

Aus dem Institut für Vegetative Physiologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

„Bedeutung des endoplasmatischen Retikulums für die mRNA
Translation unter Hypoxie“

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jonas J. Staudacher

aus Ravensburg

Datum der Promotion: 26.02.2016

Inhaltsverzeichnis:

ABSTRAKT	3
ABSTRACT	5
EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	7
AUSFÜHRLICHE ANTEILSERKLÄRUNG AN DER ERFOLGTEN PUBLIKATION	8
AUSZUG AUS DER JOURNAL SUMMARY LIST (ISI WEB OF KNOWLEDGE SM).....	9
PUBLIKATION.....	10
LEBENS LAUF.....	56
PUBLIKATIONS LISTE.....	58
DANKSAGUNG.....	59

Abstrakt:

Einleitung: Eine herabgesetzte intrazelluläre Verfügbarkeit des Energieäquivalents Adenosintriphosphat (ATP) ist eine Hauptfolge von Hypoxie, da aufgrund des Sauerstoffmangels die oxidative Phosphorylierung gehemmt wird. Zellen reagieren hierauf, indem sie ihren Metabolismus ändern und anaerobe Glykolyse in größerem Ausmaß als ATP produzierenden Prozess nutzen. Der relative Energiemangel führt zu einer globalen Unterdrückung der mRNA Translation, welche zu den energieintensivsten intrazellulären Prozessen gehört. Einige Transkripte entziehen sich jedoch der allgemeinen Hemmung der Translationsrate und können ihre normale translationelle Aktivität behalten oder erhöhen diese sogar noch. Verschiedene Mechanismen, wie etwa die „IRES“ (*Internal Ribosome Entry Site*)-abhängige Translationsinitiation oder eine Regulation durch „*upstream open reading frames*“ wurden vorgeschlagen, um die erhöhte Proteinsyntheserate spezifischer mRNAs unter den Bedingungen einer globalen Hemmung zu erklären. Eine übergreifende Erklärung, die diese Transkripte als funktionales Operon kennzeichnet, gab es bisher nicht.

Methodik: Wir untersuchten die Auswirkungen von Sauerstoffmangel (1% O₂ vs. 21% O₂ für 36 h) auf die mRNA Translation in humanen Fibrosarkomzellen (HT1080). Mittels qPCR wurde das Niveau von hypoxie-induzierbaren und nicht-hypoxie-induzierbaren Kandidaten-mRNAs in verschiedenen subzellulären Kompartimenten, in denen Proteinsynthese abläuft, bestimmt. Diese Daten wurden mit dem im Westernblot dargestellten korrespondierenden Proteinmengen als Annäherung an die netto-Genexpressionsrate verglichen. Die mRNA Translationsrate im zytoplasmatischem Kompartiment wurde mittels Polysomengradientenanalyse bestimmt. Microarray Daten der durch Menge und Lokalisation definierten mRNA Subpopulationen ermöglichte uns eine „gene ontology“ Analyse, und die *in silico* Suche nach angereicherten *cis*-Elementen. Die Funktionalität dieser Elemente wurde durch Reporter-Gen Experimente überprüft. *Fluorescence-in-situ-Hybridisierung* (FISH) wurde genutzt, um Ergebnisse zur mRNA Lokalisation zu verifizieren.

Ergebnisse: Eine spezifische Gruppe von mRNAs zeigt unter Hypoxie eine erhöhte Präsenz am Endoplasmatischen Retikulum (ER). Transkripte, die sowohl in ihrer Gesamtmenge als auch in ihrer Lokalisation am ER unter Hypoxie erhöht waren, zeigten eine Anreicherung von Genen, die den Signalwegen „*response to hypoxia*“, „*glycolysis*“

und "*HIF-1alpha transcription factor network*" zugehören. Die 5`- und 3`- untranslatierten Regionen (UTRs) dieser mRNAs zeigen einen hohen Grad an Konservierung und eine unterdurchschnittliche Anzahl von „*upstream initiation codons*“ (uAUG). Spezifische *cis*-Elemente in den UTRs dieser mRNAs sind mit einer erhöhten Translationsrate unter Hypoxie assoziiert, welche mit einer vermehrten Lokalisation am ER korreliert.

Fazit: Die Regulation der sub-zellulären Lokalisation spezifischer Transkripte stellt einen neuen Mechanismus dar, der unter den Bedingungen einer globalen Hemmung der mRNA Translation entscheidend für die Proteinsyntheserate ist. Wir identifizierten das ER als subzelluläres Kompartiment, in dem unter Sauerstoffmangel induziertem Hypometabolismus die mRNA Translation bevorzugt abläuft, während die Synthese an freien (zytoplasmatischen) Polysomen gehemmt wird.

Abstract:

Introduction: One major consequence of hypoxia is reduced intracellular energy availability. Cells react by adjusting their metabolism, favoring anaerobic glycolysis as an adenosine triphosphate (ATP) producing process. Lowered energy levels also lead to a global inhibition of mRNA translation, which represents the most energy-intensive cellular process. Nevertheless, specific transcripts elude this global translational repression, and maintain or even increase their translational activity. Several mechanisms, including internal ribosome entry sites (IRES) dependent initiation of translation and regulation through upstream open reading frames, were proposed in order to explain elevated protein synthesis of specific mRNAs under conditions of global translational suppression. However, no clear consensus on how to explain effective mRNA translation in hypoxia has been reached yet.

Methods: We investigated mRNA levels of hypoxia inducible or non-inducible gene candidates via qPCR in different subcellular compartments which are associated with protein synthesis during long term hypoxia (1% O₂ vs. 21% O₂ for 36 h) in human fibrosarcoma cells (HT1080). Protein levels were detected by Western blot analysis to estimate the net outcome of protein synthesis relative to the respective mRNA level. Polysomal gradient analysis was performed to analyze the translational efficiency of mRNAs in the cytosolic compartment. Microarray data of RNA subpopulations defined by their subcellular localization were used to perform a gene ontology analysis, and for an in silico search for enriched cis-elements. We verified the functionality of these elements by reporter-gene assays. Fluorescence-in-situ-hybridisation (FISH) was used to verify our findings of alterations of mRNA localization.

Results: A specific subset of transcripts shows an increased presence at the endoplasmic reticulum (ER) which is associated with ongoing translation during hypoxia. Transcripts up-regulated at the expression level as well as their ER localization belong to crucial hypoxia related gene groups such as “response to hypoxia”, “glycolysis”, and “HIF-1alpha transcription network”. Both the 5'- and 3'- untranslated regions (UTRs) of these mRNAs show a high conservation among species, and an upstream initiation codon (uAUG) count below average. We identified enriched cis-elements in the UTRs of these transcripts that are associated with an increased rate of mRNA translation in hypoxia that is attributed to selective mRNA localization at the ER.

Summary: We show that subcellular partitioning of specific transcripts represents a novel mechanism for the adaptation of gene expression during hypoxia. We identified the ER as a crucial compartment for the control of translational activity of transcripts encoding survival factors during hypoxia induced hypometabolism.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jonas J. Staudacher, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Bedeutung des endoplasmatischen Retikulums für die mRNA Translation unter Hypoxie“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o.) und werden von mir verantwortet.

Mein Anteil an der ausgewählten Publikation entspricht dem, der in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben ist.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Publikation:

J.J.Staudacher, I.S.Naarmann-de Vries, S.J.Ujvari, B.Klinger, M.Kasim, E.Benko, A.Ostareck-Lederer, D.H.Ostareck, A.B.Persson, S.Lorenzen, J.C.Meier, N.Blüthgen, P.B.Persson, A.Henrion-Caude, R.Mrowka & M. Fähring.

„Hypoxia-induced gene expression results from selective RNA partitioning to the endoplasmic reticulum“.

Nucleic Acids Research (2015). 43(6):3219-36. doi: 10.1093/nar/gkv167

Beitrag im Einzelnen:

Durchführung der Polysomengradientenanalyse und anschließende Analyse der mRNA Niveaus (qPCR) der Gene P4HA1, P4HB, HIF1A, ACTB und BLID in den Polysomengradientfraktionen (Figure 1, S1).

Etablierung und Verifizierung der subzellulären Fraktionierung (ER-Isolation) (Figure S3). Quantifizierung der Kandidaten-mRNAs in den zellulären Fraktionen (Gesamt-RNA, Cytosol, ER) (Figure 2, S2).

Westernblotanalyse der Proteinniveaus von P4HA1, P4HB, HIF1A, ACTB und BLID (Figure S4).

Reportergenessays zur Verifizierung der Funktionalität der im Microarray angereicherten *cis*-Elemente (Figure 7).

Diskussion der Daten und Unterstützung bei dem Versuchsdesign.

Mitwirkung an der Erstellung des Manuskripts.

Unterschrift

Auszug aus dem ISI Web of Knowledge™

ISI Web of Knowledge™

Journal Citation Reports®

2013 JCR Science Edition

Journal Summary List

Journals from: **subject categories BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY** [VIEW CATEGORY SUMMARY LIST](#)

Sorted by: **Impact Factor** [SORT AGAIN](#)

Journals 21 - 40 (of 291) [MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#) [Journal Title Changes](#)

Ranking is based on your journal and sort selections.

Mark	Rank	Abbreviated Journal Title <i>(linked to journal information)</i>	ISSN	JCR Data ^(j)					Eigenfactor® Metrics ^(j)		
				Total Cites	Impact Factor	5-Year Impact Factor	Immediacy Index	Articles	Cited Half-life	Eigenfactor® Score	Article Influence® Score
<input type="checkbox"/>	21	PLANT CELL	1040-4651	44699	9.575	10.656	1.483	315	8.3	0.08765	3.815
<input checked="" type="checkbox"/>	22	NUCLEIC ACIDS RES	0305-1048	126356	8.808	8.378	2.332	1318	7.4	0.33454	3.377
<input type="checkbox"/>	23	CURR OPIN STRUC BIOL	0959-440X	10465	8.747	9.113	1.523	111	7.4	0.03494	4.539
<input type="checkbox"/>	24	ONCOGENE	0950-9232	62603	8.559	7.719	2.207	565	8.0	0.12643	2.858
<input type="checkbox"/>	25	CELL DEATH DIFFER	1350-9047	15552	8.385	8.345	2.288	153	5.9	0.04355	2.901
<input type="checkbox"/>	26	EMBO REP	1469-221X	10867	7.858	7.653	2.069	101	6.5	0.03963	3.782
<input type="checkbox"/>	27	ANTIOXID REDOX SIGN	1523-0864	14273	7.667	8.499	2.248	306	4.1	0.04456	2.495
<input type="checkbox"/>	28	CURR OPIN CHEM BIOL	1367-5931	9066	7.652	9.446	0.976	127	6.2	0.02521	3.310
<input type="checkbox"/>	29	BBA-REV CANCER	0304-419X	3672	7.584	9.141	1.300	50	5.1	0.01089	2.972
<input type="checkbox"/>	30	ACTA CRYSTALLOGR D	0907-4449	14310	7.232	9.416	0.611	257	5.4	0.06383	5.014
<input type="checkbox"/>	31	STRUCTURE	0969-2126	13343	6.794	6.337	1.343	204	7.6	0.04740	3.415
<input type="checkbox"/>	32	HUM MOL GENET	0964-6906	35897	6.677	6.968	1.617	449	6.8	0.10689	2.853
<input type="checkbox"/>	33	MOL PLANT	1674-2052	3444	6.605	6.348	2.231	143	3.0	0.01621	1.977
<input type="checkbox"/>	34	CHEM BIOL	1074-5521	10344	6.586	6.582	1.154	143	7.0	0.02941	2.655
<input type="checkbox"/>	35	CYTOKINE GROWTH F R	1359-6101	4662	6.537	8.493	1.020	50	8.0	0.00917	2.686
<input type="checkbox"/>	36	SCI SIGNAL	1945-0877	6207	6.337	7.123	1.471	187	3.3	0.04691	3.425
<input type="checkbox"/>	37	ADDICT BIOL	1369-1600	2480	5.929	5.569	1.333	102	3.7	0.00806	1.629
<input type="checkbox"/>	38	EXPERT REV MOL MED	1462-3994	1708	5.912		0.571	14	4.9	0.00625	
<input type="checkbox"/>	39	CELL MOL LIFE SCI	1420-682X	19252	5.856	6.455	1.570	300	5.8	0.05712	2.313
<input type="checkbox"/>	40	MOL ECOL	0962-1083	31185	5.840	6.543	1.461	414	6.8	0.06837	2.053

Journals 21 - 40 (of 291) [MARK ALL](#) [UPDATE MARKED LIST](#) [Journal Title Changes](#)

Nucleic Acids Research: Position 22 out of 291 Journals in “BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY” (top 10%)

Publikation

J.J.Staudacher, I.S.Naarmann-de Vries, S.J.Ujvari, B.Klinger, M.Kasim, E.Benko,A.Ostareck-Lederer, D.H.Ostareck, A.B.Persson,S.Lorenzen, J.C.Meier, N.Blüthgen, P.B.Persson, A.Henrion-Caude, R.Mrowka & M. Fähling.

„Hypoxia-induced gene expression results from selectiv RNA partitioning to the endoplasmic reticulum“.

Nucleic Acids Research (2015).

<http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkv167>

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Publikationsliste:

Wissenschaftliche Artikel:

Staudacher, J.J., I.S.Naarmann-de Vries, S.J.Ujvari, B.Klinger, M.Kasim, E.Benko, A.Ostareck-Lederer, D.H.Ostareck, A.Bondke Persson, S.Lorenzen, J.C.Meier, N.Blüthgen, P.B.Persson, A.Henrion-Caude, R.Mrowka, and M.Fähling.

“Hypoxia-induced gene expression results from selective mRNA partitioning to the endoplasmic reticulum.”

***Nucleic Acids Research* (2015)**. 43(6):3219-36. IF: 8,8

Kasim, M., E.Benko, A.Winkelmann, R.Mrowka, **J.J.Staudacher**, P.B.Persson, H.Scholz, J.C.Meier & M.Fähling.

„Shut Down of Achaete-Scute Homolog-1 Expression by Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein (hnRNP)-A2/B1 in Hypoxia”

***Journal of Biological Chemistry* (2014)**. 289(39):26973-88. IF: 4,6

Kongressbeiträge:

Staudacher JJ, Naarmann-de Vries IS, Ujvari SJ, Klinger B, Kasim M, Benko E, Ostareck-Lederer A, Ostareck DH, Persson PB, Mrowka R & Fähling M.

“Transcriptome partitioning for mRNA translation in hypoxia”

10th International Luebeck Conference on the Pathophysiology and Pharmacology of Erythropoietin and other Hemopoietic Growth Factors. (2015) Lübeck, Germany.

Staudacher JJ, Ujvári SJ, Kasim M, Klinger B, Mrowka R, Persson PB & Fähling M.

“Adaptation of gene expression in hypoxia by shifting the site of mRNA translation”

Kongress der Deutschen Physiologischen Gesellschaft. (2012) Dresden, Germany.

Fähling M, **Staudacher JJ**, Gardow SJ & Kasim M.

“Sustained mRNA translation in hypoxia: A matter of localized protein synthesis?”

EMBO Conference Series: Protein Synthesis and Translational Control. (2011) EMBL Heidelberg, Germany.

Danksagung:

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Michael Fähling für die ausgezeichnete Betreuung meiner Arbeit danken. Seine Offenheit gegenüber neuen Ideen, sein Glaube an hierarchiearmes, wissenschaftliches Argumentieren und das Maß an Freiheit, das er mir zubilligte, um meine eigenen Fehler zu begehen, gaben mir in Kombination die beste wissenschaftliche Ausbildung, die ich mir vorstellen kann.

Ich danke außerdem Dr. Frank Wenke und Dr. Edgar Benko, die mir mit ihrer Geduld und ihrer Freundschaft halfen, diese Arbeit abzuschließen.

Meiner Frau Franziska will ich für ihre Unterstützung danken. Gemeinsam mit ihr sind große Herausforderungen nicht bedrohlich, und meine Tage stets sonniger.

Schlussendlich danke ich meinen Eltern, Eva und Thomas, und meinen Geschwistern, Dawid, Jura, Olga und Rune; ohne sie wäre ich nicht wer ich bin.