

Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Funktionelle Charakterisierung des Interaktoms des Guanin-rich
Sequence binding Factor 1 und dessen Beteiligung an der Regulation der
Redoxhomöostase

Zur Erlangung des akademischen Grades Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Bernhard Christian Dumoulin

aus Hannover

Datum der Promotion: 25.11.2022

Inhaltsverzeichnis:

Abkürzungsverzeichnis	VI
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	XI
Vorwort	XII
1 Zusammenfassung.....	XIII
1.1 Abstract	XIV
2 Einleitung	1
2.1 Genexpressionsregulation	1
2.1.1 Transkriptionelle Regulation der Genexpression.....	1
2.1.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression	2
2.2 RNA-bindende Proteine	7
2.2.1 Die RNA-bindenden Proteine aus der Familie der hnRNP F/H.....	8
2.3 GRSF1 als RNA-bindendes Protein.....	9
2.3.1 GRSF1: Gen und Proteinstruktur	9
2.3.2 Erkenntnisse über GRSF1/Substrat Interaktionen.....	10
2.3.3 Expression von GRSF1 und deren Regulation.....	11
2.3.4 GRSF1 Wirkmechanismus	12
2.3.5 GRSF1 und seine Rolle bei zellulären Signalwegen.....	16
3 Material und Methoden	21
3.1 Material	21
3.1.1 Chemikalien und Gebrauchswaren.....	21
3.1.2 Geräte	21
3.1.3 Enzyme.....	22
3.1.4 DNA-Banken und Plasmide	22
3.1.5 Bakterien- und Hefestämme sowie Zelllinien	23
3.1.6 Kommerzielle Kits	23
3.1.7 Primer für PCR.....	24
3.1.8 Primer für Mutagenese	24
3.1.9 Primer für qRT-PCR	25
3.1.10 Antikörper	25
3.1.11 Software	26
3.2 Hefemethoden	26
3.2.1 Kultur der Hefezellen.....	26

3.2.2 Große Hefe-Transformation.....	27
3.2.3 Kleine Hefe-Transformation	28
3.2.4 Plasmidpräparation aus Hefen.....	28
3.2.5 β -Galaktosidase Assay	29
3.2.6 Hefe-Zwei-Hybrid System	30
3.3 Zellmethoden.....	32
3.3.1 Kultur von HEK-293, Caco-2, HepG2 Zellen.....	32
3.3.2 Knockout von GRSF1 in Caco-2 Zellen mit CRISPR/Cas9	32
3.3.3 Transfektion von pCMV-Plasmiden in HEK-293, Caco-2, HepG2 Zellen	33
3.3.4 Transfektion von siRNA in HepG2 und Caco-2 Zellen	33
3.3.5 Zellernte	33
3.3.6 Zelllyse.....	34
3.3.7 DCFH-DA Assay	34
3.4 Molekularbiologische Methoden.....	34
3.4.1 Polymerasekettenreaktion	35
3.4.2 Mutagenese.....	35
3.4.3 MYC-Co-Immunopräzipitation.....	35
3.4.4 Co-Immunopräzipitation mit Protein G Dynabeads.....	36
3.4.5 Differentielle Zentrifugation	37
3.4.6 RNA-Isolation und Reverse Transkription	38
3.4.7 Quantitative Echtzeit-PCR	39
3.4.8 Herstellung vom externen Amplifizierungsstandards	40
3.4.9 Auswertung	40
3.4.10 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot	40
3.4.11 Sequenzanalyse	41
4 Ergebnisse	42
4.1 Hefe-Zwei-Hybrid Screen	42
4.1.1 Sequenzanalysen der im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen ermittelten Klone.....	43
4.1.2 Testung der Spezifität der Protein-Protein-Interaktionen im Hefemodell	45
4.2 Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion in HEK-293 Zellen	52
4.3 Interaktion von CYC1 und COMMD1 mit Proteinfragmenten von GRSF1	57
4.4 Interaktion von endogenem GRSF1 mit COMMD1	59
4.5 Charakterisierung der Interaktion von GRSF1 mit COMMD1.....	60
4.5.1 Einfluss von COMMD1 auf die endogene Expression von GRSF1	60
4.5.2 GRSF1 wird nicht ubiquitinyliert.....	62

4.5.3 COMMD1 reguliert die zelluläre Lokalisation von GRSF1	63
4.6 Die Rolle von GRSF1 in der zellulären Redoxhomöostase	65
4.6.1 Knockout von GRSF1 in Caco-2 Zellen mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie....	66
4.6.2 Messung der ROS Level in Wildtyp und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen.....	67
4.6.3 JNK-Aktivierung in Wildtyp und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen	69
4.6.4 Analyse der RNA-Sequenzen antioxidativer und prooxidativer Enzyme.....	69
4.6.5 Messung der RNA-Level antioxidativer und prooxidativer Proteine in GRSF1 Wildtyp und knockout Caco-2 Zellen	74
5 Diskussion	76
5.1 Protein-Interaktionspartner von GRSF1 im Hefemodell	76
5.2 Interaktion von GRSF1 mit CYC1 und ihre potenzielle Funktion.....	79
5.3 Funktion der Interaktion von GRSF1 mit COMMD1	81
5.4 Die Rolle von GRSF1 in der zellulären Redoxhomöostase	83
5.5 Ausblick	86
6 Literaturverzeichnis.....	88
7 Eidesstattliche Versicherung	110
8 Lebenslauf	112
9 Anteilserklärung	114
10 Publikationsliste	115
11 Danksagung.....	116

Widmung

Für meinen Großvater, Karl-Rudolf Koch, der mich als Erster für die Wissenschaft begeistert hat.

Abkürzungsverzeichnis

3-AT	3-Aminotriazol
4EBP	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E bindendes Protein
A	Adenin
Apaf1	<i>apoptotic protease-activating factor 1</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli protein</i>
ASS1	<i>Argininosuccinate Synthase 1</i>
ATF2	<i>Activating Transcription Factor 2</i>
AUP1	<i>Ancient ubiquitous protein 1</i>
BAX	<i>Bcl-2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
BTBD6	<i>Btb/POZ domain-containing protein 6</i>
Caco-2	Heterogene humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen
CFTR	<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator</i>
CNRIP1	<i>Cannabinoid Receptor interacting Protein 1</i>
COMM	<i>copper metabolism gene mouse U2af1-rs1 region</i>
COMMD1	<i>COMM domain containing protein 1</i>
COX	Cyclooxygenase
PTGS2	Cyclooxygenase-2
CPSF	<i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
CYC1	Cytochrom C1
DACT1	<i>Dapper homolog 1</i>
DAZL	<i>deleted in azoospermia like</i>
DCFH-DA	2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
E1-Ligase	Ubiquitin-aktivierende Ligase
E2-Ligase	Ubiquitin-konjugierende Ligase
E3-Ligase	Ubiquitin-Ligase
eEF	eukaryotischer Elongationsfaktoren

eIF	eukaryotischen Translationsinitiationsfaktoren
EIF1B	Eukaryotic translation initiation factor 1B
eIF4E	eukaryotischer Initiationsfaktor 4E
ELK1	<i>erythroblast transformation specific domain-containing protein 1</i>
ERO1L	<i>ERO1-like protein alpha</i>
eTF	eukaryotischen Terminationsfaktoren
FADS2	<i>Fatty Acid Desaturase 2</i>
FHC	<i>Ferritin Heavy Chain</i>
FMRP	<i>Fragile X mental retardation protein</i>
FNTA	Farnesyltransferase
FXS	Fragiles-X-Syndrom
FYN	Tyrosin-Protein Kinase Fyn
G	Guanin
GAL4 AD	GAL4 aktivierende Domäne
GAL4 BD	GAL4 bindende Domäne
GLTSCR2	<i>Ribosome Biogenesis Protein 2</i>
GluR-B	Glutamatrezeptor B
GO	Gen-Ontologie
GPx	Glutathionperoxidasen
GPx4	<i>Glutathionperoxidase 4</i>
GRSF1	<i>Guanin-rich Sequence binding factor 1</i>
GSE1	<i>Genetic suppressor element 1</i>
GSTP	Glutathion S-Transferase Pi
GTF	generelle Transkriptionsinitiationsfaktoren
GTF2E2	<i>Transcription initiation factor IIe subunit beta</i>
HCFC2	<i>Host cell factor 2</i>
HEK-293	Humane embryonale Nierenzellen 293
HepG2	Humane hepatozelluläre Karzinomzellen G2
HIVEP3	<i>Transcriptionfactor HIVEP3</i>
hnRNP H/F	heteronukleären Ribonukleoproteine H/F
HPETE	Hydroperoxyeicosatetraenoidsäure
HuR	<i>human antigen R</i>
IL1 β	Interleukin-1 β

ILF3	<i>interleukin enhancer binding factor 3</i>
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
IRP	<i>Iron-regulatory protein</i>
ISYNA1	Inositol-3-phosphat Synthase 1
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
KH	K-Homologie
LEF1	<i>Lymphoid Enhancer Binding Factor 1</i>
LOX	Lipoxygenase
m ⁷ G-Kappe	5'-Guanin-N7 Methyl Kappe
MAP6	<i>Microtubule associated protein 6</i>
MAPK	<i>Mitogen activated Protein-Kinase 1</i>
microRNA	miRNA
MRG	mitochondriale RNA-Granula
mRNA	messenger RNA
mt	mitochondrial
mTLE	mesiale Temporallappenepilepsie
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
ND5	<i>NADH Dehydrogenase Subunit 5</i>
ND6	NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Kette 6
ND6	<i>NADH Dehydrogenase Subunit 6</i>
NDUFB8	<i>NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8</i>
NES	nukleäres Exportsignal
NEUROD2	<i>Neurogenic differentiation factor</i>
NFκB	<i>nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NKCC1	Na-K-2Cl-Kotransporter
NMD	<i>Nonsense-mediated Decay</i>
NMRAL1	<i>NmrA-like family domain-containing protein 1</i>
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NP	Nukleoprotein
NPC	nukleären Porenkomplex
NUP153	<i>Nuclear pore complex protein Nup153</i>
NUP93	<i>Nuclear pore complex protein Nup93</i>
NXF1	nukleärer Exportfaktor 1

PBS	Phosphatgepufferter Salzlösung
PIC	Prä-Initiationskomplex
PIN1	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase MIA-interacting 1</i>
pJNK	phosphorylierte c-Jun N-terminale Kinase
Pol II	RNA-Polymerase II
PPIA	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase
PRNP	<i>Major prion protein</i>
pSer	phosphoryliertes Serin
PUFA	polyunsaturierten Fettsäure
qRRM	quasi-RRM
qRT-PCR	Quantitative Echtzeit-PCR
RAB3A	<i>Ras-related Protein 3A</i>
RBD	RNA-bindende Domänen
RBP	RNA-bindende Proteine
RELA	<i>v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A</i>
RHD	Rel-Homologie-Domäne
RING	<i>really interesting new gene</i>
RING1	<i>really interesting new gene 1</i>
RMRP	RNA-prozessierenden Endoribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleopartikel
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
RPL11	Ribosomales Protein L11
RPL5	Ribosomales Protein L5
RRM	<i>RNA Recognition Motif</i>
S6K	Protein S6 Kinase
SOD	Superoxiddismutasen
TCF/LEF	<i>transcription factor/lymphoid enhancer binding protein 1</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
UAS	<i>Upstream Activating Sequences</i>
UBE3C	<i>Ubiquitin-protein Ligase E3C</i>
USE1	<i>unusual SNARE of the endoplasmatic reticulum-1</i>
UTR	untranslatierte Region

Abkürzungsverzeichnis

VPS11	<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog</i>
Wnt	<i>Wingless and Int-1</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of Apoptosis</i>
ZNF3	<i>Zinc Finger Protein 3</i>
δENaC	δ-epithelialer Natriumkanal

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression.....	6
Abbildung 2: Schematische Zeichnung der Proteinstruktur der hnRNP H/F Familie.....	8
Abbildung 3: Der G-Quadruplex.....	9
Abbildung 4: Potenzielle GRSF1 Wirkmechanismen.....	13
Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Wnt/ β -catenin Signalweges.....	15
Abbildung 6: Die Beteiligung von GRSF1 beim mTOR Signalweg.....	16
Abbildung 7: Vereinfachtes Schema des Hefe-2-Hybrid-Systems.....	27
Abbildung 8: Spezifität der Protein-Protein Interaktion im Hefemodell.....	43
Abbildung 9: Co-Immunopräzipitationen von GRSF1-Proteinkomplexen aus dem Lysat von kotransfizierten HEK-293.....	49
Abbildung 10: COMMD1 und CYC1 interagieren mit der Δ E1 Domäne von GRSF1.....	53
Abbildung 11: COMMD1 und GRSF1 interagieren in HepG2 Zellen.....	55
Abbildung 12: Knockdown von COMMD1 in HepG2 Zellen wirkt sich nicht auf die GRSF1 Proteinkonzentration aus.....	56
Abbildung 13: COMMD1 reguliert die zelluläre Lokalisation von GRSF1 in den Mitochondrien.....	58
Abbildung 14: Knockout von GRSF1 in Caco-2 Zellen.....	61
Abbildung 15: Erniedrigte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in GRSF1 knockout Caco-2 Zellen.....	63
Abbildung 16: Verringerte Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase in GRSF1 knockout Caco-2 Zellen.....	64
Abbildung 17: RNA-Level prooxidativer und antioxidativer Proteine in GRSF1 knockout und Wildtyp Caco-2 Zellen.....	69
Tabelle 1: Liste der im Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifizierten Interaktionspartner von GRSF1.....	40
Tabelle 2: GRSF1 knockout in Caco-2 Zellen mittels CRISPR/Cas9 Technologie.....	61
Tabelle 3: Analyse der Sequenzen wichtiger oxidativer und antioxidativer Proteine.....	68

Vorwort

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Dumoulin B, Ufer C, Stehling S, Heydeck D, Kuhn H, Sofi S (2020) *Identification of the COMM-domain containing protein 1 as specific binding partner for the guanine-rich RNA sequence binding factor 1* Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2020 Jul 6;1864(11):129678.

1 Zusammenfassung

Die Regulation der Genexpression findet auf transkriptioneller, posttranskriptioneller, translationaler und posttranslationaler Ebene statt und befähigt eukaryotische Zellen dazu, sich an verändernde Umweltbedingungen anzupassen. Sie erfordert das Zusammenspiel einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen, wie dem RNA-bindenden Protein *Guanin-rich Sequence binding factor 1* (GRSF1). Dieses Protein bindet Guanin-reiche Sequenzen in seinen RNA-Substraten und spielt beispielsweise, durch die positive Regulation der Translation der Glutathionperoxidase 4 (GPx4), eine wichtige Rolle in der murinen Embryonalentwicklung. Bislang konnten nur wenige RNA-Substrate von GRSF1 entdeckt werden. Ebenso wenig ist über die Proteininteraktionspartner von GRSF1 bekannt. Im ersten Teil meiner Arbeit wurde mittels eines Hefe-Zwei-Hybrid Screens nach neuen, mit GRSF1 interagierenden Proteinen, gesucht. Zwei dieser im Hefemodell entdeckten Interaktionspartner, das Cytochrom C1 (CYC1) und das *COMM domain containing protein 1* (COMMD1), binden in Säugetierzellen an die Alanin-reiche, N-terminalen Domäne von GRSF1. Es folgte eine funktionelle Charakterisierung der Interaktion von GRSF1 mit COMMD1, bei der sich zeigte, dass COMMD1 über einen unbekanntem Mechanismus die mitochondriale Lokalisation verhindert bzw. die mitochondriale Translokation von GRSF1 blockiert.

Die zelluläre Redoxhomöostase beschreibt die Balance prooxidativer Vorgängen und effektiver antioxidativer Antworten. Durch ihre Fähigkeiten komplexe Hydroxyperoxylipide zu reduzieren, spielt die GPx4 eine wichtige Rolle beim antioxidativen Schutz von Zellen, sodass GRSF1 als positiver Regulator dieses Enzyms eine wichtige Rolle in der Redoxhomöostase zukommt. Wenig ist über die Beteiligung von GRSF1 an der Regulation der Redoxhomöostase bekannt, sodass hier durch Etablierung eines GRSF1 knockout Systems in humanen Caco-2 Zellen die Rolle von GRSF1 beleuchtet werden konnte. Dabei zeigte sich, dass in Abwesenheit von GRSF1 eine erniedrigte Konzentration an intrazellulären reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) gebildet wurde. ROS entstehen vor allem in der Atmungskette (Mitochondrium) oder als Nebenprodukte enzymatischer Oxidationsreaktionen und aktivieren als *second messenger* zum Beispiel die c-Jun N-terminale Kinase (JNK). Dessen Aktivität war in Abwesenheit von GRSF1 vermindert, sodass durch Analyse der RNA-Level wichtiger pro- und antioxidativer Proteine eine Ursache für die erniedrigte Konzentration an ROS gefunden werden sollte. Dabei zeigte sich eine signifikante Verringerung der zellulären RNA-Konzentrationen der Cyclooxygenase 2.

1.1 Abstract

The regulation of gene expression takes place on transcriptional, posttranscriptional, translational and posttranslational levels and allows eukaryotic cells to adapt to changes in their environments. It requires the concerted activity of many different regulatory proteins such as the RNA binding protein Guanin-rich Sequence binding factor 1 (GRSF1). This protein binds to guanin-rich sequences in its RNA substrates and plays an important role in murine embryo development via its regulatory interaction with the mRNA encoding for glutathione peroxidase 4 (GPx4). So far, only a few RNA substrates of GRSF1 have been discovered and little is also known about the cellular interactome of GRSF1. We employed the Yeast Two-Hybrid system to search for GRSF1 interacting proteins. Two of these proteins [the COMM domain containing protein 1 (COMMD1) and Cytochrome C1 (CYC1)] interacted with the Ala-rich N-terminal domain of GRSF1. Next, we explored the molecular mechanism of COMMD1-GRSF1 interaction and found that COMMD1 hinders the mitochondrial translocation of GRSF1 through an unknown mechanism.

The cellular redox homeostasis is characterized by a balance between pro-oxidative events and effective anti-oxidative responses. GPx4 is an anti-oxidative enzyme capable of reducing complex hydroperoxy lipids to the corresponding alcohols. Grsf1 regulates GPx4 expression and thus, impacts the cellular redox homeostasis. Unfortunately, little is currently known about the role of Grsf1 in intracellular redox regulation. To shed light on this topic we established a cellular GRSF1 knockout system and explored the functional consequences of this genetic manipulation. We found that in the absence of GRSF1 decreased levels of reactive oxygen species (ROS) were detected. ROS are predominantly generated as side-products of the respiratory chain in the mitochondria but they are also formed in other enzymatic oxidation reactions. They function as second messengers and activate for instance c-Jun N-terminal Kinase (JNK). We found that JNK's activity was decreased in GRSF1 deficient cells and that the intracellular mRNA concentrations of cyclooxygenase 2 were significantly reduced in the absence of GRSF1.

2 Einleitung

2.1 Genexpressionsregulation

Durch die modifizierte Expression spezifischer Gene können eukaryotische und prokaryotische Zellen auf Veränderungen der Umweltbedingungen reagieren. Prinzipiell werden bei der Genexpression durch Gene kodierte Informationen in ein Genprodukt umgewandelt, welches schlussendlich diese Informationen enthält. Die Genexpression muss nicht notwendigerweise zu einem Protein führen. So können z.B. durch Transkription nicht Protein-kodierender Gene ribosomale RNAs oder auch Transfer-RNAs gebildet werden, die dann als Informationsüberträger fungieren. Bei der Transkription Protein-kodierender Gene entsteht die Präkursor-RNA, die, nachdem sie posttranskriptionell modifiziert wurde, zur funktionellen mRNA heranreift. Die mRNA wird dann an den Ribosomen zum entsprechenden Protein translatiert. Diese transkriptionellen und posttranskriptionellen Vorgänge unterliegen zahlreichen Regulationen, auf die ich im ersten Teil meiner Arbeit eingehen werde. Nach Beschreibung der verschiedenen Regulationsmöglichkeiten werde ich auf die besonders in der posttranskriptionellen Regulation wichtigen RNA-bindenden Proteine eingehen, um dann eine ausgewählte Familie der RNA-bindenden Proteine (heterogenen Ribonukleoproteine) vorzustellen. Zuletzt werde ich GRSF1 als Mitglied der heterogenen Ribonukleoproteinfamilie einführen und hinsichtlich seiner regulatorischen Eigenschaften näher charakterisieren.

2.1.1 Transkriptionelle Regulation der Genexpression

Die Transkription eukaryotischer Protein-kodierender Gene erfolgt durch die RNA-Polymerase II und erfordert das Zusammenspiel einer Vielzahl von regulatorischen Proteinen und Transkriptionsfaktoren.¹ Der wichtigste Schritt der Transkription ist dabei die Bildung des Prä-Initiationskomplexes (PIC), der typischerweise am Promotor der Gene aufgebaut wird und aus mehr als 40 verschiedenen Proteinen besteht.² Unter diesen Proteinen befindet sich auch die RNA-Polymerase II (Pol II) und die generellen Transkriptionsinitiationsfaktoren (GTF).² Da die Pol II selbst nicht in der Lage ist, den Promotor zu erkennen und die Transkription zu initiieren, bedarf es der GTF, zu denen die Transkriptionsfaktoren TFIIA, TFIIB, TFIID, TFIIE, TFIIIF und TFIIH gezählt werden.³ Sie binden direkt an DNA-Sequenzen im Promotor, wie die TATA-Box, oder interagieren mit Proteinen, die an GC-, CCAAT- oder Inr-Promotorsequenzen binden. Dadurch ermöglichen sie die Bildung des PIC.³ Im Allgemeinen verfügen Transkriptionsfaktoren über eine DNA-bindende Domäne.^{4,5} Häufig vorkommende, DNA-bindende Motive dieser

Domänen sind zum Beispiel das Zink-Finger Motiv, das Helix-Turn-Helix Motiv, das Leucin-Zipper Motiv oder das Helix-Loop-Helix Motiv, mit denen GTFs meist an die große Furche der DNA binden.^{4,5} Neben den GTF gibt es noch eine Vielzahl weiterer Transkriptionsfaktoren, welche die Transkriptionsrate regulieren.⁶ Zum einen geschieht dies über die Bindung von Transkriptionsfaktoren an DNA-Abschnitte, die sich vor (*upstream*), hinter (*downstream*) oder im Gen selbst befinden.⁶ Durch diese Bindung wird die Transkriptionsrate positiv oder negativ beeinflusst.⁶ Bei einer positiven Regulation werden die regulatorischen DNA-Abschnitte *Enhancer* genannt, bei einer negativen Regulation spricht man von *Silencern*.⁶ Zum anderen stellen Transkriptionsfaktoren häufig die Endstrecke zellulärer Signalwege dar.⁷ Sie werden dabei häufig durch zytosolische Signalkaskade aktiviert, anschließend in den Nukleus transportiert und binden dort an die DNA.⁷ Über weitere mit den Transkriptionsfaktoren assoziierende Proteine kann dann die Transkription der Zielgene reguliert werden.⁷

Zusätzlich zu den oben aufgezählten genetischen Regulationsmechanismen gibt es epigenetische Regulationen der Genexpression, die vor allem auf Veränderungen der DNA- bzw. Chromatinstruktur beruhen.⁸ Dazu gehören einerseits die Methylierung GC-reicher DNA-Abschnitte (sogenannten *CpG islands*), die zu einer Stilllegung des entsprechenden Genabschnittes führen.⁸ Andererseits gehören auch die Histonmodifikationen und das *Chromatin-Remodeling* zu den epigenetischen, expressionsregulatorischen Prozessen.⁹ Im eukaryotischen Zellkern liegt die DNA als Chromatin. Das Chromatin besteht aus DNA-Protein Komplexen, die Nukleosomen genannt werden. Innerhalb der Nukleosomen windet sich die DNA um die basischen Histonproteine.⁹ Chemische Modifizierungen der Histone (z.B. Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung) spielen eine wesentliche Rolle im Rahmen der epigenetischen Transkriptionsregulation. Durch Deacetylierung der Histone verändert sich z. B. die Chromatinstruktur, so dass dieser Bereich der DNA für die Pol II nicht mehr zugänglich ist.⁹ Schließlich kann durch *Chromatin-Remodeling* die Architektur des Chromatins verändert werden.¹⁰ Dabei wird ATP-abhängig die Nukleosomenstruktur verändert, sodass die entsprechenden Genabschnitte besser oder weniger gut abgeschrieben werden können.¹⁰

2.1.2 Posttranskriptionelle Regulation der Genexpression

Während und nach der Synthese des primären Gentranskripts setzen eine Vielzahl weiterer Regulationsmechanismen ein, die unter dem Begriff der posttranskriptionellen Regulation zusammengefasst werden. Zu diesen gehören das *Capping* des Primärtranskripts, dessen Polyadenylierung und das Spleißen. Diese Prozesse sind wesentlich an der Entstehung der reifen

mRNA aus dem Primärtranskript beteiligt. Weitere posttranskriptionelle Prozesse, wie das alternative Spleißen und das RNA-Editing, führen zur Entstehung mehrerer unterschiedlicher Finaltranskripte aus einem Primärtranskript. Zusätzlich sind auch der RNA-Export aus dem Nukleus, die zytoplasmatische Lokalisierung der RNA und der zytosolische RNA-Abbau weitere Ansatzpunkte für posttranskriptionelle Regulationen.

Die zeitlich erste posttranskriptionelle Modifikation des Primärtranskriptes, die Ausbildung der **Cap-Struktur**, findet schon nach der Synthese von ca. 25-30 Nukleotiden statt.¹¹ Dabei wird das 5'-Ende der naszierenden RNA mit einer 5'-Guanin-N7 Methyl Kappe (m⁷G-Kappe) verbunden.¹¹ Diese wird über drei enzymatische Schritte mit Hilfe einer RNA-Triphosphatase (TPase), einer RNA-Guanyltransferase (GTase) und einer Guanin-N7-Methyltransferase (Guanin-N7-MTase) gebildet.¹¹ Die m⁷G-Kappe schützt die RNA vor ihrem Abbau und hat eine Vielzahl weiterer Funktionen.¹¹⁻¹⁵ Sie ist essentiell für die Translation, für das Splicing sowie für den nukleären Export der mRNA¹¹⁻¹⁵

Eine der wichtigsten posttranskriptionellen Modifikation stellt das **Spleißen** (Splicing) der Präkursor-RNA dar. Bei fast allen eukaryotischen Genen werden die kodierenden Bereiche der genomischen DNA (Exons) durch nicht-kodierenden Bereiche (Introns) unterbrochen.¹⁶ Während der Transkription werden sowohl Exons als auch Introns transkribiert und entsprechende Sequenzbereiche finden sich in den Primärtranskripten wieder. Beim Spleißen werden die Introns aus der Präkursor-RNA herausgeschnitten und anschließend die Exons zusammengefügt.¹⁷ Dieser Vorgang läuft an einem temporären Protein-RNA Komplex, dem Spleißosom, ab.¹⁸ Dieser Komplex besteht aus kleinen ribonukleären RNAs (snRNA) (U1, U2, U4, U5, U6) und ihren assoziierten Proteinen.¹⁸ Das Spleißosom erkennt die Exon-Intron-Übergänge (*splice sites, branch points*) und katalysiert die hydrolytische Spaltung des RNA-Strangs.¹⁹ Durch unterschiedliches Zusammenfügen der Exons, dem alternativen Spleißen, entstehen im Durchschnitt drei oder mehr funktionelle mRNAs aus einem Primärtranskript.^{17,20}

Auch die **Polyadenylierung** des 3'-Endes der RNA zählt zu den posttranskriptionellen Modifikationen. Mit Ausnahme der Histon-RNA wird allen Protein-kodierenden RNA-Molekülen am 3'-Ende eine 50-100 Nucleotide umfassende Adenosin-Monophosphat Kette (Poly(A)-Schwanz) angefügt.^{15,21,22} Dafür wird die RNA-Sequenz zuerst endonukleolytisch gespalten.²³⁻²⁵ Als Orientierungspunkt für diese Spaltung dient dabei das hoch konservierte Poly(A)-Signal, „AAUAAA“ sowie eine *upstream* liegende GU-reiche Sequenz.²³⁻²⁵ An das Poly(A)-Signal bindet der *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) und spaltet die Prä-RNA.²⁴⁻²⁶ Durch eine mit CPSF assoziierte Poly(A)-Polymerase wird anschließend der Poly(A)-Schwanz

synthetisiert.²⁴⁻²⁶ Der Poly(A)-Schwanz schützt die RNA vor zu schnellem Abbau durch Exo- und Endonukleasen und ist eine wichtige Struktur für den nukleären Export und die Translation.²⁷⁻²⁹ Das **RNA-Editing** stellt eine weitere posttranskriptionelle Modifikation dar. Dabei entsteht durch eine Deaminierung eines Adenosinrestes im Polynukleotid ein Iosin (für ein aktuelles Review sei der Leser auf Baysal et al.³⁰ verwiesen).^{31,32} Dieser Vorgang wird durch die doppelsträngige RNA-spezifische Adenosin-Desaminase (DRADA) katalysiert und resultiert in einer RNA-Sequenz, die sich von der für sie kodierenden DNA-Sequenz unterscheidet.^{31,33} RNA-Editing findet hauptsächlich an nicht Protein-kodierenden RNAs statt.³² Eine der wenigen Ausnahmen bildet die Glutamatrezeptor B (GluR-B) Untereinheit des AMPA Rezeptors.³⁴ Die Umwandlung eines Adenosinrestes zu einem Iosin auf der GluR-B mRNA führt zu einem Einbau eines Arginins an Stelle eines Glutamins, wodurch sich die Leitfähigkeit des AMPA-Rezeptors verändert.³⁴ Nach der Modifizierung der Präkursor-RNA und der Ausbildung der reifen mRNA findet der **nukleäre Export** der reifen mRNA als Ribonukleoproteinkomplex durch die nukleären Poren der Kernmembran statt.^{28,35} Dafür binden Exportfaktoren schon ko-transkriptionell an die RNA und vermitteln dadurch eine Interaktion mit einem für den Export vieler RNAs essentiellen Transportfaktor, dem nukleären Exportfaktor 1 (NXF1).^{28,35} Im Zytoplasma liegt die reife mRNA nun mit einer 3'-untranslatierten Region (3'-UTR), einer Protein-kodierenden Region und einer 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) vor. Die 5'-UTR wird vom Startcodon vom kodierenden Teil der mRNA abgegrenzt. Das Stopcodon bildet den Übergang des kodierenden Teils der mRNA zur 3'-UTR.

Nach dem Transport ins Zytoplasma wird die reife mRNA asymmetrisch im Zytoplasma verteilt (für ein aktuelles Review sei der Leser auf Buxbaum et al. verwiesen).³⁶ Die **Lokalisation** der mRNA entspricht dabei häufig nicht exakt der Lokalisation der ihr zugehörigen Proteinprodukte, was sich durch die asymmetrische Verteilung der Ribosomen erklären lässt.³⁷ Die asymmetrische und dynamische Verteilung von mRNA und Ribosomen wird zum Beispiel durch den Ernährungszustand der Zelle reguliert und spielt so eine wichtige Rolle in der Entwicklung charakteristischer Zell- und Gewebsphänotypen.^{36,37}

Im Zytoplasma und an der Membran des rauen endoplasmatischen Retikulums erfolgt die **Translation** der mRNA. Auch dieser Prozess wird vielfach reguliert und spielt bei dem Zellwachstum, bei der Zelldifferenzierung aber auch beim Zelltod (Apoptose, Nekrose) eine wichtige Rolle.^{38,39} Die Translation wird in Initiation, Elongation und Termination unterteilt, und wird durch eine Vielzahl von Translationsinitiationsfaktoren (eIF), -elongationsfaktoren (eEF) und -terminationsfaktoren (eRF) reguliert.³⁸ Zur Translationsinitiation binden eIF an die 5'-Kappe oder den Poly(A)-Schwanz und rekrutieren die kleine (40S) ribosomale Untereinheit.³⁸ Besonders

dieser Schritt der Translation unterliegt zahlreichen Regulationen: Durch reversible Phosphorylierung der eIF kann ihre Aktivität positiv bzw. negativ reguliert werden, wodurch eine generelle Aktivierung bzw. Hemmung der Translation erfolgt.⁴⁰ Eine Sequenz-spezifische Regulation der Translationsinitiation erfolgt zum Beispiel durch microRNAs (miRNA) (für ein aktuelles Review zu miRNA Funktion sei der Leser auf Gebert und MacRae⁴¹ verwiesen).^{38,40} Diese können durch Bindung an komplementäre Sequenzen in der 3'-UTR der mRNA die Translation spezifisch hemmen.^{38,42} Über verschiedene Mechanismen führt dies dann zur Repression der Translation und einer Beschleunigung des Abbaus der zu translatierenden mRNA.^{38,43}

Eine weitere Möglichkeit der Sequenz-spezifischen Regulation der Translationsinitiation erfolgt außerdem durch RNA-bindende Proteine (RBP). Eines der hier am besten untersuchten Systeme ist die intrazelluläre Eisenhomöostase, die maßgeblich durch die beiden RNA bindenden Proteine, *Iron regulatory Protein* (IRP) 1 und 2, reguliert wird (für ein Review zum Eisenmetabolismus sei der Leser auf Muckenthaler et al. verwiesen).⁴⁴ IRP1 und 2 interagieren mit cis regulatorischen Haarnadelstrukturen, dem *Iron Response Element* (IRE), in der 3' oder 5' untranslatierten Region verschiedener an der Eisenhomöostase beteiligten RNAs.^{44,45} Die kanonische IRE ist durch ihre RNA Sequenz und Struktur definiert.^{44,45} Dabei liegt eine Haarnadelstruktur mit einer CAGUGN (N= U, C oder A) Schleife vor, in deren Mitte, im Stamm, ein ungepaartes Cytosin vorliegt.^{44,45} Das Cytosin ist von der CAGUGN Schleife nach oben durch 5 Basenpaare getrennt, während der untere Stamm der Haarnadelstruktur von variabler Länge ist.^{44,45} Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass durch das Vorliegen zweier räumlich getrennter IRE die Spezifität und Affinität der IRE/IRP Interaktion gewährleistet wird.⁴⁴⁻⁴⁶ Diese ermöglicht mehrere RNA-Protein Interaktionen, die hauptsächlich an der Haarnadelschleife und dem ungepaarten Cytosin stattfinden.⁴⁴⁻⁴⁶

Sowohl IRP1 als auch IRP2 können durch die Bindung an die IRE in der 5' UTR zum Beispiel der *Ferritin H* oder *-L* Kette mRNA (Eisenspeicherung), *Ferroportin* mRNA (Eisenexport) oder der *δ-Aminolävulinatsynthase* mRNA (Hämsynthese) die Translationsinitiation inhibieren.^{44,45} Im Gegensatz dazu verhindert die Bindung durch IRP1 oder 2 an die 3' UTR der *Transferrinrezeptor 1* (*TFRI*) mRNA (Eisenimport) die endonukleolytische Spaltung und Degradation der *TFRI* mRNA.^{44,45}

Die Bindung von IRP an IRE ist von der zellulären Eisenkonzentration abhängig.^{44,45} Ist ausreichend Eisen in den Zellen vorhanden, bindet IRP2 an das Adapterprotein FBXL5 (*F-box and leucine-rich repeat protein 5*).^{44,45} Dadurch wird der E3 Ubiquitin Ligase Komplex SCF (bestehend aus: SKP1-CUL1-F-box) rekrutiert, wodurch IRP2 ubiquitiniert und proteasomal

abgebaut wird.^{44,45} Dabei funktioniert die Hämyerithrin-like Domäne des FBXL5 als Eisensensor.^{44,45} Liegt ausreichend Eisen intrazellulär vor, wird FBXL5 stabilisiert und IRP2 degradiert.^{44,45} Darüber hinaus kommt es in mit Eisen übersättigten Zellen zu einer Regulation von IRP1 durch die Ligation eines Eisen-Schwefel-Clusters (4Fe-4S), das die Bindung an IRE verhindert.^{44,45} 4Fe-4S IRP1 funktioniert dann als zytosolische Aconitase (Holo-IRP1).^{44,45} Bei niedriger intrazellulärer Eisenkonzentration, verliert IRP1 sein Eisen-Schwefel-Cluster und kann dann wieder an IRE binden (apo-IRP1).^{44,45}

Über die Steuerung des *mRNA-Abbaus* besteht eine weitere Möglichkeit der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression. mRNA wird durch verschiedene Mechanismen, wie etwa durch deadenylierungsabhängige und -unabhängige Wege sowie durch den *Nonsense-mediated Decay* (NMD) abgebaut.²⁷ Beim deadenylierungsabhängigen Weg wird zunächst, katalysiert durch Poly(A)-Ribonukleasen, der Poly(A)-Schwanz der mRNA gekürzt.²⁷ Anschließend erfolgt das Abspalten der 5'-Kappe von der mRNA und ein 5'-3' sowie 3'-5' exonukleolytischer Abbau.²⁷ Beim deadenylierungsunabhängigen Weg des mRNA Abbaus kommt es zuerst zu einer endonukleolytischen Spaltung der mRNA und dadurch zur Entstehung zweier Fragmente, die dann von 5'-3' bzw. von 3'-5' exonukleolytisch abgebaut werden.²⁷ Ein separater Mechanismus des mRNA-Abbaus stellt der NMD dar, bei dem initial mRNA von der RNA-Helikase *Regulator of nonsense transcripts 1* gebunden wird, sodass weitere, für den Abbau der mRNA zuständige Proteine binden können.⁴⁷ Beim NMD wird einerseits, durch den Abbau von mRNAs mit einem vorzeitigem Stopcodon, der Entstehung fehlerhafter Proteine vorgebeugt.⁴⁷ Andererseits wird durch den NMD die Konzentration von mRNAs mit einem intakten Leserahmen kontrolliert.⁴⁷ Letzteres spielt eine wichtige Rolle in der Embryogenese und bei der zellulären Antwort auf oxidativen Stress.⁴⁷

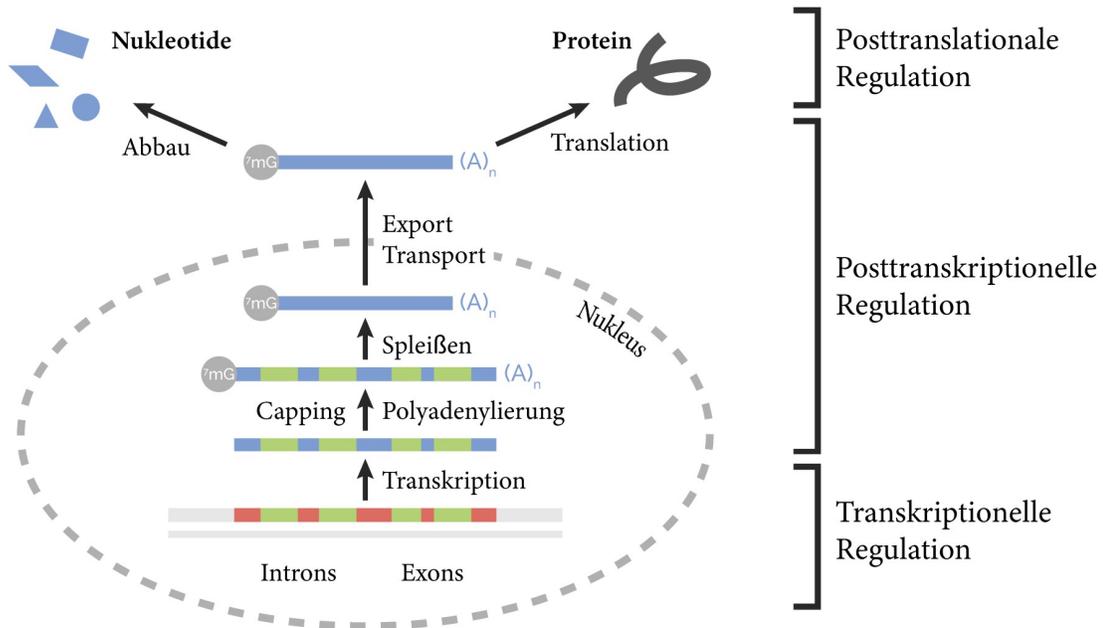


Abbildung 1: Übersicht über die verschiedenen Mechanismen der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression. Im Nukleus findet die transkriptionelle Regulation der Genexpression statt. Hier wird unter anderem die Transkriptionsrate reguliert. Aus der Transkription der DNA entsteht dann die prä-mRNA, die durch Polyadenylierung, Capping und Spleißen zur mRNA reift. Die mRNA wird dann aus dem Nukleus exportiert. Im Zytosol wird sie dann translatiert, in andere Kompartimente transportiert oder abgebaut. Abbildung modifiziert nach Halbeisen et al.⁴⁶

2.2 RNA-bindende Proteine

RNA assoziiert bereits während der Transkription, mit RNA-bindenden Proteinen (RBP). Diese vermitteln die Prozessierung, den Transport, den nukleären Export und die zelluläre Lokalisation der RNA (für ein aktuelles Review sei der Leser auf Hentze et al.⁴⁸ verwiesen).^{49–52} Der nahezu unendlichen strukturellen Vielfalt von RNAs stehen nur ungefähr 1500 RBP gegenüber.⁴⁹ Dass diese Proteine eine solch große Vielfalt an Funktionen ausüben können, liegt an ihrem modularen Aufbau.⁵⁰ Die meisten RBP sind durch verschiedene, in unterschiedlicher Reihenfolge angeordneten, RNA-bindende Domänen (RBD) charakterisiert.⁵⁰ Durch Kombination mehrerer RBD entsteht eine wandlungsfähige Bindungsfläche, die mit enzymatischen Domänen kombiniert wird, wodurch Ziel und katalytische Aktivität der RBP definiert wird.⁵⁰ Die am häufigsten vorkommenden RBD ist das ungefähr 90 Aminosäure lange *RNA Recognition Motif* (RRM).^{53,54} Es besteht aus vier antiparallelen β -Faltblättern, denen zwei α -Helices ($\beta\alpha\beta\alpha\beta$) gegenüberstehen.^{53,54} In den beiden zentralen β -Faltblättern der RRM kommen häufig drei basische Aminosäurereste (Arginin oder Lysin) vor, die über Salzbrücken mit den

Phosphodiesterbindungen der RNA-Kette interagieren.⁵⁰ Auch die etwa 70 Aminosäuren lange, heterogene nukleäre Ribonukleoprotein K-Homologie (KH) Domäne kommt ubiquitär in eukaryotischen RBP vor.⁵⁰ Ähnlich wie bei der RRM stehen hier drei α -Helices drei β -Faltblättern gegenüber (Typ I: $\beta\alpha\alpha\beta\beta\alpha$ Typ II: $\alpha\beta\beta\alpha\alpha\beta$).⁵⁰ Die Protein-RNA Interaktion der KH-Domäne erfolgt durch seine Signatursequenz (I/L/V)IGXXGXX(I/L/V) und einer bestimmten Konfiguration der umliegenden α -Helices bzw. β -Faltblättern.⁵⁰ Auch über die RGG (definiert durch Arginin-Glycin-Glycin Wiederholungen) Domäne kann RNA gebunden werden.⁴⁸ Anhand der Anzahl der RGG Wiederholungen können diese RNA bindenden Domänen weiter aufgeteilt werden.⁵⁵ Dabei konnte für das RNA Bindeverhalten der RGG Domäne des *fragile X mental retardation proteins* gezeigt werden, dass die Positionierung des zentralen Arginins für die Bindung der *sc1* mRNA wichtig ist.⁴⁸ Die hohe Flexibilität der das Arginin umgebenden Glycine erlaubt der RGG Domäne die Anpassung an die Struktur der Ziel-RNA.⁴⁸

RBP sind an der Pathologie einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt (für ein aktuelles Review sei der Leser auf Gebauer et al.⁵⁶ verwiesen).⁵⁷ Eine der bekanntesten monogenetischen Erkrankungen, die durch das Fehlen eines RBP entsteht, ist das Fragile-X-Syndrom (FXS).⁵⁷ Diese X-chromosomal vererbte Krankheit ist die häufigste erbliche Ursache für geistige Retardierung und wird durch eine CGG Tripletexpansion in der 5'-UTR des *FMRI* Gens verursacht.⁵⁷ Durch die Expansion von normalerweise 6 bis 54 CGG- auf 200 CGG-Wiederholungen kommt es zur Hypermethylierung dieses Genabschnittes und damit zu einer konsekutiven Inaktivierung des *FMRI* Gens.^{8,57,58} Das dadurch nicht synthetisierte Protein, das *fragile X mental retardation protein* (FMRP), wird bei gesunden Menschen besonders in Neuronen exprimiert, wo es am nukleozytoplasmatischen Transport von mRNAs beteiligt ist und die Translation verschiedener Proteine inhibiert.⁵⁹⁻⁶² Die beim FXS beobachteten neuronalen Entwicklungsstörungen entstehen dabei wahrscheinlich durch die fehlende Translationshemmung durch FMRP und werden als ursächlich für die geistige Retardierung, die Lernschwäche und die Hyperaktivität angesehen.^{60,63}

2.2.1 Die RNA-bindenden Proteine aus der Familie der hnRNP F/H

Die Familie der heteronukleären Ribonukleoproteine H/F (hnRNP H/F) ist eine Gruppe von RBP zu denen hnRNP F, hnRNP H1, hnRNP H2, hnRNP H3 (2H9) und GRSF1 gehören und die durch das Vorliegen mindestens zweier quasi-RRM (qRRM)-Domänen charakterisiert werden (siehe Abbildung 2).^{64,65}

Hinsichtlich ihrer Struktur unterscheidet sich die qRRM-Domäne kaum von der $\beta\alpha\beta\beta\alpha$ -Topologie der RRM-Domäne. Funktionell zeigt sie aber ein divergierendes RNA-Bindungsverhalten.⁶⁶ Während die oben beschriebene RRM-Domäne RNA durch

Aminosäureresten in den zentralen β -Faltblättern bindet, erfolgt die RNA-Interaktion der qRRM durch Aminosäurereste, die sich in den *loops* befinden, welche die β -Faltblätter miteinander verbindenden.⁶⁵ Mit der qRRM-Domäne binden die hnRNP H/F vor allem Guanin-reiche Sequenzen und sind an einer Vielzahl von Funktionen der RNA-Biologie beteiligt.^{64,65} Neben der Prozessierung des 3'-Endes der prä-mRNA, sind sie am Spleißen, am nukleozytoplasmatischen Transport und an der Polyadenylierung beteiligt.⁶⁷⁻⁷¹

Mit Ausnahme von GRSF1 enthalten alle hnRNP H/F außerdem ein oder zwei Glycin-reiche

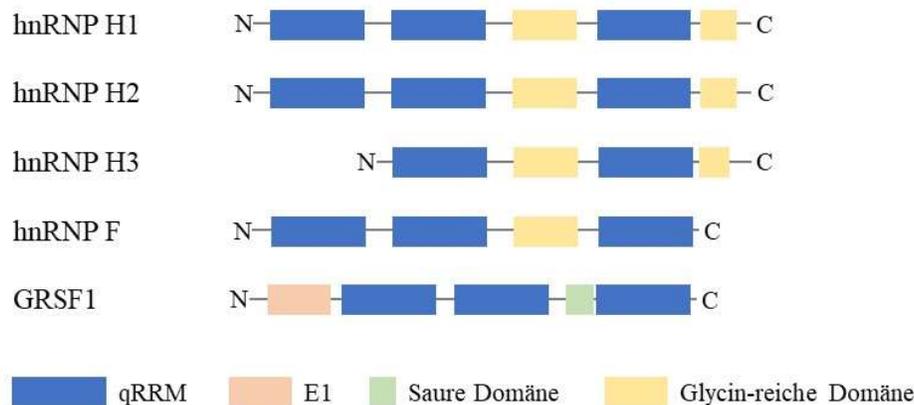


Abbildung 2: Schematische Zeichnung der Proteinstruktur der hnRNP H/F Familie. Alle Mitglieder der hnRNP H/F Familie besitzen mindestens zwei qRRM, sowie zusätzliche Glycin-reiche oder saure Domänen.

Domänen. Auch wenn hnRNP H/F überwiegend im Nukleus vorkommen, kann über die Glycin-reiche Domäne ein nukleozytoplasmatischer Transport vermittelt werden.⁶⁸ GRSF1 nimmt eine Sonderstellung in der Familie der hnRNP H/F ein. Im Gegensatz zur Glycin-reichen Domäne enthält GRSF1 eine saure Domäne und Alanin-reiche Domäne mit bisher unbekannter Funktion (siehe Abbildung 2).^{72,73} *In silico* Analysen legen die Vermutung nahe, dass die Alanin-reiche Domäne eine Signalsequenz enthält, die für den mitochondrialen Import wichtig ist.^{74,75} Weiterhin konnte GRSF1 im Gegensatz zu den restlichen Mitgliedern der hnRNP H/F nicht nur im Nukleus, sondern auch im Zytoplasma und in den Mitochondrien nachgewiesen werden.^{72,73,75}

2.3 GRSF1 als RNA-bindendes Protein

2.3.1 GRSF1: Gen und Proteinstruktur

Das humane *GRSF1*-Gen liegt auf dem Chromosom 4 in der Region 4q13.2. Diese Region wurde früher mit der Pathogenese der familiären mesialen Temporallappenepilepsie (mTLE) assoziiert.⁷⁶ Dabei handelt es sich um eine erbliche Form der Epilepsie, die mit komplex fokalen Anfällen

einhergeht.⁷⁷ Die Erkrankung geht häufig mit starken psychischen und autonomen Begleitsymptomen einher.⁷⁷ Allerdings konnte die familiäre mTLE bisher nicht präzise mit einem Gen der Region 4q13.2 verknüpft werden, sodass nicht abschließend geklärt ist, ob GRSF1 bei der Ätiologie der mTLE eine Rolle spielt.

Das GRSF1-Protein enthält drei qRRM-Domänen und eine sauren Domäne, die die zweite und dritte qRRM-Domäne miteinander verbindet.⁷³ Dabei werden die beiden N-terminalen qRRM-Domänen von Exons 2-6, die C-terminale qRRM von Exons 7-9 und die saure Domäne von Exon 6-7 kodiert.⁷³

2.3.2 Erkenntnisse über GRSF1/Substrat Interaktionen

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die qRRMs von GRSF1 an RNA-Sequenzen binden, die aus drei konsekutiven Guaninen bestehen, die von Purinen flankiert werden.⁶⁷ Obwohl diese Sequenz in eukaryotischen RNAs relativ häufig vorkommt, sind bislang nur wenige RNA-Substrate von GRSF1 bekannt. Bisher wurden zwei zelluläre Substrate, die Glutathion-Peroxidase 4 (GPx4) mRNA und die *unusual SNARE of the endoplasmatic reticulum-1* (USE1) mRNA als GRSF1 Substrate charakterisiert.^{78,79} Darüber hinaus konnte bereits vor mehr als 20 Jahren gezeigt werden, dass GRSF1 auch mit der Translationsmaschinerie des

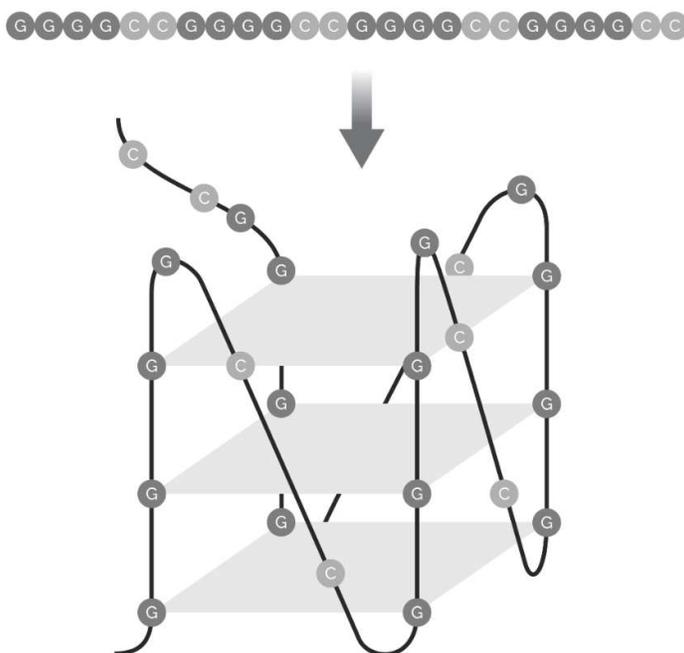


Abbildung 3: Der G-Quadruplex. Hier dargestellt ist eine exemplarische, durch Watson Crick Basenpaarungen stabilisierte Primärstruktur, die sich aufgrund ihrer zahlreichen Guaninen zu einem G-Quadruplex faltet. Dabei werden Guanine gestapelt und durch Hoogsteen Basenpaarung in einer Ebene angeordnet. (modifiziert nach Schludi et al.⁷⁹)

Influenzavirus interagiert.⁸⁰ Dabei bindet GRSF1 an eine AGGGA-Sequenz, die sich in der 5'-UTR einer viralen mRNA befindet, die für ein wichtiges Influenzavirus Protein kodiert (Influenzavirus-NP).⁸⁰ Für die mRNAs von GPx4 und Use1 liegen die Bindungssequenzen ebenfalls in der 5'-UTR und sind durch das Sequenzmotiv AGGGGA ausgezeichnet.^{78,79} Diese Guaninreichen Sequenzen können sich zu Sekundärstrukturen, den G-Quadruplexen, falten (siehe Abbildung 3).^{78,79} G-Quadruplexe werden durch Watson- Crick-

Basenpaarungen und durch Hogsteen-Basenpaarungen stabilisiert. Sie spielen bei der Regulation der Initiierung und Termination von Transkription und Translation eine wichtige Rolle.⁸¹⁻⁸³ *In vitro* Analysen der Struktur der 5'-UTR der GPx4- bzw. Use1 mRNA deuten auf das Vorkommen von G-Quadruplexen hin.^{78,79} Daher wurde vermutet, dass nicht das AGGGGA Sequenzmotiv das Bindungsmotiv für GRSF1 darstellt, sondern die von der Use1 bzw. GPx4 ausgebildeten G-Quadruplexe von größerer Bedeutung sind.^{78,79}

Neben seinen zytosolischen Substraten wurden außerdem drei mitochondriale (mt) RNAs als Substrate von GRSF1 identifiziert.⁷⁵ Dabei handelt es sich um die mRNA der NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Kette 6 (ND6) sowie zwei lange, nicht kodierende (lnc) RNAs des Cytochrom b und der NADH-Ubichinon Oxidoreduktase Kette 5 (ND5).⁷⁵ An welche Sequenz GRSF1 hier bindet und ob sich diese RNAs auch zu G-Quadruplexen falten, ist bislang unbekannt.

2.3.3 Expression von GRSF1 und deren Regulation

GRSF1 wird in den meisten Säugetiergeweben exprimiert, ist aber in männlichen Keimzellen in besonders hoher Konzentration nachweisbar.⁷³ Die regulatorischen Mechanismen der GRSF1 Expression wurden bislang nur unzureichend untersucht. Bei *in silico* Analysen der regulatorischen Regionen des *GRSF1* Gens konnten zwar potentielle Bindungsstellen für eine Reihe von Transkriptionsfaktoren nachgewiesen werden, es fehlen aber typische TATA- oder CCAAT-Boxen in der 5'-flankierenden Region des Gens.⁷³

Andererseits konnte im Promoter des GRSF1 Gens eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor *nuclear factor κ -light-chain-enhancer of activated B cells* (NF κ B) nachgewiesen werden.⁷³ Diese regulatorischen Proteine bilden eine Familie von Transkriptionsfaktoren und sind durch das Vorhandensein der DNA-bindenden Rel-Homologie-Domäne (RHD) charakterisiert.⁸⁴ Die NF κ B Transkriptionsfaktoren regulieren die Expression einer Vielzahl von Genen und induzieren unter anderem die Biosynthese von pro-inflammatorischen Zytokinen, von Wachstumsfaktoren und von Redox-regulierten Genen.^{85,86} Darüber hinaus regulieren diese Transkriptionsfaktoren auch die Apoptose.^{85,86} Ob die Expression des *GRSF1* Gens durch die Transkriptionsfaktoren der NF κ B-Familie reguliert wird, wurde bislang nicht untersucht.

Aus dem *GRSF1* Gen werden mindestens vier verschiedene Isoproteine gebildet, die sich dadurch voneinander unterscheiden, dass die durch das Exon 1 kodierte N-terminale Sequenz isoformspezifisch ist.^{73,79,87} Das C-terminale Ende der mRNA bleibt dabei unverändert.⁷³ Die verbleibenden Exons 2-9 werden nach dem Spleißen miteinander verknüpft und kodieren für die qRRM-Domänen sowie die saure Domäne.⁷³ Die molekularen Mechanismen, die zur Bildung der

verschiedenen Isoformen führen, sind nicht bekannt.⁷³ Es werden sowohl alternative Spleißmechanismen als auch alternative Transkriptionsinitiationen diskutiert.⁷³

2.3.4 GRSF1 Wirkmechanismus

Während die meisten Vertreter der hnRNP F/H Familie hauptsächlich im Nukleus lokalisiert sind, konnte GRSF1 auch im Zytoplasma und in den Mitochondrien nachgewiesen werden.^{75,78,79,88} GRSF1 aktiviert die Translation der *Glutathion Peroxidase 4* (GPx4) mRNA.⁷⁹ Dieses antioxidativ wirkende Enzym, das mit Hilfe von reduziertem Glutathion organische und anorganische Peroxide zu den entsprechenden Alkoholen reduziert,⁸⁹ ist integraler Bestandteil der intrazellulären Redoxhomöostase fungiert, aber auch als Strukturprotein bei der Spermatogenese.⁹⁰ In murinen Embryonen konnte gezeigt werden, dass GRSF1 an eine AGGGGA-Sequenz bindet, die sich in der 5'-UTR der GPx4 mRNA befindet.⁷⁹ Dadurch wird die GPx4 mRNA aktiven Ribosomen zuführt (siehe Abbildung 4).⁷⁹ Mechanistisch interagiert GRSF1 dabei wahrscheinlich direkt oder indirekt mit dem Translationsinitiationskomplex und erhöht so die Translationsrate der GPx4 mRNA.^{73,79}

Auch die Translation der *Use1* mRNA beeinflusst GRSF1 positiv.⁷⁸ Use1 ist am retrograden Transport von *coat protein complex I* (CopI)-Vesikeln beteiligt.⁹¹⁻⁹⁴ Es konnte gezeigt werden, dass GRSF1 an eine AGGGGA-Sequenz in der 5'-UTR der Use1 mRNA bindet und deren Translation positiv reguliert (siehe Abbildung 4).⁷⁸ Dies erfolgt wahrscheinlich durch die Rekrutierung der 40S ribosomalen Untereinheit und der mit ihr assoziierten Translationsfaktoren am Use1 Translationsinitiationsort.⁷⁸

Dass GRSF1 im Zytoplasma als Translationsaktivator fungiert, macht sich offenbar das *Influenzavirus* bei seiner Replikation zu Nutze.⁸⁸ Dieses Pathogen ist ein RNA-Virus aus der Familie der Orthomyxoviridae.⁹⁵ Nach Penetration der Wirtszelle kommt es schnell zur Abnahme der Synthese wirtseigener Proteine zugunsten der Translation viraler Proteine.⁸⁰ Bei dieser Translationsregulation spielen konservierte Sequenzen in der 5'-UTR verschiedener Influenza-RNAs eine wichtige Rolle.^{80,96} GRSF1 ist eines der wirtseigenen Proteine, die für die Virusreplikation eine entscheidende Rolle zu spielen scheinen.⁸⁸ Es konnte gezeigt werden, dass eine Immunodepletion von GRSF1 in Influenza-infizierten Zellen die Synthese viraler Proteine verhindert.⁸⁸ Darüber hinaus wurde eine AGGGU-Sequenz in der 5'-UTR der Influenza NP mRNA entdeckt, an die GRSF1 mit seiner RRM2 bindet (siehe Abbildung 4).⁹⁷ Andererseits haben kürzliche Untersuchungen zur Infektion von HEK-293 Zellen mit dem Influenzavirus gezeigt, dass GRSF1-defiziente Zellen ebenso effektiv infiziert werden wie entsprechende Wildtypkontrollen (Ufer, nicht publizierte Daten). In drei unabhängigen Infektionsversuchen konnte keine

signifikante Hemmung der Virusreplikation in GRSF1-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, dass das GRSF1 Protein der Wirtszelle nicht essenziell für die Replikation des Influenzavirus in HEK-293 Zellen zu sein scheint. Damit wird eine mögliche Rolle von GRSF1 bei der Influenzavirusinfektion zwar nicht generell in Frage gestellt. Essential scheint GRSF1 für den Infektionsprozess jedoch nicht zu sein. Außerdem scheint GRSF1 an der Prozessierung der viralen HIV RNAs beteiligt zu sein.⁹⁸ Der diesem Effekt zugrunde liegende Mechanismus ist allerdings noch völlig unklar.

Außer im Zytoplasma und im Zellkern konnte GRSF1 auch im Mitochondrium lokalisiert werden. Hier ist das Protein an der **Biogenese der Ribosomen** sowie an der **Prozessierung von mtRNAs** beteiligt.^{74,75} Das mitochondriale Genom kodiert für 13 Polypeptide, die an Mitochondrium-spezifischen Ribosomen translatiert werden.^{75,99,100} Die Biogenese dieser Ribosomen ist in Abwesenheit von GRSF1 gestört, sodass GRSF1 eine wichtige Rolle in den mitochondrialen Ribosomen zugesprochen wird.⁷⁵ Allerdings interagiert GRSF1 nicht direkt mit den mitochondrialen Ribosomen, wohl aber mit nicht-kodierenden RNAs, die möglicherweise für die Ribosomenbiogenese bedeutsam sind.⁷⁵

Die mitochondriale und zytoplasmatische Translation findet teilweise in RNA-Granula statt.^{74,75,101} Während sich diese im Zytoplasma als Antwort auf zellulären Stress bilden und durch eine Blockade der zytoplasmatischen Translation das Überleben der Zelle gewähren, ist über die Regulation der mitochondrialen RNA-Granula (MRG) wenig bekannt.^{101,102} Ein wichtiger Bestandteil der MRG ist die RNase P, die eine zentrale Rolle in der Prozessierung mitochondrialer RNA spielt.¹⁰³ GRSF1 kolokalisiert mit den MRG und interagiert mit der RNase P, wodurch es wahrscheinlich an der Prozessierung von mtRNAs beteiligt ist: Ein knockdown der GRSF1 Expression verzögert die Entstehung reifer mtRNAs in den MRG und reduziert die mitochondriale Proteinsynthese.^{74,75} Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass GRSF1 innerhalb der MRG an verschiedene mtRNAs (ND6 mRNA, Cytb lncRNA, ND5 lncRNA) bindet (siehe Abbildung 4).^{74,75}

Im Mitochondrium kommen neben Proteinen, die durch mtDNA kodiert werden, auch durch nukleäre DNA kodierte Proteine vor.¹⁰⁴ Gleiches gilt auch für lncRNAs, die teilweise aus dem Nukleus ins Mitochondrium transportiert werden und dort eine wichtige Rolle in der Genexpression spielen.^{105,106} Eine dieser lncRNAs ist die RNA-Komponente der RNA-prozessierenden Endoribonuklease (RMRP).^{104,107} Die RMRP ist Bestandteil der RNA-prozessierenden Endoribonuklease (RNase MRP), die an der mitochondrialen DNA-Replikation und RNA-Prozessierung beteiligt ist.^{107,108} GRSF1 und das RBP *human antigen R* (HuR) binden RMRP und sind an dessen Akkumulation in der Mitochondrienmembran beteiligt.¹⁰⁴ Durch

ungeklärte Mechanismen scheint GRSF1 dabei am Transport der RRMP zum Mitochondrium beteiligt zu sein (siehe Abbildung 4).¹⁰⁴

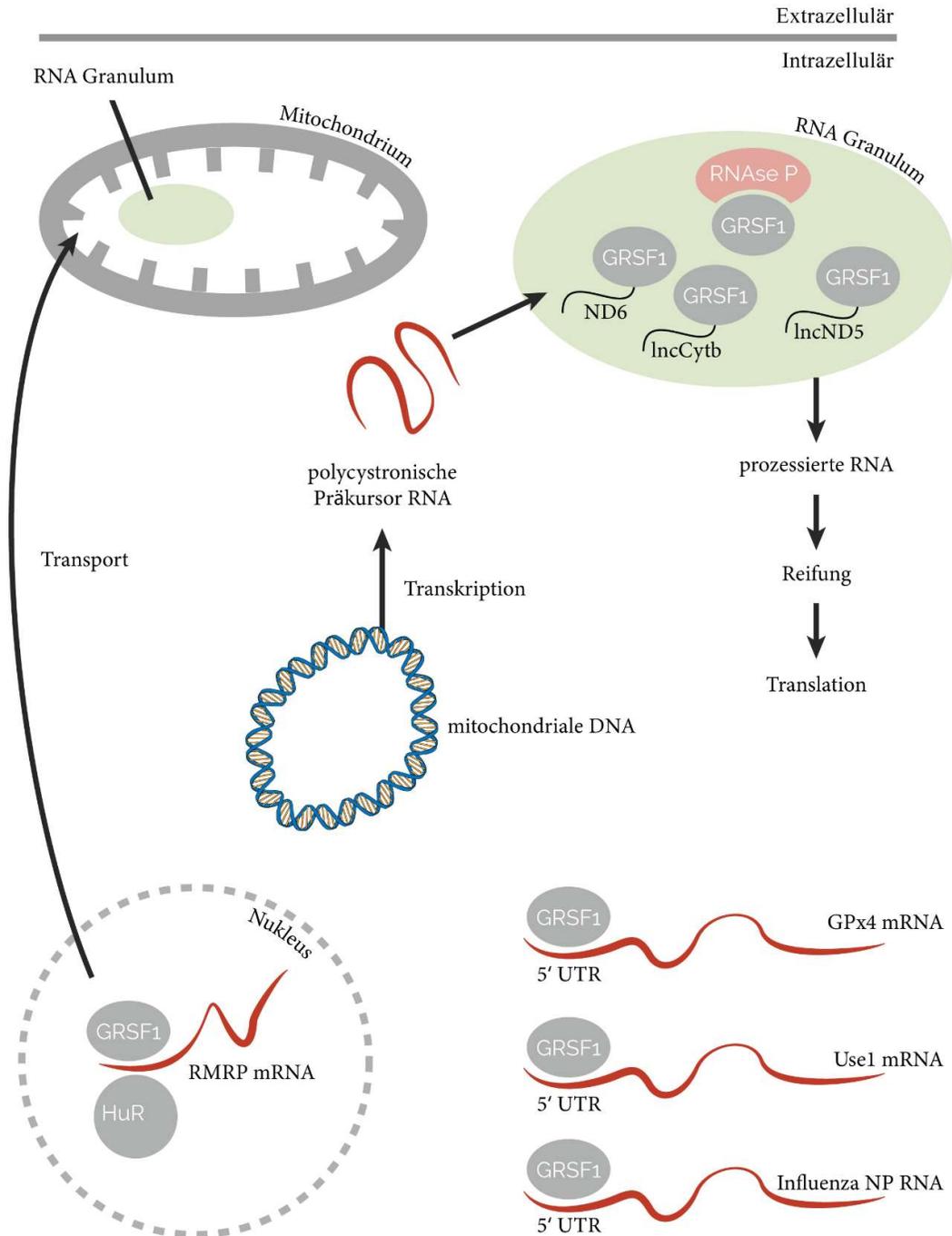


Abbildung 4: Potenzielle GRSF1 Wirkmechanismen. Im Zytoplasma reguliert GRSF1 die Translation der Use1, GPx4 und Influenza Nukleoprotein RNA positiv (s. Text). Im Mitochondrium ist GRSF1 an der Prozessierung mitochondrialer RNA beteiligt, bindet die RNase P und die mitochondriale ND6 RNA sowie Cytb und ND5 lncRNA. Außerdem transportiert es über einen bisher unbekannt Mechanismus die RMRP RNA zusammen mit dem RNA bindenden Protein HuR zum Mitochondrium. In Teilen modifiziert nach Jourdain et al.⁹⁸

Eine der wesentlichen Funktionen des Mitochondriums besteht in der Produktion von ATP mit Hilfe der aus fünf Komplexen bestehenden Atmungskette.¹⁰⁹ Es konnte gezeigt werden, dass es in GRSF1 knockdown Zellen zu einer gestörten Anordnung der Komplexe I, III, IV und V der

Atmungskette kommt.⁷⁵ Allerdings kommt es in GRSF1 knockout Zellen nicht zu einer signifikant verringerten Produktion von ATP (Ufer, unpublizierte Daten). Außerdem teilen sich die GRSF1-defiziente HEK-293 Zellen normal und zeigen keine gravierenden Auffälligkeiten im Energiestoffwechsel.

2.3.5 GRSF1 und seine Rolle bei zellulären Signalwegen

Neben seiner Rolle bei der Translationsregulation scheint GRSF1 auch an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt zu sein. Beispiele dafür sind die *Wingless and Int-1* (Wnt)- und *mechanistic target of rapamycin* (mTOR)- Signalwege.^{110,111}

2.3.5.1 GRSF1 im Wnt-Signalweg

Der kanonische Wnt-Signalweg ist an der Proliferation von Zellen, deren Differenzierung und an nahezu allen Aspekten der Embryonalentwicklung beteiligt.¹¹² Wnt gehört zu einer Familie an sekretierten Glykoproteinen, die durch hoch konservierte, Cystein-reiche Regionen ausgezeichnet sind.¹¹² Im Wnt-Signalweg binden Proteine der Wnt Familie an den zellulären Frizzled-Rezeptor, der dann über mehrere Schritte β -Catenin aktiviert (siehe Abbildung 5).^{112,113} β -Catenin ist als Komponente der zellulären Adhärensverbindungen essentiell für Zell-Zell-Interaktionen, funktioniert aber auch als Induktor der Genexpression.^{112,114} Normalerweise ist es im Zytoplasma in einem hochmolekularen Proteinkomplex, dem *destruction complex*, gebunden.¹¹² Der wichtigste Bestandteil dieses Komplexes ist das Tumorsuppressorprotein Axin, dass bei nicht-aktiviertem Wnt-Signalweg die Phosphorylierung, Ubiquitinylierung und den sich daran anschließenden proteasomalen Abbau von β -Catenin vermittelt.¹¹² Durch die Aktivierung des Wnt-Signalweges kommt es zu einer Phosphorylierung von Axin, die dazu führt, dass sich β -Catenin vom *destruction complex* löst und in den Nukleus wandert.¹¹² Im Nukleus aktiviert es dann den Transkriptionsfaktor *transcription factor/lymphoid enhancer binding protein 1* (TCF/LEF), der seinerseits die Transkription einer Vielzahl von Genen induziert (siehe Abbildung 5).^{112,115} Diese Signalabläufe spielen eine besondere Rolle im Rahmen der frühen Embryonalentwicklung, wie bei der Bildung des Primitivstreifens, bei der Festlegung der anterior-posterioren Achse oder bei der Etablierung des Isthmus (Übergang von Rhombencephalon zu Mesencephalon).¹¹⁶ Untersucht man die Gastrulation bei murinen, β -Catenin-knockdown Embryonen, die aus embryonalen Stammzellen abgeleitet wurden, zeigte sich eine gestörte Ausbildung der Somiten sowie erniedrigte Level an GRSF1.¹¹⁰ Dabei ist unklar, ob und über welche Mechanismen β -Catenin die Expression von GRSF1 reguliert.¹¹⁰ Bei *in silico* Analysen des GRSF1-

Promotorbereichs konnten allerdings Sequenzen identifiziert werden, die von Transkriptionsfaktoren gebunden werden, die durch den Wnt-Signalweg reguliert werden.^{73,117} Des Weiteren zeigten o. g. GRSF1-defiziente, murine Embryonen eine gestörte Entwicklung des Isthmus, was auch bei den weiter o.g. β -Catenin-defizienten Embryonen beobachtet wurde.¹¹⁰ Aus der funktionellen Überschneidung dieser beiden Phänotypen wurde geschlossen, dass GRSF1 ein wichtiges Steuerungselement des Wnt-Signalweges darstellt.¹¹⁰

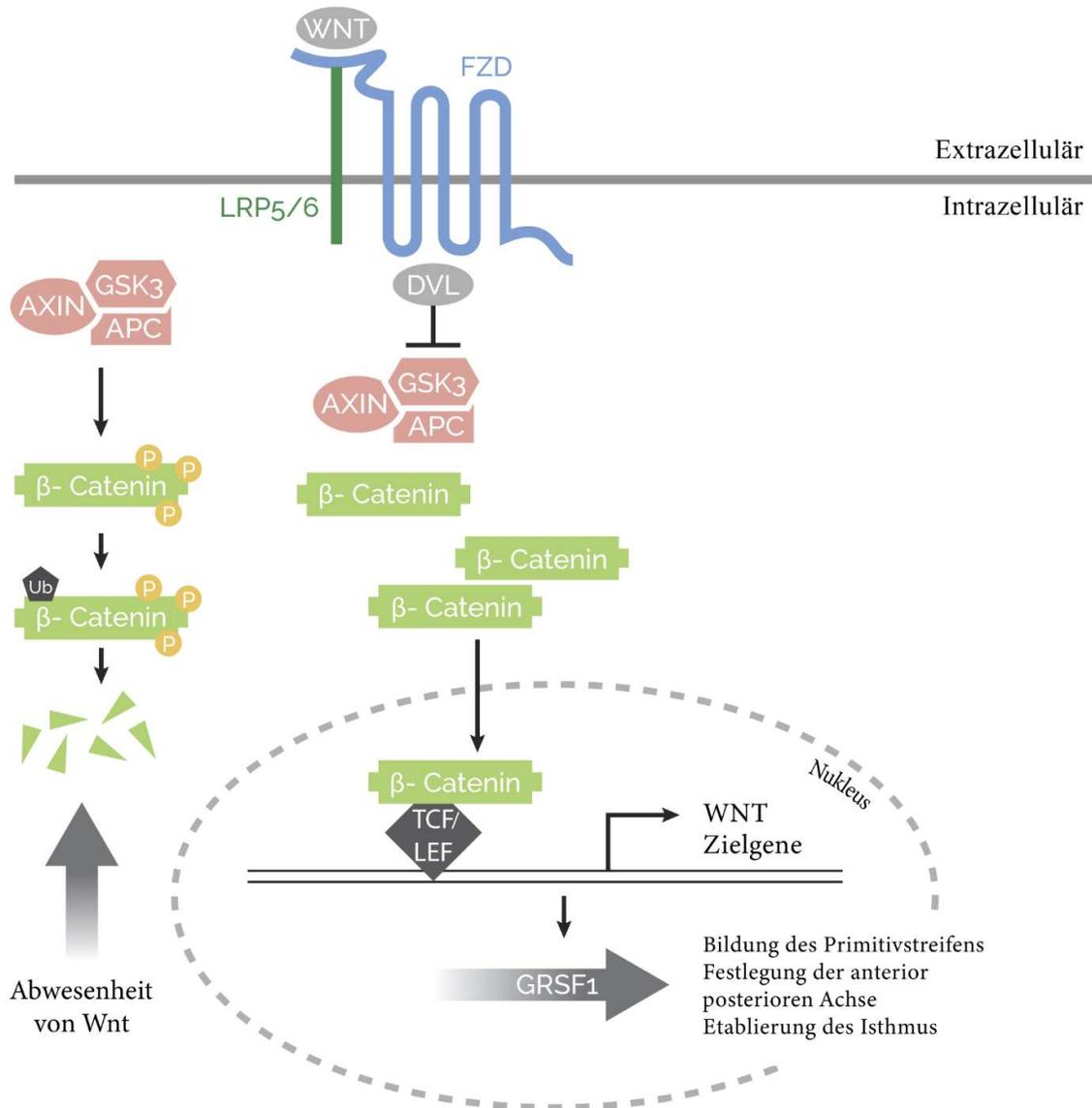


Abbildung 5: Vereinfachte Darstellung des Wnt/ β -catenin Signalweges: In der Abwesenheit des Wnt Liganden (linke Seite), wird β -Catenin durch den destruction complex, bestehend aus der Glykogen Synthase Kinase 3 (GSK3), Axin und Adenomatöse Polyposis Coli (APC), phosphoryliert, ubiquitinyliert und der proteasomal degradiert. Kommt es zur Bindung von Wnt an den Frizzled (Fzd) und das low-density lipoprotein rezeptor-related protein 5/6 (LRP5/6) wird das zytosolische Protein Dishevelled (DVL) aktiviert. DVL inhibitiert dann den destruction complex, sodass der Abbau von β -catenin gehemmt wird und letzteres in den Nukleus migrieren kann. Im Nukleus bindet β -Catenin an den TCF/LEF Komplex, was die Transkription zahlreicher Gene aktiviert. Ob GRSF1 zu diesen Genen gehört ist unklar, allerdings ist es in Abwesenheit von Wnt erniedrigt und scheint Mediator der Wnt vermittelnden, embryonalen Entwicklung muriner Embryonen zu sein. Modifiziert nach Clever.¹¹²

2.3.5.2 GRSF1 im mTOR-Signalweg

Die Expression von GRSF1 wird nicht nur durch den Wnt-Signalweg positiv reguliert, sondern auch durch den mTOR-Signalweg.¹¹¹ Die Proteinkinase mTOR bildet die Untereinheit zweier verschiedener Komplexe, dem mTOR Komplex (C) 1 und mTORC2.¹¹⁸ Diese verarbeiten externe Stimuli wie Hormone, Mitogene oder Hypoxie und interne Stimuli wie oxidativen Stress, virale Infektion oder DNA Schäden und regulieren durch Phosphorylierung von Effektorproteinen Zellmetabolismus, Wachstum, Proliferation und Überleben.¹¹⁹ Einer der Haupteffektor Proteine des mTORC1 ist die Ribosomale Protein S6 Kinase (S6K).^{119,120} Die mTORC1/S6K Achse spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Transkription, der Translation und der Lipidsynthese.¹²⁰ Die translationale Regulation übt S6K zum Teil durch die Phosphorylierung des eIF4E-bindendes

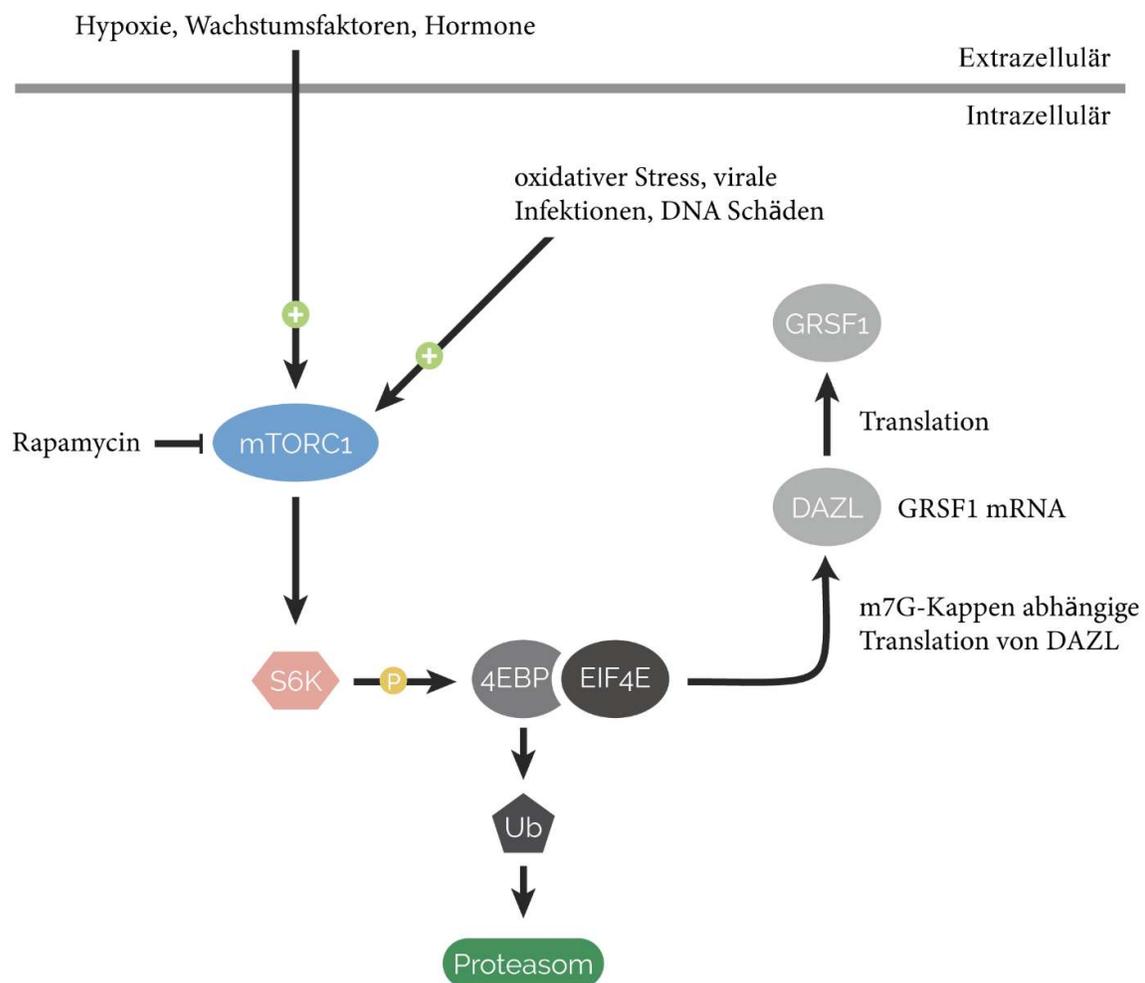


Abbildung 6: Die Beteiligung von GRSF1 beim mTOR Signalweg. Die Kinase mTORC1 wird durch zahlreiche externe Stimuli wie Hypoxie, Wachstumsfaktoren oder Hormone sowie intrazelluläre Stimuli wie oxidativer Stress, virale Infektionen oder DNA Schäden aktiviert. Inhibiert wird sie durch das Immunsuppressivum Rapamycin. Kommt es zu einer Aktivierung von mTORC1 führt dies zu einer Phosphorylierung von S6K, was seinerseits 4EBP phosphoryliert. Dadurch wird 4EBP ubiquitinyliert und proteasomal degradiert. Das dadurch freigesetzte eIF4E translatiert dann in einer m7G-Kappen-abhängig die RNA von unter anderem DAZL. DAZL ist ein RNA-bindendes Protein, das die mRNA von GRSF1 bindet und so dessen Translation positiv reguliert. In Teilen modifiziert nach Wullschleger et al.¹¹⁹

Protein (4EBP) aus, wodurch eIF4E (eukaryotischer Initiationsfaktor 4E) freigesetzt wird.¹²⁰ Über die Erkennung der mRNA m⁷G-Kappe durch eIF4E kommt es zu einer globalen Translationsinitiation, wodurch auch die Expression von *deleted in azoospermia like* (DAZL) induziert wird.^{121,122} DAZL, ein für die Spermienproduktion in Keimzellen essentielles RBP, bindet die GRSF1 mRNA in der 5'-UTR und reguliert dessen Translation positiv.^{111,123} So führt eine Aktivierung des mTOR-Signalweges letztlich zu einer erhöhten GRSF1 Expression (siehe Abbildung 6).^{111,123}

2.3.5.1 GRSF1 in der zellulären Redoxhomöostase

Die zelluläre Redoxhomöostase ist definiert als Balance zwischen prooxidativen Vorgängen und effektiver antioxidativer Antwort.^{124,125} Antioxidativ wirken dabei unter anderen die Glutathionperoxidasen (GPx), die Superoxiddismutasen (SOD) und die Katalase.¹²⁶ Diese Enzyme entgiften verschiedene prooxidative Moleküle wie etwa organische und anorganische Peroxide (z.B. Wasserstoffperoxid oder Lipidperoxide), das Superoxidradikal (O₂⁻) und das Hydroxylradikal (OH[•]).¹²⁶⁻¹²⁸ Diese prooxidativ wirkenden Verbindungen, die unter dem Begriff *reactive oxygen species* (ROS) zusammengefasst werden, entstehen intrazellulär hauptsächlich in den Mitochondrien, aber auch als Nebenprodukte enzymatischer Reaktionen im Zytosol.¹²⁶ Im Rahmen der Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert ist, entstehen ROS durch inkomplette Reduktion des Sauerstoffs.¹²⁹ Weitere Quellen für ihre Entstehung sind zum Beispiel die enzymatischen Reaktionen der Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen oder Stickstoffmonoxidsynthasen.¹²⁶ In höheren Konzentrationen induzieren ROS die Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren, was die zelluläre Funktion dieser Substanzen beeinträchtigt.¹²⁴⁻¹²⁶ Das kann zu irreparablen Schäden an den Zellen führen.¹²⁴⁻¹²⁶ In niedrigen Konzentrationen reagieren ROS reversibel mit dem Schwefelatom Cystein- und Methionin-haltiger Proteine und üben so ihre Funktion als *second messenger* aus.^{126,130} So können ROS die Oligomerisation der Glutathion S-Transferase Pi (GSTP) initiieren, wodurch es zu einer Freisetzung der c-Jun N-terminalen Kinase (JNK) kommt.¹³¹ JNK reguliert dann, über die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, die Genexpression.¹³¹ Neben der durch ROS vermittelten transkriptionellen Regulation der Genexpression, sind auch ROS abhängige, posttranskriptionelle Mechanismen der Genexpressionsregulation bekannt. So destabilisiert hnRNP D bei hohen Konzentrationen an ROS über unbekannte Mechanismen die mRNA von Cyclin D1, Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α), Interleukin-1 β (IL1 β) und Cyclooxygenase-2 (PTGS2), was zu einer Herunterregulation der Expression der betroffenen Enzyme führt.¹³²⁻¹³⁵

Durch die Hochregulation der Expression der antioxidativ wirkenden GPx4 spielt GRSF1 in der zellulären Redoxhomöostase eine wichtige Rolle.⁷⁹ Die GPx4 nimmt innerhalb der Familie der Glutathionperoxidasen eine besondere Rolle ein, da sie als einziges Enzym dieser Enzymfamilie in der Lage ist, Peroxide komplexer Lipide zu reduzieren.^{89,136,137} Andere GPx-Isoformen bevorzugen Wasserstoffperoxid oder andere, kleinere organische bzw. anorganische Peroxide als Substrate, können aber die Peroxide von Membranlipiden nicht reduzieren. Die positive Regulation der Translation der GPx4 mRNA durch GRSF1 spielt besonders in der embryonalen Entwicklung der Maus eine wichtige Rolle.⁷⁹ Ein RNAi-vermittelter knockdown der GRSF1 Expression in sich entwickelnden Mausembryonen führte zu einer Wachstumsverzögerung sowie zu einer abnormen Entwicklung des Rhombencephalon und des Mesencephalon.⁷⁹ Diese beobachteten Veränderungen konnten durch eine Überexpression von GPx4 verhindert werden konnte.⁷⁹ Dabei war ein ähnlicher Phänotyp in sich entwickelnden, GRSF1 knockdown bzw. β -Catenin knockdown Mausembryonen beobachtbar.¹¹⁰ Aus diesen Beobachtungen wurde geschlussfolgert, dass GRSF1, als wichtiges Effektorprotein des Wnt-Signalweges, über seine positive Regulation der GPx4 an der Entwicklung des Phänotyps der β -Catenin knockdown Mausembryonen beteiligt ist.⁷⁹ Des Weiteren konnte in den murinen GRSF1-knockdown Embryonen erhöhte Spiegel an oxidierten Membranlipiden nachgewiesen werden. Auch diese Veränderungen konnten durch eine Überexpression der GPx4 verhindert werden.⁷⁹ Daraus wurde geschlossen, dass GRSF1 durch seine Regulation der GPx4 Expression an wichtigen, antioxidativen Ereignissen der murinen Redoxhomöostase beteiligt ist.⁷⁹

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Gebrauchswaren

Die Standardchemikalien, die zur Herstellung der Puffer und Lösungen verwendet wurden, wurden von den Firmen Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), ICN (Eschwege, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland) oder J.T.Baker (Deventer, Niederlande) bezogen. Alle darüber hinaus verwendeten Chemikalien sind in der Beschreibung der Methoden erwähnt.

3.1.2 Geräte

Gerät	Hersteller
Brutschrank T6120	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Schüttler für Hefen	Infors HT, Einsbach, Deutschland
Brutschrank	Cotech, Berlin, Deutschland
Laminarboxen	Steril S.p.a, Leipzig, Deutschland
MilliQUF Plus	MilliPore, Bedford, USA
Wasserbäder	Haake, Karlsruhe, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Gel-Imager	Biometra, Göttingen, Deutschland
T3 Thermocycler	Biometra, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus Instruments, Hanau, Deutschland
Zentrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein, Zürich
Vortex VX100	Labnet, Edison, USA
Rotor-Gene RG-3000	Corbett Research, Sydney, Australien
BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermostat	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg Deutschland
UNO Thermoblock	Biometra, Göttingen, Deutschland
Vacunsafe comfort	Integra Bioscience, Biebertal, Deutschland
Blot-Kammer	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoreseeinheit	Biometra, Göttingen, Deutschland
Elektrophoreseeinheit PS500XT	Hoefer Scientific, Holliston, USA
Belichtung LAS-1000	Fujifilm, Tokyo, Japan
Schüttler Unimax 2010	Heidolph, Schwabach, Deutschland
PowerPac Basic	BioRad, München, Deutschland
Waage LC620S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Microplaterereader	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland

3.1.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Restriktionsendonukleasen	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
RevertAid Premium Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
SensiMix Sybr	Bioline, Luckenwalde, Deutschland

3.1.4 DNA-Banken und Plasmide

Menschliches fetales Hirn cDNA Expressionsbibliothek (Contech, Palo Alto, USA)

Plasmid	Hersteller
pCR2.1-TOPO (Klonierungsvektor)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

pACT2 Vektor	Clontech, Palo Alto, USA
pGBKT7 Vektor	Clontech, Palo Alto, USA
pCMV Vektor	Clontech, Palo Alto, USA

3.1.5 Bakterien- und Hefestämme sowie Zelllinien

Escherichia (E.) coli	XL1Blue (Stratagene, La Jolla, USA)
Saccharomyces cerevisiae	AH109 (Clontech Laboratories, Mountain View, USA)
Humane Zellen	Humane embryonale Nierenzellen 293 (HEK-293), (American Type Culture Collection, Manassas, USA)
	Humane hepatozelluläre Karzinomzellen G2 (HepG2), (American Type Culture Collection, Manassas, USA)
	Heterogene humane epitheliale kolorektale Adenokarzinomzellen (Caco-2), (American Type Culture Collection, Manassas, USA)

3.1.6 Kommerzielle Kits

Kit	Hersteller
TOPO® TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up Kit	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	Thermoscientific, Dreieich, Deutschland
QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene, La, Jolla, USA
NucleoBond® XtraMidiPlus EF	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
NucleoSpin® Plasmid EasyPure	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland
Western Lightning® Chemiluminescence Reagent	Perkin Elmer, Boston, USA
SensiMix™ SYBR PCR Kit	Bioline, Luckenwalde, Deutschland

QIAquick Gel Extraktionskit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland

3.1.7 Primer für PCR

COMMD1	5' GAATTCGATGGCGGCGGGCGAGCTTGA 3' GTCGACGGGATCATGGACACCTTGGTT
CYC1	5' GAATTCGATGGCGGCAGCTGCGGCTTC 3' GTCGACCAGACACTGGACAGGGTCACTT
DACT1	5' AAGCTTAATGAAGCCGAGTCCGGCCGG 3' GTCGACCACCAATGATGTCACTCAAACCG
DUSP1	5' GAATTCGATCCTCATGGAAGTGGGCACC 3' GGGCCCTTCTCCTCTCAAGGAGCATGGA
EIF1B	5' GAATTCGATGTCCACTATCCAGAACCTCCA 3'CTCGACTTTCACAAGGCAGCCAAACCGG
GLTSCR2	5'GAATTCGATGGCGGCAGGAGGCAGTGG 3'GTCGACTCTGATGGCAGCTACAACCTGGAT
RPL8	5'GAATTCGATGGGCCGTGTGATCCGTGGA 3'GTCGACGGCCCTCAGCACTAGTTCTCTT

3.1.8 Primer für Mutagenese

Δ E1-GRSF1	5' GGGTCCATGGAGGCCGAATTCATGGAGTCCAAA 3' ACTACTTACCTGCAGGTAAGTAGTTTTGGACTCCATGAAT TCGGCCTCCATGGACCC
Δ RRM1-GRSF1	5' AGGTGGATGATGTTTATCTCTTAATGAAGAGCCTGCAGGT 3' ACCTGCAGGCTCTTCATTAAGAGATAAACATCATCCACCT
Δ RRM2-hGRSF1	5' CTGTGCTCAGTGATGGTGTGCATGTTGGATCTCATAAAGG 3' CCTTTATGAGATCCAACATGCACACCATCACTGAGCACAG
Δ RRM3-hGRSF1	5' GCCTTCCCTGCATTAAGTCCACATGAGAGG 3' CCTCTCATGTGGACTTAATGCAGGGAAGGC

3.1.9 Primer für qRT-PCR

GPx4		
GPx4 up	GAG ATG AGC TGG GGC CGT CTG A	
GPx4 do	ACG CAG CCG TTC TTA TCA ATG AGA A	
SOD1		
SOD1 up	AAT TTC GAG CAG AAG GAA AGG AG	
SOD1 do	GTA CAA AGA CAG GAA ACG CTG G	
FHC		
FHC up	CAG AAC TAC CAC CAG GAC TCA G	
FHC do	TTG ACA AGC ACA CCC TGG GA	
ALOX5		
ALOX5 up	TGG ACA AGC CCT TCT ACA ACG AC	
ALOX5 do	CGT CGG TGT TGC TTG AGA ATG TG	
ALOX15		
ALOX15 up	GTC TCC CTG CCC GCC TGG TAT	
ALOX15 do	GCT CCT GGC CCG GAC ATT GAT	
PTGS2		
PTGS2 up	GCA TTC TTT GCC CAG CAC TTC AC	
PTGS2 do	CCA AAG ACC TCC TGC CCC ACA	
iNOS		
iNOS up	AGC TCT TCG AAA TCC CAC CTG AC	
iNOS do	GCC CAT TCT CCT GCC CAC TTC C	
GAPDH		
GAPDH up	CCA TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA	
GAPDH do	GGA TGA CCT TGC CCA CAG CCT TG	

3.1.10 Antikörper

Antikörper	Antigen	Hersteller
anti-GRSF1-AK (gezogen in Kaninchen)	Guanin-reiche Sequenz bindender Faktor 1	Abcam, Cambridge, USA
anti-COMMD1-AK (gezogen in Mäusen)	COMMD1	Abnova, Taiwan

anti-FK2-AK (gezogen in Mäusen)	K29-, K48- und K63-verknüpfte mono- und polyubiquitinylierte Proteine	Enzo, Farmingdale, USA
anti-FLAG-AK (Peroxidase Konjugat)	FLAG Epitop	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
anti-MYC-AK (Peroxidase Konjugat)	MYC Epitop	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
anti-pJNK-AK (gezogen in Mäusen)	Phosphorylierte Jun-amino-terminale Kinase	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
anti-JNK-AK (gezogen in Kaninchen)	Jun-amino-terminale Kinase	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
Anti-GAPDH-AK (gezogen in Mäusen)	Glyceraldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase	Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Deutschland
Anti-Kaninchen IgG (Peroxidase-Konjugat)	Kaninchen IgG	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
Anti-Maus IgG (Peroxidase-Konjugat)	Maus IgG	Sigma, Deisenhofen, Deutschland

3.1.11 Software

Software	Hersteller
Image J	Wayne Rasband, https://imagej.nih.gov/
CorelDrawX8	Corel Corporation, Ottawa, Kanada
Rotor Gene 6000 Series	Corbett Research, Sydney, Australia
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, USA

3.2 Hefemethoden

3.2.1 Kultur der Hefezellen

YPAD (auf 400 ml Endvolumen): 4 g Hefeextrakt; 8 g Pepton; 40 mg Adenin; 2% Glukose; (8g Agar für Agarplatten)

YC (auf 400 ml Endvolumen: 0,48g *Yeast nitrogen base* ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (Invitrogen, Karlsruhe); 2 g Ammoniumsulfat; 4 g Succinsäure; 4 ml 100X *drop out*

100X *drop out* Aminosäuremix (500 ml Endvolumen): 5 g L-Arginin, 5 g L-Cystein; 5 g L-Lysin; 2,5 g L-Isoleucin; 2,5 g L-Methionin; 2,5 g L-Phenylalanin; 2,5 g L-Prolin; 2,5 g L-Serin; 2,5 g L-Tyrosin; 2,5 g L-Valin in MilliQ-Wasser; Autoklavieren

Selektionsmarker / Hitze-labile Aminosäuren: 25X Adenin (A): 2,5 mg/ml Adenin; 100X Leucin (L): 10 mg/ml L-Leucin; 200X Histidin (H): 10 mg/ml L-Histidin; 100X Tryptophan (W): 10 mg/ml L-Tryptophan; 200X Threonin: 20 mg/ml L-Threonin; 50X Aspartat: 2,5 mg/ml L-Aspartat; 20X Uracil: 2 mg/ml Uracil

Hefezellen des AH109 Stammes (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden entweder in Vollmedium (YPAD) oder Minimalmedium (YC) bei 30 °C kultiviert. YC und YPAD wurden auf ein Endvolumen von 400 ml mit MilliQ-Wasser zubereitet und nach dem Autoklavieren Glukose auf eine 2% Endkonzentration zugesetzt. Das YC Medium wurde mit 100X *drop out* Aminosäuremix zubereitet und nach dem Autoklavieren die jeweiligen Selektionsmarker und Hitze-labilen Aminosäuren zusammen mit Glukose (auf eine Konzentration von 2%) hinzugefügt. Für die Zubereitung von Agar wurde vor dem Autoklavieren Agar auf 2% hinzugefügt.

3.2.2 Große Hefe-Transformation

Mit dem folgenden Transformationsprotokoll wurde Plasmid-DNA in Hefezellen eingebracht und damit die Voraussetzungen für den sich anschließenden Hefe-Zwei-Hybrid Screen getroffen.

10 x TE-Puffer: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA

1 x LiAc: 1 M Lithiumacetat, pH 7,5

50% (w/v) Polyethylenglykol

Carrier-ssDNA: Lachs-Testis DNA: 10 ng/µl (Sigma, Deisenhofen, Deutschland)

Dimethylsulfoxid

Aus einer wachsenden Hefekultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,3 wurden für eine Transformation 400 ml abgenommen und bei 30 °C und 180 rpm 4-6 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6-0,8 geschüttelt. Die Zellen wurden bei 1000 g 5 Minuten pelletiert, mit 1 x TE Puffer resuspendiert und erneut bei 1000 g für 5 Minuten pelletiert. Der Resuspension mit 1 x TE-Puffer und 1 x Lithiumacetat folgte eine Inkubation von 15 Minuten bei 30 °C unter leichtem Schütteln. Erneutes

Abzentrifugieren bei 1000 g 5 Minuten und Resuspension in 1 x TE-Puffer und 1 x LiAc, der 50% Polyethylenglycol zu einer Endkonzentration von 33% hinzugefügt wurde. Es wurden 600 µl Carrier-ssDNA aus Lachs Testes auf eine Endkonzentration von 10 µg/µl und 100 µg Plasmid DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde für 30 Minuten bei 30 °C inkubiert, Dimethylsulfoxid (DMSO) auf eine Endkonzentration 1,4% hinzugefügt, anschließend für 30 Minuten auf 42 °C erhitzt und dann 5 Minuten im Eisbad heruntergekühlt. Der Ansatz wurde dann für 5 Minuten bei 2000 g zentrifugiert und in Sorbitol-Vollmedium mit 5 mM CaCl₂ resuspendiert. Danach wurde erneut 30 Minuten bei 30 °C geschüttelt. Anschließend erfolgte ein erneutes Abzentrifugieren bei 1000 g für 5 Minuten, Resuspendieren in 150 mM NaCl Lösung und Ausplattieren auf geeignetem Nährmedium.

3.2.3 Kleine Hefe-Transformation

Das folgende Transformationsprotokoll wurde für kleinere Transformationen in Hefezellen eingesetzt.

Transformationslösung: 400 µl 50% (w/v) Polyethylenglykol (PEG3350)
 50 µl 10 x TE-Puffer
 50 µl 10 x Lithiumacetat

Dabei wurden aus einer wachsenden Hefekultur mit einer OD₆₀₀ von 0,2-0,3 2 ml pro Transformation abgenommen. Die Zellen wurden bei 1000 g 5 Minuten abzentrifugiert, der Überstand verworfen und in 120 µl sterilem MilliQ-Wasser resuspendiert. Zu der Suspension wurden 10 µl Carrier-ssDNA (10µg/µl), 500 µl Transformationslösung und jeweils 1 µl pGBKT7 und pACT2 Plasmid DNA hinzugefügt. Der Ansatz wurde dann 30-60 Sekunden geschüttelt und anschließend bei 30 °C für 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Danach wurde die Suspension bei 42 °C für 15 Minuten im Wasserbad inkubiert und dann direkt auf Eis abgekühlt. Nach einem kurzen scharfen Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet in 100 µl sterilem MilliQ Wasser resuspendiert. Schlussendlich wurde der Ansatz auf YC-LWH+X-α-Gal ausplattiert.

3.2.4 Plasmidpräparation aus Hefen

Aus den Hefekulturen wurden die Plasmide extrahiert, nach Standardprotokoll in kompetente E. coli XL1 blue transformiert und aus diesen erneut Plasmide für weitere Analysen präpariert.

Lysepuffer: 50 mM Tris-HCl, pH 8,0; 100 mM NaCl; 50 mM EDTA; 5% Triton X-100; 8% Saccharose

Die Hefekultur wurde über Nacht in Vollmedium ohne Leucin bei 30 °C und 200 rpm geschüttelt. Aus dieser wurde 2,5 ml abgenommen und 3 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Pellet in 100 µl Lysepuffer resuspendiert, 200 mg in Säure gewaschene Glasperlen hinzugefügt und 5 Minuten kräftig geschüttelt. Der Ansatz wurde nach Zugabe von 100 µl Lysepuffer für 3 Minuten auf 95 °C erhitzt, kurz im Eisbad heruntergekühlt und dann bei 20 000 g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Eppendorf Röhrchen überführt und die DNA wurde mit 200 µl Ethanol ausgefällt. Durch erneutes Zentrifugieren für 10 Minuten unter den gleichen Bedingungen setzte sich die DNA ab, die dann, unter Zugabe von 70% Ethanol gefolgt von erneutem Zentrifugieren, gewaschen wurde. Der Überstand wurde abgenommen, das DNA-Pellet an der Luft getrocknet, anschließend in 20 µl Wasser resuspendiert und für eine Transformation nach Standardprotokoll in *E. coli* XL1 Blue verwendet.

3.2.5 β -Galaktosidase Assay

Z-Puffer: 50mM Na₂HPO₄; 25mM NaH₂PO₄; 10 mM KCl; 1 mM MgSO₄, pH 7,0; 0,27% β -Mercaptoethanol; 334 µg/ml X-gal

Für den β -Galaktosidase Assay, den *Colony Lift Filter Assay*, wurden mit Hilfe eines Stempels Hefekolonien auf Agarplatten mit entsprechendem Selektionsmedium ausplattiert und 2-4 Tage bei 30 °C inkubiert. Anschließend wurden die Hefekolonien auf Filterpapier übertragen, in flüssigem Stickstoff für 10 Sekunden gefroren, mit Z-Puffer benetzt und für 8 Stunden bei 30 °C inkubiert.

3.2.6 Hefe-Zwei-Hybrid System

Das Hefe Zwei-Hybrid System ist eine Methode zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen. Der hierfür verwendete Hefestamm AH109 ist für Tryptophan, Leucin, Histidin und Adenin auxotroph. Das bedeutet, dass Zellen dieses Stamms auf Medien, welchen diese Aminosäuren bzw. Nukleinbasen fehlen, nicht wachsen können. Das Prinzip des Hefe-Zwei-Hybrid Systems ist in Abbildung 7 erklärt. Bei diesem System findet eine Interaktion zwischen zwei Hybrid- bzw. Fusionsproteinen statt. Hybrid 1, das als *bait* (Köder) fungiert, ist in den hier beschriebenen Experimenten ein Fusionsprotein aus $\Delta E1$ -GRSF1 und der *GAL4-binding domain* (BD). Bei der GAL4-BD handelt es sich um die DNA-Bindedomäne des Transkriptionsfaktors GAL4. Im Hybrid 2, welches auch als *prey* (Beute) bezeichnet wird, wurde die *GAL4-activating domain* (GAL4-AD) dieses Transkriptionsfaktors mit cDNAs einer cDNA-Bibliothek fusioniert. Kommt es zu einer Interaktion zwischen den beiden Hybrid-Proteinen, komplementieren sich die GAL4-AD und GAL4-BD an cis-regulatorischen Elementen im Genom der Hefezellen. Diese spezifischen Elemente, die *upstream activating sequences* (UAS), liegen im Promotorbereich verschiedener **Reportergene** (*ADE2*, *HIS3*, *MEL1* und *LacZ*). Bindet der aus GAL4-AD und -BD zusammengesetzte Transkriptionsfaktor an die DNA, kommt es zu einer Aktivierung der Expression der *downstream* gelegenen Reportergene. Das ***ADE2***-Reportergen kodiert für die Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, die in der *de novo*-Synthese von Purinen benötigt wird und dadurch eine Adenin-Prototrophie vermittelt. Wird das *ADE2* Reportergen nicht aktiviert, akkumuliert rotes Pigment in den Hefezellen. Das ***HIS3***-Gen kodiert für die

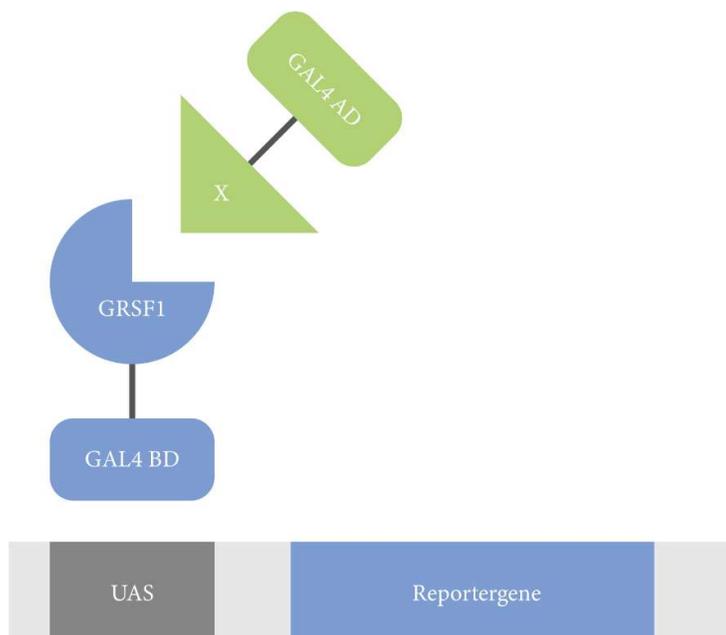


Abbildung 7: Vereinfachtes Schema des Hefe-2-Hybrid-Systems. In Blau dargestellt ist der erste Hybrid. GRSF1 ist mit der GAL4-bindenden Domäne fusioniert. Diese bindet an die Upstream Activating Sequence (UAS) auf dem Hefechromosom. Kommt es zu einer Interaktion mit einem Protein X, das mit der GAL4-aktivierenden Domäne fusioniert ist (in Gelb dargestellt), resultiert dies in einer Aktivierung der Reportergene *ADE2*, *HIS 3*, *Mel1* und *LacZ* auf dem Hefegenom.

Imidazolglycerolphosphatdehydratase. Diese synthetisiert den sechsten Schritt der Histidin-Biosynthese und vermittelt hierdurch eine Histidin-Prototrophie. Die, durch das *MEL1* bzw. *LacZ* Gen kodierte, α - bzw. β -Galaktosidase kann, durch Spalten entsprechender glykosidischer Bindungen in ihren chromogenen Substraten, zu einer makroskopisch sichtbaren Verfärbung der Hefe-Kolonien führen. In Gegenwart von X- α -Gal bzw. X-Gal verfärben sich die Hefekolonien aufgrund der Enzymaktivität der MEL1- bzw. LacZ-Genprodukte blau.

Für das erste Hybrid wurde $\Delta E1$ -GRSF1 in den pGBKT7-Vektor kloniert. Dabei wurde $\Delta E1$ -GRSF1 so in den pGBKT7-Vektor eingepasst, dass es am N-Terminus mit einem Teil des Hefe Transkriptionsfaktors GAL4, der GAL4-bindenden Domäne (GAL4 BD), hybridisiert. Auf dem pGBKT7-Vektor liegt außerdem das TRP1 Gen vor, das für die Phosphoribosylanthranilat Isomerase kodiert. Diese katalysiert den dritten Schritt in der Biosynthese von Tryptophan und vermittelt so eine Tryptophanprototrophie. Das erste Hybrid wurde mittels einer großen Hefe-Transformation in den Hefestamm eingeführt und die Transformanten anschließend auf Tryptophan-Mangelmedium ausplattiert und so auf die Anwesenheit des Hybrids 1 selektiert.

Ist nur eines der beiden Hybride vorhanden, kommt es normalerweise zu keiner Aktivierung der Reportergene. Allerdings kann es, durch unspezifische Interaktion von Proteinen der Hefezelle mit dem UAS-Element bzw. dem Hybrid 1, zu einer sogenannten Hintergrundaktivierung der Reportergene und damit falschpositiven Ergebnissen kommen. Bei der unspezifischen Aktivierung des HIS3-Reportergens durch die GAL4 BD führt dies zu einem schwachen Wachstum der Hefen aus Histidin-Mangelmedium. Um diese sogenannte Hintergrundaktivierung der Reportergene zu quantifizieren wurde eine *3-Aminotriazol (3-AT) -Titration* vorgenommen. 3-AT ist ein kompetitiver Hemmstoff des His3p, das durch Aktivierung des HIS3 Reportergens in Hefen hergestellt wird. Hefen mit pGBKT7 Plasmid wurden auf Vollmedium ohne Tryptophan und Histidin mit steigenden 3-AT Konzentrationen (0, 1, 2, 5, 15, 25 mM) ausplattiert und für 7 Tage bei 30 °C inkubiert. Für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde eine 3-AT Konzentration gewählt, bei der nach 7 Tagen keine signifikante Anzahl an Klonen gewachsen war.

Nach der Wahl der 3-AT Konzentration für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde das zweite Hybridprotein mittels einer großen Hefetransformation eingeführt. Der zweite Hybrid besteht aus cDNA, die am N-Terminus an die aktivierende Domäne (AD) des GAL4 Hefe Transkriptionsfaktors gebunden ist. Die kommerziell erworbene cDNA wurde aus menschlichem fetalem Hirn gewonnen. Der pACT2 Vektor enthält außerdem das LEU2 Gen, das für die β -Isopropylmalat Dehydrogenase kodiert. Nach der zweiten Hefe-Transformation wurde der Ansatz auf Vollmedium ohne Histidin, Leucin, Adenin mit 25 mM 3-AT und X- α -Gal ausplattiert und der Hefe-2-Hybrid Screen nach Protein-Protein Interaktionen durchgeführt.

Eine weitere Quelle falsch positiver Klone ist die unspezifische Aktivierung der Reportergene durch ein Binden des Hybrids 2 am Promotor der Reportergene. Um zwischen einer Reportergenaktivierung durch spezifische Protein-Protein-Interaktion oder durch Autoaktivierung zu unterscheiden, wurden die aus dem Hefe-2-Hybrid Screen ausgewählten Hefeklone auf Medium kultiviert, das Leucin-defizient war und damit auf die Anwesenheit des zweiten Hybrids selektiert. Zusätzlich enthielt das Medium Tryptophan, wodurch ein Selektionsdruck auf die Anwesenheit des Hybrids 1 vermieden wurde. Plasmide, auf die kein Selektionsdruck ausgeübt wird, gehen mit einer Wahrscheinlichkeit von 10-20% pro Generation verloren. Daher wurden die selektierten Hefekolonien für einige Generationen unter diesen Bedingungen kultiviert, sodass ein großer Teil der Hefezellen das Hybrid 1 verloren.

3.3 Zellmethoden

3.3.1 Kultur von HEK-293, Caco-2, HepG2 Zellen

Kulturmedium: HEK-293: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) (PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland) mit 10% fetalem Kalbserum (FKS)
Caco-2: Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) (Lonza, Walkersville, USA) mit 10% FKS
HepG2: EMEM (Lonza, Walkersville, USA) mit 10% FKS

Alle Zellreihen wurden in den von den Herstellern empfohlenen Kulturmedien bei 37 °C unter 5% Kohlenstoffdioxid und 95% Luft und Wasserdampfsättigung inkubiert. Für die Passage wurde bei präkonfluenten Zellen das Medium abgenommen und die Zellen mit steriler Phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Anschließend wurde 2 ml Trypsin-EDTA auf die Zellen gegeben und diese bis zum Ablösen von der Plastikoberfläche bei 37 °C inkubiert. Das Enzym Trypsin wurde durch die Zugabe von 10 ml des jeweiligen Kulturmediums ausverdünnt und das Zellgemisch in einer Verdünnung von 1:10 – 1:20 erneut ausgesät. Das Neubauer-Hämozytometer wurde für Zellzählungen benutzt.

3.3.2 Knockout von GRSF1 in Caco-2 Zellen mit CRISPR/Cas9

Für den knockout von GRSF1 in Caco-2 Zellen wurde auf <https://chopchop.rc.fas.harvard.edu> eine Guide-RNA mit der Sequenz CGGGGCCAATTCATACTCAGGGG für den Plusstrang des Exon 2 auf Chromosom 4 gesucht und anschließend in einen pGuide-Vektor der Firma Takara kloniert. Dieser wurde mittels Xfect (Takara) in Caco-2 Zellen, die in EMEM kultiviert wurden, transfiziert.

Die Caco-2 Zellen wurden für 2 Tage inkubiert und dann auf eine Zelle pro Well in einer 96-Well-Platte vereinzelt. Durch SDS-PAGE/Westernblot wurde anschließend auf die Anwesenheit von GRSF1 getestet und der beste GRSF1 Knockoutklon ausgewählt. Hieraus wurde die genomische DNA isoliert, der GRSF1 Lokus mittels PCR amplifiziert, das PCR Produkt in den pCR2.1 Vektor kloniert und dann mittels einer Transfektion in *E. coli* transformiert. Anschließend wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des NucleoSpin® Plasmid EasyPure Kits extrahiert und sequenziert.

3.3.3 Transfektion von pCMV-Plasmiden in HEK-293, Caco-2, HepG2 Zellen

Die pCMV-Plasmide wurden mittels LT1 Transfektionsreagenz transfiziert. Dafür wurden 400.000 Zellen in 1 ml Kulturmedium in einer 6-Well-Platte (8,87 cm² pro Well) ausgesät und 24 h inkubiert. In einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden 100 µl OptiMEM Medium mit 0,5 bis 2 µg DNA leicht gemischt und anschließend 0,15 – 0,6 µl LT1 Reagenz hinzugefügt und erneut gemischt. Der Ansatz wurde 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und wurde dann auf die Zellen gegeben.

3.3.4 Transfektion von siRNA in HepG2 und Caco-2 Zellen

COMMD1 siRNA (5' CUU GAC UGC UCA AAC CCA AAtt, 3' UUU GGU UUG AGC AGU CAA Gaa, Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) wurde mittels Xfect siRNA Transfection Reagent (Takara, Clontech) transfiziert. Dafür wurden 500.000 Zellen in 1 ml Kulturmedium in einer 6 Well (8,87 cm² pro Well) Platte ausgesät und 24 h inkubiert. In zwei sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäßen wurden jeweils 80 µl Transfektionsreagenz vorgelegt. In das erste Reagenzgefäß wurde 0,3 – 0,9 µl siRNA in der angegebenen Menge hinzugefügt, in das zweite 4 – 12 µl Transfektionspolymer. Beide Ansätze wurden jeweils für 5 Sekunden kräftig gevortext und anschließend zusammengeführt, dann erneut 10 Sekunden gevortext und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde dann auf die Zellen gegeben.

3.3.5 Zellernte

Die Zellernte erfolgte 24 oder 48 Stunden nach Transfektion. Hierfür wurde das Kulturmedium abgenommen und durch 1 ml PBS ersetzt. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und bei 1000 rpm 5 Minuten durch Zentrifugation pelletiert. Nach erneutem Waschen mit PBS und Zentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Die Zellpellets wurden bis zur weiteren Verwertung bei -20 °C gelagert.

3.3.6 Zellyse

NT2 Puffer: 50mM Tris-HCl (1 M, pH 7.4), 150mM NaCl (5 M), 1mM MgCl₂ (1 M), 0,05% Nonidet P-40 (NP-40; 10%) in H₂O

Die Lyse der Zellpellets erfolgte im Eisbad. Dabei wurde die Größe der Zellpellets geschätzt und diesem für eine Lyse eine 4-fache Menge an NT2 Puffer plus Proteaseinhibitoren im Verhältnis 1:100 hinzugefügt. Der Ansatz wurde 10 Minuten unter regelmäßigem Schütteln der Proben inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 °C mit 15.000 g für 15 Minuten. Hierbei setzten sich Zelltrümmer am Boden ab, sodass der abgenommene Überstand das Zelllysate enthielt. Die Proteinkonzentration in den gewonnenen Zelllysaten wurde nach Bradford (1976) photometrisch bestimmt.

3.3.7 DCFH-DA Assay

Das 2',7'-Dichlorofluoresceindiacetat (DCFH-DA) Assay ist eine Methode zur Messung der intrazellulären Konzentration an reactive oxygen species (ROS). DCFH-DA diffundiert durch die Zellmembran und wird intrazellulär durch Esterasen zu nicht fluoreszierendem DCFH hydrolysiert. In der Anwesenheit von ROS wird DCFH dann zu stark fluoreszierendem Dichlorofluorescein (DCF) oxidiert. Die Menge an entstehendem DCF ist direkt proportional zur intrazellulären Menge an ROS und kann mittels Microplatereader gemessen werden.

Für den DCFH-DA Assay wurden Caco-2 Zellen gezählt und pro Versuch 20.000 Zellen verwendet. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und mit DCFH-DA 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden sie erneut gewaschen, um überschüssiges DCFH-DA zu entfernen, in Medium resuspendiert und anschließend auf eine schwarze 96-Well-Platte aufgetragen. Die vom Microplatereader gemessene Extinktion lag bei 480 nm, die Emission bei 530 nm. Als Negativkontrolle diente eine Probe ohne DCFH-DA.

3.4 Molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden, Nukleinsäurepräparation, Agarose-Gelelektrophorese, Gelextraktion, Klonierung (Anhängen von Adenosin-Überhängen am 3' Ende des PCR Produktes, Zwischenklonierung in pCR2.1-TOPO-Vektor, Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Ligation, Transformation) erfolgten entsprechend der Protokolle, die durch die Hersteller bereitgestellt wurden.

3.4.1 Polymerasekettenreaktion

Als Vorbereitung für die MYC-Co-Immunopräzipitation musste die DNA der jeweiligen Proteine mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) amplifiziert und in einen pCR2.1 TOPO-Vektor inkloniert werden. Aus dem pCR2.1 TOPO-Vektor wurde die DNA anschließend herausgeschnitten und so mit einem pCMV Vektor ligiert, dass ein MYC-markiertes Protein exprimiert wurde.

Für die PCR wurden die in 3.1.7 angegebenen Primer verwendet und wie folgt durchgeführt: Es wurden 4 µl PrimeSTAR GXL Puffer, 1,6 µl dNTPs, 1,2 µl up und do (je 5µM) Primer, 0,4 µl PrimeSTAR GXL Polymerase und 10,6 µl Wasser angesetzt, als Template diente 1µl HeLa cDNA. Dabei wurde folgendes Protokoll benutzt:

Vordenaturierung:	95 °C	20 Sekunden	
PCR-Zyklen (35 Wiederholungen)			
	98 °C	20 Sekunden	(Denaturierung)
	60 °C	20 Sekunden	(Anlagerung)
	68 °C	3 Minuten	(Verlängerung)
Verlängerung:	68 °C	3 Minuten	

3.4.2 Mutagenese

Um die Relevanz der verschiedenen GRSF1 Domänen in der Protein Protein Interaktion zu studieren, wurde mittels Mutagenese Expressionsvektoren, die die verschiedenen Proteinfragmente kodierten, hergestellt. Dafür wurde das QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent, Santa Clause, USA) und die unter 3.1.8 aufgeführten Primer genutzt. Als Template wurde der Vektor, der für das vollständige FLAG markierte GRSF1 kodiert, genutzt. Dieser wurde dann nach Herstellerangaben mittels beschriebener Primer amplifiziert. Anschließend wurde mittels *Dpn I* Endonuklease das Template zerstört und der mutierte Primer in kompetente *E. coli* transformiert. So entstanden 4 Proteinfragmente: Δ E1-GRSF1 (Aminosäuren 111-480), Δ RRM1-GRSF1 (Aminosäuren 1-151 sowie 235-480), Δ RRM2-GRSF1 (Aminosäuren 1-251 sowie 235-480) und Δ RRM3-GRSF1 (Aminosäuren 1-402).

3.4.3 MYC-Co-Immunopräzipitation

Die MYC-Co-Immunopräzipitation diente dem Nachweis der im Hefe-Zwei-Hybrid Screen entdeckten Interaktionspartner von GRSF1. Dafür wurden in HEK-293 Zellen FLAG-markiertes

GRSF1 und MYC-markierte Interaktionspartner aus dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen (COMMD1, RPL8, DUSP1, DACT1, CYC1, GLTSCR2) exprimiert. Die Lysate wurden mit anti-MYC magnetischen Kugeln inkubiert und mit Hilfe von, in einem Magnetfeld fixierten, Säulen das an die jeweiligen Proteine gebundene GRSF1 gereinigt und anschließend eluiert.

HEK-293 Zellen wurden in einer Dichte von 400.000 Zellen in einer 6 Well Platte ausgesät und über Nacht inkubiert. Die Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Bradford-Nachweises gemessen und 80 µg Protein als Input abgenommen. Das restliche Lysat wurde auf ein Endvolumen von 1 ml mit NT2 Puffer aufgefüllt und mit 40 µl anti-MYC *beads* unter gleichmäßigem Drehen für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Diese Mischung wurde dann mithilfe von magnetischen Säulen, *µ columns*, der Firma Miltenyi Biotech nach Herstellerangaben gereinigt. Die Eluate, wie auch die Inputs wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Western Blot unter Verwendung von anti-FLAG und anti-MYC Antikörpern analysiert. Zur Klärung, ob eine RNA vermittelte Proteininteraktion vorlag, wurde nach einem Protokoll von Landthaler et al.¹³⁸ vor der Co-Immunopräzipitation die Lysate aufgeteilt und eines mit RNase T1 (Thermo Fisher Scientific, Darmstadt, Germany) für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

3.4.4 Co-Immunopräzipitation mit Protein G Dynabeads

Bei dieser Form der Co-Immunopräzipitation wurden Antikörper gegen COMMD1 an magnetische Kugeln, sogenannte *Protein G Dynabeads* gebunden. Die Antikörper binden dann an COMMD1 im hinzugefügten Zelllysate, sodass nach mehreren Waschschritten und Kochen der Proben mittels SDS-PAGE und Western Blot an COMMD1 gebundenes GRSF1 erkannt werden kann. Andererseits wurde diese Methode auch zur Immunopräzipitation von GRSF1 und konsekutivem Nachweis von, an GRSF1 angehängte, Ubiquitinketten verwendet.

PBS-Tween: 450 ml steriles H₂O, 50 ml PBS, 1,5 ml Tween

2X SDS Ladungspuffer: 100 mM Tris-Cl (pH 6.8), 4% Natriumlaurylsulfat (SDS);
0.2% Bromphenolblau; 20% Glycerol; 200 mM Dithiothreitol (DTT)

Für die Co-Immunopräzipitation wurden HepG2 Zellen in 10 cm Zellschalen ausgesät und wie oben beschrieben 48 Stunden inkubiert, geerntet und lysiert. Im Lysatüberstand wurde die Proteinkonzentration bestimmt. Aus dem Lysatüberstand wurden 100 µg Protein als Input abgenommen. Für die Co-Immunopräzipitation wurden etwa 10 mg Protein eingesetzt.

Für die GRSF1-Immunopräzipitation wurden HepG2 Zellen in einer 6-Well-Schale mit einer Konzentration von 500.000 Zellen pro ml ausgesät. In je 2 Wells wurden HepG2 Zellen mit 1) pCMV, 2) pCMV COMMD1, 3) siKontrollRNA oder 4) siCOMMD1 RNA transfiziert. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen geerntet, lysiert und die Proteinkonzentration bestimmt. Bei der Zellyse wurde zum NT2 Puffer zusätzlich der Deubiquitinaseinhibitor TEM in einem Verhältnis von 1:100 hinzugefügt. Es wurden jeweils 80 µg Protein für Inputs abgenommen und ungefähr 1 mg Protein pro Immunopräzipitation eingesetzt.

Parallel dazu wurden Protein G Dynabeads mit Antikörper gekoppelt. Diese wurden zunächst mit 200 µl PBS-Tween gewaschen. Für die Co-Immunopräzipitation wurden dann 50 µl *Protein G Dynabeads* mit 5 µg murinem IgG bzw. 5 µg anti-COMMD1 Antikörper für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Immunopräzipitation von GRSF1 wurden stattdessen 5 µg anti-GRSF1 Antikörper eingesetzt. Die restlichen Schritte der Co-Immunopräzipitation und Immunopräzipitation waren die Gleichen. Nach der Kopplung der *Dynabeads* mit Antikörpern wurden diese 2x mit 200 µl PBS-Tween gewaschen, jedem Ansatz das Lysat hinzugefügt und die Proben drehend 4h bei 4 °C inkubiert. Danach wurden die Proben dreimal mit 200 µl NT2 Puffer gewaschen, 50 µl 2X SDS Ladungspuffer hinzugefügt und 5 Minuten bei 95 °C gekocht. Der Überstand, das Eluat, wurde im Magnetständer abgenommen und noch einmal 3 Minuten bei 95 °C gekocht. Die Auswertung der Co-Immunopräzipitation erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot und unter Verwendung eines anti-GRSF1 (eigene Herstellung) bzw. anti-COMMD1 Antikörpers. Auch die Auswertung der Immunopräzipitation erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot unter Verwendung der indizierten anti-GRSF1-, anti-COMMD1- und anti-FK2-Antikörper.

3.4.5 Differentielle Zentrifugation

Um die Konzentration von GRSF1 in den unterschiedlichen Zellkompartimenten von Wildtyp und siCOMMD1 knockdown HepG2 Zellen nachzuweisen, wurde eine differentielle Zentrifugation durchgeführt. Mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation konnten die Zellysate über einen mehrschrittigen Prozess in eine nukleäre, zytoplasmatische und mitochondriale Fraktion aufgeteilt werden.

Mitochondrien-Isolationspuffer: 3,5 ml 70mM Sucrose, 5,25 ml 210 mM Mannitol, 125 µl 5mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure), 14,8 ml H₂O

Für die differentielle Zentrifugation wurden HepG2 Zellen mit siCOMMD1 RNA bzw. mit einem Leervektor siControl RNA transfiziert für 24 h inkubiert und geerntet. Anschließend wurde das Medium abgenommen, mit frischem Medium, das 250 µg/ml Cycloheximid enthielt, ersetzt und für 20 min bei 37° C inkubiert. Danach wurden die Zellen zwei Mal mit PBS gewaschen und 1/20 der Zellen für das Gesamtzelllysat abgenommen. Die restlichen Zellen wurden in Mitochondrien-Isolationspuffer (MIB), dem Cycloheximid auf eine Konzentration von 200 µg/ml und Protein Inhibitor Mix (PIM) hinzugefügt war, resuspendiert. Das Gemisch wurde anschließend in einen Dounce-Homogenisator transferiert, homogenisiert und auf 0° C gekühlt. Mittels Zentrifugation bei 900 g für 5 min wurde die nukleäre Fraktion von der mitochondrialen und zytoplasmatischen Fraktion abgetrennt. Der Überstand, also die mitochondriale und zytoplasmatische Fraktion, wurde in ein neues Eppendorf überführt. Durch mehrfaches Zentrifugieren bei 900 g für 5 min wurde die mitochondriale und zytoplasmatische Fraktion weiter von der nukleären Fraktion getrennt. Das Pellet, die nukleäre Fraktion, wurde in 1 ml MIB und 0,5%igem Rinderalbumin resuspendiert und anschließend durch mehrfaches Zentrifugieren bei 900 g für 5 min und darauffolgendem Resuspendieren in MIB und 0,5%igem Rinderalbumin von der zytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktion gereinigt. Die zytoplasmatische und mitochondriale Fraktion wurde hiernach bei 9000 g für 10 min zentrifugiert und der Überstand, die zytoplasmatische Fraktion, abgenommen. Das Pellet, die mitochondriale Fraktion, wurde vorsichtig in 1ml MIB resuspendiert und durch mehrfaches Zentrifugieren bei 10000 g für 10 min und anschließendem Resuspendieren in 1ml MIB, weiter von der zytoplasmatischen Fraktion gereinigt. Nach der letzten Zentrifugation der mitochondrialen Fraktion wurde der Überstand abgenommen und das trockene Pellet bei -80° C aufbewahrt. Die nukleäre und zytoplasmatische Fraktion wurden bei -20° C aufbewahrt. Die Auswertung der differentiellen Zentrifugation erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot unter Verwendung der indizierten anti-GRSF1-, anti-COMMD1-, anti-GAPDH und NDUFB8-Antikörper.

3.4.6 RNA-Isolation und Reverse Transkription

Um die Höhe der RNA-Level wichtiger antioxidativer und prooxidativer Proteine in GRSF1 Wildtyp und knockout Caco-2 Zellen zu messen wurde aus diesen RNA isoliert und die mRNA mittels reverser Transkription zu cDNA umgeschrieben.

Caco-2 Wildtyp GRSF1 knockout Zellen wurden für 24 Stunden inkubiert und geerntet. Die anschließende Isolation der RNA erfolgte mittels eines RNA-Isolationskits der Firma Macherey und Nagel und wurde nach einem Protokoll der Hersteller durchgeführt. Die Konzentration der isolierten RNA wurde anschließend photometrisch bestimmt.

Für die reverse Transkription wurden zwischen 0,5 und 1 µg RNA verwendet. Diese Menge wurde in einem sterilen Reaktionsgefäß mit Wasser auf ein Endvolumen von 10 µl gebracht. Jedem Ansatz wurden je 1 µl dNTPs (je 10 mM) und OligoT18 (0,5 µg/µl) hinzugefügt und der Ansatz für 5 Minuten bei 65 °C denaturiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis inkubiert. Jedem Ansatz wurden dann 4 µl 5 X Puffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), 1 µl Premium Reverse Transkriptase und 3 µl H₂O hinzugefügt, leicht gemischt und für 60 Minuten bei 50 °C inkubiert. Beim anschließenden 5-minütigen Erhitzen der Proben auf 85 °C wurde das Enzym inaktiviert, die cDNA wurde anschließend bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

3.4.7 Quantitative Echtzeit-PCR

Bei der quantitativen Echtzeit-PCR (qRT-PCR) handelt es sich um eine Amplifikation von DNA, die in Realzeit verfolgt werden kann. Dazu wird dem Amplifizierungsansatz ein mit doppelsträngiger DNA interkalierender fluoreszierender Farbstoff hinzugefügt und nach jedem Zyklus die Fluoreszenz gemessen.

Alle qRT-PCR wurden unter Verwendung des Rotor-Gene 3000 und des SensiMix SYBR PCR Kit durchgeführt. Für die PCR wurde das SYBR Green Kit verwendet, jeder Ansatz enthielt 5 µl 2 X Sybr Green Reaktionsmix, 3 µl Wasser, 0,4 µl Primermix (je 5 mM) und 1 µl *template*. In jedem Lauf wurden außerdem Ansätze ohne *template* als Negativkontrollen mitgeführt, um eventuelle Kontaminationen mit *template*-DNA nachzuweisen. Folgendes Programm diente zur Amplifizierung der DNA:

Vordenaturierung:	95 °C	15 Minuten
	94 °C	1 Minuten
	65 °C	1 Minuten
	72 °C	1 Minuten und Fluoreszenzmessung
PCR-Zyklen (45 Wiederholungen)		
	60 °C	1 Minuten
	60 – 99 °C in 1 °C-Schritten	
Schmelzkurve:	je Schritt 5 Sekunden warten und Fluoreszenzmessung	

Im letzten Schritt der PCR wurde eine Schmelzkurve aufgezeichnet. Dafür wurden die Proben von 60 auf 95 °C langsam erhitzt und die Fluoreszenz detektiert. Die daraus resultierende Schmelzkurve, setzt sich aus der ersten Ableitung der Fluoreszenz, aufgetragen gegen die

Temperatur zusammen und sollte bei der Amplifikation eines spezifischen DNA-Fragments deshalb nur ein Maximum besitzen.

3.4.8 Herstellung vom externen Amplifizierungsstandards

Um die Amplifizierungsreaktion exakt quantifizieren zu können, wurden den PCR-Ansätzen bekannte Mengen an Amplifizierungsstandards zugesetzt. Für die Herstellung von Amplifizierungsstandards wurde mit den gewünschten PCR-Fragmenten und jeweiligen Primer-Kombinationen eine Polymerasekettenreaktion durchgeführt. Die Produkte wurden dann auf 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechende DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten und mittels des QiaQuick Gelextraktionskit gereinigt, in einen pCR2.1 TOPO Vektor kloniert und sequenziert. Aus dem pCR2.1 Vektor wurde das PCR Fragment rausgeschnitten und mittels des Qiaquick PCR Purification Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Konzentration der DNA wurde anschließend gemessen und nach der folgenden Formel, in der M das Molgewicht doppelsträngiger DNA darstellt und N die Avogadro-Konstante, die Anzahl der doppelsträngigen DNA-Moleküle berechnet: Anhand dieser Formel konnten dann Standardverdünnungen (10^7 bis 10^2) des jeweilig zu amplifizierenden Produkts hergestellt werden.

3.4.9 Auswertung

Für die Auswertung der erhaltenen Daten wurde die Rotor-Gene 6000 Software (Version 1.7) verwendet. Die Software errechnet einen Schwellenwert (Ct), bei der das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal signifikant übersteigt. Dabei dienen die gemessenen Ct von 6 Standardverdünnungen (10^7 bis 10^2) des jeweilig zu amplifizierenden Produkts als Orientierungspunkte zur Berechnung der absoluten Menge an amplifizierter DNA in der Probe. Als Bezugsgen diente die GAPDH, die in allen Zellen als sog. *housekeeping gene* ähnlich hoch exprimiert wird. Zur statistischen Absicherung wurden mindestens drei Läufe durchgeführt.

3.4.10 SDS-Gelelektrophorese und Westernblot

Lämmli Puffer:	900ml H ₂ O; 100ml SDS
Amaresco Puffer:	720ml H ₂ O; 80ml 10 x Amaresco
PBS-Tween:	450 ml H ₂ O; 50 ml 10 x PBS; 1,5 ml Tween
Magermilch:	2,5 g Trockenmilch; 50 ml 1x PBS

Für eine SDS-Gelelektrophorese wurden 80 µg Protein mit 1 x Ladungspuffer 5 Minuten bei 95 °C denaturiert. Unter Verwendung einer Elektrophoreseeinheit wurden die Proteine bei 200 V 25 Minuten in einem 10%igen Acrylamidgel aufgetrennt. Das hierbei verwendete Puffersystem

bestand aus Amaresco und Lämmli Puffer. Der Western Blot erfolgte mit Hilfe einer Blot-Kammer, in der die Proteine mit 2,5 mA/cm² nach dem folgenden Aufbauschema auf eine Nitrocellulosemembran übertragen wurden:

Kathode

Schwamm

Filterpapier in Puffer getränkt

Gel

Nitrocellulose in Puffer getränkt

Filterpapier in Puffer getränkt

Schwamm

Anode

Die Nitrocellulosemembran wurde dann für 30 Sekunden in Ponceau geschwenkt, so dass die geblotteten Proteine sichtbar wurden. Anschließend wurde die Membran mit Magermilch 1 Stunde blockiert. Das Inkubieren mit dem primären Antikörper erfolgte bei 8 °C über Nacht. Nach intensivem Waschen mit PBS-Tween wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper für 1 h inkubiert und hiernach erneut intensiv gewaschen. Die Chemiluminiszenzsignale wurden unter Verwendung von Western Lightning Reagenz durch den *Image Analyzer* detektiert. Als Kontrolle diente GAPDH. Die densitometrische Auswertung der Western Blots erfolgte unter Verwendung der ImageJ Software.

3.4.11 Sequenzanalyse

Alle Sequenzierungen wurden von der Firma MWG Biotech durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzen wurden mittels des DNA Alignment Tools analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Hefe-Zwei-Hybrid Screen

Beim Hefe-Zwei-Hybrid-Screen handelt es sich um einen Siebtest zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen. Wir entschieden uns für die Verwendung eines GRSF1 Proteinfragmentes, dem die N-terminale Alanin reiche Domäne fehlte ($\Delta E1$ -GRSF1). Dies rührte daher, dass sich in vorangegangenen Experimenten unserer Gruppe zeigte, dass Hefezellen das vollständige GRSF1 Protein schlecht exprimieren. Dabei diente in meinen Experimenten der $\Delta E1$ -GRSF1 Hybrid als „Köder“ und eine cDNA Bibliothek aus fetalem Hirn als „Beute“. Kommt es zu einer Interaktion der beiden Hybriden werden verschiedene Reportergene aktiviert. Um die Aktivierung der Reportergene durch den GRSF1 Hybriden in Abwesenheit des zweiten Hybriden zu quantifizieren wurde eine **3-AT-Titration** durchgeführt. In Anwesenheit von 25 mM 3-AT waren nach 7 Tagen keine Hefekolonien sichtbar. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass diese 3-AT Konzentration ausreichend war, um die Hintergrundaktivierung des HIS3-Reportergens zu unterdrücken. Für den Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurde dann der pACT2 Vektor, der für das Beutehybridprotein kodiert, in die Hefezellen transformiert. Die so generierten mehr als 10^8 Transformanten wurden dann auf die **Aktivierung der Reportergene** untersucht. So wurden 2208 3-AT resistente, blau gefärbte Hefeklone für die weitere Analyse identifiziert. Diese zeigten in dem anschließend durchgeführten *Colony Lift Filter Assay* eine gleichmäßige Aktivierung des LacZ Reportergens.

Eine weitere Quelle falsch positiver Klone ist die unspezifische Aktivierung der Reportergene durch ein Binden des zweiten Hybrids am Promotor der Reportergene, der *upstream activating sequence* (UAS). Diese kann einerseits durch direkte Bindung entstehen und andererseits auch durch Wechselwirkungen des Hefeproteoms mit der UAS und dem Hybrid 1 vermittelt werden. Solche Wechselwirkungen sind unabhängig vom ersten Hybrid und repräsentieren damit keine spezifische Wechselwirkung zwischen Hybrid 1 und Hybrid 2. Man spricht daher von unspezifischen Autoaktivierungen. Um zwischen einer Reportergenaktivierung durch spezifische Protein-Protein-Interaktion und einer unspezifischen Autoaktivierung zu unterscheiden, wurde die in 4.1 beschriebene Kultivierungsstrategie durchgeführt. Anschließend wurde mittels **Colony Lift Filter Assays** auf die Aktivierung des LacZ Reportergens getestet. Die Hefeklone bei denen in Abwesenheit des „Köderhybrids“ das LacZ Reportergen aktiviert war, wurden verworfen. 120 der 2208 Klone waren nicht mehr in der Lage, das LacZ-Reportergen zu aktivieren. Diese **120 Hefeklone** wurden für die weiteren Analysen verwendet.

4.1.1 Sequenzanalysen der im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen ermittelten Klone

Da eine direkte Analyse der Plasmide in Hefezellen nicht möglich ist, wurde die aus Hefe-Klonen präparierte Plasmid-DNA in *E. coli* amplifiziert, gereinigt und sequenziert. Zur initialen Identifikation von Duplikaten wurde auch ein Kontrollverdau mit Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Die Sequenzdaten wurden dann mittels einer *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Analyse mit bekannten Einträgen in cDNA-Datenbanken verglichen. Dabei konnten 29 verschiedene cDNAs identifiziert werden (siehe *Tabelle 1*). Neben dem Namen des entsprechenden Proteins, der Genbezeichnung und der Accession Nummer ist in *Tabelle 1* außerdem eine stichwortartige Zusammenfassung der biologischen Funktion des Proteins enthalten. Diese Informationen wurden aus der Gen-Ontologie Datenbank (www.geneontology.org) extrahiert. In dieser Datenbank sind alle bisher identifizierten Gene mit ihrer zellulären Funktion zusammengefasst. Mit Hilfe des Panther Algorithmus lässt sich diese Datenbank durchsuchen und feststellen, ob in einer Liste mit Genen bestimmte biologische Prozesse überrepräsentiert sind. Dabei zeigte sich, dass die Funktion *Regulation der zellulären Lokalisation* (VPS11, DACT1, PIN1, PRNP, NUP93, NUP153, FYN, RAB3A, COMMD1) siebenfach angereichert war ($p=0,018$). Diese ist definiert als jeder Prozess, der die Frequenz, Rate oder Ausmaß eines Prozesses moduliert, bei dem eine Zelle, Substanz oder zelluläre Entität transportiert wird oder an einem bestimmten Ort in oder innerhalb der Zellmembran gehalten wird (aus <http://amigo.geneontology.org/amigo/term/GO:0060341>).

Name	Gen	Accession Nummer	Biologische Funktion
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase MIA-interacting 1</i>	PIN1	NM_006221	Mitoseregulation
<i>Dapper homolog 1</i>	DACT1	NM_152516	Regulation des Wnt Signalweges
<i>Vacuolar protein sorting-associated protein 11 homolog</i>	VPS11	NM_021729	Protein trafficking
<i>Major prion protein</i>	PRNP	AI110643	Primäre physiologische Funktion unbekannt
<i>COMM domain-containing protein 1</i>	COMMD1	NM_152516	Kupfer Ionen Homöostase, positiver Regulator der Protein Ubiquitinylierung
<i>Tyrosin-Protein Kinase Fyn</i>	FYN	AA862466	Reguliert Zellwachstum und -überleben, Zelladhäsion, Immunantwort etc.
<i>Ras-related Protein 3A</i>	RAB3A	BE258857	Reguliert die Exozytose von synaptischen Vesikeln

4 Ergebnisse

<i>Nuclear pore complex protein Nup153</i>	NUP153	AB210024	Teil des nukleären Porenkomplexes
<i>Nuclear pore complex protein Nup93</i>	NUP93	BC034346	Spielt eine Rolle in der Bildung und Aufrechterhaltung des nukleären Porenkomplexes
<i>Eukaryotic translation initiation factor 1B</i>	EIF1B	NM_005875	Translationsinitiation
<i>Microtubule associated protein 6</i>	MAP6	BM174944	Stabilisierung der Mikrotubuli
<i>Neurogenic differentiation factor 2</i>	NEUROD2	NM_006160	Transkriptionsregulation
<i>60S ribosomales Protein L8</i>	RPL8	NM_000973	Teil der großen Untereinheit des Ribosom
<i>Dual specificity protein phosphatase 1</i>	DUSP1	NM_004417	Phosphatase, die MAPK1/ERK2 dephosphoryliert
<i>Ubiquitin-protein Ligase E3C</i>	UBE3C	NM_014671	Protein Polyubiquitinierung
<i>E3 Ubiquitin-Protein Ligase</i>	RING1	NM_002931	Protein Monoubiquitylierung
<i>Farnesyltransferase</i>	FNTA	NM_002027	Transfer von Farnesyl auf Cystein
<i>Cannabinoid Receptor interacting Protein 1</i>	CNRIP1	BC011535	Interagiert mit dem Cannabinoid Rezeptor CNR1
<i>Cytochrome c1</i>	CYC1	BM845478	Atmungskette, akzeptiert Elektronen
<i>Zinc Finger Protein 3</i>	ZNF3	BC025265	Transkriptionsfaktor
<i>Transcription initiation factor IIe subunit beta</i>	GTF2E2	NM_002095	Transkriptionsinitiation
<i>Fatty Acid Desaturase 2</i>	FADS2	NM_004265.3	Katalysiert die Biosynthese von hoch ungesättigten Fettsäuren
<i>Btb/POZ domain-containing protein 6</i>	BTBD6	NM_033271	Adapterprotein der CUL3 E3 Ubiquitin-Protein Ligase Komplex
<i>Transcriptionfactor HIVEP3</i>	HIVEP3	DB547857	Transkriptionsfaktor
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase</i>	PPIA	AK293003	Beschleunigt die Faltung von Proteinen
<i>Inositol-3-phosphat Synthase 1</i>	ISYNA1	BC066902	Schlüsselenzym des Myoinositol Biosynthese Stoffwechselweges
<i>Genetic suppressor element 1</i>	GSE1	BX957079	Nichts bekannt
<i>Ancient ubiquitous protein 1</i>	AUP1	CA443628	Spielt eine Rolle im retrograden Transport von fehlgefalteten Proteinen vom ER ins Zytoplasma
<i>ERO1-like protein alpha</i>	ERO1L	NM_014584	Oxidoreduktase, die an der Formation von Disulfidbrücken im ER beteiligt ist.
<i>Host cell factor 2</i>	HCFC2	NM_013320	Zellzykluskontrolle
<i>Ribosome Biogenesis Protein 2</i>	GLTSCR2	NM_015710	Ribosomenbiogenese

Tabelle 1: Liste der im Hefe-Zwei-Hybrid Screen identifizierten Interaktionspartner von GRSF1. Es wurde ein Hefe-Zwei-Hybrid Screen in Hefen des AH109 Stammes durchgeführt. Dafür wurde $\Delta E1$ -GRSF1 mit der Galactosidase 4 binding domain fusioniert und als „Köder“ verwendet. Als „Beute“ diente ein Hybrid aus cDNA, die aus menschlichem fetalem Hirn gewonnen wurde und der Galactosidase 4 activating domain. „Beute“ und „Köder“ wurden in den Hefestamm mittels Transformation eingeführt und die Hefetransformanten wurden auf YC-LWH Agar ausplattiert, der 25 mM 3-Aminotriazol und X- α -Gal enthielt. Anschließend wurden die Klone auf die Aktivierung der Reportergene, HIS3, MEL1, ADE2 selektioniert. Die selektionierten Klone wurden dann auf YC-L ausplattiert, zwei Wochen inkubiert und anschließend die Aktivität des LacZ Reportergens mittels Placiftassay getestet. Alle Hefeklone, die das LacZ Reportergen noch aktivierten, wurden verworfen. Aus den restlichen Hefeklonen wurde die Plasmid DNA isoliert, in *E. coli* transformiert und amplifiziert. Nach der Plasmidpräparation erfolgte zunächst eine Analyse der Plasmide mittels Restriktionsendonukleasen. Anschließend wurden die Plasmide von MWG Biotech sequenziert. Eine BLAST Suche ergab die in dieser Tabelle dargestellten Ergebnisse.

Zusammenfassung: Durch Kontrollverdau der Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen sowie anschließender Sequenzierung und BLAST Analyse konnten 29 verschiedene cDNAs identifiziert werden. Diese cDNAs sollten für Proteine kodieren, die spezifisch mit GRSF1 interagieren. Um Informationen zur biologischen Rolle der identifizierten Proteine zu erhalten, wurde die Gen-Ontologie Datenbank (www.geneontology.org) mit Hilfe des Panther Algorithmus durchsucht. Bei dieser Suche ergab sich, dass die biologische Funktion „Regulation der zellulären Lokalisation“ überrepräsentiert war.

4.1.2 Testung der Spezifität der Protein-Protein-Interaktionen im Hefemodell

Mit dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen werden, wegen der oben beschriebenen Autoaktivierung der Reportergene, häufig falsch positive Ergebnisse generiert. Um diese falsch positiven Ergebnisse auszuschließen, wurden „Köder- und Beutehybride“ mit Kontrollen transformiert und die Reportergenaktivierung verglichen. So konnte im Hefemodell die Spezifität der Bindung zwischen dem $\Delta E1$ -GRSF1 enthaltenden „Köderhybrid“ und den neu ermittelten Interaktionspartnern ermittelt werden.

Dabei wurde als Selektionsmedium wie auch beim Hefe-Zwei-Hybrid Screen YC-LWH + X- α -Gal + 25 mM 3-AT gewählt. Dadurch wurde auf die Anwesenheit der beiden Plasmide, pACT2 und pGBKT7, selektioniert und auf die Aktivierung der ADE2, HIS3 und MEL1 Reportergene getestet. Für die **Positivkontrolle** wurden, die aus dem Hefe-Zwei-Hybrid-Screen isolierten, DNA-Plasmide, die pACT2-Vektoren, mittels einer kleinen Transformation zusammen mit dem $\Delta E1$ -GRSF1 Plasmid in AH109 transfiziert. Um eine mögliche **Autoaktivierung** der Reportergene durch die *Beutehybriden* bewerten zu können, wurden die aus dem Hefe-Zwei-Hybrid Screen isolierten, pACT2-Plasmide mit einem pGBKT7-Leervektor transfiziert. Für die Bewertung der **Autoaktivierung** der Reportergene durch den *Köderhybriden* wurde der pGBKT7 Vektor zusammen mit dem pACT2-Leervektor transfiziert. Als **Negativkontrolle** wurde ein pACT2-Leervektor mit einem pGBKT7-Leervektor transfiziert. Durch den Vergleich dieser vier Ansätze konnte auf die Spezifität der Protein-Protein Interaktion geschlossen werden. Dabei sollte die Positivkontrolle eine starke Aktivierung der Reportergene und durch die MEL1 Aktivierung sichtbare bläulich grüne Verfärbung der Hefekolonie zeigen. Die Ansätze, die die Autoaktivierung der Reportergene enthielten, sollten im Verhältnis ein geringeres Wachstum sowie keine bläuliche,

sondern, durch die fehlende Aktivierung des ADE2 Reportergens, rötliche Verfärbung zeigen. Kam es dabei in einem der Autoaktivierungsansätzen zu einer ähnlich starken Aktivierung der Reportergene wie in der Positivkontrolle, wurde von einer unspezifischen Protein-Protein Interaktion ausgegangen. Die Negativkontrolle sollte eine Nulllinie der Reportergenaktivierung zeigen, hier wurde durch die fehlende Aktivierung des HIS3 und ADE2 Reportergens ein sehr schwaches Wachstum sowie eine rötliche Verfärbung erwartet.

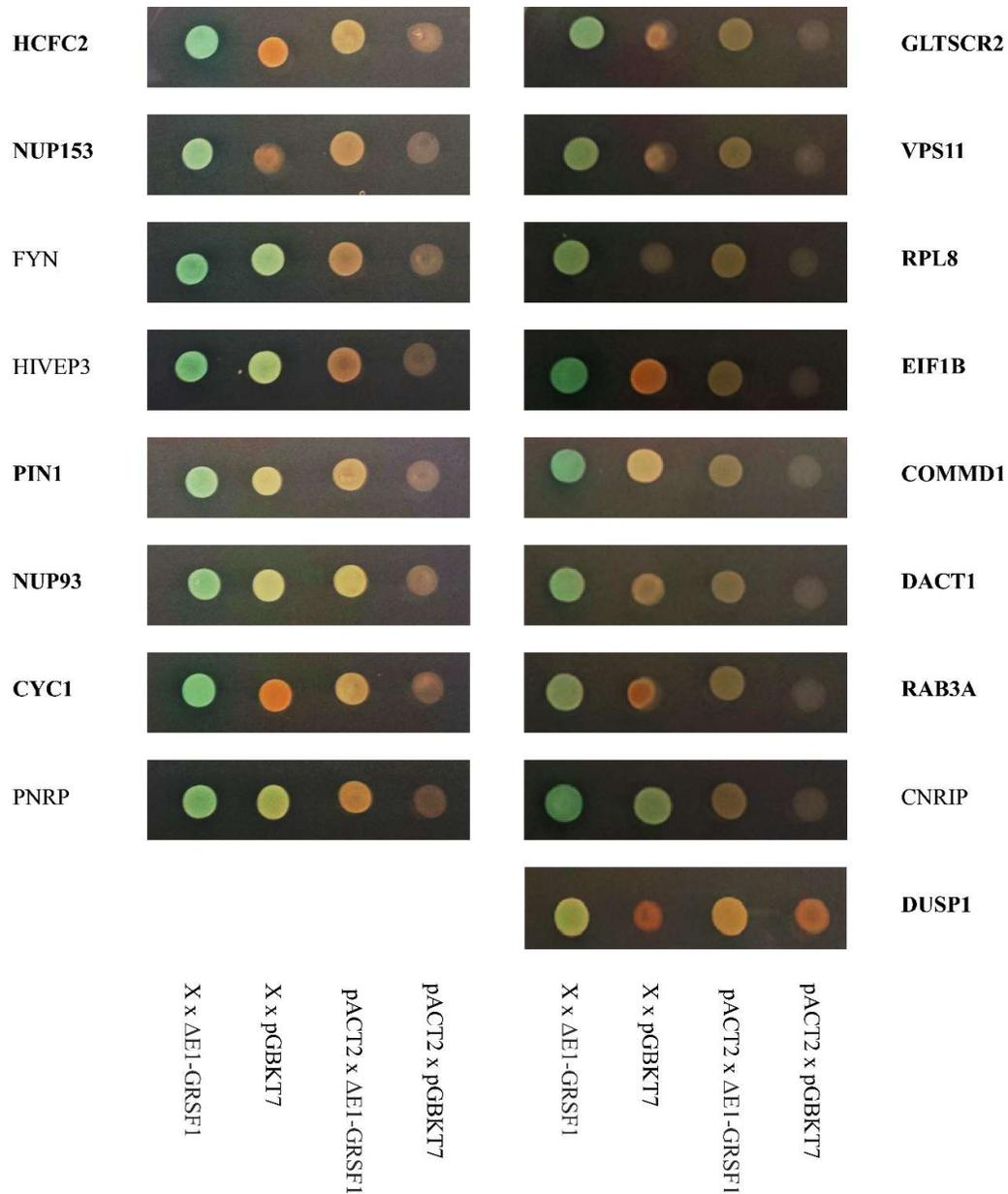


Abbildung 8: Spezifität der Protein-Protein Interaktion im Hefemodell. Im Hefe-Zwei-Hybrid Screen wurden neue Interaktionspartner von $\Delta E1$ -GRSF1 gefunden. Diese stehen in der linken bzw. rechten äußeren Spalte und sind unten als X markiert. Diese wurden entweder mit $\Delta E1$ -GRSF1 oder mit dem pGBKT7-Leervektor transfiziert (jeweils die beiden linken Spalten). Außerdem wurde der pACT2-Leervektor entweder mit $\Delta E1$ -GRSF1 oder dem pGBKT7-Leervektor transfiziert (jeweils die beiden rechten Spalten). Anschließend wurde die Aktivierung der Reportergene phänotypisch verglichen (s. Text). Die Plasmide wurden mittels einer kleinen Transformation in Hefe transformiert und jeweils 10 μ l auf YC-LWH+25mM 3-AT+X- α -Gal ausplattiert. In fetter Schrift sind alle spezifischen Protein-Protein Interaktionen dargestellt.

Die **Negativkontrollen** (siehe Abbildung 8), die durch die Transfektion der pACT2- und pGBKT7-Leervektoren in die Hefezelle erzeugt wurden, zeigten in allen Versuchen ein sehr schwaches Wachstum und keinerlei Aktivierung der Reportergene. Bei der Transfektion des *Köderhybrids* mit dem pACT2-Leervektor (siehe Abbildung 8) zeigte sich überall ein mäßiges Wachstum. Dies sprach für eine leichte Aktivierung des HIS3 Reportergens. Das ADE2 Reportergen wurde wenig

bis gar nicht aktiviert. Hier kam es zu einer leichten Rotfärbung der Klone. Das MEL1 Reporter-gen wurde nicht aktiviert, es kam zu keiner Blaufärbung der Klone.

Zusammen mit dem pGBKT7-Leervektor aktivierte das *HCFC2*-Hybrid nur das HIS3 Reporter-gen (siehe Abbildung 8). Dies konnte durch das mäßig starke Wachstum des Hefeklons festgestellt werden. Das ADE2 Reporter-gen wurde nicht aktiviert, was an der Akkumulation des rotem Farbpigmentes ersichtlich war. Eine Blaufärbung war nicht sichtbar, woraus geschlossen werden konnte, dass auch das MEL1 Reporter-gen nicht aktiviert wurde. Im Gegensatz dazu kam es bei der Co-Transfektion des HCFC2-Hybrids mit dem Δ E1-GRSF1-Hybrid zu einem starken Wachstum, was für die Aktivierung der HIS3 und ADE2 Reporter-gene sprach. Auch das MEL1 Reporter-gen wurde aktiviert, es kam zu einer sichtbaren Blaufärbung des Hefeklons. Zusammengenommen sprachen diese Ergebnisse für eine *spezifische Interaktion* zwischen dem HCFC2-Hybrid und dem Δ E1-GRSF1-Hybrid.

NUP153 aktivierte in Anwesenheit des pGBKT7-Leervektors keine Reporter-gene (siehe Abbildung 8). Es kam zu einem sehr schwachen Wachstum und zu einer sichtbaren Rotfärbung des Hefeklons, was gegen eine Aktivierung der HIS3 und ADE2 Reporter-gene sprach. Eine Blaufärbung, die auf eine Aktivierung des MEL1 Reporter-gens hindeutete, konnte nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu kam es in Anwesenheit des Δ E1-GRSF1-Hybriden zu einer starken Blaufärbung des Klons, woraus auf eine Aktivierung des MEL1 Reporter-gens geschlossen wurde. Auch die HIS3 und ADE2 Reporter-gene wurden aktiviert, es kam zu einem sehr viel stärkeren Wachstum auf Histidin und Adenin defizientem Nährmedium. So konnte im Hefemodell von einer *spezifischen Interaktion* zwischen dem Δ E1-GRSF1-Hybrid und dem NUP153-Hybrid ausgegangen werden.

Bei der Co-Transfektion von *FYN* und dem pGBKT7-Leervektor, kam es zu einer Aktivierung des HIS3 und ADE2 Reporter-gens, was am starken Wachstum auf Histidin und Adenin defizientem Nährmedium festgestellt werden konnte (siehe Abbildung 8). Auch das MEL1 Reporter-gen wurde aktiviert, es kam zu einer sichtbaren Blaufärbung des Klons. In Anwesenheit des Δ E1-GRSF1-Hybriden kam es zu einer ähnlich starken Aktivierung der HIS3, ADE2 und MEL1 Reporter-gene. Zusammengenommen sprachen diese Ergebnisse für eine *unspezifische Interaktion*.

HIVEP3 aktivierte in Anwesenheit des pGBKT7-Leervektors die Reporter-gene ähnlich stark wie in Anwesenheit des Δ E1-GRSF1-Hybrids (siehe Abbildung 8). Bei beiden Klonen kam es zu Wachstum auf Histidin und Adenin defizientem Nährmedium, was für eine Aktivierung der HIS3 und ADE2 Reporter-gene sprach. Auch das MEL1 Reporter-gen wurde ähnlich stark aktiviert, es kam bei beiden Klonen zu einer sichtbaren Blaufärbung. Aus diesen Resultaten konnte auf eine

unspezifische Interaktion des HIVEP3-Hybrids mit dem $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid geschlossen werden.

Bei *PIN1* (siehe Abbildung 8) kam es in Anwesenheit des pGBKT7-Leervektors zu einer Aktivierung des HIS3 und ADE2 Reportergens. Darauf konnte aus dem Wachstum des Hefeklons auf Histidin- und Adenin-defizienten Nährböden geschlossen werden. Das MEL1 Reportergen wurde nicht aktiviert, die Hefeklonen verfärbten sich nicht blau. Im Gegensatz dazu wurde das MEL1 Reportergen in Anwesenheit des $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrids aktiviert. Der Hefeklon färbte sich blau und es kam zu einem Wachstum auf Histidin- und Adenin-defizienten Nährböden. Diese Ergebnisse deuteten auf eine Aktivierung der HIS3 und ADE2 Reportergene hin. Insgesamt sprach ein solches Verhalten für eine *spezifische Interaktion* von PIN1- und $\Delta E1$ -GRSF1-Hybriden.

Bei der Co-Transfektion des *NUP93*-Hybriden mit dem pGBKT7-Leervektor kam es zu einer Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reportergene (siehe Abbildung 8). Darauf konnte durch das Wachstum der Hefetransformanten auf Histidin-defizientem Nährboden und der fehlenden Akkumulation von rotem Farbpigment geschlossen werden. Das MEL1 Reportergen wurde hingegen nicht aktiviert. Bei der Co-Transfektion des NUP93-Hybrids mit dem $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid wurde diese Reportergen hingegen aktiviert. Hier kam es zu einer sichtbaren Blaufärbung des Hefeklons. Auch die ADE2 und HIS3 Reportergene wurden aktiviert, es kam zu einem Wachstum auf Histidin- und Adenin-defizienten Nährböden. Zusammengefasst sprachen diese Ergebnisse für eine *spezifische Interaktion* von NUP93 mit dem $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid.

Zusammen mit dem pGBKT7-Leervektor aktivierte *CYC1* nur das HIS3 Reportergen (siehe Abbildung 8). Dies konnte durch das Wachstum des Hefeklons auf Histidin-defizienten Nährböden festgestellt werden. Das ADE2 Reportergen wurde jedoch nicht aktiviert, es kam zu einer sichtbaren Akkumulation von rotem Farbpigment. Auch das MEL1-Reportergen wurde nicht aktiviert, da es zu keiner sichtbaren Blaufärbung kam. Im Gegensatz dazu kam es bei der Co-Transfektion des CYC1-Hybrids mit dem $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid zu einem starken Wachstum, was für die Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reportergene sprach. Auch das MEL1 Reportergen wurde aktiviert, es kam zu einer sichtbaren Blaufärbung der Hefetransformante. Zusammengefasst sprachen diese Beobachtungen für eine *spezifische Interaktion* des CYC1-Hybrids mit dem $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid.

Bei der Co-Transfektion von *PRNP* und dem pGBKT7-Leervektor, kam es zu einer Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reportergene, was aus dem starken Wachstum der Hefetransformante auf Histidin- und Adenin-defizientem Nährböden geschlossen werden konnte (siehe Abbildung 8). Auch das MEL1 Reportergen wurde aktiviert, es kam zu einer sichtbaren Blaufärbung des Klons. In Anwesenheit des $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrids kam es zu einer ähnlich starken Aktivierung der

HIS3-, ADE2- und MEL1-Reporter gene. Zusammengenommen sprachen diese Ergebnisse für eine *unspezifische Interaktion* der beiden Hybridproteine.

Bei Transfektion des *GLTSCR*-Hybrids mit dem pGBKT7-Leervektor zeigte sich ein sehr schwaches Wachstum auf Histidin-defizientem Nährboden, was darauf hindeutete, dass es nicht zu einer Aktivierung des HIS3 Reportergens kam (siehe Abbildung 8). Auch das ADE2 Reportergen wurde nicht aktiviert, die Hefeklonen verfärbten sich rot. Es konnte keine Blaufärbung festgestellt werden, was gegen eine Aktivierung des MEL1-Reportergens sprach. Im Vergleich dazu kam es bei der Co-Transfektion des *GLTSCR*-Hybrids und des Δ E1-GRSF1-Hybrid zu einer starken Aktivierung des MEL1-Reportergens, was an der Blaufärbung des Hefeklons sichtbar wurde. Durch das stärkere Wachstum der Positivkontrolle konnte auf die Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reporter gene geschlossen werden. Im Hefemodell handelt es sich dementsprechend um eine *spezifische Interaktion* des *GLTSCR*-Hybridproteins mit dem Δ E1-GRSF1-Hybrid.

In Anwesenheit des pGBKT7-Leervektors aktivierte das *VPS11*-Hybridprotein keine Reporter gene (siehe Abbildung 8). Zum einen kam es zu einem sehr schwachen Wachstum, was gegen eine Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reporter gene sprach. Zum anderen konnte keine Blaufärbung der Hefetransfektanten detektiert werden, was gegen eine Aktivierung des MEL1-Reportergens sprach. Im Vergleich dazu kam es in Anwesenheit des Δ E1-GRSF1-Hybridproteins zu einem starken Wachstum der Hefetransformante. Dies sprach für eine Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reporter gene. Durch die Blaufärbung des Klons konnte auf eine Aktivierung des MEL1 Reportergens geschlossen werden. Somit konnte von einer *spezifischen Interaktion* im Hefemodell ausgegangen werden.

RPL8 aktivierte in Anwesenheit des pGBKT7-Leervektors keine Reporter gene (siehe Abbildung 8). Es kam zu einem sehr schwachen Wachstum, was gegen eine Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reporter gene sprach. Eine Blaufärbung der Hefetransformanten (Aktivierung des MEL1-Reportergens) konnte nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu kam es in Anwesenheit des Δ E1-GRSF1-Hybrids zu einer starken Blaufärbung der, woraus auf eine Aktivierung des MEL1-Reportergens geschlossen werden konnte. Auch die HIS3- und ADE2-Reporter gene wurden aktiviert (starkes Wachstum auf Histidin- und Adenin-defizientem Nährmedium). So konnte im Hefemodell von einer *spezifischen Interaktion* zwischen dem Δ E1-GRSF1-Hybrid und dem *RPL8*-Hybrid ausgegangen werden.

Zusammen mit dem pGBKT7-Leervektor aktiviert das *EIF1B*-Hybridprotein das HIS3-Reportergen (siehe Abbildung 8). Es kam zu einem Wachstum des Hefeklons auf Histidin-defizientem Nährmedium. Das ADE2-Reportergen wurde jedoch nicht aktiviert, da keine sichtbare Akkumulation von rotem Farbpigment beobachtet werden konnte. Das MEL1 Reportergen wurde

nicht aktiviert, denn es kam zu keiner sichtbaren Blaufärbung. Im Vergleich dazu kam es in Anwesenheit des $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrids zu einer starken Aktivierung der MEL1,-ADE2- und HIS3-Reporter gene. Durch die Aktivierung dieser Reporter gene in Anwesenheit des $\Delta E1$ -GRSF1-Hybriden konnte auf eine *spezifische Interaktion* der Hybridproteine geschlossen werden.

In Anwesenheit des pGBKT7-Leervektors aktivierte das **COMMD1**-Hybridprotein das HIS3- und ADE2-Reporter gen (siehe Abbildung 8). Es kam dementsprechend zu einem relativ starken Wachstum der Hefetransformante. Außerdem akkumulierte kein rotes Farbpigment intrazellulär, womit auf eine Aktivierung des ADE2-Reporter gens geschlossen werden konnte. Das Reporter gen MEL1 wurde jedoch nicht aktiviert (keine sichtbaren Blaufärbung des Hefeklons). Im Gegensatz dazu färbte sich der Hefeklon, der das COMMD1-Hybrid und $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid exprimierte blau. Aus diesen Ergebnissen kann auf eine Aktivierung des MEL1-Reporter gens geschlossen werden. Auch die Reporter gene HIS3 und ADE2 wurden aktiviert, was aus dem starken Wachstum der Hefetransformante auf Histidin- und Adenin-defizienten Nährböden ablesbar war. Zusammengefasst sprachen diese Ergebnisse für eine *spezifische Interaktion* der beiden Hybridproteine.

Zusammen mit dem pGBKT7-Leervektor aktivierte **DUSP1** nur das HIS3 Reporter gen (siehe Abbildung 8). Dies konnte durch das Wachstum des Hefeklons auf Histidin-defizienten Nährböden festgestellt werden. Das ADE2 Reporter gen wurde nicht aktiviert, es kam zu einer sichtbaren Akkumulation von rotem Farbpigment. Auch das MEL1-Reporter gen wurde nicht aktiviert, da es zu keiner sichtbaren Blaufärbung kam. Im Gegensatz dazu kam es bei der Co-Transfektion des DUSP1-Hybrids mit dem $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid zu einem starken Wachstum, was für die Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reporter gene sprach. Auch das MEL1 Reporter gen wurde aktiviert, es kam zu einer sichtbaren Blaufärbung der Hefetransformante. Zusammengefasst sprachen dies für eine *spezifische Interaktion* des DUSP1-Hybrids mit dem $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrid.

DACT1 aktivierte in Anwesenheit des pGBKT7-Leervektors keine Reporter gene (siehe Abbildung 8). Wir beobachteten ein schwaches Wachstum der Hefetransformante und dieses Ergebnis sprach gegen eine Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reporter gen. Eine Blaufärbung des Hefeklons, die eine Aktivierung des MEL1 Reporter gens angezeigt hätte, konnte nicht detektiert werden. Im Gegensatz dazu kam es in Anwesenheit des $\Delta E1$ -GRSF1-Hybrids zu einer starken Blaufärbung des Hefeklons, woraus auf eine Aktivierung des MEL1-Reporter gens geschlossen werden konnte. Auch die HIS3- und ADE2-Reporter gene wurden aktiviert, was sich am stärkeren Wachstum des Hefeklons zeigte. So konnte im Hefemodell von einer *spezifischen Interaktion* zwischen dem $\Delta E1$ -GRSF1- und dem DACT1-Hybridproteinen ausgegangen werden.

Eine Co-Transfektion des **RAB3A**-Hybrids mit dem pGBKT7-Leervektor (siehe Abbildung 8) zeigte ein sehr schwaches Wachstum (keine Aktivierung des HIS3-Reportergens). Auch das ADE2-Reportergen wurde nicht aktiviert, denn der Hefeklon verfärbte sich rot. Da auch keine Blaufärbung des Hefeklons detektiert werden konnte, kam es nicht zu einer Aktivierung des MEL1 Reportergens. Im Vergleich dazu kam es bei der Transfektion des RAB3A-Hybrids mit dem Δ E1-GRSF1-Hybrid zu einer starken Aktivierung des MEL1-Reportergens, was sich aus der Blaufärbung des Hefeklons ergab. Durch das stärkere Wachstum der Positivkontrolle konnte auf die Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reportergene geschlossen werden. Im Hefemodell handelt es sich dementsprechend um eine *spezifische Interaktion* des RAB3A-Hybridproteins mit dem Δ E1-GRSF1-Hybrid.

Bei der Co-Transfektion von **CNR1P1** und dem pGBKT7-Leervektor (siehe Abbildung 8) kam es zu einer Aktivierung der HIS3- und ADE2-Reportergene (starkes Wachstum auf Histidin- und Adenin- defizienten Nährböden). Auch das MEL1 Reportergen wurde aktiviert (sichtbare Blaufärbung der Hefetransformante). Auch in Anwesenheit des Δ E1-GRSF1-Hybrid kam es zur Aktivierung der HIS3-, ADE2- und MEL1-Reportergene. Das Wachstum der beiden Hefeklone war, wie auch die Blaufärbung, ähnlich stark ausgeprägt. Daher sprachen diese Ergebnisse für eine *unspezifische Protein-Protein Interaktion*.

Zusammenfassung: Um die Spezifität der im Screeningsystem identifizierten, potenziellen Interaktionsproteine mit GRSF1 zu testen, wurden die Phänotypen der Hefeklone analysiert, die im Siebttest eine positive Reaktion gezeigt hatten. Dabei zeigte sich eine spezifische Interaktion von Δ E1-GRSF1 mit den Hybridproteinen von HCFC2, NUP 153, PIN1, NUP93, CYC1, GLTSCR, VPS11, RPL8, EIF1B, COMMD1, DACT1 und RAB3A.

4.2 Bestätigung der Protein-Protein-Interaktion in HEK-293 Zellen

Durch den Hefe-Zwei-Hybrid-Screen konnten potenzielle neue Interaktionspartner von Δ E1-GRSF1 entdeckt und deren spezifische Interaktion mit dem Δ E1-GRSF1 Hybridprotein im Hefemodell nachgewiesen werden. Bei dieser Methode werden rekombinante humane Hybridomproteine in Hefezellen exprimiert. Obwohl es sich bei Hefen um eukaryotische Organismen handelt, können sich die im Hefesystem exprimierten, rekombinanten Proteine von den in menschlichen Zellen vorkommenden Proteinen strukturell geringfügig unterscheiden. Damit kann ein im Hefesystem erzeugtes, rekombinantes Hybridomprotein sich vom in menschlichen Zellen exprimierten Nativprotein funktionell unterscheiden. Diese Unterschiede können Quellen falsch positiver, aber auch falsch negativer Ergebnisse sein. So sind beispielsweise die Mechanismen der Proteinfaltung von Hefezellen zum Teil anders als die von

Säugetierzellen.¹³⁹ Dadurch kann es zu einer Fehlfaltung der rekombinanten Hybridproteine kommen, was zu falschen negativen Schlussfolgerungen führen würde. Andererseits ist es möglich, dass durch partielle Fehlfaltung des Hybridomproteins zufällig eine GRSF1 bindende Struktur entsteht, was ein falsch positives Ergebnis vortäuscht. Daher ist es notwendig, die spezifischen Protein-Protein-Interaktionen in einem Säugetiermodell zu bestätigen.

Um die Protein-Protein-Interaktionen der im Hefesystem identifizierten Proteine in Säugetierzellen zu bestätigen, wurde eine *Co-Immunopräzipitation* durchgeführt. Bei der Co-Immunopräzipitation handelt es sich um ein Standardverfahren zum Nachweis von Protein-Protein Interaktionen. Da es sich bei GRSF1 um ein RNA-bindendes Protein handelt, ist hier jedoch eine weitere Quelle für falsch positive Ergebnisse zu berücksichtigen: Proteine, die an die gleiche RNA

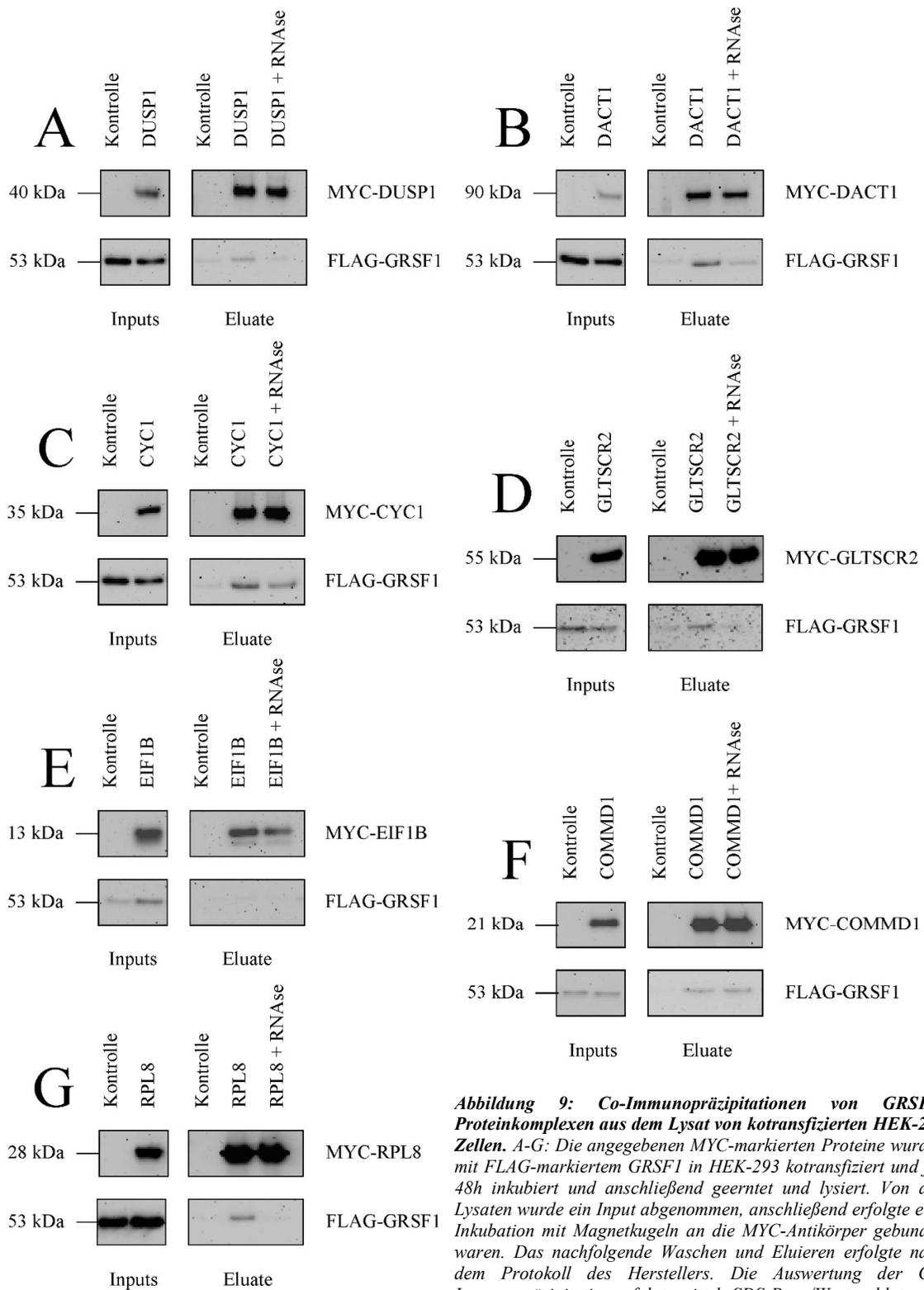


Abbildung 9: Co-Immunopräzipitationen von GRSF1-Proteinkomplexen aus dem Lysat von kotransfizierten HEK-293 Zellen. A-G: Die angegebenen MYC-markierten Proteine wurden mit FLAG-markiertem GRSF1 in HEK-293 kotransfiziert und für 48h inkubiert und anschließend geerntet und lysiert. Von den Lysaten wurde ein Input abgenommen, anschließend erfolgte eine Inkubation mit Magnetkugeln an die MYC-Antikörper gebunden waren. Das nachfolgende Waschen und Eluieren erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers. Die Auswertung der Co-Immunopräzipitation erfolgte mittels SDS-Page/Westernblot.

wie GRSF1 binden, können fälschlicherweise als direkte Interaktionspartner von GRSF1 identifiziert werden. Um diese RNA-abhängige, unspezifische Bindung auszuschließen, wurden die Zelllysate mit *RNAse* (RNA abbauendes Enzym), behandelt und anschließend präzipitiert. Durch den Vergleich dieser Ergebnisse konnte zwischen einer RNA-vermittelten und einer spezifischen Protein-Protein Interaktion unterschieden werden. Sämtliche Co-Immunpräzipitationen wurden in humanen embryonalen Nierenzellen (*HEK-293*) durchgeführt, eine humane Zelllinie, die leicht kultivierbar ist und effektiv transfiziert werden kann.

Für die Co-Immunpräzipitation wurden potentiell interessante Interaktionspartner selektioniert: Einerseits RPL8, eIF1B und GLTSCR2 als ribosomale oder mit dem Ribosomen assoziierte Proteine, um eventuelle Interaktionspartner, die die translationale Regulation von GRSF1 ermöglichen zu entdecken. Andererseits DUSP1, das am MAPK Signalweg beteiligt ist; eine Interaktion mit GRSF1 könnte dann in einer Untersuchung der Rolle von GRSF1 im MAPK Signalweg münden. COMMD1 wurde ausgesucht, weil es über Interaktion mit dem Ubiquitin Proteasom System zum Abbau interagierender Proteine beiträgt. Über GRSF1 ist ein solcher Mechanismus bisher nicht beschrieben. DACT1, als Regulator des Wnt Signalweges, an dem auch GRSF1 beteiligt ist, wurde auch weitergehend untersucht. Darüber hinaus wurde CYC1 als mitochondriales Protein der Atmungskette ausgesucht, da *in vitro* Daten zeigen konnten, dass die Abwesenheit von GRSF1 zu einer veränderten Zusammensetzung der Atmungskette führt.⁷⁵

Zur Vorbereitung der Experimente wurde die GRSF1 cDNA in einen pCMV Vektor kloniert und dadurch N-terminal mit einer FLAG-Markierung versehen. Bei FLAG handelt es sich um ein Oktapeptid, das zur Erkennung des rekombinanten Proteins dient. Die Interaktionspartner von Δ E1-GRSF1 wurden in einen pCMV Vektor kloniert und dadurch N-terminal mit einer MYC-Markierung versehen. Die MYC-Markierung ist eine 10 Aminosäure lange Peptidkette, die wie die FLAG-Markierung der Erkennung diene.

In Abbildung 9 sieht man die jeweiligen Co-Immunpräzipitationen mit den spezifischen, Interaktionspartnern von Δ E1-GRSF1, die im Hefe-Zwei-Hybrid-Screen identifiziert worden waren. Als Negativkontrolle wurde bei allen Versuchen eine Co-Transfektion von GRSF1 und dem pCMV-Leervektor verwendet. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass GRSF1 in Abwesenheit potenzieller Interaktionspartner präzipitiert wurde. Dies konnte in allen Versuchen ausgeschlossen werden.

Bei der Kotransfektion von MYC-markiertem *DUSP1* mit FLAG-markiertem GRSF1 zeigte sich eine gute Expression beider Proteine in HEK-293 Zellen (siehe Abbildung 9A). Bei der Elution konnte MYC-markiertes DUSP1 nachgewiesen werden. Dies wurde durch das Behandeln der Lysate mit RNAse verhindert, sodass auf eine *RNA-abhängige Protein Interaktion* zwischen

DUSP1 und GRSF1 im Säugetiermodell geschlossen wurde. Damit stellt DUSP1 in Säugetierzellen kein spezifisches GRSF1 Interaktionsprotein dar.

Auch MYC-markiertes **DACT1** wurde in HEK-293 Zellen gut exprimiert und fand sich in beiden Eluaten (siehe Abbildung 9B). Im Gegensatz zu den, mit RNase behandelten, Lysaten fand sich in unbehandelten Lysaten FLAG-markiertes GRSF1. Zusammengenommen sprach dies für eine **RNA-vermittelte Interaktion** zwischen GRSF1 und DACT1. Damit stellt auch DACT1 in Säugetierzellen kein spezifisches GRSF1 Interaktionsprotein dar.

Bei der Co-Transfektion von MYC-markiertem **CYC1** mit FLAG-markiertem GRSF1 zeigte sich, dass CYC1 gut exprimiert wurde (siehe Abbildung 9C). Im Eluat zeigte sich neben MYC-markiertem CYC1 FLAG-markiertes GRSF1. Dasselbe Ergebnis fand sich bei der Präzipitation mit RNase behandelte Lysate. Die Elution von MYC-markiertem CYC1 zeigte eine gelungene Co-Immunpräzipitation, während die Elution von FLAG-markiertem GRSF1 für eine **RNA-unabhängige Interaktion** sprach. Damit stellt CYC1 in Säugetierzellen ein spezifisches GRSF1 Interaktionsprotein dar.

MYC-markiertes **GLTSCR2** wurde in HEK-293 Zellen gut exprimiert (siehe Abbildung 9D). Es konnte in beiden Eluaten nachgewiesen werden. In der Co-Immunpräzipitation der mit RNase behandelten Lysate konnte kein FLAG-markiertes GRSF1 nachgewiesen werden. Das sprach für eine **RNA-vermittelte Interaktion** zwischen GRSF1 und GLTSCR2. Damit stellt GLTSCR2 in Säugetierzellen kein spezifisches GRSF1 Interaktionsprotein dar.

MYC-markiertes **EIF1B** wurde in HEK-293 Zellen gut exprimiert und konnte auch im Säuleneluat nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9E). Allerdings konnte kein FLAG-markiertes GRSF1 in unbehandelten oder mit RNase behandelten Lysaten eluiert werden. Dies deutet darauf hin, dass eIF1B in Säugetierzellen nicht mit GRSF1 interagiert.

Das MYC-markierte **COMMD1** wurde in HEK-293 Zellen gut exprimiert (siehe Abbildung 9F). Bei der Elution konnte MYC-markiertes COMMD1 und FLAG-markiertes GRSF1 nachgewiesen werden. Auch bei der Präzipitation von RNase behandeltem Lysat konnten beide Proteine im Eluat nachgewiesen werden. Zusammengenommen belegen diese Ergebnisse eine **RNA-unabhängige Protein-Protein Interaktion** im Säugetiermodell. Damit stellt COMMD1 in Säugetierzellen ein spezifisches GRSF1 Interaktionsprotein dar. MYC-markiertes **RPL8** wurde in HEK-293 Zellen gut exprimiert (siehe Abbildung 9G). In den Eluaten der nicht mit RNase behandelten Lysaten konnte neben MYC-markiertem RPL8 auch FLAG-markiertes GRSF1 nachgewiesen werden. Die Elution der Lysate, denen RNase hinzugefügt wurde, enthielt jedoch kein FLAG-markiertes GRSF1. Diese Ergebnisse deuten auf eine **RNA-vermittelte Interaktion**

zwischen GRSF1 und RPL8 hin. Damit stellt RPL8 in Säugetierzellen kein spezifisches GRSF1 Interaktionsprotein dar.

Zusammenfassung: Mit Hilfe der Co-Immunopräzipitation konnte die direkte Interaktion von rekombinantem CYC1 und COMMD1 mit rekombinantem GRSF1 in einer Säugetierzelle gezeigt werden. Für beide Proteine galt, dass diese Interaktion RNA unabhängig ist. Für alle anderen im Hefesystem identifizierten GRSF1-Bindungsproteine konnte gezeigt werden, dass entweder keine Bindung stattfindet oder diese RNA abhängig ist. Diese Proteine stellen damit keine spezifischen GRSF1-Interaktionsproteine dar

4.3 Interaktion von CYC1 und COMMD1 mit Proteinfragmenten von GRSF1

Die Interaktion von CYC1 und COMMD1 konnte in HEK-293 gezeigt werden. Im weiteren Verlauf der Arbeiten ging es nun darum herauszufinden, mit welcher Domäne GRSF1 an CYC1 bzw. COMMD1 bindet. Dafür wurde mittels ortsspezifischer Mutagenese Proteinfragmente von GRSF1 erstellt, in denen die Alanin-reiche Domäne ($\Delta E1$), die RRM1 ($\Delta RRM1$), die RRM2 ($\Delta RRM2$) und die RRM3 ($\Delta RRM3$) im exprimierten GRSF1 Protein fehlte. Mittels MYC-Co-Immunopräzipitation wurden diese Proteinfragmente mit FLAG-markiertem CYC1 bzw. COMMD1 in HEK-293 Zelle exprimiert. Dabei ergab sich zunächst eine gute Expression von MYC-markiertem CYC1 (siehe Abbildung 10, Teil 1a), während die Expression der $\Delta RRM1$ -GRSF1 und $\Delta RRM3$ -GRSF1 in HEK-293 ein bisschen schwächer ausfiel (siehe Abbildung 10, Teil 1b). In den Eluaten der Co-Immunopräzipitation konnte überall MYC-CYC1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10, Teil 1c), sowie FLAG-markiertes GRSF1 Wildtyp, $\Delta RRM1$, $\Delta RRM2$ und $\Delta RRM3$ (siehe Abbildung 10, Teil 1d). Interessanterweise präzipitierte das $\Delta E1$ -GRSF1 Konstrukt nicht mit MYC markiertem CYC1 (siehe Abbildung 10, Teil 1d). Daraus lässt sich ableiten, dass GRSF1 in HEK-293 Zellen CYC1 mit seiner E1 Domäne bindet.

MYC-markiertes COMMD1 wurde in HEK-293 Zellen in hoher Konzentration exprimiert, was sich an den Inputs der Co-Immunopräzipitation ablesen ließ (siehe Abbildung 10, Teil 2a). Es zeigte sich eine gleichmäßige Expression der FLAG-markierten GRSF1 Proteinfragmente, wobei auch hier die Expression von $\Delta RRM1$ -GRSF1 leicht abgeschwächt war (siehe Abbildung 10, Teil 2b). MYC-markiertes COMMD1 konnte gleichmäßig in allen Co-Immunopräzipitationseluaten nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10, Teil 2c). Dabei kopräzipitierten FLAG-markiertes

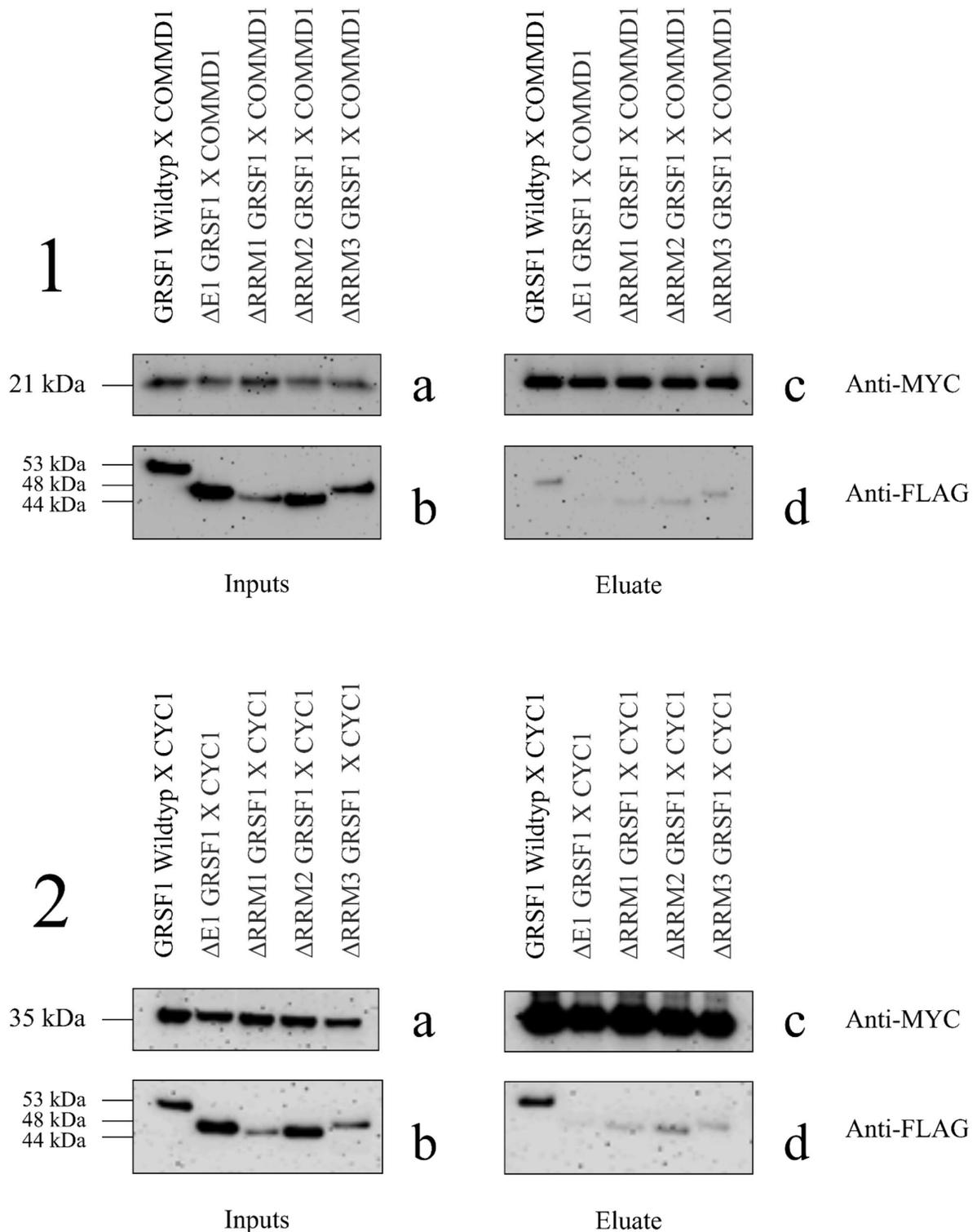


Abbildung 10: COMMD1 und CYC1 interagieren mit der ΔE1 Domäne von GRSF1. Mittels Mutagenese wurden Proteinfragmente des GRSF1 Proteins hergestellt. Die FLAG markierten GRSF1 Proteinfragmente bzw. der FLAG markierte GRSF1 Wildtyp wurden anschließend mit MYC-CYC1 (Teil 1) bzw. MYC-COMMD1 (Teil 2) in HEK-293 Zellen kotransfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet, lysiert und eine MYC-Co-Immunopräzipitation nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Auswertung der Co-Immunopräzipitation erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot. Teil 1: Co-Immunopräzipitation von FLAG markierten GRSF1 Proteinfragmenten mit MYC-CYC1: a und b zeigen die mit MYC bzw. FLAG markierten Inputs der Co-Immunopräzipitation. Teil 1c und d zeigen die MYC- bzw. FLAG-markierten Eluate. Teil 2: Co-Immunopräzipitation von FLAG markierten GRSF1 Proteinfragmenten mit MYC-COMMD1: a und b zeigen die mit MYC bzw. FLAG markierten Inputs der Co-Immunopräzipitation. Teil 1c und d zeigen die MYC- bzw. FLAG-markierten Eluate.

GRSF1 Wildtyp, Δ RRM1, Δ RRM2 und Δ RRM3. Lediglich für das FLAG-markierte Δ E1-GRSF1 konnte keine Kopräzipitation mit MYC-markiertem COMMD1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 10, Teil 2d). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass GRSF1 auch COMMD1 mit seiner E1-Domäne bindet.

Zusammenfassung: Durch die Co-Immunopräzipitation von CYC1 und COMMD1 mit verschiedenen Proteinfragmenten des GRSF1 Proteins konnte gezeigt werden, dass CYC1 und COMMD1 an die E1 Domäne von GRSF1 binden.

4.4 Interaktion von endogenem GRSF1 mit COMMD1

In den oben beschriebenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass das rekombinante GRSF1-FLAG Fusionsprotein mit rekombinantem MYC-markiertem COMMD1 RNA-unabhängig interagiert und für diese Interaktion die E1 Domäne von GRSF1 benötigt wird. Bei diesen Experimenten wurden die MYC- und FLAG-markierte Proteine rekombinant überexprimiert, wodurch es zu hohen intrazellulären Konzentrationen der Zielproteine kam. Außerdem bestand die Möglichkeit, dass die eingeführten MYC-bzw. FLAG-Markierung zu einer Fehlfaltung der rekombinanten Proteine führen, so dass die Ergebnisse nicht problemlos auf die endogen synthetisierten Proteine übertragen werden konnten. Um eine intrazelluläre Wechselwirkung der endogen synthetisierten Proteine nachzuweisen, wurde ein Co-Immunopräzipitationsverfahren verwendet, bei dem endogenes COMMD1 mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert wurde und anschließend im Präzipitat GRSF1 nachgewiesen werden sollte. Für diese Co-Immunopräzipitationsexperimente wurden HepG2 Zellen verwendet, da diese Zellen sowohl GRSF1 als auch COMMD1 konstitutiv exprimieren.

In Vorbereitung dieser Experimente wurde ein spezifischer COMMD1 Antikörper an Magnetkugeln gekoppelt. Der COMMD1-spezifische Antikörper wurde aus Kaninchen isoliert. Daher wurde für Kontrollpräzipitationen Kaninchenserum mit Magnetkugeln gekoppelt und

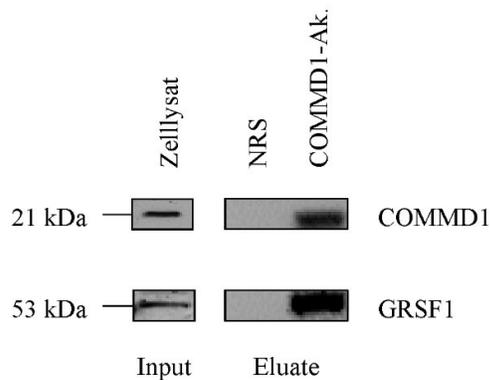


Abbildung 11: COMMD1 und GRSF1 interagieren in HepG2 Zellen. HepG2 Zellen wurden für 48h inkubiert, anschließend lysiert, 100 µg für einen Input abgenommen und das übrige Lysat aufgeteilt. Für jede Immunopräzipitation wurden dann je etwa 10 µg Protein eingesetzt. Für die Immunopräzipitation wurden G-Dyna Beads verwendet, die mit 5 µg COMMD1 Antikörper oder 5 µg Kaninchenserum für 2h inkubiert wurden. Anschließend wurde das oben gewonnene Lysat hinzugefügt und die Proben für 4h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit NT2 Puffer gewaschen, 2XSDS Ladungspuffer hinzugefügt und gekocht. Die Analyse der Ergebnisse erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot.

HepG2 Lysate präzipitiert. Durch diese „Nichtimmunkontrolle“ (NRS) konnte z.B. ausgeschlossen werden, dass GRSF1 mit dem konstanten Teil des Kaninchen Antikörpers interagiert.

Bei der Analyse der Zelllysateüberstände (Inputs) ergab sich, dass HepG2 Zellen sowohl GRSF1 als auch COMMD1 konstitutiv exprimieren (siehe Abbildung 11, linke Seite: Input). Bei der Nichtimmunkontrolle (Immunopräzipitation mit dem Nichtimmunserum des Kaninchens) konnte weder GRSF1 noch COMMD1 im Präzipitat nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11, rechte Seite: Eluate, NRS). Im Präzipitat der mit dem anti-COMMD1 Antikörper präzipitierten Lysatüberständen konnte neben COMMD1 auch

GRSF1 nachgewiesen werden (siehe Abbildung 11, rechte Seite: Eluate, COMMD1-Ak.). Zusammengefasst sprechen diese Ergebnisse für eine direkte Protein-Protein **Interaktion von nativem (nicht-rekombinantem) GRSF1 und COMMD1**.

Zusammenfassung: Bei einer Immunopräzipitation von endogenem COMMD1 konnte co-immunopräzipitiertes GRSF1 nachgewiesen werden, woraus auf eine Interaktion von endogenem GRSF1 und COMMD1 geschlossen werden konnte.

4.5 Charakterisierung der Interaktion von GRSF1 mit COMMD1

4.5.1 Einfluss von COMMD1 auf die endogene Expression von GRSF1

Durch die vorherigen Experimente konnte gezeigt werden, dass COMMD1 RNA-unabhängig mit der E1 Domäne von GRSF1 interagiert und dass diese Protein-Protein Interaktion in kultivierten HepG2 Zellen stattfindet. Die folgenden Experimente dienen dazu, die funktionellen Konsequenzen dieser Protein-Protein Interaktion näher zu charakterisieren.

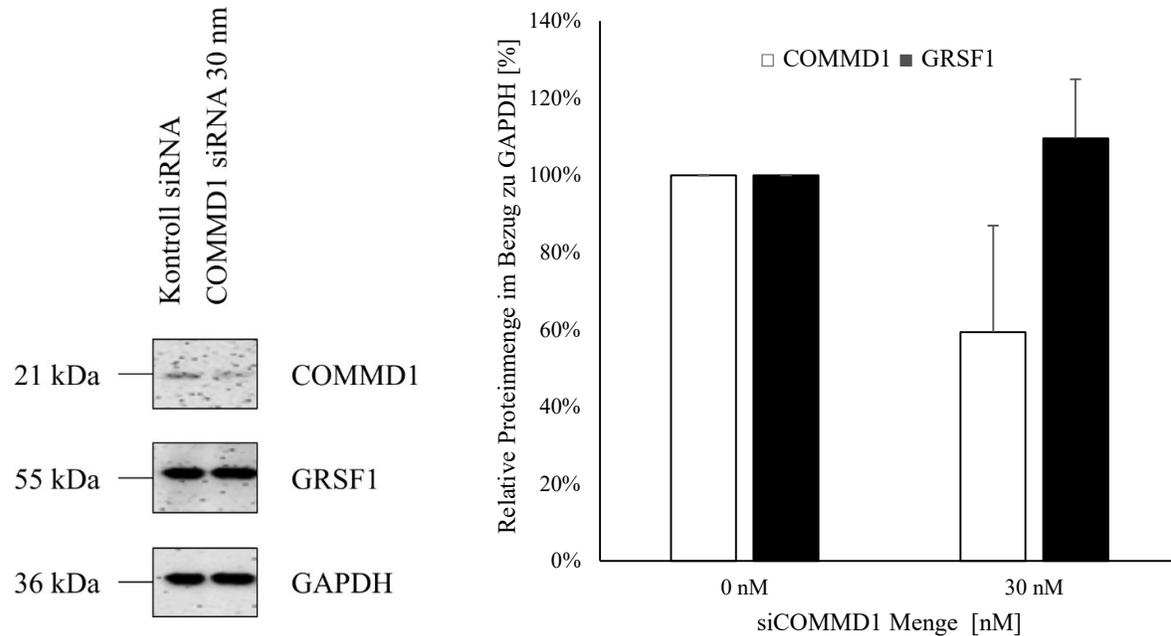


Abbildung 12: Knockdown von COMMD1 in HepG2 Zellen wirkt sich nicht auf die GRSF1 Proteinkonzentration aus. HepG2 Zellen wurden mit der angegebenen Menge an COMMD1 siRNA für 24h inkubiert. Die Zellen wurden anschließend geerntet, lysiert und mittels SDS-Page/Westernblot weiterverarbeitet. Es folgte eine densitometrische Quantifizierung der Westernblots. Die quantifizierte Menge an GRSF1 bzw. COMMD1 wurde mit der quantifizierten Menge an GAPDH normalisiert. Die normalisierte, quantifizierte Menge an GRSF1 und COMMD1 in Wildtyp Zellen wurde als 100% festgesetzt und der prozentuale Anteil der quantifizierten Menge an GRSF1 und COMMD1 in COMMD1 knockdown Zellen berechnet. Anschließend wurden der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen errechnet. Mittels berechnetem T-Test konnte berechnet werden, dass sich die Proteinlevel von GRSF1 im knockdown nicht signifikant vom Wildtyp abwichen.

Es konnte gezeigt werden, dass COMMD1 die Ubiquitylierung zahlreicher Proteine, wie dem *v-rel avian reticuloendotheliosis viral oncogene homolog A* (RELA), einem Transkriptionsfaktor des NFκB Signalwegs, beeinflusst.¹⁴⁰ Dabei wirkt sich die COMMD1-abhängige Regulation der Ubiquitylierung von RELA senkend auf die intrazellulären Konzentrationen von RELA aus.¹⁴⁰ Um herauszufinden, ob ein ähnlicher Zusammenhang auch für die Interaktion zwischen COMMD1 und GRSF1 besteht, wurden Zellen mit COMMD1 siRNA transfiziert und die intrazellulären GRSF1 Konzentrationen bestimmt. Dabei zeigte sich, dass die Konzentration von COMMD1 durch das knockdown erwartungsgemäß reduziert wurde. Der knockdown von COMMD1 wirkte sich dabei nicht signifikant auf die Konzentration von GRSF1 aus (siehe Abbildung 12). Als Kontrolle diente die Bestimmung der Protein Level von GAPDH, der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Dabei handelt es sich um ein Enzym, das konstitutiv exprimiert wird und somit gleichbleibende Mengen an eingesetztem Protein bestätigt.

Zusammenfassung: Ein knockdown der COMMD1 Expression mittels siRNA in humanen HepG2 Zellen führte zu keiner signifikanten Veränderung der intrazellulären GRSF1 Expression.

4.5.2 GRSF1 wird nicht ubiquitinyliert

Im vorherigen Experiment konnte gezeigt werden, dass ein knockdown von COMMD1 die Proteinlevel von GRSF1 nicht verändert. Neben proteasomaler Degradation werden durch Ubiquitinylierung auch andere Funktionen, wie zum Beispiel die zelluläre Lokalisation eines Proteins, vermittelt.¹⁴¹ Der *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator* (CFTR) ist ein Protein, dessen COMMD1-abhängige Ubiquitinylierung zu einer erhöhten Zelloberflächenexpression führt.¹⁴²

Um zu überprüfen, ob ein ähnlicher Zusammenhang auch für COMMD1 und GRSF1 gilt, wurde in HepG2 Zellen die endogene Expression von COMMD1 mittels siRNA herunterreguliert. Als Kontrolle für den *knockdown* von COMMD1 diente eine Transfektion mit einer Kontroll siRNA (Leervektor). Die so transfizierten Zellen wurden nun für eine Immunopräzipitation mit *Protein G Dynabeads* an die anti-GRSF1 Antikörper gebunden war, verwendet. Das so immunopräzipitierte GRSF1 wurde anschließend durch SDS-PAGE mittels Ubiquitinantikörper (anti-FK2) analysiert. Leider konnte trotz mehrfacher Versuche eine Ubiquitinylierung von GRSF1 nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich lediglich erneut, dass ein knockdown von COMMD1 keinen Einfluss auf die Proteinlevel von GRSF1 hat. Aufgrund der Redundanz wurde daher hier auf die Darstellung dieser Daten verzichtet.

Zusammenfassung: Mittels Immunopräzipitation von GRSF1 konnte keine Ubiquitinylierung von GRSF1 nachgewiesen werden.

4.5.3 COMMD1 reguliert die zelluläre Lokalisation von GRSF1

Es konnte gezeigt werden, dass ein *knockdown* von COMMD1 keinen Einfluss auf die Proteinkonzentration von GRSF1 hat. Des Weiteren konnte eine Ubiquitinylierung von GRSF1 nicht nachgewiesen werden. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass COMMD1 die zelluläre Lokalisation von Proteinen beeinflusst.¹⁴² Hier sollte nun durch eine differentielle Zentrifugation ermittelt werden, ob COMMD1 die zelluläre Lokalisation von GRSF1 reguliert. Dafür wurden HepG2 Zellen mit Kontroll siRNA oder COMMD1 siRNA behandelt und durch mehrere Zentrifugationsschritte die verschiedenen Zellfraktionen voneinander abgetrennt (siehe Abbildung

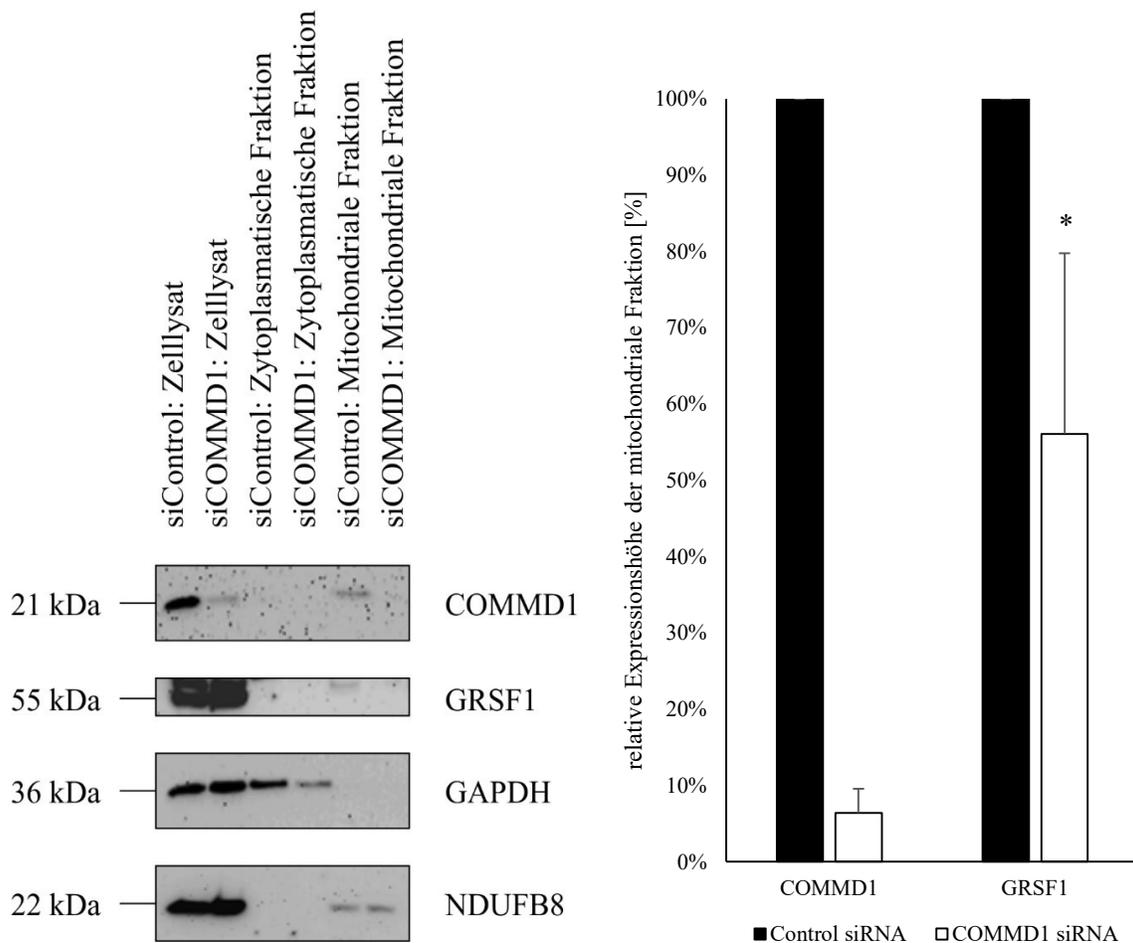


Abbildung 13: COMMD1 reguliert die zelluläre Lokalisation von GRSF1 in den Mitochondrien. HepG2 Zellen wurden mit 30 nm COMMD1 siRNA bzw. 30 nm Kontroll siRNA (random sequence) inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und für 20 min mit Cycloheximid-haltigem Medium inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen und in Cycloheximid-haltigem Mitochondrien-Isolationspuffer resuspendiert und mit Hilfe des Dounce-Homogenisator homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 900 g wurde die nukleäre Fraktion von der zytoplasmatischen und mitochondrialen Fraktion getrennt. Durch die darauffolgende Zentrifugation bei 10.000 g wurde die zytoplasmatische von der mitochondrialen Fraktion getrennt. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-PAGE und Westernblot. Als Marker der zytoplasmatischen bzw. mitochondrialen Fraktion dienten die GAPDH bzw. NDUFB8. Die Westernblots wurden densitometrisch ausgewertet und die relative Expressionshöhe von COMMD1 und GRSF1 in den verschiedenen Fraktionen bestimmt. Aus drei unabhängigen Experimenten wurden dann der Mittelwert und die Standardabweichung der relativen Expressionshöhen berechnet. Rechts dargestellt ist die relative Expressionshöhe der mitochondrialen Fraktion.

13). Als Marker der zytoplasmatischen Fraktion wurde die GAPDH bestimmt, diese ist im Zelllysate und der zytoplasmatischen Fraktion gut exprimiert (siehe Abbildung 13, GAPDH 1.- 4. Spalte). Als Marker der mitochondrialen Fraktion wurde die *NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 beta subcomplex subunit 8* (NDUFB8) bestimmt. Dieses Enzym ist an der Innenseite der Mitochondrienmembran lokalisiert und in unseren Experimenten im Zelllysate und der mitochondrialen Fraktion detektierbar (siehe Abbildung 13, NDUFB8 1./ 2. sowie 5./ 6. Spalte). Der knockdown von COMMD1 mittels siRNA funktionierte gut. In mit siCOMMD1 behandelten Zellen ließ sich kaum noch COMMD1 nachweisen (siehe Abbildung 13, COMMD1 1. vs. 2. Spalte). COMMD1 war auch leicht in der mitochondrialen Fraktion der mit siControl behandelten Zellen nachweisbar (siehe Abbildung 13, COMMD1 5. Spalte). GRSF1 war im Zelllysate gut nachweisbar (siehe Abbildung 13, GRSF1 1. und 2. Spalte). In der mitochondrialen Fraktion von mit siCOMMD1 RNA behandelten Zellen war GRSF1 im Vergleich zu mit Kontroll siRNA (Leervektor) behandelten Zellen verringert nachweisbar (siehe Abbildung 13, GRSF1 5. vs. 6. Spalte). Die Intensität der Banden wurde anschließend densitometrisch ausgewertet. Für die rechte Grafik wurde die gemessene Intensität von GRSF1 und COMMD1 in der mitochondrialen Fraktion mit der Intensität von NDUFB8 normalisiert. Anschließend wurde das Verhältnis der GRSF1 bzw. COMMD1 Intensität in COMMD1 Wildtyp und COMMD1 knockdown Zellen gemessen und so die relative Expressionshöhe bestimmt (siehe Abbildung 13, Säulendiagramm). Dabei zeigte sich in der mitochondrialen Fraktion von COMMD1 knockdown Zellen eine signifikant verminderte relative Expressionshöhe an GRSF1.

Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass GRSF1, wahrscheinlich über eine Interaktion mit nicht-kodierenden RNAs, an der mitochondrialen Ribosomenbiogenese beteiligt ist.⁷⁵ Außerdem konnte gezeigt werden, dass GRSF1 mit mitochondrialen RNA Granula kolokalisiert und wahrscheinlich über eine Interaktion mit der RNase P an der Prozessierung von mtRNAs beteiligt ist.¹⁰³ Dabei war bis dato unklar, ob es Regulationsmechanismen für die mitochondriale Lokalisierung von GRSF1 gibt.

Zusammenfassung: Mit Hilfe der differentiellen Zentrifugation wurde die subzelluläre Verteilung von COMMD1 und GRSF1 Wildtyp und COMMD1 knockdown HepG2 Zellen untersucht. Dabei zeigten sich in der mitochondrialen Fraktion von COMMD1 knockdown Zellen signifikant niedrigere Level an GRSF1.

4.6 Die Rolle von GRSF1 in der zellulären Redoxhomöostase

Die zelluläre Redoxhomöostase stellt das Gleichgewicht aller intrazellulären Redoxreaktionen dar.¹⁴³ Ein Anstieg der zellulären Oxidationsmechanismen führt dabei zur Hochregulation der reduktiven Kapazität.¹⁴³ Wird jedoch die zelluläre Reduktionskapazität durch ein Übermaß an Oxidationsreaktionen überschritten, spricht man von oxidativem Stress.¹⁴³ Wird im Gegensatz dazu, die oxidative Kapazität von Zellen durch ein Übermaß von reduktiven Reaktionen überschritten, spricht man von reduktivem Stress.¹⁴³ Oxidativer und reduktiver Stress sind an der Entstehung einer Vielzahl von Erkrankungen wie Krebs, Diabetes oder neurodegenerativen Erkrankungen beteiligt.¹⁴³ Ob diese Beteiligung kausaler oder begleitender Natur ist, wird kontrovers diskutiert.

Bei oxidativem Stress spielen die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) eine wesentliche Rolle. Zu ihnen zählen unter anderen das Superoxid, Wasserstoffperoxid, das HO-Radikal oder Singulett Sauerstoff.^{124,126} Sie entstehen überwiegend in den Mitochondrien als Folge einer unvollständigen Sauerstoffreduktion im Rahmen der Atmungskette in den Komplexen I und III.¹⁰⁹ Zusätzlich tragen aber auch andere Oxidationsreaktionen (*NADPH-Oxidase*, *Lipoxygenasen*, *Cyclooxygenasen*, *Stickstoffmonoxidsynthasen*) zur zellulären Bildung von ROS bei.¹²⁶ ROS können zu einer Aktivierung bzw. Inaktivierung von Enzymen führen, DNA mutieren oder in hohen Konzentrationen die Apoptose einleiten.¹²⁴

Um die negativen Effekte der ROS zu neutralisieren und um die zelluläre Redoxhomöostase aufrecht zu erhalten, wurden während der Evolution eine Reihe antioxidativer Enzyme eingeführt. Zu ihnen zählt die Familie der Superoxiddismutasen.¹²⁷ Die *Superoxiddismutase* katalysiert die Disproportionierung des Superoxidradikals (*O_2^- , enthält ein ungepaartes Elektron) zu Sauerstoff und Wasserstoffperoxid.¹²⁷ Ein weiteres wichtiges Enzym im Schutz vor ROS ist die *Katalase*.¹⁴⁴ Sie katalysiert die Dismutation von Wasserstoffperoxid zu Wasser und Sauerstoff.¹⁴⁴ *Ferritin Heavy Chain* (FHC) schützt die Zelle vor oxidativem Schaden, indem es als intrazelluläres Eisenspeicherprotein die Fenton Reaktion, also die Eisen-vermittelte Umwandlung von Wasserstoffperoxid zu Superoxid, verhindert.¹⁴⁵ Die Familie der Glutathionperoxidasen bildet einen weiteren Schutzmechanismus gegen intrazellulär entstehende ROS.¹⁴⁶ Mit Hilfe von reduziertem Glutathion reduzieren die *Glutathionperoxidasen* (GPx-Isoformen) Wasserstoffperoxid und andere organische bzw. anorganische Peroxide zu den entsprechenden Alkoholen.¹⁴⁶

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass GRSF1 die Translation der GPx4 positiv reguliert.⁷⁹ Die GPx4 nimmt eine Sonderstellung in der Familie der Glutathionperoxidasen ein, da sie in

Biomembranen verankerte, lipophile Peroxide reduzieren kann.¹⁴⁷ Ein knockdown von GRSF1 im Mausmodell führte durch eine verminderte Expression der GPx4 zu einer Akkumulation von Isoprostanen, die als zelluläre Marker für eine nicht-enzymatische Lipidperoxidation angesehen werden.⁷⁹ Die Akkumulation von Isoprostan in GRSF1 knockdown Mäuseembryos führte wahrscheinlich zu der beobachteten Wachstumsretardierung.⁷⁹

4.6.1 Knockout von GRSF1 in Caco-2 Zellen mit Hilfe der CRISPR/Cas9

Technologie

Um zu überprüfen, ob GRSF1 eine Rolle bei der Regulation der humanen Redoxhomöostase spielt, wurde die Expression des GRSF1 Gens mithilfe der CRISPR/Cas9 Strategie in Caco-2 Zellen ausgeknockt. Für den CRISPR/Cas9 vermittelten Knockout wurden Caco-2 Zellen verwendet, da diese endogen GRSF1 exprimieren und darüber hinaus gut zu transfizieren ist. So sollte ein effizienter Knockout gewährleistet werden. Dabei wurde unter Verwendung einer guide-RNA im Exon 2 des GRSF1 Gens ein Strangbruch verursacht. Dessen spontane Reparatur führte zur Insertion von zusätzlichen Nukleotiden und damit zur Insertion eines zusätzlichen Peptids (siehe Tabelle 2). Dies resultierte in einem stark verminderten Proteingehalt von GRSF1 in Caco-2 knockout Zellen (siehe Abbildung 14).

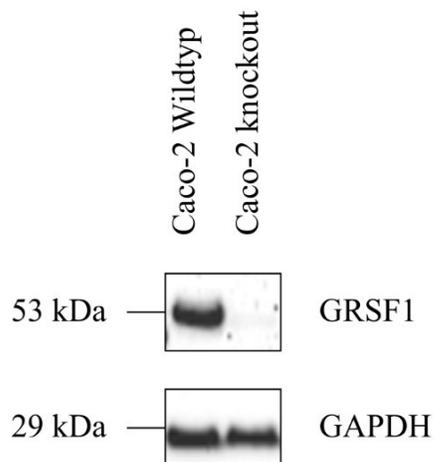


Abbildung 14: Knockout von GRSF1 in Caco-2 Zellen. Caco-2 Zellen wurden mittels CRISPR/Cas9 ausgeknockt, Wildtyp Caco-2 und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen wurden für 24h inkubiert, lysiert und mittels SDS-PAGE/Westernblot analysiert.

DNA Sequenz in Exon 2	WT	GAG TCC AAA ACT ACT TAC CTG GAA GAC CTT CCA CCA CCC CCT GAG TAT GAA TTG GCC CCG TCC AAG
--------------------------	----	--

	KO	GAG TCC AAA ACT ACT TAC CTG GAA GAC CTT CCA CCA CCC CCT GGC TTC GCG CCC CGT GAG TAT GAA TTG GCC CCG TCC AAG
Translation in	WT	ESKTTYLEDLPPPPEYELAPSK
Exon 2	KO	ESKTTYLEDLPPPPGFANRNFMLIHDDSKTFKEYELAPSK

Tabelle 2: GRSF1 knockout in Caco-2 Zellen mittels CRISPR/Cas9 Technologie. Auf <https://chopchop.rc.fas.harvard.edu> wurde eine Guide-RNA mit der Sequenz CGGGCCAATTCATACTCAGGGG für den Plusstrang des Exon 2 des GRSF1 Gens auf Chromosom 4 gesucht und anschließend in einen pGuide-Vektor der Firma Takara kloniert. Kultivierte Caco-2 Zellen wurden dann mittels Xfect (Takara) mit diesem pGuide Vektor transfiziert und für 2 Tage inkubiert. Anschließend wurden die Zellen vereinzelt und separate Zellklone kultiviert. Mittels SDS-Page/Westernblot wurden die Zellen auf die Anwesenheit von GRSF1 getestet und selektioniert. Nach Auswahl des besten GRSF1 knockouts wurde aus dem gewonnenen Caco-2 Klon genomische DNA isoliert, der GRSF1 Lokus mittels PCR amplifiziert und das PCR Produkt in den pCR2.1 Vektor kloniert. Dieser wurde in E. coli transfiziert, amplifiziert, die DNA extrahiert und sequenziert.

Zusammenfassung: Mit Hilfe der CRISPR/Cas9 Technologie wurde in Caco-2 Zellen ein Strangbruch im GRSF1 Gen ausgelöst. Durch fehlerhafte Reparatur kam es zu einer Insertion zusätzlicher Nukleotide im GRSF1 Gen und damit zu einer stark verminderten Expression von GRSF1.

4.6.2 Messung der ROS Level in Wildtyp und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen

Um den Einfluss von GRSF1 auf die zelluläre Redoxhomöostase zu erforschen, wurden die intrazellulären Konzentrationen an ROS in Wildtyp und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen verglichen. Dazu wurde ein DCFH Test durchgeführt. Bei diesem Assay diffundiert 2', 7'-Dichlorofluorescindiacetat (DCFH-DA) in die Zelle und wird dort durch Esterasen in nicht fluoreszierendes DCFH hydrolysiert. In Anwesenheit von ROS wird dieser Farbstoff zu stark fluoreszierendem DCF oxidiert. Dieses lässt sich mittels Fluoreszenzspektroskopie detektieren. Mittels eines Microplateraders wurden die ROS Level von GRSF1 knockout und Wildtyp Caco-2 Zellen nach 1, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min gemessen (siehe Abbildung 15). Die in GRSF1 knockout Zellen gemessene Fluoreszenz war signifikant niedriger als in Caco-2 Wildtyp Zellen, sodass auf niedrigere intrazelluläre Level an ROS in GRSF1 knockout Zellen geschlossen wurde. Im Mausmodell konnte eine positive Regulation der Translation der anti-oxidativen Glutathion Peroxidase 1 gezeigt werden.⁷⁹ Außerdem war in Abwesenheit von GRSF1 erhöhte Mengen an Isoprostanen, einem zellulären Marker für nicht-enzymatische Lipidperoxidation, nachweisbar.⁷⁹ Zu diesen Beobachtungen steht das Ergebnis des DCFH Assays erst einmal im Widerspruch. Vorstellbar wäre, dass durch die Abwesenheit von GRSF1 die Translation pro-oxidativer Enzyme gestört ist. Dies könnte zu einer verminderten Expression wichtiger pro-oxidativer Enzyme wie

der Stickstoffmonoxidasen, Lipoxygenasen oder Cyclooxygenasen führen und so einen erniedrigten intrazellulären Gehalt an ROS erklären.

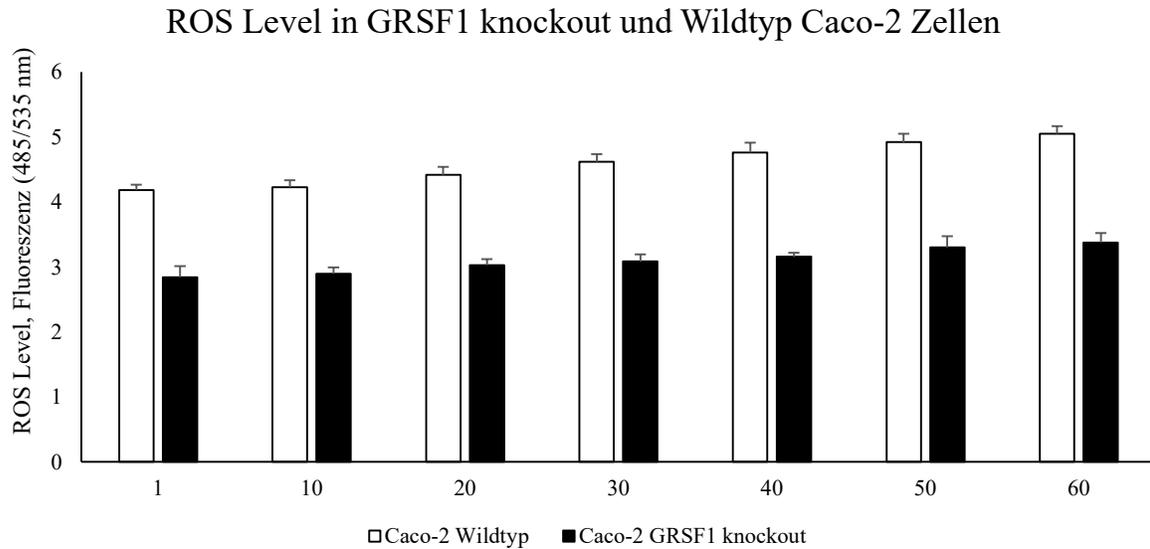


Abbildung 15: Erniedrigte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in GRSF1 knockout Caco-2 Zellen. Für jede Messung wurden 20.000 Wildtyp und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen verwendet. Diesen wurde ein Input abgenommen, anschließend wurden sie gewaschen, für 30min mit DCFH inkubiert und erneut gewaschen. Nach Auftragen auf eine 96 Well Platte wurde mit Hilfe des Microplate Readers die Fluoreszenz bei 480 bzw. 530 nm nach 1, 10, 20, 30, 40, 50 und 60 min gemessen. Mit Hilfe des Inputs wurde die Proteinkonzentration der jeweiligen Proben bestimmt und die Fluoreszenz gegen die Proteinkonzentration normalisiert. Es wurde der Mittelwert der Fluoreszenzen in Caco-2 Wildtyp und GRSF1 knockout Zellen gemessen, die Standardabweichung berechnet. Mittels T-Test konnte ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenz in Caco-2 Wildtyp und GRSF1 knockout Zellen gezeigt werden ($p < 0,0001$).

Zusammenfassung: Der DCFH Assay diente zur Detektion von ROS in GRSF1 Wildtyp und knockout Zellen. Dabei zeigte sich eine signifikant erniedrigte Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies in GRSF1 knockout Zellen.

4.6.3 JNK-Aktivierung in Wildtyp und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass in GRSF1 knockout Zellen die Konzentrationen an intrazellulären ROS erniedrigt waren. ROS dienen intrazellulär als Signalmoleküle und lösen u.a. die Oligomerisierung der Glutathion-Transferase Pi aus, wodurch die c-Jun N-terminale Kinase (JNK) aktiviert wird.¹³¹

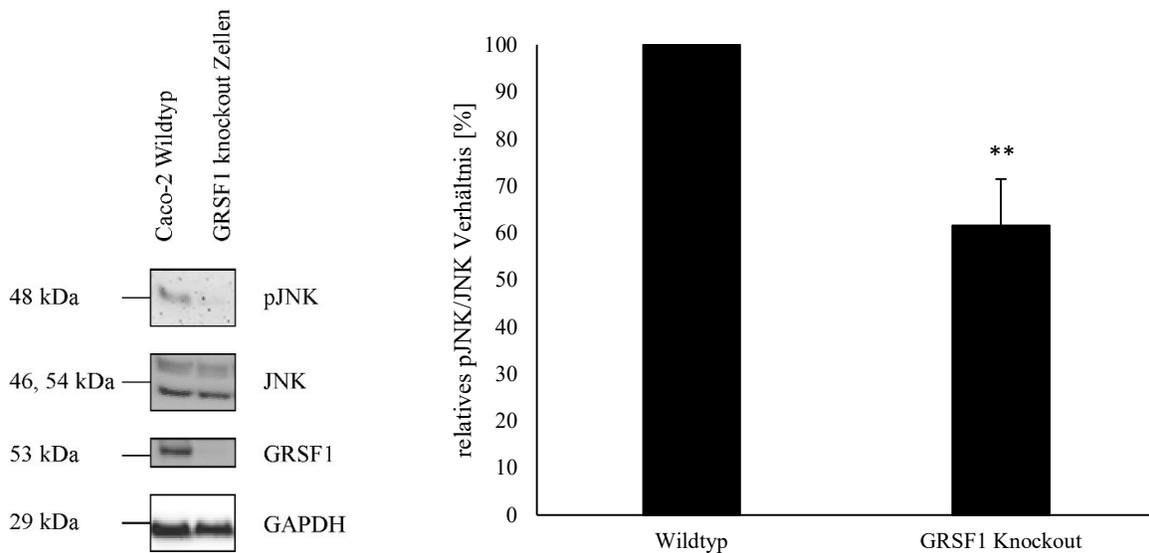


Abbildung 16: Verringerte Aktivierung der c-Jun N-terminalen Kinase in GRSF1 knockout Caco-2 Zellen. Wildtyp und GRSF1 knockout Caco-2 Zellen wurden bis zur Präkonfluenz kultiviert, geerntet und, anschließend lysiert. Die Zelllysateproteine wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert. Es folgte eine densitometrische Quantifizierung der Intensitäten der JNK und pJNK Banden. Anschließend wurde das Verhältnis von pJNK zu JNK in Wildtyp und GRSF1 knockout Zellen bestimmt. Das Verhältnis von pJNK zu JNK in GRSF1 Wildtyp Zellen wurde in allen Messungen auf 100 gesetzt und anschließend mit dem Verhältnis von pJNK zu JNK in GRSF1 knockout Zellen verglichen. Dabei zeigte sich eine signifikante Abweichung des Verhältnisses der JNK Aktivierung in GRSF1 knockout Zellen ($p < 0,01$).

Um zu überprüfen, ob sich die erniedrigten intrazellulären ROS-Level in GRSF1 knockout Zellen auf die Aktivierung der JNK auswirken, wurde mittels Westernblot die phosphorylierte und somit aktive Form von JNK (pJNK), sowie inaktives JNK densitometrisch quantifiziert (siehe Abbildung 16). Anschließend wurde das Verhältnis von pJNK/JNK errechnet. Dabei zeigte sich in GRSF1 knockout Zellen ein signifikant ($p < 0,01$) verringertes Verhältnis von pJNK/JNK, woraus auf eine verminderte Aktivierung der JNK in GRSF1 knockout Zellen geschlossen wurde.

Zusammenfassung: Es konnte gezeigt werden, dass JNK, ein intrazellulärer Sensor für oxidativen Stress, in GRSF1 knockout Zellen weniger stark aktiviert war.

4.6.4 Analyse der RNA-Sequenzen antioxidativer und prooxidativer Enzyme

Für GRSF1 sind mehrere Substrat-RNAs bekannt. Nach bisherigen Untersuchungen ist für die Protein-RNA Interaktion ein AGGGA Sequenzmotiv bedeutsam, welches in der 5'-UTR der

Substrat-mRNAs lokalisiert ist.^{78,79} Weiterhin wird vermutet, dass GRSF1 an Strukturen bindet, die man G Quadruplexe nennt.⁷⁸ Dabei handelt es sich um Sekundärstrukturelemente von RNAs die über Hogsteen Basenpaarung in G reichen Sequenzen entsteht.⁸¹ Innerhalb dieser G-reichen Sequenzen stapeln sich die G-Nukleotide zu einer Tetrade, dem G-Quadruplex.⁸¹ 2005 haben Kikin et al. ein Computerprogramm entwickelt, mit dessen Hilfe sich, die Wahrscheinlichkeit der Bildung von G-Quadruplexen aus der Nukleotidsequenz ableiten lässt. Das Programm berücksichtigt dabei drei verschiedene Prinzipien: 1) Kürzere RNA Schleifen haben eine höhere Wahrscheinlichkeit sich zu einem G-Quadruplex zu falten.¹⁴⁸ 2) Die Länge der Schleifen im G-Quadruplex ist ungefähr gleich.¹⁴⁸ 3) Je höher die Anzahl an Guanin Tetraden, desto stabiler wird der G-Quadruplex.¹⁴⁸ Bei der Berechnung ergibt sich ein Maximalscore von 105 für eine 30 Nukleotid lange Sequenz. Mit Hilfe des QGRS-Mappers wurden die RNA-Sequenzen wichtiger, an der Redoxhomöostase beteiligter Proteine analysiert (siehe Tabelle). Zu den ROS produzierenden Enzymen gehören wie oben schon beschrieben die Stickstoffmonoxidsynthasen, die Lipoxygenasen und Cyclooxygenasen.¹⁴³

Zur Familie der **Stickstoffmonoxidsynthasen** (NOS) gehören die neuronale, epitheliale und induzierbare NOS.¹⁴⁹ Sie synthetisieren Stickstoffmonoxid unter Nutzung von L-Arginin, NADPH und Sauerstoff.¹⁴⁹ Bei niedrigen intrazellulären Arginin Konzentrationen (Substratmangel) produzieren sie Superoxid.¹⁴⁹ In meiner Arbeit habe ich mich dabei auf die Analyse der induzierbaren NOS (iNOS) beschränkt, da sowohl neuronale NOS als auch endotheliale NOS in Caco-2 Zellen nicht exprimiert werden. Bei der Analyse der RNA-Sequenz zeigte sich in der 5' UTR eine G-reiche Sequenz mit einem G-Score von 21. Dabei handelte es sich um einen moderat hohen Wert. Bekannte GRSF1 Substrate, wie z.B. die murine GPx4 RNA,⁷⁹ bei der die Bildung von G4 Komplexen experimentell nachgewiesen wurde, zeigen einen G-Score von 20.

Die **Lipoxygenasen** (LOX) bilden eine Gruppe von Lipid oxidierenden Enzymen, die Sauerstoff an Arachidonsäure und andere mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFAs) addieren und so Hydroperoxyfettsäuren (HpETE) synthetisieren.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Je nachdem an welcher Stelle eine gegebene Lipoxygenase Sauerstoff an Arachidonsäure addiert, wird sie 5-, 12-, oder 15-LOX genannt.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Obwohl Hydroperoxyfettsäuren selbst keine ROS darstellen, sind sie chemisch labil und können im Rahmen von Sekundärreaktionen umgebaut werden, wobei ROS entstehen.¹⁵⁰⁻¹⁵³ Die 12-LOX (ALOX12) wird in vielen somatischen Zellen nur auf geringem Niveau exprimiert, sodass ich mich bei meinen Untersuchungen vor allem auf die 5-LOX (ALOX5) und die 15-LOX (ALOX15) beschränkt habe. Dabei zeigte sich in der 5'-UTR der ALOX15 eine G-reiche Sequenz mit einem G-Score von 41. In der kodierenden Region der ALOX5 zeigte sich eine G-reiche Sequenz mit einem G-Score von 21. Die Wahrscheinlichkeit der

G-Quadruplex Bildung der ALOX15 mRNA ist damit deutlich höher als die der ALOX5 mRNA, sodass eine Bindung von GRSF1 an die ALOX15 wahrscheinlich erscheint.

Zur Familie der *Cyclooxygenasen* (COX) gehören die COX1 und COX2 (PTGS2).¹⁵⁴ Während die COX1 konstitutiv in vielen Zellen exprimiert wird, ist die PTGS2 ein induzierbares Enzym, dass vor allem bei der Aktivierung von Entzündungszellen synthetisiert wird.¹⁵⁴ Die Cyclooxygenasen bilden aus Arachidonsäure das zyklische Endoperoxid Prostaglandin G2 und anschließend durch Reduktion der Peroxygruppe das Prostaglandin H2 (PGH2).¹⁵⁴ PGH2 wird anschließend im Rahmen verschiedener Folgeraktionen zu den klassischen Prostaglandinen, dem Thromboxan A2 und dem Prostazyklin I2 umgewandelt.¹⁵⁴ Aus dem chemisch labilen PGG2 können durch homolytische Spaltung der Peroxygruppe radikalische Folgeprodukte entstehen, die ihrerseits Radikalkettenreaktionen initiieren können.¹⁵⁵ Dadurch kommt es zur kooxidativen Modifizierung von anderen Lipiden, Proteinen und Nukleotiden.¹⁵⁶ Da die COX1 in vielen Geweben konstitutiv exprimiert wird und kaum einer Expressionsregulation unterliegt,¹⁵⁴ beschränkte ich meine Analyse auf die induzierbare PTGS2. Bei der Analyse der RNA-Sequenzen der verschiedenen PTGS2-Transkripte zeigte sich eine G-reiche Sequenz in der kodierenden Region mit einem G-Score von 20. Auch hier handelt es sich um einen moderat hohen G-Score, ähnlich wie bei der murinen GPx4 RNA oder der Use1 mRNA, die sich beide zu G-Quadruplexen falten.

Die für die Aufrechterhaltung der zellulären Redoxhomöostase wichtige Familie der *Superoxiddismutasen* besteht aus drei verschiedenen Enzymen.¹²⁷ Während die SOD1, die lösliche SOD1, im Zytoplasma vorkommt, ist die SOD2, auch als mitochondriale SOD2 bezeichnet, in der Mitochondrienmembran verankert.¹²⁷ Die SOD1 RNA weist in ihrer 3' UTR eine G-reiche Sequenz mit einem G-Score von 19 auf, während die SOD2 RNA eine G-reiche Sequenz im Protein kodierenden Teil ihrer RNA mit einem G-Score von 21 besitzt. Diese Scores sind ähnlich hoch wie bei den vorher bereits analysierten RNA-Sequenzen der murinen GPx4 (G-score 20) und Use1 (G-score 20). Die SOD3 wird nach extrazellulär sezerniert¹²⁷ und wurde in dieser Arbeit nicht berücksichtigt.

Die *Katalase* ist ein weiteres wichtiges Enzym der zellulären Redoxhomöostase.^{144,157} Sie katalysiert die Diproportionierung von Wasserstoffperoxid^{144,157} und besitzt in der Proteinkodierenden Region ihrer RNA eine G-reiche Sequenz mit einem G-Score von 21. Damit sollte diese mRNA ebenfalls eine G-Quadruplexstruktur ausbilden und stellt somit potenziell ein GRSF1 Substrat dar.

Zur Familie der *Glutathionperoxidasen* gehören acht verschiedene Glutathionperoxidasen.^{128,146} Für meine Arbeit habe ich mich auf die GPx1, GPx2 und die GPx4 konzentriert, da diese drei Isoformen in vielen Säugetierzellen exprimiert werden und wesentlich an der Regulation der zellulären Redoxhomöostase beteiligt sind.¹⁴⁶ Die GPx4 mRNA weist in ihrer 5' UTR eine G-reiche Sequenz mit einem G-Score von 21 auf und hat damit eine moderate Wahrscheinlichkeit einen G-Quadruplex zu bilden. Die GPx1 mRNA weist in ihrer 5' UTR eine G-reiche Sequenz mit einem G-Score von 12 auf und hat damit eine niedrige Wahrscheinlichkeit einen G-Quadruplex zu bilden.

Zusammenfassung: Mit dem QGRS-Mapper kann die Wahrscheinlichkeit, mit denen bestimmte RNAs eine G-Quadruplex Struktur bilden, berechnet werden. Da GRSF1 an G-Quadruplexe bindet, konnte mit Hilfe des QRS-Mappers die Wahrscheinlichkeit, dass GRSF1 an verschiedene oxidative und prooxidative RNAs bindet, berechnet werden. Dabei zeigte sich für die mRNA der ALOX5, ALOX15, COX2, GPX4, Katalase und SOD2 ein G-Score > 20.

4 Ergebnisse

	Gen	Name	RNA Länge	Kodierende Region	Position	G-reiche Sequenz	G-Score
Pro-oxidative Proteine	NOS2	Induzierbare NOS	4206	265-3726	3795	GGTCACAGGGCCTGGGGAGATGG	21
	ALOX5	Arachidonat-5-Lipoxygenase	2591	115-2139	1	GGGGCCGGGACCGGGGCCAGGG	41
	ALOX15	Arachidonat-15-Lipoxygenase	2715	23-2011	274	GGGCCCCGGAGCCGGGGACGAGG	21
	PTGS2	Cyclooxygenase 2	4507	138-1942	762	GGGCTGGGCCATGGGGTGG	20
Anti-oxidative Proteine	SOD2	Mitochondriale SOD2	4282	162-830	597	GGTTGGGGTTGGCTTGG	21
	FHC1	Ferritin Heavy Chain	1245	236-787	1088	GGCAGTATACTAAGGTGTGGCTGTCTTGG	13
	GPX4	Glutathionperoxidase 4	936	119-712	24	GGGCGTGGCCGTGGGAAAGG	21
Referenz	GPX4	Murine Glutathionperoxidase 4	974	145-738	888	GGTCCAGAGGCCTGTGGCCCTGGG	20
	USE1	unconventional SNARE in the ER 1	1037	61-840	37	GGGGTGGTGTAGGGCCGG	20

Table 3: Analyse der Sequenzen wichtiger oxidativer und antioxidativer Proteine. Die Referenz Sequenzen für die RNA wichtiger ROS bildende und ROS abbauende Enzyme wurde über RefSeq ermittelt. Anschließend wurden die Sequenzen mittels des QGRS Mappers analysiert. So wurden auch die unter Referenz aufgeführten Sequenzen analysiert. Bei diesen handelt es sich um bekannte RNA Ziele von GRSF1.

4.6.5 Messung der RNA-Level antioxidativer und prooxidativer Proteine in GRSF1 Wildtyp und knockout Caco-2 Zellen

Durch die vorherige Analyse der RNA-Sequenzen wichtiger pro- und anti-oxidativer Proteine konnte die Wahrscheinlichkeit, mit der diese Sequenzen G-Quadruplexstrukturen ausbildeten, untersucht werden. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob die An- bzw. Abwesenheit von GRSF1 die Expression der ausgewählten pro- und anti-oxidativen Proteine beeinflusst. Die Quantifizierung der Gleichgewichtskonzentrationen der mRNAs der pro- und anti-oxidativ wirkenden Enzyme wurde mittels qRT-PCR vergleichend in Caco-2 Wildtypzellen

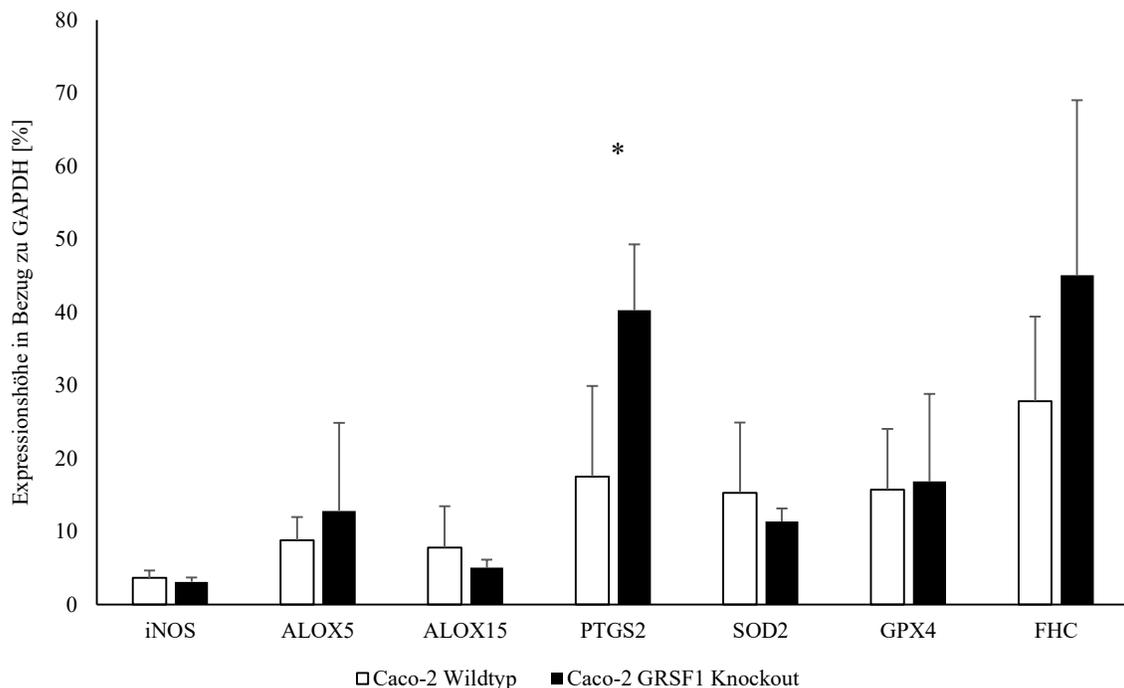


Abbildung 17: RNA-Level prooxidativer und antioxidativer Proteine in GRSF1 knockout und Wildtyp Caco-2 Zellen. GRSF1 knockout und Wildtyp Caco-2 Zellen wurden 24h inkubiert, geerntet und lysiert. Mit einem Kit wurde dann die RNA nach einem Protokoll der Hersteller isoliert. Die RNA wurde anschließend mit einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Level wurden dann mittels einer qPCR gemessen und mit der Konzentration an GAPDH RNA normalisiert.

und Caco-Zellen durchgeführt, in denen das GRSF1 Gen mithilfe der Crispr/Cas9 Strategie funktionell inaktiviert wurde. Die gemessenen RNA-Konzentrationen wurden anschließend auf die Konzentration der GAPDH mRNA normalisiert.

Bei der Untersuchung der ROS produzierenden Enzyme (iNOS, ALOX5, ALOX15, PTGS2) zeigten sich für die iNOS, ALOX15 und ALOX5 keine Unterschiede in den mRNA-Konzentration, wenn GRSF1 knockout Zellen mit den entsprechenden Wildtypkontrollen verglichen wurden. Nur für die PTGS2 ergab sich ein signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied. Bei der Messung der RNA-Konzentrationen der anti-oxidativen Enzyme (SOD2, GPX4) zeigten sich

ebenfalls keine signifikanten Unterschiede. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Abwesenheit von GRSF1 die Expression der meisten getesteten pro- und anti-oxidativen Proteine in Caco-2 Zellen nicht beeinflusst. Vorherige Untersuchungen konnten eine Regulation der Translation der GPx4 mRNA durch GRSF1 in murinen Embryonalzellen zeigen.⁷⁹ Die murine GPx4 mRNA wird dabei von GRSF1 an einer AGGGGA Sequenz in der 5' UTR gebunden.⁷⁹ Ein BLAST Alignment der mRNA der murinen und humanen GPx4 zeigt, dass diese Sequenz auch in der 5' UTR der humanen GPx4 mRNA vorhanden ist. Diese *in silico* Analyse macht eine Regulation der GPx4 durch GRSF1 auch in humanen Zellen wahrscheinlich. Allerdings wirkt sich eine translationale Regulation nicht zwangsläufig auf die mRNA-Level aus. Daher stehen die Ergebnisse in murinen Embryonalzellen in keinem Widerspruch zu den hier gezeigten.

Zusammenfassung: Die Expression ausgewählter pro- und anti-oxidativ wirkender Enzyme (iNOS, ALOX5, ALOX15, SOD2, GPx4) in kultivierten Caco-Zellen hängt nicht von der An- bzw. Abwesenheit von GRSF1 ab. Die COX2 wird jedoch in GRSF1-defizienten Zellen signifikant ($p < 0.05$) stärker exprimiert als in entsprechenden Kontrollzellen.

5 Diskussion

5.1 Protein-Interaktionspartner von GRSF1 im Hefemodell

Bisher konnten mehrere mitochondriale und zytoplasmatische RNA-Bindungssubstrate von GRSF1 entdeckt werden.^{74,75,78,79,97} Im Gegensatz dazu sind bisher nur wenige Proteininteraktionspartner von GRSF1 beschrieben worden. Eine Suche nach GRSF1 in der *BioGrid 3.4 Database*, einer kuratierten Protein-Protein Interaktionsdatenbank, ergab 64 Treffer in *Homo sapiens*. Die für GRSF1 entdeckten und in der *BioGrid 3.4 Database* aufgeführten Interaktionspartner wurden alle mittels *Affinity Capture Mass Spectrometry* entdeckt. Bei dieser Methode wurde GRSF1 als *Köder* aus Zellysaten extrahiert und die an GRSF1 gebundenen Proteine massenspektrometrisch analysiert. So werden allerdings auch Proteine, die über ein drittes Protein an den *Köder* gebunden sind, fälschlicherweise als Interaktionspartner identifiziert. Tatsächlich wurden nur zwei der, in der *BioGrid 3.4 Database* gefundenen, Interaktionspartner von GRSF1, die *tRNA methyltransferase 10 homolog C* (TRMT10C) und die *proteasome 26S subunit, non-ATPase, 10* (PSMD10), zusätzlich mittels Western Blot nachgewiesen. Ein anderer Nachteil der Methode ist, dass sie nicht angibt, wie die Stöchiometrie von GRSF1 und seinen Bindungspartnern ist. Es ist also möglich, dass ein Protein identifiziert wird, das nur in sehr kleinen Mengen an GRSF1 gebunden ist (z.B. in einem molaren Verhältnis von z.B. 1:100). Bei so einem geringen molaren Verhältnis ist am ehesten von einer unspezifischen Interaktion auszugehen.

Mit dem Wissen über Proteininteraktionspartner kann einerseits über neue Funktionen des Proteins spekuliert und diese gegebenenfalls verifiziert werden. Andererseits bietet dieses Wissen Ansatzpunkt für weitere Nachforschungen zur Funktion der Interaktionen. Mit Hilfe des Hefe-Zwei-Hybrid-Systems konnten zahlreiche neue potenzielle Interaktionspartner von $\Delta E1$ -GRSF1 identifiziert werden. Die Gen-Ontologie (GO) dieser neuen potentiellen Bindungspartner wurde analysiert, wobei sich eine Anreicherung der potentiellen Bindungspartner in der Funktionsklasse *Regulation der zellulären Lokalisation* (PIN1, DACT1, VPS11, PRNP, COMMD1, FYN, RAB3A, NUP93, NUP153) zeigte. Einerseits könnte aus diesem Ergebnis hergeleitet werden, dass GRSF1 über die Interaktion mit diesen Proteinen an einer großen Anzahl von zellulären Transportprozessen beteiligt sein könnte. Tatsächlich ist GRSF1 an der Regulation der zellulären Lokalisation der lncRNA RMRP beteiligt, deren Transport zum Mitochondrium von GRSF1 über unbekannte Mechanismen reguliert wird.¹⁰⁴ Andererseits könnte aus den Ergebnissen der GO-Analyse geschlossen werden, dass die im Hefe-2-Hybrid Screen identifizierten Interaktionspartner die intrazelluläre Lokalisation von GRSF1 beeinflussen. Auch das ist ein interessantes Ergebnis.

Obwohl GRSF1 sowohl im Nukleus, im Zytoplasma und in den Mitochondrium lokalisiert wurde, ist unbekannt, ob und wie GRSF1 zwischen diesen zellulären Kompartimenten hin und her transportiert wird.⁷³

PIN1 und **DACT1** sind Proteine, die beide der Funktionsklasse Regulation der zellulären Lokalisation angehören (siehe Tabelle 1). Sie regulieren den Wnt-Signalweg positiv bzw. negativ. Das Enzym PIN1 bindet an phosphorylierte Serin/Threonin-Prolin (pSer/Thr-Pro) Motive und isomerisiert diese Aminosäurereste.¹⁵⁸ Mit dieser Isomerisierung induziert das Enzym eine Konformationsänderung in seinen Substraten.¹⁵⁸ Zu diesen zählt, neben p53, Cyclin D1, c-Jun, NFκB, c-myc, auch β-Catenin.^{159–163} Eine Bindung von PIN1 an ein pSer-Pro-Motiv im β-Catenin Protein blockiert, wahrscheinlich über eine Konformationsänderung des β-Catenin Proteins, dessen Bindung an das Adenomatous polyposis coli protein (APC).¹⁶¹ APC ist Teil des β-Catenin-abbauenden destruction complex, sodass es durch die blockierte Bindung von APC zu einer erhöhten Konzentration an zytoplasmatischem β-Catenin kommt, was dann in den Nukleus transloziert und dort die Transkription seiner Zielgene reguliert (siehe Abbildung 5).¹⁶¹ Auf der anderen Seite reguliert DACT1 den Wnt-Signalweg durch zwei verschiedene Mechanismen negativ: Einerseits verhindert DACT1 die Aktivierung der Wnt-Signalwegkaskade, indem es das Dishevelled (Dvl) Protein (Wnt-Rezeptor assoziierten Protein) dem lysosomalen Abbau zuführt.¹⁶⁴ Andererseits behindert DACT1 im Nukleus durch eine Inhibition der Lymphoid Enhancer Binding Factor 1 (LEF1)/ β-Catenin-Komplexbildung dessen transkriptionelle Aktivität.¹⁶⁵ Die Expression von GRSF1 wird durch den Wnt-Signalweg über unbekannte Mechanismen positiv reguliert, sodass GRSF1, als wichtiges Effektorprotein dieses Signalweges, eine entscheidende Rolle in der embryonalen Mausentwicklung spielt.¹¹⁰ Tatsächlich induziert ein mehr oder weniger spezifisches Expressionssilencing der GRSF1 mRNA (RNAi Technologie) Fehlentwicklungen im Rahmen der murinen Embryogenese.¹¹⁰ Im Widerspruch zu diesen Daten stehen jedoch die kürzlich erhaltenen Ergebnisse mit systemischen GRSF1 knockout Mäusen. Diese Tiere sind fertil, entwickeln sich normal und zeigen in Abwesenheit zusätzlicher Stimulationen keine strukturellen und funktionellen Auffälligkeiten. Langzeituntersuchungen haben weiterhin gezeigt, dass diese Tiere normal altern und keine veränderten Überlebensstatistiken aufweisen (Ufer, unpublished Data). Interessanterweise konnte an Position 244 der GRSF1 Aminosäurekette durch in silico Analysen ein pSer-Pro-Motiv identifiziert werden.¹⁶⁶ Dieses Bindungsmotiv von PIN1 deutet darauf hin, dass die Struktur des GRSF1 Proteins durch PIN1 verändert werden könnte.

Die prinzipielle Möglichkeit einer Proteinphosphorylierung von GRSF1 macht auch die im Hefemodell gezeigte Interaktion mit **DUSP1** interessant (siehe Abbildung 8). DUSP1 inaktiviert als Proteinphosphatase durch eine Dephosphorylierung die *Mitogen activated Protein-Kinase 1* (MAPK), die für zelluläre Prozesse wie Proliferation oder Differenzierung bedeutsam ist,¹⁶⁷ Die Interaktion mit DUSP1 könnte zum Beispiel zu einer Dephosphorylierung von GRSF1 führen, was eine Konformationsänderung von GRSF1 induzieren könnte.

Darüber hinaus wurden zwei Proteine der Kernmembran als potenzielle Interaktionspartner von GRSF1 identifiziert (siehe Abbildung 8). Sowohl **NUP153** als auch **NUP93** sind Teil des nukleären Porenkomplex (NPC), der die Kernmembran durchsetzt und aus ungefähr 30 verschiedenen Nukleoporinen aufgebaut ist.¹⁶⁸ Während NUP93 reichlich innerhalb der Innenseite der NPC vorkommt und für dessen Permeabilität wichtig ist, spielt NUP153 eine wichtige Rolle beim Export von RNAs und Proteinen.¹⁶⁸⁻¹⁷¹ Über die Interaktion von Exportin-5 und NUP153 wird beispielsweise der nukleäre Export des RBP *interleukin enhancer binding factor 3* (ILF3) vermittelt.¹⁷²

GRSF1 wurde sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma lokalisiert, ein Mechanismus für den nukleären Export ist bislang jedoch nicht bekannt. Während die anderen Mitglieder der hnRNP H/F Familie über ihre Glycin-reiche Domäne mit Transportin-1 interagieren und so aus dem Nukleus exportiert werden, weist GRSF1 keine Glycin-reiche Domäne auf.^{73,173} Der aktive nukleozytoplasmatische Transport vieler Proteine wird über ein Leucin-reiches, nukleäres Exportsignal (NES) vermittelt und findet über eine Interaktion von Exportinen mit NPC statt.¹⁷⁴ Eine *in silico* Analyse der Aminosäuresequenz von GRSF1 mit Hilfe von NetNES 1.1 ergab jedoch keinen Hinweis auf das Vorhandensein eines solchen Signals, so dass GRSF1 möglicherweise über andere Signalwege zwischen Zytoplasma und Kern ausgetauscht wird.¹⁷⁴

Die im Hefemodell gezeigten Interaktionen von GRSF1 mit Proteinen der Translationsmaschinerie, **GLTSCR2**, **EIF1B** und **RPL8**, stellten weitere Hinweise für die bekannte Regulation der Translation durch GRSF1 dar (siehe Abbildung 8). Dabei konnte die Protein-Protein Interaktion im Hefemodell in menschlichen Zellen nicht bestätigt werden, sondern zeigte für GLTSCR2 und RPL8 eine RNA-vermittelte Interaktion und für EIF1B keine Interaktion (siehe Abbildung 9). GLTSCR2, ursprünglich als Tumorsuppressorprotein identifiziert, übt eine wichtige Funktion in der Ribosomenbiogenese aus.¹⁷⁵ Kommt es zu einer gestörten Funktion der Ribosomen, wird das 5S Ribonukleopartikels (RNP) in das Ribosomen integriert.¹⁷⁶ Dieses inhibiert *mouse double minute 2 homolog* (MDM2) und sorgt so für eine Aktivierung von p53, was dann in einer Hemmung des Zellwachstums resultiert.¹⁷⁵ Das 5S RNP besteht aus den beiden ribosomalen Proteinen RPL5, RPL11 und der 5S rRNA.¹⁷⁵ Über unbekannte Mechanismen

reguliert GLTSCR2 die nukleäre Lokalisation von RPL11 und die Integration des 5S RNP in das Ribosomen.^{175,176} GRSF1 spielt eine wichtige Rolle in der mitochondrialen Ribosomenbiogenese, die Interaktion mit GLTSCR2 im Hefemodell könnte einen Hinweis für seine Rolle in der Regulation der zytoplasmatischen Ribosomenbiogenese darstellen.⁷⁵

GRSF1 vermittelt, wahrscheinlich über eine Interaktion mit dem Translationsinitiationskomplex, die positive, translationale Regulation der GPx4 mRNA.⁷⁹ Der genaue Mechanismus ist dabei unbekannt, sodass eine Interaktion von GRSF1 mit EIF1B, einem Protein der Translationsinitiation, Grundlage weiterer Nachforschungen hätte darstellen können.¹⁷⁷ Allerdings ergab sich in der durchgeführten Co-Immunopräzipitation kein Hinweis auf eine Interaktion von EIF1B und GRSF1 in Säugetierzellen.

Die Interaktion von GRSF1 mit der kleinen (40S) ribosomalen Untereinheit scheint der bedeutendste Mechanismus für die positive translationale Regulation der Use1 mRNA zu sein.⁷⁸ Im Hefemodell konnte die Interaktion von GRSF1 mit RPL8, einem Bestandteil der großen (60S) ribosomalen Untereinheit, gezeigt werden. Über die potenzielle Interaktion mit der 60S ribosomalen Untereinheit stände GRSF1 ein weiterer Mechanismus zur positiven translationalen Regulation seiner Substrate zur Verfügung.

5.2 Interaktion von GRSF1 mit CYC1 und ihre potenzielle Funktion

Im Hefemodell konnten eine Vielzahl neuer, potenzieller Interaktionspartner von GRSF1 identifiziert werden, von denen zwei auch im Säugetiermodell bestätigt werden konnten. Eines dieser Interaktionspartner war Cytochrom C1 (CYC1), das im mammalischen Modell mit der Alanin-reichen, E1-Domäne von GRSF1 interagiert (siehe Abbildung 10). Ein möglicher Erklärungsansatz für die widersprüchliche Information, dass CYC1 im Hefemodell an Δ E1-GRSF1 bindet (siehe Abbildung 8) und im Säugetiermodell die E1-Domäne für die Interaktion mit GRSF1 benötigt wird, bildet die Fusion von CYC1 mit dem GAL4-AD in Hefezellen bzw. der MYC-Markierung in humanen Zellen. Dadurch kann es zu unterschiedlichen Faltungen der Fusionsproteine im menschlichen bzw. im Hefesystem kommen. Dies könnte auch ein unterschiedliches Bindungsverhalten von GRSF1 und CYC1 in den unterschiedlichen Systemen zur Konsequenz haben.

CYC1 gehört zum Komplex III der Atmungskette und assoziiert mit Komplex I und IV zum supramolekularen Respirasom.¹⁷⁸ Das Respirasom baut über der inneren Mitochondrienmembran einen Protonengradienten auf, der dann von der FoF₁-ATPase zur Synthese von ATP genutzt wird.¹⁷⁹ In GRSF1 knockdown Zellen konnte eine gestörte Anordnung der Komplexe I, III, IV und

V beobachtet werden.⁷⁵ Diese wurde auf eine erniedrigte Synthese der *NADH Dehydrogenase Subunit (ND) 5* und *ND 6* Untereinheiten aus Komplex I sowie der Cytochrom b Untereinheit aus Komplex III zurück geführt.⁷⁵ Eventuell trägt auch die hier gezeigte Interaktion zwischen *CYC1* und *GRSF1* teilweise zu der gestörten Anordnung der Komplexe I, III, IV und V bei, wenn die Expression von *GRSF1* herunterreguliert ist. Die gestörte Anordnung der verschiedenen Komplexe resultierte allerdings nicht in einer verminderten Produktion von ATP in *GRSF1* knockout Zellen (Ufer, unpublizierte Daten).

CYC1 ist mit seinem C-Terminus durch ein Transmembransegment in der mitochondrialen Innenmembran verankert.¹⁸⁰ Mit der N-terminalen, Häm-haltigen Domäne sorgt es für eine Elektronenübertragung von Komplex III auf Komplex IV, indem es das Rieske-Protein oxidiert und Cytochrom C reduziert.¹⁸⁰ Während dieses Elektronentransfers sichert eine einwandfreie Interaktion von *CYC1* und Cytochrom C ihre optimale Orientierung und Distanz.^{181,182} Nach dem Elektronentransfer wird dann durch die schnelle Dissoziation beider Proteine der Elektronenfluss gewährleistet und ein Elektronenleck vermieden.^{181,182} Durch das Elektronenleck entstehen an Komplex III physiologisch der Großteil der mitochondrial entstehenden ROS.^{182,183} Daher kommt es bei einer gestörten Interaktion von *CYC1* und Cytochrom C, ausgelöst zum Beispiel durch die Freisetzung von Cytochrom C, neben einer gestörten Funktion der Atmungskette, auch zu einer exzessiven Produktion von ROS.^{182,183} Die Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran wird durch proapoptotische Stimuli induziert und führt im Zytosol zu einer Komplexbildung von Cytochrom C mit dem *apoptotic protease-activating factor 1* (*Apaf1*), der dann, als sogenanntes Apoptosom, im Zytoplasma verschiedene Caspasen aktiviert.¹⁸⁴ Eine dieser Caspasen ist die Caspase 3, wobei es bei der Spaltung eines ihrer Substrate, *CYC1*, im Sinne eines positiven Feedbacks zu einer vermehrten Freisetzung von Cytochrom C und dadurch zu einer vermehrten Aktivierung der Caspasen kommt.¹⁸²

Es konnte gezeigt werden, dass *GRSF1* die *GPx4* im Mausmodell positiv reguliert.⁷⁹ Bei einem Knockdown der *GRSF1*-Expression in sich entwickelnden Mausembryonen konnte außerdem eine erhöhte Anzahl apoptotischer Zellen entdeckt werden, was durch die positive Regulation der *GPx4*-Expression durch *GRSF1* erklärt wurde.⁷⁹ Tatsächlich führte eine Überexpression der *GPx4* in Mausembryonen, die mit Diquat, einem Induktor ROS-vermittelter Apoptose, behandelt wurden, zu einer gehemmten Freisetzung von Cytochrom C aus der Mitochondrienmembran.¹⁸⁵ ROS schädigen die Membranlipide des Mitochondriums und führen so zu einer gestörten mitochondrialen Funktion und Apoptose.^{186,187} Durch die Fähigkeit der *GPx4* oxidative Schäden an Cardiolipin, einem Mitochondrien-spezifischen Phospholipid, zu begrenzen, kann eine

Überexpression der GPx4 die mitochondriale Funktion aufrechterhalten und möglicherweise so die Apoptose unterdrücken.^{185,188,189}

Durch die positive, translationale Regulation der GPx4 ist GRSF1 ein wichtiger antiapoptotischer Faktor.⁷⁹ Durch *in silico* Analyse der 5' UTR von RNA-Sequenzen, die für apoptotische Proteine kodieren, konnten mit *B-cell lymphoma 2* (BCL2) und *Bcl-2-associated X protein* (BAX) zwei weitere Ziele für GRSF1 entdeckt werden.¹¹⁰ Durch die Interaktion mit der GPx4 mRNA und potentiell BAX und BCL2 mRNA reguliert GRSF1 die Apoptose auf RNA-Ebene.¹¹⁰ Die Interaktion mit CYC1 könnte einen Mechanismus für die GRSF1-vermittelte Regulation der Apoptose auf Proteinebene darstellen. Darüber hinaus könnte über eine Interaktion von GRSF1 mit CYC1 die Entstehung von ROS an Komplex III der Atmungskette reguliert werden.

5.3 Funktion der Interaktion von GRSF1 mit COMMD1

Das zweite mit GRSF1 im Hefe- und im Säugetiermodell interagierende Protein ist COMMD1. Dabei konnte in Säugetierzellen auch eine Interaktion von endogenem COMMD1 und GRSF1 nachgewiesen werden. COMMD1 gehört zur Familie der *copper metabolism gene mouse U2af1-rs1 region* (COMM) Proteine und wurde erstmals im Zusammenhang mit Kupfer Stoffwechselstörungen in Bedlington Terriern entdeckt.^{190,191} Die COMM-Proteinfamilie wird durch ihre COMM-Domäne am Carboxy-Ende charakterisiert und besteht aus 10 verschiedenen Proteinen, die in Säugetieren hoch konserviert sind.¹⁹¹ COMMD1 wird beim Menschen ubiquitär exprimiert und wurde im Zytosol und Nukleus lokalisiert, wobei für die nukleäre Lokalisation das nukleäre Exportsignal (NES) in seiner COMM-Domäne entscheidend ist.¹⁹¹⁻¹⁹³ Außerdem kolokalisierte COMMD1 mit Endosomenmarkern, dabei führt wahrscheinlich die Bindung mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat zu einer Verankerung von COMMD1 in der Endosomenmembran.^{142,191,192,194-196} Über seine COMM-Domäne kann COMMD1 dimerisieren und mit den anderen Mitgliedern der COMM-Familie interagieren.^{191,193,197} Darüber hinaus wechselwirkt COMMD1 mit weiteren Proteinen wie dem CFTR, dem δ -epithelialen Natriumkanal (δ ENaC) oder der NF κ B Untereinheit RELA.^{142,193,198} Allerdings ist die COMM-Domäne nicht für alle Protein-Protein-Interaktionen notwendig. Eine Bindung zwischen COMMD1 und dem Na-K-2Cl-Kotransporter (NKCC2) beispielsweise wird durch die N-terminale Domäne des Proteins vermittelt.¹⁹⁹

Wie genau COMMD1 an GRSF1 bindet, wurde hier nicht im Detail untersucht. Allerdings konnte gezeigt werden, dass für die COMMD1-GRSF1 Interaktion die Alanin-reiche N-terminalen Domäne von GRSF1 bedeutsam ist (siehe Abbildung 10). Ähnlich wie bei CYC1 könnte der

Widerspruch, dass COMMD1 Δ E1-GRSF1 im Hefemodell bindet, aber im Säugetiermodell die E1-Domäne von GRSF1 für seine Interaktion braucht, auf die unterschiedlichen Fusionsproteine, die im Hefe- und Säugetiermodell verwendet wurden, zurückgeführt werden. Durch die Bindung an CFTR, δ ENaC bzw. RELA reguliert COMMD1 die Ubiquitinylierung dieser Proteine.^{140,142,198} Bei dieser posttranslationalen Modifizierung wird Ubiquitin, ein 76 Aminosäuren langes Polypeptid, kovalent an Proteine konjugiert.^{200–202} Dafür wird zunächst das Ubiquitin durch Ubiquitin-aktivierende (E1) Enzyme aktiviert und dann durch Ubiquitin-konjugierende (E2) Enzyme auf Ubiquitin-Ligasen (E3) übertragen. Schlussendlich wird das aktivierte Ubiquitin durch E3-Enzyme an das zu ubiquitinylierende Protein angehängt.²⁰⁰ Dieses so angehängte Ubiquitin kann seinerseits ubiquitiniert werden, wobei durch Isopeptidbindungen der Lysine zwischen zwei Ubiquitinmolekülen eine Vielzahl von Ubiquitinketten angehängt werden können.¹⁴¹ In diesem Fall spricht man von Polyubiquitinylierung.¹⁴¹ Ubiquitin verfügt über sechs verschiedene Lysin-Reste, sodass K6, K11, K27, K33, K48 und K63 Verknüpfungen möglich sind. Während die Monoubiquitinylierung von Proteinen beispielsweise eine Rolle in der Regulation der DNA-Reparatur und Rezeptor-vermittelten Endozytose spielt, führt eine K48-verknüpfte Polyubiquitinylierung zum proteasomalen Abbau des ubiquitinylierten Proteins.^{202,203} Es konnte gezeigt werden, dass COMMD1 mit Cullin 2 interagiert, das zusammen mit *really interesting new gene* (RING) die Cullin-RING Ligasen, die zu den E3-Ligasen gehören, bilden.^{201,204–206} Im Nukleus reguliert COMMD1 über die Interaktion mit Cullin 2 die Ubiquitinylierung von RELA positiv, was zu einem proteasomalen Abbau von RELA führt.^{205,207} Dabei ist über die Struktur der COMMD1-vermittelten Ubiquitinylierung von RELA bislang nichts bekannt.²⁰⁸

Bisher konnte keine Ubiquitinylierung von GRSF1 nachgewiesen werden und auch hier konnte mittels Immunopräzipitation von GRSF1 aus HepG2 Zellen, in denen COMMD1 herunterreguliert war, kein ubiquitinyliertes GRSF1 identifiziert werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass ein *knockdown* von COMMD1 sich nicht signifikant auf die intrazelluläre Menge an GRSF1 auswirkt, was nahelegt, dass eine durch COMMD1-vermittelte proteasomale Degradation von GRSF1 vernachlässigbar ist (siehe Abbildung 12). Tatsächlich führt die COMMD1-stimulierte Ubiquitinylierung von RELA im Zytoplasma nicht zu einem proteasomalen Abbau, sondern zur nukleären Translokation von RELA.¹⁴⁰ Auch die COMMD1-abhängige Regulation der Ubiquitinylierung des δ ENaC bzw. CFTR führt nicht zur einem erhöhten proteasomalen Abbau dieser Ionenkanäle, sondern zu ihrer erniedrigten Zelloberflächenexpression bzw. erhöhten Stabilität.^{142,209}

Um die subzelluläre Lokalisation von GRSF1 zu untersuchen, analysierten wir mit Hilfe einer differentiellen Zentrifugation die subzelluläre Lokalisation von GRSF1. Diese Experimente

zeigten, dass GRSF1 bei einem knockdown von COMMD1 signifikant weniger im Mitochondrium lokalisiert werden konnte als in COMMD1 Wildtyp Zellen (siehe Abbildung 13). Dieses Ergebnis legte nahe, dass COMMD1 über einen unbekanntem Mechanismus die mitochondriale Lokalisation von GRSF1 blockiert. Dabei ist es interessant darüber zu spekulieren, welche biologische Bedeutung diese Regulation hat. COMMD1 wird durch eine K48-verknüpfte Polyubiquitinierung, die durch den *X-linked inhibitor of Apoptosis* (XIAP) und das *NmrA-like family domain-containing protein 1* (NMRAL1) vermittelt wird, negativ reguliert.^{195,210} XIAP ist eine E3-Ligase, die, durch die Hemmung von Caspasen, antiapoptotisch wirkt.²¹¹ Ähnliches gilt für NMRAL1, einem intrazellulären Redoxsensor, der bei niedrigen, intrazellulären NADPH-Konzentrationen an die *Argininosuccinate Synthase 1* (ASS1) bindet, und dadurch die Apoptose hemmt.²¹² Im Mausmodell konnte bereits gezeigt werden, dass GRSF1 eine antiapoptotische Funktion hat.⁷⁹ Durch die negative Regulation von COMMD1, vermittelt durch zwei wichtige antiapoptotische Proteine, XIAP und NMRAL1, akkumulieren weitere Indikatoren für eine Funktion von GRSF1 in der Apoptose menschlicher Zellen.

5.4 Die Rolle von GRSF1 in der zellulären Redoxhomöostase

Die zelluläre Redoxhomöostase ist definiert als Balance zwischen prooxidativen Vorgängen und effektiver antioxidativer Antwort. Zu den prooxidativen Substanzen zählen unter anderem die reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), zu denen Superoxid, Wasserstoffperoxid, das Hydroxylradikal, Singulett-Sauerstoff, Ozon, hypochlorige Säure, organische Peroxide und nicht-enzymatisch gebildete Oxidationsprodukte gezählt werden.¹²⁶ Zu den nicht-enzymatisch gebildeten Oxidationsprodukten gehören unter anderem auch die Isoprostane, die ein Oxidationsprodukt der Arachidonsäure sind und als solche einen Marker für oxidativen Stress darstellen.^{79,213} Über die positive Regulation der GPx4 Expression im Mausmodell verhindert GRSF1 die Bildung von Isoprostanen, da es die intermediär gebildeten Hydroperoxid-derivate der Arachidonsäure zu den entsprechenden Alkoholen reduziert.⁷⁹ Aus diesem Grund kann auf eine Beteiligung von GRSF1 an antioxidativen Prozessen in der Zelle geschlossen werden.⁷⁹ Im Gegensatz zu den erhöhten Isoprostanen bei knockdown von *Grsf1* im Mausmodell, zeigte sich bei einem knockout von GRSF1 in humanen embryonalen Nierenzellen (HEK-293) ein signifikant verringerter intrazellulärer ROS-Gehalt (siehe Abbildung 15).

Ein wichtiger zellulärer Sensor für intrazelluläre ROS sind die c-Jun N-terminalen Kinasen (JNK). JNK werden über weitere Kinasen letztendlich durch UV-Strahlung, Hitzeschock, osmotischen Stress oder Zytokine aktiviert und regulieren über eine Phosphorylierung der

Transkriptionsfaktoren c-Jun, *Activating Transcription Factor 2* (ATF2), p53 und *erythroblast transformation specific domain-containing protein 1* (ELK1) die Genexpression.¹³¹ Ein bekannter Inhibitor der basalen Aktivität von JNK ist dabei die Glutathion S-Transferase Pi (GSTP).¹³¹ Diese gehört zur Familie der Glutathion-Transferasen, die in der Zelle Glutathion auf geeignete Substrate übertragen. GSTP liegt als Komplex mit JNK vor, bei einem steigenden intrazellulären Gehalt an ROS dimerisiert GSTP und löst sich von JNK, sodass dieser dann phosphoryliert und damit aktiviert wird.¹³¹ Tatsächlich wirkte sich ein erniedrigter intrazellulärer ROS-Gehalt in GRSF1 knockout Zellen auf die Aktivierung von JNK aus. Dessen basale Aktivität in GRSF1 knockout Zellen war signifikant vermindert (siehe Abbildung 16).

Als nächstes sollte die Ursache für den erniedrigten intrazellulären ROS-Gehalt in GRSF1 knockout Zellen gefunden werden. Dabei gibt es eine Vielzahl an möglichen exogenen und endogenen Entstehungsorten von ROS. Während zu den exogenen Quellen von ROS Rauch, Luftverschmutzung, UV-Strahlung und γ -Strahlung zählen, entstehen ROS intrazellulär hauptsächlich in der Atmungskette oder als Nebenprodukt oxidierender Systeme.¹²⁶ Der Großteil der intrazellulären ROS entstehen im Komplex III der Atmungskette.^{182,183} Des Weiteren können bei den enzymatischen Reaktionen der Lipoxygenasen, Cyclooxygenasen (COX), Stickstoffmonoxidsynthasen (NOS) ROS als Nebenprodukt entstehen.^{150,214,215} Die Lipoxygenasen ALOX5 und ALOX15 katalysieren die Lipidoxidation der Arachidonsäure und tragen durch die dabei entstehenden Nebenprodukte zur intrazellulären Bildung von ROS bei.^{150,214,216} Auch die PTGS2 trägt zur Entstehung intrazellulärer ROS bei.²¹⁵ Die induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) produzieren Stickstoffmonoxid, das zu den reaktiven Stickstoffspezies (RNS) gezählt wird.²¹⁷ Durch die Reaktion von Stickstoffmonoxid mit Superoxid entsteht Peroxynitrit, welches den Schaden durch ROS potenziert und damit die katalytische Aktivität der iNOS mit der ROS Produktion verknüpft.^{214,218} Sowohl die ALOX5, die ALOX15, die PTGS2 und die iNOS wiesen in der Primärstruktur ihrer mRNA Guanin-reiche Abschnitte mit einem G-Score von 20 bis 41 auf (siehe Tabelle 3). Dabei konnte in knockout GRSF1 Zellen signifikant erhöhte Level an PTGS2 gemessen werden (siehe Abbildung 17). Ob sich die erhöhten zellulären Konzentrationen an PTGS2 mRNA auch auf der Proteinebene widerspiegeln, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht.

Neben den pro-oxidativen Enzymen spielen auch Antioxidantien und anti-oxidativ wirkende Enzyme für die zelluläre Redoxhomöostase eine wichtige Rolle. Zu den antioxidativen Enzymen gehören u.a. die Superoxiddismutasen (SOD), die Katalasen und Glutathionperoxidasen (GPx). Unter den humanen GPx-Isoformen sind vor allem die zytoplasmatisch vorkommenden GPx1 und GPx4 bedeutsam, da diese oxidierend wirkendes Wasserstoffperoxid und Lipidperoxide zu nicht-

oxidierend wirkenden Alkoholen reduzieren.^{219,220} Ein weiteres antioxidatives Enzym, das den Abbau von Wasserstoffperoxiden katalysiert, ist die Katalase.¹⁵⁷ Im Gegensatz dazu reduzieren die Superoxiddismutasen den intrazellulären ROS Gehalt, indem sie zytoplasmatisch (SOD1) oder mitochondrial (SOD2) Superoxid in Wasserstoffperoxid umwandeln, welches anschließend durch Katalasen zu Sauerstoff und Wasser disproportioniert werden kann.²¹⁴ In diesem Sinn ist die konzertierte Aktion von SOD und Katalasen eine Grundvoraussetzung für einen wirksamen antioxidativen Schutz der Zelle. Auch *Ferritin Heavy Chain* (FHC) spielt eine wichtige Rolle im Schutz vor oxidativem Schaden, indem es die Konzentration des intrazellulären Eisenspeicherproteins Ferritin erhöht und damit den Katalysator (freies Eisen) der Fenton Reaktion erniedrigt.^{145,214} Damit wird die Entstehung von ROS aus intrazellulären Peroxiden reduziert.^{145,214}

Vergleicht man den Phänotyp von SOD, GPx, Katalase und FHC knockout Mäusen zeigt sich, dass vor allem die SOD, GPx und FHC eine wichtige Rolle für die intrazelluläre Redoxhomöostase spielen. Eine funktionelle Inaktivierung der Gene, die für die SOD1 bzw. SOD2 kodieren, macht sich in einer deutlich verkürzten Lebensdauer bzw. einem perinatalen Tod bemerkbar. Im Gegensatz dazu führte eine Inaktivierung des Katalasegens nicht zu phänotypischen Veränderungen der Tiere.^{144,221,222} Darüber hinaus scheint die GPx4 von besonderer Bedeutung für die Embryonalentwicklung zu sein.^{147,189} Während Knockout-Tiere der übrigen Vertreter dieser Proteinfamilie keinen deutlichen Phänotyp zeigen, sind homozygote GPx4-Knockout-Tiere embryonal letal.^{147,189} Auch GPx4-Knockin-Mäuse, die eine katalytisch inaktive Variante der GPx4 homozygot exprimieren, sind embryonal letal.²²³ Dies weist darauf hin, dass die GPx4 zu diesem Zeitpunkt wichtige biologische Funktionen innehat.^{147,189,223} Durch die Abwesenheit von FHC in murinen knockout Embryonen kommt es zu einer gestörten Sequestrierung von Eisen und über die Fenton Reaktion zu einer massiven Produktion von ROS, die zum frühen embryonalen Tod führen.²²⁴ Auch die RNA-Sequenzen der Katalase, SOD1, GPx1, GPx4 und FHC enthielten Guanin-reiche Sequenzen mit einem G-Score zwischen 19 und 21 (siehe Tabelle 3). Allerdings konnten keine signifikanten Unterschiede in der RNA-Konzentration dieser antioxidativen Enzyme in GRSF1 knockout und Wildtyp Zellen gemessen werden (siehe Abbildung 17). An dieser Stelle wären sicher die Messung der Proteinkonzentration der untersuchten antioxidativen und oxidativen Proteine in GRSF1 knockout und Wildtyp Zellen aufschlussreich gewesen. Letztlich vermuteten wir, dass die erniedrigten ROS Level in GRSF1 knockout Zellen auf eine veränderte Funktion der Mitochondrien zurück gehen, die als wichtigste Quelle für ROS gelten. Innerhalb der Mitochondrien entsteht eine Vielzahl der ROS in der Atmungskette und bei der Herstellung von ATP.¹⁰⁹ ATP wird mittels der fünf Komplexe der Atmungskette, der Nikotinamid

Adeninindinukleotid (NADH) Dehydrogenase–Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex I), der Succinatdehydrogenase–Ubichinon Oxidoreduktase (Komplex II), der Ubichinon–Cytochrom C Oxidoreduktase (Komplex III), der Cytochrom C Oxidase (Komplex IV) und der ATP Synthase (Komplex V) sowie der kleinen Elektronenträger Ubichinon (Koenzym Q10) und Cytochrom C hergestellt.¹⁰⁹ Die Produktion von ATP läuft in zwei koordinierten Schritten ab: Als erstes werden Elektronen entlang der Komplexe zu molekularem Sauerstoff transportiert, was in der Entstehung von H₂O resultiert.¹⁰⁹ Parallel dazu werden Protonen von den Komplexen I, III und IV durch die innere Mitochondrienmembran gepumpt.¹⁰⁹ Der dabei entstehende Gradient wird von Komplex V zur Produktion von ATP genutzt.¹⁰⁹ Es konnte gezeigt werden, dass es in GRSF1 knockdown Zellen zu einer gestörten Anordnung der Komplexe I, III, IV und V der Atmungskette kommt.⁷⁵ Ein Erliegen der Atmungskette könnte als möglicher Grund für die erniedrigten ROS in GRSF1 knockout Zellen gesehen werden. Dagegen spricht zumindest teilweise, dass GRSF1 knockout Zellen nicht signifikant weniger ATP produzieren als GRSF1 Wildtyp Zellen (Ufer, unpublizierte Daten). Andererseits könnte eine entkoppelte Atmungskette in GRSF1 knockout Zellen natürlich auch durch einen gesteigerten Durchsatz der Atmungskette ausgeglichen werden.

Eine entscheidende Rolle in der mitochondrialen Bildung von ROS kommt CYC1 zu: Bei dem, durch CYC1-vermittelten Elektronentransfer von Komplex III auf Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette kommt es physiologischerweise zu einem Elektronenleck, das für einen Großteil der intrazellulär anfallenden ROS verantwortlich gemacht wird.^{180–183} In dieser Hinsicht ist es interessant darüber zu spekulieren, ob eine fehlende Interaktion von GRSF1 und CYC1 im knockout Modell Einfluss auf den CYC1 vermittelten Elektronentransport zwischen Komplex III und IV nimmt und ob diese fehlende Interaktion dann letztlich zu einer erniedrigten Konzentration an ROS führt.

5.5 Ausblick

In dieser Arbeit konnte mit COMMD1 ein neuer Interaktionspartner von GRSF1 identifiziert werden. Dieser bindet die E1-Domäne von GRSF1 und reguliert so, über einen unbekanntem Mechanismus, die Lokalisation von GRSF1 im Mitochondrium. Aufgrund der bisher bekannten Funktionen von COMMD1 scheint eine Regulation der Ubiquitylierung von GRSF1 der wahrscheinlichste Mechanismus zu sein. Daher sollten in einem nächsten Schritt zusätzliche Experimente durchgeführt werden, um dies zu beweisen. Interessant wäre hier sicherlich ein reziproker Ansatz, bei dem eine Immunopräzipitation von Ubiquitin aus COMMD1 Wildtyp und *knockdown* Zellen durchgeführt wird. Am Eluat könnte dann mit Hilfe von SDS Gelelektrophorese

und Westernblot GRSF1 nachgewiesen werden. Mittels densitometrischer Analyse könnte dann ein quantitativer Vergleich von GRSF1 Proteinkonzentrationen im Eluat der präzipitierten Wildtyp und COMMD1 *knockdown* Zellen angestellt werden und eine mögliche Regulation der Ubiquitinylierung von GRSF1 durch COMMD1 aufgedeckt werden.

Des Weiteren wird Gegenstand weiterer Nachforschung sein müssen, Näheres über die Funktion der blockierten Translokation von GRSF1 ins Mitochondrium herauszufinden. Ein guter Ansatzpunkt bietet hier sicherlich die Untersuchung von Proteinen, die die Expression von COMMD1 negativ regulieren. Mit NMRAL1 und XIAP, als positive Regulatoren der proteasomalen Degradation von COMMD1, stehen zwei antiapoptotische Proteine zur Verfügung. Hier wäre es von Interesse, vergleichende Apoptoseassays in Wildtyp und GRSF1 Knockout Zellen durchzuführen oder durch bekannte, Apoptose-induzierende Substanzen den Verlauf der Apoptose in Wildtyp und GRSF1 Knockout Zellen zu vergleichen.

Der zweite Teil meiner Arbeit beschäftigte sich mit der Rolle von GRSF1 in der zellulären Redoxhomöostase. In Abwesenheit von GRSF1 kam es zu einer erniedrigten Konzentration an ROS und einer verminderten Aktivierung von JNK. Dabei waren die RNA-Level wichtiger prooxidativer und antioxidativer Proteine nicht verändert, einzig die PTGS2-mRNA Level waren in Abwesenheit von GRSF1 signifikant erhöht. So konnte letztlich eine Beteiligung von GRSF1 an der zellulären Redoxhomöostase in menschlichen Zellen gezeigt werden, der genaue Mechanismus blieb aber unklar. Eine weiterführende Analyse der Proteinkonzentration der an der zellulären Redoxhomöostase beteiligten Proteine in GRSF1 knockout und Wildtyp Zellen, wäre sicherlich aufschlussreich.

Ein möglicher Erklärungsansatz für die erniedrigten ROS-Level bzw. erniedrigte JNK-Aktivierung wäre eine veränderte Funktion der Mitochondrien in GRSF1 knockout Zellen, eventuell durch die Interaktion von GRSF1 mit CYC1 oder durch eine gestörte GRSF1-vermittelte Funktion der Mitochondrien. Daher wäre ein wichtiges zukünftiges Projekt die umfassende Charakterisierung des Atmungszustandes von GRSF1 Wildtyp und knockout Zellen. Dabei könnte mittels Seahorse Assays die basale, inhibierte und stimulierte Sauerstoffverbrauchsrate von Wildtyp und knockout Zellen verglichen werden. So könnten direkte Rückschlüsse auf die Funktion von GRSF1 in der Atmungskette gezogen werden.

6 Literaturverzeichnis

1. Young, R. A. RNA Polymerase II. *Annual Review of Biochemistry* **60**, 689–715 (1991).
2. Murakami, K. *et al.* Architecture of an RNA Polymerase II Transcription Pre-Initiation Complex. *Science* **342**, 1238724 (2013).
3. Orphanides, G., Lagrange, T. & Reinberg, D. The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* **10**, 2657–2683 (1996).
4. Murre, C. *et al.* Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. *Cell* **58**, 537–544 (1989).
5. Struhl, K. Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **14**, 137–140 (1989).
6. Riethoven, J.-J. M. Regulatory Regions in DNA: Promoters, Enhancers, Silencers, and Insulators. in *Computational Biology of Transcription Factor Binding* 33–42 (Humana Press, Totowa, NJ, 2010). doi:10.1007/978-1-60761-854-6_3.
7. Ando, H., Hew, C. L. & Urano, A. Signal transduction pathways and transcription factors involved in the gonadotropin-releasing hormone-stimulated gonadotropin subunit gene expression. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **129**, 525–532 (2001).
8. Hansen, R. S., Gartler, S. M., Scott, C. R., Chen, S. H. & Laird, C. D. Methylation analysis of CGG sites in the CpG island of the human FMR1 gene. *Hum. Mol. Genet.* **1**, 571–578 (1992).
9. Strahl, B. D. & Allis, C. D. The language of covalent histone modifications. *Nature* **403**, 41 (2000).
10. Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The Biology of Chromatin Remodeling Complexes. *Annual Review of Biochemistry* **78**, 273–304 (2009).

11. Ramanathan, A., Robb, G. B. & Chan, S.-H. mRNA capping: biological functions and applications. *Nucleic Acids Res* **44**, 7511–7526 (2016).
12. Lewis, J. D., Görlich, D. & Mattaj, I. W. A yeast cap binding protein complex (yCBC) acts at an early step in pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Res* **24**, 3332–3336 (1996).
13. Gingras, A. C., Raught, B. & Sonenberg, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 913–963 (1999).
14. Muthukrishnan, S., Both, G. W., Furuichi, Y. & Shatkin, A. J. 5'-Terminal 7-methylguanosine in eukaryotic mRNA is required for translation. *Nature* **255**, 33–37 (1975).
15. Dávila López, M. & Samuelsson, T. Early evolution of histone mRNA 3' end processing. *RNA* **14**, 1–10 (2008).
16. Sharp, P. A. The discovery of split genes and RNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 279–281 (2005).
17. Lee, Y. & Rio, D. C. Mechanisms and Regulation of Alternative Pre-mRNA Splicing. *Annu Rev Biochem* **84**, 291–323 (2015).
18. Matera, A. G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat Rev Mol Cell Biol* **15**, 108–121 (2014).
19. Konarska, M. M., Grabowski, P. J., Padgett, R. A. & Sharp, P. A. Characterization of the branch site in lariat RNAs produced by splicing of mRNA precursors. *Nature* **313**, 552–557 (1985).
20. Early, P. *et al.* Two mRNAs can be produced from a single immunoglobulin μ gene by alternative RNA processing pathways. *Cell* **20**, 313–319 (1980).
21. Chang, H., Lim, J., Ha, M. & Kim, V. N. TAIL-seq: Genome-wide Determination of Poly(A) Tail Length and 3' End Modifications. *Molecular Cell* **53**, 1044–1052 (2014).

22. Marzluff, W. F., Wagner, E. J. & Duronio, R. J. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat Rev Genet* **9**, 843–854 (2008).
23. Pérez Cañadillas, J. M. & Varani, G. Recognition of GU-rich polyadenylation regulatory elements by human CstF-64 protein. *EMBO J* **22**, 2821–2830 (2003).
24. Colgan, D. F. & Manley, J. L. Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* **11**, 2755–2766 (1997).
25. Curinha, A., Braz, S. O., Pereira-Castro, I., Cruz, A. & Moreira, A. Implications of polyadenylation in health and disease. *Nucleus* **5**, 508–519 (2014).
26. Bienroth, S., Keller, W. & Wahle, E. Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J* **12**, 585–594 (1993).
27. Guhaniyogi, J. & Brewer, G. Regulation of mRNA stability in mammalian cells. *Gene* **265**, 11–23 (2001).
28. Katahira, J. Nuclear Export of Messenger RNA. *Genes (Basel)* **6**, 163–184 (2015).
29. Elkon, R., Ugalde, A. P. & Agami, R. Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function. *Nature Reviews Genetics* **14**, 496–506 (2013).
30. Baysal, B. E., Sharma, S., Hashemikhabir, S. & Janga, S. C. RNA Editing in Pathogenesis of Cancer. *Cancer Res* **77**, 3733–3739 (2017).
31. Valente, L. & Nishikura, K. ADAR Gene Family and A-to-I RNA Editing: Diverse Roles in Posttranscriptional Gene Regulation. in *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* vol. 79 299–338 (Academic Press, 2005).
32. Glisovic, T., Bachorik, J. L., Yong, J. & Dreyfuss, G. RNA-binding proteins and post-transcriptional gene regulation. *FEBS Letters* **582**, 1977–1986 (2008).
33. Tomaselli, S., Locatelli, F. & Gallo, A. The RNA editing enzymes ADARs: mechanism of action and human disease. *Cell Tissue Res* **356**, 527–532 (2014).

34. Higuchi, M. *et al.* RNA editing of AMPA receptor subunit GluR-B: A base-paired intron-exon structure determines position and efficiency. *Cell* **75**, 1361–1370 (1993).
35. Erkmann, J. A. & Kutay, U. Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp. Cell Res.* **296**, 12–20 (2004).
36. Buxbaum, A. R., Haimovich, G. & Singer, R. H. In the right place at the right time: visualizing and understanding mRNA localization. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**, 95–109 (2015).
37. Moor, A. E. *et al.* Global mRNA polarization regulates translation efficiency in the intestinal epithelium. *Science* **357**, 1299–1303 (2017).
38. Sonenberg, N. & Hinnebusch, A. G. Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* **136**, 731–745 (2009).
39. Jan, C. H., Williams, C. C. & Weissman, J. S. Principles of ER cotranslational translocation revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* **346**, 1257521 (2014).
40. Jackson, R. J., Hellen, C. U. T. & Pestova, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, nrm2838 (2010).
41. Gebert, L. F. R. & MacRae, I. J. Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 21–37 (2019).
42. Cannell, I. G., Kong, Y. W. & Bushell, M. How do microRNAs regulate gene expression? *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1224–1231 (2008).
43. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* **20**, 1885–1898 (2006).
44. Muckenthaler, M. U., Rivella, S., Hentze, M. W. & Galy, B. A Red Carpet for Iron Metabolism. *Cell* **168**, 344–361 (2017).

45. Hentze, M. W., Muckenthaler, M. U., Galy, B. & Camaschella, C. Two to Tango: Regulation of Mammalian Iron Metabolism. *Cell* **142**, 24–38 (2010).
46. Walden, W. E. *et al.* Structure of Dual Function Iron Regulatory Protein 1 Complexed with Ferritin IRE-RNA. *Science* **314**, 1903–1908 (2006).
47. Lykke-Andersen, S. & Jensen, T. H. Nonsense-mediated mRNA decay: an intricate machinery that shapes transcriptomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**, 665–677 (2015).
48. Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T. & Preiss, T. A brave new world of RNA-binding proteins. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 327–341 (2018).
49. Gerstberger, S., Hafner, M. & Tuschl, T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 829–845 (2014).
50. Lunde, B. M., Moore, C. & Varani, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 479–490 (2007).
51. Chen, Y. & Varani, G. Engineering RNA-binding proteins for biology. *FEBS J* **280**, 3734–3754 (2013).
52. Zhou, H., Mangelsdorf, M., Liu, J., Zhu, L. & Wu, J. Y. RNA-binding proteins in neurological diseases. *Sci China Life Sci* **57**, 432–444 (2014).
53. Maris, C., Dominguez, C. & Allain, F. H.-T. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. *FEBS Journal* **272**, 2118–2131 (2005).
54. Cléry, A., Blatter, M. & Allain, F. H.-T. RNA recognition motifs: boring? Not quite. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **18**, 290–298 (2008).
55. Thandapani, P., O’Connor, T. R., Bailey, T. L. & Richard, S. Defining the RGG/RG Motif. *Molecular Cell* **50**, 613–623 (2013).
56. Gebauer, F., Schwarzl, T., Valcárcel, J. & Hentze, M. W. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **22**, 185–198 (2021).

57. Lukong, K. E., Chang, K., Khandjian, E. W. & Richard, S. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Trends Genet.* **24**, 416–425 (2008).
58. Kremer, E. J. *et al.* Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)_n. *Science* **252**, 1711–1714 (1991).
59. Kim, M., Bellini, M. & Ceman, S. Fragile X mental retardation protein FMRP binds mRNAs in the nucleus. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 214–228 (2009).
60. Chen, E. & Joseph, S. Fragile X Mental Retardation Protein: A Paradigm for Translational Control by RNA-Binding Proteins. *Biochimie* **114**, 147–154 (2015).
61. Feng, Y. *et al.* Fragile X Mental Retardation Protein: Nucleocytoplasmic Shuttling and Association with Somatodendritic Ribosomes. *J. Neurosci.* **17**, 1539–1547 (1997).
62. Darnell, J. C. *et al.* Fragile X mental retardation protein targets G quartet mRNAs important for neuronal function. *Cell* **107**, 489–499 (2001).
63. Kidd, S. A. *et al.* Fragile X Syndrome: A Review of Associated Medical Problems. *Pediatrics* **134**, 995–1005 (2014).
64. Han, S. P., Tang, Y. H. & Smith, R. Functional diversity of the hnRNPs: past, present and perspectives. *Biochemical Journal* **430**, 379–392 (2010).
65. Dominguez, C. & Allain, F. H.-T. NMR structure of the three quasi RNA recognition motifs (qRRMs) of human hnRNP F and interaction studies with Bcl-x G-tract RNA: a novel mode of RNA recognition. *Nucleic Acids Res* **34**, 3634–3645 (2006).
66. Dominguez, C., Fiset, J.-F., Chabot, B. & Allain, F. H.-T. Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 853–861 (2010).
67. Schaub, M. C., Lopez, S. R. & Caputi, M. Members of the Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein H Family Activate Splicing of an HIV-1 Splicing Substrate by

- Promoting Formation of ATP-dependent Spliceosomal Complexes. *J. Biol. Chem.* **282**, 13617–13626 (2007).
68. Van Dusen, C. M., Yee, L., McNally, L. M. & McNally, M. T. A Glycine-Rich Domain of hnRNP H/F Promotes Nucleocytoplasmic Shuttling and Nuclear Import through an Interaction with Transportin 1. *Mol Cell Biol* **30**, 2552–2562 (2010).
69. Decorsière, A., Cayrel, A., Vagner, S. & Millevoi, S. Essential role for the interaction between hnRNP H/F and a G quadruplex in maintaining p53 pre-mRNA 3'-end processing and function during DNA damage. *Genes Dev* **25**, 220–225 (2011).
70. Arhin, G. K., Boots, M., Bagga, P. S., Milcarek, C. & Wilusz, J. Downstream sequence elements with different affinities for the hnRNP H/H' protein influence the processing efficiency of mammalian polyadenylation signals. *Nucleic Acids Res* **30**, 1842–1850 (2002).
71. Zarudnaya, M. I., Kolomiets, I. M., Potyahaylo, A. L. & Hovorun, D. M. Downstream elements of mammalian pre-mRNA polyadenylation signals: primary, secondary and higher-order structures. *Nucleic Acids Res.* **31**, 1375–1386 (2003).
72. Matunis, M. J., Xing, J. & Dreyfuss, G. The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization. *Nucleic Acids Res* **22**, 1059–1067 (1994).
73. Ufer, C. The biology of the RNA binding protein guanine-rich sequence binding factor 1. *Curr. Protein Pept. Sci.* **13**, 347–357 (2012).
74. Jourdain, A. A. *et al.* GRSF1 Regulates RNA Processing in Mitochondrial RNA Granules. *Cell Metab* **17**, 399–410 (2013).
75. Antonicka, H., Sasarman, F., Nishimura, T., Paupe, V. & Shoubbridge, E. A. The Mitochondrial RNA-Binding Protein GRSF1 Localizes to RNA Granules and Is Required

- for Posttranscriptional Mitochondrial Gene Expression. *Cell Metabolism* **17**, 386–398 (2013).
76. Hedera, P. *et al.* Familial mesial temporal lobe epilepsy maps to chromosome 4q13.2-q21.3. *Neurology* **68**, 2107–2112 (2007).
77. Striano, P. *et al.* Familial mesial temporal lobe epilepsy (FMTLE). *J Neurol* **255**, 16–23 (2008).
78. Nieradka, A. *et al.* Grsf1-Induced Translation of the SNARE Protein Use1 Is Required for Expansion of the Erythroid Compartment. *PLoS One* **9**, (2014).
79. Ufer, C. *et al.* Translational regulation of glutathione peroxidase 4 expression through guanine-rich sequence-binding factor 1 is essential for embryonic brain development. *Genes Dev* **22**, 1838–1850 (2008).
80. Garfinkel, M. S. & Katze, M. G. Translational control by influenza virus. Selective translation is mediated by sequences within the viral mRNA 5'-untranslated region. *J. Biol. Chem.* **268**, 22223–22226 (1993).
81. Huppert, J. L., Bugaut, A., Kumari, S. & Balasubramanian, S. G-quadruplexes: the beginning and end of UTRs. *Nucleic Acids Res* **36**, 6260–6268 (2008).
82. Kumari, S., Bugaut, A., Huppert, J. L. & Balasubramanian, S. An RNA G-quadruplex in the 5' UTR of the NRAS proto-oncogene modulates translation. *Nat Chem Biol* **3**, 218–221 (2007).
83. König, S. L. B., Evans, A. C. & Huppert, J. L. Seven essential questions on G-quadruplexes. *Biomol Concepts* **1**, 197–213 (2010).
84. Gilmore, T. D. NF- κ B, KBF1, dorsal, and related matters. *Cell* **62**, 841–843 (1990).
85. P A Baeuerle & Henkel, and T. Function and Activation of NF-kappaB in the Immune System. *Annual Review of Immunology* **12**, 141–179 (1994).

86. Gilmore, T. D. Introduction to NF- κ B: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684 (2006).
87. Qian, Z. & Wilusz, J. GRSF-1: a poly(A)⁺ mRNA binding protein which interacts with a conserved G-rich element. *Nucleic Acids Res* **22**, 2334–2343 (1994).
88. Park, Y. W., Wilusz, J. & Katze, M. G. Regulation of eukaryotic protein synthesis: Selective influenza viral mRNA translation is mediated by the cellular RNA-binding protein GRSF-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 6694–6699 (1999).
89. Ursini, F., Maiorino, M. & Gregolin, C. The selenoenzyme phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. *Biochim. Biophys. Acta* **839**, 62–70 (1985).
90. Schneider, M. *et al.* Mitochondrial glutathione peroxidase 4 disruption causes male infertility. *The FASEB Journal* **23**, 3233–3242 (2009).
91. Belgareh-Touzé, N. *et al.* Yeast functional analysis: identification of two essential genes involved in ER to Golgi trafficking. *Traffic* **4**, 607–617 (2003).
92. Dilcher, M. *et al.* Use1p is a yeast SNARE protein required for retrograde traffic to the ER. *EMBO J.* **22**, 3664–3674 (2003).
93. Lee, M. C. S., Miller, E. A., Goldberg, J., Orci, L. & Schekman, R. Bi-directional protein transport between the ER and Golgi. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 87–123 (2004).
94. Bonifacino, J. S. & Glick, B. S. The mechanisms of vesicle budding and fusion. *Cell* **116**, 153–166 (2004).
95. Iashkulov, K. B. *et al.* [Isolation of influenza virus A (Orthomyxoviridae, Influenza A virus), Dhori virus (Orthomyxoviridae, Thogotovirus), and Newcastle's disease virus (Paromyxoviridae, Avulavirus) on the Malyi Zhemchuzhnyi Island in the north-western area of the Caspian Sea]. *Vopr Virusol* **53**, 34–38 (2008).
96. Gale, M., Tan, S.-L. & Katze, M. G. Translational Control of Viral Gene Expression in Eukaryotes. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 239–280 (2000).

97. Kash, J. C. *et al.* Selective Translation of Eukaryotic mRNAs: Functional Molecular Analysis of GRSF-1, a Positive Regulator of Influenza Virus Protein Synthesis. *J Virol* **76**, 10417–10426 (2002).
98. Jablonski, J. A. & Caputi, M. Role of Cellular RNA Processing Factors in Human Immunodeficiency Virus Type 1 mRNA Metabolism, Replication, and Infectivity. *J Virol* **83**, 981–992 (2009).
99. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).
100. A Tzagoloff & Macino, and G. Mitochondrial Genes and Translation Products. *Annual Review of Biochemistry* **48**, 419–439 (1979).
101. Buchan, J. R. & Parker, R. Eukaryotic Stress Granules: The Ins and Out of Translation. *Mol Cell* **36**, 932 (2009).
102. Iborra, F. J., Kimura, H. & Cook, P. R. The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol* **2**, 9 (2004).
103. Holzmann, J. *et al.* RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell* **135**, 462–474 (2008).
104. Noh, J. H. *et al.* HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP. *Genes Dev* **30**, 1224–1239 (2016).
105. Schmitt, M. E. & Clayton, D. A. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **13**, 7935–7941 (1993).
106. Smirnov, A., Entelis, N., Martin, R. P. & Tarassov, I. Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18. *Genes Dev.* **25**, 1289–1305 (2011).
107. Chang, D. D. & Clayton, D. A. A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science* **235**, 1178–1184 (1987).

108. Chang, D. D. & Clayton, D. A. Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell* **56**, 131–139 (1989).
109. DiMauro, S. & Schon, E. A. Mitochondrial Respiratory-Chain Diseases. *New England Journal of Medicine* **348**, 2656–2668 (2003).
110. Lickert, H. *et al.* Dissecting Wnt/ β -catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos. *Development* **132**, 2599–2609 (2005).
111. Sampath, P. *et al.* A Hierarchical Network Controls Protein Translation during Murine Embryonic Stem Cell Self-Renewal and Differentiation. *Cell Stem Cell* **2**, 448–460 (2008).
112. Clevers, H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* **127**, 469–480 (2006).
113. Bhanot, P. *et al.* A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225–230 (1996).
114. The vertebrate adhesive junction proteins beta-catenin and plakoglobin and the *Drosophila* segment polarity gene armadillo form a multigene family with similar properties. *J Cell Biol* **118**, 681–691 (1992).
115. Behrens, J. *et al.* Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature* **382**, 638–642 (1996).
116. Liu, A. & Joyner, A. L. Early anterior/posterior patterning of the midbrain and cerebellum. *Annu. Rev. Neurosci.* **24**, 869–896 (2001).
117. Cartharius, K. *et al.* MatInspector and beyond: promoter analysis based on transcription factor binding sites. *Bioinformatics* **21**, 2933–2942 (2005).
118. Laplante, M. & Sabatini, D. M. mTOR signaling at a glance. *Journal of Cell Science* **122**, 3589–3594 (2009).

119. Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M. N. TOR signaling in growth and metabolism. *Cell* **124**, 471–484 (2006).
120. Magnuson, B., Ekim, B. & Fingar, D. C. Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochemical Journal* **441**, 1–21 (2012).
121. Richter, J. D. & Sonenberg, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. *Nature* **433**, 477–480 (2005).
122. Chang, W. Y. & Stanford, W. L. Translational Control: A New Dimension in Embryonic Stem Cell Network Analysis. *Cell Stem Cell* **2**, 410–412 (2008).
123. Jiao, X., Trifillis, P. & Kiledjian, M. Identification of target messenger RNA substrates for the murine deleted in azoospermia-like RNA-binding protein. *Biol. Reprod.* **66**, 475–485 (2002).
124. Circu, M. L. & Aw, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radical Biology and Medicine* **48**, 749–762 (2010).
125. Lo, Y. Y. C., Wong, J. M. S. & Cruz, T. F. Reactive Oxygen Species Mediate Cytokine Activation of c-Jun NH2-terminal Kinases. *J. Biol. Chem.* **271**, 15703–15707 (1996).
126. Nathan, C. & Cunningham-Bussel, A. Beyond oxidative stress: an immunologist’s guide to reactive oxygen species. *Nat Rev Immunol* **13**, 349–361 (2013).
127. Fridovich, I. Superoxide Dismutases. *Annual Review of Biochemistry* **44**, 147–159 (1975).
128. Sunde, R. A. & Hoekstra, W. G. Structure, Synthesis and Function of Glutathione Peroxidase. *Nutrition Reviews* **38**, 265–273 (1980).
129. Finkel, T. Signal transduction by reactive oxygen species. *The Journal of Cell Biology* **194**, 7–15 (2011).
130. Matsuzawa, A. & Ichijo, H. Redox control of cell fate by MAP kinase: physiological roles of ASK1-MAP kinase pathway in stress signaling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1780**, 1325–1336 (2008).

131. Adler, V. *et al.* Regulation of JNK signaling by GSTp. *EMBO J.* **18**, 1321–1334 (1999).
132. Cok, S. J., Acton, S. J., Sexton, A. E. & Morrison, A. R. Identification of RNA-binding Proteins in RAW 264.7 Cells That Recognize a Lipopolysaccharide-responsive Element in the 3-Untranslated Region of the Murine Cyclooxygenase-2 mRNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 8196–8205 (2004).
133. Lin, S. *et al.* Down-Regulation of Cyclin D1 Expression by Prostaglandin A2 Is Mediated by Enhanced Cyclin D1 mRNA Turnover. *Mol Cell Biol* **20**, 7903–7913 (2000).
134. Lal, A. *et al.* Posttranscriptional Derepression of GADD45a by Genotoxic Stress. *Molecular Cell* **22**, 117–128 (2006).
135. Abdelmohsen, K., Kuwano, Y., Kim, H. H. & Gorospe, M. Posttranscriptional gene regulation by RNA-binding proteins during oxidative stress: implications for cellular senescence. *Biol. Chem.* **389**, 243–255 (2008).
136. Sattler, W., Mohr, D. & Stocker, R. Rapid isolation of lipoproteins and assessment of their peroxidation by high-performance liquid chromatography postcolumn chemiluminescence. *Meth. Enzymol.* **233**, 469–489 (1994).
137. Thomas, J. P., Geiger, P. G., Maiorino, M., Ursini, F. & Girotti, A. W. Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* **1045**, 252–260 (1990).
138. Landthaler, M. *et al.* Molecular characterization of human Argonaute-containing ribonucleoprotein complexes and their bound target mRNAs. *RNA* **14**, 2580–2596 (2008).
139. Garcia, B. A. *et al.* Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4. *J. Biol. Chem.* **282**, 7641–7655 (2007).
140. Thoms, H. C. *et al.* Nucleolar Targeting of RelA(p65) Is Regulated by COMMD1-Dependent Ubiquitination. *Cancer Res* **70**, 139–149 (2010).

141. Chen, Z. J. & Sun, L. J. Nonproteolytic Functions of Ubiquitin in Cell Signaling. *Molecular Cell* **33**, 275–286 (2009).
142. Dré villon, L. *et al.* COMMD1-Mediated Ubiquitination Regulates CFTR Trafficking. *PLoS One* **6**, (2011).
143. Ray, P. D., Huang, B.-W. & Tsuji, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell Signal* **24**, 981–990 (2012).
144. Ho, Y.-S., Xiong, Y., Ma, W., Spector, A. & Ho, D. S. Mice Lacking Catalase Develop Normally but Show Differential Sensitivity to Oxidant Tissue Injury. *J. Biol. Chem.* **279**, 32804–32812 (2004).
145. Pham, C. G. *et al.* Ferritin Heavy Chain Upregulation by NF- κ B Inhibits TNF α -Induced Apoptosis by Suppressing Reactive Oxygen Species. *Cell* **119**, 529–542 (2004).
146. Brigelius-Flohé, R. & Maiorino, M. Glutathione peroxidases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1830**, 3289–3303 (2013).
147. Yant, L. J. *et al.* The selenoprotein GPX4 is essential for mouse development and protects from radiation and oxidative damage insults. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 496–502 (2003).
148. Kikin, O., D’Antonio, L. & Bagga, P. S. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. *Nucleic Acids Res* **34**, W676–W682 (2006).
149. Xia, Y. & Zweier, J. L. Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages. *PNAS* **94**, 6954–6958 (1997).
150. Schweiger, D., Fürstenberger, G. & Krieg, P. Inducible expression of 15-lipoxygenase-2 and 8-lipoxygenase inhibits cell growth via common signaling pathways. *J. Lipid Res.* **48**, 553–564 (2007).
151. Cho, K.-J., Seo, J.-M. & Kim, J.-H. Bioactive Lipoxygenase Metabolites Stimulation of NADPH Oxidases and Reactive Oxygen Species. *Mol Cells* **32**, 1–5 (2011).

152. Kim, C. & Kim*, J.-Y. K. & J.-H. Cytosolic phospholipase A2, lipoxygenase metabolites, and reactive oxygen species. *BMB Reports* **41**, 555–559 (2008).
153. Ivanov, I., Kuhn, H. & Heydeck, D. Structural and functional biology of arachidonic acid 15-lipoxygenase-1 (ALOX15). *Gene* **573**, 1–32 (2015).
154. Fitzpatrick, F. A. Cyclooxygenase Enzymes: Regulation and Function. *Current Pharmaceutical Design* <http://www.eurekaselect.com/62065/article> (2004).
155. Rowe G T, Manson N H, Caplan M, & Hess M L. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cyclooxygenase pathway. *Circulation Research* **53**, 584–591 (1983).
156. Free radical-lipid interactions and their pathological consequences - ScienceDirect. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/016378279390006I>.
157. Takeuchi, A. *et al.* A human erythrocyte-derived growth-promoting factor with a wide target cell spectrum: identification as catalase. *Cancer Res.* **55**, 1586–1589 (1995).
158. Ding, Q. *et al.* Down-regulation of Myeloid Cell Leukemia-1 through Inhibiting Erk/Pin 1 Pathway by Sorafenib Facilitates Chemosensitization in Breast Cancer. *Cancer Res* **68**, 6109–6117 (2008).
159. Ryo, A. *et al.* Regulation of NF-kappaB signaling by Pin1-dependent prolyl isomerization and ubiquitin-mediated proteolysis of p65/RelA. *Mol. Cell* **12**, 1413–1426 (2003).
160. Zheng, H. *et al.* The prolyl isomerase Pin1 is a regulator of p53 in genotoxic response. *Nature* **419**, 849–853 (2002).
161. Ryo, A., Nakamura, M., Wulf, G., Liou, Y. C. & Lu, K. P. Pin1 regulates turnover and subcellular localization of beta-catenin by inhibiting its interaction with APC. *Nat. Cell Biol.* **3**, 793–801 (2001).

162. Wulf, G. M. *et al.* Pin1 is overexpressed in breast cancer and cooperates with Ras signaling in increasing the transcriptional activity of c-Jun towards cyclin D1. *The EMBO Journal* **20**, 3459–3472 (2001).
163. Yeh, E. *et al.* A signalling pathway controlling c-Myc degradation that impacts oncogenic transformation of human cells. *Nature Cell Biology* **6**, 308 (2004).
164. Zhang, L., Gao, X., Wen, J., Ning, Y. & Chen, Y.-G. Dapper 1 Antagonizes Wnt Signaling by Promoting Dishevelled Degradation. *J. Biol. Chem.* **281**, 8607–8612 (2006).
165. Gao, X. *et al.* Dapper1 Is a Nucleocytoplasmic Shuttling Protein That Negatively Modulates Wnt Signaling in the Nucleus. *J. Biol. Chem.* **283**, 35679–35688 (2008).
166. Mayya, V. *et al.* Quantitative Phosphoproteomic Analysis of T Cell Receptor Signaling Reveals System-Wide Modulation of Protein-Protein Interactions. *Sci. Signal.* **2**, ra46–ra46 (2009).
167. Sun, H., Charles, C. H., Lau, L. F. & Tonks, N. K. MKP-1 (3CH134), an immediate early gene product, is a dual specificity phosphatase that dephosphorylates MAP kinase in vivo. *Cell* **75**, 487–493 (1993).
168. Vollmer, B. & Antonin, W. The diverse roles of the Nup93/Nic96 complex proteins – structural scaffolds of the nuclear pore complex with additional cellular functions. *Biological Chemistry* **395**, 515–528 (2014).
169. Hawryluk-Gara, L. A., Shibuya, E. K. & Wozniak, R. W. Vertebrate Nup53 Interacts with the Nuclear Lamina and Is Required for the Assembly of a Nup93-containing Complex. *Mol Biol Cell* **16**, 2382–2394 (2005).
170. Galy, V., Mattaj, I. W. & Askjaer, P. *Caenorhabditis elegans* nucleoporins Nup93 and Nup205 determine the limit of nuclear pore complex size exclusion in vivo. *Mol. Biol. Cell* **14**, 5104–5115 (2003).

171. Ullman, K. S., Shah, S., Powers, M. A. & Forbes, D. J. The nucleoporin nup153 plays a critical role in multiple types of nuclear export. *Mol. Biol. Cell* **10**, 649–664 (1999).
172. Brownawell, A. M. & Macara, I. G. Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol* **156**, 53–64 (2002).
173. Dusen, C. M. V., Yee, L., McNally, L. M. & McNally, M. T. A Glycine-Rich Domain of hnRNP H/F Promotes Nucleocytoplasmic Shuttling and Nuclear Import through an Interaction with Transportin 1. *Mol. Cell. Biol.* **30**, 2552–2562 (2010).
174. la Cour, T. *et al.* Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Eng Des Sel* **17**, 527–536 (2004).
175. Sloan, K. E., Bohnsack, M. T. & Watkins, N. J. The 5S RNP Couples p53 Homeostasis to Ribosome Biogenesis and Nucleolar Stress. *Cell Rep* **5**, 237–247 (2013).
176. Sasaki, M. *et al.* Regulation of the MDM2-P53 pathway and tumor growth by PICT1 via nucleolar RPL11. *Nat Med* **17**, 944–951 (2011).
177. Sinvani, H. *et al.* Translational Tolerance of Mitochondrial Genes to Metabolic Energy Stress Involves TISU and eIF1-eIF4GI Cooperation in Start Codon Selection. *Cell Metabolism* **21**, 479–492 (2015).
178. Schägger, H. *et al.* Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I. *J. Biol. Chem.* **279**, 36349–36353 (2004).
179. Moreno-Lastres, D. *et al.* Mitochondrial Complex I Plays an Essential Role in Human Respirasome Assembly. *Cell Metabolism* **15**, 324–335 (2012).
180. Hunte, C., Palsdottir, H. & Trumpower, B. L. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Letters* **545**, 39–46 (2003).
181. Crofts, A. R. The cytochrome bc1 complex: function in the context of structure. *Annu. Rev. Physiol.* **66**, 689–733 (2004).

182. Zhu, Y. *et al.* Caspase cleavage of cytochrome c1 disrupts mitochondrial function and enhances cytochrome c release. *Cell Res* **22**, 127–141 (2012).
183. Zhao, Y., Wang, Z.-B. & Xu, J.-X. Effect of Cytochrome c on the Generation and Elimination of O and H₂O₂ in Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 2356–2360 (2003).
184. Zou, H., Li, Y., Liu, X. & Wang, X. An APAF-1·Cytochrome c Multimeric Complex Is a Functional Apoptosome That Activates Procaspase-9. *J. Biol. Chem.* **274**, 11549–11556 (1999).
185. Ran, Q. *et al.* Transgenic Mice Overexpressing Glutathione Peroxidase 4 Are Protected against Oxidative Stress-induced Apoptosis. *J. Biol. Chem.* **279**, 55137–55146 (2004).
186. Ott, M., Robertson, J. D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B. & Orrenius, S. Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 1259–1263 (2002).
187. Paradies, G., Petrosillo, G., Pistolese, M. & Ruggiero, F. M. Reactive oxygen species affect mitochondrial electron transport complex I activity through oxidative cardiolipin damage. *Gene* **286**, 135–141 (2002).
188. Imai, H. & Nakagawa, Y. Biological significance of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx, GPx4) in mammalian cells. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 145–169 (2003).
189. Yoo, S.-E. *et al.* Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain. *Free Radical Biology and Medicine* **52**, 1820–1827 (2012).
190. van De Sluis, B., Rothuizen, J., Pearson, P. L., van Oost, B. A. & Wijmenga, C. Identification of a new copper metabolism gene by positional cloning in a purebred dog population. *Hum. Mol. Genet.* **11**, 165–173 (2002).
191. Burstein, E. *et al.* COMMD Proteins, a Novel Family of Structural and Functional Homologs of MURR1. *J. Biol. Chem.* **280**, 22222–22232 (2005).

192. Muller, P. A. J. *et al.* Nuclear-Cytosolic Transport of COMMD1 Regulates NF- κ B and HIF-1 Activity. *Traffic* **10**, 514–527 (2009).
193. de Bie, P. *et al.* Characterization of COMMD protein–protein interactions in NF- κ B signalling. *Biochem J* **398**, 63–71 (2006).
194. Klomp, A. E. M., Sluis, B. van de, Klomp, L. W. J. & Wijmenga, C. The ubiquitously expressed MURR1 protein is absent in canine copper toxicosis. *Journal of Hepatology* **39**, 703–709 (2003).
195. Burstein, E. *et al.* A novel role for XIAP in copper homeostasis through regulation of MURR1. *The EMBO Journal* **23**, 244–254 (2004).
196. Burkhead, J. L., Morgan, C. T., Shinde, U., Haddock, G. & Lutsenko, S. COMMD1 Forms Oligomeric Complexes Targeted to the Endocytic Membranes via Specific Interactions with Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate. *J Biol Chem* **284**, 696–707 (2009).
197. Narindrasorasak, S., Kulkarni, P., Deschamps, P., She, Y.-M. & Sarkar, B. Characterization and copper binding properties of human COMMD1 (MURR1). *Biochemistry* **46**, 3116–3128 (2007).
198. Chang, T., Ke, Y., Ly, K. & McDonald, F. J. COMMD1 regulates the delta epithelial sodium channel (δ ENaC) through trafficking and ubiquitination. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **411**, 506–511 (2011).
199. Smith, L., Litman, P. & Liedtke, C. M. COMMD1 interacts with the COOH terminus of NKCC1 in Calu-3 airway epithelial cells to modulate NKCC1 ubiquitination. *Am J Physiol Cell Physiol* **305**, C133–C146 (2013).
200. Pickart, C. M. Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 503–533 (2001).
201. Petroski, M. D. & Deshaies, R. J. Function and regulation of cullin-RING ubiquitin ligases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 9–20 (2005).

202. Ikeda, F. & Dikic, I. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' review series. *EMBO Rep.* **9**, 536–542 (2008).
203. Schwartz, D. C. & Hochstrasser, M. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 321–328 (2003).
204. Mao, X. *et al.* COMMD1 (Copper Metabolism MURR1 Domain-containing Protein 1) Regulates Cullin RING Ligases by Preventing CAND1 (Cullin-associated Nedd8-dissociated Protein 1) Binding. *J Biol Chem* **286**, 32355–32365 (2011).
205. Maine, G. N., Mao, X., Komarck, C. M. & Burstein, E. COMMD1 promotes the ubiquitination of NF- κ B subunits through a cullin-containing ubiquitin ligase. *EMBO J* **26**, 436–447 (2007).
206. Ganesh, L. *et al.* The gene product Murr1 restricts HIV-1 replication in resting CD4+ lymphocytes. *Nature* **426**, 853–857 (2003).
207. Geng, H., Wittwer, T., Dittrich-Breiholz, O., Kracht, M. & Schmitz, M. L. Phosphorylation of NF- κ B p65 at Ser468 controls its COMMD1-dependent ubiquitination and target gene-specific proteasomal elimination. *EMBO Rep* **10**, 381–386 (2009).
208. Xu, H., You, M., Shi, H. & Hou, Y. Ubiquitin-mediated NF κ B degradation pathway. *Cell Mol Immunol* **12**, 653–655 (2015).
209. Ke, Y., Butt, A. G., Swart, M., Liu, Y. F. & McDonald, F. J. COMMD1 downregulates the epithelial sodium channel through Nedd4–2. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* **298**, F1445–F1456 (2010).
210. Lian, M. & Zheng, X. HSCARG Regulates NF- κ B Activation by Promoting the Ubiquitination of RelA or COMMD1. *J Biol Chem* **284**, 17998–18006 (2009).
211. Deveraux, Q. L., Takahashi, R., Salvesen, G. S. & Reed, J. C. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature* **388**, 300–304 (1997).

212. Zhao, Y. *et al.* An NADPH Sensor Protein (HSCARG) Down-regulates Nitric Oxide Synthesis by Association with Argininosuccinate Synthetase and Is Essential for Epithelial Cell Viability. *J. Biol. Chem.* **283**, 11004–11013 (2008).
213. Fam, S. S. & Morrow, J. D. The Isoprostanes: Unique Products of Arachidonic Acid Oxidation-A Review.
<https://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2003/00000010/00000017/art00009>
(2003) doi:info:doi/10.2174/0929867033457115.
214. Morgan, M. J. & Liu, Z. Crosstalk of reactive oxygen species and NF- κ B signaling. *Cell Research* **21**, 103 (2011).
215. Marnett, L. J., Rowlinson, S. W., Goodwin, D. C., Kalgutkar, A. S. & Lanzo, C. A. Arachidonic Acid Oxygenation by COX-1 and COX-2 MECHANISMS OF CATALYSIS AND INHIBITION. *J. Biol. Chem.* **274**, 22903–22906 (1999).
216. Uchida, K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Progress in Lipid Research* **42**, 318–343 (2003).
217. Wei, X. Q. *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature* **375**, 408–411 (1995).
218. Ahmad, R., Rasheed, Z. & Ahsan, H. Biochemical and cellular toxicology of peroxynitrite: implications in cell death and autoimmune phenomenon. *Immunopharmacol Immunotoxicol* **31**, 388–396 (2009).
219. Lei, X. G., Cheng, W.-H. & McClung, J. P. Metabolic Regulation and Function of Glutathione Peroxidase-1. *Annual Review of Nutrition* **27**, 41–61 (2007).
220. Yoo, M.-H. *et al.* Delineating the role of glutathione peroxidase 4 in protecting cells against lipid hydroperoxide damage and in Alzheimer's disease. *Antioxid. Redox Signal.* **12**, 819–827 (2010).

221. Li, Y. *et al.* Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase. *Nat. Genet.* **11**, 376–381 (1995).
222. Elchuri, S. *et al.* CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* **24**, 367–380 (2005).
223. Brüttsch, S. H. *et al.* Male Subfertility Induced by Heterozygous Expression of Catalytically Inactive Glutathione Peroxidase 4 Is Rescued in Vivo by Systemic Inactivation of the Alox15 Gene. *J Biol Chem* **291**, 23578–23588 (2016).
224. Ferreira, C. *et al.* Early Embryonic Lethality of H Ferritin Gene Deletion in Mice. *J. Biol. Chem.* **275**, 3021–3024 (2000).

7 Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Bernhard Christian Dumoulin, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Funktionelle Charakterisierung des Interaktoms des Guanin-rich Sequence binding Factor 1 und dessen Beteiligung an der Regulation der Redoxhomöostase“ „Functional characterization of the interactome of the Guanin-rich Sequence binding Factor 1 and its involvement in the regulation of redox homeostasis“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Erstbetreuer/in, angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

8 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

9 Anteilserklärung

Bernhard Christian Dumoulin hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Bernhard Dumoulin, Christoph Ufer, Sabine Stehling, Dagmar Heydeck, Hartmut Kuhn, Sajad Sofi *Identification of the COMM-domain containing protein 1 as specific binding partner for the guanine-rich RNA sequence binding factor 1* Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2020 Jul 6;1864(11):129678. (IF: 3,67)

1) Konzeption und Planung der Arbeiten: Die Planung der Arbeiten und die Festlegung der Forschungsstrategie erfolgte in gemeinsamer Absprache der federführenden Autoren **B.D.**, C.U., S.S. und H.K.

2) Durchführung der Experimente und deren Auswertung: Die Experimente wurden überwiegend von **B.D.**, C.U. durchgeführt, an der Datenauswertung war zusätzlich S.S. beteiligt. Für die Publikation gingen Teile der Ergebnisse des Hefe-2-Hybrid Screens (Abbildung 8), der Co-Immunopräzipitationen in HEK293 Zellen (Abbildung 9), der Co-Immunopräzipitationen von GRSF1 Proteinfsegmenten in HEK293 Zellen (Abbildung 10) sowie der endogenen Co-Immunopräzipitationen in HepG2 Zellen (Abbildung 11) ein.

3) Schreiben der Publikationen: An der Konzeption der Publikation waren vor allem **B.D.**, S.S. und H.K. beteiligt. Die Erstellung des ersten Entwurfs des Manuskripts und der Datentabellen bzw. Abbildungsentwürfe wurde von B.D. vorgenommen. Auf dieser Grundlage wurde von **B.D.**, S.S. und H.K. der finale Manuskriptentwurf erstellt, der dann an alle Koautoren zur Ergänzung und Verbesserung geschickt wurde. Die Endredaktion wurde abschließend von **B.D.**, S.S. und H.K. durchgeführt. An der Revision des MS entsprechend der Gutachterkommentare und an den zusätzlichen Experimenten waren vor allem **B.D.**, S.S., Sab. S, D.H. und H.K. beteiligt.

10 Publikationsliste

Bernhard Dumoulin, Christoph Ufer, Harmut Kuhn, Sajad Sofi *Expression regulation, protein chemistry and functional biology of the guanine-rich sequence binding factor 1 (GRSF1)* Journal of Molecular Biology Volume 433, Issue 13, 25 June 2021, 166922 (IF: 4,76)

Bernhard Dumoulin, Christoph Ufer, Sabine Stehling, Dagmar Heydeck, Hartmut Kuhn, Sajad Sofi *Identification of the COMM-domain containing protein 1 as specific binding partner for the guanine-rich RNA sequence binding factor 1* Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2020 Jul 6;1864(11):129678. (IF: 3,67)

Sajad Sofi, Julia C Fitzgerald, Désirée Jähn, **Bernhard Dumoulin**, Sabine Stehling, Hartmut Kuhn, Christoph Ufer *Functional characterization of naturally occurring genetic variations of the human guanine-rich RNA sequence binding factor 1 (GRSF1)* Biochim Biophys Acta Gen Subj. 2018 Apr ;1862(4) :866-876 (IF: 3,67)

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Hartmut Kühn für das spannende und interessante Promotionsthema bedanken und für seine Hilfe bei aufkommenden Fragen. Ein ganz besonderer Dank geht an Herrn Dr. Christoph Ufer, der mich in meiner Zeit im Institut für Biochemie großartig betreut hat und von dem ich wissenschaftlich unglaublich viel lernen konnte. Ein Dank geht auch an die gesamte AG Kühn und besonders an Frau Sabine Stehling und Frau Dr. Dagmar Heydeck, die mir bei Fragen stets zur Seite standen. Ich bin über die Zeit in eurem Labor sehr dankbar, ihr seid ein nettes, aufgeschlossenes Team und mit euch zu arbeiten war mir eine große Freude. Besonders möchte ich mich außerdem bei meinen Eltern bedanken, ohne deren Unterstützung eine so aufwendige und lehrreiche Promotion nicht möglich gewesen wäre.