

5 Zusammenfassung, Summary

In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob die rätselhafte, nichttranslatierte, oncofötale humane H19-RNA spezifische Wechselwirkungen mit Proteinen eingeht. Denn seit längerer Zeit wird die Möglichkeit diskutiert, dass das H19-Gen lediglich der begrenzenden Regulierung des reziprok geprägten Wachstumsfaktors IGF2 dient und die RNA als Genprodukt funktionslos und entbehrlich ist. Neuere Untersuchungen deuten jedoch an, dass diese RNA eine konservierte Sekundärstruktur aufweist und die Sequenz unter einem stabilisierenden Druck steht. Sie tritt in proliferierendem Gewebe bei einsetzender Differenzierung auf, und zwar temporal und gewebespezifisch parallel zum IGF2, dessen mRNA-Niveau durch die H19-RNA negativ beeinflusst zu werden scheint. Die in Zellkultur gezeigte Unterdrückung der Proliferation durch die Produktion der H19-RNA legte eine Aktivität der RNA als Tumorsuppressor nahe, das Auftreten in einer Reihe von Tumoren spricht jedoch dagegen. Von Anfang an wurde die Assoziation der RNA mit Proteinen postuliert, jedoch keines identifiziert. Die Funktion dieser strukturierten RNA könnte aber gerade in der Wechselwirkung mit Proteinen zu suchen sein.

Zur Identifikation von Bindungsproteinen musste die RNA zunächst in größeren Mengen herstellbar sein. Daher wurde die cDNA mittels RACE-PCR kloniert, um die RNA mittels *in-vitro*-Transkription herstellen zu können. Die Hälfte der Klone trug am 5'-Ende eine rätselhafte, palindromische Consensus-Sequenz. Alle Klone enthielten PCR-bedingte Punktmutationen. Der Versuch, vollständige und mutationsfreie Klone aus einer cDNA-Phagenbibliothek zu isolieren, scheiterte. Ein ausgewählter Arbeitsklon wurde umklont, um Zusatzsequenzen an den Enden der RNA zu minimieren und am 3'-Ende einen poly-A-Schwanz zu generieren. Die RNA wurde mit verschiedenen Methoden modifiziert und immobilisiert, wobei der erfolgversprechendste Ansatz die kovalente Bindung an Agarose zur Konstruktion von Affinitätsäulen war. In Gegenwart von Heparin konnten schließlich spezifische plazentale Bindungsproteine isoliert und identifiziert werden. Es handelte sich um PTB, hnRNP K, IMP3 und c-myc-FUSE-BP, wobei PTB und ein weiteres Mitglied der IMP-Familie (IMP1) durch eine andere Publikation bestätigt wurden (Runge *et al.*, 2000). H19-Sense und -Antisense scheinen im Wesentlichen die gleichen Proteine zu binden, was jedoch noch näher untersucht werden muss. Zukünftig muss die Wirkung der H19-Bindung auf die Aktivität der Proteine untersucht sowie eventuell vorhandene weitere Bindungspartner identifiziert werden, um die genaue wachstumsbegrenzende und differenzierende Wirkungsweise der H19-RNA verstehen zu können.

Summary

In this work the question was to be pursued whether the enigmatic, nontranslated oncofetal human H19-RNA interacts specifically with proteins. For a longer time the possibility has been discussed that the H19 gene serves only for the limiting regulation of the reciprocally imprinted growth factor IGF2 and therefore the RNA might be without function and dispensable. However, later investigations indicate, that this RNA has a conserved secondary structure and that the sequence is under stabilizing pressure. The RNA occurs in proliferating tissue during differentiation in temporal and tissue-specific parallelism to IGF2, whose mRNA level seems to be negatively influenced by the H19 RNA. The suppression of proliferation shown in cell culture through the production of the H19 RNA suggested a role as a tumor suppressor, whereas the occurrence in several tumors did not. From the beginning there was evidence that the RNA is associated with proteins, but none of them has been identified. The function of this structured RNA might be defined just through the interaction with proteins.

For the identification of binding proteins the RNA must be producible in larger quantities. Therefore the cDNA was cloned using RACE-PCR in order to produce the RNA via *in vitro* transcription. Half of the obtained clones carried an enigmatic consensus sequence at the very 5'-end. All of the clones carried PCR-related point mutations. The attempt to isolate a complete and mutationless clone from a cDNA phage library failed. A chosen working clone was subcloned in order to minimize the additional sequences at the ends of the RNA and to generate a poly-A-tail at the 3'-end. The RNA was modified and immobilized using different methods but the most promising was the covalent binding to agarose for the construction of affinity columns. Finally, in the presence of heparin, specific placental binding proteins could be isolated and identified. These were PTB, hnRNP K, IMP3 and c-myc-FUSE-BP, of these PTP and another member of the IMP-family (IMP1) were confirmed by another publication (Runge *et al.*, 2000). H19 sense and antisense RNA seem to bind essentially the same proteins which still has to be investigated in more detail. For the future the effect of the H19 binding on the activity of the proteins has to be investigated together with the identification of possible additional ligands in order to fully understand the growth-inhibiting and differentiating mode of action of the H19 RNA.