

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

DISSERTATION

Identifizierung von Guanine-rich sequence binding factor 1 (GRSF1) bindenden  
Proteinen sowie Herstellung und basale Charakterisierung von *Grsf1*-defizienten  
Mäusen.

Identification of guanine-rich sequence binding factor 1 (GRSF1) binding proteins and  
production and basal characterization of *Grsf1*-deficient mice.

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

vorgelegt der medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

von  
Désirée Charleen Jähn  
aus Berlin

Datum der Promotion:  
30. Juni 2024

## Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	8
Tabellenverzeichnis.....	10
Abkürzungsverzeichnis.....	11
<b>1. Zusammenfassungen.....</b>	<b>15</b>
1.1. Zusammenfassung (Deutsch) .....	15
1.2. Abstract (English).....	17
<b>2. Einleitung.....</b>	<b>19</b>
2.1. Mechanismen der Genexpression.....	19
2.1.1. Transkriptionale Regulationsmechanismen der Genexpression.....	21
2.1.2. Post-transkriptionale Regulationsmechanismen der Genexpression .....	23
2.2. <i>Guanine-rich sequence binding factor (GRSF1)</i> .....	28
2.2.1. GRSF1 als Vertreter der heteronukleären Ribonukleoproteine .....	28
2.2.2. Struktur des <i>GRSF1</i> -Gens und des GRSF1-Proteins .....	28
2.2.3. Biologische Funktionen von GRSF1 .....	30
2.2.3.1. Mögliche Rolle von GRSF1 bei der Regulation von oxidativem Stress und bei der intrazellulären Signaltransduktion.....	30
2.2.3.2. Mögliche Rolle von GRSF1 bei Zellalterung und Seneszens.....	31
2.2.3.3. Mögliche Rolle von GRSF1 bei der mitochondrialen Dysfunktion.....	32
2.2.4. GRSF1 als potenzieller Bindungspartner von anderen Regulatorproteinen .....	33
2.2.5. <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäuse.....	34
2.3. Charakterisierung von potenziellen GRSF1-Bindungsproteinen.....	35
2.3.1. Selenocystein insertion sequence binding protein 2 (SBP2).....	35
2.3.2. Tetratricopeptid repeat protein 7B (TTC7B).....	37
2.3.3. Vacuolar sorting protein 8 (SNF8).....	40

3.	<b>Zielstellung und experimentelle Strategie</b> .....	42
4.	<b>Material und Methoden</b> .....	44
4.1.	Materialien.....	44
4.1.1.	Enzyme.....	44
4.1.2.	Kits.....	44
4.1.3.	Antikörper .....	46
4.1.3.1.	Anti-cMyc-Peroxidase-Antikörper.....	46
4.1.3.2.	Anti-FLAG® M2-Peroxidase-Antikörper.....	47
4.1.3.3.	Anti-hGRSF1-Peroxidase-Antikörper .....	47
4.1.4.	cDNA-Banken .....	48
4.1.5.	Plasmide.....	48
4.1.5.1.	pGBKT .....	48
4.1.5.2.	pACT2 .....	49
4.1.5.3.	pCMV.....	49
4.1.6.	Hefestämme, Bakterienstämme, Zelllinien.....	50
4.1.7.	Nährmedien.....	50
4.1.7.1.	Nährmedien für Hefezellen .....	50
4.1.7.2.	Nährmedien für Bakterien.....	51
4.1.7.3.	Medien für HEK293-Zellen .....	51
4.1.8.	Geräte.....	52
4.2.	Methoden .....	53
4.2.1.	Hefemethoden.....	53
4.2.1.1.	Kultivierung von Hefezellen .....	53
4.2.1.2.	Hefe-2-Hybrid-System .....	54
4.2.1.3.	Transformation von Hefezellen.....	56
4.2.1.3.1.	Hefezelltransformation .....	57
4.2.1.3.1.1.	Kleine Hefezelltransformation.....	57

4.2.1.3.1.2.	Große Hefezelltransformation .....	58
4.2.1.3.2.	Transformation von Hefezellen mit rekombinanten Plasmiden .....	59
4.2.1.4.	Plasmid-Präparation aus <i>S. cerevisiae</i> AH109 .....	60
4.2.1.5.	$\beta$ -Galaktosidase-Assay .....	61
4.2.2.	Bakterienmethoden .....	61
4.2.2.1.	TOPO-Klonierung.....	61
4.2.2.2.	DNA-Transformation in Bakterien .....	63
4.2.2.3.	Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien .....	63
4.2.2.4.	Semisolide Bibliotheksamplifikation .....	63
4.2.3.	Molekularbiologische Methoden .....	64
4.2.3.1.	Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen .....	64
4.2.3.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR) .....	65
4.2.3.3.	Agarosegel-Elektrophorese .....	66
4.2.3.4.	DNA-Extraktion aus dem Agarosegel.....	68
4.2.3.5.	DNA-Ligation .....	68
4.2.3.6.	RNA-Präparation.....	69
4.2.3.7.	Reverse Transkription.....	69
4.2.4.	Zellmethoden .....	69
4.2.4.1.	HEK293-Zellen und deren Kultivierung.....	69
4.2.4.2.	Transfektion von humanen HEK293-Zellen .....	70
4.2.5.	Proteinchemische Methoden .....	71
4.2.5.1.	Proteinbestimmung nach Bradford .....	71
4.2.5.2.	Sodiumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	71
4.2.5.3.	Westernblot (Immunoblot) .....	72
4.2.5.4.	Proteinextraktion aus HEK293-Zellen .....	73
4.2.5.5.	cMyc-Immunpräzipitation .....	74

4.2.5.6.	FLAG <sup>®</sup> -Immunpräzipitation .....	74
4.2.5.7.	RNAse Immunpräzipitation .....	75
4.2.6.	Herstellung und basale Charakterisierung der <i>Grsf1</i> -Knockout Mäuse .....	75
4.2.6.1.	Struktur des Knockout-Konstruktes.....	75
4.2.6.2.	Verpaarung heterozygoter <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäuse .....	77
4.2.6.3.	Präparation genomischer DNA aus Ohrbiopsien von Mäusen.....	77
4.2.6.4.	Genotypisierung von <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäusen.....	78
4.2.6.5.	Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben.....	80
4.2.6.6.	Reverse Transkription.....	81
4.2.6.7.	Herstellung externer Amplifizierungsstandards für qRT PCR .....	81
4.2.6.8.	Quantitative Realtime PCR.....	83
4.2.6.9.	Herstellung von Gewebehomogenaten und Proteinbestimmung.....	85
4.2.6.10.	Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot von Gewebehomogenaten.....	85
4.2.6.11.	Vergleichende Gewichtskinetiken von <i>Grsf1</i> -Knockout- Mäusen und Wildtyp-Kontrollen.....	87
4.2.6.12.	Blutentnahme und Bestimmung basaler hämatopoetischer Parameter.....	88
4.2.7.	Statistische Methoden.....	89
4.2.7.1.	Zweistichproben T-Test .....	89
4.2.7.2.	Mann-Whitney-U-Test.....	89
4.2.7.3.	Wilcoxon-Test .....	90
5.	<b>Ergebnisse</b> .....	91
5.1.	Funktionsweise des Hefe-2-Hybrid-System und verwendete Filterstrategien .....	91
5.2.	Überprüfung der Spezifität der Protein-GRSF1-Interaktionen in Hefezellen .....	94

5.3.	Identifizierung der im Hefe-2-Hybrid Screen identifizierten potentiellen GRSF1-Bindungsproteine.....	95
5.4.	Überprüfung der GRSF1-Protein-Interaktionen in HEK293-Zellen .....	97
5.5.	Kotransfektion von HEK293-Zellen mit FLAG <sup>®</sup> -tag-GRSF1 und cMyc-tag-TTC7B.....	99
5.6.	Kotransfektion von HEK239-Zellen mit FLAG <sup>®</sup> -tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2 .....	102
5.7.	Kotransfektion von HEK293-Zellen mit FLAG <sup>®</sup> -tag-GRSF1 und cMyc-tag-SNF8 .....	104
5.8.	Herstellung und funktionelle Grundcharakterisierung von <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäusen.....	105
5.8.1.	Herstellung von homozygoten <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäusen und deren Genotypisierung. ....	106
5.8.2.	Expression von <i>Grsf1</i> -mRNA bei <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäusen und bei Wildtyp-Kontrolltieren.....	107
5.8.3.	Expression des <i>Grsf1</i> -Proteins bei <i>Grsf1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen und bei Wildtyp-Kontrolltieren .....	109
5.8.4.	Vermehrungsverhalten von <i>Grsf1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen.....	111
5.8.5.	Körpergewichtskinetiken von <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren .....	112
5.8.6.	Mobilität und Fellbeschaffenheit.....	114
5.8.7.	Basale hämatologische Parameter von <i>Grsf1</i> -Knockout-Tieren und Wildtyp-Kontrolltieren.....	114
6.	<b>Diskussion</b> .....	117
6.1.	Suche nach GRSF1-bindenden Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System.....	117
6.2.	Interaktion von GRSF1 mit GRSF1-bindenden Proteinen.....	119
6.2.1.	Interaktion von GRSF1 mit SBP2 .....	119
6.2.2.	Interaktion von GRSF1 mit TTC7B.....	123

6.2.3.	Interaktion von GRSF1 mit SNF8 .....	126
6.3.	<i>Grsf1</i> <sup>-/-</sup> -Mäuse .....	127
6.3.1.	Züchtung von Knockout-Mäusen mit systemisch inaktiviertem <i>Grsf1</i> -Gen.....	127
6.3.2.	Fehlen ausgekreuzter Wildtyp-Kontrollmäuse .....	130
6.3.3.	Subtil kompromittiertes Vermehrungsverhalten .....	130
6.3.4.	Postpartale Entwicklungsretardierung.....	131
6.3.5.	Monozytenzahl bei weiblichen Individuen .....	132
6.4.	Limitationen der vorliegenden Arbeit.....	134
6.4.1.	Potenzielle GRSF1-Bindungsproteine .....	134
6.4.2.	<i>Grsf1</i> -Knockout-Mäuse.....	135
6.5.	Ausblick .....	137
7.	<b>Quellenverzeichnis</b> .....	139
8.	<b>Eidesstattliche Versicherung</b> .....	148
9.	<b>Danksagung</b> .....	149
	Publikationsliste .....	150
	Curriculum Vitae .....	151

Es wurde sich bei der Verwendung der Abkürzungen an die Empfehlungen des Nomenklaturkomitees der International Union of Biochemistry (IUB) orientiert. Demnach richtet sich die Schreibweise danach, ob es sich um das humane Gen (*GRSF1*), humane Protein (GRSF1) oder das murine Gen (*Grsf1*) bzw. murine Protein (Grsf1) handelt. Sollte die Spezies keine Rolle spielen, wird die humane Schreibweise verwandt.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 01:</b> Schematische Darstellung der Genexpression.....	27
<b>Abbildung 02:</b> Struktur des humanen Chromosoms 4 und Lokalisation des <i>GRSF1</i> -Gens.....	28
<b>Abbildung 03:</b> Domänenstruktur des humanen <i>GRSF1</i> .....	29
<b>Abbildung 04:</b> Struktur des humanen Chromosoms 9 und Lokalisation des <i>SBP2</i> Gens.....	35
<b>Abbildung 05:</b> Struktur des humanen Chromosoms 14 und Lokalisation des <i>TTC7B</i> Gens. ....	37
<b>Abbildung 06:</b> Intrazelluläre Verteilung von <i>TTC7B</i> .....	37
<b>Abbildung 07:</b> Kristallstruktur des <i>TTC7B</i> Proteins. ....	38
<b>Abbildung 08:</b> Rolle von <i>TTC7B</i> beim IP3 Signaling. ....	39
<b>Abbildung 09:</b> Struktur des humanen Chromosoms 17 und Lokalisation des <i>SNF8</i> Gens.....	40
<b>Abbildung 10:</b> Strukturmodell des humanen <i>ESCR-II</i> Komplexes.....	40
<b>Abbildung 11:</b> Funktionsprinzip des Hefe-2-Hybridsystems.....	55
<b>Abbildung 12:</b> Struktur des Klonierungsvektors pCR®2.1-TOPO®.....	62
<b>Abbildung 13:</b> Beispielelektropherogramm einer Agarosegelelektrophorese von PCR-Fragmenten.....	68
<b>Abbildung 14:</b> Struktur des <i>Grsf1</i> –Knockout-Konstruktes.....	77
<b>Abbildung 15:</b> Erwartbare Größenverteilung der Amplifizierungsprodukte des <i>Grsf1</i> -Genlocus von <i>Grsf1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen und Wildtyp-Kontrollen.....	80
<b>Abbildung 16:</b> Struktur des nicht-rekombinanten (leer) Beute-Plasmids pACT2. ....	91
<b>Abbildung 17:</b> Struktur des nicht-rekombinanten (leer) Köder-Plasmids pGBKT7.....	91
<b>Abbildung 18:</b> Reaktions-mechanismus der beta-Galaktosidase bei Ver-wendung von X-gal als Substrat. ....	93
<b>Abbildung 19:</b> Kolorimetrischer Nachweis der Purinsynthese in Hefezellen.....	95
<b>Abbildung 20:</b> Beta-GAL Färbung von Hefezellklonen.....	95



<b>Abbildung 21:</b> Immunopräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293-Zellen, die mit unterschiedlichen Transfektionsplasmiden kotransfiziert wurden. ....	100
<b>Abbildung 22:</b> Immunopräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293 Zellen, die mit unterschiedlichen Transfektionsplasmiden kotransfiziert wurden.....	101
<b>Abbildung 23:</b> Immunopräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293-Zellen, die mit den FLAG <sup>®</sup> -tag-GRSF1-Plasmid und cMyc-tag SBP2-Plasmid kotransfiziert wurden.....	103
<b>Abbildung 24:</b> Immunopräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293-Zellen, die mit den FLAG <sup>®</sup> -tag-GRSF1- und cMyc-tag-SNF8-Plasmiden kotransfiziert wurden. ....	105
<b>Abbildung 25:</b> Genotypisierung von Nachkommen, die bei der Verpaarung von heterozygoten <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäusen ( <i>Grsf1</i> <sup>+/-</sup> ) entstehen. ....	106
<b>Abbildung 26:</b> Quantifizierung der <i>Grsf1</i> mRNA Konzentrationen in verschiedenen Organen von Wildtyp-Mäusen und <i>Grsf1</i> -Knockout-Mäusen.....	108
<b>Abbildung 27:</b> Expression des <i>Grsf1</i> -Proteins in verschiedenen Organen von <i>Grsf1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren. ....	110
<b>Abbildung 28:</b> Wachstumskurven der <i>Grsf1</i> -defizienten Mäuse und der Kontrolltiere.....	113
<b>Abbildung 29:</b> Basale hämopoetische Parameter von <i>Grsf1</i> <sup>-/-</sup> -Mäusen und Wildtypkontrolltieren. ....	115
<b>Abbildung 30:</b> Reaktionsmechanismus von Thioredoxinreduktasen. ....	121
<b>Abbildung 31:</b> Kristallstruktur des Thioredoxinreduktase-Thioredoxin-Komplexes. ....	122
<b>Abbildung 32:</b> Schematische Darstellung der Axonmyelinisierung im zentralen Nervensystem. ....	124
<b>Abbildung 33:</b> Rolle des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP2) bei der intrazellulären Signaltransduktion. ....	125
<b>Abbildung 34:</b> Abbau dysfunktionaler Membranproteine über den ESCRT-Weg. ....	126
<b>Abbildung 35:</b> Schematische Darstellung der Hämatopoese.....	133

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 01:</b> Verwendete Enzyme und deren Herkunft.....	44
<b>Tabelle 02:</b> Verwendete Kits, Hersteller und Verwendungszwecke.....	46
<b>Tabelle 03:</b> Verwendete cDNA-Bibliothek und deren Hersteller. ....	48
<b>Tabelle 04:</b> Verwendete Klonierungs- und Ampifizierungsplasmide.....	48
<b>Tabelle 05:</b> Verwendete Hefe- und Bakterienstämme sowie Zelllinien. ....	50
<b>Tabelle 06:</b> Verwendete Nährmedien.....	50
<b>Tabelle 07:</b> Nomenklatur der Hefenmedien. ....	51
<b>Tabelle 08:</b> Verwendete Geräte und deren Hersteller.....	53
<b>Tabelle 09:</b> Verwendetes Pipettierschema für die PCR-Amplifizierung von Template-DNA.....	66
<b>Tabelle 10:</b> Amplifizierungsprogramm für die PCR. ....	66
<b>Tabelle 11:</b> qRT-PCR Programm für die Herstellung externer Amplifikationsstandards. ....	84
<b>Tabelle 12:</b> Beschreibung der im Hefe-2-Hybrid-Screen identifizierten potentiellen GRSF1-bindenden Proteine.....	96
<b>Tabelle 13:</b> Fortpflanzungsparameter von <i>Grsf1<sup>-/-</sup></i> -Mäusen. ....	112

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
AK	Antikörper
AKT	Serin/Threonin-Kinase
Amp <sup>r</sup>	Ampicillinresistenz
APA	Alternative Polyadenylierung
APC	Adenomatous-polyposis-coli
AS	Aminosäure
ATF4	activating transcription factor 4
ATP	Adenosidtriphosphat
bp	Basenpaar(e)
bspw.	beispielsweise
bZIP	basic Leucin Zipper
C	Cytosin
cDNA	complementary DNA
CoIP	Co-Immunopräzipitation
CPSF	cleavage and polyadenylation specificity factor
cytb	Cytochrome B
Da	Dalton
DAZL	deleted in azoospermia like
DIO2	Thyroxindeiodinase 2
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DVL	Dishevelled
E.coli	Escherichia Coli
eEF	eukaryontischer Elongationsfaktor
eIF	eukaryontischer Initiationsfaktor
eRF	eukaryontischer Terminationsfaktor
ESCRT-II	Endosomal sorting complex required for transport II
FCS	fetales Kalbserum
G	Guanin

GAL4-DNA-AD	GAL4-DNA-Transkriptionsaktivator Aktivatorodomäne
GAL4-DNA-BD	GAL4-DNA-Transkriptionsaktivator Bindedomäne
Gbx2	Gastrulation homeobox 2 Gen
Gpx1	klassische Glutathion-Peroxidase 1
Gpx2	gastrointestinale Glutathion-Peroxidase 2
Gpx3	plasmatische Glutathion-Peroxidase 3
Gpx4	Phospholipid-Hydroperoxidase Glutathion-Peroxidase 4
GRSF1	Guanine-rich binding factor 1
GSK3-beta	Glykogensynthasekinase 3 beta
GTF	Generelle Transkriptionsfaktoren
GTP	Guanin-Triphosphat
hnRNP	Heteronukleäre Ribonukleoproteine
HLH	Helix-Loop-Helix
HTH	Helix-Turn-Helix
HEK293	Humane embryonale Nierenzellen 293
IL6	Interleukin 6
IL8	Interleukin 8
lncRNA	long noncoding RNA
Kan <sup>r</sup>	Kan <sup>r</sup>
Kb(p)	Kilobasen(paare)
kDa	Kilodalton
KO	Knockout
LB-Medium	lysogeny broth-Medium
LRP	Low-density lipoprotein receptor related protein
m-Gpx4	mitochondriale Glutathion-Peroxidase 4
MCS	Multi Cloning Site
miRNA	micro-RNA
mRNA	Messengerribonukleinsäure
mTOR	Mechanistic/mammalian Target of Rapamycin
mtRNA	mitochondriale RNA
NaCl	Natriumchlorid
ND5	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Kette-5-Protein
ND6	NADH-Ubichinon-Oxidoreduktase-Ketten-6-Protein

nt	Nukleotid(e)
PIK	Präinitiationskomplex
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PI4P	Phosphatidylinositol 4-phosphat
PI4KIIIa	Phosphatidylinositol 4-kinase alpha
PNPT1	Polyribonucleotide Nucleotidyltransferase 1
Pol II	RNA-Polymerase II
Prä-mRNA	Präkursor-mRNA
qRRM	quasi-RNA Recognition Motif
RMRP	RNA-prozessierende Endoribonuklease
RNA	Ribonukleinsäure
RRM	RNA Recognition Motif
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SA- $\beta$ -gal	senescence-associated $\beta$ -Galaktosidase
SBP2	Selenocystein insertion sequence (SECIS)-binding protein 2
siRNA	small interfering RNA
snRNA	small nuclear RNA
snRNP	small nuclear Ribonuclear Proteins
SUPV3L1	Suv3 Like RNA Helicase
S6K1	S6Kinase1
S6K2	S6Kinase2
T	Thymin
TPR	Tetratricopeptid repeat
tRNA	Transport-RNA
TRP1	Tyrosinase related protein 1
TSH	Thyreotropin (thyreotropes Hormon/ Thyreoidea-stimulierendes Hormon)
TTC7B	Tetratricopeptid repeat protein 7B
T3	Trijodthyronin
T4	Thyroxin
U	Uracil

u.a.	unter anderem
UAS	upstream activating sequenzen
UTR	Untranslated Region
Wnt	Wingless and Int-1
WT	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
Y2H	Yeast-Two-Hybrid-System (Hefe-Zwei-Hybrid-Modell)

# 1. Zusammenfassungen

## 1.1. Zusammenfassung (Deutsch)

Der guanine-rich sequence binding factor 1 (GRSF1) ist ein heteronukleäres Ribonukleoprotein, welches an RNA bindet und damit regulatorisch an der Genexpression teilnimmt. Die Genexpression unterliegt in jedem ihrer Teilschritte Regulationsmechanismen, die inhibitorisch oder auch aktivierend eingreifen. Dazu zählen transkriptionelle, posttranskriptionelle, translationale und post-translationale Mechanismen, die den Zellen und damit den Organismen eine Anpassung an veränderte Umweltbedingungen ermöglichen. Bisher konnte gezeigt werden, dass GRSF1 die Translation der Gluthathionperoxidase 4 (Gpx4) mRNA hochreguliert[1]. Da die Gluthathionperoxidase 4 eine wichtige Rolle bei der embryonalen Hirnentwicklung und als anti-oxidatives Enzym spielt, wurde vermutet, dass GRSF1 ebenfalls an diesen Prozessen beteiligt ist. Bei Untersuchungen zur *in vitro* Embryogenese der Maus konnte gezeigt werden, dass ein RNAi-induzierter Knockdown der *Grsf1*-Expression zu einer hypoplastischen Hirnentwicklung führt. Dabei scheint *Grsf1* mit anderen Proteinen zu interagieren. Zu Beginn meiner Arbeit lagen nur wenige Daten zur Interaktion von GRSF1 mit anderen Proteinen vor. Weiterhin konnte aufgrund des Fehlens von *Grsf1*-Knockout-Mäusen noch nicht untersucht werden, ob die *in vitro* Daten zur biologischen Funktion von *Grsf1* *in vivo* reproduziert werden können.

Aus dieser Datenlage ergaben sich für die vorliegende Dissertation zwei unterschiedliche Fragestellungen, die parallel zueinander bearbeitet wurden:

1. Welche intrazellulären Proteine fungieren als Bindungspartner für *Grsf1*?
2. Wie verändert eine systemische Inaktivierung des *Grsf1*-Gens den funktionellen Phänotyp von Mäusen.

Um die erste Frage zu beantworten, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Hefe-2-Hybrid-Screen durchgeführt, bei dem drei unterschiedliche Proteine [Tetratricopeptid 7B (TTC7B), Selenocystein-binding Protein 2 (SBP2), SNF8 Subunit Of ESCRT-II (SNF8)] als potenzielle GRSF1-Bindungspartner identifiziert werden konnten. Ko-Immunopräzipitationen von GRSF1 und den potenziellen Bindungspartnern bestätigten diese Protein-Protein-Interaktion in kotransfizierten humanen embryonalen Nierenzellen (HEK).

Um die zweite Frage zu beantworten, wurden zunächst gefloxtete *Grsf1*-Mäuse hergestellt, bei denen die Exons 4 und 5 des *Grsf1*-Gens durch Erkennungssignale der

Cre-Rekombinase flankiert wurden. Danach wurden diese geflochten *Grsf1*-Mäuse mit deleter Mäusen gekreuzt, bei denen die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des CMV-Promotors [B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J] exprimiert wird. Dadurch wurde das *Grsf1*-Gen heterozygot funktionell inaktiviert. Anschließend erfolgte die Verpaarung der *Grsf1*<sup>+/-</sup>-Mäuse, wodurch homozygote Mäuse erzeugt wurden, bei denen das *Grsf1*-Gen systemisch (in allen Geweben) inaktiviert wurde. Die Inaktivierung des *Grsf1*-Gens und die damit verbundene Unfähigkeit der Mäuse zur Expression von Grsf1 konnte durch Quantifizierung der Grsf1-mRNA in einer Reihe von Organen und durch Western-Blot Analysen im Testis nachgewiesen werden. Wir konnten feststellen, dass Mäuse mit einer systemischen Inaktivierung des *Grsf1*-Gens sich normal entwickelten und kaum phänotypische Auffälligkeiten zeigten. Während wir bei den männlichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen Unterschiede in der Körpergewichtsentwicklung im Vergleich zu entsprechenden Kontrolltieren beobachtet haben, entwickelten sich die weiblichen Mäuse normal. Ihr Reproduktionsverhalten war unauffällig und es gab keine Hinweise für eine eingeschränkte Mobilität und Lebenserwartung. In Zukunft können diese *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse in verschiedenen Krankheitsmodellen getestet werden, um die mögliche Rolle von Grsf1 bei der Pathogenese bestimmter Erkrankungen zu untersuchen.



## 1.2. Abstract (English)

Guanine-rich sequence binding factor 1 (Grsf1) is a heteronuclear ribonucleoprotein that binds to RNA and thus, takes part in the regulation of gene expression. Gene expression is regulated at different levels and involves transcriptional, post-transcriptional, translational and post-translational mechanisms. These regulatory networks enable cells and whole organisms to adapt to changing environmental conditions. Grsf1 has previously been reported to upregulate translation of glutathione peroxidase 4 (Gpx4) mRNA[1]. Since this enzyme plays an important role in embryonic brain development and as anti-oxidative enzyme, Grsf1 has also been implicated in these processes. In fact, studies on *in vitro* mouse embryogenesis have shown that RNAi-induced knockdown of Grsf1 expression leads to hypoplastic brain development but the molecular basis for these observations remains elusive. Although it has been hypothesized that Grsf1 might interact with other regulatory proteins, identification of Grsf1 binding proteins has been still pending. Moreover, due to the lack of *Grsf1* knockout mice, it has not been explored whether the reported *in vitro* data on the biological functions of Grsf1 could be reproduced *in vivo*. This situation resulted in two major questions for the present dissertation, which have been worked on simultaneously.

1. Which intracellular proteins might function as putative Grsf1 binding partners?
2. Does systemic inactivation of the *Grsf1* gene alter the phenotype of mice?

To answer the first question, we employed the yeast 2-hybrid system and identified three different proteins as putative Grsf1 binding proteins: I) tetratricopeptide 7B (TTC7B), II) selenocysteine-binding protein 2 (SBP2) and III) SNF8 subunit of ESCRT-II (SNF8)]. Co-immunoprecipitation experiments using co-transfected human embryonic kidney cells (HEK) confirmed the postulated protein-protein interaction.

To address the second question, we first generated floxed *Grsf1* transgenic mice, in which exons 4 and 5 of the *Grsf1* gene were flanked by recognition sequences for Cre-recombinase. These floxed *Grsf1* mice were crossed with deleter mice expressing the Cre-recombinase under the control of the CMV promoter [B6.C-Tg(CMV-cre)1Cgn/J]. Offsprings expressed heterozygously a truncated version of the *Grsf1* gene and the resulting dysfunctional Grsf1 mRNA was targeted for nonsense mediated decay. Intercrossing the resulting *Grsf1*<sup>+/-</sup> mice we obtain homozygous *Grsf1*<sup>-/-</sup> mice, in which the *Grsf1* gene was inactivated in all tissues. Inactivation of the *Grsf1* gene was

demonstrated by quantification of the *Grsf1* mRNA in a number of organs and by Western blot analysis in testis. We found that *Grsf1*<sup>-/-</sup> mice developed normally and did not show major phenotypic abnormalities. Although we observed subtle growth retardation in male *Grsf1*<sup>-/-</sup> mice, female individuals developed normally. The reproduction behavior of *Grsf1*<sup>-/-</sup> mice was normal and we did not detect restricted mobility or life expectancy. In the future, these *Grsf1*<sup>-/-</sup> mice can be tested in different animal disease models to explore the biological role of *Grsf1* protein in mouse models of human diseases.

## 2. Einleitung

### 2.1. Mechanismen der Genexpression

Als Genexpression wird bei Eukaryonten die Umwandlung der Information, die in der Nukleotidsequenz eines Gens gespeichert ist, in das entsprechende Genprodukt definiert [2]. Bei Protein-kodierenden Genen umfasst die Genexpression die folgende Teilschritte:

**Transkription:** Dabei wird die Nukleotidsequenz eines Gens in die Nukleotidsequenz der prä-mRNA (Primärtranskript) umgeschrieben. Die Transkription läuft im Zellkern ab und erfordert die Aktivierung des entsprechenden Gens. Diese Genaktivierung beinhaltet unterschiedliche Prozesse, welche die chemische Modifizierung der Chromatinstruktur, die Bindung verschiedener Transkriptionsfaktoren am Genpromotor sowie die Rekrutierung und Aktivierung verschiedener DNA-abhängiger DNA-Polymerasen beinhalten [2].

**Posttranskriptionale Modifizierung des Primärtranskriptes:** Das primäre Transkriptionsprodukt, das man auch als heterologe nukleäre RNA (hnRNA) bezeichnet, wird nach seiner Synthese chemisch mannigfaltig modifiziert. Dabei stellen das Spleißen (Herausschneiden der intronischen Sequenzen aus der hnRNA), das Capping (Anhängen der Cap-Struktur an das 5'-Ende der gespleißten hnRNA), die Polyadenylierung (Anhängen eines Poly-A-Schwanzes an das 3'-Ende der gespleißten hnRNA) und die RNA-Editierung (chemische Modifizierung einzelner Basen der mRNA, die zu Veränderungen des Kodierungsverhaltens der mRNA führt) die wichtigsten Modifizierungsreaktionen dar [3].

**Nukleärer Export der mRNA:** Das Ergebnis der post-transkriptionalen RNA-Modifizierung ist die reife mRNA, die anschließend aus dem Zellkern ins Zytosol transportiert wird, um an den Ribosomen als Matrize für die Proteinsynthese (Translation) zu fungieren. Der nukleäre Export der reifen mRNA erfordert eine Reihe von RNA-bindenden Proteinen und erfolgt durch die Poren in der Kernmembran. Für den Durchtritt des mRNA-Protein-Komplexes durch die Kernporen bindet zunächst der nukleäre RNA-Exportfaktor 1 an den RNA-Protein Komplex [4]. Dieses hochmolekulare Aggregat bindet anschließend an den Export-Rezeptor des Kernporenkomplexes und dadurch entsteht der „export competent complex“. Die Bewegung dieses Komplexes durch die Kernpore erfordert Energie, die in Form von GTP bereitgestellt wird. Nach

Passage der Kernpore dissoziieren die genannten Komplexe wieder und entlassen die mRNA mit einigen der gebundenen RNA-bindenden Proteinen ins Zytoplasma [4].

**Translation:** Bei der Translation wird die Information, die in der Nukleotidsequenz einer mRNA gespeichert ist, in die Aminosäuresequenz eines Proteins umgewandelt. Die Translation findet an den Ribosomen statt, die sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien vorkommen. Im Rahmen der Translation binden mehrere Ribosomen an eine reife mRNA (Polysomen), sodass an einem mRNA-Molekül gleichzeitig mehrere Kopien des kodierten Proteins synthetisiert werden können. Für intrazelluläre Proteine erfolgt die Translation an zytosolischen Polysomen. Wenn extrazelluläre oder Membran-gebundene Proteine gebildet werden sollen, erfolgt die Translation am rauen endoplasmatischen Retikulum (rER), sodass die primären Translationsprodukte in das Lumen des rER hineinsynthetisiert werden. Über ähnliche Mechanismen werden auch Proteine synthetisiert, die später in andere Zellorganellen (Mitochondrien, Lysosomen, Peroxisomen) hineintransportiert werden [5].

**Post-translationale Proteinmodifizierung:** Die primären Translationsprodukte werden nach ihrer Synthese an den Ribosomen mannigfaltig chemisch modifiziert, wobei limitierte Proteolyse, Aminosäurehydroxylierung, Glykosylierung, Lipidierung und Ribosylierung wichtige post-translationale Modifizierungsreaktionen darstellen [6]. Anschließend bilden die fertigen Translationsprodukte häufig hochmolekulare Komplexe mit anderen Proteinen, da sie nur so ihre biologischen Funktionen erfüllen können. Diese Protein-Protein-Interaktion verläuft überwiegend durch nicht-kovalente Wechselwirkungen, sodass die entstandenen hochmolekularen Proteinkomplexe entsprechend der aktuellen Reaktionsbedingungen auch wieder in ihre Bestandteile zerfallen können, was häufig mit einem Wirkungsverlust der einzelnen Proteine einhergeht.

Alle Schritte der Genexpression unterliegen vielfältigen Regulationsmechanismen, sodass der Gesamtprozess durch komplexe regulatorische Netzwerke kontrolliert wird. Diese Netzwerke funktionieren auch Organell-übergreifend. Durch diese Mechanismen kann die Genexpression von Zellen auf lokale Veränderungen in ihrer Umgebung reagieren und sich neuen metabolischen Gegebenheiten aktiv anpassen.

Die Komplexität der Regulationsmechanismen der Genexpression hängt vom evolutionären Entwicklungsgrad der Organismen ab. Bei Prokaryonten (Bakterien, Archaeen) ist das regulatorische Netzwerk der Genexpression in aller Regel einfacher strukturiert als bei den höher entwickelten Eukaryonten. Auch innerhalb der

Eukaryonten gibt es deutliche regulatorische Unterschiede. Bei primitiven einzelligen Eukaryonten (z.B. Hefen) sind die regulatorischen Netzwerke deutlich weniger komplex [7] als bei hoch entwickelten Pflanzen und Tieren. In den einleitenden Kapiteln der vorliegenden Dissertation sollen ausgewählte Regulationsprinzipien der Genexpression näher beschrieben werden, um die Protein-RNA- bzw. Protein-Protein-Interaktion als wesentliches regulatorisches Phänomen bei der Genexpression besser einordnen zu können.

### **2.1.1. Transkriptionale Regulationsmechanismen der Genexpression**

Die Transkription beschreibt den Vorgang, in dem Sequenzinformationen der DNA in RNA umgewandelt werden [8]. Hauptakteur der Transkription in eukaryontischen Zellen ist die im Kernplasma vorliegende RNA-Polymerase II [9]. Dieses Enzym bildet im Zusammenspiel mit den fünf generellen Transkriptionsfaktoren (GTF), TFIIB/D/E/F/H, den Prä-Initiationskomplex (PIK), das erste strukturell abgrenzbare Produkt der Transkription [10]. Die GTFs beinhalten DNA-bindende Domänen und dazu zählen folgende Struktur motive:

- I) Helix-Turn-Helix (HTH) Motive,
- II) Zinkfinger Motive (ZF),
- III) Helix-Loop-Helix (HLH) Motive und
- IV) Leucin-Zipper Strukturen (LZ) [11, 12].

Im Rahmen der Transkriptionsinitiation bindet zunächst die RNA-Polymerase II (Pol II) mit Hilfe der GTFs an die Promotorsequenzen der Gene, welche in drei funktionelle Bereiche untergliedert werden können. Der proximale Promotor enthält die regulatorischen Sequenzen, die sich unmittelbar stromaufwärts der Sequenz für die Transkriptionsinitiation befinden. Die Größe des proximalen Promotors ist bei allen Genen unterschiedlich und kann strukturell nicht punktgenau von den Genflankierenden Sequenzen abgegrenzt werden [13].

Der Kernpromotor (core promoter) ist Bestandteil des proximalen Promotors. Diese DNA-Sequenz befindet sich bei den meisten Genen in unmittelbarer Nähe der Transkriptionsinitiationssequenz und stellt jene DNA-Sequenz dar, an welche die Pol II mit Hilfe der GTFs bindet [14]. Der Kernpromotor enthält häufig die TATA-Box. Diese charakteristische Promotorsequenz liegt meist ca. 30 Basenpaare stromaufwärts der Transkriptionsinitiationssequenz und dient als Bindungsort der GTFs. Die Bindung der GTFs an diese Sequenz ermöglicht die Ausbildung des Initiationskomplexes der

Transkription [15]. Dabei muss allerdings erwähnt werden, dass eine große Anzahl der menschlichen Gene keine TATA-Boxen enthalten. Bei TATA-Box-freien Genen bildet sich der Initiationskomplex an anderen Sequenzen des Kernpromotors.

Enhancer und Silencer sind regulatorische Gensequenzen, die sich außerhalb des proximalen Promotors befinden [16]. Sie sind häufig unmittelbar upstream der Transkriptionsinitiationssequenz lokalisiert, können sich aber auch in großer räumlicher Distanz (mehrere kbp) zum proximalen Promotor befinden. Manchmal sind solche regulatorischen Sequenzen sogar Strukturbestandteil anderer Gene, die sich in der Nähe des Zielgens auf dem gleichen Chromosom befinden. Durch die Bindung von regulatorischen Proteinen (Transkriptionsfaktoren) an Enhancersequenzen kann die Transkriptionsrate eines Gens verstärkt werden. Das funktionelle Gegenstück zu den Enhancersequenzen stellen die Silencer dar. Auch diese DNA-Sequenzen können im großen räumlichen Abstand zum proximalen Promotor liegen. Wie bei den Enhancern können an die Silencersequenzen regulatorische Proteine (Transkriptionsfaktoren) binden, aber diese Bindung hemmt die Transkriptionseffizienz des entsprechenden Gens.

Insgesamt unterliegt die Genexpression der kombinatorischen Kontrolle durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine, wobei ein einzelnes Regulationsprotein je nach Interaktionspartner auch unterschiedliche Wirkungen entfalten kann. Des Weiteren kann eine chemische Modifizierung der Regulationsproteine und/oder der DNA Einfluss auf die Transkription von Genen nehmen. Um diesen Sachverhalt zu verdeutlichen, sollen hier drei unterschiedliche Mechanismen beispielhaft erläutert werden:

**CpG-Inseln:** CpG Inseln sind Genomabschnitte mit einer Länge von 400-500 Basenpaaren, die einen Cytosin+Guanin Gehalt (C+G-Gehalt) von mehr als 60 % aufweisen. Der durchschnittliche C+G-Gehalt im menschlichen Genom liegt bei 40 % und ist damit signifikant geringer als der von CpG-Inseln. CpG-Inseln kommen in den Genomen aller Eukaryonten vor und fast die Hälfte aller Gene des menschlichen Genoms tragen CpG-Inseln in ihren regulatorischen Genabschnitten [17]. Zu den bisher bekannten Funktionen der CpG-Inseln gehört u.a. die Initiierung der Transkription durch Bindung der RNA-Pol II. Durch Methylierung des Cytosins von CpG Inseln kann die biologische Aktivität dieser Sequenzen modifiziert werden [18]. Insgesamt sind ca. 70 % der CpG-Inseln im Säugetiergenom methyliert [19].

**Histone:** Histone sind basische Kernproteine [20], um die sich der DNA-Doppelstrang spiralförmig herumwindet. Diese Proteine bilden mit ihrem zugehörigen

DNA-Abschnitt die kleinsten Einheiten des Chromatins, die Nukleosomen. Durch chemische Modifizierung können Histone die Transkription, der sich im entsprechenden DNA-Abschnitt befindlichen Gene begünstigen oder hemmen. Durch die Azetylierung von Lysinseitenketten verlieren Histone ihre positive Ladung, wodurch es Transkriptionsfaktoren erleichtert oder erschwert wird an die DNA zu binden. Der Prozess der Histonazetylierung ist prinzipiell reversibel, sodass Azetylierung und Deazetylierung von Histonen zwei Seiten eines Regulationsprinzips darstellen. So verhindert z.B. eine Deazetylierung von Histonen die Bindung der Polymerase II (Pol II) und hemmt damit die Transkription. Umgekehrt aktiviert eine Histonazetylierung die Bindung der Pol II und aktiviert damit die Transkription [21, 22].

**Transkriptionsfaktoren:** Eine weitere Möglichkeit der Expressionsregulation stellt die reversible Methylierung von Transkriptionsfaktoren dar [23]. Dabei werden vor allem Arginin- bzw. Lysinseitenketten dieser regulatorischen Proteine chemisch modifiziert. Werden Methylgruppen an Arginin- bzw. Lysinseitenketten von DNA-bindenden Proteinen angefügt, kann damit die DNA-Bindungsfähigkeit von Transkriptionsfaktoren stimuliert oder gehemmt werden. Ähnlich wie die Methylierung wirkt auch die reversible Phosphorylierung von Transkriptionsfaktoren [24]. Allerdings findet diese chemische Modifizierung nicht an basischen Aminosäuren (Arg, Lys) statt, sondern ist vor allem auf Aminosäuren beschränkt, die freie Hydroxygruppen tragen (Tyrosin, Serin, Threonin).

### 2.1.2. Post-transkriptionale Regulationsmechanismen der Genexpression

Zu den post-transkriptionalen Regulationsmechanismen der Genexpression zählen alle regulatorischen Prozesse, welche sich auf die unter 2.1. spezifizierten post-transkriptionalen Prozesse der chemischen Modifizierung des Primärtranskriptes beziehen [3]. Manchmal laufen diese Modifizierungsprozesse schon während der Transkription ab, sodass man sie auch als ko-transkriptional bezeichnen kann [23]. Zu diesen Prozessen gehören u.a. das Spleißen, die Polyadenylierung und das Capping des Primärtranskriptes [24].

Das **Spleißen** gehört zu den post-transkriptionalen Vorgängen im Rahmen der Genexpression und kann in *cis*-Spleißen und *trans*-Spleißen untergliedert werden [25]. Gemeinsam ist beiden Prozessen die Bildung eines funktionsfähigen Spleißosoms. Unter Spleißen versteht man das Herausschneiden von nicht-kodierenden RNA-Sequenzen (intronische Sequenzen) aus dem Primärtranskript und das darauffolgende

Verbinden der kodierenden (exonischen Sequenzen) RNA-Regionen [26]. Das Spleißosom, an dem das Spleißen stattfindet, ist ein hochmolekularer Protein-RNA-Komplex und besteht aus mehreren snRNPs (small nuclear ribonuclear proteins) und snRNAs (small nuclear RNA). Das große (major) Spleißosom besteht aus den Untereinheiten U1, U2, U4, U5, und U6. Das kleine (minor) Spleißosom besteht aus den Untereinheiten U11, U12, U4<sub>ATAC</sub> und U6<sub>ATAC</sub> [27, 28]. Das kleine Spleißosom prozessiert hauptsächlich minor introns, welche zwar bei allen Eukaryonten vorkommen, insgesamt aber weniger als 0,5 % aller Introns ausmachen [29]. Das Spleißen erfolgt in jedem Fall in zwei Schritten: Die Präkursor-mRNA wird vom 5'-Ende zum 3'-Ende hin abgelesen. Beim Erreichen bzw. Erkennen einer splice-site wird das entsprechende Intron bis zum branch point herausgeschnitten. Der Unterschied zwischen *cis*- und *trans*-Spleißen besteht in der Verknüpfung der kodierenden RNA-Sequenzen (exonische Sequenzen). Während beim *cis*-Spleißen nur aufeinanderfolgende exonische Sequenzen der gleichen prä-mRNA verbunden werden, können beim *trans*-Spleißen auch exonische Regionen unterschiedlicher prä-mRNA miteinander verbunden werden. Dadurch ist es möglich, dass auf der RNA-Ebene exonische Sequenzen der gleichen prä-mRNA aber unterschiedlicher Lokalisation miteinander verbunden werden können. Alternativ dazu können auch exonische Sequenzen unterschiedlicher prä-mRNAs oder auch exonische Sequenzen aus paternalen und maternalen Genabschnitten miteinander verbunden werden.

Die **Polyadenylierung** bezeichnet das Anhängen eines 50-100 nt großen Homo-A-Polymers, das auch als Poly-A-Schwanz bezeichnet wird, an das 3'-Ende der prä-mRNA. Dieser Poly-A-Schwanz besteht aus Adenin-Nukleotiden, die eine Adenosinmonophosphatkette bilden und ist Bestandteil der 3'-untranslatierten Region (3'UTR) jeder mRNA [30]. Für die Polyadenylierung muss die RNA zuerst aufbereitet werden. Für diese Aufarbeitung ist der spezifische Proteinkomplex CPSF (cleavage and polyadenylation specificity factor) verantwortlich [31]. Dieser Komplex erkennt in der prä-mRNA die Hexanukleotidspaltungssequenz AAUAAA (Polyadenylierungssignal) sowie eine sich downstream von dieser Sequenz befindliche GU-reiche Region [32]. Die schrittweise Verlängerung des Poly-A-Schwanzes wird durch die Poly-A-Polymerase katalysiert, welche durch Spaltung von ATP Adenosinmonophosphatreste anfügen kann. Liegen auf einer prä-mRNA mehrere Polyadenylierungsstellen, kann es zur alternativen Polyadenylierung (APA) kommen [33]. Diese bietet die Möglichkeit, aus einer prä-mRNA verschiedene reife mRNAs zu bilden. Die Funktionen der



Polyadenylierung sind bisher noch nicht vollständig geklärt. Jedoch wird angenommen, dass sie dem Schutz der mRNA vor Abbau durch RNasen dient und den nukleären Export der reifen mRNA begünstigt.

Das **Capping** erfolgt meist ko-transkriptional am 5'-Ende der prä-mRNA [34]. Die Capstruktur schützt die naszierende mRNA vor dem Abbau durch Exonukleasen, fördert die Transkription, die Polyadenylierung, das Spleißen und den Kernexport von mRNAs und snRNAs [34]. Bisher sind zwei unterschiedliche Cap-Strukturen bekannt: Trimethylguanosin (TMG) und das methylierte  $\gamma$ -Phosphat (Mppp) [35]. Erstere wird während der Transkription von Genen angefügt, die durch RNA-Polymerase II vermittelt werden. Dabei wird das 5'-ständige Nukleotid der hnRNA mit einer 5'-Guanin-N7-Methylkappe ( $m^7G$ -Kappe) verbunden und posttranskriptional häufig weiter trimethyliert [35]. Bei der RNA-Polymerase III sind dagegen keine 5'-Cap-Strukturen zu finden, dafür erfolgt eine Monomethylierung an einem  $\gamma$ -Phosphatrest [35]. Der Vorgang des Cappings geschieht über drei enzymatische Teilschritte, welche durch Mitwirken einer RNA-Triphosphatase (TPase), einer RNA-Guanyltransferase (GTase) und einer Guanin-N7-Methyltransferase erfolgen [36]. Bisher wurde davon ausgegangen, dass ein Capping nur bei Eukaryonten stattfindet. Kürzlich konnte aber gezeigt werden, dass es auch bei Bakterien eine chemische Modifizierung des 5'-Endes von RNAs gibt [37] [38]. Die dabei verwendeten Cap-Strukturen (z.B. NAD<sup>+</sup>) unterschieden sich jedoch deutlich von den bei Eukaryonten verwendeten Struktureinheiten [37].

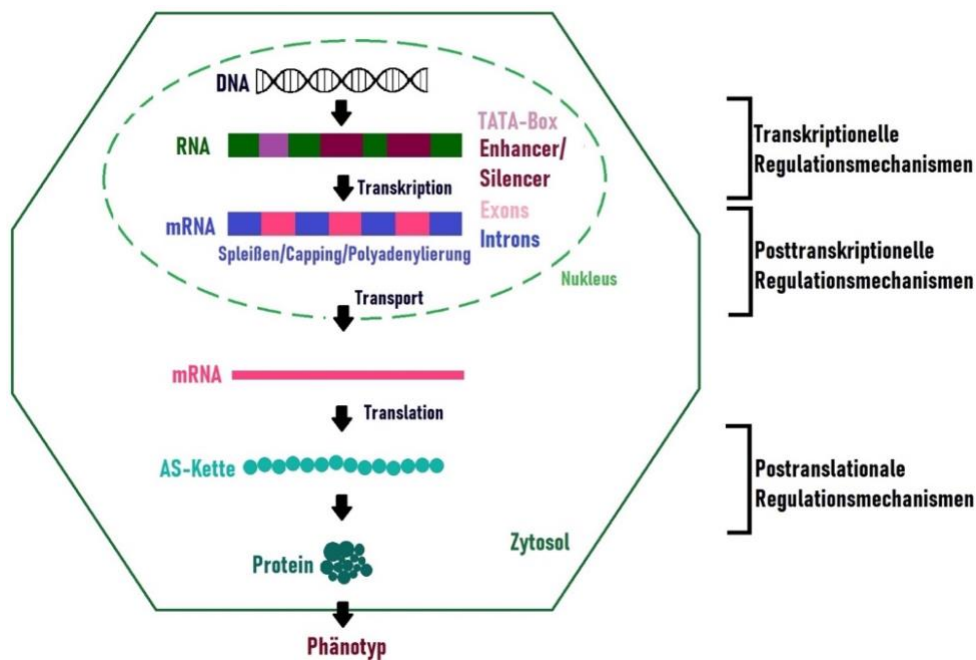
Nachdem die reife mRNA aus dem Zellkern ins Zytosol transportiert wurde, erfolgt die Translation, bei der die Nukleotidsequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz eines Proteins übersetzt wird [39]. Die Translation besteht aus drei Teilschritten:

- I) Initiation,
- II) Elongation,
- III) Termination.

In jedem Teilschritt beeinflussen regulatorische Proteine, die Translationsfaktoren, die Geschwindigkeit des Gesamtprozesses und damit die Effektivität der Translation. Daneben existieren aber auch alternative Mechanismen der Translationsregulation. Ein solcher Regulationsmechanismus stellt die Hemmung der Translation durch Mikro-RNAs dar [34]. Dabei lagert sich eine kurze RNA, die eine komplementäre Sequenz zu einer Teilsequenz der mRNA aufweist, an die mRNA an und verhindert so deren Translation [35].

Während der Initiation binden verschiedene Proteinen und die kleine Ribosomenuntereinheit am 5'-Ende der mRNA, wobei der Präinitiationskomplex entsteht. Dieser bewegt sich dann in Richtung des 3'-Endes der mRNA, bis das erste AUG Kodon (Startkodon) erreicht wird. Der komplette Präinitiationskomplex besteht bei Eukaryonten aus der 40S Untereinheit des Ribosoms, GTP, der Initiator-tRNA<sup>MET</sup> und verschiedenen Translationsinitiationsfaktoren (eIF). Einer der dabei beteiligten Translationsinitiationsfaktoren ist der eukaryontische Initiationsfaktor 2 (eIF2). In Reaktion auf Umweltstress kann dieser phosphoryliert werden. Dadurch wird die Translation gehemmt und gleichzeitig eine Apoptose der betreffenden Zelle eingeleitet [36]. Insgesamt reduziert eine Phosphorylierung des eIF2 die Translation bestimmter mRNAs, um Ressourcen der Zelle zu schonen und gleichzeitig andere Mechanismen der Genexpression zu aktivieren. Damit kann die Zelle auf Stressbedingungen reagieren [36]. Dabei werden gleichzeitig Transkriptionsfaktoren wie der basic Leucin Zipper (bZIP) und der activating transcription factor 4 (ATF4) aktiviert, die selbst wiederum andere Transkriptionsfaktoren beeinflussen [36]. Über diese Mechanismen werden z.B. die Regulation des Ablaufs der Apoptose und die zelluläre Redoxhomöostase beeinflusst [36]. Eine wichtige Rolle bei diesen Prozessen spielen die PI3K/AKT- und mTOR-Signalwege (mammalian target of rapamycin) [40]. Dadurch kommt es zur Aktivierung der mTOR Effektorinasen S6K1 und S6K2, welche an der Phosphorylierung von eIF2 beteiligt sind [40].

Nachdem der Präinitiationskomplex das Start-Kodon (AUG) erkannt hat, werden die große (60S) Untereinheit des Ribosoms und die mit der Aminosäure Methionin beladene Met-tRNA gebunden. Das beendet die Translationsinitiation und die Elongation kann beginnen. Während dieses Schrittes wird die mit einer beliebigen Aminosäure (AS) beladene tRNA an den Akzeptorort der großen Ribosomenuntereinheit gebunden und eine Peptidbindung zwischen benachbarten Aminosäuren ausgebildet. Dieser Prozess wird durch Translationselongationsfaktoren (eEF) regulatorisch beeinflusst. Dazu zählt unter anderen der eukaryontische Elongationsfaktor 1A (eEF1A), welcher die Aminoacyl-tRNA GTP-abhängig bindet und zum Akzeptorort des Ribosoms transportiert [41]. Nachdem das Antikodon des tRNA-Aminosäure-Komplexes an das Kodon der mRNA gebunden hat, kann die Aminosäure auf die wachsende Polypeptidkette übertragen werden, sodass diese um eine Aminosäure verlängert wird. Gleichzeitig dissoziiert eEF1A ab, dieser Elongationsschritt ist beendet und der nächste Elongationsschritt kann beginnen [41].



**Abbildung 01: Schematische Darstellung der Genexpression.** Nachdem die Doppelstranghelix entwunden wurde, erfolgt die Transkription. Das entstandene Produkt wird chemisch modifiziert und anschließend aus dem Zellkern in das Zytosol transportiert. Hier findet die Translation statt. Vor der endgültigen Faltung der Polypeptidkette in das fertige Protein können noch weitere Modifikationen erfolgen. Das gefaltete Protein beeinflusst anschließend den funktionellen Phänotyp der Zelle. Quelle: Schirwani S. et al., Pediatric Radiology, 2020[42].

Der finale Teilprozess der Translation, die Termination, beginnt, wenn der Translationskomplex das Stoppkodon erreicht. Die am häufigsten vorkommenden Stoppkodonsequenzen sind UAA, UAG und UGA [43]. Dieser Vorgang wird durch Translationsterminationsfaktoren (eRF) reguliert [37]. Für die zytoplasmatische Termination werden zwei Proteinfaktoren benötigt: I) eRF1 und II) eRF3 [43]. Dabei ist eRF1 in der Lage, alle drei Stoppkodons zu erkennen, um die Interaktion mit der A-Seite des Ribosoms zu unterbinden, das Peptidyltransferasezentrum zu aktivieren und die Hydrolyse der Peptidyl-tRNA zu triggern [38] [44]. eRF3 ist eine GTPase, welche an eRF1 bindet. Dieses Protein stabilisiert eRF1 und unterstützt die Erkennung des Stoppkodons [39]. Zudem kann eRF3 durch die Bindung an das poly-A-bindende Protein die Translationstermination stimulieren [45]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine eRF3 spezifische siRNA, welche eine Hemmung der eRF1 Expression induziert, die Translation reguliert [46].

Die unterschiedlichen Prinzipien der Genexpressionsregulation sind in **Abbildung 01** vereinfachend zusammengefasst. Auf eine detaillierte Darstellung der zugrunde liegenden Mechanismen (siehe Text) wurde dabei aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

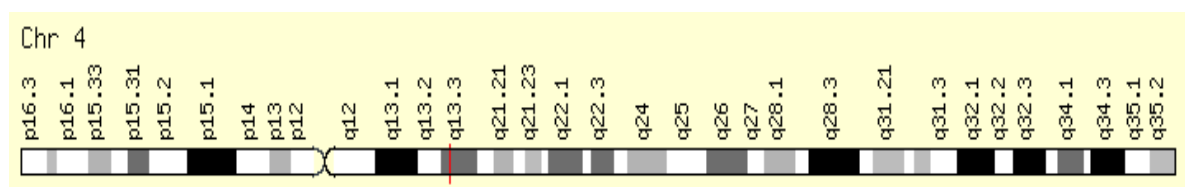
## 2.2. Guanine-rich sequence binding factor (GRSF1)

### 2.2.1. GRSF1 als Vertreter der heteronukleären Ribonukleoproteine

Heteronukleäre Ribonukleoproteine (hnRNP) bilden eine Familie von RNA-bindenden Proteinen, die an der Prozessierung von mRNAs und an der Regulation der Genexpression beteiligt sind [47]. Dabei regulieren sie Prozesse wie das Spleißen der prä-mRNA, den nukleären Export, die Translation und den Abbau der mRNA [48]. In menschlichen Zellen konnte die Zusammensetzung verschiedener hnRNP-Komplexe aufgeklärt werden. Sie bestehen neben der RNA aus 20 verschiedenen Haupt- und mehreren Nebenproteinen [49]. GRSF1 kann in die Familie der hnRNP H/F-Proteine eingruppiert werden, zu welcher auch die hnRNPs H, H', F, 2H9 gehören [50]. Diese werden ubiquitär exprimiert und sind wie viele andere RNA-bindende Proteine am Spleißen, an der Polyadenylierung, am Capping, am nukleären Export und der Translation beteiligt [51] [52]. Vereinendes Strukturmerkmal dieser Proteine ist, dass sie mit RNAs über spezielle Strukturkomponenten, die Quasi-RRM-Domänen, wechselwirken [53].

### 2.2.2. Struktur des *GRSF1*-Gens und des *GRSF1*-Proteins

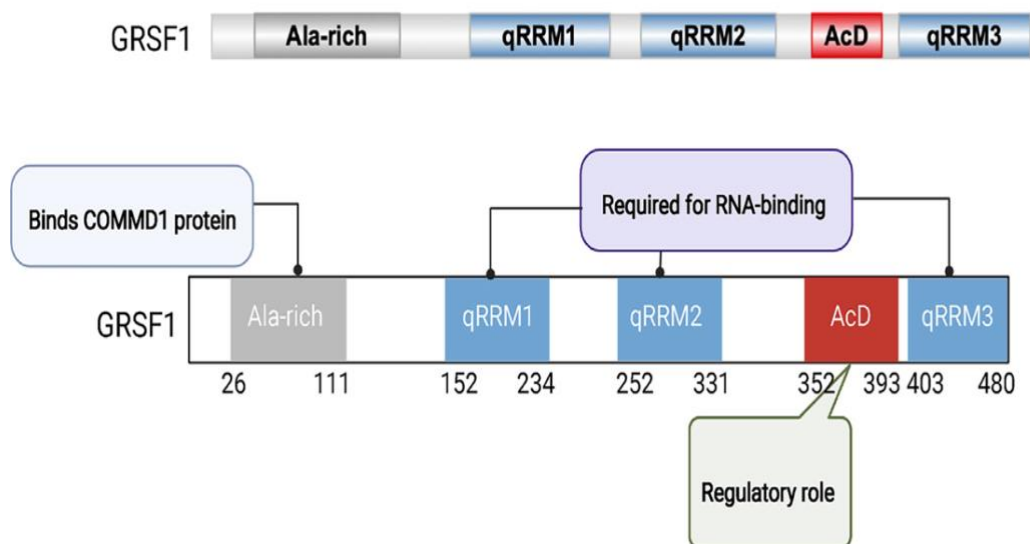
GRSF1 ist ein Protein, dessen Gen im humanen Genom auf dem langen Arm des Chromosoms 4 in der Region q13.3 nahe dem Zentromer lokalisiert ist (**Abbildung 02**). Das Gen hat eine Größe von ca. 24 kbp und setzt sich aus neun Exons und acht Introns zusammen [54]. Stromaufwärts des *GRSF1*-Gens liegt das Gen, das für das RUN and FYVE domain containing protein 3 (RUFY3) kodiert [54]. Unmittelbar stromabwärts des *GRSF1*-Gens liegen das ENSG00000283313-Gen, welches für die U6 spleißosomale RNA kodiert und das RNU6-891P-Gen, welches ebenfalls für eine spleißosomale RNA kodiert. Nach der derzeitigen Annotation des humanen Genoms repräsentiert das RNU6-891P-Gen ein funktionsloses Pseudogen.



**Abbildung 02: Struktur des humanen Chromosoms 4 und Lokalisation des *GRSF1*-Gens.** Die Lokalisation des *GRSF1* Gens auf dem humanen Chromosom 4 ist durch den senkrechten roten Strich gekennzeichnet. Quelle: modifiziert nach <https://cdn.genecards.org/genomic-location-v5-15/GRSF1-gene.png>.

Das GRSF1-Protein wurde 1994 erstmalig beschrieben [55]. Es gehört zu den RNA bindenden-Proteinen der Familie der heterogenen nukleären Ribonuklearproteine (hnRNP). Es bindet über quasi-RNA erkennende Motive (qRRM) an verschiedene RNAs. Insgesamt enthält GRSF1 drei dieser RNA-bindenden Domänen [56]. Obwohl es derzeit weder Kristallstrukturdaten noch komplette NMR-Strukturdatensätze für das GRSF1-Protein gibt, lieferten Sequenz-basierte Modellierungsstudien die in **Abbildung 03** dargestellte Domänenstruktur. Bei der RNA-Bindung interagiert GRSF1 mit G-reichen RNA-Sequenzen, welche mehrere aufeinanderfolgende Guaninreste enthalten.

Diese Nukleinsäuresequenzen können sich in G-Quadruplexstrukturen anordnen, welche die eigentlichen Erkennungsmotive für die GRSF1-RNA Interaktion darstellen [57]. G-Quadruplexe bestehen aus einer quadratischen Anordnung von Guaninmolekülen, die durch Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Guaninbasen stabilisiert werden. Zusätzlich trägt ein zentrales Kation (häufig  $K^+$ ) zur Ausbildung der G-Quadruplexe bei. Diese Superstrukturen können von DNA- und RNA-Molekülen erzeugt werden und bilden parallele bzw. anti-parallele Stränge [58]. Sie sind vor allem in den Telomerbereichen von Chromosomen anzutreffen, kommen aber auch in anderen DNA- bzw. RNA- Sequenzen vor.



**Abbildung 03: Domänenstruktur des humanen GRSF1.** Im oberen Teil der Abbildung ist die Domänenstruktur des humanen GRSF1 schematisch dargestellt. Im unteren Teil sind mögliche Funktionen der einzelnen GRSF1-Domänen zusammengefasst. Die drei qRRM-Domänen sind für die RNA Bindung von GRSF1 verantwortlich und funktionelle Trunkierungsuntersuchungen deuten darauf hin, dass die Deletion einzelner Domänen zu einem drastischen Abfall der RNA-Bindungsfähigkeit führen. Quelle: modifiziert nach Dumoulin et al, JMB 2021 [54].

### **2.2.3. Biologische Funktionen von GRSF1**

Die biologischen Funktionen von GRSF1 sind derzeit noch nicht komplett verstanden. Eine detaillierte Zusammenfassung der möglichen physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des GRSF1-Proteins wird in einer kürzlich publizierten Übersichtsarbeit gegeben [54]. Wesentliche Aspekte der physiologischen Funktionen von GRSF1 sollen an dieser Stelle kurz zusammengefasst werden. Die möglichen patho-physiologischen Funktionen von GRSF1, die sich vor allem mit der Rolle dieses Proteins bei viralen Infektionen, bei der Pathogenese verschiedener Krebsarten und bei der hereditären Epilepsie beziehen [54], sollen an dieser Stelle nicht näher erläutert werden.

#### **2.2.3.1. Mögliche Rolle von GRSF1 bei der Regulation von oxidativem Stress und bei der intrazellulären Signaltransduktion**

Das GRSF1-Protein konnte in eukaryontischen Zellen im Nukleus, im Zytosol und auch in den Mitochondrien nachgewiesen werden. Daraus lässt sich ableiten, dass GRSF1 an Prozessen beteiligt ist, die in diesen Zellorganellen lokalisiert sind [55]. Dabei wird angenommen, dass zytosolisches GRSF1 die Translation unterschiedlicher mRNAs reguliert [55]. Im Mitochondrium konnte eine Isoform des GRSF1 nachgewiesen werden, welche mit der RNase P interagiert [59]. Außerdem ist bekannt, dass GRSF1 die Translation der Glutathion-Peroxidase 4 (Gpx4) modifiziert. Dazu bindet es im Zytoplasma an die mRNA der Gpx4 und transportiert diese zu den Ribosomen [1]. Dabei wird angenommen, dass GRSF1 mit Proteinen interagiert, welche zum Initiationskomplex der Translation gehören. Dadurch aktiviert GRSF1 die Translation der Gpx4-mRNA.

Die Gpx4 ist ein Enzym, das zum intrazellulären antioxidativen Schutzsystem gehört. Es reduziert stark oxidierend wirkende Lipidhydroperoxide zu Alkoholen unter Verbrauch von reduziertem Glutathion [60] [61]. Im Testis ist die Gpx4 als Strukturprotein an der Spermienreifung beteiligt [62]. Im Gehirn spielt das Enzym eine wichtige Rolle während der frühen Embryogenese [61]. Bei Mäusen konnte gezeigt werden, dass homozygote Gpx4-defiziente Mäuse in frühen Stadien ihrer Embryonalentwicklung im Uterus der Mutter absterben und anschließend resorbiert werden. Heterozygote Gpx4<sup>+/-</sup>-Mäuse entwickelten sich hingegen normal und zeigten keine phänotypischen Veränderungen, solange sie nicht zusätzlich stimuliert wurden.

Bei *in vitro* Untersuchungen zur Mausembryogenese konnte gezeigt werden, dass ein RNAi-induzierter Knockdown der *Grsf1*-Expression zu einer Schädigung der embryonalen Hirnentwicklung führt. Diese Entwicklungsstörung konnte durch transgene Expression der mGPx4 normalisiert werden [1]. Diese Daten deuteten darauf hin, dass GRSF1 für die embryonale Hirnentwicklung benötigt wird, wobei die diesen Vorgängen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen noch nicht völlig aufgeklärt werden konnten.

Darüber hinaus scheint GRSF1 auch in der intrazellulären Signaltransduktion integriert zu sein. So wird vermutet, dass GRSF1 als Bindungspartner des Proteins DAZL (deleted in azoospermia like) fungiert und somit bedeutsam für die Aktivität des mTOR-Signalweges ist [63]. Ebenso scheint GRSF1 für den Wnt-Signalweg bedeutsam zu sein [64]. Die Aktivierung des Wnt-Signalweges verläuft über die Hemmung des Abbaus von  $\beta$ -Catenin, damit dieses Protein die Transkription seiner Zielgene aktivieren kann. Dies geschieht über die Bindung des Liganden Wnt an seinen Rezeptor „Frizzled“ und dessen Co-Rezeptor „Low-density lipoprotein receptor related protein“ (LRP) [65]. Das dadurch aktivierte Protein Dishevelled (DVL) hemmt den Destruktions-Komplex (bestehend aus Axin-1, GSK3-beta und APC), sodass die Ubiquitinierung von  $\beta$ -Catenin gestoppt wird [66]. Zu den Zielgenen von  $\beta$ -Catenin gehört auch das *gastrulation homeobox 2* Gen (*Gbx2*) [67]. Dieses Gen kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der für die embryonale Hirnentwicklung bedeutsam ist [68]. So konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown der *Grsf1*-Expression in Embryonen zu einer verminderten Ausdehnung der posterioren Achse der Allantois (hintere Ausstülpung des embryonalen Darms) führt und Defizite in der Entwicklung des Mittelhirns verursacht [69]. Zusätzlich wurde beobachtet, dass das *Gbx2*-Gen zu Beginn der Embryogenese auf hohem Niveau exprimiert wird, im weiteren Zeitverlauf aber deutlich abnimmt. Aus diesen Daten wurde geschlussfolgert, dass *Grsf1* eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der *Gbx2* Expression während der späteren Phasen der embryonalen Hirnentwicklung spielen könnte. Letztendlich sind jedoch die genauen Funktionen von *Grsf1* im Rahmen der beiden Signalwege noch nicht abschließend aufgeklärt.

#### **2.2.3.2. Mögliche Rolle von GRSF1 bei Zellalterung und Seneszens**

GRSF1 wird in gealterten Zellen weniger stark exprimiert als in weniger stark gealterten Zellen [70]. Dadurch kommt es bei gealterten Zellen zu einer mitochondrialen Dysfunktion, was mit einer erhöhten Produktion von Superoxid im Rahmen des

mitochondrialen Elektronentransports einhergeht. Durch diese Mechanismen können die anti-oxidativen Schutzsysteme der Zelle überfordert werden, was zu DNA-Schäden und zu einer verminderter Zellproliferation führt [71]. Des Weiteren wurde beobachtet, dass eine Unterdrückung der GRSF1-Expression zu einer Aktivierung der SA- $\beta$ -gal (senescence-associated- $\beta$ -Galaktosidase) führt. Dagegen konnte eine Abnahme der Freisetzung des anti-inflammatorischen Zytokins Interleukin-8 (IL8) gezeigt werden. Zusammengenommen deuten diese Daten darauf hin, dass Zellen bei einem GRSF1-Mangel einen pro-inflammatorischen Phänotyp annehmen, was zu einer beschleunigten Zellalterung beiträgt [70]. Weiterhin wird derzeit vermutet, dass eine Verringerung der GRSF1-Expression eine Störung des Mitochondrienstoffwechsels induziert, was ebenfalls zu einer beschleunigten Zellalterung beiträgt [70]. Ob bei diesem Prozess die Wechselwirkung von GRSF1 mit der mitochondrialen Isoform des Gpx4 eine Rolle spielt, muss in weiterführenden Experimenten genauer untersucht werden.

Die Hypermethylierung des *GRSF1*-Promotors reduziert die Expression von GRSF1, was auch zu einer beschleunigten Zellalterung beitragen könnte [70]. Umgekehrt konnte an humanen Hautfibroblasten gezeigt werden, dass die Methylierung des *GRSF1*-Promotors in Zellen ansteigt, die durch einen beschleunigten Alterungsprozess gekennzeichnet sind [70]. Dieses Ergebnis bestätigt den vermuteten Zusammenhang zwischen dem Funktionsstatus des *GRSF1*-Gens und der Zellalterung.

### **2.2.3.3. Mögliche Rolle von GRSF1 bei der mitochondrialen Dysfunktion**

Das humane mitochondriale Genom codiert als zirkuläres DNA-Molekül für insgesamt zwei rRNAs, 22 tRNAs und dreizehn unterschiedliche Proteine [72]. Andere Proteine, die für die Funktionalität der Mitochondrien erforderlich sind, werden durch das nukleäre Genom codiert und nach ihrer Biosynthese in das Mitochondrium importiert [73]. Die mitochondriale DNA besteht aus einem guanin-reichen Strang (H-Strang) und dem L-Strang, welcher hauptsächlich für non-coding Antisense-RNAs codiert [74]. Diese RNA-Moleküle werden durch ein Degradosom abgebaut, das aus zwei Hauptkomponenten zusammengesetzt ist: I) RNA-Helikase-Komplex SUPV3L1 (kurz SUV3) und II) der Ribonuklease PNPT1 (kurz PNPase) [74]. Viele der non-coding antisense RNAs, die durch den L-Strang codiert werden, beinhalten G-quadruplex-Strukturen, welche durch GRSF1 erkannt werden können [75]. Gleichzeitig interagiert



GRSF1 direkt mit dem SUV3-PNPase-Komplex. Damit kommt GRSF1 eine wichtige Rolle beim Abbau von mtRNA zu [74, 75].

Weiterhin beeinflusst GRSF1 die Prozessierung mitochondrialer long non-coding RNAs (lncRNAs) und ist an der Regulation der Endoribonuklease (RMRP) beteiligt [76]. Dieses Enzym wird zwar durch das nukleäre Genom kodiert, ist aber auch an der DNA-Replikation und der RNA-Prozessierung im Mitochondrium beteiligt. Dabei bindet GRSF1 an die RMRP mRNA, wodurch deren Translation gesteigert wird [76]. Durch diesen funktionellen Zusammenhang ergibt sich bei einer Reduktion der GRSF1-Expression auch eine verminderte Aktivität von RMRP mit der Folge einer reduzierten DNA-Replikation und einer beeinträchtigten mitochondrialen Zellatmung [76]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass GRSF1 auch an mitochondrialen RNA-Granula lokalisiert ist [77]. Diese Granula enthalten *de novo* synthetisierte mitochondriale RNA [78] und spielen eine Schlüsselrolle bei der post-transkriptionalen mRNA-Prozessierung und bei der Assemblierung mitochondrialer Ribosomen [79]. Letztere war nach einem Knockdown der GRSF1-Expression deutlich gestört [77]. Neben GRSF1 befindet sich auch die RNase P in den mitochondrialen RNA-Granula [59]. Dieses Enzym ist u.a. für die Prozessierung von mtRNA verantwortlich und spielt damit bei der Expression mitochondrialer Proteine eine wichtige Rolle. Auch dieses Enzym scheint mit GRSF1 zu interagieren [59], wobei die molekularen Mechanismen dieser Protein-Protein-Interaktion, insbesondere die Rolle verschiedener Strukturbereiche der beiden Proteine, bislang noch nicht aufgeklärt werden konnten.

#### **2.2.4. GRSF1 als potenzieller Bindungspartner von anderen Regulatorproteinen**

GRSF1 besitzt insgesamt vier Strukturdomänen (**Abbildung 03**), über die dieses Protein mit anderen Biomolekülen wechselwirken kann. Drei davon können auf der Basis ihrer Primärstruktur als quasi-RNA recognition motifs (qRRM) identifiziert werden und sollten damit eine wichtige Rolle bei der GRSF1-RNA Interaktion spielen [56]. Weiterhin enthält das GRSF1-Protein eine Ala-reiche Domäne (**Abbildung 03**), welche in der Aminosäuresequenz der qRRM1-Domäne vorgeschaltet ist [80-82]. Zur biologischen Funktion der Ala-reichen Domäne gibt es nur wenige experimentelle Daten. Seit geraumer Zeit wird jedoch vermutet, dass diese Domäne für die Bindung potenzieller GRSF1-Bindungsproteine verantwortlich sein könnte. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass dieses Strukturmotiv für die Interaktion von GRSF1 mit dem

copper metabolism MURR1 domain-containing protein 1 (COMMD1) bedeutsam ist [83].

Obwohl die genauen Mechanismen dieser Protein-Protein-Interaktion noch nicht aufgeklärt werden konnten, könnte die Ala-reiche Domäne auch Zielstruktur anderer GRSF1-bindender Proteine sein. Im Gegensatz zu den weitgehend unklaren Mechanismen der Protein-Protein-Interaktion zwischen GRSF1 und potentiellen Proteinbindungspartnern, sind die Mechanismen der GRSF1-RNA Interaktion wesentlich besser untersucht. Die drei qRRM-Domänen von GRSF1 binden an guaninreiche RNA-Sequenzen [53, 55, 82], die sich spontan zu viersträngigen Sekundärstrukturen, den G-Quadruplexen, falten [64, 84]. Wenn GRSF1 an diese Strukturen bindet, wird deren Quadruplexstruktur aufgelöst [75]. Bisher sind wenige eukaryontische mRNAs bekannt, an die GRSF1 effektiv binden kann. Drei Beispiele seien an dieser Stelle genannt:

- I) Gluthathionperoxidase 4 (Gpx4) mRNA [68]
- II) unusual SNARE of the endoplasmatic reticulum-1 (USE1) mRNA [85]
- III) Nukleoprotein des Influenzavirus mRNA [53, 55, 86].

Darüber hinaus bindet GRSF1 an verschiedene mtRNAs, wobei die Mechanismen dieser Interaktionen noch nicht näher charakterisiert worden sind.

### **2.2.5. *Grsf1*-Knockout-Mäuse**

Wie unter 2.2.3. beschrieben, existieren eine Reihe von Hypothesen zur biologischen Rolle von GRSF1. Die meisten dieser Hypothesen basieren auf Untersuchungen, die in zellulären *in vitro* Systemen durchgeführt wurden. Da bis vor Kurzem noch keine *Grsf1*-Knockout-Mäuse verfügbar waren, konnten die Hypothesen zur biologischen Rolle von *Grsf1* noch nicht in *in vivo* Modellen überprüft werden. Kürzlich wurden *Grsf1*-Knockout-Mäuse hergestellt, bei denen die Expression des Proteins selektiv in der Skelettmuskulatur ausgeschaltet wurde [87]. Diese Mäuse entwickelten sich normal bis zu einem Alter von neun Monaten. Im höheren Alter zeigten sie jedoch eine verminderte Ausdauerleistung der Skelettmuskulatur. Außerdem wurde bei Untersuchungen des Muskeltranskriptoms eine Erhöhung der Expression verschiedener mitochondrialer Proteine, pro-inflammatorischer Faktoren und verschiedener Ionentransporter beobachtet. Ob diese Veränderungen jedoch ursächlich mit der beobachteten Verringerung der Muskelausdauer zu tun haben, kann derzeit noch nicht sicher geschlussfolgert werden.

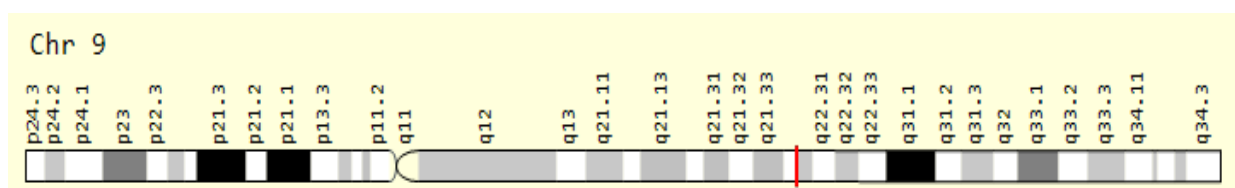
Beim Menschen und bei der Maus wird GRSF1 in fast allen Zellen und Organen exprimiert. Obwohl die Expressionshöhen in der Skelettmuskulatur und im Herzen sehr hoch sind [87], könnte ein kompletter Knockout des *Grsf1*-Gens im Gesamtorganismus andere Veränderungen bewirken. Um solche Veränderungen besser untersuchen zu können, müssten systemische *Grsf1*-Knockout Mäuse verwendet werden.

### 2.3. Charakterisierung von potenziellen GRSF1-Bindungsproteinen

Viele DNA/RNA bindende Proteine sind in der Lage, nicht nur ihre Nukleinsäuresubstrate effektiv zu binden, sondern auch mit anderen Proteinen Wechselwirkungen einzugehen. Solche Protein-Protein-Wechselwirkungen sind für die biologischen Funktionen von Nukleinsäure-bindenden Proteinen von essenzieller Bedeutung, da sie ihre regulatorischen Funktionen häufig als Bestandteile großer Multiproteinkomplexe vermitteln. Auch für GRSF1 wurde kürzlich beschrieben, dass es mit dem COMMD1 Protein wechselwirkt und dass für diese Wechselwirkung die Ala-reiche Domäne von GRSF1 bedeutsam ist [83]. Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei weitere potenziell GRSF1-bindende Proteine identifiziert und diese sollen in den folgenden Kapiteln der Einleitung zu dieser Arbeit kurz eingeführt werden.

#### 2.3.1. Selenocystein insertion sequence binding protein 2 (SBP2)

Das Selenocystein insertion sequence (SECIS) binding protein 2 (SBP2) ist ein RNA-bindendes Protein, welches spezifisch mit der Selenocystein-Insertionssequenz (SECIS) interagiert. Bei Eukaryonten ist diese Sequenz meist in der 3'-untranslatierten Region von mRNAs lokalisiert, die für Selenocystein-haltige Proteine kodieren [88, 89].



**Abbildung 04: Struktur des humanen Chromosoms 9 und Lokalisation des SBP2 Gens.** Die Lokalisation des SBP2Gens auf dem humanen Chromosom 9 ist durch den senkrechten roten Strich auf dem langen Arm des Chromosom 9 gekennzeichnet. Quelle: modifiziert nach <https://cdn.genecards.org/genomic-location-v5-15/SECISBP2-gene.png>.

Das Gen für das humane SBP2 ist auf dem langen Arm des Chromosom 9 (9q22.2) lokalisiert (**Abbildung 04**). Es hat eine Größe von mehr als 41 kbp und besteht aus 17 Exons und 16 Introns. Das entsprechende Mausgen ist in einer synthetischen

Region auf dem Chromosom 13 lokalisiert. Beim Menschen wurden unterschiedliche Transkripte isoliert und die molekulare Masse des kompletten humanen SBP2-Proteins beträgt ca. 120 kDa.

Die funktionelle Bedeutung der SECIS-Motive besteht darin, dass sie als Bindungsstellen für regulatorische Proteine fungieren (SBPs), welche das UGA-Stoppkodon, welches bei den Selenoproteinen für den Einbau von Selenocystein in die wachsende Polypeptidkette kodiert, umkodiert [90]. Selenocystein ist eine nicht-kanonische proteinogene Aminosäure, die für die Funktion von Selenoproteinen unerlässlich ist [91]. Zu den Selenoproteinen gehören beim Menschen u.a. mehrere Isoformen der Glutathionperoxidasen, die Selenoproteine SelH, SelK, SelM, SelO, SelP, die Iodothyronin-Dejodasen 1-3, die Selenophosphat Synthetase 2 sowie die Thioredoxinreduktasen 1-3 [92].

SBP2, das an die SECIS der Selenoprotein mRNAs bindet, interagiert mit der 60S-Untereinheit des Ribosoms, die hauptsächlich aus 28S rRNA besteht [93]. Mutationen des SBP2-Gens haben zur Folge, dass Selenoproteine nicht mehr ausreichend synthetisiert werden können. Eines dieser Selenoproteine ist die Thyroxindeiodinase 2 (DIO2), die dafür verantwortlich ist, dass das in der Schilddrüse synthetisierte Hormon Thyroxin (Tetraiodthyronin, T4) zu seiner Wirkform Triiodthyronin (T3) dejodiert wird. Bei Mutationen im DIO2-Gen kommt es deshalb zu einem Anstieg von T4 und zu einem anti-parallelen Abfall des Wirkhormons T3 [94]. Dabei entwickeln sich die typischen Symptome einer Hypothyreose, wobei die TSH-Werte wegen der regulären T4-abhängigen negativen Rückkopplungswirkung auf die Hypophyse normal bleiben oder sogar absinken können. Klassische Symptome dieser genetischen Erkrankungen sind Myopathie, Hörminderung, Unfruchtbarkeit (vor allem beim Mann), erhöhte Photosensitivität, mentale Retardierung und Ataxie [85]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Mutationen im SBP2-Gen auch zu einer reduzierten Synthese der Gpx4 (phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase 4) führt [95]. Dieses Enzym ist Teil des anti-oxidativen Schutzsystems der meisten eukaryontischen Zellen, fungiert aber auch als Strukturprotein bei der Spermatogenese [61, 62]. Dabei trägt die Gpx4 als Proteinpolymer zur Bildung der mitochondrialen Kapsel bei. Im Unterschied zu den Mitochondrien von somatischen Zellen, die im gesamten Zytoplasma verteilt vorhanden sind, liegen diese Organellen in Spermien geclustert vor und werden von einer gemeinsamen Hülle, der mitochondrialen Kapsel, umgeben. Mutationen im SBP2-Gen führen damit zur Beeinträchtigung der Spermatogenese, zu oxidativem Stress und

erhöhter Lipidperoxidation, was sich u.a. in einer erhöhten Photosensitivität der Haut widerspiegelt [96].

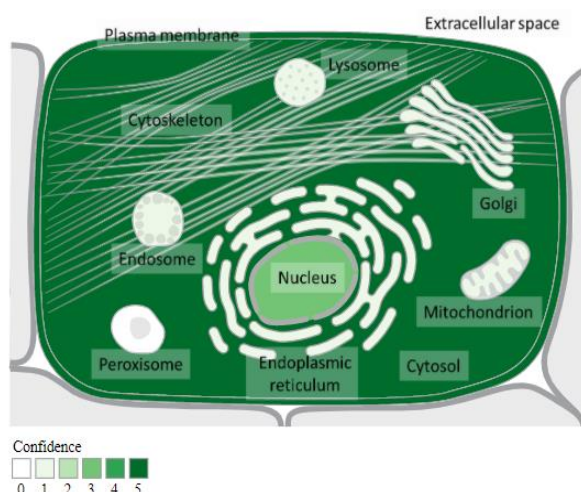
### 2.3.2. Tetratricopeptid repeat protein 7B (TTC7B)

Das Gen, das für das TTC7B-Protein kodiert, befindet sich auf dem langen Arm des Chromosom 14 (**Abbildung 05**). Das kodierte Protein besteht aus 843 Aminosäuren und besitzt eine molekulare Masse von ca. 94 kDa. Das orthologe Gen im Mausgenom befindet sich in einer syntenischen Region auf dem Chromosom 12 [97].



**Abbildung 05: Struktur des humanen Chromosoms 14 und Lokalisation des TTC7B Gens.** Die Lokalisation des TTC7B-Gens auf dem humanen Chromosom 14 ist durch den senkrechten roten Strich auf dem langen Arm des Chromosoms gekennzeichnet. Quelle: modifiziert nach <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=TTC7B>

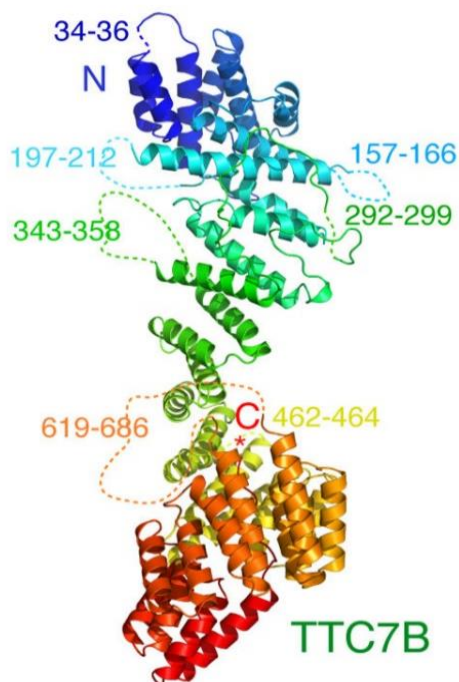
TTC7B ist an der Transkription, der mRNA Prozessierung und an der Regulation der Proteinfaltung beteiligt [98, 99]. Das Protein konnte an verschiedenen Stellen innerhalb der Zelle nachgewiesen werden. Dabei zeigen die Plasmamembran und das Zytosol das höchste Vorkommen, aber auch im Kern eukaryotischer Zellen ist TTC7B nachweisbar (**Abbildung 06**).



Compartment	Confidence
plasma membrane	5
cytosol	5
nucleus	3
cytoskeleton	1
mitochondrion	1
endoplasmic reticulum	1
endosome	1
lysosome	1
golgi apparatus	1

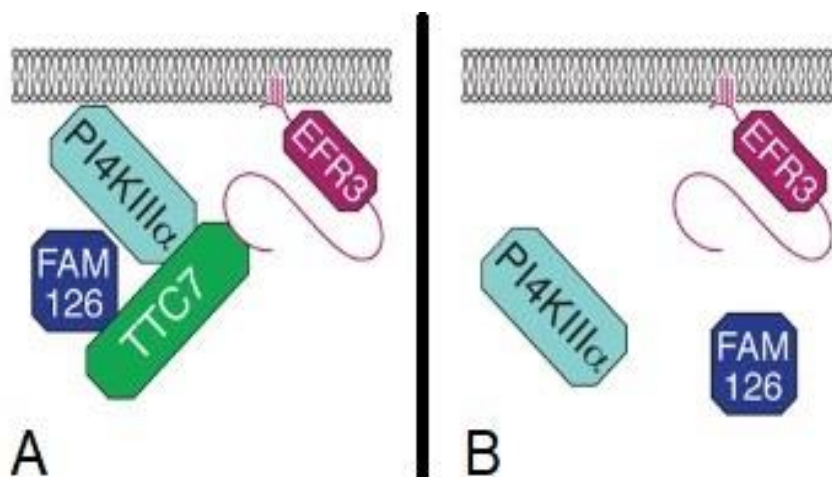
**Abbildung 06: Intrazelluläre Verteilung von TTC7B.** Die Intensität der Grüntöne symbolisiert die Expressionshöhen von TTC7B. Je dunkler der Grünton, desto mehr TTC7B wird exprimiert. Führend sind Cytosol und Plasmamembran, während Zellorganellen mit Ausnahme des Zellkerns frei von TTC7B sind. Quelle: modifiziert nach [https://www.genecards.org/Images/jensen\\_labels.png](https://www.genecards.org/Images/jensen_labels.png).

Die Kristallstruktur des TTC7B Proteins konnte im Komplex mit Hyccin aufgeklärt werden. Hyccin ist ein Vertreter der Hyccin-Proteinfamilie und spielt eine wichtige Rolle im Rahmen des beta-Catenin-Signalweges. Das TTC7B-Protein besteht aus verschiedenen Helices (**Abbildung 07**), die sich zu mehreren strukturell abgrenzbaren Domänen zusammenlagern. Der TTC7B-Hyccin Komplex besteht aus einem TTC7B-Dimer und dem Hyccin-Protein. Funktionell spielt dieser Komplex bei der Myelinisierung von Nervenfasern im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle, wobei die molekularen Mechanismen, über die TTC7B die Myelinisierungsreaktion beeinflusst, noch nicht im Detail aufgeklärt werden konnten. Defekte im Hyccin-Gen (FAM126A) verursachen eine Hypomyelinisierung von Nervenfasern und kongenitale Katarakte [100, 101]. Wegen seiner biologischen Funktion bei der Nervenfasermyleinisierung wird TTC7B im Gehirn in besonders hoher Konzentration exprimiert. Weitere Gewebe mit hoher TTC7B-Expression sind das Fettgewebe, die Plazenta und das Herz [102], wobei die biologische Rolle des Proteins in diesen Organen bislang noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte. Pathophysiologisch wurde ein Zusammenhang zwischen TTC7B-Expression und dem ischämischen Schlaganfall untersucht [98]. Dabei konnte zwar ein statistischer Zusammenhang hergestellt werden, die mechanistischen Grundlagen für diesen Zusammenhang bleiben aber weitgehend unklar [98].



**Abbildung 07: Kristallstruktur des TTC7B Proteins.** Diese Struktur wurde aus der Kristallstruktur des TTC7B-Hyccin Komplexes extrahiert (PDB: 5DSE). Quelle: modifiziert nach Baskin et al, Nat Cell Biol. 2016 [103].

TTC7 ist Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, welcher die Synthese von Phosphatidylinositol 4-phosphates (PI4P) in biologischen Membranen reguliert [103]. PI4P induziert in der Phospholipiddoppelschicht von Membranen strukturelle Veränderungen, die zu stark gekrümmten Membranstrukturen führen [104, 105] und ist damit an Membrantransportprozessen im trans-Golgi-Apparat beteiligt [106]. In diesem Multiproteinkomplex geht TTC7B direkte Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ein [103]. So konnte gezeigt werden, dass in Abwesenheit von TTC7B keine Anreicherung der anderen Komplexbestandteile an der Plasmamembran erreicht werden konnte (**Abbildung 08**), was zu einer katalytischen Inaktivität des Komplexes führte. Damit verringerte sich die PI4P Synthese, was zu einer Reduktion des gesamten intrazellulären Signalweges führte [103].



**Abbildung 08: Rolle von TTC7B beim IP3 Signaling.** Damit die PI4KIIIa an der Membran wirken kann, benötigt sie einen aktivierenden Proteinkomplex, dieser besteht aus dem FAM126, TTC7B und dem Membran-verankerten Protein EFR3. TTC7B fungiert als Bindeglied dieses Komplexes: Ohne TTC7B ist es den Proteinen nicht möglich miteinander in Kontakt zu treten und die katalytische Wirkung der PI4KIIIa bleibt aus. Dadurch wird die intrazelluläre Signalwandlung unterbrochen, was zu einer Veränderung des Phänotyps beiträgt. Quelle: modifiziert nach Baskin et al, Nat Cell Biol. 2016 [103].

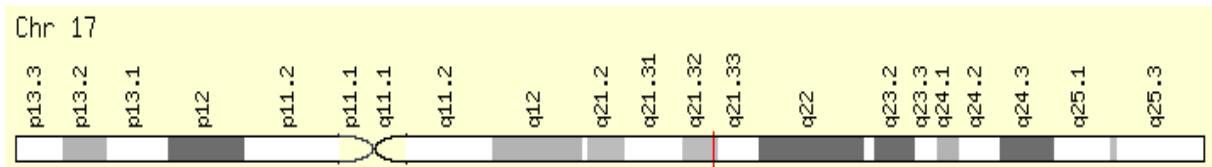
Die oben beschriebene Wirkung von TTC7B im Rahmen des IP3-Signalweges konnte bei der Entwicklung der Flügel bei der Taufliege (*D. melanogaster*) im Detail aufgeklärt werden [107]. So führte eine verminderte TTC7B-Expression zu einer verringerten Konzentration von PI4P in der Zellmembran, wodurch die normale Flügelentwicklung der Taufliege beeinträchtigt wurde [107].



### 2.3.3. Vacuolar sorting protein 8 (SNF8)

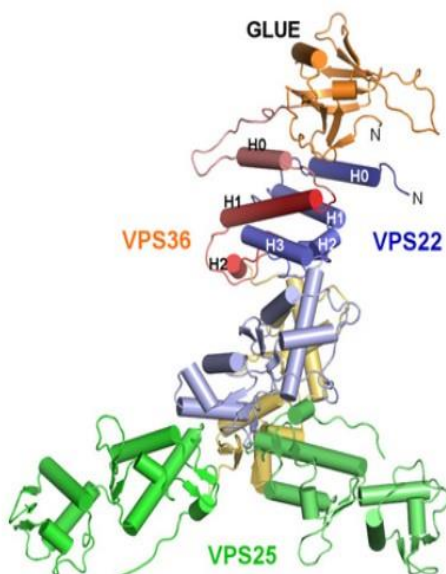
SNF8 ist ein intrazelluläres Protein, das in vielen Zellen weit verbreitet vorkommt. Es wird kodiert durch das *VPS22*-Gen, das im humanen Genom auf dem langen Arm des Chromosom 17 lokalisiert ist (**Abbildung 09**).

Im Mausgenom befindet sich das orthologe Gen in einer synthenischen Region auf dem Chromosom 11. Das humane Gen besteht aus 8 Exons und 7 Introns und hat eine Größe von ca. 5 kbp.



**Abbildung 09: Struktur des humanen Chromosoms 17 und Lokalisation des SNF8 Gens.** Die Lokalisation des SNF8-Gens auf dem humanen Chromosom 17 ist durch den senkrechten roten Strich auf dem langen Arm des Chromosoms gekennzeichnet. Quelle: modifiziert nach <https://cdn.genecards.org/genomic-location-v5-15/SNF8-gene.png>.

Das SNF8-Protein, das nach dem kodierenden Gen auch als VPS22-Protein bezeichnet wird, ist Teil des endosomalen Sortierkomplex ESCRT-II. Ein Strukturmodell dieses Komplexes (PDB entry: 2ZME) ist in **Abbildung 10** dargestellt. Strukturell ist der ESCRT-II Komplex ein Y-förmiges Heterotetramer, welches aus zwei Kopien des Proteins VPS25 (vacuolar protein-sorting associated protein 25) und je einer Kopie des Proteins VPS22 (vacuolar protein-sorting associated protein 25, Synonym für SNF8) und einer Kopie des Proteins VPS 36 (vacuolar protein-sorting associated protein 36) besteht [108, 109].



**Abbildung 10: Strukturmodell des humanen ESCRT-II Komplexes.** Der Komplex hat eine Y-Struktur und besteht aus drei Armen. Er enthält je eine Kopie des VPS22 Proteins (blau) und des VPS36 Proteins (rot) und zwei Kopien des VPS25 Proteins (grün). Die monomeren Proteine interagieren miteinander über nicht-kovalente Wechselwirkungen. Quelle: modifiziert nach Im YJ et al., Dev Cell 2008 [110].



Dieser Komplex reguliert den Transport von ubiquitierten Transmembranproteinen in die Lysosomen, wo sie proteolytisch abgebaut werden. Weiterhin ist ESCRT-II und damit SNF8 an zahlreichen anderen Prozessen beteiligt. Die Biogenese multivesikulärer bodies, die Zellteilung und die Virus-Knospung [111] sind Beispiele dafür. In einigen Viren, unter anderem auch im humanen Immundefizit Typ I (HIV-I), im Hepatitis B-Virus (HBV) und im Hepatitis C-Virus (HCV) wurden spezifische ESCRT-II Proteinkomplexe gefunden, welche hauptsächlich in der Virushülle lokalisiert sind und am Knospungsprozess beteiligt zu sein scheinen [108, 111-116].

### 3. Zielstellung und experimentelle Strategie

Obwohl GRSF1 seit mehr als 25 Jahren bekannt ist und in den letzten Jahren eine Reihe von Hypothesen zur biologischen Funktion dieses RNA-bindenden Proteins aufgestellt wurden, gab es zu Beginn meiner Arbeit nur wenige Hinweise darauf, ob diese Hypothesen auch für die *in vivo* Situation zutreffen. Das lag zum einen daran, dass bis dahin noch keine Daten verfügbar waren, mit welchen anderen Proteinen GRSF1 interagiert (Protein-Protein-Interaktion von GRSF1). Zum anderen waren zu diesem Zeitpunkt noch keine *Grsf1*-Knockout-Mäuse verfügbar, an denen die aufgestellten Hypothesen zur biologischen Funktion von GRSF1 *in vivo* überprüft werden konnten. Aufgrund dieser Datenlage wurden für die vorliegende Dissertation zwei konkrete Forschungsziele formuliert:

1. Identifizierung von intrazellulären Proteinen, die mit GRSF1 interagieren.
2. Herstellung von homozygoten *Grsf1*-defizienten Mäusen und deren basale funktionelle Charakterisierung.

Um das erste Forschungsziel (Identifizierung von GRSF1-bindenden Proteinen) zu erreichen, wurde zunächst ein Hefe-2-Hybrid-Screen durchgeführt. Die dabei identifizierten potenziellen GRSF1-Bindungsproteine wurden einem mehrstufigen Selektionsprozess unterworfen, wobei der Großteil der im Hefe-2-Hybrid-System identifizierten Kandidaten als falsch positive Treffer nicht weiter untersucht wurden. Drei der potenziellen GRSF1-Bindungsproteine überstanden die angewandte Filterstrategie und konnten in nachfolgenden Immunopräzipitationsexperimenten als GRSF1-bindende Proteine bestätigt werden (SBP2, SNF8, TTC7B).

Um das zweite Forschungsziel (Herstellung von *Grsf1*-defizienten Mäusen) zu erreichen, wurden zunächst durch genetische Manipulation von embryonalen Stammzellen gefloxt *Grsf1*-Mäuse erzeugt, bei denen die Exons 4 und 5 des *Grsf1*-Gens von Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase flankiert wurden. Diese gefloxt *Grsf1*-Mäuse wurden anschließend mit Cre-deleter Mäusen verpaart, bei denen die Rekombinase unter Kontrolle des CMV-Promotors exprimiert wird, was zu einer irreversiblen systemischen (in allen Zellen und Geweben) Inaktivierung des *Grsf1*-Gen führte. Heterozygote Merkmalsträger wurden anschließend verpaart, um homozygote Merkmalsträger (*Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse) zu züchten. Diese Mäuse wurden anschließend funktionell charakterisiert, wobei festgestellt werden konnte, dass homozygote männliche *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse weniger Gewichtszunahme während ihrer post-

partalen Entwicklung (5-50 Wochen) zeigten als entsprechende Wildtypkontrolltiere. Bei weiblichen Individuen wurde diese subtile Wachstumsretardierung jedoch nicht beobachtet, was auf einen geschlechtsspezifischen Effekt hindeutet. Die Mobilität, das Vermehrungsverhalten, die Fellstruktur und die basalen hämatologischen Parameter der *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse wurden durch die Modifizierung des *Grsf1*-Gens nicht beeinflusst. Diese Daten deuten darauf hin, dass eine systemische Inaktivierung des *Grsf1*-Gens geschlechtsspezifische Veränderungen bei der Körpergewichtsentwicklung induziert, deren molekulare Ursachen in zukünftigen Untersuchungen näher charakterisiert werden müssen.

## 4. Material und Methoden

### 4.1. Materialien

#### 4.1.1. Enzyme

Enzym	Hersteller	Funktionen
T4 DNA Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland	Katalysiert die Verbindung zweier Moleküle mittels einer kovalenten Bindung.
Restriktionsendonukleasen XhoI, EcoRI, Bgl II	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Enzyme zum Schneiden von DNA an spezifischen DNA Sequenzen.
RevertAid Premium Reverse Transkriptase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Polymerasen, welche eine umgekehrte Transkription katalysieren und somit RNA in DNA umschreiben können.
Zymolyase	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland	Baut enzymatisch die Zellwand von Hefezellen ab.
RNase	Macherey-Nagel, Düren, Deutschland	Dient dem Abbau von RNA.

**Tabelle 01:** Verwendete Enzyme und deren Herkunft.

#### 4.1.2. Kits

Kit	Hersteller	Funktionen
SensiFast™ SYBR® No-ROX KIT	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Dient der Amplifizierung von DNA und cDNA-Templates. Zusätzlich erfolgt die Markierung mittels eines fluoreszierenden Farbstoffes.
NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit	Macherey Nagel, Düren, Deutschland	Präparationskit für Plasmide

TOPO TA Cloning Kit	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Kit zur Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren.
GeneJET Plasmid Miniprep Kit®	ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Vorbereitung für andere Downstream-Anwendungen.
Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland	Amplifizierung von DNA-Fragmenten zur Vorbereitung für andere Downstream-Anwendungen
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Zur Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus TAE- oder TBE-Agarosegelen.
Rapid Ligation Kit	Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA	Ligation von DNA mit Sticky- oder Blunt-Enden für die anschließende bakterielle Transformation
NucleoSpin RNA-Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Zur Aufreinigung von RNA aus unterschiedlichen Geweben.
Pierce™ Magnetic c-Myc-Tag IP/Co-IP Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Kit für Immunpräzipitationen mittels magnetischen Beads für c-Myc-markierte Proteine.
NucleoSpin® RNA (RNA-Isolations-Kit)	Machery-Nagel, Düren, Deutschland	Zur Aufreinigung von RNA aus unterschiedlichen Geweben.
RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthese Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Kit für die Synthese von Erststrang-cDNA aus gereinigter Poly(A)+ oder Gesamt-RNA.
GeneJet Gel Extraction Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Für die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Standard-Agarosegelen.

GeneJet Plasmid Kits	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Kit zur DNA-Präparation aus Bakterien.
NucleoBond Xtra MIDI Plus Kit	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Aufreinigung von Plasmid-DNA
GeneJET Purification Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Zur Reinigung von DNA-Fragmenten zur Vorbereitung für andere Downstream-Anwendungen.
Western Blot Chemilumineszenz HRP Substrat Kit	Serva-Electrophoresis, Heidelberg, Deutschland	Substrat zum Nachweis von Meerrettichperoxidase-Konjugaten auf Immunoblots.
FastPrep-24® Homogenisators	MP Biomedical, Eschwege, Deutschland	Homogenisierung biologischer Proben
RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthese Kits	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA	Synthese von cDNA aus präparierten RNA-Templates.
NucleoBond Xtra MIDI Plus	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland	Präparation und Aufreinigung von Plasmid-DNA.

**Tabelle 02:** Verwendete Kits, Hersteller und Verwendungszwecke.

### 4.1.3. Antikörper

#### 4.1.3.1. Anti-cMyc-Peroxidase-Antikörper

Der Anti-Myc-Peroxidase-Antikörper ist laut Beschreibung des Herstellers Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) ein monoklonaler Antikörper gegen das c-Myc-Peptid und ist an die Meerrettichperoxidase konjugiert. Er erkennt das 9E10-Epitop mit der Aminosäuresequenz EQKLISEEDL (Einbuchstabencode der Aminosäuren).

#### **4.1.3.2. Anti-FLAG® M2-Peroxidase-Antikörper**

Der Anti-FLAG® M2-Peroxidase-Antikörper ist ebenfalls ein monoklonaler Antikörper der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA). Er ist kovalent an die Meerrettichperoxidase konjugiert und erkennt das Epitop DYKDDDDK (Einbuchstabencode der Aminosäuren).

#### **4.1.3.3. Anti-hGRSF1-Peroxidase-Antikörper**

Der verwendete Anti-humane GRSF1-Antikörper ist ein polyklonaler Antikörper gegen das rekombinante humane GRSF1, welcher im Kaninchen produziert wurde. Er ist ebenfalls mit der Meerrettichperoxidase gekoppelt und wurde auch von der Firma Sigma-Aldrich (St. Louis, USA) bezogen. Laut Angaben des Herstellers bindet dieser Antikörper an die folgende immunogene Sequenz des humanen GRSF1: RRNEV RTHVG SYK GK KIASF PTAKY ITEPE MVFEE HEVNE DIQPM TAFES EKEIL PKEVP EKLPE AADFG TTSSL HFVH. Zusätzlich zum oben beschriebenen Anti-hGRSF1-Antikörper wurde in einigen Experimenten der Anti-GRSF1-Antikörper (AB205531) der Firma Abcam (Cambridge, UK) verwendet. Dies ist ein monoklonaler Antikörper, der gleichermaßen mit Gewebeextrakten des Menschen, der Maus und der Ratte reagiert.

Der ebenfalls verwendete polyklonale Anti-human-GRSF1-Antikörper (HPA036985) von Sigma-Aldrich (Diesenhofen, Deutschland) wurde durch Immunisierung von Kaninchen mit einem menschlichen GRSF1 Peptid hergestellt und reagiert ausschließlich mit menschlichem GRSF1 (hGRSF1).

Des Weiteren wurde der monoklonale Anti-Maus-Gapdh Antikörper MA5-15738 von Invitrogen (Carlsbad, USA) angewendet. Dieser Antikörper erkennt die Glyzerinaldehydphosphatdehydrogenasen (GAPDH) aus *E. coli*, Sf9-Insektenzellen, *Saccharomyces cerevisiae*, Menschen, Mäusen, Ratten, Kaninchen, Hamstern und Hühnern. Er wurde ursprünglich gegen die Maus-Gapdh hergestellt.

Als sekundäre Antikörper wurde ein monoklonaler Anti-Kaninchen IgG Antikörper AB 205531 (Abcam, Cambridge, UK) und ein POD-markierter Anti-Maus-IgG-Antikörper (Invitrogen, Carlsbad, USA) verwendet. Die genaue Anwendung der Antikörper ist in den entsprechenden Abbildungen dargelegt.

Die Beschreibungen der verwendeten Antikörper entstammen den Angaben des jeweils genannten Herstellers.

#### 4.1.4. cDNA-Banken

DNA-Bank	Hersteller
cDNA-Expressionsbibliothek (hergestellt aus menschlichen fetalen Gehirn)	Clontech (heute Takara Bio, Kusatsu, USA)

**Tabelle 03:** Verwendete cDNA-Bibliothek und deren Hersteller.

#### 4.1.5. Plasmide

Plasmid	Hersteller
pACT2 (Vektor der Matchmaker cDNA Expressionsbibliothek)	Clontech, Palo Alto, USA
pCMV-3Tag-2C	Clontech, Palo Alto, USA
pCMV-3Tag-1	Clontech, Palo Alto, USA
pCR2.1-TOPO	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
TOPO TA Cloning 2.1	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
pGBKT7 Vektor	Clontech, Palo Alto, USA

**Tabelle 04:** Verwendete Klonierungs- und Ampifizierungsplasmide.

##### 4.1.5.1. pGBKT

Das pGBKT7-Plasmid kann sowohl in *E.coli* als auch in *S. cerevisiae* Zellen hineintransformiert werden. Der Vektor enthält das Gen Kan<sup>r</sup> (Kanamycinresistenzgen) für die Selektion von transformierten *E. coli* Zellen und das Gen TRP1 (Synthese von Tryptophan) für die Selektion von transformierten *S. cerevisiae* Zellen. Außerdem exprimiert es die GAL4-DNA Bindungsdomäne (GAL4-DNA-BD). Damit enthält es die Information für den C-terminalen Anteil eines Fusionsproteins, dass aus der C-terminal lokalisierten GAL4-Bindungsdomäne (GAL4-BD) und der N-terminal lokalisierten GAL4 Aktivator-domäne (GAL4-AD) besteht. Die GAL-Bindungsdomäne bindet an den Promotor des GAL4-abhängigen Reportergens. Zusätzlich kodiert das Plasmid für das c-Myc-Epitop.



#### 4.1.5.2. pACT2

Das pACT2-Plasmid dient der Expression der N-terminalen GAL4-Aktivator-domäne des Fusionsproteins. Des Weiteren beinhaltet es die Gene Amp<sup>r</sup> (Ampicillinresistenzgen) zur Selektion der transformierten *E.coli* Zellen auf Ampicillin-haltigem Nährboden und LEU2 (Synthese von Leucin) zur Selektion der transformierten *S. cerevisiae* Zellen auf Leucin-defizienten Nährmedien.

#### 4.1.5.3. pCMV

Die pCMV-Plasmide sind zirkuläre Vektoren, die zur Expression von rekombinanten Proteinen in geeigneten Säugetierzellen entwickelt wurden. Sie können in Bakterien vermehrt werden und sind in der Lage, nach Transfektion in Säugetierzellen, die Expression einklonierter Fremdproteine zu erzwingen. Dabei können sowohl markierte Fusionsproteine, die z.B. einen Myc-Tag (Aminosäuresequenz EQKLISEEDL) oder einen FLAG<sup>®</sup>-Tag (Aminosäuresequenz DYKDDDDK) tragen, als auch Nichtfusionsproteine exprimiert werden. Bei Fusionsproteinen können die entsprechenden Fusionssequenzen entweder N-Terminal oder auch C-terminal angehängt werden. Für die in dieser Arbeit beschriebenen Experimente wurde das Plasmid pCMV-3Tag-2C zur Erzeugung der Myc-markierten Proteine verwendet, wobei das Myc-Epitop am N-terminalen Ende den eigentlichen Protein vorgeschaltet wurde. Wie das entsprechende Leerplasmid beinhalteten die verschiedenen rekombinanten Plasmide eine Neomycin- und eine Kanamycinresistenzgenkassette. Die ungefähre Größe des Leerplasmids beträgt ca. 4,2 kbp.

Für die Expression des FLAG<sup>®</sup>-markierten GRSF1 wurde das Plasmid pCMV-3Tag-1 verwendet. Es induziert die Expression eines GRSF1-Fusionsprotein, N-terminal seiner eigentlichen Aminosäuresequenz den FLAG<sup>®</sup>-Tag enthält. Außerdem trägt auch dieses eukaryontische Expressionsplasmid eine Kanamycin-Neomycinresistenzgenkassette und erlaubt es transformierten Zellen sich auch in Anwesenheit dieser Antibiotika zu vermehren. Auch dieses eukaryontische Expressionsplasmid kann in Bakterienzellen vermehrt werden und besitzt eine ungefähre Größe von 4,2 kbp.

#### 4.1.6. Hefestämme, Bakterienstämme, Zelllinien

Stamm/Linie	Hersteller
<i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ), XL1 Blue	Stratagene, La Jolla, USA; Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> AH109	Clontech Laboratories, Mountain View, USA
Humane embryonale Nierenzellen HEK 293	American Type Cell Culture Collection, Manassas, USA

**Tabelle 05:** Verwendete Hefe- und Bakterienstämme sowie Zelllinien.

#### 4.1.7. Nährmedien

Medium	Hersteller
YPAD	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
YPAD-Agar	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten
LB-Medium	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
LB-Agar	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM	PAN Biotech, Aidenbach, Deutschland
10%iges fetales Kälberserum	Sigma Aldrich, St. Louis, USA

**Tabelle 06:** Verwendete Nährmedien.

##### 4.1.7.1. Nährmedien für Hefezellen

**YPAD-Medium:** Yeast extract (10 g/l), Pepton (20 g/l), Adenin (0,4 g/l), Dextrose (20 g/l): Für die Kultivierung der Hefen wurde initial das Vollmedium YPAD verwendet. Dieses besitzt alle Nähr- und Zusatzstoffe, sodass die damit angezüchteten Hefezellen keine zu ihrem Wachstum benötigten Bestandteile selbst synthetisieren müssen. Somit können nicht transformierte Hefen auf diesem Medium wachsen. Des Weiteren wurde das Mangel- bzw. Selektionsmedium YC-Medium genutzt. Diesen Nährmedien fehlen bestimmte Nährstoffe (z.B. bestimmte proteinogene Aminosäuren oder Adenin). Um zu wachsen, müssen die Hefezellen die fehlenden Bestandteile synthetisieren.

Um die Medien zu verfestigen, zum Beispiel für den Gebrauch als Nährplatten, wurde den Medien Agar-Agar (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) zugesetzt und die erhitzten Medien in Petrischalen gegossen. Auch hier mussten Mangelmedien für bestimmte Substrate hergestellt werden. In der **Tabelle 07** sind die in dieser Arbeit verwandten Mangelmedien-Klaturen erläutert.

<b>Nomenklatur</b>	<b>Fehlender Zusatz</b>
-L	Leucin
-A	Adenin
-W	Tryptophan
-H	Histidin
-AHLW	Adenin, Histidin, Leucin, Tryptophan

**Tabelle 07:** Nomenklatur der Hefenmedien.

#### **4.1.7.2. Nährmedien für Bakterien**

Lysogeny **B**roth Medium: Trypton (10g/l), Hefeextrakt (5 g/l), NaCl (5g/l)

Lysogeny **B**roth Agar: Trypton (10 g/l), Hefeextrakt (5 g/l), NaCl (5 g/l)

Für die Anzucht der *E.coli* Bakterien wurde das lysogeny-broth-Medium (LB-Medium) verwandt. Dazu wurden die oben aufgeführten Substanzen in einem Liter destilliertem Wasser gelöst und anschließend unter beständigem Schütteln erhitzt, bis das Gemisch den Siedepunkt für eine Minute erreicht hat. Im Anschluss wurde das Medium bei 121 °C für 15 Minuten autoklaviert. Das nun sterilisierte Medium kühlte im Wasserbad herunter. Ab einer Temperatur von unter 50 °C konnten weitere Zusätze hinzugefügt werden, beispielsweise Antibiotika. Das fertige Medium liegt in flüssiger Form vor und enthält neben Hefeextrakt auch Trypton und Natriumchlorid. Die Ausplattierung der Bakterien erfolgte auf LB-Agar, welcher aus LB-Medium unter Zugabe von Agar-Agar (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland), einem Gallert-bildenden Polysaccharid, hergestellt wird: Lysogeny Broth Agar.

#### **4.1.7.3. Medien für HEK293-Zellen**

Die HEK293-Zellen wurden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) kultiviert. Diesem wurde zusätzlich 10%iges fetales Kälberserum (FCS) hinzugefügt. Das fötale Kälberserum besitzt verschiedene Nährstoffe, die für das Wachstum eukaryontischer Zellen in Zellkulturansätzen bedeutsam zu sein scheinen.

#### 4.1.8. Geräte

Gerät	Hersteller
BioPhotometer Plus (Photometer)	Eppendorf, Hamburg
Blot-Kammer	Biometra, Göttingen
Brutschrank, Bakterien	Binder, Tuttlingen
Brutschrank, Hefen (Heraeus)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Brutschrank, Zellen (Heracell)	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Centrifuge 5804	Eppendorf, Hamburg
Centrifuge 5424R	Eppendorf, Hamburg
Elektrophoresegerät	Biometra, Göttingen
FastPrep-24® Homogenisators	MP Biomedical, Eschwege
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Gel-Imager Biodoc Analyze	Biometra, Göttingen
Ikamag RCT (Rührfischgerät)	Janke & Kunkel GmbH, Staufen
Laminarboxen	Steril S.p.a., Leipzig
Megafuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham
Membran-Imager	Fujifilm, Japan
MilliQUF Plus	Millipore, Bedford, USA
Mikroskop	Olympus, Tokio
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
PowerPac TM Basic (Gelelektrophorese)	Bio Rad, Kalifornien
Ready gel cell (Gelkammer)	Bio Rad, Kalifornien
Rotamix RM1 (der Spieß)	Elmi, Riga
Rotor Gene 3000 (RT-PCR-Gerät)	Corbett Research, Mortlake, Australia
Shaker, Bakterien (Gallenkamp)	Gemini BV, Apeldorn
Shaker, Hefen	HAT Infors, Bottmingen (Schweiz)
Thermocycler	Biometra, Göttingen
ThermoStat Plus	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Kinesis (ehem. Abimed), Langenfeld
UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Vacunsafe	Integra Bioscience, Biebertal
Vortex-Genie 2	Scientific Industries, New York

Waage	Sartorius, Göttingen
Wasserbad	PSL Systemtechnik GmbH, Göttingen
Laminarflowboxen	Thermo Fisher Scientific, Waltham

**Tabelle 08:** Verwendete Geräte und deren Hersteller.

## 4.2. Methoden

### 4.2.1. Hefemethoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Hefezellen *Saccharomyces cerevisiae*, Stamm AH 109 (*S. cerevisiae* AH109) verwendet, welche für Tryptophan, Leucin, Histidin, Uracil und Adenin auxotroph sind. Eine Hefezelle ist dann auxotroph für einen Metaboliten, wenn sie diesen nicht selbst synthetisieren kann, sondern darauf angewiesen ist, dass der Metabolit im Nährmedium enthalten ist.

#### 4.2.1.1. Kultivierung von Hefezellen

Zur Herstellung der Nährmedien, die für die Anzucht der Hefezellen benötigt wurden, haben wir folgende Medienbestandteile abgewogen, zusammengemischt und mit destilliertem Wasser auf das angegebene Endvolumen aufgefüllt:

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

YC (auf 400 ml Endvolumen): 0,48 g Yeast nitrogen base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat (Invitrogen, Karlsruhe); 2 g Ammoniumsulfat; 4 g Succinat; 4 ml 100-fach konzentrierter „drop out“ Aminosäuremix, Glukose (2 % Endkonzentration); (8 g Agar für Agarplatten); pH 7,0

Der „drop out“ Aminosäure-Mix (100-fach konzentriert) wurde folgendermaßen hergestellt: 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 wurden eingewogen und in mit 0,1 M HCl angesäuertem MilliQ-Wasser (500 ml) gelöst. Danach wurde die Lösung autoklaviert. Zusätzlich zu den oben beschriebenen

Kultivierungsmedien wurden noch Lösungen für die zu verwendenden Selektionsmarker und für hitzelabile Nährstoffe hergestellt:

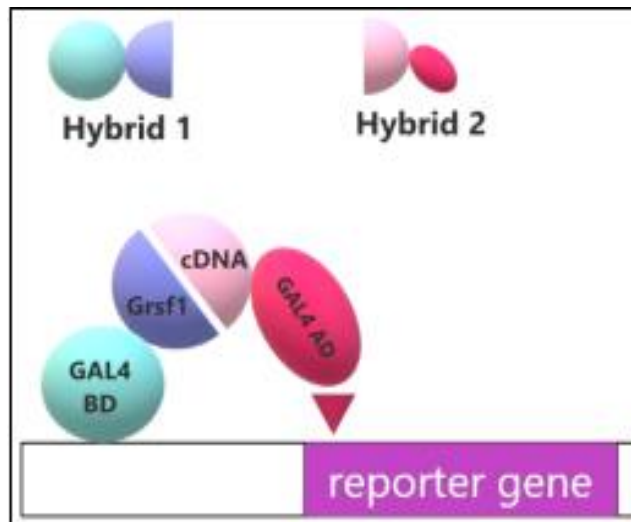
- 25-fach konzentrierte Adeninlösung (A): 2,5 mg/ml Adenin
- 20-fach konzentrierte Uracillösung (U): 2 mg/ml Uracil
- 100-fach konzentrierte Leucinlösung (L): 10 mg/ml L-Leucin
- 200-fach konzentrierte Histidinlösung (H): 10 mg/ml L-Histidin
- 100-fach konzentrierte Tryptophanlösung (W): 10 mg/ml L-Tryptophan
- 200-fach konzentrierte Threoninlösung (T): 20 mg/ml L-Threonin
- 50-fach konzentrierte Aspartatlösung (D): 2,5 mg/ml L-Aspartat

Die Kultivierung der *S. cerevisiae* AH109 Zellen erfolgte über Nacht in einem Vollmedium (YPAD) und bei späteren Selektionsprozessen in gezielt substituierten Minimalmedium (YC) bei 30 °C. Jedes Medium wurde in sterilem Milli-Q-Wasser angesetzt und autoklaviert. Nach dem Autoklavieren wurde zusätzlich sterile 20%ige Glukose-Lösung auf eine Endkonzentration von 2 % (w/v) hinzugesetzt. Dem YC-Medium wurde zusätzlich ein 100-fach konzentrierter „drop out“ Aminosäuremix hinzugefügt. Je nach Bedarf wurden Selektionsmarker und hitzelabile Aminosäuren auf die jeweiligen einfach konzentrierte Endkonzentration nach dem Autoklavieren hinzugefügt. Für die Agar-Kulturen wurde vor dem Autoklavieren 2 % (w/v) Agar zugesetzt.

Die Ziel OD600 lag im Bereich von 0,15-0,2. Die OD600 ist eine Abkürzung für die optische Dichte (engl. optical density) einer bakteriellen Flüssigkultur bei einer Wellenlänge von 600 nm. Sie dient der Bestimmung der Konzentration von Bakterien in einem Kultivierungsansatz. [117] Zur Erstellung von Wachstumskurven wurde ein Spektralphotometer verwendet und die Lichtabsorption bei 600 nm gemessen.

#### 4.2.1.2. Hefe-2-Hybrid-System

Beim Hefe-2-Hybrid-System (Y2H) handelt es sich um eine *in-vitro*-Siebtestmethode, mit der potentielle Protein-Protein-Interaktionspartner eines definierten Proteins identifiziert werden können [118]. Das Prinzip dieser Siebtestmethode ist in **Abbildung 11** dargestellt.



**Abbildung 11: Funktionsprinzip des Hefe-2-Hybridsystems.** Das Y2H besteht aus zwei Hybridproteinen, die im Falle ihrer nicht-kovalenten Wechselwirkung den aktiven Transkriptionsfaktor GAL4 bilden. Das eine Hybridprotein enthält die spezifische RNA-Bindungsdomäne dieses Transkriptionsfaktor (GAL4-BD) und jenes Protein, für das potenzielle Bindungsfaktoren gesucht werden sollen (in unserem Fall GRSF1). Das zweite Hybridprotein enthält die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und alle Proteine, die durch eine cDNA-Bibliothek kodiert werden. Wenn das Zielprotein (GRSF1) mit einem der durch die cDNA-Bibliothek kodierten Proteine physisch interagiert, werden die Aktivierungsdomäne von GAL4 und dessen DNA-Bindungsdomäne zusammengeführt und bilden den aktiven Transkriptionsfaktor GAL4. Dieser ist dann in der Lage, verschiedene Reportergene zu aktivieren und damit den Stoffwechsel der Hefezellen zu verändern. Diese Änderungen können durch Indikatorreaktionen sichtbar gemacht werden. Quelle: Eigene Darstellung.

Das System beruht auf der nicht-kovalenten Bindung zweier Hybridproteine. Das eine Hybridprotein enthält die spezifische RNA-Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktor (GAL4-BD) und jenes Protein, für das potentielle Bindungspartner (in unserem Fall GRSF1) gesucht werden sollen. Das zweite Hybridprotein enthält die GAL4-Aktivierungsdomäne (GAL4-AD) und alle Proteine, die durch eine cDNA-Bibliothek kodiert werden. Jedes der beiden Hybridproteine kann allein das lacZ Gen nicht aktivieren. Wenn beide Hybridproteine jedoch einen nicht-kovalenten Protein-Protein-Komplex bilden, werden die Aktivierungsdomäne von GAL4 und dessen DNA-Bindungsdomäne zusammengeführt, wodurch der aktive Transkriptionsfaktor GAL4 entsteht. Dabei fungiert das erste Hybridprotein als Köder (bait) und besteht aus der GAL4-Bindungsdomäne (GAL4-BD) und dem zu untersuchenden Protein. Da in der vorliegenden Arbeit GRSF1 Bindungsproteine identifiziert werden sollten, bestand das Köderkonstrukt aus der GAL4-BD und der humanen *GRSF1*-cDNA.

Das zweite Hybridprotein (Beute – prey) beinhaltet die Aktivatoromäne (GAL-AD) und eine Aminosäuresequenz, welche einen potenziellen Bindungspartner des

Köderproteins darstellt. Es wurde ein Hefestamm verwendet, welcher selbst kein funktionierendes GAL4-Gen besitzt. Im Falle dieser Arbeit wurde für diesen Zweck der Hefestamm *S. cerevisiae AH109* verwendet. In die Hefezellen werden simultan zwei unterschiedliche Plasmide transformiert. Zum einen das Plasmid pGBKT7, welches die cDNA-Sequenz für das Köderhybridprotein (GAL4-BD plus hGRSF1) enthält. Zum anderen das pACT2-Plasmid, welches die cDNA der GAL4-AD enthält, die mit einer humanen cDNA-Expressionsbibliothek verknüpft wurde. Wenn nach der Kotransfektion in den Hefezellen sowohl das Köderkonstrukt als auch eines der vielen verschiedenen Beuteproteine exprimiert werden und die beiden Fusionsproteine intrazellulär miteinander wechselwirken, sollte ein funktionsfähiger Transkriptionsfaktor für das GAL4-Gen entstehen. Eine stattgefundene Protein-Protein-Interaktion kann über die Messung der Reporterogenaktivität (HIS3, ADE2, lacZ) gemessen werden. Entsteht durch die Bindung zwischen der GAL4-BD und der GAL4-AD ein aktiver Transkriptionsfaktor, so interagiert dieser mit *cis*-regulatorischen Sequenzen, den sogenannten *upstream activating sequences* (UAS), welche den Reportergenen vorgeschaltet sind. Sie fungieren als Enhancer und erhöhen die Expression der nachfolgenden Reportergene.

#### **4.2.1.3. Transformation von Hefezellen**

Das Monitoring des Transformationserfolges erfolgt über die Aktivierung der Reportergene. In diesem Fall handelte es sich um die Reportergene HIS3, ADE2 und lacZ, welche in den Wildtyp-Hefezellen inaktiv sind. Das HIS3-Gen kodiert für die Imidazolglycerolphosphatdehydrogenase, welche den sechsten und den achten von neun Schritten der Histidin-Biosynthese katalysiert [119]. Hefezellen, in denen dieses Gen aktiviert wurde, sind in der Folge prototroph für Histidin und besitzen damit die Fähigkeit auf einem Histidin-Mangelmedium zu wachsen. Das ADE2-Gen kodiert für die Phosphoribosylaminoimidazol-Carboxylase, welche die Schritte sechs und sieben der *de novo* Synthese von Purinen katalysiert. Bei Inaktivierung dieses Genes ist die Purinsynthese gestört und es akkumuliert ein roter Farbstoff. Je ausgeprägter die Inaktivierung ist, desto intensiver erscheint die Färbung, sodass das Farbspektrum von zarten Rosatönen bis zu tief rot gefärbten Hefekolonien reicht [120]. Das lacZ-Gen kodiert für die  $\beta$ -Galactosidase. Dieses Enzym hydrolysiert Lactose zu Galactose und Glucose. In unserem Fall setzt es das Glycosid X-Gal (5-Brom-4-Chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) zu Galactose und 5-Brom-4-chlor-indoxyl um. Letzteres oxidiert unter



Sauerstoffverbrauch zu einem tiefblauen Farbstoff (5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo). Die Expression des LacZ-Gens in einem Hefezellklon wird damit nach der Zugabe von X-Gal durch eine Blaufärbung des Hefezellklons angezeigt. [121]

#### **4.2.1.3.1. Hefezelltransformation**

Die Transformation von Hefezellen dient dem Einbringen von Plasmid-DNA in Hefezellen und erfolgte in zwei Größenordnungen. Dabei wurde dieselbe Methodik verwandt, wobei sich Zusammensetzung der verwendeten Medien unterschied, je nach dem in welcher Art und Weise die wachsenden Hefen selektiert werden sollten. Um schneller größere Mengen an Hefezellen wachsen zu lassen wurde neben der kleinen Transformation auch eine größere durchgeführt. Während die kleine Hefentransformation für die Erstellung der Wachstumskurven der Hefezellen durchgeführt wurde, diente die große Hefentransformation der Herstellung der transformierten Hefezellen für die Siebtestexperimente.

##### **4.2.1.3.1.1. Kleine Hefezelltransformation**

###### *Materialien:*

- Milli-Q Wasser
- 10-fach TE-Puffer (10xTris-EDTA): 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5), 10mM EDTA
- 10-fach LiAc: 1M Litiumacetat (pH 7,5)
- 50 % PEG (Polyethylenglycol)
- Carrier-DNA (Lachssperma; 10 µg/µL)
- Plasmid-DNA (pGBKT7+Leervektor/pGBKT7+hGRSF1)

Zunächst erfolgte die Anzucht von Hefezellen im 50 ml Medium bis zu einer OD von 0,6-0,8. Sobald diese erreicht war, erfolgte die Zentrifugation der gewachsenen Hefekultur für 5 Minuten bei 1000 g. Es bildete sich ein weißes Pellet. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 18 ml Milli-Q-Wasser resuspendiert. Im Anschluss werden 2 ml 10-fach TE-Puffer dazu gegeben und bei 1000 g erneut für 5 Minuten zentrifugiert. Auch hier wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 480 µl Milli-Q-Wasser resuspendiert und in einem separatem Eppendorfgefäß mit 60 µl 1-fach TE-Puffer und 60 µl 10-fach Litiumacetat in mehreren Stößen kurz stark geschüttelt. Anschließend inkubierte die Probe bei 30 °C und wurde mit 250 rpm für insgesamt 15 Minuten geschüttelt. Die Hefen werden für 5 Sekunden abzentrifugiert und nun in zwei

gleichgroße Teile getrennt. Diesen wird jeweils hinzugefügt: 400 µl PEG, 60 µl 10-fach Liciumacetat, 10 µl Carrier-ssDNA mit einer Endkonzentration von 10 µg/µl und 1 µl Plasmid-DNA. Um beide Proben jeweils auf ein Gesamtvolumen von 600 µl zu bringen, wurden sie mit Milli-Q-Wasser aufgefüllt. Zum Erzeugen einer Suspension wurde erneut das Pellet stark gerüttelt und bei 30 °C und bei 250 rpm für 30 Minuten inkubiert. Nachfolgend wurden die Proben im Wasserbad bei 42° C für 15 Minuten geschüttelt. Zudem erfolgte alle 5 Minuten eine manuelle Inversion. Danach wurden die Proben für 5 Sekunden bei 1000 g pelletiert, der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Hefezellen in 500 µl Medium resuspendiert und eine Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1000) hergestellt. Aliquots dieser Verdünnungsreihen wurden auf Agarplatten ausplattiert und diese bei 37 °C bebrütet.

#### 4.2.1.3.1.2. Große Hefezelltransformation

##### *Materialien:*

- Milli-Q Wasser
- 10xTE-Puffer (10xTris-EDTA): 0,1 M Tris-HCl (pH 7,5); 10 mM EDTA
- 10xLiAc: 1M Litiumacetat (pH 7,5)
- 50 % PEG (Polyethylenglycol), Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- Sorbitol-Puffer: 1,2M D-Sorbitol, 0,01M CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % β-Mercaptoethanol
- 10 mM NaCl
- Carrier-DNA (Lachssperma; 10 µg/µl)
- Plasmid-DNA (1,75µg/µl cDNA Bibliothek human fetal brain)

Zunächst wurden 400 ml der *Saccharomyces cerevisiae* Flüssigkultur mit einer Ziel OD von 0,6-0,8 für 5 Minuten bei 4 °C mit 1000 g pelletiert. Zum Waschen der Zellen wurde das Zellpellet in 3 ml 10-fach konzentriertem TE-Puffer und 24 ml Milli-Q-Wasser resuspendiert und erneut für 5 Minuten bei 4° C mit 1000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden die Zellen erneut in 24 ml Milli-Q-Wasser und 3 ml 10-fach konzentriertem TE-Puffer resuspendiert und wieder für 5 Minuten bei 1000 g und 4 °C zentrifugiert (zweiter Waschschrift). Der Überstand wurde erneut verworfen. Im Anschluss wurde das Pellet in 4 ml Milli-Q-Wasser, 600 µl 10-fach konzentriertem TE-Puffer und 600 µl 10-fach konzentriertem Litiumacetat durch wiederholtes kurzes Schütteln resuspendiert. Danach wurden die Proben für 15 Minuten unter leichtem

Schütteln (150rpm) bei 30 °C inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 1000 g wurde das Zellpellet nach Verwerfen des Überstandes wieder in 5 ml MilliQ-Wasser resuspendiert. Es erfolgte die Aufteilung der Zellsuspension in zwei gleichgroße Aliquots. Den Ansätzen wurden jeweils 12 ml 50 % PEG, 1,8 ml 10f-ach konzentriertem TE-Puffer, 1,8 ml 10-fach konzentriertem Litiumacetat, 600 µg (10 µg/µl) Carrier-ssDNA (Lachssperma) und 57 µl Plasmid-DNA hinzugefügt. Nach dem 1-minütigem starken Schütteln erfolgte eine 30-minütige Inkubation bei 30 °C. Nach der Zugabe von 600 µl DMSO wurden die Proben auf mehrere 2 ml große Eppendorfgefäße aliquotiert. Diese inkubierten für 30 Minuten im Wasserbad bei 42 °C unter 5-minütlichen manuellen invertieren und standen anschließend für 5 Minuten auf Eis. Anschließend wurden die Proben durch Zentrifugation (1000 g, 5 Minuten bei 4 °C) pelletiert. Die Zellpellets wurden in 1,5 ml Sorbitol resuspendiert und für 30 Minuten bei 30 °C mit 150 rpm bebrütet. Im Anschluss wurden die Proben zentrifugiert (1000 g/5 Minuten/4 °C) und die Zellpellets in 8 ml 10 mM NaCl resuspendiert. Danach wurde eine Verdünnungsreihe der Zellkonzentrationen von 1:10, 1:100, 1:1000 erstellt und Aliquots dieser Verdünnungen wurden gleichmäßig auf einer YC-AWLH-Agarplatte ausplattiert.

#### **4.2.1.3.2. Transformation von Hefezellen mit rekombinanten Plasmiden**

Um zu erreichen, dass Hefezellen die rekombinanten Hybridproteine koexprimieren, wurden die Hefezellen mit den *in vitro* konstruierten Expressionsplasmiden (pGBKT7-Plasmid und pACT2-Plasmid) kotransformiert. Dazu wurde ein Transformationsansatz hergestellt, der folgende Substanzen enthielt:

##### *Materialien:*

- 400 µl PEG (50 % w/v Polyethylenglykol)
- 50 µl 10X Lithium-Acetate (1 M Lithiumacetat, pH 7,5)
- 50 µl 10X TE (100 mM Tris-HCl, pH 7,5; 10 mM EDTA)
- 10 µl Carrier-DNA (Lachssperma; 10 µg/µl)
- 1 µl Plasmid-DNA (cDNA-Bibliothek)

Nach ca. 20 Stunden Inkubationszeit in 2 ml YPAD-Medium bei 30 °C mit 250 rpm Schüttelfrequenz wurden Hefezellen in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Dieses wurde bei 1000 g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 120 µl sterilem Milli-Q-Wasser resuspendiert. Dazu wurden 10 µl Carrier-DNA, 1 µl

Plasmid DNA und 500 µl Transformationslösung pipettiert. Die Proben inkubierten bei 30 °C und 250 rpm Schüttelfrequenz für 30 Minuten. Anschließend erfolgte eine 15-minütige Inkubation im 42 °C Wasserbad, 2-5 Minuten auf Eis und ein Shortspin für 5 Sekunden auf bis zu 10.000 g. Der Überstand der Zentrifugation wurde verworfen und das Zellpellet in 200 µl sterilem Milli-Q-Wasser resuspendiert. Abschließend wurde der gesamte Ansatz auf dem jeweiligen Selektions-Medium ausplattiert: die mit pGBKT7+hGRSF1 transformierten Hefen wurden auf YC-W-Agar-Platten ausplattiert, dagegen die mit der zuvor gewonnenen Bakterien-DNA transformierten Hefen wurden auf YC-L-Agar Platten ausplattiert. Es erfolgte eine Inkubation bei 30 °C für 24 Stunden.

#### **4.2.1.4. Plasmid-Präparation aus *S. cerevisiae* AH109**

Eine direkte Sequenzierung der Hefe-Plasmide ist nicht möglich, daher war eine Präparation der Plasmid-DNA und eine anschließende Transformation in kompetente *E.coli* Bakterien nötig. In den Bakterien wurden die Hefe-Plasmide amplifiziert, isoliert und konnten anschließend sequenziert werden.

##### *Materialien:*

- YC-L-Medium
- Waschpuffer: 200 µl EDTA + 9,8 ml Milli-Q Wasser
- Sorbitol-Puffer: 1,2 M D-Sorbitol, 0,01M CaCl<sub>2</sub>, 0,1 % β-Mercaptoethanol
- Zymolyase
- NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland)

Die ca. 3-4 mm großen Hefeklone wurden gepickt, in 5 ml YC-L-Medium bei 30 °C kultiviert und anschließend geerntet (2000 g bei 4 °C für 5 min). Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml Waschpuffer resuspendiert und anschließend erneut pelletiert. Zur einfacheren Präparation der DNA wurden Sphäroplasten durch die Zugabe von Zymolase hergestellt. Das Pellet wurde in 600 µl Sorbitol-Puffer resuspendiert und mit zusätzlich 200 U Zymolase für 30 Minuten bei 30 °C und 150 rpm Schüttelfrequenz inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 250 µl Sorbitol-Puffer resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde Plasmid-DNA mit dem NucleoSpin® Plasmid Miniprep Kit (Macherey Nagel, Düren, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers präpariert. Zur weiteren Analyse wurde die DNA in kompetente *E.coli* Zellen hinein transformiert.

#### 4.2.1.5. $\beta$ -Galaktosidase-Assay

Zur Analyse der Aktivierung des Reportergenes der  $\beta$ -Galactosidase (LacZ) wurde das „Colony Lift Filter Assay“ verwendet und der Aktivitätszustand des Reportergens in den verschiedenen Hefekolonien bestimmt. Dazu wurde ein Reaktionsansatz hergestellt, der folgende Substanzen enthielt:

##### *Materialien:*

- X-Gal Stammlösung: 20 mg X-Gal/ml Dimethylformamid
- X-Gal: 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
- Z-Puffer: 10,674 g/l  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ ; 5,520 g/l  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; 0,746 g/l KCl; 0,246 g/l  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ; pH 7,0
- Z-Puffer/X-Gal-Lösung: 20 ml Z-Puffer; 0,54  $\mu\text{l}$  0,27 %  $\beta$ -Mercaptoethanol; 334 g/ml X-Gal

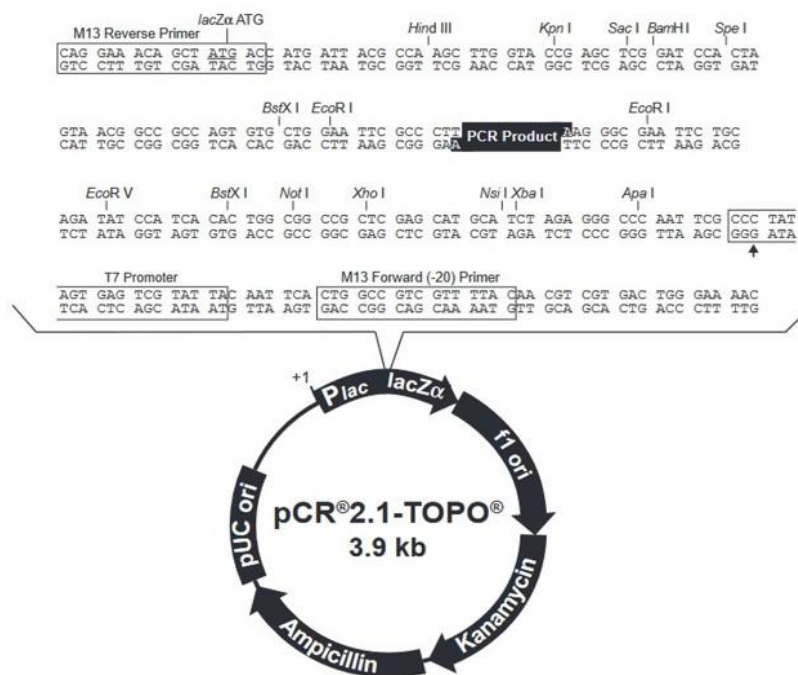
Die zuvor auf den AWLH-Agar-Platten angezüchteten Hefekolonien wurden mit Hilfe eines Stempels auf eine neue Agar-Platte zum Erhalt der Kolonie übertragen und für 2-4 Tage bei 30 °C bebrütet. Im Anschluss erfolgte ein Abklatsch der Kolonien auf ein Filterpapier, welches anschließend in flüssigem Stickstoff für 10-15 Sekunden schockgefroren wurde. Das Filterpapier inkubierte anschließend in der Z-Puffer/X-Gal-Lösung bei 30 °C für wenigstens 30 Minuten und maximal 8 Stunden. Die Hefezellen, die mit beiden Plasmiden erfolgreich transformiert wurden und infolgedessen das Fusionsprotein zur Aktivierung des  $\beta$ -Galaktosidase/Lac-Z-Gens synthetisieren können, färbten sich blau, da X-Gal durch die  $\beta$ -Galaktosidase zu einem blauen Farbstoff verstoffwechselt wird. Im Umkehrschluss war die Transformation bei Hefen ohne Blaufärbung nicht erfolgreich. Diese Hefekolonien bildeten keine GRSF1-bindenden Proteine.

#### 4.2.2. Bakterienmethoden

##### 4.2.2.1. TOPO-Klonierung

Bei der PCR entstehen Amplifizierungsprodukte, die nicht direkt in Plasmide hinein legiert werden können. Deshalb ist es auch nicht ohne weiteres möglich, Konstrukte für Hybridproteine herzustellen, die von Hefezellen exprimiert werden können. Um PCR-Produkte klonierungsfähig zu machen, kann man diese in dem TOPO TA Cloning Vektor

von ThermoFischer Scientific (Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) hineinlegieren. Für die Einklonierung müssen die PCR-Amplifizierungsprodukte zunächst präpariert und gereinigt werden, um sie dann in die MCS (multicloning site) des Vektors einzupassen. Um die PCR-Produkte wieder aus dem Klonierungsvektor herausschneiden zu können werden die in der MCS enthaltenen Spaltstellen verschiedener Restriktionsendonukleasen verwendet.



**Abbildung 12: Struktur des Klonierungsvektors PCR®2.1-TOPO®, der zur Klonierung von PCR-Amplifizierungsprodukten verwendet wurde.** Bei der Einklonierung der PCR-Fragmente wird ausgenutzt, dass bei der PCR am 5'- und am 3'-Ende der Amplifizierungsprodukte einzelsträngige Basenüberhänge entstehen. Quelle: User Guide TOPO® TA Cloning® Kit, Version: 250184 MAN0000047 A.01 (12 Aug 2015), Invitrogen, Carlsbad, USA

Die Einklonierung der PCR-Fragmente erfolgte nach den Maßgaben des Herstellers (ThermoFischer, Waltham, Massachusetts, Vereinigte Staaten) unter Verwendung des dargestellten Plasmids (**Abbildung 12**). Nach erfolgreicher Klonierung enthielt das entstandene rekombinante Plasmid das Amplifizierungsprodukt zusammen mit einem Ampicillin- und einem Kanamycin-Resistenzgen und wurde anschließend in kompetente *E. coli* Zellen transformiert. Da die transformierten *E. coli* Zellen das Ampicillin-Resistenzgen exprimieren, konnten diese auf Ampicillin-haltigem Nährboden wachsen. *E. coli* Zellen, die dieses Plasmid nicht aufgenommen hatten, konnten auf diesem Nährmedium nicht vermehren. Die sich vermehrenden *E. coli* Zellen wurden

isoliert, sodass am Ende des Klonierungsprozesses große Mengen an rekombinantem Plasmid präpariert werden konnte.

#### **4.2.2.2. DNA-Transformation in Bakterien**

Nach der Isolation der rekombinanten Plasmide aus den Hefezellen wurden diese in kompetente *E. coli* Zellen hineintransformiert. Dazu waren folgenden Materialien nötig:

*Materialien:*

- kompetente *E. coli* XL1 Bakterien
- LB-Agar
- SOC-Medium
- Antibiotikum (Ampicillin 100 µg/ml oder Kanamycin 50 µg/ml)

Nach dem Auftauen der Bakterien wurden 5 µg Plasmid-DNA hinzugefügt und die Zellsuspension für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 45 Sekunden bei 42 °C und einer erneuten Inkubation für 2 Minuten auf Eis wurden 400 µl SOC-Medium hinzugefügt und für eine Stunde bei 37 °C und bei einer Schüttelfrequenz von 170 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert, auf LB-Agar mit geeigneten Selektionsmarkern ausplattiert und ca. 20 Stunden im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die angezüchteten Klone wurden je zweimal gepickt. Der erste gepickte Klon diente der Erstellung einer Masterplatte mit LB-Agar und Ampicillin/Kanamycin. Der zweite gepickte Klon inkubierte in LB-Medium (mit Ampicillin 1µl/ml Medium oder Kanamycin 1µl/ml Medium) für 20 Stunden im Brutschrank bei 37 °C.

#### **4.2.2.3. Plasmid-DNA Präparation aus Bakterien**

Plasmid DNA wurde aus transformierten *E. coli* Zellen mit Hilfe des Gene JET Plasmid Miniprep Kit® entsprechend der Angaben des Herstellers präpariert.

#### **4.2.2.4. Semisoliden Bibliotheksamplifikation**

Die kommerzielle cDNA-Bibliothek, die für das Hefe-2-Hybridsystem verwendet werden sollte, war mengenmäßig limitiert und musste deshalb vor der Verwendung vervielfältigt (amplifiziert) werden. Wir entschieden uns für eine semisoliden Bibliotheksamplifikation und dazu wurden folgende Materialien verwendet.

*Materialien:*

- 2-fach konzentriertes LB (1 Liter): 20 g Trypton; 10 g Hefeextrakt; 10 g NaCl
- 2-fach konzentrierte LB-Amp/Agarose: 1,35 g SeaPrep-Agarose (Lonza, Rockland, USA); 450 ml 2x LB; 400 µl Ampicillin (100 µg/ml)
- 2x LB-Glyzerol: 175 ml 2x LB; 25 ml Glyzerol (100 %)

Zur Vorbereitung wurden 20 Flaschen á 0,5 l mit je 8 g LB-Medium, 1,2 g Seaprep® Agarose und 400 ml Milli-Q-Wasser befüllt und autoklaviert. Die Flaschen kamen dann für je 30 Minuten ins 37 °C warme Wasserbad. Anschließend wurden 400 µl Ampicillin und 20 µl cDNA-Bibliothek hinzugefügt. Mittels Rührfisch wurde alles für 5-10 Minuten gemischt, für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend bei 30 °C im Brutschrank für 2 Tage inkubiert. Danach wurde der Flascheninhalt auf mehrere Zentrifugenbecher verteilt und jeweils sechs dieser Zentrifugenbecher zeitgleich für 30 Minuten bei Raumtemperatur und 7.200 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die gewonnenen Zellpellets jeweils in 10 ml LB-Medium resuspendiert, in 50 ml Falcon-Tubes überführt und abschließend erneut bei 4.000 g und 4 °C für 20 Minuten zentrifugiert. Die Pellets von jeweils sechs Falcon-Tubes wurden vereinigt und bei -20 °C gelagert. Die DNA wurde mittels Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden) laut Herstellerangaben präpariert.

### **4.2.3. Molekularbiologische Methoden**

#### **4.2.3.1. Verdau von DNA mit Restriktionsendonukleasen**

Um Inserts aus rekombinanten Expressionsplasmiden herauszuschneiden oder um zirkuläre Expressionsplasmide zu linearisieren wurde ein Verdau der Plasmid-DNA mit passenden Restriktionsendonukleasen durchgeführt. Dazu wurden folgende Materialien benötigt:

*Materialien:*

Master-Mix bestehend aus

- 1 µl 10-fach konzentriertem HF Greenbuffer (Fermentas, Waltham, USA)



- 7 µl Milli-Q Wasser
- 1 µl Restriktionsendonukleasen (EcoRI, XhoI, Bgl II)

Template-DNA:

- 1ml Plasmid-DNA SNF8 (164 ng/µl)
- 1ml Plasmid-DNA TTC7B (209 ng/µl)
- 1ml Plasmid-DNA SBP2 (203 ng/µl)

Agarosegel bestehend aus

- 1g Bioline® Agarose
- 100 ml 1-fach konzentriertem TAE

Der DNA-Verdau erfolgte in einem Mini-Eppendorfgefäß bei 37 °C für eine Stunde. Anschließend erfolgte die Analyse des Restriktionsverdau mittels Agarosegel-Elektrophorese.

#### 4.2.3.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der Vervielfältigung von DNA-Sequenzen. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass ein Stück doppelsträngige DNA, das zwischen zwei Amplifizierungsprimern liegt, selektiv mit hoher Genauigkeit amplifiziert werden kann. Dazu wurden folgende Materialien benötigt:

*Materialien:*

- Up-Primer 5µM
- Down-Primer 5µM
- 10-fach konzentrierter PCR-Puffer (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
- Desoxynukleosidtriphosphate (dNTPs, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
- Template-DNA: SNF8 (164 ng/µl), TTC7B (209 ng/µl), SBP2 (203 ng/µl)
- Advantage 2 Polymerase-Mix (Takara Bio USA, San Jose, USA)

Das Pipettierschema ist in **Tabelle 09** beschrieben. Entsprechend diesen Schemas wurden unterschiedliche Volumina der verschiedenen Lösungen in ein Amplifizierungsgefäß gegeben und dieses Gefäß wurde gasdicht verschlossen. Dadurch wurde verhindert, dass Wasser während des Amplifizierungsprozesses verdunstet und sich damit die Konzentrationen der Reaktanten verändern.

*Pipettierschema:*

Einfacher Ansatz	
2,5 µl	10-fach konzentrierter PCR-Puffer
0,5 µl	dNTPs-Mix
0,25 µl	Polymerase-Mix
19,75 µl	Milli-Q-Wasser
0,5 µl	Up-Primer 5 µM
0,5 µl	Down-Primer 5 µM
1 µl	Template-DNA
24 µl	Master-Mix pro Tube

**Tabelle 09:** Verwendetes Pipettierschema für die PCR-Amplifizierung von Template-DNA.

Es wurden 25-35 Amplifizierungszyklen nach unten angegebenem Schema im Thermozykler durchgeführt. Anschließend wurden die Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

Zeit	Temperatur
1,5 min	95 °C
0,5 min	95 °C
3 min	68 °C
Beim letzten Zyklus zusätzlich:	
3 min	68 °C

**Tabelle 10:** Amplifizierungsprogramm für die PCR.

#### 4.2.3.3. Agarosegel-Elektrophorese

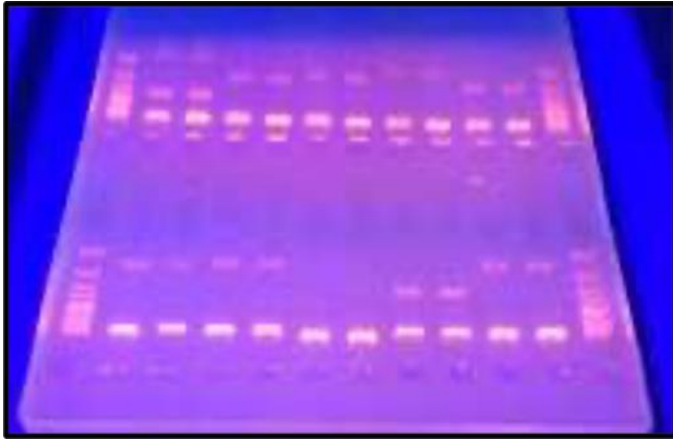
Zur Trennung von PCR-Fragmenten unterschiedlicher Größe und zur Reinigung der Amplifizierungsprodukte für spätere Klonierungen wurde eine Agarosegel-

Elektrophorese durchgeführt. Bei dieser Methode werden doppelsträngige DNA-Fragmente entsprechend ihres Molekulargewichtes voneinander getrennt. Dazu wurden folgende Chemikalien benötigt:

*Materialien (für ein 1%iges Agarosegel):*

- 1g Agarose (Promega, Fitchburg, USA)
- 100 ml 1-fach konzentrierter TAE-Puffer
- 0,025 % Ethidiumbromid (Färbung)

Mit Hilfe der Agarosegel-Elektrophorese können DNA-Fragmente (PCR-Amplifizierungsprodukte, Restriktionsfragmente) nach ihrer Größe, die bei dieser Methode in Basenpaaren (bp) angegeben wird, aufgetrennt werden. Zur Herstellung des Agarosegels wird die Agarose in Puffer (TAE-Puffer) kurz aufgekocht, wobei sich das Agarosepulver verflüssigt. Anschließend lässt man das Gel langsam abkühlen. Je höher die Konzentration des Gels, desto höher ist auch dessen Dichte. Nach dem Abkühlen wurden die zu analysierenden Proben zunächst mit einem Probenpuffer und Ethidiumbromid versetzt. Dann erfolgte das Auftragen der Proben in vorgefertigte Geltaschen. Zusätzlich zu den Proben wird in separaten Geltaschen ein Gemisch von Molekulargewichtsmarkern aufgetragen, die zur Abschätzung des Molekulargewichtes der PCR-Fragmente herangezogen wurden. Die Gelelektrophorese erfolgt bei 120 V. Im angelegten elektrischen Feld bewegen sich die negativ geladenen DNA-Fragmente zur Anode, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit vom Molekulargewicht des PCR-Produktes abhängt. Kleine DNA-Fragmente wandern schnell und legen damit in einer vorgegebenen Zeit größere Strecken zurück. Größere DNA-Fragmente wandern hingegen langsamer. Anschließend erfolgt die Auswertung der Elektropherogramm in der Fotokammer unter UV-Licht (**Abbildung 13**). Dabei wird die Belichtungszeit möglichst kurzgehalten, um Schäden an der DNA durch die UV-Strahlung zu vermeiden.



**Abbildung 13: Beispielelektrophogramm einer Agarosegelelektrophorese von PCR-Fragmenten.** Die hell erscheinenden Banden repräsentieren Nukleinsäure-fragmente mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Rechts und links der Analyseproben wurden Molekulargewichts-marker aufgetragen. Dabei repräsentiert jede Markerbande ein bestimmtes Molekular-gewicht, das üblicherweise in Basenpaaren (bp) angegeben wird. Damit ist eine eindeutige Größenzuordnung der PCR-Fragmente möglich. Quelle: Eigenes Foto

#### **4.2.3.4. DNA-Extraktion aus dem Agarosegel**

Nachdem die PCR-Fragmente in der Agarosegelelektrophorese von anderen Bestandteilen des Amplifizierungsansatzes abgetrennt und damit gereinigt worden waren, musste die DNA aus den Agarosegel extrahiert werden. Dazu wurde der PureLink™ Quick Gel Extraction Kit von Thermo Fischer Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Zunächst wurden die gewünschten DNA-Banden unter Sichtkontrolle aus dem Agarosegel ausgeschnitten und anschließend die DNA aus dem Gel nach Herstellerangaben extrahiert. Die DNA-Extraktion aus den Agarosegel erfolgte dabei unter nicht-denaturierenden Bedingungen, sodass die native DNA Struktur nicht zerstört wurde. Dies ist u.a deshalb bedeutsam, um das spätere Einklonieren der Restriktionsfragmente in die Expressionsplasmide nicht zu erschweren.

#### **4.2.3.5. DNA-Ligation**

Um PCR-Amplifizierungsprodukte oder Restriktionsfragmente in Plasmide einzuklonieren, mussten die doppelsträngigen DNA-Fragmente in die linearisierten Plasmide hineinlegiert werden. Dazu wurde der Rapid Ligation Kit (Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die DNA Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Anschließend erfolgte die Transformation der rekombinanten Plasmide in *E.coli XL1* Zellen.

#### **4.2.3.6. RNA-Präparation**

Zur Quantifizierung der zellulären Konzentration verschiedener mRNAs wurde aus Zellen und Organen Gesamt-RNA präpariert. Dazu wurde der NucleoSpin RNA-Kit der Firma Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die RNA-Präparation erfolgte gemäß dem Herstellerprotokoll.

#### **4.2.3.7. Reverse Transkription**

Da einzelsträngige RNA nicht direkt in der PCR amplifiziert werden kann, mussten die bei der Gesamt-RNA Präparation gewonnenen RNA-Moleküle zunächst in ihre complementary doublestranded DNA (cDNAs) umgeschrieben werden. Diesen Prozess nennt man reverse Transkription und dazu wird eine reverse Transkriptase (RT) als Enzym verwendet. Für unseren Experimente wurden zuerst zwei Mastermix Lösungen zusammenpipettiert, die dann vereinigt wurden.

##### *Materialien:*

Mastermix I: - 10 µl RNA (1037 ng/µl )  
- 1 µl dNTPs (10 mM)  
- 1µl Oligo dT18 (0,5 µg/µl)

Mastermix II: - 4 µl 5x PCR-Buffer (Fermentas, Waltham, USA)  
- 0,5 µl Premium Reverse Transkriptase (Fermentas, Waltham, USA)  
- 3,5 µl H<sub>2</sub>O

Für die reverse Transkription wurde der Mastermix I für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gestellt. Nach Zugabe des Mastermix II wurden die Proben zweimal kurz geschüttelt und im Inkubator für 60 Minuten bei 50 °C inkubiert. Anschließend wurde die Reverse Transkriptase 5 Minuten bei 85 °C inaktiviert.

#### **4.2.4. Zellmethoden**

##### **4.2.4.1. HEK293-Zellen und deren Kultivierung**

HEK293-Zellen (human embryonic kidney) sind humane embryonale Nierenzellen, die durch Infektion mit dem Adenovirus 5 immortalisiert wurden. Sie sind hypotriploide Epithelzellen und wachsen adhärent. Aufgrund ihrer Wachstumseigenschaften und

ihres guten Transfektionsverhaltens werden diese Zellen zur Erforschung intrazellulärer Funktionsabläufe in der Zellbiologie häufig eingesetzt. Sie spiegeln jedoch nicht in jeder Hinsicht die metabolischen Besonderheiten anderer humaner Zellen wieder. Die HEK293-Zellen wurden in DMEM-Medium (Pan Biotech, Aidenbach, Deutschland) kultiviert, das mit 10 % Kalbserum, 1,0 g/l Glukose supplementiert wurde. Für die Kultivierung wurden HEK293-Zellen im oben beschriebenen in Kulturmedium bei 37 °C unter 5 % Kohlendioxid und Wasserdampfsättigung kultiviert. Zur Anzucht wurden die präkonfluenten Zellen im Verhältnis 1:10 (Zielzellzahl von  $4 \times 10^5$  Zellen/Well) auf six-well-Platten in DMEM-Medium ausgesät. Die Zellzählung erfolgte mit Hilfe des Neubauer-Hämozytometers.

#### **4.2.4.2. Transfektion von humanen HEK293-Zellen**

Plasmide können die Zellmembran nicht ohne Weiteres permieren. Um Plasmide *in vitro* in eine Zelle einzuschleusen, damit die durch die Plasmide kodierten Proteine durch die Zellen exprimiert werden, können unterschiedliche Methoden angewendet werden. Für unsere Untersuchungen haben wir die Methode der Lipofektion verwendet, die für HEK293-Zellen hohe Transfektionsraten verspricht. Bei dieser Methode wird die Plasmid-DNA mit Liposomen vermischt und kann so durch die Zellmembran in das Zellinnere gelangen.

##### *Materialien:*

- Invitrogen™ Lipofectamine™ LTXReagent (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)
- Opti-MEM® (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)

Für die Transfektion wurden zunächst 100 µL Opti-MEM® und 6,75 µl Invitrogen™ Lipofectamine™ zusammenpipettiert. Nach 5 Minuten Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde je Ansatz 2 µg/µl Plasmid-DNA zugesetzt. Nachdem jede Probe kurz geschüttelt wurde, inkubierte die DNA bei Raumtemperatur für 25 Minuten, damit sich die Lipid-DNA-Komplexe bilden konnten. Anschließend wurden die Probenansätze, auf die zuvor in six-well-Platten kultivierten HEK293 Zellen pipettiert und die Zellen im Brutschrank bei 37 °C für 48 Stunden inkubiert.

## **4.2.5. Proteinchemische Methoden**

### **4.2.5.1. Proteinbestimmung nach Bradford**

Mit der Proteinbestimmung nach Bradford kann der Proteingehalt einer biologischen Probe quantifiziert werden. Dazu wird ein Aliquot einer biologischen Flüssigkeit (Blutplasma, Gewebehomogenatüberstand) mit Bradfordreagenz (Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland) gemischt und die Entstehung eines Kupfer-Protein-Komplexes kolorimetrisch bei 595 nm quantifiziert. Zum Zweck der exakten Quantifizierung wird ein Leerwert (800 µL Wasser plus 200µL Bradford-Reagenz plus 2 µl PBS) mitgeführt und eine Eichkurve (Zugabe definierter Mengen einer Lösung von humanem Serumalbumin zum Reaktionsansatz) aufgenommen. Für die zu messende Probe wurden 2 µl des Homogenatlysates auf 800 µl H<sub>2</sub>O gegeben und 200 µl Bradfordreagenz zugesetzt. Nach 10-minütiger Reaktionszeit wurde die Lichtabsorption am Photometer bei 595 nm gemessen, wobei parallel ein Leerwert (2 µl PBS-Zusatz anstatt 2 µl Gewebeextrakt) als Kontrollwert quantifiziert wurde.

### **4.2.5.2. Natriumdodecylsulfat Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die SDS-PAGE wird üblicherweise dazu verwendet, um eine komplexe Proteinmischung, wie es biologische Proben üblicherweise darstellen, in ihre Proteinbestandteile aufzutrennen. Dabei werden zunächst die in der Lösung enthaltenen Proteine komplett entfaltet. Das wird durch das im Probenpuffer enthaltene Natriumdodecylsulfate (SDS) erreicht. SDS ist ein Detergenz, welches die hydrophoben Wechselwirkungen, die die Tertiärstruktur von Proteinen stabilisieren, auflöst und damit die Proteine vollständig denaturiert. Anschließend werden die entfalteten Proteine mit SDS-Molekülen beladen, was allen Proteinen unabhängig von ihrer Aminosäurezusammensetzung eine negative Nettoladung verleiht. Dadurch können die Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der Proteingröße (Molekulargewicht) abhängt. Zusätzlich zum SDS enthält der Probenpuffer üblicherweise noch ein starkes Reduktionsmittel ( $\beta$ -Mercaptoethanol), um Disulfidbrücken, die in vielen Proteinen vorkommen, reduktiv zu spalten. [122] Folgende Materialien wurden für die SDS-PAGE verwendet:

#### *Materialien:*

- 7,5%-iges Polyacrylamidgel bestehend aus
- Trenngel (4 mL H<sub>2</sub>O, 2,5 ml 4-fach konzentriertes TGP, 3,3 ml 30%iges AA/Bis, 100 µl 10 % SDS, 100 µl APS, 10 µl TEMED)
- Sammelgel (6 ml H<sub>2</sub>O, 2,5 ml 4-fach konzentriertes SGP, 1,3 ml 30 % AA/Bis, 100 µl 10 % SDS, 100 µl APS, 10 µl TEMED)
- Lämmli-Puffer/ProSieve EX running Puffer (Lonza, Basel, Schweiz)
- Elektrophoresesystem (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Amresco-Puffer (Cole-Parmer, St. Neots, Vereinigtes Königreich)

Zur Vorbereitung der Proben wurde anhand der Bradford-Proteinbestimmung die Proteinmenge (10-50 µg) pro Auftragungstasche berechnet. Die entsprechenden Mikroliter wurden auf 10 µl mit Milli-Q-Wasser aufgefüllt und zusätzlich 4 µl Probenpuffer hinzugefügt. Anschließend wurden die fertigen Proben bei 95 °C für 3 Minuten erhitzt und auf das Polyacrylamidgel aufgetragen. Nach Zugabe von Amresco-Puffer (Cole-Parmer, St. Neots, Vereinigtes Königreich) lief die Elektrophorese für ca. 45 Minuten bei 200 V.

#### **4.2.5.3. Westernblot (Immunoblot)**

Zur selektiven Färbung bestimmter Proteinbande wurden die in der SDS-PAGE entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennten Proteine der Homogenatsüberstände auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Das geschah dadurch, dass die Membran auf des Elektrophoresegel gelegt wurde und die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung aus dem Gel auf die Membran wanderten. Die für den Western-Blot benötigten Chemikalien sind unten aufgeführt:

#### *Materialien:*

- Nitrocellulose Blotting Membrane (0,45 µm, Macherey Nagel, Düren, Deutschland)
- Amresco-Puffer, Rapid Transfer Buffer 10-fach (Cole-Parmer, St. Neots, UK)
- Filterpapier (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- 5 % Trockenmilch (2,5 g Biorad Blotting Grade Blocker Nonfat drymilk + PBS)



- PBS Tween (0,3 % TWEEN®-20 in PBS, Sigmaaldrich, Darmstadt, Deutschland)
- Elvanol (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
- Enhanced Luminol Reagent Plus (Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA)
- Oxidizing Reagent Plus (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)

Das Acrylgelamidgel aus der Elektrophorese wurde in Vorbereitung auf den Westernblot auf die Membran, welche zuvor 5 Minuten in Amresco-Puffer inkubiert wurde, gelegt. Die Membran und das Elektrophoresegel wurden anschließend zwischen zwei Filterpapierplatten in das Blot-System eingespannt. Der Blottingprozess lief bei 400 mA für 24 Minuten. Anschließend wurde die Membran mit 5 % Trockenmilch für 30 Minuten blockiert. Danach wurde die Blotmembran mit den jeweiligen primären Antikörpern für eine Stunde inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Blotmembran wurde diese mit dem sekundären Antikörper inkubiert und anschließend wurde der Blot unter Zugabe von Elvanol gefärbt.

#### **4.2.5.4. Proteinextraktion aus HEK293-Zellen**

Nachdem HEK293-Zellen mit den verschiedenen Expressionsplasmiden transfiziert worden waren, erfolgte die Zellernte nach 24-48 Stunden durch Zentrifugation bei 1.000 g. Das Zellpellet wurde zwei Mal in DPBS gewaschen, um Mediumrückstände zu entfernen. Für die Zellyse und die Aufarbeitung der Zellysate wurden folgende Chemikalien verwendet:

##### *Materialien:*

- NT2-Puffer (50mM Tris 7,4; 10 % 0,25 % NP4O, 140mM NaCl, 1M 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O)
- Lyse-Puffer (1250 µl NT2-Puffer, 12 µl Protease-Inhibitoren)

Das Zell-Pellet wurde in 250 µl Lyse-Puffer resuspendiert und für 15 Minuten auf Eis inkubiert, dabei wurden die Proben alle 3-4 Minuten kurz und kräftig geschüttelt. Nach anschließender Zentrifugation bei 4 °C für 10 Minuten bei 13.000 g erhielten wir den Zellysatüberstand. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in den Lysatüberständen wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford vorgenommen.

#### 4.2.5.5. cMyc-Immunpräzipitation

Um cMyc-tag enthaltende Proteine bzw. Proteinkomplexe aus dem Lysatüberständen zu präzipitieren, wurde eine Immunopräzipitation mit Magnetbeads durchgeführt, die mit einem Anti-cMyc-Antikörper beladen waren.

##### *Materialien:*

- Thermo Scientific Pierce Magnetic c-Myc-Tag IP/Co-IP Kit (Waltham, USA)
- $\mu$ MACS™ c-myc Isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch-Gladbach, Deutschland)
- NT2-Puffer (50 mM Tris 7,4; 0,25 % NP40-10 %, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O)

Von dem Lysat der HEK293-Zellen wurden 40  $\mu$ l separiert. Dem Rest wurden cMyc-Magnet-Beads (40  $\mu$ l beads-Suspension pro 10<sup>7</sup> Zellen) hinzugefügt und für 30 Minuten bei 7 °C unter Kopf-über Inversion inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf magnetische Säulen aufgetragen. Der Durchfluss wurde aufgefangen. Nach mehrmaligem Waschen mit NT2-Puffer wurden die Säulen mittels in 95 °C heißem Wasserbad erhitztem Elutionspuffer eluiert. Dabei erfolgte zuerst eine Inkubation (5 Minuten) der Beads mit 20  $\mu$ l Elutionspuffer bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde mit weiteren 50  $\mu$ l Elutionspuffer eluiert bei 95 °C (heiß) eluiert. Die Analyse der von den Beads eluierten Proteine erfolgte durch eine SDS-PAGE mit anschließenden Westernblots, bei denen unterschiedliche primäre Antikörper verwendet wurden.

#### 4.2.5.6. FLAG®-Immunpräzipitation

Um FLAG®-tag enthaltende Proteine bzw. Proteinkomplexe aus dem Lysatüberständen zu präzipitieren wurde eine Immunopräzipitation mit Magnetbeads durchgeführt, die mit einem Anti-FLAG®-tag-Antikörper beladen waren. Die für die Immunopräzipitation verwendeten Materialien sind hier kurz aufgeführt:

##### *Materialien:*

- Thermo Scientific Pierce Magnetic FLAG®-Tag IP/Co-IP Kit (Waltham, USA)
- Anti-FLAG® M2 Magnetic Beads (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland)
- NT2-Puffer (50 mM Tris 7,4; 0,25 % NP40-10 %, 140 mM NaCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O)

Vom Lysat der HEK293-Zellen wurden 40 µl abgenommen. In ein separates Eppendorfggefäß wurden 500 µl NT2-Puffer pipettiert und 40 µl FLAG<sup>®</sup>-tag Beads hinzugefügt, damit die Beads äquilibriert werden. Anschließend wurden die Eppendorfggefäße in den Magneten gestellt und der NT2-Puffer abgenommen. Nun wurde der Rest des Lysates dazu pipettiert und eine Stunde bei 9 °C unter Kopf-über Inversion inkubiert. Anschließend wurden die Proben erneut auf den Magneten gestellt und der Überstand (Durchfluss) wurde gewonnen. Nach dreimaligem Waschen der Beads mit je 1 ml NT2-Puffer wurden 40 µl SDS-Ladungspuffer ohne DTT dazu gegeben und 3 Minuten bei 95 °C inkubiert. Abschließend wurden die Proben in ein neues Eppendorfggefäß überführt und wurden nach Zugabe von 1,5 µl 2M DTT erneut bei 95 °C für 3 Minuten gekocht. Die Analyse der Proben erfolgte durch eine SDS-Gel-Elektrophorese mit anschließendem Westernblot.

#### **4.2.5.7. RNase Immunpräzipitation**

GRSF1 ist ein RNA-bindendes Protein. Sollte es sich bei den im Hefe-2-Hybrid-System identifizierten potentiell GRSF1-bindenden Proteinen ebenfalls um RNA-bindende Proteine handeln, wäre es denkbar, dass sowohl GRSF1 als auch die potentiell GRSF1-bindenden Proteine an die gleiche RNA binden. Dadurch würden beide Proteine koimmunopräzipitiert werden, obwohl sie nicht direkt über Protein-Protein-Wechselwirkungen miteinander interagieren. Um dies zu vermeiden, wurden die Lysatübersände vor der Immunopräzipitation mit RNase (Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland) behandelt. Dadurch wurden alle RNA-Moleküle im Zelllysätüberstand abgebaut, sodass nur noch direkt GRSF1-interagierende Proteine koimmunopräzipitiert werden. Für den RNA-Abbau wurden die Zelllysätübersände mit NT2-Puffer auf 1 ml aufgefüllt. Im Anschluss erfolgte wie oben beschrieben die Zugabe der Magnet-Beads und zusätzlich die Zugabe von 20 µl RNase (2 mg/ml Sigmaaldrich, Darmstadt, Deutschland). Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten wurde das Protokoll wie oben beschrieben fortgesetzt.

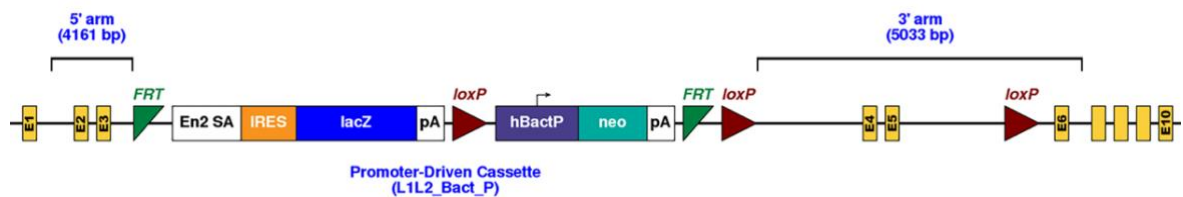
#### **4.2.6. Herstellung und basale Charakterisierung der *Grsf1*-Knockout Mäuse**

##### **4.2.6.1. Struktur des Knockout-Konstruktes**

Das murine *Grsf1*-Gen erstreckt sich über etwa 30 kb, enthält zehn Exons und liegt auf dem Chromosom 4 (**Abbildung 02**). Die für die Funktion von Grsf1 wichtigen RNA-

bindenden Domänen werden von den Exons 2-9 kodiert. Für die Herstellung des *Grsf1*-Knockout-Konstruktes, das im Rahmen des European Conditional Mouse Mutagenesis (EUCOMM) Programms erstellt wurde, hat man zunächst ein zusätzliches Exon zwischen die Exons 3 und 4 des *Grsf1*-Gens kloniert (**Abbildung 14**). Dieses zusätzliche Exon beinhaltet ein funktionelles LacZ-Genkonstrukt und ein Neomycinresistenz-Minigen. Das LacZ-Konstrukt beginnt mit einer Spleiß-Akzeptorstelle (En2 SA) und enthält stromabwärts eine interne ribosomale Insertionsstelle (IRES), einen offenen Leserahmen für die beta-Galaktosidase (LacZ) sowie ein Polyadenylierungssignal (PA). Unmittelbar downstream dieses Polyadenylierungssignals folgt auf das LacZ-Konstrukt eine loxP-Erkennungssequenz und anschließend das Neomycinresistenz-Minigen. Dieses Minigen besteht aus einem humanen beta-Aktin-Promotor (hBactP), einer Neomycin-Resistenzkasette und einem Polyadenylierungssignal. Das LacZ-Konstrukt und das Neomycinresistenz-Minigen sind zusammen eingerahmt von zwei FRT-Rekombinationsstellen. Darüber hinaus wurden jeweils eine loxP-Rekombinationsstelle vor dem Exon 4 und nach dem Exon 5 in das Knockout-Konstrukt inkloniert. Die erfolgreiche Integration des Genkonstruktes ins Genom der Zielzellen durch homologe Rekombination verleiht den Zellen die Fähigkeit in neomycinhaltigen Kulturmedien zu überleben. Gleichzeitig führt eine homologe Rekombination zur funktionellen Inaktivierung des *Grsf1*-Gens. Durch FLP-Rekombination werden das LacZ-Exon sowie das Neomycin-Minigen aus dem Genom der selektierten Zellen entfernt und damit die Konditionalität des Konstruktes hergestellt. Die so behandelten Zellen besitzen ein funktionelles *Grsf1*-Gen, obwohl die loxP Sequenzen die Exons 4 und 5 flankieren, auch noch vorhanden sind. Dieser Genotyp entspricht hinsichtlich der Funktionalität von *Grsf1* dem Funktionszustand von Wildtyp-Mäusen.

Wenn diese Tiere mit Mäusen verpaart werden, welche die Cre-Rekombinase unter der Steuerung des CMV-Promotors exprimieren, werden die Exons 4 und 5 des *Grsf1*-Gens in allen Zellen deletiert. Diese Deletion führt zur Einführung eines vorzeitigen Stopp-Kodons in die *Grsf1*-mRNA. Die in dieser Weise mutierte *Grsf1*-mRNA ist dann Substrat des nonsense-mediated decay (NMD)-Weges des RNA-Abbaus. Daraus resultiert ein effizienter Abbau der trunkierten *Grsf1*-mRNA und damit ein Knockout der *Grsf1*-Expression in allen Zellen und Geweben.



**Abbildung 14: Struktur des *Grsf1* –Knockout-Konstruktes.** Das *Grsf1*-Knockout-Konstrukt wurde im Rahmen des European Conditional Mouse Mutagenesis (EUCOMM) Programms hergestellt und uns für die Erzeugung von *Grsf1*-Knockout-Mäusen zur Verfügung gestellt. Die verschiedenen Bestandteile des Konstruktes und deren Funktion bei der Herstellung der *Grsf1*-Knockout-Mäuse sind im Text beschrieben. Besondere Bedeutung für den konditionellen *Grsf1*-Knockout ist dabei die Tatsache, dass die Exons 4 und 5, die für eine der RNA-Bindungsdomänen (qRRM1) kodieren, durch Erkennungssequenzen der Cre-Rekombinase (*loxP* Orte) flankiert werden. Wenn Mäuse, die dieses Konstrukt anstelle des normalen *Grsf1*-Gens tragen, mit Mäusen verpaart werden, welche die Cre-Rekombinase unter der Kontrolle des CMV-Promotors exprimieren, kommt es in allen Zellen dieser Tiere dazu, dass eine trunkierte Version des *Grsf1*-Gens vorhanden ist. Die Transkription dieses trunkierten Gens würde zu einer unvollständigen mRNA führen, die nach ihrer Synthese durch non-sense mediated decay sofort abgebaut wird. Deshalb sollten in allen Zellen und Geweben homozygoter *Grsf1*-Knockout-Tiere weder die *Grsf1*-mRNA noch das funktionsfähige *Grsf1*-Protein nachweisbar sein. Die heterozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäuse wurden von Dr. C. Ufer (Institut für Biochemie, Charité – Universitätsmedizin Berlin) hergestellt und mir für die Verpaarung und die anschließende funktionelle Charakterisierung der homozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäuse zur Verfügung gestellt. Quelle: modifiziert nach Dumoulin, BC et al., Cell Biosci 2022 [123]

#### 4.2.6.2. Verpaarung heterozygoter *Grsf1*-Knockout-Mäuse

Durch die unter 4.2.6.1. beschriebene Strategie wurden *Grsf1*-Knockout-Mäuse hergestellt, bei denen in allen Zellen und Geweben die Expression eines *Grsf1*-Allels nicht zu einem funktionellen Protein führt. Da das andere *Grsf1*-Allel jedoch von den gentechnischen Manipulationen nicht betroffen ist, konnte durch die Expression dieses Allels ein funktionelles *Grsf1* exprimiert werden. Um aus diesen heterozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäusen (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) homozygote Merkmalsträger (*Grsf1*<sup>-/-</sup>) zu züchten, wurden die heterozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäuse untereinander verpaart und homozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*-Knockout) ausgekreuzt. Die dabei gezüchteten Nachkommen wurden mittels genomischer PCR genotypisiert und homozygote Merkmalsträger identifiziert. Diese wurden anschließend untereinander verpaart und so eine Kolonie von homozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäusen etabliert. Für die Charakterisierungsuntersuchungen wurden diese homozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäuse mit Wildtyp-Mäusen (C57BL/6) verglichen.

#### 4.2.6.3. Präparation genomischer DNA aus Ohrbiopsien von Mäusen

Für die Genotypisierung der neu geborenen Mäuse musste aus Ohrbiopsiematerial zunächst genomische DNA gewonnen werden. Dazu wurden folgende Materialien verwendet:

#### Materialien:

- Basislösung (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH=12)
- Neutralisationslösung (40 mM Tris-HCl Puffer, pH=5)

Nach den Mendelschen Regeln entstehen bei der Kreuzung von heterozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäusen (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) homozygote Wildtyp-Mäuse (*Grsf1*<sup>+/+</sup>), heterozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) und homozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>-/-</sup>) in einem Verhältnis von 1:2:1. Um in der Mischung dieser drei Genotypen die homozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>-/-</sup>) zu identifizieren, wurden alle Nachkommen genotypisiert. Für die Genotypisierung wurde aus deren Ohrbiopsien zunächst genomische DNA extrahiert. Dazu wurden die Gewebstücke (maximal 50 mg Feuchtgewicht) in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gegeben und für 45 min in 0,04 ml Basislösung (25 mM NaOH, 0,2 mM EDTA, pH=12) in einem Thermoschüttler bei 95 °C inkubiert. Danach wurden die Proben bei 10.000 rpm in einer Eppendorf-Zentrifuge für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und 0,04 ml Neutralisationslösung (40 mM Tris-HCl Puffer, pH=5) zugegeben. Die Proben wurden anschließend zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu entfernen. Der Zentrifugationsüberstand enthält die genomische DNA und kann bei -20° für mehrere Monate gelagert werden.

#### 4.2.6.4. Genotypisierung von *Grsf1*-Knockout-Mäusen

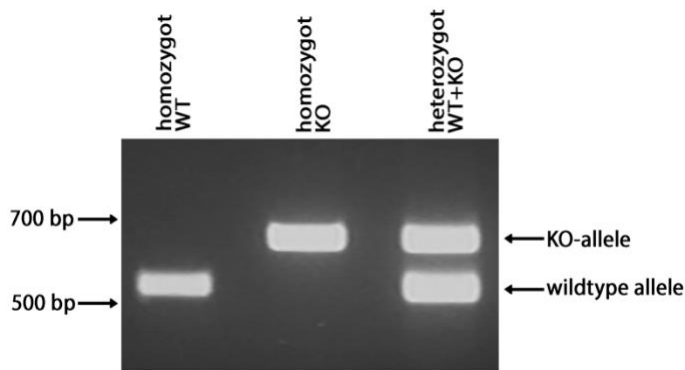
Die Genotypisierung der Nachkommen, die bei der Kreuzung von heterozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäusen entstanden sind, erfolgte durch genomische PCR. Dazu wurden zunächst zwei Genotyp-spezifische Primerkombinationen konstruiert, wobei der Downstream Primer für beide Genotypen identisch war (24140-do: GAA CTT CTT GGA TTC TGG CTC ACA). Als Upstream Primer wurden für das Wildtypallel (*Grsf1*-for: TCA GTG AAG AAC GCT CTT GTT GGC) und das Knockout-Allel (*Grsf1*-5'-arm: GAA CTT CTT GGA TTC TGG CTC ACA) unterschiedliche Primer verwendet. Die Primer wurden so gewählt, dass sich bei der Amplifizierung des Wildtypallels eine PCR-Bande mit einer Größe von 556 bp ergab. Für das Knockout-Allel (KO-Allel) konnte eine Größe von 682 bp vorhergesagt werden. Damit ließen sich die PCR-Produkte des Wildtyp-Allels von den Produkten des KO-Allels in der Agaroseelektrophorese unterscheiden, was für die Genotypisierung der Nachkommen ein großer Vorteil war. Für die genomische PCR wurden zunächst folgende Reagenzien in ein PCR-Gefäß gegeben:

*Materialien:*

- 2     µl der genomischen DNA (siehe 2.8.3.)
- 0,4   µl dNTPs (10 mM Stammlösung)
- 1     µl Primer *Grsf1*-for (TCA GTG AAG AAC GCT CTT GTT GGC)
- 2     µl Primer 24140-do (GAA CTT CTT GGA TTC TGG CTC ACA)
- 1     µl Primer *Grsf1*-5'arm (GAA CTT CTT GGA TTC TGG CTC ACA)
- 4     µl Phusion HF Buffer
- 0,6   µl DMSO
- 0,2   µl Phusion HS II DNA Polymerase F549S
- 8,8   µl Wasser

Anschließend wurde das PCR-Amplifizierungsprogramm gestartet. Dafür wurden die Proben zunächst für eine Minute auf 98 °C erhitzt. Danach wurden 31 Amplifizierungszyklen durchgeführt, wobei jeder Zyklus aus einer Denaturierungsphase (20 s bei 98 °C), einer Annealingphase (30 s bei 68 °C) und einer Synthesephase (30 s bei 72 °C) bestand. Abschließend wurden die Proben noch für 3 min bei 72 °C inkubiert und dann bei 10 °C bis zur weiteren Analyse gelagert.

Schlussendlich wurde ein Aliquot (2-5 µl) des PCR-Ansatzes auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen, um die entstandenen PCR-Produkte hinsichtlich ihrer Größenverteilung zu analysieren. Proben, bei denen in der Elektrophorese eine Doppelbande zu sehen war, konnten als heterozygote Merkmalsträger identifiziert werden. Proben, bei denen nur eine Bande mit der Größe von 682 bp zu sehen war (obere Bande), können als homozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>-/-</sup>) identifiziert werden. Proben, bei denen eine PCR-Bande mit einem Molekulargewicht von 556 bp (untere Bande) sichtbar ist, konnten als homozygote Wildtyp-Tiere klassifiziert werden (siehe **Abbildung 15**).



**Abbildung 15: Erwartbare Größenverteilung der Amplifizierungsprodukte des *Grsf1*-Genlocus von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen.** Tiere mit einer Doppelbande sind heterozygot, da sie sowohl das Wildtypallel als auch das Knockout-Allel (KO-Allel) exprimieren. Tiere, die nur die niedermolekulare Bande zeigen sind ein homozygoter Wildtyp. Tiere mit einer hochmolekularen Bande sind homozygote Knockout-Mäuse. Quelle: modifiziert nach Dumoulin, BC et al., Cell Biosci 2022 [123].

#### 4.2.6.5. Präparation von Gesamt-RNA aus Mausgeweben

Um die Expression der *Grsf1*-mRNA in verschiedenen Geweben zu quantifizieren, wurden *Grsf1*-Knockout-Mäuse und Wildtyp-Kontrolltiere im Alter von 20-30 Wochen getötet, Organe bzw. Organstücke entnommen, in 1 ml RNALater® überführt und die Proben bei -20 °C gelagert. Die Euthanasie wurde durch berechtigtes Personal (Frau Dr. D. Heydeck) der AG Kühn durchgeführt. Um die Gesamt-RNA zu isolieren, wurden von den aufgetauten Proben 25-30 mg eingewogen. Um dieses zu homogenisieren wurde in ein entsprechendes Homogenisierungsröhrchen (Lysing-Tubes, MP Biomedical, Eschwege, Deutschland) das Gewebe mit Lysepuffer vermengt und durch den FastPrep-24® Homogenisator (MP-Biomedical, Eschwege, Deutschland) für 40 sek. bei höchster Geschwindigkeit bearbeitet. Um eine vollständige Homogenisierung zu erreichen musste dieser Vorgang mit Bearbeitungspausen auf Eis für 2 Minuten (zur Vermeidung einer Überhitzung) mehrmals wiederholt werden. Danach wurden die Homogenate zentrifugiert und der Homogenatsüberstand, der die Gesamt-RNA enthielt, gewonnen. Im Anschluss wurde die Gesamt-RNA aus dem Zelllysate unter Verwendung des RNA-Isolations-Kits (NucleoSpin® RNA; Machery-Nagel; Düren, Deutschland) isoliert. Dabei wurde die an die Matrix gebundene RNA mit RNA-freiem Wasser von der Matrix eluiert. Die Quantifizierung der RNA-Konzentration sowie die Bestimmung der Reinheit der RNA-Präparation erfolgte photometrisch durch Messung der Lichtabsorption bei 260 nm (Absorptionsmaximum der RNA) und 280 nm (Absorptionsmaximum der als Verunreinigung noch vorhandenen Proteine). Die isolierten RNA-Proben wurden bis zur weiteren Verwendung eingefroren und bei -80 °C gelagert.



#### **4.2.6.6. Reverse Transkription**

Um die *Grsf1*-mRNA-Konzentrationen in den Geweben von *Grsf1*-Knockout-Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen quantifizieren zu können, musste die Gesamtheit aller aus den Geweben extrahierten RNAs zunächst in die zugehörigen cDNAs umgeschrieben werden, die anschließend mittel PCR amplifiziert werden können. Eine direkte Amplifizierung der RNA-Moleküle ist nicht möglich. Die Reverse-Transkription wurde nach Herstellerangaben des RevertAid™ Premium First Strand cDNA Synthese Kits (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Insgesamt wurden zum Versuchsansatz 1-2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Dazu wurde die benötigte RNA-Menge mit 100pmol Oligo(dt)-Primern und den entsprechenden Nukleosidtriphosphaten (dNTPs) auf ein Gesamtvolumen von 20µl mit RNA-freiem Wasser aufgefüllt. Im Anschluss wurde das Gemisch für 5 Minuten bei 65 °C inkubiert, sodass die Sekundärstrukturen der RNA aufgespalten werden konnten. Nach weiteren 3 Minuten auf Eis wurde ein 5-fach konzentrierter Reaktionspuffer (RiboLock RNase Inhibitor, 20 U/µl) und eine RevertAid Premium Reverse Transcriptase (200 U/µl) nach Maßgabe des Herstellers zugesetzt. Für die Reverse Transkription wurden die Proben im Anschluss für 1 h bei 50 °C inkubiert. Um die Reaktion zu stoppen wurde bei 85 °C für 5 Minuten die reverse Transkriptase denaturiert. Der RT-Puffer wurde in einem Verhältnis von 1:3 für die quantitative Real-Time PCR eingesetzt und im Anschluss bei -20 °C verwahrt.

#### **4.2.6.7. Herstellung externer Amplifizierungsstandards für qRT PCR**

Die quantitative RT-PCR ist eine hoch sensitive Methode zur Quantifizierung der Gleichgewichtskonzentrationen ausgewählter mRNA-Spezies in biologischen Proben. Aufgrund des Amplifizierungsprozesses können geringe Abweichungen (z.B. Pipettierfehler) im experimentellen System zu großen Schwankungen der Ergebnisse führen. Um solche Probleme zu minimieren, werden den Amplifizierungsansätzen bekannte Konzentrationen externer Amplifizierungsstandards beigefügt. Diese Amplifizierungsstandards (Amplicons) mussten für die Ziel-mRNA (*Grsf1*) und die Referenz-mRNA (*Gapdh*) separat präpariert werden. Hierfür wurde zunächst Gesamt-RNA aus Maushoden isoliert, von dem bekannt war, dass sowohl *Grsf1* als auch die *Gapdh* in großen Mengen exprimiert wird. Das Hodengewebe wurde zunächst homogenisiert und die Gesamt-RNA extrahiert. Die Gesamt-RNA wurde anschließend

als Matrize für die Amplifizierung eines geeigneten Abschnitts der Grsf1- bzw. Gapdh-mRNA eingesetzt. Die entstandene PCR-Produkte wurde im Anschluss auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen und eine Gelelektrophorese durchgeführt. Die Gelbande der Amplifizierungsprodukte wurden ausgeschnitten und eine Gelextraktion mit Hilfe des GeneJet Gel Extraction Kits (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurde durchgeführt. Danach wurden die isolierten Amplifizierungsprodukte in den Klonierungsvektor (TOPO TA Cloning 2.1; Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) nach Angaben des Herstellers einkloniert. Für die Transformation dienten kompetente *E.coli* Zellen (XL1 Blue; Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die transformierten Zellen wurden auf mit Ampicillin behandelten Agarplatten über Nacht bei 37 °C inkubiert und fünf isoliert gewachsene *E. coli* Klone wurden ausgewählt. Die Zellen dieser Klone wurden separat in 2,5 ml Ampicillin-haltigem LB-Medium bei 37 °C für 17 h angezchtet. Die Zellen wurden abzentrifugiert und die Plasmid DNA mit Hilfe des GeneJet Plasmid Kits (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) isoliert. Danach erfolgte eine Probenspaltung mit unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen und positive Klone wurden zur Sequenzierung an die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) geschickt.

Nach Überprüfung der Sequenzen der hergestellten Amplikonplasmide wurden diese in größeren Bakterienkulturen amplifiziert und mit Hilfe des Kits NucleoBond Xtra MIDI Plus (Sigma-Aldrich, Taufkirchen Deutschland) gereinigt. Das zirkuläre Plasmid wurde mit Hilfe der Restriktionsendonuklease HindIII linearisiert, mit Hilfe einer Gelelektrophorese gereinigt und mit Hilfe des GeneJET Purification Kits (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aus dem Gel extrahiert. Die so präparierten externen Amplifikationsstandards (Amplikons) für murines Grsf1 und die murine Gapdh wurden im Anschluss in einer definierten Menge Wasser aufgenommen. Dadurch entstand die Urlösung (UL) der Amplikons. Für die exakte Quantifizierung der Grsf1- bzw. Gapdh-Amplifizierungsprodukte unbekannter Proben, musste zunächst die Konzentration der Urlösung in µg DNA pro ml mittels Absorbtionsmessung bei 260 nm ermittelt werden. Aus diesem Wert konnte dann die Anzahl der doppelsträngigen DNA-Moleküle (Kopien/µl) des jeweiligen Amplikons in der Urlösung errechnet werden. Dies erfolgt über folgende Formel:

$$\left( \frac{\text{Konzentration UL} / 10^9}{\text{Fragmentgröße (Vektor + Insert)} \times 660} \right) \times 6,022 \times 10^{23}$$

Anschließend wurde die URLösung so verdünnt, dass eine Gebrauchslösung SL1 entstand, welche eine Konzentration von  $10^{10}$  einzelsträngigen DNA-Moleküle pro  $\mu\text{l}$  SL1 enthält. Zur Herstellung für eine SL1 mit einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  wurde folgende Berechnung durchgeführt:

$$\left( \frac{10^{10} \times 100}{\text{ds DNA-Moleküle} / \mu\text{l}} \right) / 2$$

Für die weitere Verdünnung von SL1 zu SL2 sowie SL3 wurde RT-Puffer genutzt. Es wurden  $10 \mu\text{l}$  SL1 mit  $989 \mu\text{l}$  einfachem RT-Puffer sowie  $1,06 \mu\text{l}$  Plasmid (pGL3 Control,  $2,35 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) verdünnt. Damit ergab sich eine SL2 mit  $10^8$  einzelsträngigen Molekülen/ $\mu\text{l}$ . Um die endgültige SL3 zu erhalten, erfolgte eine Verdünnung mittels RT-Puffers. Ziel waren 2 bis 40 Millionen Kopien, in Abhängigkeit vom Gen. Es erfolgte die qRT-PCR. Mit Hilfe dieser externen Amplifikationsstandards war es möglich, die Anzahl der Kopien der Grsf1-mRNA pro 1 Millionen Kopien der Gapdh mRNA in einem Gewebe zu quantifizieren. Da die Gapdh ein häufig verwendetes Referenzenzym darstellt, kann man aus diesem Wert darauf schließen, wie hoch Grsf1 in einem Gewebe exprimiert wird. Sollten bei den Messungen Werte von  $<1000$  Kopien von Grsf1-mRNA pro  $10^6$  Kopien Gapdh-mRNA gemessen werden, kann man davon ausgehen, dass Grsf1 in diesem Gewebe nur auf niedrigem Niveau exprimiert wird. Sollten  $10^6$  Grsf1-mRNA Kopien pro  $10^6$  Gapdh-mRNA Kopien gemessen werden, kann geschlussfolgert werden, dass Grsf1 auf hohem Niveau exprimiert wird.

#### 4.2.6.8. Quantitative Realtime PCR

Zur Quantifizierung der zellulären Gleichgewichtskonzentrationen von Grsf1- und Gapdh-mRNA wurde eine quantitative real-time PCR (qRT-PCR) durchgeführt. Hierfür wurde das SensiFast™ SYBR® No-ROX KIT (Thermo Fischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) sowie das RotorGene 3000-PCR Gerät (Corbett Research; Mortlake, Australia) verwendet. Für die beiden zu quantifizierenden mRNA-Spezies (Grsf1, Gapdh) wurden folgende Primerkombinationen verwendet:

Grsf1: upstream Primer - GAATCCAAACTACCTACCTGGAAG

downstream Primer – CAGCTGTAAGGAAGTCCTCTCAG

Gapdh: upstream Primer - CCATCACCATCTTCCAGGAGCGA

downstream Primer - GGATGACCTTGCCCACAGCCTTG

Für die PCR wurden Aliquots (1-5 µl) der cDNA-Präparationen mit 9 µl des Mastermix (5 µl SensiFast Mix™, 1 µl des jeweiligen Primers und 3 µl MilliQ-H<sub>2</sub>O) zusammen pipettiert und das Volumen des PCR-Ansatzes auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt. Für jede Probe erfolgte die PCR in drei unabhängigen Ansätzen. Durch alle Messungen wurde sowohl eine Negativkontrolle als auch ein vorgegebener Standard des jeweiligen Gens mitgeführt. Es folgte die Herstellung einer Verdünnungsreihe mit vorgegebener Konzentration, um eine Kalibrierungskurve für jedes Transkript zu generieren. Dies ermöglichte die Extrapolation der Target-Gen-Konzentration.

Temperatur	Dauer	Prozess
95 °C	2 Minuten	Aktivierung der Polymerase
95 °C	5 Sekunden	Denaturierung der cDNA
65 °C	10 Sekunden	Annealing der Primer
72 °C	20 Sekunden	Verlängerung der Zielsequenz

} 30 Zyklen

**Tabelle 11:** qRT-PCR Programm für die Herstellung externer Amplifikationsstandards.

Der *Sybr-Green* Fluoreszenzfarbstoff, der im SensiMix™ enthalten ist, setzt sich in die entstehende DNA, wodurch die Fluoreszenzintensität nach jedem Amplifizierungszyklus ansteigt. Dieser Anstieg kann durch Messung der Emission quantifiziert werden. Letztendlich konnten die entstandenen Amplifizierungsprodukte mittels der Analyse einer Schmelzkurve ausgewertet werden. Dadurch können z.B. unspezifische Primer-Dimere, die üblicherweise im Rahmen der Amplifikationsreaktion als Nebenprodukte entstehen, vom spezifischen Amplifizierungsprodukten unterschieden werden. Im Rahmen der Erhitzung wird eine Denaturierung der DNA-Doppelstränge erwirkt. Dadurch wird der *Sybr-Green* Farbstoff frei und das Maß der Fluoreszenz nimmt ab. Die Unterscheidung von spezifischen Amplifizierungsprodukten und Primerdimeren ist dadurch möglich, da der Siedepunkt der DNA höher ist.

#### **4.2.6.9. Herstellung von Gewebehomogenaten und Proteinbestimmung**

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden verschiedene Organe von *Grsf1*-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren homogenisiert. Dazu wurden Organstücke (20-50 mg Feutgewicht) zu 1 ml PBS gegeben und in Homogenisationsröhrchen (Lysing-Tubes; MP Biomedicals, Eschwege, Deutschland) überführt. Die Gewebehomogenisation wurde mit Hilfe einem FastPrep-24® Homogenisators (MP Biomedical, Eschwege, Deutschland) durchgeführt (40 s bei maximaler Geschwindigkeit). Es erfolgte eine zweifache Wiederholung unter Sicht, um eine vollständige Gewebehomogenisierung zu erreichen. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurden die Proben für 2 Minuten auf Eis gelegt um eine Überhitzung zu vermeiden. Danach wurden die Homogenate zentrifugiert (10 min 10.000 g) und der Homogenatsüberstand abgehoben. Anschließend erfolgte die Proteinbestimmung in den Homogenatsüberständen nach der Bradford-Methode [124]. Hierfür wurde zunächst eine Eichkurve mit Hilfe einer 1:10 Verdünnung einer BSA-Stammlösung (2 mg/ml) mit entionisiertem Wasser hergestellt. Von dieser Stammlösung wurden verschiedene Volumina zur Quantifizierung eingesetzt und die Eichgerade mittels linearer Regressionsanalyse bestimmt. Im Anschluss wurden von jedem Homogenatsüberstand 10 µl des Überstandes in ein Eppendorfgefäß gegeben und mit Wasser auf 800 µl aufgefüllt. Dann wurden 200 µl des Farbreagens hinzugefügt. Anschließend erfolgte bei 595 nm die photometrische Messung der entsprechenden Probe.

Die statistische Datenanalyse der *Grsf1*-Konzentration der Gewebe der Wildtyp-Mäuse erfolgte durch Ermittlung des Mittelwertes  $\pm$  Standardabweichung. Die Vergleichsanalyse zwischen Wildtypmäusen und *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurde unter Anwendung des Mann-Whitney-U-Tests (s. 4.2.7.2.) durchgeführt.

#### **4.2.6.10. Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblot von Gewebehomogenaten**

Zur Differenzierung zwischen Veränderungen der Genexpression auf mRNA-Ebene und Proteinebene erfolgte eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [125]. Dabei erfolgt eine Auftrennung der Moleküle nach Masse durch ein angelegtes elektrisches Feld. Für die Durchführung wurden Aliquots

der Homogenatsüberstände mit einem 5-fach konzentrierten kommerziellen Probenpuffer gemischt, in dem sich Mercaptoethanol (ME), Natriumdodecylsulfat (SDS), Glycerol und ein Farbstoff befanden. Diese Mischung wurde anschließend bei 95 °C für 2 min denaturiert. Danach wurden ausgefällte Proteine durch Zentrifugation eliminiert und Aliquots der klaren Überstände zur SDS-PAGE aufgetragen. Für unseren Analysen wurde ein 12,5%iges Polyacrylamidgel verwendet, das mit einem Sammelgel überschichtet wurde. In diesem pH-neutralen Sammelgel werden die zu trennenden Lysatproteine konzentriert und wandern im Anschluss in das basische Trenngel ein. Hier werden sie entsprechend ihres Molekulargewichts getrennt. Zur Größenbestimmung wurden ein kommerzielles Markerproteingemisch (Precision Plus Protein Standards, Dual Color; Bio-Rad; Hercules, USA) verwendet. Das Elektrophoressystem war von der Firma Bio-Rad (Hercules, USA). Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 200 V für ungefähr 45 Minuten.

Nach der SDS-PAGE wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Dabei wurde das Tank-Blotting-Verfahren angewandt, bei dem die Proteine durch Anlegen einer elektrischen Spannung aus dem SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran (Amersham, UK-Buckinghamshire) bei 250 mA für 60 Minuten überführt wurden. Anschließend wurde die Blotmembran in einer 0,2%igen Ponceau-Lösung gebadet. Diese färbt die übertragenen Proteine auf der Membran an und erlaubt damit eine Aussage über die Transfer-Effizienz. Anschließend wurde die Membran mit *Aqua dest.* gewaschen und inkubierte über 60 Minuten mit 1x PBS – 0,1 % Tween20 behandelte 5%iger Magermilch. Dieser Vorgang blockierte die nicht besetzten Stellen der Membran. Darauf folgte die Inkubation mit den jeweiligen anti-Grsf1-Antikörpern, um die spezifischen Proteine nachzuweisen. Für die Färbung der Testis Lysatüberstände wurde ein Anti-Grsf1-Antikörper (AB205531) der Firma Abcam (Cambridge, UK) verwendet. Dieser polyklonale Antikörper wurde gegen ein synthetisches Peptid des Grsf1-Proteins im Kaninchen hergestellt. Er wurde in einer Verdünnung von 1:1000 in 5 % Magermilch/PBS-Tween20 eingesetzt. Die Blotmembran wurde über Nacht mit der Antikörperlösung inkubiert. Danach wurde die Membran mehrfach gewaschen (PBS mit 0,3 % Tween20). Im Anschluss wurde der sekundäre Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:4.000 der Membranen zugesetzt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach nochmaligem Waschen wurde der Blotmembran eine Luminol-Reagenzlösung (Western Blot Chemilumineszenz HRP Substrat Kits, Serva-Electrophoresis;

Heidelberg, Deutschland) zugesetzt, wodurch die Antigen-reaktiven Proteinbanden sichtbar wurden.

Nach der spezifischen *Grsf1*-Färbung wurde die Blotmembran gestrippt und anschließend unter Verwendung des monoklonalen Anti-Maus-Gapdh-Antikörpers MA5-15738 (Invitrogen, Carlsbad, USA) gefärbt. Für die Färbung der Lysatüberstände der anderen Gewebe erwies sich der Anti-*Grsf1*-Antikörper (AB205531) der Firma Abcam (Cambridge, UK) als ungeeignet, da sich eine große Anzahl verschiedener Proteinbanden anfärbte. Deshalb wurde der Anti-human-*Grsf1*-Antikörper HPA036985 von Sigma-Aldrich (Diesenhofen, Deutschland) verwendet, der ebenfalls im Kaninchen gezogen wurde. Zwar wurden auch mit diesem Antikörper andere Proteine im höheren Molekulargewichtsbereich angefärbt, der *Grsf1*-Molekulargewichtsbereich blieb allerdings frei von unspezifischen Färbungen. Der Antikörper wurde ebenfalls in einer Verdünnung von 1:1.000 eingesetzt. Die spezifische Färbung der *Grsf1*-immunreaktiven Banden erfolgte mit einem sekundären Antikörper (Anti-Rabbit IgG, Abcam, Cambridge, UK) in einer Verdünnung von 1:5.000. Nach der spezifischen *Grsf1*-Färbung wurde die Blotmembran gestrippt und anschließend unter Verwendung des monoklonalen Anti-Maus-Gapdh-Antikörpers MA5-15738 (Invitrogen, Carlsbad, USA) gefärbt. Hier wurde ein POD-markierter Anti-Maus-IgG-Antikörper der gleichen Firma in einer Verdünnung von 1:5.000 eingesetzt.

#### **4.2.6.11. Vergleichende Gewichtskinetiken von *Grsf1*-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrollen**

Um zu überprüfen, ob die funktionelle Inaktivierung des *Grsf1*-Gens zu einer postpartalen Entwicklungsstörung führt, wurden *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse und entsprechende Wildtypkontrollen (n=10 für jeden Genotyp und jedes Geschlecht) über einen Zeitraum von 45 Wochen unter identischen Bedingungen gehalten. Dazu wurden die Tiere in vier experimentelle Gruppen eingeteilt:

- I) männliche Wildtypiere
- II) männliche *Grsf1*<sup>-/-</sup> Tiere
- III) weibliche Wildtypiere
- IV) weibliche *Grsf1*<sup>-/-</sup> Tiere

Die Tiere einer experimentellen Gruppe wurden aus Tierschutzgründen in zwei separaten Käfigen gehalten (5 Tiere pro Käfig). Einmal pro Woche (alle sieben Tage) wurde das Körpergewicht gemessen und der allgemeine Gesundheitszustand (Mobilität, Fellstruktur, Stuhlbeschaffenheit) eingeschätzt. In diesen Experimenten ging es vor allem darum herauszufinden, ob die *Grsf1*-Knockout-Mäuse im Vergleich mit Wildtyp-Tieren im Laufe der Individualentwicklung mehr oder weniger Körpergewicht zunehmen. Um die inter-individuellen Unterschiede innerhalb der vier Versuchsgruppen zu minimieren, wurden zunächst die relativen Körpergewichte für jedes einzelne Individuum am Tag 1 des experimentellen Protokolls bestimmt. Zu diesem Zweck wurden die Körpergewichte aller Individuen einer experimentellen Gruppe gemittelt und die prozentuale Abweichung der individuellen Körpergewichte von diesem Mittelwert bestimmt. Im weiteren Verlauf des Versuches wurden dann die prozentuale Gewichtszunahme für jedes Individuum berechnet, wobei das Individualgewicht am Tag 1 des Experiments für jedes Tier 100 % gesetzt wurde. Die statistische Analyse der experimentellen Rohdaten erfolgte mit Hilfe des Wilcoxon-Tests inklusive Ermittlung des p-Wertes. Die von uns aufgestellte Null-Hypothese dafür war die Annahme, dass es keinen Unterschied in der Gewichtsentwicklung zwischen den Wildtyp-Mäusen und *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen gibt. Dazu wurde die GraphPad Prism Software, Version 8.3.1. (Insight Partners, New York, USA) verwendet.

#### **4.2.6.12. Blutentnahme und Bestimmung basaler hämatopoetischer Parameter**

Unabhängig vom oben geschilderten Alterungsversuch wurde vergleichend das Blut von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren analysiert. Dazu wurden je fünf *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse und entsprechende Wildtypkontrolltiere beiderlei Geschlechts im Alter von 80-90 Wochen (alte Mäuse) unter Inhalationsnarkose getötet und Blut durch Herzpunktion gewonnen. Für diese Experimente wurden bewusst alte Mäuse ausgewählt, da phänotypische Veränderungen von genetisch manipulierten Tieren sich häufig erst im höheren Lebensalter manifestieren. Junge Mäuse verfügen üblicherweise über Kompensationsmechanismen, die latente phänotypische Veränderungen ausgleichen könnten. Um die Blutgerinnung während der Blutgewinnung zu verhindern, wurde das Blut in mit EDTA beschichtete Eppendorfgefäße gegeben und diese leicht geschüttelt. Die Analyse des Blutes erfolgte unmittelbar nach der Blutgewinnung durch das Institut für Veterinärmedizinische Diagnostik GmbH Berlin (Berlin, Deutschland).



Die statistische Auswertung der experimentellen Rohdaten erfolgte unter Verwendung des zweiseitigen T-Testes für zwei unabhängige Stichproben (siehe 4.2.7.1.). Auch dazu wurde die GraphPad Prism Software, Version 8.3.1. (Insight Partners, New York, USA) verwendet.

#### **4.2.7. Statistische Methoden**

Für die statistische Auswertung der experimentellen Rodaten aus den Mausexperimenten wurden verschiedene Tests der deskriptiven Statistik verwendet, um die erhaltenen Ergebnisse besser zu veranschaulichen und um statistische Unterschiede zwischen den beiden Genotypen (Wildtypmäuse vs. *Grsf1<sup>-/-</sup>*-Mäuse) zu objektivieren. Zudem wurden neben Mittelwerten auch die jeweilige Standardabweichung als Maß für die Streuweite der Einzelmessungen vom Mittelwert bestimmt. Die grafische Darstellung erfolgte mit Hilfe der Prism GraphPad Prism Software, Version 8.3.1. (Insight Partners, New York, USA).

##### **4.2.7.1. Zweistichproben T-Test**

Der Zweistichproben T-Test wird für Stichproben verwendet, um zu ermitteln, ob sich die Mittelwerte zweier unabhängiger Stichproben unterscheiden. Dazu werden zwei voneinander unabhängige Stichproben bzw. Gruppen benötigt. Zusätzlich ist zwischen einem einseitigen und einem zweiseitigen T-Test zu unterscheiden:

- I) Beim einseitigen (gerichteten) T-Test geht es um die Frage, ob die Stichprobe signifikant vom Mittelwert abweicht.
- II) Beim zweiseitigen (ungerichteten) T-Test wird der Mittelwert aller Stichproben dem Mittelwert der Gesamtheit gegenübergestellt.

Hinsichtlich der hämatopoetischen Parameter führten wir einen zweiseitigen T-Test durch. Die Analyse dieser Stichproben erfolgte mittels Hilfe der Prism GraphPad Prism Software, Version 8.3.1. (Insight Partners, New York, USA).

##### **4.2.7.2. Mann-Whitney-U-Test**

Mit dem Mann-Whitney-U-Test (b: Wilcoxon Rangsummen-Test) wird einen Vergleich von zwei unabhängigen (nicht gepaarten) Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenzen geprüft. Die Auswertung erfolgte mit SPSS (IBM, New York, USA). Dabei werden von beiden Gruppen (Wildtypmäuse vs. *Grsf1<sup>-/-</sup>*-knockout-Mäuse) die

Durchschnittswerte gegenübergestellt. Die graphische Aufarbeitung erfolgte mit Prism GraphPad Prism Software, Version 8.3.1. (Insight Partners, New York, USA).

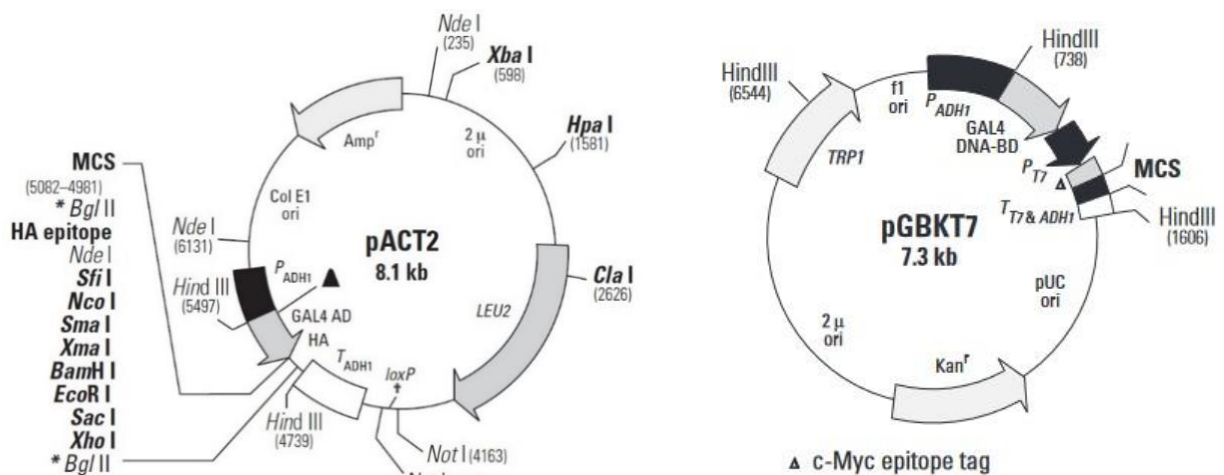
#### **4.2.7.3. Wilcoxon-Test**

Der Wilcoxon-Test (b: Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test) prüft zwei abhängige (gepaarte) Stichproben hinsichtlich ihrer zentralen Tendenzen. Es werden zwei Ränge aus den Differenzen der Messwerte erstellt. Zudem erfolgte eine zweiseitige Testung. Im Falle der vorliegenden Arbeit handelt es sich um Messwiederholungen des Körpergewichtes am selben postnatalen Tag der beiden zu vergleichenden Gruppen. Der Vergleich erfolgte nach Geschlecht getrennt, das heißt das jeweilige Gewicht der weiblichen Wildtyp-Mäuse wurde mit dem Gewicht der entsprechenden weiblichen Grsf1<sup>-/-</sup>-Mäusen verglichen. Gleiches gilt auch für die männlichen Versuchstiere. Ein intergeschlechtlicher Vergleich wurde nicht gezogen. Als Signifikanzniveau wurde  $p = 0.05$  genommen. Die Analyse erfolgte mittels Prism GraphPad Prism Software, Version 8.3.1. (Insight Partners, New York, USA).

## 5. Ergebnisse

### 5.1. Funktionsweise des Hefe-2-Hybrid-System und verwendete Filterstrategien

Das Hefe-2-Hybrid-System stellt ein eukaryontisches Expressionssystem dar, das für die Suche nach Interaktionspartnern für ein gegebenes Protein genutzt werden kann. Für diesen Zweck werden Hefezellen mit zwei verschiedenen Plasmiden (Köderplasmid und Beuteplasmid) transformiert. Wenn diese rekombinant veränderten Plasmide für Fusionsproteine kodieren, die miteinander wechselwirken (Protein-Protein-Wechselwirkung), entsteht ein aktiver Transkriptionsfaktor, sodass sich der Funktionsstatus der kotransformierten Zelle verändert. Diese funktionell veränderten Zellen können somit von Zellen abgegrenzt werden, deren Fusionsproteine nicht miteinander wechselwirken.



**Abbildung 17: Struktur des nicht-rekombinanten (leer) Beute-Plasmids pACT2.** Es fusioniert die GAL4-AD mit einem HA-Epitop-Tag und einem externen Protein. Für unsere Untersuchungen wurde eine cDNA-Fusionsbibliothek in die Multicloningsequenz des Plasmids eingefügt. Das Plasmid vermittelt in Hefen eine Auxotrophie für Leucin und eine Ampicillinresistenz in E.coli Bakterien. Quelle: modifiziert nach <https://www.takarabio.com/assets/documents/Vector%20Documents/pACT2%20AD%20Vector%20Information.pdf>

**Abbildung 17: Struktur des nicht-rekombinanten (leer) Köder-Plasmids pGBKT7.** Das Plasmid kodiert für Proteine, die mit der GAL4-BD fusioniert sind. Für unsere Untersuchungen wurde die cDNA-Sequenz von Grsf1 in die Multicloning Sequenz des Plasmids einkloniert. Zudem enthält das Plasmid einen c-Myc-Epitop-Tag und vermittelt eine Auxotrophie für Tryptophan in Hefezellen und eine Kanamycinresistenz in E.coli Bakterien. Quelle: modifiziert nach <https://www.takarabio.com/assets/documents/Vector%20Documents/PT3248-5.pdf>.

Für unsere Suche nach GRSF1-bindenden Proteinen wurde als ursprüngliches Köderplasmid pGBKT7 verwendet. Dieses Plasmid kodiert zum einen für die DNA-

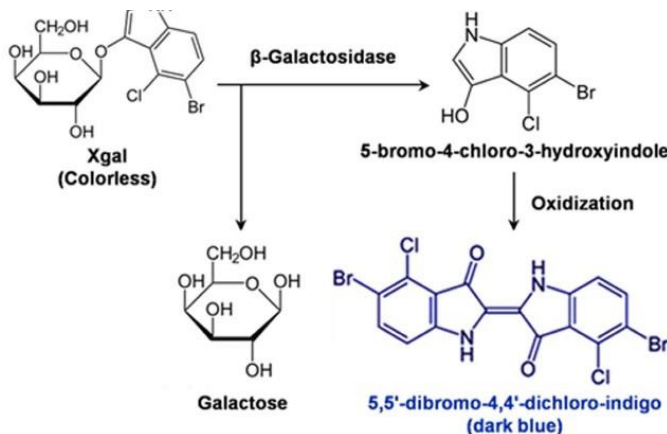
Bindungsdomäne des Transkriptionsfaktors GAL4, zum anderen vermittelt es eine Prototrophie für Tryptophan. Die erfolgreich mit diesem Plasmid transformierten Hefezellen können mithin Tryptophan selbst synthetisieren und sind damit nicht darauf angewiesen, diese Aminosäure aus dem Nährmedium aufzunehmen. In dieses Plasmid wurde die kodierende Sequenz von *GRSF1* einkloniert, sodass die transformierten Hefezellen ein GRSF1-enhaltendes Fusionsprotein exprimieren sollten, welches gleichzeitig die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 enthält (Köderprotein) und auf einem Tryptophan-defizienten Nährboden wächst. Als zweites Plasmid für die Kotransformation (Beuteplasmid) wurde pACT2 verwendet. Dieses Plasmid kodiert für die Aktivator-domäne des Transkriptionsfaktors GAL4. Zudem sind erfolgreich mit pACT2 transformierte Zellen prototroph für Leucin, können also auf Leucin-defizienten Nährböden wachsen. In das pACT2-Plasmid wurde eine cDNA-Bibliothek einkloniert. Dabei entstanden viele unterschiedliche rekombinante pACT2-Plasmide, die neben der Sequenz, die für die Aktivierungsdomäne von GAL4 kodiert (diese ist in allen rekombinanten Plasmiden enthalten) auch die cDNA-Sequenzen für eine große Anzahl unterschiedlicher Proteine enthält. Bei der Kotransformation mit beiden Plasmiden sind nur diejenigen Zellen, die beide Plasmide aufgenommen haben in der Lage, auf einem Nährboden zu überleben, der defizient für Tryptophan und Leucin ist. Alle anderen Hefezellen sterben ab. Wenn eine Hefezelle das GRSF1-enhaltende Köderfusionsprotein exprimiert und das koexprimierte Beutefusionsprotein ein GRSF1-bindendes Protein enthält, kann das Köderfusionsprotein mit dem Beutefusionsprotein physisch interagieren. In diesem Fall würde die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 (enthalten im Köderfusionsproteine) mit der GAL4-Aktivierungsdomäne (enthalten im Beutefusionsprotein) miteinander nicht-kovalent wechselwirken und es entsteht der aktive GAL4-Transkriptionsfaktor. Unter diesen Umständen könnten die Reportergene aktiviert werden. Wenn jedoch das Beuteplasmid eine cDNA enthält, die für ein Protein kodiert, dass nicht mit GRSF1 wechselwirkt, findet keine direkte Interaktion von Köderfusionsprotein und Beutefusionsprotein statt. Damit entsteht kein funktionsfähiger GAL4-Transkriptionsfaktor und die Reportergene können nicht aktiviert werden.

In dem von uns verwendeten System können drei unterschiedliche Reportergene verwendet werden, um Hefezellen zu identifizieren, die GRSF1-bindende Proteine als Bestandteil des Beutefusionsproteins enthalten.

- 1) Das ADE2-Gen kodiert für Phosphoribosylaminoimidazolecarboxylase, die essenziell für die de-novo-Synthese von Purinen ist. Durch Aktivierung

dieses Repotergens werden die Zellen für Adenin (essentieller Strukturbestandteil der Nukleinsäuresynthese) prototroph und können auf einem Adenin-defizientem Nährboden wachsen.

- II) Das HIS3-Gen kodiert für die Imidazoleglycerolphosphat-dehydrogenase, die einen essenziellen Schritt der Histidinsynthese katalysiert. Bei Aktivierung des Transkriptionsfaktors GAL4 können die Zellen die Aminosäure Histidin synthetisieren und können somit in einem Histidin-Mangel-Medium wachsen.
- III) Das lacZ-Gen kodiert für die beta-Galaktosidase. Wird Hefezellen, welche die beta-Galaktosidase als Reaktion auf die Aktivierung des lacZ-Gens exprimieren, das Substrat X-gal (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- $\beta$ -D-galactopyranosid) angeboten, wird dieses Substrat gespalten, was zur Bildung von 5-Brom-4-chlor-indoxyl führt. Dieses Reaktionsprodukt wird durch Luftsauerstoff oxidiert und bildet nach Dimerisierung den blauen Farbstoff 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo [121](**Abbildung 18**).



**Abbildung 18: Reaktionsmechanismus der beta-Galaktosidase bei Verwendung von X-gal als Substrat.** Hefezellen, die das lacZ-Gen exprimieren, können dadurch identifiziert werden, dass sie durch Inkubation mit X-gal blau angefärbt werden.  
Quelle: modifiziert nach Cai, X et al., PLoS ONE 2012 [126]

Die prinzipielle Funktionsweise des Hefe-2-Hybrid-Systems (**Abbildung 11**) und die für die Kotransformation der Hefezellen verwendeten Leerplasmide (**Abbildung 16+17**) sind oben schematisch dargestellt. In die multicloning-site (MCS) des pACT2-Plasmids wurde die cDNA-Bibliothek einkloniert, in die des pGBKT7-Plasmids die *GRSF1*-cDNA. Anschließend wurden Hefezellen mit den beiden rekombinanten Plasmiden kotransformiert und die Zellen auf entsprechenden Mangelnährböden angezüchtet. Danach wurde ein Filterpapierabklatsch der gewachsenen Hefezellkolonien durchgeführt, der dann auf die Expression des MEL1-Gens (Blaufärbung) untersucht wurde. Auf diese Weise wurden insgesamt mehr als 1,5 Mio unterschiedliche Hefezellklone gescreent.

## 5.2. Überprüfung der Spezifität der Protein-GRSF1-Interaktionen in Hefezellen

Nachdem mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid-Screen Hefeklone identifiziert wurden, die in der Lage waren, potentielle GRSF1-bindenden Proteine zu exprimieren, musste die Spezifität der Protein-GRSF1-Wechselwirkung überprüft werden. Um Hefeklone herauszufiltern, welche durch Autoaktivierung oder unspezifische Protein-Protein-Wechselwirkungen die Reportergene aktiviert haben, wurden die identifizierten Hefezellklone in drei konsekutive Filtermethoden getestet.

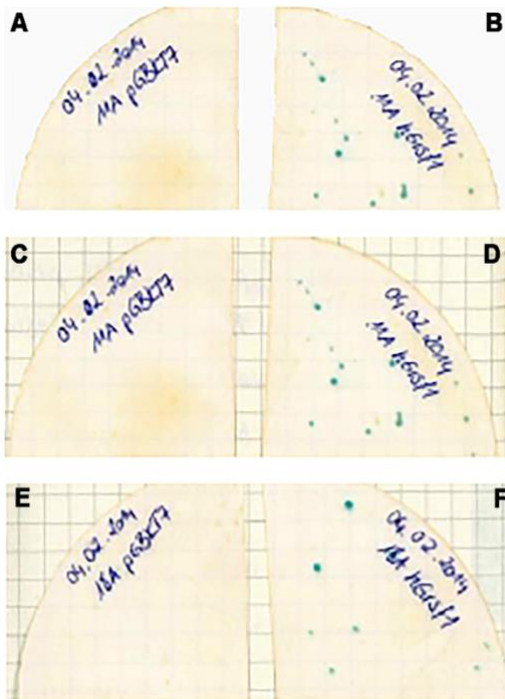
1. Erfolgreich kotransformierte Hefezellen sollten durch Aktivierung des HIS3-Gens in der Lage sein, auf Histidin-defizienten Mangelmedien zu wachsen. Deshalb wurden die im Hefe-2-Hybrid-Screen identifizierten Hefezellklone auf ein His-Mangelmedium überimpft.
2. Die auf dem His-Mangelmedium gewachsenen Klone wurden gepickt und anschließend auf ein Adenin-Mangelmedium überimpft. Wie unter 5.1. beschrieben, wird bei einer spezifischen Protein-Protein-Wechselwirkung von Köder- und Beute-Fusionsprotein das ADE2-Reportergen aktiviert. Dadurch erwarben die Hefezellen eine Adenin-Prototrophie. Bei Hefezellen, die kein GRSF1-bindendes Beuteprotein exprimieren, wird dieses Reportergen nicht aktiviert und die Zellen können auf einem Adenin-Mangelmedium nicht wachsen. Nur Hefezellen, die sowohl auf His-defizienten als auch auf Adenin-defizienten Mangelmedien wuchsen, wurden weiter untersucht. Die Aktivierung des ADE2-Reportergens konnte auch dadurch identifiziert werden, dass die Hefezellen eine Rosafärbung aufwiesen. Diese Zellfärbung ist darauf zurückzuführen, dass im Rahmen der Purinsynthese in den Zellen ein roter Farbstoff entsteht, welcher in den Zellen akkumuliert. Deshalb wurden nur solche Hefezellen für die weitere Charakterisierung verwendet, die diesen Farbstoff trugen.
3. Schlussendlich wurden die im Screen identifizierten Hefezellen auf ihre Fähigkeit hin untersucht, das artifizielle beta-Galaktosidasesubstrat X-gal umsetzen zu können (**Abbildung 20**). Dafür wird die beta-Galactosidase, welche durch das lacZ-Gen codiert wird, benötigt. Dieses Enzym spaltet das synthetische Substrat zu Galaktose und 5-Brom-4-Chlor-3-

hydroxyindol. Letzteres wird durch Luftsauerstoff oxidiert und dimerisiert anschließend zu einem blauen Farbstoff (**Abbildung 18**).



**Abbildung 19: Kolorimetrischer Nachweis der Purinsynthese in Hefezellen.** In dem von uns verwendeten System wird während der endogenen Purinbiosynthese ein roter Farbstoff als Nebenprodukt gebildet. Wurde in den kotransformierten Hefezellen ein GRSF1-bindendes Beutefusionsprotein exprimiert, waren die Zellen in der Lage, das ADE2-Gen zu exprimieren und damit Adenin endogen zu synthetisieren. Diese Synthesekapazität wurde durch die Rotfärbung der Zellen angezeigt. Quelle: Eigene Fotografie.

Zur weiteren Analyse wurden nur jene Hefezellklone verwendet, die in allen drei Testverfahren positive Ergebnisse zeigten.



**Abbildung 20: Beta-GAL Färbung von Hefezellklonen.** Hefezellklone, welche sich in den ersten beiden Filterprozessen als positiv herausgestellt hatten, wurden auf Filterpapier übertragen (colony-lift transfer) und anschließend einer X-Gal Färbung unterzogen. In Kontrollexperimenten (A, C, E) erfolgte dabei die Kotransfektion der Hefezellen mit einem Köderplasmid, das kein Grsf1 enthielt. Ein positives Ergebnis lag dann vor, wenn die Hefezellen, die mit dem rekombinanten (Grsf1-enthaltenden) Köder-plasmid (B, D, F) transformiert worden waren, blau-grün angefärbt wurden, die Kontrollzellen aber keinerlei Färbung zeigten. Quelle: Eigene Fotografien.

### 5.3. Identifizierung der im Hefe-2-Hybrid Screen identifizierten potentiellen GRSF1-Bindungsproteine

Um die Identität der potenziellen GRSF1-Bindungsproteine aufzuklären, welche die 3-stufige Filterstrategie überlebt hatten, mussten Sequenzanalysen der in diesen Zellen exprimierten Beuteplasmide durchgeführt werden. Da eine direkte Sequenzanalyse dieser Plasmide in Hefezellen nicht möglich ist, wurde aus den Hefezellklonen zunächst die Plasmid-DNA extrahiert.

Klon Nr.	Name des Proteins	Kurzbeschreibung	humaner Gen-locus	Größe (bp)
1 (B2*)	T-complex-protein subunit eta (CCT7) 1	Dieses Gen kodiert für ein Chaperon, das zum Chaperon containing TCP1 complex (TCP1 ring complex) gehört. Es faltet ATP-abhängig verschiedene Proteine, unter anderem Actin und Tubulin. [127]	2p13.2	1200
2 (C2*)	Selenozystein-insertions-sequenz-bindendes Peptid (SECIS BP2)	<b>Das kodierte Protein bindet mit anderen Proteinen an die Selenocystein - Insertionssequenz (SECIS) in für Selenoproteine-kodierenden mRNAs und rekodiert das für den Einbau von Selenozystein verantwortliche Stopkodon [88].</b>	9q22.2	1300
3 (D2*)	Tetratrico-peptid repeat protein 7B (TTC7B)	<b>Das TTCB7-Protein ist an der Zellzyklusregulation und an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt. Es reguliert die Transkription, die mRNA-Prozessierung, die Proteinfaltung und die Proteintranslokation [99].</b>	14q32.11	1600
4	Keine Übereinstimmung mit bisher bekannten humanen Proteinen			1500
5 (F2)	Guanine nucleotide-binding $\beta$ -2-like1 (GNB2L1/RACK1)	Ein ribosomales Protein. Es initiiert die Translation an Ribosomen, wurde an der Plasmamembran nachgewiesen und ist an verschiedenen intrazellulären Signalwegen beteiligt [128].	5q35.3	600
6 (G2)	Phospholipase A2 $\beta$ , group IVB (PLA2 G4B)	Dieses Protein gehört zur Familie der zytosolischen Phospholipasen A2. Es hydrolysiert Phospholipide und setzt damit Fettsäuren und Lysophosphatide frei [129].	6p21.2	800
7 (H2)	NEDD4-binding protein 2-like 2 (N4BP2L2)	Dieses Protein ist an der Ubiquitierung von Proteinen beteiligt und dient damit dem intrazellulären Proteinabbau [130].	13q13.1	2200
8 (A11)	SNF8, ESCRT-II complex subunit	<b>Dieses Protein ist an Abbauprozessen von Transmembranproteinen im Lysosom beteiligt. Zudem wird es zur Rekrutierung von ESCRT-III benötigt [131].</b>	17q21.32	1400

**Tabelle 12: Beschreibung der im Hefe-2-Hybrid-Screen identifizierten potentiellen GRSF1-bindenden Proteine.** Aus den die Filterstrategie überlebenden Hefezellklonen wurde die Plasmid-DNA isoliert, in *E. coli* hinein transformiert, amplifiziert, gereinigt und schließlich sequenziert. Mit den identifizierten Sequenzen wurde eine BLAST-Suche durchgeführt, um die Proteine strukturell zu identifizieren. Die mit \* markierten Proteine liegen überwiegend in Mitochondrien vor.

Diese DNA wurde anschließend in kompetente *E. coli* Zellen hinein transformiert und amplifiziert. Anschließend erfolgte eine erneute Präparation der Plasmid-DNA aus den *E.coli* Zellen und ein Verdau mit geeigneten Restriktionsendonukleasen. Dabei wurden die cDNA-Insert aus den Plasmiden herausgeschnitten, wobei sich Fragmentgrößen von 0,6-2,2 kbp ergaben. Die Restriktionsfragmente wurden anschließend sequenziert und die erhaltenen Sequenzdaten wurden mittels *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) Analyse mit allen bekannten Einträgen humaner cDNA-Datenbanken verglichen. Dabei konnten sieben verschiedene cDNAs identifiziert



werden, welche in **Tabelle 12** aufgelistet sind. In dieser Tabelle, welche die wesentlichen Ergebnisse unseres Hefe-2-Hybrid-Screens zusammenfasst, wird neben dem Namen der entsprechenden Proteine, die Lokalisation des entsprechenden Gens im humanen Genom und eine kurze Zusammenfassung der bisher beschriebenen biologischen Funktionen der einzelnen Proteine gegeben. Da der Zeitrahmen meiner Promotionsarbeit nicht ausreicht hat, um alle sechs in Rahmen des Screenings identifizierten Proteine näher zu charakterisieren, wurden drei Proteine für weiterführende Untersuchungen ausgewählt. Diese Proteine sind in **Tabelle 12** fett gedruckt hervorgehoben:

- I) Selenozysteininsertionssequenz bindendes Peptid (SECIS BP2), Klon C2
- II) Tetratricopeptid repeat protein 7B (TTC7B), Klon D2
- III) SNF8, ESCRT-II complex subunit, Klon A11

**Zsf.: Mit Hilfe des Hefe-2-Hybrid Screens konnten die Sequenzen von sieben bisher unbekanntem potentiellen GRSF1-bindende Proteine identifiziert werden. Eine Sequenz konnte keinem menschlichen Protein zugeordnet werden. Drei Sequenzen wurde für weiterführende Untersuchungen ausgewählt.**

#### **5.4. Überprüfung der GRSF1-Protein-Interaktionen in HEK293-Zellen**

Hefezellen sind primitive eukaryontische Organismen, die zwar ähnlichen Stoffwechselprinzipien folgen wie Säugetierzellen, die aber häufig weniger komplexe Regulationsmechanismen der Genexpression aufweisen [132]. Viele dieser regulatorischen Unterschiede sind auf komplexere Protein-Protein-Interaktionen in Säugetierzellen zurückzuführen. Aus diesem Grund ergab sich für uns nachfolgend die Aufgabe zu überprüfen, ob die in den Hefezellen nachgewiesene Interaktion von GRSF1 mit den neu identifizierten GRSF1-Bindungsproteinen auch in humanen Zellen nachweisbar ist. Um diese Frage zu untersuchen, wurden humane embryonale Nierenzellen (HEK293) verwendet. Da diese Zellen GRSF1 jedoch konstitutiv nur auf niedrigem Niveau exprimieren, wurden die kodierenden Sequenzen von GRSF1 auf der einen Seite und von den potenziellen GRSF1-Bindungsproteine auf der anderen in unterschiedliche eukaryontische Expressionsplasmide einkloniert. Für unsere Experimente verwendeten wir pCMV-basierte Expressionsvektoren, bei denen die kodierende Sequenz von GRSF1 als FLAG<sup>®</sup>-tag Fusionsprotein exprimiert wurde. Der

FLAG<sup>®</sup>-tag repräsentiert die Aminosäuresequenz (DYKDDDDK), die sowohl am N-Terminus oder am C-Terminus eines rekombinanten Proteins angehängt werden kann und dient der Erkennung des Fusionsproteins durch FLAG<sup>®</sup>-tag spezifische Antikörper [133]. Der FLAG<sup>®</sup>-tag hat eine molare Masse von ca. 1000 Da [134]. In unseren Versuchsreihen wurde der FLAG<sup>®</sup>-tag N-terminal vor das GRSF1-Protein geschaltet.

Die neu beschriebenen potenziellen GRSF1-Bindungsproteine (TTC7B, SBP2, SNF8) wurden als Myc-tag Fusionsproteine exprimiert. Der Myc-tag wird durch die Aminosäuresequenz (EQKLISEEDL) definiert und kann wie die FLAG<sup>®</sup>-tag-Sequenz N-terminal oder C-terminal an ein rekombinantes Protein angefügt werden. In dieser Arbeit wurde auch das Myc-tag N-terminal an die neuen potenziellen GRSF1-bindenden Proteine angefügt. Auch hier kann das Fusionsprotein mit Hilfe eines Myc-tag spezifischen Antikörpers selektiv nachgewiesen werden. Wichtig für den selektiven Nachweis der beiden Arten der Fusionsproteine ist, dass der anti-FLAG<sup>®</sup>-tag Antikörper nicht die Myc-tag Aminosäuresequenz erkennt.

Nachdem die rekombinanten Expressionsplasmide kloniert und ihre Korrektheit mittels DNA-Sequenzierung bestätigt wurde, konnten kultivierte HEK293-Zellen jeweils mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag GRSF1-Expressionsplasmid und einem Myc-tag Expressionsplasmid kotransfiziert werden, das für eines der potenziell GRSF1-bindenden Proteine kodiert. Dabei wurden für jedes der potenziellen GRSF1-Bindungsproteine zwei unterschiedliche Transfektionsansätze angesetzt:

- I) Myc-tag-pCMV-Leervektor + FLAG<sup>®</sup>-tag-pCMVh*GRSF1*,
- II) Myc-tag-pCMV-Protein + FLAG<sup>®</sup>-tag-pCMVh*GRSF1*.

Die kotransfizierten Zellen wurden 48 h bebrütet, wobei sich unter den gegebenen Bedingungen die Zellzahl binnen 24 h verdoppeln sollte. Nach der Bebrütung erfolgte die Auszählung der Zellen mittels Zählkammer. Ziel dieses Experiments war es, eine Zelldichte von ca. 10<sup>4</sup> Zellen/ml zu erreichen. Nach der Zellkultivierung wurden die kotransfizierten HEK293-Zellen geerntet, mittels Ultraschalls lysiert und das Lysat bei 10.000 g zentrifugiert. Der dadurch entstandene Lysatüberstand wurde mit Anti-Myc- bzw. Anti-FLAG<sup>®</sup>-markierten magnetischen beads inkubiert. Die Antikörper an den Beads sollten die tag-Sequenzen an den rekombinanten Fusionsproteinen (GRSF1 bzw. GRSF1-bindende Proteine) binden und die Proteine damit an den Magnetbeats arretieren. Danach wurden die beads im Magnetfeld immobilisiert und gewaschen. Anschließend wurden die an die beads gebundenen Proteine eluiert (siehe Material und Methoden). Nach der Eluation wurde die von den beads abgewaschenen Proteine

mittels Western-Blot analysiert. Dazu erfolgte zunächst eine SDS-PAGE. Die nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine wurden anschließend auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und der Blot mit verschiedenen Antikörpern (anti-cMyc-tag-AK bzw. anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-AK) gefärbt. Die immunreaktiven Banden wurden im Anschluss mittels Imager sichtbar gemacht und quantifiziert.

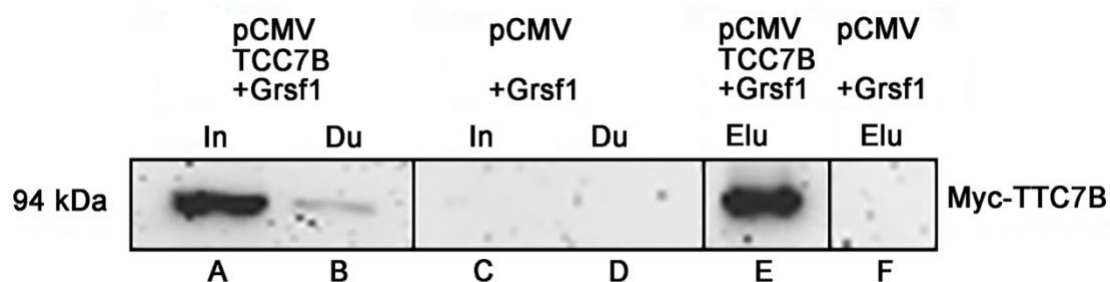
In den Versuchsreihen, in denen überprüft werden sollte, ob GRSF1 mit seinem potenziellen Bindungsprotein über eine gemeinsame RNA-Bindung interagiert (keine direkte Protein-Protein-Wechselwirkung), wurde dem Zelllysatüberstand vor der Immunopräzipitation RNase zugefügt. Dadurch konnte überprüft werden, ob eine vermeintliche Protein-Protein-Wechselwirkung auf die direkte physische Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen ist, oder ob beide Proteine simultan an die gleiche RNA binden. Dadurch konnten falsch positive Ergebnisse eliminiert werden.

### **5.5. Kotransfektion von HEK293-Zellen mit FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-TTC7B**

Um zu überprüfen, ob das cMyc-markierte rekombinante TTC7B in HEK293-Zellen mit dem rekombinanten FLAG<sup>®</sup>-markierten GRSF1 interagiert, wurden die Expressionsplasmide, die für die beiden Fusionsproteine kodieren, in HEK293-Zellen kotransfiziert. Bei der Aufbereitung der Zellen erfolgte die Zugabe von RNase vor dem Auftragen auf die Bead-Säulen um eine Wechselwirkung durch die gemeinsame Bindung an dieselbe RNA auszuschließen. Der durch die direkte Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine entstandene Protein-Protein-Komplex wurde anschließend durch Immunopräzipitation mit einem Anti-cMyc-Antikörper von anderen Proteinen des Lysatüberstandes abgetrennt. Danach wurden die an die Magnetbeads gebundenen Proteine von den Beads eluiert und mittels Westernblot analysiert. Dabei wurde zur Färbung der Blots ein Anti-cMyc-Antikörper verwendet (**Abbildung 21**). Der Blot wurde also nach der An- bzw. Abwesenheit von cMyc-tag-TTC7B Fusionsprotein in den verschiedenen Fraktionen der Immunopräzipitation untersucht.

Wurden die Zellen mit dem FLAG<sup>®</sup>-markiertem *GRSF1*-Plasmid und dem cMyc-markiertem TTC7B-Plasmid kotransfiziert, konnten im Lysatüberstand (**Abbildung 21 A**) große Mengen an cMyc-TTC7B-Fusionsprotein nachgewiesen werden. Im Durchfluss (**Abbildung 21 B**) der Immunopräzipitation wurden nur geringe Mengen des Fusionsproteins detektiert. Das deutete darauf hin, dass das exprimierte cMyc-

markierte TTC7B-Fusionsprotein, welches sich im Lysatüberstand befand, fast vollständig an die Magnetbeads gebunden hatte.

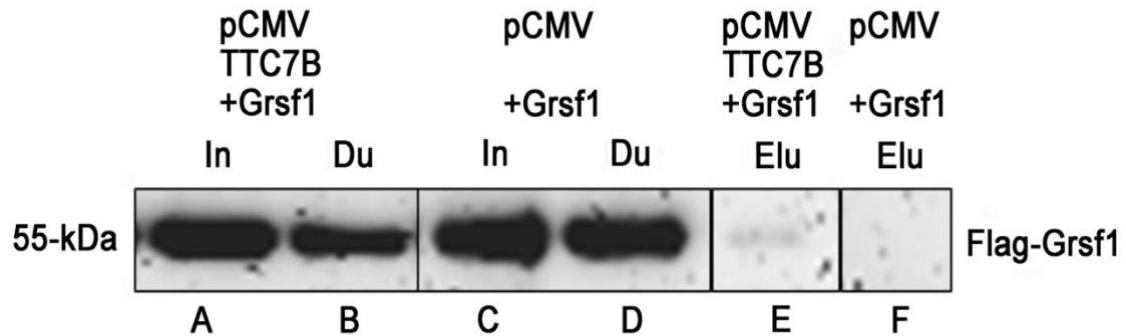


**Abbildung 21: Immunopräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293-Zellen, die mit unterschiedlichen Transfektionsplasmiden kotransfiziert wurden.** HEK293-Zellen wurden mit folgenden zwei Plasmidkombinationen kotransfiziert: I) Kombination von FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 Plasmid mit cMyc-tag-TTC7B Plasmid (A, B, E), II) Kombination von FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 Plasmid und cMyc-tag-Leerplasmid (C, D, F). Anschließend wurden die Lysatübersände präpariert und eine Immunpräzipitation mit einem Anti-cMyc-tag Antikörper durchgeführt. Zunächst wurden Aliquots des Lysatüberstandes (vor der Immunpräzipitation, In) und des Durchflusses der Immunpräzipitation (Du) zum Westernblot aufgetragen, der mit einem anti-cMyc-tag Antikörper entwickelt wurde. Abschließend wurden die während der Immunpräzipitation an die Magnetbeads gebundenen Proteine von den Beads eluiert (E, F). Dabei konnte in den Eluaten (Elu) der Präzipitate vor Zellen, die simultan mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und dem cMyc-tag-TTC7B-Plasmid kotransfiziert wurden, große Mengen an cMyc-tag-TTC7B-Fusionsprotein nachgewiesen werden (E). Wurden die Zellen, die mit der Plasmidkombination cMyc-tag-Leerplasmid und FLAG<sup>®</sup>-tag GRSF1-Plasmid transfiziert, konnte erwartungsgemäß kein cMyc-tag-TTC7B-Fusionsprotein im Eluat der Immunopräzipitates (F) nachgewiesen werden. Quelle: Eigene Abbildung.

Wurden die an die Magnetbeads gebundenen Proteine eluiert, konnten große Mengen an cMyc-tag-TTC7B-Fusionsprotein im Eluat (**Abbildung 21 E**) nachgewiesen werden. Parallel wurden die HEK293-Zellen simultan mit dem pCMV-cMyc-tag-Leerplasmid und dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid transfiziert (Leerkontrolle). Dabei konnte weder im Lysatüberstand (**Abbildung 21 C**), noch im Durchfluss der Immunopräzipitation (**Abbildung 21 D**), noch im Eluat der Immunopräzipitation (**Abbildung 21 F**) signifikante Mengen an cMyc-tag-TTC7B Fusionsprotein nachgewiesen werden.

In einem Parallelansatz wurden die gleichen Lysatüberstände verwendet, deren Herstellung in der obigen **Abbildung 21** beschrieben wurde. Auch hier wurde die Immunopräzipitation mit dem Anti-cMyc-tag-Antikörper durchgeführt. Sollten bei dieser Immunopräzipitation signifikante Mengen an FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Protein präzipitiert werden, wäre dieses Ergebnis nur dadurch erklärbar, dass die beiden Fusionsproteine (FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-TTC7B) im Lysatüberstand physisch miteinander interagieren. Um das herauszufinden, wurde der Westernblot (**Abbildung 22**) mit einem Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-Antikörper gefärbt, wodurch das Vorhandensein bzw. die Abwesenheit

von FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Fusionsprotein in den verschiedenen Fraktionen der Immunpräzipitation angezeigt wird.



**Abbildung 22: Immunpräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293 Zellen, die mit unterschiedlichen Transfektionsplasmiden kotransfiziert wurden.** HEK293-Zellen wurden wie in der Legende zur Abbildung 22 beschrieben, mit folgenden Plasmidkombinationen kotransfiziert: I) Kombination von Flag-tag-GRSF1-Plasmid und cMyc-tag-TTC7B-Plasmid (A, B, E), II) Kombination von Flag-tag-GRSF1-Plasmid und cMyc-tag-Leerplasmid (C, D, F). Anschließend wurden die Lysatüberstände der Zellen präpariert und eine Immunpräzipitation mit einem Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-Antikörper durchgeführt. Aliquots des Lysatüberstandes (vor der Immunpräzipitation, In) und des Durchflusses der Immunpräzipitation (Du) wurden zum Westernblot aufgetragen. Abschließend wurden die während der Immunpräzipitation an die Magnetbeads gebundenen Proteine von den Beads eluiert (E, F). Dabei konnte in den Eluat (Elu) der Präzipitaten von Zellen, die simultan mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 Plasmid und dem cMyc-tag-TTC7B-Plasmid kotransfiziert wurden, kleine Mengen an FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Fusionsprotein nachgewiesen werden (schwache immunoreaktive Bande). Wurden die Zellen, die mit der Kombination von cMyc-tag-Leerplasmid und dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 Plasmid transfiziert worden waren, zur Analyse eingesetzt, konnte erwartungsgemäß kein FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Fusionsprotein im Eluat des Immunpräzipitates nachgewiesen werden (F). Quelle: Eigene Abbildung.

Aus **Abbildung 22** ist ersichtlich, dass im Lysatüberstand (**Abbildung 22 A**) der HEK293-Zellen, die mit den FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und dem cMyc-tag-TTC7B-Plasmid transfiziert wurden, große Mengen an FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Fusionsprotein vorhanden waren. Diese Mengen waren offensichtlich so groß, dass die Bindungskapazität der Magnetbeads überschritten wurde, sodass auch im Durchfluss der Immunpräzipitation (**Abbildung 22 B**) FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 nachgewiesen werden konnte. Erwartungsgemäß konnten auch im Lysatüberstand der Zellen, die mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und dem cMyc-tag-Leerplasmid transfiziert wurden, große Mengen an FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Fusionsprotein sowohl im Lysatüberstand als auch im Durchfluss der Immunpräzipitation nachgewiesen werden (**Abbildung 22 C, D**).

Wurden die während der Immunpräzipitation an die Magnetbeads gebundenen Proteine von den Beads eluiert und die dabei erhaltenen Proteine im Westernblot analysiert, konnte eine schwache FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Bande im Eluat der Beads nachgewiesen werden (**Abbildung 22 E**). Keine FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Bande war jedoch im Immunpräzipitat nachweisbar, wenn die HEK293-Zellen mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-

*GRSF1*-Plasmid und dem cMyc-tag-Leerplasmid kotransfiziert wurden (**Abbildung 22 F**). Die Tatsache, dass nur geringe Mengen an FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 mit den cMyc-tag-Antikörper präzipitiert werden konnten (**Abbildung 22 E**), deutet darauf hin, dass die Affinität der Bindung zwischen FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und dem cMyc-tag-TTC7B unter den gegebenen experimentellen Bedingungen eher gering zu sein scheint. Bei höheren Bindungsaffinitäten hätten größere Mengen an FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 präzipitiert werden müssen. Trotzdem deuten die erhaltenen Daten darauf hin, dass rekombinantes FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und rekombinantes cMyc-tag-TTC7B in kotransfizierten HEK293-Zellen miteinander zu interagieren scheinen.

**Zsf: Durch Kotransfektion von HEK293-Zellen mit eukaryontischen Expressionsplasmiden die für FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-TTC7B kodieren und anschließender Immunopräzipitation konnte TTC7B als GRSF1-bindendes Protein identifiziert werden, wobei die Bindungsaffinitäten zwischen den beiden rekombinanten Hybridproteinen eher gering zu sein scheinen.**

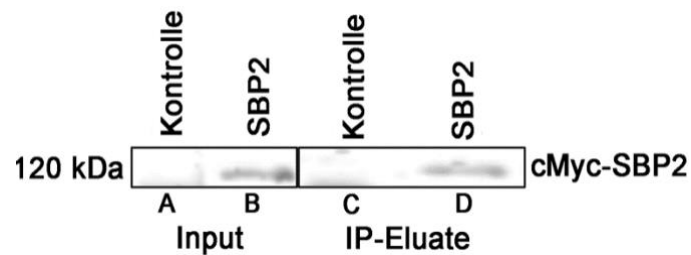
#### **5.6. Kotransfektion von HEK293-Zellen mit FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2**

Um zu überprüfen, ob das cMyc-markierte rekombinante SBP2 in HEK293-Zellen mit dem rekombinanten FLAG<sup>®</sup>-markierten GRSF1 interagiert, wurden die Expressionsplasmide, die für die beiden Fusionsproteine kodieren, in HEK293-Zellen kotransfiziert. Der durch die direkte Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine entstandene Protein-Protein-Komplex wurde anschließend durch Immunpräzipitation mit einem Anti-cMyc-Antikörper von anderen Proteinen des Lysatüberstandes abgetrennt. Danach wurden die an die Magnetbeads gebundenen Proteine von den Beads eluiert und mittels Western-Blot analysiert.

Dabei wurde zur Färbung der Blots der Anti-cMyc-Antikörper verwendet (**Abbildung 23**). Der Blot wurde also nach der An- bzw. Abwesenheit von cMyc-tag-SBP2 Fusionsprotein im Lysatüberstand (Input) und im Eluat der Immunopräzipitation untersucht.

In Kontrollexperimenten wurde der Lysatüberstand von HEK293-Zellen verwendet, die mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-*GRSF1*-Plasmid und einem cMyc-tag-Leerplasmid

kotransfiziert wurden. Um auszuschließen, dass die Wechselwirkung des FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Fusionsprotein mit dem cMyc-tag-SBP2-Fusionsprotein darauf zurückzuführen ist, dass beide Proteine an eine gemeinsame RNA binden, wurden die Lysatüberstände mit RNase behandelt. Dadurch wurden alle RNA-Moleküle in den Lysatüberständen abgebaut, sodass eine gemeinsame Bindung von cMyc-tag-SBP und Flag-tag-GRSF1 an eine RNA nicht mehr möglich war.



**Abbildung 23: Immunopräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293-Zellen, die mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und cMyc-tag SBP2-Plasmid kotransfiziert wurden.** HEK293-Zellen wurden mit den beiden spezifizierten eukaryontischen Expressionsplasmiden (FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und cMyc-tag SBP2-Plasmid) kotransfiziert und die Immunopräzipitation erfolgte mit Magnetbeads, die mit einem Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-Antikörper beladen waren. Anschließend wurde in den Lysatüberständen der kotransfizierten Zellen und im Eluat der Immunopräzipitation, die mit Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-Antikörper durchgeführt wurde, die An- bzw. Abwesenheit von cMyc-markiertem SBP2 mittels Westernblot-Analyse untersucht. Als Kontrollen dienten die Lysatüberstände von HEK293-Zellen, die mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und einem cMyc-tag-Leerplasmid kotransfiziert wurden. Um auszuschließen, dass es sich bei der möglichen Interaktion von Flag-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2 um eine indirekte Interaktion handelt, die darauf zurückzuführen ist, dass beide Proteine mit einer RNA wechselwirken, wurden die Lysatüberstände der HEK293-Zellen mit RNase behandelt. Quelle: Eigene Abbildung

Aus **Abbildung 23** ist erkennbar, dass erwartungsgemäß bei der Kontrolltransfektion (cMyc-tag-Leerplasmid) keine Expression des cMyc-tag-SBP2 Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 23 A**). Dagegen war bei der Analyse des Lysatüberstandes von mit FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und cMyc-tag-SBP2-Plasmid kotransfizierten Zellen eine deutliche cMyc-SBP2 Fusionsproteinbande sichtbar (**Abbildung 23 B**). Wurden die Eluate der Immunopräzipitation, die mit dem Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag Antikörper durchgeführt wurde, untersucht (**Abbildung 23 C+D**), konnten bei den Kontrolltransfektionen keine cMyc-SBP2 Bande beobachtet werden (**Abbildung 23 C**). Im Gegensatz dazu konnte in den Eluaten der mit FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2 kotransfizierten Zellen eine deutliche immunreaktive Bande beobachtet werden (**Abbildung 23 D**). Diese Daten belegen, dass bei der Kotransfektion von HEK293-Zellen mit der Plasmidkombination FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2 beide Fusionsproteine exprimiert wurden und dass sie RNA-unabhängig miteinander wechselwirken.

**Zsf: Durch Kotransfektion von HEK293-Zellen mit eukaryontischen Expressionsplasmiden die für FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2 kodieren und anschließender Immunopräzipitation konnte SBP2 als GRSF1-bindendes Protein identifiziert werden.**

### **5.7. Kotransfektion von HEK293-Zellen mit FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SNF8**

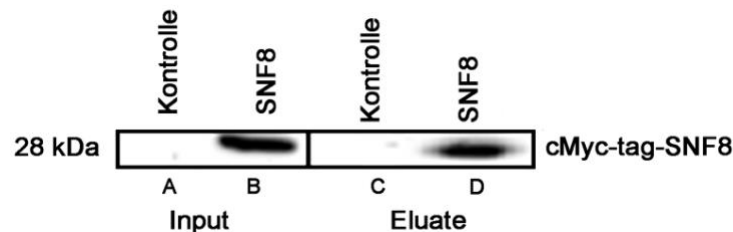
Um zu überprüfen, ob das cMyc-markierte rekombinante SNF8 in HEK293-Zellen mit dem rekombinanten FLAG<sup>®</sup>-markierten GRSF1 interagiert, wurden die Expressionsplasmide, die für die beiden Fusionsproteine kodieren, in HEK293-Zellen kotransfiziert. Der durch die direkte Wechselwirkung der beiden Fusionsproteine entstandene Protein-Protein-Komplex wurde anschließend durch Immunpräzipitation mit einem Anti-cMyc-Antikörper von anderen Proteinen des Lysatüberstandes abgetrennt. Danach wurden die an die Magnetbeads gebundenen Proteine von den Beads eluiert und mittels Westernblot analysiert.

Dabei wurde zur Färbung der Blots der Anti-cMyc-Antikörper verwendet (**Abbildung 24**). Der Blot wurde also nach der An- bzw. Abwesenheit von cMyc-tag-SNF8-Fusionsprotein im Lysatüberstand (Input) und im Eluat der Immunopräzipitation untersucht. In Kontrollexperimenten wurden wie bei den oben beschriebenen potentiellen GRSF1-bindenden Proteinen (TTC7B, SBP2) der Lysatüberstand von HEK293-Zellen verwendet, die mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und einem cMyc-tag-Leerplasmid kotransfiziert wurden. Um auszuschließen, dass die Wechselwirkung des FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Fusionsprotein mit dem cMyc-tag-SBP2-Fusionsprotein darauf zurückzuführen ist, dass beide Proteine an eine gemeinsame RNA binden, wurden die Lysatüberstände mit RNase behandelt. Dadurch wurden alle RNA-Moleküle in den Lysatüberständen abgebaut, sodass eine gemeinsame Bindung der beiden rekombinanten Fusionsproteine an eine RNA nicht mehr möglich war.

Aus **Abbildung 24** ist erkennbar, dass bei der Kontrollkotransfektion mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und dem cMyc-tag-Leerplasmid keine Expression des cMyc-tag-SNF8-Fusionsprotein nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 24 A**). Dagegen war bei der Analyse des Lysatüberstandes von mit FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und cMyc-tag-SNF8-Plasmid kotransfizierten Zellen eine deutliche cMyc-SNF8-Fusionsproteinbande sichtbar (**Abbildung 24 B**). Wurden die Eluate der Immunopräzipitation, die mit dem Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-Antikörper durchgeführt wurde,



untersucht (**Abbildung 24 C+D**), konnten bei der Kontrolltransfektion keine cMyc-SNF8-Bande beobachtet werden (**Abbildung 24 C**). Im Gegensatz dazu konnte im Immunopräzipitationseluat der mit FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2 kotransfizierten Zellen eine deutliche immunreaktive Bande beobachtet werden (**Abbildung 24 D**). Diese Daten belegen, dass bei der Kotransfektion mit der Plasmidkombination FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SNF8 beide Fusionsproteine exprimiert wurden und dass sie RNA-unabhängig miteinander wechselwirken.



**Abbildung 24: Immunopräzipitation des Lysatüberstandes von HEK293-Zellen, die mit den FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1- und cMyc-tag-SNF8-Plasmiden kotransfiziert wurden.** HEK293-Zellen wurden mit den beiden spezifizierten eukaryontischen Expressionsplasmiden (FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid and cMyc-tag-SNF8-Plasmid) kotransfiziert und die Immunopräzipitation erfolgte mit Magnetbeads, die mit einem Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-Antikörper beladen waren. Anschließend wurde in den Lysatüberständen der kotransfizierten Zellen und im Eluat der Immunopräzipitation, die mit Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag-Antikörper durchgeführt wurde, die An- bzw. Abwesenheit von cMyc-markiertem SNF8 mittels Westernblot-Analyse untersucht. Als Kontrollen dienten die Lysatüberstände von HEK293-Zellen, die mit dem FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1-Plasmid und einem cMyc-tag-Leerplasmid kotransfiziert wurden. Um auszuschließen, dass es sich bei der möglichen Interaktion von FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2 um eine indirekte Interaktion handelt, die darauf zurückzuführen ist, dass beide Proteine mit einer RNA wechselwirken, wurden die Lysatüberstände der HEK293-Zellen mit RNase behandelt. Quelle: Eigene Abbildung

**Zsf: Durch Kotransfektion von HEK293-Zellen mit eukaryontischen Expressionsplasmiden die für FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SNF8 kodieren und anschließender Immunopräzipitation konnte SNF8 als GRSF1-bindendes Protein identifiziert werden.**

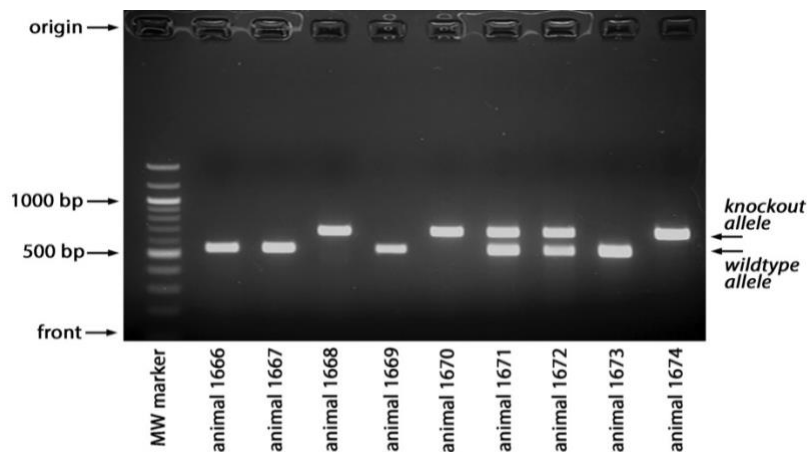
### 5.8. Herstellung und funktionelle Grundcharakterisierung von *Grsf1*-Knockout-Mäusen

Obwohl in der Vergangenheit detaillierte Untersuchungen in zellulären Modellsystemen zur biologischen Rolle von GRSF1 durchgeführt wurden, existierten bis vor Kurzem keine *Grsf1*-Knockout-Mäuse, mit denen überprüft werden konnte, ob sich die in vitro Ergebnisse auch unter in vivo Bedingungen bestätigen lassen. Kürzlich wurden Experimente mit einem Muskel-spezifischen *Grsf1*-Knockout durchgeführt [87] und dabei ergab sich ein subtil defekter Phänotyp der Tiere. Bisher wurden jedoch noch keine Daten für systemisch *Grsf1*-defiziente Mäuse publiziert.

### 5.8.1. Herstellung von homozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäusen und deren Genotypisierung.

Heterozygote Mäuse, bei denen ein Allel des *Grsf1*-Genortes durch gentechnische Manipulation systemisch inaktiviert wurde, konnten wie unter 4.2.6. ff beschrieben von Dr. C. Ufer (AG Lipoxygenaseforschung, der Charité – Universitätsmedizin Berlin, Leitung Prof. H. Kühn) hergestellt werden. Diese heterozygoten Tiere wurden miteinander verpaart und die Nachkommen hinsichtlich des *Grsf1*-Genlokus mit Hilfe der genomischen PCR genotypisiert.

Ein Beispiel für die Genotypisierung ist in **Abbildung 25** dargestellt. Wie unter 4.2.6.3. beschrieben sollten entsprechend der Mendel'schen Regeln bei der Kreuzung von heterozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäusen (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) Wildtypmäuse (*Grsf1*<sup>+/+</sup>), heterozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) und homozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>-/-</sup>) in einem Verhältnis von 1:2:1 entstehen. Bei Tier 1666 konnte mittels genomischer PCR nur eine Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 580 bp nachgewiesen werden. Diese Bande belegt das Vorhandensein des *Grsf1* Wildtypallels, während keine Hinweise für das Vorkommen des Knockout-Allels erhalten wurden. Diese Daten beweisen, dass es sich bei dieser Maus um ein ausgekreuztes WildtypTier handelt. Ähnliche Schlussfolgerungen konnten für die Tiere 1667, 1669 und 1673 gezogen werden.



**Abbildung 25: Genotypisierung von Nachkommen, die bei der Verpaarung von heterozygoten *Grsf1*-Knockout-Mäusen (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) entstehen.** Die Nachkommen eines Zuchtpaares (zwei Weibchen + ein Männchen) heterozygoter *Grsf1*-Knockout-Mäuse wurden wie unter Material und Methoden beschrieben genotypisiert. Die bei der genomischen PCR entstandenen Amplifizierungsprodukte wurde in einem 1,5 % Agarosegel aufgetrennt. Quelle: modifiziert nach Dumoulin, BC et al., Cell Biosci 2022 [123]

Für die Tiere 1668, 1670 und 1674 ergab sich bei der genomischen PCR eine einzelne Bande mit einem Molekulargewicht von ca. 700 bp und dieses Amplifizierungsprodukt belegt die ausschließliche Anwesenheit eines *Grsf1*-Knockout-Allels. Da kein Wildtypallel nachgewiesen werden konnte, muss es sich bei diesen Tieren um homozygote *Grsf1*-Knockout-Tiere (*Grsf1*<sup>-/-</sup>) handeln. Bei den Mäusen 1671 und 1672 ergaben sich bei der genomischen PCR-Amplifizierungsprodukte des Wildtypallels und des Knockout-Allels, wobei die Bandenintensitäten vergleichbar waren. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass im Genom dieser beiden Tiere das *Grsf1*-Wildtypallel und das *Grsf1*-Knockout-Allel in vergleichbaren Konzentrationen vorkommen. Diese Daten müssen dahingehend interpretiert werden, dass es sich bei diesen beiden Mäusen um heterozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) handelt. Mehrere zufällig ausgewählte homozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse wurden anschließend miteinander verpaart, sodass eine Kolonie von *Grsf1*-Knockout-Mäusen (*Grsf1*<sup>-/-</sup>) erstellt werden konnte. Dazu wurden mehrere homozygote Zuchtpaare zusammengestellt und deren Nachkommen wurde durch Inzucht innerhalb der Kolonie weiter verpaart. Für die folgenden vergleichenden Untersuchungen von *Grsf1*-Knockout-Mäusen Tieren mit Wildtyp-Kontrollen wurden kommerziell erhältliche C57BL/6J Mäuse verwendet.

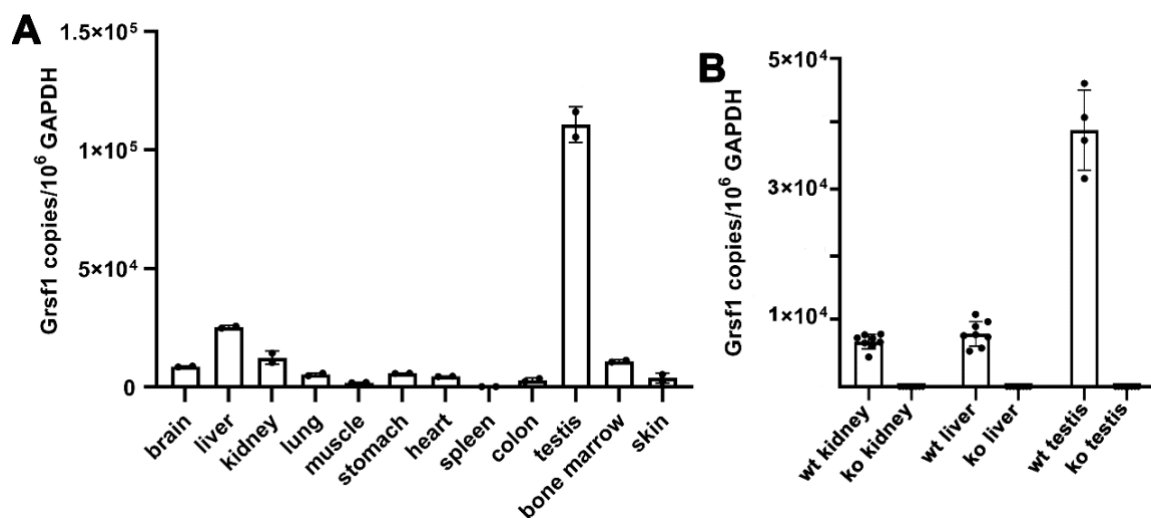
**Zsf: Durch Verpaarung heterozygoter *Grsf1*-Knockout-Mäuse (*Grsf1*<sup>+/-</sup>) konnten homozygote *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse gezüchtet werden. Zufällig ausgewählte Individuen wurden zum Aufbau einer Mauskolonie verwendet, bei denen das *Grsf1*-Gen systemisch funktionell inaktiviert ist.**

### **5.8.2. Expression von *Grsf1*-mRNA bei *Grsf1*-Knockout-Mäusen und bei Wildtyp-Kontrolltieren**

In früheren Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass *Grsf1* in fast allen Organen und Geweben der Maus exprimiert wird [64]. Um diese Ergebnisse zu überprüfen und um herauszufinden, in welchem Organ der experimentelle Knockout des *Grsf1*-Gens am besten nachvollzogen werden kann, haben wir zunächst die Expression der *Grsf1*-mRNA in verschiedenen Organen von C57BL/6J Wildtypmäusen mittels qRT-PCR quantifiziert. Wie aus **Abbildung 26 A** ersichtlich ist, konnte die *Grsf1*-mRNA in allen getesteten Geweben nachgewiesen werden. Unter allen untersuchten Geweben

war die Konzentration der *Grsf1*-mRNA im Testis am höchsten. In diesem Organ konnte die *Grsf1*-mRNA in hohen Konzentrationen ( $10^5$  Kopien *Gapdh*-mRNA pro  $10^6$  Kopien *Gapdh*-mRNA) nachgewiesen werden. Diese Daten bestätigen frühere Berichte zur hohen Expressionsrate von *Grsf1*-mRNA in diesem Organ [64].

In den anderen Geweben variierten die Gleichgewichtskonzentrationen der *Grsf1*-mRNA zwischen 500-5000 Kopien *Grsf1*-mRNA pro  $10^6$  Kopien *Gapdh*-mRNA. In Leber ( $5 \times 10^3$  *Grsf1*-mRNA Kopien pro  $10^6$  *Gapdh*-mRNA Kopien) und Niere ( $2,5 \times 10^3$  *Grsf1*-mRNA Kopien pro  $10^6$  *Gapdh*-mRNA Kopien) wurden dabei die höchsten *Grsf1*-mRNA Expressionsniveaus gemessen. Es zeigte sich, dass die *Grsf1*-mRNA Gleichgewichtskonzentrationen in der Skelettmuskulatur und im Herzen deutlich geringer waren. In diesen Organen wurden auf der Basis von Literaturangaben höhere Werte erwartet [87], konnten aber in unseren Untersuchungen nicht bestätigt werden. Unabhängig davon kann jedoch geschlussfolgert werden, dass die *Grsf1*-mRNA in den meisten somatischen Zellen auf relativ geringem Niveau vorhanden ist.



**Abbildung 26: Quantifizierung der *Grsf1* mRNA Konzentrationen in verschiedenen Organen von Wildtyp-Mäusen und *Grsf1*-Knockout-Mäusen.** A) Eine männliche Wildtyp-Maus (C57BL/6 background) wurde in Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet, die aufgeführten Organe wurden präpariert, Organstücke (ca. 50 mg) in RNALater eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Aus diesen Organstücken wurde anschließend Gesamt-RNA extrahiert und die Gleichgewichtskonzentrationen der *Grsf1*- und *Gapdh*-mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert (Material und Methoden). Jeder RNA-Extrakt wurde in zwei unabhängigen Analysen quantifiziert. B) Vier männliche und vier weibliche *Grsf1*-Knockout-Mäuse und eine entsprechende Anzahl von Wildtyp-Kontrolltieren beiderlei Geschlechts wurden in Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet, die Leber und die Nieren präpariert, Organstücke (ca. 50 mg) in RNALater eingefroren und bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert. Bei den männlichen Individuen wurden zusätzlich noch die Testis entnommen und ebenfalls in RNALater gelagert. Aus diesen Organstücken wurde anschließend Gesamt-RNA präpariert und die Gleichgewichtskonzentrationen der *Grsf1* und *Gapdh*-mRNA mittels qRT-PCR quantifiziert (Material und Methoden). Die Datenanalyse erfolgte durch die Berechnung der Mittelwerte  $\pm$  den jeweiligen Standardabweichungen. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test (siehe 4.2.7.2.). Leber und Niere  $n = 8$ ; Testis  $n = 4$ . Quelle: modifiziert nach Dumoulin BC et al., Cell Biosci 2022 [123]

Um den systemischen Knockout des *Grsf1*-Gens in den von uns gezüchteten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen nachzuweisen, wurde in zusätzlichen Experimenten die Expression der *Grsf1*-mRNA vergleichend in *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypkontrolltieren (C57BL/6J) im Testis, in der Leber und in der Niere untersucht (**Abbildung 26 B**). Dabei konnte die hohe Expressionsrate der *Grsf1*-mRNA im Testis von Wildtyp-Tieren bestätigt werden. Auch in Leber und Niere wurden ähnliche *Grsf1*-mRNA Konzentrationen wie im Organpanel (**Abbildung 26 A**) gefunden. Bei den *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnten jedoch keine spezifischen *Grsf1*-Signale in den drei untersuchten Organen gefunden werden. Diese Daten belegen, dass in den Organen, in denen bei Wildtyp-Mäusen die höchsten *Grsf1*-mRNA Konzentrationen nachweisbar waren, bei den *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen keine *Grsf1*-mRNA gefunden werden konnte.

**Zsf: Durch quantitative RT-PCR wurde die Expression von Grsf1 in verschiedenen Mausgeweben nachgewiesen, wobei die höchste Expression im Testis zu finden war. Bei *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse war keine *Grsf1*-mRNA in Testis, Leber und Niere nachweisbar.**

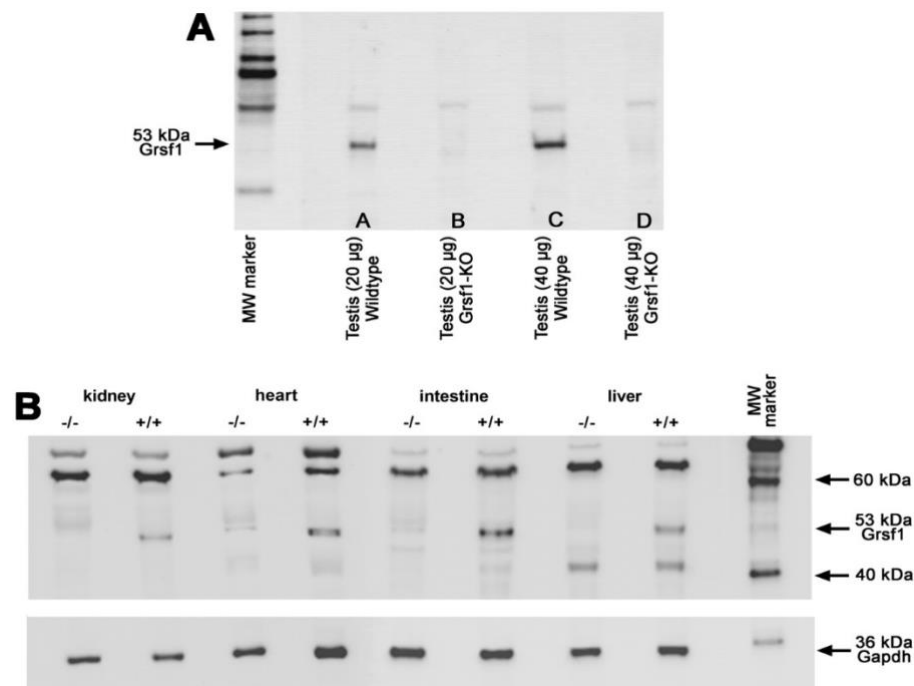
### **5.8.3. Expression des *Grsf1*-Proteins bei *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und bei Wildtyp-Kontrolltieren**

In weiterführenden Experimenten wurde überprüft, ob das *Grsf1*-Protein bei den *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen ähnlich wie die *Grsf1*-mRNA nicht exprimiert wird. Dazu wurde von den präparierten Gewebestücken, die bei der Tötung der Mäuse erhalten und schockgefroren wurden, zunächst ein Gewebshomogenate hergestellt. Nach der Zentrifugation der Homogenate wurden Aliquots der Homogenatlysate mittels SDS-PAGE analysiert, die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt und das *Grsf1*-Protein auf dem Blot mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers angefärbt.

Wie aus **Abbildung 27 A** ersichtlich ist, konnte bei Wildtypmäusen im Testis eine spezifisch angefärbte *Grsf1*-Proteinbande im erwarteten Molekulargewichtsbereich detektiert werden. Wurde das aufgetragene Probenvolumen verdoppelt, erhöhte sich die Intensität der spezifisch angefärbten Bande. Bei *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen konnte diese Bande erwartungsgemäß nicht nachgewiesen werden. Diese Daten belegen, dass die von uns hergestellten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse kein *Grsf1*-Protein im Testis exprimieren.

Entsprechend unserer Knockout-Strategie sollte das *Grsf1*-Protein nicht nur im

Testis, sondern auch in anderen Organen der *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse fehlen. Um diese Arbeitshypothese zu bestätigen, wurden auch von anderen Organen Gewebshomogenate hergestellt und mittels Western-Blot auf das Vorhandensein von Grsf1-Protein untersucht (**Abbildung 27 B**). Dabei konnte in allen Organen der Wildtypiere eine immunreaktive Proteinbande im Molekulargewichtsbereich von Grsf1 (53 kDa) nachgewiesen werden.



**Abbildung 27: Expression des Grsf1-Proteins in verschiedenen Organen von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren.** A) Eine zufällig ausgewählte männliche *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Maus und ein entsprechendes Wildtyp-Kontrolltier wurden in Isoflurannarkose durch zervikale Dislokation getötet, die Hoden entnommen und jeweils ein Gewebshomogenat hergestellt. Nach Zentrifugation wurden Aliquots des Homogenatüberstandes (20 µg bzw. 40 µg Gesamtprotein) auf eine SDS-PAGE aufgetragen. Die Proteinblots wurden anschließend mit einem Grsf1-spezifischen Antikörper (Abcam, Carlsbad, USA, AB205531) angefärbt. B) Von einer anderen zufällig ausgewählten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Maus (-/-) und einem Wildtyp-Kontrolltier (+/+) wurden Homogenate hergestellt und Aliquots der Lysatüberstände (40 µg Protein) wurden zur SDS-PAGE aufgetragen. Der Blot wurde mit einem Anti-Grsf1-Antikörper (HPA036985, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) angefärbt. Nach der Grsf1-Färbung wurde der Blot gestriipt und anschließend mit einem Anti-Gapdh-Antikörper (Invitrogen, Carlsbad, USA, MA5-15738) angefärbt (unteres Panel). Aus der Gapdh Färbung geht hervor, dass die Proteinbeladungen bei den Analysepaaren (+/+ vs. -/-) ähnlich waren. Quelle: Dumoulin BC et al., Cell Biosci 2022 [123].

Im Gegensatz dazu wurde bei der Analyse der Lastüberstände, die von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen hergestellt wurden, keine immunreaktiven Banden in diesem Größenbereich beobachtet. Neben der spezifischen Grsf1-Bande (53 kDa) wurden noch andere immunreaktive Baden in den verschiedenen Organen beobachtet. (40 kDa, >60 kDa). Da diese Bande sowohl bei *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen als auch bei Wildtyp-Kontrolltieren sichtbar waren, scheint es sich dabei nicht um Grsf1-Abkömmlinge, sondern um immunologisch kreuzreaktive Proteine zu handeln. Als Referenzprotein wurde das Gapdh-Protein

parallel quantifiziert. Da die Intensitäten der Gapdh-Banden bei *Grsf1*-Knockout-Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Kontrollen nahezu identisch waren, beweisen diese Daten, dass es sich bei den hergestellten Tieren um systemische *Grsf1*-Knockout-Mäuse handelt.

**Zsf: Durch Western-Blot Analysen konnte im Testis von Wildtypmäusen eine immunreaktive Grsf1-Bande im korrekten Molekulargewichtsbereich beobachtet werden. Diese Bande war bei *Grsf1*<sup>-/-</sup> nicht nachweisbar. Ähnliche Resultate wurden bei entsprechenden Analysen von Niere, Herz, Dünndarm und Leber erhalten.**

#### 5.8.4. Vermehrungsverhalten von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen

*Grsf1* ist für die Expression der Gpx4 bedeutsam [1]. Da dieses Enzym bei der Spermatogenese als wichtiges Strukturprotein fungiert [135], wäre es plausibel, wenn die Spermatogenese bei *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Tieren kompromittiert wäre. Beim Menschen konnte gezeigt werden, dass Mutationen im Gpx4-Gen zu einer Beeinträchtigung der männlichen Fertilität führen [136]. Um zu überprüfen, ob ein systemischer Knockout des *Grsf1*-Gens zu einem veränderten Fortpflanzungsverhalten der Tiere führt, wurden zunächst fünf Zuchtpaare bestehend aus einem *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Männchen und zwei *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Weibchen zusammengesetzt. Bei einem dieser Zuchtpaare konnten nach 1,5 Monaten keine Jungtiere erhalten werden und deshalb wurde dieser Zuchtkasten aufgelöst. Bei den anderen Zuchtpaaren kam es zu multiplen Schwangerschaften und für diese Zuchtpaare wurden folgende Fortpflanzungsparameter quantifiziert:

- I) Anzahl der Nachkommen pro Wurf (Wurfgröße),
- II) Anzahl der Würfe pro Weibchen und Monat (Wurffrequenz),
- III) Anzahl der Nachkommen pro Weibchen und Monat (Wurfeffizienz),
- IV) Geschlechterverhältnis der Nachkommen.

Die erhaltenen experimentellen Daten sind in **Tabelle 13** zusammengestellt. Leider wurden bei diesen Untersuchungen keine parallelen Experimente mit Wildtyp-Kontrolltieren durchgeführt, sodass ein direkter Vergleich zwischen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse und Wildtyp-Kontrollen nicht möglich ist. Wenn man jedoch Durchschnittswerte für C57BL/6J-Mäuse, die in unserer Tierhaltung erhoben wurden, zugrunde legt, scheinen die *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse ein subtil schlechteres Fortpflanzungsverhalten aufzuweisen.



Diese Schlussfolgerung beruht vor allem auf einer reduzierten Wurfrequenz (Anzahl an Würfen pro Weibchen und Monat) und auf einer ebenfalls reduzierten Wurf-effizienz (Anzahl an Nachkommen pro Weibchen und Monat), wobei die Wurfgrößen kaum beeinträchtigt waren. Diese Schlussfolgerungen müssen jedoch mit Vorsicht interpretiert werden, weil sie auf einer relativ kleinen Datenbasis (vier Zuchtpaare) beruhen und keine direkten Kontrolldaten erhoben wurden.

Parameter	Numerische Werte
Wurfgröße	5,3±3,2 (Anzahl der Nachkommen pro Wurf)
Wurf-frequenz	0,37±0,28 (Anzahl der Würfe pro Weibchen und Monat)
Wurf-effizienz	2,33±2,41 (Anzahl der Nachkommen pro Weibchen und Monat)
Sex-ratio	51,7 % (männlich) vs. 48,3 % (weiblich)

**Tabelle 13:** Fortpflanzungsparameter von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen. Fünf Zuchtpaare von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen (jeweils ein Männchen mit zwei Weibchen) wurden zusammengesetzt und die in der Tabelle beschriebenen Parameter wurde für jeden Zuchtkasten separat ermittelt. Da sich in einem der Zuchtkästen nach mehr als einem Monat keine Schwangerschaften einstellten, wurde dieser Zuchtkasten aufgelöst und nicht mit in die Auswertung einbezogen. Die in der Tabelle enthaltenen Daten stellen die Mittelwerte ± Standardabweichungen aller Zuchtkästen dar.

**Zsf: *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigen ein leicht reduziertes Fortpflanzungsverhalten, was durch eine geringere Wurf-frequenz und eine parallel reduzierte Wurf-effizienz zum Ausdruck kommt.**

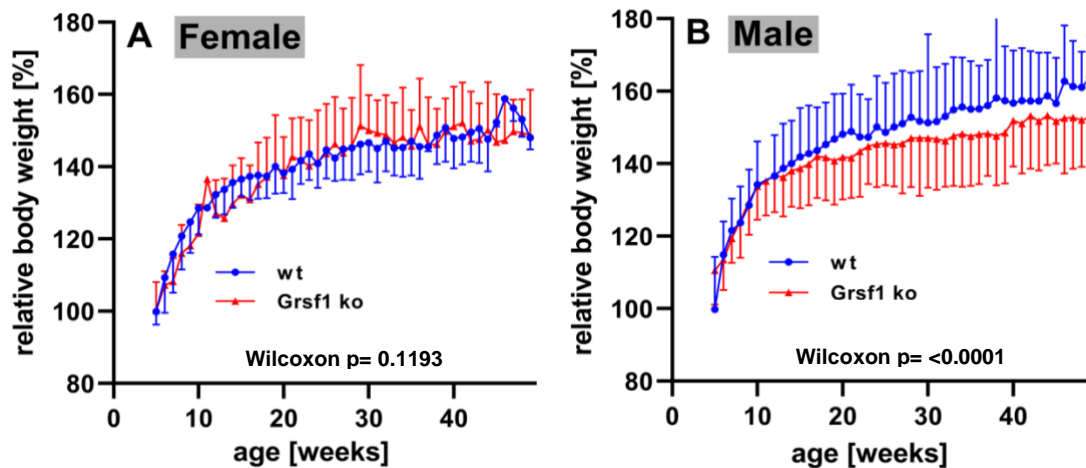
### 5.8.5. Körpergewichtskinetiken von *Grsf1*-Knockout-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren

Für *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, bei denen die Expression von *Grsf1* selektiv im Skelettmuskel inaktiviert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Tiere bei körperlicher Belastung eine schnellere Ermüdung zeigen [87]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass es im Laufe der Individualentwicklung zu Problemen im mitochondrialen Energiestoffwechsel in der Skelettmuskulatur kommt. Um zu überprüfen, ob sich der systemische *Grsf1*-Knockout auf die postnatale Entwicklung von Mäusen auswirkt, wurden 10 männliche und 10 weibliche *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse und eine gleiche Anzahl von Wildtyp-Kontrolltieren in separaten Käfigen gehalten. Einmal in der Woche wurde die Zunahme des Körpergewichts quantifiziert und die Körpergewichtskinetiken über einen Zeitraum von



45 Wochen aufgenommen. Die erhaltenen Körpergewichtskinetiken sind in **Abbildung 28** dargestellt.

Weibliche *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse zeigten eine ähnliche Körpergewichtsentwicklung wie die Wildtyp-Kontrollen (**Abbildung 28 A**). Das kann leicht daran erkannt werden, dass die Kurven für beide Genotypen praktisch übereinander liegen. Der statistische Vergleich (Wilcoxon-Test) ergab mit einem p-Wert von 0,1193 keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen.



**Abbildung 28: Wachstumskurven der *Grsf1*-defizienten Mäuse und der Kontrolltiere.** Gezeigt werden die Wachstumskurven der Wildtyp-Mäuse und der *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse. Es erfolgte die Datenanalyse mit Hilfe des Wilcoxon-Tests und GraphPad (Insight Partners, New York, USA) von insgesamt 10 männlichen und 10 weiblichen Tieren beider Gruppen (Wildtyp vs. *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse) (A) Bei den weiblichen Tieren lässt sich kein signifikanter Unterschied im Wachstum zwischen den beiden Genotypen feststellen. (B) Bei den männlichen Tieren ist der Kurvenverlauf bis zur ca. 12. Entwicklungswoche identisch. Erst danach lässt sich ein signifikanter Unterschied ausmachen. Die *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse zeigen eine Entwicklungsretardierung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren. Dieser Unterschied bleibt auch im Verlauf der weiteren Individualentwicklung bestehen und kann von den *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen nicht kompensiert werden. Quelle: modifiziert nach Dumoulin BC et al., Cell Biosci 2022 [123].

Bei den männlichen Individuen war die Situation jedoch anders. Im Laufe der frühen postnatalen Entwicklungsperiode (5. bis 12. Woche) lagen die Gewichtskinetikkurven übereinander und die statistische Auswertung (Wilcoxon-Test) dieses Zeitfensters ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Ab Woche 12 des experimentellen Protokolls wichen die Kurven jedoch deutlich voneinander ab, wobei die Kurve der gentechnisch veränderten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen konstant unter der Kurve der Wildtyp-Kontrollen lag. Die statistische Auswertung aller experimentellen Rohdaten mit Hilfe des Wilcoxon-Tests ergab für den gesamten Kurvenverlauf (5-50 Wochen) einen p-Wert von <0,0001. Diese Daten belegen, dass der systemische Knockout des *Grsf1*-Gens eine Verringerung der entwicklungsbedingten Körpergewichtszunahme induziert. Die ursprünglich aufgestellte

Null-Hypothese, dass es keinen Unterschied in der Gewichtsentwicklung zwischen den Wildtyp-Mäusen und *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen gibt muss damit abgelehnt werden. Da ein ähnlicher Unterschied zwischen den beiden Genotypen bei den weiblichen Tieren nicht beobachtet werden konnte, muss man davon ausgehen, dass dieser Effekt geschlechtsspezifisch ist. Leider konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden, worauf diese subtile Entwicklungsretardierung der männlichen Tiere zurückzuführen ist und was die Ursachen für die Geschlechtsspezifität sein könnten. Im Rahmen der Diskussion wird auf diesen Punkt noch näher eingegangen.

**Zsf: Verglichen mit Wildtyp-Mäusen nahmen männliche *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse signifikant weniger Körpergewicht während ihrer post-partalen Individualentwicklung zu. Dieser Effekt war bei weiblichen Individuen nicht nachweisbar.**

#### **5.8.6. Mobilität und Fellbeschaffenheit**

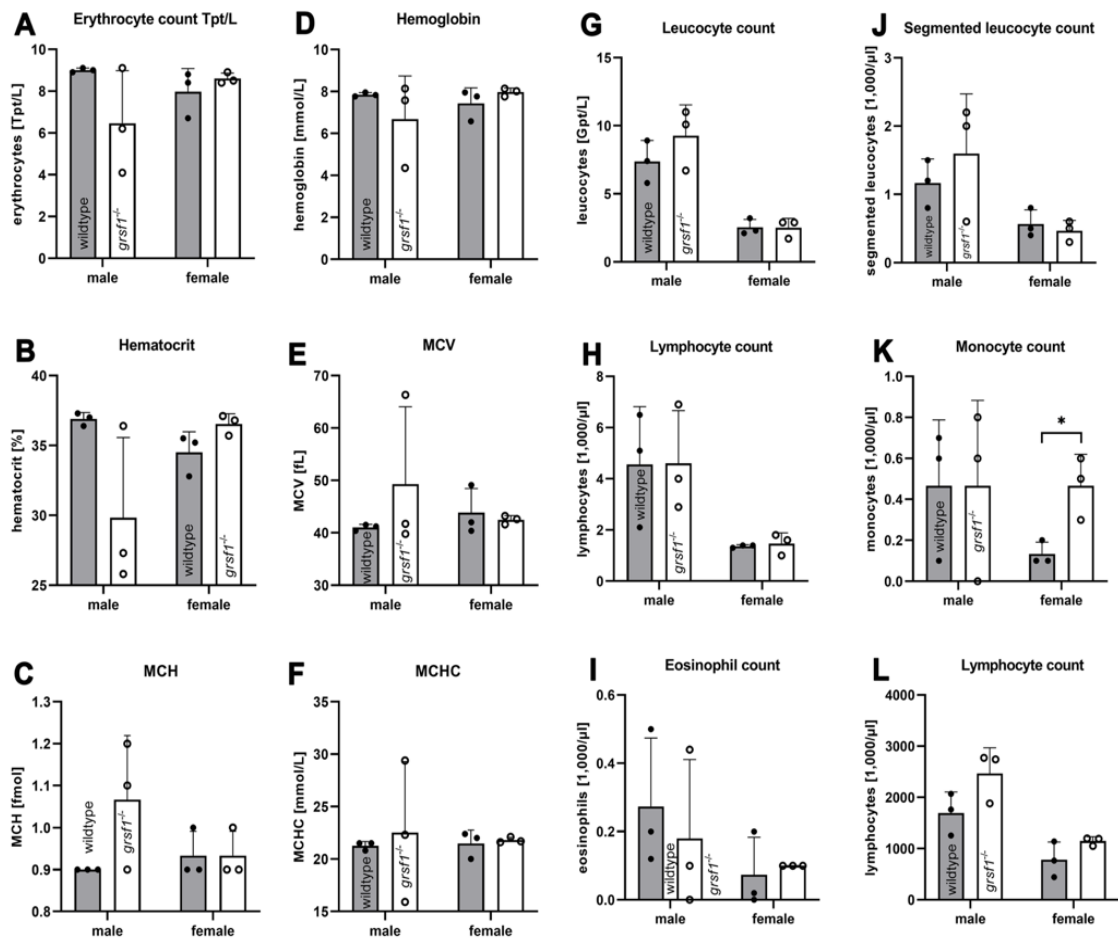
Mobilität und Fellbeschaffenheit sind klassische Parameter, an denen das Wohlbefinden von Mäusen abgelesen werden kann. Im Rahmen des unter 4.2.6.11. beschriebenen Alterungsversuchs wurde vergleichend auch die Mobilität von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und von Wildtypkontrollen eingeschätzt. Obwohl zu diesem Zweck keine quantitativen Messungen durchgeführt wurden, deuten unsere Beobachtungen darauf hin, dass zwischen den beiden Genotypen keine gravierenden Unterschiede bemerkt werden konnten. Ähnliches gilt auch für die Fellbeschaffenheit. Auch hier konnten keine sichtbaren Unterschiede zwischen *Grsf1*<sup>-/-</sup>- und Wildtyptieren beobachtet werden.

**Zsf: Zwischen *Grsf1*<sup>-/-</sup> Tieren und Wildtypkontrollen konnten keine Unterschiede in der Mobilität der Tiere und in deren Fellstruktur beobachtet werden.**

#### **5.8.7. Basale hämatologische Parameter von *Grsf1*-Knockout-Tieren und Wildtyp-Kontrolltieren**

Wie in **Abbildung 26** gezeigt werden konnte, wird *Grsf1* im Knochenmark auf niedrigem Niveau exprimiert und könnte damit eine Rolle bei der Hämatopoese spielen. Sollte dies der Fall sein, könnte ein systemischer Knockout des *Grsf1*-Gens zu einer

beeinträchtigt die Hämopoese führen, was wiederum eine mögliche Ursache für die Entwicklungsretardierung der männlichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse sein könnte.



**Abbildung 29: Basale hämopoetische Parameter von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtypkontrolltieren.** Analysiert wurden jeweils 3 Mäuse beider Varianten (Wildtyp-Mäuse vs. *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse) im Alter von 18-20 Monaten sowie beiderlei Geschlechts. Gezeigt sind die Mittelwerte der jeweiligen Altersgruppen nach Geschlecht getrennt sowie die jeweiligen Standardabweichungen. In den Diagrammen ist zu sehen, dass lediglich bei den Monozyten und auch nur bei den weiblichen Mäusen ein signifikanter Unterschied zwischen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen und Wildtypkontrolltieren besteht. Die Datenanalyse erfolgte mittels t-Test wie unter 4.2.7.1. beschrieben. So weisen die weiblichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse eine Monozytose auf, was bei den weiblichen Wildtyp-Tieren nicht beobachtet werden konnte. Quelle: modifiziert nach Dumoulin BC et al., Cell Biosci 2022 [123].

Um diese Arbeitshypothesen zu überprüfen, haben wir *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und entsprechenden Wildtyp-Kontrolltieren EDTA-Blut entnommen und basale hämatologische Parameter bestimmt. Bei der Auswahl der Tiere haben wir darauf geachtet, die Experimente an möglichst alten Tieren durchzuführen. Die Ursache dafür waren frühere Beobachtungen mit gentechnisch veränderten Mäusen, die darauf hindeuteten, dass phänotypische Konsequenzen einer Genmanipulation sich häufig erst im höheren Alter bemerkbar machen. Möglicherweise besitzen junge Mäuse eine höhere Kompensationsfähigkeit als ältere Tiere. Dadurch könnten phänotypische

Veränderungen bei der Untersuchung von jungen Mäusen übersehen werden. Die Ergebnisse dieser Analysen sind in **Abbildung 29** graphisch dargestellt.

Generell lässt sich aus diesen Daten schlussfolgern, dass (mit Ausnahme der Monozytenzahl bei weiblichen Tieren) bei beiden Geschlechtern keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen nachzuweisen waren. Alle Parameter des roten Blutbilds [Erythrozytenzahl (Ery), Hämoglobinkonzentration im Vollblut (Hb), Hämatokritwert (HK), mittleres zelluläres Erythrozytenvolumen (MCV), mittlere zelluläre Hämoglobingehalt (MHC), mittlere zelluläre Hämoglobinkonzentration (MCHC)] lagen bei allen Tieren im Normbereich und mittels des Mann-Whitney-U-Tests konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Genotypen nachgewiesen werden. Ähnliches gilt auch für die quantifizierten Parameter des Differentialblutbildes. Zwar wurden hier signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Individuen beobachtet, aber es ergaben sich keine Unterschiede zwischen den beiden Genotypen. Einschränkend muss dabei jedoch erwähnt werden, dass die interindividuellen Schwankungen relativ groß waren, sodass subtile Unterschiede zwischen den beiden Genotypen möglicherweise übersehen wurden.

Die einzige Ausnahme bildete dabei die Monozytenzahl weiblicher Individuen. Hier wurden bei *Grsf1*-Knockout-Mäusen signifikant höhere Werte gemessen als bei den Wildtyp-Kontrolltieren. Diese Daten deuten darauf hin, dass *Grsf1* möglicherweise als negativer Regulator der Monozytopoese fungiert. Wie diese Regulatorfunktion im Detail aussehen könnte, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

**Zsf: Zwischen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen und Wildtyp-Kontrolltieren zeigten sich unabhängig vom Geschlecht in den meisten der erhobenen Werte keine signifikanten Unterschiede. Lediglich die Monozytenzahl war bei weiblichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen signifikant höher als bei Wildtyptieren.**

## 6. Diskussion

### 6.1. Suche nach GRSF1-bindenden Proteinen im Hefe-Zwei-Hybrid-System

GRSF1 ist ein RNA-bindendes Protein [64] und derzeit sind mehrere RNA Substrate bekannt, an die GRSF1 mit hoher Affinität binden kann [56, 83]. Da viele RNA-bindende Proteine im Rahmen ihrer Funktion als Regulatoren der Translation Multiproteinkomplexe bilden, sollte auch GRSF1 zur Protein-Protein-Interaktion fähig sein. Zu Beginn meiner Arbeit lagen zu Proteinbindungspartnern von GRSF1 noch keine experimentellen Daten vor. Kürzlich wurde von einem Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe darüber berichtet, dass das Copper Metabolism Domain Containing Protein 1 (COMMD1) mit GRSF1 spezifisch wechselwirkt, wobei die nicht-kovalente Interaktion der beiden Proteine RNA-unabhängig ist [83].

Um weitere GRSF1 bindende Proteine zu identifizieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Hefe-2-Hybrid-Screen durchgeführt, wobei sieben neue potenziell GRSF1-bindende Proteine identifiziert werden konnten (**Tabelle 12**). Drei von diesen potenziell GRSF1-bindenden Proteinen wurden hinsichtlich ihrer Wechselwirkung mit GRSF1 näher charakterisiert. Das Hefe-2-Hybrid-System ist eine etablierte Standardmethode zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen. Es beruht darauf, dass Hefezellen mit zwei rekombinanten Plasmiden kotransformiert werden, die für zwei unabhängige Fusionsproteine (Hybride) kodieren. Dabei trägt das Köderplasmid die genetische Information für zwei Proteine, die als gemeinsames Fusionsprotein von den Hefezellen exprimiert werden sollen. In unserem Fall waren das GRSF1 und die GAL4-Bindungsdomäne des GAL4-Transkriptionsfaktors. Dieses Hybridprotein ist als Transkriptionsfaktor inaktiv, da ihm die GAL4-Aktivierungsdomäne fehlt. Das zweite Plasmid (Beuteplasmid) kodiert für viele Proteine, die neben der Aktivierungsdomäne von GAL4 alle Proteine enthalten, die von einer cDNA-Bibliothek kodiert werden, die aus beliebigen Zellen hergestellt werden kann. Für unsere Untersuchungen haben wir eine kommerziell erhältliche cDNA-Bibliothek verwendet, die aus humanem fetalem Gehirn hergestellt wurde [Clontech (heute Takara Bio), Kusatsu, USA]. Wenn das Beuteplasmid für ein GRSF1-bindendes Hybridprotein kodiert, sollte das Beutehybridprotein mit dem Köderhybridprotein interagieren und dadurch würden die DNA-Bindungsdomäne von GAL4 und dessen Aktivierungsdomäne zusammenkommen. Damit würde der komplette Transkriptionsfaktor GAL4 entstehen, sodass die Expression von Reportergenen aktiviert würde. Über die Messung

verschiedener Reportergenaktivitäten können Hefezellklone identifiziert werden, die das entsprechende Beutehybridprotein exprimieren.

Wie bei allen Siebtestmethoden ergeben sich auch beim Hefe-2-Hybrid-System eine große Anzahl falsch positiver Treffer. Um deren Anzahl zu verringern, wurden die isolierten Zellklone einer mehrstufigen Filterprozedur unterworfen. Nur Zellklone, die diesen Filterungsprozess überlebten, wurden für weitere Untersuchungen verwendet.

Hefen sind einzellige eukaryontische Organismen, die gut transformierbar sind. Sie lassen sich leicht züchten und sind anderen eukaryontischen Zellen metabolisch ähnlicher als den Prokaryonten. In Hefezellen laufen ähnliche post-translationale Modifizierungen ab, wie in Säugetierzellen, wobei es durchaus Unterschiede in der subzellulären Lokalisation der Modifizierungsprozesse gibt [132]. Durch das unterschiedliche Milieu in den verschiedenen Zellkompartimenten ist es möglich, dass sich rekombinante Proteine differentiell falten, in Abhängigkeit davon, ob sie in Hefezellen oder in Säugetierzelle exprimiert werden. Da die Protein-Protein-Interaktion von der 3D-Struktur der Proteine abhängt, ist es durchaus möglich, dass ein und dasselbe Protein in Hefezellen anders gefaltet wird als in Säugetierzellen. Dadurch können sowohl falsch positive als auch falsch negative Treffer im Hefe-2-Hybrid-Screen erhalten werden. Aus diesem Grund musste im Anschluss an den Hefe-2-Hybrid-Screen überprüft werden, ob die in diesem Siebtest identifizierten potenziellen GRSF1-bindenden Proteine auch in HEK293-Zellen miteinander interagieren. Da GRSF1 in HEK293-Zellen nur in geringen Mengen endogen synthetisiert wird, wurden die Zellen mit Expressionsplasmiden kotransfiziert, die einerseits für FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und andererseits für cMyc-markierte potenzielle GRSF1-Bindungsproteine kodieren. Wenn die Lyastüberstände der kotransfizierten Zellen mit einem Anti-FLAG<sup>®</sup>-tag Antikörper präzipitiert und die präzipitierten Proteine im Westernblot mit einem Anti-cMyc-Antikörper gefärbt wurden, konnte die Kopräzipitation der drei neuen GRSF1-bindenden Proteine nachgewiesen werden.

Die Interaktion der rekombinanten Fusionsproteine (z.B. FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 und cMyc-tag-SBP2) in HEK293-Zellen bedeute jedoch nicht automatisch, dass endogen synthetisiertes GRSF1 mit endogen synthetisiertem SBP2 interagiert. So könnten sich z.B. die endogen synthetisierten Proteine anders falten als die rekombinanten Fusionsproteine, was zu einer veränderten Protein-Protein-Wechselwirkung führen würde. Um dieses Problem zu lösen, müssten Zelllinien identifiziert werden, in denen GRSF1 und wenigstens eines der potenziellen GRSF1-Bindungsproteine konstitutiv auf

hohem Niveau exprimiert wird. Aus einer solchen Zelllinie ließe sich problemlos ein Lysatüberstand herstellen, der dann durch Koimmunopräzipitationsexperimente untersucht werden könnte. Für solche Experimente wären spezifische Antikörper nötig, die gegen die nativen Nicht-fusionsproteine (GRSF1 und SBP2) gerichtet sind. In Vorbereitung solcher Experimente haben wir einige der in unserem Labor vorhandenen permanenten Zelllinien mittels qRT-PCR untersucht, konnten aber keine geeignete Linie identifizieren, in der beide Proteine auf hohem Niveau exprimiert werden. Deshalb konnten im Rahmen dieser Arbeit keine weiterführenden Untersuchungen zu diesem Punkt durchgeführt werden.

## **6.2. Interaktion von GRSF1 mit GRSF1-bindenden Proteinen**

Die biologische Funktion von GRSF1 sind bislang nur unzureichend untersucht. Obwohl eine kürzlich erschienene Übersichtsarbeit [54], die derzeit existierenden Hypothesen zu den biologischen Funktionen von GRSF1 zusammengefasst hat, sind noch viele Fragen zur *in vivo* Relevanz der beschriebenen *in vitro* Effekte ungeklärt. Die Identifizierung von potenziellen GRSF1 Bindungspartnern liefert neue Ansatzpunkte für die Suchen nach weiteren biologischen Funktionen von GRSF1, denen in Zukunft nachgegangen werden könnten. In der vorliegenden Arbeit wurden drei potenzielle Bindungsproteine von GRSF1 identifiziert. Damit muss die biologische Rolle von GRSF1 im Kontext der Funktionen der neu identifizierten GRSF1-Bindungsproteine neu interpretiert werden.

### **6.2.1. Interaktion von GRSF1 mit SBP2**

Das Selenocystein insertion sequence (SECIS) binding protein 2 (SBP2) ist ein RNA-bindendes Protein mit hoch spezifischer biologischer Funktion. Es bindet mit hoher Affinität an die Selenozysteininsertionssequenz (SECIS), die bei Säugetieren in der 3'-untranslatierten Region von mRNAs lokalisiert ist, die für Selenozystein-haltige Proteine kodieren [88, 89]. Bindet SBP2 an SECIS-Motive dieser mRNA-Moleküle, wird das UGA Stopkodon, das bei den Selenoproteinen für den Einbau von Selenozystein in die wachsende Polypeptidkette verantwortlich ist, umkodiert [90]. Selenocystein ist eine nicht-kanonische proteinogene Aminosäure, die für die Funktion von Selenoproteinen unerlässlich ist [91].

Selenoproteine erfüllen im Säugetierorganismus vielfältige biologische Funktionen [137]. So gehören verschiedenen Isoformen der Glutathionperoxidasen (Gpx) zu den

Selenoproteinen (z.B. GPX1, GPX2, GPX3, GPX4, GPX6). Diese Enzyme sind an der Regulation des intrazellulären Redoxgleichgewichts beteiligt, da sie anorganische (z.B. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und organische (z.B. Lipidperoxide) Hydroperoxide zu den weniger reaktiven Hydroxyverbindungen reduzieren [138, 139]. Da der zelluläre Redoxstatus ein wesentliches Steuerungselement für die Expression redox-sensitiver Gene [140] ist, spielen die verschiedenen GPX-Isoformen eine wichtige Rolle bei der Regulation der Genexpression und können durch ihre katalytische Aktivität den funktionellen Phänotyp von Zellen beeinflussen. Wenn GRSF1 mit SBP2 interagiert, kann es den Umkodierungsprozess des UGA-Stoppkodons regulieren und damit die Expression katalytisch aktiver GPX-Isoformen beeinflussen. Dadurch würde GRSF1 indirekt an der Regulation des zellulären Redoxstatus teilnehmen und damit u.a. das Expressionsniveau redox-sensitiver Gene steuern. Für die GPX4 konnte in früheren Arbeiten gezeigt werden, dass GRSF1 die Expression des Enzyms über einen zusätzlichen, SBP2 unabhängigen Mechanismus beeinflusst [141]. GRSF1 bindet an die 5-untranslatierte Region der Gpx4-mRNA und beschleunigt dadurch die Bildung translationsaktiver Polysomen. Dadurch wird die Translation der GPX4 mRNA hochreguliert, sodass vermehrt katalytisch aktive GPX4 gebildet werden kann. Sollte die von uns beobachtete Bindung von rekombinantem, FLAG<sup>®</sup>-tag-GRSF1 and cMyc-tag-SBP2 auch für die endogen synthetisierten Nichtfusionsproteine zutreffen, würde GRSF1 die Expression der GPX4 in doppelter Weise beeinflussen:

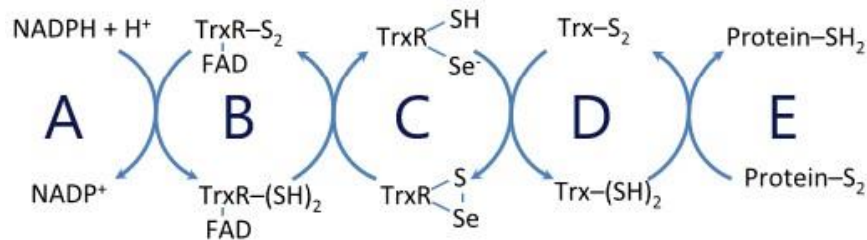
- I) Durch Bindung an die 5'-untranslatierte Region der Gpx4 mRNA und damit Beschleunigung ihrer Translation.
- II) Durch Bindung an SBP2 und damit Regulation des Rekodierungsprozesse des für den Einbau von Selenozystein verantwortlichen UGA-Stoppkodons.

Die Frage, ob die GRSF1-SBP2 Wechselwirkung den Rekodierungsprozess des UAG-Kodons hoch- oder runterreguliert, kann auf der Basis der derzeit vorhandenen experimentellen Daten nicht beantwortet werden.

Die Thioredoxinreduktasen 1-3 sind ebenfalls Selenoproteine [142]. Sie katalysieren die Reduktion von Thioredoxinen, die ähnlich wie die Glutathionperoxidasen (Gpx-Isoformen) eine wichtige Rolle bei der Regulation des intrazellulären Redoxstatus spielen [143]. Thioredoxine sind kleine redox-aktive Proteine, die in allen lebenden Organismen vorkommen [144]. Bei Mäusen führt ein Knockout der Thioredoxingene zum Absterben der Embryos während der frühen Embryogenese [144]. Die primäre Funktion von Thioredoxinen und damit auch der

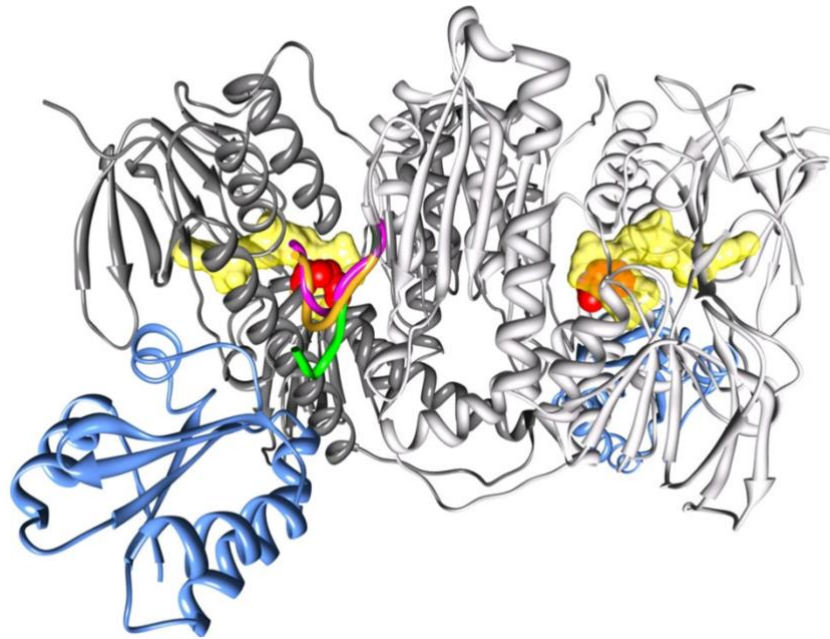


Thioredoxinreduktasen besteht darin, oxidierte Zysteinreste in Proteinen zu reduzieren und damit Disulfidbrücken aufzuspalten. Dabei werden die Thioredoxine oxidiert und müssen durch die Thioredoxinreduktasen rückreduziert werden. Die dafür nötigen Elektronen werden von NADPH zur Verfügung gestellt. In **Abbildung 30** sind die beschriebenen Redoxmechanismen schematisch dargestellt. Um Elektronen auf Thioredoxine übertragen zu können, muss die Thioredoxinreduktase Thioredoxine effektiv binden können [145].



**Abbildung 30: Reaktionsmechanismus von Thioredoxinreduktasen.** Der Reaktionsmechanismus beinhaltet mehrere hintereinander geschaltete Elektronenübergänge (A-E). Reduziertes NADPH<sub>2</sub> (NADPH+H<sup>+</sup>), das hauptsächlich im oxidativen Pentosephosphatweg aus NADP reduziert wird, gibt Elektronen ab, die von der oxidierten Thioredoxinreduktase (TrxR-S<sub>2</sub>) aufgenommen werden (A-zu-B-Übergang). Dabei wird im Enzymprotein eine Disulfidbrücke reduziert, sodass die reduzierte TrxR [TrxR-(SH)<sub>2</sub>] entsteht (B). Danach werden die Elektronen innerhalb der TrxR umgelagert (B-zu-C-Übergang), wobei das gemischte Selendisulfid im Selenozysteincluster des Enzyms reduziert wird, sodass eine SH-Gruppe und ein dissoziiertes Selenol entsteht (C). Im weiteren Verlauf der Reaktion werden die Elektronen dann auf oxidiertes Thioredoxin (Trx-S<sub>2</sub>) übertragen (C-zu-D-Übergang). Dabei wird der Selenolcluster des Enzyms wieder zum gemischten Selendisulfid oxidiert (C), wobei reduziertes Thioredoxin [Trx-(SH)<sub>2</sub>] entsteht (D). Das reduzierte Thioredoxin kann dann die aus dem NADPH<sub>2</sub> stammenden Elektronen dazu nutzen, Disulfidbrücken innerhalb eines Substratproteins zu reduzieren (D-zu-E-Übergang). Quelle: modifiziert nach Holmgren A. et al., Biochemical and Biophysical Research Communications 2010 [145]

In **Abbildung 31** ist die Kristallstruktur für den Thioredoxinreduktase-Thioredoxin-Komplex dargestellt. Da die Thioredoxinreduktasen essentiell für das irdische Leben zu sein scheinen, kommt einer möglichen Interaktion von GRSF1 und diesen Enzymen eine besondere Bedeutung zu. GRSF1 wird zwar ebenso wie die Thioredoxinreduktasen in fast allen Zellen höherer Säugetiere exprimiert, das *GRSF1*-Gen kommt jedoch bei primitiven Lebensformen nicht vor [54]. Weiterhin sind *Grsf1*-Knockout-Mäuse durchaus lebensfähig (siehe 4.2.6.). Aus diesen Daten kann geschlossen werden, dass unabhängig davon, ob GRSF1 exprimiert wird oder nicht, die Thioredoxinreduktasen in katalytisch aktiver Form exprimiert werden. Welche Rolle genau GRSF1 für die Funktionalität der Thioredoxinreduktasen spielt, muss in weiterführenden Untersuchungen erforscht werden.



**Abbildung 31: Kristallstruktur des Thioredoxinreduktase-Thioredoxin-Komplexes.** Die Thioredoxinreduktase (grau), das Thioredoxin-1 (blau), das gebundene FAD (gelb) und das N-terminale Redoxzentrum (rot) sind dargestellt. Der verschiedenen Konformationen des C-terminalen Anteils des Enzyms sind farblich markiert. I) Magenta: Struktur des C-terminalen Peptids in der oxidierten Form des Enzyms, II) Orange: Struktur des C-terminalen Peptids in der reduzierten Form des Enzyms, III) Grün: Struktur des C-terminalen Peptids im TrxR-Trx1 Komplex. Quelle: modifiziert nach K. Fritz-Wolf, Nat. Commun. 2011 [146]

Weitere Selenoproteine, für deren Expression und zelluläre Aktivität die GRSF1-SBP-Interaktion bedeutsam sein könnte, sind die Thyroxindeiodinasen 1-3. Diese Enzyme sind zum einen dafür verantwortlich, dass das in der Schilddrüse synthetisierte Tetrajodthyronin (T4) zu seiner Wirkform Trijodthyronin (T3) dejodiert wird [147]. Zum anderen tragen sie auch durch Dejodierung von T3 dazu bei, dass die Wirkung der Schilddrüsenhormone aufgehoben wird. Bei Problemen, die mit einer verminderten Expression bzw. einem kompromittierten Einbau von Selenozystein in die Thyroxindeiodinasen einher gehen, sollten sich Symptome einer peripheren Hypothyreose entwickeln, wobei die TSH-Spiegel im Blut aufgrund der normalen oder leicht erhöhten T4 Konzentrationen kaum verändert sein sollten. Im Umkehrschluss würde das bedeuten, dass bei Patienten, die Symptome einer peripheren Hypothyreose zeigen, die intrazellulären GRSF1-Konzentrationen verringert sein könnten. Solche Veränderungen ließen sich an Biopsiematerialien mittel qRT-PCR relativ einfach nachweisen.

## 6.2.2. Interaktion von GRSF1 mit TTC7B

Sowohl GRSF1 als auch TTC7B werden im Gehirn exprimiert. GRSF1 scheint bei der embryonalen Hirnentwicklung eine Rolle zu spielen [64]. TTC7B scheint vor allem in den Hirngefäßen hoch exprimiert zu werden [98], wobei die biologische Rolle des Proteins im Gefäßsystem noch nicht näher untersucht wurde. Des Weiteren ist derzeit unklar, ob die GRSF1 exprimierenden Zellen im ZNS auch TTC7B exprimieren und ob die biologische Rolle von GRSF1 bei der Hirnentwicklung von der Expression von TTC7B abhängt.

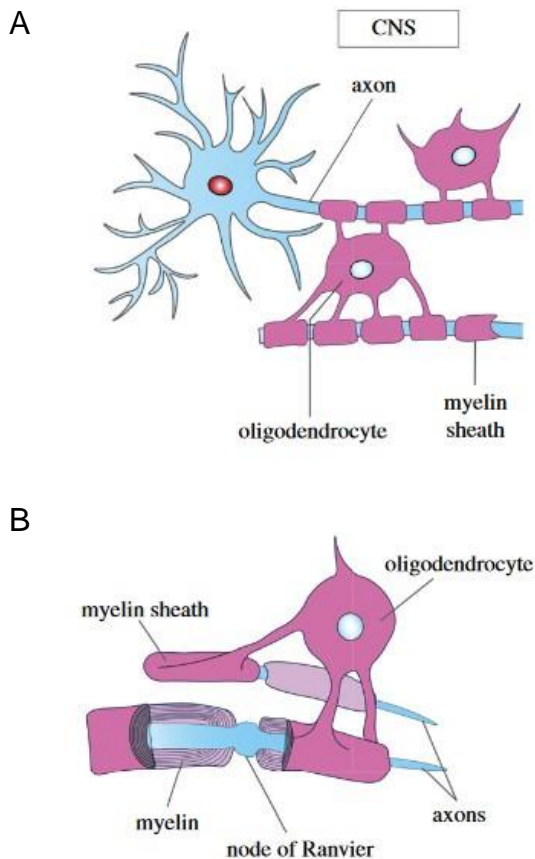
Als Vertreter der TPR-Familie ist TTC7B auch an der Proteinfaltung beteiligt [103]. Für GRSF1 ist bislang eine solche Chaperonwirkung nicht beschrieben. Trotzdem wäre es denkbar, dass GRSF1 zur Chaperonwirkung von TTC7B beitragen könnte, wenn beide Proteine in einer Zelle koexprimiert würden. Leider gibt es zu dieser Frage bisher noch keine soliden experimentellen Daten.

Weiterhin ist TTC7B an der Regulation der Transkription und der mRNA Prozessierung beteiligt [99]. Um diese Funktionen erfüllen zu können, muss TTC7B mit mRNAs wechselwirken. Auch GRSF1 bindet an spezifische mRNA Spezies [1]. Es wurde bisher jedoch noch nicht untersucht, ob z.B. für die intrazelluläre Wechselwirkung von GRSF1 mit der Gpx4 mRNA [1] TTC7B nötig ist. Ähnliches gilt auch für andere mRNAs, an die GRSF1 mit hoher Affinität zu binden scheint. Umgekehrt wurde bislang ebenfalls nicht untersucht, ob für die Rolle von TTC7B bei der intrazellulären mRNA Prozessierung [99] GRSF1 gebraucht wird.

Das TTC7B Protein ist Bestandteil des TTC7B-Hyccin Komplexes, der aus einem TTC7B Dimer und dem Hyccin-Protein besteht (**Abbildung 07**). In diesem Multiproteinkomplex geht TTC7B direkte Wechselwirkungen mit anderen Proteinen ein [103], wobei bisher noch nicht untersucht wurde, ob GRSF1 eines dieser Proteine ist. Da TTC7B bei der Entwicklung der Flügel bei der Taufliege (*D. melanogaster*) bedeutsam zu sein scheint [107], sollte auch hier untersucht werden, ob das nicht auch für GRSF1 zutrifft.

Funktionell spielt der TTC7B-Hyccin-Komplex bei der Myelinisierung von Nervenfasern im zentralen Nervensystem eine wichtige Rolle, wobei die molekularen Mechanismen dieser Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnten. Für die Myelinisierung im ZNS sind die Oligodendrozyten zuständig. Jeder Oligodendrozyt bildet mehrere Fortsätze, welche simultan mehrere benachbarte Axonen umwickeln. Die

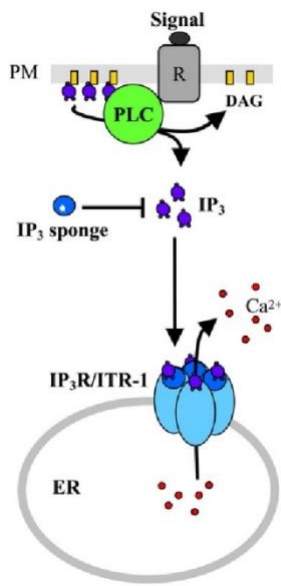
Membranschichten, die beim spiralförmigen Umschlingen eines Axonenabschnitts aufeinander zu liegen kommen, myelinisieren den Abschnitt eines Axons zwischen zwei benachbarten Ranvier' Schnürringen. Im Bereich der Schnürringe fehlt den Axonen die Myelinscheide, sodass sich die Fortsätze der Astrozyten zwischen die Fortsätze der Oligodendrozyten schieben können [148].



**Abbildung 32: Schematische Darstellung der Axonmyelinisierung im zentralen Nervensystem.** A) In der Umgebung von Axonen bilden die Oligodendrozyten mehrere Zytoplasma-ausläufer um ein Axon herum. Ein Oligodendrozyt kann Makrscheiden für mehrere Axone ausbilden. B) Die Ausläufer des Zytoplasmas legen sich spiralförmig um das Axon. Unterbrochen wird diese Ummantelung durch den Ranvierschen Schnürring, welcher dem Axonpotential ermöglicht schneller weitergeleitet werden zu können. Quelle: modifiziert nach Chen CZ et al., Open Biol. 2021. [148].

Bislang wurde jedoch noch nicht untersucht, ob GRSF1 ebenfalls für die Nervenfasermyleinisierung benötigt wird und ob es dabei mit TTC7B interagiert. Frühere Untersuchungen zur *in vitro* Reifung von Mausembryonen von haben gezeigt, dass GRSF1 für die embryonale Hirnentwicklung bedeutsam ist [1]. Ob diese Rolle auf eine Beteiligung von GRSF1 bei der Nervenfasermyleinisierung zurückzuführen ist, wurde bislang noch nicht erforscht.

Wie unter 2.3.2. beschrieben, spielt TTC7 auch bei der intrazellulären Signalwandlung eine wichtige Rolle. Das Protein ist Bestandteil eines Multiproteinkomplexes, welcher die Konzentration von Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P) in der Membran des Golgi-Apparates reguliert [103]. PI4P ist ein Prekursor des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), das eine entscheidende Rolle im Rahmen des IP3 Signaling spielt (**Abbildung 33**).

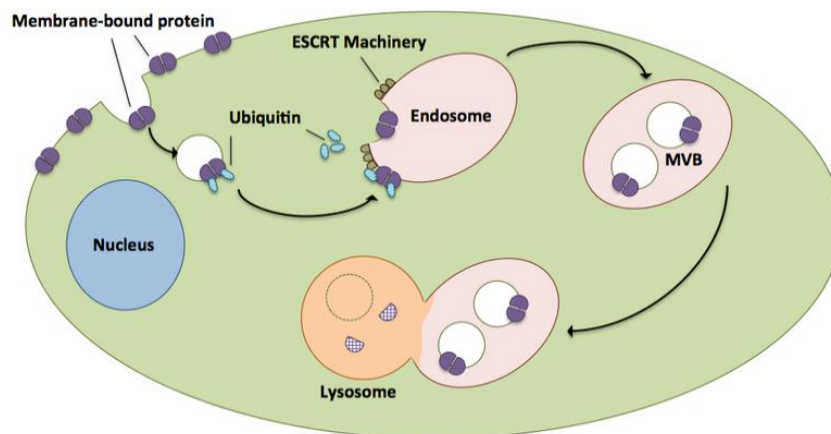


**Abbildung 33: Rolle des Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP2) bei der intrazellulären Signaltransduktion.** Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP2) wird durch Umwandlung durch die Phospholipase C zu Inositol-3-phosphat (IP3) und Diacylglycerol gespalten. Die Freisetzung des IP3 führt zu einer Aktivierung von Kalziumkanälen in der Membran des endoplasmatischen Retikulums mit dem Ergebnis einer Erhöhung der zytosolischen Kalziumkonzentration. Quelle: modifiziert nach Walker D et al., PLoS Genetics 2009 [149].

Phosphatidylinositol-4-phosphat (PI4P), das unter Mitwirkung von TTC7B aus Phosphatidylinositol (PI) hergestellt wird, kann durch weitere Phosphorylierung zu Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphats (PIP2) umgewandelt werden. Dieses Membranlipid wird dann durch eine Phospholipase C zu Inositol-3-phosphat (IP3) und Diacylglycerol (DAG) gespalten. IP3 wird aus der Membran freigesetzt und aktiviert IP3-sensitive Kalziumkanäle in der Membran des endoplasmatischen Retikulums und erhöht damit die zytosolische Kalziumkonzentration [149]. DAG verbleibt in der Zellmembran und aktiviert die Proteinkinase C. Dieses Enzym katalysiert in ATP-abhängigen Reaktionen die Phosphorylierung einer Reihe von Enzymen, die dadurch ihren Aktivitätszustand verändern (Interkonversion). Die so veränderten Enzyme regulieren den Energiestoffwechsel der Zielzellen und bedingen gemeinsam mit den erhöhten zytosolischen Kalziumkonzentrationen eine Veränderung des funktionellen Phänotyps der Zielzellen. Die Erhöhung der zytosolischen  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist darauf zurückzuführen, dass das bei der Phospholipase C Reaktion freigesetzte IP3 einen Liganden-gesteuerten Ca-Kanal in der Membran des endoplasmatischen Retikulums (ER) öffnet, sodass im ER gespeichertes  $\text{Ca}^{2+}$  ins Zytosol austreten kann. Da die Konzentration von Kalzium im Lumen des endoplasmatischen Retikulums deutlich höher ist als im Zytosol ruhender Zellen, erfordert der Austritt der  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen keine zusätzliche Energie in Form von ATP.

### 6.2.3. Interaktion von GRSF1 mit SNF8

Ähnlich wie GRSF1 ist SNF8 ein intrazelluläres Protein, das in vielen Zellen weit verbreitet vorkommt. Das SNF8 Protein ist Teil des endosomalen Sortierkomplex ESCRT und ist damit für intrazelluläre Transportmechanismen von Bedeutung [150, 151]. Funktionslose Proteine, die für den intrazellulären Proteinabbau markiert wurden, werden in Endosomen verpackt, damit diese mit Lysosomen verschmelzen können. Nach dem Verschmelzungsprozess können die lysosomalen Proteasen die Ubiquitin-markierten Abfallproteine proteolytisch abbauen, wobei die dabei freiwerdenden Aminosäuren wiederverwertet werden können. Das gilt auch für dysfunktionale Membranproteine, die über den lysosomalen Weg der intrazellulären Proteolyse abgebaut werden (**Abbildung 34**). Ohne einen funktionierenden ESCRT Komplex ist die Endosomenbildung kompromittiert, was zu einer Ansammlung dysfunktionaler Proteine im Zytoplasma führt.



**Abbildung 34: Abbau dysfunktionaler Membranproteine über den ESCRT-Weg.** Dysfunktionale Membranproteine werden zusammen mit umgebenden Anteilen der Plasmamembran internalisiert und funktionseingeschränkte Proteine mit Ubiquitin beladen. Diese mit ubiquitinierten Proteinen gefüllten intrazellulären Vesikel verschmelzen dann mit der Membran von Endosomen und dabei spielt der ESCRT-Komplex eine entscheidende Rolle. Die dadurch entstehenden multivesikulären bodies (MVB) verschmelzen anschließend mit Lysosomen, sodass die dysfunktionalen Proteine abgebaut werden können. Quelle: modifiziert nach Schmidt et al., Curr Biol. 2012 [150]

So kommt es z.B. bei Abnormalitäten im ESCRT-Komplex zur hereditären Form der spastischen Paraplegie, bei der eine exzessive intrazelluläre Ablagerung dysfunktionaler Proteine zu einer Störung der Neuronenfunktion führt [152]. Der ESCRT-Komplex spielt auch bei der Zellteilung eine wichtige Rolle [153]. Gegen Ende der Zellteilung werden die beiden Tochterzellen noch von einer gemeinsamen Zellmembran umgeben. Den Prozess der endgültigen Teilung der beiden Tochterzellen



nennt man „cellular abscission“ und dabei spielt der ESCRT-Komplex ebenfalls eine wichtige Rolle. [111] Bei Störungen der Bildung dieses Komplexes kommt es nicht zur endgültigen Teilung der Mutterzelle. Dadurch entstehen mehrkernige Riesenzellen, die einen hohen DNA-Gehalt aufweisen. Diese Zellen werden normalerweise durch Apoptose abgebaut. Eine dritte Funktion des ESCRT-Komplexes besteht darin, dass der Komplex von Viren benutzt wird, wenn diese nach erfolgreicher Vermehrung die Zelle verlassen wollen (viral budding). Bei Störungen des ESCRT können die neu synthetisierten Viren die Zelle nicht verlassen, was die Infektion benachbarter Zellen verhindert [150]. Damit stellt der ESCRT einen potenziellen Ansatzpunkt für die Entwicklung anti-viraler Medikamente dar.

### **6.3. *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse**

#### **6.3.1. Züchtung von Knockout-Mäusen mit systemisch inaktiviertem *Grsf1*-Gen**

Zu Beginn meiner experimentellen Arbeiten waren *Grsf1*-Knockout-Mäuse noch nicht verfügbar. Dadurch war es bis vor kurzem noch nicht möglich, die beschriebenen biologischen Funktionen von *Grsf1*, die vor allem bei *in vitro* Experimenten in zellulären Systemen untersucht worden waren, darauf hinzutesten, ob die beschriebenen Effekte auch *in vivo* bestätigt werden können. Erst Mitte 2021 wurden erstmals Untersuchungen mit *Grsf1*-Knockout-Mäusen publiziert, bei denen das *Grsf1*-Gen spezifisch in Skelettmuskelzellen inaktiviert wurde [87]. Diese Mäuse entwickelten sich normal bis zu einem Alter von 9 Monaten. Im höheren Alter zeigten sie jedoch eine verminderte Ausdauerleistung der Skelettmuskulatur. Außerdem wurde bei Untersuchungen des Muskeltranskriptoms eine Erhöhung der Expression verschiedener mitochondrialer Proteine, pro-inflammatorischer Faktoren und verschiedener Ionentransporter beobachtet [87].

Wir haben bei vergleichenden Expressionsuntersuchungen in verschiedenen Zellen und Geweben normaler Mäuse beobachtet, dass die *Grsf1*-mRNA in allen untersuchten Organen nachgewiesen werden konnte (**Abbildung 26**). Das mit Abstand höchste Expressionsniveau dieser mRNA konnte im Testis beobachtet werden. Unsere Daten bedeuten jedoch nicht, dass *Grsf1* in der Skelettmuskulatur nicht exprimiert wird. In der Tat konnten wir niedrige Konzentrationen der *Grsf1*-mRNA auch im Skelettmuskel nachweisen. Andererseits ist nach unseren Daten das Expressionsniveau der *Grsf1*-mRNA im Testis mehr als 10-fach höher als in der Skelettmuskulatur. Diese Daten

stehen im Einklang mit früheren Experimenten, in denen ein hohes Expressionsniveau der *Grsf1*-mRNA im Testis nachgewiesen wurde [64]. Da die *Grsf1*-mRNA entsprechend unserer Daten (**Abbildung 26**) in vielen Organen und Geweben der Maus nachgewiesen wurde, haben wir uns dazu entschlossen, *Grsf1*-Knockout-Mäuse herzustellen, bei denen das Gen in allen Zellen und Geweben funktionell inaktiviert wurde. Zu diesem Zweck haben wir die von uns generierten geflochtenen *Grsf1*-Knockout-Mäuse mit Cre-LOX-Mäusen verpaart, bei denen die Expression der Cre-Rekombinase unter Verwendung des CMV-Promotors in allen Zellen und Geweben exprimiert wird. Dadurch wurde das *Grsf1*-Gen in allen Zellen so verändert, dass die Exons 4 und 5 nicht mehr Bestandteil des Gens waren. Außerdem kam es bei dieser genetischen Manipulation dazu, dass der offene Leseraster verschoben wurde und dass ein vorzeitiges Stopkodon eingebaut wurde. Dadurch entstand eine *Grsf1*-mRNA, die für die Bildung eines unvollständigen Proteins kodiert. Solche mRNAs werden über den Weg des nonsense mediated decay (NMD) schnell abgebaut [154-156]. Befindet sich ein vorzeitiges Stopkodon im offenen Leseraster einer mRNA, kommt die Translation schon an dieser Stelle zum Stillstand. Wie beim normalen Stopkodon werden auch beim Erreichen der Ribosomen von vorzeitigen Stopkodon Terminationfaktoren aktiviert. Bei vorzeitigen Stopkodon befindet sich in der Regel downstream dieses Kodons noch mindestens eine Exon-Intron-Grenze an der sich ein Exon-junction Komplex bildet. Dieser Exon-junction Komplex interagiert mit den am vorzeitigen Stopkodon gebundenen Terminationfaktoren [157]. Diese Interaktion hat zur Folge, dass Decapping-Enzyme aktiviert werden, welche die Cap-Struktur vom 5'-Ende der mRNA entfernen. Dadurch kann die mRNA durch 5'-Endonukleasen, vor allem durch die Exoribonuklease XNR1, sehr schnell abgebaut werden. Aufgrund dessen können sich die trunkierten mRNAs im Zytosol nicht anreichern, sodass sie auch nicht translatiert werden können. Daraus folgt eine systemische funktionelle Inaktivierung des *Grsf1*-Gens.

Die basale funktionelle Charakterisierung unserer *Grsf1*-Knockout-Mäuse ergab, dass die Mäuse keine gravierenden Auffälligkeiten im Rahmen der Embryonalentwicklung zeigten. Diese Daten waren insofern überraschend, da frühere Untersuchungen zur Rolle der Gpx4 bei der Embryonalentwicklung ergeben hatten, dass ein Expressionssilencing des Enzyms mittels RNAi Technologie die normale embryonale Hirnentwicklung beeinträchtigte [1]. Außerdem starben *Gpx4*<sup>-/-</sup>-Mäuse bereits während der frühen Embryonalentwicklung [156, 158]. Ein konditionaler



Knockout des *Gpx4*-Gens bei erwachsenen Mäusen induzierte ebenfalls neurologische Fehlfunktionen und einen baldigen Tod der gentechnisch veränderten Tiere [159]. Da *Grsf1* in früheren Studien als Regulator der Translation der *Gpx4* mRNA identifiziert wurde [1], war es wahrscheinlich, dass der systemische Knockout der *Grsf1*-Expression ebenfalls zu einer gestörten Hirnentwicklung führen sollte [1]. Dies war jedoch nicht der Fall. Auf der Basis dieser Daten muss davon ausgegangen werden, dass die Expression der *Gpx4* auch in Abwesenheit von *Grsf1* normal funktioniert.

Die *Gpx4* spielt auch bei der Hämatopoese eine wesentliche Rolle. *Grsf1*-Knockout-Mäuse, bei denen die Expression des Enzyms in hämatopoetischen Zellen ausgeschaltet wurde, entwickelten einen defekten hämatopoetischen Phänotyp [160]. Die vergleichende Messung der basalen hämatologischen Parameter unserer *Grsf1*-Knockout-Mäuse und von Wildtyp-Kontrolltieren ergab mit Ausnahme der Monozytenzahl bei weiblichen Individuen keine signifikanten Differenzen zwischen den beiden Genotypen. Auch hier konnte auf der Basis der in der Vergangenheit publizierten Daten vermutet werden, dass ein systemischer Knockout der *Grsf1*-Expression zu einem kompromittierten hämatopoetischen System führt. Auch diese Annahme konnte durch unsere *in vivo* Knockout Experimente nicht bestätigt werden.

Frühere Untersuchungen zur biologischen Rolle von GRSF1 haben ergeben, dass dieses Protein bei der Infektion eukaryontischer Zellen durch das Influenzavirus bedeutsam sein könnte [80, 158]. Dabei konnte in zellulären Systemen gezeigt werden, dass GRSF1 an die 5'-untranslatierte Region viraler mRNAs bindet und die Bildung translationsaktiver Polysomen beschleunigt. Dabei scheint die qRRM2-Domäne von GRSF1 besondere Bedeutung zu besitzen. Diese Daten deuten darauf hin, dass das Influenzavirus endogen synthetisiertes GRSF1 dazu „missbraucht“, virale mRNA bevorzugt von infizierten Zellen translatieren zu lassen. Sollten diese Mechanismen auch *in vivo* greifen, müssten die von uns hergestellten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse gegen eine Influenzainfektion geschützt sein. Leider können entsprechende *in vivo* Experimente aus Gründen des Infektionsschutzes nicht in unserem Labor durchgeführt werden. Die systemischen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse sind jedoch vorhanden und stehen interessierten KollegInnen im Rahmen einer Wissenschaftskooperation jederzeit zur Verfügung, um diese und andere vermuteten biologischen Funktionen von *Grsf1* *in vivo* zu untersuchen.

Neben dem Influenza A Virus wäre es auch denkbar, dass andere Viren in Verbindung zu GRSF1 stehen und deren Pathomechanismus von GRSF1 beeinflusst

ist. Aus aktuellem Anlass wären hier auch Untersuchungen hinsichtlich des Coronavirus SARS-CoV-2 denkbar.

### **6.3.2. Fehlen ausgekreuzter Wildtyp-Kontrollmäuse**

Die von uns gezüchteten *Grsf1*-Knockout-Mäuse zeigten im Rahmen ihrer postpartalen Entwicklung zwei Auffälligkeiten:

- I) Männliche *Grsf1*-Knockout-Mäuse nahmen in ihrer Individualentwicklung signifikant weniger Körpergewicht zu als Wildtyp-Mäuse und dieser Effekt war bei weiblichen Individuen nicht messbar (siehe 5.8.5.).
- II) Das Fortpflanzungsverhalten von *Grsf1*-Knockout-Mäusen scheint subtil kompromittiert zu sein (siehe 5.8.4.).

Leider wurden bei diesen vergleichenden Experimenten, normale C57BL/6J-Mäuse und keine ausgekreuzten Wildtyp-Mäuse als Kontrolltiere verwendet. Diese Strategie lässt die Möglichkeit offen, dass Unterschiede im genetischen Background verantwortlich für die beobachteten Fehlfunktionen sein könnten. Für die unterschiedlichen Körpergewichtskinetiken sollte das jedoch nicht zutreffen, da weibliche *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse, die in diesem Fall als interne Kontrollgruppe fungieren, diesen Effekt nicht zeigten.

### **6.3.3. Subtil kompromittiertes Vermehrungsverhalten**

Das Fortpflanzungsverhalten von *Grsf1*-Knockout-Mäusen kann derzeit noch nicht abschließend eingeschätzt werden. Zwar deuten einige der von uns erhobenen Fortpflanzungsparameter darauf hin, dass diese Mäuse ein eingeschränktes Fortpflanzungsverhalten zeigen (siehe 4.2.6.2.), aber diese Beobachtung könnte in der Tat auf Unterschiede im genetischen Background zurückzuführen sein. Weiterhin basieren unsere Schlussfolgerungen lediglich auf Daten von 4 Zuchtkäfigen und deshalb müssen die gezogenen Schlussfolgerungen zum jetzigen Zeitpunkt als vorläufig eingeschätzt werden.

Um diesen Punkt in der Zukunft näher zu untersuchen, sollten heterozygote *Grsf1*<sup>+/-</sup>-Knockout-Mäuse neu miteinander verpaart und einerseits männliche und weibliche Wurfgeschwister homozygoter ausgekreuzter Wildtypmäuse isoliert werden. Die Wurfgeschwister (*Grsf1*<sup>-/-</sup> und *Grsf1*<sup>+/+</sup>) müssten in einer zweiten Zuchtrunde miteinander verpaart und die beschriebenen Fortpflanzungsparameter bestimmt werden. Dabei sollten die Daten von mindestens zehn Zuchtpaaren vergleichend erhoben werden. Sollte sich bei diesen Experimenten tatsächlich ein kompromittiertes

Fortpflanzungsverhalten der *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse ergeben, müsste überprüft werden, ob das auf eine Beeinträchtigung der männlichen oder der weiblichen Fertilität zurückzuführen ist. Dazu müssten Kreuzungsexperimente mit männlichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen und weibliche Wildtypmäuse bzw. männlichen Wildtypmäusen und weiblichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen durchgeführt werden. Weiterhin könnten auch die Spermien von männlichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen und die Eizellen von weiblichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Tieren funktionell charakterisiert werden.

#### **6.3.4. Postpartale Entwicklungsretardierung**

Männliche homozygote *Grsf1*-Knockout-Mäuse nehmen in ihrer Individualentwicklung signifikant weniger Körpergewicht zu als Wildtyp-Kontrollmäuse und dieser Effekt war bei weiblichen Individuen nicht messbar (5.8.5.). Da die möglichen Ursachen für die differentiellen Körpergewichtskinetiken der beiden Genotypen aus zeitlichen Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden konnten, sollten entsprechende Experimente in weiterführenden Untersuchungen durchgeführt werden. Dabei sollte zuerst geprüft werden, ob die Gewichtsunterschiede möglicherweise darauf zurückzuführen sein könnten, dass die männlichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse weniger Fettgewebe, Muskelgewebe oder Körperflüssigkeit ansammeln als die Wildtyp-Kontrolltiere. Zwar haben stochastische Tiertötungen keine eindeutigen Hinweise für diese Hypothesen geliefert, aber bei den geringen Körpergewichtsunterschieden zwischen den beiden Genotypen sollte eine exakte Quantifizierung der Gewebemassen bei beiden Genotypen durchgeführt werden. Dies könnte nicht-invasiv durch Anwendung der Kleintier-NMR und/oder durch elektrische Impedanzmessungen erfolgen. Dazu müssten die Tiere jedoch narkotisiert werden, um eine völlige Ruhigstellung zu erreichen. Damit haben solche Messungen den Status von Tierversuchen und benötigen eine behördliche Genehmigung.

Eine weitere Möglichkeit zur Erklärung der unterschiedlichen Körpergewichtskinetiken der beiden Genotypen könnte darin bestehen, dass die von uns hergestellten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse weniger Nahrung zu sich nehmen. Obwohl den Mäusen über die gesamte Versuchsdauer Futter und Trinkwasser *ad libitum* zur Verfügung standen, wurde nicht dokumentiert, wie viel Futter die Tiere tatsächlich zu sich nahmen. Entsprechende Messungen sind sehr leicht durchzuführen und bedürfen keiner behördlichen Genehmigung. So könnten vier Zuchtkästen zu jeweils 5-8 männlichen und weiblichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen und entsprechenden Wildtyp-

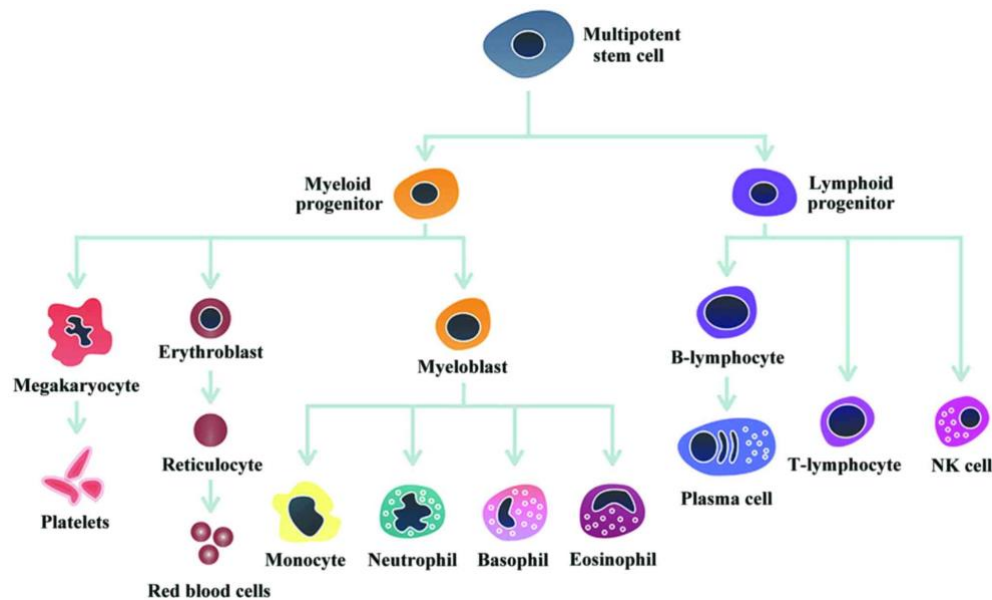
Kontrollen zusammengestellt und die gefressene Futtermenge alle zwei Tage über einen Zeitraum von 2-3 Monaten gemessen werden. Weiterhin könnte an ausgewählten Beispieltieren untersucht werden, ob sich die *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse mehr bewegen als die Kontrolltiere, sodass sie einen höheren Energieverbrauch aufweisen. Dazu müsste den Tieren ein Chip subkutan implantiert werden, sodass die Bewegungsprofil der einzelnen Individuen separat voneinander aufgezeichnet werden können. Schließlich könnte das geringere Körpergewicht der *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäuse auch darauf zurückzuführen sein, dass der Wassergehalt der Massenorgane geringer ist als der von Wildtypmäusen. Um diese These zu überprüfen, könnten aus den großen Organen (Leber, Skelettmuskel, Fettgewebe, Niere, Gehirn) Gewebeprobe entnommen und deren Wassergehalt mit Hilfe der Trocknungsmethode werden [161].

Ein anderes, bisher experimentell nicht adressiertes Problem ist die Frage nach der Geschlechtsspezifität der differentiellen Körpergewichtsentwicklung bei männlichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen (siehe 5.8.5.). Dieser Effekt beruht auf einer soliden Datenbasis (n=10, p<0,0001 im Wilcoxon-Test) und konnte über den gesamten Versuchsablauf beobachtet werden. Da der Effekt bei weiblichen Mäusen nicht zu beobachten war, sollten Differenzen im genetischen Background der Versuchstiere keine entscheidende Rolle spielen. Trotzdem sollte in weiterführenden Experimenten versucht werden, diesen Effekt mit ausgekreuzten Wildtyp-Kontrollmäusen zu reproduzieren. Obwohl bislang keine experimentellen Hinweise dafür vorliegen, dass *Grsf1* eine Rolle bei der Synthese von Sexualhormonen spielt, könnte eine solche Beteiligung möglich sein. Wenn das der Fall wäre, sollten die Konzentrationen von männlichen bzw. weiblichen Geschlechtshormonen im Blut von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen und ausgekreuzten Wildtypkontrollen unterschiedlich sein. Da entsprechende Messungen bislang nicht vorgenommen wurden, können derzeit noch keine detaillierten Aussagen zu diesem Punkt gemacht werden.

### **6.3.5. Monozytenzahl bei weiblichen Individuen**

Bei der vergleichenden Bestimmung der hämatologischen Parameter (siehe 5.8.7.) fiel auf, dass es bei den meisten der quantifizierten Parameter weder bei männlichen noch bei weiblichen Mäusen signifikante Unterschiede zwischen den beiden Genotypen gab. Diese Daten deuten darauf hin, dass der systemische Knockout des *Grsf1*-Gens weder die Bildung noch den Abbau von Blutzellen beeinflusst. Einzige Ausnahme stellen die Monozyten dar. Hier konnten bei weiblichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-

Mäusen deutlich (3-fach) höhere Zellzahlen im strömenden Blut beobachtet werden. Interessanterweise konnten ähnliche Unterschiede bei männlichen Tieren nicht beobachtet werden. Die molekularen Ursachen für die erhöhten Monozytenzahlen bei weiblichen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht experimentell untersucht.



**Abbildung 35: Schematische Darstellung der Hämatopoese.**

Aus einer hämatopoetischen Stammzelle entwickeln sich entweder myeloische oder lymphatische Stammzellen. Aus lymphatischen Stammzellen entstehen im weiteren Verlauf der Hämatopoese alternative B- oder T-Zellen. Aus den B-Zellen differenzieren sich entlang der lymphatischen Reihe die Antikörper-produzierenden Plasmazellen. Entlang der myeloischen Reihe entstehen Erythrozyten, Megakaryozyten (Thrombozyten), Granulozyten und Monozyten. Damit sind Monozyten mit Erythrozyten evolutionsbiologisch gesehen näher verwandt als mit Lymphozyten, obwohl Monozyten und Lymphozyten zu den Leukozyten gehören. Monozyten können aus dem strömenden Blut auswandern und sich im peripheren Gewebe in Abhängigkeit von den lokalen Bedingungen zu Gewebsmakrophagen differenzieren. Quelle: modifiziert nach Jin M et al., *Oncology Letters* 2017 [162]

Monozyten sind Leukozyten, die im strömenden Blut des Menschen nur etwa 7 % der weißen Blutzellen repräsentieren. Sie werden im Knochenmark gebildet und differenzieren sich aus hämatopoetischen Stammzellen entlang der myeloischen Reihe. Aus myeloischen Stammzellen werden auch Erythrozyten, Thrombozyten und Granulozyten gebildet, während die Lymphozyten aus lymphatischen Stammzellen hervorgehen (**Abbildung 35**). Die Aufspaltung der Blutzellbildung in die myeloische bzw. lymphatische Reihe erfolgt im zeitlichen Verlauf der Hämatopoese deutlich früher als die Trennung von Erythropoese und Granulozytopoese. Deshalb sind Erythrozyten und Monozyten evolutionsbiologisch gesehen enger miteinander verwandt als Monozyten und Lymphozyten, obwohl diese beiden Blutzellarten den Leukozyten

zugerechnet werden. Die Tatsache, dass wir bei den Parametern der roten Blutzellen keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Genotypen beobachtet haben, deutet darauf hin, dass die Unterschiede in der Monozytopoese erst nach der Aufspaltung der myeloischen Reihe in die Differenzierungslinien von Erythrozyten und Monozyten eingetreten sein müssen. Was dabei aber genau passiert und welche Rolle dabei die Geschlechtshormone spielen (geschlechtsspezifischer Effekt) muss in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden.

#### **6.4. Limitationen der vorliegenden Arbeit**

Im Diskussionsteil der vorliegenden Arbeit wurde bereits an einigen Stellen darauf eingegangen, welche offenen Fragen die hier vorgestellten Ergebnisse aufwerfen und welche experimentellen Strategien zur Beantwortung dieser Fragen angewendet werden könnten. Für einige dieser neu entstandenen Fragen soll diese Diskussion im folgenden Kapitel vertieft werden, um Limitationen der vorliegenden Arbeit explizit darzustellen.

##### **6.4.1. Potenzielle GRSF1-Bindungsproteine**

Im Hefe-2-Hybrid-System haben wir sieben verschiedene humane Proteine als potenzielle GRSF1-bindende Proteine identifiziert (**Tabelle 12**). Für drei dieser Proteine konnte ihre Funktion als GRSF1-Bindungspartner auch in Säugetierzellen bestätigt werden. Diese Ergebnisse schließen jedoch nicht aus, dass es noch weitere GRSF1-bindende Proteine im menschlichen Proteom gibt. Für den Hefe-2-Hybrid-Screen wurde eine kommerzielle cDNA-Bibliothek verwendet, die aus humanem embryonalem Gehirn präpariert wurde. Zum Zeitpunkt der Präparation der cDNA-Bibliothek wurden mit großer Sicherheit nicht alle menschlichen Proteine in diesem Gewebe exprimiert, sodass zur GRSF1-Bindungsfähigkeit der nicht exprimierten Proteine keine Aussagen gemacht werden können. Um diese Limitation der vorliegenden Arbeit zu eliminieren, müssten entsprechende Hefe-2-Hybrid-Screens mit cDNA-Bibliotheken durchgeführt werden, die aus anderen Zellen und Geweben präpariert werden. Aufgrund des hohen Arbeitsaufwandes war das im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht möglich.

Wie alle Siebtestmethoden liefert auch das Hefe-2-Hybrid-System eine große Anzahl falsch positiver aber auch falsch negativer Treffer. Um die Anzahl der falsch positiven Treffer zu minimieren, wurden die positiv identifizierten Hefezellklone konsekutiven Filterschritten unterworfen. Für die falsch negativen Treffer gab es jedoch

keine solche Filterstrategie. So ist es denkbar, dass nicht alle im menschlichen embryonalen Hirngewebe vorhandenen mRNAs sich gleichermaßen gut in den cMyc-tag Expressionsvektor einklonieren ließen. Diese nicht-klonierbaren mRNAs bzw. die durch diese mRNAs kodierten Proteine fielen von vornherein aus dem Screening Protokoll heraus. Damit können zur GRSF1-Bindungsfähigkeit dieser Proteine keine Aussagen gemacht werden.

Für die drei im Hefe-2-Hybrid-System neu identifizierten GRSF1-Bindungsproteine konnte zwar eine Bindung der rekombinanten Fusionsproteine in HEK-293 Zellen durch Immunopräzipitation nachgewiesen werden, es bleibt aber weiter unklar, ob sich die nicht-markierten endogen synthetisierten Proteine genau so verhalten, wie ihre tag-markierten Fusionsproteine. Leider war es im Rahmen der vorliegenden Dissertation nicht möglich, permanente Zelllinien zu identifizieren, die GRSF1 und eines oder mehrere der neuen GRSF1-Bindungsproteine in großen Mengen exprimieren. Eine solche Zelllinie wären von großem Interesse, da damit ähnliche Koimmunopräzipitationsexperimente durchgeführt werden könnten, wie sie für die rekombinanten Fusionsproteine beschrieben wurden. Dazu müssten allerdings Antikörper verwendet werden, die nicht die tag-Sequenzen der Fusionsproteine, sondern endogene Sequenzen von GRSF1 bzw. von den potenziellen neuen GRSF1-Bindungsproteinen erkennen.

Eine weitere offenen Frage bleibt die biologische Relevanz der Wechselwirkung von GRSF1 mit den neu identifizierten GRSF1-Bindungsproteinen. Auch für die Klärung dieser Frage stand im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht ausreichend Zeit zur Verfügung. Um diese Fragen zu untersuchen, könnten Zellen, die sowohl GRSF1 als auch eines der identifizierten GRSF1-Bindungsproteine exprimieren mit RNAi-Plasmiden behandelt werden, um die Expression eines oder simultan beider Proteine zu unterdrücken. Wenn die separate Unterdrückung der Expression der beiden Proteine ähnliche zell-physiologischen Effekte induziert wie das simultane Expressionssilencing, kann das als Hinweis darauf gewertet werden, dass beide Proteine intrazellulär miteinander wechselwirken.

#### **6.4.2. *Grsf1*-Knockout-Mäuse**

Bei Aufnahme der Arbeiten an dieser Dissertation waren noch keine *Grsf1*-Knockout-Mäuse verfügbar. Deshalb konnten auch noch keine soliden Aussagen zur biologischen *in vivo* Relevanz von *Grsf1* gemacht werden. Erst Mitte 2021 wurde eine

Arbeit publiziert, in der zum ersten Mal die Herstellung und die funktionelle Charakterisierung von *Grsf1*-Knockout-Mäusen beschrieben wurde [87]. Dabei handelte es sich um Mäuse, bei denen das *Grsf1*-Gen selektiv in Skelettmuskelzellen funktionell inaktiviert wurde. Die Mäuse waren lebensfähig und zeigten ähnlich wie unsere *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse keine gravierenden phänotypischen Unterschiede zu Wildtypkontrollen, solange sie nicht zusätzlich stimuliert wurden. Im Unterschied zu unseren *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen, bei denen das *Grsf1*-Gen systemisch (in allen Zellen) funktionell inaktiviert wurde, zeigten männlichen Muskel-spezifischen *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht [87]. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass der bei unseren Mäusen beobachtete Körpergewichtsunterschied zu Wildtypkontrollen nicht darauf zurückzuführen sein sollte, dass die Muskelmasse der Tiere kleiner ist. Diese Schlussfolgerung haben wir jedoch nicht gezielt experimentell untersucht.

Die wohl gravierendste Limitation, der hier durchgeführten *in vivo* Experimente, besteht darin, dass als Kontrolltiere C57BL/6J Mäuse verwendet wurden, die sich mit hoher Sicherheit in ihrem genetischen Background von der *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Mäusen unterschieden. Wegen Zeitmangel haben wir für die Experimente zwar homozygote *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse aus der Verpaarung heterozygoter *Grsf1*<sup>+/-</sup>-Knockout-Mäuse ausgezüchtet. Auf die Auszüchtung von Wildtypkontrolltieren wurde aber zunächst aus Zuchtkapazitätsgründen verzichtet. Für weiterführende Experimente sollten Kolonien von homozygoten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen und homozygoten Wildtyptieren gezüchtet werden, die aus der Verpaarung von homozygoten Wurfgeschwistern hervorgehen. Eine weitere Möglichkeit den Effekt der Wachstumsretardierung bei männlichen *Grsf1*-Knockout-Mäusen als spezifische Folge der Inaktivierung des *Grsf1*-Gens zu charakterisieren, besteht darin, die *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse mit transgenen Tieren zu verpaaren, bei denen die Expression von *Grsf1* in allen Zellen hochreguliert ist (*Grsf1*<sup>tg</sup>). Bei diesen Tieren sollte ein Defekt, der spezifisch auf das Fehlen des *Grsf1* Proteins zurückzuführen ist, durch die Expression des Transgens ausgeglichen werden. Die so erzeugten *Grsf1*<sup>-/-</sup> + *Grsf1*<sup>tg</sup>-Mäuse sollten ähnliche Körpergewichtskinetiken zeigen wie Wildtypmäuse. Solche *Grsf1*<sup>tg</sup>-Mäuse waren zum Zeitpunkt der Arbeit nicht verfügbar.

Aus unseren derzeit verfügbaren Daten zum Fortpflanzungsverhalten der *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse konnte geschlussfolgert werden, dass diese Tiere sich weniger gut vermehren als die verwendeten Wildtypkontrollen. Leider basiert diese Schlussfolgerung lediglich auf den Ergebnissen von vier Zuchtkästen und deshalb



tragen diese Ergebnisse eher vorläufigen und orientierenden Charakter. Sie müssen in weiterführenden Verpaarungsuntersuchungen bestätigt und ausgeweitet werden.

## 6.5. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden drei neue GRSF1-bindende Proteine identifiziert. Damit besteht die Möglichkeit, dass die biologischen Funktionen, die bislang für diese drei Proteine beschrieben wurden, auch durch GRSF1 beeinflusst werden könnten. Um diese Schlussfolgerung zu testen, könnte in verschiedenen zellulären Systemen die Expression von GRSF1 und des GRSF1-bindenden Proteins blockiert (RNAi-Strategie) werden. Wenn beide Strategien zu ähnlichen phänotypischen Veränderungen führen, könnten diese Veränderungen auf die intrazelluläre Interaktion der beiden Proteine zurückzuführen sein. Solche Experimente sind einfach durchzuführen und würden dazu beitragen, die funktionelle Bedeutung von GRSF1 und dessen Protein-Protein-Bindungspartner näher zu charakterisieren.

Die molekularen Details der Wechselwirkung von GRSF1 mit seinen neu identifizierten Bindungspartnern sind noch völlig unklar. Um diese näher zu charakterisieren, könnten GRSF1 und seine Bindungspartner als rekombinante Proteine in größeren Mengen exprimiert und gereinigt werden. Die gereinigten Proteine sollten dann für *in vitro* Bindungsexperimente verwendet werden, bei denen die Bindungsaffinitäten quantifiziert werden könnten. Anschließende Mutagenese-Untersuchungen könnten im weiteren Verlauf der Arbeiten wertvolle Details zu den Bindungsmechanismen liefern. Gleichzeitig können solche Experimente dazu dienen, Ansatzpunkte zu erhalten, wie diese Protein-Protein-Wechselwirkungen effektiver beeinflusst werden können.

Für GRSF1 wurden eine Reihe von biologischen Funktionen postuliert, deren *in vivo* Relevanz aufgrund der bislang fehlenden *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse noch nicht überprüft werden konnte. So wurde GRSF1 z.B. eine wichtige Rolle bei der intrazellulären Vermehrung von Influenzaviren zugeschrieben [80]. Wenn GRSF1 für die Virusvermehrung *in vivo* bedeutsam sein sollte, müssten *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse gegen eine Influenzainfektion zumindest teilweise geschützt sein. Unsere *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse könnten als Forschungswerkzeuge verwendet werden, um diese Hypothese zu untersuchen. Ähnliches gilt für andere biologische Funktionen von GRSF1, die kürzlich in einer Übersichtsarbeit zusammengefasst wurden [54]. GRSF1 fungiert als Translationsregulator der Gpx4 und dieses Protein ist von essenzieller

Bedeutung für die Spermatogenese von Maus und Mensch [135, 160]. Ein systemischer Knockout des *Grsf1*-Gens sollte zu einer Kompromittierung der Spermatogenese und damit zu einer Beeinträchtigung des Fortpflanzungsverhalten von Mäusen führen. Unsere vorläufigen Daten zum Fortpflanzungsverhalten von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen scheinen die Vermutung zu bestätigen. In weiterführenden Untersuchungen sollte die Funktionsfähigkeit von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Spermien quantifiziert werden. Zu diesem Zweck können Spermien aus Hoden und Nebenhoden von *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäusen und aufgekreuzten Wildtypkontrolltieren präpariert und hinsichtlich ihrer Mobilität und morphologischen Integrität charakterisiert werden. Ähnliche Untersuchungen wurde in der AG Kühn an *Gpx4*<sup>+/-</sup>- und *ALOX15*<sup>-/-</sup>-Mäusen bereits durchgeführt und können ohne größere methodische Modifizierungen auch auf *Grsf1*<sup>-/-</sup>-Knockout-Mäuse übertragen werden [163].

## 7. Quellenverzeichnis

1. 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, 2008. **22**(13): p. 1838-50.
2. Naumova, O.Y., et al., *Gene expression in the human brain: the current state of the study of specificity and spatiotemporal dynamics*. Child Dev, 2013. **84**(1): p. 76-88.
3. Bentley, D.L., *Coupling mRNA processing with transcription in time and space*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(3): p. 163-75.
4. Joshi-Tope, G., *Transport of Mature Transcript to Cytoplasm*. Reactome 2004. **83**.
5. Sonneveld, S., B.M.P. Verhagen, and M.E. Tanenbaum, *Heterogeneity in mRNA Translation*. Trends Cell Biol, 2020. **30**(8): p. 606-618.
6. Rattan, S.I., A. Derventzi, and B.F. Clark, *Protein synthesis, posttranslational modifications, and aging*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **663**: p. 48-62.
7. McCarthy, J.E., *Posttranscriptional control of gene expression in yeast*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. **62**(4): p. 1492-553.
8. Yap, E.L. and M.E. Greenberg, *Activity-Regulated Transcription: Bridging the Gap between Neural Activity and Behavior*. Neuron, 2018. **100**(2): p. 330-348.
9. Weipoltshammer, K. and C. Schofer, *Morphology of nuclear transcription*. Histochem Cell Biol, 2016. **145**(4): p. 343-58.
10. Liu, X., D.A. Bushnell, and R.D. Kornberg, *RNA polymerase II transcription: structure and mechanism*. Biochim Biophys Acta, 2013. **1829**(1): p. 2-8.
11. Struhl, K., *Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins*. Trends Biochem Sci, 1989. **14**(4): p. 137-40.
12. Torres-Machorro, A.L., *Homodimeric and Heterodimeric Interactions among Vertebrate Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(23).
13. Blackwood, E.M. and J.T. Kadonaga, *Going the distance: a current view of enhancer action*. Science, 1998. **281**(5373): p. 60-3.
14. Il'icheva, I.A., et al., *Structural features of DNA that determine RNA polymerase II core promoter*. BMC Genomics, 2016. **17**(1): p. 973.
15. Shi, W. and W. Zhou, *Frequency distribution of TATA Box and extension sequences on human promoters*. BMC Bioinformatics, 2006. **7 Suppl 4**(Suppl 4): p. S2.
16. Malin, J., M.R. Aniba, and S. Hannenhalli, *Enhancer networks revealed by correlated DNase hypersensitivity states of enhancers*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(14): p. 6828-38.
17. Illingworth, R.S. and A.P. Bird, *CpG islands--'a rough guide'*. FEBS Lett, 2009. **583**(11): p. 1713-20.
18. Ziller, M.J., et al., *Genomic distribution and inter-sample variation of non-CpG methylation across human cell types*. PLoS Genet, 2011. **7**(12): p. e1002389.
19. Suzuki, M.M. and A. Bird, *DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics*. Nat Rev Genet, 2008. **9**(6): p. 465-76.
20. Grant, P.A., *A tale of histone modifications*. Genome Biol, 2001. **2**(4): p. REVIEWS0003.
21. Shen, Y., W. Wei, and D.X. Zhou, *Histone Acetylation Enzymes Coordinate Metabolism and Gene Expression*. Trends Plant Sci, 2015. **20**(10): p. 614-621.

22. Shvedunova, M. and A. Akhtar, *Modulation of cellular processes by histone and non-histone protein acetylation*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2022. **23**(5): p. 329-349.
23. Brody, Y., et al., *The in vivo kinetics of RNA polymerase II elongation during co-transcriptional splicing*. *PLoS Biol*, 2011. **9**(1): p. e1000573.
24. Stewart, M., *Polyadenylation and nuclear export of mRNAs*. *J Biol Chem*, 2019. **294**(9): p. 2977-2987.
25. Berger, A., et al., *mRNA trans-splicing in gene therapy for genetic diseases*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2016. **7**(4): p. 487-98.
26. Matera, A.G. and Z. Wang, *A day in the life of the spliceosome*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2014. **15**(2): p. 108-21.
27. Staley, J.P. and J.L. Woolford, Jr., *Assembly of ribosomes and spliceosomes: complex ribonucleoprotein machines*. *Curr Opin Cell Biol*, 2009. **21**(1): p. 109-18.
28. Verma, B., et al., *Minor spliceosome and disease*. *Semin Cell Dev Biol*, 2018. **79**: p. 103-112.
29. Turunen, J.J., et al., *The significant other: splicing by the minor spliceosome*. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, 2013. **4**(1): p. 61-76.
30. Mazumder, B., V. Seshadri, and P.L. Fox, *Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means*. *Trends Biochem Sci*, 2003. **28**(2): p. 91-8.
31. Clerici, M., et al., *Structural basis of AAUAAA polyadenylation signal recognition by the human CPSF complex*. *Nat Struct Mol Biol*, 2018. **25**(2): p. 135-138.
32. Hu, J., et al., *Bioinformatic identification of candidate cis-regulatory elements involved in human mRNA polyadenylation*. *RNA*, 2005. **11**(10): p. 1485-93.
33. Elkon, R., A.P. Ugalde, and R. Agami, *Alternative cleavage and polyadenylation: extent, regulation and function*. *Nat Rev Genet*, 2013. **14**(7): p. 496-506.
34. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. *Cell*, 2004. **116**(2): p. 281-97.
35. Correia de Sousa, M., et al., *Deciphering miRNAs' Action through miRNA Editing*. *Int J Mol Sci*, 2019. **20**(24).
36. Wek, R.C., H.Y. Jiang, and T.G. Anthony, *Coping with stress: eIF2 kinases and translational control*. *Biochem Soc Trans*, 2006. **34**(Pt 1): p. 7-11.
37. Kisselev, L.L. and L. Frolova, *Termination of translation in eukaryotes*. *Biochem Cell Biol*, 1995. **73**(11-12): p. 1079-86.
38. Frolova, L., et al., *A highly conserved eukaryotic protein family possessing properties of polypeptide chain release factor*. *Nature*, 1994. **372**(6507): p. 701-3.
39. Frolova, L., et al., *Eukaryotic polypeptide chain release factor eRF3 is an eRF1- and ribosome-dependent guanosine triphosphatase*. *RNA*, 1996. **2**(4): p. 334-41.
40. Sfakianos, A.P., et al., *The mTOR-S6 kinase pathway promotes stress granule assembly*. *Cell Death Differ*, 2018. **25**(10): p. 1766-1780.
41. Dever, T.E. and R. Green, *The elongation, termination, and recycling phases of translation in eukaryotes*. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2012. **4**(7): p. a013706.
42. Schirwani, S. and J. Campbell, *Genetics for paediatric radiologists*. *Pediatr Radiol*, 2020. **50**(12): p. 1680-1690.
43. Huang, L., et al., *Targeting Translation Termination Machinery with Antisense Oligonucleotides for Diseases Caused by Nonsense Mutations*. *Nucleic Acid Ther*, 2019. **29**(4): p. 175-186.
44. Carnes, J., et al., *Stop codon suppression via inhibition of eRF1 expression*. *RNA*, 2003. **9**(6): p. 648-53.

45. Ivanov, A., et al., *PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination*. *Nucleic Acids Res*, 2016. **44**(16): p. 7766-76.
46. Chauvin, C., et al., *Involvement of human release factors eRF3a and eRF3b in translation termination and regulation of the termination complex formation*. *Mol Cell Biol*, 2005. **25**(14): p. 5801-11.
47. Chaudhury, A., P. Chander, and P.H. Howe, *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) in cellular processes: Focus on hnRNP E1's multifunctional regulatory roles*. *RNA*, 2010. **16**(8): p. 1449-62.
48. Dreyfuss, G., V.N. Kim, and N. Kataoka, *Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. **3**(3): p. 195-205.
49. Pinol-Roma, S., et al., *Immunopurification of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein particles reveals an assortment of RNA-binding proteins*. *Genes Dev*, 1988. **2**(2): p. 215-27.
50. Schaub, M.C., S.R. Lopez, and M. Caputi, *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*, 2007. **282**(18): p. 13617-26.
51. Min, H., R.C. Chan, and D.L. Black, *The generally expressed hnRNP F is involved in a neural-specific pre-mRNA splicing event*. *Genes Dev*, 1995. **9**(21): p. 2659-71.
52. Chou, M.Y., et al., *hnRNP H is a component of a splicing enhancer complex that activates a c-src alternative exon in neuronal cells*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(1): p. 69-77.
53. Dominguez, C., et al., *Structural basis of G-tract recognition and encaging by hnRNP F quasi-RRMs*. *Nat Struct Mol Biol*, 2010. **17**(7): p. 853-61.
54. Dumoulin, B., et al., *Expression Regulation, Protein Chemistry and Functional Biology of the Guanine-Rich Sequence Binding Factor 1 (GRSF1)*. *J Mol Biol*, 2021. **433**(13): p. 166922.
55. Qian, Z. and J. Wilusz, *GRSF-1: a poly(A)<sup>+</sup> mRNA binding protein which interacts with a conserved G-rich element*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(12): p. 2334-43.
56. Sofi, S., et al., *Functional characterization of naturally occurring genetic variations of the human guanine-rich RNA sequence binding factor 1 (GRSF1)*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018. **1862**(4): p. 866-876.
57. Sofi, S., et al., *Functional characterization of isolated RNA-binding domains of the GRSF1 protein*. *Biochim Biophys Acta Gen Subj*, 2018. **1862**(4): p. 946-957.
58. Burge, S., et al., *Quadruplex DNA: sequence, topology and structure*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(19): p. 5402-15.
59. Jourdain, A.A., et al., *GRSF1 regulates RNA processing in mitochondrial RNA granules*. *Cell Metab*, 2013. **17**(3): p. 399-410.
60. Forcina, G.C. and S.J. Dixon, *GPX4 at the Crossroads of Lipid Homeostasis and Ferroptosis*. *Proteomics*, 2019. **19**(18): p. e1800311.
61. Savaskan, N.E., et al., *Role for glutathione peroxidase-4 in brain development and neuronal apoptosis: specific induction of enzyme expression in reactive astrocytes following brain injury*. *Free Radic Biol Med*, 2007. **43**(2): p. 191-201.
62. Imai, H., et al., *Depletion of selenoprotein GPx4 in spermatocytes causes male infertility in mice*. *J Biol Chem*, 2009. **284**(47): p. 32522-32.
63. Sampath, P., et al., *A hierarchical network controls protein translation during murine embryonic stem cell self-renewal and differentiation*. *Cell Stem Cell*, 2008. **2**(5): p. 448-60.

64. Ufer, C., *The biology of the RNA binding protein guanine-rich sequence binding factor 1*. *Curr Protein Pept Sci*, 2012. **13**(4): p. 347-57.
65. Rabbani, S.A., A. Arakelian, and R. Farookhi, *LRP5 knockdown: effect on prostate cancer invasion growth and skeletal metastasis in vitro and in vivo*. *Cancer Med*, 2013. **2**(5): p. 625-35.
66. Kimelman, D. and W. Xu, *beta-catenin destruction complex: insights and questions from a structural perspective*. *Oncogene*, 2006. **25**(57): p. 7482-91.
67. Li, B., et al., *The posteriorizing gene Gbx2 is a direct target of Wnt signalling and the earliest factor in neural crest induction*. *Development*, 2009. **136**(19): p. 3267-78.
68. Nakayama, Y., et al., *Gbx2 functions as a transcriptional repressor to regulate the specification and morphogenesis of the mid-hindbrain junction in a dosage- and stage-dependent manner*. *Mech Dev*, 2013. **130**(11-12): p. 532-52.
69. Lickert, H., et al., *Dissecting Wnt/beta-catenin signaling during gastrulation using RNA interference in mouse embryos*. *Development*, 2005. **132**(11): p. 2599-609.
70. Kim, S.J., et al., *GRSF1 is an age-related regulator of senescence*. *Sci Rep*, 2019. **9**(1): p. 5546.
71. Noh, J.H., et al., *GRSF1 suppresses cell senescence*. *Aging (Albany NY)*, 2018. **10**(8): p. 1856-1866.
72. Anderson, S., et al., *Sequence and organization of the human mitochondrial genome*. *Nature*, 1981. **290**(5806): p. 457-65.
73. Fernandez-Silva, P., J.A. Enriquez, and J. Montoya, *Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA*. *Exp Physiol*, 2003. **88**(1): p. 41-56.
74. Pietras, Z., et al., *Controlling the mitochondrial antisense - role of the SUV3-PNPase complex and its co-factor GRSF1 in mitochondrial RNA surveillance*. *Mol Cell Oncol*, 2018. **5**(6): p. e1516452.
75. Pietras, Z., et al., *Dedicated surveillance mechanism controls G-quadruplex forming non-coding RNAs in human mitochondria*. *Nat Commun*, 2018. **9**(1): p. 2558.
76. Noh, J.H., et al., *HuR and GRSF1 modulate the nuclear export and mitochondrial localization of the lncRNA RMRP*. *Genes Dev*, 2016. **30**(10): p. 1224-39.
77. Antonicka, H., et al., *The mitochondrial RNA-binding protein GRSF1 localizes to RNA granules and is required for posttranscriptional mitochondrial gene expression*. *Cell Metab*, 2013. **17**(3): p. 386-98.
78. Hensen, F., et al., *Mitochondrial RNA granules are critically dependent on mtDNA replication factors Twinkle and mtSSB*. *Nucleic Acids Res*, 2019. **47**(7): p. 3680-3698.
79. Antonicka, H. and E.A. Shoubridge, *Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis*. *Cell Rep*, 2015. **10**(6): p. 920-932.
80. 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*, 2002. **76**(20): p. 10417-26.
81. Guo, J., et al., *miR-346 Up-regulates Argonaute 2 (AGO2) Protein Expression to Augment the Activity of Other MicroRNAs (miRNAs) and Contributes to Cervical Cancer Cell Malignancy*. *J Biol Chem*, 2015. **290**(51): p. 30342-50.
82. Consortium, E.P., et al., *Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project*. *Nature*, 2007. **447**(7146): p. 799-816.

83. Dumoulin, B., et al., *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. **1864**(11): p. 129678.
84. Honore, B., et al., *Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins H, H', and F are members of a ubiquitously expressed subfamily of related but distinct proteins encoded by genes mapping to different chromosomes*. *J Biol Chem*, 1995. **270**(48): p. 28780-9.
85. Seeher, S., et al., *Secisbp2 is essential for embryonic development and enhances selenoprotein expression*. *Antioxid Redox Signal*, 2014. **21**(6): p. 835-49.
86. Matunis, M.J., J. Xing, and G. Dreyfuss, *The hnRNP F protein: unique primary structure, nucleic acid-binding properties, and subcellular localization*. *Nucleic Acids Res*, 1994. **22**(6): p. 1059-67.
87. Driscoll, R.K., et al., *GRSF1 deficiency in skeletal muscle reduces endurance in aged mice*. *Aging (Albany NY)*, 2021. **13**(11): p. 14557-14570.
88. Donovan, J. and P.R. Copeland, *Threading the needle: getting selenocysteine into proteins*. *Antioxid Redox Signal*, 2010. **12**(7): p. 881-92.
89. Bifano, A.L., et al., *Identification of nucleotides and amino acids that mediate the interaction between ribosomal protein L30 and the SECIS element*. *BMC Mol Biol*, 2013. **14**: p. 12.
90. Berry, M.J., et al., *Recognition of UGA as a selenocysteine codon in type I deiodinase requires sequences in the 3' untranslated region*. *Nature*, 1991. **353**(6341): p. 273-6.
91. Allmang, C., P. Carbon, and A. Krol, *The SBP2 and 15.5 kD/Snu13p proteins share the same RNA binding domain: identification of SBP2 amino acids important to SECIS RNA binding*. *RNA*, 2002. **8**(10): p. 1308-18.
92. Brown, K.M. and J.R. Arthur, *Selenium, selenoproteins and human health: a review*. *Public Health Nutr*, 2001. **4**(2B): p. 593-9.
93. Kossinova, O., et al., *The SBP2 protein central to selenoprotein synthesis contacts the human ribosome at expansion segment 7L of the 28S rRNA*. *RNA*, 2014. **20**(7): p. 1046-56.
94. Dumitrescu, A.M., et al., *Mutations in SECISBP2 result in abnormal thyroid hormone metabolism*. *Nat Genet*, 2005. **37**(11): p. 1247-52.
95. Thomas, J.P., et al., *Enzymatic reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides in artificial bilayers and lipoproteins*. *Biochim Biophys Acta*, 1990. **1045**(3): p. 252-60.
96. Schoenmakers, E., et al., *Mutations in the selenocysteine insertion sequence-binding protein 2 gene lead to a multisystem selenoprotein deficiency disorder in humans*. *J Clin Invest*, 2010. **120**(12): p. 4220-35.
97. Wang, L., et al., *Differences between Mice and Humans in Regulation and the Molecular Network of Collagen, Type III, Alpha-1 at the Gene Expression Level: Obstacles that Translational Research Must Overcome*. *Int J Mol Sci*, 2015. **16**(7): p. 15031-56.
98. Krug, T., et al., *TTC7B emerges as a novel risk factor for ischemic stroke through the convergence of several genome-wide approaches*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2012. **32**(6): p. 1061-72.
99. Krachler, A.M., A. Sharma, and C. Kleanthous, *Self-association of TPR domains: Lessons learned from a designed, consensus-based TPR oligomer*. *Proteins*, 2010. **78**(9): p. 2131-43.

100. Kawasoe, T., et al., *Isolation and characterization of a novel human gene, DRCTNNB1A, the expression of which is down-regulated by beta-catenin.* Cancer Res, 2000. **60**(13): p. 3354-8.
101. Zara, F., et al., *Deficiency of hyccin, a newly identified membrane protein, causes hypomyelination and congenital cataract.* Nat Genet, 2006. **38**(10): p. 1111-3.
102. Eno, C.C., et al., *14q32.11 microdeletion including CALM1, TTC7B, PSMC1, and RPS6KA5: A new potential cause of developmental and language delay in three unrelated patients.* Am J Med Genet A, 2021. **185**(5): p. 1519-1524.
103. Baskin, J.M., et al., *The leukodystrophy protein FAM126A (hyccin) regulates PtdIns(4)P synthesis at the plasma membrane.* Nat Cell Biol, 2016. **18**(1): p. 132-8.
104. Furse, S., Brooks, N. J., Seddon, A. M., Woscholski, R., Templer, R. H., Tate, E. W., Gaffney, P. R. J., Ces, O., *Lipid membrane curvature induced by distearoyl phosphatidylinositol 4-phosphate.* Soft Matter, 2012. **8** (11): p. 3090-3093.
105. Furse S., B.N., Woscholski R., Gaffney PRJ., Templer RH., *Pressure-dependent inverse bicontinuous cubic phase formation in a phosphatidylinositol 4-phosphate/phosphatidylcholine system.* Chemical Data Collections, 2016. **3-4**: p. 15-20.
106. Choudhury, R.R., N. Hyvola, and M. Lowe, *Phosphoinositides and membrane traffic at the trans-Golgi network.* Biochem Soc Symp, 2005(72): p. 31-8.
107. Basu, U., et al., *A PI4KIIIalpha protein complex is required for cell viability during Drosophila wing development.* Dev Biol, 2020. **462**(2): p. 208-222.
108. Langelier, C., et al., *Human ESCRT-II complex and its role in human immunodeficiency virus type 1 release.* J Virol, 2006. **80**(19): p. 9465-80.
109. Babst, M., et al., *Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body.* Dev Cell, 2002. **3**(2): p. 283-9.
110. Im, Y.J. and J.H. Hurley, *Integrated structural model and membrane targeting mechanism of the human ESCRT-II complex.* Dev Cell, 2008. **14**(6): p. 902-13.
111. Henne, W.M., N.J. Buchkovich, and S.D. Emr, *The ESCRT pathway.* Dev Cell, 2011. **21**(1): p. 77-91.
112. Corless, L., et al., *Vps4 and the ESCRT-III complex are required for the release of infectious hepatitis C virus particles.* J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 2): p. 362-72.
113. Ghoulal, B., et al., *ESCRT-II's involvement in HIV-1 genomic RNA trafficking and assembly.* Biol Cell, 2012. **104**(12): p. 706-21.
114. Sette, P., et al., *Ubiquitin conjugation to Gag is essential for ESCRT-mediated HIV-1 budding.* Retrovirology, 2013. **10**: p. 79.
115. Stieler, J.T. and R. Prange, *Involvement of ESCRT-II in hepatitis B virus morphogenesis.* PLoS One, 2014. **9**(3): p. e91279.
116. Ariumi, Y., et al., *The ESCRT system is required for hepatitis C virus production.* PLoS One, 2011. **6**(1): p. e14517.
117. Meyers, A., C. Furtmann, and J. Jose, *Direct optical density determination of bacterial cultures in microplates for high-throughput screening applications.* Enzyme Microb Technol, 2018. **118**: p. 1-5.
118. Bruckner, A., et al., *Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology.* Int J Mol Sci, 2009. **10**(6): p. 2763-2788.
119. Brillì, M. and R. Fani, *Molecular evolution of hisB genes.* J Mol Evol, 2004. **58**(2): p. 225-37.
120. Stotz, A. and P. Linder, *The ADE2 gene from Saccharomyces cerevisiae: sequence and new vectors.* Gene, 1990. **95**(1): p. 91-8.



121. Serebriiskii, I.G. and E.A. Golemis, *Uses of lacZ to study gene function: evaluation of beta-galactosidase assays employed in the yeast two-hybrid system*. Anal Biochem, 2000. **285**(1): p. 1-15.
122. Brunelle, J.L. and R. Green, *One-dimensional SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (1D SDS-PAGE)*. Methods Enzymol, 2014. **541**: p. 151-9.
123. Dumoulin, B., et al., *Male guanine-rich RNA sequence binding factor 1 knockout mice (Grsf1(-/-)) gain less body weight during adolescence and adulthood*. Cell Biosci, 2022. **12**(1): p. 199.
124. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. Anal Biochem, 1976. **72**: p. 248-54.
125. Laemmli, U.K., *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. Nature, 1970. **227**(5259): p. 680-5.
126. Cai, X., et al., *Multi-scale molecular photoacoustic tomography of gene expression*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e43999.
127. Brackley, K.I. and J. Grantham, *Activities of the chaperonin containing TCP-1 (CCT): implications for cell cycle progression and cytoskeletal organisation*. Cell Stress Chaperones, 2009. **14**(1): p. 23-31.
128. Gibson, T.J., *RACK1 research - ships passing in the night?* FEBS Lett, 2012. **586**(17): p. 2787-9.
129. Cheng, Y., et al., *A novel read-through transcript JMJD7-PLA2G4B regulates head and neck squamous cell carcinoma cell proliferation and survival*. Oncotarget, 2017. **8**(2): p. 1972-1982.
130. Behne, D. and A. Kyriakopoulos, *Mammalian selenium-containing proteins*. Annu Rev Nutr, 2001. **21**: p. 453-73.
131. Baietti, M.F., et al., *Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes*. Nat Cell Biol, 2012. **14**(7): p. 677-85.
132. Barrientos, A., *Yeast models of human mitochondrial diseases*. IUBMB Life, 2003. **55**(2): p. 83-95.
133. Sasaki, F., et al., *A high-affinity monoclonal antibody against the FLAG tag useful for G-protein-coupled receptor study*. Anal Biochem, 2012. **425**(2): p. 157-65.
134. Terpe, K., *Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems*. Appl Microbiol Biotechnol, 2003. **60**(5): p. 523-33.
135. Ursini, F., et al., *Dual function of the selenoprotein PHGPx during sperm maturation*. Science, 1999. **285**(5432): p. 1393-6.
136. Ufer, C. and C.C. Wang, *The Roles of Glutathione Peroxidases during Embryo Development*. Front Mol Neurosci, 2011. **4**: p. 12.
137. Qazi, I.H., et al., *Selenium, Selenoproteins, and Female Reproduction: A Review*. Molecules, 2018. **23**(12).
138. Tinggi, U., *Selenium: its role as antioxidant in human health*. Environ Health Prev Med, 2008. **13**(2): p. 102-8.
139. Papp, L.V., et al., *From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health*. Antioxid Redox Signal, 2007. **9**(7): p. 775-806.
140. Bartling, T.R., et al., *Redox-sensitive gene-regulatory events controlling aberrant matrix metalloproteinase-1 expression*. Free Radic Biol Med, 2014. **74**: p. 99-107.
141. Savaskan, N.E., et al., *Molecular biology of glutathione peroxidase 4: from genomic structure to developmental expression and neural function*. Biol Chem, 2007. **388**(10): p. 1007-17.

142. Ren, X., et al., *Selenocysteine in mammalian thioredoxin reductase and application of ebselen as a therapeutic*. Free Radic Biol Med, 2018. **127**: p. 238-247.
143. Lu, J. and A. Holmgren, *The thioredoxin antioxidant system*. Free Radic Biol Med, 2014. **66**: p. 75-87.
144. Stefankova, P., M. Kollarova, and I. Barak, *Thioredoxin - structural and functional complexity*. Gen Physiol Biophys, 2005. **24**(1): p. 3-11.
145. Holmgren, A. and J. Lu, *Thioredoxin and thioredoxin reductase: current research with special reference to human disease*. Biochem Biophys Res Commun, 2010. **396**(1): p. 120-4.
146. Fritz-Wolf, K., et al., *Crystal structure of the human thioredoxin reductase-thioredoxin complex*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 383.
147. Duntas, L.H., *The role of selenium in thyroid autoimmunity and cancer*. Thyroid, 2006. **16**(5): p. 455-60.
148. Chen, C.Z., et al., *Schwann cell remyelination of the central nervous system: why does it happen and what are the benefits?* Open Biol, 2021. **11**(1): p. 200352.
149. Walker, D.S., et al., *Inositol 1,4,5-trisphosphate signalling regulates the avoidance response to nose touch in Caenorhabditis elegans*. PLoS Genet, 2009. **5**(9): p. e1000636.
150. Schmidt, O. and D. Teis, *The ESCRT machinery*. Curr Biol, 2012. **22**(4): p. R116-20.
151. Wollert, T. and J.H. Hurley, *Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes*. Nature, 2010. **464**(7290): p. 864-9.
152. Hurley, J.H., *The ESCRT complexes*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 2010. **45**(6): p. 463-87.
153. Mueller, M., M.A. Adell, and D. Teis, *Membrane abscission: first glimpse at dynamic ESCRTs*. Curr Biol, 2012. **22**(15): p. R603-5.
154. Maquat, L.E., *Nonsense-mediated mRNA decay in mammals*. J Cell Sci, 2005. **118**(Pt 9): p. 1773-6.
155. Chang, Y.F., J.S. Imam, and M.F. Wilkinson, *The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway*. Annu Rev Biochem, 2007. **76**: p. 51-74.
156. Frischmeyer, P.A. and H.C. Dietz, *Nonsense-mediated mRNA decay in health and disease*. Hum Mol Genet, 1999. **8**(10): p. 1893-900.
157. Schlautmann, L.P. and N.H. Gehring, *A Day in the Life of the Exon Junction Complex*. Biomolecules, 2020. **10**(6).
158. Park, Y.W., J. Wilusz, and M.G. Katze, *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, 1999. **96**(12): p. 6694-9.
159. Yoo, S.E., et al., *Gpx4 ablation in adult mice results in a lethal phenotype accompanied by neuronal loss in brain*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(9): p. 1820-7.
160. Ursini, F., et al., *A white paper on Phospholipid Hydroperoxide Glutathione Peroxidase (GPx4) forty years later*. Free Radic Biol Med, 2022. **188**: p. 117-133.
161. Jansen, H.H., *[Potassium, sodium and water content of the internal organs at certain times after death]*. Virchows Arch Pathol Anat Physiol Klin Med, 1961. **334**: p. 510-5.
162. Jin, M., S. Xu, and Q. An, *Pediatric haematopoiesis and related malignancies*. Oncol Lett, 2017. **14**(1): p. 10-14.

163. Soria-Tiedemann, M., et al., *Unbalanced Expression of Glutathione Peroxidase 4 and Arachidonate 15-Lipoxygenase Affects Acrosome Reaction and In Vitro Fertilization*. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(17).

## 8. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Désirée Charleen Jähn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema:

„Identifizierung von Guanine-rich sequence binding factor 1 (Grsf1) bindenden Proteinen sowie Herstellung und basale Charakterisierung von Grsf1-defizienten Mäusen.“

“Identification of guanine-rich sequence binding factor 1 (GRSF1) binding proteins and production and basal characterization of Grsf1-deficient mice.”

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).

Meine Anteile an den Publikationen einiger in der Dissertationsschrift enthaltener Daten sind in den wissenschaftlichen Publikationen klar spezifiziert. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; [www.icmje.org](http://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.“

## 9. Danksagung

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. sc. med. Hartmut Kühn, Arbeitsgruppenleiter Lipoxxygenaseforschung, bedanken. Durch Ihre konstante Unterstützung war die Fertigstellung dieser Arbeit überhaupt möglich. Vielen Dank für Ihre umfangreiche und sehr gute Betreuung.

Zudem möchte ich auch Dr. Christoph Ufer meinen großen Dank aussprechen, welcher mich nicht nur an das Thema meiner Arbeit herangeführt und begleitet hat, sondern auch die Biochemie und die Grundlagenforschung mir nahegebracht hat. Damit einhergehend möchte ich mich auch bei dem Rest der AG Kühn (insbesondere Sabine Stehling und Dr. Dagmar Heydeck) bedanken: Für eure Geduld, eure Hilfe und das immer sehr nette Miteinander. Meine Arbeit im Labor und die Zusammenarbeit hat mir immer Freude bereitet und Spaß gemacht.

Auch möchte ich meiner Familie und Freunden für jeden emotionalen Support, die Aufrechterhaltung der Motivation und alle Unterstützung danken.

## Publikationsliste

Dumoulin B, Heydeck D, **Jähn D**, Lassé M, Sofi S, Ufer C, Kuhn H. Male guanine-rich RNA sequence binding factor 1 knockout mice (*Grsf1<sup>-/-</sup>*) gain less body weight during adolescence and adulthood. *Cell Biosci.* 2022 Dec 9;12(1):199. doi: 10.1186/s13578-022-00922-3.

Sofi S, Fitzgerald JC, **Jähn D**, Dumoulin B, Stehling S, Kuhn H, Ufer C. 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. doi: 10.1016/j.bbagen.2017.12.008.

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