

POSTTRANSKRIPTIONELLE EINFLÜSSE AUF DIE EXPRESSION DES TRANSKRIPTIONSFAKTORS ACHAETE-SCUTE HOMOLOG-1 (ASCL1)

vorgelegt von
Dipl.-Ing. Edgar Benko
aus Berlin

von der Fakultät III – Prozesswissenschaften
der Technischen Universität Berlin
zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften
- Dr. rer. nat. -

genehmigte Dissertation

Promotionsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Jens Kurreck, Technische Universität Berlin
Gutachter: Prof. Dr. Michael Fähling, Charité-Universitätsmedizin Berlin
Gutachter: Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl, Technische Universität Berlin

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 29. Oktober 2013

Berlin 2013

D 83



Die Arbeit wurde von April 2008 bis August 2013 unter der Leitung von Prof. Dr. Michael Fähling am Institut für Vegetative Physiologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin angefertigt.

Die Betreuung von Seiten der Fakultät III der Technischen Universität Berlin wurde von Prof. Dipl.-Ing. Dr. Ulf Stahl übernommen.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	1
Tabellenverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	9
1.1 Der Transkriptionsfaktor Achaete-Scute Homolog-1	10
1.1.1 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteinen	10
1.1.2 Bedeutung von Achaete-Scute Homolog-1 in der Neurogenese	12
1.1.3 Achaete-Scute Homolog-1 und Tumoren	14
1.1.4 Regulation von Achaete-Scute Homolog-1	15
1.2 Posttranskriptionelle Regulation	16
1.2.1 Regulationsebenen der Genexpression	16
1.2.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression	17
1.2.2.1 Prozessierung im Zellkern und Export	18
1.2.2.2 mRNA-Abbau im Cytosol	19
1.2.2.3 Der Translationsvorgang und seine Kontrolle	20
1.2.2.4 mRNA-Trafficking und -Lokalisation im Cytosol	21
1.2.3 Einfluss der untranslatierten Regionen einer mRNA (UTRs)	23
1.2.3.1 5'-UTR	24
1.2.3.2 3'-UTR	25
1.3 Zielstellung dieser Arbeit	27
2 Material und Methoden	29
2.1 Molekularbiologische und biochemische Arbeitsmethoden	29
2.1.1 PCRs und Mutagenese	29
2.1.2 Klonierung und verwendete Vektoren	29
2.1.3 Plasmid-DNA-Präparationen	33
2.1.4 RNA-Isolierung	33
2.1.5 mRNA-Quantifizierung mittels Realtime-PCR	34
2.1.6 Gesamt-Proteinpräparationen	34

2.1.7	Isolierung von cytosolischen Proteinen und Kernproteinen	35
2.1.8	Cytosol-Isolierung mit Komplexen in nativen Konstellationen	35
2.1.9	Westernblotting und Proteinquantifizierung	36
2.1.10	Polysomengradienten-Analyse	36
2.1.11	<i>In vitro</i> -Transkription	37
2.1.12	UV-Crosslinking	38
2.2	Zellkultur	38
2.2.1	Zelllinien und Kultivierung	38
2.2.2	Primäre Zellen	40
2.2.3	Immunfluoreszenz	40
2.2.4	Stimulierung der Zellen	40
2.2.5	Transfektion	41
2.2.6	Reportergenassay	41
2.2.7	mRNA-Stabilitätsassay	43
2.2.8	Protein-Stabilitätsassay	43
2.2.9	Bioinformatische Sequenzanalysen	43
2.3	Statistik	44
3	Ergebnisse	45
3.1	Analyse der hASH1-UTRs nach <i>cis</i> -Elementen	45
3.2	Screening nach Stimuli mit Einfluss auf die hASH1-UTRs	46
3.2.1	Aufbau des Reporterkonstrukts	47
3.2.2	Screening im Reportergenassay	48
3.3	Einfluss von Phorbol ester (PMA) auf die hASH1-Expression	49
3.3.1	Die Wirkung von PMA im Reportergenassay ist konzentrationsabhängig	50
3.3.2	PMA erniedrigt die hASH1-mRNA-Menge	50
3.3.3	PMA erniedrigt die hASH1-Protein-Menge	51
3.3.4	Zeitlicher Vergleich des Verhaltens von hASH1-Promotor und -UTRs im Reportergenassay	53
3.3.5	Kurzfristig ist eine mRNA-Destabilisierung für die hASH1-Herabregulation verantwortlich	55
3.3.6	Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) können den Effekt von PMA im Reportergenassay (partiell) aufheben	56
3.3.7	Auf mRNA-Ebene lässt sich die Wirkung von PMA ebenfalls mithilfe von PKC-Inhibitoren abschwächen	58
3.3.8	Suche nach <i>trans</i> -Faktoren	60
3.3.9	Suche nach verantwortlichen <i>cis</i> -Elementen in den UTRs	61
3.4	Einfluss von Hypoxie auf die hASH1-Expression	62
3.4.1	Sinkender Sauerstoffpartialdruck führt zu einer Abnahme der hASH1-Proteinmenge	63

3.4.2	Im Gegensatz zur hASH1-Proteinmenge bleibt die mRNA-Menge unter Hypoxie unverändert	63
3.4.3	Eine Hemmung der Translation ist für die hASH1-Abnahme unter Hypoxie verantwortlich	64
3.4.4	Die Deletion dreier Differenzierungskontroll-Elemente (DI-CE) hebt den Einfluss der 3'-UTR bei der hASH1-Abnahme unter Hypoxie auf	66
4	Diskussion	71
5	Zusammenfassung	85
6	Summary	87
7	Publikationen im Rahmen dieser Arbeit	89
8	Literaturverzeichnis	91
	Danksagung	127

Abbildungsverzeichnis

1.1	Darstellung eines an DNA gebundenen bHLH-Dimers	11
1.2	Posttranskriptionelle Prozesse, denen ein Transkript unterliegt . . .	17
1.3	<i>cis</i> -Elemente in den UTRs einer mRNA	23
2.1	Prinzip des Crosslinkings	39
2.2	Funktionsweise des Reportergenassays	42
3.1	BLAT-Analyse der hASH1-UTRs	46
3.2	Aufbau des Reporterkonstrukts mit den UTRs von hASH1	47
3.3	Screening nach Stimuli mit UTR-vermitteltem Einfluss auf die hASH1-Expression	50
3.4	Dosis-Wirkungs-Beziehung von PMA im Reportergenassay	51
3.5	Zeitkinetik der mRNA-Menge von hASH1 unter PMA	52
3.6	Zeitkinetik der hASH1-Proteinmenge unter PMA	53
3.7	Mash1-Immunfluoreszenz	54
3.8	Vergleich von hASH1- und Mash1-Mengen von Kelly-Zellen und Kortexzellen (Ratte) unter PMA-Einfluss	55
3.9	Zeitlicher Verlauf der Reportergenaktivitäten des UTR- und Promo- torkonstrukts von hASH1	56
3.10	mRNA-Stabilität in Kelly-Zellen	57
3.11	hASH1-Proteinstabilität unter PMA	57
3.12	Einfluss von PKC-Inhibitoren auf die PMA-Wirkung im Reporter- genassay	58
3.13	Zeitkinetik des Staurosporin- und GF109203X-Einflusses auf die mRNA-Menge von hASH1	59
3.14	Einfluss von PKC-Inhibitoren auf die PMA-Wirkung auf mRNA-Ebene	60
3.15	Crosslinking-Experimente	61
3.16	Vergleich des Einflusses von 5'- und 3'-UTR bei der Vermittlung der PMA-Wirkung	62
3.17	Einfluss verschiedener Sauerstoffpartialdrücke auf die hASH1- Proteinmenge	64
3.18	Zeitkinetik der Protein- und mRNA-Menge von hASH1 unter Hypoxie	65
3.19	Polysomengradienten-Analyse	65

3.20	Analyse der verschiedenen Polysomen-Fraktionen unter Hypoxie . .	67
3.21	Untersuchung der hASH1-UTRs im Reportergenassay bzgl. ihres Hypoxie-Einflusses	68
4.1	Zusammenfassung der PMA-Wirkung auf die hASH1-Expression .	76
4.2	Zusammenfassung der Hypoxie-Wirkung auf die hASH1-Expression	83

Tabellenverzeichnis

2.1	Primer der Mutagenese-PCRs	30
2.2	In Reportergenassays benutzte Plasmide	31
2.3	Zur Quantifizierung in Realtime-PCRs benutzte Primer	34
2.4	Verwendete Antikörper	37

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Base)	Co	Kobalt
Ago1	Argonautenprotein-1	CoCl ₂	Kobaltchlorid
Ago1-4	Argonautenproteine 1 bis 4	cpm	Zerfälle pro Minute (<i>engl.</i> counts per minute)
ASCL1	Achaete-Scute Komplex Homolog-1	DICE	Differenzierungskontroll-Element (<i>engl.</i> differentiation control element)
AS-C	Achaete-Scute Komplex	DMSO	Dimethylsulfoxid
ASH1	Achaete-Scute Homolog-1	DNA	Desoxyribonukleinsäure
ATP	Adenosintriphosphat	2,2-DP	2,2-Dipyridyl (auch: 2,2'-Bipyridin)
AUF1	AU-rich element binding protein 1; Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0/ hnRNP D0 (<i>engl.</i>)	DTT	Dithiothreitol
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (<i>engl.</i>)	EDTA	EthylendiamintetraEssigsäure
BLAT	BLAST-Like Alignment Tool (<i>engl.</i>)	eIF	eukaryontischer Translationsinitiationsfaktor
C	Cytosin (Base)	EJC	Exon-Junction-Komplex
°C	Grad Celsius (Temperaturereinheit)	<i>engl.</i>	Englisch
cAMP	Cyklisches Adenosinmonophosphat; Adenosin-3',5'-monophosphat	EtOH	Ethanol
CBC	Kappenbindender Komplex (<i>engl.</i> cap binding complex)	Fe	Eisen
cDNA	zu mRNA komplementäre einzelsträngige DNA	FIH	HIF-inhibierender Faktor (<i>engl.</i> factor inhibiting HIF)
		G	Guanin (Base)
		g	Erdbeschleunigung = 9,81 m/s ²
		g	Gramm (Masseneinheit)
		GABA	γ-Aminobuttersäure

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	l	Liter (Volumeneinheit) (= dm ³)
GEF	G-Nukleotid-Austauschfaktor	LB	komplexes Nährmedium für Bakterien (<i>engl.</i> lysogeny broth)
GTP	Guanosintriphosphat	15-LOX	<i>engl.</i> 15-lipoxygenase
h	Stunde (Zeiteinheit)	m	Meter (Längeneinheit)
H ₂ O	Dihydrogenmonoxid	M	Molar (= mol/l)
<i>hν</i>	Photon, Lichtquant	Mash1	Säuger- bzw. Nagerhomolog von ASH1
hASH1	humanes ASH1	Mdm2	(murine) double minute 2 protein; E3 ubiquitin-protein ligase Mdm2 (<i>engl.</i>)
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure	Met	Methionin
HIF	Hypoxie-induzierbarer Faktor (<i>engl.</i> Hypoxia-inducible factor)	MgCl ₂	Magnesiumchlorid
hnRNP	heterogenes nukleäres Ribonukleoprotein (<i>engl.</i> Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein)	min	Minute (Zeiteinheit)
HRP	Meerrettich-Peroxidase	miRNA	microRNA, kurze nichtkodierende RNA
HuR	Hu-Antigen R; ELAV-like protein 1(<i>engl.</i>)	mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule (Nicht-SI-Einheit des Druckes; 1 mmHg ≈ 133.322 Pa)
IRE	auf Eisen reagierendes Element (<i>engl.</i> iron response element)	mol	Mol (Einheit der Stoffmenge)
IRES	interne Ribosomeneintrittsstelle (<i>engl.</i> internal ribosome entry site)	mRNA	Boten-RNA (<i>engl.</i> messenger RNA)
IRP	Eisen regulatorisches Protein (<i>engl.</i> Iron regulatory element)	mRNP	messenger ribonucleoprotein (<i>engl.</i>)
JNK	c-Jun N-terminale Kinase	N	Asparagin
kb	Kilobasen	N	beliebige Base (A, G, C oder T/U)
KCl	Kaliumchlorid	NaCl	Natriumchlorid
		NaOH	Natriumhydroxid

NMD	Nonsense-vermittelter mRNA Abbau (<i>engl.</i> nonsense mediated mRNA decay)	pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
		POU3F2	POU domain, class 3, transcription factor 2 (<i>engl.</i>); BRN2
NPC	Kernporenkomplex (<i>engl.</i> nuclear pore complex)	pVHL	Von-Hippel-Lindau Tumor Suppressor
ns	nicht signifikant	Q	Glutamin
nt	Nukleotide	RBP	RNA-bindendes Protein
O ₂	Sauerstoff	Realtime-PCR	Echtzeit-PCR
³² P	radioaktives Phosphor-Isotop (β-Strahler)	Re-Oxy	Reoxygenierung
Pa	Pascal (Einheit des Druckes)	RISC	RNA-induced silencing complex (<i>engl.</i>)
PABPC	Poly(A)-Bindungsprotein des Cytosols	RNA	Ribonukleinsäure
PABPN1	Poly(A)-Bindungsprotein des Kerns	RNAi	RNA-Interferenz
PAGE	Polyacrylamid-Elektrophorese	rpm	Umdrehungen in der Minute (<i>engl.</i> rounds per minute)
PB	Prozessierungskörper (<i>engl.</i> P-bodies)	rRNA	ribosomale RNA
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung	s	Sekunde (Zeiteinheit)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>eng.</i> Polymerase Chain Reaction)	S	Svedberg (Einheit des Sedimentationskoeffizienten)
PHD	Prolylhydroxylase (<i>engl.</i> prolyl hydroxylase domain protein)	S.	Seite
PMA	Tetradecanoyl-Phorbol-acetat (<i>engl.</i> Phorbol 12-myristate 13-acetate)	SD	Standardabweichung (<i>engl.</i> standard deviation)
PNEC	pulmonale neuroendokrine Zellen (<i>engl.</i> pulmonary neuroendocrine cells)	SDS	Natriumdodecylsulfat
		SGs	Stress-Granula (<i>engl.</i> Stress granules)
PNS	peripheres Nervensystem	SGZ	subgranuläre Zone des Gyrus dentatus
		SI	Internationales Einheitensystem
		SVZ	subventrikuläre Zone der lateralen Ventrikel
		T	Thymin (Base)

TBE	TRIS-Borat-EDTA		aufwärts des eigentlichen Startcodons (<i>engl.</i> upstream open reading frame)
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan		
tRNA	Transfer-RNA	UTR	untranslatierte Region der mRNA
U	Uracil (Base)		
U	Unit (<i>engl.</i>) (Aktivitätseinheit)	UV	ultraviolett
uORF	offener Leserahmen strom-	ZNS	zentrales Nervensystem

Verwendete SI-Vorsätze:

k	Kilo (Faktor 10^3)
d	Dezi (Faktor 10^{-1})
c	Zenti (Faktor 10^{-2})
m	Milli (Faktor 10^{-3})
μ	Mikro (Faktor 10^{-6})
n	Nano (Faktor 10^{-9})

1 Einleitung

Eines der faszinierendsten Probleme der Biologie stellt die Entwicklung einer befruchteten Eizelle zu den verschiedenen Geweben und Organen eines ausgewachsenen Organismus dar. Das genetische Material wird jeweils an die Tochterzellen weitergegeben, angefangen bei der Zygote, nach der initialen Verschmelzung der haploiden Genome von Eizelle und Spermium, bis hin zu den verschiedenen, aus unterschiedlichen Zellen zusammengesetzten komplexen Strukturen, die den fertigen Organismus bilden. Eine dieser komplexen Strukturen ist das Nervensystem, welches die Gesamtheit aller Nerven- und der sie unterstützenden Gliazellen eines Organismus umfasst. Nervenzellen ermöglichen innerhalb eines vielzelligen Organismus die schnellste Art der Informationsübertragung, die innerhalb einer Nervenzelle nicht auf Diffusion oder gerichtetem Transport von Signalmolekülen, sondern auf der Ausbreitung einer Änderung der elektrischen Spannung über der neuronalen Plasmamembran beruht. Mit dieser Eigenschaft sind Nervenzellen gut gerüstet, ihrer Aufgabe nachzukommen: Signale zu empfangen, weiterzuleiten und zu filtern. Das Nervensystem ist dadurch in der Lage, Informationen über innere und äußere Bedingungen zu sammeln, zu verarbeiten und daraufhin angemessene Reaktionen hervorzurufen.

Doch wie ist es möglich, dass sich aus ein und demselben Genom während der Embryogenese derartige Strukturen mit Zellen unterschiedlichster Eigenschaften bilden können? Bei diesem Prozess spielen vielfältige Regulationsmechanismen zur Steuerung der Zusammensetzung des Proteinrepertoires von Zellen eine Rolle. U.a. erlaubt das abgestimmte Eingreifen von zahlreichen Transkriptionsfaktoren, die an spezifischen Bindungsstellen nahe oder auch weiter entfernt vom Transkriptionsstart der Zielgene binden, eine solche Steuerung in einer zeitlich, räumlich und Zelltyp spezifischen Weise. Dies wiederum lässt Zellen mit unterschiedlichen Eigenschaften entstehen. So können unterschiedliche Zelloberflächenproteine, wie beispielsweise Rezeptoren eine Interaktion mit anderen Zellen erlauben oder verwehren. Des Weiteren ist die Zellfunktion an die Expression spezifischer Gene gekoppelt. So wird beispielsweise Insulin nur durch die β -Zellen der Langerhans'schen Insel-Zellen des Pankreas synthetisiert. Diese Zellen reagieren auf Erhöhungen des Blutzuckerspiegels mit der Ausschüttung dieses Hormons und sorgen damit für eine gesteigerte Glucose-Aufnahme verschiedener Zellen, welche letztendlich zu einer Normalisierung des Blutzuckerspiegels führt.

Ein Transkriptionsfaktor, der eine wichtige Rolle bei der Reifung neuronaler Zellen, ihrer sogenannten Differenzierung, bzw. der Spezifizierung des neuronalen Subtyps spielt, ist das Achaete-Scute Komplex Homolog-1 (ASCL1; hASH1).

1.1 Der Transkriptionsfaktor Achaete-Scute Homolog-1

Schon im frühen 20. Jahrhundert wurden verschiedene Mutanten von *Drosophila melanogaster* beobachtet, welche eine gestörte Ausbildung der, auf Thorax und Kopf befindlichen, großen Borsten (Macrochaetae) aufwiesen [100, 96]. Diesen Veränderungen zugrunde lagen verschiedene Allele des *Achaete*- und des *Scute*-Genes, wobei diese jeweils zu einem Ausbleiben unterschiedlicher Untergruppen der Borsten führten [72, 2, 95, 94]. Zusammen mit zwei weiteren Genen (*lethal of scute*, *asense*) verwandter bHLH-Transkriptionsfaktoren und den angrenzenden Sequenzen, welche *cis*-regulatorische Elemente enthalten, wird der 40 kb große *Achaete-Scute*-Komplex (AS-C) gebildet. Heute weiß man, dass der AS-C von Bedeutung für die ordnungsgemäße Entwicklung des peripheren und zentralen Nervensystems in *Drosophila* ist [100, 269, 96].

Das Nagerhomolog von Achaete-Scute, Mash1, wurde ursprünglich unter Benutzung von degenerierten Primern, die auf Gensequenzen von *Drosophila* Achaete-Scute beruhten, aus einer sympathoadrenalen Vorläufer-Zelllinie der Ratte kloniert [155]. Frühe Experimente zeigten, dass Mash1 für eine ordnungsgemäße Entwicklung des vegetativen Nervensystems sowie von olfaktorischen Neuronen notwendig ist [117]. Mäuse ohne intaktes Mash1 waren nicht mehr imstande, sympathische, parasympathische oder enterische Ganglien zu bilden und starben kurz nach der Geburt aufgrund von u.a. Atmungsinsuffizienz. In neueren Experimenten ist es gelungen, ausdifferenzierte Zellen nicht-neuronalen Ursprungs mithilfe von Mash1 umzuprogrammieren. So genügte die Überexpression von Mash1 zusammen mit zwei weiteren Faktoren (POU domain, class 3, transcription factor 2 (POU3F2); myelin transcription factor 1-like protein (Myt1l)) um Maus-Fibroblasten embryonalen und postnatalen Ursprungs in funktionale Neuronen zu überführen [321].

1.1.1 Strukturelle und funktionelle Eigenschaften von basischen Helix-Loop-Helix (bHLH) Proteinen

hASH1 gehört zu den basischen Helix-Loop-Helix-Proteinen (bHLH-Proteine). Das bHLH-Motiv (siehe Abbildung 1.1) zeichnet sich dadurch aus, dass es einerseits

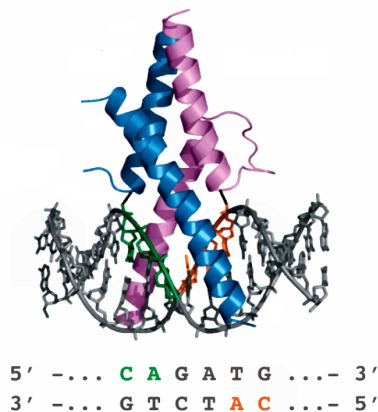


Abbildung 1.1: Exemplarische Darstellung eines bHLH-Dimers (hier: E47 und NeuroD1) gebunden an DNA. Die Dimerisierung wird über die α -Helices ermöglicht. Darunter ist das aus zwei Teilen (grün und orangefarben) zusammengesetzte E-Box-Motiv, welches durch bHLH-Dimere gebunden wird, dargestellt. Entnommen [192].

für die DNA-Bindung zuständig ist und andererseits der Dimerisierung dient. Die Helices sind amphipatisch, wobei die hydrophoben Aminosäuren derart alternierend angeordnet sind, dass sie alle auf einer Seite der Helix präsentiert werden. Die Interaktion mit einem weiteren bHLH-Protein erfolgt nun über die hydrophoben Seiten der Helices [136]. Der basische Bereich des bHLH-Motivs hingegen ist für die DNA-Bindung zuständig. Das bHLH-Motiv wurde bereits in 125 humanen Transkriptionsfaktoren gefunden [175]. bHLH-Proteine können Homo- sowie Heterodimere bilden, wobei die Wahl des Dimerisierungspartners Auswirkungen auf Zellproliferation und Differenzierung haben kann [200].

Eine Einteilung der bHLH-Proteine in verschiedene Klassen I-VII erfolgte aufgrund unterschiedlicher Eigenschaften wie z.B. ihrer Verteilung in den Geweben, ihrem Dimerisierungsverhalten und ihrer DNA-Bindungsspezifitäten [200, 219]. Proteine der Klasse I und II dimerisieren ausschließlich über ihre bHLH-Domäne, während Mitglieder anderer Klassen über weitere Dimerisierungsdomänen wie beispielsweise das Leucin-Zipper-Motiv verfügen [194]. Klasse I Proteine wie E12 und E47 werden ubiquitär exprimiert und können Homodimere bilden. Klasse II Proteine, zu denen auch ASCL1 gehört, werden hingegen gewebsspezifisch exprimiert und benötigen im Allgemeinen Klasse I Proteine als Dimerisierungspartner.

bHLH-Faktoren binden als Dimer eine pseudo-palindromische Konsensussequenz, CANNTG, die als E-Box bezeichnet wird [24]. Die Bindungspräferenzen für die beiden zentralen Basen sowie die an das E-Box-Motiv angrenzenden Basen werden durch die Zusammensetzung des Dimers bestimmt, wobei jedes Monomer je eine Halbseite des E-Box-Motives erkennt. Neben den aktivierenden bHLH-Transkriptionsfaktoren, wie beispielsweise ASCL1, gibt es auch solche, die eine reprimierende Funktion ausüben. Dazu gehört z.B. das Säugerhomolog 1 des *Drosophila*-Gens *hairy and enhancer of split* (HES-1). Dieser Transkriptionsfaktor bindet anstelle des E-Box-Motivs mit höherer Affinität N-Box-Motive bzw. Klasse

C-Bindungsstellen (CACNAG bzw. CACG(C/A)G). HES-1 kann die Transkription an Bindungsstellen selbst oder über die Rekrutierung von Korepressoren aktiv reprimieren. Zudem kann er mit bHLH-Proteinen Dimere bilden, die dann nicht mehr in der Lage sind E-Box-Motive zu erkennen, was zu einer passiven Reprimierung der betroffenen Gene führt [156].

1.1.2 Bedeutung von Achaete-Scute Homolog-1 in der Neurogenese

Die Vorläuferzellen, die das Nervensystem von Vertebraten bilden, können in ihrer Entwicklung bis auf eine epitheliale Zellschicht, das Ektoderm, welches die äußere Schicht des Embryos während der Gastrulation bedeckt, zurückverfolgt werden. Die ektodermalen Zellen bilden verschiedene Zell- bzw. Gewebsabkömmlinge abhängig von ihrer axialen Position. Der am weitesten dorsal gelegene Bereich des Ektoderms verdickt sich und bildet dabei die Neuralplatte, eine Struktur mit der Form eines Schlüssellochs und einem kaudal gelegenen breiten Ende. Während eines komplexen morphogenetischen Prozesses, der Neurulation, kommt es zur Bildung des Neuralrohres. Dabei entsteht in der Neuralplatte eine schmale Vertiefung, wobei sich daran beidseitig angrenzend Wülste erheben und letztendlich von der Mitte des Keimlings aus miteinander verschmelzen [296].

Das so gebildete Neuralrohr stellt den Ausgang für Gehirn und Rückenmark, den beiden Bestandteilen des zentralen Nervensystems (ZNS), dar, wobei aus dem Bereich der Verschmelzung der Wülste die Zellen der Neuralleiste hervorgehen. Diese Zellen sind der Ursprung zur Bildung des peripheren Nervensystems (PNS). Am rostralen Ende des Neuralrohres bilden sich drei miteinander verbundene Kammern, wobei aus dem sie umgebenden Gewebe die drei Hauptanteile des Gehirns hervorgehen: Prosencephalon (bestehend aus Telencephalon und Diencephalon), Mesencephalon und Rhombencephalon (aus Cerebellum, Pons und Medulla oblongata bestehend). Aus den Kammern gehen die später Ventrikel genannten Liquor-gefüllten Hohlräume des Gehirns hervor. Die proliferierenden Zellen des Neuralrohrs in der ventrikulären Zone bilden nun die Grundlage für Nerven- und Gliazellen des ZNS und migrieren von dort zu den Orten ihres zukünftigen Wirkens [296].

Im ZNS von Säugern werden verschiedene Neurone vielschichtig miteinander verschaltet, um komplexe neuronale Funktionen zu erfüllen. Für die Entstehung dieses komplexen ZNS-Aufbaus müssen verschiedene Populationen an Neuronen, die zu spezifischen Regionen zeitlich präzise während der Embryogenese wandern, generiert werden. Die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen sind noch nicht gänzlich aufgeklärt. Die bHLH-Transkriptionsfaktoren scheinen jedoch eine zentrale Rolle bei der Erzeugung der neuronalen Diversität, über die Regulierung der

Subtyp-Spezifizierung sowie bei der Differenzierung, einzunehmen [21].

Mash1 ist ein bHLH-Transkriptionsfaktor, dessen räumlich spezifische Expression auf proliferierende Regionen des sich entwickelnden Gehirns und des Rückenmarks begrenzt ist. Dabei ist die Mash1-Expression nur transienter Natur und geht zurück sobald die Mash1-exprimierenden Zellen den Zellzyklus verlassen und zum Ort ihres zukünftigen Wirkens migrieren. Verschiedene Studien an Mausembryos mit ausgeschalteter Mash1-Expression deuten darauf hin, dass Mash1 ein neuronaler Differenzierungsfaktor ist, der für die Bildung von verschiedenen spezifischen neuronalen Subtypen während der Entwicklung des zentralen und peripheren Nervensystems von Bedeutung ist [86, 127, 141, 220, 245, 247].

Viele Neuronen und Oligodendrocyten, Zellen eines Gliazelltyps, gehen auf Mash1-exprimierende neuronale Vorläuferzellen verschiedener Phasen der Embryogenese zurück. So konnten Zellen die einstmalig Mash1 exprimiert hatten, beispielsweise in jedem der Hauptanteile des Mäusegehirns nachgewiesen werden [160]. Die Gruppe der, nach Mash1-Expression gebildeten, reifen Zellen beinhaltet im Prosencephalon u.a. Interneurone des Riechkolbens, Interneurone der Hirnrinde, cholinerge Interneurone der Amygdala und hippocampale Pyramidenzellen sowie Körnerzellen [160, 191, 239, 44, 198, 256]. Im Mesencephalon beinhaltet diese Gruppe z.B. glutamaterge und GABAerge Neuronen von Colliculi inferiores/superiores, Zellen der Nuclei (Ansammlung von Nervenzellkörpern/Somata) des Thalamus und neuroendokriner Zellen des Hypothalamus [160, 212, 221, 318, 323, 205]. Und im Rhombencephalon gehören zu den reifen Zellen mit vormaliger Mash1-Expression beispielsweise die Purkinjezellen des Cerebellums, noradrenerge Neuronen des Locus caeruleus und serotonerge Neurone des Nucleus raphe dorsalis [160, 263, 135, 245] und im Rückenmark z.B. die dI3-, dI5- und v2-Neuronen [127, 179, 330].

In Abkömmlingen von Neuralleistenzellen ist Mash1 an der Bildung des vegetativen Nervensystems beteiligt. Sobald sich im Nager die Neuralleistenzellen um die dorsalen Aorten aggregiert haben, beginnt in ihnen die Expression von Mash1 [116, 188]. Im ZNS wirkt Mash1 als proneurales Protein [21, 273] und ist zudem involviert in die Spezifizierung des neuronalen Subtyps [240]. Das scheint jedoch bei Neuronen die aus Neuralleistenzellen hervorgehen nicht der Fall zu sein. Hier wird Mash1 für die Expression von pan-neuronalen Markergenen benötigt [240, 294].

Die große Bandbreite an verschiedenen neuronalen Subtypen (und zusätzlich den Oligodendrocyten), die aus Mash1-exprimierenden Zellen hervorgehen, lässt sich durch das Zusammenwirken von Mash1 mit verschiedenen anderen Faktoren bei der Spezifizierung des Subtyps erklären. Zu diesen Faktoren gehören beispielsweise andere bHLH-Proteine, Homeodomänenproteine wie Phox2b und Phox2a [189, 216, 242, 243, 299] und auch Zinkfingerproteine wie GATA-3 [181, 235].

Durch seine Beteiligung an der Reifung dieser Vielzahl an Neuronen ist es nicht ver-

wunderlich, dass bei Verlust von Mash1 viele Bereiche des Nervensystems betroffen sind. Dabei muss es nicht unbedingt nur zum Verlust verschiedener Neuronentypen kommen, es kann ebenso zur verspäteten Bildung bestimmter Neurone führen, da Mash1 auch in die zeitliche Koordination von Differenzierungsvorgängen involviert ist [244].

Die Wirkung von Mash1 ist nicht nur auf die Embryonalentwicklung beschränkt. Auch im adulten Organismus findet eine Differenzierung von Zellen unter Mitwirkung von Mash1 statt. Orte für die Neubildung von Zellen aus adulten Stammzellen sind die subventrikuläre Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel sowie die subgranuläre Zone (SGZ) des Gyrus dentatus, einem Teil des Hippocampus [90, 8, 306]. Die adulte Neurogenese scheint dabei entscheidend für die Gehirnfunktion zu sein und könnte auch bei neurologischen Erkrankungen eine Rolle spielen [280, 345]. Mash1 wird in Ratten jedoch nur in der SVZ exprimiert. Man nimmt an, dass Mash1 dabei an der Generierung von zumindest einigen olfaktorischen Neuronen mitwirkt, die während des gesamten Lebens gebildet werden [239, 161]. Eine retroviral-vermittelte Überexpression von Mash1 in der SVZ zeigte auch keine großen Veränderungen der olfaktorischen Neurogenese, wogegen eine solche Überexpression in adulten hippocampalen Stammzellen der SGZ (welche eigentlich keine Mash1-Expression aufweisen) dazu führte, dass statt der eigentlich von diesen Zellen gebildeten exzitatorischen Körnerzellen, aus ihnen Oligodendrocyten ausgebildet wurden [150].

1.1.3 Achaete-Scute Homolog-1 und Tumoren

Während der Neurogenese büßen die anfänglich pluripotenten Zellen auf ihrem Weg hin zur ausdifferenzierten Zelle nach und nach ihr Vermögen ein, sich in unterschiedliche Zelltypen zu entwickeln. Dabei verlieren die Zellen bestimmte Fähigkeiten der Vorläuferzellen und gewinnen andere Eigenschaften, wie z.B. die Fähigkeit zur Synthese von Neurotransmittern im differenzierten Zustand hinzu. Im Gegensatz zu stärker differenzierten Zellen bilden unreifere Zellen aggressivere Tumore [124]. Die Krebszellen verfügen dabei über eine Reihe von für den Organismus nachteiligen Eigenschaften der Ausgangszellen, wie eine hohe Proliferationsrate, Plastizität und erweiterte Migrationsfähigkeiten, welche maßgeblich die Gefährlichkeit der Krebszellen bestimmen.

Neuroblastome sind Tumore, die in erster Linie bei Kindern vor dem fünften Lebensjahr auftreten. Die Neuroblastomzellen haben dabei Eigenschaften, die denen von undifferenzierten Zellen des sich entwickelnden Sympathikus ähneln. Deshalb werden Neuroblastoma-Zelllinien nicht nur benutzt um Charakteristika des entsprechenden Tumors, sondern um neuronales Wachstum und Differenzierung im Allgemeinen zu untersuchen [14]. In einer Studie zeigte ein Großteil der getesteten

humanen Neuroblastom-Zelllinien eine hASH1-Expression, welche bei induzierter Differenzierung schnell herabreguliert wurde [113]. Zudem war es nicht möglich in Zelllinien ohne hASH1-Expression mit derselben Behandlung eine Differenzierung zu induzieren [113, 144]. Doch konnte bei einer Studie mit 61 primären Neuroblastomen, von denen 40 hASH1 exprimierten, kein klarer Zusammenhang von hASH1-Expression zu klinischen Parametern wie dem Stadium des Tumors hergestellt werden [98, 144]. Zudem war es möglich Neuroblastom-Zellen mit konstitutiver hASH1-Expression zu erzeugen, in denen dennoch eine Differenzierung induziert werden konnte [293].

hASH1 scheint aber auch bei einigen Formen von Lungenkrebs von Bedeutung zu sein. So wird hASH1 nicht nur in normalen fetalen pulmonalen neuroendokrinen Zellen (*engl.* pulmonary neuroendocrine cells, PNECs) sondern auch in Bronchiolalkarzinomen mit neuroendokrinen Eigenschaften exprimiert [29, 16, 183]. Von PNECs nimmt man an, dass sie wichtig für die Entwicklung und Wachstumsregulation von Epithelzellen der Lunge sind. Es konnte gezeigt werden, dass ein Verlust von Mash1 zum Verlust von PNECs in der Lunge führt [29], wohingegen eine konstitutive Mash1-Expression die Bildung von Lungentumoren mit neuroendokrinen Eigenschaften begünstigte [182]. Dass Achaete-Scute Homolog-1 einen förderlichen Einfluss auf Wachstum und Überleben von Tumoren mit neuroendokrinen Eigenschaften ausübt, lässt sich wohl über seine Fähigkeit erklären, putative Tumorsuppressorgene zu reprimieren [228].

1.1.4 Regulation von Achaete-Scute Homolog-1

Obwohl man schon einiges über die Funktion von Achaete-Scute Homolog-1 und seine Rolle bei der Differenzierung und Subtypspezifikation von Neuronen weiß, so ist doch über seine eigene Regulation wenig bekannt. Auf transkriptioneller Ebene wurde mit HES-1 der bisher einzige direkte Modulator der Achaete-Scute Homolog-1-Expression gefunden. Seine Überexpression führte zu einer Hemmung der durch NGF (*engl.* Nerve growth factor) stimulierten Differenzierung hippocampaler Neurone und zu einer Abnahme der endogenen Mash1-Expression [46]. Eine Möglichkeit der hASH1-Regulation über HES-1 verläuft über den Notch Signalweg [113]. Die Aktivierung von Notch-Rezeptoren führt zu deren Interaktion mit dem DNA-Bindungsprotein RBP-Jk (*engl.* recombining binding protein suppressor of hairless). Dieses wiederum hat eine verstärkte Bildung von HES-1 zur Folge, welches nun seinerseits Zielgene wie hASH1 reprimiert [51, 13, 14].

Zudem gibt es Hinweise dass der Transkriptionsfaktor POU3F2 (*engl.* POU domain, class 3, transcription factor 2) an der hASH1-Regulation in bestimmten Bronchiolalkarzinom-Zelllinien beteiligt ist [145]. Transkriptionsfaktoren der POU-

Familie sind unentbehrlich für Zelldifferenzierung und eine ordnungsgemäße Organentwicklung [278, 122, 67]. Putative POU3F2-Bindungsstellen in der hASH1-Promotorregion könnten diese Regulation vermitteln, wobei der Nachweis einer direkten transkriptionellen Aktivierung der hASH1-Expression durch POU3F2 noch fehlt [145].

Auf posttranskriptioneller Ebene konnte das Fragile X Mental Retardation Protein (FMRP) als Regulator identifiziert werden [83]. Dieses RNA-Bindungsprotein interagiert mit einer U-reichen Sequenz in der 5' untranslatierten Region (UTR) der hASH1-mRNA. Das führt dazu, dass die Translationseffizienz der hASH1-mRNA steigt. So konnte mittels Polysomengradienten-Analyse bei FMRP-Überexpression ein höherer Besetzungsgrad der hASH1-Transkripte mit Ribosomen gezeigt werden, was als Hinweis auf eine erhöhte Translationsrate gilt. Eine Fehlregulation des zu FMRP gehörigen Gens *FMR1* ist verbunden mit neuronalen Erkrankungen wie dem Fragilen X-Syndrom [225, 167, 320, 332].

Da der Fokus dieser Arbeit auf der posttranskriptionellen Kontrolle der hASH1-Synthese lag, soll im Folgenden ein Überblick über Prozesse und Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation gegeben werden.

1.2 Posttranskriptionelle Regulation

1.2.1 Regulationsebenen der Genexpression

Die Gesamtheit aller in einer Zelle zu einem bestimmten Zeitpunkt exprimierten Proteine, ihr sogenanntes Proteom, ist nicht nur von Zelltyp zu Zelltyp verschieden, sondern muss sich auch zeitlich bzw. situationsbedingt anpassen. Die Kontrolle der Genexpression kann dabei auf verschiedenen Ebenen stattfinden (siehe Abbildung 1.2). So unterliegt die Transkription einer Kontrolle durch *cis*-Elemente wie Promotoren, Enhancer und Silencer sowie den daran bindenden Faktoren. Epigenetische Veränderungen der DNA und deren Chromatinstruktur sind dabei ebenso von Bedeutung [227, 17, 178, 121].

Posttranskriptionelle Prozesse spielen ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Genexpression. Eine Regulation kann dabei während der Prozessierung, beim Export aus dem Kern sowie der zellulären Lokalisation, der mRNA-Stabilität und Translationseffizienz stattfinden.

Hinzu kommt, dass Proteine oftmals selbst einer Regulation unterliegen. So können Proteine vielfältigen Modifizierungen ausgesetzt sein. Dazu gehören u.a. Ubiquitinierungen, Phosphorylierungen, Hydroxylierungen, Glykosylierungen, proteolytische

1.2 Posttranskriptionelle Regulation

Spaltungen und das Anhängen von Fettsäuren. Anlagerung oder Dissoziation von anderen Faktoren können ebenso wie die Modifizierungen zu Aktivitätsänderungen von Proteinen aber auch zur Änderung ihrer Stabilität führen.

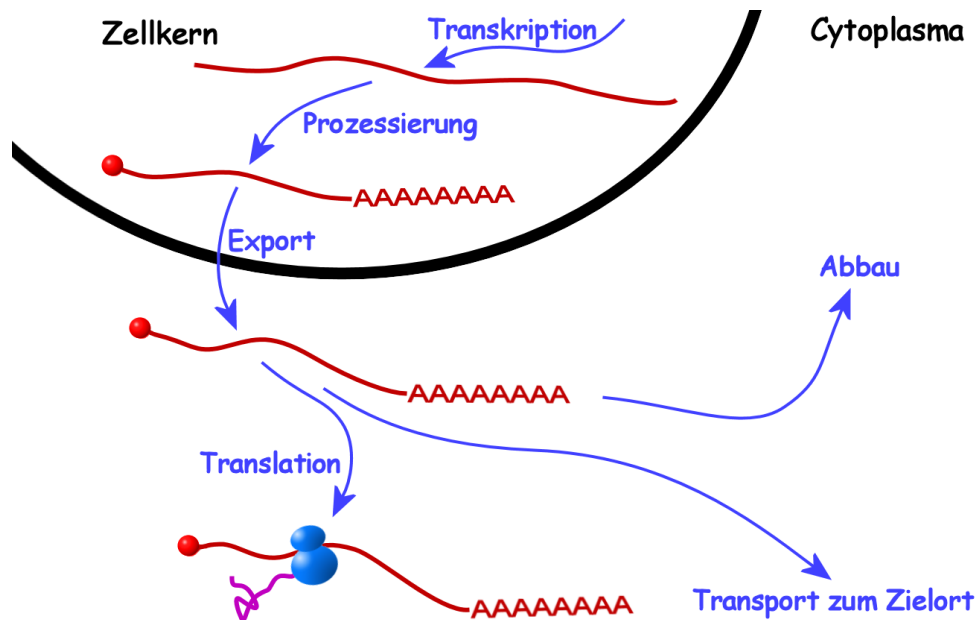


Abbildung 1.2: Das primäre Transkript ist vielfältigen Reifungsschritten unterworfen, bis es als mRNA im Cytosol der Translation zugeführt wird, einem Transport zu seinem Zielort unterliegt oder abgebaut wird.

1.2.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression

Die posttranskriptionelle Regulation stellt nicht nur ein Werkzeug zum abgestimmten Feintuning der Genexpression dar. Sie ermöglicht auch eine maßgebliche Verstärkung über die in der Transkription vorgegebene Aktivierung oder Reprimierung hinaus. Mehr noch: Sie gestattet oftmals eine deutlich schnellere Reaktion. So liegen selbst bei komplettem Transkriptionsstopp eines Gens immer noch Restbestände an mRNA vor, die weiter translatiert werden könnten. D.h. die Auswirkungen auf den Protein-Pool würden erst mit einiger Verzögerung eintreten können. Eine posttranskriptionelle Regulation über eine Stilllegung der mRNA auf Translationsebene würde sich somit deutlich früher auswirken. Eine Antwort auf posttranskriptioneller Ebene kann z.B. auf Entwicklungs- oder Umgebungsstimuli wie Cytokine, Hormone oder Temperaturänderungen aber auch als Reaktion auf Stresssituationen wie Hypoxie, Hypokalzämie, virale Infektionen oder Gewebsverletzungen hin erfolgen. Zudem konnten fehlregulierte posttranskriptionelle Prozesse bereits mit verschiede-

nen Erkrankungen wie beispielsweise der Thalassämie oder der Alzheimer-Krankheit in Zusammenhang gebracht werden [327, 61, 42].

1.2.2.1 Prozessierung im Zellkern und Export

Die Prozessierung einer Prä-mRNA beginnt schon während ihrer Transkription. Dazu gehört das Anfügen einer 5'-Kappenstruktur, welche durch ein methyliertes Guanosin gebildet wird, das über drei Phosphatreste in einer 5'-5' Bindung mit dem ersten Nukleotid des Transkripts verknüpft wird [343, 290]. Auch das Spleißen findet ko-transkriptionell statt [59], wobei das Spleißosom den katalytisch tätigen Komplex, der die enzymatischen Reaktionen beim Entfernen der Introns und der Ligation der flankierenden Exons übernimmt, darstellt. In höheren Eukaryonten führt die pure Anwesenheit von putativen Spleißstellen allein jedoch nicht notwendigerweise zu deren Auswahl durch das Spleißosom. Flankierende regulatorische Elemente der Prä-mRNA bzw. die daran bindenden *trans*-Faktoren können die Rekrutierung von Spleißosom-Komponenten fördern oder unterdrücken und bilden damit die Grundlage für alternatives Spleißen, so dass aus ein und derselben Prä-mRNA verschiedene Proteine hervorgehen können [43, 292].

Das RNA-Editing sei hier nur kurz erwähnt, da es zwar auch in Neuronen und Zellen des Immunsystems relevant ist, jedoch hauptsächlich bei der Expression mitochondrialer Gene eine Rolle spielt. Dabei kommt es zu einem Austausch bzw. einer Insertion oder Deletion einzelner oder mehrerer Nukleotide im Transkript und kann somit auch zu abgeänderten Proteinen oder veränderter Expression führen [25, 109, 237, 207].

Die Fertigstellung des 3'-Endes stellt den letzten Schritt der Prozessierung der Prä-mRNA dar. Dieser Vorgang ist auch gleichzeitig an den Abbruch der Transkription gekoppelt. Bis auf wenige Ausnahmen wird hierbei das Transkript 10 – 30 nt stromabwärts einer Signal-Sequenz (konservierte AAUAAA Sequenz in Säugern) unter Mitwirkung mehrerer Proteine endonukleolytisch geschnitten und an der Schnittstelle durch die Poly(A)-Polymerase polyadenyliert [260]. Der so gebildete Poly(A)-Schwanz ist mit der 5'-Kappenstruktur insofern vergleichbar, als dass auch er wichtig für die Stabilität sowie die Translationseffizienz der mRNA ist [70]. So bestimmt die Länge des Poly(A)-Schwanzes maßgeblich die Halbwertszeit einer mRNA mit. Ähnlich dem Spleißen können Transkripte auch mehrere potentielle Polyadenylierungsstellen besitzen, die ebenfalls zu verschiedenen langen 3'-UTRs aber auch zu unterschiedlichen Proteinen führen können [315]. Die der alternativen Polyadenylierung zugrunde liegenden Mechanismen sind jedoch noch weitgehend ungeklärt [336].

Fertig prozessierte mRNAs müssen für die Translation ins Cytosol exportiert wer-

den. Der Export einer reifen mRNA über die Kernporenkomplexe (NPCs) verläuft dabei nur im Kontext mit den im Zellkern, auch infolge der Prozessierung, am Transkript angelagerten Proteinen [159, 215]. So findet sich beispielsweise an der 5'-Kappenstruktur der aus zwei Untereinheiten aufgebaute Kappen-bindende Komplex (CBC) ein [287], und infolge des Spleißens bildet sich etwa 20nt stromaufwärts von der Spleißstelle ein als Exon-Junction-Komplex (EJC) bezeichneter Protein-Komplex als Überbleibsel bzw. Markierung eines stattgefundenen Spleißvorgangs [133]. Und auch am Poly(A)-Schwanz bindet ein, als Merkmal einer reifen mRNA, wichtiges Protein, das Poly(A)-Bindungsprotein des Kerns (PABPN1)[196]. Dazu kommen weitere RNA-bindende Proteine (RBPs), die in ihrer Gesamtheit das Transkript um eine weitere Facette an Informationen ergänzen, die für Export, Lokalisation, Translation und Stabilität der mRNA von Bedeutung sind [105, 215].

Die an der reifen mRNA angelagerten Proteine können nun selbst oder über Interaktion mit anderen Proteinen mit Komponenten des NPC sowie mit für den Export wichtigen Faktoren in Wechselwirkung treten. Einige der mit dem Transkript assoziierten Proteine bleiben mit der mRNA über den Export hinaus verbunden, während andere auf den Zellkern beschränkt dort verbleiben. Im Cytosol selbst findet ein weiterer Austausch an Proteinen an der mRNA statt. Hierbei spielt insbesondere der erste Translationsdurchgang (*engl.* pioneering round of translation) eine entscheidende Rolle [197].

1.2.2.2 mRNA-Abbau im Cytosol

Die Regulation der mRNA-Stabilität im Cytosol stellt einen wichtigen Kontrollpunkt der Genexpression dar. Die Stabilität einer mRNA wird dabei durch spezifische Interaktionen zwischen ihren strukturellen Elementen und RBPs gesteuert. Diese Wechselwirkungen können allgemeinerer Natur oder für eine gewählte mRNA spezifisch sein [115].

Cytosolische mRNA-Level spiegeln einerseits die Raten von Transkription, Prozessierung sowie Export und andererseits deren cytosolische Abbauraten wieder. Stabile mRNAs erlauben ein ausgedehnteres Zeitfenster für die Translation von Genen, die auf hohem Niveau exprimiert werden müssen, wie es beispielsweise für β -Globulin der Fall ist [277]. Im Gegensatz dazu verfügen mRNAs von Proteinen, die nur in kurzen kräftigen Schüben aufgrund von externen oder internen Stimuli exprimiert werden, über geringe Halbwertszeiten [281, 272, 246, 300].

Der Poly(A)-Schwanz und an ihn gebundenes Poly(A)-Bindungsprotein (PABPC) tragen maßgeblich zum Schutz der mRNA vor vorzeitigem nukleolytischem Abbau bei. Außerdem fördert ein intakter Poly(A)-Schwanz die Translation, welche ihrerseits wiederum die mRNA-Stabilität beeinflusst [279, 272]. Daher ist es nicht

verwunderlich, dass ein Weg des mRNA-Abbaus über die Deadenylierung des Transkripts führt, woran mindestens eine Poly(A)-Ribonuklease (PARN) beteiligt ist [164, 165]. Daran gekoppelt ist in Hefe wie auch in Säugern die Entfernung der 5'-Kappenstruktur [57, 19]. Diese bildet normalerweise mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E im Cytoplasma einen mRNA-stabilisierenden Komplex [262]. Zudem würde der Wegfall der 5'-Kappenstruktur einen gleichzeitigen exonukleolytischen Abbau über die 5'-Seite ermöglichen [32].

Der Nonsense-vermittelte Abbau (NMD) scheint Teil eines mRNA-Überwachungssystems gegen fehlerhafte Transkripte im Cytosol zu sein. Diesem Abbau können Transkripte anheimfallen, welche übermäßig lange 3'-UTRs besitzen, über ungespleißte Introns oder über im Leserahmen liegende Stopp-Codons stromaufwärts von EJC's verfügen. Dadurch wird verhindert, dass unüblich verkürzte Proteine synthetisiert werden. In der Hefe beinhaltet dieser Weg eine Deadenylierungs-unabhängige Entfernung der 5'-Kappe gefolgt von einem Abbau der mRNA in 5'-3'-Richtung [58, 129, 128, 335, 47]. Die Kontrolle der Transkriptqualität scheint aber nicht die einzige Aufgabe des NMD zu sein. So regulieren eine Reihe von Spleißfaktoren ihre eigene Expression bei zu hohen zellulären Proteinkonzentrationen über den NMD. Dieses wird durch eine Veränderung des Spleißmusters erreicht, so dass infolge von alternativem Spleißen eine mRNA gebildet wird, die einen EJC stromabwärts eines Stopp-Codons trägt und die mRNA somit als NMD-Substrat ausweist [204, 298].

Einige mRNAs in Säugern werden endonukleolytisch und somit Deadenylierungs-unabhängig abgebaut [19]. Dabei folgt dem endonukleolytischen Schnitt des Transkripts ein exonukleolytischer Abbau der beiden Fragmente, wobei das 5'-Fragment in 3'-5'-Richtung und das 3'-Fragment wohl in 5'-3'-Richtung abgebaut wird. Einige der Endonukleasen sind konstitutiv aktiv, so dass eine Regulation über ihren Zugang zu den Schnittstellen stattfindet. Während andere Endonukleasen hingegen direkt reguliert werden [180].

1.2.2.3 Der Translationsvorgang und seine Kontrolle

Die Translation kann in drei unterschiedliche Phasen eingeteilt werden: Initiation, Elongation und Termination. Unter Initiation versteht man alle Ereignisse, die zur Positionierung des zur Elongation fähigen 80S-Ribosoms am Translationsstartcodon führen. Während der Elongation findet die Synthese des Polypeptids statt. Das fertige Polypeptid wird entlassen sobald das Ribosom auf ein Stopp-Codon während der Termination der Translation trifft [170]. Vieles spricht dafür, dass die Initiation den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt der Translation darstellt. Daher ist es kaum überraschend, dass ein Großteil der Regulation der Translation über die Kontrolle der Initiation verläuft [97, 138, 201, 259].

Der erste Schritt der Bildung des 43S-Präinitiationskomplexes ist die Zusammenlagerung des ternären Komplexes. Dieser setzt sich aus dem eukaryontischen Translationsinitiationsfaktor eIF2, der Starter-tRNA Met-tRNA_i^{Met} und GTP zusammen. Seine Bildung wird durch den G-Nukleotid-Austauschfaktor (GEF) eIF2B reguliert. Die Bindung des ternären Komplexes an die kleine ribosomale Untereinheit wird unabhängig voneinander durch die Initiationsfaktoren eIF1, eIF1A und eIF3 in Säugern unterstützt [253, 259, 6]. Der so gebildete 43S-Präinitiationskomplex ist nun bereit zur Bindung an das 5'-Ende der mRNA.

Die Erkennung der 5'-Kappenstruktur wird über den im Cytosol zur Kappenstruktur rekrutierten Translationsinitiationsfaktor eIF4E im Verbund mit eIF4G und eIF4A vermittelt. eIF4G wirkt dabei als Gerüstprotein während eIF4A über seine Helikase-Aktivität ein Aufwinden von Sekundärstrukturen in der 5'-UTR und darüber das Scannen des Präinitiationskomplexes entlang der mRNA hin zum Translationsstart ermöglicht [131, 253, 259]. Sobald der Präinitiationskomplex auf das Startcodon trifft, führt die durch eIF5 geförderte Hydrolyse des von eIF2 gebundenen GTPs zur Dissoziation der meisten Translationsinitiationsfaktoren von der kleinen ribosomalen Untereinheit [131]. Die Anlagerung der großen ribosomalen Untereinheit (60S) wird nun durch eIF5B-GTP gefördert, wobei die Bildung des 80S-Ribosoms seinerseits die GTP-Hydrolyse durch eIF5B stimuliert und das Ribosom in einen zur Peptidsynthese kompetenten Komplex überführt [176, 252, 289].

Alle hier vorgestellten Schritte der Initiation der Translation können einer Regulation unterliegen. So kann die Bildung von aktivem ternären Komplex gestört werden, indem eine der Untereinheiten von eIF2 phosphoryliert wird. Dies verhindert bei eIF2 den Austausch von GDP zu GTP. Hinzu kommt, dass eIF2B, der zugehörige GEF, eine höhere Affinität zu phosphoryliertem eIF2 besitzt [275]. Dadurch wird die Bildung von aktivem ternären Komplex behindert und die Translation somit global herabreguliert [63, 97, 138, 270]. Eine andere Möglichkeit stellt die Inhibition von eIF4E dar. Dabei binden inhibitorische Proteine (4E-BPs) an eIF4E und verhindern damit seine Interaktion mit eIF4G [266]. Zusätzlich zu den 4E-BPs können aber auch andere Proteine an eIF4E in einer mRNA-spezifischen Weise binden und ebenfalls die Initiation der Translation stören. Weitere Möglichkeiten der Translationskontrolle wie beispielsweise die Verhinderung der Assoziation der beiden ribosomalen Untereinheiten sollen weiter unten noch ausführlicher betrachtet werden.

1.2.2.4 mRNA-Trafficking und -Lokalisation im Cytosol

Die gezielte Lokalisation einer mRNA innerhalb einer Zelle ermöglicht die räumliche Kopplung von der Synthese des von ihr kodierten Proteins mit dem Ort seines zukünftigen Wirkens [68]. Bei Nervenzellen etwa können die Längen der Zellausläufer wie Dendriten oder Axon ein Vielfaches des Somadurchmessers erreichen. Der

gerichtete Transport von mRNAs ermöglicht hier ein effizientes Wiederauffüllen der distalen Bereiche eines Neurons mit neuen Proteinen [68]. Zudem kann die lokale Kotranslation spezifischer Polypeptide auch die Bildung von Komplexen begünstigen, ohne dass dabei die einzelnen Komponenten des Komplexes übermäßig mit unerwünschten Bindungspartnern konkurrieren müssen [214].

Die Zelle besitzt verschiedene Möglichkeiten um spezifische mRNAs an bestimmten subzellulären Zielorten anzureichern. Dazu gehören (i) der aktive Transport über das Cytoskelett mithilfe von Motorproteinen, (ii) die Diffusion mit anschließender Verankerung am Zielort sowie (iii) der örtliche Schutz vor Abbau der mRNA. Meist kommen Kombinationen davon für die richtige Lokalisation einer mRNA zum Einsatz [214]. Beim Transport einer mRNA zu ihrem Zielort sind alternativ zu Peptid-Signalsequenzen an neu synthetisierten Proteinen, wie bei Proteinen mit endoplasmatischer Prädestination, auch Sekundärstrukturen der mRNA selbst von Bedeutung. Der Transport einer mRNA geht dabei gewöhnlich bis zum Erreichen des Zielorts mit einer Inhibition der Translation einher [139].

Als besondere Abbau- aber auch Lagerorte von mRNAs haben sich sogenannte Prozessierungskörper (*engl.* P-bodies, PBs) und Stress-Granula (*engl.* stress granules, SGs) herausgestellt [9, 87]. Bei einer Stress-induzierten Stilllegung der Translationsinitiation und der dabei eintretenden Disassemblierung von Polysomen, kommt es zu einer verstärkten Bildung von PBs oder SGs [238, 10]. PBs scheinen sich um mRNP-Aggregate, welche translational inaktiv sind, zu bilden. Sie sind reich an Proteinen, die für den mRNA-Abbau von Bedeutung sind und fungieren wohl als Sammelorte für deadenylierte mRNAs, die ihrem Abbau entgegensehen [238]. Daneben konnten in PBs auch Proteine mit einer Rolle in der RNA-Interferenz (RNAi) nachgewiesen werden. Darunter befanden sich beispielsweise Komponenten des RISC (*engl.* RNA induced silencing complex) wie die Argonautenproteine Ago1-4 und miRNAs [78, 185, 255, 286]. Der RISC kann dabei entweder zur Degradation zugehöriger mRNAs führen oder eine translationale Stilllegung entsprechender mRNAs herbeiführen [80, 334]. Da mRNAs PBs jedoch auch wieder verlassen und anschließend translatiert werden können, sind PBs wohl ebenso als vorübergehende Lagerstätten für translational stillgelegte mRNAs anzusehen [31, 23].

SGs enthalten im Gegensatz zu PBs keine Proteine des mRNA-Abbaus, sondern stattdessen verstärkt Komponenten der Translationsinitiation [10, 238, 87, 79]. Sie stellen sich als vorübergehender Ruhesitz von mRNAs unter Stress-Bedingungen dar. Obwohl unter bestimmten Stress-Bedingungen die Translation großräumig zurückgefahren wird, erlaubt die selektive Translation von Chaperonen und Reparatur-Enzymen sowie einigen Transkriptionsfaktoren der Zelle die Behebung von Stress-induzierten Schäden bei gleichzeitiger Einsparung von Energie. Sobald sich die Situation der Zelle normalisiert hat, können die durch die SGs freigegebenen mRNAs entweder wieder zum translational aktiven Pool zurückkehren oder in den PBs abgebaut

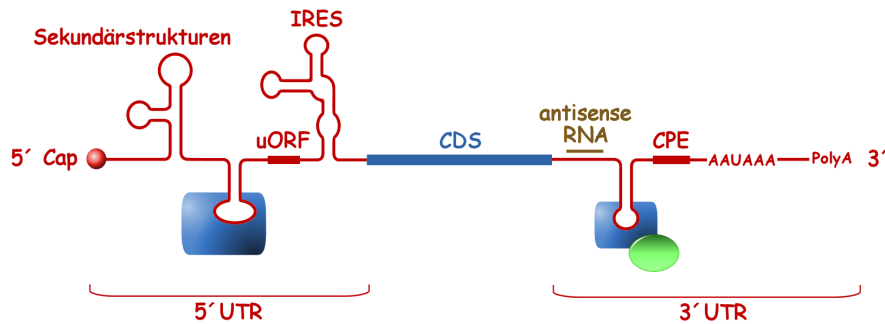


Abbildung 1.3: Verschiedene *cis*-Elemente in den UTRs einer mRNA (modifiziert nach einer Abbildung aus [249]). Einzelheiten siehe Text. Es bedeuten: **Cap** (Kappenstruktur des 5'-Endes), **uORF** (Offener Leserahmen stromaufwärts des eigentlichen Translationsstarts), **CDS** (offener Leserahmen), **IRES** (interne Ribosomenbindungsstelle), **CPE** (cytoplasmatisches Polyadenylierungselement [322]).

werden [101, 11].

1.2.3 Einfluss der untranslatierten Regionen einer mRNA (UTRs)

Posttranskriptionelle Expressionskontrolle kann einerseits auf globaler Ebene erfolgen und andererseits ausschließlich die Regulation einer spezifischen mRNA betreffen. So kann beispielsweise über ein allgemeines Anpassen der Translation die Translationseffizienz vieler mRNAs gleichzeitig moduliert werden [97].

Die Regulation der Translation auf globaler Ebene wird im Allgemeinen über Modifizierungen der Translationsinitiationsfaktoren erreicht. Soll jedoch nur eine kleinere Gruppe oder eine einzige mRNA reguliert werden, so sind spezifische Sequenzmotive oder Struktur motive auf der mRNA, sogenannte *cis*-Elemente, von großer Bedeutung (siehe Abbildung 1.3). Diese können zwar entlang der gesamten mRNA auftreten, sind jedoch vornehmlich in den nicht-kodierenden Bereichen, den untranslatierten Regionen der mRNA (UTRs), zu finden. Daneben lassen sich jedoch auch regulatorische Mechanismen mit Einfluss auf die Expression finden, die nicht auf *cis*-Elementen in der reifen mRNA beruhen. So hat man beispielsweise festgestellt, dass gespleißte mRNAs translationsaktiver als ihre cDNA-Pendants sind [134]. Dafür verantwortlich sind die als Markierungen des Spleißvorgangs auf dem Transkript zurückgelassenen EJCs. Diese fördern nämlich den ersten Translationsdurchlauf [215].

Einzelsträngige RNA neigt stärker als doppelsträngige DNA dazu, Sekundärstrukturen auszubilden. In vielen Fällen ist das gebildete Strukturmotiv und nicht etwa die Sequenz entscheidend für ein *cis*-Element. Da man bei bestimmten RNA-Sequenzen

jedoch nicht ohne weiteres auf die Sekundärstruktur schließen kann bzw. umgekehrt einer Sekundärstruktur nicht einfach eine RNA-Sequenz zuordnen kann, ist das Auffinden von bereits beschriebenen *cis*-Elementen auf einer neuen RNA komplizierter, als es auf DNA-Ebene der Fall ist.

1.2.3.1 5'-UTR

cis-Elemente, die für die Kontrolle der mRNA-Stabilität eine Rolle spielen, finden sich zwar vornehmlich in der 3'-UTR, sind aber nicht auf diese beschränkt. Ein Beispiel hierfür ist die mRNA von Interleukin-2. In ihrer 5'-UTR konnte ein *cis*-Element (JNK Response Element) identifiziert werden, welches zur Stabilisierung der mRNA während der T-Zell-Aktivierung beiträgt. Zwei RBPs (Nucleolin und YB-1) binden spezifisch an dieses Element und stabilisieren die mRNA [48].

Der Hauptteil der Regulation über die 5'-UTR betrifft jedoch die Translation. Bei den meisten zellulären mRNAs findet die Translationsinitiation 5'-Kappen-abhängig statt. Daneben besteht jedoch über interne Ribosomen-Bindungsstellen (IRES) auch die Möglichkeit der Kappen-unabhängigen Translationsinitiation, wobei die IRES selbst eine aktive Rolle bei der Rekrutierung der kleinen ribosomalen Untereinheit besitzen. Dabei enthalten die IRES weniger konservierte Konsensussequenzen. Vielmehr scheinen IRES über ähnliche Sekundärstruktur-Elemente in den 5'-UTRs von mRNAs zu verfügen [15]. IRES wurden zwar zuerst in viralen mRNAs entdeckt, doch schätzt man, dass bis zu 10 % aller zellulären Transkripte das Potential, die Translation über IRES zu initiieren, besitzen [154]. Sie werden unter normalen Bedingungen meist nur schwach translatiert, können jedoch bei einer Herabregulation der Kappen-abhängigen Translation durchaus mit gesteigerter Effizienz translatiert werden [88, 126, 147, 295, 301].

Eine andere Möglichkeit der Zelle, die Translation einer mRNA zu regulieren, verläuft über die Verhinderung der Anlagerung des 43S-Präinitiationskomplexes an die mRNA. Ein Beispiel dafür ist das Iron Response Element (IRE, auf Eisen reagierendes Element) auf der 5'-UTR der Ferritin-mRNA nahe der Kappenstruktur. Ferritin ist ein Speicherprotein für Eisen und unter Eisenmangel binden die Eisen Regulatorischen Proteine IRP1 und IRP2 an dieses Element und blockieren eine Anlagerung des 43S-Präinitiationskomplexes an die mRNA und inhibieren somit seine Translation. Bei reichhaltigem Eisenangebot dagegen wird IRP1 über post-translationale Modifikationen inaktiviert und IRP2 proteasomal abgebaut [3, 110, 274].

Sekundärstrukturen in der 5'-UTR können aber auch ohne zugehörige RBPs eine Wirkung auf die Translation entfalten, indem sie den Zugang zur Kappenstruktur selbst verwehren oder den Scanning-Prozess behindern, wenn sie weiter von der

Kappe entfernt liegen [110, 166]. Als Beispiel sei hier die mRNA von Mdm2 genannt (*engl.* double minute 2 protein). Mdm2 ist eine E3 Ubiquitin-Ligase und wirkt als negativer Regulator des Tumorsuppressors p53 u.a. über dessen Polyubiquitinierung und anschließendem proteasomalen Abbau. Mdm2 kann von zwei Promotoren aus transkribiert werden, was zu Transkripten mit verschiedenen langen 5'-UTRs führt. Die lange Version der 5'-UTR hemmt den Scanvorgang. Die kurze führt dagegen zu einer deutlich effizienteren Translation [56, 339, 173, 40, 41].

Kleine offene Leserahmen stromaufwärts des eigentlichen Startcodons (uORFs) können ebenfalls einen Einfluss auf die Translation haben. In der Hefe besitzt die *GCN4*-mRNA vier uORFs. Dieses Gen kodiert einen Transkriptionsfaktor, der wichtig für die Aminosäure-Biosynthese ist [132, 130]. Bei Aminosäure-Mangel kommt es zur Phosphorylierung der α -Untereinheit von eIF2 und somit zur Senkung der Menge an aktivem ternären Komplex. Ribosomen neigen nun eher dazu, über die letzten uORFs hinweg zu scannen und umgehen dabei die nach Translationstermination üblicherweise erfolgende Dissoziation vom Transkript. Das führt dazu, dass es am richtigen Startcodon verstärkt zur Translationsinitiation kommt [131]. uORFs können jedoch auch über andere Mechanismen wirken. Beispielsweise können RBPs über die Bindung von *cis*-Elementen einer mRNA das Erkennen eines uAUGs (Startcodon eines uORFs) durch den 43S-Präinitiationskomplex fördern und somit die eigentliche Translation des stromabwärts gelegenen Gens behindern [206]. Oder das aus einem uORF hervorgegangene Peptid kann über Interaktion mit einem Release-Faktor dafür sorgen, dass das Ribosom auf der mRNA stehen bleibt und somit den Weg für weitere Ribosomen versperrt [149].

1.2.3.2 3'-UTR

Obwohl die oben aufgeführten Beispiele für die posttranskriptionelle Regulation über die 5'-UTR vielseitig sind, wird der Großteil der posttranskriptionellen Regulation über *cis*-Elemente in der sehr viel längeren 3'-UTR abgewickelt. *cis*-Elemente in der 3'-UTR können dabei mRNA-Stabilität, Translationseffizienz und mRNA-Lokalisation kontrollieren [69, 112, 12, 258, 331, 307].

AU-reiche Elemente (ARE) sind die am weitesten verbreiteten *cis*-Elemente mit einer Funktion bei der Regulierung der Stabilität von Säuger-mRNAs. Sie finden sich bei vielen kurzlebigen mRNAs in der 3'-UTR [49, 333, 22]. Das ARE-Motiv zeichnet sich bei einer Größe von 50 – 150 nt durch eine variable Anzahl von oftmals auch überlappenden AUUUA-Pentameren meist innerhalb oder in der Nähe einer U-reichen Region aus. Zwar beschleunigen AREs in den 3'-UTRs von mRNAs deren Abbau, doch sind die zugrunde liegenden Mechanismen in Bezug auf Ausprägung und Art des Abbaus verschieden. Diese Vielfalt beruht auf den unterschiedlichen

RBPs, die in der Lage sind, dieses Motiv zu binden [115]. AREs, die die mRNA-Stabilität *in vivo* regulieren, eint, dass sie als starke Stimulatoren von Deadenylierung sowie der Entfernung der 5'-Kappe wirken [93, 338]. Zwei der *trans*-Faktoren, die dieses Motiv binden, sind AUF1 (*engl.* AU-rich element RNA-binding protein 1) und HuR (*engl.* Hu-antigen R). Man nimmt an, dass diese beiden RBPs entgegengesetzte Wirkungen entfalten. AUF1 hat einen destabilisierenden Einfluss auf gebundene mRNAs, wohingegen HuR einen stabilisierenden Einfluss ausübt [106, 27]. Je nach Gewebe bzw. nach physiologischen Bedingungen findet sich in Zellen ein unterschiedliches Expressionsverhältnis beider Proteine, so dass ARE-tragende mRNAs dadurch wechselnden Abbauraten unterliegen. Weiteren Einfluss auf die Stabilität einer mRNA kann die Zelle aber auch über die Lokalisation von ARE-bindenden Proteinen sowie über Änderungen ihrer Aktivität bzw. ihrer Bindungseigenschaften zu AREs ausüben [22]. AREs wirken jedoch nicht nur auf die Stabilität einer mRNA. Sie können auch eine veränderte Translationseffizienz hervorrufen [254, 66].

Das IRE, ein anderes *cis*-Element, hat einen stabilisierenden Einfluss auf die mRNA. Wie in Unterabschnitt 1.2.3.1 beschrieben wirkt ein IRE in der 5'-UTR der Ferritin-mRNA bei der Regulation der Translationsinitiation mit. In der Transferrinrezeptor-mRNA finden sich jedoch fünf IREs in der 3'-UTR. Hier bewirken drei dieser Haarnadelstrukturen unter Eisenmangel durch Bindung von IRP1 und IRP2 eine Stabilisierung der mRNA und ermöglichen letztendlich die Eisenaufnahme [236]. Bei starkem Eisenangebot werden IRP1 und IRP2 jedoch inaktiviert bzw. abgebaut und können so die Transferrinrezeptor-mRNA nicht mehr vor Abbau schützen. Die so erniedrigte Transferrin-Rezeptor-Expression hat nun ihrerseits eine verringerte Eisenaufnahme zur Folge [236].

Die Kontrolle der Translationsinitiation über *cis*-Elemente in der 5'-UTR wurde schon weiter oben beschrieben. Die räumliche Nähe dieser *cis*-Elemente zum Ort der Bildung des Initiations-Komplexes lässt diese Regulation plausibel erscheinen. Es ist jedoch auch *cis*-Elementen in der 3'-UTR möglich, Einfluss auf die Translationsinitiation zu nehmen. Dieser Umstand lässt sich aus der Tatsache ableiten, dass sich beide Enden einer mRNA, aufgrund von Interaktionen miteinander, in räumlicher Nähe zueinander befinden [91, 319]. Diese Interaktionen können direkter Natur sein, wie bei einigen viralen mRNAs [118], oder über angelagerte Proteine vermittelt werden. So konnte in Hefe gezeigt werden, dass das am Poly(A)-Schwanz befindliche Pab1p (Hefehomolog von PABPC) und der Translationsinitiationfaktor eIF4G in Wechselwirkung miteinander treten [311]. Da eIF4G an das Kappenbindungsprotein eIF4E bindet, bildet die mRNA so eine geschlossene Schleife [326, 329]. Dies hat u.a. den Vorteil, dass sich Ribosomen nach Termination der Translation in der Nähe der Kappe aufhalten. Ein effizientes Recycling der Ribosomen zur erneuten Translationsinitiation ist daher möglich. Als Beispiel für eine Regulation der Translation von einem *cis*-Element der 3'-UTR sei hier das Differenzierungskontroll-Element (DICE)

genannt. Während der Erythropoese kommt es zu einer translationalen Stilllegung der 15-Lipoxygenase-mRNA [230, 229]. Diese mRNA besitzt in ihrer 3'-UTR ein als DICE bezeichnetes CU-reiches Element. Die Bindung der heterogenen nukleären Ribonucleoproteine (hnRNP) K und E1 an DICE führt zur Bildung eines Komplexes, der die Translation verhindert. Dabei werden zwar weder die Bildung des Präinitiationskomplexes noch der Scanning-Vorgang beeinträchtigt, doch führt die Verhinderung der Anlagerung der großen ribosomalen Untereinheit zur Bildung des zur Translation fähigen 80S-Ribosoms ebenfalls zur Stilllegung der mRNA.

Die subzelluläre Lokalisation einer mRNA wird ebenfalls durch Elemente in der 3'-UTR bestimmt. So wird der Transport von β -Actin-mRNA an die Zellperipherie in Fibroblasten, unter Bedingungen der erhöhten Actin-Synthese in diesen Bereichen, durch eine als Zipcode-Element (*engl.* „Postleitzahl“) bezeichnete Sequenz in der 3'-UTR gesteuert. Die Ausschaltung dieses Signals führt zu einer gestörten β -Actin-Verteilung und Zellmotilität [162, 267, 143, 233].

1.3 Zielstellung dieser Arbeit

Bei der Regulation der Genexpression spielt nicht nur die Kontrolle der Transkription über an die genomische DNA bindende Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Es gehen auch posttranskriptionelle Einflüsse in die Regulation ein. Diese Einflüsse können beispielsweise insbesondere unter Stress-Bedingungen sowie bei Differenzierungsvorgängen eine entscheidende Funktion ausüben. Die Kontrollelemente für eine solche Regulation finden sich vornehmlich in den untranslatierten Regionen (UTRs) einer mRNA. Zugehörige *trans*-Faktoren, wie microRNAs (miRNAs) oder RNA-Bindungsproteine (RBPs), erkennen diese Kontrollelemente und modulieren beispielsweise die Stabilität oder die Translationseffizienz der mRNA. Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Regulation der hASH1-Expression, wobei posttranskriptionelle Einflüsse im Fokus standen.

2 Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische und biochemische Arbeitsmethoden

2.1.1 PCRs und Mutagenese

Sequenzen von Interesse wurden mithilfe des peqGOLD Taq DNA Polymerase Kits (peqlab) via PCR unter Verwendung spezifischer Primer amplifiziert. Im Allgemeinen wurden dabei 30-34 Zyklen durchlaufen, wobei sich die jeweils gewählte Annealingtemperatur an den von der Synthesefirma (TIB MOLBIOL GmbH) angegebenen Schmelztemperaturen der Primer orientierte.

Um einen bestimmten Abschnitt innerhalb einer Sequenz (die schon in einen Vektor integriert wurde) zu verändern, wurde die Mutation über Primer eingeführt. Dazu wurden jeweils zwei PCRs durchgeführt. Beide Ansätze enthielten jeweils einen der beiden endständigen Primer als Hinprimer sowie einen der beiden (zueinander komplementären) innenliegenden mutierten Primer (siehe Tabelle 2.1) als Rückprimer. Beide PCR-Produkte konnten nun vereinigt werden und dienten zusammen als Template für eine erneute PCR mit den endständigen Primern. Das so erzeugte PCR-Produkt trug nun die Mutation und konnte wieder in den Vektor integriert werden. Die Mutationen wurden mittels Sequenzierung überprüft (MWG Biotech AG).

2.1.2 Klonierung und verwendete Vektoren

PCR-Produkte wurden entweder direkt unter Benutzung des QIAquick PCR Purification Kits (QIAGEN) gereinigt oder als Bande nach Auftrennung in einer Agarose-Gelelektrophorese mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) isoliert. Zur Klonierung der Amplifikate wurde das TOPO TA Cloning[®] Dual Promoter Kit (Invitrogen[™]) nach Herstellerangaben verwendet. Die aus der PCR hervorgegangenen 3'-Adenin-Überhänge der PCR-Produkte konnten hierbei mit den 3'-T-Überhängen des mitgelieferten Vektors für die Ligation kombiniert werden. Chemisch kompetente

Tabelle 2.1: Liste mit den in den Mutagenese-PCRs eingesetzten Primern

Primer	Sequenz
hASH1_5'_Fw	5'-CCA GAA GTA GTG AGG AGG CT
hASH1_5'_Re	5'-CAG CGT AAG TGA TGT CCA CC
hASH1_5' TOPdel_Fw	5'-AAG CTT GCC AGG GAA CGT GGA AGG
hASH1_3'_Fw	5'-GTC GCC AGT CAA GTA ACA AC
hASH1_3'_Re	5'-GAA GAC AGT CAT AAG TGC GG
hASH1_3' DICE-Adel_Fw	5'-AAA CGA AAA CAG TCA ACC AAC CGA GGC ATG CCT GAG AGA C
hASH1_3' DICE-Adel_Re	5'-GTC TCT CAG GCA TGC CTC GGT TGG TTG ACT GTT TTC GTT T
hASH1_3' DICE-Bdel_Fw	5'-TTG CTC GGG TCC CTT CAC CTT GCA GTT CTT AGC CCT CTA G
hASH1_3' DICE-Bdel_Re	5'-CTA GAG GGC TAA GAA CTG CAA GGT GAA GGG ACC CGA GCA A
hASH1_3' DICE-Cdel_Fw	5'-GTG TCT TTC GTC TCA GTA GCC TGT AGA CAT TGG TTT ACA GTG
hASH1_3' DICE-Cdel_Re	5'-CAC TGT AAA CCA ATG TCT ACA GGC TAC TGA GAC GAA AGA CAC
hASH1_3' XXdel_Fw	5'-GAA CTC TCA TAG GTG AGA TCG TAC TTC AGC ACC AAT GTG TCT TAC
hASH1_3' XXdel_Re	5'-GTA AGA CAC ATT GGT GCT GAA GTA CGAT CTC ACC TAT GAG GAG AGT TC
hASH1_3' IRESdel_Re	5'-GTC GAC GAA AAA GTT TTA TTA CAA GAA AAA AAA AGG CAG TAA TAG AAA TCT C

TOP10F' *E. coli*-Zellen (Invitrogen™) wurden transformiert und Klone über die Ampicillinresistenz selektiert. Hierzu wurden die kompetenten Zellen mit den ligierten Plasmiden für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend auf vorgewärmte (37 °C) LB-Agar Platten (1,5 % Agar; 100 µg/ml Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. TOPO-Klone wurden via PCR auf richtige Insert-Größe sowie T7-sense Orientierung, für eine mögliche später erfolgende *in vitro*-Transkription, getestet. Von korrekten Klonen wurden Kryokulturen angelegt, wobei 500 – 700 µl einer über Nacht Schüttelkultur (LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin) mit demselben Volumen Glycerin versetzt und bei –80 °C eingefroren wurden.

Die Überführung von Zielsequenzen in die entsprechenden Vektoren für die Reporter-genassays erfolgte über natürliche in den Sequenzen vorkommende bzw. über durch Primer in der PCR eingeführte Restriktionsschnittstellen. Nach Verdau der Plasmide mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (New England Biolabs oder Fermentas) erfolgte eine Auftrennung durch Agarose-Gelelektrophorese und die Isolierung der DNA per QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Die anschließende Ligation der Fragmente (im molaren Verhältnis von 1:2 bis 1:3 Vektor zu Insert) wurde mithilfe des LigaFast™ Rapid DNA Ligation Systems (Promega) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Transformation kompetenter Zellen sowie die Erzeugung von Kryokulturen erfolgte wie oben dargestellt.

Eine Überprüfung der klonierten Sequenzen erfolgte per Sequenzierung durch die MWG Biotech AG. Die in der Arbeit benutzten fertigen Plasmide sind in Tabelle 2.2 aufgeführt.

Tabelle 2.2: Liste mit den in dieser Arbeit im Reporter-genassay verwendeten Plasmide.

Name	Bemerkungen	Referenz
pGL3p	Ausgangsvektor/ Kontrollvektor mit SV40 Promotor	Promega
p251	Reporter unter Kontrolle des hASH1-Promoters	[324]
pGL3p_hASH1- _5Luc	Reporter unter Kontrolle der 5'-UTR von hASH1	[83]
pGL3p_hASH1_5- TOPdel-Luc	Reporter unter Kontrolle der 5'-UTR von hASH1, wobei die TOP-Sequenz deletiert wurde	diese Arbeit
pGL3p_hASH1_5- AUdel-Luc	Reporter unter Kontrolle der 5'-UTR von hASH1, wobei eine AU-reiche Sequenz deletiert wurde	[83]

Fortsetzung: Liste mit den in dieser Arbeit im Reporterassay verwendeten Plasmiden.

Name	Bemerkungen	Referenz
pGL3p_hASH1_5-GQdel-Luc	Reporter unter Kontrolle der 5'-UTR von hASH1, wobei ein G-Quartet deletiert wurde	[83]
pGL3p_hASH1_5-OligoUdel-Luc	Reporter unter Kontrolle der 5'-UTR von hASH1, wobei eine U-reiche Sequenz deletiert wurde	[83]
pGL3p_hASH1-_Luc3	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1	[83]
pGL3p_hASH1-_5Luc3	Reporter unter Kontrolle beider UTRs von hASH1	[83]
pGL3p_hASH1-_Luc3-488del	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei 488 nt des 5'-gelegenen Bereichs deletiert wurden	[83]
pGL3p_hASH1-_Luc3_del_DICE-A	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei DICE-Element A deletiert wurde	diese Arbeit
pGL3p_hASH1-_Luc3_del_DICE-B	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei DICE-Element B deletiert wurde	diese Arbeit
pGL3p_hASH1-_Luc3_del_DICE-C	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei DICE-Element C deletiert wurde	diese Arbeit
pGL3p_hASH1-_Luc3_del_DICE-AB	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei DICE-Elemente A und B deletiert wurden	diese Arbeit
pGL3p_hASH1-_Luc3_del_DICE-AC	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei DICE-Elemente A und C deletiert wurden	diese Arbeit

2.1 Molekularbiologische und biochemische Arbeitsmethoden

Fortsetzung: Liste mit den in dieser Arbeit im Reporterassay verwendeten Plasmiden.

Name	Bemerkungen	Referenz
pGL3p_hASH1- _Luc3_del_DICE- BC	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei DICE-Elemente B und C deletiert wurden	diese Arbeit
pGL3p_hASH1- _Luc3_del_DICE- ABC	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von hASH1, wobei alle DICE-Elemente wurden	diese Arbeit
pGL3p_hASH1- _5Luc3_del_DICE- ABC	Reporter unter Kontrolle der beider UTRs von hASH1, wobei alle DICE-Elemente wurden	diese Arbeit
pGL3p_Mash1- _Luc3	Reporter unter Kontrolle der 3'-UTR von Mash1 (<i>Mus musculus</i>)	diese Arbeit
pGL3p_Mash1- _5Luc3	Reporter unter Kontrolle beider UTRs von Mash1 (<i>Mus musculus</i>)	diese Arbeit

2.1.3 Plasmid-DNA-Präparationen

Plasmid-DNA-Präparationen wurden mit dem QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) oder dem PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit (Invitrogen™) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die DNA wurde am Schluss in nukleasefreiem Wasser (Gibco) aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.1.4 RNA-Isolierung

Nach einmaligem Waschen mit $1 \times$ PBS (Biochrom AG) wurden Zellen mit RNA-Bee™ (AMS Biotechnology) versetzt und nach Herstellerangaben weiter behandelt. Dabei kam es durch Zugabe von Chloroform zur Ausbildung zweier Phasen, wobei die RNA in der wässrigen Oberphase lokalisiert war und mithilfe von Isopropanol über Nacht bei -20°C gefällt wurde. Nach zweimaligem Waschen mit 70 % Ethanol wurde das RNA-Pellet in nukleasefreiem Wasser (Gibco) aufgenommen.

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm.

2.1.5 mRNA-Quantifizierung mittels Realtime-PCR

Für die Realtime-PCR mussten aus mRNA erst DNA-Templates erzeugt werden. Dazu wurde 1 µg der RNA-Präparation mittels Reverser Transkriptase in cDNA unter Nutzung des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) umgeschrieben. Als Primer wurden die im Kit enthaltenen randomisierten Primer verwendet.

20 ng der so erzeugten cDNA wurden nun in der Realtime-PCR je Ansatz eingesetzt. Bei dieser Methode ist es durch den interkalierenden Farbstoff SYBR Green I (Invitrogen™) möglich, die Menge an PCR-Produkt in Echtzeit zu messen, da die Fluoreszenz proportional zur Menge an Komplex aus Farbstoff und doppelsträngiger DNA zunimmt. Die quantitative Analyse einer Probe wurde in dreifach Ansätzen mit dem GeneAMP 5700 System (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei wurde für die Realtime-PCR ein fertiger Mix (Bioline) aus DNA-Polymerase, dNTPs sowie Puffer verwendet. Spezifische Intron-überspannende Primer wurden zur Quantifizierung von hASH1-mRNA benutzt, wobei entweder auf die mRNA-Menge von GAPDH oder β -Actin nach der ΔC_t Methode [187] normiert wurde.

Die verwendeten Primer (siehe Tabelle 2.3) wurden von der TIB MOLBIOL GmbH synthetisiert.

Tabelle 2.3: Liste mit den in der Realtime-PCR eingesetzten Primern.

Primer	Sequenz
hASH1 Q Fw	5'-CGACTTCACCAACTGGTTCT
hASH1 Q Re	5'-CCGTGAATGATTGGAGTGC
ACTB Q Fw	5'-TGAAGTGGTACGTGGACATC
ACTB Q Re	5'-GTCATAGTCCGCCTAGAAGC
GAPDH Q Fw	5'-CACCATCTTCCAGGAGCGAG
GAPDH Q Re	5'-GCAGGAGGCATTGCTGAT

2.1.6 Gesamt-Proteinpräparationen

Zellen wurden nach einmaligem Waschen mit $1 \times$ PBS und vorsichtigem Abschaben von den Zellkulturschalen mit Laemmli-Probenpuffer 10 mM DTT [171] versetzt. Es

folgte entweder ein 15-minütiges Kochen der Proben bei 95 °C oder eine Ultraschallbehandlung und darauf folgend ein 5-minütiges Kochen (95 °C) der Proben. Die Proteinkonzentrationen wurden photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm bestimmt. Eine Verdünnung der Proben für die SDS-PAGE wurde in Laemmli-Probenpuffer mit 0,02 % Bromphenolblau (Endkonzentration) durchgeführt.

2.1.7 Isolierung von cytosolischen Proteinen und Kernproteinen

Zur getrennten Gewinnung von cytosolischen Proteinen und Kernproteinen wurden Zellen nach einmaligem Waschen mit $1 \times$ PBS und vorsichtigem Abschaben von den Zellkulturschalen in doppeltem Volumen Lysepuffer (10 mM Tris, pH 7,5; 140 mM NaCl; 1 mM EDTA; 20 % Glucose; 0,1 % SDS; 0,5 % Nonidet P-40, 1 mM DTT; $1 \times$ Complete Protease Inhibitor Mix (Roche Diagnostics GmbH)) auf Eis für 10 min inkubiert. Eine 10-minütige Zentrifugation bei 4 °C und $10000 \times g$ sorgte für die Trennung der cytosolischen Fraktion (Überstand) von den Kernen (Pellet). Zum Aufschließen der Kerne wurden diese mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und in einem Thermoschüttler bei 95 °C für 15 min bei 1200 rpm geschüttelt. Die Konzentrationsbestimmung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm mit Lysepuffer bzw. Laemmli-Probenpuffer als Leerkontrolle ermittelt. Eine Verdünnung der Proben für die SDS-PAGE wurde in Laemmli-Probenpuffer mit 0,02 % Bromphenolblau (Endkonzentration) durchgeführt.

2.1.8 Cytosol-Isolierung mit Komplexen in nativen Konstellationen

Um Ribosomem-besetzte mRNP-Komplexe für die Polysomengradienten-Analyse zu gewinnen, wurden die Ribosomen mithilfe von Cycloheximid (Sigma-Aldrich®) an ihren mRNAs fixiert. Dazu wurden die Zellen mit Cycloheximid (100 µg/ml) versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein zweimaliges Waschen mit $1 \times$ PBS + 100 µg/ml Cycloheximid und die Aufnahme in Cycloheximid-haltigem Lysepuffer (20 mM Tris, pH 7,4; 150 mM KCl; 30 mM MgCl₂; 0,5 % Nonidet P40; 1 mM DTT; 100 µg/ml Cycloheximid; $1 \times$ PIC; 200 U/ml RNaseOUT (Invitrogen™ life technologies)). Nach 10-minütiger Lyse auf Eis wurden die Kerne über eine 10-minütige Zentrifugation bei $10000 \times g$ und 4 °C abgetrennt. Der Überstand konnte nun in Polysomengradienten-Analysen eingesetzt werden. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm.

2.1.9 Westernblotting und Proteinquantifizierung

30 – 60 µg der Protein-Präparation wurden über SDS-PAGE aufgetrennt anschließend auf Roti®-PVDF Membranen (Carl Roth GmbH & Co. KG) geblottet. Für das Blockieren wurde die Membran eine Stunde lang in 5 % Milchpulver (Carl Roth GmbH & Co. KG) in 1 × TBS-T (20 mM Tris, 137 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) inkubiert. Die anschließende Inkubation mit Primärantikörper (siehe Tabelle 2.4) fand über Nacht bei 4°C statt. Nach dreimaligem Waschen à 10 min mit TBS-T folgte eine einstündige Inkubation mit HRP-konjugiertem Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.4). Die Detektion erfolgte nach erneutem Waschen (wieder 3 × 10 min) mit 1 × TBS-T unter Zuhilfenahme des ChemiGlow West Chemiluminescence Substrate Kits (Cell Biosciences). Hierbei wird die durch die HRP erzeugte Lichtreaktion zur Proteinquantifizierung genutzt. Die Detektion dieser Lichtreaktion fand über die Exposition von photosensitiven Filmen statt, wobei Amersham Hyperfilm ECL (Amersham) verwendet wurden. Nach Scannen der Signale auf den Filmen wurden diese mithilfe der Scion Image Software (Scion Corporation) quantifiziert.

Vor erneuter Nutzung der Blots zum Nachweis anderer Proteine wurden die Blots erst mit entionisiertem Wasser für 5 min auf dem Schüttler gewaschen, anschließend mit 0,2 M NaOH für 2 – 5 min gestrippt und daraufhin abermals mit entionisiertem Wasser gewaschen. Nun wurden die Membranen, angefangen beim Blocken, wie oben beschrieben weiterbehandelt. So war auch eine Normierung von im ersten Durchlauf ermittelten Bandenintensitäten auf die Bandenintensitäten von GAPDH oder β-Aktin als interne Beladungskontrolle möglich.

2.1.10 Polysomengradienten-Analyse

Ein kontinuierlicher Saccharose-Gradient wurde unter Verwendung einer 17 %-igen und einer 51 %-igen Saccharoselösung in Gradientenpuffer (20 mM Tris pH 7,4; 150 mM KCl; 5 mM MgCl₂; 1 mM DTT) mithilfe eines automatischen Mischsystems in Polyallomer-Röhrchen aufgebaut. 200 µl einer Cytosol-Präparationen (gewonnen wie in Unterabschnitt 2.1.8 beschrieben) mit einer Konzentration von 10 µg/µl wurden auf diesen Saccharose-Gradienten (17 – 51 %) geladen.

Durch die anschließende Ultrazentrifugation bei 37000 rpm ($\approx 100000 \times g$) für 2 h (Beckmann L70 Ultrazentrifuge, SW-41 Rotor) wurden die Ribonukleoprotein-Komplexe entsprechend ihrer Masse im Gradienten aufgetrennt. Diese ist abhängig vom Beladungsgrad mit Ribosomen. Vom Boden des Zentrifugenröhrchens aus wurde die Gradientenlösung mittels einer Pumpe abgesaugt. Dabei wurde die Absorption kontinuierlich bei einer Wellenlänge von 254 nm gemessen und dokumentiert. Die

2.1 Molekularbiologische und biochemische Arbeitsmethoden

Tabelle 2.4: Liste der verwendeten Antikörper. Die Antikörper wurden in TBS-T mit 10% Chemical Blocking solution (Millipore) verdünnt auf die Blots gegeben.

	Name	Hersteller	Verdünnung
1. Antikörper	Mouse Anti-Mash1	BD Pharmingen™, Katalognummer: 556604	1 : 500
	Anti-β-Actin	Chemicon, Katalognummer: MAB1501R	1 : 4000
	Anti-GAPDH	Acris, Katalognummer: BM439	1 : 1500
	Anti-hnRNP-E1 (PCBP1 Antibody)	Aviva Systems Biology, Katalognummer: ARP40630_T100	1 : 1000
	Anti-hnRNP-K	Novus Biologicals, Katalognummer: NB100-2123	1 : 1000
	Anti-TTP (Anti ZFP-36)	Aviva Systems Biology, Katalognummer: ARP34385_P100	1 : 1000
2. Antikörper	goat anti-mouse	Santa Cruz, Katalognummer: sc2031	1 : 100.000
	donkey anti-rabbit	Santa Cruz, Katalognummer: sc2317	1 : 50.000 bis 1 : 100.000

Gradientenlösung wurde zur weiteren Aufarbeitung in 12 Fraktionen à 1 ml unterteilt. Die RNA der einzelnen Fraktionen wurde nun mithilfe des E.Z.N.A RNA Total Kits (VWR International) nach Herstellerangaben isoliert, wobei die Elution der RNA von der Säule mit nukleasefreiem Wasser (Gibco) erfolgte. Eine Quantifizierung spezifischer mRNAs wurde nach Umschreiben in cDNA über Realtime-PCR wie unter Unterabschnitt 2.1.5 beschrieben durchgeführt.

2.1.11 *In vitro*-Transkription

Im ersten Schritt wurden die Templates für die *in vitro*-Transkription mittels PCR aus hASH1-UTR-tragenden TOPO® II-Vektoren erzeugt. Unter Nutzung des Vektorprimers TOPO II M13 Fw sowie jeweils spezifischen Rückprimern konnten Amplikons erzeugt werden, die die T7-Promotorsequenz aus dem TOPO® II Vektor (Invitrogen™) sowie die jeweilige Zielsequenz unter Kontrolle dieses Promotors enthielten. Die *in vitro*-Transkription wurde mit T7-RNA-Polymerase (Promega) mit

den entsprechenden Amplikons nach Herstellerangaben durchgeführt.

Die so erzeugten *in vitro*-Transkripte wurden anschließend mit Chroma Spin™-100 DEPC columns (Clontech) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

2.1.12 UV-Crosslinking

Eine Möglichkeit des Nachweises einer Wechselwirkung zwischen RNA-Bindungsfaktoren und einer spezifischen RNA stellt das UV-Crosslinking dar. Hierbei werden mit einem radioaktiven Nukleotid markierte *in vitro*-Transkripte erzeugt und mit cytosolischen Extrakten (Unterabschnitt 2.1.8) inkubiert. Mittels UV-Licht werden die Protein-RNA-Komplexe kovalent miteinander verknüpft. Ein anschließender Verdau der RNA degradiert die Bereiche der Transkripte, die nicht mit Proteinen in Wechselwirkung standen (siehe Abbildung 2.1). Nach Auftrennung in einer SDS-PAGE sind nur Proteine, welche während des UV-Crosslinkings in direktem Kontakt mit der RNA standen, radioaktiv markiert und können mittels eines Röntgenfilms detektiert werden.

Die Transkripte wurden wie in Unterabschnitt 2.1.11 beschrieben oder in Anwesenheit von $\alpha^{32}\text{P}$ -U/C/A/GTP zur radioaktiven Markierung erzeugt. Für die Komplexbildung wurden 3,5 μl cytosolischer Extrakt (10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Proteinkonzentration) mit 5,5 μl Puffer (10 mM HEPES, pH 7,2; 3 mM MgCl_2 ; 5 % Glycerin; 1 mM DTT; 150 mM KCl; 2 U/ μl RNaseOUT (Invitrogen™); 50 ng/ μl Kaninchen rRNA) und 1 – 2 ng *in vitro*-Transkript (100.000 cpm) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die RNA/Protein-Komplexe wurden mit UV-Licht (255 nm, 1,6 Joule, UV-Stratalinker) bestrahlt. Eine Behandlung mit RNase-A (30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Endkonzentration) und RNase-T1 (750 U/ml Endkonzentration) für 1 h bei 37 °C folgte. Die Ansätze wurden mit Lade-puffer (Roti®-Load 1, Carl Roth GmbH & Co. KG) versetzt und per SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für 30 min in Fixierungs-Lösung (10 % Essigsäure, 10 % Methanol) fixiert und anschließend auf einem Filter getrocknet. Die Signale wurden über das Phospho-Imager-System (Fujifilm FLA-3000) sowie durch Exposition von Filmen (Kodak Biomax MR-1) dokumentiert.

2.2 Zellkultur

2.2.1 Zelllinien und Kultivierung

Die humane Neuroblastoma-Zelllinie Kelly (ACC 355) wurde von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen. Die Kultur

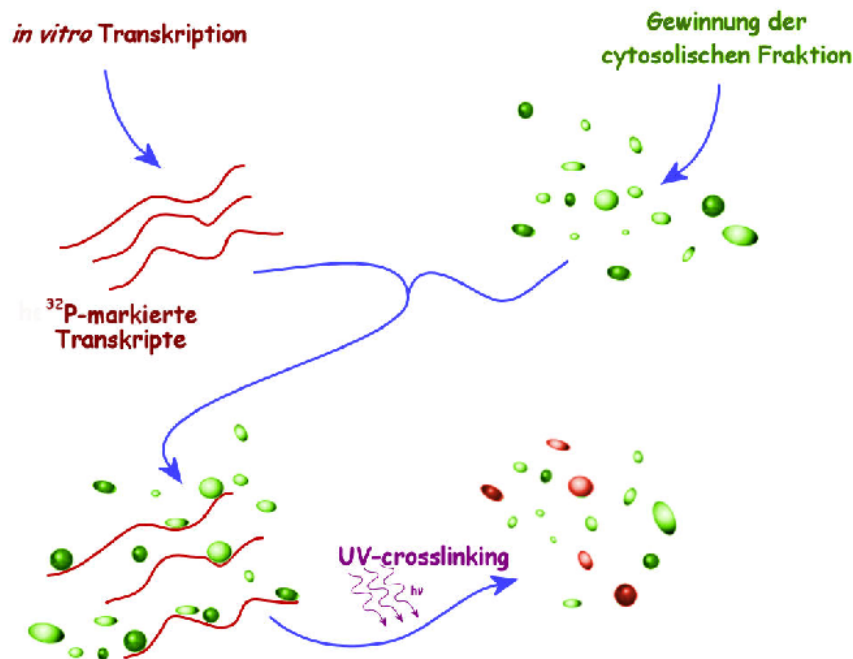


Abbildung 2.1: Vereinfachte Darstellung des Prinzips des Crosslinkings. Radioaktiv markierte Transkripte werden mit cytosolischen Extrakten inkubiert. Nach der Komplexbildung werden RNA sowie RNA-Bindungsproteine mittels UV-Licht kovalent miteinander verknüpft. Nach einem anschließenden Verdau der RNA können Proteine die mit der RNA (in der Abbildung rot dargestellt) interagierten, radiographisch detektiert werden. Proteine ohne direkte Wechselwirkung mit der RNA bleiben auch nach dem Crosslinking unmarkiert (grün dargestellt).

der Zellen fand in 6 cm- und 10 cm-Zellkulturschalen (TPP Techno Plastic Products AG) oder auf 96-Well Platten (μ Clear Platte 96K, Greiner BIO-ONE GmbH) bei 37 °C und 5 % CO₂ statt. Als Wachstums-Medium diente RPMI-Medium (PAA Laboratories GmbH) mit 10 % fetalem Kälberserum (Biochrom AG, Katalognummer: S0115) sowie 100 U/ml Penicillin, 100 μ g/ml Streptomycin und 1 % Glutamat (Invitrogen™). Die Zellen konnten bis zu einer Konfluenz von 80 – 90 % wachsen und wurden dann je nach Anforderung unterschiedlich stark gesplittet. Zudem wurden die Zellen höchstens bis zur 50. Passage verwendet.

Die Zellen je einer 10 cm-Zellkulturschale (mit einer Konfluenz von etwa 80 %) wurden für je eine Kryokultur geerntet und in 1 ml Kryomedium (RPMI + 20 % fetalem Kälberserum + 10 % DMSO) langsam auf –80 °C heruntergekühlt und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

2.2.2 Primäre Zellen

Zur Gewinnung von primären Neuronen wurden Ratten gemäß der Erlaubnis (LaGe-So, 0122/07) vom Landesamt für Arbeitsschutz, Gesundheitsschutz und technische Sicherheit Berlin und in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Union getötet. Dabei wurden Kortex-Zellen von E19 Wistar Ratten wie von Eichler et al. [74] für Hippocampus-Zellen beschrieben präpariert und in mit B27 (Gibco®) und 1 % fetalem Kälberserum supplementiertem Neurobasal Medium (Gibco®) für acht Tage kultiviert [34].

2.2.3 Immunfluoreszenz

In Kortex-Zellkulturen von E19 Wistar Ratten wurde Mash1 mithilfe von Mouse Anti-Mash1 (1:500, BD Pharmingen™) sowie mit Tetramethylrhodaminisothiocyanat-gekoppeltem Zweitantikörper (Jackson ImmunoResearch Laboratories) sichtbar gemacht. Dazu wurden die Neurone auf Deckgläschen kultiviert und mit einer Eis-gekühlten Mischung aus 4 % Paraformaldehyd und 4 % Saccharose in PBS für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Deckgläschen über Nacht in PBS/Gelatine bei 4 °C inkubiert. Die Deckgläschen wurden mit Erst- und Zweitantikörper jeweils für 1 h und 45 min inkubiert. Zwischen den Antikörper-Inkubationen wurden die Deckgläschen viermal mit PBS/Gelatine gewaschen. Die Deckgläschen wurden dann auf Objektträgern angebracht und DAPI-enthaltendes Vectashield Medium (Vector Laboratories) zur Sichtbarmachung der Zellkerne eingesetzt.

Die Quantifizierung des Mash1-Fluoreszenzsignals wurde über Intensitätsmessungen innerhalb kreisförmiger Bereiche von Interesse (5 µm im Durchmesser) durchgeführt. Die Hintergrund-Fluoreszenz (Rauschen) wurde entsprechend bestimmt, wobei jedoch Zell-freie Bereiche von Interesse gewählt wurden. Zur erleichterten Darstellung der Messwerte wurden die ursprünglichen Signalintensitäten (von 0 bis 255 reichend, wobei „0“ für starke Lichtintensität (weiß) und „255“ für schwache Lichtintensität (schwarz) steht) vom Wert 255 abgezogen, so dass höhere Werte nun für eine erhöhte Lichtintensität stehen.

2.2.4 Stimulierung der Zellen

Die Chemikalien für die Stimulationsversuche an den Zellen wurden in Ethanol oder DMSO gelöst, so dass mindestens eine 1:1000 Verdünnung in den Kulturmedien für die Inkubation der Zellen vorlag. Kontrollzellen wurden in den jeweiligen

Lösungsmitteln für die gleichen Zeiträume inkubiert. Kelly-Zellen hatten bei Stimulierung mindestens eine Konfluenz von 50 %. Sollte der PMA-Einfluss unter Bedingungen der Proteinkinase C-Inhibition getestet werden, so wurden die Zellen vor PMA-Inkubation einer 4-stündigen Präinkubation mit Staurosporin (40 nM, Sigma Aldrich®) bzw. GF109203X (5 µM, Sigma Aldrich®) sowie zur Kontrolle dem Proteinkinase A-Inhibitor KT-5720 (2 µM, Enzo Lifesciences GmbH) ausgesetzt.

Die Anfangs-Zelldichte der primären Kortex-Zellen betrug 68000 /cm². Die 6-stündige Inkubation mit PMA (Sigma Aldrich®) wurde am zweiten Tag *in vitro* durchgeführt.

2.2.5 Transfektion

Zur transienten Transfektion von Zellen mit den Reportergen-Konstrukten wurde das Liposomen-basierte System Roti®-Fect (Carl Roth GmbH & Co. KG) nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei wurden für je 3 µg eingesetzter DNA-Gesamtmenge 10 µl Roti®-Fect Reagenz zur Komplexbildung (20 min) eingesetzt. Die Zellen wurden mit dem Transfektionsmix für mindestens 6 h inkubiert, wonach ein Austausch mit frischem Medium folgte.

Als alternative Methode wurde Magnetofection™-PolyMag (OZ Biosciences) nach Herstellerangaben verwendet. Hierbei bildet die Nukleinsäure mit magnetischen Partikeln Komplexe. Diese Komplexe werden dann mithilfe eines Magneten auf die Zellen gezogen, so dass es schon nach kurzer Zeit zu einer starken Aufkonzentrierung der zu transfizierenden DNA an den Zellen kommt. Für die 30-minütige Komplexbildung wurden 10 µl PolyMag je µg eingesetzter DNA verwendet. Nach 20-minütiger Inkubation der Zellen mit den Nukleinsäurekomplexen erfolgte ein Austausch des Mediums.

2.2.6 Reportergenassay

Im Reportergenassay werden die Auswirkungen auf die Expression eines Luciferasereportergens, welches jeweils unter Kontrolle des hASH1-Promotors oder der UTRs sowie verschiedenen Deletionsvarianten der UTRs steht, beobachtet. Das Luciferasegen stammt vom Leuchtkäfer *Photinus pyralis* (siehe Abbildung 3.2 auf Seite 47). Dieser nutzt die von der Luciferase erzeugte Biolumineszenz in der Natur zum Auffinden von Paarungspartnern. Das Enzym katalysiert dabei eine Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin, wobei elektronisch angeregte Zwischenstufen erzeugt werden, die beim Fall auf ihren Grundzustand Energie in Form von Lichtquanten emittieren (siehe Abbildung 2.2) [107].

Die Menge an gebildeter Luciferase lässt sich nun über die Stärke des emittierten Lichts ableiten und kann als Maß für die Aktivität des Promotors und der UTRs von hASH1 unter den gegebenen Bedingungen dienen. Da bei den UTR-abhängigen Reporterassays in den Reportervektoren ein konstitutiver Promotor vorlag, konnte nach Normierung auf den Kontrollvektor, der nur denselben konstitutiven Promotor nicht aber die UTRs enthielt, direkt auf den UTR-Einfluss rückgeschlossen werden.

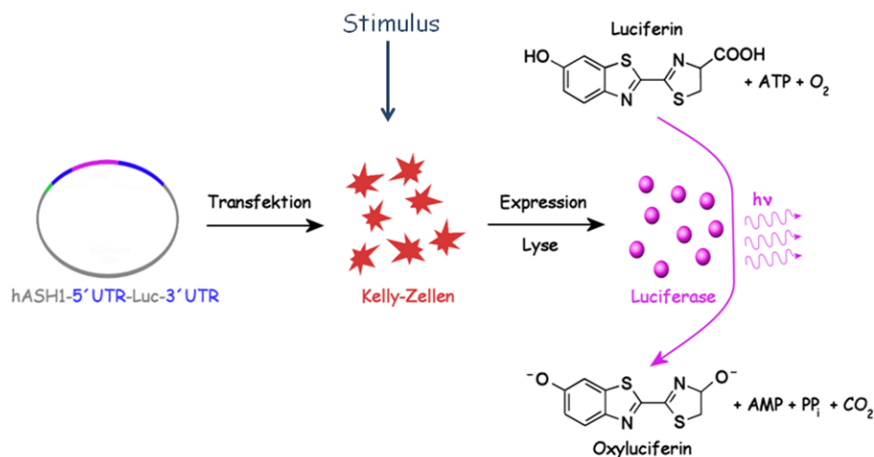


Abbildung 2.2: Funktionsweise des Reporterassays. Kelly-Zellen werden mit Reportergenvektoren transfiziert und bilden je nach Stimulus mehr oder weniger Luciferase als Kontroll-Zellen. Dieses äußert sich in veränderten Lichtintensitäten in der durch die Luciferase katalysierten Lichtreaktion.

Für die Reporterassays wurden Kelly-Zellen auf 96-Well Platten (μ Clear Platte 96K, Greiner BIO-ONE GmbH) überführt und darin für 24 h kultiviert. Es folgte eine Transfektion mit 100 ng Reporterkonstrukt sowie mit 175 ng Renilla Luciferase Vektor phRL-TK (Promega) je Well wie in Unterabschnitt 2.2.5 beschrieben. Die Renilla-Luciferase diente als Kontrolle für die Transfektionseffizienz (bzw. gegebenenfalls für die Zelldichte). Da die Renilla-Luciferase ein anderes pH-Optimum besitzt sowie ein anderes Substrat umsetzt, können mit aufeinanderfolgend zugegebenen Substrat-Puffer-Lösungen (PJK GmbH) die Lichtreaktionen der verschiedenen Luciferasen nacheinander gemessen werden. So lässt sich die Lichtintensität der Firefly-Reaktion durch Normierung auf die Lichtintensität der Renilla-Reaktion vom Einfluss der Transfektionseffizienz befreien, so dass sich die Streubreite der Messwerte verringert.

24 – 48 h nach der Transfektion der Zellen folgte die Inkubation der Zellen mit den Stimuli bzw. den erniedrigten Sauerstoffbedingungen. Danach wurden die Zellen mithilfe von Passive Lysis 5X Buffer (Promega) lysiert. Die anschließende Detektion der Luciferaseaktivitäten wurde in einem Luminometer (LabSystems Luminoscan RS), programmiert mit institutseigener Software (Luminoscan-RalfII, Dr. Ralf Mrowka),

durchgeführt.

2.2.7 mRNA-Stabilitätsassay

Zur Überprüfung der mRNA-Stabilität in Zellen die zuvor mit oder ohne PMA kultiviert wurden, wurde die weitere Transkription in den Zellen per Actinomycin D (5 µg/ml Endkonzentration im Kulturmedium, Sigma-Aldrich®) unterbunden und nach verschiedenen Zeitpunkten der Actinomycin D-Inkubation die RNA der Zellen isoliert (in Unterabschnitt 2.1.4 beschrieben).

Nach Quantifizierung über Realtime-PCR (in Unterabschnitt 2.1.5 beschrieben) konnten so für spezifische mRNAs Abbaukinetiken (unter PMA sowie ohne PMA) erstellt werden. Da durch Actinomycin D die mRNA-Neusynthese blockiert wurde, repräsentiert die Abnahme an mRNA die Abbaurate unter den vorliegenden Bedingungen.

2.2.8 Protein-Stabilitätsassay

Um die Proteinstabilität zu testen, wurde die Translation in Zellen, die zuvor mit oder ohne PMA inkubiert wurden, mit Cycloheximid (20 µg/ml Endkonzentration im Kulturmedium, Sigma-Aldrich®) gestoppt. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden Gesamt-Proteinpräparationen durchgeführt (beschrieben in Unterabschnitt 2.1.6) und Proteinmengen per SDS-PAGE und anschließendem Westernblotting bestimmt (beschrieben in Unterabschnitt 2.1.9). Durch die blockierte Protein-Neusynthese ist die Protein-Abnahme auf die Abbaurate unter den vorliegenden Bedingungen zurückzuführen.

2.2.9 Bioinformatische Sequenzanalysen

Zur Sequenzanalyse wurden im Netz frei zugängliche Programme genutzt. Dabei wurden die Sequenzen von Interesse entweder der Bibliothek des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oder der Bibliothek des Ensemble Genome Browsers (<http://www.ensembl.org/index.html>) entnommen. Die Überprüfung der UTRs hinsichtlich enthaltener cis-Elemente fand mit BIG Staff UTRscan (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>) statt. Zur Untersuchung der UTRs auf konservierte Sequenzen wurde die BLAT-Suche des UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) verwendet.

2.3 Statistik

Die im Folgenden präsentierten Ergebnisse beruhen auf mindestens zwei Versuchsserien mit jeweils drei unabhängigen Einzelproben. Dabei wurden die Ergebnisse als Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt. Die statistische Signifikanz wurde unter Verwendung eines 2-seitigen Student'schen t-Testes berechnet (dabei bedeuten: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$).

3 Ergebnisse

3.1 Analyse der hASH1-UTRs nach *cis*-Elementen

Die hASH1-UTRs sind mit 559 nt (5'-UTR) und 1197 nt (3'-UTR) auffällig lang, da durchschnittliche Längen für die 5'-UTR 300 nt und für die 3'-UTR 770 nt betragen [172]. Zur Untersuchung der hASH1-UTRs nach *cis*-Elementen wurde ein im Netz verfügbares Programm (BIG Staff UTRscan (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>)) genutzt [111, 211, 251, 210, 250, 248]. Hierbei wurden sowohl die 5'- als auch die 3'-UTR nach Sequenzmotiven durchsucht, welche schon mit einer regulativen Funktion beschrieben wurden. Dabei wurden in der 5'-UTR eine als TOP-Motiv (*engl.* 5'-terminal oligopyrimidine) bezeichnete und in der 3'-UTR drei als DICE-Elemente (Differenzierungskontroll-Element) bezeichnete putative *cis*-Elemente offenbart. Zudem fand sich in der 3'-UTR ein IRES-Element (Ribosomen-Bindungsstellen). Getestet wurden 30 *cis*-Elemente¹.

Befund der 3'-UTR (Länge: 1197 nt)

15-LOX-DICE seq: [177,193]: CCCCATCGCC AACT AAG
seq: [431,448]: CCCCGCCCTTT CTTA AAG
seq: [499,513]: CCCCACCCCA AT AAG

IRES

seq: [1102,1197]: TCTTAC TGTTTT ATTAC AA ACTTA
CAAAAA TATGT ATAAC CCTGT TTTAT ACAA CTAGT
TTC GTAATA AAAC TTTT CCTTTTTT TAAAA TGAAA

Befund der 5'-UTR (Länge: 559 nt)

TOP seq: [1,6] : C TTCT G

¹Getestete *cis*-Elemente: Histone 3'-UTR stem-loop structure, IRE, SECIS-1, SECIS-2, APP, CPE, TGE, NANOS_TCE, 15-LOX-DICE, ARE2, TOP, Glut1, TNF, VIMENTIN, IRES, MSL2-5UTR, MSL2-3UTR, BRE, ADH_DRE, BYDV, Proneural-Box, K-Box, Brd-Box, GY-Box, Androgen-Rezeptor, Elastin G3A, Insulin 3'-UTR stability, Beta-actin 3'-UTR zipcode, Gap-43 stabilization element, Dendritic localization element

Eine weitere Untersuchung der UTRs hinsichtlich konservierter Sequenzen erfolgte mithilfe einer BLAT-Analyse (*engl.* BLAST-Like Alignment Tool) unter Nutzung des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) [257, 291, 26, 52, 283]. Sequenzen von Bedeutung für eine Regulation oder auch kodierende Sequenzen zeichnen sich häufig durch eine stärkere Konserviertheit zwischen verschiedenen Spezies gegenüber Abschnitten ohne eine solche Bedeutung aus, da hier eingeführte Mutationen größere negative Auswirkungen auf den Organismus haben können. Dementsprechend sind regulatorisch wichtige Sequenzen innerhalb der UTRs eher unter den konservierten Abschnitten zu vermuten. Allerdings werden Sequenzen, die nur von Bedeutung für die Spezies-spezifische Regulation sind, bei diesem Ansatz nicht erfasst. Die BLAT-Analyse der hASH1-UTRs zeigte jedoch auch einige konservierte Bereiche, die insbesondere mit dem für die 3'-UTR ungewöhnlichen IRES-Motiv überlagerten (siehe Abbildung 3.1).

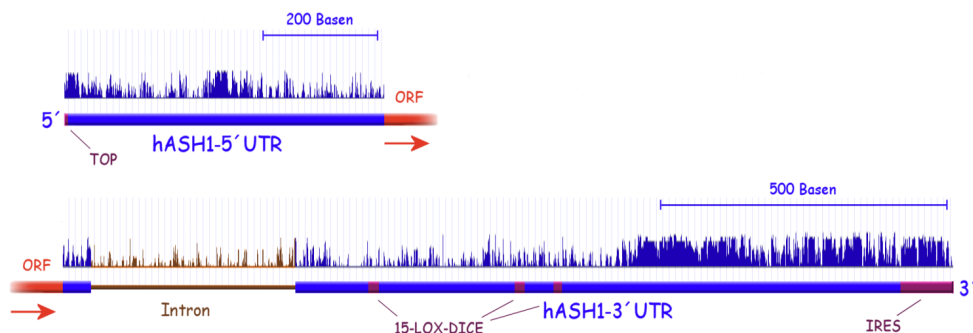


Abbildung 3.1: BLAT-Analyse unter Nutzung des UCSC Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>). Eine höhere Konserviertheit einer Base ist hier durch einen stärkeren Ausschlag über dem UTR-Bereich dargestellt. Die durch BIG Staff UTRscan (<http://itbtools.ba.itb.cnr.it/utrscan>) gefundenen Motive sind in den UTR-Bereichen eingezeichnet. Die Balken über den Strahlen zur Darstellung des Konservierungsgrades stellen Längenmaßstäbe dar.

3.2 Screening nach Stimuli mit Einfluss auf die hASH1-UTRs

Die Zielstellung dieser Arbeit war die Untersuchung der posttranskriptionellen Kontrolle der hASH1-Expression. Die posttranskriptionelle Regulation beruht meist auf Interaktionen von RNA-bindenden Faktoren mit Motiven auf der mRNA. Da sich diese Motive vornehmlich in den untranslatierten Regionen (UTR) der mRNAs befinden, wurde in einem ersten Schritt nach Bedingungen gesucht, die in der Lage

sind die hASH1-Expression UTR-vermittelt zu modulieren. Zu diesem Zweck sollten verschiedene Stimuli im Reportergenassay mithilfe eines hASH1-UTR-Konstrukts getestet werden.

3.2.1 Aufbau des Reporterkonstrukts

Das im Reportergenassay einzusetzende Konstrukt (pGL3p-hASH1-5'-UTR-Luc-3'-UTR) enthielt den konstitutiv aktiven viralen SV40-Promotor sowie ein Luciferase-Reportergen unter Kontrolle der hASH1-5'-UTR und 3'-UTR (siehe Abbildung 3.2). Dabei diente der pGL3-promoter Vektor (Promega) als Ausgangsplasmid und wurde im Folgenden als Kontrollvektor verwendet.

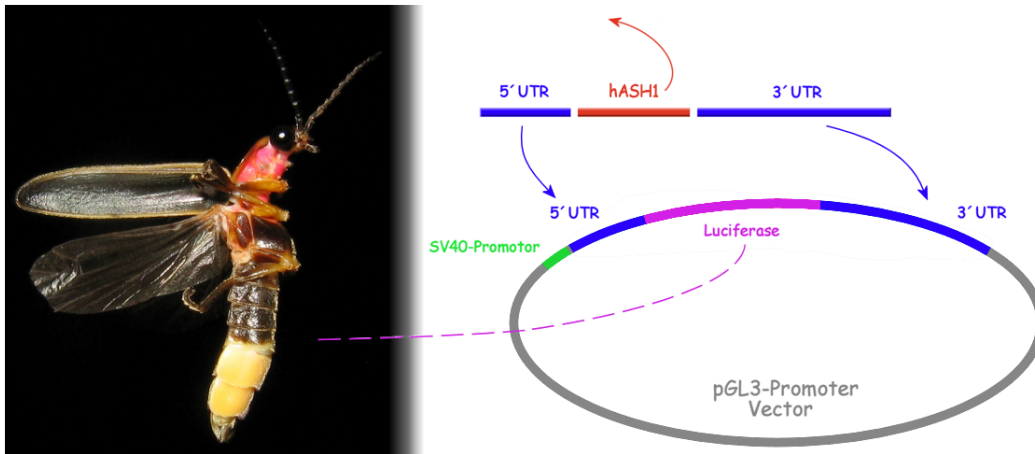


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des hASH1-UTR-Konstrukts (pGL3p-hASH1-5'-UTR-Luc-3'-UTR). Ausgangsvektor war der pGL3-promotor Vektor (Promega) mit Luciferase-Reportergen vom Leuchtkäfer unter Kontrolle des konstitutiven SV40-Promotors. Für das hASH1-UTR-Konstrukt wurden die Vektor-eigenen UTRs durch die UTRs von hASH1 ausgetauscht [83]. Das Bild des Leuchtkäfers wurde Wikipedia entnommen.

Im Reportergenassay werden Zellen transient mit UTR-Reporterkonstrukten sowie dem Ausgangsvektor als Kontrolle transfiziert. Nach einer definierten Zeit für die Expression sowie der Inkubation mit bzw. ohne Stimulus werden die Zellen lysiert und mit einem Überschuss an Luciferin versetzt. Die Intensität des so entstehenden Lichtsignals ist nun von der Menge an erzeugter Luciferase abhängig und gibt somit Aufschluss über die durch den Promotor und die UTRs bedingte Stärke der Expression unter den gegebenen Bedingungen (siehe Abbildung 3.2). Um etwaige gemessene Einflüsse auf den Promotor nicht fälschlicherweise den UTRs zuzuschreiben, wurde in jeder Serie auf den Ausgangsvektor normiert, der den Luciferase-Reporter nur unter Kontrolle des SV40-Promotors nicht aber der hASH1-UTRs enthielt.

3.2.2 Screening im Reportergenassay

Da hASH1 in der neuronalen Entwicklung bzw. in der Differenzierung zu Neuronen eine wichtige Rolle spielt, wurde als Zellmodell die Neuroblastoma-Zelllinie Kelly gewählt. Neuroblastomzellen sind entartete Zellen, die noch verschiedene Eigenschaften von neuronalen Vorläuferzellen aufweisen. So zeichnen sich Kelly-Zellen durch eine konstitutive hASH1-Expression aus und scheinen somit über ein intaktes hASH1-Gen sowie ein zur hASH1-Expression nötiges Set an Faktoren zu verfügen.

Nach Transfektion mit dem oben beschriebenen UTR-Konstrukt (pGL3p-hASH1-5'-UTR-Luc-3'-UTR) wurden die Zellen mit verschiedenen Substanzen für 48 h inkubiert. Die hierbei getesteten Substanzen wurden mit verschiedenen Zellreaktionen beschrieben. So vermitteln Dopamin und Adenosin ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren in der Zellmembran. Dabei wurden für Dopamin bisher fünf und für Adenosin vier verschiedene Rezeptoren identifiziert. Diese liegen G-Protein-gekoppelt vor und können, abhängig von der Beschaffenheit des G-Proteins, über eine Aktivierung oder Inhibition von Adenylatcyclase eine Änderung des cAMP-Spiegels innerhalb der Zelle bewirken. Dieser wiederum kann z.B. über cAMP-abhängige Proteinkinasen die Aktivität verschiedener anderer Proteine beeinflussen. Zudem können noch weitere Wirkungen, wie beispielsweise die Aktivierung von Phospholipase C oder Ionenkanälen in der Zellmembran, durch diese Rezeptoren vermittelt werden [264, 18, 89]. Das Diterpenoid Forskolin dagegen wirkt nicht über einen Rezeptor, sondern direkt über eine Anlagerung an das cytosolisch gelegene katalytische Zentrum von Adenylatcyclase. Die damit verbundene Aktivierung dieses Enzyms führt ihrerseits zu einer Anhebung des cAMP-Spiegels [62, 4].

Ascorbinsäure wird über spezifische Transporter in das Zellinnere transportiert [317, 276]. Da Ascorbinsäure einen Elektronendonator darstellt und reaktive Sauerstoffspezies (ROS) reduziert, nimmt man an, dass es Reaktionen in der Zellkultur, wie beispielsweise die Aktivitätsänderung einiger Transkriptionsfaktoren, vornehmlich über eine Änderung des Redoxstatus der Zellen hervorruft [71, 271, 38, 203, 64, 169, 5, 7, 346]. Da es jedoch aufgrund von Verunreinigungen mit Spuren an katalytisch wirksamen Übergangsmetallen in den Kulturmedien zu einer Autooxidation von Ascorbinsäure kommt, könnten beobachtete Reaktionen aber ebenso auf das bei dieser Autooxidation gebildete Wasserstoffperoxid zurückzuführen sein [37, 119].

Phorbolester wie PMA stellen 1,2-Diacylglycerol-Analoga dar und wurden schon mit verschiedenen Zellantworten in Verbindung gebracht, wie beispielsweise Stimulierung von Proliferation, Förderung von Tumorwachstum, Differenzierung oder Apoptose. Als 1,2-Diacylglycerol-Analoga wirken sie vornehmlich über eine Aktivierung von Proteinkinase C [186, 158, 102, 123, 54, 223, 328, 36, 103, 104].

Kobaltchlorid und 2,2-Dipyridyl (2,2-DP) wirken als Hypoxie-Mimetika. Bei der

zellulären Antwort auf Hypoxie spielt der heterodimere Transkriptionsfaktor HIF (Hypoxie-induzierbarer Faktor) eine essentielle und bedeutende Rolle [81, 325, 285]. Die alpha-Untereinheit dieses Faktors wird während normoxischer Bedingungen unter Mitwirkung von Prolylhydroxylasen (PHDs) und dem Von-Hippel-Lindau Protein (pVHL), dem Bestandteil eines E3-Ubiquitin-Ligase Komplexes, fortwährend proteasomal abgebaut [202, 55]. Zudem sorgt die Asparaginhydroxylase FIH (*engl.* factor inhibiting HIF) unter normoxischen Bedingungen zusätzlich zu einer Verringerung der transkriptionellen Aktivität von HIF [195, 75, 174]. Unter hypoxischen Bedingungen hingegen bleibt der Abbau der alpha-Untereinheit aus, so dass der dimere Transkriptionsfaktor seine Tätigkeit bei der Expression von Genen, die unter Sauerstoffmangel benötigt werden, aufnehmen kann [184, 81, 45]. Die Hypoxie-Mimetika täuschen der Zelle hypoxische Bedingungen u.a. vor, indem sie in die soeben beschriebenen Prozesse eingreifen. So führen Eisenchelatoren wie 2,2-DP zu einer intrazellulären Fe^{2+} -Verknappung. Da Fe^{2+} u.a. ein wichtiger Kofaktor der PHDs und FIH ist, bleibt in diesem Fall offenbar der Abbau bzw. die transkriptionelle Inhibition von HIF aus [342, 282]. Der Wirkmechanismus von Kobaltchlorid wird ebenfalls mit einer Inaktivierung der PHDs in Verbindung gebracht. So nimmt man an, dass Co^{2+} die Eisen-Bindungsstelle im aktiven Zentrum der Enzyme besetzt, ohne jedoch im Stande zu sein, die entsprechenden Enzymreaktionen zu katalysieren [76]. Auch scheint Co^{2+} in der Lage zu sein an die alpha-Untereinheit von HIF zu binden und dabei ihre Interaktion mit pVHL zu stören [342].

Drei der getesteten Substanzen zeigten eine Veränderung der Reportergenexpression gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 3.3). PMA sowie Kobaltchlorid und 2,2-DP führten dabei zu einer Halbierung oder noch stärkeren Herabsetzung der Luciferaseaktivität. Die weiteren getesteten Substanzen zeigten hingegen keinen Einfluss auf die hASH1-UTR-kontrollierte Reportergenaktivität (siehe Abbildung 3.3).

Der PMA- sowie der Hypoxie-Einfluss auf die posttranskriptionelle Kontrolle der hASH1-Synthese sollen im Folgenden ausführlich nacheinander behandelt werden.

3.3 Einfluss von Phorbolester (PMA) auf die hASH1-Expression

Da PMA schon in anderen Zelllinien neuronalen Ursprungs Differenzierungsprozesse auszulösen vermochte [231] und hASH1 u.a. bei Differenzierungsvorgängen eine entscheidende Rolle spielt, sollte im Folgenden dieser Aspekt sowie zugehörige Mechanismen untersucht werden.

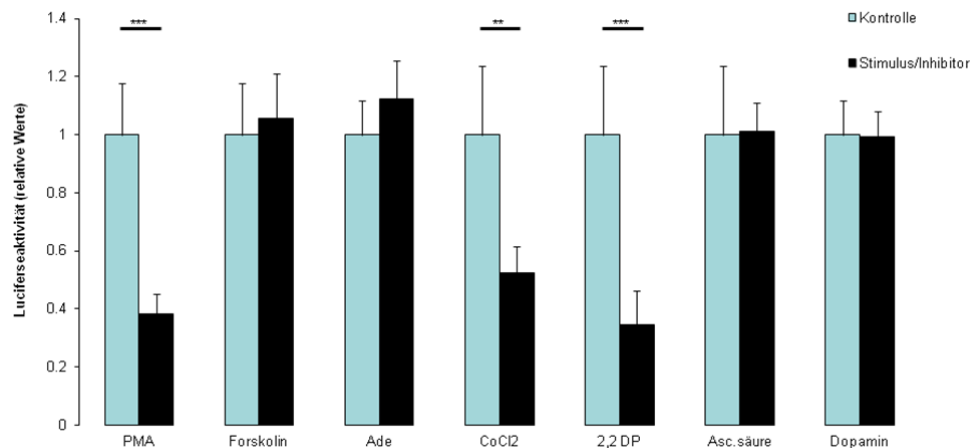


Abbildung 3.3: Screening nach Substanzen mit dem Vermögen die hASH1-UTR vermittelte Reporterogenaktivität zu verändern. Gezeigt ist eine Auswahl der getesteten Stimuli bzw. Inhibitoren. Kelly-Zellen wurden dafür mit dem hASH1-UTR-Konstrukt transfiziert und anschließend für 48 h mit verschiedenen Substanzen (100 nM PMA; 100 nM Forskolin; 100 nM Adenosin; 50 nM CoCl₂; 100 nM 2,2-DP; 100 nM Ascorbinsäure; 100 nM Dopamin) inkubiert. Dabei zeigten PMA, CoCl₂ und 2,2-DP eine deutliche Reduzierung der Reporterogenaktivität im Vergleich zur Reporterogenaktivität von Kontroll-Zellen (nur mit den Lösungsmitteln EtOH, DMSO oder H₂O behandelt).

3.3.1 Die Wirkung von PMA im Reporterogenassay ist konzentrationsabhängig

Zur Überprüfung, ob die im Screening eingesetzte Konzentration optimal für den Effekt war, wurden Kelly-Zellen nach Transfektion mit den Reporterkonstrukten mit verschiedenen PMA-Konzentrationen für 48 h inkubiert. Dabei zeigte sich eine Konzentrationsabhängigkeit des PMA-Einflusses mit der stärksten Herabregulation der hASH1-UTR-vermittelten Reporterogen-Expression bei einer PMA-Konzentration von 40 nM auf unter 30 % bezogen auf die Kontrolle (siehe Abbildung 3.4). Die im Screening getestete Konzentration von 100 nM zeigte einen starken Einfluss mit einer Herabregulation auf etwa 40 %, so dass im Weiteren nur noch diese beiden PMA-Konzentrationen eingesetzt wurden. Diese PMA-Konzentrationen entsprechen denen, welche üblicherweise in Zellkulturexperimenten verwendet wurden.

3.3.2 PMA erniedrigt die hASH1-mRNA-Menge

Um die im vorangegangenen Reporterogenmodell gemachten Beobachtungen zu überprüfen, wurde getestet, ob unter PMA die hASH1-mRNA-Menge ebenfalls zurückgeht. Dazu wurden Kelly-Zellen für unterschiedlich lange Perioden mit PMA

3.3 Einfluss von Phorbol ester (PMA) auf die hASH1-Expression

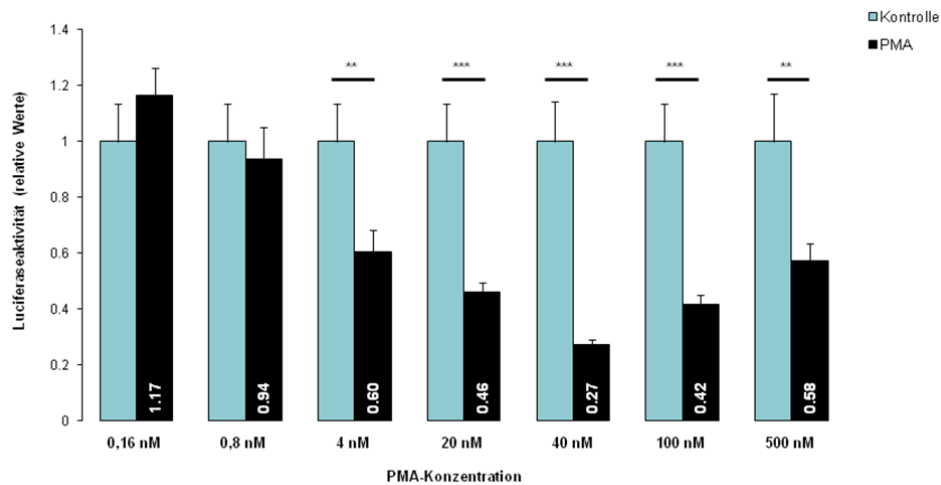


Abbildung 3.4: Dosis-Wirkungs-Beziehung von PMA im Reporterassay mit dem hASH1-UTR-Konstrukt (pGL3p-hASH1-5'-UTR-Luc-3'-UTR). Dazu wurden Kelly-Zellen mit dem Vektor transfiziert und mit unterschiedlichen Konzentrationen an PMA für 48 h inkubiert. PMA zeigte dabei bei einer PMA-Konzentration von 40 nM die stärkste Abschwächung des Reportersignals.

inkubiert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA diente in der anschließenden Realtime-PCR als Template für die Quantifizierung der hASH1-mRNA.

Der Eindruck, dass PMA einen negativen Einfluss auf die hASH1-Expression ausübt, konnte auch auf Ebene der mRNA bestätigt werden. So zeigte sich, dass die hASH1-mRNA unter PMA schon nach 3 h auf unter die Hälfte der mRNA-Menge der Kontroll-Zellen herab-reguliert wird. Die hASH1-mRNA-Menge ging nach 6 h unter PMA sogar auf etwa 1/5 verglichen mit der Kontrolle zurück, erholte sich dann aber wieder auf über 50 % nach 48 h (siehe Abbildung 3.5).

3.3.3 PMA erniedrigt die hASH1-Protein-Menge

Als wichtige Überprüfung musste sich nun noch zeigen, ob sich PMA auch auf der hASH1-Proteinebene auswirkt. Dazu wurden von Kelly-Zellen, nach unterschiedlich langen Inkubationszeiten mit PMA, Protein-Präparationen hergestellt. Diese wurden dann per SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blotting mittels spezifischer Antikörper detektiert.

Hier zeigte sich deutlich, dass hASH1 unter PMA herabreguliert wird. So geht die hASH1-Proteinmenge schon nach 3 h auf unter 50 % der Kontrolle zurück. Jedoch fand hier im Gegensatz zu den mRNA-Daten über den gesamten getesteten Zeitraum

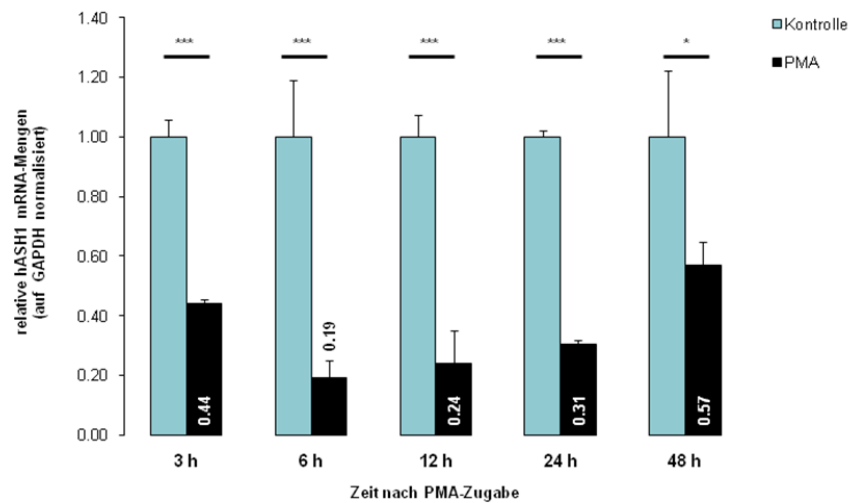


Abbildung 3.5: Zeitlicher Verlauf der hASH1-mRNA-Menge in Kelly-Zellen nach Inkubation mit PMA (100nM) verglichen mit Kontrollzellen ohne PMA-Behandlung. Als interner Marker für die in der Realtime-PCR eingesetzte Gesamt-cDNA-Menge wurde hier auf GAPDH normiert (eine ebenfalls durchgeführte Normierung auf β -Aktin führte zu vergleichbaren Ergebnissen).

eine sukzessive Abnahme der hASH1-Proteinmenge statt, so dass nach 48 h nur noch etwa $\frac{1}{5}$ der hASH1-Proteinmenge verglichen mit Zellen ohne PMA-Behandlung nachweisbar waren (siehe Abbildung 3.6).

Ob der beobachtete PMA-Einfluss möglicherweise einen nur auf Neuroblastoma-Zellen begrenzten Effekt darstellt, sollte eine Überprüfung in primären Zellen klären. Hierzu wurde Mash1 in primären Kortex-Zellen von E19 Ratten *in situ* mit Antikörper-gekoppeltem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt. Dabei zeigte sich, dass Mash1 in den Kortex-Zellen nach zwei Tagen *in vitro*-Kultivierung exprimiert wird und PMA die Mash1-Fluoreszenzintensität deutlich senkte (siehe Abbildung 3.7 A und B). Unter Kontrollbedingungen zeigte die Mash1-Expression eine zelluläre Heterogenität die unter PMA-Behandlung nicht zu beobachten war (Standardabweichung in Abbildung 3.7 C). Zudem ließ sich der Dendriten-Marker MAP2 (*engl.* microtubule-associated protein 2) unter PMA-Einfluss verstärkt nachweisen (Abbildung 3.7 D). Aus dem MAP2 Gen gehen verschiedene Spleißvarianten hervor. Man nimmt von diesen Proteinen an, dass sie über ihre Mikrotubuli-stabilisierende Aktivität eine Rolle bei Regulation der Mikrotubuli-Netzwerke in den Dendriten von Neuronen spielen [60]. Da ihre Expression in neuronalen Vorläuferzellen nur schwach, aber einen Tag nach der Expression der Neuronen-spezifischen Tubulin-Isoform III β stark, ausgeprägt ist, wird MAP2 als sensibler und spezifischer Marker für reife Neuronen eingesetzt [209, 261].

3.3 Einfluss von Phorbol ester (PMA) auf die hASH1-Expression

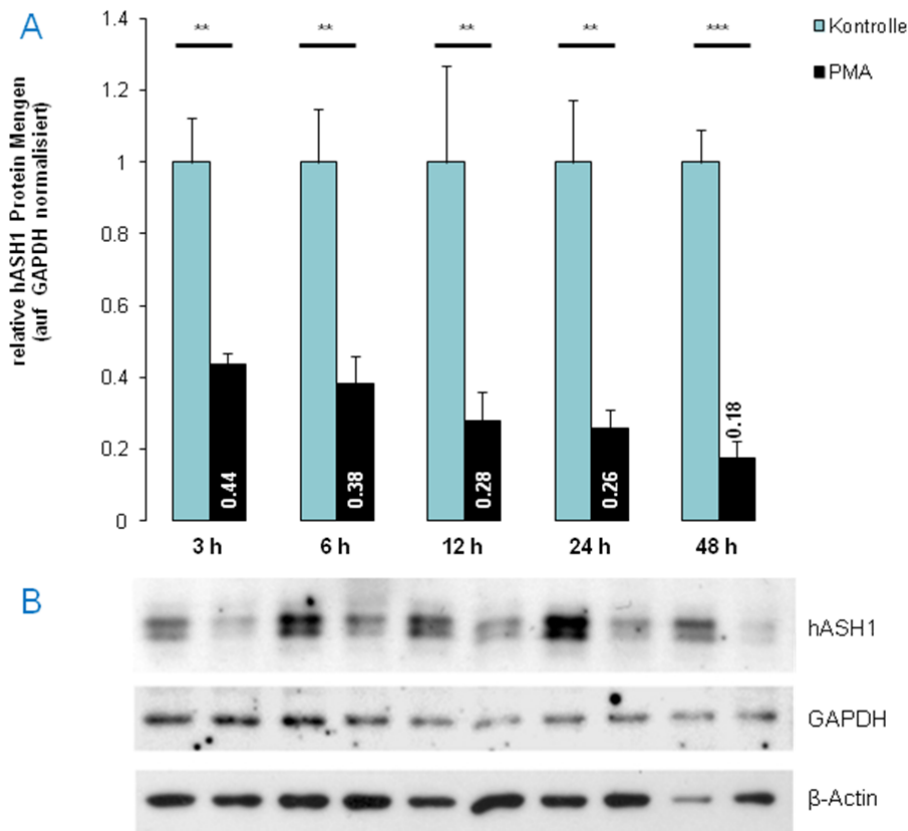


Abbildung 3.6: Zeitlicher Verlauf der hASH1-Proteinmenge in Kelly-Zellen nach Inkubation mit PMA (100 nM). Eine repräsentative Originaldarstellung wird in (B) gezeigt.

Eine Westernblot-Analyse bestätigte diese Ergebnisse. Hierzu wurden Kelly-Zellen und zum Vergleich primäre Kortex-Zellen aus der Ratte mit PMA für 6 h inkubiert. Hierbei konnte eine vergleichbare Abnahme vom Nagerhomolog Mash1 auf Protein-Ebene beobachtet werden (siehe Abbildung 3.8).

3.3.4 Zeitlicher Vergleich des Verhaltens von hASH1-Promotor und -UTRs im Reporteragenassay

Inwieweit bei der Herabregulation von hASH1 der Promotor involviert ist, sollte eine Aufklärung des zeitlichen Ablaufs der Reporteragen-Aktivität von UTR-Konstrukt (pGL3p-hASH1-5'-UTR-Luc-3'-UTR) im Vergleich zu einem hASH1-Promotor-Konstrukt (p251) in Kelly-Zellen zeigen. Dieses Promotor-Konstrukt besitzt an Stelle des SV40-Promotors des Kontrollvektors (ohne hASH1-UTRs) eine 1,4 kb lange

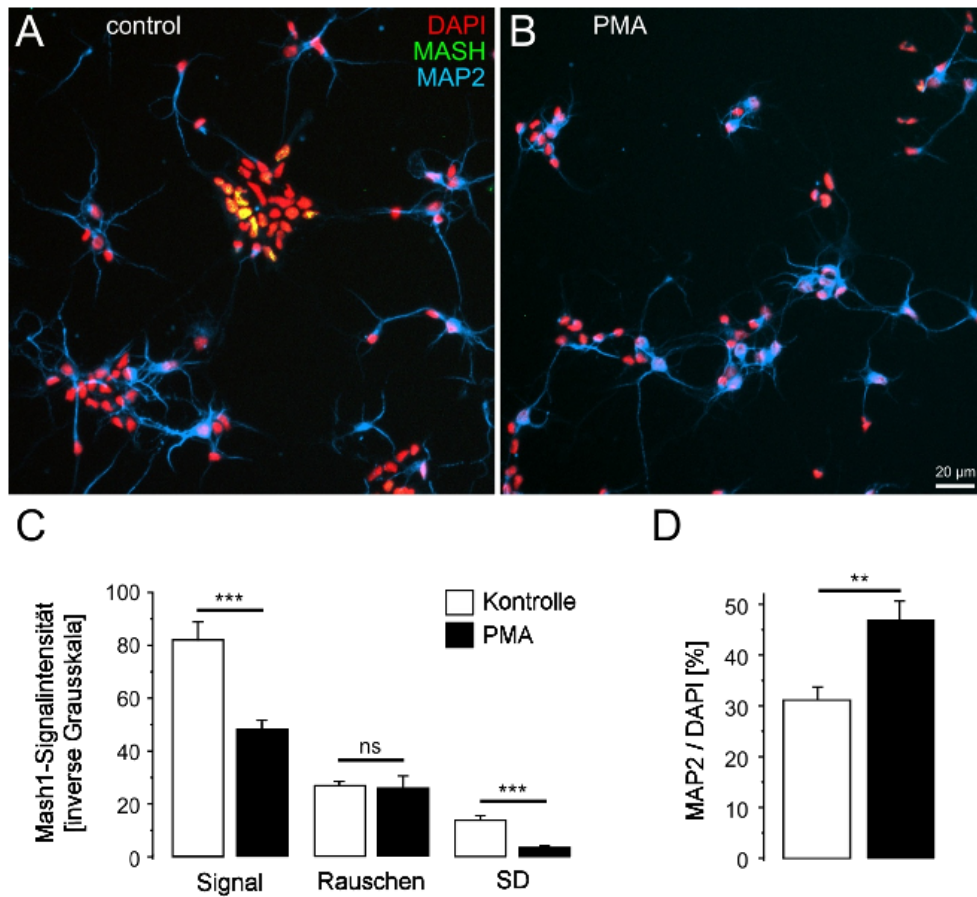


Abbildung 3.7: Mash1-Immunofluoreszenz in primären Kortex-Zellen der Ratte. (A) Mash1 ließ sich in Kontrollzellen nach zwei Tagen *in vitro*-Kultivierung nachweisen. (B) Unter PMA-Behandlung ging die Mash1-Fluoreszenzintensität der Zellen zurück. (C) Die quantitative Analyse der Fluoreszenzintensitäten zeigte bei PMA-behandelten Zellen in etwa eine Halbierung. Hierbei werden steigende Fluoreszenzintensitäten durch steigende Werte wiedergegeben. Die Hintergrund-Fluoreszenz (Rauschen) war bei unbehandelten und PMA-behandelten Zellen identisch. Die Standardabweichung (SD) diente als Maß für die zelluläre Heterogenität der Mash1-Expression. (D) Zudem wurde der Dendriten-Marker MAP2 bei Zellen unter PMA-Einfluss verstärkt gebildet. Zur Kennzeichnung der Zellkerne (A, B) sowie zur Normierung der MAP2-Mengen (D) wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) eingesetzt.

3.3 Einfluss von Phorbol ester (PMA) auf die hASH1-Expression

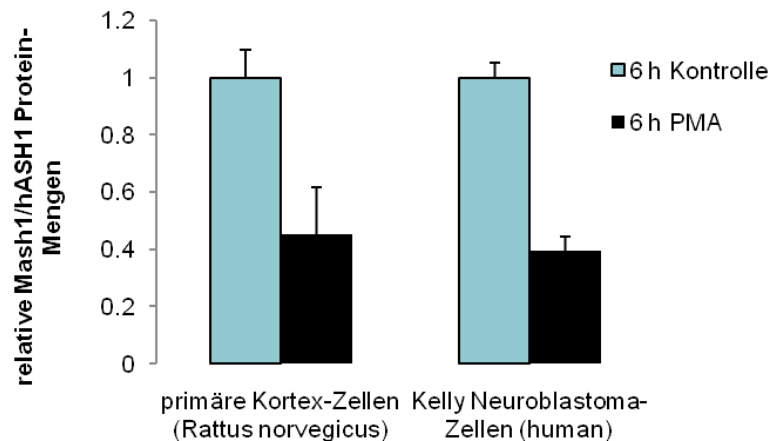


Abbildung 3.8: Vergleich der Proteinmengen von hASH1 in Kelly-Zellen und Mash1 in primären Kortex-Zellen (Ratte) nach 6-stündiger Inkubation mit PMA (20 nM).

stromaufwärts des Translationsstarts gelegene Sequenz der hASH1-Promotorregion.

Dabei zeigte sich, dass während beim UTR-Konstrukt schon nach 12 h eine deutliche Reduzierung des Reporter-Signals gegenüber dem Kontrollvektor zu beobachten war, eine Verminderung beim Promotor-Konstrukt erst nach 48 h stattfand (siehe Abbildung 3.9).

3.3.5 Kurzfristig ist eine mRNA-Destabilisierung für die hASH1-Herabregulation verantwortlich

Zur Aufklärung der dem PMA-Effekt zugrunde liegenden Mechanismen, sollte im Folgenden eine Änderung der mRNA-Stabilität überprüft werden. Hierzu wurden Kelly-Zellen für 6 h und 48 h mit PMA inkubiert. Anschließend wurde die Transkription in den Zellen mit Actinomycin D unterbunden und die RNA der Zellen, nach unterschiedlich langen Inkubations-Zeiträumen mit dem Transkriptionsinhibitor, isoliert. Eine Quantifizierung der hASH1-mRNA wurde per Realtime-PCR vorgenommen.

Bei kürzerer Inkubationszeit mit PMA kam es zu einer Stabilitätsminderung der hASH1-mRNA (siehe Abbildung 3.10a). Diese ist nach länger anhaltender PMA-Behandlung aber nicht mehr zu beobachten (siehe Abbildung 3.10b).

Da die hASH1-Proteinmenge jedoch kontinuierlich abnimmt, sollte geklärt werden, ob bei längerer PMA-Behandlung möglicherweise ein verstärkter hASH1-Proteinabbau stattfindet. Dazu wurden Kelly-Zellen für 48 h mit PMA (100 nM) inkubiert und die Translation mithilfe von Cycloheximid gestoppt. Nach verschiedenen

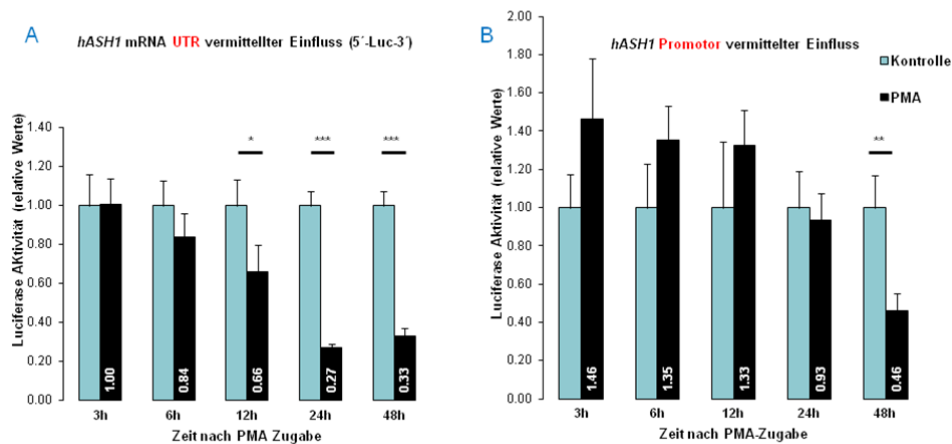


Abbildung 3.9: Vergleich des zeitlichen Verlaufs der Reporterogenaktivitäten in Abhängigkeit von den hASH1-UTRs (A) bzw. hASH1-Promotor (B) im Reporteragenassay. In diesem Modell kommt es in beiden Fällen zu einer Absenkung der Luciferaseaktivität, doch tritt die UTR-vermittelte Reaktion auf PMA deutlich früher als die des Promotors ein.

langen Inkubations-Zeiträumen mit dem Translationsinhibitor wurden die Zellen geerntet und die hASH1-Proteinmengen bestimmt.

Hierbei zeigte sich jedoch, dass die hASH1-Proteinstabilität durch 48-stündige PMA-Behandlung unbeeinflusst blieb, so dass die Halbwertszeit von hASH1 mit und ohne PMA-Behandlung etwa 1,5 h betrug (siehe Abbildung 3.11).

3.3.6 Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) können den Effekt von PMA im Reporteragenassay (partiell) aufheben

Da PMA ein bekannter Aktivator von Proteinkinase C (PKC) ist, wurde geprüft, ob PKC eine Rolle bei der hASH1-Regulation spielt. Dazu wurde getestet, ob die beiden PKC-Inhibitoren Staurosporin und GF109203X in der Lage wären, den PMA-Einfluss im Reporteragenassay abzuschwächen bzw. aufzuheben.

Für diesen Reporteragenassay wurden Kelly-Zellen mit dem hASH1-UTR-Konstrukt (pGL3p-hASH1-5'-UTR-Luc-3'-UTR) sowie dem Kontrollvektor (pGL3p) transfiziert. Die Zellen unterlagen dann einer 24-stündigen PMA-Behandlung mit sowie ohne PKC-Inhibitor. Bei Zellen die mit PKC-Inhibitor behandelt wurden, ging der

3.3 Einfluss von Phorbol ester (PMA) auf die hASH1-Expression

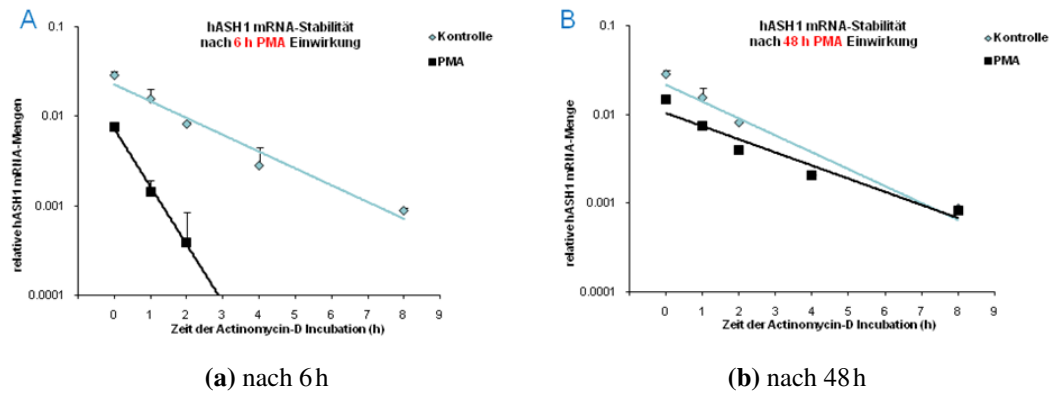


Abbildung 3.10: hASH1-mRNA-Stabilität in Kelly-Zellen 6 h (A) und 48 h (B) nach PMA (100 nM) Einwirkung. Es lässt sich eine deutliche Abnahme der hASH1-mRNA-Stabilität nach 6-stündiger Inkubation feststellen. Diese war jedoch nach längerer Inkubationszeit nicht mehr nachweisbar.

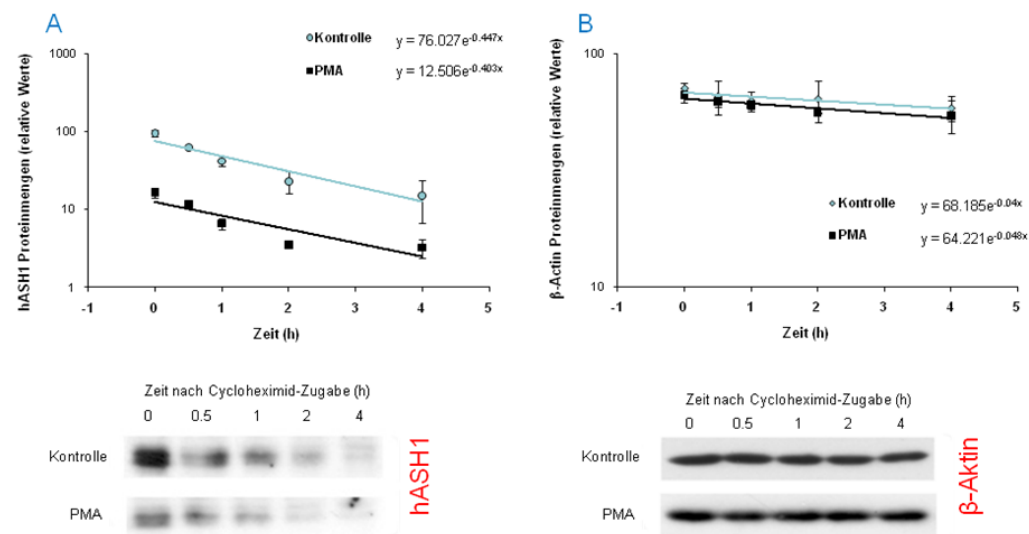


Abbildung 3.11: Bestimmung von Proteinstabilitäten mittels Arrest der Translation mit Cycloheximid nach 48-stündiger Inkubation mit und ohne PMA (100 nM). Die hASH1-Proteinstabilität (A) bleibt durch PMA ebenso unbeeinflusst wie die der β -Aktin-Kontrolle (B).

eigentlichen Inkubation mit PMA und PKC-Inhibitor eine 4-stündige Präinkubation nur mit dem Inhibitor voraus, um die Funktionsfähigkeit von PKC schon vor der PMA-Behandlung einzuschränken.

Es zeigte sich, dass Staurosporin, und in stärkerem Maße GF109203X, den von PMA hervorgerufenen Effekt abschwächten (Abbildung 3.12). Der als Kontrolle eingesetzte Proteinkinase A-Inhibitor KT-5720 vermochte dagegen nicht die Wirkung von PMA zu mildern.

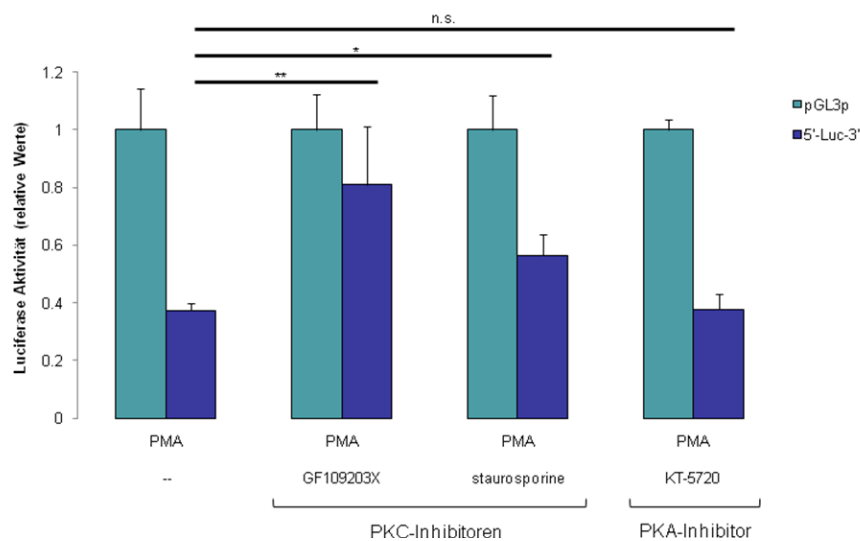


Abbildung 3.12: Die beiden PKC-Inhibitoren Staurosporin (40 nM) und GF109203X (5 μ M) konnten den hemmenden Einfluss von PMA auf das hASH1-UTR-Konstrukt (5'-Luc-3') im Vergleich zum Kontroll-Vektor (pGL3p) im Reportergenassay partiell aufheben, wobei der Einfluss von GF109203X im Vergleich zu Staurosporin stärker ausgeprägt war. Der zur Kontrolle miteingesetzte Proteinkinase A-Inhibitor KT-5720 (2 μ M) zeigte dagegen keinen Effekt.

3.3.7 Auf mRNA-Ebene lässt sich die Wirkung von PMA ebenfalls mithilfe von PKC-Inhibitoren abschwächen

Da zumindest der frühe Einfluss von PMA auf hASH1 eine post-transkriptionelle Komponente über eine Destabilisierung der mRNA beinhaltet, sollte auch auf Ebene der mRNA überprüft werden, ob die PKC-Inhibitoren die PMA-Wirkung schwächen.

Um die alleinige Wirkung der PKC-Inhibitoren auf hASH1 zu untersuchen, wurden Kelly-Zellen unterschiedlich lang entweder mit Staurosporin oder GF109203X allein inkubiert und anschließend die RNA isoliert. Mit spezifischen Primern wurden die hASH1-mRNA-Mengen per Realtime-PCR quantifiziert. Dabei zeigte sich, dass

3.3 Einfluss von Phorbol ester (PMA) auf die hASH1-Expression

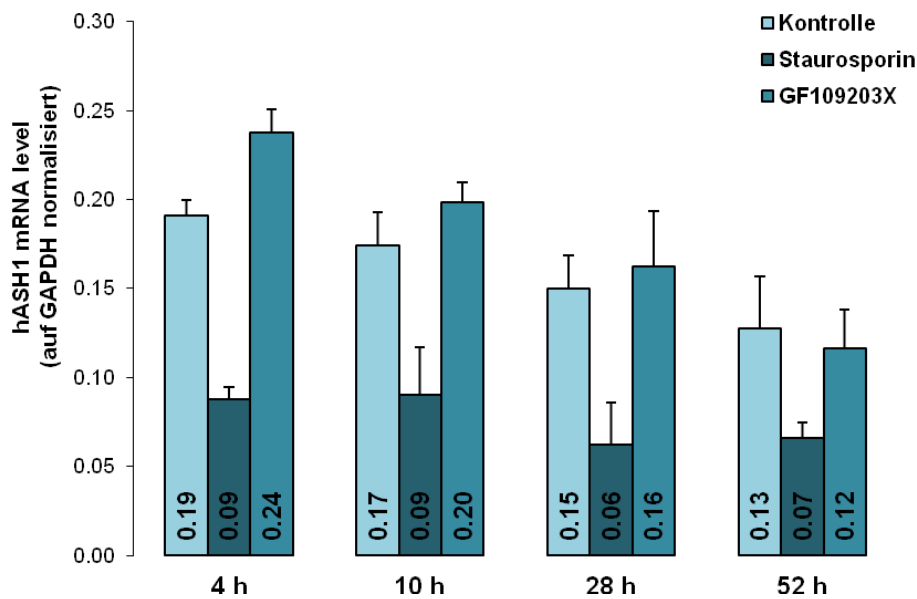


Abbildung 3.13: Zeitlicher Verlauf von hASH1-mRNA-Menge bei Inkubation von Kelly-Zellen mit den beiden getesteten PKC-Inhibitoren Staurosporin und GF109203X. Schon nach 4-stündiger Inkubation der Zellen mit Staurosporin ist eine deutliche Senkung von hASH1 auf mRNA-Ebene zu beobachten. GF109203X hingegen führt abgesehen von einer leichten Erhöhung nach 4h zu keiner Veränderung gegenüber unbehandelten Zellen.

sich GF109203X kaum auf die mRNA-Menge von hASH1 auswirkte. Staurosporin hingegen reduzierte die hASH1-mRNA-Menge schon nach 4h auf etwa die Hälfte verglichen mit den Kontrollzellen (siehe Abbildung 3.13).

Im nächsten Schritt wurden Kelly-Zellen unterschiedlich langen PMA-Inkubationszeiten mit und ohne PKC-Inhibitoren ausgesetzt und danach geerntet. Dabei ging der PMA-Inkubation eine 4-stündige Präinkubation mit den PKC-Inhibitoren voraus. Die isolierte RNA wurde abermals per Realtime-PCR mit hASH1-spezifischen Primern analysiert. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden die hASH1-mRNA-Mengen bei PMA-behandelten Zellen auf die Mengen der unbehandelten Zellen bzw. auf die Mengen der nur mit dem jeweiligen PKC-Inhibitor behandelten Zellen normiert.

Und auch hierbei bestätigte sich der Eindruck, dass PKC eine Rolle bei der hASH1-Expression spielt. So vermochten die beiden PKC-Inhibitoren insbesondere zu früheren Zeitpunkten (bis 24h) die durch PMA hervorgerufene hASH1-Herabregulation abzumildern (siehe Abbildung 3.14).

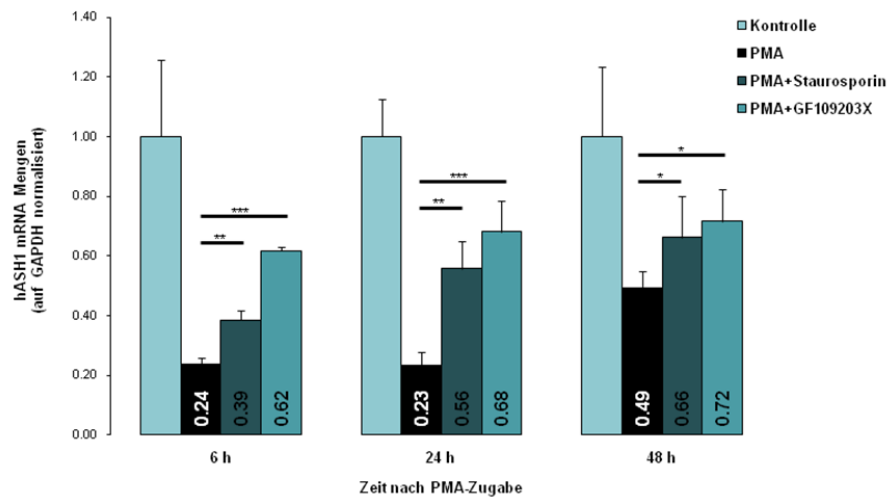


Abbildung 3.14: Kelly-Zellen wurden unterschiedlich lang mit PMA und PKC-Inhibitoren behandelt. Anschließend wurde die hASH1-mRNA-Menge bestimmt. Es zeigte sich, dass beide PKC-Inhibitoren auch auf mRNA-Ebene den PMA-Einfluss abschwächten. Vergleichbar zu den UTR-abhängigen Reporterassays zeigte GF109203X den stärkeren Effekt im Vergleich zu Staurosporin. Hierbei dienten unbehandelte Zellen als Kontrolle für die PMA-Behandlung und nur mit dem jeweiligen PKC-Inhibitor behandelte Zellen als Kontrolle für Zellen, die mit PMA sowie PKC-Inhibitor inkubiert wurden.

3.3.8 Suche nach *trans*-Faktoren

Um mögliche *trans*-Faktoren zu ermitteln, die in die hASH1-Regulation unter PMA-Behandlung involviert sind, wurden Crosslinking-Experimente durchgeführt. Hierbei wurden radioaktiv markierte *in vitro*-Transkripte der hASH1-UTRs mit Proteinen nativer Konformation von Cytosolpräparationen aus Kelly-Zellen inkubiert. Dabei bildeten sich RNA-Proteinkomplexe. Diese Interaktionen wurden anschließend mittels UV-Bestrahlung fixiert. Nach einem Abbau der RNA waren nur Proteine, die in direktem Kontakt zur RNA standen, radioaktiv markiert. Nach Trennung in einem Gel sollten sich Änderungen im Bandenmuster zwischen Cytosolpräparationen von PMA-behandelten Zellen und Kontrollzellen auf mögliche in die hASH1-Regulation involvierte *trans*-Faktoren zurückführen lassen. Mit unterschiedlichen Nukleotiden markierte RNAs sollten zudem Rückschlüsse auf die Bindungsspezifitäten der involvierten Faktoren zulassen.

Die Crosslinking-Experimente zeigten jedoch nur schwache Veränderungen zwischen PMA-behandelten Zellen und Kontrollzellen. Die deutlichste Musterveränderung offenbarte die 5'-UTR von hASH1 hervorgerufen durch einen möglichen *trans*-Faktor mit einer Präferenz für eine U- und C-reiche Bindungsstelle (siehe Abbildung 3.15).

3.3 Einfluss von Phorbol ester (PMA) auf die hASH1-Expression

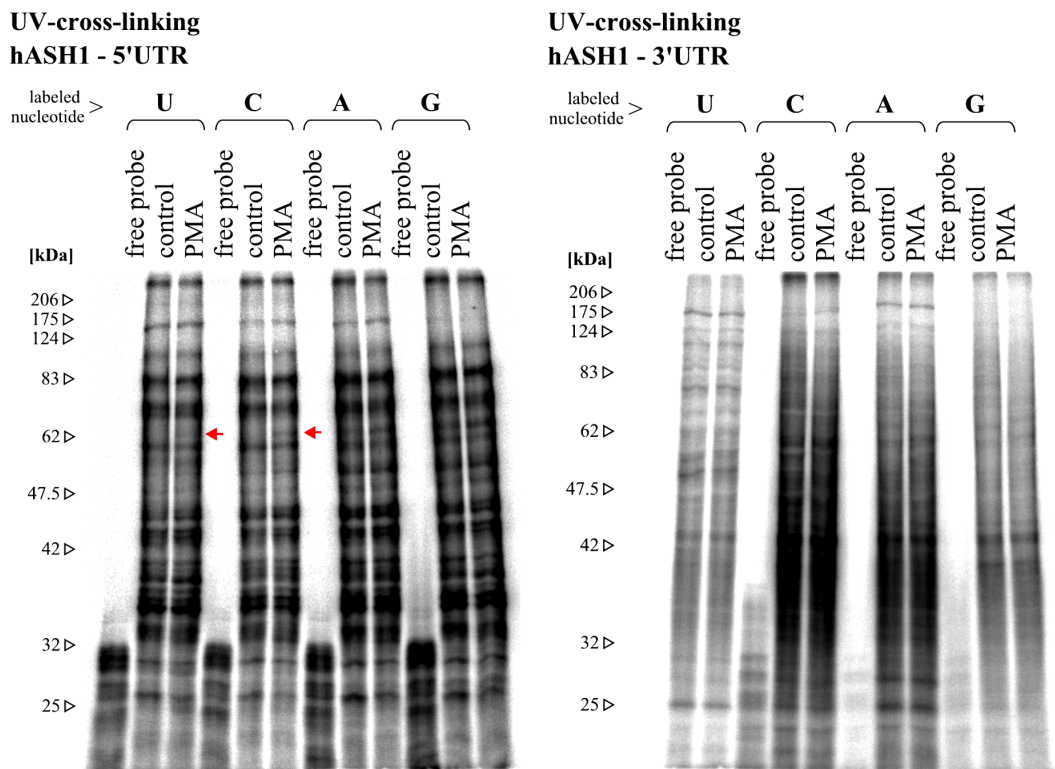


Abbildung 3.15: UV-Crosslinking-Experimente mit *in vitro*-Transkripten der hASH1-UTRs und den Cytosolpräparationen von PMA-behandelten Zellen sowie Kontrollzellen. Nur die 5'-UTR zeigte eine Musterveränderung aufgrund eines putativen Bindungsfaktors mit einer Größe von etwa 60kDa und einer CU-reichen Bindungsstelle (durch Pfeile markiert).

3.3.9 Suche nach verantwortlichen *cis*-Elementen in den UTRs

Um für die hASH1-Herabregulation unter PMA mögliche *cis*-Elemente ausfindig zu machen, wurden für eine erste Eingrenzung des Bereichs Reporter-Konstrukte verwendet, die entweder nur die hASH1-5'-UTR (pGL3p-hASH1-5'-UTR-Luc) oder aber die 3'-UTR (pGL3p-hASH1-Luc-3'-UTR) enthielten (siehe Abbildung 3.16). Nachdem Kelly-Zellen mit den verschiedenen Konstrukten transfiziert wurden und einer PMA-Inkubation für 48 h unterlagen, konnte keine der UTRs einzeln für den PMA-Effekt verantwortlich gemacht werden (siehe Abbildung 3.16). Da beide UTRs einen additiven, jedoch voneinander unabhängigen Anteil an der Herabregulation von hASH1 unter PMA haben, scheinen hier mehrere verschiedene Faktoren mit

Bindungsstellen in beiden UTRs bei der Vermittlung des PMA-Effekts zusammenzuwirken.

Auch mit einer weiteren genaueren Untersuchung, mit unterschiedlich langen PMA-Inkubationszeiten unter Nutzung verschiedener UTR-Deletionsvarianten, gelang es nicht, den PMA-Effekt einem einzigen Bereich zuzuordnen (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde im Folgenden auch auf eine weiterreichende Suche nach *trans*-Faktoren, ohne in Reporterassays gewonnene klar definierte *cis*-Elemente, verzichtet.

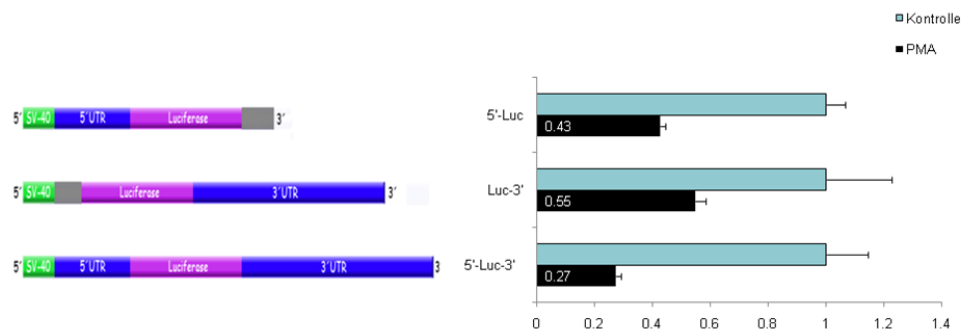


Abbildung 3.16: Zum Auffinden an der PMA-Regulation beteiligter *cis*-Elemente wurden hASH1-UTR-Konstrukte im Reporterassay getestet, die nur die hASH1-5'- oder 3'-UTR enthielten. Dabei wurde Kelly-Zellen mit den Vektoren transfiziert und einer 48-stündigen Inkubation mit PMA ausgesetzt. Es war jedoch nicht möglich, den PMA-Einfluss auf eine der beiden UTRs zurückzuführen. Beide UTRs vermitteln additiv den PMA-Einfluss.

3.4 Einfluss von Hypoxie auf die hASH1-Expression

Sauerstoff spielt als terminaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette der Mitochondrien eine entscheidende Rolle bei der Energieproduktion der eukaryontischen Zelle. Deshalb ist eine Reaktion der Zelle auf Sauerstofflimitierungen von äußerster Wichtigkeit für den Energiehaushalt der Zelle. Unter Hypoxie kommt es allgemein zu einer Suppression u.a. von Transkription, Translation und Proteinabbau. Jedoch unterliegen ausgewählte Gene einer ausgeprägteren Stilllegung sowie andere im Gegensatz dazu gar einer verstärkten Expression. Die Regulation ist hierbei sehr komplex und schließt auch posttranskriptionelle Prozesse ein [82, 81].

Wie im Screening nach Substanzen mit potentiell posttranskriptionalem Einfluss auf die hASH1-Synthese zu sehen war, führten zusätzlich zu PMA auch die bei-

den Hypoxie-Mimetika CoCl_2 und 2,2-DP zu einer Verringerung der Reporter-gen-Aktivität beim hASH1-UTR-Konstrukt (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 50). Die beiden Hypoxie-Mimetika sind in der Lage die Auswirkungen hypoxischer Bedingungen u.a. auf die α -Untereinheit von HIF (Hypoxie-induzierbarer Faktor), eines heterodimeren Transkriptionsfaktors, welcher eine bedeutende Rolle bei der Antwort der Zelle auf Sauerstoffmangel spielt, zu imitieren [282].

Der folgende Teil soll sich nun mit der UTR-vermittelten hASH1-Kontrolle unter Hypoxie bzw. Sauerstoffmangel beschäftigen.

3.4.1 Sinkender Sauerstoffpartialdruck führt zu einer Abnahme der hASH1-Proteinmenge

Um zu beurteilen, ob sich die im Reporter-genassay gemachten Beobachtungen auch auf hASH1-Protein-Ebene unter tatsächlich hypoxischen Bedingungen manifestieren, wurden Kelly-Zellen verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken ausgesetzt. Nach 18 h wurden die Zellen geerntet und die hASH1-Proteinmengen in den Zelllysaten mittels Immunoblotting bestimmt.

Es bestätigte sich, dass hypoxische Bedingungen zu einer Herabregulation von hASH1 führen. Dabei blieb hASH1 über einen Bereich von 21 % bis 6 % Sauerstoff konstant und nahm erst bei niedrigeren Sauerstoffpartialdrücken ab (siehe Abbildung 3.17). Deshalb soll im Folgenden bei Normoxie auf einen Sauerstoffgehalt von 21 % (entspricht einem Partialdruck $p\text{O}_2$ von etwa 160 mmHg) Bezug genommen werden und bei Hypoxie auf einen Sauerstoffgehalt von 1 % (entspricht einem Partialdruck $p\text{O}_2$ von 7,6 mmHg).

3.4.2 Im Gegensatz zur hASH1-Proteinmenge bleibt die mRNA-Menge unter Hypoxie unverändert

Um den zeitlichen Verlauf der mRNA- und Proteinmenge von hASH1 unter Hypoxie zu untersuchen, wurden Kelly-Zellen unterschiedlich lange hypoxischen Bedingungen ausgesetzt und danach geerntet. Die hASH1-Menge der Zelllysate wurde dann per Immunoblotting bestimmt.

Dabei zeigte sich, dass hASH1 nach 3 h unter Hypoxie auf die Hälfte verglichen mit normoxischen Kontrollbedingungen abnimmt. Dabei wird die stärkste Ausprägung der hASH1-Abnahme auf $\frac{1}{5}$ der Kontrollmenge schon nach 6 h unter Hypoxie erreicht. Dieser Effekt scheint relativ konstant zu bleiben, relativiert sich bei länger andauernder Hypoxie jedoch etwas. Die hASH1-Abnahme scheint zudem ein

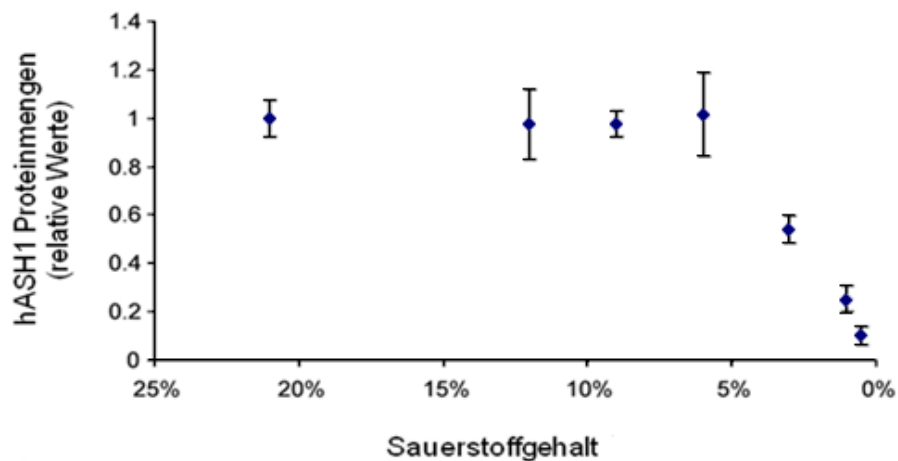


Abbildung 3.17: Kelly-Zellen wurden verschiedenen Sauerstoffpartialdrücken für 18 h ausgesetzt. Die anschließende Überprüfung der hASH1-Proteinmengen offenbarte, dass hASH1 erst ab einem Sauerstoffgehalt von kleiner als 6 % mit einer Abnahme reagiert. Die hASH1-Proteinmengen wurden auf β -Aktin normiert.

reversibler Prozess zu sein (Abbildung 3.18). So wurde das hASH1-Ausgangslevel nach 48 h unter Hypoxie und anschließender 6-stündiger Inkubation unter Normoxie (Re-Oxygenierung) wieder erreicht.

Im Gegensatz dazu zeigte die hASH1-mRNA-Menge kaum Veränderungen unter Hypoxie über die Zeit und blieb in etwa auf Kontrollniveau (siehe Abbildung 3.18).

3.4.3 Eine Hemmung der Translation ist für die hASH1-Abnahme unter Hypoxie verantwortlich

Eine mRNA-unabhängige Abnahme der Proteinmenge kann auf eine Hemmung der Protein-Syntheserate zurück gehen. Der Beladungsgrad mit Ribosomen ist ein gutes Maß für die Translationsaktivität einer mRNA. So sind translationsinaktive mRNAs in der Regel nur mit Proteinen zu RNP-Komplexen assoziiert. Eine Möglichkeit den Beladungsgrad von mRNAs zu bestimmen stellt die Polysomengradienten-Analyse dar. Durch Cycloheximid-Behandlung werden die Ribosomen von cytosolischen Extrakten an den von ihnen gebundenen mRNAs fixiert. Die so behandelten Extrakte werden dann in einem Saccharose-Gradienten mittels Ultrazentrifugation aufgetrennt. Die Polysomen und mRNP-Komplexe werden während der Zentrifugation entsprechend ihrer Masse mehr oder weniger stark innerhalb des Konzentrationsgefälles bewegt (siehe Abbildung 3.19), wobei stärker mit Ribosomen besetzte mRNA-Komplexe eine höhere Masse besitzen und sich somit nach Ultrazentrifugation im

3.4 Einfluss von Hypoxie auf die hASH1-Expression

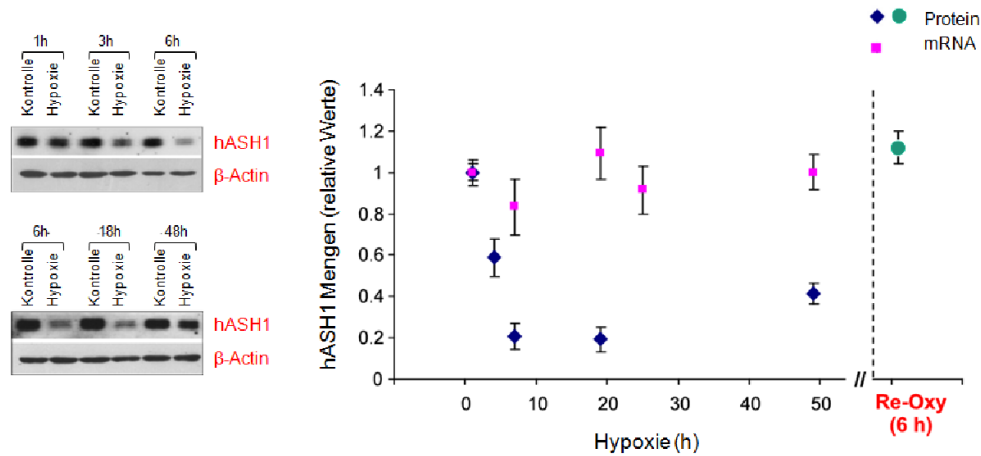


Abbildung 3.18: Zeitlicher Verlauf der Protein- und mRNA-Menge von hASH1 unter Hypoxie bezogen auf die Normoxie-Niveaus. Linke Seite: Westernblots zeigen einen Abfall von hASH1 unter Hypoxie. Rechte Seite: Im Vergleich dazu bleibt die hASH1-mRNA-Menge auch bei längerer Hypoxie-Dauer unbeeinflusst. Eine 6-stündige Reoxygenierung bringt die hASH1-Proteinmenge wieder auf das Ausgangsniveau.

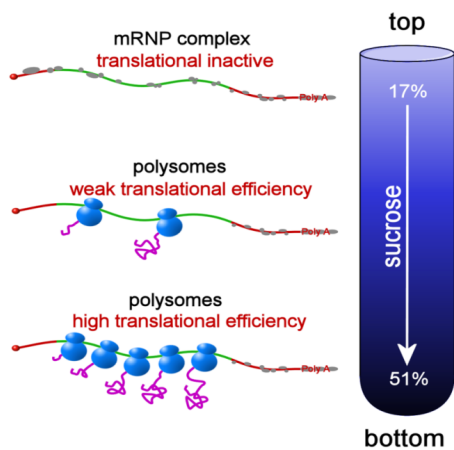


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung der Polysomengradienten-Analyse. Durch Ultrazentrifugation werden die mRNP-Komplexe je nach Besetzungsgrad mit Ribosomen innerhalb eines Saccharose-Gradienten aufgetrennt. Stärker mit Ribosomen besetzte mRNP-Komplexe finden sich somit nach Ultrazentrifugation in Bereichen höherer Dichte (im Schema weiter unten). Abbildung entnommen aus [81].

unteren Teil des Gradienten (höhere Dichte) sammeln. Anschließend werden die im Gradienten aufgetrennten Polysomen und mRNP-Komplexe in verschiedene Fraktionen aufgeteilt. Nach Isolierung der RNA können nun mithilfe spezifischer Primer definierte mRNAs einzelnen Fraktionen per Realtime-PCR quantitativ zugeordnet werden.

Da sich unter Hypoxie die hASH1-Proteinmenge verringert, die mRNA-Menge jedoch unverändert bleibt, sollte geprüft werden, ob eine Änderung der Translationsaktivität vorliegt. Dazu wurden Kelly-Zellen 18 h lang hypoxischen Bedingungen bzw. zur Kontrolle normoxischen Bedingungen ausgesetzt. Die cytosolischen Extrakte der Zellen wurden dann einer Polysomengradienten-Analyse unterzogen.

Dabei war allgemein eine leichte Verlagerung der RNAs hin zur nicht-polysomalen Fraktion zu beobachten (siehe Abbildung 3.20 A). Diese Beobachtung deckt sich mit dem bekannten Phänomen, wonach Hypoxie zu einer allgemeinen bzw. globalen Hemmung der mRNA-Translation führt [82], welche nach 6 h jedoch noch nicht sehr stark ausgeprägt ist. In viel stärkerem Ausmaß zeigte sich aber die Verlagerung der hASH1-mRNA hin zu translationsinaktiven mRNP-Komplexen. Hier war die hASH1-mRNA unter Hypoxie fast gänzlich in der translationsinaktiven Fraktion zu finden (siehe Abbildung 3.20 B/C).

3.4.4 Die Deletion dreier

Differenzierungskontroll-Elemente (DICE) hebt den Einfluss der 3'-UTR bei der hASH1-Abnahme unter Hypoxie auf

Um den Bereich aufzufinden, der den Hypoxie-Einfluss auf hASH1 vermittelt, wurden zunächst UTR-Konstrukte die nur die hASH1-5'-UTR oder 3'-UTR sowie beide UTRs enthielten in Kelly-Zellen getestet. Dabei wurde deutlich, dass *cis*-Elemente sowohl in der hASH1-5'-UTR als auch der 3'-UTR jeweils allein die Antwort auf Hypoxie vermitteln konnten. So zeigten Reporterkonstrukte mit entweder nur der 5'-UTR oder nur der 3'-UTR eine starke Herabregulation der Reportergenaktivität. Waren jedoch beide UTRs im Reporterkonstrukt zugegen, verstärkte sich der Hypoxie-Effekt kaum gegenüber den Konstrukten mit jeweils nur einer der beiden UTRs (siehe Abbildung 3.21).

Im nächsten Schritt sollte eine weitere Eingrenzung der dem Hypoxie-Effekt zugrunde liegenden *cis*-Elemente erfolgen. Dazu wurden UTR-Konstrukte mit unterschiedlichen Deletionen im Reportergenassay eingesetzt. Dabei gelang es, den für die Hypoxie wichtigen Anteil in der 3'-UTR auf einen 488 Basen großen Bereich am 5'-Ende der UTR einzugrenzen (siehe Abbildung 3.21). Zellen, die mit einem

3.4 Einfluss von Hypoxie auf die hASH1-Expression

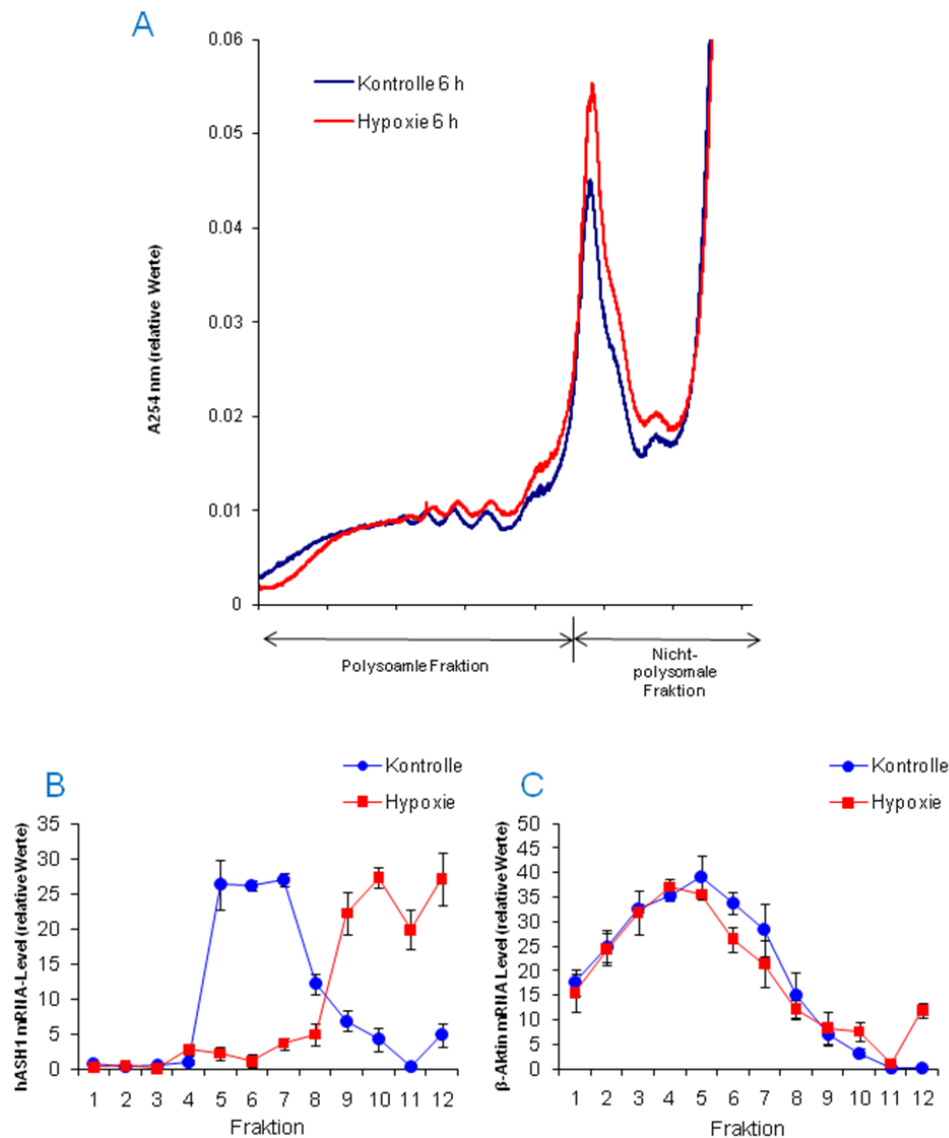


Abbildung 3.20: (A) Ribosomales Profil. Während der Fraktionierung wurde die Absorption bei 254 nm kontinuierlich gemessen. Durch Hypoxie kommt es allgemein zu einer Nettoverschiebung der mRNAs zu Fraktionen mit geringerem Beladungsgrad mit Ribosomen. (B/C) Die Verteilungsprofile von hASH1-mRNA (B) und β -Aktin-mRNA (C) in den Fraktionen der Polysomengradienten-Analyse gehen auf eine Quantifizierung durch Realtime-PCR zurück. Dabei bedeuten frühe Fraktionen eine hohe Saccharose-Konzentration und dementsprechend einen hohen Besetzungsgrad mit Ribosomen und spätere Fraktionen einen geringen Besetzungsgrad (die einzelnen Fraktionen bedeuten: 1-7 Polysomen; 8 Monosomen; 9-12 mRNPs/freie Proteine; (siehe hierzu Abbildung 3.19). Deutlich ist ein Shift der hASH1-mRNA in die Fraktionen geringerer Dichte unter Hypoxie zu erkennen. Das zur Kontrolle ebenfalls getestete β -Aktin dagegen zeigt kaum eine Verlagerung seiner mRNA durch Hypoxie.

Konstrukt (pGL3p-hASH1-Luc-3'-UTR-488del) transfiziert wurden, bei dem diese 488 Basen deletiert wurden (und die hASH1-5'-UTR fehlte), wiesen unter Hypoxie keine Herabregulation des Reporters mehr auf.

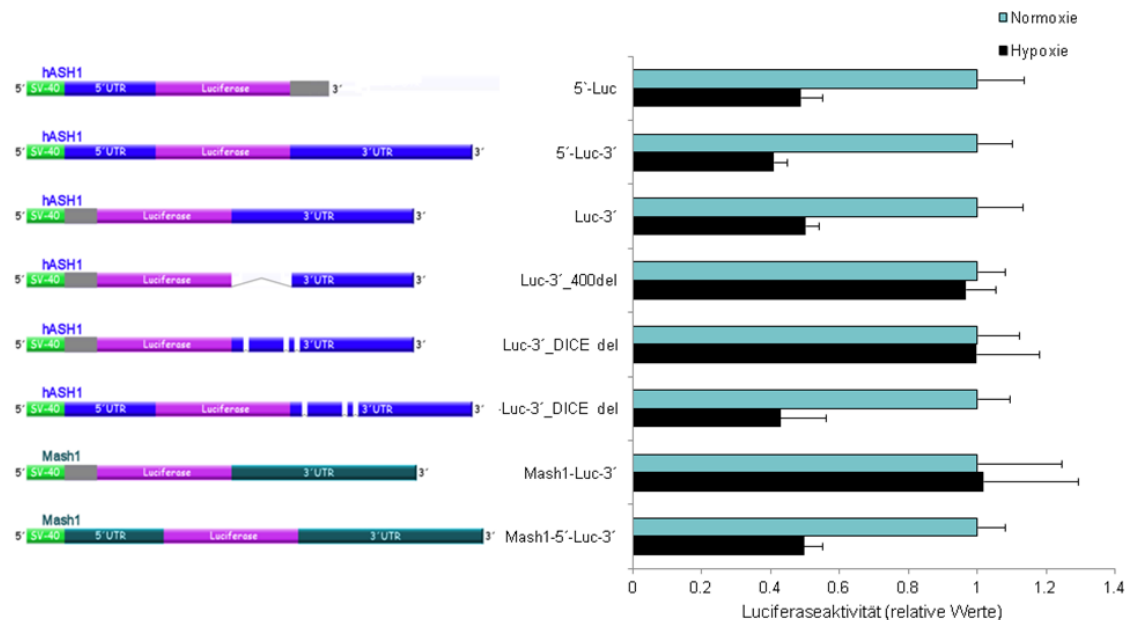


Abbildung 3.21: Verschiedene hASH1-UTR-Konstrukte wurden im Reporterassay auf ihre Fähigkeit die Reporteraktivität unter Hypoxie (18h) herabzuregulieren getestet. Es wurden zuerst 5'-UTR und 3'-UTR einzeln sowie ihre Kombination geprüft. Dabei wurde deutlich, dass der Hypoxie-Einfluss sowohl über die 5'- als auch über die 3'-UTR von hASH1 vermittelt wird. Der Einfluss der 3'-UTR lässt sich sowohl durch Deletion eines 488bp großen Bereichs als auch über die Deletion dreier DICE-Elemente aufheben. Ist jedoch zusätzlich die hASH1-5'-UTR im Reporterkonstrukt zugegen, so bleibt der Hypoxie-Einfluss erhalten. Bei den Reporterkonstrukten mit den Maus-UTRs konnte nur die Kombination aus 5'- und 3'-UTR den Hypoxie-Effekt zeigen, nicht aber das Reporterkonstrukt mit der Mash1-3'-UTR allein. Das ebenfalls getestete Konstrukt mit der Mash1-5'-UTR allein zeigte eine zu geringe Expression, um sinnvoll ausgewertet zu werden (Daten nicht gezeigt).

Eine *in silico*-Analyse (siehe dazu Abschnitt 3.1 auf Seite 45) offenbarte zwei von drei Differenzierungskontroll-Elementen (DICE). Ein Reporterkonstrukt (pGL3p-hASH1-Luc-3'-UTR-del_DICE-ABC), in dem diese DICE-Stellen deletiert wurden, verlor ebenfalls die Fähigkeit den Hypoxie-Einfluss im Reporterassay zu vermitteln (siehe Abbildung 3.21). Diese durch die Deletionen in der 3'-UTR bedingte Aufhebung des Hypoxie-Effekts konnte jedoch durch die Anwesenheit der 5'-UTR wieder kompensiert werden. So zeigte ein Reporterkonstrukt (pGL3p-hASH1-5'-Luc-3'-UTR-del_DICE-ABC) mit der Deletionen enthaltenden 3'-UTR aber vollständiger 5'-UTR eine vergleichbare Herabregulation der Reporteraktivität unter Hypoxie

3.4 Einfluss von Hypoxie auf die hASH1-Expression

wie das Konstrukt mit beiden vollständigen UTRs (siehe Abbildung 3.21). Dieser Sachverhalt ließe sich durch einen unabhängigen Einfluss der 5'-UTR erklären.

Einen weiteren Einblick in die Regulation unter Hypoxie sollten Reporterkonstrukte mit den UTRs der Maus ergeben. Lassen sich ähnliche Effekte unter Hypoxie beobachten, sind die für die Hypoxie wichtigen *cis*-Elemente vermutlich unter den zwischen Mensch und Maus konservierten Bereichen der UTRs zu suchen. Tatsächlich konnte der Hypoxie-Einfluss auf die Reportergenaktivität auch bei dem Konstrukt, das beide Maus-UTRs enthielt, beobachtet werden (siehe Abbildung 3.21). Interessanterweise jedoch war die Mash1-3'-UTR allein nicht in der Lage, die Herabregulation der Reportergenaktivität zu vermitteln (siehe Abbildung 3.21). Diese Beobachtung passt jedoch gut zu der Tatsache, dass der Mash1-3'-UTR die DICE-Stellen der humanen 3'-UTR fehlen.

4 Diskussion

Eine Zelle muss entsprechend innerer sowie äußerer Reize ihr Proteinrepertoire den Bedürfnissen entsprechend anpassen. Diese Anpassung umfasst dabei Änderungen in den exprimierten Mengen bestimmter Proteine bis hin zum kompletten An- und Abschalten der Expression spezifischer Gene. Eine Nervenvorläuferzelle beispielsweise muss andere Aufgaben erfüllen bzw. andere Eigenschaften für diese Obliegenheiten aufweisen, als die ausdifferenzierte reife Nervenzelle. So muss die Vorläuferzelle z.B. über erhöhte Migrationseigenschaften verfügen, um die Orte ihres zukünftigen Wirkens als Neuron zu erreichen, auf welche die fertige Nervenzelle hingegen nicht mehr angewiesen ist. Diese aber wiederum muss im Gegensatz zu ihrem Vorläufer in der Lage sein, beispielsweise Neurotransmitter zu erzeugen, um ihrer Aufgabe zur Informationsübertragung nachzukommen.

Um aus ein und demselben Genom die vielfältigsten Expressionsmuster zu erzeugen, kann auf verschiedenen Ebenen eingriffen werden. So schließen die beteiligten Mechanismen dabei nicht nur die Kontrolle auf Ebene der Transkription sondern auch posttranskriptionelle Regulationsmechanismen ein. Diese können beispielsweise die mRNA-Stabilität oder die Translationseffizienz einer mRNA, welche sich ebenso wie eine Änderung der Transkription letztlich auf die exprimierte Proteinmenge auswirken, betreffen. Die Informationen für diese posttranskriptionellen Regulationsmechanismen befinden sich vornehmlich in den untranslatierten Bereichen (UTRs) einer mRNA.

Der bHLH-Transkriptionsfaktor hASH1 spielt eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der neuronalen Entwicklung und Differenzierung [21, 273, 142] und scheint ebenso bei bestimmten Tumoren und Karzinomen von Bedeutung zu sein [228, 151]. Die hASH1-mRNA zeichnet sich durch überdurchschnittlich lange UTRs aus. Zudem zeigte eine *in silico*-Analyse der UTRs Bereiche mit starker Konservierung und einige putative *cis*-Elementen (siehe Abbildung 3.1 auf Seite 46), welche ebenso eine Regulation von hASH1 auf posttranskriptioneller Ebene nahelegten. Gegenstand dieser Arbeit ist die Untersuchung posttranskriptioneller Einflüsse auf die hASH1-Regulation im Hinblick auf die durch PMA und Hypoxie hervorgerufte Änderung der Expression.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass hASH1 einer starken Suppression in der Neuroblastoma-Zelllinie Kelly unter dem Einfluss von PMA unterliegt. Dies konnte

auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene beobachtet werden. Da Mash1 auch in Cortex-Zellen der Ratte unter PMA herabreguliert wird, scheint der zugrunde liegende Mechanismus nicht nur für einen bestimmten Zelltyp spezifisch zu sein. Phorbolester wie PMA stellen in Bezug auf Proteinkinase C (PKC) Analoga des sekundären Botenstoffs (*engl.* second messenger) 1,2-Diacylglycerol (DAG) dar. Sie werden jedoch langsamer abgebaut, so dass sie in der Zellkultur wie auch in *in vivo* Modellen als bevorzugte Aktivatoren von PKC eingesetzt werden [28]. Phorbolester wurden schon mit verschiedenen zellulären Reaktionen, wie Zellwachstum, Differenzierung oder Apoptose, in Verbindung gebracht [157, 1, 120]. In dieser Arbeit werden die der hASH1-Herabregulation zugrunde liegenden Mechanismen unter PMA genauer untersucht.

Eine schnelle und signifikante Abnahme der hASH1-mRNA-Menge auf unter die Hälfte des Kontrollwerts konnte schon nach kurzer Inkubation (3 h) mit PMA beobachtet werden. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Daten anderer Veröffentlichungen, in denen eine durch PMA induzierte Differenzierung anderer Neuroblastoma-Zellen ebenfalls zu einer hASH1-Abnahme führte [231, 293, 113]. Der schnelle Abfall der hASH1-mRNA-Menge wird gefolgt von einer leichten Abschwächung des Effekts bei längeren Inkubationszeiten (48 h). Im Gegensatz dazu nimmt die Menge an hASH1-Proteinmenge kontinuierlich über den beobachteten Zeitraum ab.

Kelly-Zellen die mit einem Reporterkonstrukt transfiziert wurden, welches das Luciferase-Reportergen unter Kontrolle der hASH1-UTRs enthielt, zeigten ebenfalls eine starke Herabregulation des Reporters unter Inkubation mit PMA. Das deutet darauf hin, dass die UTRs und somit posttranskriptionelle Prozesse maßgeblich an der hASH1-Herabregulation unter PMA beteiligt sind. Eine Konzentrationskinetik mit PMA zeigte eine sukzessive Steigerung des PMA-Effekts (und somit stärkerer Herabregulation des Reporters) mit steigender PMA-Konzentration, wobei der Effekt bei einer Konzentration von 40 nM am ausgeprägtesten war und danach wieder abnahm (siehe Abbildung 3.4). Dieser Umstand korrespondiert mit einer früheren Studie in der die Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y mit 16 nM PMA am stärksten zur Differenzierung stimuliert werden konnte [231]. Höhere PMA-Konzentrationen führten auch hier zu einer schwächeren Ausprägung der Differenzierung. Im Vergleich zu einem Reporterkonstrukt das den Reporter unter Kontrolle des hASH1-Promotors enthielt, stellte sich heraus, dass der frühe Einbruch der hASH1-Expression wohl auf die UTRs und somit posttranskriptionelle Einflüsse zurückzuführen ist. Zwar reagierte auch der hASH1-Promotor mit einer Herabregulation des Reportergens unter PMA, doch erst deutlich später als die UTRs.

Darauf folgende Stabilitätsassays zeigten, dass der UTR-vermittelte Einfluss hauptsächlich auf einer Abnahme der hASH1-mRNA-Stabilität beruht. Die mRNA-Stabilität von Transkripten wird oft über die Länge des Poly(A)-Schwanzes be-

stimmt. Jedoch stellen auch endonukleolytische Schnittstellen im Transkript, wie beispielsweise AREs, entscheidende regulatorische Elemente dar [272, 115]. Obwohl die Stabilität einer mRNA oft von *cis*-Elementen in ihrer 3'-UTR vermittelt wird, scheinen bei hASH1 die 5'-UTR und die 3'-UTR unabhängig voneinander einen Einfluss auf die Stabilität zu haben. Das deutet auf ein Zusammenwirken mehrerer *trans*-Faktoren bei der Steuerung der hASH1-mRNA-Stabilität unter PMA hin. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bei der Regulation des bHLH-Transkriptionsfaktors c-myc gefunden. Zellen der humanen Leukämie-Zelllinie K562 wurden mit PMA zur Differenzierung zu Megakaryoblasten stimuliert [33]. Während der Differenzierung nahm die Expression von c-myc zumindest teilweise aufgrund einer Destabilisierung seiner mRNA ab. Interessanterweise scheint die Destabilisierung dabei auf einem Deadenylierungs-unabhängigen Abbaumechanismus zu beruhen.

Die transkriptionelle Reprimierung der hASH1-Synthese in Neuroblastoma-Zellen über Phorbolester wurde schon mit der Aktivierung des Notch Signalwegs und der damit hervorgerufenen verstärkten Expression von HES-1 in Verbindung gebracht [14]. Dabei kann die Herabregulation der hASH1-mRNA-Menge durch aktivierten Notch1 jedoch stärker als durch HES-1 allein ausfallen [297]. Zusammengenommen deuten die Daten darauf hin, dass die herabgesetzte hASH1-mRNA-Menge bei PMA-induzierter Differenzierung das Resultat von erniedrigter mRNA-Stabilität und erniedrigter Transkription ist. Die schnelle Reaktion ist dabei auf den gesteigerten mRNA-Abbau zurückzuführen, wohingegen die herabgesetzte Promotoraktivität unter längeren Bedingungen, wenn die Erniedrigung der mRNA-Stabilität wieder aufgehoben ist, im Wesentlichen für die hASH1-Herabregulation verantwortlich ist.

Unter längerer PMA-Behandlung (48h) ging die hASH1-Proteinmenge auf etwa 1/5 der Kontrollmenge zurück, wogegen der Abfall auf mRNA-Ebene mit etwa 60% der Kontrollmenge weniger stark ausfiel. Das deutet darauf hin, dass noch weitere Mechanismen in der Kontrolle der Expression eine Rolle spielen. Die UTR-abhängigen Reporter-gen-Assays stützen die Ansicht, dass obgleich die hASH1-mRNA-Destabilisierung schon vorüber ist, die UTRs dennoch einen reprimierenden Einfluss ausüben. Diese Differenz ließe sich möglicherweise auf eine verringerte Translationseffizienz zurückführen. Doch wurde die hASH1-Abnahme nach Notch-Aktivierung auch einem erhöhten hASH1-Proteinumsatz zugeschrieben [297]. Im Gegensatz dazu zeigte sich nach 48h unter PMA jedoch keine Veränderung der hASH1-Proteinstabilität (siehe Abbildung 3.11 auf Seite 57), so dass die beobachteten Veränderungen in der hASH1-Proteinmenge wohl auf eine veränderte Translationsrate zurückgehen. Da die gemessenen mRNA- und Proteinwerte die Nettoeffekte aller aktivierten Mechanismen in der Kontrolle der Expression eines bestimmten Gens widerspiegeln, deuten die Daten darauf hin, dass der schnelle, starke und lang-anhaltende herabregulierende Einfluss auf hASH1 unter PMA-Einfluss auf verschiedene *trans*-Faktoren, die synergistisch und zumindest teilweise unabhängig

voneinander wirken, zurückzuführen ist. Im Crosslinking-Experiment konnte zwar nur eine deutliche Änderung des Bandenmusters beobachtet werden, doch werden beim Crosslinking beispielsweise Änderungen des Phosphorylierungsstatus eines Proteins, sofern sie die Bindungseigenschaften zur RNA unverändert lassen, nicht erfasst. Desweiteren lassen sich im Crosslinking nur Proteine mit direktem Kontakt zur RNA aufspüren. Proteine die wichtig für die Regulation sind, jedoch über weitere Proteine mit der RNA assoziiert sind, können so nicht detektiert werden.

Um einen umfassenderen Eindruck von dem PMA-vermittelten Effekt zu erhalten, wurde überprüft, ob die Herabregulation von hASH1, mit dem Hauptaugenmerk auf die frühe posttranskriptionelle Komponente, auf die Mitwirkung von PKC zurückgeht. PKCs repräsentieren die bekanntesten Ziele der Wirkung von Phorbolestern [224, 186]. Die PKC-Familie der Serin/Threonin-Kinasen wird aus mindestens 10 verschiedenen Isoformen gebildet. Diese können in drei Gruppen, basierend auf strukturellen und biochemischen Eigenschaften, eingeteilt werden. Nur zwei dieser Gruppen, die klassischen PKC (*engl.* classical PKCs, zusätzlich über Ca^{2+} aktiviert) und die 'neuartigen' PKCs (*engl.* novel PKCs, nicht von Ca^{2+} abhängig), werden durch Phorbolster aktiviert. Zudem variieren die Expressionsmuster der PKCs abhängig von Zelltyp bzw. Gewebe [208, 222].

In der Neuroblastoma-Zelllinie SH-SY5Y konnte schon gezeigt werden, dass PKC wohl nicht nur für die Initiierung der Differenzierung, sondern sehr wohl auch eine Rolle während des weiteren PMA-induzierten Differenzierungsvorgangs, spielt [241]. So konnte in dieser Studie nachgewiesen werden, dass PKC- α , ein Mitglied der klassischen PKCs, während der gesamten PMA-induzierten Differenzierung (wobei PMA alle 4 Tage erneuert wurde) nicht nur zugegen war, sondern auch, gemessen an endogenem und *in vitro*-Substrat, aktiviert vorlag.

Um eine Beteiligung von PKC bei der Vermittlung der posttranskriptionellen PMA-Wirkung nachzuweisen, wurden Zellen vor der PMA-Behandlung mit den bekannten PKC-Inhibitoren Staurosporin oder GF109203X vorinkubiert [310, 316]. Beide Inhibitoren vermochten den herabregulierenden Effekt von PMA im Reporterassay und auf mRNA-Ebene zu verringern jedoch nicht vollständig aufzuheben. Das lässt den Schluss zu, dass auch PKC-unabhängige Mechanismen an der PMA-vermittelten Inhibition der hASH1-Synthese teilhaben. Interessanterweise führte die Behandlung mit GF109203X zu einer fast kompletten Aufhebung der hASH1-UTR-vermittelten PMA-Wirkung im Reporterassay, wogegen Staurosporin einen weitaus schwächeren Einfluss hatte. Diese Diskrepanz lässt sich möglicherweise mit den unterschiedlichen Spezifitäten beider Inhibitoren erklären. So wurde gezeigt, dass Staurosporin auch andere Kinasen zusätzlich zu PKC hemmt [316]. Daher erscheint es möglich, dass die PKC-unabhängigen Effekte von Staurosporin die Antwort der hASH1-UTRs auf PMA-Behandlung beeinflussen oder sogar übertreffen könnten. Zudem zeigten bereits zwei Studien, dass Staurosporin selbst in der Lage

war, in den beiden Neuroblastoma-Zelllinien SH-SY5Y sowie NB-1 Differenzierungsvorgänge auszulösen [148, 217]. Das deckt sich mit der Beobachtung, dass schon die 4-stündige Präinkubation mit Staurosporin die hASH1-mRNA-Menge herabsetzte (siehe Abbildung 3.13). Der zusätzliche Abfall der mRNA-Menge durch PMA jedoch war weniger stark ausgeprägt als bei Zellen die nur mit PMA behandelt wurden, was auch hier den Schluss nahelegt, dass PMA zwar PKC-abhängig wirkt aber auch PKC-unabhängige Mechanismen nutzt.

Eine Zusammenfassung der hier vorgestellten Daten gibt Abbildung 4.1 wieder.

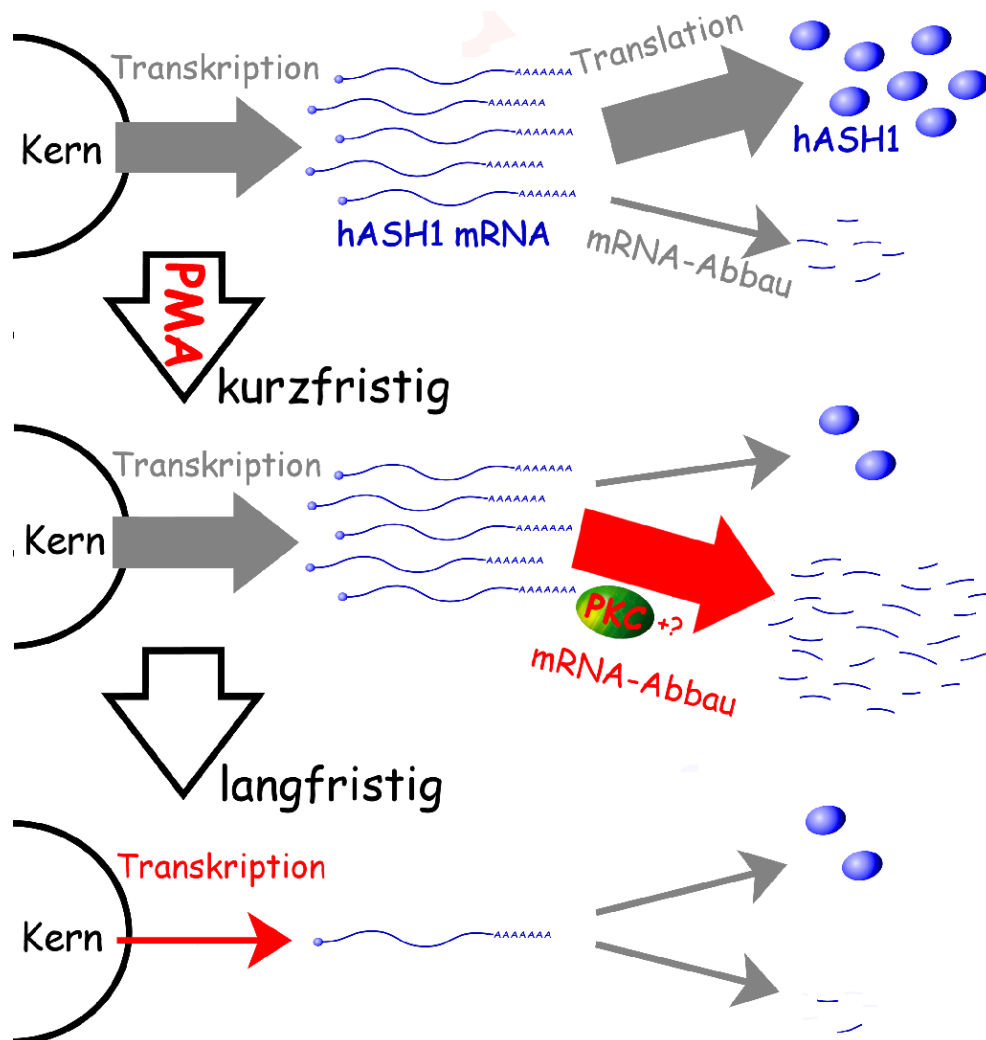


Abbildung 4.1: Schematische Darstellung der PMA-Wirkung in Kelly-Zellen. Diese verfügen über eine konstitutive HASH1-Expression. Nach PMA-Behandlung steigt u.a. PKC-abhängig kurzfristig die HASH1-mRNA-Abbaurrate, so dass weniger Transkripte für die Translation zur Verfügung stehen. Daneben scheinen noch PKC-unabhängige Faktoren eine Rolle zu spielen (angedeutet durch das Fragezeichen). Langfristig wird diese Reprimierung durch eine verringerte HASH1-Transkriptionsrate, mit demselben Effekt einer reduzierten HASH1-Bildung, abgelöst.

Ein weiterer Stimulus, der in dieser Arbeit als potentiell posttranskriptionell auf die hASH1-Synthese wirkend identifiziert wurde, ist der Sauerstoffmangel bzw. die Hypoxie. Sauerstoff spielt als finaler Elektronenakzeptor in der Atmungskette eine wichtige Rolle bei der Energiegewinnung der Zelle. Er ist zudem auch ein schneller Regulator des zellulären Metabolismus. So wirkt sich der Sauerstoffpartialdruck auf vielfältige Bereiche des Lebens, einschließlich Wachstum und Entwicklung, aus. Hypoxie bezeichnet den Zustand erniedrigter Sauerstoffkonzentration im Vergleich zum Normalzustand. Werden Zellen hypoxischen Bedingungen ausgesetzt, wird über Signalkaskaden eine Antwort induziert, welche die metabolischen Anforderungen der reduzierten Sauerstoffverfügbarkeit anzupassen versucht. Diese Reaktion der Zelle führt letztlich zu einer veränderten Expression einer Vielzahl von Genen [81, 82, 45, 234, 344]. Dabei ist zu beachten, dass sich die normalen Sauerstoffpartialdrücke in den verschiedenen Organen und Geweben deutlich voneinander unterscheiden können. So variieren die Partialdrücke im Körper beispielsweise von 150 mmHg ($\approx 21\% \text{ O}_2$) in den oberen Atemwegen bis hin zu nur 5 mmHg ($\approx 1\% \text{ O}_2$) in der Retina [313]. Deshalb unterscheiden sich auch die einzelnen Sauerstoffpartialdrücke, die in verschiedenen Organen als hypoxisch angesehen werden.

Mit einem Verbrauch von etwa 20% stellt das Gehirn einen der größten Sauerstoffkonsumenten des Körpers dar [199]. Doch sind die Sauerstofflevel verglichen mit anderen Teilen des Körpers in fast allen Hirnbereichen, mit beispielsweise $27 \pm 6 \text{ mmHg}$ ($\approx 4\% \text{ O}_2$) in der Großhirnrinde, $20 \pm 3 \text{ mmHg}$ ($\approx 3\% \text{ O}_2$) im Hippocampus oder $4,1 \text{ mmHg}$ ($\approx 0,55\% \text{ O}_2$) im Mesencephalon, sehr gering [146, 65, 77]. Dazu kommt, dass die Entwicklung einer ganzen Reihe von Organen eines Embryos einschließlich des ZNS in einer sauerstoffarmen Umgebung stattfindet [85, 50]. So beginnt die embryonale Neurogenese in der frühen Schwangerschaft, noch bevor der placentale Gasaustausch eingesetzt hat, unter sehr niedrigen Sauerstoffpartialdrücken von $\leq 15,2 \text{ mmHg}$ ($\approx 2\% \text{ O}_2$) [344, 85, 309]. Die Neurogenese in sauerstoffarmer Umgebung setzt sich aber auch später noch fort [50, 177]. So konnte beispielsweise der Hypoxie-Marker EF5, welcher Sauerstoffumgebungen von weit weniger als $7,6 \text{ mmHg}$ ($\approx 1\% \text{ O}_2$) anzeigt [193], im Neuralrohr im Bereich des Rhombencephalon und des Mesencephalons nachgewiesen werden [50].

Auch scheint in der Neurogenese adulter neuronaler Stammzellen, welche nur in der subventrikulären Zone (SVZ) der lateralen Ventrikel sowie der subgranulären Zone (SGZ) des Gyrus dentatus des adulten Gehirns stattfindet [306], die Sauerstoffumgebung der Stammzellen eine wichtige Rolle zu spielen. So konnte beobachtet werden, dass die SVZ mit einem dichten Netzwerk an Blutgefäßen durchzogen wird. Zellen, die Stammzell-Marker exprimierten, wurden in engem Kontakt mit der extrazellulären Matrix, die die vaskulären Endothelialzellen umschließen, nachgewiesen [288]. Zusammengenommen mit Daten anderer Gruppen könnte das bedeuten, dass hier der erhöhte Sauerstoffpartialdruck um die Blutgefäße in der SVZ notwendig für die

Aufrechterhaltung der adulten Stammzellen ist [312, 30, 344].

Bei der oben dargelegten Zusammenstellung, unter welchen Sauerstoffverhältnissen neuronale Stammzellen gedeihen bzw. Neurogenese stattfindet, scheint es kaum verwundernswert, dass die beiden chemischen Hypoxie-Mimetika CoCl_2 und 2,2-DP auch einen Einfluss auf die hASH1-Expression ausüben. Wurden Kelly-Zellen, welche mit einem Reportergenvektor unter Kontrolle der hASH1-UTRs transfiziert wurden, jeweils einer dieser beiden Substanzen ausgesetzt, so schwächte sich die Expression des Reportergens im Vergleich zu transfizierten Kontrollzellen, welche nur mit den entsprechenden Lösungsmitteln behandelt wurden, ab. Eine Überprüfung mit tatsächlicher Hypoxie bestätigte diese Vorbefunde. Wurden Kelly-Zellen 18h lang hypoxischen Bedingungen ($\leq 3\% \text{ O}_2$) ausgesetzt, so verringerte sich die hASH1-Proteinmenge in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck. Ein Minimum der hASH1-Proteinmenge (auf etwa $\frac{1}{5}$ der Kontrollmenge) wurde dabei am kleinsten untersuchten Sauerstoffgehalt von $0,5\%$ gemessen. Da hASH1 aber zwischen $21\% \text{ O}_2$ (Umgebungsbedingungen) und $6\% \text{ O}_2$ keinerlei Veränderung zeigte, wurden $21\% \text{ O}_2$ im Weiteren als Kontrollwert verwendet. Diese Befunde legen nahe, dass die Sauerstoff-abhängige hASH1-Regulation unter physiologisch relevanten Bedingungen erfolgt (d.h. $p\text{O}_2 < 5\%$ bzw. $p\text{O}_2 < 38 \text{ mmHg}$). Hyperoxie ($p\text{O}_2 > 5\%$) hat keinen Einfluss auf die hASH1-Synthese und folglich wahrscheinlich nicht die hASH1-abhängige Differenzierung.

Einen ersten Hinweis darauf, dass bei dieser hASH1-Herabregulation posttranskriptionelle Einflüsse eine Rolle spielen könnten, deuteten schon die Reportergenassays des Eingangs-Screenings (siehe Abbildung 3.3 auf Seite 50) mit dem Reporterkonstrukt, welches den Reporter unter Kontrolle der hASH1-UTRs enthielt, an. Hier führten die beiden getesteten chemischen Hypoxie-Mimetika CoCl_2 und 2,2-DP zu einer Herabregulation der Reportergenaktivität. Auch in diesem Fall zeigte die Überprüfung mit tatsächlicher Hypoxie eine Herabregulation der Reportergenaktivität.

Um den zeitlichen Verlauf der hASH1-Herabregulation unter Hypoxie nachzuvollziehen, wurden Kelly-Zellen nach verschiedenen langen Inkubationszeiten unter Hypoxie geerntet. Auf Protein-Ebene war hierbei eine schnelle Herabregulation von hASH1 zu beobachten. Die Proteinmenge war schon nach 3h auf die Hälfte gefallen und erreichte nach 6h ihr Minimum, wobei sich die hASH1-Menge nach längerer Hypoxie (48h) wieder etwas erholte. Eine 6-stündige Re-Oxygenierung, bei der die Zellen im Anschluss an die Hypoxie unter normoxischen Bedingungen inkubiert wurden, ließ das hASH1-Proteinlevel wieder auf Kontrollniveau steigen. Das deutet darauf, dass die Stress-bedingte Herabregulation von hASH1 einen reversiblen Prozess darstellt.

Interessanterweise jedoch ließ sich dieser Befund nicht auf die hASH1-mRNA-Ebene übertragen. Im Gegensatz zur hASH1-Herabregulation unter PMA, welche sich sowohl auf Protein- sowie mRNA-Ebene widerspiegelte, wirkte sich die Hy-

poxie nicht auf die hASH1-mRNA-Menge in den Zellen aus und blieb während der gesamten untersuchten Zeitspanne (48h) vergleichsweise unverändert. Die Abnahme an hASH1-Protein lässt sich somit nicht über eine veränderte Transkription oder mRNA-Stabilität erklären. Diese Feststellung steht jedoch in Einklang mit dem Eingangsversuch, der ein Mitwirken posttranskriptioneller Mechanismen nahelegte.

Da also weder eine Änderung der Transkriptionsaktivität noch eine veränderte mRNA-Stabilität, welche sich in einer Änderung der Menge der hASH1-mRNA widerspiegelt hätten, für die Regulation unter Hypoxie verantwortlich schienen, erfolgte eine Überprüfung der Translationseffizienz. Die dazu durchgeführte Polysomengradienten-Analyse ergab eine allgemeine Verschiebung der mRNAs in die leichteren Fraktionen bei der Ultrazentrifugation nach 18-stündiger Hypoxie verglichen mit der normoxischen Kontrolle. Dies ist deshalb sehr naheliegend, da Hypoxie und damit einhergehender ATP-Mangel zu einer globalen Hemmung der Translation führen. Schließlich entfallen etwa 25 – 30 % des gesamten ATP-Verbrauchs einer Zelle auf den Translationsvorgang [268]. Erst im späteren Verlauf der durch Hypoxie verursachten Energieverknappung wird die Hemmung auch auf Transkriptionsebene ausgedehnt [337, 304]. Zusätzlich zu dieser allgemeinen Translationshemmung jedoch konnte bei der hASH1-mRNA eine viel stärkere Verlagerung in die Fraktionen geringerer Dichte verglichen mit der hASH1-mRNA von Kontrollzellen beobachtet werden. War bei normoxischen Zellen hASH1-mRNA vornehmlich in den polysomalen Fraktionen zu finden, so kam es unter Hypoxie zu einem deutlichen Shift hin zu Fraktionen mit translationsinaktiven mRNAs (siehe Abbildung 3.20). Die hASH1-Abnahme unter Hypoxie ist somit auf eine spezifische translationale Stilllegung der mRNA zurückzuführen (siehe Abbildung 4.2 auf Seite 83).

Um die an der Translationsinaktivierung beteiligten *cis*-Elemente aufzufinden, wurden weitergehende Reporterassays durchgeführt. Dabei wurde deutlich, dass unter Hypoxie sowohl die hASH1-5'-UTR als auch die 3'-UTR einen starken suppressiven Einfluss auf den Reporter ausübten. Interessanterweise zeigte auch das Reporterkonstrukt, in welchem der Reporter unter Kontrolle der Maus-UTRs vorlag, eine Herabregulation unter Hypoxie. Ein Konstrukt, das nur die Mash1-3'-UTR enthielt, konnte die Herabregulation allein jedoch nicht mehr vermitteln. Mithilfe eines Reporterkonstrukts mit einer verkürzten hASH1-3'-UTR konnte der Bereich, der für den Hypoxie-Einfluss innerhalb der 3'-UTR wichtig ist, auf einen 488 nt großen Abschnitt am 5'-Ende der 3'-UTR eingegrenzt werden. Fehlte dieser Bereich, so war auch die humane 3'-UTR nicht mehr in der Lage, die Reporteraktivität unter Hypoxie herunter zu regulieren.

Drei sogenannte DICE-Stellen, wovon sich zwei in diesem 488 nt Bereich befanden, kamen als putative *cis*-Bereiche für eine Translationsinaktivierung in Frage. Diese Elemente wurden schon für eine Vermittlung einer mRNA-Stilllegung durch die

beiden RBPs hnRNP-E1 und hnRNP-K beschrieben [230, 229]. Wurden diese DICE-Stellen in der 3'-UTR des Reporterkonstrukts entfernt, verhielt es sich im Reporterassay identisch wie das um 488 nt deletierte Reporterkonstrukt, was für eine Beteiligung dieser *cis*-Elemente an der hASH1-Herabregulation unter Hypoxie spricht. Diese Annahme wird durch den Umstand, dass auch die 3'-UTR der Maus keine DICE-Elemente vorweisen kann, unterstützt, da diese ebenfalls keine Rolle unter Hypoxie zu spielen scheint.

Zukünftige Experimente sollten weitergehenden Aufschluss über die Identität der beteiligten Transfaktoren ergeben. Ein vielversprechender Ansatz wäre beispielsweise das Ausschalten bestimmter RBPs über siRNAs und die Überprüfung der Auswirkungen, die dadurch auf die hASH1-Expression unter Hypoxie bewirkt werden. Eine weitere Möglichkeit etwa wäre über die Überexpression verschiedener RBPs und der Beobachtung der hASH1-Expression gegeben. Um möglichst alle Kandidaten für die posttranskriptionelle Kontrolle der hASH1-Expression zu erfassen, würde sich eine Affinitätschromatographie anbieten. Hierbei könnte mithilfe von *in vitro*-transkribierten UTRs oder UTR-Abschnitten von hASH1 nach Interaktionspartnern in Cytosolpräparationen „gefischt“ werden. Eine Identifizierung aller an die RNAs gebundenen Proteine wäre massenspektrometrisch möglich. Mengenmäßige Unterschiede einzelner Proteine zwischen normoxischen und hypoxischen Cytosolpräparationen würden geeignete Kandidaten für die Vermittlung der Hypoxie auf die hASH1-Expression aufzeigen.

Doch welche Bedeutung könnte die Tatsache, dass hASH1 in dieser Neuroblastoma-Zelllinie unter Hypoxie über ein Aussetzen der Translation herabreguliert wird, haben? Einerseits könnte man meinen, diese Beobachtung ginge darauf zurück, dass auch hier Differenzierungsvorgänge, wofür die Herabregulation von hASH1 ein wichtiges Indiz sein könnte, durch die Hypoxie ausgelöst wurden. So konnte an neuronalen Vorläuferzellen des Mesencephalons des Rattenembryos gezeigt werden, dass es durch eine Verringerung des Sauerstoffpartialdruckes von 152 mmHg ($\approx 21\% \text{ O}_2$) auf $22,8 \pm 15,2 \text{ mmHg}$ ($\approx 3\% \text{ O}_2$) zu einer Verdreifachung des Anteils an Zellen mit dopaminergem Phänotyp kam [305]. Ähnliches konnte auch für Stammzellen der Neuralleiste nachgewiesen werden, wo unter verringerter Sauerstoffumgebung (38 mmHg) der Anteil an Zellen mit katecholaminergem Differenzierung anstieg [218], wie auch für humane neuronale Vorläuferzellen des Mesencephalons, welche unter hypoxischen Bedingungen dopaminerge Neurone bildeten [303, 302].

In einem Schlaganfall-Modell im adulten Rattenhirn, bei welchem mithilfe eines Lasers Thrombozyten photochemisch zum Verschluss von Blutgefäßen gebracht wurden, konnte ebenfalls beobachtet werden, dass es durch die dabei hervorgerufene Ischämie und den dadurch ausgelösten Sauerstoffmangel im betroffenen Bereich zur Neubildung von Neuronen kam [114]. Dabei sind Neurogenese und Angiogenese eng miteinander verkettet, wobei wohl aber dem erhöhten Sauerstoffpartialdruck um

die Blutgefäße herum eine Schlüsselrolle bei der durch Schlaganfall verursachten Neurogenese zukommt [226, 314, 344].

Daneben konnten hypoxische Bedingungen Zellen nicht nur zur Differenzierung stimulieren, sondern beispielsweise auch die Proliferationsrate oder Überlebensrate der Zellen in Kultur begünstigen [305, 218]. Zudem war es möglich, bei neuronalen Stammzellen aus dem Telencephalon von Mausföten durch eine Erniedrigung des Sauerstoffpartialdrucks unter 15,2 mmHg ($\approx 2\% \text{ O}_2$), ihrer optimalen Sauerstoffumgebung im Hinblick auf Proliferation und Differenzierung, einen Wechsel bei der Differenzierung bezüglich des entstehenden Subtyps von GABA-positiven Neuronen hin zu Glutamat-positiven Neuronen zu bewirken [140].

Erschwerend bei der Deutung dieser hASH1-Herabregulation kommt hinzu, dass man annimmt, dass hypoxische Bedingungen in verschiedenen Stammzell- und Vorläuferzellpopulationen einen undifferenzierten Zustand fördern [213]. Es wird vermutet, dass die geringeren Sauerstoffpartialdrücke in Stammzellnischen den Stammzellen einen selektiven Vorteil verschaffen, indem beispielsweise der oxidative Stress, welcher bei Zellen mit aeroben Metabolismus auftritt, minimiert wird. Schädigungen an der DNA etwa durch so entstehende reaktive Sauerstoffspezies, welche insbesondere bei Stamm- und Vorläuferzellen nachteilig für den Organismus wären, würden in diesen sauerstoffarmen Nischen vermieden werden [53, 39]. So konnte gezeigt werden, dass murine embryonale Fibroblasten, die bei 20% Sauerstoff kultiviert wurden, deutlich mehr Mutationen anhäuften im Vergleich zu Zellen, die bei 3% Sauerstoff kultiviert wurden [39]. Auch bei induzierten pluripotenten Stammzellen, welche aus embryonalen Mausfibroblasten und aus humanen somatischen Zellen durch Transfektion mit vier spezifischen Transkriptionsfaktoren generiert wurden, zeigte sich, dass sich zumindest milde hypoxische Bedingungen förderlich auf die Ausbeute an induzierten Stammzellen auswirkten [308, 341, 340]. Zudem schien die Umprogrammierung der Zellen schneller unter Hypoxie abzulaufen und es war sogar möglich, induzierte pluripotente Stammzellen mittels Transfektion mit nur zwei der ursprünglich vier Transkriptionsfaktoren zu erzeugen [340]. Auch diese Beobachtungen können als Indiz dafür gesehen werden, dass niedrige Sauerstoffpartialdrücke einen Stammzell-Phänotyp begünstigen.

Dass es sich bei der in dieser Arbeit beschriebenen hASH1-Herabregulation unter Hypoxie wohl nicht um Differenzierungsvorgänge handelt, sondern die Hypoxie wohl eher reversibel einen stärker undifferenzierten Zustand in den Neuroblastomzellen fördert, wird auch durch folgende Beobachtungen unterstützt: So scheinen hypoxische Tumorzellen zu dedifferenzieren und dabei Stammzell-ähnliche Eigenschaften zu erlangen. Dies konnte u.a. für Brustkrebszellen, Prostatakrebszellen sowie Neuroblastomzellen gezeigt werden [125, 99, 152]. Es zeigte sich somit, dass Neuroblastomzellen, welche unter hypoxischen Bedingungen kultiviert wurden, die Expression einer Reihe von neuronalen sowie neuroendokrinen Markergenen redu-

zierten [152, 153]. Daneben konnte eine verstärkte Expression von Genen, welche mit einem Phänotyp von Zellen der Neuralleiste in Verbindung gebracht werden, beobachtet werden [152, 153, 190, 232]. Diese *in vitro* Beobachtungen konnten auch *in vivo* reproduziert werden. So wurde die Expression von Differenzierungsmarkergenen in hypoxischen Bereichen eines Tumors aus humanen Neuroblastomzellen, welcher in nackte Mäuse xenotransplantiert wurde, ebenfalls herabreguliert [152].

Bisher hat man die Herabregulation von hASH1 unter Hypoxie jedoch eher mit einer parallel beobachteten verstärkten Expression von HES-1 und Notch-1 zu erklären versucht [152]. Diese hASH1-Regulation über Notch/HES-1 würde jedoch nur eine Reprimierung der Transkription von hASH1 zur Folge haben, welche in dieser Arbeit nicht beobachtet wurde. Doch gibt es Hinweise, dass Notch auch HES-1-unabhängig an der hASH1-Herabregulation mitwirken kann [297]. Zudem zeichneten sich nicht alle der getesteten Neuroblastomzelllinien durch eine erhöhte HES-1-Expression unter Hypoxie aus [152]. In zwei der vier getesteten Zelllinien blieb HES-1 unverändert, was auch hier den Schluss zulässt, dass weitere Mechanismen, wie die in dieser Arbeit vorgestellte Stilllegung der Translation, bei der Herabregulation von hASH1 unter Hypoxie eine Rolle spielen.

Neuroblastomzellen rühren von Vorläuferzellen bzw. unreifen Zellen des sympathischen Nervensystems her und sind während verschiedener Phasen der Differenzierung stehen geblieben. Primärtumore können an nahezu allen Strukturen des sympathischen Nervensystems entstehen [73]. Tumore neigen dazu, Bereiche mit hypoxischen Bedingungen auszubilden, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass die Neubildung von Blutgefäßen nicht mit dem schnellen Wachstum der Tumorzellen schritthalten kann. Außerdem sind Blutgefäße innerhalb von Tumoren oftmals missgebildet und in ihrer Funktion beeinträchtigt [137]. Hypoxie eines Tumors und seine Gefährlichkeit korrelieren häufig miteinander [92]. Dies könnte einerseits darauf zurück gehen, dass Tumore aufgrund hypoxischer Bedingungen aggressiver werden, oder aber aggressive Tumore durch ihr schnelles Wachstum eher zur Hypoxie neigen. Wenngleich man diesen Sachverhalt noch nicht gänzlich klären konnte, kennt man jedoch einige nachteilige Auswirkungen der Hypoxie auf die Tumorbehandlung. So schränkt Hypoxie die Sensitivität des Tumors gegenüber verschiedenen therapeutischen Verfahren ein. Daneben scheinen hypoxische Tumore erfolgreicher zu metastasieren und zeigen zudem interessanterweise höhere Mutationsraten als weniger hypoxische Tumore [284, 108, 35, 265]. Letztere Eigenschaft geht auf die Herabregulation einer Reihe von DNA-Reparatur-Genen bei hypoxischen Tumoren zurück [163, 168]. Die erhöhte Aggressivität hypoxischer Tumore aufgrund beispielsweise der verbesserten Metastatisierungseigenschaften lässt sich möglicherweise aus dem durch die Hypoxie hervorgerufenen Wechsel der Krebszellen hin zu einem unreiferen Zustand ableiten. Die über die Hypoxie wiedergewonnenen Stammzeleigenschaften tragen so maßgeblich zur Gefährlichkeit

des Tumors bei [152].

Da hASH1 eine wichtige Rolle bei der Ausdifferenzierung zukommt, liegt die Vermutung nahe, dass auch die Herabregulation von hASH1 unter Hypoxie, bei der Wiedergewinnung von Stammzeleigenschaften der Tumorzellen, von großer Relevanz ist. Eine weitestgehende Analyse der translationalen Stilllegung von hASH1 könnte somit neue Angriffspunkte bei der Behandlung von Neuroblastomen aufzeigen.

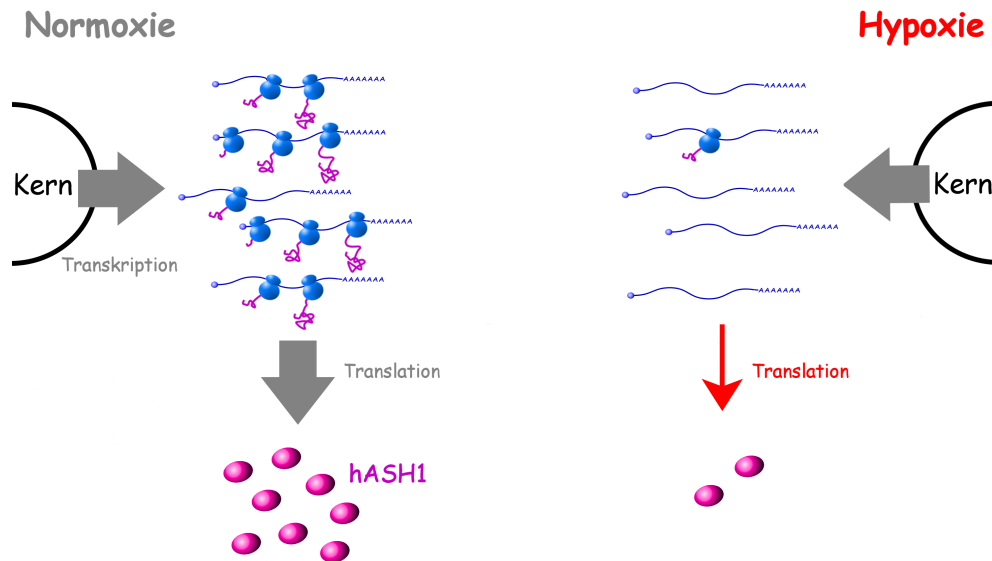


Abbildung 4.2: Schematische Darstellung der Auswirkungen der Hypoxie auf die Bildung von hASH1 in Kelly-Zellen. Unter hypoxischen Bedingungen gehen die hASH1-mRNAs in einen translationsinaktiven Zustand über, wobei die Transkription jedoch unbeeinflusst bleibt.

5 Zusammenfassung

Eine Zelle muss die Zusammenstellung ihres Proteinrepertoires entsprechend den auftretenden Bedürfnissen qualitativ und quantitativ anpassen. Bei der Expression eines Gens können neben der Kontrolle der Transkription seiner mRNA über den Promotor noch vielfältige weitere Mechanismen zum Tragen kommen. Diese sogenannte posttranskriptionelle Kontrolle der Genexpression kann beispielsweise über eine Veränderung der Prozessierung der mRNA, eine Anpassung der mRNA-Stabilität oder eine Änderung der Translationseffizienz die Regulation über die Transkription hinaus deutlich verstärken aber auch eine erheblich beschleunigte Antwort der Zelle ermöglichen. Die für diese Art der Regulation verantwortlichen Bereiche befinden sich vornehmlich in den untranslatierten Regionen der mRNA (UTRs).

Der bHLH-Transkriptionsfaktor Achaete-Scute Homolog-1 (ASCL1, hASH1) hat eine wichtige Funktion während der neuronalen Entwicklung. Er ist von Bedeutung für die Differenzierung bzw. die Subtypespezifizierung von neuronalen Zellen. Jedoch ist über seine direkte Regulation wenig bekannt. *In silico*-Analysen offenbarten konservierte Bereiche sowie putative *cis*-Elemente in den überdurchschnittlich langen UTRs der hASH1-mRNA und legten ein Mitwirken von posttranskriptionellen Mechanismen bei der hASH1-Regulation nahe. Diese Mechanismen sollten in dieser Arbeit genauer untersucht werden.

Hierbei traten zwei verschiedene posttranskriptionelle Regulationsmechanismen zutage. Unter Stimulierung mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) wird hASH1 in der humanen Neuroblastom-Zelllinie Kelly herabreguliert. Dabei geht der anfängliche schnelle hASH1-Abfall auf eine Destabilisierung seiner mRNA zurück. Später übernimmt eine transkriptionelle Reprimierung die Hemmung von hASH1. Insbesondere bei der Vermittlung des posttranskriptionellen Einflusses scheint dabei Proteinkinase C (PKC) involviert zu sein.

Auch unter Hypoxie konnte eine Herabregulation von hASH1 in Kelly-Zellen beobachtet werden. Diese kommt jedoch vornehmlich durch eine Inhibition der Translation zustande. Beide hASH1-UTRs scheinen jeweils für sich allein den Hypoxie-Effekt vermitteln zu können, wobei wohl drei Differenzierungskontroll-Elemente (DICE) für den Hypoxie-Einfluss auf die 3'-UTR der hASH1-mRNA verantwortlich sind.

Bekannte Bindungsproteine für dieses Motiv sind das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein E1 (hnRNP-E1) und das heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K (hnRNP-K), welche schon mit der Stilllegung der Translation von bestimmten mRNAs beschrieben wurden. Diese reversible translationale Stilllegung von hASH1 ist möglicherweise ein Anzeichen bzw. Bedingung dafür, dass die Neuroblastomzellen in einen unreiferen Zustand wechseln, welcher bei Tumorzellen mit einer stärkeren Ausprägung unerwünschter Eigenschaften, wie beispielsweise erhöhter Überlebensrate und verbesserten Migrationseigenschaften der Zellen, einhergeht.

6 Summary

Cells have to change the composition of their protein inventory to adapt to changing requirements. Gene expression can be controlled by the rate of transcription but also by several posttranscriptional mechanisms. These mechanisms include, for example, a change in mRNA stability, an alteration in mRNA processing as well as a change in the translation rate of an mRNA. Due to these posttranscriptional mechanisms, a cell is able to amplify its transcriptional response and also react to changing needs in a faster way. The elements responsible for these control mechanisms are mainly located in the untranslated regions of an mRNA (UTRs).

The bHLH transcription factor Achaete-scute complex homolog 1 (ASCL1, hASH1) plays an important role during neuronal development. It is involved in differentiation and subtype specification of neurons. However, knowledge about its regulation is sparse. An *in silico* analysis revealed conserved regions as well as putative *cis*-elements in its higher-than-average long UTRs. This suggests a participation of posttranscriptional mechanisms in hASH1 regulation. The examination of this topic was the aim of this study.

Two different mechanisms of posttranscriptional control were shown to be involved in the regulation of hASH1. Under phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) administration hASH1 is down-regulated in the human neuroblastoma cell line Kelly. At first, the rapid, strong down-regulation is caused by a destabilization of its mRNA. Under prolonged treatment, this down-regulation results also from transcriptional repression. Protein kinase C (PKC) seems to be particularly involved in the posttranscriptional down-regulation of hASH1.

A down-regulation of hASH1 in Kelly cells was also observed under hypoxic conditions. But in this case, an inhibition of the translation of the hASH1 mRNA was mainly responsible for this decline. Both hASH1 UTRs were able to down-regulate hASH1 under hypoxia. Three differentiation control elements (DICE) appear to be responsible for the influence of the 3'-UTR. Known binding proteins of DICE are heterogeneous nuclear ribonucleoprotein E1 (hnRNP-E1) and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K (hnRNP-K), which were previously shown to cause translational arrest of certain mRNAs. This reversible arrest of hASH1 could be a prerequisite for the neuroblastoma cells to acquire a less differentiated state, which is accompanied

by better survival rates or improved migratory abilities that are characteristics of aggressive neuroblastomas.

7 Publikationen im Rahmen dieser Arbeit

- [84] Michael Fähring, Anja Bondke Persson, Bertram Klinger, **Edgar Benko**, Andreas Steege, Mumtaz Kasim, Andreas Patzak, Pontus B Persson, Gunter Wolf, Nils Blüthgen und Ralf Mrowka.
Multi-level regulation of HIF-1 signaling by TTP.
In: *Mol Biol Cell*. 2012 (Okt. 2012), S. 4129–4141.
- [42] François Cartault, Patrick Munier, **Edgar Benko**, Isabelle Desguerre, Sylvain Hanein, Nathalie Boddaert, Simonetta Bandiera, Jeanine Vellayoudom, Pascale Krejbich-Trotot, Marc Bintner, Jean-Jacques Hoarau, Muriel Girard, Emmanuelle Génin, Pascale de Lonlay, Alain Fourmaintraux, Magali Naville, Diana Rodriguez, Josué Feingold, Michel Renouil, Arnold Munnich, Eric Westhof, Michael Fähring, Stanislas Lyonnet und Alexandra Henrion-Caude.
Mutation in a primate-conserved retrotransposon reveals a non-coding RNA as a mediator of infantile encephalopathy.
In: *Proc Natl Acad Sci U S A*. (März 2012), S. 4980–4985.
- [20] **Edgar Benko**, Aline Winkelmann, Jochen C Meier, Pontus B Persson, Holger Scholz und Michael Fähring.
Phorbol-Ester Mediated Suppression of hASH1 Synthesis: Multiple Ways to Keep the Level Down.
In: *Front Mol Neurosci* 4 (2011).
- [83] Michael Fähring, Ralf Mrowka, Andreas Steege, Karin M Kirschner, **Edgar Benko**, Benjamin Förster, Pontus B Persson, Bernd J Thiele, Jochen C Meier und Holger Scholz.
Translational regulation of the human achaete-scute homologue-1 by fragile X mental retardation protein.
In: *J Biol Chem* (Feb. 2009), S. 4255–4266.

8 Literaturverzeichnis

- [1] A. Agadir, Gq Chen, F. Bost, Y. Li, D. Mercola und X. Zhang. **Differential effect of retinoic acid on growth regulation by phorbol ester in human cancer cell lines.** eng. In: *J Biol Chem* 274.42 (Okt. 1999), S. 29779–29785 (siehe S. 72).
- [2] I. J. Agol. **Step Allelomorphism in DROSOPHILA MELANOGASTER.** eng. In: *Genetics* 16.3 (Mai 1931), S. 254–266 (siehe S. 10).
- [3] P. Aisen, C. Enns und M. Wessling-Resnick. **Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism.** eng. In: *Int J Biochem Cell Biol* 33.10 (Okt. 2001), S. 940–959 (siehe S. 24).
- [4] R. H. Alasbahi und M. F. Melzig. **Forskolin and derivatives as tools for studying the role of cAMP.** eng. In: *Pharmazie* 67.1 (Jan. 2012), S. 5–13 (siehe S. 48).
- [5] F. J. Alcaín und M. I. Burón. **Ascorbate on cell growth and differentiation.** eng. In: *J Bioenerg Biomembr* 26.4 (Aug. 1994), S. 393–398 (siehe S. 48).
- [6] O. M. Alekhina und K. S. Vassilenko. **Translation initiation in eukaryotes: versatility of the scanning model.** eng. In: *Biochemistry (Mosc)* 77.13 (Dez. 2012), S. 1465–1477. (Siehe S. 21).
- [7] R. G. Allen und M. Tresini. **Oxidative stress and gene regulation.** eng. In: *Free Radic Biol Med* 28.3 (Feb. 2000), S. 463–499 (siehe S. 48).
- [8] Arturo Alvarez-Buylla und Daniel A Lim. **For the long run: maintaining germinal niches in the adult brain.** eng. In: *Neuron* 41.5 (März 2004), S. 683–686 (siehe S. 14).
- [9] Paul Anderson und Nancy Kedersha. **RNA granules: post-transcriptional and epigenetic modulators of gene expression.** eng. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 10.6 (Juni 2009), S. 430–436. (Siehe S. 22).
- [10] Paul Anderson und Nancy Kedersha. **Stress granules: the Tao of RNA triage.** eng. In: *Trends Biochem Sci* 33.3 (März 2008), S. 141–150. (Siehe S. 22).
- [11] Paul Anderson und Nancy Kedersha. **Stressful initiations.** eng. In: *J Cell Sci* 115.Pt 16 (Aug. 2002), S. 3227–3234 (siehe S. 23).

-
- [12] Catia Andreassi und Antonella Riccio. **To localize or not to localize: mRNA fate is in 3'UTR ends.** eng. In: *Trends Cell Biol* 19.9 (Sep. 2009), S. 465–474. (Siehe S. 25).
- [13] A. Apelqvist, H. Li, L. Sommer, P. Beatus, D. J. Anderson, T. Honjo, M. Hrabec de Angelis, U. Lendahl und H. Edlund. **Notch signalling controls pancreatic cell differentiation.** eng. In: *Nature* 400.6747 (Aug. 1999), S. 877–881. (Siehe S. 15).
- [14] Håkan Axelson. **The Notch signaling cascade in neuroblastoma: role of the basic helix-loop-helix proteins HASH-1 and HES-1.** eng. In: *Cancer Lett* 204.2 (Feb. 2004), S. 171–178. (Siehe S. 14, 15, 73).
- [15] Stephen D Baird, Marcel Turcotte, Robert G Korneluk und Martin Holcik. **Searching for IRES.** eng. In: *RNA* 12.10 (Okt. 2006), S. 1755–1785. (Siehe S. 24).
- [16] Douglas W Ball. **Achaete-scute homolog-1 and Notch in lung neuroendocrine development and cancer.** eng. In: *Cancer Lett* 204.2 (Feb. 2004), S. 159–169. (Siehe S. 15).
- [17] Andrew J Bannister und Tony Kouzarides. **Regulation of chromatin by histone modifications.** eng. In: *Cell Res* 21.3 (März 2011), S. 381–395. (Siehe S. 16).
- [18] Jean-Martin Beaulieu und Raul R Gainetdinov. **The physiology, signaling, and pharmacology of dopamine receptors.** eng. In: *Pharmacol Rev* 63.1 (März 2011), S. 182–217. (Siehe S. 48).
- [19] C. A. Beelman und R. Parker. **Degradation of mRNA in eukaryotes.** eng. In: *Cell* 81.2 (Apr. 1995), S. 179–183 (siehe S. 20).
- [20] Edgar Benko, Aline Winkelmann, Jochen C Meier, Pontus B Persson, Holger Scholz und Michael Fähring. **Phorbol-Ester Mediated Suppression of hASH1 Synthesis: Multiple Ways to Keep the Level Down.** eng. In: *Front Mol Neurosci* 4 (Feb. 2011), S. 1. (Siehe S. 89).
- [21] Nicolas Bertrand, Diogo S Castro und François Guillemot. **Proneural genes and the specification of neural cell types.** eng. In: *Nat Rev Neurosci* 3.7 (Juli 2002), S. 517–530. (Siehe S. 13, 71).
- [22] Annamaria Bevilacqua, Maria Cristina Ceriani, Sergio Capaccioli und Angelo Nicolin. **Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs.** eng. In: *J Cell Physiol* 195.3 (Juni 2003), S. 356–372. (Siehe S. 25, 26).

- [23] Suvendra N Bhattacharyya, Regula Habermacher, Ursula Martine, Ellen I Closs und Witold Filipowicz. **Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress.** eng. In: *Cell* 125.6 (Juni 2006), S. 1111–1124. (Siehe S. 22).
- [24] T. K. Blackwell und H. Weintraub. **Differences and similarities in DNA-binding preferences of MyoD and E2A protein complexes revealed by binding site selection.** eng. In: *Science* 250.4984 (Nov. 1990), S. 1104–1110 (siehe S. 11).
- [25] Valerie Blanc und Nicholas O Davidson. **C-to-U RNA editing: mechanisms leading to genetic diversity.** eng. In: *J Biol Chem* 278.3 (Jan. 2003), S. 1395–1398. (Siehe S. 18).
- [26] Mathieu Blanchette, W. James Kent, Cathy Riemer, Laura Elnitski, Arian F A Smit, Krishna M Roskin, Robert Baertsch, Kate Rosenbloom, Hiram Clawson, Eric D Green, David Haussler und Webb Miller. **Aligning multiple genomic sequences with the threaded blockset aligner.** eng. In: *Genome Res* 14.4 (Apr. 2004), S. 708–715. (Siehe S. 46).
- [27] B. C. Blaxall, L. D. Dwyer-Nield, A. K. Bauer, T. J. Bohlmeier, A. M. Malkinson und J. D. Port. **Differential expression and localization of the mRNA binding proteins, AU-rich element mRNA binding protein (AUF1) and Hu antigen R (HuR), in neoplastic lung tissue.** eng. In: *Mol Carcinog* 28.2 (Juni 2000), S. 76–83 (siehe S. 26).
- [28] P. M. Blumberg. **Complexities of the protein kinase C pathway.** eng. In: *Mol Carcinog* 4.5 (1991), S. 339–344 (siehe S. 72).
- [29] M. Borges, R. I. Linnoila, H. J. van de Velde, H. Chen, B. D. Nelkin, M. Mabry, S. B. Baylin und D. W. Ball. **An achaete-scute homologue essential for neuroendocrine differentiation in the lung.** eng. In: *Nature* 386.6627 (Apr. 1997), S. 852–855. (Siehe S. 15).
- [30] Karin Van der Borght, Dóra E Kóbor-Nyakas, Karin Klauke, Bart J L Eggen, Csaba Nyakas, Eddy A Van der Zee und Peter Meerlo. **Physical exercise leads to rapid adaptations in hippocampal vasculature: temporal dynamics and relationship to cell proliferation and neurogenesis.** eng. In: *Hippocampus* 19.10 (Okt. 2009), S. 928–936. (Siehe S. 78).
- [31] Muriel Brengues, Daniela Teixeira und Roy Parker. **Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies.** eng. In: *Science* 310.5747 (Okt. 2005), S. 486–489. (Siehe S. 22).
- [32] G. Brewer. **Evidence for a 3'-5' decay pathway for c-myc mRNA in mammalian cells.** eng. In: *J Biol Chem* 274.23 (Juni 1999), S. 16174–16179 (siehe S. 20).

- [33] G. Brewer. **Regulation of c-myc mRNA decay in vitro by a phorbol ester-inducible, ribosome-associated component in differentiating megakaryoblasts.** eng. In: *J Biol Chem* 275.43 (Okt. 2000), S. 33336–33345. (Siehe S. 73).
- [34] G. J. Brewer und C. W. Cotman. **Survival and growth of hippocampal neurons in defined medium at low density: advantages of a sandwich culture technique or low oxygen.** eng. In: *Brain Res* 494.1 (Aug. 1989), S. 65–74 (siehe S. 40).
- [35] D. M. Brizel, S. P. Scully, J. M. Harrelson, L. J. Layfield, J. M. Bean, L. R. Prosnitz und M. W. Dewhirst. **Tumor oxygenation predicts for the likelihood of distant metastases in human soft tissue sarcoma.** eng. In: *Cancer Res* 56.5 (März 1996), S. 941–943 (siehe S. 82).
- [36] C. Brodie und P. M. Blumberg. **Regulation of cell apoptosis by protein kinase c delta.** eng. In: *Apoptosis* 8.1 (Jan. 2003), S. 19–27 (siehe S. 48).
- [37] G. R. Buettner. **In the absence of catalytic metals ascorbate does not autoxidize at pH 7: ascorbate as a test for catalytic metals.** eng. In: *J Biochem Biophys Methods* 16.1 (Mai 1988), S. 27–40 (siehe S. 48).
- [38] G. R. Buettner und B. A. Jurkiewicz. **Catalytic metals, ascorbate and free radicals: combinations to avoid.** eng. In: *Radiat Res* 145.5 (Mai 1996), S. 532–541 (siehe S. 48).
- [39] Rita A Busuttil, Miguel Rubio, Martijn E T Dollé, Judith Campisi und Jan Vijg. **Oxygen accelerates the accumulation of mutations during the senescence and immortalization of murine cells in culture.** eng. In: *Aging Cell* 2.6 (Dez. 2003), S. 287–294 (siehe S. 81).
- [40] C. Capoulade, L. M. Mir, K. Carlier, Y. Lécluse, C. Tétaud, Z. Mishal und J. Wiels. **Apoptosis of tumoral and nontumoral lymphoid cells is induced by both mdm2 and p53 antisense oligodeoxynucleotides.** eng. In: *Blood* 97.4 (Feb. 2001), S. 1043–1049 (siehe S. 25).
- [41] C. Capoulade, B. Bressac-de Paillerets, I. Lefrère, M. Ronsin, J. Feunteun, T. Tursz und J. Wiels. **Overexpression of MDM2, due to enhanced translocation, results in inactivation of wild-type p53 in Burkitt's lymphoma cells.** eng. In: *Oncogene* 16.12 (März 1998), S. 1603–1610. (Siehe S. 25).
- [42] François Cartault, Patrick Munier, Edgar Benko, Isabelle Desguerre, Sylvain Hanein, Nathalie Boddaert, Simonetta Bandiera, Jeanine Vellayoudom, Pascale Krejbich-Trotot, Marc Bintner, Jean-Jacques Hoarau, Muriel Girard, Emmanuelle Génin, Pascale de Lonlay, Alain Fourmaintraux, Magali Naville, Diana Rodriguez, Josué Feingold, Michel Renouil, Arnold Munnich, Eric Westhof, Michael Fähling, Stanislas Lyonnet und Alexandra Henrion-Caude.

- Mutation in a primate-conserved retrotransposon reveals a noncoding RNA as a mediator of infantile encephalopathy.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 109.13 (März 2012), S. 4980–4985. (Siehe S. 18, 89).
- [43] Luca Cartegni, Shern L Chew und Adrian R Krainer. **Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing.** eng. In: *Nat Rev Genet* 3.4 (Apr. 2002), S. 285–298. (Siehe S. 18).
- [44] S. Casarosa, C. Fode und F. Guillemot. **Mash1 regulates neurogenesis in the ventral telencephalon.** eng. In: *Development* 126.3 (Feb. 1999), S. 525–534 (siehe S. 13).
- [45] Jessica Cassavaugh und Karen M Lounsbury. **Hypoxia-mediated biological control.** eng. In: *J Cell Biochem* 112.3 (März 2011), S. 735–744. (Siehe S. 49, 77).
- [46] P. Castella, J. A. Wagner und M. Caudy. **Regulation of hippocampal neuronal differentiation by the basic helix-loop-helix transcription factors HES-1 and MASH-1.** eng. In: *J Neurosci Res* 56.3 (Mai 1999), S. 229–240 (siehe S. 15).
- [47] Yao-Fu Chang, J. Saadi Imam und Miles F Wilkinson. **The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway.** eng. In: *Annu Rev Biochem* 76 (2007), S. 51–74. (Siehe S. 20).
- [48] C. Y. Chen, R. Gherzi, J. S. Andersen, G. Gaietta, K. Jürchott, H. D. Royer, M. Mann und M. Karin. **Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation.** eng. In: *Genes Dev* 14.10 (Mai 2000), S. 1236–1248 (siehe S. 24).
- [49] C. Y. Chen und A. B. Shyu. **AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation.** eng. In: *Trends Biochem Sci* 20.11 (Nov. 1995), S. 465–470 (siehe S. 25).
- [50] E. Y. Chen, M. Fujinaga und A. J. Giaccia. **Hypoxic microenvironment within an embryo induces apoptosis and is essential for proper morphological development.** eng. In: *Teratology* 60.4 (Okt. 1999), S. 215–225. (Siehe S. 77).
- [51] H. Chen, A. Thiagalingam, H. Chopra, M. W. Borges, J. N. Feder, B. D. Nelkin, S. B. Baylin und D. W. Ball. **Conservation of the Drosophila lateral inhibition pathway in human lung cancer: a hairy-related protein (HES-1) directly represses achaete-scute homolog-1 expression.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94.10 (Mai 1997), S. 5355–5360 (siehe S. 15).
- [52] F. Chiaromonte, V. B. Yap und W. Miller. **Scoring pairwise genomic sequence alignments.** eng. In: *Pac Symp Biocomput* (2002), S. 115–126 (siehe S. 46).

- [53] M. G. Cipolleschi, P. Dello Sbarba und M. Olivotto. **The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells.** eng. In: *Blood* 82.7 (Okt. 1993), S. 2031–2037 (siehe S. 81).
- [54] M. J. Clemens, I. Trayner und J. Menaya. **The role of protein kinase C isoenzymes in the regulation of cell proliferation and differentiation.** eng. In: *J Cell Sci* 103 (Pt 4) (Dez. 1992), S. 881–887 (siehe S. 48).
- [55] M. E. Cockman, N. Masson, D. R. Mole, P. Jaakkola, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. R. Maher, C. W. Pugh, P. J. Ratcliffe und P. H. Maxwell. **Hypoxia inducible factor- α binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein.** eng. In: *J Biol Chem* 275.33 (Aug. 2000), S. 25733–25741. (Siehe S. 49).
- [56] C. Cordon-Cardo, E. Latres, M. Drobnjak, M. R. Oliva, D. Pollack, J. M. Woodruff, V. Marechal, J. Chen, M. F. Brennan und A. J. Levine. **Molecular abnormalities of mdm2 and p53 genes in adult soft tissue sarcomas.** eng. In: *Cancer Res* 54.3 (Feb. 1994), S. 794–799 (siehe S. 25).
- [57] P. Couttet, M. Fromont-Racine, D. Steel, R. Pictet und T. Grange. **Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94.11 (Mai 1997), S. 5628–5633 (siehe S. 20).
- [58] M R Culbertson. **RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic disorders and cancer.** In: *Trends Genet* 15.2 (Feb. 1999), S. 74–80. ISSN: 0168-9525. (Siehe S. 20).
- [59] Rita Das, Jiong Yu, Zuo Zhang, Melanie P Gygi, Adrian R Krainer, Steven P Gygi und Robin Reed. **SR proteins function in coupling RNAP II transcription to pre-mRNA splicing.** eng. In: *Mol Cell* 26.6 (Juni 2007), S. 867–881. (Siehe S. 18).
- [60] Leif Dehmelt und Shelley Halpain. **The MAP2/Tau family of microtubule-associated proteins.** eng. In: *Genome Biol* 6.1 (2005), S. 204. (Siehe S. 52).
- [61] Charlotte Delay, Wim Mandemakers und Sébastien S Hébert. **MicroRNAs in Alzheimer’s disease.** eng. In: *Neurobiol Dis* 46.2 (Mai 2012), S. 285–290. (Siehe S. 18).
- [62] C. W. Dessauer, T. T. Scully und A. G. Gilman. **Interactions of forskolin and ATP with the cytosolic domains of mammalian adenylyl cyclase.** eng. In: *J Biol Chem* 272.35 (Aug. 1997), S. 22272–22277 (siehe S. 48).
- [63] T. E. Dever, L. Feng, R. C. Wek, A. M. Cigan, T. F. Donahue und A. G. Hinnebusch. **Phosphorylation of initiation factor 2 α by protein kinase GCN2 mediates gene-specific translational control of GCN4 in yeast.** eng. In: *Cell* 68.3 (Feb. 1992), S. 585–596 (siehe S. 21).

- [64] E. J. Diliberto, A. J. Daniels und O. H. Viveros. **Multicompartmental secretion of ascorbate and its dual role in dopamine beta-hydroxylation.** eng. In: *Am J Clin Nutr* 54.6 Suppl (Dez. 1991), 1163S–1172S (siehe S. 48).
- [65] J. Dings, J. Meixensberger, A. Jäger und K. Roosen. **Clinical experience with 118 brain tissue oxygen partial pressure catheter probes.** eng. In: *Neurosurgery* 43.5 (Nov. 1998), S. 1082–1095 (siehe S. 77).
- [66] Dan A Dixon, Glen C Balch, Nancy Kedersha, Paul Anderson, Guy A Zimmerman, R. Daniel Beauchamp und Stephen M Prescott. **Regulation of cyclooxygenase-2 expression by the translational silencer TIA-1.** eng. In: *J Exp Med* 198.3 (Aug. 2003), S. 475–481. (Siehe S. 26).
- [67] Martin H Dominguez, Albert E Ayoub und Pasko Rakic. **POU-III Transcription Factors (Brn1, Brn2, and Oct6) Influence Neurogenesis, Molecular Identity, and Migratory Destination of Upper-Layer Cells of the Cerebral Cortex.** eng. In: *Cereb Cortex* (Aug. 2012). (Siehe S. 16).
- [68] Christopher J Donnelly, Mike Fainzilber und Jeffery L Twiss. **Subcellular communication through RNA transport and localized protein synthesis.** eng. In: *Traffic* 11.12 (Dez. 2010), S. 1498–1505. (Siehe S. 21, 22).
- [69] Gideon Dreyfuss, V. Narry Kim und Naoyuki Kataoka. **Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry.** eng. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 3.3 (März 2002), S. 195–205. (Siehe S. 25).
- [70] D. R. Drummond, J. Armstrong und A. Colman. **The effect of capping and polyadenylation on the stability, movement and translation of synthetic messenger RNAs in Xenopus oocytes.** eng. In: *Nucleic Acids Res* 13.20 (Okt. 1985), S. 7375–7394 (siehe S. 18).
- [71] Tiago L Duarte und Joseph Lunec. **Review: When is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C.** eng. In: *Free Radic Res* 39.7 (Juli 2005), S. 671–686. (Siehe S. 48).
- [72] N. P. Dubinin. **Step-allelomorphism and the theory of centres of the gene achaete-scute.** In: *J Genet* 26.1 (Juli 1932), S. 37–58. (Siehe S. 10).
- [73] Anders Edsjö, Linda Holmquist und Sven Pahlman. **Neuroblastoma as an experimental model for neuronal differentiation and hypoxia-induced tumor cell dedifferentiation.** eng. In: *Semin Cancer Biol* 17.3 (Juni 2007), S. 248–256. (Siehe S. 82).

- [74] Sabrina A Eichler, Sergei Kirischuk, René Jüttner, Philipp K Schafermeier, Pascal Legendre, Thomas-Nicolas Lehmann, Tengis Gloveli, Rosemarie Grantyn und Jochen C Meier. **Glycinergic tonic inhibition of hippocampal neurons with depolarizing GABAergic transmission elicits histopathological signs of temporal lobe epilepsy.** eng. In: *J Cell Mol Med* 12.6B (Dez. 2008), S. 2848–2866. (Siehe S. 40).
- [75] Jonathan M Elkins, Kirsty S Hewitson, Luke A McNeill, Jurgen F Seibel, Imre Schlemminger, Christopher W Pugh, Peter J Ratcliffe und Christopher J Schofield. **Structure of factor-inhibiting hypoxia-inducible factor (HIF) reveals mechanism of oxidative modification of HIF-1 alpha.** eng. In: *J Biol Chem* 278.3 (Jan. 2003), S. 1802–1806. (Siehe S. 49).
- [76] A. C. Epstein, J. M. Gleadle, L. A. McNeill, K. S. Hewitson, J. O'Rourke, D. R. Mole, M. Mukherji, E. Metzen, M. I. Wilson, A. Dhanda, Y. M. Tian, N. Masson, D. L. Hamilton, P. Jaakkola, R. Barstead, J. Hodgkin, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, C. J. Schofield und P. J. Ratcliffe. **C. elegans EGL-9 and mammalian homologs define a family of dioxygenases that regulate HIF by prolyl hydroxylation.** eng. In: *Cell* 107.1 (Okt. 2001), S. 43–54 (siehe S. 49).
- [77] M. Erecińska und I. A. Silver. **Tissue oxygen tension and brain sensitivity to hypoxia.** eng. In: *Respir Physiol* 128.3 (Nov. 2001), S. 263–276 (siehe S. 77).
- [78] Michèle Ernoult-Lange, Marianne Bénard, Michel Kress und Dominique Weil. **P-bodies and mitochondria: which place in RNA interference?** eng. In: *Biochimie* 94.7 (Juli 2012), S. 1572–1577. (Siehe S. 22).
- [79] Ana Eulalio, Isabelle Behm-Ansmant und Elisa Izaurralde. **P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways.** eng. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 8.1 (Jan. 2007), S. 9–22. (Siehe S. 22).
- [80] Marc Robert Fabian, Nahum Sonenberg und Witold Filipowicz. **Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs.** eng. In: *Annu Rev Biochem* 79 (2010), S. 351–379. (Siehe S. 22).
- [81] M. Föhling. **Cellular oxygen sensing, signalling and how to survive translational arrest in hypoxia.** eng. In: *Acta Physiol (Oxf)* 195.2 (Feb. 2009), S. 205–230. (Siehe S. 49, 62, 65, 77).
- [82] Michael Föhling. **Surviving hypoxia by modulation of mRNA translation rate.** eng. In: *J Cell Mol Med* 13.9A (Sep. 2009), S. 2770–2779. (Siehe S. 62, 66, 77).

- [83] Michael Fähring, Ralf Mrowka, Andreas Steege, Karin M Kirschner, Edgar Benko, Benjamin Förster, Pontus B Persson, Bernd J Thiele, Jochen C Meier und Holger Scholz. **Translational regulation of the human achaete-scute homologue-1 by fragile X mental retardation protein.** eng. In: *J Biol Chem* 284.7 (Feb. 2009), S. 4255–4266. (Siehe S. 16, 31, 32, 47, 89).
- [84] Michael Fähring, Anja Bondke Persson, Bertram Klinger, Edgar Benko, Andreas Steege, Mumtaz Kasim, Andreas Patzak, Pontus B Persson, Gunter Wolf, Nils Blüthgen und Ralf Mrowka. **Multilevel regulation of HIF-1 signaling by TTP.** eng. In: *Mol Biol Cell* 23.20 (Okt. 2012), S. 4129–4141. (Siehe S. 89).
- [85] B. Fischer und B. D. Bavister. **Oxygen tension in the oviduct and uterus of rhesus monkeys, hamsters and rabbits.** eng. In: *J Reprod Fertil* 99.2 (Nov. 1993), S. 673–679 (siehe S. 77).
- [86] C. Fode, Q. Ma, S. Casarosa, S. L. Ang, D. J. Anderson und F. Guillemot. **A role for neural determination genes in specifying the dorsoventral identity of telencephalic neurons.** eng. In: *Genes Dev* 14.1 (Jan. 2000), S. 67–80 (siehe S. 13).
- [87] Tobias M Franks und Jens Lykke-Andersen. **The control of mRNA decapping and P-body formation.** eng. In: *Mol Cell* 32.5 (Dez. 2008), S. 605–615. (Siehe S. 22).
- [88] Christopher S Fraser und Jennifer A Doudna. **Structural and mechanistic insights into hepatitis C viral translation initiation.** eng. In: *Nat Rev Microbiol* 5.1 (Jan. 2007), S. 29–38. (Siehe S. 24).
- [89] Bertil B Fredholm, Adriaan P IJzerman, Kenneth A Jacobson, Joel Linden und Christa E Müller. **International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors—an update.** eng. In: *Pharmacol Rev* 63.1 (März 2011), S. 1–34. (Siehe S. 48).
- [90] F. H. Gage. **Mammalian neural stem cells.** eng. In: *Science* 287.5457 (Feb. 2000), S. 1433–1438 (siehe S. 14).
- [91] D. R. Gallie. **A tale of two termini: a functional interaction between the termini of an mRNA is a prerequisite for efficient translation initiation.** eng. In: *Gene* 216.1 (Aug. 1998), S. 1–11 (siehe S. 26).
- [92] David R Gandara, Primo N Lara, Zelanna Goldberg, Quynh T Le, Phillip C Mack, Derick H M Lau und Paul H Gumerlock. **Tirapazamine: prototype for a novel class of therapeutic agents targeting tumor hypoxia.** eng. In: *Semin Oncol* 29.1 Suppl 4 (Feb. 2002), S. 102–109 (siehe S. 82).

-
- [93] M. Gao, C. J. Wilusz, S. W. Peltz und J. Wilusz. **A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements.** eng. In: *EMBO J* 20.5 (März 2001), S. 1134–1143. (Siehe S. 26).
- [94] A. García-Bellido. **Genetic Analysis of the Achaete-Scute System of DROSOPHILA MELANOGASTER.** eng. In: *Genetics* 91.3 (März 1979), S. 491–520 (siehe S. 10).
- [95] A. García-Bellido und P. Santamaria. **Developmental Analysis of the Achaete-Scute System of DROSOPHILA MELANOGASTER.** eng. In: *Genetics* 88.3 (März 1978), S. 469–486 (siehe S. 10).
- [96] Antonio García-Bellido und Jose F de Celis. **The complex tale of the achaete-scute complex: a paradigmatic case in the analysis of gene organization and function during development.** eng. In: *Genetics* 182.3 (Juli 2009), S. 631–639. (Siehe S. 10).
- [97] Fátima Gebauer und Matthias W Hentze. **Molecular mechanisms of translational control.** eng. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5.10 (Okt. 2004), S. 827–835. (Siehe S. 20, 21, 23).
- [98] C. Gestblom, A. Grynfeld, I. Øra, E. Ortoft, C. Larsson, H. Axelsson, B. Sandstedt, P. Cserjesi, E. N. Olson und S. Pahlman. **The basic helix-loop-helix transcription factor dHAND, a marker gene for the developing human sympathetic nervous system, is expressed in both high- and low-stage neuroblastomas.** eng. In: *Lab Invest* 79.1 (Jan. 1999), S. 67–79 (siehe S. 15).
- [99] Mohamed A Ghafar, Aristotelis G Anastasiadis, Min-Wei Chen, Martin Burchardt, L. Eric Olsson, Hui Xie, Mitchell C Benson und Ralph Buttyan. **Acute hypoxia increases the aggressive characteristics and survival properties of prostate cancer cells.** eng. In: *Prostate* 54.1 (Jan. 2003), S. 58–67. (Siehe S. 81).
- [100] A. Ghysen und C. Dambly-Chaudière. **From DNA to form: the achaete-scute complex.** eng. In: *Genes Dev* 2.5 (Mai 1988), S. 495–501 (siehe S. 10).
- [101] Natalie Gilks, Nancy Kedersha, Maranatha Ayodele, Lily Shen, Georg Stoecklin, Laura M Dember und Paul Anderson. **Stress granule assembly is mediated by prion-like aggregation of TIA-1.** eng. In: *Mol Cell Biol* 15.12 (Dez. 2004), S. 5383–5398. (Siehe S. 23).
- [102] Gunjan Goel, Harinder P S Makkar, George Francis und Klaus Becker. **Phorbol esters: structure, biological activity, and toxicity in animals.** eng. In: *Int J Toxicol* 26.4 (2007), S. 279–288. (Siehe S. 48).

- [103] Anatlilde M Gonzalez-Guerrico und Marcelo G Kazanietz. **Phorbol ester-induced apoptosis in prostate cancer cells via autocrine activation of the extrinsic apoptotic cascade: a key role for protein kinase C delta.** eng. In: *J Biol Chem* 280.47 (Nov. 2005), S. 38982–38991. (Siehe S. 48).
- [104] Anatlilde M Gonzalez-Guerrico, John Meshki, Liqing Xiao, Fernando Benavides, Claudio J Conti und Marcelo G Kazanietz. **Molecular mechanisms of protein kinase C-induced apoptosis in prostate cancer cells.** eng. In: *J Biochem Mol Biol* 38.6 (Nov. 2005), S. 639–645 (siehe S. 48).
- [105] Stanislaw A Gorski, Miroslav Dundr und Tom Misteli. **The road much traveled: trafficking in the cell nucleus.** eng. In: *Curr Opin Cell Biol* 18.3 (Juni 2006), S. 284–290. (Siehe S. 19).
- [106] A. Gouble und D. Morello. **Synchronous and regulated expression of two AU-binding proteins, AUF1 and HuR, throughout murine development.** eng. In: *Oncogene* 19.47 (Nov. 2000), S. 5377–5384. (Siehe S. 26).
- [107] S. J. Gould und S. Subramani. **Firefly luciferase as a tool in molecular and cell biology.** eng. In: *Anal Biochem* 175.1 (Nov. 1988), S. 5–13 (siehe S. 41).
- [108] C. H. Graham, J. Forsdike, C. J. Fitzgerald und S. Macdonald-Goodfellow. **Hypoxia-mediated stimulation of carcinoma cell invasiveness via upregulation of urokinase receptor expression.** eng. In: *Int J Cancer* 80.4 (Feb. 1999), S. 617–623 (siehe S. 82).
- [109] Michael W Gray. **Diversity and evolution of mitochondrial RNA editing systems.** eng. In: *IUBMB Life* 55.4-5 (2003), S. 227–233. (Siehe S. 18).
- [110] N. K. Gray und M. W. Hentze. **Regulation of protein synthesis by mRNA structure.** eng. In: *Mol Biol Rep* 19.3 (Mai 1994), S. 195–200 (siehe S. 24, 25).
- [111] Giorgio Grillo, Antonio Turi, Flavio Licciulli, Flavio Mignone, Sabino Liuni, Sandro Banfi, Vincenzo Alessandro Gennarino, David S Horner, Giulio Pavesi, Ernesto Picardi und Graziano Pesole. **UTRdb and UTRsite (RELEASE 2010): a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs.** eng. In: *Nucleic Acids Res* 38.Database issue (Jan. 2010), S. D75–D80. (Siehe S. 45).
- [112] Rachel Groppo und Joel D Richter. **Translational control from head to tail.** eng. In: *Curr Opin Cell Biol* 21.3 (Juni 2009), S. 444–451. (Siehe S. 25).
- [113] A. Grynfeld, S. Pahlman und H. Axelson. **Induced neuroblastoma cell differentiation, associated with transient HES-1 activity and reduced HASH-1 expression, is inhibited by Notch1.** eng. In: *Int J Cancer* 88.3 (Nov. 2000), S. 401–410 (siehe S. 15, 72).

- [114] W. Gu, T. Brännström und P. Wester. **Cortical neurogenesis in adult rats after reversible photothrombotic stroke.** eng. In: *J Cereb Blood Flow Metab* 20.8 (Aug. 2000), S. 1166–1173. (Siehe S. 80).
- [115] J. Guhaniyogi und G. Brewer. **Regulation of mRNA stability in mammalian cells.** eng. In: *Gene* 265.1-2 (März 2001), S. 11–23 (siehe S. 19, 26, 73).
- [116] F. Guillemot und A. L. Joyner. **Dynamic expression of the murine Achaete-Scute homologue Mash-1 in the developing nervous system.** eng. In: *Mech Dev* 42.3 (Aug. 1993), S. 171–185 (siehe S. 13).
- [117] F. Guillemot, L. C. Lo, J. E. Johnson, A. Auerbach, D. J. Anderson und A. L. Joyner. **Mammalian achaete-scute homolog 1 is required for the early development of olfactory and autonomic neurons.** eng. In: *Cell* 75.3 (Nov. 1993), S. 463–476 (siehe S. 10).
- [118] L. Guo, E. M. Allen und W. A. Miller. **Base-pairing between untranslated regions facilitates translation of uncapped, nonpolyadenylated viral RNA.** eng. In: *Mol Cell* 7.5 (Mai 2001), S. 1103–1109 (siehe S. 26).
- [119] B. Halliwell, M. V. Clement, J. Ramalingam und L. H. Long. **Hydrogen peroxide. Ubiquitous in cell culture and in vivo?** eng. In: *IUBMB Life* 50.4-5 (2000), S. 251–257. (Siehe S. 48).
- [120] Annette Hansson, Yari E Marín, Junghan Suh, Arnold B Rabson, Suzie Chen, Eliezer Huberman, Richard L Chang, Allan H Conney und Xi Zheng. **Enhancement of TPA-induced growth inhibition and apoptosis in myeloid leukemia cells by BAY 11-7082, an NF-kappaB inhibitor.** eng. In: *Int J Oncol* 27.4 (Okt. 2005), S. 941–948 (siehe S. 72).
- [121] Diana C Hargreaves und Gerald R Crabtree. **ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms.** eng. In: *Cell Res* 21.3 (März 2011), S. 396–420. (Siehe S. 16).
- [122] X. He, M. N. Treacy, D. M. Simmons, H. A. Ingraham, L. W. Swanson und M. G. Rosenfeld. **Expression of a large family of POU-domain regulatory genes in mammalian brain development.** eng. In: *Nature* 340.6228 (Juli 1989), S. 35–41. (Siehe S. 16).
- [123] E. Hecker. **Cocarcinogenesis and tumor promoters of the diterpene ester type as possible carcinogenic risk factors.** eng. In: *J Cancer Res Clin Oncol* 99.1-2 (1981), S. 103–124 (siehe S. 48).
- [124] F. Hedborg, C. Bjelfman, P. Sparén, B. Sandstedt und S. Pahlman. **Biochemical evidence for a mature phenotype in morphologically poorly differentiated neuroblastomas with a favourable outcome.** eng. In: *Eur J Cancer* 31A.4 (1995), S. 435–443 (siehe S. 14).

- [125] Karolina Helczynska, Asa Kronblad, Annika Jögi, Elise Nilsson, Siv Beckman, Göran Landberg und Sven Pählman. **Hypoxia promotes a dedifferentiated phenotype in ductal breast carcinoma in situ.** eng. In: *Cancer Res* 63.7 (Apr. 2003), S. 1441–1444 (siehe S. 81).
- [126] C. U. Hellen und P. Sarnow. **Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules.** eng. In: *Genes Dev* 15.13 (Juli 2001), S. 1593–1612. (Siehe S. 24).
- [127] Amy W Helms, James Battiste, R. Michael Henke, Yuji Nakada, Nicolas Simplicio, François Guillemot und Jane E Johnson. **Sequential roles for Mash1 and Ngn2 in the generation of dorsal spinal cord interneurons.** eng. In: *Development* 132.12 (Juni 2005), S. 2709–2719. (Siehe S. 13).
- [128] M. W. Hentze und A. E. Kulozik. **A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay.** eng. In: *Cell* 96.3 (Feb. 1999), S. 307–310 (siehe S. 20).
- [129] P. Hilleren und R. Parker. **Mechanisms of mRNA surveillance in eukaryotes.** eng. In: *Annu Rev Genet* 33 (1999), S. 229–260. (Siehe S. 20).
- [130] Alan G Hinnebusch. **Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast.** eng. In: *Annu Rev Microbiol* 59 (2005), S. 407–450. (Siehe S. 25).
- [131] Alan G. Hinnebusch, Thomas E. Dever und Katsura Asano. **Mechanism of Translation Initiation in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.** In: Michael B. Mathews, N. Sonenberg und JWB Hershey. *Translational Control in Biology and Medicine*. Hrsg. von Michael B. Mathews, N. Sonenberg, JWB Hershey: Translational Control in Biology und Medicine. Bd. 48. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. Kap. 9, S. 225–268. (Siehe S. 21, 25).
- [132] Alan G Hinnebusch und Krishnamurthy Natarajan. **Gcn4p, a master regulator of gene expression, is controlled at multiple levels by diverse signals of starvation and stress.** eng. In: *Eukaryot Cell* 1.1 (Feb. 2002), S. 22–32 (siehe S. 25).
- [133] H. Le Hir, E. Izaurralde, L. E. Maquat und M. J. Moore. **The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions.** eng. In: *EMBO J* 19.24 (Dez. 2000), S. 6860–6869. (Siehe S. 19).
- [134] Hervé Le Hir, Ajit Nott und Melissa J Moore. **How introns influence and enhance eukaryotic gene expression.** eng. In: *Trends Biochem Sci* 28.4 (Apr. 2003), S. 215–220 (siehe S. 23).

- [135] M. R. Hirsch, M. C. Tiveron, F. Guillemot, J. F. Brunet und C. Goridis. **Control of noradrenergic differentiation and Phox2a expression by MASH1 in the central and peripheral nervous system.** eng. In: *Development* 125.4 (Feb. 1998), S. 599–608 (siehe S. 13).
- [136] Tord Hjalt. **Basic helix-loop-helix proteins expressed during early embryonic organogenesis.** eng. In: *Int Rev Cytol* 236 (2004), S. 251–280. (Siehe S. 11).
- [137] M. Höckel und P. Vaupel. **Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects.** eng. In: *J Natl Cancer Inst* 93.4 (Feb. 2001), S. 266–276 (siehe S. 82).
- [138] Martin Holcik und Nahum Sonenberg. **Translational control in stress and apoptosis.** eng. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 6.4 (Apr. 2005), S. 318–327. (Siehe S. 20, 21).
- [139] Christine E Holt und Simon L Bullock. **Subcellular mRNA localization in animal cells and why it matters.** eng. In: *Science* 326.5957 (Nov. 2009), S. 1212–1216. (Siehe S. 22).
- [140] Nobutaka Horie, Kenji So, Takahiro Moriya, Naoki Kitagawa, Keisuke Tsutsumi, Izumi Nagata und Kazuyuki Shinohara. **Effects of oxygen concentration on the proliferation and differentiation of mouse neural stem cells in vitro.** eng. In: *Cell Mol Neurobiol* 28.6 (Sep. 2008), S. 833–845. (Siehe S. 81).
- [141] S. Horton, A. Meredith, J. A. Richardson und J. E. Johnson. **Correct coordination of neuronal differentiation events in ventral forebrain requires the bHLH factor MASH1.** eng. In: *Mol Cell Neurosci* 14.4-5 (1999), S. 355–369. (Siehe S. 13).
- [142] Marthe J Howard. **Mechanisms and perspectives on differentiation of autonomic neurons.** eng. In: *Dev Biol* 277.2 (Jan. 2005), S. 271–286. (Siehe S. 71).
- [143] Stefan Hüttelmaier, Daniel Zenklusen, Marcell Lederer, Jason Dichtenberg, Mike Lorenz, Xiuhua Meng, Gary J Bassell, John Condeelis und Robert H Singer. **Spatial regulation of beta-actin translation by Src-dependent phosphorylation of ZBP1.** eng. In: *Nature* 438.7067 (Nov. 2005), S. 512–515. (Siehe S. 27).
- [144] S. Ichimiya, Y. Nimura, N. Seki, T. Ozaki, T. Nagase und A. Nakagawara. **Downregulation of hASH1 is associated with the retinoic acid-induced differentiation of human neuroblastoma cell lines.** eng. In: *Med Pediatr Oncol* 36.1 (Jan. 2001), S. 132–134. (Siehe S. 15).

- [145] Jun Ishii, Hanako Sato, Masashi Sakaeda, Yukiko Shishido-Hara, Chie Hiramatsu, Hiroshi Kamma, Hiroaki Shimoyamada, Masachika Fujiwara, Tetsuya Endo, Ichiro Aoki und Takuya Yazawa. **POU domain transcription factor BRN2 is crucial for expression of ASCL1, ND1 and neuroendocrine marker molecules and cell growth in small cell lung cancer.** eng. In: *Pathol Int* 63.3 (März 2013), S. 158–168. (Siehe S. 15, 16).
- [146] Zoran Ivanovic. **Hypoxia or in situ normoxia: The stem cell paradigm.** eng. In: *J Cell Physiol* 219.2 (Mai 2009), S. 271–275. (Siehe S. 77).
- [147] R. J. Jackson. **Alternative mechanisms of initiating translation of mammalian mRNAs.** eng. In: *Biochem Soc Trans* 33.Pt 6 (Dez. 2005), S. 1231–1241. (Siehe S. 24).
- [148] A. Jalava, J. Heikkilä, M. Lintunen, K. Akerman und S. Pählman. **Staurosporine induces a neuronal phenotype in SH-SY5Y human neuroblastoma cells that resembles that induced by the phorbol ester 12-O-tetradecanoyl phorbol-13 acetate (TPA).** eng. In: *FEBS Lett* 300.2 (März 1992), S. 114–118 (siehe S. 75).
- [149] Deanna M Janzen, Lyudmila Frolova und Adam P Geballe. **Inhibition of translation termination mediated by an interaction of eukaryotic release factor 1 with a nascent peptidyl-tRNA.** eng. In: *Mol Cell Biol* 22.24 (Dez. 2002), S. 8562–8570 (siehe S. 25).
- [150] Sebastian Jessberger, Nicolas Toni, Gregory D Clemenson, Jasodhara Ray und Fred H Gage. **Directed differentiation of hippocampal stem/progenitor cells in the adult brain.** eng. In: *Nat Neurosci* 11.8 (Aug. 2008), S. 888–893. (Siehe S. 14).
- [151] Yuanqing Jiang, Bo Yang und Michael K Deyholos. **Functional characterization of the Arabidopsis bHLH92 transcription factor in abiotic stress.** eng. In: *Mol Genet Genomics* 282.5 (Nov. 2009), S. 503–516. (Siehe S. 71).
- [152] Annika Jögi, Ingrid Øra, Helén Nilsson, Asa Lindeheim, Yuichi Makino, Lorenz Poellinger, Håkan Axelsson und Sven Pählman. **Hypoxia alters gene expression in human neuroblastoma cells toward an immature and neural crest-like phenotype.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99.10 (Mai 2002), S. 7021–7026. (Siehe S. 81, 82, 83).
- [153] Annika Jögi, Johan Vallon-Christersson, Linda Holmquist, Håkan Axelsson, Ake Borg und Sven Pählman. **Human neuroblastoma cells exposed to hypoxia: induction of genes associated with growth, survival, and aggressive behavior.** eng. In: *Exp Cell Res* 295.2 (Mai 2004), S. 469–487. (Siehe S. 82).

- [154] G. Johannes und P. Sarnow. **Cap-independent polysomal association of natural mRNAs encoding c-myc, BiP, and eIF4G conferred by internal ribosome entry sites.** eng. In: *RNA* 4.12 (Dez. 1998), S. 1500–1513 (siehe S. 24).
- [155] J. E. Johnson, S. J. Birren und D. J. Anderson. **Two rat homologues of *Drosophila* achaete-scute specifically expressed in neuronal precursors.** eng. In: *Nature* 346.6287 (Aug. 1990), S. 858–861. (Siehe S. 10).
- [156] Ryoichiro Kageyama, Toshiyuki Ohtsuka und Taeko Kobayashi. **Roles of *Hes* genes in neural development.** eng. In: *Dev. Growth Differ.* 50 Suppl 1 (Juni 2008), S97–103. (Siehe S. 12).
- [157] Tetsuro Kamiya, Junya Makino, Hirokazu Hara, Naoki Inagaki und Tetsuo Adachi. **Extracellular-superoxide dismutase expression during monocytic differentiation of U937 cells.** eng. In: *J Cell Biochem* 112.1 (Jan. 2011), S. 244–255. (Siehe S. 72).
- [158] M. G. Kazanietz. **Eyes wide shut: protein kinase C isozymes are not the only receptors for the phorbol ester tumor promoters.** eng. In: *Mol Carcinog* 28.1 (Mai 2000), S. 5–11 (siehe S. 48).
- [159] Seth M Kelly und Anita H Corbett. **Messenger RNA export from the nucleus: a series of molecular wardrobe changes.** eng. In: *Traffic* 10.9 (Sep. 2009), S. 1199–1208. (Siehe S. 19).
- [160] Euiseok J Kim, James Battiste, Yasushi Nakagawa und Jane E Johnson. **Ascl1 (Mash1) lineage cells contribute to discrete cell populations in CNS architecture.** eng. In: *Mol Cell Neurosci* 38.4 (Aug. 2008), S. 595–606. (Siehe S. 13).
- [161] Euiseok J Kim, Cheuk T Leung, Randall R Reed und Jane E Johnson. **In vivo analysis of Ascl1 defined progenitors reveals distinct developmental dynamics during adult neurogenesis and gliogenesis.** eng. In: *J Neurosci* 27.47 (Nov. 2007), S. 12764–12774. (Siehe S. 14).
- [162] E. H. Kislauskis, X. Zhu und R. H. Singer. **Sequences responsible for intracellular localization of beta-actin messenger RNA also affect cell phenotype.** eng. In: *J Cell Biol* 127.2 (Okt. 1994), S. 441–451 (siehe S. 27).
- [163] Thomas J Klein und Peter M Glazer. **The tumor microenvironment and DNA repair.** eng. In: *Semin Radiat Oncol* 20.4 (Okt. 2010), S. 282–287. (Siehe S. 82).
- [164] C. G. Körner und E. Wahle. **Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease.** eng. In: *J Biol Chem* 272.16 (Apr. 1997), S. 10448–10456 (siehe S. 20).

- [165] C. G. Körner, M. Wormington, M. Muckenthaler, S. Schneider, E. Dehlin und E. Wahle. **The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes.** eng. In: *EMBO J* 17.18 (Sep. 1998), S. 5427–5437. (Siehe S. 20).
- [166] M. Kozak. **Bifunctional messenger RNAs in eukaryotes.** eng. In: *Cell* 47.4 (Nov. 1986), S. 481–483 (siehe S. 25).
- [167] E. J. Kremer, M. Pritchard, M. Lynch, S. Yu, K. Holman, E. Baker, S. T. Warren, D. Schlessinger, G. R. Sutherland und R. I. Richards. **Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)n.** eng. In: *Science* 252.5013 (Juni 1991), S. 1711–1714 (siehe S. 16).
- [168] Ramya Kumareswaran, Olga Ludkovski, Alice Meng, Jenna Sykes, Melania Pintilie und Robert G Bristow. **Chronic hypoxia compromises repair of DNA double-strand breaks to drive genetic instability.** eng. In: *J Cell Sci* 125.Pt 1 (Jan. 2012), S. 189–199. (Siehe S. 82).
- [169] Nermin Kuzkaya, Norbert Weissmann, David G Harrison und Sergey Dikalov. **Interactions of peroxynitrite, tetrahydrobiopterin, ascorbic acid, and thiols: implications for uncoupling endothelial nitric-oxide synthase.** eng. In: *J Biol Chem* 278.25 (Juni 2003), S. 22546–22554. (Siehe S. 48).
- [170] Daniel H Lackner und Jürg Bähler. **Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes.** eng. In: *Int Rev Cell Mol Biol* 271 (2008), S. 199–251. (Siehe S. 20).
- [171] U. K. Laemmli. **Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.** eng. In: *Nature* 227.5259 (Aug. 1970), S. 680–685 (siehe S. 34).
- [172] E S Lander, L M Linton, B Birren, C Nusbaum, M C Zody, J Baldwin, K Devon, K Dewar, M Doyle, W FitzHugh, R Funke, D Gage, K Harris, A Heaford, J Howland, L Kann, J Lehoczký, R LeVine, P McEwan, K McKernan, J Meldrim, J P Mesirov, C Miranda, W Morris, J Naylor, C Raymond, M Rosetti, R Santos, A Sheridan, C Sougnez, N Stange-Thomann, N Stojanovic, A Subramanian, D Wyman, J Rogers, J Sulston, R Ainscough, S Beck, D Bentley, J Burton, C Clee, N Carter, A Coulson, R Deadman, P Deloukas, A Dunham, I Dunham, R Durbin, L French, D Grafham, S Gregory, T Hubbard, S Humphray, A Hunt, M Jones, C Lloyd, A McMurray, L Matthews, S Mercer, S Milne, J C Mullikin, A Mungall, R Plumb, M Ross, R Shownkeen, S Sims, R H Waterston, R K Wilson, L W Hillier, J D McPherson, M A Marra, E R Mardis, L A Fulton, A T Chinwalla, K H Pepin, W R Gish, S L Chissoe, M C Wendl, K D Delehaunty, T L

- Miner, A Delehaunty, J B Kramer, L L Cook, R S Fulton, D L Johnson, P J Minx, S W Clifton, T Hawkins, E Branscomb, P Predki, P Richardson, S Wenning, T Slezak, N Doggett, J F Cheng, A Olsen, S Lucas, C Elkin, E Uberbacher, M Frazier, R A Gibbs, D M Muzny, S E Scherer, J B Bouck, E J Sodergren, K C Worley, C M Rives, J H Gorrell, M L Metzker, S L Naylor, R S Kucherlapati, D L Nelson, G M Weinstock, Y Sakaki, A Fujiyama, M Hattori, T Yada, A Toyoda, T Itoh, C Kawagoe, H Watanabe, Y Totoki, T Taylor, J Weissenbach, R Heilig, W Saurin, F Artiguenave, P Brottier, T Bruls, E Pelletier, C Robert, P Wincker, D R Smith, L Doucette-Stamm, M Rubenfield, K Weinstock, H M Lee, J Dubois, A Rosenthal, M Platzer, G Nyakatura, S Taudien, A Rump, H Yang, J Yu, J Wang, G Huang, J Gu, L Hood, L Rowen, A Madan, S Qin, R W Davis, N A Federspiel, A P Abola, M J Proctor, R M Myers, J Schmutz, M Dickson, J Grimwood, D R Cox, M V Olson, R Kaul, C Raymond, N Shimizu, K Kawasaki, S Minoshima, G A Evans, M Athanasiou, R Schultz, B A Roe, F Chen, H Pan, J Ramser, H Lehrach, R Reinhardt, W R McCombie, M de la Bastide, N Dedhia, H Blöcker, K Hornischer, G Nordsiek, R Agarwala, L Aravind, J A Bailey, A Bateman, S Batzoglou, E Birney, P Bork, D G Brown, C B Burge, L Cerutti, H C Chen, D Church, M Clamp, R R Copley, T Doerks, S R Eddy, E E Eichler, T S Furey, J Galagan, J G Gilbert, C Harmon, Y Hayashizaki, D Haussler, H Hermjakob, K Hokamp, W Jang, L S Johnson, T A Jones, S Kasif, A Kasprzyk, S Kennedy, W J Kent, P Kitts, E V Koonin, I Korf, D Kulp, D Lancet, T M Lowe, A McLysaght, T Mikkelsen, J V Moran, N Mulder, V J Pollara, C P Ponting, G Schuler, J Schultz, G Slater, A F Smit, E Stupka, J Szustakowski, D Thierry-Mieg, J Thierry-Mieg, L Wagner, J Wallis, R Wheeler, A Williams, Y I Wolf, K H Wolfe, S P Yang, R F Yeh, F Collins, M S Guyer, J Peterson, A Felsenfeld, K A Wetterstrand, A Patrinos, M J Morgan, P de Jong, J J Catanese, K Osoegawa, H Shizuya, S Choi, Y J Chen und International Human Genome Sequencing Consortium. **Initial sequencing and analysis of the human genome.** In: *Nature* 409.6822 (Feb. 2001), S. 860–921. ISSN: 0028-0836. (Siehe S. 45).
- [173] J. E. Landers, S. L. Cassel und D. L. George. **Translational enhancement of mdm2 oncogene expression in human tumor cells containing a stabilized wild-type p53 protein.** eng. In: *Cancer Res* 57.16 (Aug. 1997), S. 3562–3568 (siehe S. 25).
- [174] David Lando, Daniel J Peet, Jeffrey J Gorman, Dean A Whelan, Murray L Whitelaw und Richard K Bruick. **FIH-1 is an asparaginyl hydroxylase enzyme that regulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor.** eng. In: *Genes Dev* 16.12 (Juni 2002), S. 1466–1471. (Siehe S. 49).

- [175] Valérie Ledent, Odier Paquet und Michel Vervoort. **Phylogenetic analysis of the human basic helix-loop-helix proteins.** eng. In: *Genome Biol* 3.6 (Mai 2002), RESEARCH0030.1–0030.18 (siehe S. 11).
- [176] Joon H Lee, Tatyana V Pestova, Byung-Sik Shin, Chune Cao, Sang K Choi und Thomas E Dever. **Initiation factor eIF5B catalyzes second GTP-dependent step in eukaryotic translation initiation.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99.26 (Dez. 2002), S. 16689–16694. (Siehe S. 21).
- [177] Y. M. Lee, C. H. Jeong, S. Y. Koo, M. J. Son, H. S. Song, S. K. Bae, J. A. Raleigh, H. Y. Chung, M. A. Yoo und K. W. Kim. **Determination of hypoxic region by hypoxia marker in developing mouse embryos in vivo: a possible signal for vessel development.** eng. In: *Dev Dyn* 220.2 (Feb. 2001), S. 175–186. (Siehe S. 77).
- [178] Guohong Li und Danny Reinberg. **Chromatin higher-order structures and gene regulation.** eng. In: *Curr Opin Genet Dev* 21.2 (Apr. 2011), S. 175–186. (Siehe S. 16).
- [179] Shengguo Li, Kamana Misra, Michael P Matisse und Mengqing Xiang. **Foxn4 acts synergistically with Mash1 to specify subtype identity of V2 interneurons in the spinal cord.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102.30 (Juli 2005), S. 10688–10693. (Siehe S. 13).
- [180] X. L. Li, J. A. Blackford, C. S. Judge, M. Liu, W. Xiao, D. V. Kalvakolanu und B. A. Hassel. **RNase-L-dependent destabilization of interferon-induced mRNAs. A role for the 2-5A system in attenuation of the interferon response.** eng. In: *J Biol Chem* 275.12 (März 2000), S. 8880–8888 (siehe S. 20).
- [181] K. C. Lim, G. Lakshmanan, S. E. Crawford, Y. Gu, F. Grosveld und J. D. Engel. **Gata3 loss leads to embryonic lethality due to noradrenaline deficiency of the sympathetic nervous system.** eng. In: *Nat Genet* 25.2 (Juni 2000), S. 209–212. (Siehe S. 13).
- [182] R. I. Linnoila, B. Zhao, J. L. DeMayo, B. D. Nelkin, S. B. Baylin, F. J. DeMayo und D. W. Ball. **Constitutive achaete-scute homologue-1 promotes airway dysplasia and lung neuroendocrine tumors in transgenic mice.** eng. In: *Cancer Res* 60.15 (Aug. 2000), S. 4005–4009 (siehe S. 15).
- [183] R. I. Linnoila. **Functional facets of the pulmonary neuroendocrine system.** eng. In: *Lab Invest* 86.5 (Mai 2006), S. 425–444. (Siehe S. 15).
- [184] K. Lisy und D. J. Peet. **Turn me on: regulating HIF transcriptional activity.** eng. In: *Cell Death Differ* 15.4 (Apr. 2008), S. 642–649. (Siehe S. 49).

-
- [185] Jidong Liu, Marco Antonio Valencia-Sanchez, Gregory J Hannon und Roy Parker. **MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies.** eng. In: *Nat Cell Biol* 7.7 (Juli 2005), S. 719–723. (Siehe S. 22).
- [186] W. S. Liu und C. A. Heckman. **The sevenfold way of PKC regulation.** eng. In: *Cell Signal* 10.8 (Sep. 1998), S. 529–542 (siehe S. 48, 74).
- [187] K. J. Livak und T. D. Schmittgen. **Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method.** eng. In: *Methods* 25.4 (Dez. 2001), S. 402–408. (Siehe S. 34).
- [188] L C Lo, J E Johnson, C W Wuenschell, T Saito und D J Anderson. **Mammalian achaete-scute homolog 1 is transiently expressed by spatially restricted subsets of early neuroepithelial and neural crest cells.** In: *Genes Dev* 5.9 (Sep. 1991), S. 1524–37. ISSN: 0890-9369. (Siehe S. 13).
- [189] L Lo, X Morin, J F Brunet und D J Anderson. **Specification of neurotransmitter identity by Phox2 proteins in neural crest stem cells.** In: *Neuron* 22.4 (Apr. 1999), S. 693–705. ISSN: 0896-6273. (Siehe S. 13).
- [190] Tobias Löfstedt, Annika Jögi, Mikael Sigvardsson, Katarina Gradin, Lorenz Poellinger, Sven Pålman und Håkan Axelsson. **Induction of ID2 expression by hypoxia-inducible factor-1: a role in dedifferentiation of hypoxic neuroblastoma cells.** eng. In: *J Biol Chem* 279.38 (Sep. 2004), S. 39223–39231. (Siehe S. 82).
- [191] Jason E Long, Sonia Garel, Manuel Alvarez-Dolado, Kazuaki Yoshikawa, Noriko Osumi, Arturo Alvarez-Buylla und John L R Rubenstein. **Dlx-dependent and -independent regulation of olfactory bulb interneuron differentiation.** eng. In: *J Neurosci* 27.12 (März 2007), S. 3230–3243. (Siehe S. 13).
- [192] Antonella Longo, Gerald P Guanga und Robert B Rose. **Crystal structure of E47-NeuroD1/beta2 bHLH domain-DNA complex: heterodimer selectivity and DNA recognition.** eng. In: *Biochemistry* 47.1 (Jan. 2008), S. 218–229. (Siehe S. 11).
- [193] E. M. Lord, L. Harwell und C. J. Koch. **Detection of hypoxic cells by monoclonal antibody recognizing 2-nitroimidazole adducts.** eng. In: *Cancer Res* 53.23 (Dez. 1993), S. 5721–5726 (siehe S. 77).
- [194] B. Lüscher und L. G. Larsson. **The basic region/helix-loop-helix/leucine zipper domain of Myc proto-oncoproteins: function and regulation.** eng. In: *Oncogene* 18.19 (Mai 1999), S. 2955–2966. (Siehe S. 11).

- [195] P. C. Mahon, K. Hirota und G. L. Semenza. **FIH-1: a novel protein that interacts with HIF-1alpha and VHL to mediate repression of HIF-1 transcriptional activity.** eng. In: *Genes Dev* 15.20 (Okt. 2001), S. 2675–2686. (Siehe S. 49).
- [196] David A Mangus, Matthew C Evans und Allan Jacobson. **Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression.** eng. In: *Genome Biol* 4.7 (2003), S. 223. (Siehe S. 19).
- [197] Lynne E Maquat. **Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics.** eng. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5.2 (Feb. 2004), S. 89–99. (Siehe S. 19).
- [198] O. Marin, S. A. Anderson und J. L. Rubenstein. **Origin and molecular specification of striatal interneurons.** eng. In: *J Neurosci* 20.16 (Aug. 2000), S. 6063–6076 (siehe S. 13).
- [199] Kazuto Masamoto und Kazuo Tanishita. **Oxygen transport in brain tissue.** eng. In: *J Biomech Eng* 131.7 (Juli 2009), S. 074002. (Siehe S. 77).
- [200] M. E. Massari und C. Murre. **Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms.** eng. In: *Mol Cell Biol* 20.2 (Jan. 2000), S. 429–440 (siehe S. 11).
- [201] Michael B. Mathews, N. Sonenberg und JWB Hershey. **Translational Control in Biology and Medicin.** Bd. 48. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007 (siehe S. 20).
- [202] P. H. Maxwell, M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff, C. W. Pugh, E. R. Maher und P. J. Ratcliffe. **The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis.** eng. In: *Nature* 399.6733 (Mai 1999), S. 271–275. (Siehe S. 49).
- [203] J. M. May. **Is ascorbic acid an antioxidant for the plasma membrane?** eng. In: *FASEB J* 13.9 (Juni 1999), S. 995–1006 (siehe S. 48).
- [204] Nicholas J McGlincy und Christopher W J Smith. **Alternative splicing resulting in nonsense-mediated mRNA decay: what is the meaning of nonsense?** eng. In: *Trends Biochem Sci* 33.8 (Aug. 2008), S. 385–393. (Siehe S. 20).
- [205] David E G McNay, Michelle Pelling, Suzanne Claxton, François Guillemot und Siew-Lan Ang. **Mash1 is required for generic and subtype differentiation of hypothalamic neuroendocrine cells.** eng. In: *Mol Endocrinol* 20.7 (Juli 2006), S. 1623–1632. (Siehe S. 13).

- [206] Jan Medenbach, Markus Seiler und Matthias W Hentze. **Translational control via protein-regulated upstream open reading frames.** eng. In: *Cell* 145.6 (Juni 2011), S. 902–913. (Siehe S. 25).
- [207] Mark F Mehler und John S Mattick. **Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease.** eng. In: *Physiol Rev* 87.3 (Juli 2007), S. 799–823. (Siehe S. 18).
- [208] H. Mellor, P. Flynn, C. D. Nobes, A. Hall und P. J. Parker. **PRK1 is targeted to endosomes by the small GTPase, RhoB.** eng. In: *J Biol Chem* 273.9 (Feb. 1998), S. 4811–4814 (siehe S. 74).
- [209] J. R. Menezes und M. B. Luskin. **Expression of neuron-specific tubulin defines a novel population in the proliferative layers of the developing telencephalon.** eng. In: *J Neurosci* 14.9 (Sep. 1994), S. 5399–5416 (siehe S. 52).
- [210] Flavio Mignone, Carmela Gissi, Sabino Liuni und Graziano Pesole. **Untranslated regions of mRNAs.** eng. In: *Genome Biol* 3.3 (2002), REVIEWS0004 (siehe S. 45).
- [211] Flavio Mignone, Giorgio Grillo, Flavio Licciulli, Michele Iacono, Sabino Liuni, Paul J Kersey, Jorge Duarte, Cecilia Saccone und Graziano Pesole. **UTRdb and UTRsite: a collection of sequences and regulatory motifs of the untranslated regions of eukaryotic mRNAs.** eng. In: *Nucleic Acids Res* 33.Database issue (Jan. 2005), S. D141–D146. (Siehe S. 45).
- [212] Hiroyuki Miyoshi. **Gene delivery to hematopoietic stem cells using lentiviral vectors.** eng. In: *Methods Mol Biol* 246 (2004), S. 429–438 (siehe S. 13).
- [213] Ahmed Mohyeldin, Tomás Garzón-Muvdi und Alfredo Quiñones-Hinojosa. **Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche.** eng. In: *Cell Stem Cell* 7.2 (Aug. 2010), S. 150–161. (Siehe S. 81).
- [214] Melissa J Moore. **From birth to death: the complex lives of eukaryotic mRNAs.** eng. In: *Science* 309.5740 (Sep. 2005), S. 1514–1518. (Siehe S. 22).
- [215] Melissa J Moore und Nick J Proudfoot. **Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation.** eng. In: *Cell* 136.4 (Feb. 2009), S. 688–700. (Siehe S. 19, 23).
- [216] X. Morin, H. Cremer, M. R. Hirsch, R. P. Kapur, C. Goridis und J. F. Brunet. **Defects in sensory and autonomic ganglia and absence of locus coeruleus in mice deficient for the homeobox gene Phox2a.** eng. In: *Neuron* 18.3 (März 1997), S. 411–423 (siehe S. 13).

- [217] K. Morioka und T. Ono. **Induction and modification of erythropoiesis in a suspension culture system derived from long-term bone marrow culture of Syrian hamster.** eng. In: *Cell Differ* 17.1 (Juli 1985), S. 49–56 (siehe S. 75).
- [218] S. J. Morrison, M. Csete, A. K. Groves, W. Melega, B. Wold und D. J. Anderson. **Culture in reduced levels of oxygen promotes clonogenic sympathoadrenal differentiation by isolated neural crest stem cells.** eng. In: *J Neurosci* 20.19 (Okt. 2000), S. 7370–7376 (siehe S. 80, 81).
- [219] C. Murre, G. Bain, M. A. van Dijk, I. Engel, B. A. Furnari, M. E. Massari, J. R. Matthews, M. W. Quong, R. R. Rivera und M. H. Stuiver. **Structure and function of helix-loop-helix proteins.** eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1218.2 (Juni 1994), S. 129–135 (siehe S. 11).
- [220] Yuji Nakada, Thomas L Hunsaker, R. Michael Henke und Jane E Johnson. **Distinct domains within Mash1 and Math1 are required for function in neuronal differentiation versus neuronal cell-type specification.** eng. In: *Development* 131.6 (März 2004), S. 1319–1330. (Siehe S. 13).
- [221] Tomoya Nakatani, Yasuko Minaki, Minoru Kumai und Yuichi Ono. **Helt determines GABAergic over glutamatergic neuronal fate by repressing Ngn genes in the developing mesencephalon.** eng. In: *Development* 134.15 (Aug. 2007), S. 2783–2793. (Siehe S. 13).
- [222] M. A. Newton, C. M. Kendzioriski, C. S. Richmond, F. R. Blattner und K. W. Tsui. **On differential variability of expression ratios: improving statistical inference about gene expression changes from microarray data.** eng. In: *J Comput Biol* 8.1 (2001), S. 37–52. (Siehe S. 74).
- [223] Y. Nishizuka. **Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C.** eng. In: *Science* 258.5082 (Okt. 1992), S. 607–614 (siehe S. 48).
- [224] Y. Nishizuka. **The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation.** eng. In: *Nature* 334.6184 (Aug. 1988), S. 661–665. (Siehe S. 74).
- [225] I. Oberle, F. Rousseau, D. Heitz, C. Kretz, D. Devys, A. Hanauer, J. Boue, M. Bertheas und J. Mandel. **Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome.** eng. In: *Science* 252.5009 (Mai 1991), S. 1097–1102. (Siehe S. 16).
- [226] John J Ohab, Sheila Fleming, Armin Blesch und S. Thomas Carmichael. **A neurovascular niche for neurogenesis after stroke.** eng. In: *J Neurosci* 26.50 (Dez. 2006), S. 13007–13016. (Siehe S. 81).

- [227] Chin-Tong Ong und Victor G Corces. **Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression.** eng. In: *Nat Rev Genet* 12.4 (Apr. 2011), S. 283–293. (Siehe S. 16).
- [228] Hirotaka Osada, Shuta Tomida, Yasushi Yatabe, Yoshio Tatematsu, Toshiyuki Takeuchi, Hideki Murakami, Yutaka Kondo, Yoshitaka Sekido und Takashi Takahashi. **Roles of achaete-scute homologue 1 in DKK1 and E-cadherin repression and neuroendocrine differentiation in lung cancer.** eng. In: *Cancer Res* 68.6 (März 2008), S. 1647–1655. (Siehe S. 15, 71).
- [229] D. H. Ostareck, A. Ostareck-Lederer, I. N. Shatsky und M. W. Hentze. **Lipoxygenase mRNA silencing in erythroid differentiation: The 3'UTR regulatory complex controls 60S ribosomal subunit joining.** eng. In: *Cell* 104.2 (Jan. 2001), S. 281–290 (siehe S. 27, 80).
- [230] D. H. Ostareck, A. Ostareck-Lederer, M. Wilm, B. J. Thiele, M. Mann und M. W. Hentze. **mRNA silencing in erythroid differentiation: hnRNP K and hnRNP E1 regulate 15-lipoxygenase translation from the 3' end.** eng. In: *Cell* 89.4 (Mai 1997), S. 597–606 (siehe S. 27, 80).
- [231] S. Pålman, A. I. Ruusala, L. Abrahamsson, L. Odelstad und K. Nilsson. **Kinetics and concentration effects of TPA-induced differentiation of cultured human neuroblastoma cells.** eng. In: *Cell Differ* 12.3 (März 1983), S. 165–170 (siehe S. 49, 72).
- [232] Sven Pålman, Marie-Thérèse Stockhausen, Erik Fredlund und Håkan Axelsson. **Notch signaling in neuroblastoma.** eng. In: *Semin Cancer Biol* 14.5 (Okt. 2004), S. 365–373. (Siehe S. 82).
- [233] Feng Pan, Stefan Hüttelmaier, Robert H Singer und Wei Gu. **ZBP2 facilitates binding of ZBP1 to beta-actin mRNA during transcription.** eng. In: *Mol Cell Biol* 27.23 (Dez. 2007), S. 8340–8351. (Siehe S. 27).
- [234] David M Panchision. **The role of oxygen in regulating neural stem cells in development and disease.** eng. In: *J Cell Physiol* 220.3 (Sep. 2009), S. 562–568. (Siehe S. 77).
- [235] P. P. Pandolfi, M. E. Roth, A. Karis, M. W. Leonard, E. Dzierzak, F. G. Grosveld, J. D. Engel und M. H. Lindenbaum. **Targeted disruption of the GATA3 gene causes severe abnormalities in the nervous system and in fetal liver haematopoiesis.** eng. In: *Nat Genet* 11.1 (Sep. 1995), S. 40–44. (Siehe S. 13).
- [236] Kostas Pantopoulos. **Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update.** eng. In: *Ann N Y Acad Sci* 1012 (März 2004), S. 1–13 (siehe S. 26).

- [237] F. Nina Papavasiliou und David G Schatz. **Somatic hypermutation of immunoglobulin genes: merging mechanisms for genetic diversity.** eng. In: *Cell* 109 Suppl (Apr. 2002), S35–S44 (siehe S. 18).
- [238] Roy Parker und Ujwal Sheth. **P bodies and the control of mRNA translation and degradation.** eng. In: *Mol Cell* 25.5 (März 2007), S. 635–646. (Siehe S. 22).
- [239] Carlos M Parras, Rossella Galli, Olivier Britz, Sylvia Soares, Christophe Galichet, James Battiste, Jane E Johnson, Masato Nakafuku, Angelo Vescovi und François Guillemot. **Mash1 specifies neurons and oligodendrocytes in the postnatal brain.** eng. In: *EMBO J* 23.22 (Nov. 2004), S. 4495–4505. (Siehe S. 13, 14).
- [240] Carlos M Parras, Carol Schuurmans, Raffaella Scardigli, Jaesang Kim, David J Anderson und François Guillemot. **Divergent functions of the proneural genes Mash1 and Ngn2 in the specification of neuronal subtype identity.** eng. In: *Genes Dev* 16.3 (Feb. 2002), S. 324–338. (Siehe S. 13).
- [241] V. Parrow, E. Nånberg, J. Heikkilä, U. Hammerling und S. Pålman. **Protein kinase C remains functionally active during TPA induced neuronal differentiation of SH-SY5Y human neuroblastoma cells.** eng. In: *J Cell Physiol* 152.3 (Sep. 1992), S. 536–544. (Siehe S. 74).
- [242] A Pattyn, X Morin, H Cremer, C Goridis und J F Brunet. **Expression and interactions of the two closely related homeobox genes Phox2a and Phox2b during neurogenesis.** In: *Development* 124.20 (Okt. 1997), S. 4065–75. ISSN: 0950-1991. (Siehe S. 13).
- [243] A Pattyn, X Morin, H Cremer, C Goridis und J F Brunet. **The homeobox gene Phox2b is essential for the development of autonomic neural crest derivatives.** In: *Nature* 399.6734 (Mai 1999), S. 366–70. ISSN: 0028-0836. (Siehe S. 13).
- [244] Alexandre Pattyn, François Guillemot und Jean-François Brunet. **Delays in neuronal differentiation in Mash1/Ascl1 mutants.** eng. In: *Dev Biol* 295.1 (Juli 2006), S. 67–75. (Siehe S. 14).
- [245] Alexandre Pattyn, Nicolas Simplicio, J. Hikke van Doorninck, Christo Goridis, François Guillemot und Jean-François Brunet. **Ascl1/Mash1 is required for the development of central serotonergic neurons.** eng. In: *Nat Neurosci* 7.6 (Juni 2004), S. 589–595. (Siehe S. 13).
- [246] W. R. Paulding und M. F. Czyzyk-Krzeska. **Hypoxia-induced regulation of mRNA stability.** eng. In: *Adv Exp Med Biol* 475 (2000), S. 111–121. (Siehe S. 19).

- [247] S. E. Perez, S. Rebelo und D. J. Anderson. **Early specification of sensory neuron fate revealed by expression and function of neurogenins in the chick embryo.** eng. In: *Development* 126.8 (Apr. 1999), S. 1715–1728 (siehe S. 13).
- [248] G. Pesole, C. Gissi, D. Catalano, G. Grillo, F. Licciulli, S. Liuni, M. Attimonelli und C. Saccone. **MitoNuc and MitoAln: two related databases of nuclear genes coding for mitochondrial proteins.** eng. In: *Nucleic Acids Res* 28.1 (Jan. 2000), S. 163–165 (siehe S. 45).
- [249] G. Pesole, S. Liuni, G. Grillo und C. Saccone. **Structural and compositional features of untranslated regions of eukaryotic mRNAs.** eng. In: *Gene* 205.1-2 (Dez. 1997), S. 95–102 (siehe S. 23).
- [250] G. Pesole, F. Mignone, C. Gissi, G. Grillo, F. Licciulli und S. Liuni. **Structural and functional features of eukaryotic mRNA untranslated regions.** eng. In: *Gene* 276.1-2 (Okt. 2001), S. 73–81 (siehe S. 45).
- [251] Graziano Pesole, Sabino Liuni, Giorgio Grillo, Flavio Licciulli, Flavio Mignone, Carmela Gissi und Cecilia Saccone. **UTRdb and UTRsite: specialized databases of sequences and functional elements of 5' and 3' untranslated regions of eukaryotic mRNAs. Update 2002.** eng. In: *Nucleic Acids Res* 30.1 (Jan. 2002), S. 335–340 (siehe S. 45).
- [252] T. V. Pestova, I. B. Lomakin, J. H. Lee, S. K. Choi, T. E. Dever und C. U. Hellen. **The joining of ribosomal subunits in eukaryotes requires eIF5B.** eng. In: *Nature* 403.6767 (Jan. 2000), S. 332–335. (Siehe S. 21).
- [253] Tatyana V. Pestova, Jon R. Lorsch und Christopher U.T. Hellen. **The mechanism of translation initiation in eukaryotes.** In: Michael B. Mathews, N. Sonenberg und JWB Hershey. *Translational Control in Biology and Medicine*. Hrsg. von Michael B. Mathews, N. Sonenberg, JWB Hershey: Translational Control in Biology und Medicine. Bd. 48. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. Kap. 4, S. 87–128. (Siehe S. 21).
- [254] M. Piecyk, S. Wax, A. R. Beck, N. Kedersha, M. Gupta, B. Maritim, S. Chen, C. Gueydan, V. Kruys, M. Streuli und P. Anderson. **TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha.** eng. In: *EMBO J* 19.15 (Aug. 2000), S. 4154–4163. (Siehe S. 26).
- [255] Ramesh S Pillai, Suvendra N Bhattacharyya, Caroline G Artus, Tabea Zoller, Nicolas Cougot, Eugenia Basyuk, Edouard Bertrand und Witold Filipowicz. **Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells.** eng. In: *Science* 309.5740 (Sep. 2005), S. 1573–1576. (Siehe S. 22).

- [256] S. J. Pleasure, A. E. Collins und D. H. Lowenstein. **Unique expression patterns of cell fate molecules delineate sequential stages of dentate gyrus development.** eng. In: *J Neurosci* 20.16 (Aug. 2000), S. 6095–6105 (siehe S. 13).
- [257] Katherine S Pollard, Melissa J Hubisz, Kate R Rosenbloom und Adam Siepel. **Detection of nonneutral substitution rates on mammalian phylogenies.** eng. In: *Genome Res* 20.1 (Jan. 2010), S. 110–121. (Siehe S. 46).
- [258] T. Preiss und M. W. Hentze. **From factors to mechanisms: translation and translational control in eukaryotes.** eng. In: *Curr Opin Genet Dev* 9.5 (Okt. 1999), S. 515–521 (siehe S. 25).
- [259] Thomas Preiss und Matthias W Hentze. **Starting the protein synthesis machine: eukaryotic translation initiation.** eng. In: *Bioessays* 25.12 (Dez. 2003), S. 1201–1211. (Siehe S. 20, 21).
- [260] Nick Proudfoot. **New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription.** eng. In: *Curr Opin Cell Biol* 16.3 (Juni 2004), S. 272–278. (Siehe S. 18).
- [261] S. A. Przyborski und M. A. Cambray-Deakin. **Developmental regulation of MAP2 variants during neuronal differentiation in vitro.** eng. In: *Brain Res Dev Brain Res* 89.2 (Nov. 1995), S. 187–201 (siehe S. 52).
- [262] M. Ptushkina, T. von der Haar, M. M. Karim, J. M. Hughes und J. E. McCarthy. **Repressor binding to a dorsal regulatory site traps human eIF4E in a high cap-affinity state.** eng. In: *EMBO J* 18.14 (Juli 1999), S. 4068–4075. (Siehe S. 20).
- [263] Ying Qian, Senji Shirasawa, Chih-Li Chen, Leping Cheng und Qiufu Ma. **Proper development of relay somatic sensory neurons and D2/D4 interneurons requires homeobox genes Rnx/Tlx-3 and Tlx-1.** eng. In: *Genes Dev* 16.10 (Mai 2002), S. 1220–1233. (Siehe S. 13).
- [264] M.L. Rankin, L.A. Hazelwood, R.B. Free, Yoon Numkung, E.B. Rex, R.A. Roof und D.R. Sibley. **Molecular Pharmacology of the Dopamine Receptors.** In: L.L. Iversen, S.D. Iversen und S.B. Dunnett. *Dopamine handbook*. Hrsg. von L.L. Iversen, S.D. Iversen und S.B. Dunnett. Oxford University Press, Incorporated, 2010. Kap. 3.1, S. 63–87. (Siehe S. 48).
- [265] T. Y. Reynolds, S. Rockwell und P. M. Glazer. **Genetic instability induced by the tumor microenvironment.** eng. In: *Cancer Res* 56.24 (Dez. 1996), S. 5754–5757 (siehe S. 82).
- [266] Joel D Richter und Nahum Sonenberg. **Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins.** eng. In: *Nature* 433.7025 (Feb. 2005), S. 477–480. (Siehe S. 21).

- [267] Alexis J Rodriguez, Kevin Czaplinski, John S Condeelis und Robert H Singer. **Mechanisms and cellular roles of local protein synthesis in mammalian cells.** eng. In: *Curr Opin Cell Biol* 20.2 (Apr. 2008), S. 144–149. (Siehe S. 27).
- [268] D. F. Rolfe und G. C. Brown. **Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals.** eng. In: *Physiol Rev* 77.3 (Juli 1997), S. 731–758 (siehe S. 79).
- [269] S. Romani, S. Campuzano, E. R. Macagno und J. Modolell. **Expression of achaete and scute genes in Drosophila imaginal discs and their function in sensory organ development.** eng. In: *Genes Dev* 3.7 (Juli 1989), S. 997–1007 (siehe S. 10).
- [270] David Ron und Heather P. Harding. **eIF2 α Phosphorylation in Cellular Stress Responses and Disease.** In: Michael B. Mathews, N. Sonenberg und JWB Hershey. *Translational Control in Biology and Medicine*. Hrsg. von Michael B. Mathews, N. Sonenberg, JWB Hershey: Translational Control in Biology und Medicine. Bd. 48. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2007. Kap. 13, S. 345–368. (Siehe S. 21).
- [271] R. C. Rose und A. M. Bode. **Biology of free radical scavengers: an evaluation of ascorbate.** eng. In: *FASEB J* 7.12 (Sep. 1993), S. 1135–1142 (siehe S. 48).
- [272] J. Ross. **mRNA stability in mammalian cells.** eng. In: *Microbiol Rev* 59.3 (Sep. 1995), S. 423–450 (siehe S. 19, 73).
- [273] Sarah E Ross, Michael E Greenberg und Charles D Stiles. **Basic helix-loop-helix factors in cortical development.** In: *Neuron* 39.1 (Juli 2003), S. 13–25. ISSN: 0896-6273. (Siehe S. 13, 71).
- [274] Tracey A. Rouault und Joe B. Harford. **Translational Control of Ferritin Synthesis.** In: N. Sonenberg, JWB Hershey und Michael B. Mathews. *Translational Control of Ferritin Synthesis*. Hrsg. von N. Sonenberg, JWB Hershey und Michael B. Mathews. Bd. 39. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2000. Kap. 21, S. 655–670. (Siehe S. 24).
- [275] A. G. Rowlands, R. Panniers und E. C. Henshaw. **The catalytic mechanism of guanine nucleotide exchange factor action and competitive inhibition by phosphorylated eukaryotic initiation factor 2.** eng. In: *J Biol Chem* 263.12 (Apr. 1988), S. 5526–5533 (siehe S. 21).
- [276] S. C. Rumsey, O. Kwon, G. W. Xu, C. F. Burant, I. Simpson und M. Levine. **Glucose transporter isoforms GLUT1 and GLUT3 transport dehydroascorbic acid.** eng. In: *J Biol Chem* 272.30 (Juli 1997), S. 18982–18989 (siehe S. 48).

- [277] J. E. Russell, J. Morales und S. A. Liebhaber. **The role of mRNA stability in the control of globin gene expression.** eng. In: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 57 (1997), S. 249–287 (siehe S. 19).
- [278] A. K. Ryan und M. G. Rosenfeld. **POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes.** eng. In: *Genes Dev* 11.10 (Mai 1997), S. 1207–1225 (siehe S. 16).
- [279] A. Sachs. **The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA.** eng. In: *Curr Opin Cell Biol* 2.6 (Dez. 1990), S. 1092–1098 (siehe S. 19).
- [280] Amar Sahay und Rene Hen. **Adult hippocampal neurogenesis in depression.** eng. In: *Nat Neurosci* 10.9 (Sep. 2007), S. 1110–1115. (Siehe S. 14).
- [281] S. C. Schiavi, J. G. Belasco und M. E. Greenberg. **Regulation of proto-oncogene mRNA stability.** eng. In: *Biochim Biophys Acta* 1114.2-3 (Dez. 1992), S. 95–106 (siehe S. 19).
- [282] Christopher J Schofield und Peter J Ratcliffe. **Oxygen sensing by HIF hydroxylases.** eng. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 5.5 (Mai 2004), S. 343–354. (Siehe S. 49, 63).
- [283] Scott Schwartz, W. James Kent, Arian Smit, Zheng Zhang, Robert Baertsch, Ross C Hardison, David Haussler und Webb Miller. **Human-mouse alignments with BLASTZ.** eng. In: *Genome Res* 13.1 (Jan. 2003), S. 103–107. (Siehe S. 46).
- [284] H. Seimiya, M. Tanji, T. Oh-hara, A. Tomida, I. Naasani und T. Tsuruo. **Hypoxia up-regulates telomerase activity via mitogen-activated protein kinase signaling in human solid tumor cells.** eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 260.2 (Juli 1999), S. 365–370. (Siehe S. 82).
- [285] G. L. Semenza und G. L. Wang. **A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation.** eng. In: *Mol Cell Biol* 12.12 (Dez. 1992), S. 5447–5454 (siehe S. 49).
- [286] George L Sen und Helen M Blau. **Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies.** eng. In: *Nat Cell Biol* 7.6 (Juni 2005), S. 633–636. (Siehe S. 22).
- [287] A. J. Shatkin und J. L. Manley. **The ends of the affair: capping and polyadenylation.** eng. In: *Nat Struct Biol* 7.10 (Okt. 2000), S. 838–842. (Siehe S. 19).

- [288] Qin Shen, Yue Wang, Erzsebet Kokovay, Gang Lin, Shu-Mien Chuang, Susan K Goderie, Badrinath Roysam und Sally Temple. **Adult SVZ stem cells lie in a vascular niche: a quantitative analysis of niche cell-cell interactions.** eng. In: *Cell Stem Cell* 3.3 (Sep. 2008), S. 289–300. (Siehe S. 77).
- [289] Byung-Sik Shin, David Maag, Antonina Roll-Mecak, M. Shamsul Arefin, Stephen K Burley, Jon R Lorsch und Thomas E Dever. **Uncoupling of initiation factor eIF5B/IF2 GTPase and translational activities by mutations that lower ribosome affinity.** eng. In: *Cell* 111.7 (Dez. 2002), S. 1015–1025 (siehe S. 21).
- [290] S. Shuman. **Structure, mechanism, and evolution of the mRNA capping apparatus.** eng. In: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 66 (2001), S. 1–40 (siehe S. 18).
- [291] Adam Siepel, Gill Bejerano, Jakob S Pedersen, Angie S Hinrichs, Minmei Hou, Kate Rosenbloom, Hiram Clawson, John Spieth, Ladeana W Hillier, Stephen Richards, George M Weinstock, Richard K Wilson, Richard A Gibbs, W. James Kent, Webb Miller und David Haussler. **Evolutionarily conserved elements in vertebrate, insect, worm, and yeast genomes.** eng. In: *Genome Res* 15.8 (Aug. 2005), S. 1034–1050. (Siehe S. 46).
- [292] Ravinder Singh und Juan Valcárcel. **Building specificity with nonspecific RNA-binding proteins.** eng. In: *Nat Struct Mol Biol* 12.8 (Aug. 2005), S. 645–653. (Siehe S. 18).
- [293] H. Söderholm, E. Ortoft, I. Johansson, J. Ljungberg, C. Larsson, H. Axelsson und S. Pålman. **Human achaete-scute homologue 1 (HASH-1) is downregulated in differentiating neuroblastoma cells.** eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 256.3 (März 1999), S. 557–563. (Siehe S. 15, 72).
- [294] L. Sommer, N. Shah, M. Rao und D. J. Anderson. **The cellular function of MASH1 in autonomic neurogenesis.** eng. In: *Neuron* 15.6 (Dez. 1995), S. 1245–1258 (siehe S. 13).
- [295] K. A. Spriggs, M. Bushell, S. A. Mitchell und A. E. Willis. **Internal ribosome entry segment-mediated translation during apoptosis: the role of IRES-trans-acting factors.** eng. In: *Cell Death Differ* 12.6 (Juni 2005), S. 585–591. (Siehe S. 24).
- [296] Larry Squire, Darwin Berg, Floyd E. Bloom, Sascha du Lac, Anirvan Ghosh und Nicholas C. Spitzer. **Fundamental Neuroscience, 3rd Edition.** Academic Press Inc, 2008 (siehe S. 12).

- [297] Virote Sriuranpong, Michael W Borges, Christopher L Strock, Eric K Nakakura, D. Neil Watkins, Christine M Blaumueller, Barry D Nelkin und Douglas W Ball. **Notch signaling induces rapid degradation of achaete-scute homolog 1.** eng. In: *Mol Cell Biol* 22.9 (Mai 2002), S. 3129–3139 (siehe S. 73, 82).
- [298] Lukas Stalder und Oliver Mühlemann. **The meaning of nonsense.** eng. In: *Trends Cell Biol.* 18.7 (Juli 2008), S. 315–321. (Siehe S. 20).
- [299] M Stanke, D Junghans, M Geissen, C Goridis, U Ernsberger und H Rohrer. **The Phox2 homeodomain proteins are sufficient to promote the development of sympathetic neurons.** In: *Development* 126.18 (Sep. 1999), S. 4087–94. ISSN: 0950-1991. (Siehe S. 13).
- [300] J. M. Staton, A. M. Thomson und P. J. Leedman. **Hormonal regulation of mRNA stability and RNA-protein interactions in the pituitary.** eng. In: *J Mol Endocrinol* 25.1 (Aug. 2000), S. 17–34 (siehe S. 19).
- [301] Mark Stoneley und Anne E Willis. **Cellular internal ribosome entry segments: structures, trans-acting factors and regulation of gene expression.** eng. In: *Oncogene* 23.18 (Apr. 2004), S. 3200–3207. (Siehe S. 24).
- [302] A. Storch, G. Paul, M. Csete, B. O. Boehm, P. M. Carvey, A. Kupsch und J. Schwarz. **Long-term proliferation and dopaminergic differentiation of human mesencephalic neural precursor cells.** eng. In: *Exp Neurol* 170.2 (Aug. 2001), S. 317–325. (Siehe S. 80).
- [303] Alexander Storch, Henry A Lester, Bernhard O Boehm und Johannes Schwarz. **Functional characterization of dopaminergic neurons derived from rodent mesencephalic progenitor cells.** eng. In: *J Chem Neuroanat* 26.2 (Okt. 2003), S. 133–142 (siehe S. 80).
- [304] Kenneth B Storey und Janet M Storey. **Metabolic rate depression in animals: transcriptional and translational controls.** eng. In: *Biol Rev Camb Philos Soc* 79.1 (Feb. 2004), S. 207–233 (siehe S. 79).
- [305] L. Studer, M. Csete, S. H. Lee, N. Kabbani, J. Walikonis, B. Wold und R. McKay. **Enhanced proliferation, survival, and dopaminergic differentiation of CNS precursors in lowered oxygen.** eng. In: *J Neurosci* 20.19 (Okt. 2000), S. 7377–7383 (siehe S. 80, 81).
- [306] Hoonkyo Suh, Wei Deng und Fred H Gage. **Signaling in adult neurogenesis.** eng. In: *Annu Rev Cell Dev Biol* 25 (2009), S. 253–275. (Siehe S. 14, 77).
- [307] Emilia Szostak und Fátima Gebauer. **Translational control by 3'-UTR-binding proteins.** eng. In: *Brief Funct Genomics* 12.1 (Jan. 2013), S. 58–65. (Siehe S. 25).

- [308] Kazutoshi Takahashi, Koji Tanabe, Mari Ohnuki, Megumi Narita, Tomoko Ichisaka, Kiichiro Tomoda und Shinya Yamanaka. **Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors.** eng. In: *Cell* 131.5 (Nov. 2007), S. 861–872. (Siehe S. 81).
- [309] Masashi Takahashi. **Oxidative stress and redox regulation on in vitro development of mammalian embryos.** eng. In: *J Reprod Dev* 58.1 (2012), S. 1–9 (siehe S. 77).
- [310] T. Tamaoki, H. Nomoto, I. Takahashi, Y. Kato, M. Morimoto und F. Tomita. **Staurosporine, a potent inhibitor of phospholipid/Ca⁺⁺dependent protein kinase.** eng. In: *Biochem Biophys Res Commun* 135.2 (März 1986), S. 397–402 (siehe S. 74).
- [311] S. Z. Tarun und A. B. Sachs. **Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G.** eng. In: *EMBO J* 15.24 (Dez. 1996), S. 7168–7177 (siehe S. 26).
- [312] Masoud Tavazoie, Lieven Van der Veken, Violeta Silva-Vargas, Marjorie Louissaint, Lucrezia Colonna, Bushra Zaidi, Jose Manuel Garcia-Verdugo und Fiona Doetsch. **A specialized vascular niche for adult neural stem cells.** eng. In: *Cell Stem Cell* 3.3 (Sep. 2008), S. 279–288. (Siehe S. 78).
- [313] Cormac T Taylor. **Mitochondria and cellular oxygen sensing in the HIF pathway.** eng. In: *Biochem J* 409.1 (Jan. 2008), S. 19–26. (Siehe S. 77).
- [314] Pär Thored, James Wood, Andreas Arvidsson, Jörg Cammenga, Zaal Kokaia und Olle Lindvall. **Long-term neuroblast migration along blood vessels in an area with transient angiogenesis and increased vascularization after stroke.** eng. In: *Stroke* 38.11 (Nov. 2007), S. 3032–3039. (Siehe S. 81).
- [315] Bin Tian, Jun Hu, Haibo Zhang und Carol S Lutz. **A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes.** eng. In: *Nucleic Acids Res* 33.1 (2005), S. 201–212. (Siehe S. 18).
- [316] D. Toullec, P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier und F. Loriolle. **The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C.** eng. In: *J Biol Chem* 266.24 (Aug. 1991), S. 15771–15781 (siehe S. 74).
- [317] H. Tsukaguchi, T. Tokui, B. Mackenzie, U. V. Berger, X. Z. Chen, Y. Wang, R. F. Brubaker und M. A. Hediger. **A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters.** eng. In: *Nature* 399.6731 (Mai 1999), S. 70–75. (Siehe S. 48).

- [318] R. Tuttle, Y. Nakagawa, J. E. Johnson und D. D. O’Leary. **Defects in thalamocortical axon pathfinding correlate with altered cell domains in Mash-1-deficient mice.** eng. In: *Development* 126.9 (Mai 1999), S. 1903–1916 (siehe S. 13).
- [319] G. Varani. **Delivering messages from the 3’ end.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 98.8 (Apr. 2001), S. 4288–4289. (Siehe S. 26).
- [320] A. J. Verkerk, M. Pieretti, J. S. Sutcliffe, Y. H. Fu, D. P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M. F. Victoria und F. P. Zhang. **Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome.** eng. In: *Cell* 65.5 (Mai 1991), S. 905–914 (siehe S. 16).
- [321] Thomas Vierbuchen, Austin Ostermeier, Zhiping P Pang, Yuko Kokubu, Thomas C Südhof und Marius Wernig. **Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors.** eng. In: *Nature* 463.7284 (Feb. 2010), S. 1035–1041. (Siehe S. 10).
- [322] Ana Villalba, Olga Coll und Fátima Gebauer. **Cytoplasmic polyadenylation and translational control.** eng. In: *Curr Opin Genet Dev* 21.4 (Aug. 2011), S. 452–457. (Siehe S. 23).
- [323] Tou Yia Vue, Joshua Aaker, Aya Taniguchi, Christina Kazemzadeh, Jennifer M Skidmore, Donna M Martin, James F Martin, Mathias Treier und Yasushi Nakagawa. **Characterization of progenitor domains in the developing mouse thalamus.** eng. In: *J Comp Neurol* 505.1 (Nov. 2007), S. 73–91. (Siehe S. 13).
- [324] Nicole Wagner, Kay-Dietrich Wagner, Annette Hammes, Karin M Kirschner, Valerie P Vidal, Andreas Schedl und Holger Scholz. **A splice variant of the Wilms’ tumour suppressor Wt1 is required for normal development of the olfactory system.** eng. In: *Development* 132.6 (März 2005), S. 1327–1336. (Siehe S. 31).
- [325] G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue und G. L. Semenza. **Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 92.12 (Juni 1995), S. 5510–5514 (siehe S. 49).
- [326] J. R. Warner, A. Rich und C. E. Hall. **Electron Microscope Studies of Ribosomal Clusters Synthesizing Hemoglobin.** eng. In: *Science* 138.3548 (Dez. 1962), S. 1399–1403. (Siehe S. 26).

- [327] John S Waye, Barry Eng, Fabrizio Dutly und Hannes Frischknecht. **alpha-Thalassemia caused by two novel splice mutations of the alpha2-globin gene: IVS-I-1 (G>A and G>T).** eng. In: *Hemoglobin* 33.6 (2009), S. 519–522. (Siehe S. 18).
- [328] I. B. Weinstein, L. S. Lee, P. B. Fisher, A. Mufson und H. Yamasaki. **Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes.** eng. In: *J Supramol Struct* 12.2 (1979), S. 195–208. (Siehe S. 48).
- [329] S. E. Wells, P. E. Hillner, R. D. Vale und A. B. Sachs. **Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors.** eng. In: *Mol Cell* 2.1 (Juli 1998), S. 135–140 (siehe S. 26).
- [330] Hendrik Wildner, Thomas Müller, Seo-Hee Cho, Dominique Bröhl, Constance L Cepko, François Guillemot und Carmen Birchmeier. **dILA neurons in the dorsal spinal cord are the product of terminal and non-terminal asymmetric progenitor cell divisions, and require Mash1 for their development.** eng. In: *Development* 133.11 (Juni 2006), S. 2105–2113. (Siehe S. 13).
- [331] Gavin S Wilkie, Kirsten S Dickson und Nicola K Gray. **Regulation of mRNA translation by 5'- and 3'-UTR-binding factors.** eng. In: *Trends Biochem Sci* 28.4 (Apr. 2003), S. 182–188 (siehe S. 25).
- [332] Rob Willemsen, Marianne Hoogeveen-Westerveld, Surya Reis, Joan Holstege, Lies-Anne W F M Severijnen, Ingeborg M Nieuwenhuizen, Mariette Schrier, Leontine van Unen, Flora Tassone, Andre T Hoogeveen, Paul J Hagerman, Edwin J Mientjes und Ben A Oostra. **The FMR1 CGG repeat mouse displays ubiquitin-positive intranuclear neuronal inclusions; implications for the cerebellar tremor/ataxia syndrome.** eng. In: *Hum Mol Genet* 12.9 (Mai 2003), S. 949–959 (siehe S. 16).
- [333] G. M. Wilson und G. Brewer. **The search for trans-acting factors controlling messenger RNA decay.** eng. In: *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62 (1999), S. 257–291 (siehe S. 25).
- [334] Ross C Wilson und Jennifer A Doudna. **Molecular mechanisms of RNA interference.** eng. In: *Annu Rev Biophys* 42 (2013), S. 217–239. (Siehe S. 22).
- [335] C. J. Wilusz, W. Wang und S. W. Peltz. **Curbing the nonsense: the activation and regulation of mRNA surveillance.** eng. In: *Genes Dev* 15.21 (Nov. 2001), S. 2781–2785. (Siehe S. 20).

- [336] Jeremy E Wilusz und David L Spector. **An unexpected ending: noncanonical 3' end processing mechanisms.** eng. In: *RNA* 16.2 (Feb. 2010), S. 259–266. (Siehe S. 18).
- [337] Bradly G Wouters, Twan van den Beucken, Michael G Magagnin, Marianne Koritzinsky, Diane Fels und Constantinos Koumenis. **Control of the hypoxic response through regulation of mRNA translation.** eng. In: *Semin Cell Dev Biol* 16.4-5 (2005), S. 487–501. (Siehe S. 79).
- [338] N. Xu, C. Y. Chen und A. B. Shyu. **Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay.** eng. In: *Mol Cell Biol* 17.8 (Aug. 1997), S. 4611–4621 (siehe S. 26).
- [339] Yili Yin, C. W. Stephen, M. Gloria Luciani und Robin Fähræus. **p53 Stability and activity is regulated by Mdm2-mediated induction of alternative p53 translation products.** eng. In: *Nat Cell Biol* 4.6 (Juni 2002), S. 462–467. (Siehe S. 25).
- [340] Yoshinori Yoshida, Kazutoshi Takahashi, Keisuke Okita, Tomoko Ichisaka und Shinya Yamanaka. **Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells.** eng. In: *Cell Stem Cell* 5.3 (Sep. 2009), S. 237–241. (Siehe S. 81).
- [341] Junying Yu, Maxim A Vodyanik, Kim Smuga-Otto, Jessica Antosiewicz-Bourget, Jennifer L Frane, Shulan Tian, Jeff Nie, Gudrun A Jonsdottir, Victor Ruotti, Ron Stewart, Igor I Slukvin und James A Thomson. **Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells.** eng. In: *Science* 318.5858 (Dez. 2007), S. 1917–1920. (Siehe S. 81).
- [342] Yong Yuan, George Hilliard, Tsuneo Ferguson und David E Millhorn. **Cobalt inhibits the interaction between hypoxia-inducible factor-alpha and von Hippel-Lindau protein by direct binding to hypoxia-inducible factor-alpha.** eng. In: *J Biol Chem* 278.18 (Mai 2003), S. 15911–15916. (Siehe S. 49).
- [343] Z. Yue, E. Maldonado, R. Pillutla, H. Cho, D. Reinberg und A. J. Shatkin. **Mammalian capping enzyme complements mutant *Saccharomyces cerevisiae* lacking mRNA guanylyltransferase and selectively binds the elongating form of RNA polymerase II.** eng. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 94.24 (Nov. 1997), S. 12898–12903 (siehe S. 18).
- [344] Kuan Zhang, Lingling Zhu und Ming Fan. **Oxygen, a Key Factor Regulating Cell Behavior during Neurogenesis and Cerebral Diseases.** eng. In: *Front Mol Neurosci* 4 (2011), S. 5. (Siehe S. 77, 78, 81).

- [345] Chunmei Zhao, Wei Deng und Fred H Gage. **Mechanisms and functional implications of adult neurogenesis.** eng. In: *Cell* 132.4 (Feb. 2008), S. 645–660. (Siehe S. 14).
- [346] L. Z. Zhou, A. P. Johnson und T. A. Rando. **NF kappa B and AP-1 mediate transcriptional responses to oxidative stress in skeletal muscle cells.** eng. In: *Free Radic Biol Med* 31.11 (Dez. 2001), S. 1405–1416 (siehe S. 48).

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei Prof. **Ulf Stahl** für die Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit, die Begutachtung selbiger sowie für die Leitung des Promotionsverfahrens bedanken. Außerdem gilt mein Dank Prof. **Michael Fähling** für die Begutachtung und exzellente Betreuung meiner Arbeit.

Bei Prof. **Holger Scholz** bedanke ich mich für die hilfreichen Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge. Zudem danke ich Prof. **Jochen Meier** für die Durchführung der Versuche mit den primären Rattenzellen, sowie die Möglichkeit an der Mitarbeit an einem Projekt seiner Arbeitsgruppe.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Mitarbeitern des Instituts für Vegetative Physiologie für die gute Arbeitsatmosphäre, die Hilfestellungen und die zahlreichen Zuarbeiten bedanken. Dabei gilt mein besonderer Dank Frau **Regine Stöbe** und **Jeannette Werner**. Frau Dr. **Angela Skalweit** möchte ich zudem für die vorzügliche Einarbeitung in die Lehre diverser vom Institut ausgerichteter Praktika danken. Meinen lieben Eltern danke ich für die bemerkenswerte Unterstützung während der Entstehung dieser Arbeit sowie die großartige Hilfe meines Vaters beim Editieren dieser Arbeit.