Mutation-Scanning Kit, Amersham Biosciences) ergaben sich im Rahmen einer Diplomarbeit bei 9 der 24 NF1-Patienten Hinweise auf Sequenzauffälligkeiten innerhalb der 3'-nicht-translatierten Region. Die bei einem Patienten (NF170) gefundene Auffälligkeit wurde bereits im Rahmen dieser Diplomarbeit näher untersucht und charakterisiert (Axmann 1999).

Folgende Übersicht zeigt die NF1-Patienten sowie die jeweils weiter analysierten Fragmente. Dafür wurden die jeweiligen 3'UTR Fragmente mittels PCR amplifiziert (Primer unter 2.1.9) und in den Vektor pUC18 kloniert.

<u>NF1-Patient</u>	<u>klonierte 3'UTR Fragmente</u>
NF29	1 und 4
NF48	1 und 4
NF181	4
NF229	1 und 4
NF271	3
NF279	3
NF289	3
NF124-2	2

Nach Transformation der Plasmide in *E.coli* XL1-blue Zellen erfolgte Plasmid-DNA Isolierung aus den rekombinanten Klonen, die dann für Restriktionsverdau und

Sequenzreaktion zur Verfügung stand. Um zu kontrollieren, ob das Insert die erwartete Länge besaß, wurde ein Aliquot der Plasmid-DNA mit *EcoR* I und *Sal* I verdaut. Ergaben sich nach der Auftrennung des Restriktionsansatzes auf einem Agarosegel keine Auffälligkeiten, wurde eine Sequenzreaktion mit der Plasmid-DNA durchgeführt, wobei jeweils mehrere Klone mit gleichen Inserts sequenziert wurden. Die mittels ALFexpress erhaltenen Sequenzen der untersuchten Patienten wurden mit Datenbanksequenzen der 3'UTR des *NF1*-Gens verglichen. Die zum Vergleich verwendeten genomischen Datenbanksequenzen haben die GenBank Accession Nummern L05367 (Humneurof) und AC004526. Die ermittelten Sequenzen wurden zusätzlich mit der EST-Datenbank (expressed sequences tag) des NCBI (National Center for Biotechnology Information (USA)) verglichen, um möglichst viele unabhängige Referenzsequenzen zu nutzen.

In Tabelle 2 sind die Ergebnisse der Sequenzvergleiche dargestellt. Dabei handelt es sich nur um solche Veränderungen, die jeweils bei mehreren rekombinanten Klonen gefunden werden konnten. Positionsangaben beziehen sich auf die Lage innerhalb der NF1-3'UTR und Sequenzveränderungen sind in Bezug zur Humneurof-Sequenz zu sehen.

Tab. 2: Auflistung der Sequenzveränderungen, gefunden bei verschiedenen NF1-Patienten.

<i>Patient</i>	<i>3'UTR Fragment</i>	<i>Sequenzveränderung</i>	<i>Position</i>
NF29	1	857insAT	857
NF48	1	427insT 857insAT	427 857
NF124-2	2	1942insTGCCAAGGA	1942
NF271	3	1942insTGCCAAGGA 2200delGTGTA	1942 2200
NF279	3	1942insTGCCAAGGA 2039delT A2190G G2254C	1942 2039 2190 2254
NF289	3	1942insTGCCAAGGA 2039delT A2190G G2254C	1942 2039 2190 2254
NF48	4	AT3343TA	3343
NF181	4	AT3343TA	3343
NF229	4	AT3343TA	3343

Tabelle 2 zeigt insgesamt 8 verschiedene Sequenzveränderungen, die durch Datenbankvergleiche der analysierten 3'UTR Fragmente gefunden werden konnten. Drei dieser Veränderungen sind als Polymorphismen in der NF1-3'UTR bei Cowley et al. (1998) beschrieben. Dabei handelt es sich um die Insertion von AT an Position 857 der 3'UTR (857insAT), eine Deletion von 5 Nukleotiden an der Stelle 2200 (2200delGTGTA) und den Einzelbasenaustausch von G nach C (G2254C).

Die verbleibenden fünf Sequenzveränderungen innerhalb der NF1-3'UTR (427insT, 1942insTGCCAAGGA, 2039delT, A2190G, AT3343TA) wurden weiter untersucht um zu klären, ob die Sequenzveränderungen Polymorphismen oder spezifisch für NF1-Patienten sind.

Verifizierung der Sequenzveränderungen

In Abhängigkeit von der gefundenen Sequenzveränderung wurden unterschiedliche Methoden gewählt, um diese zu verifizieren. Größere Insertionen konnten durch Amplifikation des entsprechenden DNA-Abschnitts und Auftrennung des PCR-Produktes auf einem Acrylamid-Gel näher untersucht werden. Für Basenaustausche oder kurze Insertionen bot sich die Primer-Extension oder die Analyse mittels Restriktion an.

Untersuchung der Sequenzveränderung 1942insTGCCAAGGA

Zur Verifizierung der 9 Basen Insertion an Position 1194 der NF1-3'UTR (1942insTGCCAAGGA) wurden PCR-Produkte (Primer: NF87440 (hin), 3'UTR2041), gewonnen an DNA der Patienten NF124-4, NF271, NF279 und NF289 sowie an DNA gesunder Kontrollpersonen, auf einem hochauflösenden Acrylamid-Gel aufgetrennt. Die Primer waren so gewählt, dass das amplifizierte DNA-Fragment im Fall der Insertion eine Länge von 230 Basen besitzt. Da der Primer NF87440 am 5'-Ende das Fluorophor Cy5 trug, war die Detektion und Größenbestimmung der PCR-Produkte mittels ALFexpress und angeschlossener Software möglich.

Abbildung 7 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung, wobei nur der relevante Bildausschnitt vergrößert dargestellt ist. In Spur 1 wurde der Marker aufgetragen, der alle 50 Basen ein Signal (Peak) liefert (Skala unter Spur 10). Neben diesem externen Standard sind in jeder Spur zwei interne Standardpeaks zu sehen (schwarze Pfeile). Diese internen Standards sind Cy5-markierte PCR-Produkte definierter Länge (100 und 392 Basen). Mit

Hilfe dieser Standards konnte die Länge der zu untersuchenden PCR-Produkte exakt bestimmt werden. Der mit rotem Pfeil gekennzeichnete Peak hat die Länge 230 Basen und ist in allen Spuren an gleicher Position zu sehen. Das bedeutet, dass die Sequenzveränderung 1942insTGCCAAGGA nicht nur bei den untersuchten NF1-Patienten zu finden ist, sondern auch bei gesunden Kontrollpersonen (K 1-4). Zusätzlich sind auch PCR-Produkte aufgetragen, die an einem DNA-Mix von 95 gesunden, nicht verwandten Personen amplifiziert wurden (Spur: Mix). Aber auch hier ist lediglich die DNA Variante mit der Insertion nachzuweisen, obwohl der Datenbanksequenz L05367 diese 9 Basen fehlen. Damit handelt es sich in diesem Fall um keine patientenspezifische Sequenzveränderung innerhalb der NF1-3'UTR.

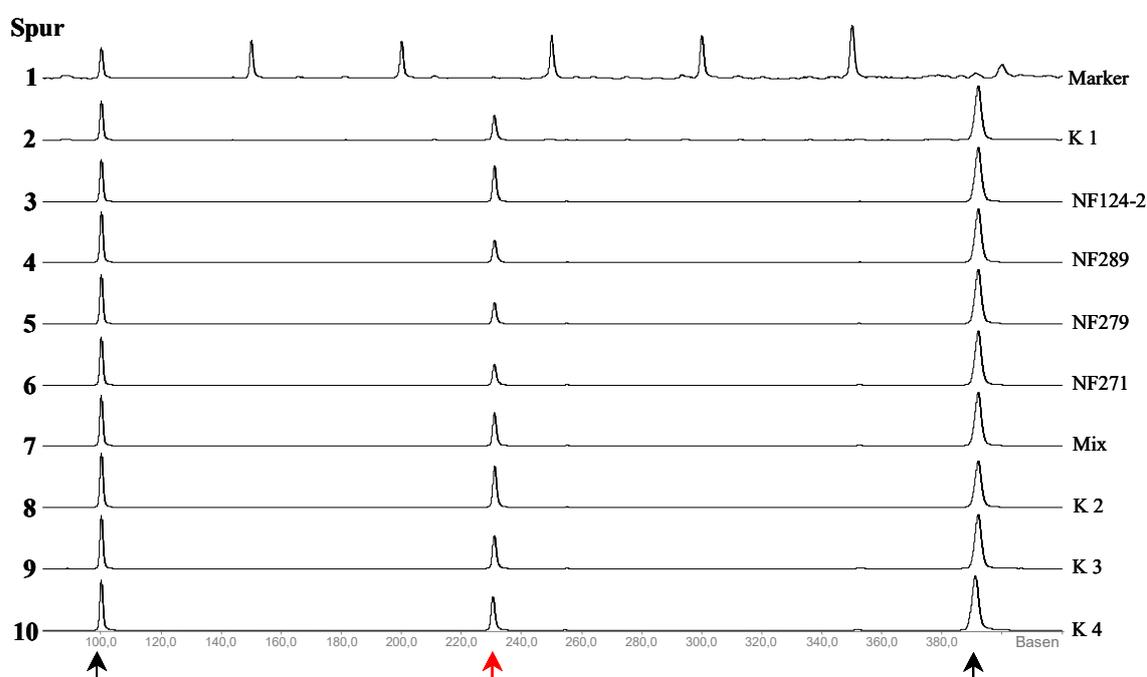


Abb. 7: Analyse und Auswertung der Sequenzveränderung 1942insTGCCAAGGA mittels ALFexpress auf einem hochauflösenden Acrylamidgel. Die oberste Spur zeigt den 50 Basen Marker, Spuren 3-5 zeigen die PCR-Produkte der untersuchten NF1-Patienten, die gesunder Kontrollpersonen sind in den Spuren 2 und 7-10 aufgetragen, wobei in Spur 7 (Mix) ein DNA-Mix von 95 Kontrollpersonen als Template für die PCR diente. Schwarze Pfeile markieren interne Standards (100 und 392 Basen), der rote Pfeil zeigt den zu analysierenden Peak.

Untersuchung mittels Primer-Extension

Diese Untersuchungen wurden mit Hilfe des ABI PRISM[®]SnaPShot[™] ddNTP Primer Extension Kit durchgeführt. Dabei wurde ein unmarkiertes Oligonukleotid, das unmittelbar vor der veränderten Stelle endete um die gesuchte Base verlängert. Als Template in dieser Reaktion dienten PCR-Produkte, amplifiziert an DNA des zu untersuchenden NF1-

Patienten, wobei das Oligonukleotid nicht mit den in der PCR-Reaktion eingesetzten Primern identisch war (Primer unter 2.1.9). Die Auftrennung und Analyse der um eine Base verlängerten Oligonukleotide erfolgte durch den ABI PRISM[®] 310 Genetic Analyzer und entsprechender Software. Mit dieser Methode wurden die Sequenzveränderungen 427insT, 2039delT und AT3343TA näher untersucht.

Tabelle 3 zeigt die NF1-Patienten, bei denen diese Sequenzveränderungen gefunden und analysiert wurden. Außerdem ist zu entnehmen welche Oligonukleotide, zum Einsatz kamen und um welche Basen sie verlängert werden konnten (vierte Spalte). Die fünfte Spalte gibt die tatsächlich eingebaute Base an. Für die Insertion der Base T an Position 427 der NF1-3'UTR (427insT) bedeutet dies beispielsweise, dass das Oligonukleotid 3'UTR406 (hin) um ein T verlängert wird, falls die Insertion vorhanden ist, ansonsten erfolgt der Einbau der Base C. Analoges gilt für die beiden anderen Sequenzveränderungen.

Tab. 3: Übersicht der mittels Primer-Extension untersuchten Sequenzveränderungen, den genotypisierten NF1-Patienten und den jeweils eingesetzten Oligonukleotiden.

<i>Sequenz- veränderung</i>	<i>Oligonukleotid</i>	<i>NF1- Patient</i>	<i>Mögliche Verlängerung um Base</i>	<i>Eingebaute Base</i>
427insT	3'UTR406 (hin)	NF48	T oder C	T
2039delT	3'UTR2041 (mut;T) (rück)	NF279 NF289	T oder A	T
AT3343TA	SNAP 6 A-T	NF48 NF181 NF229	T oder A	T

Bei allen NF1-Patienten konnte die bei ihnen gefundene Sequenzveränderung bestätigt werden, da das eingesetzte Oligonukleotid nur um die Base T verlängert wurde. Das bedeutet auch, dass alle sechs NF1-Patienten homozygot für die Veränderungen sind. Um zu überprüfen, in wie weit es sich um Polymorphismen oder patientenspezifische Mutationen handelte, wurden 95 gesunde Kontrollpersonen aus Süddeutschland genotypisiert. Dafür wurde die DNA von jeweils 5 Personen gepoolt und wie oben beschrieben analysiert. Die Aufteilung in 19 Subpools anstelle eines DNA-Mixes aus allen Kontrollen sollte im Fall eines Polymorphismus gewährleisten, dass auch Varianten mit geringer Frequenz detektiert werden können. Durch die Subpools ließ sich aber, im

Vergleich zur separaten Analyse jeder einzelnen Kontrollperson, der Typisierungsaufwand reduzieren.

Die Analyse der Kontrollpersonen ergab, dass bei ihnen ausschließlich dieselben Sequenzvarianten wie bei den Patienten vorkamen. In keinem einzigen Fall ließ sich die Datenbanksequenz (GenBank Accession Nummer L05367 (Humneurof)) bestätigen.

Analyse der Sequenzveränderung A2190G mittels Restriktionsverdau

Der bei den Patienten NF279 und NF289 gefundene Basenaustausch von A nach G an Position 2190 der NF1-3'UTR sollte mittels Restriktionsanalyse verifiziert werden. Ein 403 Basen langer, die Veränderung beinhaltender DNA-Abschnitt, wurde mit den Primern 3'UTR 1809 (hin) und 3'UTR 2211 (mut;C) (rück) amplifiziert. Als Template für die PCR-Reaktion dienten neben den DNAs der beiden Patienten auch zwei DNAs gesunder Kontrollpersonen. Die PCR-Produkte wurden vor der Analyse auf einem Agarosegel mit der Restriktionsendonuklease *Alu I* verdaut. Die amplifizierten DNA Abschnitte trugen in jedem Fall zwei Erkennungssequenzen für *Alu I*. Daraus ergaben sich Restriktionsfragmente mit 49, 93 und 260 bp Länge. Die beiden kürzeren Fragmente dienten als Spaltkontrolle. Um zwischen den beiden Sequenzvarianten (A (Datenbank Humneurof) oder G (NF1-Patienten)) unterscheiden zu können, wurde der Rückprimer an einer Stelle so verändert, dass sich im Fall der Sequenz aus der Datenbank eine zusätzliche Schnittstelle für *Alu I* ergab. Das 260 bp Fragment wurde im Fall der Sequenzvariante A in 20 bp und 240 bp große Teilfragmente unterteilt, im Fall der Variante G blieb das ursprüngliche 260 bp Fragment erhalten.

In Abbildung 8 sind die mit *Alu I* geschnittenen und auf einem Agarosegel aufgetrennten PCR-Produkte dargestellt, allerdings ist der Bildausschnitt so gewählt, dass die beiden immer entstehenden Spaltfragmente (49 und 93 bp) nicht abgebildet sind. Die mit *Alu I* verdauten PCR-Produkte der beiden NF1-Patienten (Spur 2: NF279, Spur 3: NF289) zeigen beide bei 260 bp eine distinkte Bande. Diese entspricht der Sequenzvariante G, die bei diesen Patienten durch Sequenzierung gefunden wurde. Patient NF279 ist homozygot für die diese Variante. In Spur 3 (Patient NF289) ist zusätzlich auch auf der Höhe von 240 bp ein Spaltprodukt zu erkennen. Dieser Patient besitzt ein Allel mit Sequenzvariante A und eines mit Variante G, ist somit heterozygot. Da die beiden gesunden Kontrollpersonen (Spuren 4 und 5) für die Variante A ebenfalls hetero- bzw. homozygot

sind, handelt es sich bei der identifizierten Sequenzveränderung A2190G um keine patientenspezifische Mutation, sondern um einen zu diesem Zeitpunkt noch nicht beschriebenen Polymorphismus in der NF1-3'UTR.

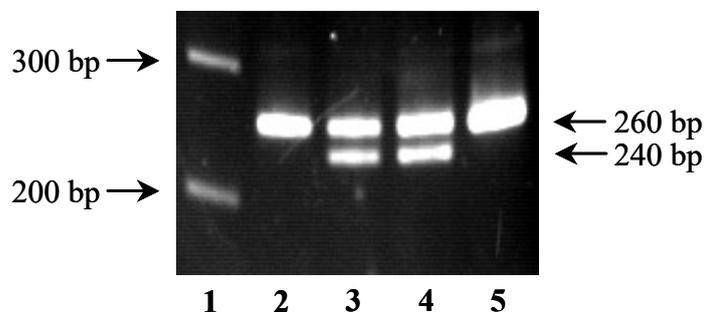


Abb. 8: Analyse von Sequenzveränderung A2190G auf einem Agarosegel. Spur 1: 100 bp-Leiter, Spuren 2-5: PCR-Produkte verdaut mit *Alu* I wobei die Template-DNA von Patient NF279 (Spur 2), von NF289 (Spur 3) und Kontrollpersonen (Spuren 4 und 5) stammte.

Um die Allelfrequenzen des Polymorphismus zu bestimmen, wurden analog zu obigem PCR-Ansatz und dazugehöriger Restriktionsanalyse 95 Personen genotypisiert. Dabei handelte es sich wieder um nicht verwandte Personen aus dem süddeutschen Raum. Unter diesen 95 Personen waren 39 heterozygot. Homozygot waren 44 Individuen für die Sequenzvariante G und die verbleibenden 12 trugen nur Allele mit Variante A.

In Abbildung 9 sind die Ergebnisse der Mutationssuche innerhalb der NF1-3'UTR zusammengefasst. Bei einem Teil der untersuchten NF1-Patienten konnten innerhalb der 3'UTR drei bereits bekannte Polymorphismen nachgewiesen werden (schwarze Pfeile). Mit rotem Pfeil ist der neu beschriebene Polymorphismus (A2190G) an Position 2190 der *NF1*-3'UTR gekennzeichnet. Es sind, soweit bekannt auch die Referenznummern der Polymorphismen angegeben.

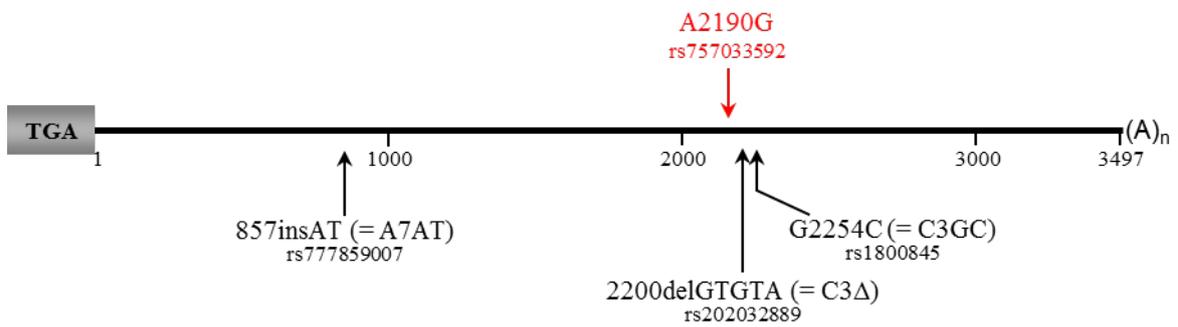


Abb. 9: Graphische Zusammenfassung der Mutationssuche innerhalb der NF1-3'UTR, bekannte Polymorphismen sind in schwarz und der neu identifizierte in rot dargestellt.

Im Rahmen der Mutationssuche wurden keine patientenspezifischen Mutationen innerhalb der 3'-nicht-translatierten Region der NF1-mRNA identifiziert.

3.2 Funktionelle Analysen der NF1-3'UTR

3.2.1 Charakterisierung von NF1-PBR5 auf RNA Ebene

Protein-bindende Region 5, die am weitesten 3' innerhalb der 3'UTR gelegene Binderegion (Position 3313-3460), beinhaltet ein für die Proteinbindung wichtiges Kernmotiv. In diesem 34 nt großen Teilbereich der NF1-3'UTR sind drei Pyrimidin-reiche Motive lokalisiert, die in Abb. 10 A unterstrichen dargestellt sind. Erste Experimente mit an diesen Stellen veränderten RNA-Fragmenten im Rahmen meiner Diplomarbeit (Striebel 1998) zeigten, dass die beiden 5'-liegenden Motive an der Protein/RNA-Komplexbildung beteiligt sind. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten mit Hilfe der RNA-Gelretentionsanalyse die verantwortlichen Nukleotide identifiziert werden.

Dafür mussten RNA-Fragmente synthetisiert werden, die definierte Mutationen in den zur Proteinbindung wichtigen Motiven trugen. Hierfür kam der QuikChangeTM Site Directed Mutagenesis Kit zum Einsatz. Ausgehend von doppelsträngigen Plasmiden als Template wurden Oligonukleotide in einer PCR-ähnlichen Reaktion verlängert. Das eingesetzte Plasmid (pUC18) enthielt die NF1-PBR5 Sequenz, mit der T7-Promotorsequenz am 5'-Ende (Abb. 10 A). Da die eingesetzten Oligonukleotide Mutationen im Vergleich zur PBR5 Wildtyp-Sequenz trugen, sollten auch die neu synthetisierten und in Bakterien vermehrten Plasmide diese Sequenzveränderung tragen. Dies wurde mittels Sequenzierung überprüft. Um RNA-Transkripte definierter Länge zu erhalten, mussten die Plasmide vor der *in vitro*-Transkription mit *Xba*I linearisiert werden. Mit diesem Verfahren wurden drei unterschiedliche Arten mutanter RNA-Fragmente synthetisiert, die entweder einen oder zwei Basenaustausche im Vergleich zur Wildtyp-Sequenz von PBR5 trugen. In Abbildung 10 B sind diese im Vergleich zum Wildtyp veränderten Nukleotide rot dargestellt. Da alle Fragmente eine Länge von 148 Nukleotiden aufwiesen und sich in ihren 5'-Enden nicht unterschieden, wurde auf die Darstellung dieser Basen verzichtet.

Protein/RNA-Komplex, wenn Fragmente mit unveränderter RNA-Sequenz von NF1-PBR5 eingesetzt wurden (Abb. 11 A, Spur 2). In Abbildung 11 B Spur 2 ist ebenfalls eine Komplexbildung zu erkennen. Das bedeutet, dass der Basenaustausch C nach U im zweiten Pyrimidin-reichen Motiv (RNA-Fragment: NF1-PBR5 Mut2/3) keinen Einfluss auf die Proteinbindung im Vergleich zur Wildtyp RNA-Sequenz von PBR5 hat. Im Gegensatz dazu führt ein weiterer Basenaustausch in diesem Pyrimidin-reichen Motiv (RNA: NF1-PBR5 Mut2/3+2) zum Ausbleiben der Protein/RNA-Komplexbildung (Abb. 11 C, Spur 2). Ist die PBR5 Wildtyp-Sequenz an einer Position des am weitesten 5'-liegenden Pyrimidin-reichen Motives durch eine Basenaustausch von C nach U mutiert (NF1-PBR5 Mut1/2), verhindert dieser bereits die Bildung eines Protein/RNA-Komplexes (Abb. 11 D, Spur 2).

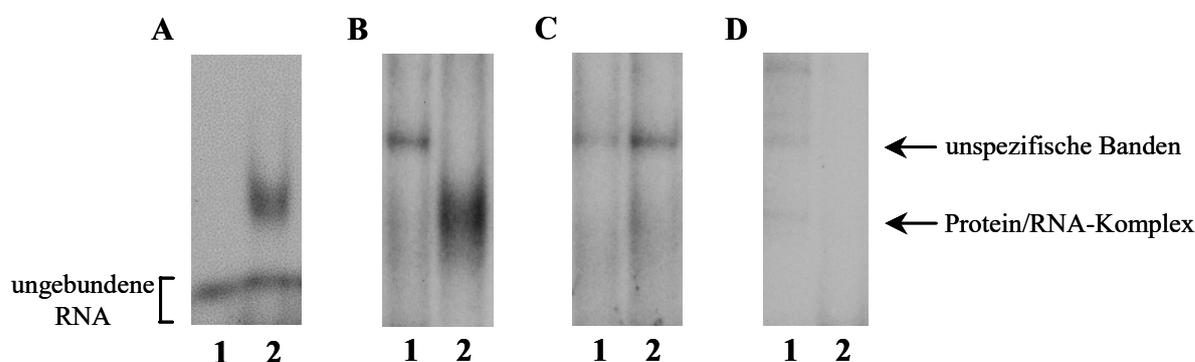


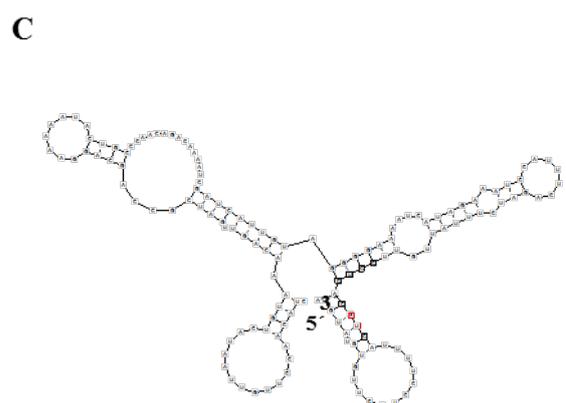
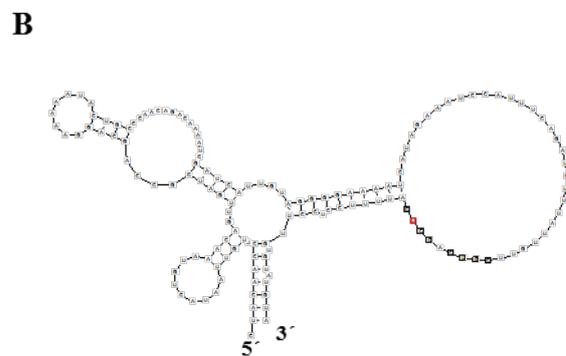
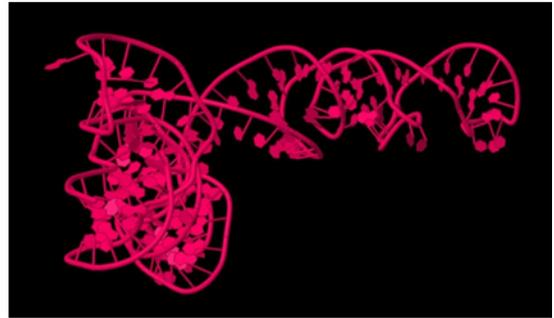
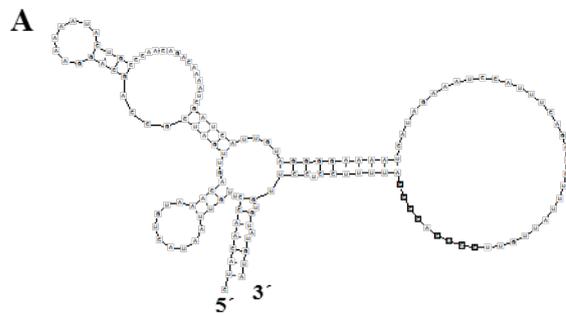
Abb. 11 A-D: Autoradiogramme nach Bandshift-Experimenten mit Wildtyp-RNA von NF1-PBR5 (A) sowie der veränderten RNA-Fragmente NF1-PBR5 Mut2/3 (B), NF1-PBR5 Mut2/3+2 (C) und NF1-PBR5 Mut1/2 (D). In Spur 1 ist jeweils die Negativkontrolle, in Spur 2 der entsprechende Ansatz mit Proteinlysate aufgetragen.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Pyrimidin-reichen Sequenzmotive innerhalb der NF1-PBR5 eine wichtige Rolle bei der Proteinbindung spielen. Bereits ein einzelner Basenaustausch in Motiv 1 bzw. zwei veränderte Nukleotide in Motiv 2 führen zum Ausbleiben der Protein/RNA-Komplexbildung.

Darstellung der Sekundärstrukturen

Bei Protein/RNA-Wechselwirkungen spielt die RNA-Sekundärstruktur eine wichtige Rolle. Es stehen verschiedene Algorithmen zur Berechnung der Sekundärstruktur und Programme zu deren Darstellung zur Verfügung. Die verwendete Software ermöglichte sowohl die Darstellung in 2-dimensionalen (2D, RNA-Draw) als auch in 3-dimensionalen

Form (3D, Berechnung: RNAcomposer, Darstellung: jmol). Die theoretisch errechneten Strukturen sind in Abbildung 12 A-D dargestellt.



D

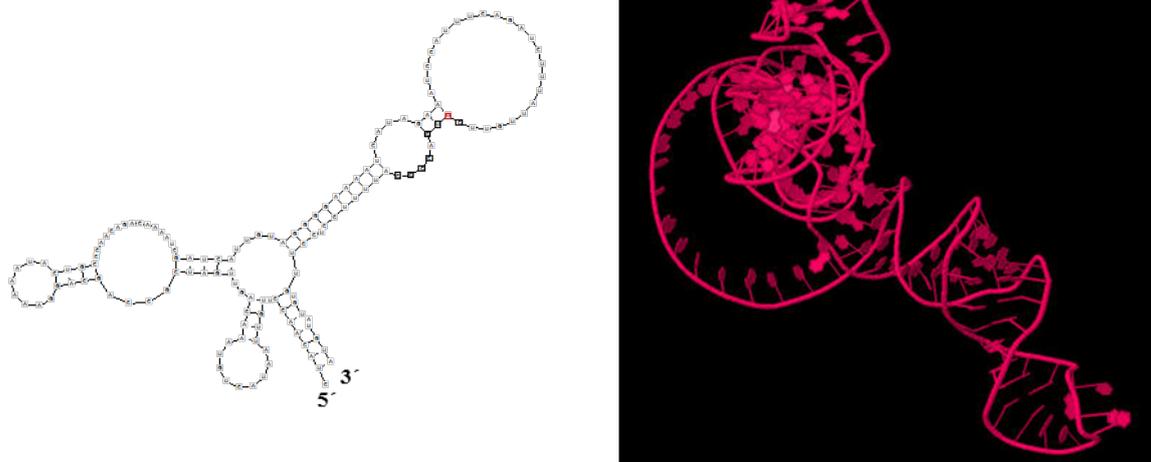


Abb. 12 A-D: Theoretische Sekundärstrukturen von NF1-PBR5 (A) sowie der veränderten RNA-Fragmente NF1-PBR5 Mut2/3 (B), NF1-PBR5 Mut2/3+2 (C) und NF1-PBR5 Mut1/2 (D), links jeweils die Darstellung in 2D (relevante Sequenzmotive sind eingerahmt und veränderte Basen rot dargestellt) sowie rechts in 3D.

Die Sekundärstrukturen sind vor allem für die NF1-3'UTR Fragmente NF1-PBR5 Mut2/3+2 (Abb. 12 C) und NF1-PBR5 Mut1/2 (Abb. 12 D) deutlich verändert. Wie oben beschrieben ist eine RNA-Proteinbindung bei diesen Fragmenten nicht mehr nachweisbar. Die Veränderungen bei Fragment NF1-PBR5 Mut2/3 (Abb. 12 B) sind im Vergleich zum WT (Abb. 12 A) gering, die zur Proteinbindung wichtigen Sequenzmotive sind analog dem WT zugänglich und die RNA-Proteininteraktion lässt sich über Bandshift-Experimente nachweisen. Diese computerbasierten Berechnungen zur Sekundärstruktur unterstützen ebenfalls, dass die beiden Pyrimidin-reichen Sequenzmotive innerhalb der NF1-PBR5 eine wichtige Rolle bei der Proteinbindung spielen.

Konservierung der Pyrimidin-reichen Sequenzmotive innerhalb der NF1-PBR5

Inwieweit diese Sequenzmotive bei verschiedenen Spezies konserviert sind, wurde mittels Datenbankanalysen untersucht. Hierzu wurden mit Hilfe der „UCSC Genome Browser Database“ verschiedene Referenzsequenzen unterschiedlicher Spezies miteinander verglichen. Die verwendeten Sequenzen sind im Material und Methoden Teil aufgelistet. Für die durchgeführten Analysen stand eine vordefinierte DNA Zusammenstellung von 46 verschiedenen Spezies zur Verfügung. Von diesen 46 Vertebraten wurden auch Untergruppen (Primaten, Plazentalier) analysiert. Die Arten sind in Abb. 13 als phylogenetischer Baum dargestellt (basierend auf der Darstellung von UCSC nach Murphy

et al, 2001), wobei für die Analyse nicht alle Spezies berücksichtigt werden konnten, da nicht alle Spezies zu NF1-PBR5 homologe Sequenzen aufweisen.

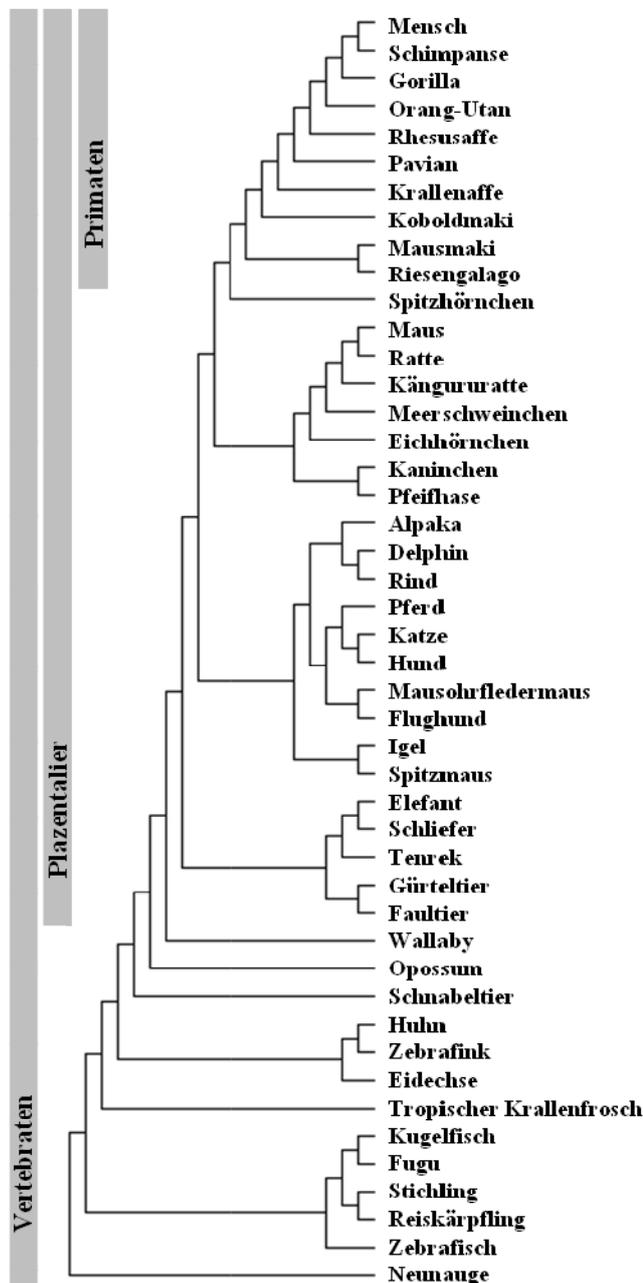
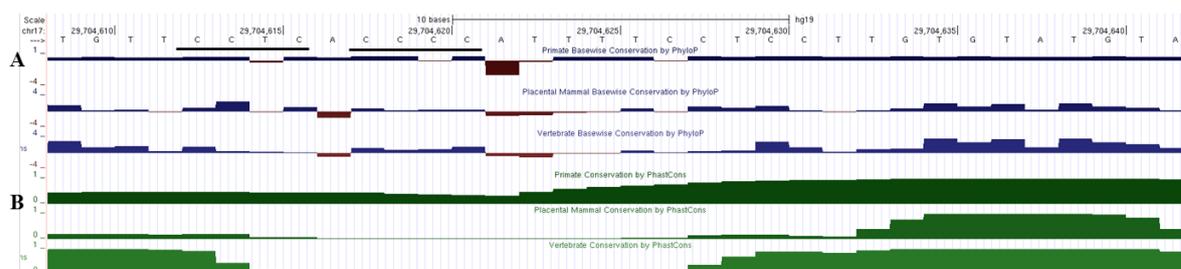


Abb. 13: Phylogenetischer Baum der betrachteten Vertebraten.

Für die Untersuchungen zur Konservierung innerhalb der NF1-3'UTR diente die UCSC Sequenzversion hg19/GRCh37 vom Februar 2009 als Referenz, wobei die 34 bp umfassende PBR5 auf Chromosom 17, Position 29.704.609-29.704.642 lokalisiert ist. In Abbildung 14 A-C sind die Ergebnisse zusammengefasst, wobei in Abbildung 14 A bzw. B jeweils für die 3 betrachteten Gruppen (Primate (Primaten), Placental Mammals

(Plazentalier) und Vertebrate (Vertebraten)) mit zwei unterschiedlichen Algorithmen, PhyloP (A) und PhastCons (B), der Konservierungsgrad ermittelt wurde. Je höher der Balken ist, desto größer ist der Grad der Konservierung pro Base. Im Vergleich zur ganz oben dargestellten humanen Referenzsequenz zeigt sich, dass es, unabhängig vom verwendeten Algorithmus, stärker und schwächer konservierte Bereiche gibt. In Abbildung 14 C ist der Sequenzvergleich für die einzelnen Spezies auf Basis der einzelnen Basen dargestellt (Details zu den jeweiligen Sequenzen sind unter „Material und Methoden“ aufgeführt). Allerdings konnte bei Kugelfisch, Fugu, Stichling, Reiskärpfling, Zebrafisch und Neunauge keine zur PBR5 der humanen NF1-3'UTR homologe Sequenz identifiziert werden. In der humanen Referenzsequenz sind die Pyrimidin-reichen Sequenzmotive unterstrichen dargestellt. Die in Mutationsexperimenten näher untersuchten Bereiche, wie unter 3.2.1 beschrieben, sind rot hinterlegt, wobei es sich zeigt, dass diese Bereiche über Speziesgrenzen hinaus konserviert sind. Dies sind vor allem die Basen, für die Proteinbindung als kritisch identifizierten wurden (dunkler rot hinterlegt). Erwartungsgemäß ist der Konservierungsgrad im Vergleich zu den Menschenaffen am größten und nimmt mit geringerem Verwandtschaftsgrad gemäß phylogenetischen Baum in Abbildung 13 ab. Kommt es im Bereich der in Abbildung 14 C rot hinterlegten Basen zu einer Änderung, so wird v.a. im ersten Motiv „T“ zu „C“ ausgetauscht, beispielsweise bei Wollaby, Opposum und Schnabeltier. Beim zweiten Motiv zeigt sich ebenfalls ein hoher Grad an Konservierung, v.a. bei den beiden mittleren Cytosinen (dunkler rot hinterlegt). Falls eine Sequenzänderung vorliegt, werden überwiegend nur dieser beiden „Cs“ nach „T“ verändert. Wie in den Mutationsexperimenten gezeigt, ist durch die Veränderung an dieser Basenposition noch eine Proteinbindung möglich. Lediglich Maus und Ratte zeigen Veränderungen in beiden Basen. Neben den Cytosin-reichen Bereichen der NF1-PBR5 ist auch der Bereich am 3'Ende dieser Protein-Binderegion bei den verschiedenen Spezies konserviert (Abbildung 14 A und B, Position 29.704.633 – 29.704642).



C

Mensch	tgttc <u>cctcac</u> -- <u>ccc</u> -a--tt-tt <u>cctcctt</u> gtgt-atgta
Schimpanse
Gorilla
Orang-Utang.....
Rhesusaffe
Pavian
Krallenaffe
Mausmakic.....g.....
Riesengalagoc.....t.....
Spitzhörnchen	----t.....g..cc.a.t.c.tc.....
Maus	---g.....ttg.c...c.c-tg...-.....cc
Ratte	---c.....ttg.c...c.c-tg...-.....cacc
Kängururatte	---c.c.ct.t-.....ttca.....
Meerschweinchen	.c.c.c.t.....g.....-
Eichhörnchenc.t.....-t.....
Kaninchen	---.ctg.....g..g.....a.....
Pfeifhase	---.gtc.....a.t.ca..gg...c....a.....
Alpakac.t.....tt.....c.....
Delphinc.gt.....c.....
Rindc.gt.....c.....c.....
Pferdc.g.....g.....c.....
Katzec.g.....g.....c.....
Hund	.a...c.....c.....c.....
Mausohrfledermausc.....c.....
Flughundtc.....
Igelt.c.....a..a..c.a.....
Spitzmausc.g.....c.....c.....
Elefantc.cacc.....c.....c.....
Schliefer	...a...-...a...c.c...a.....g...-
Tenrekc.g.....-...-...-...-...-
Gürteltier	..-..c.....a.....-
Faultiert.c.....a.....t.c.....c.....
Wallabytct.....c.....ca.....
Opossumtca.....c.....t...ca.....
Schnabeltiertc.....g...ac.t...ca.....
Huhn-..ct.....c...t...ca.....
Zebrafink-..t.....g...c...-..ca.....
Eidechse-..t.....t...c.ac...t...cca.....
Tropischer Krallenfroschc.a.....g.c.--..ca.....

Abb. 14 A-C: Konservierung von NF1-PBR5 bei verschiedenen Spezies. Darstellung jeweils 3 verschiedener Gruppen (Primate (Primaten), Placental Mammals (Plazentalier) und Vertebrate (Vertebraten)) nach Auswertung mit unterschiedlichen Algorithmen PhyloP (A) und PhastCons (B) des UCSC Gene Browsers. Abb. C zeigt den Vergleich auf DNA Ebene pro Spezies, wobei die Pyrimidin-reichen Bereiche in der Referenzsequenz (Mensch) unterstrichen dargestellt sind. Rot hinterlegt sind die Basen, die in Mutationsexperimenten (beschreiben unter 3.2.1) modifiziert wurden. Im Vergleich zur Referenzsequenz identische Basen sind mit „.“, fehlende Basen mit „-“ und abweichende Basen mit dem entsprechenden Buchstaben dargestellt.

Die Untersuchungen zur Charakterisierung von NF1-PBR5 auf RNA Ebene zeigten klar, dass dieser Bereich eine wichtige Rolle bei der Protein-RNA Interaktion spielt. Dies wird durch die Betrachtung der Sekundärstrukturen sowie Analyse der phylogenetischen Konservierung dieses RNA Bereichs unterstützt. Im Folgenden stehen nun die

interagierenden Proteine im Vordergrund, zunächst deren Identifikation und später ihre Funktion.

3.2.3 Identifikation interagierender Proteine mit Teilbereichen der NF1-3'UTR

Die zur Protein-Bindung relevanten RNA-Motive sind sowohl für NF1-PBR1 als auch für PBR5 gut charakterisiert, die interagierenden Proteine dagegen teilweise noch unbekannt. Für NF1-PBR1 konnte gezeigt werden, dass diese Binderegion mit drei verschiedenen Proteinen interagieren kann, etwa 35, 68 und 97 kDa groß. Die größte Proteinkomponente wurde bereits als PKR identifiziert. Außerdem ist HuR/HuD *in vitro* ein Interaktionspartner von NF1-PBR1. Bei dem Interaktionspartner von NF1-PBR5 handelt es sich um ein etwa 46 kDa großes, bisher unbekanntes, Protein. Im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit sollten weitere Interaktionspartner von PBR1 bzw. das an PBR5 bindende Protein identifiziert werden. Eine Möglichkeit die bindenden Proteine zu finden stellt ein systematischer Screening-Ansatz einer cDNA-Bank mit Hilfe des Hefe 3-Hybrid-Systems dar.

3.2.3.1 Hefe 3-Hybrid-System

Dieses, von SenGupta et al. 1996 erstmals beschriebene System, dient zur Untersuchung von RNA-Protein Interaktionen *in vivo* in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, dass beide funktionellen Domänen, Aktivierungs- (AD) und DNA-Binde-Domäne (DBD), von Transkriptionsfaktoren ohne Funktionsverlust voneinander getrennt eingesetzt werden können. Zwei Komponenten des 3-Hybrid-Systems bestehen jeweils aus einer dieser Domänen fusioniert mit einem Protein (Hybridprotein 1 und 2). Durch den dritten Bestandteil, der Hybrid-RNA, kann im Falle einer Interaktion dieser mit den beiden Hybridproteinen die Funktion des Transkriptionsfaktors wiederhergestellt werden. Dies zeigt sich dann durch die Expression von Reportergenen (s. „Material und Methoden“ Abb. 4).

Eine cDNA-Bank, generiert aus HeLa Zellen, wurde unter Verwendung des Hefe 3-Hybrid-Systems nach Interaktionspartnern von NF1-PBR1 und PBR5 gescreent. Alle benötigten Komponenten waren im RNA-Protein Hybrid Hunter KitTM enthalten oder konnten über die Firma Invitrogen bezogen werden. Dieser Kit enthielt außerdem als Positivkontrolle die bekannten Interaktionspartner des Eisenstoffwechsels, das „iron

responsive element“ (IRE), welches in der mRNA des Transferrin-Rezeptors bzw. der Ferritin-mRNA zu finden ist und das „iron regulatory protein 1 (IRP), deren Interaktion bei der Regulation des Eisengehalts einer Zelle von essentieller Bedeutung ist. In Abbildung 15 sind die verschiedenen Plasmide dargestellt. Sämtliche, für Hybridprotein 2 kodierenden Konstrukte (Abb. 15 B) waren entweder im Kit enthalten ((pYESTrp2 und pYESTrp2/IRP (Positivkontrolle) oder Plasmide der zu untersuchenden cDNA-Bank (pYESTrp2/X). Für die Klonierung der Hybrid-RNA Konstrukte (Abb. 15 A) wurden die beiden Plasmide pRH5' und pRH3' mit *Sma* I geschnitten und die zu testenden NF1-3'UTR Fragmente inkloniert. Durch Ausbildung von Sekundärstrukturen der resultierenden Hybrid-RNAs könnte die zur Interaktion mit Proteinen nötige Bindestelle nicht zugänglich sein. Dieses Risiko sollte durch Einsatz beider Plasmid-Varianten minimiert werden. Die Vektoren unterscheiden sich lediglich in der Lage der MS2-Sequenz relativ zur Schnittstelle. Die zu untersuchenden 3'UTR Fragmente waren NF1-PBR1 und 5, die jeweils in sense (s) und antisense (as) Orientierung inseriert wurden. Letztere diente als Kontrolle, ebenso wie die Konstrukte mit FRg, einem Fragment der NF1-3'UTR ohne Proteinbindende Kapazität.

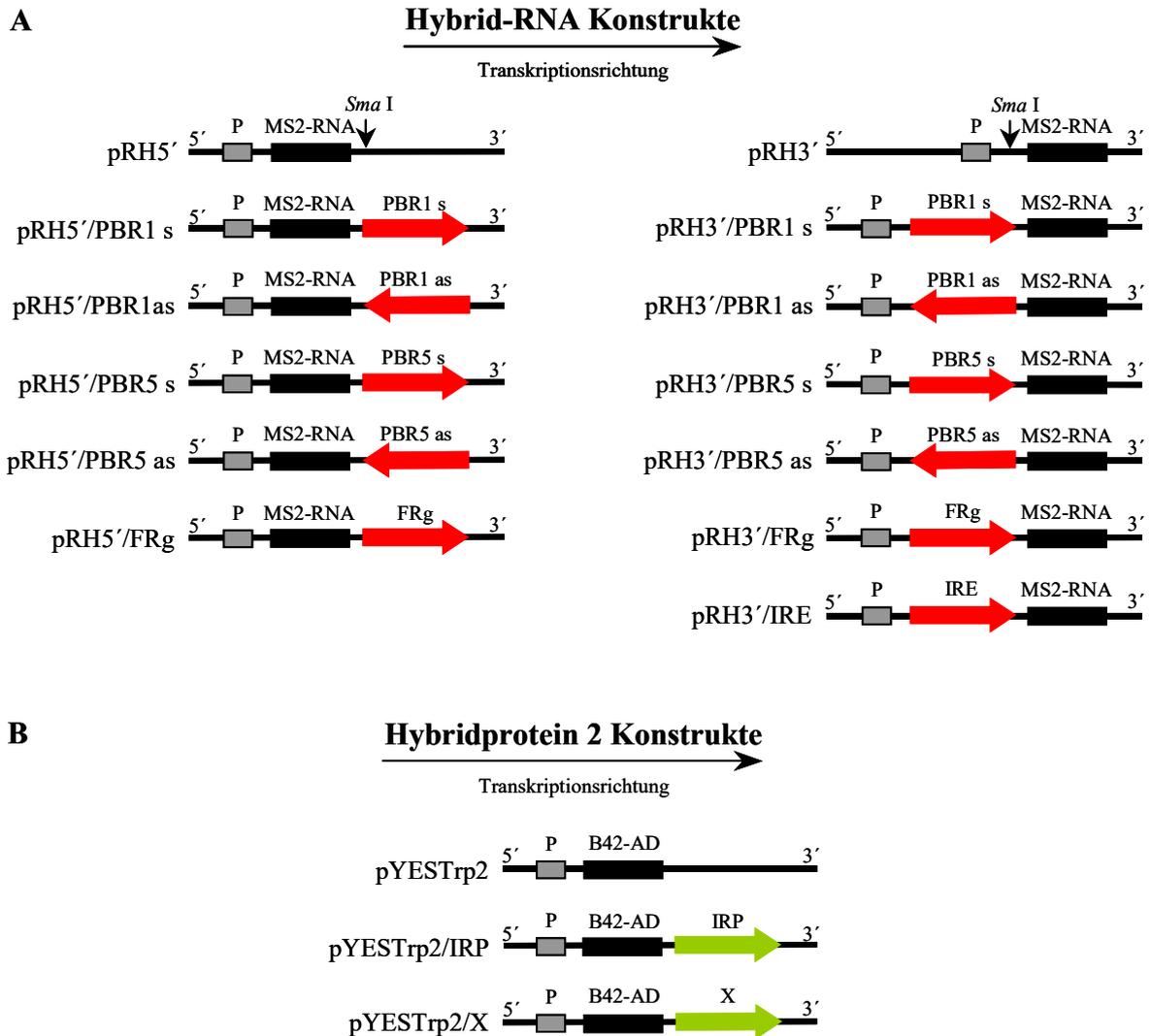


Abb. 15: Schematisch Darstellung der Hybrid-RNA Konstrukte (A) und der für Hybridprotein 2 kodierenden Plasmide (B) eingesetzt im Hefe 3-Hybrid-System. Transkriptionsrichtung ist durch Pfeile angegeben, Promotor ist durch P gekennzeichnet. Zuerst sind jeweils die Ausgangsvektoren (pRH5', pRH3' bzw. pYESTrp2) gezeigt. Im Fall der Hybrid-RNA Konstrukte ist die konstante MS2-RNA als schwarze Box dargestellt und die verschiedenen 3'UTR Fragmente rot, wobei die Orientierung variiert (s: sense, as: antisense). Die Hybridprotein 2 Genkonstrukte enthalten als konstanten Anteil das Gen für die B42-Aktivierungsdomäne (B42-AD) und variable Anteile (grün), z.B. verschiedene cDNAs (X, cDNA-Bank).

Vorversuche

In den Hefestamm *L40uraMS2*, der das Fusionsprotein aus DNA-BD und MS2-Bindeprotein konstitutiv exprimiert, wurden Plasmide transformiert, welche die zu testende RNA (Auxotrophiemarker: *ura3*) und das Hybridprotein 2 (Hefemarker: *trp1*) kodierten. Durch Wachstum auf Selektionsmedium $SD^{-Ura, -Trp}$ konnten die Hefen identifiziert werden, welche beide Plasmide trugen. Zusätzliches Wachstum der Klone auf $SD^{-Ura, -Trp, -His}$ sollte nur im Fall einer Interaktion zwischen den zu testenden

Komponenten möglich sein, da die Expression der Reportergene *his3* und *lacZ* nur im Fall einer Protein/RNA-Interaktion erfolgen kann. Der Nachweis der β -Galaktosidase, dem Genprodukt des *lacZ*-Gens, erfolgte durch einen Kolonie-Filter Assay, wobei durch die Enzymaktivität die farblose Substanz X-Gal in einen blauen Farbstoff umgesetzt wird. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse dieser Vorversuche mit verschiedenen Plasmidkombinationen, transformiert in den Hefestamm L40uraMS2, dargestellt.

Tab. 4: Ergebnisse der Expression beider Reportergene *his3* und *lacZ* bei verschiedenen Plasmidkombinationen im Hefe 3-Hybrid-System. „+“ bedeutet Expression des Reportergens, keine Expression ist durch „-“ gekennzeichnet. Die eingesetzten Plasmide sind in Abb. 15 dargestellt.

Plasmidkombination (RNA-Plasmid + HP2-Plasmid)	Histidin-SyntheseWachstum auf SD ^{-Ura, -Trp, -His}	β-Galaktosidase-Expression (Blaufärbung)
pRH3'/IRE + pYESTrp2/IRP	+	+
pRH5' + pYESTrp2/IRP	+	-
pRH5'/PBR1 s + pYESTrp2	-	-
pRH5'/PBR1 as + pYESTrp2	-	-
PRH5'/PBR1 s + pYESTrp2/IRP	+	-
pRH5'/PBR5 s + pYESTrp2	-	-
pRH5'/PBR5 as + pYESTrp2	-	-
pRH5'/PBR5 s + pYESTrp2/IRP	+	-
pRH3'/PBR5 s + pYESTrp2	-	-
pRH3'/PBR5 as + pYESTrp2	-	-
pRH3'/PBR5 s + pYESTrp2/IRP	+	-
pRH5'/FRg + pYESTrp2	-	-
PRH3'/FRg + pYESTrp2	-	-

Lediglich nach Transformation der Plasmidkombination pRH3'/IRE + pYESTrp2/IRP in den Hefestamm L40uraMS2 war die Expression beider Reportergene nachzuweisen. Dies war zu erwarten, da es sich um bekannte Interaktionspartner (Positivkontrolle) handelte. Bei allen anderen Plasmidkombinationen sollte keine Protein/RNA-Interaktion möglich sein und die Transkription der Reportergene unterbleiben. Jedoch konnte immer dann die Expression des Reportergens *his3* durch Wachstum auf Selektionsmedium nachgewiesen werden, wenn die Hefen sowohl ein für die RNA als auch das für Hybridprotein 2

kodierende Plasmid (pYESTrp2/IRP) enthielten. Diese Histidin-Expression könnte durch unspezifische RNA-Bindung des „iron regulatory protein 1“ (IRP) verursacht worden sein. Allerdings hätte dies auch die Aktivierung des zweiten Reportergens *lacZ* zur Folge haben müssen, was aber nicht beobachtet werden konnte (Tab. 4). Es ist aber bekannt, dass der verwendete Hefestamm nach Transformation mit jeweils einem für RNA- und HP2-kodierenden Plasmid eine basale Histidin-Expression zeigen kann, die aber durch Zugabe von 3-Amino-1,2,4-Triazol (3-AT) zu unterdrücken ist. Besonders wichtig ist dies dann, wenn eine cDNA-Fusionsbank nach möglichen Interaktionspartnern gescreent wird, da sonst viele, falsch positive Klone auf Histidin-defizientem Selektionsmedium nach der Transformation mit HP2-Plasmid wachsen könnten.

Ausgehend vom Hefestamm L40*ura*MS2 mit dem Plasmid pRH5'/PBR1 s, im Folgenden L40/5'PBR1 s genannt, sowie Hefen mit den Plasmiden pRH5'/PBR5 s (L40/5'PBR5 s) oder pRH3'/PBR5 s (L40/3'PBR5 s) wurde die optimale 3-AT Konzentration ermittelt. Nachdem das Plasmid pYESTrp2/IRP in die oben genannten Hefen transformiert worden war, wurde das Wachstum der Transformanten auf SD-Agar^{-Ura, -Trp, -His, +3-AT}, mit verschiedenen 3-AT-Konzentrationen (0-10 mM 3-AT) überprüft. Die optimale Konzentration war die diejenige, bei der durch das zugesetzte 3-AT die basale Histidin-Synthese unterblieb und keine Klone mehr wachsen konnten. Für den Hefestamm L40/5'PBR1 s erweisen sich 3 mM 3-AT als optimal, bei L40/5'PBR5 s und L40/3'PBR5 s war bereits bei 2,5 mM bzw. 1 mM keine basale Histidin-Expression mehr nachweisbar. Diese 3-AT-Konzentrationen wurden für das Screening einer cDNA-Bank (Abb. 16) für jeden Stamm individuell eingesetzt.

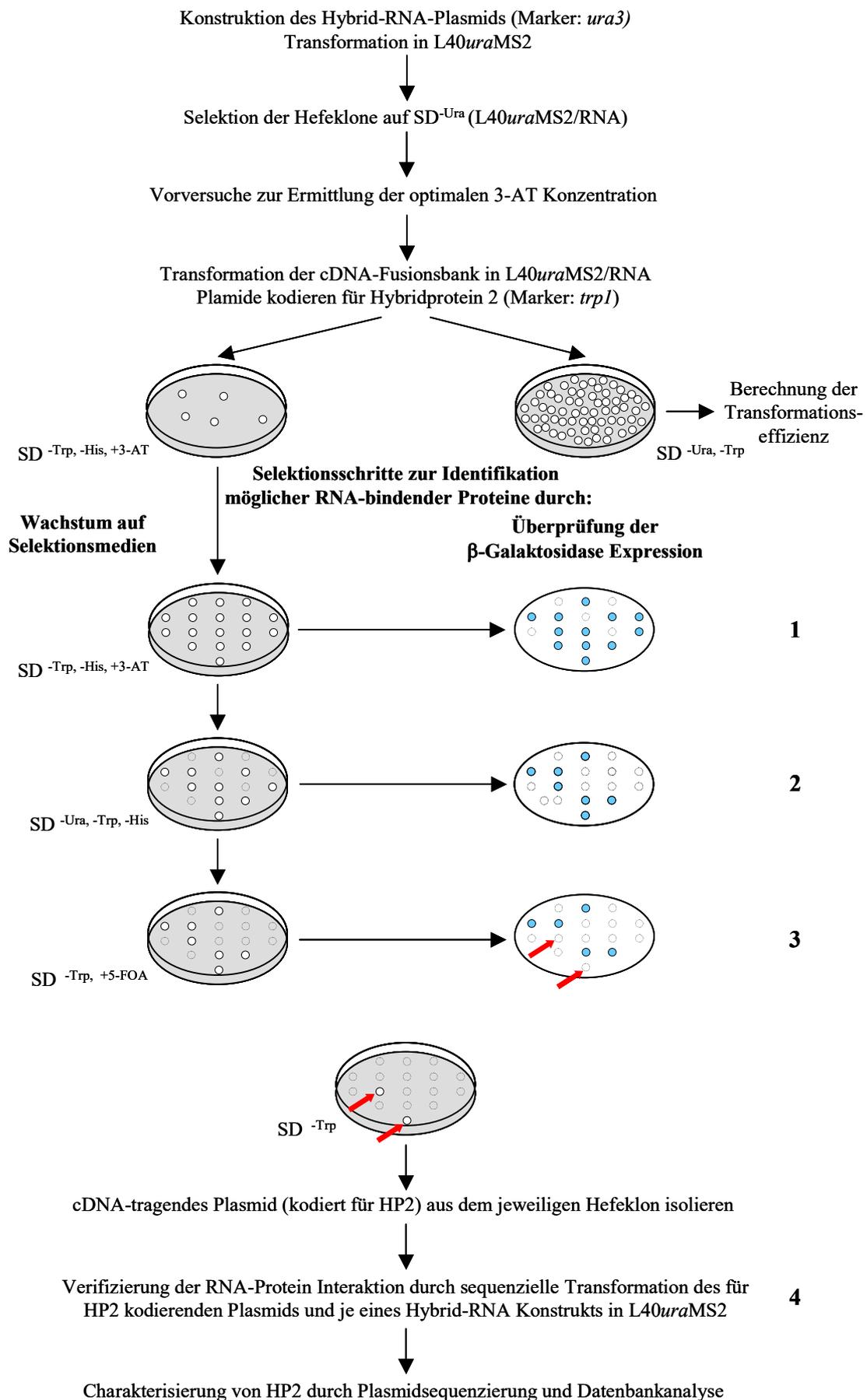


Abb. 16: Vorgehen beim Screenen einer cDNA-Fusionsbank nach RNA-bindenden Proteinen mittels des Hefe 3-Hybrid-Systems. Rote Pfeile markieren positive Klone, deren Protein/RNA-Interaktion noch verifiziert werden muss.

Screening einer cDNA-Bank

In diesem Versuch wurden verschiedene RNA-Plasmid tragende Hefestämme mit Plasmiden der HeLa cDNA-Bank, welche für Hybridprotein 2 kodierten, transformiert. In Abbildung 16 sind die Vorversuche sowie alle durchgeführten Selektionsschritte in einem allgemeinen Schema dargestellt.

Nach Transformation der cDNA-Fusionsbank in L40/5'PBR1 s, L40/5'PBR5 s oder L40/3'PBR5 wurde der Ansatz auf SD-Agar^{-Trp, -His, +3-AT} und ein Aliquot auf SD-Agar^{-Ura, -Trp} ausplattiert. Aus der Anzahl der Kolonien auf letzterem Medium konnte die Transformationseffizienz errechnet werden, da nur die Klone wachsen konnten, die ein für HP2 kodierendes Plasmid aufgenommen hatten. Für alle drei Transformationsansätze ergab sich eine Effizienz von etwa 10^5 Klone pro μg eingesetzter Plasmid-DNA (cDNA-Bank). Da pro Transformation 750 μg Plasmid-DNA eingesetzt wurden, erwartet man etwa $7,5 \times 10^6$ Klone, die sowohl RNA- als auch HP2-Plasmid trugen. Auf den SD^{-Trp, -His, +3-AT}-Platten wuchsen deutlich weniger Kolonien, da in diesem ersten Selektionsschritt nicht nur auf die Anwesenheit des HP2-Plasmids, sondern auch auf die Aktivierung des Reportergens *his3* selektiert wurde. Dies ist in Abbildung 16 Ziffer 1 schematisch dargestellt. Es wurden solche Klone, die auf SD^{-Trp, -His, +3-AT}-Platten wuchsen und im Kolonie-Filter Assay Blaufärbung (Aktivierung des 2. Reportergens *lacZ*) zeigten, einem weiteren Selektionsschritt unterzogen. Im Fall des Ausgangs-Stamms L40/5'PBR1 s waren dies 347 Klone, bei L40/5'PBR5 s 312 und bei L40/3'PBR5 s waren 297 Kolonien positiv. Der zweite Selektionsschritt diente dazu, solche Klone zu eliminieren, die trotz aktivierter Reportergene kein RNA-Plasmid mehr trugen. Dafür wurden die bisher positiven Klone auf SD^{Ura, -Trp, -His} Minimalmedien umplattiert, ihr Wachstum überprüft und die β -Galaktosidase Expression analysiert (Abb. 16 Ziffer 2). Für weitere Untersuchungen kamen nur solche Klone in Frage, die sowohl Wachstum als auch eine Blaufärbung im entsprechenden Test aufwiesen. Bei Ausgangs-Stamm L40/5'PBR1 s zeigten 84 der ursprünglichen 347 Klone dies, bei L40/5'PBR5 s 33 und bei L40/3'PBR5 s waren 39 Kolonien positiv. Diese Klone wurden einem dritten Selektionsschritt unterzogen, bei dem solche Klone identifiziert und aussortiert wurden, die das Reportergen *lacZ* unabhängig

von einer RNA-Protein Interaktion aktivieren konnten. Dafür wurden die zu testenden Hefeklone auf dem Selektionsmedium $SD^{-Trp, +5-FOA}$ kultiviert und anschließend auf ihre β -Galaktosidase Aktivität überprüft (Abb. 16 Ziffer 3). Auf diesem Medium wuchsen nur Hefen, die das RNA-Plasmid (Auxotrophiemarker: *ura3*) verloren hatten, da die 5-Fluoroorotic Säure (5-FOA) toxisch für *ura3*-exprimierende Zellen ist. Im folgenden Kolonie-Filter Assay sollten sich die Klone, die ihr Reportergen über die Interaktion zwischen PBR1 bzw. 5 RNA (Hybrid-RNA) und dem variablen Anteil von Hybridprotein 2 (Protein X, kodiert von cDNA) aktivieren konnten, weiß bleiben, da die Hybrid-RNA Komponente fehlte. In Abbildung 16 Ziffer 3 sind exemplarisch zwei solcher Klone mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Im Rahmen dieses Screening-Experiments blieben von den Transformanten mit Ausgangs-Stamm L40/5'PBR1 s 10 Kolonien weiß, bei L40/5'PBR5 s waren es 5 und bei L40/3'PBR5 s 3 Klone. Diese insgesamt 18 Klone trugen ein Plasmid, das für ein Hybridprotein 2 kodiert, dessen variabler Protein-Anteil RNA-bindende Fähigkeit hat. Allerdings musste die Spezifität der Interaktion mit NF1-PBR1 bzw. 5 noch durch einen vierten Selektionsschritt gezeigt werden (Abb. 16 Ziffer 4). Nach Isolierung des HP2-Plasmids aus der Hefe erfolgte die sequenzielle Transformation dieses Plasmids und je eines der Hybrid-RNA Konstrukte (Abb. 15 A) in L40*ura*MS2. In Abbildung 17 ist exemplarisch das Ergebnis dieses Selektionsschritts gezeigt. Die Expression beider Reportergene *his3* und *lacZ* in den Transformanten wurde durch Wachstum auf Selektionsmedium $SD^{Ura, -Trp, -His}$ (Abb. 17 A) und mittels Kolonie-Filter Assay (Abb. 17 B) getestet. Sowohl Wachstum auf Selektionsmedium als auch Blaufärbung der Hefen ist in jedem Fall zu beobachten, unabhängig davon, welches Hybrid-RNA Konstrukt transformiert worden war. Es zeigte sich bei allen 18 HP2-Plasmiden, dass nicht ausschließlich die Bindung des variablen Teils von Hybridprotein 2 an NF1-PBR1 bzw. 5 die Expression der Reportergene aktivieren konnte, sondern auch die Interaktion von HP2 mit verschiedenen RNAs oder den Klonierungsvektoren pRH3' bzw. pRH5'.

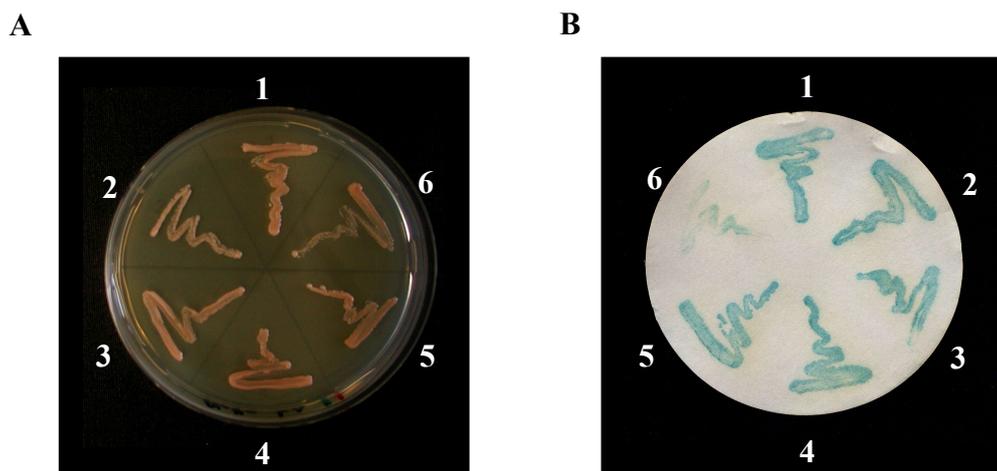


Abb. 17: Überprüfung der Reporter-Expression im Hefe 3-Hybrid-System mittels Wachstum auf Selektionsmedium $SD^{-Ura, -Trp, -His}$ (A) und Kolonie-Filter Assay (B). Dabei tragen die Hefen neben einem Hybridprotein 2 Konstrukt (aus der cDNA-Bank) folgende Hybrid-RNA Konstrukte: pRHH3'/PBR5 s (Abschnitt 1), pRHH3'/PBR5 as (2), pRHH3'/PBR1 s (3), pRHH3'/FRg s (4), pRHH3' (5). Auf Abschnitt 6 ist die Positivkontrolle aufgetragen (Plasmide pRHH3'/IRE + pYESTrp2/IRP).

Diese Ergebnisse zeigen, dass alle mittels des Hefe 3-Hybrid-Systems identifizierten Proteine nicht nur mit Protein-Binderegion 1 oder 5 der NF1-3'UTR spezifisch interagieren können, sondern generell RNA-bindende Fähigkeit besitzen.

Aufgrund dieser Ergebnisse musste eine Alternative zum Hefe 3-Hybrid-System gefunden werden, um die an PBR1 bzw. 5 bindenden Proteine zu identifizieren. Dabei wäre eine Methode wünschenswert, die einerseits weniger Selektionsschritte benötigt und damit schneller zu einem Ergebnis führt und andererseits spezifische Interaktionspartner liefert. Zu diesem Zeitpunkt wurden vom „Resource Center German Human Genome Project“ (RZPD, Berlin) neu entwickelte Proteinfiler angeboten. Deshalb war das Ziel, ein System mit Hilfe dieser Filter zu etablieren um die RNA-bindenden Proteine der NF1-3'UTR zu identifizieren.

3.2.3.2 Identifikation der Interaktionspartner über filtergebundene Proteine

Im Rahmen dieser Arbeit konnte dieses neue Verfahren zur Identifikation RNA-bindender Proteine entwickelt und angewendet werden. Die Methode basiert auf der Hybridisierung filtergebundener Proteine mit radioaktiv-markierter RNA (s. 2.2.10). Die verwendeten Proteinfiler wurden vom RZPD bezogen. Auf einem Set dieser Filter (2 Stück) sind

37.200 cDNA Klone repräsentiert, generiert von RNA aus humanem, fötalem Hirn. Die Bakterienklone wuchsen auf den PVDF-Membranen und die Expression der humanen Proteine wurde vor Lyse der Bakterien induziert (Büssow et al., 1998).

Diese Proteinfiler wurden mit radioaktiv-markierter RNA der Protein-Binderegionen NF1-PBR1 bzw. 5 inkubiert. Nach mehreren Waschschritten und Inkubation mit RNase T1, um ungebundene RNA zu entfernen, konnten mögliche Protein/RNA-Komplexe mittels Autoradiographie sichtbar gemacht werden. In Abbildung 18 sind beispielhaft zwei Autoradiogramme identischer Filter nach Inkubation mit radioaktiv-markierter RNA gezeigt. Die zur Hybridisierung eingesetzte RNA war NF1-PBR1 (Abb. 18 A) bzw. NF1-PBR5 (B). Die Hybridisierungssignale der cDNA-Klone, deren Inserts weiter analysiert wurden, sind rot markiert. Diese Klone konnten, berechnet über ihre Koordinaten auf den Filtern, eindeutig identifiziert und über das RZPD (Berlin) bezogen werden.

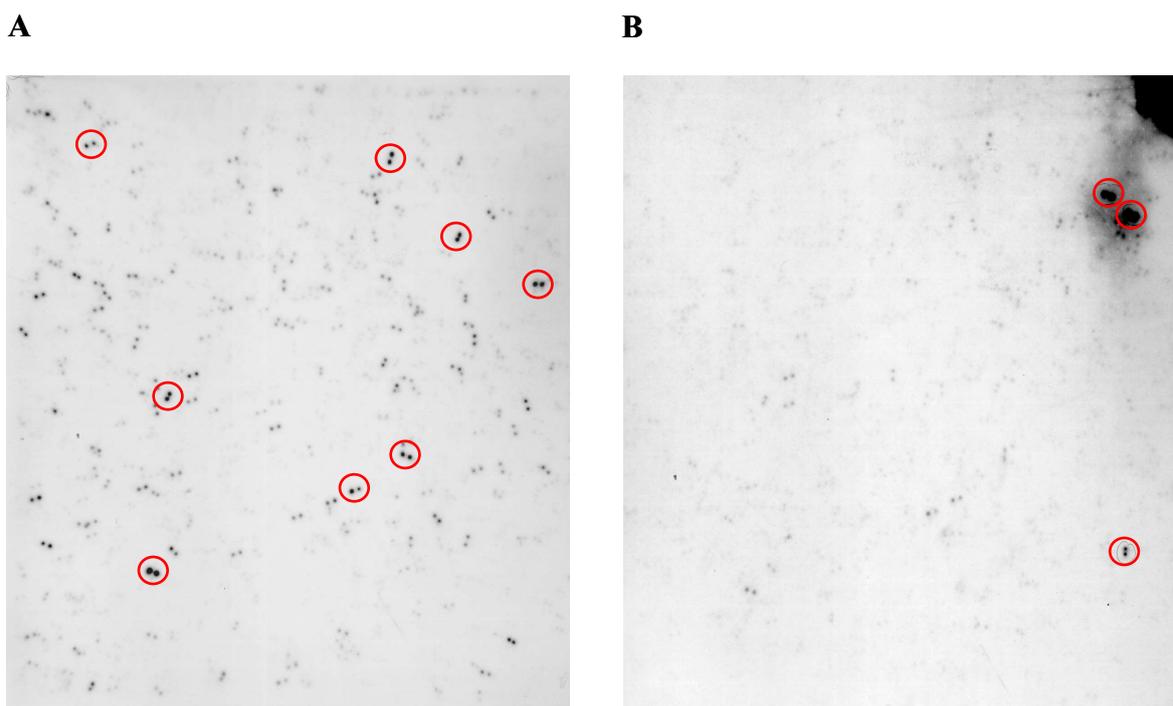


Abb. 18: Autoradiogramme identischer Proteinfiler nach Inkubation mit radioaktiv-markierter RNA von NF1-PBR1 (A) oder PBR5 (B).

Für weitere Untersuchungen kamen nur solche cDNA-Klone in Frage, die entweder ausschließlich mit einer der beiden Protein-Binderegionen ein Hybridisierungssignal zeigten oder deren Interaktion mit einer Binderegion ein deutlich stärkeres Signal lieferte. Durch diese Einschränkung sollten spezifische Interaktionspartner von NF1-PBR1 oder 5

gefunden werden und Proteine mit unspezifischer RNA-Bindekapazität nicht berücksichtigt werden. Zur Verifizierung wurden die 18 vom RZPD bezogenen Klone auf PVDF-Membranen angeimpft und die Expression der rekombinanten Proteine induziert. Die Inkubation mit *in vitro*-transkribierter, radioaktiv-markierter RNA von PBR1 bzw. 5 erfolgte analog zur ersten Hybridisierung. Die Ergebnisse beider Hybridisierungen sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Außerdem wurden die cDNA-Inserts der weiter untersuchten Klone ansequenziert, um mögliche Homologien zu bekannten Proteinen zu zeigen. Auch diese Ergebnisse sind in Tabelle 5 dargestellt. Insgesamt exprimierten fünf cDNA-Klone ein rekombinantes, humanes Protein das ausschließlich mit NF1-PBR1 (MPMGp800M05586Q102, MPMGp800A05512Q102, MPMGp800D15597Q102) oder PBR5 (MPMGp800F06548Q102, MPMGp800M6537 Q102) interagiert. Im Folgenden werden für die Bezeichnung der Klone nur die unterstrichenen Anteile der ID-Nummern verwendet. Die Klone exprimieren Proteine, die Homologie zu vier unterschiedlichen Proteinen zeigen (in Tab. 5 durch Fett- bzw. Kursivdruck hervorgehoben). Der Klon A05512 zeigt Homologie zu einem Nukleotid-bindenden Protein, wurde aber für weitergehende Analysen nicht verwendet, da auch Klon K13590 homolog zum gleichen Protein ist, das allerdings nicht spezifisch nur mit PBR1 interagiert. Datenbankanalysen ergaben für Klon D15597 Ähnlichkeit zu einem Protein mit Zinkfinger-Domäne, die RNA-bindende Eigenschaften besitzen könnte. Da aber keine weiteren Informationen zu diesem Protein vorlagen, wurden in weiteren Analysen nur die drei Klone einbezogen, die für Proteine mit bekannter RNA-Bindefähigkeit kodierten (in Tabelle 5 fett dargestellt). Bei diesen handelt es sich um ein Protein mit Homologie zu dem hnRNP A1 (Klon M05586), ein Interaktionspartner von NF1-PBR1. Weitere PCR- und Sequenz-Analysen ergaben, dass die inserierte cDNA um 366 nt kürzer war als erwartet und damit das exprimierte, zu hnRNP A1 homologe Protein um 122 AS am N-Terminus trunziert sein müsste. NF1-PBR5 zeigte ein positives Hybridisierungssignal mit zwei Klonen (F06548, M6537), die beide Homologie zu NFAR aufweisen. Von diesem Protein sind zwei Varianten bekannt, NFAR-1 und NFAR-2. PCR-Analysen zeigten, dass die inserierte cDNA für NFAR-2 kodiert, allerdings ist diese auch in diesem Fall nicht vollständig. Da am 3'-Ende 1.320 nt fehlten, sollte folglich das zu NFAR-2 homologe Protein am N-Terminus um 430 AS verkürzt sein.

Tab. 5: Zusammenfassung der Hybridisierungsergebnisse, wobei „++“ für eine starke RNA/Protein-Interaktion steht, „+“ bedeutet eine schwache, aber noch nachweisbare Interaktion und „-“ heißt, dass keine RNA/Protein-Komplexbildung stattfand. Als Klon-Bezeichnungen dienen die ID-Nummer des RZPD.

<i>Klon</i> (RZPD Klon ID- Nummer)	<i>Hybridisierung der Proteinfiler</i> Interaktion mit		<i>2. Hybridisierung</i> Interaktion mit		<i>Homologie zu</i> (GenBank Accession Nummer)
	<i>PBR1</i>	<i>PBR5</i>	<i>PBR1</i>	<i>PBR5</i>	
MPMGp800 M05586Q102	++	-	++	-	hnRNP A1 (AAH09600)
MPMGp800 K09596Q102	++	++	++	+	zinc finger protein ZNF 229 (AAF07969)
MPMGp800 K13590Q102	++	+	+	-	putative nucleotide binding protein (AF118394)
<i>MPMGp800 A05512Q102</i>	++	-	+	-	<i>nucleotide binding protein 2</i> (NM_12225 bzw. AF118394)
<i>MPMGp800 D15597Q102</i>	++	-	+	-	<i>hypothetical protein with zinc finger</i> (XM_016902)
MPMGp800 K09596Q102	++	+	+	+	Homo sapiens chr. 19 cosmid R32516 (AF025422)
MPMGp800 J13563Q102	++	-	+	+	Y box binding protein 1 (J03827)
MPMGp800 L19532Q102	++	+	++	+	6-phospho-gluconolactonase (AJ243972)
MPMGp800 K18518Q102	++	+	++	+	KIAA469 gene product (NM_014851)
MPMGp800 H12565Q102	++	+	+	+	CpG island upstream of MAPK12 (AL022328)
MPMGp800 E12566Q102	++	+	+	+	CpG island upstream of MAPK12 (AL022328)
MPMGp800 L13563Q102	++	+	++	+	6-phospho-gluconolactonase (AJ243972)

MPMGp800 A20546Q102	++	+	++	+	6-phospho-gluconolactonase (AJ243972)
MPMGp800 F06548Q102	-	++	-	++	nuclear factor associated with dsRNA (NFAR-2) (AF167570)
MPMGp800 M6537Q102	-	++	-	+	nuclear factor associated with dsRNA (NFAR-2) (AF167570)
MPMGp800 C03595Q102	-	++	++	+	Y box binding protein-1 (J03827)
MPMGp800 J08578Q102	-	++	++	++	Fas-associated protein (FADD) (NM003824)
MPMGp800 G08560Q102	+	++	++	++	CCAAT/enhancer binding protein (XM_009180)

Um diese Interaktionen durch Bandshift-Analysen zu verifizieren, mussten die rekombinanten Proteine in löslicher Form vorliegen. Eine Möglichkeit war die Isolierung und Aufreinigung aus Bakterienkulturen über Nickel-Affinitätschromatographie, da die rekombinanten Proteine einen Poly-Histidin-Schwanz trugen. Eine Aufreinigung war allerdings mit der für die Proteinfiler verwendeten Kombination von Vektor (pQE30NST, AF074376) und *E.coli* Expressionsstamm (SCS1, Stratagene) unter nativen Bedingungen nicht möglich.

Aufgrund dieser Tatsache wurden die cDNA-Inserts der Klone M05586, F06548 und M6537 in ein anderes bakterielles Expressions-System umkloniert. Als Klonierungsvektor diente pGEX-6P-1, der einen durch IPTG-induzierbaren *tac*-Promotor (*tac*-P.) hat unter dessen Kontrolle ein Teil des *Gluthation-S-Transferase* (*GST*) Gens steht, dessen Produkt zur Aufreinigung der Proteine verwendet werden kann. Diesem Abschnitt, der für den 26 kDa großen C-Terminus der GST kodiert, schließt sich die multiple Klonierungsstelle (MCS) an (Abb.19). Um später die korrekte Expression der Fusionsproteine aus GST und zu testendem Protein zu gewährleisten, ist eine Klonierung im Leseraster nötig. Hierzu wurde folgende Strategie gewählt, die in Abbildung 19 schematisch dargestellt ist: Nach Restriktionsverdau des Vektors mit *Not I* und *EcoR I* wurden die zu klonierenden DNA-Abschnitte über zwei PCR-Reaktionen amplifiziert, wobei als Template die Klone M05586, F06548 oder M6537 dienten. Dabei waren die

beiden Primerpaare jeweils so gewählt, dass jedes der ansonsten identischen PCR-Produkte an den 5'-Enden die Erkennungssequenzen für die entsprechenden Restriktionsenzyme *Not I* (grün) bzw. *EcoR I* (rot) als Überhang trug. Beide PCR-Produkte wurden gemischt und denaturiert. Nach Renaturierung lagen 25 % PCR-Hybride mit korrekten Erkennungssequenzen, d.h. *EcoR I* am 5'-Ende und *Not I* am 3'-Ende, vor. Diese wurden in den Vektor pGEX-6P-1 ligiert und die rekombinanten Plasmide in dem Expressionsstamm BL21 transformiert (Benennung: pGEX/Klon-Bezeichnung).

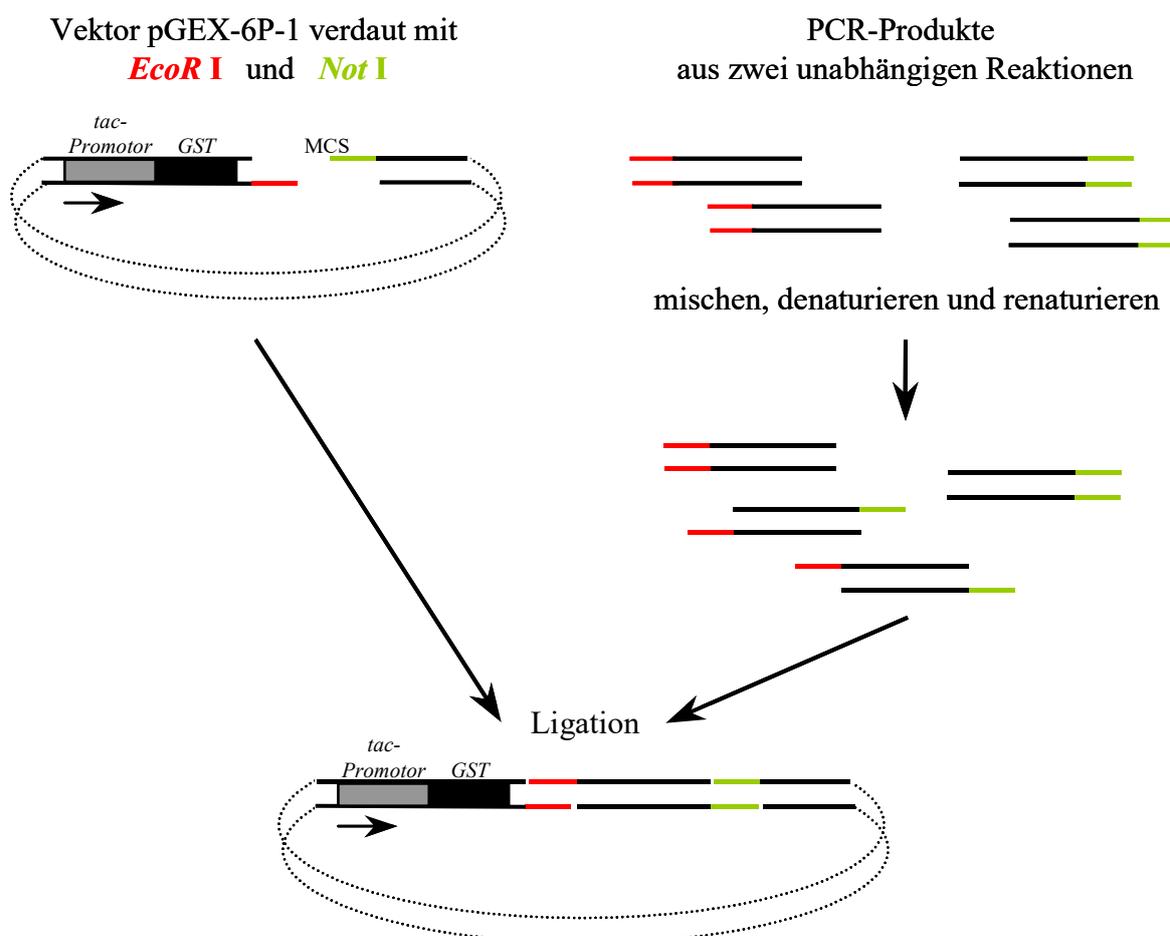


Abb. 19: Schematische Darstellung des Vektors pGEX-6P-1 (*GST*: Gluthation-S-Transferase, *MCS*: multiple Klonierungsstelle) sowie der Klonierungsstrategie, um die PCR-Produkte im Leseraster zu inserieren.

Die korrekte Insertion im Leseraster wurde durch Sequenzierung überprüft und die Größe des Inserts über „Pick-PCR“. Nach der Umklonierung des cDNA-Inserts von Klon F06548 ergaben sich stets deutlich verkürzte Produkte in der „Pick-PCR“, die Rekombinations-Ereignisse in den Bakterien vermuten lassen. Deshalb wurden diese Klone, die das Plasmid pGEX/F06548 enthielten, in weiteren Untersuchungen nicht mehr

betrachtet. Da das Genkonstrukt im Vektor pGEX-6P-1 unter der Kontrolle eines tac-Promotor stand, konnte die Expression der Fusionsproteine durch Zugabe von IPTG induziert werden. Nach Auftrennung eines Aliquots der Expressionskultur auf SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung des Gels war die Beurteilung der Induktion möglich.

Abbildung 20 zeigt ein Polyacrylamid-Gel nach Coomassie-Färbung, wobei Proben von nicht induzierten Bakterien-Kulturen als Referenz aufgetragen sind (Spuren 2, 4 und 6). Im Vergleich dazu sind zusätzliche Banden (Pfeile) in den Spuren 3, 5 und 7 zu erkennen, die jeweils die rekombinanten Proteine repräsentieren. Als Kontrolle diente der Vektor pGEX-6P-1, der nach Induktion lediglich den 26 kDa großen Teil der GST exprimiert. Die Klone pGEX/M6537 und pGEX/M05586 exprimieren GST-Fusionsproteine mit knapp 90 kDa (Spur 5) bzw. etwa 50 kDa (Spur 7) Molekulargewicht. Diese Molekulargewichte entsprechen für beide Fusionsproteine in etwa den erwarteten unter Berücksichtigung, dass nicht die gesamte cDNA der entsprechenden Proteine inseriert war (s. o.).

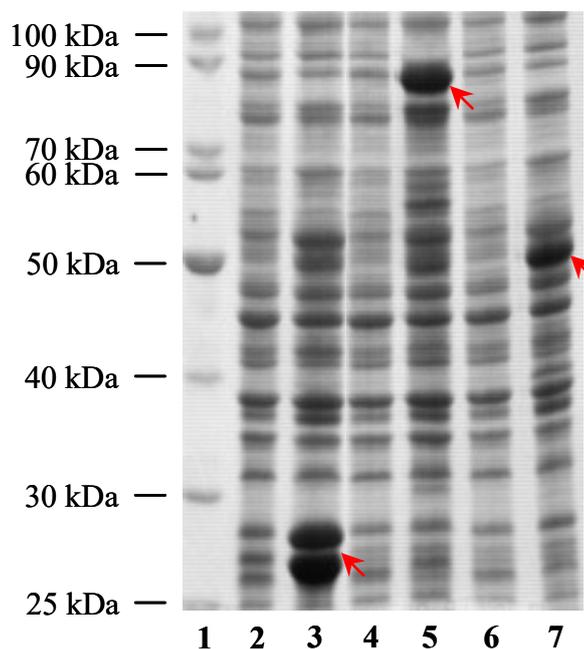


Abb. 20: Expressionskulturen aufgetragen auf SDS-PAGE und nach Coomassie-Färbung, wobei induzierte Bakterienkulturen in den Spuren 3 (Plasmid pGEX-6P-1), 5 (pGEX/M6537) und 7 (pGEX/M05586) aufgetragen sind. In den jeweils vorhergehenden Spuren (2, 4 und 6) ist ein Aliquot der entsprechenden nicht induzierten Kultur als Referenz aufgetragen. Spur 1: Molekulargewichtsmarker (peqGold Protein-Marker II).

Die rekombinanten Proteine lagen mit GST fusioniert vor, was die Aufreinigung mittels immobilisiertem Glutathion ermöglichte. Allerdings war die Ausbeute der Proteine GST/NFAR-2 und GST/hnRNP A1 sehr gering. Dies ist auf eine Aggregat-Bildung der in den Bakterien überexprimierten Proteine zurückzuführen. Die Bildung solcher „inclusion bodies“ kann durch Veränderung der Kulturbedingungen nach Induktion der Proteinexpression verringert werden. Im vorliegenden Fall war weder die Erniedrigung der Inkubations-Temperatur noch eine Verkürzung der Induktions-Zeit zielführend.

3.2.4 Einfluss auf die RNA-Stabilität durch Proteinbindung an die NF1-3'UTR

Mehrere Publikationen deuten auf eine Regulation des *NF1*-Gens auf posttranskriptioneller Ebene hin. Deshalb sollte besonders auf Modulation der mRNA- oder Proteinstabilität bei Untersuchungen zur posttranskriptionellen Regulation des *NF1*-Gens geachtet werden. Vor diesem Hintergrund stellten wir die Arbeitshypothese auf, dass die Stabilität der NF1-mRNA über Proteine reguliert wird, die mit den bekannten Binderegionen der NF1-3'UTR interagieren.

Zur Verifikation sind zwei unterschiedliche Versuchsansätze denkbar. Entweder kann durch gezielte Überexpression eines bekannten Proteins in geeigneten Zellen dessen möglicher Einfluss auf die Stabilität der NF1-mRNA analysiert werden. Oder es wird nicht gezielt ein bestimmtes Protein getestet, sondern die Wirkung unterschiedlicher NF1-3'UTR Fragmente auf die Stabilität einer Reporter-RNA. Dabei kann allerdings keine Aussage in Bezug auf die Identität der interagierenden Proteine gemacht werden.

3.2.4.1 Stabilitätsveränderungen einer Reporter-RNA durch verschiedene 3'-UTR Fragmente

Es wurden Reportergene mit verschiedenen 3'UTRs in HeLa-Zellen transfiziert und die Stabilität der mRNA mittels Northern-Blot analysiert. Der Expressionsvektor pRL-SV40 und die daraus generierten Vektoren sowie deren Konstruktion sind in Abbildung 21 schematisch dargestellt. Für den Testvektor (Abb. 21 B) wurde zunächst der pUC18 Polylinker in die *Xba I* Schnittstelle des Expressionsvektors pRL-SV40 inseriert. Damit war die Möglichkeit gegeben, verschiedene 3'UTR Fragmente (NF1-PBR1, 2, 3 oder 5) hinter das Reportergen Luciferase, aus *Renilla reniformis* (*Rluc*) zu klonieren. Als Kontrollen dienen die 3'UTRs der Gene *GM-CSF* und α -2 *globin* sowie FRg der NF1-3'UTR, ein Fragment das keine Protein-Bindfähigkeit hat. Die *GM-CSF* 3'UTR enthält

destabilisierende Elemente in *cis*, dagegen sollte die α -2 globin 3'UTR einen stabilisierenden Effekt haben. Um die Reporter-RNA (Luciferase) quantifizieren zu können, wurde ein Referenzplasmid cotransfiziert. Das Referenzplasmid enthielt anstelle des Gens für die Luciferase ein 550 bp langes Fragment aus der kodierenden Region des *NF1*-Gens, in Abbildung 21 C dargestellt. Einen Teilbereich des *NF1*-Gens als Referenz zu nutzen bot sich aus zwei Gründen an. Einerseits unterscheidet er sich deutlich in der Größe vom Reporter-gen Luciferase. Andererseits lässt sich im Northern-Blot mit der entsprechenden NF1-Sonde nicht nur die Referenzplasmid-RNA detektieren, sondern auch die endogene NF1-RNA. Dadurch könnten Unterschiede in der im Northern-Blot eingesetzten Gesamt-RNA Menge sichtbar gemacht werden.

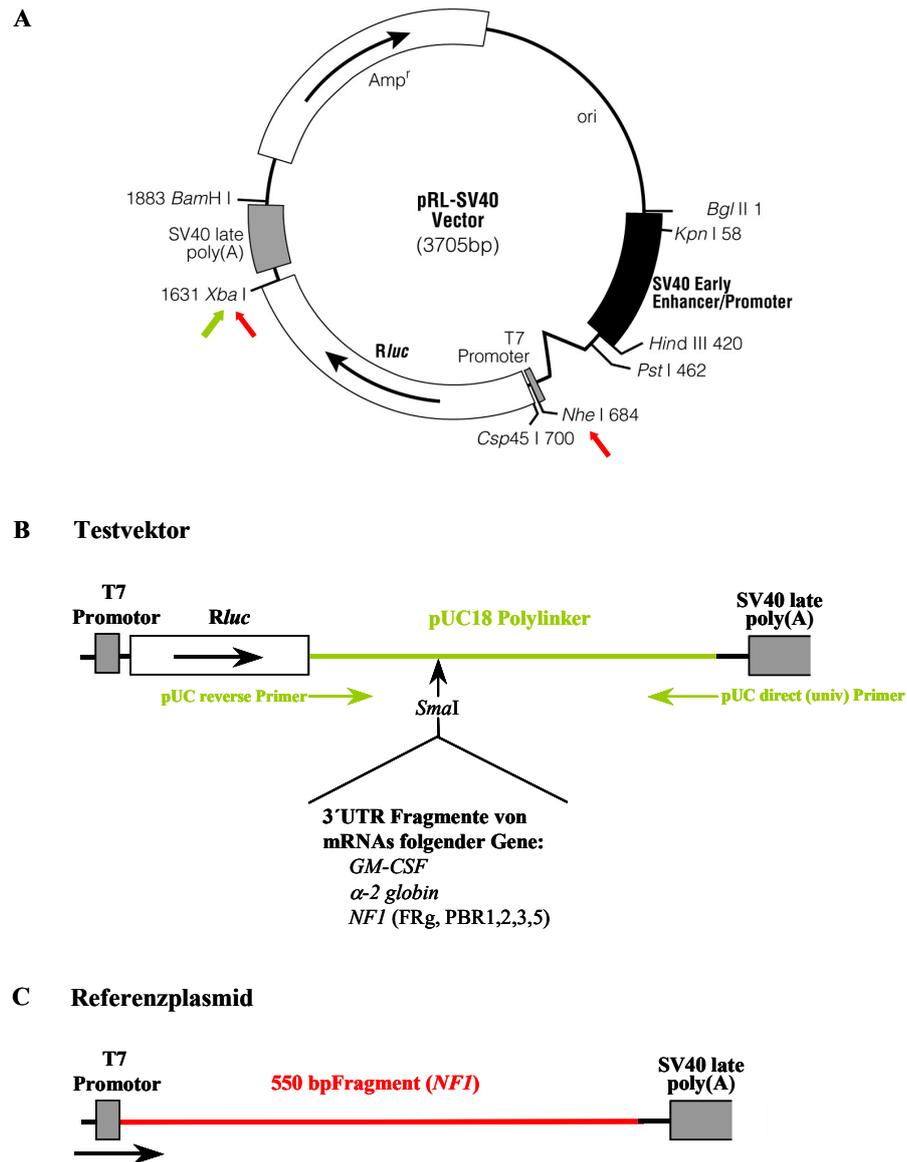


Abb.21: Schematische Darstellung der in Transfektions-Experimenten eingesetzten Plasmide.

Nach Cotransfektion des Referenzplasmids zusammen mit einem der Testvektor-Konstrukte in HeLa Zellen wurde nach 24 Stunden RNA isoliert und diese auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach Transfer der RNA auf eine Nylonmembran konnten die Transkripte durch Hybridisierung mit ^{32}P -markierten Sonden detektiert werden. Als Sonde diente zum Einen das 550 bp Fragment des *NFI*-Gens, welches mit der mRNA des Referenzplasmids hybridisiert, zum Anderen ein Teilbereich des Luciferase-Gens (detektiert die Luciferase-mRNA des Testvektors). Die Hybridisierungssignale wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

Abbildung 22 zeigt ein solches Autoradiogramm. Das untere Signal liefert die 550-Basen Sonde aus dem *NF1*-Gen und detektiert die RNA-Menge, die vom Referenzplasmid exprimiert wurde. Dieses Signal ist in allen Spuren etwa gleich stark, dient als Transfektions-Kontrolle. Die Intensität wird als Bezugsgröße für spätere Berechnungen genutzt. Die aus dem Luciferase-Gen gewonnene Sonde erkennt die RNA, die vom Testvektor exprimiert wurde (oberes Signal, Luciferase-mRNA). Da dieses Signal außer in Spur 2 in allen anderen mit etwa gleicher Intensität zu sehen ist (Abb. 22) und sich die verschiedenen Transfektionsansätze nur in den eingesetzten 3'UTR-Fragmenten im Testvektor unterscheiden, muss die Ursache für den Intensitätsunterschied dort liegen. Hier (Ansatz Spur 2) wirkt die 3'UTR des *GM-CSF*-Gens erwartungsgemäß destabilisierend auf die Luciferase-mRNA die nicht mehr über Northern-Blot Analysen nachzuweisen ist. Alle zu testenden 3'UTR-Fragmente - NF1-PBR1 (Spur 7), PBR2 (Spur 6) und PBR3 (Spur 5) und PBR5 (Spur 4) - zeigen keine stabilitätsverändernde Wirkung im Vergleich zu FRg, einem NF1-3'UTR Fragment ohne Proteinbinde-Fähigkeit (Spur 1). Die stabilisierende Wirkung der α -2 *globin*-3'UTR auf die Reporter-RNA, erkennbar durch ein verstärktes oberes Hybridisierungssignal in Spur 3 im Vergleich zu den anderen Spuren, lässt sich nicht darstellen.

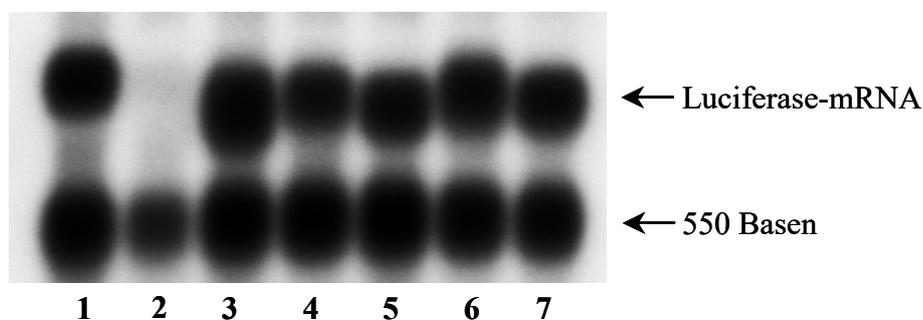


Abb. 22: Autoradiogramm nach Cotransfektion von HeLa-Zellen mit Referenzplasmid und verschiedenen Testvektor-Konstrukten und anschließender Northern-Blot Analyse. Folgende 3'UTRs bzw. Fragmente sind in den Testvektoren inseriert: FRg (Spur 1), *GM-CSF* (2), α -2 *globin* (3), NF1-PBR5 (4), PBR3 (5), PBR2 (6) und PBR1 (7).

Um nicht nur eine qualitative sondern auch eine quantitative Aussage zum Einfluss verschiedener 3'UTR-Fragmente auf die Stabilität der Reporter-RNA zu machen, erfolgte die Exposition der mit radioaktiv markierten Sonden hybridisierten Filter auf spezielle Platten. Die entsprechende Software (s. 2.2.15.4) zur Auswertung erlaubte, die Intensität dieser Hybridisierungssignale zu bestimmen, da keine Sättigung wie bei Verwendung von

Röntgenfilmen auftritt. Dafür wurde die Signalintensität, die die Luciferase-Sonde (detektiert RNA des Testvektors) lieferte, durch die der 500 Basen NF1-Sonde (RNA des Referenzplasmid) dividiert. Bei der Berechnung dieser Intensitäts-Verhältnisse und damit auch der RNA-Stabilität, wurden die Fläche der Signale sowie der Hintergrund in den einzelnen Spuren mit berücksichtigt. In Abbildung 23 sind die Werte für die einzelnen Transformationsansätze, errechnet aus drei unabhängigen Experimenten, sowie die jeweiligen Standardabweichungen graphisch dargestellt.

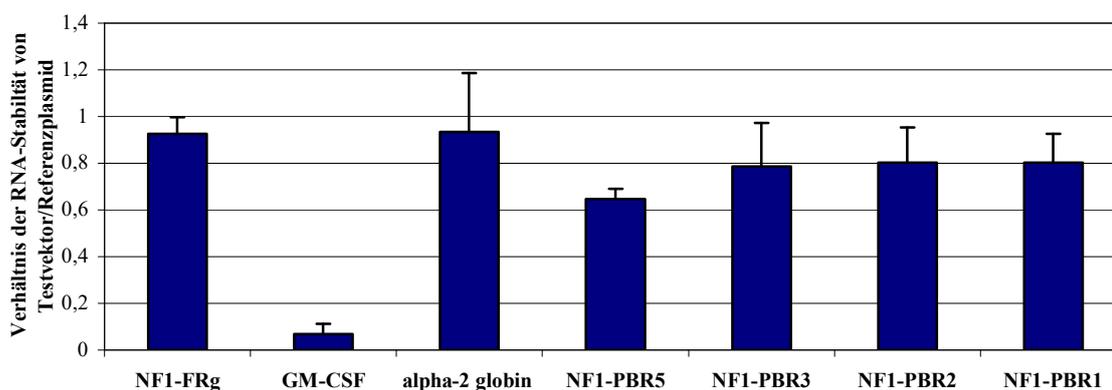


Abb. 23: Graphische Darstellung des Einflusses verschiedener 3'UTR Fragmente auf die Stabilität einer Reporter-RNA.

Deutlich zu erkennen ist auch in Abbildung 23, dass nur die 3'UTR des *GM-CSF* Gens destabilisierend auf die Luciferase-mRNA des Testvektors wirkt. Die Anwesenheit der NF1-3'UTR Fragmente PBR 1, 2, 3 oder 5 führen zu keiner signifikanten Stabilitätsveränderung der mRNA. Eine stabilisierende Wirkung einzelner 3'UTR Teilbereiche konnte auch nicht gezeigt werden. Allerdings kann sie nicht ausgeschlossen werden, da die Test-RNA mit *α-2 globin*-3'UTR auch keine größere Stabilität aufwies.

3.2.4.2 Der Einfluss von HuD auf die Stabilität der NF1-mRNA *in vivo*

Im Verlauf dieser Arbeit wurde im Rahmen zweier Diplomarbeiten zuerst das ubiquitär exprimierte Protein HuR (Häusler 1999) und später auch das Neuronen-spezifisch exprimierte Hu-Protein HuD (Bader 2000) als Interaktionspartner der NF1-PBR1 *in vitro* identifiziert. Da von Hu-Proteinen bekannt ist, dass sie über Bindung an AU-reiche Elemente, wie sie auch in der NF1-3'UTR vorkommen, die Stabilität der RNA beeinflussen können, sollte die Wirkung von HuD auf die NF1-mRNA *in vivo* untersucht werden. Hierfür wurde HuD-cDNA in den Expressionsvektor pcDNA3.1 sowohl in sense als auch antisense Orientierung inseriert. Die Expression erfolgte in HeLa-Zellen, da diese kein endogenes HuD-Protein besitzen. Die Expression der HuD-mRNA wurde mittels RT-PCR überprüft. Über Northern-Blot Analysen konnte dann auf RNA-Ebene der Einfluss des transient exprimierten HuD Proteins auf die Menge der endogenen NF1-mRNA untersucht werden. Abbildung 24 zeigt ein Autoradiogramm eines Northern-Blots nach Hybridisierung mit zwei Sonden. Durch Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde konnten Unterschiede in der geladenen RNA-Menge sichtbar gemacht werden, wobei hier die Hybridisierungssignale und damit die RNA-Mengen in allen Spuren gleich sind. Als zweite Sonde diente ein 550 bp NF1-Fragment, das die beiden Spleiß-Varianten der endogenen NF1-mRNA, 11 oder 13 kb lang, detektiert. Die Längenunterschiede sind auf ein alternatives Poly(A)-Signal in der 3'UTR zurückzuführen. In den Spuren 2 und 3 ist RNA aufgetragen, die 24 Stunden nach Transfektion mit den HuD-Konstrukten isoliert wurde, wobei die HuD cDNA entweder in sense (Spur2) oder antisense (Spur 3) Orientierung in den Expressionsvektor inseriert worden war. Die Orientierung in antisense Richtung dient ebenso als Kontrolle wie die RNA aus nicht-transfizierten HeLa-Zellen, aufgetragen in Spur 1. Es sind keine Unterschiede in den Intensitäten der Hybridisierungssignale in den einzelnen Spuren und damit auch in der Stabilität der NF1-mRNA zu erkennen. Um ausschließen zu können, dass die Zeit zwischen der Transfektion der HuD-Konstrukte und Isolierung der Gesamt-RNA zu kurz gewählt worden war, um Stabilitätsunterschiede detektieren zu können, erfolgte die RNA-Isolierung in einem weiteren Experiment erst nach 48 Stunden. Die Ergebnisse sind in Abbildung 24 Spuren 4-6 dargestellt. Aber auch hier sind keine Unterschiede in den Intensitäten der Hybridisierungssignale zu erkennen.

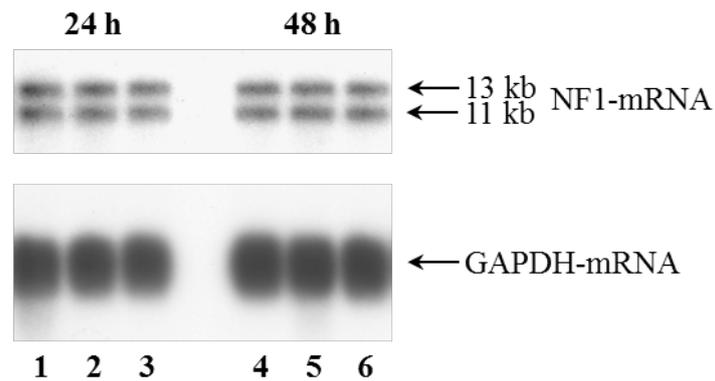


Abb.24: Autoradiogramm eines Northern-Blots von RNA aus HeLa Zellen (Spur 1 und 4) sowie Zellen nach Transfektion mit Expressionsvektoren, die die HuD cDNA entweder in sense (Spuren 2 und 5) oder antisense (3 und 6) Orientierung enthielten. Die RNA Isolierung erfolgte nach 24 (Spuren 1-3) oder 48 Stunden (Spuren 4-6).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass durch diese *in vivo* Experimente kein Einfluss des HuD Proteins auf die Stabilität der NF1-mRNA gezeigt werden konnte. Allerdings lässt sich nicht ausschließen, dass HuD in HeLa Zellen instabil ist und deshalb nicht mit der NF1-3'UTR interagieren kann.

4. DISKUSSION

Zahlreiche Beispiele zeigen, dass 3'UTRs wichtige Funktionen bei der posttranskriptionellen Genregulation zukommen. Die Mechanismen reichen dabei von der Beeinflussung der Stabilität, über die prinzipielle Translatierbarkeit und die Translationseffizienz bis hin zum Transport und der Lokalisation der mRNA innerhalb der Zelle. Diese Vorgänge können über die Interaktion von RNA-Sequenzen, sogenannte *cis*-Elemente, mit *trans*-wirkenden Proteinen gesteuert werden. Erste Hinweise für einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus des *NF1*-Gens fanden unter anderem Grieser und Kollegen in unserer Abteilung (Grieser et al. 1997). Nach Stimulation mit Phorbol-Myristat-Acetat stieg in Melanocyten der Neurofibromingehalt auf das 3- bis 4-fache an, ohne dass Veränderungen in der mRNA Menge nachgewiesen werden konnten. In einer anderen Untersuchung stieg der Neurofibromin-Gehalt in mechanisch verletzten Keratinozyten in nur 0,5 bis 2 Stunden an (Korkiamäki et al. 1999). Unter Berücksichtigung der Größe des *NF1*-Gens ist dies nur durch einen posttranskriptionellen Regulationsmechanismus erklärbar.

Die 3'UTR der Neurofibromin mRNA zeichnet sich nicht nur durch ihre Länge (3,5 kb) sondern auch durch die 75 %ige Homologie zwischen Maus und Mensch aus. Damit lag die Vermutung nahe, dass dieser Region eine wichtige Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation des *NF1*-Gens zukommen muss. Hierbei wären entweder eine Beeinflussung der *NF1*-mRNA Stabilität oder die Kontrolle der Translationseffizienz des *NF1*-Gens mögliche Mechanismen (Upadhyaya 2008).

Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass in der *NF1*-3'UTR insgesamt 5 Protein-binde Stellen lokalisiert sind (PBR1 bis 5) (Häußler 1998, Striebel 1998). Mit PBR1, einer AU-reichen Sequenz, interagieren 3 Proteine unterschiedlicher Größe, von denen bislang zwei identifiziert werden konnten (Haeussler et al. 2000). Die anderen Protein-binde Regionen sind maximal auf RNA-Ebene näher charakterisiert, wobei die interagierenden Proteine unbekannt sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *NF1*-3'UTR bzw. einzelne Teilbereiche unter mehreren Gesichtspunkten näher untersucht.

4.1 Mutationssuche innerhalb der NF1 3'UTR

Ausgehend von den Hinweisen auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen und den Befunden innerhalb der NF1-3'UTR wäre es denkbar, dass es NF1 Patienten gibt die Mutationen innerhalb der 3'UTR der NF1-mRNA aufweisen. In die Mutationssuche wurden deshalb nur Patienten eingeschlossen, bei denen bislang keine krankheitsauslösende Mutation gefunden werden konnte.

Im Rahmen der Mutationssuche gab es zwei unterschiedliche Ansätze. Zum einen wurde untersucht, ob es Patienten gab, bei denen ein Allel des *NF1*-Gens schwächer oder gar nicht exprimiert wurde. Diese Untersuchung war nur bei Patienten möglich, die heterozygot für einen von Hoffmeyer et al. (1994) beschriebenen Polymorphismus in Exon 5 waren. Dieser Einzelbasenaustausch hat eine polymorphe *Rsa I* Schnittstelle zur Folge (Referenznummer: rs778975931). Bei drei (NF121, NF232 und NF279) der 9 untersuchten Patienten konnte eine unterschiedliche Expression der beiden *NF1*-Allele auf RNA-Ebene nachgewiesen werden. Daraus ergibt sich für diese drei Patienten ein indirekter Hinweis auf den funktionellen Verlust einer *NF1*-Genkopie einschließlich ihrer 3'UTR. Die unterschiedliche Expression eines Allels könnte auf die konstitutionelle Mutation zurückzuführen sein. Bei einem der Patienten (NF232) konnte im Rahmen von weiteren Mutationsanalysen in unserer Abteilung ein Basenaustausch in Exon 38 identifiziert werden (T6962C), der zu einem Aminoäureaustausch (Leu2321Pro) führt (Prof. Assum, persönliche Mitteilung).

Der zweite Ansatz zur Mutationssuche zielte direkt auf Sequenzveränderungen innerhalb der NF1-3'UTR ab. Dieser Schritt wurde gewählt, da nicht alle Patienten Unterschiede in der Allelexpression des *NF1*-Gens gezeigt hatten bzw. diese Analyse nicht bei allen Patienten möglich war, da sie homozygot für den Polymorphismus in Exon 5 waren.

In der Literatur sind diverse Erkrankungen beschreiben, die sich auf Mutationen innerhalb von 3'-nichtranslatierten Regionen der entsprechenden mRNA zurückführen lassen. Grundsätzlich wären unterschiedliche Stellen für Sequenzveränderungen innerhalb der 3'UTR denkbar, über die Einfluss auf die Funktionalität der mRNA genommen werden könnte und die damit letztendlich krankheitsauslösend sein könnten (Chatterjee und Pal, 2009; Michalova et al. 2013). Zum einen können Veränderungen im Stopp-Codon zu einer Verlängerung des Translationsproduktes führen. Am Beispiel von Aniridie, dem erblich bedingten Fehlen der Iris, vermuten Chao et al. (2003) dass das mutante Protein sich

störend auf die PAX6 (paired box 6) Proteinfunktion auswirkt. Zum anderen können Mutationen innerhalb der 3'UTR das Polyadenylierungssignal betreffen und damit mit dem Entstehen von Krankheiten assoziiert sein, wie beispielsweise IPEX (immune dysfunction, polyendocrinopathy and enteropathy, x-linked). Hier führt ein seltener Basenaustausch von A nach G im ersten Polyadenylierungssignal (AATAAA -> AATGAA) zu einem unspezifischen Abbau des FOXP3 Proteins (forkhead box P3), einem Regulator der Entwicklung und Steuerung von T-Zellen, und damit zu IPEX (Bennett et al. 2001). Eine dritte Möglichkeit zielt auf die Ausbildung von Sekundärstrukturen innerhalb von 3'- nicht translatierten Bereichen ab, die durch Mutationen verändert werden können. Damit kann die Interaktion von *cis*-Elemente mit *trans*-wirkenden Proteinen erschwert bzw. verhindert werden. Ein solcher Mechanismus konnte am Beispiel von GATA4, einem Vertreter der GATA-bindenden Proteine, gezeigt werden. Mutationen im *GATA4*-Gen werden bei Familien mit CHD (congenital heart disease) beschrieben wobei auch einige dieser Sequenzveränderungen innerhalb der 3'UTR der GATA4 mRNA zu finden sind. Es wird vermutet, dass diese Mutationen die Sekundärstruktur der mRNA verändern und somit auch deren Lokalisierung und Translation (Reamon-Buettner et al. 2007).

Basierend auf den ersten Hinweisen auf Sequenzauffälligkeiten innerhalb der NF1-3'UTR bei 9 NF1-Patienten (Axmann 1999) wurden im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit insgesamt 8 verschiedenen Sequenzveränderungen identifiziert und näher untersucht sowie, falls möglich, verifiziert. Hierbei konnten bei drei der 8 Sequenzveränderungen die von Cowley et al. (1998) beschriebenen Polymorphismen bestätigt werden. Dies waren innerhalb der *NF1*-3'UTR eine Insertion von AT an Position 857 (857insAT; Referenznummer rs777859007), eine 5 Nukleotide umfassende Deletion an der Stelle 2200 (2200delGTGTA; rs201032889) sowie einen Einzelbasenaustausch von G nach C an Position 2254 (G2254C; rs1800845).

Bei der Analyse der verbliebenen Sequenzveränderungen mittels unterschiedlicher Methoden ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse. Die Sequenzveränderung 1942insTGCCAAGGA im Vergleich zur Datenbanksequenz L05367 konnte bei allen untersuchten NF1-Patienten sowie bei 95 gesunden Kontrollpersonen nachgewiesen werden. Damit konnte die um 9 bp verkürzte Basenfolge der Referenzsequenz nicht in den untersuchten Kontrollen bzw. NF1-Patienten bestätigt werden. Ein Vergleichbares Ergebnis ergab sich für weitere drei der untersuchten Sequenzveränderungen. Bei 427insT,

2039delT sowie AT3343TA konnte die Variante der Datenbanksequenz L05367 nicht gefunden werden. Alle untersuchten Kontrollpersonen zeigten die Sequenz, die in den NF1-Patienten gefunden werden konnten. Damit ist auch hier, analog zur Sequenzveränderung 1942insTGCCAAGGA, die Variante der der Referenzsequenz nicht in den untersuchten NF1-Patienten sowie den gesunden, nicht verwandten Kontrollpersonen aus dem süddeutschen Raum nachweisbar. Diese Sequenzveränderungen sind auch nicht in der entsprechenden Datenbank „Variation Viewer“ am NCBI zu finden, so dass davon auszugehen ist, dass es sich hier nicht um Mutationen oder Polymorphismen handelt, sondern um Ungenauigkeiten der verwendeten Referenzsequenz, da zum Untersuchungszeitpunkt das human Genom noch nicht vollständig sequenziert war.

Ein anderes Bild ergab sich für die untersuchte Sequenzvariante A2190G. Hier konnte ein Polymorphismus nachgewiesen werden, der auch bei Gesunden vorkommt. Allerdings handelt es sich auch nicht um eine patientenspezifische Sequenzveränderung der NF1-3'UTR. Dieser Einzelbasenaustausch ist nach kompletter Sequenzierung des humanen Genoms (Referenzsequenz: GRCh38.p2: Annotation Release 107) unter der Nummer rs757033592 gelistet. Damit konnten bei den hier untersuchten NF1-Patienten keine patientenspezifischen Sequenzveränderungen nachgewiesen werden, obwohl zum Zeitpunkt der Untersuchung noch keine konstitutionelle Mutation im *NF1*-Gen nachgewiesen war.

Umfangreiche Untersuchungen diverser Forschergruppen beschäftigen sich mit der Identifikation der konstitutionellen Mutationen bei NF1-Patienten. Bislang sind über 1485 verschiedene Mutationen im *NF1*-Gen identifiziert worden (Abramowicz und Gos, 2014), wobei Punktmutationen für schätzungsweise 90 % der NF1 Fälle verantwortlich sind. Bei 5-7 % wird die NF1 Erkrankung in Zusammenhang mit Deletionen eines Exons oder aber auch des gesamten *NF1*-Gens gebracht. Esposito et al. (2015) konnten zeigen, dass ungefähr 80 % der beschriebenen *NF1*-Mutationen zu einem trunkierten Protein führen. An diesen Zahlen zeigt sich aber auch, dass bei einem, wenn auch kleinen Teil der NF1-Patienten die krankheitsauslösende Sequenzveränderung bislang nicht gefunden werden kann. Da die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten NF1-Patienten noch weitergehenden Analysen unterzogen wurden, konnte zu einem späteren Zeitpunkt, nach Abschluss der hier durchgeführten Mutationsanalysen, bei einigen Patienten eine Mutation im *NF1*-Gen gefunden werden (Prof. Assum, persönliche Mitteilung). Bei drei Patienten konnte ein

Einzelbasenaustausch als krankheitsauslösende Mutation gefunden werden und zwei Patienten zeigten Deletionen von zwei bzw. 4 Basen in unterschiedlichen Exons.

Vor allem zwei miteinander verwandte Patienten waren Ziel intensiver Untersuchungen. Dabei wurde ein Basenaustausch von G nach A in Exon 6 (G801A) als konstitutionelle Mutation identifiziert (Wiest et al. 2003). Allerdings konnte bei den verbleibenden 4 Patienten bislang keine krankheitsauslösende Mutation gefunden werden.

Offen bleibt die Frage, ob die hier gefunden Polymorphismen trotzdem einen Einfluss auf die NF1-Erkrankung haben könnten. Insgesamt sind im Rahmen des „1000 Genome Projekts“ 81 Polymorphismen innerhalb der NF1-3'UTR beschrieben worden (Stand Mai 2015). Auffällig ist hierbei, dass sich die Polymorphismen auf die gesamte 3'UTR verteilen und sich kein „hot spot“ innerhalb dieses Bereichs der NF1-mRNA erkennen lässt. Da das Krankheitsbild der NF1 sehr variabel ist, auch innerhalb einer Familie, und bisher nur in zwei Fällen eine Phänotyp-Genotyp Korrelation hergestellt werden konnte (Upadhyaya 2008, Jouhilahti et al. 2011) wäre ein Einfluss der Polymorphismen auf das Krankheitsbild durchaus denkbar.

Wie weit der Einfluss von Polymorphismen innerhalb von 3'UTRs gehen kann, ist am Beispiel des Zervixkarzinoms, einer multifaktoriellen Erkrankung, bei der sowohl Umwelt- als auch genetische Faktoren eine Rolle spielen, beschrieben. Fu und Kollegen (2014) zeigten, dass ein Polymorphismus in der 3'UTR der Hypoxia-Inducible Factor-1 alpha (HIF-1 α) mRNA das Erkrankungsrisiko signifikant erhöht (CC Genotyp). Auch auf RNA-Ebene lassen sich Unterschiede nachweisen. So haben Träger der CT/TT Genotypen im Vergleich zum CC Genotyp eine deutlich verminderte Expression der HIF-1 α mRNA.

Im Fall der NF1 wäre es durchaus denkbar, dass Polymorphismen innerhalb der 3'UTR die die Expression der mRNA beeinflussen und damit auf die individuelle Ausprägung der Krankheitssymptome Einfluss nehmen. Hierzu wären allerdings umfangreiche Genotypisierungen bei NF1-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen notwendig um einen möglichen Einfluss zeigen zu können.

Denkbar wäre auch ein Einfluss auf die Stabilität der mRNA über Polymorphismen innerhalb der NF1-3'UTR. Ein solcher Mechanismus ist für PLK1 (Polo-like Kinase 1) beschrieben (Akdeli et al. 2014). PLK1 gehört zur großen Familie der Serin/Threonin Kinasen mit bislang 400 Mitgliedern. Diese Proteine sind an der Regulierung der Zellteilung beteiligt. PLK1 ist der am besten charakterisierte Vertreter und fördert

einerseits die Zellproliferation und verhindert andererseits über die Interaktion mit p53 die Apoptose (Zhang et al. 2011, Ando et al. 2004). Akdeli und Kollegen (2014) konnten zeigen, dass ein Polymorphismus (rs27770) innerhalb der PLK1 3'UTR die mRNA Stabilität eines Reporter-gen-Konstrukts erhöhen kann. Das A-Allel führt zu einer etwa 25 %igen Erhöhung der Reporter-gen-Aktivität im Vergleich zum G-Allel. Strukturanalysen ergaben außerdem, dass sich die Sekundärstrukturen der mRNA von A-Allel im Vergleich zum G-Allel deutlich unterscheiden.

Dieses Beispiel zeigt, dass Funktionalität von 3'UTRs und die Sekundärstruktur der mRNA eng miteinander verbunden sind. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden aus diesem Grund neben den Mutationsanalysen auch funktionelle Untersuchungen der NF1-3'UTR durchgeführt.

4.2 Funktionelle Analysen der NF1-3'UTR

Neben der weiteren Charakterisierung der PBR5 auf RNA-Ebene sollte überprüft werden, ob die RNA-Protein Interaktion auf die Stabilität der NF1-mRNA wirkt. Ein weiterer Fokus lag auf der Identifikation der mit PBR1 bzw. PBR5 interagierenden Proteine um darüber weitere Erkenntnisse zum posttranskriptionellen Regulationsmechanismus zu erlangen.

Wie weit die Beeinflussung der Genexpression durch 3'UTRs und deren Struktur gehen kann, konnte die Arbeitsgruppe um Zhang im Jahr 1997 am Beispiel der Geschlechtsdeterminierung von *Caenorhabditis elegans* sehr eindrucksvoll zeigen. Der Nematode existiert zunächst als männliches Individuum, zu einem späteren Zeitpunkt in seinem Lebenszyklus als Zwitter. Im Hermaphrodit entscheidet sich dann durch die posttranskriptionelle Regulation der beiden geschlechtsbestimmenden Gene *fem-3* und *tra-2*, ob sich eine Keimzelle zum Spermium oder zur Eizelle entwickelt. Der Beginn von Spermatogenese wird von der *tra-2* 3'UTR reguliert, während die Umstellung von Spermatogenese zu Oogenese über die 3'UTR von *fem-3* vermittelt wird. Es sind zwei verschiedene *fem-3*-Mutanten bekannt: die „gain-of-function“-Mutanten (*fem-3(gf)*), die Zeit ihres Lebens nur Spermien produzieren und im Gegensatz dazu, die „loss-of-function“-Mutanten, welche nur Oocyten bilden können (Ahringer et al. 1992). Bei ersteren wird *fem-3* überexprimiert, bei letzteren ist keine *fem-3* Expression nachweisbar.

Bislang konnte bei 17 von 19 *fem-3(gf)*-Mutanten ein Basenaustausch in einem fünf Nukleotide (UCUUG) großen Abschnitt innerhalb der *fem-3* 3'UTR gefunden werden. Diese Region wird als „point mutation element“ (PME) bezeichnet und scheint maßgeblich an der Genregulation beteiligt zu sein (Ahringer et al. 1992). Mit Hilfe des 3-Hybrid-Systems gelang es Zhang und Mitarbeitern, das mit PME interagierende Protein zu finden. FBF (*fem-3 binding factor*) bindet spezifisch an das PME der *fem-3* 3'UTR und schaltet posttranskriptionell die Genexpression von *fem-3* ab, wodurch die Umstellung von Spermatogenese zu Oogenese eingeleitet wird.

Dieses Beispiel zeigt, dass bereits minimale Änderungen in einer Protein-binde Region deutliche Auswirkungen auf die Genfunktion haben können. Bei Protein-RNA Interaktionen sind, wie bereits oben beschreiben, insbesondere RNA Sekundärstrukturen von Bedeutung. Zur Berechnung solcher Strukturen sind verschiedene Algorithmen bekannt, die dann die Ergebnisse graphisch darstellen. Hierbei wurde RNA-Draw für die zweidimensionale Darstellung eingesetzt. Für die dreidimensionale Grafik kam das Programm RNacomposer, in Verbindung mit jmol, zum Einsatz. Die Verwendung zweier Algorithmen sowie unterschiedlicher Darstellungsarten ist der Tatsache geschuldet, dass die Berechnung von Sekundärstrukturen immer nur theoretischer Natur sein kann. Durch *in vitro* Untersuchungen mittels EMSA wurden die veränderten RNA Strukturen auf ihre Funktionalität überprüft. Hierbei ergab sich ein Ausbleiben der Protein-RNA Interaktion wenn bereits ein C innerhalb des ersten Pyrimidin-reichen Motivs der NF1-PBR5 verändert wurde (NF1-PBR5 Mut1/2). Für dieses Fragment ist auch die Sekundärstruktur sowohl in 2D als auch 3D Darstellung deutlich verändert. Im Gegensatz dazu führt eine geänderte Base im zweiten Motiv (NF1-PBR5 Mut2/3) noch nicht zum Ausbleiben der Interaktion. Auch ist hier die Sekundärstruktur der RNA weitgehend unverändert. Erst die Veränderung einer weiteren Base (NF1-PBR5 Mut2/3+2) führt zum Ausbleiben der Protein-RNA Komplexbildung. Damit liegt die Vermutung nahe, dass diesen beiden Pyrimidin-reichen Motiven innerhalb der NF1-PBR5 eine wichtige Rolle bei der Proteinbindung spielen.

Im Fall der NF1-PBR5 zeigten Sequenzvergleiche insbesondere der Pyrimidin-reichen Sequenzen bei verschiedenen Vertebraten, dass der Grad der Konservierung umso höher ist, je näher die einzelnen Spezies phylogenetisch verwandt sind. Erwartungsgemäß ist der Grad der Konservierung bei den Menschenaffen am höchsten. Außerdem fällt auf, dass das erste Pyrimidin-reiche Motiv stärker konserviert zu sein scheint und Basenaustausche sich

überwiegend von CCTC nach CCCC darstellen. Laut Parker et al. (2011) sind RNA Strukturen dann evolutionär konserviert, wenn sie von funktioneller Bedeutung sind. Damit unterstützen auch die Sequenzvergleiche die These, dass PBR5 eine Rolle bei der posttranskriptionellen Regulation von *NF1* spielen könnte.

Welche Regulationsmechanismen im Fall von *NF1* tatsächlich wirken, war zu Beginn dieser Arbeit unklar. Allerdings lassen die Befunde von Korkiamäki et al. (1999) bei mechanisch verletzten Keratinozyten aufgrund des Anstiegs der Neurofibromin Menge bei gleichzeitig konstanter mRNA Menge vermuten, dass dies entweder über die Steigerung der Translationseffizienz oder durch eine sehr stabile NF1-mRNA erreicht werden könnte. Untersuchungen in unserer Abteilung konnten zeigen, dass sowohl HuR (Haeussler et al. 2000) als auch HuD (Bader 2000) *in vitro* mit der NF1-PBR1 interagieren konnten. Für beide humanen Vertreter der ELAV-ähnlichen Proteine ist bekannt, dass sie über die Bindung an AU- und U-reichen Sequenzen innerhalb von 3'UTRs an posttranskriptionellen Regulationsmechanismen beteiligt sind. Simone und Keene (2013) postulieren einen stabilisierenden Effekt auf die mRNA, wenn HuD/HuR an die entsprechenden AU-reichen Elemente innerhalb der 3'UTR gebunden ist. Dabei kompetitieren die Hu Proteine mit miRs um die Regulation der RNA.

Vor diesem Hintergrund entstand die Arbeitshypothese, dass der posttranskriptionelle Regulationsmechanismus über die Proteinbindung an PBR1 bzw. 5 stabilisierend auf die NF1-RNA wirken könnte. Dies könnte über die Interaktion von PBR1 mit Hu-Proteinen gesteuert sein. Um diese Hypothese zu überprüfen kamen zwei Ansätze zum Einsatz. Über Reporter-gen-Konstrukte wurde die Wirkung von verschiedenen Teilbereichen der NF1-3'UTR auf das Reporter-gen Luciferase untersucht. Dabei wurden in diesem Testvektor entweder eine einzelne NF1-PBR eingesetzt (1, 2, 3 oder 5) oder ein Fragment, das keine Protein-Bindfähigkeit besitzt (Fragment g). Zusätzlich dienten zwei weitere 3'UTRs als Kontrollen. Zum einem die des *GM-CSF* Gens, als Beispiel für eine destabilisierende Wirkung und zum anderen *α -2 globin* als Positivkontrolle mit einer sehr stabilen mRNA. Um eine Quantifizierung der Reporter-gen-RNA Luciferase zu ermöglichen wurden HeLA-Zellen mit einem Referenzplasmid kotransfiziert. Die Bestimmung der RNA Menge erfolgte über Northern-Blot Analysen. Hierbei zeigte sich erwartungsgemäß die destabilisierende Wirkung der GM-CSF 3'UTR. Allerdings war kein signifikanter Unterschied in der RNA Menge der Reporter-gene, die entweder die *α -2*

globin 3'UTR oder einen Teilbereich der NF1-3'UTR trugen, erkennbar. Als mögliche Ursache ist denkbar, dass der Zeitraum von 24 h zwischen Transfektion und Isolierung der Gesamt-RNA zu kurz gewählt war, um eine stabilisierende Wirkung einzelner 3'UTR Fragmente nachzuweisen. Allerdings kann weiterhin nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne NF1-3'UTR Bereiche stabilisierend wirken könnten, da kein Unterschied zur α -2 globin 3'UTR detektiert werden konnte. Aus diesem Grund sollte in einem zweiten Ansatz gezielt *in vivo* der Einfluss von HuD auf die Stabilität der NF1-mRNA untersucht werden. Dazu wurden HeLa-Zellen mit einem Expressionsvektor, der die HuD cDNA in sense- als auch in antisense-Orientierung trug, transfiziert. Letztere diente als Kontrolle. Northern-Blot Analysen sollten dann den Einfluss des transient expriemierten HuD Proteins auf die endogene NF1-mRNA zeigen. Um Effekte basierend auf einem zu kurzen Zeitintervall zwischen Transfektion und Isolierung der Gesamt-RNA ausschließen zu können, erfolgte die RNA Gewinnung zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten, 24 h und 48 h nach der Transfektion. Es ergaben sich aber keine Hinweise auf Unterschiede in der Stabilität NF1-mRNA in den verschiedenen Transfektions-Ansätzen. Damit war kein stabilisierender Einfluss des HuD Proteins nachzuweisen. Da zwar die Expression der HuD mRNA überprüft wurde, aber eine Detektion des HuD Proteins über Antikörper nicht möglich war, kann nicht ausgeschlossen werden, dass HuD in HeLa Zellen instabil ist und daher seine Wirkung nicht entfalten kann. Eine Lösung wäre, eine andere Zelllinie zu verwenden die bereits endogenes HuD enthält, beispielsweise Zellen kleinzelliger Lungenkarzinome (Keene 1999). Diese könnten dann mit den oben beschriebenen Testvektor-Konstrukten mit unterschiedlichen NF1-3'UTR Fragmenten transfiziert werden. Dieser Ansatz wäre dann erfolgsversprechend, wenn HuD direkt stabilisierend auf einzelne Protein-binde Regionen, wie NF1-PBR1 wirkt. Falls aber komplexe Mechanismen mit mehreren Faktoren der posttranskriptionellen Regulation der NF1-mRNA zugrunde liegen, ist dieser Ansatz schwierig.

Am Beispiel der Regulation von Cyclooxygenase-2 (COX-2) bei Darmkrebs haben Young und Kollegen (2012) einen komplexen Regulationsmechanismus über HuR näher untersucht. Im gesunden Darmepithel ist die COX-2 mRNA Ziel eines schnellen Abbaus. In Tumoren ist HuR im Cytoplasma überexprimiert und fördert über Interaktion mit AREs die Stabilität der COX-2 mRNA. Young et al. identifizierten miR-16 als weiteren Bindepartner der COX-2 3'UTR und Inhibitor der COX-2 Expression, vermittelt über schnellen Abbau der mRNA. Wird HuR überexprimiert so ist die Interaktion von miR-16

mit der COX-2 mRNA nicht mehr möglich. Diese Ergebnisse zeigen, dass die erhöhte Konzentrationen des HuR Proteins als Antagonist der miR-16 Funktion wirkt (Young et al. 2012). Ein Mechanismus zur Regulation der NF1-mRNA Stabilität, bei dem neben den Hu Proteinen weitere Faktoren, analog zum obigen Beispiel mi-Rs, involviert sein könnten, wäre durchaus denkbar und könnte eine weitere Erklärung für die unklaren Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchungen sein. miRs sind kurze, hochkonservierte, nichtkodierende RNA Sequenzen, die in der Regel 21-23 Nukleotide lang sind, aber auch bis zu einigen hundert Nukleotide umfassen können. Neben Proteinen spielen miRs eine wichtige Rolle bei der Genregulation auf posttranskriptioneller Ebene. So konnten Paschou und Doxakis (2012) zeigen, dass auch die NF1-3'UTR in Neuronen ein Ziel von miRs ist. Die Überexpression von miR-128 allein oder zusammen mit miR-103 und miR-137 reduziert den endogenen Neurofibromin Gehalt signifikant. Umgekehrt führt die Hemmung dieser miRs zu einer verstärkten Translation von Neurofibromin in Primärkulturen von Neuronen aus dem Hypocampus. Paschou und Doxakis (2012) schlussfolgerten, dass dies ein weiterer Mechanismus zur Regulation von Neurofibromin in Neuronen ist und damit auch einen Einfluss auf die Pathophysiologie der NF1 haben könnte.

Bader konnte in ihrer Diplomarbeit (2000) HuD als Interaktionspartner der NF1-PBR1 *in vitro* identifizieren. HuD ist Neuronen-spezifisch exprimiert und so wäre ein Regulationsmechanismus zur Stabilisierung der NF1-mRNA vermittelt über HuD und miRs durchaus denkbar. Dies bietet auch eine mögliche Erklärung des extrem variablen Krankheitsbildes von NF1, da auch die Expression von miRs Regulationsmechanismen unterworfen ist. Die unterschiedlichen kognitiven Einschränkungen bei NF1 Patienten, die von nicht vorhanden über Lernschwierigkeiten bis hin zur mentalen Retardierung reichen können, könnten über das Zusammenspiel von miRs und HuD beeinflusst werden. Dies könnte ein Ansatz für weitere Untersuchungen sein.

Da in der vorliegenden Arbeit die Untersuchung zur Stabilität keine eindeutigen Ergebnisse zeigten, wurde in einem nächsten Schritt der Fokus auf die Identifikation der interagierenden Proteine gelegt. Ein weiteres Ziel im Rahmen dieser Arbeit war, weitere, mit der NF1-3'UTR interagierenden Proteine zu identifizieren. Dabei lag der Fokus auf PBR5 sowie PBR1. Mit PBR1 interagieren insgesamt 3 Proteine mit unterschiedlichen Molekulargewichten (40, 68 und 97 kDA), wobei zwei bislang näher charakterisiert werden konnten. Für das kleinste dieser 3 Proteine (40 kDA) zeigten Bandshift-

Experimente, dass es zur Gruppe der HU-Proteine gehört. Sowohl HuR als auch HuD zeigten, wie bereits erwähnt, *in vitro* die Fähigkeit mit der NF1-PBR1 zu interagieren (Haeussler et al. 2000; Bader 2000). Die 68 kDA Komponente ließ sich sowohl durch *in vitro* als auch *in vivo* als Proteinkinase R (PKR) identifizieren (Häußler 1998). Der *in vivo* Nachweis erfolgte unter Verwendung des Hefe 3-Hybrid-Systems. Mit diesem System lassen sich definierte Protein-binde Regionen innerhalb der RNA entweder gezielt auf die Interaktion mit einzelnen, bekannten Proteinen untersuchen oder mittels einer cDNA-Fusionsbank nach bislang unbekanntem, interagierenden Proteinen screenen. Letzterer Ansatz wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit gewählt, um das größte, bislang unbekanntes, mit PBR1 interagierende Protein (98 kDA) sowie das PBR5 bindende Protein (46 kDA) zu identifizieren.

Bei einem solchen Screening-Ansatz sind mehrere Punkte zu beachten. Zum einen ist der zu untersuchende RNA-Abschnitt so in das RNA Plasmid zu klonieren, dass die Hybrid-RNA eine solche dreidimensionale Struktur ausbildet, die die Interaktion mit Proteinen erlaubt. Die Reportergene *lacZ* und *HIS3* können nur dann aktiviert werden, wenn Hybridprotein 2 über die Interaktion mit der Hybrid-RNA die Transkription ermöglicht. Wurster und Maher (2010) schlossen aus ihren Untersuchungen, dass die RNA Struktur ein wichtiger Parameter ist, der die Affinität von Proteinen zu ihrer Ziel-RNA beeinflussen kann. Um solche Effekte bei den Hybrid-RNA Konstrukten zu minimieren, wurde sowohl PBR1 als auch PBR5 jeweils 5' und 3' der MS2 coat-Domäne kloniert. Zum anderen war es in Vorversuchen wichtig die Selektionsbedingungen durch den Einsatz von 3-AT, einem Inhibitor des *HIS3* Genprodukts, so zu optimieren dass die Balance zwischen Spezifität und Sensitivität gegeben war. Für diese Vorversuche werden üblicherweise Konzentrationen zwischen 0 und 10 mM 3-AT eingesetzt um die basale Histidin-Expression zu unterdrücken. Falls ein Hefewachstum auch bei hohen 3-AT Konzentrationen nachweisbar sein sollte, kann die RNA wahrscheinlich auch ohne Protein-Interaktion das Reportergen aktivieren und ist damit ungeeignet für einen Screening-Ansatz (Koh und Wickens 2014). Die für PBR1 bzw. 5 ermittelten Konzentrationen für das Screening der cDNA Bank lagen bei 3 mM (PBR1) bzw. 2,5 mM und 1 mM (PBR5). Diese Konzentrationen lagen eher im unteren Bereich und lieferten keine Hinweise, dass die eingesetzten RNAs die Fähigkeit zur Aktivierung der Reportergene haben könnten. Auf Basis der Vorversuche wurde die cDNA Fusionsbank in Hefen die bereits ein Hybrid-RNA Plasmid tragen transformiert. Neben mehreren Selektionsschritten, die darauf

abzielten, dass die gesuchten Klone unter den gewählten Bedingungen wachsen konnten, wurde auch ein „negativ-Selektionsschritt“ durchgeführt. Dieser sollte die Spezifität steigern und falsch-positive Klone eliminieren, da das eingesetzte 5-FOA haltige Medium toxisch für alle *ura3*-exprimierenden Klone war.

Am Ende zeigten alle identifizierten Klone eine generelle RNA-binde Fähigkeit die nicht nur auf NF1-PBR1 bzw. PBR5 beschränkt war. Grundsätzlich zeigen Hefe 3-Hybrid-Systeme methodische Limitierungen, so dass, wie im vorliegenden Fall, das interagierende Protein nicht identifiziert werden kann. Die Gründe hierfür sind vielfältig und können auch durch diverse Selektions- und Optimierungsschritte nicht vollständig eliminiert werden, zumal sie auch in der Struktur der eingesetzten Komponenten begründet liegen (Martin 2012). Nicht nur aus der Struktur der RNA und der Zugänglichkeit der Hybrid-RNA können sich Schwierigkeiten, wie bereits oben beschrieben, ergeben. Analoges gilt auch für das Hybridprotein, das nicht korrekt gefaltet sein kann oder dass sich die einzelnen Komponenten gegenseitig behindern können. Eine weitere Ursache für das Scheitern des Screening-Ansatzes könnte sein, dass die eingesetzten RNAs posttranskriptionelle Modifikationen benötigen um eine stabile, mittels 3-Hybrid-System nachweisbare Interaktion einzugehen. Denkbar wäre auch, dass das interagierende Protein Co-Faktoren benötigt, um ihre Ziel-RNA zu erkennen. Ob diese Faktoren im vorliegenden Fall zutreffen, bleibt unklar. Auch sind bestimmte RNA Sequenzen für einen Einsatz im 3-Hybrid-System nicht geeignet. Vor allem PBR1 aber auch PBR5 enthält in der zu untersuchenden Region U-reiche Bereiche, die wie von Martin beschreiben, als RNA Polymerase III Terminationssequenz dienen könnten (Martin 2012).

Da sich, wie oben beschrieben, der Ansatz, die Interaktionspartner mittels Hefe 3-Hybrid-System zu finden, als nicht zielführend erwiesen hatte, wurde nach Alternativmethoden gesucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden vom „Resource Center German Human Genome Project“ sogenannte „high-density Proteinfiler“ angeboten. Diese Filter trugen rekombinante Proteine, die über cDNA aus fötaler Hirn-RNA generiert worden waren. Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Methode nutzt diese Proteinfiler. Die Hybridisierung erfolgte mittels radioaktiv markierter RNA von PBR1 bzw. PBR5 und kann als eine Art „North-Western-Blot“ bezeichnet werden.

Die durch eine Screening-Ansatz identifizierten cDNA Klone wurden nochmals auf selbsthergestellte Filter aufgebracht und die Interaktion nochmals verifiziert, wobei die ausschließliche Interaktion mit nur einer der beiden Proteinbinderegion der NF1-3'UTR,

PBR1 bzw. 5, als eine bestätigte Interaktion eingestuft wurde. In einem weiteren Schritt sollte die Interaktion zusätzlich mittels EMSA verifiziert werden. Allerdings war es nicht möglich, die überexprimierten Proteine aus den Bakterienzellen so zu isolieren, dass diese in Bandshift-Analysen eingesetzt werden konnten. Da die Expression der Proteine nachgewiesen werden konnte, ist zu vermuten, dass diese „Inclusion bodies“ gebildet haben und deshalb nicht zu extrahieren waren. Die Identifizierung der interagierenden Proteine erfolgte über Sequenzanalysen der jeweiligen cDNA Klone.

Dabei ergab sich, dass NF1-PBR1 mit zwei unterschiedlichen Proteinen interagiert. Ein Klon (D15597) zeigt Ähnlichkeit zu einem Protein mit Zinkfinger-Domäne, die RNA-bindende Eigenschaft besitzen könnte. Allerdings waren keine weiteren Informationen zu diesem Protein bekannt, so dass es im Folgenden nicht weiter betrachtet wird. Der zweite Klon (M05586) zeigt Homologie zu einem Vertreter der Ribonukleoproteine, genauer hnRNP A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1). Zu dieser Gruppe gehören insgesamt 20 Proteine, genannt hnRNPs A-U, die eine wichtige Rolle im Rahmen des Nukleinsäure-Stoffwechsels spielen (Han et al. 2010).

NF1-PBR5 zeigt ebenfalls eine positive Interaktion mit zwei verschiedenen cDNA Klonen (F06548 und M6537), allerdings zeigten die Sequenzanalysen, dass beide Klone für ein Protein kodieren das zu NFAR (nuclear Factor associated with double-stranded RNA) homolog ist.

Das *hnRNP A1* Gen enthält 10 Exons, die 4,6 kb genomischer DNA überspannen, und ist auf Chromosom 12q13.1 lokalisiert. Aus der Gruppe der Ribonukleoproteine ist hnRNP A1 ein ubiquitär exprimierter Vertreter (Romero-Garcia et al. 2014). hnRNP A1 zeigt eine Vielzahl unterschiedlicher Eigenschaften, darunter fällt neben der Fähigkeit, einzel- bzw. doppelstängige DNA zu binden auch die Affinität zu RNA Sequenzen (Jean-Philippe et al. 2013). Dabei handelt es sich um AUUUA-reiche Sequenzen, wie sie in zahlreichen 3'UTRs enthalten sind. Auch die NF1-PBR1 kann diesen AU-reichen Sequenzen zugeordnet werden. Diese Fähigkeit zur spezifischen Interaktion mit RNA Sequenzen kann durch Phosphorylierung von Serin-Resten innerhalb von hnRNP A1 durch Proteinkinase C und mitogen-activated Proteinkinase MAP (mitogen-activated Proteinkinase)-interagierende Kinasen reduziert werden. Darüber beeinflusst dieser Mechanismus auch die Fähigkeit regulierend auf die Lokalisation der RNA einzugreifen (Jean-Philippe et al. 2013). Michael und Kollegen (1995) zeigten, dass sich hnRNP A1 kontinuierlich zwischen Kern und Zytoplasma bewegt. Dies wird über eine 38 Aminosäuren umfassende

Domäne (M9) vermittelt, die sowohl als Lokalisations- als auch Export-Signal dient. Diese Ergebnisse wurden von Roy et al. (2014) bestätigt und gehen sogar einen Schritt weiter. Über Phosphorylierung am N-Terminus von hnRNP A1 wird die Assoziierung mit Anti-Apoptose Proteinen wie Bcl-xL (B-cell lymphoma-extra large) und XIAP (X chromosome-linked inhibitor of apoptosis) gestärkt und deren Export aus dem Kern gefördert. Im Cytoplasma wird diese Verbindung gelöst, wodurch die Translation der Proteine ermöglicht wird. Damit verbindet hnRNP A1 zwei Angriffspunkte postranskriptioneller Regulationsmechanismen, Lokalisierung von mRNA sowie deren Translation (Roy et al. 2014).

Inwieweit hnRNP A1 eine Relevanz im Zusammenhang mit Krebserkrankungen haben könnte, zeigte David et al. (2010) am Beispiel des Transkriptionsfaktors c-MYC. C-MYC erhöht u.a. die Transkription von hnRNP A1, welches auch in humanen Gliomen überexprimiert wird. Da Gliome des Nervus opticus auch bei NF1-Patienten auftreten können, ergibt sich hier eine mögliche Verbindung zum Krankheitsbild der Neurofibromatose Typ 1. Welche Mechanismen im Einzelnen dem zugrunde liegen könnten, müssten weitergehende Untersuchungen zeigen.

Neben hnRNP A1 als Interaktionspartner für PBR1 wurde für PBR5 ein, zu NFAR (nuclear factor associated with double-stranded RNA) homologes Protein identifiziert. Bekannt sind NFAR1 und NFAR2, zwei Spleiß-Varianten, die vom *ILF3* Gen (interleukin enhancer binding factor 3) transkribiert und translatiert werden. Das zugrunde liegende Gen *ILF3* ist auf Chromosom 19p13 lokalisiert und überspannt 22 Exons. Sequenzanalysen zeigten, dass es sich beim Interaktionspartner von PBR5 um NFAR2 handelt. NFAR2, auch bekannt als NF110, ist die größere Spleiß-Variante und besitzt ein Arg-Gly-Gly Motiv, eine sogenannte RGG Box. Neben diesem bekannten RNA-binde Motiv besitzt NFAR2 auch eine Zink-Finger Domäne (DZF Domäne) die durch PKR phosphoryliert werden und über die DZF Domäne mit NF45 (nuclear factor 45) Heterodimere bilden kann (Harashima et al. 2010; Wolkowicz et al. 2012). Am C-Terminus besitzt NFAR2 eine weitere Domäne, die verstärkt die Aminosäuren Gly, Gln, Ser und Tyr enthält (GQSY Domäne) und als deren Funktion bislang nur eine Steigerung der Genexpression bei bestimmten Promotoren bekannt ist (Reichman et al. 2003).

Ursprünglich wurden NFAR1 und NFAR2 als Teil eines Komplexes mit NF45 identifiziert und wirkten verstärkend auf die Transkription. Neben dieser Regulation wirken sowohl NFAR1 als auch NFAR2 über Bindung an 3'UTRs auf die Stabilität, Lokalisierung und Translation der mRNA. So konnten Kuwano und Kollegen (2008) zeigen, dass NFAR1/2 an die 3'UTR der MAP Kinase-Phosphatase 1 (MKP-1) binden und so stabilisierend auf die mRNA wirken. Darüber hinaus zeigten Immunpräzipitationsversuche, dass die durch oxidativen Stress verursachte Hochregulierung von MKP-1 durch Stabilisierung der mRNA und Steigerung der Translationseffizienz beeinflusst wird (Kuwano et al. 2008). Dieses Beispiel zeigt einige Parallelen mit den Beobachtungen von Korkiamäki et al. (1999) an mechanisch verletzten Keratinozyten, deren Neurofibromin-Gehalt in nur 0,5 bis 2 Stunden angestiegen war. Damit ergeben sich auch hieraus Hinweise auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen.

Obiges Beispiel zeigt aber auch, dass unterschiedliche RNA-bindende Proteine mit mRNA Komplexe bilden und Teil von großen Ribonukleoprotein-Komplexen, auch RNA Granula genannt, sein können. Diese Komplexe bestehen aus mRNA, Ribosomen, Translationsfaktoren und RNA-bindenden Proteinen. RNA Granula sind an der Regulation des mRNA Transports sowie der Translationskontrolle beteiligt, um den Zeitpunkt und Ort der Proteinsynthese zu regulieren (Martin und Ephrussi 2009). NFAR2 kann die Bildung solcher RNA Granula verstärken, was Shiina und Nakayama (2014) an Zellkulturen zeigen konnten. Es sind verschiedene Arten von RNA Granula in der Literatur beschrieben, wie beispielsweise Neuronale RNA Granula, die eine zentrale Rolle beim mRNA Transport, lokaler Translation in Dendriten und der Ausbildung von Synapsen spielen (Wang et al. 2010). Eine weitere Art sind Stress Granula (SG), wobei einige RNA-bindende Proteine in beiden Typen vorkommen können. SG spielen eine wichtige Rolle bei verschiedenen neurodegenerativen Erkrankungen und können über Mutationen oder Veränderung der Proteinwirkung direkt zu neurologischen Erkrankungen wie Fragile-X-Syndrom führen (Vanderweyde et al. 2013). Kim et al. (2013) konnten zeigen, dass Mutationen in hnRNP A1, ein Bindepartner von PBR1, zu einem erhöhten Einbau von hnRNP A1 in SGs führen und somit auch zur Aggregation von SGs im Zytoplasma.

Auffällig ist, dass die Proteine, für die bislang eine Interaktion mit der NF1-3'UTR gezeigt werden konnte (PKR, HuR, hnRNP A1 sowie NFAR2), als Teile von RNA Granula beschreiben werden. Inwieweit dies für die Pathogenese von NF1 relevant ist, müssten weitergehende Untersuchungen zeigen.

Diese Untersuchungen sollten die unterschiedliche Ausprägung der NF1 als einen Fokus haben. Dabei sind die Ursachen der interindividuellen Variabilität in der Expression des *NF1*-Gens von großem Interesse. Bei der spinalen Form der NF1 sind zwar Mutationen im *NF1*-Gen zu finden, die Patienten zeigen aber nicht unbedingt die klassischen Symptome wie Cafe-au-lait Flecken oder Lischknötchen. Dabei lässt sich kein spezifischer Mutationstyp dieser speziellen Form der NF1 zuordnen (Burkitt Wright et al. 2013). Auch bei der „klassischen Form“ der NF1 ist bisher, bis auf wenige Ausnahmen, keine Phänotyp-Genotyp-Korrelation möglich. Deshalb stellt sich hier ganz klar die Frage nach modifizierenden Faktoren und/oder Modifier-Genen sowie deren Charakterisierung.

Vor diesem Hintergrund wäre eine denkbare Arbeitshypothese, dass die posttranskriptionelle Regulation der NF1-mRNA und damit auch die Neurofibromin-Menge über RNA Granula und das komplexe Zusammenspiel der einzelnen Komponenten erfolgen könnte. Um mögliche weitere Komponenten des Ribonukleoprotein-Komplexes zu identifizieren, bieten sich Immunpräzipitationsversuche an. Über Untersuchungen an Zellkulturen unter Normal- und Stress-Bedingungen lassen sich Auswirkungen auf die Expression der identifizierten Interaktionspartner der NF1-3'UTR sowie der NF1-mRNA zeigen. Änderungen im Expressionsmuster könnten Rückschlüsse auf die Rolle der einzelnen Komponenten innerhalb des RNA Komplexes ermöglichen. Zusätzlich könnten FISH Untersuchungen ggf. noch Hinweise zur Lokalisation geben. Ein weiterer Ansatz sollte bei diesen Untersuchungen auch die Rolle von miRs bei der Pathophysiologie von NF1 näher beleuchten. Hier stellt sich die Frage, welchen Einfluss miRs auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der NF1 haben könnten. Auch hier bieten sich Expressionsanalysen unter unterschiedlichen Bedingungen an.

Möglicherweise haben auch die Polymorphismen innerhalb der NF1-mRNA Einfluss auf die Regulation und damit auch auf die Ausprägung des Krankheitsbildes. Hierzu würden sich Assoziationsstudien anbieten. Für die Genotypisierung kommen Patienten in Frage, bei denen z.B. bestimmte Krankheitsmerkmale besonders stark oder eben auch nicht

ausgeprägt sind im Vergleich zu gesunden Kontrollpersonen. Hierbei ergibt sich im besten Fall eine Assoziation von bestimmten Krankheitsmerkmalen mit einem oder mehreren Polymorphismen.

Grundsätzlich sollten alle weiteren Untersuchungen darauf abzielen die posttranskriptionellen Regulationsmechanismen des *NFI*-Gens weiter aufzuklären.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind Untersuchungen zur Bedeutung der Interaktion von Proteinen mit der 3'-nicht-translatierten Region (3'UTR) der Neurofibromatose Typ 1 (NF1) mRNA. NF1 ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung des Menschen, die weltweit mit einer Inzidenz von etwa 1:3.500 auftritt. Die NF1-mRNA umfasst 11-13 kb, wovon 3,5 kb auf die auffällig große und evolutionär stark konservierte 3'UTR entfallen. Zahlreiche Arbeiten zeigen, dass 3'UTRs eine wichtige Funktion bei der posttranskriptionellen Genregulation spielen können. Diese Mechanismen werden über die Interaktion mit Proteinen vermittelt und umfassen die korrekte zytoplasmatische Lokalisation der mRNA sowie deren Stabilität und Beeinflussung der Translationsrate. Auch für NF1 gibt es einige Hinweise auf posttranskriptionelle Regulationsmechanismen. Es sind bereits 5 Protein-binde Stellen innerhalb der NF1-3'UTR beschrieben (NF1-PBR1 bis 5). Bislang sind Proteinkinase R (PKR) sowie die humanen Vertreter HuR/HuD der ELAV (embryonic lethal abnormal vision)-ähnlichen Proteine als Interaktionspartner der PBR1 identifiziert worden. Allerdings ist die Bedeutung der Protein-RNA Interaktion noch nicht geklärt und ein Teil der Interaktionspartner noch unbekannt. Dies ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, dass NF1 eine starke interindividuelle Variabilität aufweist, wobei bis auf wenige Ausnahmen eine eindeutige Phänotyp-Genotyp Korrelation fehlt.

In dieser Arbeit wurde deshalb die NF1 3'UTR unter verschiedenen Aspekten untersucht. Im Rahmen von Mutationsanalysen bei insgesamt 20 NF1 Patienten zeigte sich bei dreien eine unterschiedliche Expression eines der beiden *NF1*-Allele auf RNA Ebene. Dies wird vermutlich durch die, zu diesem Zeitpunkt unbekannt konstitutionellen Mutationen verursacht. Gezielte Mutationssuche innerhalb der 3'UTR bei allen 20 Patienten zeigten keine krankheitsauslösenden Sequenzveränderung in diesem Bereich. Allerdings wurden verschiedene Polymorphismen bei den Patienten nachgewiesen, einer davon bis dahin nicht beschreiben (rs757033592). Ob diese Polymorphismen einen Einfluss auf die Pathophysiologie von NF1 und die extreme Variabilität des Krankheitsbildes haben, wäre ein Ansatz für zukünftige Untersuchungen.

In einem weiteren Ansatzpunkt wurde die NF1-3'UTR funktionellen Analysen unterzogen. Ein Focus lag dabei auf der weiteren Charakterisierung von PBR5. Diese Protein-binde Region enthält zwei Pyrimidin-reiche Motive, die für die Interaktion wichtig sind. Dabei

zeigte sich in Bandshift-Experimenten, dass bereits ein einzelner Basenaustausch im ersten Motiv zum Ausbleiben der Proteinbindung führt. Diese Sequenzänderung führt auch zu veränderter Sekundärstruktur der mRNA. Sequenzvergleiche verschiedener Spezies zeigten, dass v.a. dieses erste Pyrimidin-reiche Motiv der NF1-PBR5 konserviert ist und damit eine wichtige Rolle bei der Interaktion mit Proteinen haben könnte.

Gezielte Untersuchungen zur Stabilität der NF1-mRNA zeigten, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen verschiedene 3'UTR Fragmente keinen Einfluss auf die Stabilität von Reportergenen hatten. Dies lässt vermuten, dass die Stabilität nicht nur über einen Teilbereich der 3'UTR oder nur ein Protein reguliert wird, sondern über mehrere Faktoren.

Aus diesem Grund war ein weiterer Ansatzpunkt noch weitere Interaktionspartner der NF1-3'UTR zu identifizieren. Durch ein, im Rahmen dieser Arbeit entwickeltes Verfahren wurden zwei weitere Interaktionspartner der NF1-3'UTR gefunden. Ein weiterer Interaktionspartner der PBR1 ist hnRNP A1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1) und PBR5 zeigte mit NFA2 (nuclear factor associated with double-stranded RNA 2) eine Interaktion. Nicht nur für diese beiden Proteine sondern auch die bereits identifizierten Interaktionspartner der NF1-3'UTR ist beschrieben, dass sie als Teil von Ribonukleoprotein-Komplexen, auch RNA Granula genannt, an der posttranskriptionellen Regulation diverser Gene beteiligt sind. Darunter fallen auch solche Gene, die im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen stehen.

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die Regulation des *NF1*-Gens ein komplexes Zusammenspiel von mehreren modifizierenden Faktoren auf verschiedene Ebenen posttranskriptioneller Regulationsmechanismen ist. Dies ist eine mögliche Erklärung für das extrem variable Krankheitsbild der NF1. Deshalb sollten zukünftige Untersuchungen darauf abzielen, die posttranskriptionellen Regulationsmechanismen des *NF1*-Gens weiter aufzuklären.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. **Abramowicz A, Gos M:**
Neurofibromin in Neurofibromatosis type 1 – mutations in *NF1* as a cause of disease.
Dev. Period Med. 18: 297-306 (2014)
2. **Aharon T, Schneider RJ:**
Selective destabilization of short-lived mRNAs with the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor AU-rich 3' noncoding region is mediated by a cotranslational mechanism.
Mol. Cell. Biol. 13:1971-1980 (1993).
3. **Ahmadian MR, Wiesmüller L, Lautwein A, Bischoff FR, Wittinghofer A:**
Structural differences in the minimal catalytic domains of the GTPase-activating p120GAP and neurofibromin.
J. Biol. Chem 271: 16409-16415 (1996)
4. **Ahringer J, Rosenquist TA, Lawson DN, Kimble J:**
The *Caenorhabditis elegans* sex determining gene *fem-3* is regulated post-transcriptionally.
EMBO J. 11: 2303-2310 (1992)
5. **Akdeli N, Riemann K, Westphal J, Hess J, Siffert W, Bachmann HS:**
A 3'UTR polymorphism modulates mRNA stability of the oncogene and drug target Polo-like Kinase 1.
Mol. Cancer 13: 87 (2014)
6. **Andersen LB, Ballester R, Marchuk DA, Chang E, Gutmann DH, Saulino AM, Camonis J, Wigler M, Collins FS:**
A conserved alternative splice in the von Recklinghausen neurofibromatosis (NF1) gene produces two neurofibromin isoforms, both of which have GTPase-activating protein activity.
Mol. Cell. Biol. 13: 487-495 (1993)
7. **Ando K, Ozaki T, Yamamoto H, Furuya K, Hosoda M, Hayashi S, Fukuzawa M, Nakagawara A:**
Polo-like kinase 1 (PLK) inhibits p53 function by physical interaction and phosphorylation.
J. Biol. Chem. 279: 25549-25561 (2004)
8. **Antic D, Keene JD:**
Embryonic lethal abnormal visual RNA-binding proteins involved in growth, differentiation, and posttranscriptional gene expression.
Am. J. Hum. Genet. 61:273-278 (1997)

9. **Assum G, Schmegner C:**
NF1 gene evolution in mammals.
In: Neurofibromatosen. Edited by Kaufmann D.
Basel, Karger: 103-112 (2008)
10. **Axmann S:**
Zur Bedeutung nicht-kodierender Abschnitte des Neurofibromingens für die Pathogenese der Neurofibromatose 1.
Diplomarbeit, Universität Ulm (1999)
11. **Bader TA:**
Funktionelle Analysen proteinbindender Sequenzen der 3' nicht translatierten Region der Neurofibromin mRNA.
Diplomarbeit, Universität Ulm (2000)
12. **Ballester R, Marchuk DA, Boguski M, Sauline AM, Letcher R, Wigler M, Collins FS:**
The NF1 locus encodes a protein functionally related to mammalian GAP and yeast IRA proteins.
Cell 63: 851-859 (1990)
13. **Barber GN, Wambach M, Wong ML, Dever TE, Hovanessian AG:**
Translational regulation by the interferon-induced double-stranded-RNA-activated 68-kDa protein kinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 4621-4625 (1993)
14. **Barron VA, Lou H:**
Alternative splicing the Neurofibromatosis type I pre-mRNA.
Biosci. Rep. 32: 131-138 (2012)
15. **Bennett CL, Brunkow ME, Ramsdell F, O'Briant KC, Zhu Q, Fuleihan RL, Shigeoka AO, Ochs HD, Chance PF:**
A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA -> AAUGAA) leads to the IPEX syndrome.
Immunogenetics 53: 435-439 (2001)
16. **Bernards A, Snijders AJ, Hanningan GE, Murthy AE, Gusella JF:**
Mouse neurofibromatosis type 1 cDNA sequence reveals high degree of conservation of both coding and non-coding mRNA segments.
Hum. Mol Genet 2: 645-650 (1993)
17. **Bernstein P, Ross J:**
Poly (A), poly (A)-binding protein and the regulation of mRNA stability.
Trends Biochem. Sci. 14: 373-377 (1989)
18. **Black BL, Lu J, Olson EN:**
The MEF2A 3' untranslated region functions as a cis -acting translational repressor.
Mol. Cell. Biol. 17: 2756-2763 (1997)

- 19. Bradford MM:**
A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
Anal. Biochem. 72: 248-254 (1976)
- 20. Brems H, Chmara M, Sahbatou M, Denayer E, Taniguchi K, Kato R, Somers R, Messiaen L, De Schepper S, Fryns J-P, Cools J, Marynen P, Thomas G, Yoshimura A:**
Germline loss-of-function mutations in SPRED 1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype.
Nat. Genet. 39: 1120-1126 (2007)
- 21. Bruckenstein DA, Lein PJ, Higgins D, Fremeau RTJ:**
Distinct spatial localization of specific mRNA in cultured sympathetic neurons.
Neuron 5: 809-819 (1990)
- 22. Buchberg AM, Bedigian HG, Jenkins NA, Copeland NG:**
Evi-2, a common integration site involved in murine myeloid leukemogenesis.
Mol. Cell. Biol. 10: 4658-4666 (1990a)
- 23. Buchberg AM, Cleveland LS, Jenkins NA, Copeland NG:**
Sequence homology shared by neurofibromatosis type-1 gene and IRA-1 and IRA-2 negative regulators of the RAS cyclic AMP pathway.
Nature 347: 291-294 (1990b)
- 24. Burkitt Wright EMM, Sach E, Sharif S, Quarrell O, Carroll T, Whitehouse RW, Upadhyaya M, Huson SM, Evans DGR:**
Can the diagnosis of NF1 be excluded clinically? A lack of pigmentary findings in families with spinal neurofibromatosis demonstrate a limitation of clinical diagnosis.
J. Med. Genet. 50: 606-613 (2013)
- 25. Büssov K, Cahill D, Nietfeld W, Bancroft D, Scherzinger E, Lehrach H, Walter G:**
A method for global protein expression and antibody screening on high-density filters of an arrayed cDNA library.
Nucleic Acids Res. 26: 5007-5008, (1998)
- 26. Büssov K, Nordhoff E, Lübbert C, Lehrach H, Walter G:**
A Human cDNA Library for High-Throughput Protein Expression Screening.
Genomics 65: 1-8 (2000)
- 27. Cawthon RM, Weiss R, Xu G, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P, White R:**
A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure and point mutations.
Cell 62: 193-201 (1990a)

28. **Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg A, Viskochil D, Weiss R, Culver M, Stevens J, Jenkins N, Copeland N, White R:**
Identification and characterisation of transcripts from the neurofibromatosis type 1 gene.
Genomics 7: 555-565 (1990b)
29. **Cawthon RM, Anderson LB, Buchberg A, Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Weiss RB, Wallace MR, Marchuk DA, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland N, White R:**
cDNA sequence and genomic structure of EVI2B, a gene lying within an intron of the neurofibromatosis type 1 gene.
Genomics 9: 446-460 (1991)
30. **Chai G, Liu N, Ma J, li H, Oblinger JL, Prahalad AK, Gong M, Chang L-S, Wallace M, Muir D, Guha A, Phipps RJ, Hock JM, Yu X:**
MicroRNA-10b regulates tumorigenesis in neurofibromatosis type 1.
Cancer Sci. 101: 1997-2004 (2010)
31. **Chao LY, Mishra R, Strong LC, Saunders GF:**
Missense mutations in the DNA-binding region and termination codon in PAX6.
Hum. Mutat. 21: 138-145 (2003)
32. **Chatterjee S, Pal JK:**
Role of 5'- and 3'-untranslated regions of mRNA in human diseases.
Biol. Cell 101: 251-262 (2009)
33. **Chen FY, Amara FM, Wright JA:**
Regulation of mammalian ribonucleotide reductase R1 mRNA stability is mediated by a ribonucleotide reductase R1 mRNA 3'-untranslated region cis-trans interaction through a protein kinase C-controlled pathway.
Biochem. J. 302:125-132 (1994)
34. **Cichowski K, Jacks T:**
NF1 Tumor Suppressor Gene Function: Narrowing the GAP.
Cell 104: 593-604 (2001)
35. **Cowley GS, Muthy AE, Parry DM, Schneider G, Korf B, Upadhyaya M, Harper P, MacCollin M, Bernardis A, Gusella JF:**
Genetic variation in the 3'-untranslated region of the neurofibromatosis 1 gene: application to unequal allelic expression.
Somatic Cell and Molecular Genetics 24: 107-119 (1998)
36. **Cummings LM, Glatfelter A, Marchuk DA:**
NF1-related loci on chromosome 2, 12, 14, 15, 20 21 and 22: A potential role for gene conversion in the high spontaneous mutation rate of NF1.
Am. J. Hum. Genet. 53: Supplement 672 (1993)

37. **David CJ, Chen M, Assanah M, Canoll P, Manley JL:**
hnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer.
Nature 463: 364-368 (2010)
38. **DeClue JE, Cohen BD, Lowry DR:**
Identification and characterization of the neurofibromatosis type 1 protein product.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9914-9918 (1991)
39. **Del Tito BJ Jr, Poff HE 3rd, Novotny MA, Cartledge DM, Walker RI 2nd, Earl CD, Bailey AL:**
Automated fluorescent analysis procedure for enzymatic mutation detection.
Clin. Chem. 44: 731-739 (1998)
40. **Eisenbarth I, Beyer K, Krone W, Assum G:**
Toward a survey of somatic mutation of the *NFI* Gene in benign neurofibromas of patients with neurofibromatosis type 1.
Am. J. Hum. Genet. 66: 393-401 (2000)
41. **Esposito T, Piluso G, Saracino D, Uccello R, Schettino C, Dato C, Capaldo G, Giugliano T, Varriale B, Paolisso G, Di Iorio G, Melone MA:**
A novel diagnostic method to detect truncated neurofibromin in Neurofibromatosis 1.
J. Neurochem. Oct. 19. doi: 10.1111/jnc. 13396 [Epub ahead of print] (2015)
42. **Fahsold R, Hoffmeyer S, Mischung C, Gille C, Ehlers C, Kucukceylan N, Abdel-Nour M, Gewies A, Peters H, Kaufmann D, Buske A, Tinschert S, Nürnberg P:**
Minor lesion mutational spectrum of the entire *NFI* gene does not explain its high mutability but points to a functional domain upstream of the GAP-related domain.
Am. J. Hum. Genet. 66: 790-818 (2000)
43. **Fontes AM, Ito J, Jacobs-Lorena M:**
Control of Messenger RNA Stability during Development.
Curr. Top. Dev. Biol. 44: 171-202 (1999)
44. **Fu L, Minden MD, Benchimol S**
Translational regulation of human p53 gene expression.
EMBO J. 15: 4392-4401 (1996)
45. **Fu SL, Miao B, Ding XL, Cheng WJ, Dai HH, Han SP:**
A polymorphism in the 3' untranslated region of Hypoxia-Inducible Factor -1 alpha confers an increased risk of cervical cancer in a Chinese population.
Neoplasma 61: 63-69 (2014)

46. **Glover RM, Stein CK, Legius E, Andersen LB, Brereton A, Johnson S:**
Molecular and cytogenetic analysis of tumors in von Recklinghausen neurofibromatosis.
Genes Chromosomes Cancer 3: 62-70 (1991)
47. **Gonzalez I, Buonomo SB, Nasmyth K, von Ahsen U:**
ASH1 mRNA localization in yeast involves multiple secondary structural elements and Ash1 protein translation.
Curr. Biol. 9: 337-340 (1999)
48. **Goodwin EB, Okkema PG, Evans TC, Kimble J:**
Translational regulation of *tra-2* by its 3' untranslated region controls sexual identity in *C. elegans*.
Cell 75: 329-339 (1993)
49. **Griesser J, Kaufmann D, Maier B, Mailhammer R, Kuehl P, Krone W:**
Post-transcriptional regulation of neurofibromin level in cultured human melanocytes in response to growth factors.
J. Invest. Dermatol. 108: 275-280 (1997)
50. **Guo H, The I, Hannan F, Bernard A, Zhong Y:**
Requirement of Drosophila NF1 for activation of adenylyl cyclase by PACP38-like neuropeptides.
Science 276: 795-798 (1997)
51. **Gutmann DH, Wood DL, Collins FS:**
Identification of the neurofibromatosis type 1 gene product.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 9658-9662 (1991)
52. **Gutmann DH, Tennekoon JL, Cole FS, Collins FS, Rutkowski JL:**
Modulation of the neurofibromatosis type 1 gene product, neurofibromin, during schwann cell differentiation.
J. Neurosci. Research 36: 216-223 (1993)
53. **Gutmann DH, Collins FS:**
Von Recklinghausen Neurofibromatosis.
The metabolic and molecular basis of inherited disease, 7th edition chapter 14 (1994)
54. **Gutmann DH:**
The neurofibromatoses: when less is more.
Hum. Mol. Gen. 10: 747-755 (2001)
55. **Harashima A, Guettouche T, Barber GN:**
Phosphorylation of the NFAR proteins by the dsRNA-dependent protein kinase PKR constitutes a novel mechanism of translational regulation and cellular defense.
Genes Dev. 24: 2640-2653 (2010)

- 56. Häusler J:**
Untersuchungen zur Interaktion von Proteinen mit 3' nicht-translatierten Sequenzen der Neurofibromin mRNA.
Diplomarbeit, Universität Ulm (1999)
- 57. Häußler J:**
Molekulargenetische und biochemische Untersuchungen der 3' nicht translatierten Region (3'UTR) der Neurofibromin-mRNA.
Dissertation, Universität Ulm (1998)
- 58. Haeussler J, Haeusler J, Striebel AM, Assum G, Vogel W, Furneaux H, Krone W:**
Tumor antigen HuR binds specifically to one of the five protein-binding segments in the 3'-untranslated region of the neurofibromin messenger RNA.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 267: 726-732 (2000)
- 59. Hajra A, Martin-Gallardo M, Tarle SA, Freedmann M, Wilson-Gunn S, Bernards A, Collins, FS:**
DNA sequences in the promotor region of the NF1 gene are highly conserved between human and mouse.
Genomics 21: 649-652 (1994)
- 60. Han SP, Tang YH, Smith R:**
Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives.
Biochem. J. 430(3): 379-392 (2010)
- 61. Hoffman CS, Winston F:**
A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*.
Gene 57:267-272 (1987)
- 62. Hoffmeyer S, Assum G, Kaufmann D, Krone W:**
Unequal expression of NF1 alleles.
Nature Genet. 6: 331 (1994)
- 63. Hoffmeyer S, Assum G, Griesser J, Kaufmann D, Nürnberg P, Krone W:**
On unequal allelic expression of the neurofibromin gene in neurofibromatosis type 1.
Hum. Mol. Genet. 4: 1267-1272 (1995)
- 64. Huson SM, Hughes RAC:**
The neurofibromatosis. A pathogenetic and clinical overview.
Chapmann and Hall, London (1994)
- 65. Huson SM:**
The neurofibromatosis: classification, clinical features and genetic Counselling.
In: Neurofibromatoses. Edited by Kaufmann D.
Basel, Karger: 1-20 (2008)

66. **Jacks T, Shih TS, Schmitt EM, Bronson RT, Bernard A, Weinberg RA:**
Tumor predisposition in mice heterozygous for a targeted mutation in *NF1*.
Nature Genet. 7: 353-361 (1994)
67. **Jean-Philippe J, Paz S, Caputi M:**
hnRNP A1: The swiss army knife of gene expression.
Int. J. Mol. Sci. 14: 18999-19024 (2013)
68. **John A, Ruggieri M, Ferner R, Upadhyaya M:**
A search for evidence of somatic mutations in the *NF1* gene.
J. Med. Genet. 37: 44-49 (2000)
69. **Johnson MR, Look AT, DeClue JE, Valentine MB, Lowry DR:**
Inactivation of the *NF1* gene in human melanoma and neuroblastoma cell lines
without impaired regulation of GTP-Ras.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5539-5543 (1993)
70. **Jouhilahti E-M, Peltonen S, Heape AM, Peltonen J:**
The Pathoetiology of Neurofibromatosis 1
AJP 178: 1932-1939 (2011)
71. **Kayl AE, Moore BD III:**
Behavioral phenotype of neurofibromatosis type 1.
Ment. Retard. Dev. Disabil. Res. 6: 117-124 (2000)
72. **Keene JD:**
Why is Hu where? Shuttling of early-response gene messenger RNA subsets.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5-7 (1999)
73. **Kelsey CM, Ephrussi A:**
mRNA localization: gene Expression in the spatial Dimension.
Cell 136: 719-730 (2009)
74. **Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM,
Haussler D.**
The human genome browser at UCSC.
Genome Res. 12: 996-1006 (2002)
75. **Kiledjian M, Wang X, Liebhaber SA:**
Identification of two KH domain proteins in the α -globin mRNP stability
complex.
EMBO J. 14: 4357-4364 (1995)

76. **Kim HJ, Kim NC, Wang Y-D, Scarborough EA, Moore J, Diaz Z, MacLea KS, Freibaum B, Li S, Molliex A, Kanagaraj AP, Carter R, Boylan KB, Wojtas AM, Rademakers R, Pinkus JL, Greenberg SA, Trojanowski JQ, Traynor BJ, Smith BN, Topp S, Gkazi A-S, Miller J, Shaw CE, Kottlors M, Kirschner J, Pestronk A, Li YR, Ford AF, Gitler AD, Benater M, King OD, Kimonis VE, Ross ED, Wehl CC, Shorter J, Taylor JP:**
Prion-like domain mutations in hnRNPs cause multisystem proteinopathy and ALS.
Nature 495: 467-473 (2013)
77. **Kinzler KW, Vogelstein B:**
Lessons from hereditary colorectal cancer.
Cell 87:159-170 (1996)
78. **Klausner RD, Rouault TA, Harford JB:**
Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism.
Cell 72: 19-28 (1993)
79. **Kloc M, Zearfoss NR, Etkin LD:**
Mechanisms of Subcellular mRNA Localization.
Cell 108: 533-544 (2002)
80. **Koeller DM, Horowitz JA, Casey JL, Klausner RD, Harford JB:**
Translation and stability of mRNAs encoding the transferrin receptor and c-fos.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 7778-7782 (1991)
81. **Koh YY, Wickens M**
Identifying proteins that bind a known RNA sequence using the yeast three-hybrid system.
Methods Enzymol. 539: 195-214 (2014)
82. **Koivunen J, Ylä-Outinen H, Korkiamäki T, Karvonen S-L, Pöyhönen M, Laato M, Karvonen J, Peltonen S, Peltonen J:**
New function for NF1 tumor suppressor.
J. Invest. Dermatol. 114: 473-479 (2000)
83. **Korkiamäki T, Ylä-Outinen H, Peltonen J:**
Increased NF1 tumor suppressor expression in mechanically injured keratinocytes.
8th European Neurofibromatosis Meeting, 6th Workshop Neurogenetics.
Medizinische Genetik Jahrgang 11, Nummer 3): (1999)
84. **Korkiamäki T, Ylä-Outinen H, Koivunen J, Karvonen S-L, Peltonen J:**
Altered Calcium-mediated cell signaling in keratinocytes cultered from patients with neurofibromatosis type 1.
American Journal of Pathology 160: 1981-1990 (2002)

- 85. Koromilas AE, Roy S, Barber GN, Katze MG, Sonenberg N:**
Malignant transformation by a mutant of the IFN-inducible dsRNA-dependent protein kinase.
Science 257: 1685-1689 (1992)
- 86. Kuersten S, Goodwin EB:**
The power of the 3'UTR: translational control and development.
Nature reviews genetics 4: 626-637 (2003)
- 87. Kuwano Y, Kim HH, Abdelmohsen K, Pullmann R Jr., Martindale JL, Yang X, Gorospe M:**
MKP-1 mRNA stabilization and translational control by RNA-binding proteins HuR und NF90.
Mol. Cell. Biol. 28: 4562-4575 (2008)
- 88. Lämmlli UK:**
Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.
Nature 227: 680-685 (1970)
- 89. Ledbetter DH, Rich DC, O'Connell P, Leppert M, Carey JC:**
Precise localization of NF1 to 17q11.2 by balanced translocation.
Am. J. Hum. Genet. 44: 20-24 (1989)
- 90. Legius E, Marchuk DA, Collins FS, Glover TW:**
Somatic deletion of the neurofibromatosis type 1 gene in a neurofibrosarcoma supports a tumor suppressor gene hypothesis.
Nature Genet. 3: 122-124 (1993)
- 91. Legius E, Dierick H, Wu R:**
p53 mutations are frequent in malignant NF1 tumors.
Genes Chromosomes Cancer 10: 250-255 (1994)
- 92. Li Y, O'Connell P, Breidenbach Huntsman H, Cawthon R, Stevens J, Xu G, Neil S, Robertson M, White R, Viskochil D:**
Genomic organization of the neurofibromatosis 1 gene (NF1).
Genomics 25: 9-18 (1995)
- 93. Litman P, Barg L, Rindzoonski L, Ginzburg I:**
Subcellular localization of tau mRNA in differentiating neuronal cell culture: implications for neuronal polarity.
Neuron 10: 627-638 (1993)
- 94. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:**
Protein measurement with the Folin Pheol reagent.
J. Biol. Chem. 193:265-275 (1951)

- 95. Luijten M, Redeker S, Minoshima S, Shimizu N, Westerfeld A, Hulsebos TJM:**
Duplication and transposition of the NF1 pseudogene regions on chromosomes 2, 14, and 22.
Hum. Genet. 109: 109-116 (2001)
- 96. Marchuk DA, Saulino AM, Tavakkol RL, Swaroop M, Wallace MR, Andersen LB, Mitchell AM, Gutmann DH, Collins FS:**
cDNA cloning of the type 1 neurofibromatosis gene: complete sequence of the NF1 gene product.
Genomics 11: 931-940 (1991)
- 97. Marchuk DA, Tavakkol R, Wallace MR, Brownstein BH, Taillon-Miller P, Fong CT, Legius E, Andersen LB, Glover TW, Collins FS:**
A yeast artificial chromosome contig encompassing the type 1 neurofibromatosis gene.
Genomics 13: 672-680 (1992)
- 98. Martin F:**
Fifteen years of the yeast three-hybrid system: RNA-protein interactions under investigation.
Methods 58: 367-375 (2012)
- 99. Martin GA, Viskochil D, Bollag G, McCabe PC, Croisier WJ, Haubruck H, Conroy L, Clark R, O'Connell P, Cawthon RM, Innis MA, McCormick F:**
The GAP-related domain of the neurofibromatosis type 1 gene product interacts with ras p21.
Cell 63:843-849 (1990)
- 100. Martin KC, Ephrussi A:**
mRNA localization: gene expression in the spatial dimension.
Cell 136 (4): 719-730 (2009)
- 101. Matzura O, Wennborg A:**
RNAdraw: an integrated program for RNA secondary structure calculation and analysis under 32-bit Microsoft Windows.
Comput. Appl. Biosci. 12: 247-249 (1996)
- 102. Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR:**
Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter.
Nucleic. Acids. Res. 12:7035-7056 (1984)
- 103. Menon AG, Anderson KM, Riccardi VM, Chung RY, Whaley JM, Yandell DW, Farmer GE, Freimann RN, Lee JK, Li FP, Barker DF, Ledbetter DH, Kleider A, Matsuza RL, Gusella JF, Seizinger BR:**
Chromosome 17p deletions and p53 gene mutations associated with the formation of malignant neurofibrosarcomas in von Recklinghausen neurofibromatosis.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5435-5439 (1990)

- 104. Meurs EF, Galabru J, Barber GN, Katze MG, Hovanessian AG:**
Tumor suppressor function of the interferon-induced double-stranded RNA-activated protein kinase.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 232-236 (1993)
- 105. Michael WM, Choi M, Dreyfuss G:**
A nuclear export signal in hnRNP A1: a signal-mediated, temperature-dependent nuclear protein export pathway.
Cell 83: 415-422 (1995)
- 106. Michalova E, Vojtesek B, Hrstka R:**
Impaired pre-mRNA processing and altered architecture of 3' untranslated regions contribute to the development of human disorders.
Int J Mol Sci. 14(8): 15681-15694 (2013)
- 107. Mignone F, Gissi C, Luini S, Pesole G:**
Untranslated regions of mRNAs
Genome Biol. 3: reviews 004.1-0004.10 (2002)
- 108. Murphy WJ, Eizirik E, O'Brien SJ, Madsen O, Scally M, Douady CJ, Teeling E, Ryder OA, Stanhope MJ, de Jong WW, Springer MS:**
Resolution of the early placental mammal radiation using Bayesian phylogenetics.
Science 294: 2348-2351 (2001)
- 109. Osborn M, Cooper DM, Upadhyaya M:**
Molecular analysis of the 5'-flanking region of the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) gene: identification of five sequence variants.
Clin. Genet. 57: 221-224 (2000)
- 110. Ostareck DH, Ostareck-Lederer A, Wilm M, Thiele BJ, Mann M, Hentze MW:**
mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K und hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end.
Cell 89: 597-606 (1997)
- 111. Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Standart N, Thiele BJ:**
Translation of 15-lipoxygenasemRNA is inhibited by a protein that binds to a repeated sequence in the 3' untranslated region.
EMBO 13: 1476-1481 (1994)
- 112. Park YW, Tan S-L, Katze MG:**
Differential sensitivity to 5-fluoro-orotic acid as a screen for bait RNA-independent false positives in a yeast three-hybrid system.
BioTechniques 26: 1102-1106 (1999)

-
- 113. Parker BJ, Moltke I, Roth A, Washietl A, Wen J, Kellis M, Breaker R, Pedersen JS:**
New families of human regulatory RNA structures identified by comparative analysis of vertebrate genomes.
Genome 21: 1929-1943 (2011)
- 114. Paschou M, Doxakis E:**
Neurofibromin 1 is a miRNA target in neurons.
PLOS ONE 7: e46773 (2012)
- 115. Peterson GL:**
Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall.
Anal. Biochem. 100: 201-220 (1979)
- 116. Popena M, Szachniuk M, Antczak M, Purzycka KJ, Lukasiak P, Bartol N, Blazewicz J, Adamiak RW:**
Automated 3D structure composition for large RNAs.
Nucleic Acids Res. 40: e112 (2012)
- 117. Rajagopalan LE, Malter JS:**
Regulation of eukaryotic messenger RNA turnover.
Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 56:257-286 (1997)
- 118. Rasmussen SA, Overman J, Thomson SA, Colman SD, Abernathy CR, Trimpert RE, Moose R, Virdi G, Roux K, Bauer M, Rojiani AM, Maria BL, Muir D, Wallace MR:**
Chromosome 17 loss-of heterozygosity studies in benign and malignant tumors in neurofibromatosis type 1.
Genes Chromosome Cancer 28: 425-431 (2000)
- 119. Rauen KA:**
The RASopathies.
Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 14: 355-369 (2013)
- 120. Reamon-Buettner SM, Cho S-H, Borlak J:**
Mutations in the 3'-untranslated region of GATA4 as molecular hotspots for congenital heart disease.
BMC Med. Genet. 8: 38 (2007)
- 121. Régnier V, Meddeb M, Lecointre G, Richard F, Duverger A, Nguyen VC, Dutrillaux B, Bernheim A, Danglot G:**
Emergence and scattering of multiple neurofibromatosis (NF1)-related sequences during hominoid evolution suggest a process of pericentromeric interchromosomal transposition.
Hum. Mol. Genet. 6: 9-16 (1997)

122. **Reichman TW, Parrot AM, Fierro-Monti I, Caron DJ, Kao PN, Lee CG, Li H, Mathews MB:**
Selective regulation of gene expression by nuclear factor 110, a member of the NF90 family of double-stranded RNA-binding proteins.
J. Mol. Biol. 332: 85-98 (2003)
123. **Riccardi VM, Eichner JE:**
Neurofibromatosis: Phenotype, natural history and pathogenesis.
John Hopkins University Press, Baltimore (1986)
124. **Riccardi VM:**
Neurofibromatosis: Phenotype, natural history and pathogenesis. Second edition.
John Hopkins University Press, Baltimore (1992)
125. **Romero-Garcia S, Prado-Garcia H, Lopez-Gonzalez JS:**
Transcriptional analysis of hnRNPA0, A1, A2, B1, and A3 in lung cancer cell lines in response to acidosis, hypoxia, and serum deprivation conditions.
Exp. Lung Res. 40: 12-21 (2014)
126. **Rosenbloom KR, Armstrong J, Barber GP, Casper J, Clawson H, Diekhans M, Dreszer TR, Fujita PA, Guruvadoo L, Haeussler M, Harte RA, Heitner S, Hickey G, Hinrichs AS, Hubley R, Karolchik D, Learned K, Lee BT, Li CH, Miga KH, Nguyen N, Paten B, Raney BJ, Smit AF, Speir ML, Zweig AS, Haussler D, Kuhn RM, Kent WJ:**
The UCSC Genome Browser database: 2015 update.
Nucleic Acids Res. 43: Database issue (2015)
127. **Roy R, Durie D, Li H, Liu B-Q, Skehel JM, Mauri F, Cuorvo LV, Barbaresegi M, Guo L, Holcik M, Seckl MJ, Pardo OE:**
hnRNPA1 couples nuclear export and translation of specific mRNAs downstream of FGF-2/S6K2 signalling.
Nucleic Acids Res. 42: 12483-12497 (2014)
128. **Rubenstein AE, Korf BR:**
Neurofibromatosis: a handbook for patients, families and health-care professionals.
Thieme, Stuttgart New York (1990)
129. **Russel JE, Morales J, Makeyev AV, Liebhaber SA:**
Sequence divergence in the 3' untranslated regions of human z- and a-globin mRNA mediates a difference in their stabilities and contributes to efficient a- to z-gene developmental switching.
Mol. Cell. Biol. 18: 2173-2183 (1998)

-
- 130. Sabbagh A, Pasmant E, Laurendeau I, Parfait I, Barbarot S, Guillot B, Combemale P, Ferkal S, Vidaud M, Aubourg P, Vidaud D, Wolkenstein P and the members of the NF France Network:**
Unravelling the genetic basis of variable clinical expression in neurofibromatosis 1.
Hum. Mol. Genet. 18: 2768-2778 (2009)
- 131. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:**
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467 1977
- 132. Saunders LR, Barber GN:**
The dsRNA binding protein family: Critical roles, diverse cellular functions.
FASEB J. 17: 961-983 (2003)
- 133. Schmidt MA, Michels VV, Dewald GW:**
Cases of neurofibromatosis with rearrangements of chromosome 17 involving band 17q11.2.
Am. J. Med. Genet. 28: 771-777 (1987)
- 134. Seizinger BR:**
NF1: a prevalent cause of tumorigenesis in human cancers?
Nature Genet. 3: 97-99 (1993)
- 135. SenGupta DJ, Zhang B, Kraemer B, Pochart P, Fields S, Wickens M:**
A three-hybrid system to detect RNA-protein interactions *in vivo*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 8496-8501 (1996)
- 136. Shabalina SA, Ogurtsov AY, Lipman DJ, Kondrashov AS:**
Patterns in interspecies similarity correlate with nucleotide composition in mammalian 3'UTRs.
Nucleic Acids Res. 31: 5433-5439 (2003)
- 137. Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, McCormick F:**
Loss of the normal NF1 alleles from the bone marrow of children with type 1 neurofibromatosis and malignant disorders.
N. Engl. J. Med. 330: 597-601 (1994)
- 138. Shaw G, Kamen R:**
A Conserved AU Sequence from the 3' Untranslated Region of GM-CSF mRNA Mediates Selective mRNA Degradation.
Cell 46: 659-667 (1986)
- 139. Shiina N, Nakayama K:**
RNA granule assembly and disassembly modulated by nuclear factor associated with double-stranded RNA 2 and nuclear factor 45.
J. Biol.Chem. 289: 21163-21180 (2014)

- 140. Simone LE, Keene JD:**
Mechanisms coordinating ELAV/Hu mRNA regulons.
Curr. Opin. Genet. Dev. 23: 35-43 (2013)
- 141. Spurlock G, Bennett E, Chuzhanova N, Thomas N, Jim H-P, Side L, Davies S, Haan E, Kerr B, Huson SM, Upadhyaya M:**
SPRED1 mutations (legius Syndrome): another clinically useful genotype for dissecting the neurofibromatosis type 1 phenotype.
J. Med. Genet. 46: 431-437 (2009)
- 142. Striebel AM:**
Analyse von proteinbindenden Motiven in der 3'-nicht-translatierten Region (3'UTR) der Neurofibromin mRNA.
Diplomarbeit, Universität Ulm (1998)
- 143. Stumpf DA, Alkanse JF, Annegers JF:**
Neurofibromatosis. NIH Consensus Development Conference Statement
Vol. 6, No. 12 (1987)
- 144. Taylor DR, Lee SB, Romano PR, Marshak DR, Hinnebusch AG, Esteban M, Mathews MB:**
Autophosphorylation Sites Participate in the Activation of the Double-Stranded-RNA-Activated Protein Kinase PKR.
Mol. Cell. Biol. 16: 6295-6302 (1996)
- 145. The I, Murthy AE, Hannigan GF, Jacoby LB, Menon AG, Gusella JF, Bernardis A:**
Neurofibromatosis type 1 gene mutations in neuroblastoma.
Nature Genet. 3: 62-66 (1993)
- 146. Trahey M, McCormick F:**
A cytoplasmic protein stimulates normal N-ras p21 GTPase, but does not affect oncogenic mutants.
Science 238: 542-545 (1987)
- 147. Trovo-Marqui AB, Tajara EH:**
Neurofibromin: a general outlook.
Clin. Genet. 70: 1-13 (2006)
- 148. Upadhyaya M:**
NF1 gene structure and *NF1* genotype/phenotype correlations.
In: Neurofibromatosis. Edited by Kaufmann D.
Basel, Karger: 103-112 (2008)
- 149. Upadhyaya M, Maynard J, Osborn M, Huson SM, Ponder M, Ponder BAJ, Harper PS:**
Characterisation of germline mutations in the neurofibromatosis type 1 (*NF1*) gene.
J. Med. Genet. 32: 706-710 (1995)

- 150. Upadhaya M, Cooper DN:**
The mutational spectrum in neurofibromatosis 1 and its underlying mechanisms. In: Upadhaya M, Cooper DN (eds) Neurofibromatosis type 1: from genotype to phenotype.
BIOS Scientific Publishers, Oxford: 65-88 (1998)
- 151. Upadhaya M, Osborn M, Cooper DN:**
Detection of *NF1* Mutations utilizing the protein Truncation Test (PTT).
Methods Mol. Biol. 217: 315-327 (2003)
- 152. Upadhaya M:**
NF1 gene structure and NF1 genotype/phenotype correlations.
In: Neurofibromatoses. Edited by Kaufmann D.
Basel, Karger: 1-20 (2008)
- 153. Vandenbrouke I, Van Oostveldt P, Coene E, De Paepe A, Messiaen L:**
Neurofibromin is actively transported to the nucleus.
FEBS Lett. 560: 98-102 (2004)
- 154. Vanderweyde T, Yourmans K, Liu-Yesucevitz L:**
Role of stress granules and RNA-binding proteins in neurodegeneration: a mini-review.
Gerontology 59: 524-533 (2013)
- 155. Viskochil D, Buchberg AM, Xu G, Cawthon RM, Stevens J, Wolff RK, Culver M, Carey JC, Copeland NG, Jenkins NA, White R, O'Connell P:**
Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus.
Cell 62: 187-192 (1990)
- 156. Wallace MR, Collins FS:**
Molecular genetics of von Recklinghausen neurofibromatosis.
Adv. Hum. Genet. 20: 267-297 (1991)
- 157. Weiss IM, Liebhaber SA:**
Erythroid cell-specific determinants of α -globin mRNA stability.
Mol. Cell. Biol. 14: 8123-8132 (1994)
- 158. Wickens M:**
How the messenger gets its tail: addition of poly (A) in the nucleus.
Trends Biochem. Sci. 15: 277-281 (1990)
- 159. Wiest V, Eisenbarth I, Schmegner C, Krone W, Assum G:**
Somatic NF1 mutation spectra in a family with neurofibromatosis type 1: toward a theory of genetic modifiers.
Hum. Mutat. 22: 423-427 (2003)
- 160. Williams VC, Lucas J, Babcock MA, Gutmann DH, Korf B, Maria BL:**
Neurofibromatosis Type 1 Revisited.
Pediatrics 123: 124-133 (2009)

-
161. **Wang DO, Martin KC, Zukin RS:**
Spatially restricting gene expression by local translation at synapses.
Trends Neurosci. 33: 173-182 (2010)
162. **Wolkowicz UM, Cook AG:**
NF45 dimerizes with NF90, Zfr and SPNR via conserved domain that has a nucleotidyltransferase fold.
Nucleic Acids Res. 40: 9356-9368 (2012)
163. **Wong GG, Witek JS, Temple PA, Wilkens KM, Leary AC, Luxenber DP, Jones SS, Brown EL, Kay RM, Orr EC, Shoemaker C, Golde DW, Kaufman RJ, Hewick RM, Wang EA, Clark SC:**
Human GM-CSF: Molecular cloning of the complementary DNA and purification of the natural and recombinant proteins.
Science 228: 810-815 (1985)
164. **Wurster SE, Maher LJ:**
Selections that optimize RNA display in the yeast three-hybrid system.
RNA 16: 253-258 (2010)
165. **Xu G, O'Connell P, Viskochil D, Cawthon R, Robertson M, Culver M, Dunn D, Stevens J, Gesteland R, White R, Weiss R:**
The neurofibromatosis type 1 gene encodes a protein related to GAP.
Cell 62: 599-608 (1990)
166. **Young LE, Moore AE, Sokol L, Meisner-Kober N, Dixon DA:**
The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of cyclooxygenase-2.
Mol. Concer Res. 10: 167-180 (2012)
167. **Zhang B, Gallegos M, Puoti A, Durkin E, Fields S, Kimble J, Wickens MP:**
A conserved RNA-binding protein that regulates sexual fates in the *C. elegans* hermaphrodite germ line.
Nature 390: 477-484 (1997)
168. **Zhang L, Shao H, Huang Y, Yan F, Chu Y, Hou H, Zhu M, Fu C, Aikhionbare F, Fang G, Ding X, Yao X:**
PLK1 phosphorylates mitotic centromere-associated kinesin and promotes its depolymerase activity.
J. Biol. Chem. 286: 3033-3046 (2011)
169. **Zhang X, Herring CJ, Romano PR, Szczepanowska J, Brzeska H, Hinnebusch AG, Qin J:**
Identification of phosphorylation sites in proteins separated by polyacrylamide gel electrophoresis.
Anal. Chem. 70: 2050-2059 (1998)

DANKSAGUNG

Aus Datenschutzgründen entfernt.

LEBENS LAUF

Aus Datenschutzgründen entfernt.

Publikationsliste

Veröffentlichungen

1. *10 Jahre Pharmakovigilanzprojekt „Gemeinschaftliche Literaturrecherche und -auswertung“.*
Alexander Silber-Mankowsky, Dr. Tankred Wegener, Melanie Broicher, Dr. Carolin Hand, Dr. Ulrike Paulus, Prof. Dr. Ines Golly, Sabine Adolph, Dr. Olaf Schickling, Dr. Thomas Dobmeyer, Simone Olk, Dr. Alexander Philipp, Dr. Miriam Schlott-Haubold, Andrea Striebel.
Pharmind 75: 1076-1085 (2013)
2. *Long-range sequence composition mirrors linkage disequilibrium pattern in a 1.13 Mb region of human chromosome 22.*
Eisenbarth I, Striebel AM, Moschgath E, Vogel W, Assum G.
Hum Mol Genet. 10: 2833-2839 (2001)
3. *Tumor antigen HuR binds specifically to one of five protein-binding segments in the 3'-untranslated region of the neurofibromin messenger RNA.*
Haeussler J, Haeussler J, Striebel AM, Assum G, Vogel W, Furneaux H, Krone W.
Biochem Biophys Res Commun. 267: 726-32 (2000)

Vorträge

1. *Pharmacovigilance in the Context of RIM.*
eRegulatory Affairs (eRA) Conference
10. bis 11. April 2013 (Rom)
2. *Homöopathika: Besondere Therapierichtung - besondere Pharmakovigilanz?*
Bremer Pharmakovigilanz Kongress
23. bis 24. September 2009 (Bremen)
3. *Specific binding of HuD to the NF1 3'UTR; analysis of RNA stabilizing effects.*
13th Annual Meeting of the German Society of Human Genetics
29. September bis 02. Oktober 2002 (Leipzig)
4. *Analyse von RNA-Protein-Interaktionen (3-Hybrid-System).*
Gradiuertentreffen an der Universität Ulm
24. bis 26. Februar 2000

Poster

1. *A new screening method applied to the identification of proteins interacting with the neurofibromin mRNA.*
Striebel A, Haeussler J, Vogel W, Assum G.
10th International Congress of Human Genetics
15. bis 19. Mai 2001 (Wien)
2. *Identification of proteins interacting with 3'UTR motifs of the neurofibromin mRNA using the yeast three hybrid system.*
Striebel A, Häußler J, Häusler J, Assum G, Krone W.
8th European Neurofibromatosis Meeting
15. bis 19. October 2000 (Ulm)
3. *Search for mutations within the 3'UTR of the neurofibromin mRNA.*
Striebel A, Axmann S, Eisenbarth I, Assum G.
12. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik
22. bis 25. März 2000 (Lübeck)
4. *Protein binding segments in the neurofibromatosis type 1 mRNA act as expression regulatory elements.*
Striebel A, Häußler J, Häusler J, Assum G.
11. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik
24. bis 27. März 1999 (Nürnberg)
5. *The 3'UTR of the neurofibromatosis type 1 (NF1) mRNA is highly conserved and contains at least three potential protein binding sites.*
Striebel A, Häußler J, Assum G.
11. Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Humangenetik
25. bis 28. März 1998 (Jena)