

4. Diskussion

Auf der Suche nach Genen, die wie das α -Fetoprotein (oncofötaler Proteinmarker, Tumormarker) spezifisch während der Embryonalphase exprimiert und nach der Geburt abgeschaltet werden, wurde 1984 die H19-cDNA mit dieser Eigenschaft entdeckt (Pachnis *et al.*, 1984). Die Sequenz der humanen cDNA und des korrespondierenden Gens wurde erst 1990 veröffentlicht (Brannan *et al.*, 1990). Die korrespondierende RNA wird wie eine klassische mRNA gecapped, gespliced und polyadenyliert. Brannan *et al.* analysierten die Sequenz und stellten fest, dass sie außergewöhnlich viele Start- und Stopcodons in allen drei Leserastern enthält. Der Vergleich zwischen der Sequenz des Menschen und der Maus ergab keinen Hinweis auf konservierte offene Leseraster. Da sie ebenfalls nicht mit Polysomen assoziiert war, schloss man, dass die Funktion dieser ungewöhnlichen RNA nicht wie sonst üblich in der Kodierung eines Proteins lag, sondern mit der RNA selbst verbunden ist (Brannan *et al.*, 1990). Es gibt Hinweise durch Sequenzvergleiche aus mehreren Arten, dass die Sekundärstruktur der H19-RNA konserviert und daher von Bedeutung zu sein scheint (Juan *et al.*, 2000). Brannan *et al.* haben 1990 ebenfalls dargestellt, dass H19-RNA *in vivo* mit Proteinen assoziiert vorliegt (Sedimentation im Dichtegradienten im Vergleich zur nackten RNA). Da zu Beginn dieser Arbeit keines der möglichen Bindungsproteine identifiziert war und auch sonst der RNA keine direkte Funktion zugeordnet werden konnte, erschien die Isolation H19-bindender Proteine interessant. So könnte die RNA in Verbindung mit Proteinen einen enzymatischen Komplex bilden oder durch die Bindung der Proteine deren Aktivität beeinflussen und somit als indirekter Regulator wirken. Bisher sind lediglich einige wenige nichtcodierende RNAs bekannt, deren genaue Wirkungsmechanismen jedoch weitgehend ungeklärt sind (Erdmann *et al.*, 1999). Somit könnte die Identifizierung H19-bindender Proteine einen Beitrag leisten zur Aufklärung der Funktion dieser rätselhaften RNA, die an so entscheidenden Prozessen wie Proliferation und Differenzierung beteiligt ist.

4.1 Die Klonierung der H19-cDNA

Um H19-bindende Proteine isolieren zu können, musste die RNA zunächst in größeren Mengen (mg-Maßstab) isoliert werden, damit ausreichend Material zur Methodenetablierung (Modifikation, Immobilisierung) und für die eigentlichen Hauptversuche (Inkubation immobilisierter RNA mit Proteinextrakten) zur Verfügung stand. Die Möglichkeit der Isolation von H19-

RNA aus humanem Gewebe wurde wegen der damit verbundenen Schwierigkeiten als unrealistisch verworfen. Denn Humangewebe ist nur sehr begrenzt verfügbar und müsste zudem H19-RNA enthalten. Daher kämen nur Embryonal-, Tumor- oder Plazentagewebe in Frage, wobei nur letzteres realistisch in relativ frischem Zustand (nach Kaiserschnitt) erhältlich ist. Der immense organisatorische und experimentelle Aufwand der präparativen Isolation einer bestimmten intakten RNA aus nativem Gewebe mit der latenten Gefahr der Degradation ließ die einmalige Klonierung der cDNA-Sequenz lohnenswert erscheinen. Die RNA ließe sich anschließend sehr einfach in beliebigen Mengen höchster Reinheit und in intaktem Zustand durch *in-vitro*-Transkription herstellen. Die H19-cDNA wurde bereits im Jahre 1990 als kloniert veröffentlicht (Brannan *et al.*, 1990), jedoch blieben mehrfache Versuche der Kontaktaufnahme zwecks Überlassung eines H19-Plasmides erfolglos. Eine Partnerarbeitsgruppe besaß lediglich die genomische Variante (inklusive Introns), so dass die Notwendigkeit eigener Klonierungsarbeiten bestand. Da die PCR ein sehr schnelles Verfahren zur Isolation mittels selektiver Amplifikation ist und durch die Bekanntheit der H19-Sequenz PCR-Primer einfach zu entwerfen waren, wurde zunächst versucht, die H19-cDNA als Ganzes zu amplifizieren. Dies schlug fehl, da der Startpunkt der Sequenz am 5'-Ende von H19 nicht bekannt war, sondern in der Publikation von der Mausequenz abgeleitet wurde. Daher wurde die RACE-PCR zur Amplifikation zweier überlappender Hälften der H19-cDNA eingesetzt.

Für das 5'-Produkt war dies auch problemlos möglich. Dagegen bereitete das 3'-Fragment erhebliche Probleme. Es konnte auch bei Variation einiger PCR-Parameter kein deutlich spezifisches Produkt erhalten werden. Eine schwache Bande der erwarteten Größe stellte sich als Artefakt zufällig identischer Größe heraus. Erst der Einsatz von schmelztemperatursenkenden Chemikalien in der PCR ermöglichte schließlich die hochspezifische Amplifikation des gewünschten Produktes. So beruhten die Probleme offensichtlich auf der Ausbildung von Sekundärstrukturen der Einzelstrang-Templates, die noch bei der verwendeten Arbeitstemperatur von 68°C die Primer-Elongation durch die Polymerase verhinderten. Dies korreliert mit den Beobachtungen von Juan *et al.* (2000), wonach gerade das 3'-Ende der H19-RNA essentiell ist für die *in-vitro*-Tumorsuppressor-Aktivität, während 700 Nukleotide des 5'-Endes hierfür entbehrlich sind. Ferner wurde bei UV-Crosslinking-Experimenten das erhaltene Muster an H19-bindenden Proteinen im Wesentlichen durch das 3'-Ende der RNA bestimmt. (Runge *et al.*, 2000). So könnte die 3'-Hälfte eine besonders stabile Sekundärstruktur ausbilden, die beispielsweise über die Bindung bestimmter Proteine für diese Funktion verantwortlich ist und sich auch auf DNA-Ebene bei der PCR widerspiegelt. Dafür könnte auch der hohe GC-Basengehalt sprechen (63 %), der jedoch im 5'- und im 3'-Bereich gleich ist. Die Verteilung der Basen ist

jedoch etwas unterschiedlich: Im 5'-Bereich (713 Nukleotide) gibt es doppelt so viele Guanine wie Cytosine (300 : 157), während es im 3'-Bereich (1663 Nukleotide) praktisch gleich viele gibt (538 : 513). Adenin und Thymin sind in beiden Bereichen etwa im gleichen Verhältnis zueinander verteilt. Ob die unterschiedlichen GC-Verteilungen in beiden Bereichen auch tatsächlich zur verstärkten Ausbildung von GC-Watson-Crick-Basenpaarungen im 3'-Bereich führt, die das unterschiedliche Schmelzverhalten erklären könnte, bleibt jedoch hypothetisch.

Somit konnte schließlich nach Ligation der beiden RACE-Produkte die gesamte H19-cDNA amplifiziert und kloniert werden, was durch Sequenzierung bestätigt wurde. Die Hälfte der untersuchten informativen Klone wies am 5'-Ende unmittelbar vor der H19-Sequenz eine zusätzliche 28 Nukleotide lange, palindromische (selbstkomplementäre), drei Restriktionsschnittstellen enthaltende Consensus-Sequenz auf, die in der veröffentlichten genomischen Sequenz von H19 nicht zu finden ist. Die Durchsuchung von Nukleotid-Datenbanken ergab 30 Sequenzen, die ebenfalls diese Consensus-Sequenz enthalten. Diese weisen jedoch keinerlei logische oder funktionelle Ähnlichkeit zu H19 oder untereinander auf. Allerdings ist die Consensus-Sequenz immer im 5'-Bereich außerhalb des codierenden Bereiches lokalisiert und die sie enthaltene Sequenz wurde mit PCR-Methoden isoliert. Da die Consensus-Sequenz zum Teil mit dem MarathonTM-3'-cDNA-Primer identisch ist, mit dessen Hilfe durch Erstrang-Synthese die Bibliothek erstellt wurde, die als Template für die RACE-PCR diente, ist ein Artefakt der cDNA-Synthese nicht auszuschließen. Dagegen spricht jedoch, dass dieser Einzelstrang-Primer zu diesem Zweck seinen poly-T-Schwanz verloren und ein die Palindromität erzeugendes 9 Nukleotide langes Sequenzstück hinzu gewonnen haben müsste. Wie er dann schließlich doppelsträngig wurde, um am falschen Ende der cDNA wie auch immer eingebaut zu werden, ist ebenfalls schwer vorstellbar. Ist es jedoch kein Artefakt, so hätte diese Consensus-Sequenz posttranskriptional an das 5'-Ende der RNA angefügt werden müssen über einen bisher unbekanntem Mechanismus. Hätte die Sequenz eine physiologische Relevanz, so wäre sie vermutlich in mehr Sequenzen zu finden als in den erwähnten 30. Somit bleibt diese Consensus-Sequenz rätselhaft und ist ein eher verwirrendes Puzzle-Stück in der komplexen H19-Thematik.

Die Sequenzierdaten belegten außerdem, dass alle Klone Punktmutationen enthielten, die also an Einzelpositionen von der veröffentlichten Sequenz abwichen. Da sie im untersuchten 5'-Bereich bei allen Klonen an fast immer anderen Positionen lokalisiert waren, konnte es sich nur um PCR-bedingte Mutationen handeln. Dafür spricht außerdem, dass im verwendeten Polymerase-Mix die Hauptkomponente eine Variante der Taq-Polymerase bildete, die über keine Korrekturfunktion verfügte. Die Kompletsequenzierung des ausgewählten, vollständigsten Klons ergab ferner, dass von insgesamt 8 Punktmutationen 7 im Bereich der 5'-RACE-PCR lokalisiert waren,

wo auch mit 78 Zyklen deutlich mehr amplifiziert wurde als im 3'-Bereich (48 Zyklen) mit nur einer Punktmutation, was ebenfalls für Mutationen durch die PCR spricht.

Da Mutationen Abweichungen von der physiologischen Situation darstellen, wurde dann versucht, mittels Durchmusterung einer plazentalen Phagen-cDNA-Bibliothek mutationsfreie H19-Varianten zu isolieren. Dies gelang auch nach mehrfachen Versuchen nicht. Trotz eindeutiger Hybridisierungsergebnisse enthielten alle isolierten Plasmide zu kurze und damit unbrauchbare cDNA-Inserts. Auch ließen sich die Phagen trotz genauester Einhaltung der Herstellervorschriften praktisch nicht in Plasmid-DNA umwandeln, was insgesamt für Lieferung mangelhafter Ware sprach. Da jedoch diese Arbeiten bereits unverhältnismäßig viel Zeit beansprucht haben und der mögliche Nutzen, lediglich 8 Punktmutationen in 2300 Nukleotiden zu beseitigen, dazu in keinem vertretbaren Verhältnis stand, wurden auf das Bestehen der Lieferung mangelfreier Ware mit erneuter Durchmusterung verzichtet. Denn schließlich bestand die Möglichkeit, dass die Mutationen die Proteinbindungseigenschaften der RNA in keiner oder nur geringer Weise beeinflussen, zumal fast alle Mutationen im 5'-Bereich der RNA lokalisiert sind, der, wie oben bereits beschrieben, für die Funktion und die Bindungseigenschaften entbehrlich zu sein scheint. Das eigentliche Ziel der Proteinisolierung sollte somit trotzdem erreichbar sein.

Schließlich wurde der ausgewählte Klon durch Umklonierung dahingehend optimiert, dass bei der RNA-Herstellung Zusatzsequenzen am 5'- bzw. 3'-Ende, die aus Adapter- bzw. Vektorsequenzen stammten, auf ein unvermeidbares Minimum reduziert wurden und gleichzeitig am 3'-Ende einen poly-A-Schwanz generiert wird, um wiederum der physiologischen Situation möglichst nahe zu kommen. Ob allerdings die Reduzierung der Zusatzsequenzen von 23 auf 9 Nukleotide am 5'-Ende und von 31 auf 8 Nukleotide am 3'-Ende angesichts der Größe der H19-RNA (2.300 Nukleotide) für die Bindung von Proteinen relevant ist, darf angesichts der oben erwähnten Entbehrlichkeit von Teilen der H19-RNA bei der Proteinbindung (Runge *et al.*, 2000) bezweifelt werden. Jedoch ermöglicht die Anfügung des 31 Nukleotide langen, sekundärstrukturlosen poly-A-Schwanzes die optimierte sterische Zugänglichkeit des 3'-Endes der RNA zum Zwecke der Immobilisierung.

4.2 Immobilisierung der H19-RNA

Um RNA-bindende Proteine zu isolieren, musste zunächst die RNA an eine Matrix immobilisiert werden, um nach der Inkubation mit plazentalen Proteinen die RNA-Protein-Komplexe von nichtbindenden Proteinen, die im großen Überschuss vorliegen, abzutrennen. Voraussetzung der Immobilisierung war die Einführung einer immobilisierbaren Modifizierung der RNA. Eine elegante Methode hierfür ist die Einführung von Digoxigenin- bzw. Biotingruppen in die RNA zur Bindung an Anti-DIG- bzw. Streptavidin-magnetische Partikel. Der statistische Einbau der Gruppen in die RNA führte allerdings bei der Beladung der Partikel zu großklumpigen, schnell präzipitierenden, vernetzten Komplexen, die für die Proteinisolierung unbrauchbar erschienen, da die uneingeschränkte Zugänglichkeit der RNA-Strukturdomänen für die spezifische Interaktion mit Proteinen nicht mehr gegeben war. Dieses Problem wird durch die Endmarkierung der RNA umgangen. Dabei traten jedoch die Probleme auf, dass entweder die RNA degradiert wurde (Terminale Transferase) oder aber mit RNA-Ligase die Markierungseffizienz gering war, besonders bei der Antisense-RNA, da ihr der poly-A-Schwanz fehlte, so dass der Kosten- und Zeitfaktor relevant wurde, zumal die Qualität des Ligationsproduktes Schwankungen unterlag, d.h die RNA z.T. ein verändertes Bandenmuster im Agarosegel aufwies. Auch die Immobilisierung durch Hybridisierung an poly-T-Partikel erwies sich als suboptimal, da nur das H19-Sense-Transkript immobilisierbar war und die verwendeten Partikel unspezifische Protein-Bindungseigenschaften aufwiesen.

Die besten Ergebnisse konnten mit der traditionellen Methode der chemischen Modifizierung des 3'-Endes der RNA durch Oxidation der 2'-3'-Hydroxylgruppen zu Aldehydgruppen erzielt werden mit anschließender kovalenter Immobilisierung durch Umsetzung mit Hydrazidagarose. Da bei allen Schritten bei dem für die RNA schonenden pH-Wert 5,0 gearbeitet wurde, gab es keinerlei Stabilitätsprobleme. Außerdem konnten wesentlich größere Mengen RNA immobilisiert werden im Vergleich zu den magnetischen oder sonstigen Partikeln, was das Verfahren zudem sehr kostengünstig macht. Die ausschließliche Immobilisierung der RNA über das 3'-Ende sollte die Strukturbildung nicht behindern oder stören und dieses Ende vor dem Angriff von Exonukleasen im Proteingemisch schützen. Der einzige Nachteil bestand darin, dass die RNA nach der Inkubation mit Proteinen durch die kovalente Bindung nicht von der Matrix eluiert und auf ihre Unversehrtheit überprüft werden kann. Angesichts der Vorteile konnte dies jedoch billigend in Kauf genommen werden.

4.3 H19-bindende Proteine

Die RNA-Affinitätssäulen, mit denen schließlich aussagekräftige Ergebnisse erzielt werden konnten, wurden unter physiologischen Salzbedingungen mit plazentalen Proteinen inkubiert, da H19 in Plazenta exprimiert wird und somit dort H19-bindende Proteine zu erwarten sind. Zur Steigerung der Spezifität der RNA-Protein-Interaktion wurden sowohl Heparin als auch HefetRNA (Kompetitor im Überschuss) verwendet. Nach intensivem Waschen der Säulen mit Bindungspuffer, der ebenfalls tRNA enthielt, wurden gebundene Proteine unter Hochsalzbedingungen eluiert. Bei diesen Protein-Isolationsexperimenten erwies sich der Einsatz von Heparin als essentiell, die erhaltenen Proteinmuster mit und ohne Heparin unterschieden sich extrem. So erhielt man ohne Heparin mit der unspezifischen Kontroll-RNA (DHFR) das gleiche Proteinmuster wie mit H19-Sense bzw.-Antisense, während mit Heparin die beiden letztgenannten deutlich andere Proteine zurückhielten als die Kontroll-RNA, die fast keine Proteine mehr gebunden hat. Auch die H19-Sense und -Antisense-Säulen wiesen mit Heparin signifikant andere und viel weniger Proteine auf als ohne Heparin, was insgesamt eine deutliche Steigerung der Spezifität belegt. Somit liegt die Vermutung nahe, dass bereits bei den erfolglosen Experimenten mit den magnetischen Partikeln ein ähnliches Ergebnis hätte erzielt werden können, wenn zu diesem Zeitpunkt bereits mit Heparin gearbeitet worden wäre.

Die H19-Sense- und -Antisense-Säulen wiesen auch mit Heparin merkwürdigerweise ein sehr ähnliches Proteinmuster auf. Zur Identifikation der Proteine mittels MALDI wurden wegen der größeren Materialmenge 3 Banden der Antisense-Säule ausgeschnitten sowie die Hauptbande der Sense-Säule bei 55 kDa, um zu überprüfen, ob diese Bande identisch ist mit der in etwa gleichlaufenden Bande der Antisense-Säule. Dies war in der Tat der Fall, es handelte sich bei beiden um das humane "polypyrimidine tract-binding protein" (PTB), allerdings bei Antisense um PTB2 (550 Aminosäuren) und bei Sense um PTB1, auch hnRNP I genannt (531 Aminosäuren). Beide sind Isoformen, wobei PTB1 durch alternatives Splicing 19 Aminosäuren aus dem mittleren Teil des Proteins fehlen. Funktionelle Unterschiede sind jedoch nicht bekannt, in der Literatur wird nur allgemein von PTB gesprochen, das zudem vor kurzem als H19-bindendes Protein durch UV-Crosslinking mit Tumorzelllysaten identifiziert wurde (Runge *et al.*, 2000). Somit scheint dieses Protein tatsächlich spezifisch mit H19-Sense und -Antisense zu interagieren. PTB ist ein nukleäres Protein, das am Prozess des alternativen Splicings beteiligt ist. Dabei bindet es

Intronbereiche stromaufwärts bzw. -abwärts von alternativen Exons, was deren Benutzung i.d.R. unterdrückt, jedoch auch positiv regulieren kann (Lou *et al.*, 1999).

Eine weitere Bande der Antisense-Säule enthielt das Protein "IGF2 mRNA-binding protein 3" (IMP3). Die entsprechende Bande der Sense-Säule wurde zwar nicht analysiert, jedoch wurde in der erwähnten Veröffentlichung (Runge *et al.*, 2000) gezeigt, dass die H19-RNA neben PTB auch vier Moleküle IMP1 bindet. IMP1 und 3 gehören zur selben, kürzlich entdeckten Familie von Proteinen sehr ähnlicher Größe (IMP1-3: 63, 66, 64 kDa), die mit der mRNA von IGF2 wechselwirken und deren Translatierbarkeit beeinflussen. Ihre genaue Wirkungsweise ist aber noch unbekannt (Nielsen *et al.*, 1999). Dabei kommt aus dieser Familie IMP3 in terminaler Plazenta am häufigsten vor, was seine Isolierung in diesem Experiment erklärt (*ibid.*). Dies ist ein deutliches Indiz dafür, dass die Interaktion von IMP3 mit H19-Antisense spezifisch war und IMP3 auch mit H19-Sense interagiert, was schließlich mittels BIACORE[®] gezeigt werden konnte: Beide interagieren wesentlich stärker mit IMP3 als die DHFR-Kontroll-RNA, wobei H19-Antisense sogar mehr IMP3 bindet als H19-Sense. Somit scheint es sich bei den Proteinbanden, die nach den Affinitätssäulen im Gel bei H19-Sense und -Antisense auf gleicher Höhe lokalisiert sind, tatsächlich um dieselben Proteine zu handeln. Um diese Vermutung weiter abzusichern, werden zur Zeit zwei weitere Proteinbanden der H19-Sense-Spur aus dem rehydrierten PAA-Gel ausgeschnitten zur Identifikation mittels MALDI-TOF.

Die Mitglieder der IMP-Familie weisen Ähnlichkeiten zu Proteinen auf, die an der Lokalisation von mRNAs beteiligt sind (Nielsen *et al.*, 1999). So ist IMP1 zu 95 % identisch mit dem "zipcode-binding protein" aus Hühnern, das an der Lokalisation der β -Actin mRNA beteiligt ist und zu 99 % mit dem "c-myc coding region determinant-binding protein" (CRD-BP) der Maus, das durch die Bindung an die c-myc mRNA diese vor Endonukleasen schützt und so die Lebensdauer dieser kurzlebigen proto-oncogenen mRNA ($t_{1/2}$ ca. 30 min) deutlich erhöht. Da CRD-BP in fötalem, nicht aber adultem Gewebe auftritt und außerdem in neoplastischen Zelllinien zu finden ist, wird es als oncofötale Protein bezeichnet (Doyle *et al.*, 1998), ähnlich wie die H19-RNA als oncofötale RNA bezeichnet wird (Ariel *et al.*, 1997). IMP3 ist identisch mit "KOC", einem in menschlichen Krebszellen überexprimiertem KH-Domänen-Protein unbekannter Funktion und zu 83 % identisch mit "Vera", einem mRNA-Lokalisationsfaktor aus *Xenopus laevis* (Nielsen *et al.*, 1999). Die zelluläre Lokalisation von IMP1 und 3 ist in Zellkultur abhängig von der Dichte der Zellen: Bei wachstumsarretierten konfluenten Zellen sind diese IMPs gleichmäßig im Cytosol verteilt, während sie in vereinzelt proliferierenden Zellen an diskreten Orten um den Zellkern, an der Plasmamembran und dem Lamellipodium lokalisiert sind (*ibid.*). Ihre Lokalisation wird demnach durch Zellkontakt und Wachstum reguliert. Die gewebespezi-

fisch überlappenden Expressionsmuster der IMPs mit IGF2 und die *in-vitro*-Inhibition der Translatierbarkeit von IGF2-mRNA durch die Wechselwirkung mit IMPs deuten eine kontrollierende Wirkung der IMPs auf die Produktion des fötalen Wachstumsfaktors IGF2 an, bei der auch die korrekte Lokalisation der IGF2-mRNA von Bedeutung sein könnte. Eine Wechselwirkung der H19-RNA mit den IMPs könnte somit einen weiteren indirekten Einfluss auf die IGF2-Produktion ausüben.

In der Bande, die IMP3 enthielt, war ein weiteres Protein enthalten: das "c-myc far upstream element-binding protein" (FUSE-BP). Dieses nukleäre Protein stimuliert in undifferenzierten Zellen die Expression des Proto-Oncogens c-myc, dessen Produkt c-Myc in proliferierenden Zellen auftritt und als Transkriptionsfaktor einer Kontrolle sowohl auf transkriptioneller als auch posttranskriptioneller Ebene unterliegt. In Zellkultur wird die Induktion der Differenzierung von einer starken Abnahme des c-Myc-Proteines und der mRNA begleitet (Bazar *et al.*, 1995, Thompson, 1998). Würde die Interaktion von der H19-RNA mit FUSE-BP dessen Interaktion mit FUSE und damit die Stimulation der c-myc-Expression inhibieren, so würde H19 als indirekter Repressor von c-Myc und damit antiproliferativ bzw. differenzierend wirken.

Die letzte Proteinbande enthielt das "heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K" (hnRNP K). Dieses Protein kann zwischen Zellkern und Cytosol hin und her wandern und hat eine starke Affinität zu polypyrimidinreicher RNA und einzelsträngiger DNA. Es interagiert mit mehreren Proteinen, die an Signaltransduktion (Kinasen) und Transkription beteiligt sind und hat mehrere Protein- bzw. Nukleinsäurebindungsdomänen. Es kann als "Docking-Plattform" mit mehreren Partnern gleichzeitig interagieren und so vermutlich deren Interaktion vermitteln. Es wird vermutet, dass es auch an der Chromatinorganisation beteiligt ist (Shnyreva *et al.*, 2000).

4.4 Mögliche Funktion der H19-RNA

Die seit 1990 bekannte cytosolische, gesplicte und polyadenylierte H19-RNA stellt bisher ein Rätsel dar: Es codiert offensichtlich nicht für ein Protein, wird jedoch während der Embryonalentwicklung z.T. reichlich hergestellt. Eine konkrete Funktion konnte dieser RNA bisher nicht zugeordnet werden. Durch Sequenzanalysen wird vermutet, dass sie eine evolutionär konservierte Sekundärstruktur aufweist und eine Funktion hat (Juan *et al.*, 2000, Hurst und Smith, 1999). Bereits von Anfang an wurde die Assoziation mit Proteinen vermutet, jedoch wurde lange Zeit keines der Bindungsproteine identifiziert. Runge *et al.* veröffentlichten 2000 schließlich, dass die H19-RNA mit den Proteinen IMP1 und PTB interagieren kann. Dies konnte mit der hier vorlie-

genden Arbeit bestätigt werden, sowohl PTB als auch ein weiteres Mitglied der IMP-Familie, das in Plazenta am häufigsten vorkommende IMP3 konnten als H19-Bindungsproteine nachgewiesen werden. Diese erst kürzlich entdeckten IMPs, deren Funktion bisher unbekannt ist, können an die IGF2-mRNA binden und damit die Translatierbarkeit dieses fötalen Wachstumsfaktors inhibieren und haben außerdem Ähnlichkeit mit mRNA-Lokalisationsproteinen. Zeitgleich zu IGF2 wird auch die H19-RNA gebildet. Sie wird mit der Negativ-Regulation der IGF2-Produktion in Verbindung gebracht. Bindet nun die H19-RNA die IMPs in Konkurrenz zur IGF2-mRNA, so könnte das wegen der wegfallenden Inhibition der Translation zur verstärkten IGF2-Produktion und damit zu verstärktem Wachstum führen, was im Widerspruch stünde zur Rolle von H19 als Negativregulator. Wenn jedoch die korrekte Translation und Funktion von IGF2 an die korrekte, IMP-vermittelte Lokalisation der IGF2-mRNA gekoppelt wäre bzw. diese Protein-Bindung zu einem Nukleaseschutz und damit zu einer erhöhten Lebensdauer der mRNA führte, so könnte die Interaktion der H19-RNA mit den IMPs tatsächlich die funktionelle IGF2-Produktion stören und H19 damit wachstumsbegrenzend wirken.

In dieser Arbeit deutet sich die Interaktion der H19-RNA mit weiteren Proteinen an, wobei die Eindeutigkeit durch weitere Experimente noch untermauert werden sollte. Interessant ist hierbei das c-myc-FUSE-BP, dessen Expression mit proliferierendem, undifferenziertem Zellwachstum korreliert und das das Proto-Oncogen c-myc stimuliert. Führt nun die Interaktion der H19-RNA zur Inhibition der Funktion des c-myc-FUSE-BP, könnte die H19-RNA auf diesem Wege ebenfalls antiproliferativ und differenzierend wirken, was zusammen mit der Inhibition von IGF2 in guter Übereinstimmung mit der Konflikthypothese wäre, nach der maternal exprimierte Gene (wie H19) das Embryonalwachstum begrenzen. Dazu sind allerdings weitere Untersuchungen notwendig, um zu klären, ob H19 die Wirkung von c-myc-FUSE-BP inhibiert oder nicht oder sogar verstärkt.

Schließlich bleibt noch die Frage, was eigentlich mit einer nicht-translatierbaren RNA wie H19 am Ribosom passiert. Der Translationsapparat würde vermutlich assoziieren und dissoziieren, ohne dass ein Protein gebildet würde. Derartig sinnlos beschäftigte Ribosomen könnten jedoch nicht an der Translation codierender mRNAs teilnehmen, d.h., es wäre vorstellbar, dass die Menge proteinbildender Ribosomen und damit die allgemeine, zelluläre Translationsrate herabgesetzt werden würde, je mehr nichttranslatierbare mRNAs mit ihnen assoziiert wären. Wachstum und Zellteilung sind jedoch immer auch mit einer gesteigerten Proteinproduktion verbunden. Wenn die nichttranslatierbare H19-RNA nun wie in neuerer Literatur beschrieben mit Ribosomen assoziiert wäre (Li *et al.*, 1998), könnte sie allgemein die zelluläre Translationrate senken und so ebenfalls antiproliferativ wirken. Dies wäre vereinbar mit der wachstums-

begrenzenden und differenzierenden Wirkung von nichttranslatierbaren Bereichen anderer mRNAs (Rastinejad *et al.*, 1993).

Somit ergäbe sich ein Bild, bei dem die H19-RNA durch ihre Wechselwirkung mit Proteinen bzw. Ribosomen wachstumsbegrenzend und differenzierend wirken könnte, quasi als "Sand im Getriebe der Proliferationsmaschinerie". Das Auftreten von H19 in Tumoren ist als Folge der Tatsache zu sehen, dass neoplastisches und embryonales Gewebe ähnliche Eigenschaften aufweisen, wie z.B. eine hohe Proliferationsrate und die Fähigkeit zur Zellmigration, ähnlich wie auch andere embryonale Gene in Krebsgeweben exprimiert werden (oncofötale Gene, Ariel *et al.*, 1996). Die genauen Zusammenhänge bedürfen allerdings der weiteren Aufklärung. Dabei ist insbesondere wichtig, ob und inwieweit die Bindung der H19-RNA an die Zielproteine deren Aktivität beeinflusst.