

4 Diskussion

4.1 ZBP1 assoziiert während der zellulären Stressantwort mit RNA-Liganden in SGs

Das RNA-bindende Protein ZBP1 ist ein Mitglied der VICKZ Proteinfamilie, welche wichtige Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation erfüllt und dadurch während der Embryo- sowie Karzinogenese von Bedeutung ist (siehe Einleitung und *review* (Yisraeli, 2005)). In ungestressten Zellen hat ZBP1 einen Einfluss auf die Polarität, Migration und Proliferation von Zellen, indem es die Lokalisierung, Translation und mRNA-Stabilität verschiedener mRNAs kontrolliert. Über die Funktion von RBPs wie ZBP1 während der zellulären Stressantwort ist hingegen kaum etwas bekannt.

Die zelluläre Stressantwort, während der das gesamte Translatom von Zellen reorganisiert wird, kann durch verschiedene Umwelteinflüsse ausgelöst werden. Infolge der Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 α und/oder der Inhibierung der Helikase eIF4A werden mRNAs von Polysomen freigesetzt und in *stress granules* (SGs) sortiert (Anderson and Kedersha, 2002a; Kedersha and Anderson, 2002; Kedersha et al., 2002; Kedersha et al., 2005; Kedersha et al., 1999; Mazroui et al., 2006). Zusammen mit diesen mRNAs wird auch eine Reihe von RBPs in SGs rekrutiert. Letztere erfüllen unter physiologisch normalen Bedingungen eine Vielzahl von Funktionen insbesondere im Rahmen der posttranskriptionellen Genregulation. Ob und wenn ja, welche Prozesse solche RBPs wie ZBP1 in SGs steuern, war die zentrale Fragestellung, die es im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen galt.

Deshalb wurde zunächst die subzelluläre Lokalisierung von ZBP1 unter diversen Stresseinflüssen detailliert untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass ZBP1 eine ubiquitäre SG-Komponente ist. Das bedeutet, dass sowohl endogenes als GFP/RFP-ZBP1 unter dem Einfluss verschiedener Stress-Stimuli, deren Wirkung über unterschiedliche Stresskinasen zu einer Phosphorylierung von eIF2 α führt, in SGs lokalisieren (siehe Abb. 3.1 - 3.3). Jedoch induziert die Überexpression von GFP-ZBP1 keine SG-Bildung wie es z.B. für TIA-1 oder G3BP beschrieben ist (siehe Abb. 3.6; (Kedersha et al., 1999; Tourriere et al., 2003)). Dies ist bereits ein erster Hinweis darauf, dass ZBP1 weniger an der SG-Entstehung beteiligt ist, als viel mehr eine regulatorische Funktion in SGs ausüben könnte.

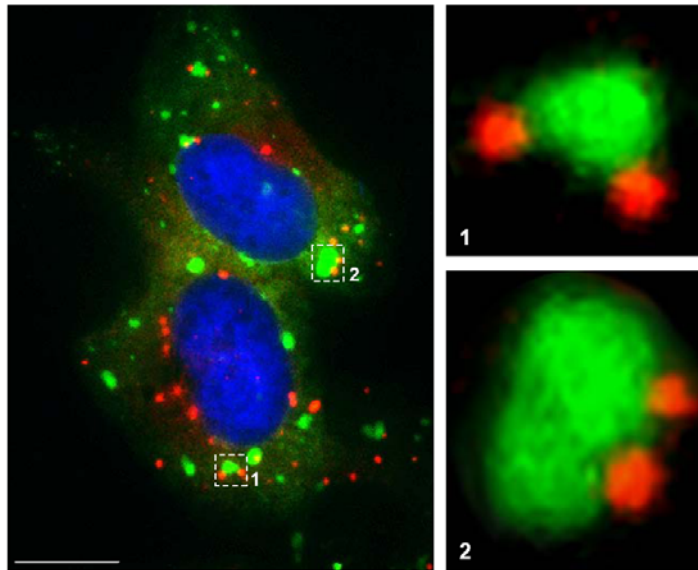


Abb. 4.1: SGs und PBs assoziieren temporär miteinander. U2OS-Zellen wurden mit GFP-ZBP1 und RFP-DCP1 transfiziert. 24 h nach Transfektion wurde oxidativer Stress appliziert. Die Zellkerne wurden mit DAPI angefärbt. Balken 10 μm .

SGs und *processing bodies* (PBs) sind dynamische Strukturen, die temporär miteinander assoziieren können (Abb. 4.1) (Kedersha et al., 2005). Um zu evaluieren, ob die putative Funktion von ZBP1 während der zellulären Stressantwort für SGs spezifisch ist oder möglicherweise auch PBs involviert, wurde ZBP1 hinsichtlich seiner Lokalisierung in PBs analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass ZBP1 unter Stress ausschließlich in SGs, nicht jedoch in PBs lokalisiert (siehe Abb. 3.7). Auch in ungestressten Zellen wurde das Protein nicht in PBs detektiert (siehe Abb. 3.7). Da PBs Zentren des RNA-Abbaus sind, die unter Stress sogar vergrößert vorliegen, ZBP1 jedoch nicht in diesen Strukturen lokalisiert, könnte man spekulieren, dass das Protein möglicherweise entweder für die Lokalisierung von mRNAs in SGs verantwortlich ist oder aber mit der selektiven Stabilisierung einzelner mRNAs unter Stress im Zusammenhang steht. In dieser Hinsicht wäre es denkbar, dass ZBP1 den Abbau bestimmter RNAs verhindert, indem es diese an der Lokalisierung in PBs hindert.

Im nächsten Schritt wurde daher untersucht, wie ZBP1 in SGs rekrutiert wird und ob dabei die Assoziation mit RNA-Liganden eine Rolle spielt. Zunächst wurden verschiedene ZBP1-Deletionsfragmente hinsichtlich ihrer Lokalisierung unter Stress analysiert. Dabei stellte sich heraus, dass nur Fragmente, welche die letzten beiden KH-Domänen umfassen (KH1-4 und KH3-4, siehe Abb. 3.8 B), in SGs rekrutiert werden. Diese beiden Fragmente verhalten sich bezüglich ihrer Lokalisierung und ihres RNA-Bindungsverhaltens ähnlich dem Wildtyp-Protein. Die Domäne KH3-4 wurde als für die RNA-Bindung essentiell beschrieben (Farina et al., 2003). Das deutet darauf hin, dass die Assoziation mit RNA-Liganden auch für die SG-Rekrutierung des Proteins unter Stress notwendig ist und ZBP1

wahrscheinlich mit seinen mRNA-Liganden in SGs assoziiert oder möglicherweise die Lokalisierung dieser mRNAs vermittelt.

Aufgrund dessen wurde die Lokalisierung von ZBP1 mRNA-Liganden unter Stress untersucht und die Koloalysierung von RNA und Protein in SGs analysiert. Mit Hilfe einer eigens entwickelten Technik, welche eine Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung kombiniert mit einer Immunfluoreszenzfärbung erlaubt, wurde die Lokalisierung verschiedener RNAs unter Stress untersucht. Hierbei wurde festgestellt, dass alle untersuchten spezifischen mRNAs sowie polyA⁽⁺⁾ mRNA mit endogenem SG-Marker TIAR in SGs koloalysieren (siehe Abb. 3.9). Unter den in SGs rekrutierten Transkripten befanden sich auch ZBP1-Liganden wie β -Aktin, IGF-II, *c-myc* oder die untranslatierte H19 RNA, welche mit TIAR und GFP-ZBP1 in SGs koloalysierten (siehe Abb. 3.10). Die einzige untersuchte mRNA, welche kaum in SGs zu beobachtet wurde, war die *HSP90* mRNA, welche, da sie für ein Hitzeschockprotein kodiert, auch unter Stress translatiert werden sollte (Kedersha et al., 1999; Nover et al., 1989). In Übereinstimmung mit der Literatur verdeutlichen diese Lokalisierungsstudien, dass die Mehrheit zytoplasmatischer polyadenylierter mRNAs unter Stress in SGs rekrutiert wird (Kedersha and Anderson, 2002). Die Anreicherung von poly(A)⁺ RNA in SGs bestätigt darüber hinaus die Stabilisierungsfunktion dieser Kompartimente, da sowohl die mRNA Degradation durch PBs oder das Exosom durch Deadenylierung eingeleitet wird. Allerdings bedarf es vermutlich keiner spezifischen Regulation, damit eine RNA in SGs lokalisiert, da sogar RNAs, welche nicht translatierbar sind, in SGs rekrutiert werden, was am Beispiel der H19 RNA verdeutlicht wird. Vielmehr scheint es spezifische Mechanismen zu geben, welche die SG-Lokalisierung von mRNAs verhindert, die auch unter Stress translatiert werden müssen, wie es z.B. bei für HSPs kodierende Transkripte der Fall ist. Somit ist es eher unwahrscheinlich, dass spezifische RBPs wie ZBP1 an der Rekrutierung ihrer mRNA-Liganden in SGs beteiligt sind. Das führt zu der Vermutung, dass RBPs sehr viel wahrscheinlicher die mRNA-Sortierung in SGs und damit das Schicksal ihrer Liganden-mRNAs unter Stress regulieren.

Handelt es sich bei der SG-Rekrutierung von mRNAs tatsächlich um einen unspezifischen Prozess, der eine Vielzahl polyadenylierter mRNAs involviert und lediglich diejenigen ausschließt, welche auch unter Stressbedingungen translatiert werden, so würde man erwarten, dass exogene Reportertranskripte ebenfalls in SGs lokalisiert werden. Diese Fragestellung wurde mit Hilfe des MS2-*tethering* Assays (siehe auch 3.1.2.2) anhand zweier Reporter untersucht, welche im Fall von β -Aktin-Zip-MS2 einen Teil des endogenen β -Aktin-3'UTRs, in Fall von Luc- Δ Zip-MS2 nur den artifiziellen 3'UTR des pcDNA3.1-Vektors

enthielten. Beide Reporter wurden in SGs lokalisiert (siehe Abb. 3.11). Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass der SG-Rekrutierung von mRNAs in der Tat ein unspezifischer Mechanismus zu Grunde liegt, für welchen es offenbar nicht notwendig ist, dass eine mRNA ein regulatorisches *cis*-Element, wie z.B. der Zipcode, besitzt. Vielmehr werden mRNAs durch die Assoziation mit poly(A) bindenden Proteinen (PABPs) und/oder eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren (eIFs) in SGs rekrutiert (Kedersha et al., 2005).

Wenn nun spezifische *cis/trans*-Interaktionen nicht für die Rekrutierung einer mRNA in SGs notwendig sind, stellt sich die Frage, ob es solche spezifischen Interaktionen zwischen einer RNA und einem assoziierten RBP überhaupt in SGs gibt und wenn ja, wofür solche Interaktionen benötigt werden. Die Frage nach spezifischen *cis/trans*-Interaktionen in SGs wurde mittels TriFC-Assay (*Tri-Molekular Complementation Assay*) untersucht (Rackham and Brown, 2004). Basierend auf einem zweigeteilten YFP (*Yellow Fluorescent Protein*), dessen eine Hälfte via MS2-Tagging den RNA-Reporter markiert und dessen andere Hälfte mit dem zu untersuchenden RBP fusioniert ist, können spezifische Protein-RNA-Interaktionen *in vivo* analysiert werden (siehe auch 3.1.2.3). Dabei wurde festgestellt, dass ZBP1 spezifisch mit dem Zipcode der β -Aktin mRNA in SGs interagiert (siehe Abb. 3.12, β -Aktin-Zip-MS2). Wurde der Luc- Δ Zip-MS2 Reporter verwendet, konnte kein rekonstituiertes YFP-Signal in SGs detektiert werden. Das bedeutet, dass es trotz Lokalisation von ZBP1, MS2BP und Reporter in SGs nicht zu einer Assoziation aller drei Komponenten kommt, weil die ZBP1 Bindungsstelle im Reporter fehlt (siehe Abb. 3.12). Diese Analysen deuten darauf hin, dass ZBP1 spezifisch an seine RNA-Liganden in SGs bindet. Das legt die Vermutung nahe, dass spezifische *cis/trans*-Interaktionen auch in SGs von Bedeutung sind.

Um die Funktion von ZBP1 in SGs zu untersuchen und damit einen Eindruck zu bekommen, wofür solche spezifischen *cis/trans*-Interaktionen in SGs notwendig sind, wurde ZBP1 mittels RNAi ausgeschaltet und zunächst die SG-Entstehung und RNA-Rekrutierung in SGs analysiert. Wie bereits vermutet, hatte der Knockdown von ZBP1 keinen Einfluss auf die Ausbildung von SGs (siehe Abb. 3.14). Auch wurden die ZBP1 mRNA-Liganden *c-myc*, β -Aktin und *IGF-II* nach ZBP1 Knockdown weiterhin in SGs rekrutiert. Allerdings erschien die RNA-Menge der Knockdownpopulation verglichen mit der Kontrollpopulation reduziert (siehe Abb. 3.14 und 3.21). Diese Beobachtung ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die SG-Rekrutierung einer mRNA keine spezifischen *cis/trans*-Interaktionen voraussetzt.

Zusammenfassend lassen diese Befunde den Schluss zu, dass ZBP1 ein ubiquitärer Bestandteil von SGs ist, welcher durch Bindung an RNA-Liganden in SGs rekrutiert wird und dort mit letzteren nicht nur kolokalisiert sondern spezifisch assoziiert. Das Protein ist jedoch

nicht in die SG-Entstehung involviert, da die Überexpression von GFP-ZBP1 keine SG-Bildung induziert und nach ZBP1 Knockdown SGs unverändert gebildet werden. Auch die Rekrutierung von mRNAs in SGs ist unbeeinflusst von ZBP1. Erstens wird die Mehrheit polyadenylierter mRNAs unter Stress in SGs rekrutiert. Hierbei ist es offenbar nicht von Bedeutung, ob eine mRNA translatiert werden kann oder ein spezifisches *cis*-Element besitzt. Zweitens sind nach ZBP1 Knockdown dessen RNA-Liganden immer noch in SGs lokalisiert. Da der Knockdown von ZBP1 allerdings zu einer scheinbar reduzierten Menge an Liganden-RNAs unter Stress führt und ZBP1 zudem nicht in PBs lokalisiert, könnte man ZBP1 mit dem RNA-Transit in SGs in Verbindung bringen. Aufgrund von dieser Überlegung wurde die Hypothese formuliert, dass ZBP1 den Abbau seiner RNA-Liganden unter Stress vermindert, indem es diese durch Assoziation mit selbigen in SGs zurückhält und dadurch deren Rekrutierung in PBs verhindert.

4.2 ZBP1 als "gatekeeper" in SGs

Wie bereits im vorigen Abschnitt erwähnt, ist ZBP1 weder an der SG-Bildung noch an der Rekrutierung seiner mRNA-Liganden in SGs beteiligt. Dennoch scheint das Protein auch unter Stress eine Funktion zu erfüllen, da ZBP1 spezifisch mit seinen RNA-Liganden in SGs assoziiert. Darüber hinaus erscheinen ZBP1 mRNA-Liganden infolge des ZBP1 Knockdowns in SGs reduziert vorliegen, weshalb man auf eine Funktion des Proteins bei der Regulation des RNA-Abbaus unter Stress schließen könnte.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde daher das Schicksal von ZBP1 RNA-Liganden während der zellulären Stressantwort genauer untersucht. Umfassende Analysen der RNA-Mengen von ZBP1 assoziierten und nicht-assoziierten mRNAs unter zellulärem Stress ergaben, dass bei aktiver Transkription eine Vielzahl von mRNAs über einen Zeitraum von mehreren Stunden angereichert wird (siehe Abb. 3.15). Zudem ist der Abbau der *c-myc* mRNA unter oxidativem Stress vermindert (siehe Abb. 3.16). Die Daten belegen, dass mRNAs unter Stress stabilisiert werden können und unterstützen damit das von Kedersha und Kollegen publizierte Modell (siehe Abb. 1.6; (Kedersha et al., 2005)), nach dem translationell reprimiert mRNAs in SGs gespeichert werden können, anstatt sofort durch die Degradationsmaschinerie der Zelle abgebaut zu werden.

Reduziert man die endogene ZBP1 Proteinmenge in der Zelle, ergibt sich ein anderes Bild. Verglichen mit einer Kontrollpopulation wird die *c-myc* mRNA nach ZBP1 Knockdown

nicht länger unter Stress stabilisiert (siehe Abb. 3.17). Diese Destabilisierung nach Knockdown ist für ZBP1-Liganden spezifisch, da nicht assoziierte mRNAs wie z.B. *α-Tubulin* vom ZBP1 Knockdown unbeeinflusst bleiben (siehe Abb. 3.17 C). Dieser Befund erscheint zunächst nicht sonderlich überraschend, da ZBP1 auch unter physiologisch normalen Bedingungen die *c-myc* mRNA stabilisiert. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass der Stabilisierung durch ZBP1 unter Normalbedingungen ein Mechanismus zu Grunde liegt, welcher mit aktiver Translation gekoppelt ist (siehe 1.1.3.3 und Abb. 1.4 ((Lemm and Ross, 2002)). Letztere ist jedoch unter Stress fast vollständig blockiert. Interassenterweise wurde diese Destabilisierung unter Stress nach ZBP1 Knockdown für alle untersuchten ZBP1-Liganden (*β-Aktin*, *IGF-II* und *CD44*; siehe Abb. 3.18 A und B) beobachtet, welche unter Normalbedingungen nicht nur auf Stabilitäts- sondern auch auf Translationsebene reguliert werden. Unter physiologisch normalen Bedingungen bleibt die mRNA-Stabilität der translationell regulierten *β-Aktin* und *IGF-II* mRNA vom ZBP1 Knockdown unbeeinflusst (siehe Abb. 3.18 C). Unter oxidativen Stress und Knockdown hingegen werden auch diese beiden mRNAs destabilisiert. Darüber hinaus ist dieser Effekt "umkehrbar". Die Überexpression von GFP-ZBP1 führt zu einer zusätzlichen Stabilisierung der *β-Aktin* und *IGF-II* mRNA in gestressten Zellen (siehe Abb. 3.19). Diese Beobachtungen implizieren eine neue Funktion für ZBP1 unter zellulärem Stress, die sich von den posttranskriptionellen Regulationsmechanismen, die das Protein in ungestressten Zellen kontrolliert, unterscheidet.

Aus diesen Ergebnissen leitet sich folgende Hypothese für die putative Funktion von ZBP1 als "gatekeeper" in SGs ab: Durch Assoziation mit seinen mRNA-Liganden wird ZBP1 in SGs rekrutiert, in welchen es deren weiteres Schicksal bestimmt. Das Protein stabilisiert seine RNA-Liganden unter Stress, indem es diese in SGs zurückhält und dadurch deren Abbau durch PBs oder das Exosom verhindert. Damit sorgt ZBP1 dafür, dass in SGs ein stabiles aber translationell reprimiertes Reservoir seiner mRNA-Liganden vorliegt, welches nach Stresserholung für die Reinitiation der Translation zur Verfügung steht.

Um diese Hypothese der "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 unter zellulärem Stress weiter zu untermauern und dabei die Abhängigkeit von spezifischen *cis*-Elementen in der mRNA zu demonstrieren, wurde das Schicksal zweier exogener Reporter-Transkripte analysiert (siehe 3.1.3.7). Hierfür wurde die Auswirkung des ZBP1 Knockdowns unter Stress bzw. während einer Stresserholungsphase auf die mRNA-Stabilität der Reporter sowie deren Translation anhand der Luziferase-Aktivität untersucht. Dabei wurde nur für den Reporter, welcher das ZBP1-Bindungsselement der *β-Aktin* mRNA (Zipcode, siehe Abb. 3.20, Luc-Zip) enthält, eine Destabilisierung der RNA unter Knockdown und Stress festgestellt, die auch eine

Reduktion der Luziferase-Aktivität zur Folge hatte. Die Destabilisierung der Reporter-RNA sowie die Reduktion der Luziferase-Aktivität hielten über den Stress hinaus auch in der ersten Phase der Erholung an. Der Reporter hingegen, welchem der Zipcode fehlte (siehe Abb. 3.20, Luc- Δ Zip), blieb vom ZBP1 Knockdown unbeeinflusst. Die Daten belegen, dass mRNAs aufgrund spezifischer *cis/trans*-Interaktionen unter Stress stabilisiert werden können. Die Beobachtungen korrelieren somit mit den Ergebnissen, die für die endogenen Transkripte beobachtet wurden, und bekräftigen damit die postulierte "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 in SGs. Darüber hinaus sind sie von physiologischer Bedeutung, da sich unter Stresserholung ein direkter Einfluss auf den Proteingehalt in Zellen abzeichnet. Im Hinblick auf die krebisrelevanten Liganden c-Myc und IGF-II könnte dies von besonderem Interesse sein. ZBP1 ist in verschiedenen humanen Tumoren stark überexprimiert (Gu et al., 2004; Ioannidis et al., 2004; Ioannidis et al., 2003; Ioannidis et al., 2001; Kobel et al., 2005; Ross et al., 1997; Ross et al., 2001). Die im Inneren von Tumoren herrschende Hypoxie kann zur Ausbildung von SGs führen (Moeller et al., 2004). Somit ist es denkbar, dass in Tumoren, welche ZBP1 überexprimieren, mRNA-Liganden wie *IGF-II* oder *c-myc* verstärkt in SGs stabilisiert werden. Kommt es zu einer Reoxygenierung des Tumors, dissoziieren SGs und die in den SGs stabilisierten mRNAs stehen für die Reinitiation der Translation zur Verfügung. Dadurch könnte es zu einer erhöhten Synthese von IGF-II und c-Myc Proteinen kommen, was sich wiederum auf das Wachstum des Tumors auswirken würde. Eine Reoxygenierung des Tumorgewebes kann z.B. durch radioaktive Bestrahlung ausgelöst werden, welche bei der Krebstherapie Anwendung findet (Dewhirst et al., 1990). Es ist bekannt, dass manche Tumore eine Resistenz gegen Radiotherapie entwickeln (Garcia-Barros et al., 2003). Diese Resistenz ist u.a. auf die Sekretion von Zytokinen wie VEGF durch den Tumor zurückzuführen, die durch radioaktive Bestrahlung induziert wird (Gorski et al., 1999).

Die bisherigen Daten unterstützen die postulierte Funktion von ZBP1 als "gatekeeper" in SGs, indem sie den Einfluss von ZBP1 auf das Schicksal seiner mRNA-Liganden unter Stress dokumentieren. Dennoch belegen sie nicht, dass diese Stabilisierung unter Stress bzw. Destabilisierung unter ZBP1 Knockdown tatsächlich in SGs stattfindet. Um dies zu untersuchen, wurde der RNA-Gehalt einzelner SGs vergleichend zwischen ZBP1 Knockdown- und Kontrollpopulationen anhand einer Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) quantifiziert. Dabei stellte sich heraus, dass in SGs der Knockdownpopulation weniger β -Aktin und *IGF-II* mRNA enthalten war, während die Mengen an *GAPDH* und polyA⁽⁺⁾ mRNA konstant blieben (siehe Abb. 3.21). Geht man davon aus, dass (1) ZBP1 die Rekrutierung von mRNAs in SGs nicht beeinflusst; (2) dennoch die Dichte der ZBP1 *target-*

Transkripte in SGs abnimmt, wenn die ZBP1-Proteinmenge in der Zelle reduziert ist; und (3) der Abbau *c-myc* mRNA erst dann fast völlig zum Erliegen kommt, wenn SGs vollständig ausgebildet sind; lässt sich folgendes Szenario in SGs postulieren. SGs stellen unter Stress die Kompartimente der mRNA-Sortierung sowie der Lagerung translationell reprimierter mRNAs dar, in denen RBPs als "gatekeeper" fungieren, da sie durch Assoziation mit ihren mRNA-Liganden deren Freisetzung aus SGs und den damit verbundenen verstärkten Abbau verhindern. Diese Funktion wird durch dieselben *cis/trans*-Interaktionen vermittelt, welche auch in ungestressten Zellen von Bedeutung sind, jedoch ist der damit verbundene Regulationsmechanismus ein anderer. Unabhängig davon, ob eine mRNA in ungestressten Zellen auf Stabilitäts- oder Translationsebene von einem RBP reguliert wird, bewirkt dasselbe RBP nach Stressinduktion ausschließlich die Stabilisierung dieser mRNA in SGs. Es kommt somit zu einem "switch of function".

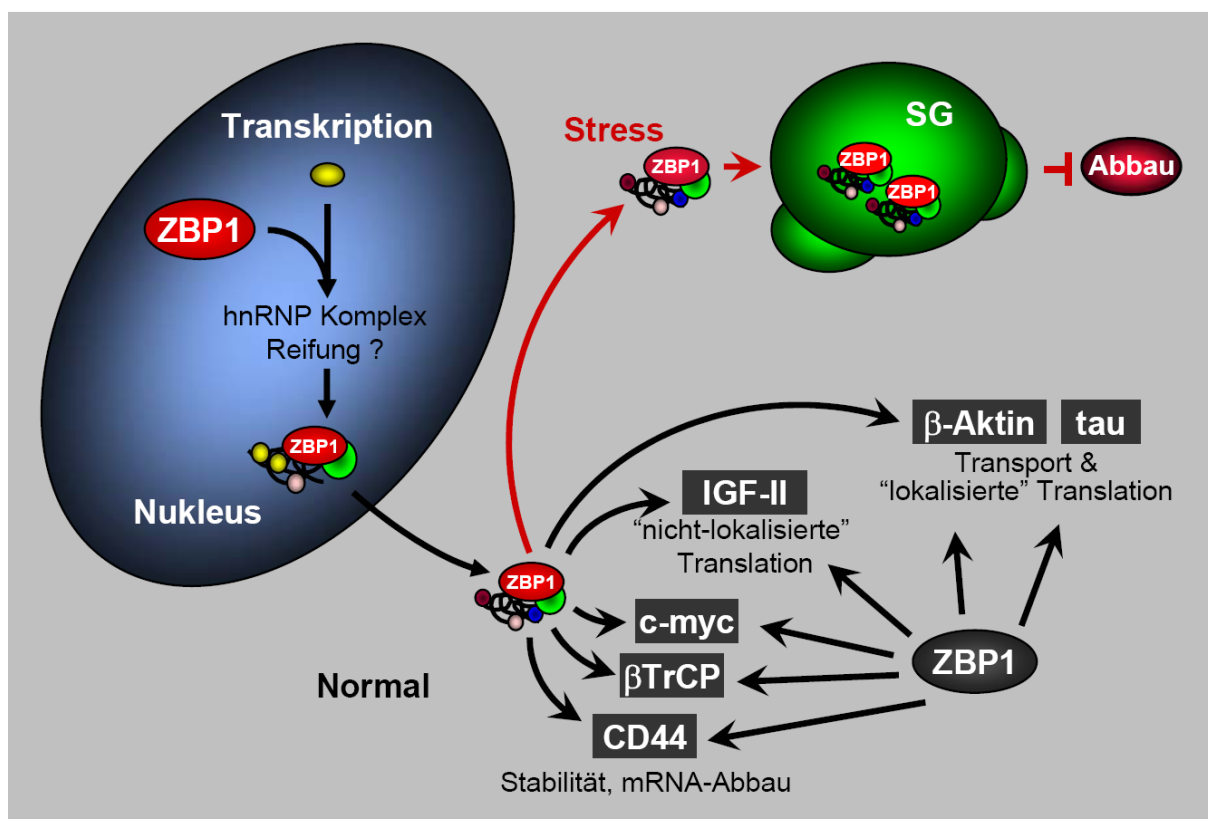


Abb. 4.2: Modell der "gatekeeper"-Funktion von ZBP1 in SGs. Unter physiologisch normalen Bedingungen kontrolliert ZBP1 die mRNA-Stabilität von *c-myc*, *CD44* und β TrCP und reguliert die lokalisierte bzw. nicht-lokalisierende Translation von β -Aktin, *IGF-II* und evtl. *tau*. Unter Stress wird ZBP1 mit seinen mRNA-Liganden in SGs rekrutiert, in denen es als "gatekeeper" deren Freisetzung aus SGs und den damit verbundenen Abbau verhindert. Diese Funktion wird über dieselben *cis/trans*-Interaktionen vermittelt, die auch unter Normalbedingungen von Bedeutung sind. Jedoch werden alle RNA-Liganden - unabhängig vom Regulationsmechanismus in nicht gestressten Zellen - unter Stress stabilisiert. Es kommt somit zu einem "switch of function".

Wenn RBPs das Schicksal ihrer mRNA-Liganden unter Stress regulieren, indem sie die Transkripte in SGs zurückhalten und dadurch deren Abbau verhindern, stellt sich die Frage, was mit der mRNA geschieht, wenn diese nicht durch assoziierte RBPs effektiv geschützt werden kann. Da es nach ZBP1 Knockdown zu einer spezifischen Destabilisierung der ZBP1-*targets* kommt, liegt die Vermutung nahe, dass diese in erhöhtem Maße abgebaut werden. PBs sind unter Stress vergrößert und können zudem temporär mit SGs assoziieren (siehe Abb. 4.2)(Kedersha et al., 2005). Daher könnte man vermuten, dass mRNAs, die aus SGs freigesetzt werden zum Abbau in PBs rekrutiert werden. Aufgrund dieser Überlegung wurde die β -Aktin mRNA hinsichtlich ihrer Lokalisierung in PBs unter oxidativem Stress und ZBP1 Knockdown mittels FISH untersucht (siehe Abb. 3.22). Dabei wurde festgestellt, dass β -Aktin nur in SGs nicht jedoch in PBs detektierbar ist. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte sein, dass der Abbau in PBs auch unter Stress nicht limitiert ist und es deshalb nicht zu einer Anreicherung der mRNA in PBs kommt, was wiederum deren Nachweis in diesen Kompartimenten erschwert. Demnach können PBs als Abbauzentren für von SGs freigesetzte RNAs nicht zwangsläufig ausgeschlossen werden.

Da es nicht möglich war, mittels FISH die β -Aktin mRNA in PBs zu detektieren, wurde der Versuch unternommen, Reporter-Transkripte durch MS2-*tethering* in PBs zu visualisieren. Hierbei wird angenommen, dass sich Transkripte mit MS2-*tethering* als deutlich stabiler erweisen, wodurch eine Detektion der RNA auch in PBs möglich war. Nach Quantifizierung des mRNA-Gehalts in SGs und PBs anhand der Fluoreszenzintensität wurde festgestellt, dass unter ZBP1 Knockdown nicht nur eine Reduktion der β -Aktin-Zip-Transkripte in SGs sondern auch in PBs vorlag (siehe Abb. 3.23). Dies erscheint auf den ersten Blick verwunderlich, da man zunächst eine Delokalisierung der RNA von SGs in PBs und damit eine Erhöhung der RNA-Menge in PBs erwarten würde. Nach näherer Betrachtung ist es jedoch keineswegs überraschend, dass PBs genau die SG-Situation widerspiegeln. Da man in diesem Experiment lediglich ein kleines Zeitfenster betrachtet, detektiert man eine Gleichgewichtssituation der mRNA-Menge des Reporters zum Zeitpunkt x. Da sich zum Zeitpunkt x eine bestimmte Menge y des Reporters in SGs befindet, kann auch nur eben diese Menge von PBs abgebaut werden. Ist der Abbau in PBs nicht limitiert, kann keine Anreicherung des Reporters detektiert werden. Somit korreliert der MS2-*tethering* Assay mit dem Ergebnis der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung und involviert darüber hinaus PBs in den RNA-Abbau unter Stress. Um jedoch den Hauptabbauweg von mRNAs unter Stress zu identifizieren, sofern PBs und das Exosom nicht gleichermaßen daran beteiligt sind, müssen weitere Experimente durchgeführt werden. Hierbei wären z.B. RNAi-Experimente gegen

Komponenten des einen oder anderen Abbaukompartimentes denkbar, an die sich eine Analyse des RNA-Gehalts von Zellen nach Stressinduktion anschließt.

Zusammenfassend lässt sich folgender Regulationsmechanismus in SGs postulieren: RBPs wie ZBP1, welche unter Normalbedingungen die Stabilität, Lokalisation und Translation ihrer RNA-Liganden regulieren, werden unter Stress zusammen mit diesen RNAs als RNPs in SGs lokalisiert. Die Assoziation dieser RBPs mit ihren Liganden wird durch dieselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen vermittelt, welche vermutlich auch den Regulationsmechanismen in ungestressten Zellen zu Grunde liegen. Diese spezifischen Bindungen halten eine RNA in SGs zurück und bewerkstelligen deren Lagerung in einem translationell reprimierten Zustand. Dadurch wird verhindert, dass die RNA freigesetzt und durch die zelluläre Degradationsmaschinerie abgebaut wird.

Die hier postulierte *"gatekeeper"*-Hypothese von RBPs wie ZBP1 in SGs beschreibt erstmalig gleichermaßen eine putative Funktion von RBPs in SGs sowie das Schicksal zytoplasmatischer mRNAs, welche unter Stress in diese Kompartimente rekrutiert werden. Die in dieser Arbeit präsentierten Daten gewähren somit erstmals einen Einblick in die Funktionsweise von SGs und geben einen Hinweis auf deren physiologische Bedeutung. Neben veränderten Umweltbedingungen können auch radioaktive Bestrahlung und Hypoxie, wie sie im Inneren eines Tumors zu finden ist, Stress induzieren. Bedenkt man, dass ZBP1 in verschiedenen Tumorarten stark überexprimiert ist und die Überexpression von ZBP1 unter Stress mRNA-Liganden wie z.B. die für den Wachstumsfaktor IGF-II kodierende mRNA stabilisiert, eröffnet sich hieraus eine klinische Bedeutung der zellulären Stressantwort.

Neben dieser physiologischen Bedeutung ergibt sich aber noch ein weiterer interessanter wie nützlicher Aspekt aus der Rolle von ZBP1 unter Stress. Basierend auf der *"gatekeeper"*-Funktion von ZBP1 in SGs wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues stressbasierendes *Screening*-Verfahren (SIRL; *Stress-based Isolation of RNA-Ligands*) etabliert, welches eine schnelle Identifizierung physiologisch relevanter RNA-Liganden erlaubt und im nächsten Abschnitt näher erläutert wird.

4.3 SIRL – ein neues stressbasierendes Verfahren zur Identifizierung von RNA-Liganden

Die "gatekeeper"-Hypothese besagt, dass aufgrund derselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen zwischen einem RBP und dessen mRNA-Liganden, welche die Stabilität, Lokalisierung oder Translation dieser mRNAs in ungestressten Zellen regulieren, diese mRNAs unter Stress durch das RBP in SGs stabilisiert werden. Erweist sich diese Hypothese tatsächlich als zutreffend, würde man erwarten, dass man, basierend auf dieser spezifischen Stabilisierung unter Stress, neue regulatorischer Netzwerke und bislang unbekannte mRNA-Liganden des entsprechenden RBPs identifizieren kann, welche auch in ungestressten Zellen von physiologischer Relevanz sind. Um die "gatekeeper"-Hypothese zu bekräftigen und dabei gleichzeitig putative ZBP1 mRNA-Liganden zu identifizieren, wurde ein auf zellulärem Stress basierendes *screening*-Verfahren (SIRL, *Stress-based Identification of RNA-Ligands*) entwickelt (siehe Abb. 3.24). Wird die Menge des als "gatekeeper" in SGs fugierenden RBPs in der Zelle reduziert, so werden dessen mRNA-Liganden unter Stress nicht länger in SGs stabilisiert. Diese selektive Destabilisierung ist unabhängig davon, ob das Protein die Stabilität, Lokalisierung oder Translation dieser mRNAs in ungestressten Zellen reguliert. Daher sollten mit Hilfe von sich anschließenden vergleichenden Mikroarray-Analysen sowohl translationell- als auch stabilitätsregulierte mRNA-Liganden identifiziert werden können (siehe Abb. 3.24). Darin ist ein entscheidender Vorteil von SIRL gegenüber herkömmlichen Verfahren zu sehen. Letztere wie RNAi, Ribosomenprofile oder Pulldown-Experimente in Kombination mit Mikroarray-Analysen erlauben hingegen nur die Identifizierung von entweder stabilitäts- oder aber translationskontrollierten mRNA-Liganden oder aber laufen Gefahr, zahlreiche falsch positive Ergebnisse zu liefern, was insbesondere bei Pulldown-basierenden *Screens* zu beobachten ist.

Unter Anwendung des SIRL-Verfahrens wurden in vergleichenden Mikroarray-Analysen 128 Gene identifiziert, welche in der Kontrollpopulation als "vorhanden" nach ZBP1 Knockdown jedoch als "abwesend" detektiert wurden (siehe Anhang Tab. 6.2). 25 dieser Gene (SIRL-Gene) wurden durch verschiedene stringente Assays verifiziert. Zunächst wurden mRNAs hinsichtlich ihrer Destabilisierung unter ZBP1 Knockdown und Stress untersucht (Abb. 3.26). Darüber hinaus wurden in diese Analysen auch die RNA-Input-Mengen vor Stressinduktion einbezogen, um mögliche Sekundäreffekte, die durch den Knockdown unabhängig von der Stressinduktion entstehen können, zu eliminieren (Abb.

3.27). Um zu evaluieren, ob die putativen Liganden auch unter Normalbedingungen relevant sind und in nicht gestressten Zellen mit ZBP1 assoziieren, wurden Pulldown-Experimente durchgeführt. Dabei wurde die spezifische Anreicherung der einzelnen Transkripts gegenüber einem Kontroll-Pulldown sowie dem Input ermittelt (Abb. 3.28). Diejenigen SIRL-Gene, welche unter Stress mindestens so stark destabilisiert sowie im Pulldown mindestens so stark angereichert wurden wie die bekannten ZBP1-Liganden, wurden als putative neue ZBP1-Liganden hinsichtlich ihrer Regulation durch ZBP1 in ungestressten Zellen untersucht. Hierfür wurde der Einfluss von ZBP1 auf das Abbauverhalten dieser mRNAs (siehe Abb. 3.29 und 3.30) sowie auf die Proteinmenge der durch diese mRNAs kodierten Proteine (siehe Abb. 3.31) analysiert. Dabei erwiesen sich die mRNAs des Transkriptionsfaktors LEF1, der Phosphatase PTEN sowie des *Guanine Nukleotide Exchange Factors* RAPGEF2 als durch ZBP1 stabilitätskontrolliert, da diese mRNAs infolge des Knockdowns von ZBP1 schneller abgebaut wurden (siehe Abb. 3.29). Für die mRNAs von MAPK4 sowie der stressaktivierten Kinase MSK1 scheint ZBP1 ähnlich wie für β -Aktin und *IGF-II* als translationeller Repressor zu fungieren, welcher die endogene Proteinmenge, die durch diese mRNAs kodiert wird, nicht jedoch ihre Stabilität beeinflusst (siehe Abb. 3.30 und 3.31).

Zusammenfassend kann man sagen, dass durch die SIRL Analysen für ZBP1 fünf neue RNA-Liganden identifiziert werden konnten, welche unter Normalbedingungen entweder auf der Ebene der mRNA-Stabilität oder aber der Translation durch ZBP1 regulierte werden. Darin ist ein entscheidender Vorteil dieses Verfahren gegenüber konventionellen Methoden zu sehen. Neben diesem technischen Aspekt liefern die durch SIRL gewonnenen Daten einen weiteren Beweis dafür, dass RBPs als "gatekeeper" in SGs das Schicksal derselben mRNAs regulieren, welche auch in ungestressten Zellen durch das RBP kontrolliert werden. Hierbei sind dieselben Protein-RNA-Interaktionen und vermutlich dieselben regulatorischen Netzwerke wirksam, wenngleich die posttranskriptionelle Genregulation in ungestressten Zellen die Ebenen der mRNA-Stabilität, Lokalisierung und Translation umfasst, die "gatekeeper"-Funktion unter Stress hingegen die Speicherung von mRNAs in SGs und dadurch deren Stabilität reguliert. Dabei ist anzunehmen, dass die Regulationsmechanismen und funktionellen Proteinkomplexe in gestressten im Vergleich zu ungestressten Zellen erweitert jedoch nicht grundlegend verändert sind. Somit ist es sehr wahrscheinlich, dass SGs Aggregate aus zytoplasmatischen RNPs ungestresster Zellen darstellen, welche entstehen, wenn mRNAs infolge der Stressinduktion aus Polysomen freigesetzt werden.