

**Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie I  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h. c. Helmut Sies**

# **Regulation der Expression von Connexin43 durch HuR**

**Dissertation**

**zur Erlangung des Grades eines Doktors der  
Medizin**

**Der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität  
Düsseldorf**

**vorgelegt von**

**Christiane Hedwig Sobieroy**

**2008**

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

gez.: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf  
Dekan

Referent: Prof. Dr. Lars-Oliver Klotz

Korreferent: Prof. Dr. Axel Gödecke

"Sapere aude!"  
Habe Mut, dich deines eigenen Verstandes zu bedienen!  
(Immanuel Kant)

<u>Regulation der Expression von Connexin43 durch HuR.....</u>	<u>1</u>
<u>1. Einleitung.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1 Connexin43 und Zell-Zell Kommunikation.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1.1 Aufbau und Funktion von Gap Junctions.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1.2 Zur Bedeutung intakter Zell-Zell-Kanäle.....</u>	<u>2</u>
<u>1.1.3 Regulation der Zell-Zell-Kommunikation.....</u>	<u>2</u>
<u>1.2 mRNA-Stabilität .....</u>	<u>4</u>
<u>1.2.1 Bedeutung der Stabilisierung der mRNA für eukaryote Zellen.....</u>	<u>4</u>
<u>1.2.2 HuR .....</u>	<u>5</u>
<u>1.3 Ziele der Arbeit.....</u>	<u>8</u>
<u>2. Material und Methoden.....</u>	<u>9</u>
<u>2.1 Verwendete Lösungen.....</u>	<u>9</u>
<u>2.2 Zellkultur.....</u>	<u>10</u>
<u>2.3 Isolierung von RNA.....</u>	<u>10</u>
<u>2.4 RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese.....</u>	<u>11</u>
<u>2.4.1 Reverse Transkription (RT) und PCR.....</u>	<u>11</u>
<u>2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese.....</u>	<u>12</u>
<u>2.5 Bestimmung der Stabilität von mRNA.....</u>	<u>13</u>
<u>2.6 Nachweis der Bindung von Proteinen an mRNA .....</u>	<u>13</u>
<u>2.6.1 Protein-RNA-Kopräzipitation („mRNP-IP“.....</u>	<u>14</u>
<u>2.6.2 RNA-Protein-Kopräzipitation („Pull down“.....</u>	<u>16</u>
<u>2.7 Depletion von HuR mit Hilfe der RNA-Interferenz (siRNA).....</u>	<u>17</u>
<u>2.8 Herstellung von Proteinlysaten.....</u>	<u>18</u>
<u>2.8.1 Gesamt-Proteine.....</u>	<u>19</u>
<u>2.8.2 Trennung cytoplasmatischer und nukleärer Proteine.....</u>	<u>19</u>
<u>2.9 Proteinquantifizierung.....</u>	<u>20</u>
<u>2.10 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und „Western-Blot“.....</u>	<u>20</u>
<u>2.10.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese.....</u>	<u>20</u>
<u>2.10.2 Immunanfärbung nach Western-Blot.....</u>	<u>21</u>
<u>2.11 Klonierung.....</u>	<u>21</u>
<u>3. Ergebnisse.....</u>	<u>23</u>
<u>3.1 Isolation und Klonierung möglicher regulatorischer Sequenzen der 3'-untranslatierten</u> <u>Region der Connexin43-mRNA.....</u>	<u>23</u>
<u>3.2 Nachweis der Bindung von HuR an die Connexin43 mRNA.....</u>	<u>27</u>

3.2.1 Protein-RNA-Kopräzipitation („mRNP-IP“)	27
3.3 Regulation der Expression von Cx43 durch HuR	30
3.4 Einfluss von HuR auf die Stabilität der Cx43-mRNA	31
3.4.1 Bestimmung der Lebensdauer von Connexin43 mRNA in Rattenleberepithelzellen	31
3.4.2 Einfluss der Depletion von HuR auf die Lebensdauer von Cx43	32
4. Diskussion	34
4.1 Bindung von Cx43-mRNA durch HuR	34
4.2 HuR und Cx43 in der zellulären Reaktion auf Stress	35
4.3 Cx43 und HuR in der Karzinogenese	37
4.4 Fazit und Ausblick	38
5. Zusammenfassung	40
6. Literatur	41
7. Abkürzungsverzeichnis	50
8. Danksagung	52

# 1. Einleitung

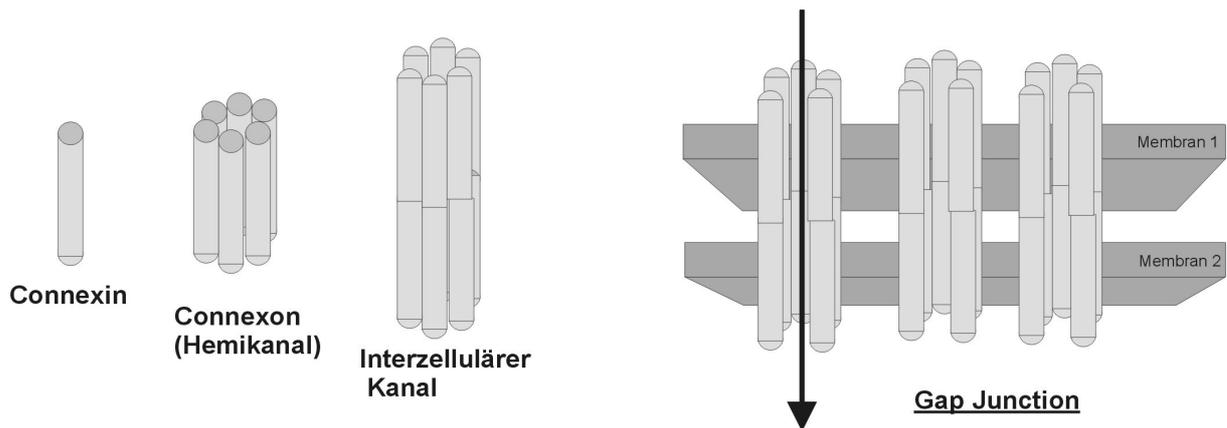
## 1.1 Connexin43 und Zell-Zell Kommunikation

### 1.1.1 Aufbau und Funktion von Gap Junctions

Gap Junctions sind Ansammlungen von Zell-Zell-Kanälen, die den Stoffaustausch zwischen benachbarten Zellen ermöglichen. Dieser Stoffaustausch ist notwendig um die Homöostase der Zelle zu erhalten, Gewebeverbände miteinander zu koppeln und Proliferations- und Differenzierungsprozesse zu steuern (Krutovskikh und Yamasaki, 1997). Über Gap Junctions können wasserlösliche Stoffe einer Masse von bis zu etwa 1 kDa ausgetauscht werden, z.B. Zucker, Aminosäuren, Nukleotide, Ionen oder Signalstoffe (Willecke *et al.*, 2002). Die Gap Junction-Kanäle sind aus je zwei Connexonen aufgebaut, die sich jeweils von benachbarten Zellen aus aneinanderlagern (vgl. Abb. 1.1). Connexone bestehen aus sechs Proteinbausteinen, den Connexinen (Cx), die intrazellulär zu Halbkanälen zusammengebaut und anschließend in die Zellmembran transportiert werden, wo die extrazellulären Schleifen der Connexinmoleküle mit denen der Nachbarzell-Halbkanäle interagieren (Goodenough *et al.*, 1996).

Bislang sind 20 verschiedene Mitglieder der Connexin-Familie bekannt, die jeweils nach ihrem Molekulargewicht bezeichnet werden. In Säugetieren sind Connexine in nahezu allen Geweben nachweisbar, ihre Verteilung ist gewebespezifisch. Connexin43 (Cx43; 43 kDa) ist das am häufigsten vorkommende Connexin und findet sich in der Epidermis, im ZNS, im Myokard, in der Niere, dem Intestinaltrakt, der Gallenblase und in Endothelzellen (Bennett *et al.*, 1991; Willecke *et al.*, 1991; Ruch und Trosko, 1999; Di *et al.*, 2001; Kiehn und Tresch, 2002; Willecke *et al.*, 2002). Alle Connexine zeigen eine ähnliche Membrantopologie mit intrazellulären Amino- und Carboxytermini und vier Transmembrandomänen. Während die vier Transmembrandomänen und die extrazellulären Schleifen hochkonserviert sind, variieren die intrazelluläre Schleife und der Carboxyterminus stark zwischen verschiedenen Connexinen (Simon und Goodenough, 1998).

Mutationen in für Connexine codierenden Genen stehen in direktem Zusammenhang mit Krankheiten wie einer Unterform der Charcot-Marie-Tooth Krankheit („CMTX“, (Bergoffen *et al.*, 1993) oder der erblichen Taubheit (Kelsell *et al.*, 1997).



**Abb.1.1** Schematische Darstellung des Aufbaus von Connexin, Connexon und Gap Junction. Modifiziert nach (Goodenough und Paul, 2003).

### 1.1.2 Zur Bedeutung intakter Zell-Zell-Kanäle

Der durch die Connexinproteinkanäle stattfindende interzelluläre Austausch niedermolekularer Stoffe wird für das Phänomen des „Bystander-Effektes“ (Bi *et al.*, 1993) verantwortlich gemacht. Dieser besteht darin, dass über Gap Junctions miteinander gekoppelte Zellverbände an einer Belastung mit Xenobiotika zugrunde gehen können, obwohl nicht jede einzelne dieser Zellen initial dem Xenobiotikum ausgesetzt war. Dieser Mechanismus wird in der Chemotherapie ausgenutzt, um ein effektives Absterben von (Krebs-) Zellverbänden zu erwirken. Intakte Zellverbände steigern die Effizienz von Suizid-Gentherapieverfahren sowie von klassischer Chemotherapie. So wirkte beispielsweise Doxorubicin stärker zytotoxisch auf Glio- oder Neuroblastomzellen, wenn diese Cx43 überexprimierten oder die Cx43-Expression anderweitig stimuliert worden war (Carystinos *et al.*, 2001; Huang *et al.*, 2001).

### 1.1.3 Regulation der Zell-Zell-Kommunikation

Die Regulation der Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) kann auf verschiedenen Ebenen erfolgen. Sie wird unter anderem durch eine Variation der Gesamtzahl der Kanäle, die Öffnungs- und Schließdynamik der Poren sowie durch das Gleichgewicht aus Cx-synthese und -abbau bestimmt. Modulation der Genexpression, alternatives Spleißen und posttranslationale Modifizierung der Cx-Untereinheiten können Anzahl und Aktivität der Gap Junctions in der Zellmembran beeinflussen. Connexine besitzen im Gegensatz zu anderen integralen Membranproteinen eine kurze Halbwertszeit von 2-5 h (Yancey *et al.*, 1981; Laird *et al.*, 1995).

Zahlreiche regulatorische Elemente wurden in der Promotorregion des Cx43-Gens identifiziert. Im Falle des Cx43-Gens der Maus wurde gezeigt, dass drei verschiedene

Promotoren (P1, P2 und P3) die Synthese mindestens neun unterschiedlicher Cx-mRNAs in Abhängigkeit von Zelltyp und Zellzyklusstatus regulieren (Pfeifer *et al.*, 2004). Bestimmte Hormone wie Glukokortikoide und Östrogene sowie zahlreiche andere Substanzen (z.B. Carotinoide u.a.) können direkt (z.B. über Östrogen-responsive Elemente der DNA) oder indirekt (über eine gesteigerte Expression der AP1-Bausteine c-Fos und c-Jun) die Transkription von Cx43 beeinflussen (Lefebvre *et al.*, 1995). Auf diesem Weg kommt es zu einer Erhöhung der Anzahl der Proteinkanäle in der Zellmembran (Kwiatkowski *et al.*, 1994; Yu *et al.*, 1994). Für das Cx43-Gen der Maus wurde zudem extensives alternatives Spleißen beschrieben (Pfeifer *et al.*, 2004). Die transkriptionelle Regulation des Cx43-Gens spielt folglich eine wichtige Rolle bei der Regulation der Cx43-Menge. Auch posttranskriptionelle, die Cx-mRNA stabilisierende Effekte sind von Bedeutung, für Cx43 allerdings noch nicht ausreichend untersucht (Bex *et al.*, 1995).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Cx43 posttranslational modifiziert wird. Zahlreiche Phosphorylierungsstellen wurden identifiziert. Es gibt Anzeichen dafür, dass diese posttranslationale Phosphorylierung für die Aggregation der Connexine zu einem Proteinkanal, die Kanalpermeabilität und die Stabilität von Cx43 von Bedeutung ist (Musil und Goodenough, 1991). Mehrere Serin- und Threoninreste des Cx43 werden von Proteinkinase A (PKA), Proteinkinase C (PKC) oder den klassischen mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK), den extrazellulär regulierten Kinasen (ERK) 1 und 2, phosphoryliert. Auch Src-abhängige Tyrosinphosphorylierung wurde beschrieben (Lampe und Lau, 2000). Diese Phosphorylierungen modulieren die Permeabilität der Gap Junctions, den intrazellulären Transport im Rahmen der Proteinreifung sowie den Abbau der Proteine und den Einbau in die Plasmamembran (Kumar und Gilula, 1996; George *et al.*, 1999; Fischer *et al.*, 2005).

Für den Abbau der Connexine existieren zwei Hauptmechanismen. Zum einen werden die Proteinkanäle durch Einstülpung der Zellmembran in das Zytoplasma internalisiert und in den Lysosomen abgebaut, zum anderen mittels Ubiquitin markiert und proteasomal abgebaut (Larsen und Hai, 1978; Laing und Beyer, 1995; Laird, 1996; Laing *et al.*, 1997). Die Behandlung von Zellen mit Tumorpromotoren (Phorbol ester, Lindan, DDT), Wachstumsfaktoren (EGF, PDGF) oder Vitamin K<sub>3</sub> (Menadion), sowie die Überexpression von Onkogenen (ras, raf, src) führt unter Beteiligung von Cx43-Phosphorylierung zu einer Inhibition der Zell-Zell-Kommunikation (Hu *et al.*, 1995; Trosko und Ruch, 1998; Klotz *et al.*, 2002). Einige Substanzen wie Flavonoide, Vitamin D, Melatonin, Schilddrüsenhormone und Thalidomid sind in der Lage, die ZZK zu stimulieren

(Chaumontet *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1994; Ubeda *et al.*, 1995; Nicolai *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 1998). Ein möglicher Mechanismus ist hier die gesteigerte Produktion von Cx43-mRNA und -Protein (Clairmont *et al.*, 1996).

Weitere Mechanismen der Modulation der ZZK wurden beschrieben, so etwa die Expression eines Cx43-Pseudogens in Tumorzellen;  $\psi$ Cx43 wies zwar – ähnlich dem Cx43 – wachstumshemmende Wirkung auf, unterdrückte jedoch die Bildung funktioneller Gap Junctions in den entsprechenden Zellen (Kandouz *et al.*, 2004). Als ein weiterer Mechanismus der Unterdrückung der Expression von Cx-Genen in Tumorzellen wurde die Hypomethylierung des Promotors beschrieben (Piechocki *et al.*, 1999). In den meisten Tumorzelllinien lassen sich keine funktionstüchtigen Gap Junctions finden (Vine und Bertram, 2002). Die Rolle von Connexinen in der Tumorgenese ist allerdings weiterhin unklar. Einerseits gibt es Hinweise darauf, dass Connexine in Tumorzellen nicht exprimiert werden (Loewenstein und Kanno, 1966) und es durch das Fehlen von Zell-Zell-Kontakten zum unkontrollierten Wachstum dieser Zellen kommt. Andererseits scheint das Vorhandensein funktionsfähiger Connexine eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Metastasen zu spielen (Kanczuga-Koda *et al.*, 2006), wobei die genauen Mechanismen unbekannt sind.

Schließlich gibt es Hinweise auf eine Regulation der Cx43-Synthese auf Ebene der Stabilität der Cx43-mRNA (Rogers *et al.*, 1990; Clairmont *et al.*, 1996).

### **1.2 mRNA-Stabilität**

#### **1.2.1 Bedeutung der Stabilisierung der mRNA für eukaryote Zellen**

Die Regulation der Genexpression ist von entscheidender Bedeutung für das Wachstum und die Entwicklung eukaryoter Zellen. Diese findet typischerweise auf der Ebene der Transkription oder auf Ebene der Translation statt. Die Regulation kann auch posttranskriptionell, beispielsweise über Modulation der mRNA-Stabilität erfolgen (Brennan und Steitz, 2001). In den letzten 20 Jahren sind verschiedene Signalkaskaden und Proteine beschrieben worden, die einerseits in den mRNA-Abbau, andererseits in die Stabilisierung der mRNA involviert sind.

Der Abbau der mRNA ist sowohl von Elementen in der 5'-untranslatierten Region (5'UTR) als auch der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) abhängig. Die 5'Kappe der mRNA sorgt für eine Stabilisierung, indem sie einen Abbau durch Exonukleasen verhindert. Die 3'UTR beeinflusst die Halbwertszeit über den Abbau der mRNA vom 3'-Ende her; für eine erfolgreiche Translation muss ein ausreichend langer Poly-(A)-Schwanz

vorhanden sein: Im Falle der  $\beta^+$ -Thalassämien gibt es beispielsweise eine Unterform, die mit Mutationen in der 3'UTR von  $\beta$ -Globin einhergeht. Das führt in diesem Fall zu einer herabgesetzten  $\beta$ -Globin-mRNA-Stabilität und somit zu einer verminderten  $\beta$ -Globin-Produktion (Russell und Liebhaber, 1996).

Die bislang am besten studierten destabilisierenden Elemente der mRNA sind Adenosin- und Uridin-reiche Elemente der mRNA („AU-reiche Elemente“, ARE) in der 3'UTR verschiedenster mRNA. Schon früh wurden ARE von Verma und Kollegen beschrieben (Miller *et al.*, 1984), die *v-fos* und *c-fos* verglichen und auf Unterschiede in den 3'UTR der Transkripte gestoßen sind. In weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass *c-fos*-mRNA aufgrund eines AU-reichen Abschnittes in der 3'UTR weniger stabil ist. Seither ist die Liste der ARE-beinhaltenen 3'UTRs stetig angewachsen und hat zu einer Klassifikation dieser ARE geführt. Chen und Shyu (1995) teilen die ARE anhand ihrer Sequenzen und ihres Aufbaus in drei Untergruppen ein: Klasse 1-ARE (z.B. *c-fos*) enthalten ein bis drei verteilte Kopien des Pentamers AUUUA, eingebettet in eine U-reiche Region. Klasse 2-ARE (z.B. GM-CSF) bestehen aus mindestens zwei überlappenden Nonameren UUAUUUA(U/A)(U/A), ebenfalls umgeben von Uridin. Klasse 3-ARE (z.B. *c-Jun*) enthalten zwar nicht das „Markenzeichen“ AUUUA, vermitteln den mRNA-Abbau aber vermutlich über U-reiche oder andere, noch unbekannt Sequenzen (Chen und Shyu, 1995). Nach heutiger Erkenntnis stabilisieren sowohl zellulärer Stress als auch neoplastische Transformation verschiedenste ARE-enthaltende mRNAs. In einigen Fällen sind bereits bekannte Signaltransduktionswege an dieser Regulation beteiligt. Zahlreiche Proteine, die selektiv AU- und U-reiche Sequenzen binden, konnten über Gelshiftanalysen und UV-Crosslinking-Tests identifiziert werden, darunter AUF-B, AU-A, AU-B, AU-C, Hel-N1 (= HuB), hnRNP D (= AUF1) (Zhang *et al.*, 1993), hnRNP A1, hnRNP C, AUH, GAPDH, hnRNP A0, HuR (Ma *et al.*, 1996; Myer *et al.*, 1997), TTP (Tristetraprolin), TIAR, BRF1, TIA-1 (T-cell-restricted intracellular antigen 1), HuC und HuD (Lal *et al.*, 2004).

### 1.2.2 HuR

1996 wurde von Ma und Kollegen auf der Suche nach Homologen der bereits als mRNA stabilisierende Proteine bekannten ELAV- (embryonic lethal abnormal vision)- Proteine aus *Drosophila melanogaster* das „ELAV-like“ Protein HuR identifiziert und charakterisiert. Im Unterschied zu weiteren „ELAV-like“ Proteinen wie HuD, HuC und HelN1, die vornehmlich im Gehirn vorkommen, wird HuR in sehr vielen Geweben exprimiert (Ma *et al.*, 1996). Alle vier Hu-Proteine sind Ziel der „Antikörpervermittelten

Paraneoplastischen Enzephalomyelitischen sensorischen Neuropathie“, auch Hu-Syndrom genannt (Dalmau *et al.*, 1991; Szabo *et al.*, 1991).

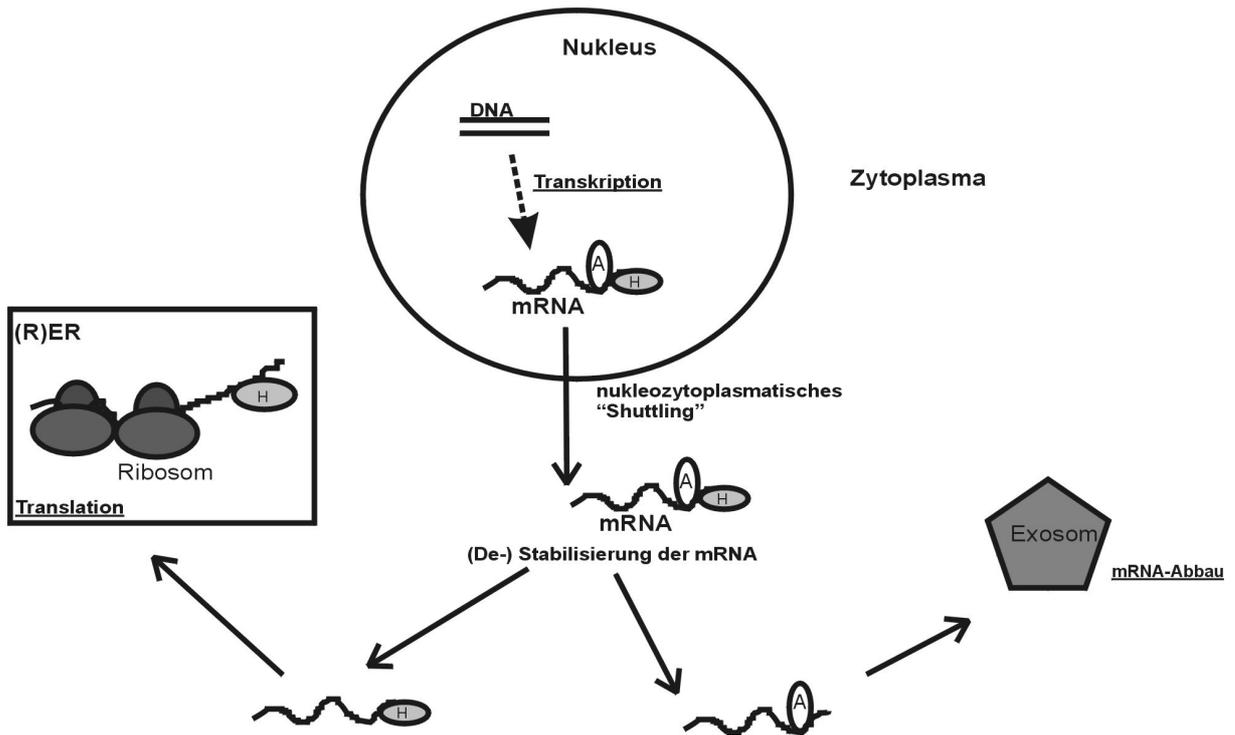
Ebenso wie die anderen Hu-Proteine besitzt HuR drei RNA-erkennende Domänen („RNA recognition motifs“, RRM). Zwischen RRM 2 und 3 befindet sich ein kaum konservierter Verbindungsstrang aus 50-80 Aminosäuren. Studien mit HuC [neuronenspezifisches Hu in Säugetieren (Inoue *et al.*, 2000)] zeigen, dass die ersten beiden RRMs einzeln nur sehr schwach an AUUUA binden, aber in Kombination eine starke Affinität zu längeren ARE haben. Im Fall von HuD wird die Erkennung der ARE durch die ersten beiden dieser RRMs vermittelt; das dritte RRM scheint an den Poly(A)-Schwanz zu binden. Die Deletion des dritten RRM in Transfektionstests hat die Fähigkeit von HuR zur Stabilisierung der mRNA aufgehoben (Fan und Steitz, 1998).

Obwohl HuR überwiegend nukleär lokalisiert ist, pendelt es zwischen Kern und Cytoplasma über eine „Shuttling“-Sequenz, welche in der Verbindungsregion zwischen zweitem und drittem RRM liegt und der M9-Shuttling-Sequenz von hnRNP A1 sehr ähnlich ist. Der Transport von HuR aus dem Kern wird über zwei verschiedene Proteine ermöglicht, Trn2 (Transportin-2) oder CRM1 (chromosome maintenance-1)(Gallouzi *et al.*, 2001).

Die Fähigkeit von HuR zum „Shuttling“ hat zu der Annahme geführt, dass HuR die mRNA schon im Kern bindet und unter dauerhaftem Schutz vor der Abbaumaschinerie ins Zytoplasma begleitet. Weitere Versuche haben gezeigt, dass HuR sowohl im Zytoplasma als auch im Kern die Fähigkeit besitzt, am Poly-(A)-Schwanz zu binden (Gallouzi *et al.*, 2001). Ungefähr 15 % des HuR sind cytoplasmatisch mit Polysomen assoziiert. Zytoplasmatisches HuR gilt mittlerweile als Hauptregulator verschiedenster Zellantworten: Zellteilung, Karzinogenese, Muskelzellendifferenzierung, replikative Seneszenz, Immunzellaktivierung und Stressantwort (Atasoy *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2001; Kullmann *et al.*, 2002; Figueroa *et al.*, 2003). Es beeinflusst die Stabilität zahlreicher mRNAs, so etwa die der mRNAs von Cyclin A1, Cyclin B1 (Wang *et al.*, 2000), c-Fos, VEGF, TNF-alpha (Dean *et al.*, 2001), Casein (Nagaoka *et al.*, 2006),  $\beta$ -Catenin (Lopez de Silanes *et al.*, 2003), c-Myc, Cyclooxygenase-2 (Dixon *et al.*, 2001), Cytochrom *c* (Kawai, Lal; 2006), Myogenin, MyoD, GM-CSF, zahlreiche Interleukine, p21 (Wang *et al.*, 2000), p27, p53, hsp70 (Lal *et al.*, 2004) und Prothymosin- $\alpha$  (Lal *et al.*, 2005). Die mRNAs, an die HuR in vitro gebunden hat, enthalten ARE der Klassen 1 und 2.

Mittlerweile sind Interaktionen zwischen den verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (RBP) bekannt geworden. Erwähnenswert sind hier zwei Gegenspieler zu HuR, AUF1 und

BRF1. BRF1, ein Zinkfingerprotein, steht in Zusammenhang mit rapidem Abbau von Cytokin-mRNA und scheint ein direkter Antagonist des HuR zu sein, der letzteres durch Konkurrenz aus der Bindung an die RNA verdrängt (Raineri *et al.*, 2004). HuR und AUF1 sind im Zellkern miteinander assoziiert und imstande, an nicht-überlappenden Stellen derselben Ziel-RNA zu binden. Kompetitive oder konkurrente Bindung an die RNA scheinen allerdings von vielen verschiedenen Faktoren abzuhängen: Zielsequenz der RNA, Menge des RBP, Stresssituation der Zelle und untersuchtes subzelluläres Kompartiment. HuR und AUF gehen dabei keine Protein-Protein-Interaktion ein, sondern binden zusammen an RNA-assoziierten Komplexen. HuR ist im Zytoplasma meist mit Polysomenfraktionen assoziiert, AUF an der Abbaumaschinerie zu finden (vgl Abb. 1.2.). HuR und AUF zusammen sind also vermutlich Export-Proteine, die im Zytoplasma dissoziieren und dort entsprechend ihrer Funktion unterschiedliche Kompartimente der Zelle (Exosom oder Ribo-/Polysom) ansteuern. Stress, UVC, Proliferations- und Differenzierungs-Signale sorgen für einen Anstieg des zytoplasmatischen HuR-Gehaltes, wohingegen Wachstumsfaktorentzug und Stress auf das Endoplasmatische Retikulum (ER) HuR-Spiegel im Zytoplasma reduzieren. Auch die subzelluläre Verteilung von HuR wird so beeinflusst (Lal *et al.*, 2004). Dies ist insofern von Bedeutung, als bislang postuliert wurde, dass HuR nur in seiner zytoplasmatischen Form einen stabilisierenden Einfluss auf die mRNA nehmen kann, da im Zytoplasma wahrscheinlich eine Konformitätsänderung von HuR stattfindet.



**Abb. 1.2 Regulation der mRNA-Stabilität durch RNA-bindende Proteine (RBP):** RBP unterstützen den Transport von RNA aus dem Kern in das Zytoplasma. Dort beeinflussen sie die Stabilität und Lebensdauer der RNA, indem sie beispielsweise zu einem schnellen Abbau der mRNA durch Exosomen (Nukleasen enthaltende Proteinkomplexe) führen, andererseits eine Verlängerung der Halbwertszeit der mRNA durch die Verhinderung des Abbaus der mRNA bewirken. Das RBP „A“ könnte beispielsweise AUF1 sein, ein Gegenspieler des HuR (Lal *et al*, 2004) mit Verringerung der HWZ bestimmter mRNAs. „H“ steht in diesem Fall für das RBP HuR, dass über die Stabilisierung der RNA eine verlängerte Lebensdauer und somit gesteigerte Translatierbarkeit erreicht.

### 1.3 Ziele der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte am Beispiel von Rattenleberepithelzellen (WB-F344) untersucht werden, ob HuR mit der mRNA des Cx43 interagiert und inwieweit dies Einfluss auf die zelluläre Konzentration der Cx43-mRNA sowie die Menge an Cx43-Protein hat. Schließlich sollte die Bedeutung von HuR für die Zell-Zell-Kommunikation (ZZK) abgeklärt werden. Kenntnis der Regulation der Cx43-Biosynthese kann als Grundlage therapeutischer Ansätze zur Behandlung von Krebsformen, die mit einer Dysregulation der Cx43-Synthese einhergehen, dienen.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, stammen alle Reagenzien von der Firma Merck (Darmstadt) oder Sigma (München). Alle Lösungen wurden mit Reinstwasser hergestellt, welches aus einer Milli-Q-Anlage (Millipore, Eschborn) aufbereitet wurde.

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung verwendeter Lösungen

<b>Bezeichnung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>2x TENT-Puffer</b>	20 mM Tris-HCl (ICN Biomedicals; Aurora, Ohio, USA ) pH 8,0 2 mM EDTA (= Titriplex III) pH 8,0 500 mM NaCl 1 % (v/v) TritonX-100
<b>2,5 x Trenngelpuffer</b>	1,5 M Tris (8 mM EDTA); pH 8,8 0,4 % (w/v) SDS
<b>5 x Laufpuffer</b>	0,25 M Tris 1,92 M Glycin 0,5 % SDS pH 8,3
<b>5 x Sammelgelpuffer</b>	0,3 M Tris 0,5 % SDS pH 6,7 mit HCl einstellen
<b>10 x TBS</b>	20 mM Tris 137 mM NaCl pH 7,4 mit NaOH einstellen
<b>10 x TBST</b>	990 ml 10 x TBS (siehe oben) 10 ml Tween-20 (Roth, Karlsruhe)
<b>10 x Transfer-Puffer</b>	250 mM Tris 2 M Glycin Mit HCl auf pH 8,5 einstellen
<b>CDK2 Puffer</b>	50 mM Tris pH 7,9; 0,25 mM NaCl; 0,5 % Nonidet P-40 ( Fluka); 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> ; 0,5 mM NaF
<b>DNA-Blaumarker, 5 x konzentriert</b>	30 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA pH 8,0; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau
<b>Einfriermedium</b>	80 % (v/v) DMEM 10 % (v/v) FBS, 10 % (v/v) DMSO (Fluka, Buchs, Schweiz)
<b>Lösung A für Proteinfractionierung</b>	10 mM HEPES pH 7,9; 10 mM KCl; 1,5 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>Lösung A für „Pull down“</b>	0,1 M NaOH 0,05 M NaCl
<b>Lösung B für „Pull down“</b>	0,1 M NaCl
<b>Lösung C für Proteinfractionierung</b>	20 mM HEPES pH 7,9; 0,45 M NaCl; 1 mM EDTA
<b>NT<sub>2</sub> Puffer</b>	50 mM Tris pH 7,4 150 mM NaCl

	1 mM MgCl <sub>2</sub>
<b>PBS</b>	2,6 mM KCl 1,4 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 137 mM NaCl 6,4 mM Na <sub>2</sub> HP <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O pH 7,2-7,4
<b>PLB-Lösung</b>	100 mM KCl 5 mM MgCl <sub>2</sub> 0,05 % (v/v) Nonidet P-40 (Roth)
<b>SDS-Lysepuffer, 4-fach konzentriert („4x-Laemmli“)</b>	0,25 M Tris 20 % (v/v) Glycerin 5 % (w/v) SDS 0,1 mg/ml Bromphenolblau pH 8,0 mit HCl einstellen direkt vor Gebrauch Zugabe von 100 mM DTT (Invitrogen, Karlsruhe)
<b>Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer</b>	40 mM Tris, 2 mM EDTA, pH 8,3

### 2.2 Zellkultur

Rattenleberepithelzellen (WB-F344) wurden von Dr. James E. Trosko, East Lansing, MI, USA, zur Verfügung gestellt und in Dulbecco`s modified Eagle`s Medium (DMEM), das mit 9 % (v/v) FBS (Greiner, Frickenhausen), 2 mM L-Glutamin (Invitrogen) und Penicillin/Streptomycin (100 mg/ml und 10 U/l, PAA, Cölbe) supplementiert war, bei 37°C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % (v/v) Kohlendioxid kultiviert. Etwa zwei Tage nach Aussäen wurden die zu 80-100 % konfluenten Zellen passagiert und auf neue Kulturflaschen (Cellstar, Greiner) verteilt. Menschliche „1306“-Hautfibroblasten (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, UK) wurden auf dieselbe Weise in Kultur gehalten. Für Gefrierkulturen wurden Zellen in Einfriermedium resuspendiert und bei -80°C gelagert.

### 2.3 Isolierung von RNA

Zum Aufreinigen von RNA aus kultivierten Zellen wurden diese mit PBS gewaschen und alle Flüssigkeit auf Filterpapier ausgeklopft. In Schalen mit 15 cm Durchmesser zur Konfluenz gewachsene Zellen wurden mit 1 ml Trizol (Invitrogen) lysiert, gründlich mit einem Zellschaber abgekratzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Die entstandenen Lysate wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C gelagert.

Nach Auftauen bei Raumtemperatur wurden 0,3 ml Chloroform (Roth) hinzugegeben, 15 sec stark geschüttelt und mit 20800 x g bei 4°C für 30 min zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde vorsichtig in mit 0,7 ml Isopropanol gefüllte Eppendorf-Gefäße überführt. Der Ansatz wurde stark gemixt und mindestens 15 min bei -20°C inkubiert.

Nach anschließender Zentrifugation für 10 min bei 4°C und 20800 x g wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und das entstandene RNA-Präzipitat mit 1 ml eiskaltem 75 %-igem Ethanol gewaschen, für 20 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die RNA wurde für etwa 5-15 min im Abzug luftgetrocknet. Je nach Präzipitatgröße wurden 25-100 µl ddH<sub>2</sub>O hinzupipettiert und zum Lösen für 5 bis max. 15 min bei 65°C inkubiert und resuspendiert. Die RNA-Lösung wurde im Anschluss zur weiteren Verwendung auf Eis gehalten oder bei -70°C eingefroren. Eine Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte spektrophotometrisch durch Messung der Extinktion bei 260 nm unter der Annahme, dass eine Extinktion von 1,0 etwa einer RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht.

### 2.4 RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis und zur halbquantitativen Bestimmung spezifischer mRNA wurde zelluläre RNA revers transkribiert und die dadurch entstandene cDNA über Polymerasekettenreaktion (PCR) analysiert, wobei ein durch Primer bestimmter Abschnitt der cDNA vervielfältigt wurde. Nach anschließender Agarosegelelektrophorese wurden einzelne DNA-Banden mit Hilfe eines UV-Illuminators sichtbar gemacht und in ihrer Intensität vermessen (AIDA, Raytest Isotopen Messgeräte, Straubenhardt).

#### 2.4.1 Reverse Transkription (RT) und PCR

Zelluläre mRNA wurde mit Hilfe des „Omniskript“-Kits von Qiagen (Hilden) in cDNA umgeschrieben. Den Ansätzen zur reversen Transkription von 2 µg Gesamt-RNA (vgl. Abschnitt 2.3) wurden neben reverser Transkriptase (1 U), dNTPs (500 µM Endkonzentration) und entsprechendem RT-Puffer aus dem Kit auch 10 U RNase Inhibitor („RNaseOUT“, Invitrogen) sowie Oligodesoxythymidin (dT<sub>15</sub>, Invitrogen; 10 µM Endkonzentration) zugegeben (Gesamtvolumen des Ansatzes: 20 µl). Das Reaktionsgemisch wurde sodann für 60 min bei 37°C inkubiert. Lagerung erfolgte, falls nötig, bei -20°C.

Die Amplifikation von Zielsequenzen aus der entstandenen cDNA über PCR erfolgte in einem „T-Personal“-Thermocycler der Firma Biometra (Göttingen). In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden dazu 2 µl des Produkts aus oben genannten RT-Ansätzen mit 1 U Taq-Polymerase (Qiagen), jeweils 200 µM (Endkonzentration) dATP, dCTP, dGTP, dTTP (dNTP-Mix, Sigma) sowie je 1,5 µM (Endkonzentration) der beiden Primer (Invitrogen) versetzt. Eine Liste der in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Primer findet sich in Tabelle 2.2. Zur Amplifikation im Thermocycler wurde nach einer initialen

Denaturierung bei 95°C für 2 min ein Zyklus aus Temperaturen für Denaturierung (94°C, 30 sec), Primeranlagerung (58-60°C, 30 sec) und Elongation (72°C, 1 min) mehrfach wiederholt. Anlagerungstemperatur und Zyklenzahl variierten dabei mit den eingesetzten Primerpaaren (vgl. Tab. 2.2). Die PCR wurde mit einer Inkubation bei 72°C für 10 min zur Verlängerung noch unvollständiger PCR-Produkte abgeschlossen.

**Tabelle 2.2** In der vorliegenden Arbeit eingesetzte Primer

Nr.	Bezeichnung	Sequenz	Produktlänge (bp)	Zykluszahl	Anlagerungstemperatur
1a	5' p21CDSrat	agcaaagtatgccgtcgtct	427	32	60°C
1b	3' p21CDSrat	ggcgcttggagtgatagaaa			
2a	ratGAPDH sense	gatcgtggaaggctaatga	124	32	60°C
2b	ratGAPDH antisense 2	ggatgcagggatgatgttct			
3a	rat CX43 exonintron FP	ggcgtgaggaaaagtacaaa	321	32	60°C
3b	rat CX43 exonintron RP	acagcgaaggcagactgtt			
4a	ratGAPDH sense	gatcgtggaaggctaatga	124	27	60°C
4b	ratGAPDH antisense 2	ggatgcagggatgatgttct			
5a	rat CX43 exonintron FP	ggcgtgaggaaaagtacaaa	321	27	60°C
5b	rat CX43 exonintron RP	acagcgaaggcagactgtt			
7a	5' human-CX43 727bp	ctatgtgatgcgaaaggaagagaa	727	36	58°C
7b	3' human-CX43 727bp	atcggggaaatcaaaaggctgtg			
7c	T7-5' human-CX43 727bp	ccaagcttctaatacgaactactataggag actatgtgatgcgaaaggaagagaa			
8a	5'human CX43A	aggttcactgggggtgatg	200	36	58°C
8b	3'human CX43A	caattaccaccgctcattc			
8c	T7-5'human CX43A	ccaagcttctaatacgaactactataggag aaggttcactgggggtgatg			
9a	5'human CX43B	gtgcctaaatgaatttgcagt	400	36	58°C
9b	3'human CX43B	ttacatgcaatgaagctgaaca			
9c	T7-5' humanCX43B	ccaagcttctaatacgaactactataggag agtgccctaaatgaatttgcagt			
10a	5'CX43 3UTR-ARE	caaccatgccattgctacac	304	36	58°C
10b	3'CX43 3UTRrat	gaagaggatggaggtaaattaacaa			
10c	5'T7-CX433UTR-ARE	ccaagcttctaatacgaactactataggag acaaccatgccattgctacac			
11a	5'T7- human-CX43727bp	ccaagcttctaatacgaactactataggag actatgtgatgcgaaaggaagagaa	141	36	58°C
11b	human Cx43exonintron RP	ttaccatgctctcaataaccg			

### 2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Trennung und Aufreinigung amplifizierter DNA erfolgte über Elektrophorese im Agarosegel. Hierzu wurde geeignete Agarose (Biozym, Hessisch Oldendorf) in Tris-Acetat-EDTA (TAE)-Puffer aufgekocht und abgekühlt. Vor dem Gießen der noch heißen Agaroselösung in eine Gelkammerform wurde der Lösung 5 µg/100ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die zu analysierenden DNA-Proben wurden mit Blaumarker versetzt und über

Elektrophorese im ausgehärteten Agarosegel mit TAE als Laufpuffer analysiert. In der vorliegenden Arbeit wurden 1 %-ige (w/v) Agarosegele eingesetzt. Extraktion von DNA-Fragmenten aus der Agarosegelmatrix erfolgte unter Verwendung des „GFX PCR DNA and Gel Band Purifikation Kit“ der Firma Amersham Biosciences (Braunschweig) nach Angaben des Herstellers.

### **2.5 Bestimmung der Stabilität von mRNA**

Zur Untersuchung der Stabilität einer spezifischen mRNA wurden Zellen mit Actinomycin D inkubiert, das durch Einlagerung in die DNA dazu führt, dass die Transkription eingestellt wird. Unter diesen Bedingungen wird die jeweils messbare zelluläre RNA-Menge nur noch durch ihren Abbau beeinflusst.

Für die Behandlung von WB-F344-Zellen mit Actinomycin D (Sigma; Stammlösung: 2 mg/ml in DMSO) wurden Zellen auf Schalen mit 6 cm Durchmesser ausgesät, zu 80 %-iger Konfluenz herangezüchtet, mit PBS gewaschen und anschließend mit Actinomycin D (2 µg/ml in FBS-freiem DMEM) inkubiert. Mehrere dieser Inkubationsansätze wurden zeitgleich gestartet und nach unterschiedlichen Inkubationszeiten durch Lyse der Zellen mit Trizol-Reagens zum Zwecke der RNA-Isolierung (vgl. Kap. 2.3) gestoppt. Zeitpunkt 0 ist der Moment vor Zugabe von Actinomycin D. Nach Aufreinigung der RNA der für verschiedene Zeiten mit Actinomycin D inkubierten Ansätze wurde die Menge an Cx43-mRNA durch RT-PCR und Agarose-Gelelektrophorese (vgl. 2.4) bestimmt. Als Primer für die Amplifikation der Cx43-cDNA wurden Primer Nr. 5a und 5b (Tabelle 2.2) eingesetzt.

Als unter den beschriebenen Bedingungen stabile mRNA stellte sich diejenige der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase (GAPDH) heraus, weswegen ihre Amplifikation per RT-PCR als Kontrolle diente (Primer Nr. 4a und 4b in Tabelle 2.2)

### **2.6 Nachweis der Bindung von Proteinen an mRNA**

Zwei Methoden wurden zum Nachweis der Interaktion des Proteins HuR mit der Cx43-mRNA eingesetzt. Zum einen wurde HuR aus Zellen immunopräzipitiert und kopräzipitierte mRNA per RT-PCR analysiert [Protein-RNA-Koprazipitation, „mRNP-IP“, (Lopez de Silanes *et al.*, 2004; Penalva *et al.*, 2004)], zum zweiten wurde markierte Cx43-mRNA als „Angel“ für HuR benutzt und ausgefällt. Das mit dieser RNA präzipitierte Protein wurde über Western Blot (vgl. Kap. 2.10) analysiert [RNA-Protein-Koprazipitation, „Pull down“ (Wang *et al.*, 2000)].

### 2.6.1 Protein-RNA-Kopräzipitation („mRNP-IP“)

#### 2.6.1.1 Gewinnung von Zellysaten

In Kulturschalen mit 15 cm Durchmesser zur Konfluenz gewachsene WB-F344-Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und anschließend in 500 µl PBS von der Schale gekratzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Nach Zentrifugation mit 420 x g bei 4°C wurde der Überstand verworfen. 1 ml PLB-Puffer wurde mit 100 U/ml RNase OUT (Invitrogen, 40 U/µl), 10 µl/ml DTT (Invitrogen, 0,1 M) und 40 µl/ml Proteaseinhibitor „Complete“ (Roche, Mannheim) versetzt. Je nach Präzipitatgröße wurden 60-100 µl dieser Lösung hinzugegeben, 5-10 x resuspendiert, 10 min auf Eis inkubiert und bis zu 6 Wochen bei -80°C gelagert. Vor der eigentlichen Immunopräzipitation wurde das Lysat aufgetaut und soweit aufgereinigt, dass sich nur noch Proteine und die daran gebundene RNA in dem Reaktionsgemisch befanden. Dazu wurde das PLB-Lysat mit 20800 x g bei 4°C für 30 min zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt. Zu dem Lysat wurden 15 µg IgG-Antikörper (Becton & Dickinson, Sparks, MD, USA; 0,5 mg/ml) hinzugegeben und dieses Gemisch für mindestens 30 min bei 4°C mittels eines Überkopffrotators bewegt. Nach Zusatz von 50 µl Protein A-Sepharose (PAS, Sigma) wurde das Reaktionsgemisch wieder für mindestens 30 min bei 4°C im Überkopffrotator inkubiert, anschließend 5 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert und der Überstand, der nur noch die Proteine und die daran gebundene RNA enthielt, bei -80°C eingefroren.

#### 2.6.1.2 Sättigung der Protein A-Sepharose mit Antikörper

In einem 50-ml-Gefäß wurde 5 ml PAS in 15 ml 5 %-iger BSA-Lösung (Rinderserumalbumin, Roth) über Nacht schwellen gelassen. Am nächsten Morgen wurde durch vorsichtiges Dekantieren des überschüssigen BSA das Volumen auf 10 ml reduziert und dieses Gemisch mit 0,1 % (Endkonzentration) NaAzid versetzt, um es bei 4°C haltbar zu machen.

Am Tag vor der Immunopräzipitation wurde die Protein A-Sepharose (PAS) mit Antikörper gesättigt, indem zu 100 µl der vorbereiteten PAS 30 µg Antikörper und 200 µl NT<sub>2</sub>-Puffer hinzugegeben und dieses über Nacht auf dem Überkopf-Rotator bei 4°C inkubiert wurde. Am nächsten Morgen wurden diese ummantelte PAS fünfmal mit 1 ml NT<sub>2</sub>-Puffer gewaschen. Diese 50 µl ummantelte PAS wurde sofort weiterverwendet.

#### 2.6.1.3 Immunopräzipitation

Zu den ungefähr 50 µl der ummantelten, antikörpergesättigten PAS wurden 700 µl NT<sub>2</sub>-Puffer, 10 µl 0,1 M DTT (Invitrogen), 10 µl RNase OUT (Invitrogen, 40 U/µl) und 66 µl 0,25 M EDTA gegeben und kurz gemischt. Dazu wurden 100 µl des gereinigten Lysats

gegeben und das Reaktionsgemisch 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Überkopf-Rotator inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch 5 sec mit 20800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Um Proteine zu gewinnen, wurde das Präzipitat daraufhin fünfmal mit 1 ml NT<sub>2</sub>-Puffer gewaschen, 50 µl 4-fach konzentrierter SDS-Lysepuffer dazugegeben und die Proteine bis zur Analyse über Polyacrylamid-Gelelektrophorese bei -20°C gelagert.

Um die an die Proteine gebundene RNA zu gewinnen wurde das Präzipitat dreimal mit 1 ml kaltem NT<sub>2</sub>-Puffer und dann zweimal mit 1 ml kaltem NT<sub>2</sub>-Puffer, der mit 1 M Harnstoff versetzt war, gewaschen. Anschließend wurden zu dem Präzipitat 5 µl einer Proteinase K-Lösung (10 mg/ml, Fermentas, St. Leon-Rot), 1 µl einer Natriumdodecylsulfat-Lösung [SDS, 10 % (v/v)] und 100 µl NT<sub>2</sub>-Puffer gegeben und für 20 min bei 55°C und 700 rpm auf einem Thermomixer (Eppendorf) inkubiert. Nachdem 2 min bei 4°C mit 20800 x g abzentrifugiert wurde, wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben. Das Präzipitat wurde nochmals mit 200 µl NT<sub>2</sub>-Puffer versetzt, 2 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert und der Überstand zu dem vorherigen Überstand pipettiert. Zum Fällen der RNA wurden dann 800 µl einer Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Mischung (25:24:1; Roth) gegeben und sehr stark gemischt. Dieser Ansatz wurde 1 min mit 20800 x g zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt, mit 30 µl 3 M Natriumacetat (pH 5), 650 µl Ethanol und 5 µl Glycogen (20 mg/ml, Fermentas) versetzt und bei -20°C über Nacht ausgefällt. Am nächsten Morgen wurde die RNA für 30 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Präzipitat wurde mit 1 ml eiskaltem 75 %-igem Ethanol gewaschen und nach dem Herunterzentrifugieren bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Anschließend wurde die RNA in 20 µl ddH<sub>2</sub>O bei 65°C und 1400 rpm auf dem Thermomixer gelöst und ein DNase-Verdau durchgeführt, um die Amplifikation genomischer DNA zu verhindern und Hintergrundsignale zu minimieren. Dazu wurden zu den 20 µl RNA 3 µl 10 x Reaktionspuffer MgCl<sub>2</sub> (Fermentas), 4 µl ddH<sub>2</sub>O und 3 µl DNaseI (Fermentas, 1 U/µl) hinzugegeben und das Ganze bei 37°C für 30 min inkubiert. Zum anschließenden Fällen wurden 70 µl ddH<sub>2</sub>O und 100 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (Roth) hinzupipettiert und stark gemischt. Nach 10-minütigem Zentrifugieren mit 20800 x g bei 4°C wurde die obere, wässrige Phase in ein neues Gefäß pipettiert, nochmals 100 µl Chloroform hinzugegeben und stark gemischt. Wiederum wurde für 10 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert und die obere Phase in ein neues Gefäß überführt, zu der dann 10 µl 3 M Natriumacetat, 250 µl 100 %-iges Ethanol

und 2,5 µl Glycogen (20 mg/ml) gegeben wurde. Dieser Ansatz wurde dann zum Fällen für mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert und abschließend für 30 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert, das Präzipitat mit 1 ml kaltem 75 %-igem Ethanol gewaschen und luftgetrocknet. Das Präzipitat wurde dann bei 65°C unter Schütteln in 15 µl ddH<sub>2</sub>O gelöst und bei -80°C gelagert. Für die RT wurden 2 µl der RNA verwendet, für die anschließende PCR 2 µl der RT. Die PCR wurde mit Primer Nr. 1a und 1b, Nr. 2a und 2b und Nr. 3a und 3b durchgeführt (siehe Tabelle 2.2).

### 2.6.2 RNA-Protein-Kopräzipitation („Pull down“)

#### 2.6.2.1 *In vitro*-Transkription zur Biotinylierung von RNA

Zur Markierung von RNA mit Biotin wurde diese durch *in vitro*-Transkription der unter 2.11 erzeugten T7-cDNA Konstrukte in Gegenwart von biotinyliertem UTP erzeugt. Die Biotinylierung dient dem Zwecke der Präzipitation dieser so markierten RNA, da Biotin eine starke Bindung mit Streptavidin eingeht. Die Herausfällung auf einem magnetisierten Eppendorf-Ständer erfolgte mit Hilfe ebenfalls magnetischer, Streptavidin-ummantelter Mikrokügelchen.

##### 2.6.2.1.1 PCR der Plasmid-DNA

Zunächst wurden, wie in Kapitel 2.11 beschrieben, die interessierenden Fragmente der mRNA kloniert und in einen die T7-Polymerase-Bindestelle-tragenden Vektor (pGEM-T, Promega) eingebaut. Nach Restriktionsverdau des jeweils interessierenden Konstruktes mit ApaI [2 µg DNA + 1 U ApaI (Promega)] wurde eine PCR durchgeführt. Dazu wurden mit einem T7-Promotor gekoppelte Primer verwendet (Tabelle 2.2, Primer Nr.7b und 7c; Nr. 8b und 8c; Nr. 9b und 9c; Nr. 10b und 10c; Nr.11a und 11b), so dass die zur *in vitro*-Transkription verwendete Polymerase einen Startpunkt hatte. Die PCR wurde wie in Punkt 2.4 beschrieben durchgeführt, allerdings wurden statt des RT-Produktes 0,5 µg des Plasmids verwendet.

##### 2.6.2.1.2 *in vitro*-Transkription

Zunächst wurde ein „rNTP-Master Mix“ vorbereitet, in dem sich jeweils 10 µl rATP, rCTP und rGTP (je 10 mM Stammlösung; Ambion, Austin, Texas, USA), 6 µl rUTP (10 mM, Ambion) und 4 µl biotinyliertes rUTP (10 mM, Roche) befanden. Für die *in vitro*-Transkriptionsreaktion wurden 1 µg der T7-gekoppelten cDNA, 4 µl des obigen rNTP-Master Mix, 2 µl Enzym-Mix (T7- Polymerase (15 U/µl) und RNase-Inhibitoren; Ambion) und 2 µl 10 x Transkriptionspuffer für 1 Stunde bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurde 1 µl DNaseI (2 U/µl; Ambion) hinzugegeben und 15 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der biotinylierten RNA wurde mit „Mini Quick spin

RNA columns“ (Roche) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und diese bei -80°C gelagert, sofern sie nicht sofort verwendet wurde.

### 2.6.2.2 „Pull Down“

Der erste Schritt des so genannten „Pull down“ bestand im Waschen von „Dynabeads™“, mit Streptavidin beschichtete magnetische Mikrokügelchen. Dazu wurden pro Pull Down-Ansatz je 10 µl Dynabeads™ (Dynal, Oslo, Norwegen) mit je 200 µl Lösung A zweimal und je 200 µl Lösung B einmal auf dem Magnetständer (Promega) gewaschen und anschließend in je 10 µl 1 x TENT gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden die gewaschenen Mikrokügelchen auf Eis gelagert.

Als Zweites folgte der eigentliche Pull Down-Schritt. Um ein besseres Verhältnis der Reagenzien zueinander zu bekommen und anschließend eine ausreichende Menge an Proteinen zu gewinnen, wurde die Reaktion auf drei Eppendorf-Gefäße aufgeteilt. Dazu wurden je Gefäß 40 µg der cytoplasmatischen Proteine (vgl. 2.8 u. 2.9) mit 2 µg biotinylierter RNA, 2,5 µl RNaseOUT (Invitrogen) und 25 µl 2 x TENT in separaten Eppendorf-Gefäßen zusammenpipettiert und mit der entsprechenden Menge Wasser auf 50 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde sowohl für den humanen als auch für den Ratten-Ansatz die der RNA entsprechende Menge an ddH<sub>2</sub>O hinzugegeben. Das Reaktionsgemisch wurde für 30 min bei Raumtemperatur im Überkopf-Rotator inkubiert. Nach Zugabe von je 10 µl der gewaschenen Dynabeads™ wurde das RNA-Protein-Gemisch weitere 30 min bei Raumtemperatur im Überkopf-Rotator inkubiert. Das Eppendorf-Gefäß wurde auf den Magnetständer gestellt und ca. 2 Minuten ruhen gelassen, damit sich die Mikrokügelchen anheften konnten. Der Überstand wurde herauspipettiert und die Mikrokügelchen 2 x mit je 1 ml kaltem PBS gewaschen, in je 10 µl zweifach konzentriertem SDS-Lysepuffer gelöst, in ein Gefäß zusammengeführt und bis zum Auftragen auf das 10 %-ige SDS-1 bei -20°C gelagert. Mit diesem SDS-Polyacrylamidgel (vgl. 2.10) wurde dann ein Western Blot gegen HuR durchgeführt.

### 2.7 Depletion von HuR mit Hilfe der RNA-Interferenz (siRNA)

Die Depletion von zellulärem HuR erfolgte über RNA-Interferenz (Penalva *et al.*, 2004). Hierbei wurden Zellen mit RNA-Oligonukleotiden (ca. 22 bp) inkubiert, die komplementär zur RNA-Zielsequenz waren, was zu einer Verhinderung der Translation und einem verfrühten Abbau der RNA führte. Diese Versuche wurden mit der Unterstützung von Elisabeth Sauerbier durchgeführt.

Dazu wurden WB-F344-Zellen auf Kulturschalen mit 6 cm Durchmesser in DMEM mit 5 % FCS ausgesät, und zwar so, dass 24 h später eine Zellzahl von etwa 50000 Zellen pro Schale erreicht wurde. Am nächsten Tag wurden 10 µl Oligofectamin (Invitrogen) in 1 ml Opti-MEM (Invitrogen) gegeben und gut durchmischt. Hierzu wurden 10 µl der 20 µM siRNA (siehe Tabelle 2.3) hinzugegeben, vorsichtig gemischt und 30-60 min bei Raumtemperatur inkubiert. Inzwischen wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und diese mit PBS gewaschen. Zu den Zellen wurden anschließend 1 ml Opti-MEM pro Kulturschale gegeben und anschließend tropfenweise der siRNA/Oligofectamin-Mix, was daraufhin gut gemischt wurde. Es wurde somit eine Endkonzentration von 100 nM siRNA pro Schale erreicht. Die Kulturschalen wurden nun wieder in den Inkubator gestellt. Am nächsten Morgen wurden je 1,5 ml DMEM (10 % FCS) zu den Zellen gegeben, am Abend des Tages wurden die Zellen je einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 3 ml DMEM (10 % FCS) versehen. Es ergab sich also eine siRNA-Gesamt-Inkubationszeit von ca. 30 h. Am dritten Tag des Versuchs waren die Zellen dann bereit für die jeweilige, weitere Behandlung, etwa mit Actinomycin D, die entsprechend Kap. 2.5 durchgeführt wurde.

**Tabelle 2.3:** Verwendete siRNA Sequenzen (Qiagen)

**HuR siRNA:** HuR Ziel-Sequenz (Lal et al, 2004): AAGAGGCAATTACCAGTTTCA

mit DNA Überhang:

5'-GAGGCAAUUACCAGUUUCAd(TT)-3'

3'-d(TT)CUCCGUUAAUGGUCAAAGU-5'

**Kontroll siRNA:** (Lal et al, 2004): AATTCTCCGAACGTGTCACGT

mit DNA Überhang:

5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUGd(TT)-3'

3'-d(TT)AAGAGGCUUGCACAGUGCA-5'

### 2.8 Herstellung von Proteinlysaten

Zur groben Trennung cytoplasmatischer von nukleären Proteinen wurde eine Fraktionierung durch die gezielte Lyse einzelner Komponenten der Zelle durchgeführt. Diese Fraktionierung wurde benötigt, da die im Zytoplasma vorliegenden Proteine die reife, zytoplasmatische mRNA stabilisieren.

### 2.8.1 Gesamt-Proteine

Konfluente Zellen wurden einmal mit kaltem PBS gewaschen, gründlich ausgeklopft, mit 500 µl kaltem PBS versetzt und die Schalen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden sorgfältig mit einem Zellschaber von der Schale gekratzt und in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Das Lysat wurde dann 5 min bei 4°C mit 1700 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen; das restliche PBS wurde herauspipettiert. Je nach Präzipitatgröße wurden 100 % (v/v) CDK2 Puffer, der kurz zuvor mit Proteaseinhibitoren [Leupeptin, 1 µg/µl (Sigma); Aprotinin, 1 µg/µl (Sigma); Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), 1 mM (Calbiochem)] versetzt wurde, dazugegeben und resuspendiert. Das Gefäß wurde für 10 min bei 4°C mit 20800 x g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Die Probe wurde bei -20°C gelagert.

### 2.8.2 Trennung cytoplasmatischer und nukleärer Proteine

Bei einer 80 %-igen Konfluenz wurde die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und mit Trypsin/EDTA (PAA) aus der Kulturflasche gelöst. Für RNA-Protein-Kopräzipitationsversuche wurden die Zellen vorher zwei Stunden mit Actinomycin D inkubiert, um ein vermehrtes shuttling von HuR aus dem Kern ins Zytoplasma zu erreichen (Wang *et al.*, 2000). Die Zellen wurden mit je 4 ml PBS vorsichtig in ein Zentrifugiergefäß überführt, für 2 min bei 1000 x g zentrifugiert, der Überstand verworfen, die Zellen nochmals mit PBS gewaschen, mit ca. 1 ml PBS gelöst und vorsichtig in ein Eppendorf-Gefäß überführt. Bei 4°C mit 1700 x g wurde 5 min zentrifugiert, das PBS dekantiert. Je nach Größe des Präzipitats wurden 50-300 µl Lösung A zusammen mit Proteaseinhibitoren (Leupeptin 1 µg/µl, Aprotinin 1 µg/µl und Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) 1 mM) hinzugegeben und das Ganze resuspendiert, bis sich das Präzipitat vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde das Lysat 15 min auf Eis inkubiert. 25 µl Puffer A, versetzt mit 1 % Nonidet-P40 (Fluka) wurden daraufhin zu den Proteinen hinzupipettiert und diese wurden durch Klopfen gegen den Gefäß-Boden vorsichtig gemischt. Dann wurde bei 4°C mit 1700 x g 5 min zentrifugiert und der Überstand von dem Präzipitat getrennt.

Für die cytoplasmatische Fraktion wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und bei -80°C eingefroren. Anschließend wurde dieser Überstand zweimal wieder aufgetaut und eingefroren; nach dem dritten Auftauen wurden die Proteine mit 1700 x g 5 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß gefüllt.

Um die nukleäre Fraktion zu gewinnen, wurde zu dem Präzipitat als Waschschrift 200 µl Puffer A mit Proteaseinhibitoren und 25 µl 1 % NP40 gegeben, resuspendiert, 5 min bei

4°C mit 1700 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurden zu dem Präzipitat 100 µl Lösung C mit Proteaseinhibitoren (gleiche Konzentrationen und Substrate wie in Puffer A) gegeben und resuspendiert. Das Gemisch wurde 15 min bei 4°C geschüttelt und anschließend bei 4°C mit 1700 x g 10 min zentrifugiert. Der Überstand, bei dem es sich um die nukleäre Fraktion handelt, wurde in ein neues Gefäß pipettiert und bei -80°C gelagert.

### 2.9 Proteinquantifizierung

Die Proteinbestimmung in Zellextrakten erfolgte unter Einsatz des „BioRad Protein Assay Dye-Reagent“ (BioRad, München) nach Bradford gegen Standards aus Rinderserumalbumin nach Angaben des Herstellers (Bradford, 1976).

### 2.10 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese (SDS-PAGE) und „Western-Blot“

#### 2.10.1 SDS-Polyacrylamidgel-Elektrophorese

Die unter denaturierenden Bedingungen durchgeführte elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte in diskontinuierlichen Polyacrylamidgelen, bei maximal 40 mA pro Minigel (Towbin *et al.*, 1979).

Trenngel (10 % Acrylamid): 40 % (v/v) Trenngel; 35 % (v/v) PAA-Lösung (Polyacrylamid, Roth; 30 % (w/v) Acrylamid; 0.8 % (w/v) Bisacrylamid); 25 % (v/v) H<sub>2</sub>O. Zur Polymerisation Zugabe von 0,07 % (v/v) APS (Ammoniumperoxodisulfat) und 0,007 % (v/v) N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin (TEMED).

Sammelgel (4 % Acrylamid): 13,4 % (v/v) PAA-Lösung; 30 % (v/v) Sammelgelpuffer; 56,6 % (v/v) H<sub>2</sub>O. Zur Polymerisation Zugabe von 0,075 % (v/v) APS; 0,007 % (v/v) TEMED.

Der Transfer („Blotting“) der Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Hybond-P, Amersham, Braunschweig) geschah über 90 min bei 100 mA pro Gel. Hierzu wurde nach der Elektrophorese das zu blottende Gel kurz in Transferpuffer äquilibriert und zusammen mit in Gelgröße zurechtgeschnittenen 3 mm-Blottingpapieren (Schleicher & Schuell, Dassel) sowie mit in Methanol aktivierter und anschließend in Transferpuffer äquilibrierter PVDF-Membran zum Blottingaufbau zusammengestellt. Zwei in Transferpuffer gesättigte Blottingpapiere wurden luftblasenfrei auf die Anode gebracht, gefolgt von Membran, Gel und zwei

weiteren Blottingpapieren, die in einer „Trans-Blot™ Semi-Dry Transfer Cell“-Apparatur von BioRad zum Elektrotransfer eingesetzt wurde.

### 2.10.2 Immunanfärbung nach Western-Blot

Der Nachweis einzelner Proteine auf PVDF-Membranen erfolgte mithilfe von Antikörpern (siehe Tabelle 2.4). Das Blockieren unspezifischer Bindestellen erfolgte mit Blockierpuffer, bestehend aus 1 x TBST und 1 % (w/v) Magermilchpulver (BioRad) für 60 min. Anschließend wurde die Membran mit dem Primärantikörper in der entsprechenden Verdünnung in TBST und 1 % Magermilchpulver für 90 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einer halben Stunde Waschen mit TBST, wobei dieses mehrfach gewechselt wurde, erfolgte dann die Inkubation mit an Meerrettichperoxidase (HRP) gekoppeltem sekundärem Antikörper (vgl. Tab 2.5) für 90 min bei Raumtemperatur. Nach einem letzten Waschschrift mit TBST von mindestens einer halben Stunde mit regelmäßigem Pufferwechsel erfolgte der Nachweis gebundener Antikörper über Chemilumineszenz [„SuperSignal® West Pico Chemiluminescent“ Substrat (Pierce, Rockford, USA)] durch Auflegen eines Filmes (Amersham). Zum Teil wurden diese Versuche von Elisabeth Sauerbier durchgeführt.

**Tabelle 2.4 Verwendete primäre Antikörper:**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti Cx43 (rabbit)	Sigma # C6219R	1:1000 in TBS
HuR 3A2 Antibody (mouse)	Santa Cruz # Sc-5261	1:1000 in TBST
beta Actin (AC-15) (mouse)	Abcam # Ab6276	1:1000 in TBST
beta-Tubulin (mouse)	Santa Cruz # Sc-5274	1:1000 in TBS
Anti HDAC1 (rabbit)	Santa Cruz # Sc-7872	1:1000 in TBS

**Tabelle 2.5 Verwendete sekundäre Antikörper**

<b>Name</b>	<b>Firma</b>	<b>Verdünnung</b>
Anti-Rabbit IgG, Peroxidase-conjug. (H+L)	Dianova	1:6000 in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST
Anti-Mouse IgG, Peroxidase-conj.	Amersham	1:5000 in 5 % (w/v) Milchpulver in TBST

### 2.11 Klonierung

Um die Interaktion zwischen RNA und Proteinen zu untersuchen, wurden spezifische DNA-Fragmente in ein Plasmid eingebracht. Dies wurde zum einen durchgeführt, um konstante Sequenzen in ausreichender Menge zu erhalten und zum anderen, um zum

Zwecke der *in-vitro* Transkription eine T7-Polymerase vor das zu untersuchende Fragment zu platzieren.

Dazu wurden die interessierenden RNA-Fragmente in cDNA umgeschrieben, amplifiziert (vgl Kap. 2.4) und in einen Klonierungsvektor eingebracht, der durch Bereitstellung einer Primer- und RNA-Polymerase-Bindestelle nicht nur die indirekte Sequenzierung der RNA-Fragmente, sondern auch die *in vitro*-Transkription zur Markierung der RNA erlaubte. Die den Fragmenten komplementären cDNAs wurden per Ligation in pGEM-T (Promega) eingebracht und die resultierenden Plasmide nach Transformation in *E.coli* JM109 (Sigma) vervielfältigt. Zur Ligation wurden 1 µg Vektor sowie 1 µg cDNA in entsprechendem Puffer für 4 h bei Raumtemperatur mit 3 U T4-Ligase (Promega) inkubiert. 10 µl dieser Ligationsansätze dienten schließlich der Transformation kompetenter JM109 durch Hitzeschock (45 sec, 42°C). Die transformierten Bakterien wurden in SOC-Medium (Invitrogen) bei 37°C auf einem Schüttler vermehrt und anschließend auf LB-Agarplatten (Invitrogen) mit Ampicilin selektiv (100 µg/ml) für mehrere Stunden bei 37°C gezüchtet. Die Aufreinigung der Plasmide wurde mittels „QIAprep Spin Miniprep Kit“ (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die gewonnene DNA-Menge wurde spektrophotometrisch bei 260 nm unter der Annahme, dass eine Extinktion von 1,0 etwa einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht, quantifiziert.

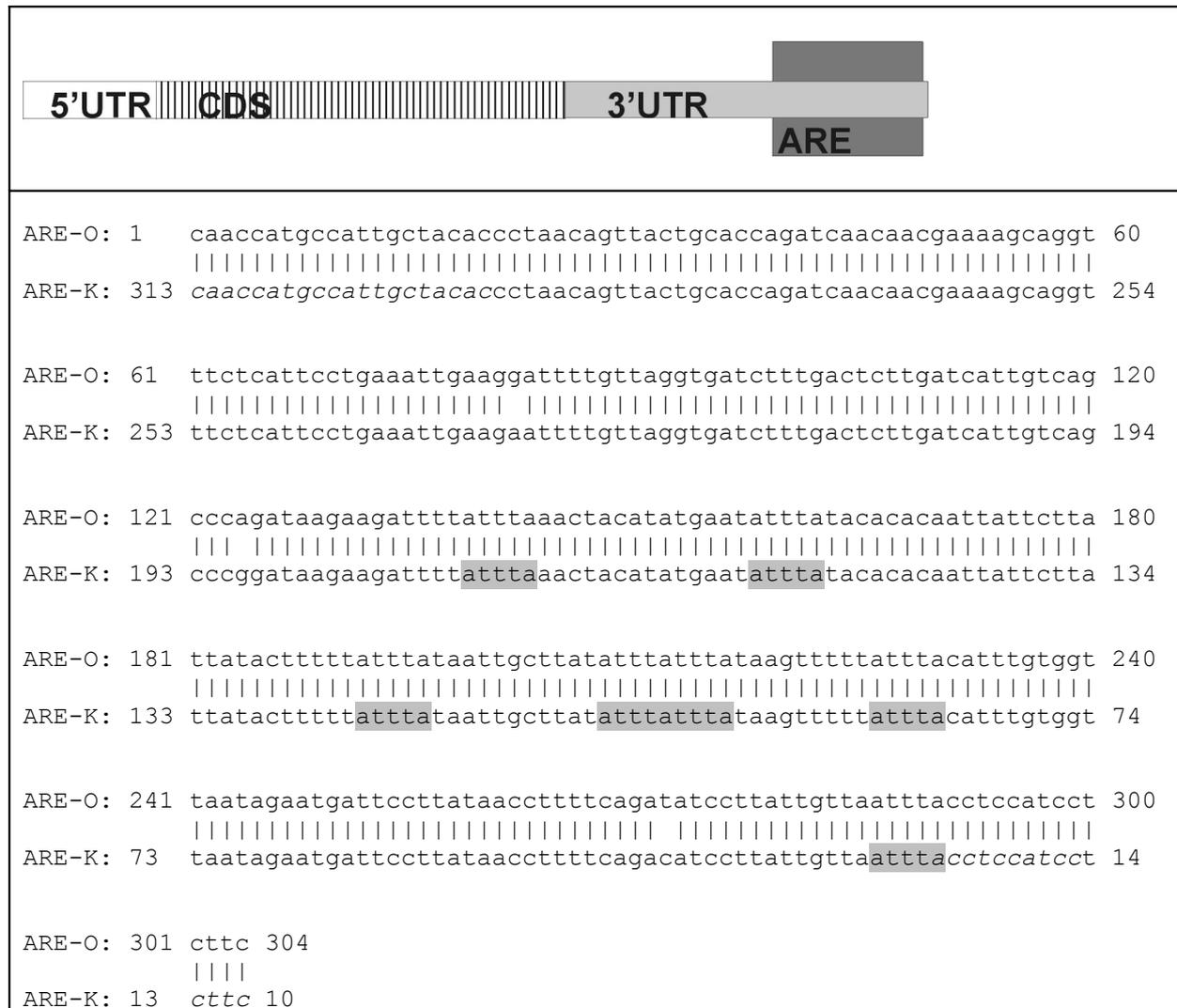
### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Isolation und Klonierung möglicher regulatorischer Sequenzen der 3'-untranslatierten Region der Connexin43-mRNA

Die Expression von Connexin43 (Cx43) wird durch zahlreiche Mechanismen reguliert: So wurden Methylierung des Promotors (Piechocki *et al.*, 1999), Transkriptionsbeeinflussung (Lefebvre *et al.*, 1995), Translationsbeeinflussung (Pfeifer *et al.*, 2004), proteasomaler und lysosomaler Abbau des Proteins (Laing *et al.*, 1997), sowie posttranslationelle Modifikationen (Lampe und Lau, 2000) beschrieben. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, inwieweit die Regulation auch auf posttranskriptioneller Ebene, beispielsweise über die Stabilisierung der mRNA, stattfindet. Clairmont *et al.* (1997) wiesen auf bestimmte Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) der Cx43-mRNA aus Mauszellen hin, an die RNA bindende Proteine (RBP) binden. Vor diesem Hintergrund wurde die 3'UTR der Cx43-mRNA aus Ratte und Mensch nach potentiellen Bindungsstellen abgesucht, insbesondere AUUUA-reichen Sequenzen, die für viele RBP als Zielsequenz dienen (Peng *et al.*, 1998).

Arbeiten von Lopez de Silanes *et al.* (2004) weisen auf Konsensus-Nukleotidsequenzen für die Bindung von HuR an die 3'UTR verschiedenster mRNAs hin. In ihrer Arbeit konnte sie in unterschiedlichen Zellsystemen mögliche HuR-Bindesequenzen extrapolieren und so mittels einer Computeranalyse wahrscheinliche Nukleotidsequenzen für die Bindung von HuR an die 3'UTR diverser mRNAs vorhersagen, wobei sowohl Primär- als auch Sekundärstruktur der RNAs berücksichtigt wurden. Basierend auf diesen Arbeiten wurden mögliche HuR-Bindestellen in der 3'UTR von humanem Cx43 herausgearbeitet (grau unterlegte Abschnitte in Abb. 3.2). Diese Fragmente mit potentiellen HuR-Bindestellen wurden per RT-PCR von aus menschlichen 1306-Hautfibroblasten isolierter RNA amplifiziert und in den Vektor pGEM-T, der mit einer T7-Sequenz über eine Ansatzstelle der T7-RNA-Polymerase verfügt, eingebracht (vgl. 2.11). Anschließend wurden die Plasmide sequenziert und mit Sequenzen aus Datenbanken verglichen (vgl. Abb. 3.2). Aus Abbildung 3.2 ist zu ersehen, dass es sich bei den amplifizierten Fragmenten der 3'UTR um ein 200 bp langes Stück aus der Nähe der kodierenden Sequenz („A“) und ein circa 400 bp langes Fragment auf der 3'-Seite („B“) handelt. Außerdem wurden ein 727 bp langes Fragment vom Ende der kodierenden Sequenz („727“) und ein 141 bp Fragment aus der Mitte der kodierenden Sequenz („CDS“= coding sequence) amplifiziert. Die schematische Anordnung dieser Fragmente auf der Cx43-mRNA sowie die Ergebnisse der Sequenzierung finden sich in Abbildung 3.2. Die Sequenzierung

ergab  $\geq 99\%$  Übereinstimmung mit Genbank-Einträgen (vgl. Abb. 3.2). Da die Daten von Lopez de Silanes *et al* nicht auf die Ratten-mRNA übertragbar waren, wurde hier ein entsprechendes, möglicherweise HuR-bindendes Fragment anhand der Anzahl der klassischen AU-reichen Elemente (ARE) ausgesucht (Vgl Abb. 3.1). Das analog dem oben beschriebenen Vorgehen amplifizierte und in pGEM-T eingebrachte Fragment war 304 bp lang und entsprach der Sequenz am Ende der 3'UTR der Cx43-mRNA aus Ratte. Die Sequenzierung ergab 98 % Übereinstimmung mit dem Eintrag aus der Genbank. PCR dieser klonierten Fragmente mit den jeweils adäquaten Primerpaaren sowie anschließende Agarosegelelektrophorese ergab das in Abbildung 3.3 gezeigte Bild mit Fragmenten, die in ihrer Größe den theoretischen Längen entsprechen.



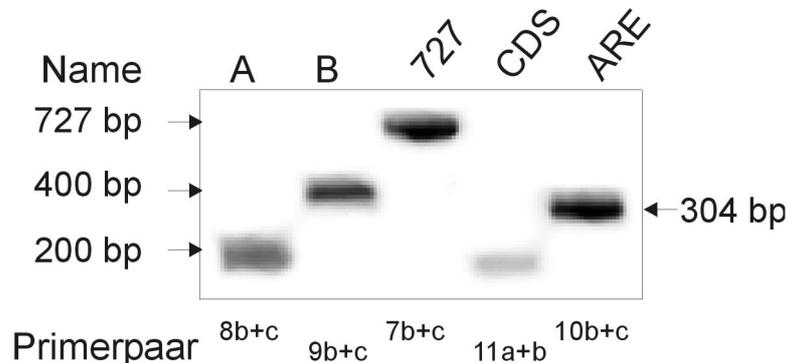
**Abb. 3.1 Nukleotidsequenzen von Fragmenten der mRNA von Cx43 aus Ratte:** Die in der Literatur beschriebene Originalsequenz (Genbankeintrag NM\_X06656) ist hier als „O“ bezeichnet. **Grau** unterlegt sind AU-reiche Sequenzen, die laut Peng *et al.* (1998) mögliche Bindestellen für RNA-bindende Proteine darstellen. Die verwendeten Primersequenzen sind kursiv dargestellt.



A-Ori: 1	aggttcactgggggtgtatggggtagatgggtggagagggaggggataagagaggtgcat	60
A-Klo: 50	aggttcactgggggtgtatggggtagatgggtggagagggaggggataagagaggtgcat	109
A-Ori: 61	gttggtatTTAAAGTAGTGGATTCAAAGAAGCTTAGATTATAAATAAGAGTTCATTAGGT	120
A-Klo: 110	gttggtatTTAAAGTAGTGGATTCAAAGAAGCTTAGATTATAAATAAGAGTTCATTAGGT	169
A-Ori: 121	gatacatagataagggctTTTTCTCCCCGCAAACACCCCTAAGAATGGTTCGTGTATGT	180
A-Klo: 170	gatacatagataagggctTTTTCTCCCCGCAAACACCCCTAAGAATGGTTCGTGTATGT	229
A-Ori: 181	gaatgagcgggtggttaattg	200
A-Klo: 230	gaatgagcgggtggttaattg	249
B-Ori: 1	gtgcctaaatgaatTTTGCAGTAAGTGGTATTCTTGGGTTTTCTACTTAATACACAGTA	60
B-Klo: 24	gtgcctaaatgaatTTTGCAGTAAGTGGTATTCTTGGGTTTTCTACTTAATACACAGTA	83
B-Ori: 61	attcagaacttGTATTCTATTATGAGTTTAGCAGTCTTTGGAGTGACCAGCAACTTTGA	120
B-Klo: 84	attcanaacttGTATTCTATTATGAGTTTAGCAGTCTTTGGAGTGACCAGCAACTTTGA	143
B-Ori: 121	tgTTTGCACCTAAGATTTTATTTGGAATGCAAGAGAGGTTGAAAGAGGATTCAGTAGTACA	180
B-Klo: 144	tgTTTGCACCTAANATTTTATTTGGAATGCAAGAGAGGTTGAAAGAGGATTCAGTAGTACA	203
B-Ori: 181	catacaactaATTTATTTGAAGTATATGTTGAAGACATCTACCAGTTTCTCCAAATGCCT	240
B-Klo: 204	catacaactaATTTATTTGAAGTATATGTTGAAGACATCTACCAGTTTCTCCAAATGCCT	263
B-Ori: 241	TTTTTAAACTCATCACAGAAGATTGGTGAAAATGCTGAGTATGACACTTTCTTCTTGC	300
B-Klo: 264	TTTTTAAACTCATCACAGANATTGGTGAAAATGCTGAGTATGACNCTTTCTTCTTGC	323
B-Ori: 301	atgcatgtcagctacataaacagTTTTGTACAATGAAAATTACTAATTTGTTGACATTC	360
B-Klo: 324	atgcatgtcagctacataaacagTTTTGTACAATGAAAATTACTAATTTGTTGACATTC	383
B-Ori: 361	catgTTAAACTACGGTCATGTTTCAGCTTCATTGCATGTA	400
B-Klo: 384	catgTTAAACTACGGTCATGTTTCAGCTTCATTGCATGTA	423

**Abb. 3.2 Nukleotidsequenzen von Fragmenten der mRNA des menschlichen Cx43:** „Ori“ bzw. „O“ bezeichnet die Originalsequenz laut Genbank-Eintrag Nr. NM\_000165. „Klo“ bzw. „K“ ist die hier klonierte und sequenzierte Sequenz, wobei Übereinstimmungen durch einen vertikalen Verbindungsstrich gekennzeichnet sind. Mögliche HuR-Bindesequenzen sind grau unterlegt (Lopez de

Silanes *et al.*, 2004), AU-reiche Sequenzen sind unterstrichen. Kursiv dargestellt sind die Primersequenzen.



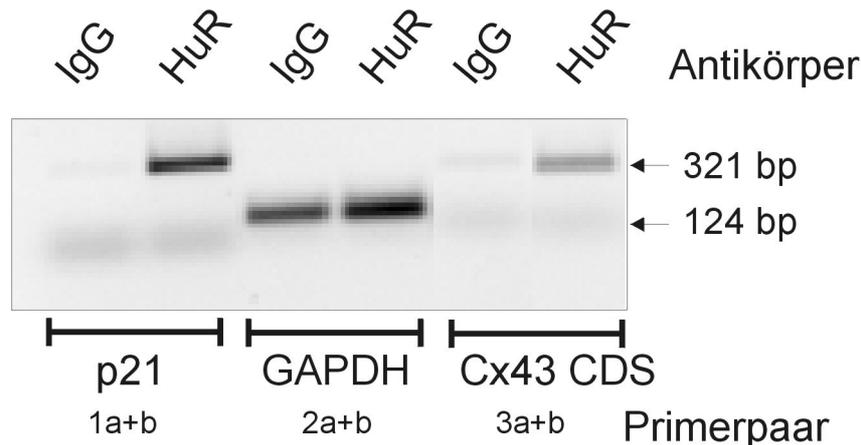
**Abb. 3.3 Agarosegel per PCR amplifizierter Cx43-mRNA Fragmente:** Fragmente mit möglichen Bindestellen für RNA-bindende Proteine sowie Teile der kodierenden Bereiche der Cx43-mRNA aus Mensch (A, B, 727, CDS) und Ratte (ARE) sind in einen mit einer T7-Polymerase-Sequenz versehenen Vektor (pGEM-T) kloniert und mittels PCR amplifiziert worden. Die Bezeichnung der Primerpaare bezieht sich auf Tabelle 2.2 (Kapitel 2.4.1).

### 3.2 Nachweis der Bindung von HuR an die Connexin43 mRNA

HuR ist als RNA-stabilisierendes Protein bekannt (Ma *et al.*, 1996; Dixon *et al.*, 2001); vergleiche Kap 1.2). Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob dieses Protein an die Cx43-mRNA bindet. Dazu wurde zum einen HuR und die daran gebundene RNA aus den Zellen gefällt und aufbereitet (siehe 3.2.1) und zum anderen mit Biotin markierte RNA hergestellt, welche dann mit cytoplasmatischen Proteinen inkubiert wurde (siehe 3.2.2).

#### 3.2.1 Protein-RNA-Kopräzipitation („mRNP-IP“)

Aus WB-F344 Rattenleberepithelzellen wurden Proteine unter Bedingungen, die bestehende Bindungen an Nukleinsäuren möglichst unbeeinflusst ließen, isoliert (vgl. Kap. 2.6.1.1). Nach Immunpräzipitation von HuR (vgl. 2.6.1.3f) konnte über RT-PCR die Kopräzipitation von Cx43-mRNA nachgewiesen werden: während Präzipitation mit HuR-Antikörper Cx43-mRNA mitfällte (Abb. 3.4), blieb das Präzipitat mit einem als Negativkontrolle eingesetzten unspezifischen IgG-Molekül, das im Western Blot erkennbar HuR-frei war (vgl. Abb. 3.5), ohne Cx43-mRNA-Kopräzipitat. Als Positivkontrolle für eine mRNA mit nachgewiesener HuR-Bindung wurde die mRNA von p21<sup>waf</sup>, einem Zellzyklusregulator, eingesetzt (Lal *et al.*, 2004). Als Negativkontrolle diente GAPDH. Diese ist zwar erkennbar mitpräzipitiert, was aber zu vernachlässigen ist, da in den HuR- und IgG-Präzipitaten eine ähnliche Menge an GAPDH-mRNA nachgewiesen wurde.



**Abb. 3.4: Nachweis der Bindung von HuR an die Cx43-mRNA mittels „mRNP-IP“:** RT-PCR der nach Immunopräzipitation unter Einsatz der angegebenen Antikörper gewonnenen mRNA aus WB-F344-Rattenleberepithelzellen. Nachweis der Bindung von HuR an die mRNA von p21<sup>waf</sup> (427 bp) diene als Positivkontrolle (Lal et al., 2004), die mRNA der GAPDH (124 bp) als Negativkontrolle. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für n=3 voneinander unabhängige Experimente, die Angegebenen Nummern beziehen sich auf die verwendeten Primerpaare aus Tabelle 2.2.

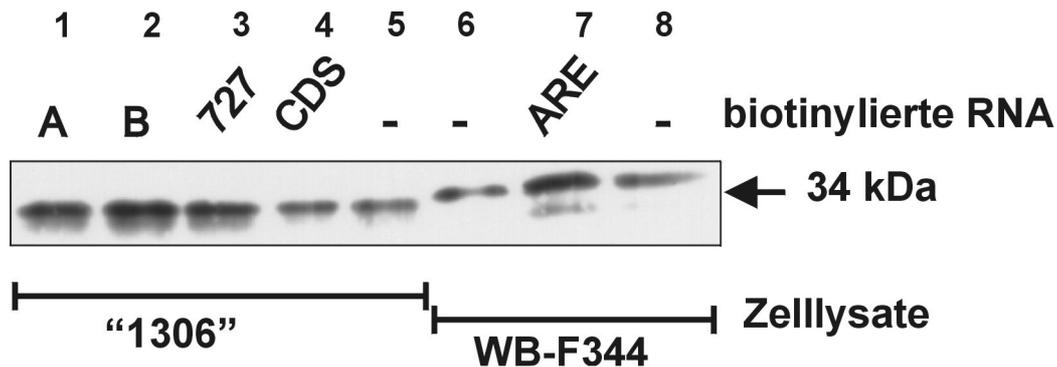


**Abb. 3.5 Immunopräzipitation von HuR:** Die für die mRNP-IP gefällten Proteine sind hier mittels Western Blot auf die Anwesenheit von HuR getestet worden. Als Kontrolle (-) diene ein nukleäres Proteinlysate aus unbehandelten WB-F344-Zellen.

### 3.2.2 RNA-Protein-Kopräzipitation („Pull down“)

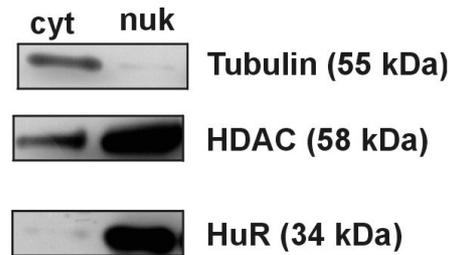
Die in Kapitel 3.1 beschriebenen Konstrukte wurden mittels *in vitro*-Transkription in biotinylierte RNA umgeschrieben (vgl. 2.6.2). Nach Inkubation dieser biotinylierten RNA mit cytoplasmatischen Proteinen, die vorher zwei Stunden mit Actinomycin D inkubiert worden waren, wurde die biotinylierte RNA mitsamt der daran gebundenen Proteine über an Magnetkügelchen gekoppeltes Streptavidin isoliert. Die gewonnenen Proteine wurden daraufhin in einem 10 %-igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch Immunanfärbung auf die Anwesenheit von HuR untersucht (vgl. 2.10). Dazu wurden die Fragmente der menschlichen Cx43-mRNA Sequenz mit zytoplasmatischen Zelllysaten aus „1306“ humanen Hautfibroblasten inkubiert. Als Negativkontrolle diene eine Inkubation mit ddH<sub>2</sub>O statt mRNA, um unspezifische Bindungen von HuR an die Streptavidinkügelchen auszuschließen. RNA-enthaltende Negativkontrollen waren die Fragmente CDS (Spur 4 in Abb.3.6) und 727 (Spur 3 in Abb. 3.6) aus der Cx43-kodierenden Sequenz. Während das CDS-Fragment ähnlich der Kontrolle kein HuR präzipitiert, fällt das 727-Fragment eindeutig HuR mit, so dass gefolgert wird, dass HuR auch an Teile der kodierenden Sequenz der mRNA des

menschlichen Cx43 bindet. Im Gegensatz zur Bindung von HuR an A und B war die Interaktion zwischen HuR und 727 nicht vollständig reproduzierbar. Zur Analyse der Bindung von HuR an das der Cx43-mRNA aus Ratte entstammende Fragment ARE wurden cytosolische und nukleäre Lysate aus WB-F344-Zellen mit Streptavidinkügelchen bzw. an Streptavidinkügelchen gekoppeltem ARE inkubiert. In Abb. 3.6 (Spur7) ist die Bindung von HuR an ARE deutlich zu erkennen.



**Abb. 3.6 Western Blot gegen HuR nach „Pull Down“:** Die Abbildung zeigt einen Western Blot gegen HuR (34 kDa) nach RNA-Protein-Kopräzipitation unter Einsatz der angegebenen biotinylierten RNA. Spuren 5 und 6 sind die Negativkontrollen, d.h. Präzipitation wurde ohne biotinylierte mRNA, jedoch mit menschlichen (5) bzw. mit Ratten-Proteinen (6) durchgeführt. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für  $n=3$  voneinander unabhängige Experimente, wobei die humanen Fragmente mit zytoplasmatischen Proteinfractionen aus „1306“-Zellen inkubiert wurden, die Rattenfragmente mit zytoplasmatischen Proteinen aus WB-F344 Rattenleberepithelzellen. Als Kontrolle (Spur 8) diente ein nukleäres Proteinlysate aus unbehandelten WB-F344 Zellen.

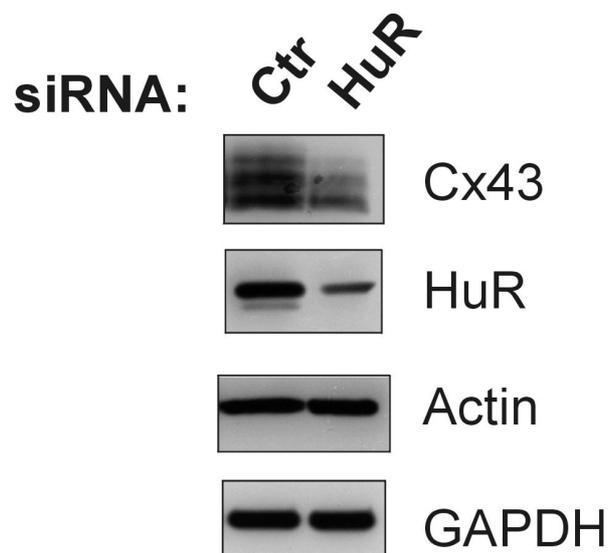
Obgleich HuR zu etwa 90 % nukleär vorliegt (vgl. Abb. 3.7), genügen die etwa 10 % zytosolisch vorliegender Proteine für die Stabilisierung von Ziel-mRNAs, wie dies am Beispiel der UV-induzierten Stabilisierung von p53-mRNA durch HuR gezeigt wurde (Mazan-Mamczarz *et al.*, 2003). Aus diesem Grunde wurden für die Inkubation zytoplasmatische Proteinextrakte verwendet, da im Zytoplasma die RNA-Stabilisierung mittels RNA-bindender Proteine stattfindet. Bislang ist noch nicht abschließend geklärt, inwieweit HuR durch das Pendeln ins Zytoplasma eine Konformationsänderung erfährt. Allerdings ist eindeutig belegt, dass HuR nukleär an die mRNA bindet und sie im Zytoplasma weiterhin stabilisiert (Gallouzi *et al.*, 2001). Auf bestimmte Stressoren wie zum Beispiel Actinomycin D findet ein verstärktes „Shuttling“ statt und HuR stabilisiert vermehrt Ziel-RNAs im Zytoplasma (Wang *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001; Lal *et al.*, 2004). Aus diesem Grund wurden überwiegend zytoplasmatische Fraktionen der Zellen bei den Versuchen eingesetzt weshalb die Zellen gemäß Kapitel 2.8.2 lysiert und ihre cytoplasmatische Fraktion isoliert wurde. Der Western Blot in Abbildung 3.7 gegen Histondeacetylase 1 (HDAC, überwiegend nukleär) und  $\beta$ -Tubulin (überwiegend zytoplasmatisch) weist das Gelingen der Fraktionierung nach.



**Abb. 3.7 Nachweis von Proteinen in WB-F344 Zellfraktionen:** HDAC 1 und Tubulin stehen stellvertretend für überwiegend zytoplasmatische ( $\beta$ -Tubulin) und nukleäre (HDAC 1) Proteine aus unbehandelten WB-F344 Rattenleberepithelzellen.

### 3.3 Regulation der Expression von Cx43 durch HuR

Um festzustellen, ob die Bindung von Cx43-mRNA durch HuR funktionelle Konsequenzen für die Cx43 Expression hat, wurden zelluläre HuR-Spiegel mittels siRNA verringert (siehe Kapitel 2.7). In Abbildung 3.8 wird mittels Western Blot gezeigt, dass in WB-F344 Zellen nach HuR-Depletion eine Abnahme des zellulären Cx43-Proteingehaltes erkennbar ist. Die Kontrollproteine GAPDH und Actin wurden durch die Behandlung der Zellen mit HuR-siRNA nicht beeinflusst; weder die RNA von GAPDH noch die von Actin besitzen eine HuR-Zielsequenzen in ihrer mRNA (Lopez de Silanes *et al.*, 2004). Zur Kontrolle diente eine Nonsens-siRNA.



**Abb. 3.8 Cx43-Spiegel nach HuR-Depletion:** WB-F344 Rattenleberepithelzellen wurden mit Kontroll-(Ctr) oder HuR-siRNA behandelt und anschließend per Western Blot auf die Gegenwart von Cx43 (43 kDa), HuR (34 kDa), GAPDH (36 kDa) und Actin (42 kDa) analysiert. Die gezeigten Daten sind repräsentativ für  $n = 3$  voneinander unabhängige Experimente.

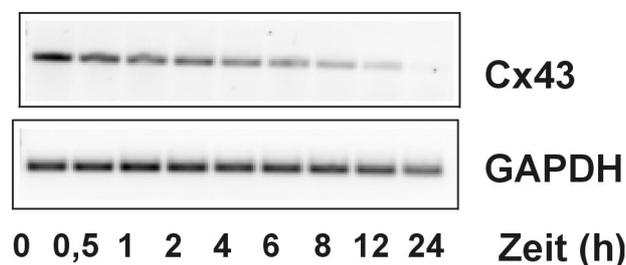
### 3.4 Einfluss von HuR auf die Stabilität der Cx43-mRNA

In den vorausgehenden Versuchen konnte gezeigt werden, dass HuR die Cx43-mRNA bindet und dass die Depletion von HuR dazu führt, dass zelluläre Cx43-Protein-Spiegel sinken. Im Weiteren wurde nun untersucht, inwieweit dies auf eine Änderung der mRNA-Stabilität von Cx43-mRNA zurückzuführen ist. Dazu wurde zunächst die Lebensdauer von Cx43-mRNA unter Behandlung mit Actinomycin D bestimmt. In einer weiteren Versuchsreihe wurden die Zellen zunächst zur Depletion von HuR mit siRNA vorinkubiert und dann die Halbwertszeit von Cx43-mRNA nach dem gleichen Schema bestimmt. Actinomycin D hemmt durch seine Einlagerung in die DNA die Transkription, so dass unter diesen Bedingungen die jeweils messbare zelluläre RNA-Menge nur noch durch ihren Abbau beeinflusst wird. Zum Vergleich wurde die mRNA der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) detektiert, da diese sich als relativ stabil erwies, HuR-unabhängig reguliert wird (Lopez de Silanes *et al.*, 2003; Lopez de Silanes *et al.*, 2004) und somit als Kontrolle zur Normierung geeignet war (vgl. Abb. 3.9). Mittels Densitometrie wurden die mRNA-Spiegel zu den einzelnen Zeitpunkten analysiert (vgl. 2.5).

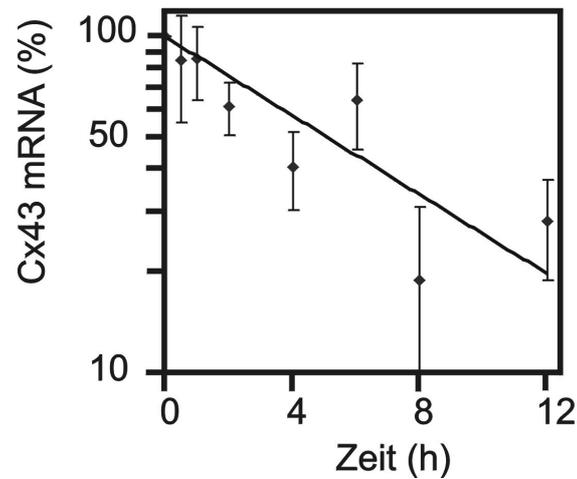
#### 3.4.1 Bestimmung der Lebensdauer von Connexin43 mRNA in Rattenleberepithelzellen

WB-F344 Rattenleberepithelzellen wurden mit Actinomycin D behandelt und bis zu 24 Stunden postinkubiert. Dabei wurde zu verschiedenen Zeitpunkten die RNA isoliert (vgl. 2.3) und per RT-PCR die vorhandene Cx43-mRNA-Menge detektiert (vgl. 2.5). Nach densitometrischer Analyse ergab sich eine Halbwertszeit der Cx43-mRNA von etwa 5 h

A



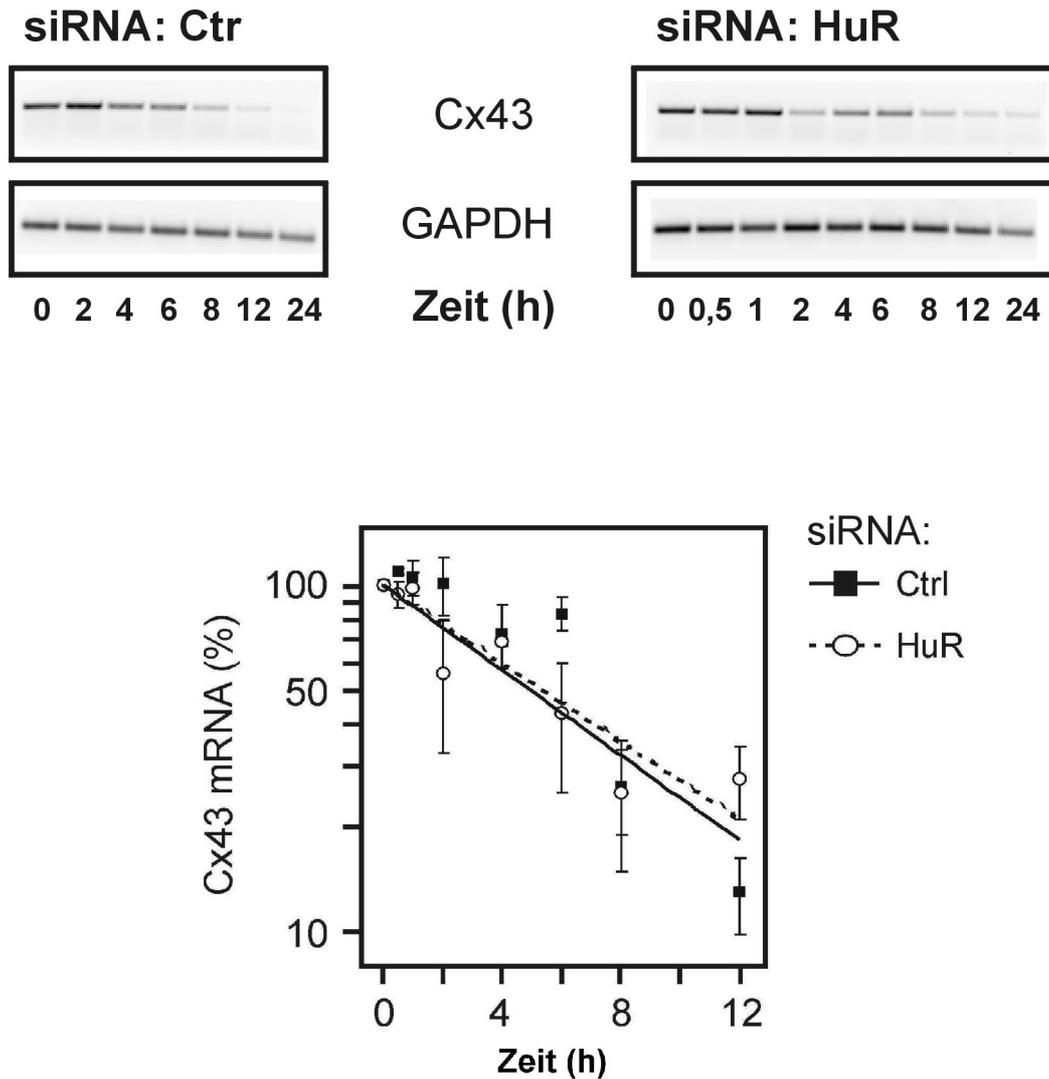
B



**Abb. 3.9 Lebensdauer der Cx43-mRNA** A: repräsentatives Agarosegel B: Densitometrische Auswertung; MW  $\pm$ SD (n = 3). WB-F344-Zellen werden mit Actinomycin D behandelt und anschließend die Cx43-RNA-Menge per RT-PCR bestimmt. Als Kontrolle diente die mRNA von GAPDH.

### 3.4.2 Einfluss der Depletion von HuR auf die Lebensdauer von Cx43

Analog zu 3.4.1 wurden WB-F344-Rattenleberepithelzellen zunächst für 30 h mit siRNA (Nonsens-siRNA oder HuR-siRNA) behandelt (vgl. 2.7) und anschließend mit Actinomycin D postinkubiert. Die Depletion von HuR wurde per Western Blot bestätigt (ohne Abbildung) und die Stabilität der Cx43-mRNA analog zu Kapitel 3.4.1 per RT-PCR bestimmt. Nach Agarosegelelektrophorese und densitometrischer Analyse zeigte sich allerdings kein signifikanter Einfluss der Depletion von HuR auf die Halbwertszeit der Cx43-mRNA, die weiterhin bei 5 h lag.



**Abb. 3.10 Lebensdauer von Cx43-mRNA nach siRNA-Behandlung** WB-F344-Rattenleberepithelzellen wurden zunächst mit Kontroll-siRNA oder HuR-siRNA inkubiert und anschließend die Transkription durch Actinomycin D inhibiert. Daraufhin wurde mittels RT-PCR die Cx43-mRNA-Menge und als Kontrolle die Menge der stabilen mRNA der GAPDH bestimmt. Die Abbildung zeigt repräsentative Agarosegele (oben) und densitometrische Analyse (unten; MW  $\pm$ SD, n = 3).

## 4. Diskussion

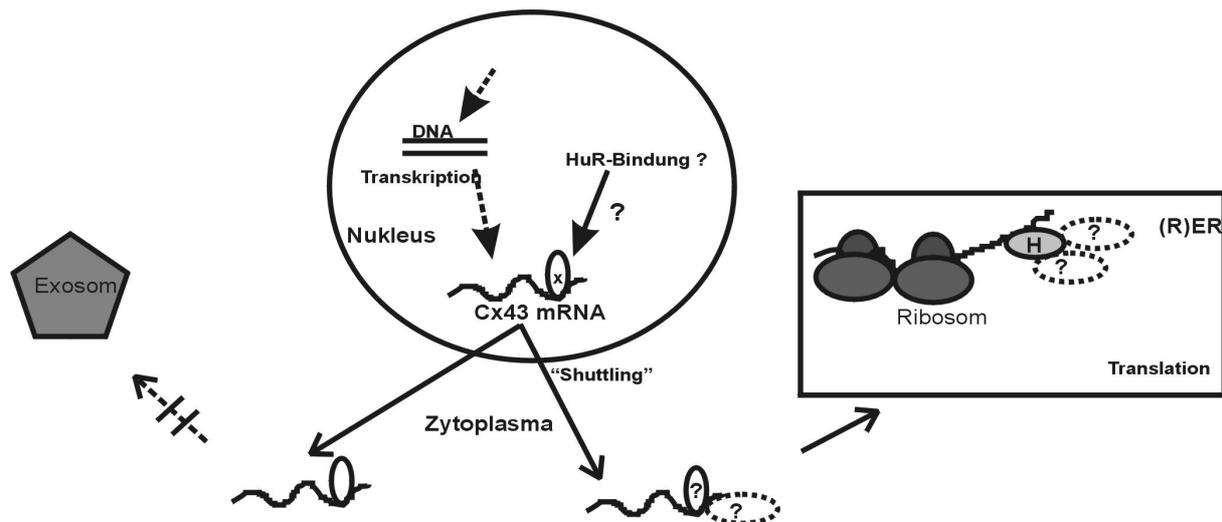
In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der Expression von Connexin43 (Cx43) an Rattenleberepithelzellen (WB-F344) und menschlichen Hautfibroblasten („1306“) untersucht. Hierbei war die Kontrolle auf posttranskriptioneller Ebene, d.h. auf Ebene der mRNA-Stabilität von Interesse.

### 4.1 Bindung von Cx43-mRNA durch HuR

HuR ist ein Protein, das in einer Vielzahl von Zellen zu einer Stabilisierung von mRNA führt. Deshalb wurde zunächst untersucht, ob HuR an die Cx43-mRNA bindet. In dieser Arbeit konnte durch zwei verschiedenen Versuchsansätze nachgewiesen werden, dass HuR an die Cx43-mRNA von Rattenleberepithelzellen und menschlichen Hautfibroblasten bindet (vgl. Kapitel 3.2). Verhält sich HuR im Falle der Cx43-mRNA wie bei seinen anderen Interaktionspartnern, müsste die mRNA stabilisiert und eine Verlängerung der Halbwertszeit der Cx43-mRNA nachweisbar werden (schematische Darstellung siehe Abbildung 4.1). In der Tat hatte Depletion von HuR eine deutliche Abnahme der ZZK um bis zu 80 % (hier nicht gezeigte Daten von Dr. Galbán) zur Folge. In Western Blot Analysen konnte zudem eine Abnahme der Cx43-Proteinmenge nachgewiesen werden. Hiervon war hauptsächlich der phosphorylierte Anteil von Cx43 betroffen. Eine Abnahme der Halbwertszeit der Cx43-mRNA nach HuR-Depletion war allerdings nicht festzustellen (vgl. Kapitel 3.4). Das wirft die Frage auf, ob HuR über eine Translationskontrolle, ähnlich Cytochrom *c* (*Cytc*), den Cx43-Spiegel beeinflusst (Kawai *et al.*, 2006). HuR und TIA-1 binden die 3'UTR von *Cytc*, HuR an drei verschiedenen Stellen (AU-reich), TIA-1 an einer bestimmten Stelle nahe der CDS. Ist HuR herunterreguliert, kommt es zu einer verringerten *de-novo* Synthese von *Cytc* sowohl in un- als auch behandelten Zellen. Es gibt allerdings eine konstante Basalrate an *Cytc*-Proteinsynthese. TIA-1 ist in un- und behandelten Zellen ein Suppressor der Translation, während HuR dafür sorgt, dass die mRNA zu translatierenden subzellulären Kompartimenten geleitet wird (Kawai *et al.*, 2006). Wird das Endoplasmatische Retikulum (ER) gestresst, z.B. durch Hitze, oxidativen Stress, Hyperosmolarität etc., verringert sich die *Cytc*-Proteinmenge, die mRNA-Menge bleibt jedoch gleich, da TIA-1 überwiegt.

Die genannten Daten legen den Schluss nahe, dass HuR keinen direkten Einfluss auf die Cx43-mRNA und die ZZK hat, sondern ein indirekter Mechanismus zum Tragen kommt. So interagiert Cx43 beispielsweise mit dem Mikrotubulussystem (Tubulin), tight junctions (ZO 1), E- und N-Cadherin und Matrix-Adhäsions-Rezeptoren (Vine und Bertram, 2002),

Proteinen also, die die ZVK modulieren können und ebenfalls über HuR reguliert werden könnten.



**Abbildung 4.1: Möglicher Weg der RNA-Bindung durch HuR:** HuR dient als Exportprotein und vermittelt normalerweise eine Stabilisierung der mRNA. Im Fall von Cx43 wird eine Bindung von HuR an die Cx43-mRNA nachgewiesen und die Proteinlevel sinken nach HuR-siRNA Behandlung aber eine verlängerte Cx43-mRNA HWZ kann nicht nachgewiesen werden. Führt also HuR dazu, dass vermehrt Translatiert wird oder ist HuR als eines von vielen Proteinen in einem RNP-Komplex an einer verstärkten Translation von Cx43 beteiligt?

## 4.2 HuR und Cx43 in der zellulären Reaktion auf Stress

Sowohl HuR als auch Cx43 zeigen verschiedene Antworten auf unterschiedliche Stressoren. Der Einfluss von HuR auf p21, ein wichtiges Zellzyklusprotein, war Mittelpunkt einiger Studien. Durch Supershift-Analysen wurde herausgefunden, dass bestimmte Stressoren (ActD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, MMS und PGA<sub>2</sub>) die cytoplasmatischen HuR-Spiegel erhöhen und die Bindung von HuR an p21 induzieren. Die durch UV-Bestrahlung induzierte Verlängerung der p21-HWZ ist ebenfalls HuR-abhängig; dazu wird HuR vermehrt aus dem Kern ins Zytoplasma exportiert (Wang *et al.*, 2000). Ein ERK-unabhängiger Anstieg der cytoplasmatischen HuR-Spiegel und eine ERK-vermittelte Assoziation zwischen 3'UTR der p21-mRNA und HuR führt bei der Behandlung von Zellen mit Prostaglandin A<sub>2</sub> zur Stabilisierung der p21-mRNA (Yang *et al.*, 2004). Durch UVC-Bestrahlung wird in Colocarcinom-(RKO-)Zellen die p53-Translation erhöht, was wiederum die Translation von p21 aktiviert (Mazan-Mamczarz *et al.*, 2003). Auch bei den Connexinen ist eine Veränderung durch diverse Stressoren beobachtbar.

Nach UVC-Bestrahlung einer somatischen Zelllinie, die normalerweise Cx43-mRNA und Protein exprimiert, verliert die Zelle die Möglichkeit zur GJC und wird ein aggressiver Tumor. In der Studie von Ehring und Kollegen (1998) fiel auf, dass es in Tumorzellen homologe Kommunikation ohne heterologe Kommunikation gibt. Das heißt, dass die Tumorzellen untereinander kommunizieren, zu dem umgebenden Gewebe allerdings nur ein minimaler Austausch an Färbemittel beobachtbar ist (Ehring *et al.*, 1998). Es stellt sich die Frage, inwieweit dies durch Interaktionen mit den für die GJC indirekt notwendigen Tight junctions/ Zelladhäsionsmoleküle verursacht wird (Meyer *et al.*, 1992). Andererseits sind alternative Glycosylierung und Mutationen in der extrazellulären Binde-Domäne denkbar (Garber *et al.*, 1997; Cesen-Cummings *et al.*, 1998). In humanen Keratinozyten war eine dosisabhängige 10-fache Erniedrigung des Cx-Spiegels nach UVA-Bestrahlung zu sehen, die mit einer vermehrten Internalisierung von Cx43 einherging. Die UVA-Bestrahlung beschädigte ebenfalls das Aktin-Zytoskelett, gezeigt von Provost und Kollegen (2003) durch das Verschwinden der Mikrofilamente. UVA veränderte die Menge an Cx-Protein nicht, führte aber zu einer Umverteilung der Cx-Proteinanteile zugunsten des unphosphorylierten Cx. Anhand weiterer Versuche konnte gezeigt werden, dass diese unphosphorylierten Proteine in der Erholungsphase der Zellen nach Beendigung der Stress-Behandlung de novo synthetisiert werden (Provost *et al.*, 2003).

AMPK ist ein Enzym, das die zelluläre Stress-Antwort, beispielsweise auf virale Infektionen und metabolischen Stress, einleitet. Verringert AMPK cytoplasmatische HuR-Level, führt dies zu einer verringerten Anzahl und kürzeren HWZ der mRNAs von p21, CyclinA und -B. AMPK führt zu einer Inhibierung der Translokation von HuR ins Zytoplasma, was zur Folge hat, dass die Ziel-RNA von HuR nicht mehr stabilisiert werden (Wang *et al.*, 2002).

Im Fall von Cx43 führt Hitze zu einer verstärkten Phosphorylierung und somit zu einem vermehrten Wegfall der GJC. Diese Ergebnisse von Hamada und Kollegen (2003) implizieren, dass GJC gegen Hitze schützt und der Wegfall (z.B. in Krebszellen) zu einer verstärkten Anfälligkeit gegenüber Hyperthermie führt. Persistierender Hitzeschock führt zu einer Abnahme der unphosphorylierten Banden und einer Zunahme der doppelt phosphorylierten Banden im Western Blot (Hamada *et al.*, 2003). Es gibt einige Studien, die zeigen, dass hitzeschockvermittelter Zelltod durch Desmosomen und sogenannte „tight junctions“ erleichtert wird (Ning und Hahn, 1994) und dass einige Zelladhäsionsproteine mit Cx43 assoziiert sind (Toyofuku *et al.*, 1998; Kojima *et al.*, 1999; Yano *et al.*, 2001). Nach Hitzeschock findet sich HuR hauptsächlich nukleär an mRNAs, die stressinduziert daraufhin einen dramatischen Anstieg der Halbwertszeit zu verzeichnen haben (Gallouzi *et al.*, 2000).

Hitze führt ebenfalls dazu, dass das ER gestresst wird und HuR die Translation von *Cytc* nicht mehr fördert (Kawai *et al.*, 2006). Die Stabilisation verschiedenster RNAs durch HuR scheint an eine Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK) gekoppelt zu sein, was mit einer niedrigeren Rate an IL-3-mRNA in Mastzellen korreliert ist (Ming *et al.*, 1998). ERK, JNK, p38, PKC und Pi3-Kinase ändern allerdings nicht die cytoplasmatischen HuR-Spiegel (Wang *et al.*, 2002). Die Aktivierung von JNK führt zu einer signifikanten Erniedrigung von Cx43 sowohl auf mRNA als auch auf Proteinebene (Petrich *et al.*, 2002).

### 4.3 Cx43 und HuR in der Karzinogenese

Cx43 spielt laut einer Metaanalyse von Trosko und Ruch (1998) eine entscheidende Rolle in der Karzinogenese. Anhand der vorhandenen Literatur unterstützen sie die These, dass eine Tumorprogression nur durch die Zerstörung der heterologen Kommunikation, d.h. die Kommunikation zwischen unterschiedlichen Geweben, zustande kommen kann. Dabei beschreiben sie nicht nur die interzelluläre Kommunikation, sondern auch die intra- und extra-zelluläre Kommunikation, beispielsweise über Signalkaskaden und Hormone. Trosko und Ruch legen ein besonderes Augenmerk auf die Rolle von Connexinen und die interzelluläre Kommunikation. Die GJC ist notwendig, um eine Kontaktinhibition zu vermitteln und gegebenenfalls Todesstoffe in benachbarte Zellen zu schleusen. Wie in vielen Versuchen beobachtet, ist die ZZK in den meisten soliden Tumoren vermindert. Allerdings ist in den wenigsten Fällen eine Mutation des Cx-Gens daran beteiligt. Zumeist handelt es sich um epigenetische oder posttranskriptionelle Mechanismen, die in die Funktion von Cx eingreifen. Anzuführen wären die Methylierung des Promotors (Piechocki *et al.*, 1999), die Verminderte Assoziation der Cx-mRNA mit Polysomen, der falsche Aufbau des Cx-Proteins, da z.B. ein Pseudogen transkribiert wurde (Kandouz *et al.*, 2004), die „Fehl“-Phosphorylierung von Cx, die Hypophosphorylierung und der damit einhergehende Internalisierungsmechanismus sowie der verfrühte Abbau von Cx. Es gibt allerdings auch Mechanismen in der Karzinogenese, die nur indirekt auf Cx einwirken. Ein fehlerhafter Zusammenbau von Adhäsionsproteinen beispielsweise führt zu einer Disaggregation der Gap Junctionalen Plaques und verhindert so die ZZK. Ebenfalls führt das verbleiben in der S-Phase des Zellzyklus dazu, dass Cx internalisiert bleibt und nicht in die Zellmembran eingebaut wird.

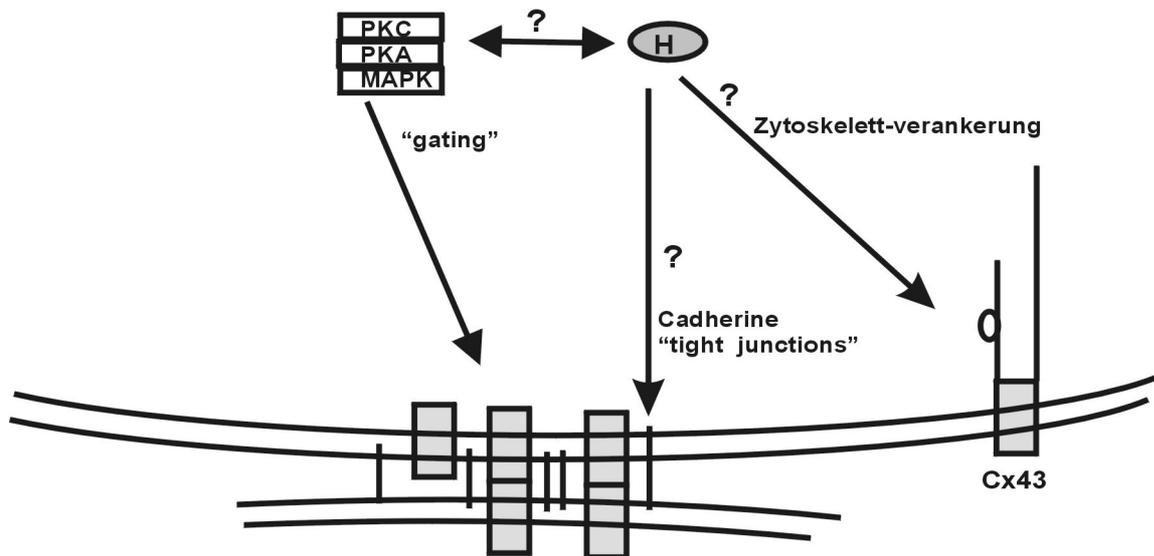
Andererseits gibt es neuere Studien, die darauf hinweisen, dass Cx wichtig für die Metastasierung ist. In diesem Zusammenhang wurde bei Brustkrebs darauf hingewiesen, dass die Filiae über funktionelles Cx verfügen und eine Kommunikation der metastatischen Zelle mit dem Invasionsgewebe besteht. Ebenfalls ein Sonderfall scheinen Hirntumore zu sein. Das Glioblastom ist umso aggressiver, je besser die Fähigkeit der Zellen zur Kommunikation mit

den umgebenden Astrogliazellen ist. Auch HuR ist in allen Hirntumoren zu finden, wobei es signifikant höhere Level in Tumoren mit höherer Malignität (Medullo-/Glioblastom) gibt (Nabors *et al.*, 2001). Generell ist HuR in malignen Tumoren (Blaxall *et al.*, 2000) signifikant mehr vertreten als in benignen. Da neoplastische Transformation unter Anderem auf einer Blockierung der Apoptose beruht, ist ein Einfluss von HuR in einigen Zellsystemen berechtigterweise anzunehmen. Lal und Kollegen fanden 2005 heraus, dass HuR durch eine Stabilisierung und die HuR-vermittelte vermehrte Translation von Prothymosin $\alpha$  zu einer Aktivierung antiapoptotischer Zellprogramme führt (Lal *et al.*, 2005).

Ein weiterer wichtiger Einflussfaktor der Tumorprogression ist HuR. Lopez de Silanes und ihre Kollegen haben Colonkarzinomzellen (RKO) untersucht und herausgefunden, dass die Größe und Invasivität des Tumors in direktem Zusammenhang mit der zytosolischen HuR-Fraktion stand. Dies erklärten sich Lopez de Silanes und ihre Kollegen mit der Fähigkeit von HuR, bestimmte mRNAs zu stabilisieren. Zu diesen stabilisierten mRNAs gehören vor allem Zellzyklusproteine wie CyclinD, p21 und einige weitere. Darüber hinaus wird die Proliferation der Zellen angeregt und eine erhöhte Zahl an neoplastisch transformierten Zellen entsteht. Auch die Erstbeschreibung des paraneoplastischen Enzephalomyelopathie-Komplex als Hu-Syndrom weist auf eine Rolle von HuR in der Karzinogenese hin (Dalmau *et al.*, 1991; Szabo *et al.*, 1991).

### 4.4 Fazit und Ausblick

Bislang ist nicht klar, ob HuR als einzelnes Protein die mRNA bindet oder zu einem Komplex mit anderen Proteinen zusammengelagert werden muss, um seine Funktion zu erfüllen, wobei es einen Hinweis hierfür gibt (Wang *et al.*, 2000). Verschiedene HuR-Konformationen, eine unterschiedliche Phosphorylierung von HuR und die Möglichkeit spezieller Untereinheiten sind denkbar (Wang *et al.*, 2000). Noch weitere RBP (bsp: AUF-1, KSRP, TTP, G3BP, PTB, PABP, TIA-1, TIAR und andere) kommen für die Bindung AU-reicher Elemente der 3'UTR von Cx43 in Frage, die noch näher untersucht werden müssen (schematische Darstellung siehe Abb.4.2). Da Connexine stark auf ein intaktes Zytoskelett und das Vorhandensein von Zelladhäsionsmolekülen angewiesen sind, eröffnet sich hier ein weiteres, neues Feld für mögliche Interaktionen.



**Abbildung 4.2: Mögliche indirekte Regulationswege für HuR und Cx43:** HuR könnte über eine Stabilisierung bestimmter Kinasen einen Einfluss auf den Tormechanismus („gating“) der Gap Junctions nehmen. Auch wäre denkbar, dass durch das Eingreifen in die Proteinbiosynthese von Zelladhäsionsmolekülen und Zytoskelettproteinen indirekt auf die Funktionsfähigkeit von Gap Junctions eingewirkt wird.

## 5. Zusammenfassung

Gap Junctions sind Ansammlungen von Zell-Zell-Kanälen, die die Zytoplasmen benachbarter Zellen miteinander verbinden und die regulierte interzelluläre Diffusion niedermolekularer Stoffe (< 1 kDa) erlauben. Die interzelluläre Kommunikation über Gap Junctions („gap junctional communication“, GJC) wird sowohl posttranslational (beispielsweise durch Phosphorylierung der Connexine) als auch auf Ebene der Connexin-Biosynthese reguliert.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob eine Regulation der Connexinbiosynthese und damit der GJC posttranskriptionell über Modulation der mRNA-Stabilität erfolgt. Dazu wurde die 3'-untranslatierte Region (3'UTR) der mRNA des in den untersuchten Zellen (WB-F344-Rattenleberepithelzellen und menschliche Hautfibroblasten) vornehmlich exprimierten Connexins, Cx43, kloniert. Bindestudien auf Basis von Protein/mRNA-Kopräzipitationsansätzen ergaben, dass das mRNA stabilisierende Protein HuR die 3'UTR der Cx43-mRNA bindet. In der Tat hatte die Depletion zellulärer HuR-Spiegel durch siRNA sowohl den Verlust von Cx43 als auch der GJC zur Folge. Analysen der Stabilität der Cx43-mRNA in Rattenleberepithelzellen ergaben eine Halbwertszeit von etwa fünf Stunden. Trotz Bindung von HuR an die Cx43-mRNA war nach Depletion des zellulären HuR mittels siRNA keine messbare Veränderung der Halbwertszeit der mRNA feststellbar. Aus diesem Grunde muss gefolgert werden, dass HuR den zellulären Spiegel von Cx43 und die GJC zwar reguliert, dieses jedoch indirekt, also nicht über Regulation der Stabilität der Cx43-mRNA, erfolgt.

## 6. Literatur

- Atasoy, U., Watson, J., et al. (1998).** "ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is upregulated during serum stimulation and T cell activation." *J Cell Sci* 111 (Pt 21): 3145-56.
- Bennett, M. V., Barrio, L. C., et al. (1991).** "Gap junctions: new tools, new answers, new questions." *Neuron* 6(3): 305-20.
- Bergoffen, J., Scherer, S. S., et al. (1993).** "Connexin mutations in X-linked Charcot-Marie-Tooth disease." *Science* 262(5142): 2039-42.
- Bex, V., Mercier, T., et al. (1995).** "Retinoic acid enhances connexin43 expression at the post-transcriptional level in rat liver epithelial cells." *Cell Biochem Funct* 13(1): 69-77.
- Bi, W. L., Parysek, L. M., et al. (1993).** "In vitro evidence that metabolic cooperation is responsible for the bystander effect observed with HSV tk retroviral gene therapy." *Hum Gene Ther* 4(6): 725-31.
- Blaxall, B. C., Dwyer-Nield, L. D., et al. (2000).** "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." *Mol Carcinog* 28(2): 76-83.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Brennan, C. M. and Steitz, J. A. (2001).** "HuR and mRNA stability." *Cell Mol Life Sci* 58(2): 266-77.
- Carystinos, G. D., Alaoui-Jamali, M. A., et al. (2001).** "Upregulation of gap junctional intercellular communication and connexin 43 expression by cyclic-AMP and all-trans-retinoic acid is associated with glutathione depletion and chemosensitivity in neuroblastoma cells." *Cancer Chemother Pharmacol* 47(2): 126-32.

- Cesen-Cummings, K., Fernstrom, M. J., et al. (1998).** "Frequent reduction of gap junctional intercellular communication and connexin43 expression in human and mouse lung carcinoma cells." *Carcinogenesis* 19(1): 61-7.
- Chaumontet, C., Bex, V., et al. (1994).** "Apigenin and tangeretin enhance gap junctional intercellular communication in rat liver epithelial cells." *Carcinogenesis* 15(10): 2325-30.
- Chen, C. Y. and Shyu, A. B. (1995).** "AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation." *Trends Biochem Sci* 20(11): 465-70.
- Clairmont, A., Tessmann, D., et al. (1996).** "Analysis of connexin43 gene expression induced by retinoic acid in F9 teratocarcinoma cells." *FEBS Lett* 397(1): 22-4.
- Dalmau, J., Furneaux, H. M., et al. (1991).** "Detection of the anti-Hu antibody in specific regions of the nervous system and tumor from patients with paraneoplastic encephalomyelitis/sensory neuronopathy." *Neurology* 41(11): 1757-64.
- Dean, J. L., Wait, R., et al. (2001).** "The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR." *Mol Cell Biol* 21(3): 721-30.
- Di, W. L., Rugg, E. L., et al. (2001).** "Multiple epidermal connexins are expressed in different keratinocyte subpopulations including connexin 31." *J Invest Dermatol* 117(4): 958-64.
- Dixon, D. A., Tolley, N. D., et al. (2001).** "Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells." *J Clin Invest* 108(11): 1657-65.
- Ehring, G. R., Antoniono, R. J., et al. (1998).** "Gap junction expression following UVC-induced neoplastic transformation in human hybrid cell lines." *Carcinogenesis* 19(12): 2085-93.
- Fan, X. C. and Steitz, J. A. (1998).** "Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs." *EMBO J* 17(12): 3448-60.

- Figueroa, A., Cuadrado, A., et al. (2003).** "Role of HuR in skeletal myogenesis through coordinate regulation of muscle differentiation genes." *Mol Cell Biol* 23(14): 4991-5004.
- Fischer, R., Reinehr, R., et al. (2005).** "Intercellular communication via gap junctions in activated rat hepatic stellate cells." *Gastroenterology* 128(2): 433-48.
- Gallouzi, I. E., Brennan, C. M., et al. (2001).** "Protein ligands mediate the CRM1-dependent export of HuR in response to heat shock." *Rna* 7(9): 1348-61.
- Gallouzi, I. E., Brennan, C. M., et al. (2000).** "HuR binding to cytoplasmic mRNA is perturbed by heat shock." *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(7): 3073-8.
- Garber, S. A., Fernstrom, M. J., et al. (1997).** "Altered gap junctional intercellular communication in neoplastic rat esophageal epithelial cells." *Carcinogenesis* 18(6): 1149-53.
- George, C. H., Kendall, J. M., et al. (1999).** "Intracellular trafficking pathways in the assembly of connexins into gap junctions." *J Biol Chem* 274(13): 8678-85.
- Goodenough, D. A., Goliger, J. A., et al. (1996).** "Connexins, connexons, and intercellular communication." *Annu Rev Biochem* 65: 475-502.
- Goodenough, D. A. and Paul, D. L. (2003).** "Beyond the gap: functions of unpaired connexon channels." *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(4): 285-94.
- Hamada, N., Kodama, S., et al. (2003).** "Gap junctional intercellular communication and cellular response to heat stress." *Carcinogenesis* 24(11): 1723-8.
- Hu, J., Speisky, H., et al. (1995).** "The inhibitory effects of boldine, glaucine, and probucol on TPA-induced down regulation of gap junction function. Relationships to intracellular peroxides, protein kinase C translocation, and connexin 43 phosphorylation." *Biochem Pharmacol* 50(10): 1635-43.
- Huang, R. P., Hossain, M. Z., et al. (2001).** "Connexin 43 (cx43) enhances chemotherapy-induced apoptosis in human glioblastoma cells." *Int J Cancer* 92(1): 130-8.

- Inoue**, M., Muto, Y., et al. (2000). "NMR studies on functional structures of the AU-rich element-binding domains of Hu antigen C." *Nucleic Acids Res* 28(8): 1743-50.
- Kanczuga-Koda**, L., Sulkowski, S., et al. (2006). "Increased expression of connexins 26 and 43 in lymph node metastases of breast cancer." *J Clin Pathol* 59(4): 429-33.
- Kandouz**, M., Bier, A., et al. (2004). "Connexin43 pseudogene is expressed in tumor cells and inhibits growth." *Oncogene* 23(27): 4763-70.
- Kawai**, T., Lal, A., et al. (2006). "Translational control of cytochrome c by RNA-binding proteins TIA-1 and HuR." *Mol Cell Biol* 26(8): 3295-307.
- Kelsell**, D. P., Dunlop, J., et al. (1997). "Connexin 26 mutations in hereditary non-syndromic sensorineural deafness." *Nature* 387(6628): 80-3.
- Kiehn**, O. and Tresch, M. C. (2002). "Gap junctions and motor behavior." *Trends Neurosci* 25(2): 108-15.
- Klotz**, L. O., Patak, P., et al. (2002). "2-Methyl-1,4-naphthoquinone, vitamin K(3), decreases gap-junctional intercellular communication via activation of the epidermal growth factor receptor/extracellular signal-regulated kinase cascade." *Cancer Res* 62(17): 4922-8.
- Kojima**, T., Sawada, N., et al. (1999). "Induction of tight junctions in human connexin 32 (hCx32)-transfected mouse hepatocytes: connexin 32 interacts with occludin." *Biochem Biophys Res Commun* 266(1): 222-9.
- Krutovskikh**, V. and Yamasaki, H. (1997). "The role of gap junctional intercellular communication (GJIC) disorders in experimental and human carcinogenesis." *Histol Histopathol* 12(3): 761-8.
- Kullmann**, M., Gopfert, U., et al. (2002). "ELAV/Hu proteins inhibit p27 translation via an IRES element in the p27 5'UTR." *Genes Dev* 16(23): 3087-99.
- Kumar**, N. M. and Gilula, N. B. (1996). "The gap junction communication channel." *Cell* 84(3): 381-8.

- Kwiatkowski, A. P., Baker, T. K., et al. (1994).** "Comparison of glucocorticoid-mediated changes in the expression and function of rat hepatocyte gap junctional proteins." *Carcinogenesis* 15(8): 1753-7.
- Laing, J. G. and Beyer, E. C. (1995).** "The gap junction protein connexin43 is degraded via the ubiquitin proteasome pathway." *J Biol Chem* 270(44): 26399-403.
- Laing, J. G., Tadros, P. N., et al. (1997).** "Degradation of connexin43 gap junctions involves both the proteasome and the lysosome." *Exp Cell Res* 236(2): 482-92.
- Laird, D. W. (1996).** "The life cycle of a connexin: gap junction formation, removal, and degradation." *J Bioenerg Biomembr* 28(4): 311-8.
- Laird, D. W., Castillo, M., et al. (1995).** "Gap junction turnover, intracellular trafficking, and phosphorylation of connexin43 in brefeldin A-treated rat mammary tumor cells." *J Cell Biol* 131(5): 1193-203.
- Lal, A., Kawai, T., et al. (2005).** "Antiapoptotic function of RNA-binding protein HuR effected through prothymosin alpha." *Embo J* 24(10): 1852-62.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., et al. (2004).** "Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs." *Embo J* 23(15): 3092-102.
- Lampe, P. D. and Lau, A. F. (2000).** "Regulation of gap junctions by phosphorylation of connexins." *Arch Biochem Biophys* 384(2): 205-15.
- Larsen, W. J. and Hai, N. (1978).** "Origin and fate of cytoplasmic gap junctional vesicles in rabbit granulosa cells." *Tissue Cell* 10(3): 585-98.
- Lefebvre, D. L., Piersanti, M., et al. (1995).** "Myometrial transcriptional regulation of the gap junction gene, connexin-43." *Reprod Fertil Dev* 7(3): 603-11.
- Loewenstein, W. R. and Kanno, Y. (1966).** "Intercellular communication and the control of tissue growth: lack of communication between cancer cells." *Nature* 209(29): 1248-9.
- Lopez de Silanes, I., Fan, J., et al. (2003).** "Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis." *Oncogene* 22(46): 7146-54.

- Lopez de Silanes, I., Zhan, M., et al. (2004).** "Identification of a target RNA motif for RNA-binding protein HuR." *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(9): 2987-92.
- Ma, W. J., Cheng, S., et al. (1996).** "Cloning and characterization of HuR, a ubiquitously expressed Elav-like protein." *J Biol Chem* 271(14): 8144-51.
- Mazan-Mamczarz, K., Galban, S., et al. (2003).** "RNA-binding protein HuR enhances p53 translation in response to ultraviolet light irradiation." *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(14): 8354-9.
- Meyer, R. A., Laird, D. W., et al. (1992).** "Inhibition of gap junction and adherens junction assembly by connexin and A-CAM antibodies." *J Cell Biol* 119(1): 179-89.
- Miller, A. D., Curran, T., et al. (1984).** "c-fos protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene." *Cell* 36(1): 51-60.
- Ming, X. F., Kaiser, M., et al. (1998).** "c-jun N-terminal kinase is involved in AUUUA-mediated interleukin-3 mRNA turnover in mast cells." *EMBO J* 17(20): 6039-48.
- Musil, L. S. and Goodenough, D. A. (1991).** "Biochemical analysis of connexin43 intracellular transport, phosphorylation, and assembly into gap junctional plaques." *J Cell Biol* 115(5): 1357-74.
- Myer, V. E., Fan, X. C., et al. (1997).** "Identification of HuR as a protein implicated in AUUUA-mediated mRNA decay." *EMBO J* 16(8): 2130-9.
- Nabors, L. B., Gillespie, G. Y., et al. (2001).** "HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs." *Cancer Res* 61(5): 2154-61.
- Nagaoka, K., Suzuki, T., et al. (2006).** "Stability of casein mRNA is ensured by structural interactions between the 3'-untranslated region and poly(A) tail via the HuR and poly(A)-binding protein complex." *Biochim Biophys Acta* 1759(3-4): 132-40.

- Nicolai**, S., Sies, H., et al. (1997). "Stimulation of gap junctional intercellular communication by thalidomide and thalidomide analogs in human skin fibroblasts." *Biochem Pharmacol* 53(10): 1553-7.
- Ning**, S. and Hahn, G. M. (1994). "Formation of tight junctions and desmosomes protects MDCK cells against hyperthermic killing." *J Cell Physiol* 160(2): 249-54.
- Penalva**, L. O., Tenenbaum, S. A., et al. (2004). "Gene expression analysis of messenger RNP complexes." *Methods Mol Biol* 257: 125-34.
- Peng**, S. S., Chen, C. Y., et al. (1998). "RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein." *EMBO J* 17(12): 3461-70.
- Petrich**, B. G., Gong, X., et al. (2002). "c-Jun N-terminal kinase activation mediates downregulation of connexin43 in cardiomyocytes." *Circ Res* 91(7): 640-7.
- Pfeifer**, I., Anderson, C., et al. (2004). "Redefining the structure of the mouse connexin43 gene: selective promoter usage and alternative splicing mechanisms yield transcripts with different translational efficiencies." *Nucleic Acids Res* 32(15): 4550-62.
- Piechocki**, M. P., Burk, R. D., et al. (1999). "Regulation of connexin32 and connexin43 gene expression by DNA methylation in rat liver cells." *Carcinogenesis* 20(3): 401-6.
- Provost**, N., Moreau, M., et al. (2003). "Ultraviolet A radiation transiently disrupts gap junctional communication in human keratinocytes." *Am J Physiol Cell Physiol* 284(1): C51-9.
- Raineri**, I., Wegmueller, D., et al. (2004). "Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference." *Nucleic Acids Res* 32(4): 1279-88.
- Rogers**, M., Berestecky, J. M., et al. (1990). "Retinoid-enhanced gap junctional communication is achieved by increased levels of connexin 43 mRNA and protein." *Mol Carcinog* 3(6): 335-43.
- Ruch**, R. J. and Trosko, J. E. (1999). "The role of oval cells and gap junctional intercellular communication in hepatocarcinogenesis." *Anticancer Res* 19(6A): 4831-8.

- Russell, J. E. and Liebhaber, S. A. (1996).** "The stability of human beta-globin mRNA is dependent on structural determinants positioned within its 3' untranslated region." *Blood* 87(12): 5314-23.
- Simon, A. M. and Goodenough, D. A. (1998).** "Diverse functions of vertebrate gap junctions." *Trends Cell Biol* 8(12): 477-83.
- Stahl, W., Nicolai, S., et al. (1994).** "Vitamin D influences gap junctional communication in C3H/10T 1/2 murine fibroblast cells." *FEBS Lett* 352(1): 1-3.
- Stock, A., Sies, H., et al. (1998).** "Enhancement of gap junctional communication and connexin43 expression by thyroid hormones." *Biochem Pharmacol* 55(4): 475-9.
- Szabo, A., Dalmau, J., et al. (1991).** "HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to Elav and Sex-lethal." *Cell* 67(2): 325-33.
- Towbin, H., Staehelin, T., et al. (1979).** "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9): 4350-4.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., et al. (1998).** "Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes." *J Biol Chem* 273(21): 12725-31.
- Trosko, J. E. and Ruch, R. J. (1998).** "Cell-cell communication in carcinogenesis." *Front Biosci* 3: d208-36.
- Ubeda, A., Trillo, M. A., et al. (1995).** "Melatonin enhances junctional transfer in normal C3H/10T1/2 cells." *Cancer Lett* 91(2): 241-5.
- Vine, A. L. and Bertram, J. S. (2002).** "Cancer chemoprevention by connexins." *Cancer Metastasis Rev* 21(3-4): 199-216.
- Wang, W., Caldwell, M. C., et al. (2000).** "HuR regulates cyclin A and cyclin B1 mRNA stability during cell proliferation." *EMBO J* 19(10): 2340-50.
- Wang, W., Fan, J., et al. (2002).** "AMP-activated kinase regulates cytoplasmic HuR." *Mol Cell Biol* 22(10): 3425-36.

- Wang, W., Furneaux, H., et al. (2000).** "HuR regulates p21 mRNA stabilization by UV light." *Mol Cell Biol* 20(3): 760-9.
- Wang, W., Yang, X., et al. (2001).** "Loss of HuR is linked to reduced expression of proliferative genes during replicative senescence." *Mol Cell Biol* 21(17): 5889-98.
- Willecke, K., Eiberger, J., et al. (2002).** "Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome." *Biol Chem* 383(5): 725-37.
- Willecke, K., Heynkes, R., et al. (1991).** "Mouse connexin37: cloning and functional expression of a gap junction gene highly expressed in lung." *J Cell Biol* 114(5): 1049-57.
- Yancey, S. B., Nicholson, B. J., et al. (1981).** "The dynamic state of liver gap junctions." *J Supramol Struct Cell Biochem* 16(3): 221-32.
- Yang, X., Wang, W., et al. (2004).** "Prostaglandin A2-mediated stabilization of p21 mRNA through an ERK-dependent pathway requiring the RNA-binding protein HuR." *J Biol Chem* 279(47): 49298-306.
- Yano, T., Hernandez-Blazquez, F. J., et al. (2001).** "Reduction of malignant phenotype of HEPG2 cell is associated with the expression of connexin 26 but not connexin 32." *Carcinogenesis* 22(10): 1593-600.
- Yu, W., Dahl, G., et al. (1994).** "The connexin43 gene is responsive to oestrogen." *Proc Biol Sci* 255(1343): 125-32.
- Zhang, W., Wagner, B. J., et al. (1993).** "Purification, characterization, and cDNA cloning of an AU-rich element RNA-binding protein, AUF1." *Mol Cell Biol* 13(12): 7652-65.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

Ak	Antikörper
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	AU-reiche Elemente
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
CRM1	chromosome maintenance-1
Cx	Connexin
Cx43	Connexin43
Cytc	Cytochrom <i>c</i>
ddH <sub>2</sub> O	zweifach autoklaviertes Wasser
DMEM	Dulbecco's modification of Eagle's minimal essential medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELAV	embryonic lethal abnormal vision
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	extrazellulär regulierte Kinasen
FCS	Fötale Kalbserum (fetal calf serum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
GM-CSF	Granulozyten Makrophagen Colonie stimulierender Faktor
HDAC	Histondeacetylase
HRP	Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase)
HWZ	Halbwertszeit
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kDa	kilo Dalton
MAPK	mitogen aktivierte Proteinkinasen
mRNP	mRNA bindendes Protein
NTP	Nukleosidtriphosphat
PAA	Polyacrylamid

PAS	Protein A Sepharose
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RBP	RNA-bindendes Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per minute)
rNTP	ribo Nukleosidtriphosphat
RNP	Ribonukleoprotein
RRM	RNA recognition motif
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
siRNA	small interfering RNA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan
Trn2	Transportin-2
UTR	untranslatierte Region
v/v	volume/volume, ml Volumen in 100 ml Gesamtvolumen
w/v	weight/volume, g Substanz in 100 ml Gesamtvolumen
ZZK	Zell-Zell-Kommunikation

## 8. Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. Lars-Oliver Klotz danke ich für die freundliche Betreuung, für die Einweisung in die Methoden und für das Korrekturlesen dieser Arbeit. Nicht zuletzt bin ich aufrichtig dankbar für die gewinnbringende Zusammenarbeit, für die Einweisung in wissenschaftliches Arbeiten und dafür, dass er mir dieses interessante Thema anvertraute.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Professor Dr. Dr. Helmut Sies für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Universitätsprofessor Dr. Axel Gödecke danke ich sehr für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Stefanie Galbàn für Ihre Geduld, ihre Erklärungsbereitschaft und Unterstützung.

Für ausgezeichnetes Arbeitsklima und vielerlei Hilfestellungen in fachlichen und anderen Fragen danke ich den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Klotz sowie den anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie I der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Darüber hinaus gilt mein Dank besonders meinen Laborkollegen Claudia von Montfort, Dominik Fugmann und den Assistentinnen Andrea Borchard und Elisabeth Sauerbier für ihre Hilfsbereitschaft aber auch die vielen schönen Tage im Labor.

Schließlich danke ich von ganzem Herzen meinen Freunden und meiner Familie für die stete Unterstützung in allen Belangen.

Den größten Dank schulde ich jedoch meinem Mann Volker, der so manche Laune und Phase, insbesondere gegen Ende dieser Dissertation, gleichmütig ertragen und mir sehr viel Kraft gegeben hat. Ohne ihn wäre diese Arbeit nicht entstanden.

## Lebenslauf

### Pers. Daten:

Name: Christiane Hedwig Sobieroy, geb. Tepe  
Dietrich-Bonhoeffer-Str.8  
61440 Oberursel

Geburtsdatum: 13.01.1979

Geburtsort: Ibbenbüren

Familienstand: verheiratet

Religion: römisch-katholisch

Hobby's: Lesen, Chor, Viola, Taiji Quan

### Beruflicher Werdegang:

1985-89: St. Georg Grundschule Hopsten

1989-98: priv. bisch. Fürstenberggymnasium Recke

1998-2001: Krankenpflegeausbildung an der Akademie für Gesundheitsberufe „Alte Michaelschule“ Rheine

2001-2007: Medizinstudium an der Heinrich Heine Universität Düsseldorf

01/08- 06/08 Assistenzärztin der hämato-onkologischem Abteilung des St. Johannes Hospitals Duisburg

Seit 08/2008 Assistenzärztin der kardiologischen Abteilung der Hochtaunuskliniken Bad Homburg

Doktorarbeit: 2003-2008: „Regulation der Expression von Connexin43 durch HuR“ am Institut für Biochemie und Molekularbiologie I der HHU Düsseldorf.

### Ehrenamtliche Tätigkeit:

1996-99 Jugendgruppenleiterin und Ersthelferin beim Roten Kreuz Hopsten

1998-2002 Jugendgruppenleiterin und Sanitäterin beim Malteser Hilfsdienst Rheine

1998-99: Rettungssanitäterausbildung beim Malteser Rheine in Zusammenarbeit mit der Akademie für Gesundheitsberufe „Alte Michaelschule“ Rheine