

1 Einleitung

1.1 Die VICKZ Protein Familie und deren Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation

Die Differenzierung einer großen Zahl spezialisierter Gewebe- und Zellarten, so wie deren Fähigkeit auf unterschiedlichste Bedingungen zu reagieren erfordert eine sehr präzise Regulation des zellulären Stoffwechsels. Dazu muss in unterschiedlichen Zelltypen ein jeweils spezifischer Teil der Erbinformation zunächst in mRNA umgeschrieben, prozessiert, ins Zytoplasma exportiert und in Proteine translatiert werden. Verschiedenen Mechanismen, die entweder die Transkription spezifischer Gene regulieren oder durch posttranslationelle Modifikationen die Aktivität und die Lebensdauer der Proteine regulieren, sind seit langem bekannt und gut charakterisiert. Eine weitere Regulation der Genexpression, die ganz wesentlich die Reaktionsfähigkeit einer Zelle auf veränderte Umweltbedingungen beeinflusst, geschieht auf posttranskriptioneller Ebene und wird durch verschiedene RNA-bindende Proteine (RBPs) sowie mikroRNAs vermittelt. RBPs, welche spezifisch mit einer mRNA interagieren, modulieren dadurch die Stabilität, Lokalisierung oder Translation dieser mRNA, ohne dabei deren Transkription zu beeinflussen. In ähnlicher Weise vermittelt auch der miRISC (*mikroRNA-induced silencing complex*) seine Wirkung, welcher neben der mikroRNA auch Argonaute Proteine enthält und je nach Zusammensetzung entweder die Translation einer mRNA inhibiert oder aber deren Degradation bewirkt (reviewed (Pillai et al., 2007)). Im Gegensatz zur mRNA-Prozessierung, welche das *capping*, *splicing* sowie die Polyadenylierung einer mRNA umfasst und im Zellkern abläuft, findet die Regulation auf posttranskriptioneller Ebene im Wesentlichen zytoplasmatisch statt. Durch posttranskriptionelle Genregulation werden wichtige zelluläre Prozesse wie Proliferation und Differenzierung, Zellmotilität und -migration sowie die Adaptierung auf verschiedene Umweltbedingungen entscheidend beeinflusst.

Die VICKZ Proteinfamilie, deren Name sich von den Anfangsbuchstaben ihrer Mitglieder ableitet, ist eine Familie von RBPs, welche eine Vielzahl von Funktionen während der posttranskriptionellen Regulation verschiedener mRNAs erfüllt. Sie besteht aus Vg1-RBP/Vera (*Vg1 mRNA Binding Protein*) aus *Xenopus* und *Drosophila*, den humanen Proteinen Imp1-3 (*IGF-II mRNA binding protein 1-3*) und KOC (*KH-domain-containing protein overexpressed in cancer*), dem murinen CRD-BP (*Coding Region instability*

Determinant Binding Protein) sowie ZBP1 (*Zipcode Binding Protein 1*) aus Huhn (Doyle et al., 1998; Havin et al., 1998; Mueller-Pillasch et al., 1999; Nielsen et al., 1999; Ross et al., 1997). Im Folgenden werden die Proteine die orthologen Proteine ZBP1, Imp1 und CRD-BP unter dem Begriff ZBP1 zusammengefasst.

Die Mitglieder dieser Proteinfamilie regulieren die Stabilität, Lokalisation und Translation ihrer mRNA-Liganden. So vermittelt z.B. Vg1BP/Vera die Lokalisierung der *Vg1* mRNA zum vegetativen Pol in *Xenopus* Oozyten (Deshler et al., 1998; Havin et al., 1998). Das *Drosophila*-Homologe ist an der Lokalisierung der *oskar*-mRNA in während der Embryogenese beteiligt (Deshler et al., 1998; Havin et al., 1998; Munro et al., 2006). ZBP1 wurde als Translationsrepressor der β -Aktin mRNA identifiziert (Ross et al., 1997). Das Protein reguliert die lokalisierte Translation dieser mRNA und moduliert dadurch die Ausbildung von Neuriten während der Differenzierung primärer Neuronen (Farina et al., 2003; Huttelmaier et al., 2005). In humanen Zellen wurde nachgewiesen, dass ZBP1 die Translation der *IGF-II* mRNA kontrolliert (Liao et al., 2004; Nielsen et al., 1999). Darüber hinaus hat das Protein Funktionen bei der mRNA-Stabilisierung. Nachgewiesen wurde dies für c-Myc, CD44 sowie β TrCP (Doyle et al., 1998; Kobel et al., 2007; Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006).

VICKZ Proteine weisen ein onkofötales Expressionsmuster auf, d.h. sie werden während der Embryogenese exprimiert, bei der sie die zuvor beschriebenen Funktionen erfüllen. Im adulten Organismus kaum vorhanden, werden die Proteine dieser Familie in malignen Tumoren *de novo* exprimiert und scheinen von fundamentaler Bedeutung für die Tumorprogression zu sein (Kobel et al., 2007; Yaniv and Yisraeli, 2002).

1.1.1 Funktionelle Sequenzmotive und Domänen von ZBP1

Wie alle VICKZ Proteine enthält ZBP1 zwei verschiedene Arten von RNA-bindenden Motiven, welche für die Assoziation der Proteine mit ihren mRNA-Liganden notwendig sind. Zum einen befinden sich am N-Terminus zwei *RNA Recognition Motifs* (RRMs), zum anderen sind im C-terminalen Bereich vier *hnRNP K Homology* Domänen (KHs) lokalisiert.

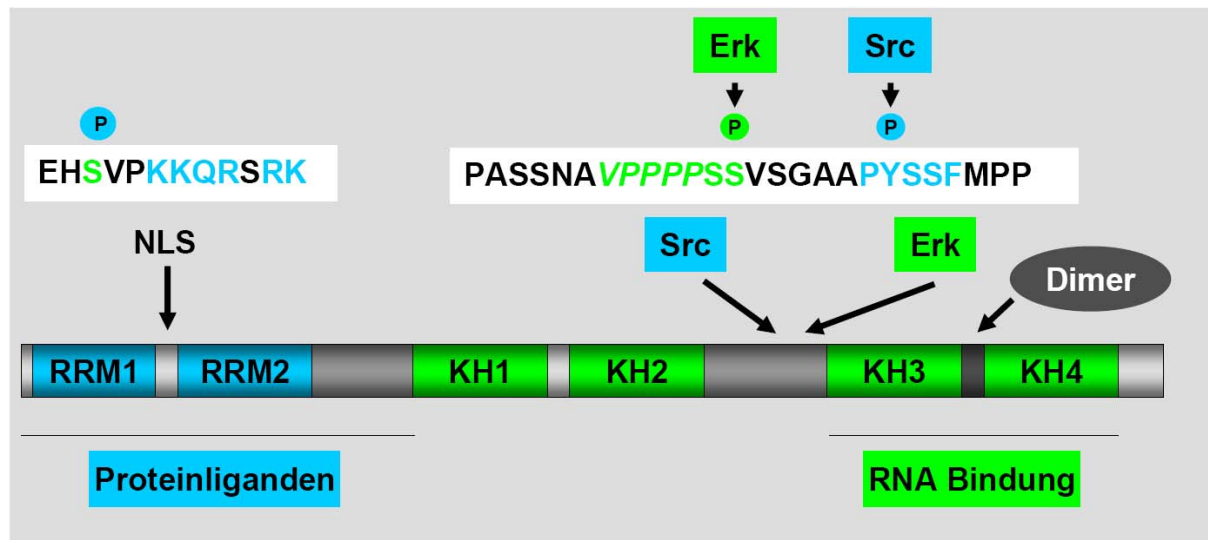


Abb. 1.1: Sequenzmotive des ZBP1 Proteins. Die beiden RRM (RNA Recognition Motifs) am N-Terminus interagieren auch mit Proteinliganden und enthalten ein putatives NLS (nuclear localization signal). Die C-terminal gelegenen KH-Domänen (*hnRNP K Homology*) liegen als Di-Domänen vor. Besonders die 2. Di-Domäne (KH3-4) weist eine hohe RNA-Bindungsaffinität auf. Die Linkerregion zwischen KH2 und 3 enthält zwei Phosphorylierungsstellen. Während die Tyrosin-Phosphorylierung durch Src-Kinasen die RNA-Bindungsaffinität des Proteins reduziert, verhindert die Serin-Phosphorylierung durch ERK die Assoziation des Proteins mit Src-Kinasen (Farina et al., 2003; Huttelmaier et al., 2005)(ERK; Huttelmaier et al., noch nicht publiziert). Über die Linkerregion zwischen KH3 und 4 bildet ZBP1 Homo- oder Heterodimere mit anderen Mitgliedern der ZBP Familie.

Abb. 1.1 zeigt eine schematische Darstellung der Sequenzmotive von ZBP1. Im N-terminalen Bereich des Proteins befinden sich zwei RRM, welche jedoch nur eine geringe RNA-Affinität besitzen, weshalb diesen Motiven eine putative Interaktion mit Proteinliganden zugeschrieben wird (Farina et al., 2003). Die Linkerregion zwischen RRM1 und RRM2 enthält vermutlich ein *nuclear localization signal* (NLS), welches für den Import des Proteins in den Zellkern verantwortlich sein könnte, sowie eine putative Serin-Phosphorylierungsstelle. ZBP1, das vorwiegend zytoplasmatisch vorliegt, wird jedoch auch im Zellkern nachgewiesen. Hier ist es in einzelnen *spots* zu finden, welche möglicherweise Transkriptionsstellen markieren (Oleynikov and Singer, 2003). Das deutet darauf hin, dass ZBP1 seine RNA-Liganden bereits im Zellkern bindet und RNA-abhängig ins Zytoplasma exportiert wird.

Der C-terminale Bereich von ZBP1 enthält vier KH-Domänen, die als Di-Domänen, bestehend aus je zwei benachbarten KH-Domänen, vorliegen. Die zweite Di-Domäne weist eine ähnlich hohe Bindungsaffinität zu RNA auf wie das Wildtyp-Protein und ist für die Interaktion von ZBP1 mit mRNA-Liganden essentiell (Farina et al., 2003). Die Affinität der RNA-Bindung wird durch zwei Phosphorylierungsstellen, welche sich in der Linkerregion zwischen KH2 und KH3 befinden, reguliert. Zum einen handelt es sich hierbei um das Tyrosin 396, welches ein Substrat von Kinasen der Src-Familie darstellt. Die Tyrosin-

Phosphorylierung von ZBP1 reduziert dessen Affinität, RNA zu binden, und bewirkt dadurch die Freisetzung der RNA vom Protein (Huttelmaier et al., 2005). Dem gegenüber steht die Phosphorylierung des Serin 388 durch ERK-Kinasen, welche die Tyrosin-Phosphorylierung inhibiert, indem es die Assoziation der Src-Kinasen mit ZBP1 verhindert. Dabei bildet die Src-Phosphorylierungsstelle die Assoziationsstelle für die ERK-Kinase und umgekehrt (siehe Abb. 1.1). Durch den Phosphorylierungsstatus des Proteins werden die verschiedenen Funktionen von ZBP1 moduliert, die Phosphatase PP2B reguliert hierbei vermutlich die Dephosphorylierung des Proteins (Lederer et al., in Vorbereitung).

ZBP1 bildet zudem über ein Sequenzmotiv, welches sich zwischen KH3 und KH4 befindet, Homo- und Heterodimere mit anderen Mitgliedern der Proteinfamilie (siehe Abb. 1.1). Nielson und Kollegen postulieren für die Dimerisierung einen kooperativen sequenziellen Mechanismus, welcher die RNA involviert. Zunächst assoziiert ein ZBP1-Molekül mit dem Bindungsmotiv der RNA und bildet ein instabiles Intermediat. Im 2. Schritt bindet ein weiteres ZBP1-Molekül an dieselbe mRNA und stabilisiert den entstandenen RNP-Komplex durch Protein-Protein-Interaktion zwischen den beiden Dimerisierungsmotiven (Nielsen et al., 2004). Hierbei ist zu vermuten, dass besonders durch Heterodimerisierung unterschiedlicher Mitglieder der Proteinfamilie eine diversifizierte Substratspezifität und gegebenenfalls erhöhte Komplexität der Regulationsmechanismen erreicht werden kann.

Wie bereits erwähnt assoziiert ZBP1 über seine KH-Domänen (besonders KH3 und 4) mit *cis*-Elementen seiner mRNA-Liganden. *Cis*-Elemente sind spezifische Sequenzmotive, welche bevorzugt in den untranslatierten Bereichen (5'UTR und 3'UTR) aber auch in der kodierenden Region einer mRNA vorkommen und für deren Interaktion mit *trans*-agierenden RNA-bindenden Proteinen (RBPs) verantwortlich sind. Diese Sequenzmotive bilden sehr wahrscheinlich Sekundärstrukturen aus, welche durch RBPs spezifisch erkannt werden können. Bislang wurde jedoch keine *Consensus*-Sequenz in ZBP1-Liganden identifiziert, stattdessen wurden verschiedene *cis*-Elemente in den einzelnen ZBP1-Liganden identifiziert.

Ein solches *cis*-Element ist der Zipcode des β -Aktin 3'UTRs, durch welchen ZBP1 (*Zipcode Binding Protein*) seinen Namen erhielt (Regulationsmechanismus siehe 1.1.3.1). Der Zipcode, welcher vermutlich eine *stem-loop* Struktur ausweist, enthält ein essentielles Sequenzmotiv (5'-ACACCC-3') (Kislauskis et al., 1993; Ross et al., 1997). Ein beinahe identisches Motiv (5'-RCACCC-3', wobei R eine Pyrimidinbase bezeichnet) wurde mittels SELEX Analyse als ZBP1 Bindungsmotiv identifiziert (Farina et al., 2003). Innerhalb der ersten 233 Nukleotide des β -Aktin-3'UTR befinden sich zwei putative Zipcode-Elemente

(Huttelmaier et al., noch nicht publiziert). Dieser Bereich ist für die posttranskriptionelle Regulation der β -Aktin mRNA durch ZBP1 notwendig und hinreichend.

Ein weiteres bekanntes *cis*-Element, mit dem ZBP1 interagiert, ist die 249 Nukleotid große CRD (*Coding Region instability Determinant*) in der kodierenden Region der *c-myc* mRNA (Lemm and Ross, 2002). Dieses *cis*-Element vermittelt die translationsgekoppelte Stabilitätskontrolle der RNA, welche durch ZBP1 reguliert wird (Regulationsmechanismus siehe 1.1.3.2). Die ZBP1 Bindungsstelle in der CRD befindet sich *downstream* einiger seltener Codons und überlappt mit einer endonukleolytischen Schnittstelle.

1.1.2 Das Expressionsmuster von ZBP1

Das onkofötale RNA-bindende Protein ZBP1 wird hauptsächlich während der Embryonalentwicklung exprimiert. In Expressionsanalysen wurde die höchste ZBP1-Menge am Tag E12.5 der Mausembryogenese detektiert (Runge et al., 2000). Darauf folgte eine stetige Abnahme der ZBP1 RNA-Menge bis hin zur Geburt, in neonatalen Mäusen konnte keine Expression von ZBP1 nachgewiesen werden (Runge et al., 2000). Im adulten Gewebe ist ZBP1 mit Ausnahme von geringen Mengen in Darm und Testis ebenfalls nicht exprimiert (Hansen et al., 2004; Ioannidis et al., 2001; Leeds et al., 1997; Ross et al., 2001). Eine *de novo* Expression oder Überexpression von ZBP1 wurde allerdings in verschiedenen humanen Neoplasien und Tumorarten beobachtet (Gu et al., 2004; Ioannidis et al., 2004; Ioannidis et al., 2003; Ioannidis et al., 2001; Kobel et al., 2007; Ross et al., 1997; Ross et al., 2001). Darüber hinaus wurden erhöhte Spiegel von Autoimmunantikörpern gegen ZBP1 in Seren von Krebspatienten nachgewiesen (Zhang and Chan, 2002; Zhang et al., 2007). Hierbei ist zu berücksichtigen, dass ZBP1 jüngst als *target* des β -Catenin Signaltransduktionsweges identifiziert wurde, welcher die Transkription von ZBP1 aktiviert (Noubissi et al., 2006).

Mausmodelle zeigen, dass eine ZBP1-Defizienz während der Embryogenese zu Zwergenwuchs, unvollständiger Darmentwicklung und erhöhter perinataler Mortalität führt (Hansen et al., 2004). Dem gegenüber führte die gezielte Überexpression von ZBP1 im Brustgewebe weiblicher Mäuse zur Entwicklung von Brustkrebs (Tessier et al., 2004).

1.1.3 Die Funktionen von ZBP1 in der posttranskriptionellen Genregulation

ZBP Proteine weisen eine charakteristische Lokalisierung in zytoplasmatischen RNPs (Ribonukleokomplexe) auf, welche z.T. als mRNA-Transport *granules* entlang des Zytoskeletts transportiert werden (Farina et al., 2003; Jonson et al., 2007)(siehe Abb. 1.3). Aufgrund der Lokalisierung des Proteins an putativen Transkriptionsstellen im Zellkern (Huttelmaier et al., 2005; Oleynikov and Singer, 2003), wird vermutet, dass ZBP1 seine mRNA-Liganden bereits in Nukleus bindet, mit diesen zusammen ins Zytoplasma exportiert wird und dort deren weiteres Schicksal bestimmt (siehe Abb. 1.2).

Abhängig von der RNA, an welche es über ein spezifisches *cis*-Element, wie z.T. den Zipcode der β -Aktin mRNA, bindet, kontrolliert das Protein entweder die Stabilität, Lokalisierung oder Translation seiner *target*-Transkripte (*reviewed* (Yisraeli, 2005)) (siehe Abb. 1.2). Dadurch moduliert ZBP1 verschiedene Prozesse während der Embryo- und Karzinogenese wie z.B. Zellpolarität, Migration und Proliferation.

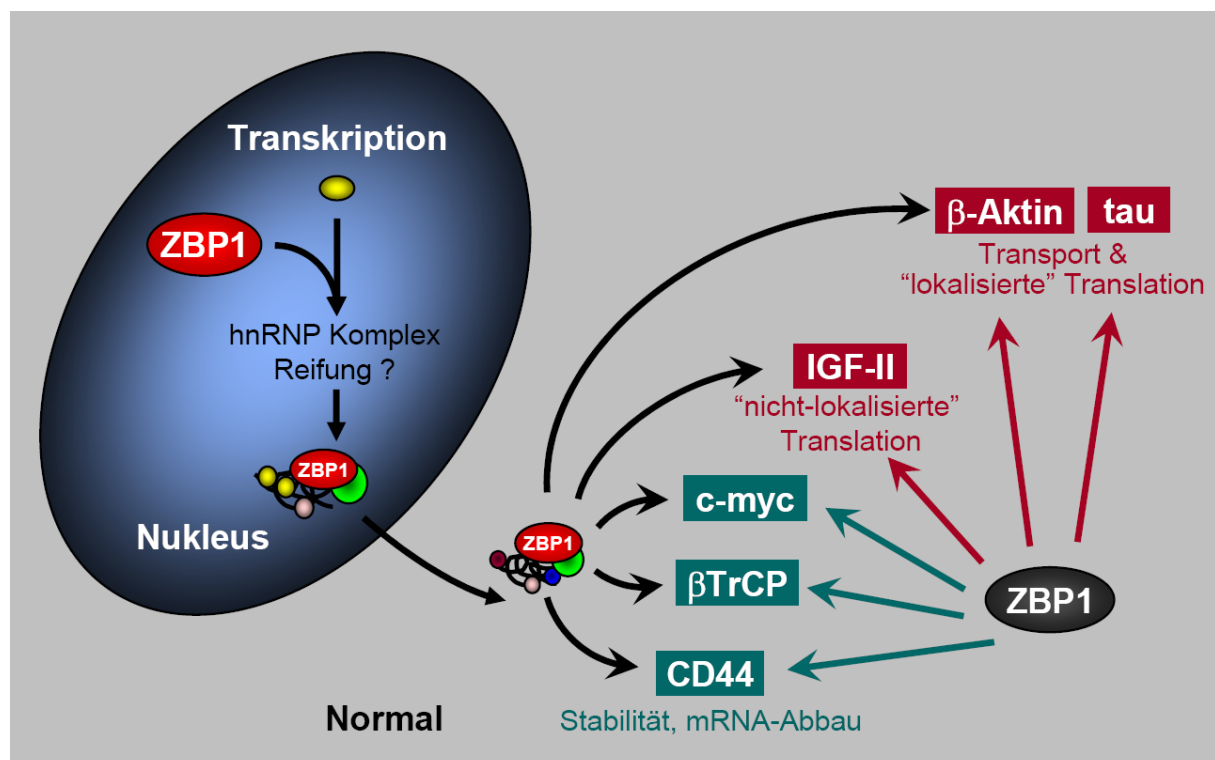


Abb. 1.2: Posttranskriptionelle Regulation verschiedener mRNAs durch ZBP1. ZBP1 bindet seine mRNA-Liganden vermutlich bereits im Nukleus, wird zusammen mit diesen ins Zytoplasma exportiert, wo es deren weiteres Schicksal bestimmt. ZBP1 ist für den Transport und die lokalisierte Translation der β -Aktin und vermutlich der tau mRNA verantwortlich. Es reprimiert darüber hinaus die Translation der IGF-II mRNA und stabilisiert c-myc, CD44 und β TrCP mRNAs.

In primären Neuronen reguliert ZBP1 den Transport sowie die lokalisierte Translation der β -Aktin mRNA in Wachstumskronen unter der Kontrolle von Kinasen der Src-Familie (Huttelmaier et al., 2005). Dieser Mechanismus ist u.a. in primären Neuronen für die Ausbildung von Neuriten verantwortlich (siehe auch 1.1.3.1.).

Im Komplex mit dem ELAV-Protein HuD assoziiert ZBP1 vermutlich mit der neuronalen *tau* mRNA, welche für ein Mikrotubuli-assoziiertes Protein kodiert und asymmetrisch in den Axonen primärer Neuronen lokalisiert wird (Atlas et al., 2004). Auch für diese mRNA wird der Mechanismus der lokalisierten Translation postuliert, bei dem ZBP1 als translationeller Repressor fungieren könnte. Translationskontrolle durch ZBP1 wurde auch für die *IGF-II* mRNA beschrieben (Nielsen et al., 1999; Liao et al., 2004), wobei in diesem Fall neben einer Regulation über den 3'UTR auch eine über den 5'UTR-vermittelte Repression der Translation postuliert wird (siehe 1.1.3.2).

Neben Lokalisierung und Translation reguliert ZBP1 auch die Stabilität verschiedener mRNAs. Leeds et al., 1997 beschreiben erstmals die Stabilisierung der *c-myc* mRNA durch ZBP1 (Leeds et al., 1997). Hierbei handelt es sich um einen translationsgekoppelten Mechanismus, bei dem ZBP1 durch Bindung an die so genannte CRD (*Coding Region instability Determinant*) die endonukleolytische Spaltung derselbigen verhindert. Für die Regulation der β TrCP mRNA-Stabilität wird ebenfalls ein Mechanismus postuliert, welcher die kodierende Region der mRNA involviert, wohingegen *CD44* mRNA-Stabilität durch ZBP1 vermutlich über deren 3'UTR reguliert wird (Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006).

1.1.3.1 Die lokalisierte Translation der β -Aktin mRNA

Besonders während der Embryonalentwicklung ist es für verschiedene Prozesse notwendig, dass mRNAs asymmetrisch sortiert und lokalisiert translatiert werden. Lokalisierte Translation ist aus zweierlei Hinsicht von Bedeutung: zum einen stellt sie einen Energiegewinn für eine Zelle dar, da es energetisch günstiger ist wenige RNA-Moleküle an die Peripherie zu transportieren, um dort größere Proteinmengen zu synthetisieren, als große Proteinmengen zu transportieren. Zum anderen bietet das lokale Vorhandensein einer RNA den Vorteil, das entsprechende Protein lokal zu dem Zeitpunkt zu synthetisieren, an dem es benötigt wird, um so ektopische Fehlfunktionen zu verhindern. Der Mechanismus der

lokalisierten Translation wurde für verschiedene mRNAs in unterschiedlichen Organismen beobachtet. So werden z.B. *oskar* oder *nanos* mRNAs während der *Drosophila* Embryogenese asymmetrisch sortiert und anschließend lokal translatiert (*reviewed* (Wilhelm and Smibert, 2005)). Auch für die Vg1 mRNA aus *Xenopus* wurde eine durch Vg1BP/Vera regulierte lokalisierte Translation postuliert (Zhang et al., 1999).

Diese Arbeiten postulieren, dass in primären Fibroblasten die Zellmotilität und Ausbildung einer intrinsischen Polarität durch die Lokalisierung der β -Aktin mRNA an die Führungslamelle und deren lokale Translation gewährleistet wird (Farina et al., 2003; Kislauskis et al., 1994). Die lokalisierte Translation führt zu einer erhöhten Konzentration von monomerem Aktin, welches zu F-Aktin polymerisiert und dadurch eine gerichtete Bewegung der Zelle fördert (Condeelis and Singer, 2005). Auch in Neuronen spielt die lokalisierte β -Aktin Translation eine wichtige Rolle (Huttelmaier et al., 2005). Hier führt die lokale Erhöhung des monomeren Aktin-Spiegels zu vermehrter F-Aktin-Polymerisation, sorgt dadurch für das gerichtete Auswachsen von Dendriten und Axonen, wodurch letztlich die Ausbildung synaptischer Vernetzungen im Gehirn gewährleistet wird.

Um eine RNA an die Zellperipherie transportieren zu können, ist es notwendig, diese translationell zu reprimieren. Dies wird durch die Integration der RNA in einen RNP-Komplex gewährleistet, welcher verhindert, dass die RNA mit Ribosomen assoziiert (Dahm and Kiebler, 2005). Einen solchen Translationsrepressor stellt ZBP1 für die β -Aktin mRNA dar. Das Protein bindet an den so genannten Zipcode, einem RNA-Sequenzmotiv innerhalb der ersten 54 Nukleotide des β -Aktin 3'UTRs (Farina et al., 2003; Ross et al., 1997). Der β -Aktin 3'UTR enthält innerhalb der ersten 233 Nukleotide zwei dieser ZBP1 Bindungsstellen. Gebunden an die β -Aktin mRNA reprimiert ZBP1 während des Transports deren Translation. Am Zielort angekommen, wird die RNA vom Protein freigesetzt und kann lokal translatiert werden. Der Mechanismus der RNA-Bindung und -Freisetzung wird über den Phosphorylierungsstatus von ZBP1 reguliert (siehe 1.1.1).

Wie bereits unter 1.1.1 erwähnt, besitzt ZBP1 in der Linkerregion zwischen KH2 und KH3 zwei Phosphorylierungsstellen (Abb. 1.1). Gebunden an die β -Aktin mRNA wird ZBP1 auf seinem Weg vom Nukleus ins Zytoplasma am Serin 388 durch die Serin/Threonin-Kinase ERK1/2 phosphoryliert. Die Serin-Phosphorylierung verhindert die Assoziation des Proteins mit Src-Kinasen und damit dessen Tyrosin-Phosphorylierung (Huttelmaier et al., 2005). Dadurch wird gewährleistet, dass die β -Aktin mRNA während ihres Transports an die Zellperipherie von ZBP1 gebunden bleibt und nicht frühzeitig freigesetzt wird.

Der translationell reprimierte RNP-Komplex wird entlang des Zytoskeletts zur Zellperipherie transportiert (Abb. 1.3). Dort angekommen wird das Serin 388 wahrscheinlich durch die Phosphatase PP2B dephosphoryliert (Lederer et al., in Vorbereitung). Dadurch wird die Assoziation der Src-Kinase begünstigt, welche ZBP1 nun am Tyrosin 396 phosphorylieren kann, was wiederum die Freisetzung der β -Aktin mRNA zur Folge hat (Huttelmaier et al., 2005). Nach Freisetzung der β -Aktin mRNA von ZBP1 kann sich der Translationsinitiationskomplex ausbilden. Die lokalisierte Translation findet statt.

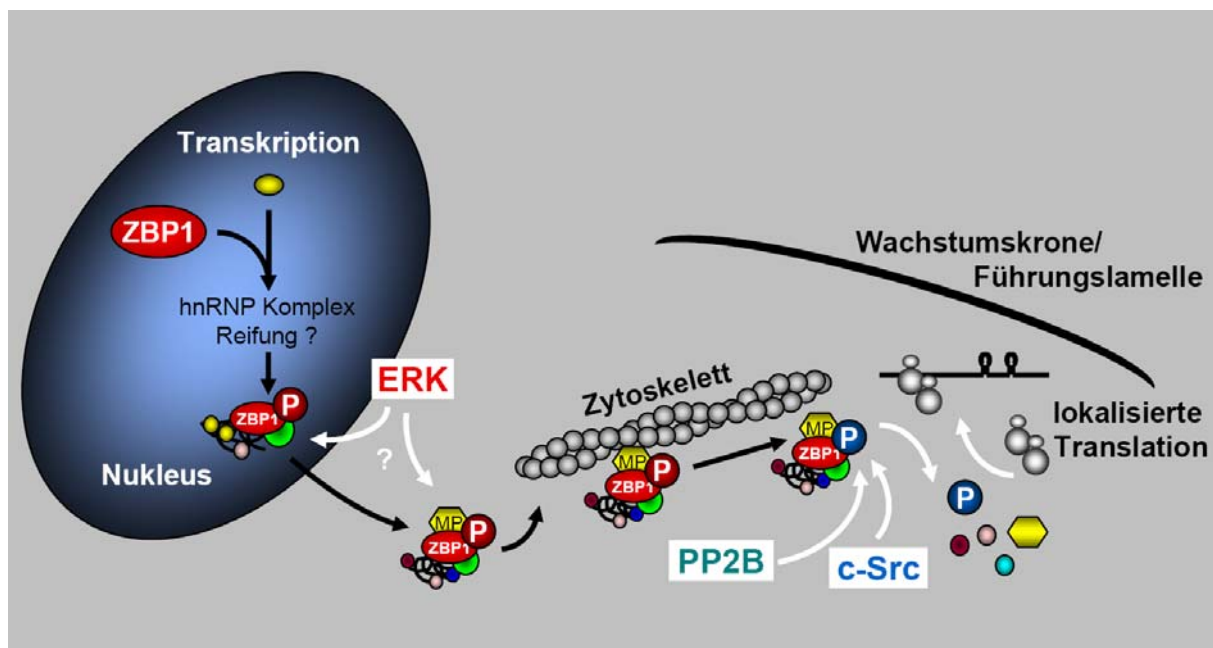


Abb. 1.3: Die Lokalisierte Translation der β -Aktin mRNA. Nach der Translation bindet ZBP1 an die β -Aktin mRNA und wird ins Zytoplasma exportiert. Die Bindung von ZBP1 an die β -Aktin mRNA verhindert die Ausbildung eines Translationsinitiationskomplexes. Translationell reprimiert wird der RNP-Komplex entlang des Zytoskeletts zur Zellperipherie transportiert. Während des Transports ist ZBP1 am Serin 388 phosphoryliert. Dadurch wird die Assoziation der Src-Kinase inhibiert, was eine frühzeitige Freisetzung der RNA verhindert. An der Zellperipherie wird das Serin 388 vermutlich durch PP2B dephosphoryliert, wodurch Src-Kinasen mit ZBP1 assoziieren und Letzteres am Tyrosin 396 phosphorylieren können. Durch diese Phosphorylierung wird die β -Aktin mRNA von ZBP1 freigesetzt und kann lokal translatiert werden.

1.1.3.2 Translationelle Repression der IGF-II mRNA

IGF-II (*Insulin-like Growth Factor II*) ist ein sezernierter onkofötaler Wachstumsfaktor mit auto- und parakriner Wirkung, dessen Überexpression zu überproportionalen Wucherungen und Missbildungen im Embryo führen (*Beckwith-Wiedemann-Syndrom*, (Weksberg et al., 1993). Die IGF-II Expression wird wesentlich durch paternales *Imprinting* reguliert (DeChiara et al., 1991). Darüber hinaus findet eine zusätzliche

Regulation auf posttranskriptioneller Ebene statt. Es existieren vier Isoformen der mRNA, welche alle eine identische kodierende Region und 3'UTR besitzen, sich jedoch im 5'UTR stark unterscheiden und differentiell exprimiert werden (Nielsen et al., 1995). Die *leader4*-mRNA, welche einen nur 100 Nukleotide großen 5'UTR enthält, wird konstitutiv exprimiert. Die *leader3*-mRNA, deren ca. 1,2 kb großer 5'UTR sehr cytosinreich ist und einen hohen Grad an Sekundärstrukturen aufweist, wird translationell reprimiert in 100S Partikeln gespeichert und kann in proliferierenden Zellen vermehrt translatiert werden. Mittels *UV-crosslinking* wurde ZBP1 als Bindungspartner des *leader3* identifiziert (Nielsen et al., 1999). Anhand eines Luziferase-Reportersystems demonstrierten Nielsen und Kollegen eine *leader3* abhängige Reprimierung der Translation der *IGF-II* mRNA, die vermutlich durch ZBP1 vermittelt wurde (Nielsen et al., 1999). Interessanterweise zeigen die *leader3*-mRNA und ZBP1 sowohl während der Embryogenese als auch in adulten Geweben ein nahezu identisches Expressionsmuster (Runge et al., 2000). Der Knockdown von ZBP1 erhöht die IGF-II Translation. Die damit verbundene vermehrte Sekretion von IGF-II steigert die Proliferation von K562 Zellen (Liao et al., 2004). Neben dem *leader3* wurden auch im *IGF-II* 3'UTR ZBP1-Bindungsstellen identifiziert (Nielsen et al., 2004). Jedoch wurde hierfür bis *dato* kein Regulationsmechanismus beschrieben.

Die H19 RNA, welche mit dem *Imprinting* des IGF-II Genlokus im Mausmodell in Verbindung gebracht wird, assoziiert ebenfalls mit ZBP1 (Zemel et al., 1992). Die Funktionen der untranslatierten H19 RNA, welche keinen bekannten ORF (*open reading frame*) enthält, sind weitestgehend unbekannt. Jedoch wird auch für die H19 RNA eine Funktion bei der negativen Regulation der IGF-II Expression postuliert (Li et al., 1998). Auch der Verlust der H19 RNA führt zu erhöhtem Wachstum während der Embryogenese (Leighton et al., 1995). Es wird vermutet, dass ZBP1 den 3' Terminus der H19 RNA bindet und deren zytoplasmatische Lokalisierung reguliert (Runge et al., 2000).

1.1.3.3 Translationsgekoppelte Regulation der *c-myc* mRNA-Stabilität

Die mRNA-Stabilität des Protoonkogens c-Myc wird durch verschiedene RBPs reguliert. Die mRNA enthält zwei destabilisierende Elemente, über die unterschiedliche Regulationsmechanismen vermittelt werden. Neben einem ARE (*AU-rich element*), welches im 3'UTR der mRNA lokalisiert ist und u.a. durch das ELAV-Protein HuR reguliert wird, befindet sich in der kodierenden Region der mRNA auch eine CRD (*Coding Region*

instability Determinant), durch welche die mRNA in einem translationsgekoppelten Mechanismus destabilisiert wird (Abb. 1.4). Die CRD vermittelte Destabilisierung der *c-myc* mRNA wird durch Bindung von ZBP1 verhindert und ist aufgrund des Expressionsmusters von ZBP1 besonders während der Embryonalentwicklung und Karzinogenese von Bedeutung (Ioannidis et al., 2001; Leeds et al., 1997).

Die CRD vermittelte Stabilisierung der *c-myc* mRNA durch ZBP1 ist an aktive Translation der mRNA gekoppelt. Der 5' Bereich der 249 Nukleotide großen CRD enthält einige seltene Codons (*rare codon region*), wodurch die Elongationsgeschwindigkeit in diesem Bereich verringert wird (*ribosomal pausing* (Lemm and Ross, 2002)). An die Region seltener Codons schließt eine endonukleolytische Schnittstelle an. Wird die Elongation durch das Fehlen einer bestimmten tRNA inhibiert, ist die endonukleolytische Schnittstelle ungeschützt. Die RNA ist dem Abbau durch Endonukleasen ausgesetzt. Ist jedoch ausreichend ZBP1 in der Zelle vorhanden, bindet dieses an die CRD und verhindert dadurch den endonukleolytischen Abbau der mRNA (Sparanese and Lee, 2007). Die Bindung von ZBP1 an die *c-myc* mRNA inhibiert jedoch nicht die Translation. Im weiteren Verlauf der Elongation wird ZBP1 durch Ribosomen von der mRNA verdrängt (Lemm and Ross, 2002).

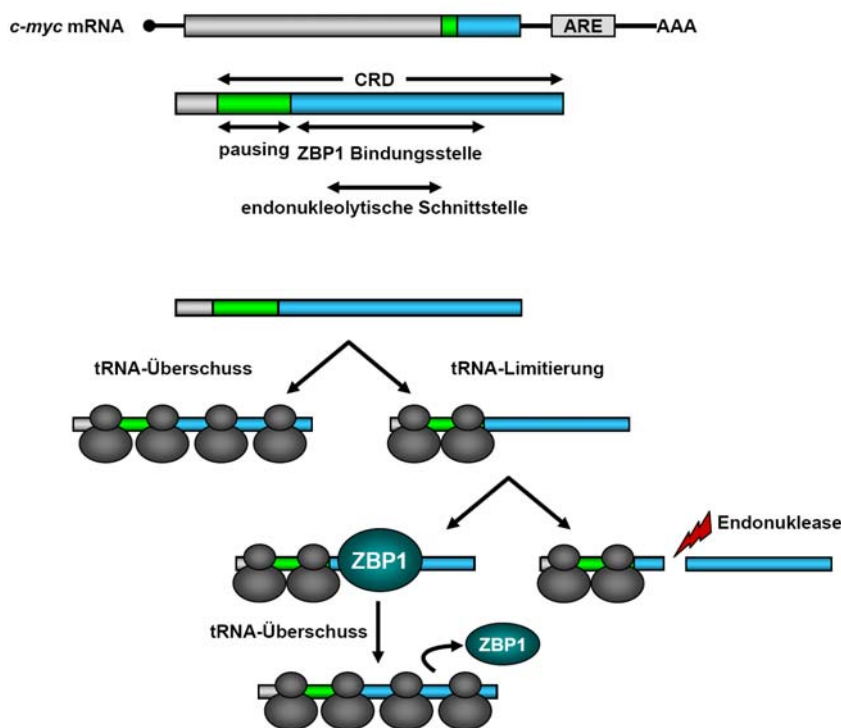


Abb. 1.4: Mechanismus der translationsgekoppelten Stabilitätskontrolle der *c-myc* mRNA durch ZBP1. Die CRD (*Coding Region instability Determinant*) der *c-myc* mRNA besteht aus einem Bereich seltener Codons (grün). Daran schließt sich die ZBP1 Bindungsstelle, welche mit einer endonukleolytischen Schnittstelle überlappt, an (blau). Die Limitierung bestimmter tRNAs verringert die Elongationsgeschwindigkeit der Translation. Dadurch ein Teil der RNA vor Endonukleaseangriffen ungeschützt. Ist ausreichend ZBP1 vorhanden, bindet dieses die *c-myc* RNA und verhindert dadurch deren Abbau. Im Verlauf der Elongation wird ZBP1 von den Ribosomen verdrängt. (Lemm and Ross, 2002)

1.1.3.4 Stabilitätskontrolle von *CD44*- und *βTrCP*-mRNA durch ZBP1

ZBP1 reguliert neben *c-myc* auch die Stabilität zweier weiterer mRNAs – *CD44* und *βTrCP* (Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006). Ähnlich wie für die *c-myc* mRNA ist auch für *βTrCP* ein Mechanismus beschrieben, welcher einen Teil der kodierenden Region der mRNA involviert. Noubissi und Kollegen postulieren, dass infolge der Aktivierung des β -Catenin/TCF Signaltransduktionsweges die *βTrCP* mRNA stabilisiert wird (Noubissi et al., 2006). Überraschenderweise aktiviert der β -Catenin/TCF Signaltransduktionsweg jedoch nicht die Transkription von β TrCP. Stattdessen wird das RNA-bindende Protein ZBP1 verstärkt transkribiert, welches direkt mit der kodierenden Region der *βTrCP* mRNA assoziiert, was wiederum die Stabilisierung letzterer zur Folge hat. Eine erhöhte endogene β TrCP Proteinmenge führt ihrerseits zu einer Aktivierung der SCF ^{β TrCP1} E3 Ligase, wodurch β TrCP-Substrate wie β -Catenin oder I κ B α vermehrt degradiert werden. ZBP1 wird in diesem Zusammenhang als direktes Zielgen des β -Catenin/TCF Signaltransduktionsweg beschrieben, welches in einem negativen *feed back* Mechanismus β -Catenin/TCF *signaling* induziert (Noubissi et al., 2006).

Die Stabilität der *CD44* mRNA hingegen wird über deren 3'UTR und dessen Assoziation mit ZBP1 reguliert. Vikesaa und Kollegen identifizierten mittels *mobility-shift assays* und *UV crosslinking* im 3'UTR der *CD44* mRNA fünf putative ZBP1 Bindungsregionen (Vikesaa et al., 2006). Darüber hinaus wurde nachgewiesen, dass die *CD44* mRNA mit ZBP1 in RNP *granules* kolokalisierte. Der Knockdown von ZBP1 und Imp3 reduzierte zudem die Halbwertszeit der *CD44* mRNA und führte ähnlich wie der *CD44* Knockdown selbst zu reduzierter Zelladhäsion und dem Verlust von Invadopodien (Vikesaa et al., 2006).

1.1.4 ZBP1 enthaltende RNP *granules*

Zytoplasmatische RNPs (Ribonukleoprotein *granules*) kommen in verschiedenen Zellen vor, z.B. in Keimzellen (*germinal granules*), somatischen Zellen (*stress granules* und *processing bodies*) oder Neuronen (*neuronal granules* wie Staufen- oder FMRP-*granules*). Sie alle spielen eine Rolle in der posttranskriptionellen Genregulation, allerdings variiert die Zusammensetzung dieser Partikel z.T. sehr stark. Sie können u.a. ribosomale Untereinheiten, Translationsinitiationsfaktoren, Enzyme, die am RNA-Abbau beteiligt sind, Helikasen, Gerüstproteine (*scaffolding factors*), Motorproteine und RNA-bindende Proteine enthalten und die Lokalisierung, Translation oder Stabilität der assoziierten Transkripte (*cargo*-RNAs) bestimmen (*reviewed* (Anderson and Kedersha, 2006)). Die Funktion dieser zytoplasmatischen RNP *granules* ist dennoch weitgehend unerforscht. Auch ist unbekannt, wie viele verschiedene RNP *granules* existieren, wie groß ihre Heterogenität ist, wie sie assembliert oder dissoziiert werden und welche Komponenten sie enthalten. Gleichwohl gibt es Hinweise, dass lokale Signalereignisse eine Rolle bei der RNA-Freisetzung spielen (Huttelmaier et al., 2005) uns anzunehmen, dass RNAs während ihres Transportes in solchen Partikeln translationell reprimiert werden können.

Kürzlich wurden von Jonson und Kollegen ZBP1 enthaltende RNP *granules* identifiziert, welche anscheinend eine eigene Spezies von *granules* darstellen, die sich von *stress granules*, *processing bodies* oder neuronalen Staufen- und FMRP-*granules* unterscheiden soll (Jonson et al., 2007). Für die identifizierten Partikel wurde ein Durchmesser von 100-300 nm bestimmt und eine sphärische Form postuliert. Neben ZBP1 enthielten diese *granules* auch 40S ribosomale Untereinheiten, verschiedene *heterologous nuclear ribonucleoproteins* (hnRNP A1, hnRNP A2/B1, hnRNP D, hnRNP L, hnRNP Q, hnRNP R und hnRNP U), *poly(A)-binding proteins* (PABP1, PABP2, PABP4), den Transkriptionsfaktor YB1, RNA Helikase A sowie Proteine des NFAR-Komplexes. Darüber hinaus wurden auch das nukleäre *cap-binding protein* CBP80 und Komponenten des *exon junction complex* (EJC) identifiziert, was darauf hindeutet, dass zumindest ein Teil der in den *granules* enthaltene RNA unmittelbar nach Prozessierung in diese Strukturen rekrutiert wurde und noch nicht die erste Runde der Translation durchlaufen haben konnte (Jonson et al., 2007). Darauf deutet auch die Abwesenheit der Translationsinitiationsfaktoren eIF4E, eIF4G, and eIF2 α hin. Noch ungeklärt ist die Frage, in wieweit ZBP1 *granules* heterogen in ihrer Protein- und RNA-Zusammensetzung sind.

1.2 Zellulärer Stress – die Entstehung von stress granules

Umwelteinflüsse können eine Vielzahl zellulärer Prozesse stören und erfordern deshalb eine kontinuierliche Anpassung auf zellulärer Ebene, um das Überleben zu sichern. Deshalb haben Zellen im Laufe der Evolution verschiedene Mechanismen entwickelt, um auf solche Umwelteinflüsse reagieren zu können. Häufig lösen veränderte Umweltbedingungen intrazelluläre Stressreaktionen aus. Während einer solchen zellulären Stressreaktion modifizieren Zellen ihr Repertoire an Proteinen, welches sie synthetisieren, indem sie z.B. bestimmte Gene wie Hitzeschockproteine (HSPs) aktivieren, und bilden darüber hinaus im Zytoplasma so genannte *stress granules* (SGs) aus. SGs sind zytoplasmatische granuläre Strukturen, in denen translationell reprimierte RNP-Komplexe (Ribonukleoprotein-Komplexe) infolge des stressbedingten Erliegens der Translation reversibel aggregieren. Faktoren, welche eine solche Stressreaktion auslösen können, sind z.B. erhöhte Temperatur, die Intoxikation mit bestimmten Schwermetallen (oxidativer Stress, ER-Stress), osmotischer Schock, UV-Bestrahlung, Nahrungsmangel oder auch Virusinfektionen.

Während der zellulären Stressreaktion kommt es zu einem beinahe vollständigen Erliegen der Translation. Ein Großteil der mRNAs, welcher von Polysomen freigesetzt wird, wird dabei in SGs rekrutiert (Anderson and Kedersha, 2002b; Kedersha and Anderson, 2002). Bislang sind zwei Wege bekannt, über welche die Ausbildung von SGs initiiert werden kann. Beiden Wegen ist eine Inhibierung der Translation gemeinsam, die entweder durch Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 α oder durch die funktionelle Blockierung der Helikase eIF4A hervorgerufen wird (Anderson and Kedersha, 2002a; Anderson and Kedersha, 2002b; Bordeleau et al., 2006; Bordeleau et al., 2005; Kedersha et al., 1999; Low et al., 2005; Mazroui et al., 2006).

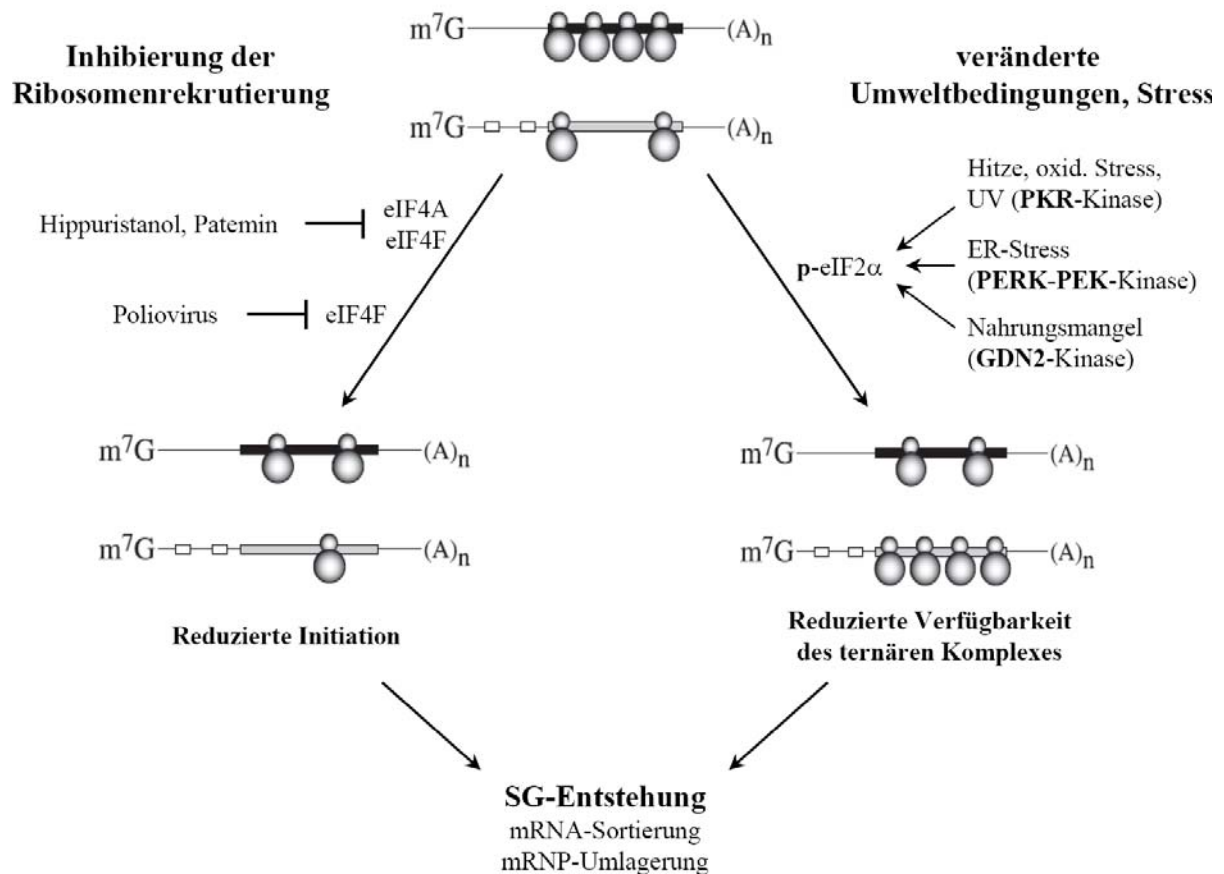


Abb. 1.5: Induktion der SG-Bildung. Wird der Initiationsfaktor eIF2 α infolge von Stress phosphoryliert, sinkt die Konzentration des eIF2-GTP-tRNA^{Met} Komplexes. Dadurch wird der Initiationskomplex nicht mit tRNA^{Met} beladen, was eine Inhibierung der Translation zur Folge hat. Auch die Blockierung der Helikase eIF4A durch Hippuristanol oder Patemin sowie die verminderte Ausbildung des eIF4F-Komplexes infolge Poliovirus-Infektion inhibiert die Translationsinitiation. Das Erliegen der Translation führt zu SG-Bildung. Abb. In Anlehnung (Mazroui et al., 2006)

Bei der Initiation der Translation bilden die eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren eIF1, eIF2, eIF3 und eIF5 zusammen mit der 40S ribosomalen Untereinheit den 43S Prä-Initiationskomplex aus (Asano et al., 2000; Dever, 1999; Pestova and Hellen, 1999; Phan et al., 2001). Dieser 43S Komplex rekrutiert die *cap*-Struktur der mRNA und die damit assoziierten eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren des eIF4F-Komplexes sowie das poly(A) bindende Protein, wodurch der 48S Initiationskomplex gebildet wird. Der 48S Initiationskomplex durchsucht die mRNA nach dem Startcodon. Wird dieses durch das Anticodon der tRNA_{Met} erkannt, hydrolysiert eIF5 das mit eIF2 assoziierte GTP, wodurch es zu Umlagerungen des Initiationskomplexes kommt. Frühe Initiationsfaktoren dissoziieren aus dem Komplex. Die 60S ribosomale Untereinheit wird

rekrutiert, wodurch das 80S Ribosom entsteht. Durch Rekrutierung weiterer Ribosomen bildet sich ein Polysom.

Der Prozess der Initiation ist stark reguliert. Ein Schlüsselereignis bei der Initiation der Translation ist die Beladung der kleinen ribosomalen Untereinheit mit der tRNA_{Met} während der Ausbildung des 43S Prä-Initiationskomplexes. Dies geschieht durch den eIF2-GTP-tRNA_{Met} ternären Komplex. Die α Untereinheit des eukaryotischen Translationsinitiationsfaktors eIF2 ist ein Substrat verschiedener stressaktivierter Kinasen (PKR, PERK-PEK und GCN2), welche diese am Serin51 phosphorylieren können. Die Phosphorylierung von eIF2 α reduziert die Konzentration des eIF2-GTP-tRNA^{Met} ternären Komplexes, der die kleine ribosomale Untereinheit zur Initiation der Translation mit tRNA^{Met} belädt. Außerdem findet unter eIF2 α Phosphorylierung kein GDP/GTP-Austausch statt, der jedoch für die Ausbildung des eIF2-GTP-tRNA^{Met} ternären Komplexes essentiell ist (Kedersha and Anderson, 2002; Kedersha et al., 2002; Kedersha et al., 1999). Fehlt der 40S ribosomalen Untereinheit die tRNA^{Met}, kann sich der 43S Prä-Initiationskomplex nicht ausbilden, wodurch die Translationsinitiation inhibiert wird.

Die Kinasen, welche die Serin51 Phosphorylierung der eIF2 α -Untereinheit katalysieren, werden durch Stress infolge veränderter Umweltbedingungen aktiviert. So wird z.B. die Kinase PKR infolge erhöhter Temperatur, UV-Bestrahlung, oxidativen Stresses oder virale Infektionen aktiviert (Williams, 2001). ER-Stress hingegen induziert infolge PERK-PEK-Aktivierung die eIF2 α -Phosphorylierung und damit die SG-Bildung (Harding et al., 2000). Kommt es aufgrund Nahrungsmangel zu Hungerzuständen im Organismus, entstehen SGs infolge GCN2-Aktivierung (Kimball, 1999). Die HRI-Kinase, welche eine veränderte Häm-Versorgung während der Erythrozyten-Differenzierung widerspiegelt, induziert ebenfalls die SG-Bildung infolge eIF2 α -Phosphorylierung (Han et al., 2001; Lu et al., 2001).

Infolge der Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α wird die Translationsinitiation inhibiert, wodurch ein Großteil an mRNAs in translationell reprimierten 48S Komplexen vorliegt. Anderson und Kedersha postuliert, dass die Bindung der RNA-bindenden Proteine TIA-1 und TIAR an diese inhibierten 48S Komplexe deren Aggregation bewirkt, wodurch es zur Ausbildung von SGs kommt (Kedersha et al., 1999). SGs sind reversible Strukturen, so dass die in SGs gespeicherten 48S Komplexe infolge der Stresserholung verbunden mit einer ausreichenden Menge des eIF2-GTP-tRNA^{Met} ternären Komplexes reinitiiert werden können (Kedersha et al., 2005).

Neben der Inhibierung der Translationsinitiation durch Phosphorylierung von eIF2 α , welche durch veränderte Umweltbedingungen ausgelöst wird, können SGs auch unabhängig

von diesem Schlüsselereignis entstehen. So wurde z.B. beschrieben, dass mitochondrial wirkende Gifte zur SG-Bildung ohne gleichzeitige eIF2 α Phosphorylierung führen (Kedersha et al., 2002). Jüngst wurde beobachtet, dass die Inhibierung anderer an der Initiation der Translation beteiligter Faktoren ebenfalls SG-Entstehung zur Folge hat. Hierbei ist besonders die Inhibierung der RNA-Helikase eIF4A bzw. des eIF4F-Komplexes zu erwähnen, in deren Folge SGs unabhängig der eIF2 α Phosphorylierung assemblieren (Mazroui et al., 2006). Die RNA-Helikase eIF4A ist der in der Zelle am häufigsten vorkommende Translationsinitiationsfaktor, welcher in drei Kopien pro Ribosom vorliegt (Duncan et al., 1987). Es gibt drei Isoformen, von denen zwei (eIF4AI und eIF4AII) beinahe identisch und funktionell austauschbar sind (Conroy et al., 1990; Yoder-Hill et al., 1993). eIF4A liegt in der Zelle frei oder als Untereinheit des eIF4F-Komplexes vor, welcher neben eIF4A auch das *cap*-bindende Protein eIF4E sowie den als Plattform des Komplexes dienenden Translationsinitiationsfaktor eIF4G enthält (Edery et al., 1983; Grifo et al., 1983). Die RNA-Helikase eIF4A ist während der Initiation der Translation für die Rekrutierung der Ribosomen zur mRNA notwendig (Rogers et al., 2002). Jüngst wurde zwei Wirkstoffe, Hippuristanol und Patemin, welche die Aktivität der RNA-Helikase eIF4A beeinflussen, als Inhibitoren der Translationsinitiation und SG-Induktoren identifiziert (Bordeleau et al., 2006; Bordeleau et al., 2005; Low et al., 2005). Hippuristanol inhibiert die Fähigkeit der Helikase, mRNA zu binden (Bordeleau et al., 2006), während Patemin die Affinität des freien eIF4A zu mRNA erhöht, wodurch weniger eIF4A für die Ausbildung des eIF4F-Komplexes zur Verfügung steht (Bordeleau et al., 2005; Low et al., 2005). Dem gegenüber affektieren Poliovirus-Infektionen eIF4A nur indirekt. Die Poliovirus Protease 2A^{pro} schneidet den bei der Ausbildung des eIF4F-Komplexes als Plattform dienenden Faktor eIF4G, wodurch die Assoziation der RNA-Helikase eIF4A an der *cap*-Struktur der mRNA verhindert wird (Gradi et al., 1998). Poliovirusinfektionen induzieren daher auch SG-Bildung unabhängig der Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α (Mazroui et al., 2006).

Allen initialen Schritten der SG-Entstehung ist damit die Inhibierung der translationellen Initiation gemeinsam. Infolge eines translationellen Arrests, der durch die Inhibierung der Translationsinitiation hervorgerufen wird, lösen sich Polysomen auf. Translationell blockierte mRNAs werden aus letzteren freigesetzt und aggregieren zusammen mit verschiedenen RNA-bindenden Proteinen (RBPs) wie TIA-1, TIAR, G3BP, oder CPEB in SGs (Abb. 1.6)(Anderson and Kedersha, 2006; Kedersha et al., 1999; Mazroui et al., 2002; Thomas et al., 2005; Tourriere et al., 2003; Wilczynska et al., 2005).

Nach dem Modell von Kedersha und Kollegen stellen SGs ein Reservoir stabiler aber translationell reprimierter mRNAs dar, welche durch Lagerung in selbigen Strukturen vor Abbau durch *processing bodies* (PBs) oder das Exosom geschützt werden (Kedersha et al., 2005)(Abb. 1.6). Hierbei wird postuliert, dass RNP-Komplexe in SGs einer Reorganisation unterzogen werden, aufgrund derer sie entweder für die Speicherung in SGs, die Degradation in PBs oder aber die Reinitiation nach Stresserholung sortiert werden (Kedersha et al., 2005). Dieses Modell stützt sich darauf, dass es sich bei SGs und PBs um bewegliche Strukturen handelt, welche *in vivo* temporär miteinander assoziieren (siehe Abb. 4.1). Bislang gibt es keinerlei Hinweise auf RNA-Abbau in SGs, da mRNAs in SGs stabil und zudem polyadenyliert sind. Darüber hinaus lokalisieren die *decapping* Enzyme DCP1 und DCP2, welchen in den RNA-Abbau in PBs involviert sind, ausschließlich in PBs, nicht jedoch in SGs (Sheth and Parker, 2003). Dem gegenüber werden verschiedene RBPs wie HuR, Staufen oder FMRP, welche unter physiologisch normalen Bedingungen die Stabilität und/oder Translation bestimmter mRNAs regulieren, unter Stress in SGs rekrutiert (Gallouzi et al., 2000; Mazroui et al., 2002; Thomas et al., 2005).

Obwohl bisher viele RBPs als SG-Komponenten identifiziert wurden, ist ihre Funktion in diesen Strukturen weitestgehend unbekannt. Ebenso unzureichend untersucht ist das Schicksal von mRNAs in SGs. Ob und in wie weit RBPs das Schicksal von mRNAs unter Stress beeinflussen, wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

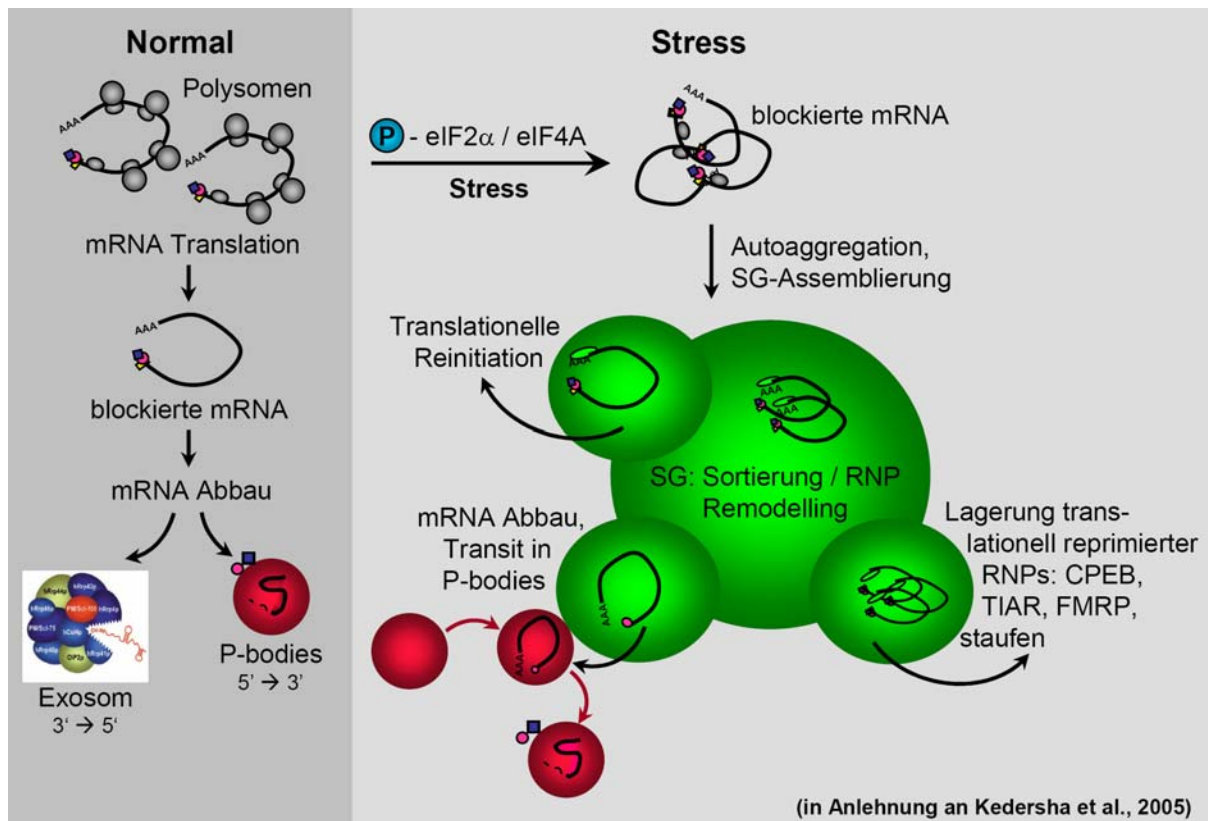


Abb. 1.6: Zytoplasmatische stress granules (SGs). Unter physiologisch normalen Bedingungen werden mRNAs in Polysomen translatiert. Ihre anschließende Degradation verläuft über zwei Abbauewege – zum einem durch Exonukleasen des Exosoms in 3'→5' Richtung, zum anderen durch *processing bodies* (PBs) in 5'→3' Richtung. Während der zellulären Stressantwort wird der Initiationsfaktor eIF2 α phosphoryliert, was eine Reduktion des eIF2-GTP-tRNA^{Met} zur Folge hat und die Initiation der Translation inhibiert. Inhibition der Helikase eIF4A führt ebenfalls zu einem translationellen Arrest. Die Bindung von TIA-1 und TIAR an die inhibierten 48S Komplexe bewirkt deren Aggregation zu SGs. In SGs können RNP-Komplexe gespeichert oder zum Abbau in PBs oder möglicherweise auch das Exosom sortiert werden. In SGs selbst finden kein Abbau und keine Translation statt. Nach Stresserholung können die eingelagerten mRNAs reinitiiert werden.

1.3 Zielstellung der Arbeit

Das onkofötale RNA-bindende Protein ZBP1 ist ein wichtiger posttranskriptioneller Regulator verschiedener mRNAs. Indem ZBP1 den Transport, die Translation und die Stabilität seiner RNA-Liganden reguliert, moduliert das Protein wichtige zelluläre Prozesse wie Zellpolarität, Migration und Proliferation. Aufgrund dieser multiplen Funktionen ist ZBP1 sowohl an der Embryonalentwicklung als auch an der Karzinogenese beteiligt.

Die Rolle RNA-bindender Proteine wie ZBP1 unter physiologischen Stressbedingungen ist jedoch bislang weitestgehend unerforscht. Im Rahmen dieser Dissertation sollte daher die Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress untersucht werden. Einen Schwerpunkt bildete dabei der Einfluss von ZBP1 auf das Schicksal seiner mRNA-Liganden während der zellulären Stressantwort. Hierbei sollte untersucht werden, inwieweit spezifische *cis/trans*-Interaktionen unter Zellstress von Bedeutung sind und möglicherweise den Aufbau von SGs bzw. die RNA-Rekrutierung oder das Schicksal bestimmter mRNAs in SGs regulieren können. Dabei sollte analysiert werden, ob möglicherweise die gleichen regulatorischen Netzwerke, welche die Stabilität, Lokalisierung und Translation von mRNAs unter physiologisch normalen Bedingungen kontrollieren, auch unter zellulärem Stress wirksam sind.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues stressbasierendes *screening*-Verfahren (SIRL, *Stress-based Isolation of RNA-Ligands*) entwickelt, mit dem es nicht nur gelang, bereits für ZBP1 bekannte spezifische *cis/trans*-Interaktionen als stressrelevant zu charakterisieren, sondern darüber hinaus neue mRNA-Liganden zu identifizieren, welche sowohl unter Stress als auch unter physiologisch normalen Bedingungen von ZBP1 reguliert werden. Dadurch wurde belegt, dass dieselben regulatorischen Interaktionen zwischen mRNAs und ihren RBPs sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Stress wirksam sind. Darüber hinaus konnte erstmalig eine Funktion für RBPs in SGs identifiziert und charakterisiert werden. Die SIRL-Methode ist in zweierlei Hinsicht von Bedeutung: erstens verdeutlicht sie, dass unter Stress dieselben regulatorischen Netzwerke aktiv sind wie unter Normalbedingungen und gewährt damit Einblick in die Funktionsweise von SGs, und zweitens stellt sie ein Verfahren dar, welches es ermöglicht, in einem einzigen *screening*-Ansatz sowohl auf Translations- als auch auf mRNA-Stabilitätsebene regulierte RNA-Liganden für in SG-lokalisierte RBPs zu identifizieren.