

Funktionelle Analyse von RNF6, einer RLIM-ähnlichen Ubiquitin-Ligase bei Vertebraten

Zusammenfassung der Dissertation von Anne Schlüter

LIM-Homöodomänen-Transkriptionsfaktoren (LIM-HD-Proteine) spielen eine wichtige Rolle für die Entwicklung unterschiedlicher Spezies von *Caenorhabditis elegans* bis zum Menschen. Sie gehören zur Familie der LIM-Proteine. Allen LIM-Proteinen gemein ist die LIM-Domäne, die aus zwei tandemartig wiederholten Zinkfinger-Strukturen besteht. Die LIM-Domäne ist eine Protein-Protein-Interaktionsdomäne, über die Multiproteinkomplexe mit verschiedenen Proteinen aufgebaut werden können. Außer den LIM-HD-Proteinen gehören noch die LIM-only-Proteine (LMOs) zum nukleären LIM-Protein-Netzwerk. Reguliert werden LIM-HD-Proteine über die positiv wirkenden Kofaktoren der CLIM-Familie und den negativ wirkenden Kofaktor RLIM. Alle Kofaktoren binden an LIM-Domänen. Auch die LMOs regulieren die LIM-HD-Proteine, indem sie mit diesen um die Kofaktoren konkurrieren. Außer den eben beschriebenen nukleären LIM-Proteinen gibt es eine ganze Reihe cytoplasmatischer LIM-Proteine. Dazu zählen die LIM-Kinasen (LIMK), die im Cytoplasma eine entscheidende Rolle für die Aktin-Dynamik spielen.

Da von LIM-HD-Proteinen und CLIM-Kofaktoren in Säugetieren immer zwei sehr nahe verwandte Proteine vorkommen, war es Ziel dieser Arbeit ein zu RLIM homologes Protein zu identifizieren und seine Funktion im Vergleich mit RLIM zu untersuchen.

Sequenzvergleiche mit der NCBI-Datenbank zeigten, dass RNF6 dasjenige Protein ist, das die stärkste Homologie zu RLIM aufweist. Daher wurde die cDNA von RNF6 der Maus kloniert. Es wurden spezifische polyklonale Antikörper gegen RNF6 generiert, mit denen RNF6 überraschend als vorwiegend cytoplasmatisches Protein identifiziert werden konnte. In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass RNF6, wie RLIM, eine RINGfinger-abhängige Ubiquitin-Ligase ist. Auf der Suche nach cytoplasmatischen Substratproteinen von RNF6 konnte LIMK als RNF6-Interaktionspartner bestimmt werden. Mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen konnte gezeigt werden, dass RNF6 in axonalen

Projektionen mit LIMK kolokalisiert vorliegt. Weiterhin konnte LIMK als Substratprotein für RNF6-vermittelte Polyubiquitinierungen identifiziert werden, die einen proteasomalen Abbau von LIMK vermitteln. Es ist bekannt, dass unter anderem die LIMK-Konzentration im Cytoplasma die Aktin-Dynamik steuert. Da RNF6 als Ubiquitin-Ligase von LIMK die Konzentration von LIMK reguliert, ist RNF6 maßgeblich in diesen wichtigen zellulären Prozess involviert.

Die gewonnenen Daten identifizieren RNF6 und RLIM als Kofaktorfamilie von LIM-Protein-Netzwerken des Cytoplasmas und des Zellkerns. Beide Proteine sind Ubiquitin-Ligasen, die zentrale zelluläre Prozesse in unterschiedlichen Kompartimenten steuern. RLIM steuert, als negativer Koregulator, die Regulation der Transkription im Zellkern, während RNF6 die Aktin-Dynamik im Cytoplasma reguliert.