

5 Zusammenfassung und Ausblick

Als Reaktion auf veränderte Umweltbedingungen reorganisieren Zellen ihre Translationsmaschinerie. Die Phosphorylierung des Translationsinitiationsfaktors eIF2 α sowie die Inhibierung der RNA-Helikase eIF4A führen hierbei zu einem beinahe vollständigen Erliegen der Translation, in dessen Folge *stress granules* (SGs) entstehen (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). Während dieser zellulären Stressantwort werden mRNAs, welche aus Polysomen freigesetzt werden, in SGs rekrutiert, welche dabei ein Reservoir an stabilen jedoch translationell reprimierten mRNAs darstellen. mRNAs, welche in SGs gespeichert werden, können nach Stresserholung für die Translation reinitiiert werden (Kedersha et al., 2005). Neben poly(A)⁺mRNA und einer Reihe von Translationsinitiationsfaktoren werden auch verschiedene RNA-bindende Proteine (RBPs) unter Stress 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 in SGs steuern, war die zentrale Fragestellung, die es im Rahmen dieser Arbeit zu untersuchen galt.

Das onkofötale *Zipcode binding protein 1* (ZBP1) ist ein solches RBP, welches unter Normalbedingungen verschiedene Funktionen in der posttranskriptionellen Genregulation besitzt, unter zellulärem Stress jedoch in SGs lokalisiert. In ungestressten 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). Translationskontrolle durch ZBP1 wurde auch für die *IGF-II* mRNA beschrieben (Liao et al., 2004; Nielsen et al., 1999). Neben Lokalisierung und Translation reguliert ZBP1 auch die Stabilität der *c-myc*, *CD44* sowie β TrCP mRNAs (Leeds et al., 1997; Noubissi et al., 2006; Vikesaa et al., 2006).

Während der zellulären Stressantwort wird ZBP1 zusammen mit seinen mRNA-Liganden in SGs rekrutiert. Das Protein ist jedoch nicht in die SG-Entstehung involviert. Auch die Rekrutierung von ZBP1 Liganden-RNAs in SGs bleibt von ZBP1 unbeeinflusst. Jedoch assoziiert ZBP1 in SGs über dieselben spezifischen *cis/trans*-Interaktionen, welche die Grundlage für posttranskriptionelle Genregulationen in ungestressten Zellen bilden, mit seinen Liganden-RNAs und reguliert dadurch das Schicksal Letzterer auch unter Stress.

Basierend auf diesen Protein-RNA-Interaktionen stabilisiert ZBP1 als "*gatekeeper*" in SGs spezifisch seine mRNA-Liganden, indem es deren Freisetzung aus diesen Kompartimenten und damit deren Abbau durch *processing bodies* (PBs) oder das Exosom verhindert. Diese Stabilisierung involviert alle bisher bekannten ZBP1 Liganden gleichermaßen und ist zudem unabhängig davon, ob ZBP1 die Stabilität oder aber die Translation dieser mRNAs in ungestressten Zellen reguliert (Stohr et al., 2006). Die in dieser Arbeit postulierte "*gatekeeper*"-Hypothese beschreibt erstmals gleichermaßen eine putative Funktion, die RBPs wie ZBP1 in *stress granules* ausüben können, wie auch das Schicksal zytoplasmatischer mRNAs und identifiziert ZBP1 als einen Schlüsselregulator unter zellulärem Stress.

Darüber hinaus bildet diese Funktion in SGs die Grundlage für ein neues *screening*-Verfahren (SIRL, *Stress-based Identification of RNA-Ligands*), welches eine schnelle und experimentell einfache Identifizierung physiologisch relevanter RNA-Liganden ermöglicht. Reduziert man die endogene Proteinmenge eines RBPs, welches als "*gatekeeper*" in SGs fungiert, werden unter zellulärem Stress dessen mRNA-Liganden selektiv destabilisiert. Da diese Destabilisierung auf denselben *cis/trans*-Interaktionen und regulatorischen Protein-RNA-Netzwerken beruht, welche die Regulation dieser mRNAs in ungestressten Zellen vermitteln, ist es möglich, physiologisch relevante Liganden zu identifizieren. Da diese Liganden, unabhängig von der Ebene der posttranskriptionellen Regulation in ungestressten Zellen, unter Stress destabilisiert werden, ermöglicht es das SIRL-Verfahren, in einem einzigen Ansatz sowohl stabilitäts- als auch translationskontrollierte Liganden zu identifizieren, was einen entscheidenden Vorteil dieser Methode im Vergleich zu herkömmlichen Ansätzen darstellt. Durch die Anwendung des SIRL-Verfahrens auf ZBP1 konnten fünf neue RNA-Liganden identifiziert werden, welche unter Normalbedingungen entweder auf der Ebene der mRNA-Stabilität oder aber der Translation durch ZBP1 reguliert werden. Die einzelnen Regulationsmechanismen dieser fünf mRNAs, welche ZBP1 in ungestressten Zellen vermittelt, müssen in weiterführenden Studien detailliert untersucht werden. Dabei ist es von Bedeutung, die ZBP1-Bindungs-elemente in diesen mRNAs zu charakterisieren. Nichtsdestotrotz 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. Um zu untersuchen, ob die "*gatekeeper*"-Funktion eine generelle Eigenschaft von RBPs in SGs darstellt, ist es notwendig, das SIRL-Verfahren in weiterführenden Studien auf andere RBPs auszudehnen. FMRP oder Syncrin wären hierfür interessante Beispiele, da es sich bei diesen Proteinen

ähnlich wie bei ZBP1 um posttranskriptionelle Genregulatoren handelt und zweitens für diese beiden RBPs bislang kaum mRNA-Liganden bekannt sind.

Da in ungestressten wie in gestressten Zellen sehr wahrscheinlich dieselben Protein-RNA-Interaktionen und regulatorischen Netzwerke wirksam sind, ist anzunehmen, dass die Regulationsmechanismen und funktionellen Proteinkomplexe in gestressten im Vergleich zu ungestressten Zellen möglicherweise 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. Um diese Fragestellung umfassend zu beantworten, bedarf es jedoch detaillierter Analysen der SG-Zusammensetzung. Hierbei wäre es interessant zu wissen, ob eine mRNA bereits die erste Runde der Translation durchlaufen haben muss oder ob auch *virginRNP* rekrutiert werden kann. *VirginRNPs* stellen translationell reprimierte RNA-Transport *granules* dar, welche noch nicht translatierte mRNAs und daher auch Komponenten des EJC (*exon junction complex*) enthalten.

Darüber hinaus könnte die "*gatekeeper*"-Funktion im Hinblick auf die krebisrelevanten ZBP1-Liganden c-Myc und IGF-II auch von physiologischer Bedeutung 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). Ebenso induziert radioaktive Bestrahlung, wie sie bei der Krebstherapie Anwendung findet, die SG-Bildung. Somit wäre es denkbar, dass in Tumoren, welche ZBP1 überexprimieren, mRNA-Liganden wie *IGF-II* oder *c-myc* verstärkt in SGs stabilisiert werden. Kommt es durch veränderte Bedingungen zu einer Dissoziation der SGs, stehen die in den SGs stabilisierten mRNAs 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. Um diese physiologische Relevanz der zellulären Stressantwort zu analysieren, sind weiterführende Studien notwendig, um die die SG-Entstehung und –Dissoziation in Organismen charakterisieren