



Posttranskriptionelle Genregulation

- Die Funktion der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress -

Dissertation

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

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Nadine Stöhr

geboren am 19.01.1980 in Lutherstadt Eisleben

Gutachter:

Prof. Behrens
Prof. E. Wahle
Prof. St Kindler

Halle, Juli 2007

Verteidigungsdatum: 21.02.2008

urn:nbn:de:gbv:3-000013408

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000013408>]

M e i n e n E l t e r n ,

Heike und Uwe

"Wenn jemand sucht, dann geschieht es leicht, dass sein Auge nur noch das Ding sieht, das er sucht, dass er nichts zu finden, nichts in sich einzulassen vermag, weil er nur immer an das Gesuchte denkt, weil er ein Ziel hat, weil er vom Ziel besessen ist. Suchen heißt: ein Ziel haben. Finden aber heißt: frei sein, offen stehen, kein Ziel haben."

Hermann Hesse, *Siddhartha*

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Die VICKZ Protein Familie und deren Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation	1
1.1.1	Funktionelle Sequenzmotive und Domänen von ZBP1	2
1.1.2	Das Expressionsmuster von ZBP1	5
1.1.3	Die Funktionen von ZBP1 in der posttranskriptionellen Genregulation.....	6
1.1.3.1	Die lokalisierte Translation der <i>β-Aktin</i> mRNA.....	7
1.1.3.2	Translationelle Repression der <i>IGF-II</i> mRNA.....	9
1.1.3.3	Translationsgekoppelte Regulation der <i>c-myc</i> mRNA-Stabilität.....	10
1.1.3.4	Stabilitätskontrolle von <i>CD44</i> - und <i>βTrCP</i> -mRNA durch ZBP1	12
1.1.4	ZBP1 enthaltende RNP <i>granules</i>	13
1.2	Zellulärer Stress – die Entstehung von stress granules	14
1.3	Zielstellung der Arbeit	20
2	Material und Methoden	21
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien, Enzyme, Größenstandards	21
2.1.2	Bakterien	21
2.1.3	Zelllinien	21
2.1.4	Antikörper	22
2.1.5	Plasmide	23
2.1.6	Oligonukleotide.....	23
2.1.7	Systeme	25
2.1.8	Sonstiges.....	25
2.2	Methoden.....	26
2.2.1	Molekularbiologische und mikrobiologische Methoden.....	26
2.2.1.1	Molekularbiologische Standardmethoden.....	26
2.2.1.2	Mikrobiologische Standardmethoden	26
2.2.1.3	Klonierungen	26
2.2.2	Zellkultur.....	28
2.2.2.1	Kultivierung humaner Zelllinien.....	28
2.2.2.2	Transfektion von U2OS Zellen	28
2.2.2.3	Stressapplikation	29

2.2.3	Biochemische Methoden	29
2.2.3.1	RNA-Isolierung	29
2.2.3.2	Reverse Transkription	30
2.2.3.3	Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	31
2.2.3.4	SDS-PAGE und Western Blotting	33
2.2.3.5	Ko-Immunopräzipitation von ZBP1-mRNA-Liganden	35
2.2.3.6	Mikroarray-Analysen	37
2.2.3.7	Stress-Erholungs-Assay	38
2.2.3.8	Statistische Auswertungen	40
2.2.4	Immunohistologische Methoden	41
2.2.4.1	Immunofluoreszenz	41
2.2.4.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung (FISH)	41
3	Ergebnisse	44
3.1	Funktion der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress	44
3.1.1	Lokalisierung der ZBP Proteinfamilie unter zellulärem Stress.....	44
3.1.1.1	Lokalisierung von endogenen ZBP1 unter verschiedenen Stress-Stimuli	45
3.1.1.2	Lokalisierung von exogenem ZBP1 unter zellulärem Stress	48
3.1.1.3	Lokalisierung von Imp1-3 unter oxidativem Stress	49
3.1.1.4	Lokalisierung anderer RBPs unter oxidativem Stress.....	49
3.1.1.5	Die Überexpression von GFP-ZBP1 induziert keine SG-Bildung.....	51
3.1.1.6	ZBP1 wird nicht <i>processing bodies</i> (PBs) rekrutiert	52
3.1.1.7	Die KH-Domänen drei und vier sind für die SG-Rekrutierung von ZBP1 essentiell	54
3.1.2	Lokalisierung verschiedener mRNAs unter zellulärem Stress.....	57
3.1.2.1	Die Mehrheit zytoplasmatischer mRNAs wird in SGs rekrutiert.....	57
3.1.2.2	Exogene Reporter-mRNAs lokalisieren in SGs unabhängig von <i>cis</i> -agierenden Elementen.....	60
3.1.2.3	ZBP1 assoziiert spezifisch mit dem β -Aktin-Zipcode in SGs	62
3.1.3	Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress	63
3.1.3.1	ZBP1 hat keinen Einfluss auf die SG-Bildung und mRNA-Rekrutierung.....	65
3.1.3.2	Anreicherung verschiedener mRNAs nach Stressinduktion	66
3.1.3.3	Die <i>c-myc</i> mRNA wird unter Stress vermindert abgebaut.....	67
3.1.3.4	Der ZBP1 Knockdown destabilisiert die <i>c-myc</i> mRNA unter zellulärem Stress.....	68

3.1.3.5	ZBP1 Knockdown destabilisiert mRNA-Liganden unter zellulärem Stress.....	70
3.1.3.6	Überexpression von GFP-ZBP1 stabilisiert selektiv <i>β-Aktin</i> und <i>IGF-II</i> mRNA....	72
3.1.3.7	ZBP1 Knockdown destabilisiert selektiv den Zipcode-Reporter.....	73
3.1.3.8	ZBP1 Knockdown destabilisiert mRNA-Liganden spezifisch in SGs.....	75
3.1.3.9	<i>β-Aktin</i> mRNA lokalisiert nicht in PBs nach ZBP1 Knockdown	77
3.1.3.10	Zipcode-Reporter wird nach ZBP1 Knockdown in SGs <i>und</i> PBs destabilisiert	78
3.2	ZBP1 als "gatekeeper" in SGs.....	80
3.2.1	Die "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 in SGs zur Identifizierung neuer mRNA-Liganden.....	81
3.2.1.1	Das SIRL-Verfahren	82
3.2.1.2	Die Anwendung des SIRL-Verfahrens zur Identifizierung von ZBP1-Liganden....	84
3.2.1.3	Die SIRL-Daten basierend auf Mikroarray-Analysen.....	85
3.2.2	Charakterisierung der durch SIRL identifizierten mRNAs.....	86
3.2.2.1	ZBP1 Knockdown destabilisiert putative Liganden unter oxidativem Stress.....	86
3.2.2.2	Assoziation von SIRL-Transkripten mit ZBP1 in ungestressten Zellen	89
3.2.3	Posttranskriptionelle Regulation ausgewählter SIRL-Transkripte durch ZBP1 unter Normalbedingungen	91
3.2.3.1	Einfluss von ZBP1 auf die mRNA-Stabilität putativer mRNA-Liganden.....	92
3.2.3.2	Einfluss von ZBP1 auf die Translation putativer Liganden.....	94
4	Diskussion	96
4.1	ZBP1 assoziiert während der zellulären Stressantwort mit RNA-Liganden in SGs	96
4.2	ZBP1 als "gatekeeper" in SGs.....	100
4.3	SIRL – ein neues stressbasierendes Verfahren zur Identifizierung von RNA-Liganden.....	106
5	Zusammenfassung und Ausblick	108
6	Literatur.....	111
7	Anhang	119
7.1	Abkürzungsverzeichnis	119
7.2	Transfektionen.....	121
7.3	Daten der Mikroarray-Analyse.....	121