

***In vivo*-Analyse des LIM-Domäne-bindenden Kofaktors RLIM in Vertebraten**

Zusammenfassung der Dissertation von Michael Bossenz

Bei der LIM-Domäne handelt es sich um ein Proteinmotiv, das Protein-Protein-Wechselwirkungen mit einer Vielzahl von Proteinen vermittelt. Im Zellkern gibt es mindestens zwei Proteinklassen die LIM-Domänen besitzen, und zwar die LIM-Homeodomänen-Proteine (LIM-HD) und die LIM-only-Proteine (LMO). LIM-HD-Transkriptionsfaktoren übernehmen essentielle Funktionen in der Entwicklung des Nervensystems und sind dort u.a. für die Differenzierung verschiedener Zelltypen während der Neurogenese verantwortlich. Die Familie der CLIM/Ldb/NLI/Chip-Kofaktoren und das RING Zinkfinger Protein RLIM wurden aufgrund ihrer Fähigkeit an LIM-Domänen zu binden, identifiziert. Die Interaktionen der CLIM-Kofaktorfamilie mit LIM-Domänen sind wichtig für die biologische Aktivität, die durch die LIM-HD-Proteine vermittelt werden. Bei RLIM handelt es sich um einen Kofaktor, der sowohl mit LIM-Domänen als auch mit CLIM-Kofaktoren wechselwirken kann. RLIM wirkt dabei als transkriptioneller Korepressor und hemmt die biologische Aktivität von LIM-HD-Proteinen während der Embryogenese von Vertebraten.

Da RLIM einen RING Zinkfinger enthält und dieses Motiv in Ubiquitin-Ligasen weitverbreitet zu finden ist, wurde untersucht, ob RLIM ebenfalls eine Ubiquitin-Ligase-Aktivität besitzt. RLIM konnte in der Tat als eine Ubiquitin-Protein-Ligase identifiziert werden, die fähig ist sich selbst, CLIM-Kofaktoren und LMO-Proteine zu ubiquitinieren. RLIM markiert auf diese Weise CLIM-Kofaktoren für den proteolytischen Abbau durch das 26S Proteasom und hemmt somit die Aktivität von LIM-HD-Proteinen, da die CLIM-Kofaktoren ihre positive Wirkung auf die LIM-HD-Faktoren nicht weiter aufrechterhalten können. Um die entwicklungsbiologische *in vivo*-Funktion von RLIM während der Entwicklung von Vertebraten zu untersuchen, sollte auf der einen Seite das

für RLIM-kodierende *Rnf12*-Gen durch homologe Rekombination in der Maus inaktiviert werden. Auf der anderen Seite sollte mit ektopischen Überexpressionsversuchen von RLIM der entwicklungsbiologische Einfluß von RLIM während der frühen Zebrafischartwicklung erforscht werden. Zur Verwirklichung dieser Aufgaben wurde zuerst das *Rnf12*-Gen aus einer murinen genomischen λ -Bibliothek isoliert und nachfolgend charakterisiert. Das *Rnf12*-Gen erstreckt sich über 20 kb des murinen Genoms und kodiert für ein aus 600 Aminosäuren bestehendes RLIM-Protein. Die Sequenzanalysen zeigen, dass das *Rnf12*-Gen zwischen verschiedenen Spezies konserviert ist. Die Homologien auf Proteinebene zwischen Mensch, Frosch, Huhn und Maus sind sehr hoch. Basierend auf diesen genomischen Daten wurde zunächst versucht, das *Rnf12*-Gen durch homologe Rekombination in der Maus komplett zu inaktivieren. Diese komplette Knockout-Methode führte allerdings nicht zur Keimbahntransmission der rekombinierten ES-Zellen. Durch die Etablierung einer konditionalen Knockout-Mauslinie konnten die Probleme bei der Generierung der *Rnf12*-defizienten Mauslinie umgangen werden. Allerdings wurden auch hier, trotz erfolgter Keimbahntransmission der rekombinierten ES-Zellen, bei der konditionellen kompletten Knockout-Variante weder männliche noch weibliche homozygote *Rnf12*-defiziente Nachkommen erzielt. Diese und die Ergebnisse von anderen Arbeitsgruppen weisen auf eine frühe embryonale Lethalität von *Rnf12*-defizienten Mausembryonen hin. Die ektopische Überexpression von RLIM während der frühen Zebrafischartwicklung führte zu keinem detektierbaren Phänotyp. Ein Grund dafür könnte sein, dass das RLIM-Protein in Zebrafischen instabil ist und es deshalb trotz Überexpression zu keinem Phänotyp führt. Um dieser Fragestellung nachzugehen, entwickelte ich eine *in vivo*-Methode mit entwicklungsbiologischer Relevanz, mit der es möglich ist, Proteinstabilitäten während der frühen Zebrafischartwicklung direkt miteinander vergleichen zu können. In der Tat zeigte sich, dass ektopisch überexprimiertes RLIM-Protein nach den ersten 24 Stunden der frühen embryonalen Zebrafischartwicklung nicht mehr zu detektieren ist.

Sowohl unsere Ergebnisse als auch die Ergebnisse aus anderen Laboratorien weisen auf eine wichtige entwicklungsbiologische Rolle von RLIM während der Entwicklung von Vertebraten hin.