

Aus dem Zentrum für Innere Medizin der Universität zu Köln
Klinik und Poliklinik für Innere Medizin II der Universität zu Köln
Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Th. Benzing

Neue Einblicke zum
Apoptose-antagonisierenden Transkriptionsfaktor
(AATF)
im Zentrum der ribosomalen Biogenese:
Eine umfassende proteomische Analyse

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Sadrija Cukoski
aus Köln

promoviert am 22. Februar 2023

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität zu Köln
2022

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. G. R. Fink
1. Gutachterin: Privatdozentin Dr. med. K. A. Höpker
2. Gutachter: Universitätsprofessor Dr. rer. nat H. Walczak

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich keine Unterstützungsleistungen erhalten.

Weitere Personen waren an der Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe einer Promotionsberaterin/eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertationsschrift stehen.

Die Dissertationsschrift wurde von mir bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind nach entsprechender Anleitung durch Frau PD Dr. Katja Höpker und Herrn Prof. Dr. Bernhard Schermer von mir selbst ausgeführt worden. Unterstützung erhielt ich bei der Planung der Versuche zudem von Frau Dr. Francesca Fabretti.

Frau Dr. Heide Heinen und Frau Dr. Manaswita Jain standen mir mit praktischen Hilfestellungen zur Durchführung der Versuche zur Seite.

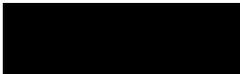
Die Analyse der Rohdaten wurden von mir mit Unterstützung von Herrn Dr. Christian Frese und Herrn Prof. Dr. Markus Rinschen durchgeführt. Dabei hat Herr Dr. Frese den von MaxQuant ® ausgegebenen Datensatz zur Verfügung gestellt, die folgenden statistischen Auswertungen erfolgten unter Anleitung durch mich mittels der Software Perseus.

Die im Diskussionsteil dargelegten Bewertungen meiner Ergebnisse wurden ferner durch den wertvollen Austausch mit Frau PD Dr. Katja Höpker, Frau Dr. Fabretti sowie meinem Mitdoktoranden Dr. Rainer Kaiser geprägt.

Erklärung zur guten wissenschaftlichen Praxis:

Ich erkläre hiermit, dass ich die Ordnung zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis und zum Umgang mit wissenschaftlichem Fehlverhalten (Amtliche Mitteilung der Universität zu Köln AM 132/2020) der Universität zu Köln gelesen habe und verpflichte mich hiermit, die dort genannten Vorgaben bei allen wissenschaftlichen Tätigkeiten zu beachten und umzusetzen.

Köln, den 10.06.2022

Unterschrift: 

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Thomas Benzing gelingt es seit vielen Jahren Studentinnen und Studenten in seinen Vorlesungen von der Nephrologie zu begeistern. Er gab auch mir die entscheidenden Impulse, mich für diese Doktorarbeit und dieses großartige Fach zu entscheiden – und ist mir heute ein inspirierender, wohlwollender und immer ansprechbarer Chef als Assistenzärztin an seiner Klinik. Herr Prof. Dr. Bernhard Schermer leitet mit höchstem Anspruch an sich selbst, großem Enthusiasmus und Menschlichkeit das nephrologische Forschungslabor. Er schafft uns einen Raum, in dem eine enge Betreuung selbstverständlich ist, eigene Ideen umgesetzt werden können, stets ein reger Austausch und nicht zuletzt der Spaß an der Wissenschaft kultiviert wird.

Frau PD Dr. Katja Höpker erfüllte all das, was eine gelungene Betreuung auszeichnet. Durch versiertes Planen, Ansprechbarkeit und Hilfestellung bei Herausforderungen und das Fördern von eigenständigem Denken. Allem voran aber, indem du mir das beste Vorbild selbst bist: Durch deine Stärke, deine Leidenschaft für die Wissenschaft und deinen Mut, neue Wege zu denken und zu gehen. Es ist mir eine große Freude deine erste Doktorandin zu sein.

Der Anspruch, selbst als Vorbild zu dienen, bietet vielleicht die größte Motivation. Deshalb ist diese Arbeit weniger mit, schon gar nicht trotz, sondern vielmehr wegen meinem Sohn Malik gelungen.

Im Nephrolab gab es viele Menschen, die mir Anleitung, Hilfe und Inspiration boten. Besonders hervorheben möchte ich hier Frau Dr. Francesca Fabretti und Frau Dr. Manaswita Jain sowie Herrn Prof. Dr. Markus Rinschen. Die Proteomics AG unter der Leitung von Dr. Christian Frese stand mir stets bei meinen Versuchen mit Rat und Tat beiseite. Meine Weggefährtinnen und -gefährten im CECAD haben für mich die erfolgreichen Tage im Labor unvergesslich gemacht und geholfen, schwierigere Tage schneller zu vergessen. Die Zeit im Nephrolab wäre ohne Dr. Heide Heinen, Lea Münkner, Dr. Rainer Kaiser und viele andere nicht dieselbe gewesen. Danken möchte ich außerdem meiner lieben Freundin Dr. Rosanne Sprute, an deren Seite ich ausnahmslos die besten Ideen habe.

Und besonders danke ich meiner Familie, allen voran meiner Mutter, die mir bedingungslos zur Seite steht.

INHALTSVERZEICHNIS

1.	ZUSAMMENFASSUNG	8
2.	EINLEITUNG	10
2.1.	AATF (Apoptosis Antagonizing Transcription Factor)	10
2.1.1.	Struktur und Lokalisation	11
2.1.2.	Funktion	12
2.2.	Nukleolärer Stress, Integrität und Stabilisierung von p53	15
2.3.	Ribosomen	17
2.4.	RNA-bindende Proteine sind Effektoren der Genexpression	18
2.5.	Hypoxie und zelluläre Stressreaktion	19
2.6.	Ziel dieser Arbeit	21
3.	MATERIAL UND METHODEN	23
3.1.	Material	23
3.2.	Methoden	27
4.	ERGEBNISSE	36
4.1.	Nachweis der regelrechten Proteinexpression und DNA-Schadensantwort	36
4.2.	Das AATF Interaktom vor Induktion der zellulären Stressantwort	38
4.2.1.	Identifikation von 282 Interaktoren vor der Hypoxie-Behandlung	39
4.2.2.	Bestätigung von 35 Interaktoren des AATF Interaktoms vor UV-Behandlung	40
4.2.3.	Die Bindungspartner lassen sich in funktionelle Cluster einordnen	40
4.3.	Das AATF Interaktom nach Hypoxie	42
4.3.1.	Identifikation von 363 Interaktoren nach der Hypoxie-Behandlung	42
4.3.2.	AATF geht unter Hypoxie zahlreiche neue Bindungen ein	42
4.3.3.	Unter Hypoxie interagiert AATF mit wichtigen RNA-bindenden und ribosomalen Proteinen	44
4.3.4.	Nach Hypoxiebehandlung lassen sich Interaktoren derselben Cluster nachweisen wie nach UV-Radiation.	44

4.4.	Das AATF Interaktom vor und nach RNase Behandlung	45
4.4.1.	Aus den 5 Replikaten können 164 Interaktoren von AATF mit hoher Signifikanz gegenüber der Kontroll MS-IP nachgewiesen werden	45
4.4.2.	Unter den Interaktoren von AATF befinden sich rund 80% RNA-bindende Proteine	47
4.4.3.	Eine klare RNA-Abhängigkeit zeigt sich nur bei 2 Interaktoren	47
4.4.4.	AATF interagiert mit RNAPI-abhängigen und RNAPI-unabhängigen RBP	48
5.	DISKUSSION	50
5.1.	Versuchsaufbau und Validität der Daten	50
5.1.1.	AATF - ein RNA-bindendes Protein im Zentrum der Ribosomenbiogenese	52
5.1.2.	AATF als möglicher Faktor der Translationskontrolle	53
5.2.	Nukleoläre Integrität und p53 - der „Hüter des Genoms“	55
5.2.1.	Chaperone	57
5.2.2.	Zusammenfassung	58
5.2.3.	Ausblick	59
6.	LITERATURVERZEICHNIS	62
7.	ANHANG	66
7.1.	Abbildungsverzeichnis	82
7.2.	Tabellenverzeichnis	83
8.	VORABVERÖFFENTLICHUNGEN VON ERGEBNISSEN	84

Abkürzungsverzeichnis

AATF	Apoptose-antagonisierender Transkriptionsfaktor
Abb.	Abbildung(en)
BSA	Bovines Serum Albumin
Cas	CRISPR-assoziiertes Protein
Chk1/2	Checkpoint Kinase 1/2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DDR	DNA-Schadensantwort (<i>DNA Damage Response</i>)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNase	Desoxyribonuklease
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektronensprayionisierung
FBS	Fetales Bovin Serum
FC	Fold Change
FDR	Falscherkennungsrate (<i>False Discovery Rate</i>)
FRT	Flippase Recognition Target
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GO	Gene Ontology
HRP	Enzym Meerrettich-Peroxidase (<i>Horseradish peroxidase</i>)
IP	Immunpräzipitation
KEGG	Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
LFQ	Markierungsfreie Quantifizierung (<i>Label-free Quantification</i>)
LSU	Große Untereinheit (<i>Large subunit</i>)
LC	Flüssigkeitschromatographie (<i>Liquid chromatography</i>)
LOG	dekadischer Logarithmus
mRNA	Boten-RNS (<i>Messenger ribonucleic acid</i>)
MS	Massenspektrometrie
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (<i>Phosphate-buffered saline</i>)
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
PVDF	Polyvinylidendifluorid

RBP	RNA-bindende(s) Protein(e)
RIC	RNA Interaktom Erfassung (<i>RNA interactome capture</i>)
RIPA	Radioimmunpräzitationsassay
RNA	Ribonukleinsäure (<i>Ribonucleic acid</i>)
rRNA	ribosomale RNA
RNAi	RNA-Interferenz
RNAPI	RNA Polymerase I
RNAPII	RNA Polymerase II
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
RP	Ribosomales Protein
RPM	Drehzahl (<i>Revolutions per minute</i>)
RPL	Große ribosomale Proteine (<i>Large ribosomal proteins</i>)
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecylsulfate</i>)
siRNA	small interfering RNA
snoRNA	small nucleolar RNA
SSU	Kleine Unterheit (<i>Small subunit</i>)
STAGE	STop And Go Extraktion
UHPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>Ultra high performance liquid chromatography</i>)
UV	Ultraviolett

1. Zusammenfassung

Der humane Organismus besteht aus unzähligen, stetig proliferierenden Zellen. Fehler in diesem wichtigen Prozess können schwerwiegende Erkrankungen verursachen. Um dies zu vermeiden ist die Zelle mit zahlreichen Kompensationsmechanismen ausgestattet - unweigerlich wird dabei eine Stressreaktion ausgelöst. Genotoxischer Stress beschreibt dabei jegliche Ereignisse, die zu einer Veränderung der Zusammensetzung und Organisation des genetischen Materials führen kann. Die DNA Damage Response (DDR) ist ein komplexes Netzwerk aus Signalkaskaden, deren Ablauf durch unterschiedlichste Faktoren beeinflusst wird. Am Ende steht eine schicksalshafte Entscheidung: Wird der Zellzyklus angehalten, um die Schäden zu reparieren oder sind diese so ausgeprägt, dass die Apoptose eingeleitet werden muss, um die genomische Integrität zu wahren?

In dieser Arbeit wird der Apoptosis Antagonizing Transcription Factor (AATF) untersucht, welcher in dualistischer Manier als Dirigent zwischen Proliferation, Apoptose und Überleben fungiert. Einige hochrelevante Arbeiten, die in den letzten Jahren zum Verständnis der vielfältigen Rollen von AATF beigetragen haben, stammen aus dem nephrologischen Forschungslabor der Uniklinik Köln unter der Leitung von Prof. Dr. Bernhard Schermer. Darunter ist die Arbeit von Höpker *et al.* zu nennen, die bereits 2012 genau aufdecken konnte, wie AATF ähnlich einem phosphorylierungsabhängigen molekularen Schalter agiert und über die Tumorprotein 53 (p53) vermittelte Antwort im Rahmen der DDR entscheidet.¹ Es folgten zahlreiche weitere Projekte, die mehr und mehr Puzzleteile zum Verständnis unseres heutigen Bildes von AATF lieferten – dazu gehören auch die Interaktionspartner des Proteins. Unmittelbar vor meinem Promotionspraktikum konnte Frau Dr. Heide Heinen, ebenfalls unter Supervision von Frau PD Dr. Katja Höpker, ein umfassendes Interaktom von AATF erstellen. Im Rahmen proteomischer Analysen werden die Proteinnetzwerke einer Zelle oder gar eines ganzen Organismus untersucht. Besonders spannend ist hier, sich diese unter verschiedenen Konditionen anzuschauen, denn durch unzählige Mechanismen können Anpassungen, etwa in Form von veränderter Transkription, Translation oder posttranslationalen Modifikationen vorgenommen werden. Das Proteom ist somit ein höchst dynamisches Gebilde. Mithilfe der Proteomik und insbesondere der Technik der Massenspektroskopie stehen heute automatisierte Techniken zur Verfügung, um Proteine in großer Zahl zu identifizieren und quantifizieren.

Frau Dr. Heinen führte eine Analyse der Bindungspartner von AATF vor und nach einer Behandlung mit ultraviolettem (UV) Licht als Beispiel einer DNA-Schädigung durch. Im direkten

Vergleich zeigte sich, dass ein Großteil der Interaktionspartner in beiden Konditionen vorkommen. Hingegen konnten 74 Proteine nur nach UV-Behandlung signifikant angereichert werden. Hierunter befanden sich besonders viele ribosomale Proteine. Dreißig Interaktoren, darunter viele Zytoskelett-assoziierte Proteine, konnten nur im Interaktom ohne UV-Behandlung nachgewiesen werden.

Meine Experimente planten wir im Folgenden zur Validierung dieser Ergebnisse und Untersuchung einer alternativen zellulären Stressbedingung – der Hypoxie. Während die Validierung der unstimulierten Interaktoren unter einem leicht modifizierten Protokoll nicht vollständig gelang, konnte ich einen Großteil der Interaktionspartner durch bereits publizierte Arbeiten bestätigen und neue Interaktionen identifizieren. Funktionelle Analysen der Bindungspartner, die sich zwischen den beiden Konditionen am stärksten unterscheiden, offenbarten interessante neue Aspekte der zellulären Stressantwort. AATF konnte zudem als Protein im Fokus der ribosomalen Biogenese identifiziert werden. Nahezu 80 % der Interaktionspartner waren RNA-bindende Proteine. Daher planten wir weitere Versuche, die zeigen sollten, ob AATF mit seinen ribosomalen Interaktionspartnern direkt oder über RNA-bindende Proteine agiert. Diese Fragestellung konnten wir mittels einer Immunopräzipitation vorgeschalteten RNase Verdauung adressieren und sahen, dass die Mehrheit der Interaktoren nicht RNA-abhängig sind und somit direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen darstellen. Nur zwei Interaktoren waren vollständig RNA-abhängig. Die vorliegende Arbeit bietet damit neue Einblicke in die vielfältigen Funktionen des Proteins.

2.1.1. Struktur und Lokalisation

Das für AATF kodierende Gen sitzt auf Chromosom 17, ist 560 Aminosäuren lang und 63 Kilodalton (kDa) schwer. AATF besitzt zwei Leucin Zipper, zwei aminotermine saure Domänen, drei nukleäre und zwei nukleoläre Lokalisationssignale.⁸ Die C-terminale Domäne weist große strukturelle Ähnlichkeit mit dem Maus-Homolog „Traube“ auf und wird daher als Traube-Domäne bezeichnet.

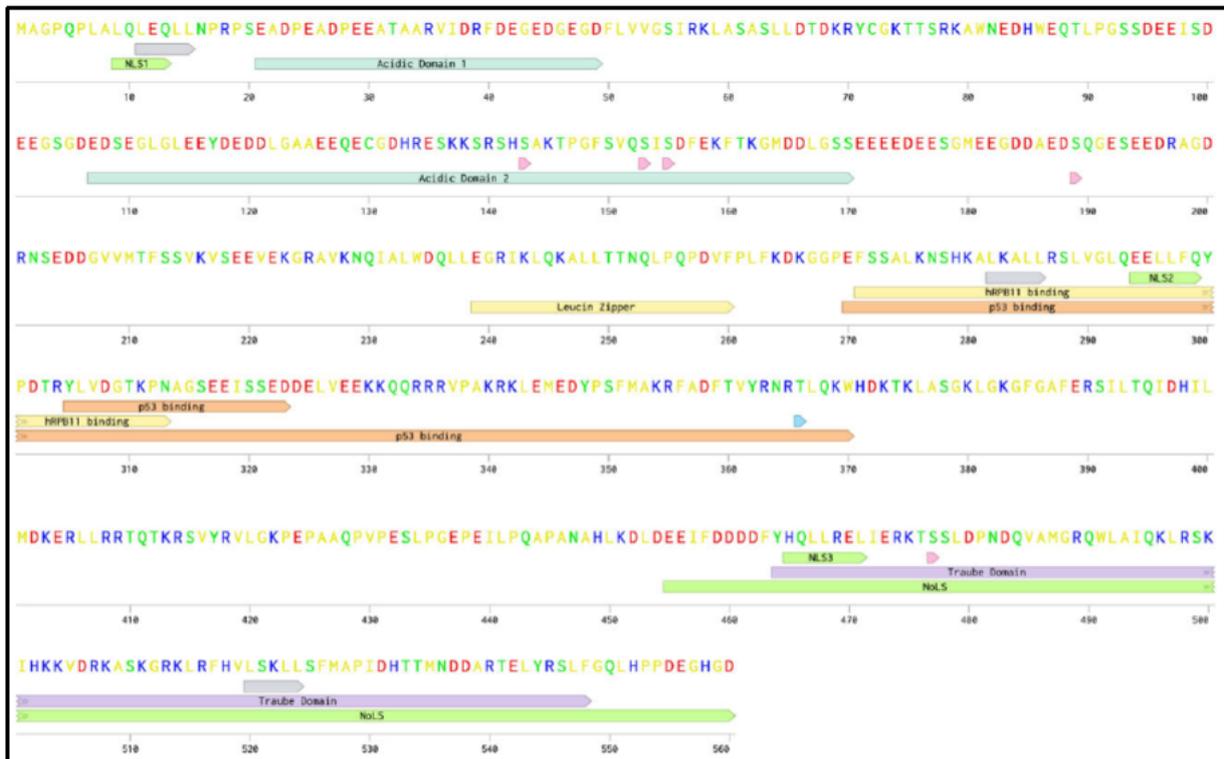


Abbildung 2: Aminosäurestruktur von AATF und funktionelle Residuen

AATF besitzt zwei nukleäre Lokalisationssignale (NLS), ein nukleoläres Lokalisationssignal (NoLS), zwei extrem saure Domänen und die Traube-Domäne. Zur Funktionsvielfalt tragen zahlreiche posttranslationale Modifikationen bei: Phosphorylierung, Poly (ADP)-Ribosylierung, Isomerisierung und Ubiquitinierung. Die Ziel-Aminosäurestrukturen für diese Modifikationen sind hier entsprechend gekennzeichnet. (Abbildung erstellt mit Benchling)

Während AATF zu Beginn als nukleäres Protein entdeckt wurde ist inzwischen bekannt, dass es darüber hinaus auch in das Zytoplasma, den Nukleolus, an Zentrosomen und an Zilien lokalisieren kann.^{1,6,9} Zu den Mechanismen, denen diese Translokationen zugrunde liegen, zählen vor allem posttranslationale Modifikationen: In ruhenden Zellen etwa liegt AATF in einem Komplex mit MRLC3 vor, bei DNA-Schäden wird AATF MK2-abhängig an Threonin 366 phosphoryliert, löst sich aus dem Komplex und wandert in den Zellkern.¹

2.1.2. Funktion

AATF stellt ein wichtiges Bindeglied zwischen Zellzykluskontrolle, DNA-Reparaturmaschinerie und ribosomaler Biogenese dar.

Zellzyklus

Eine zentrale Funktion von AATF ist die Zellzykluskontrolle an G1/S, G2/M und dem Spindelauflaufbau, wonach entweder die Proliferation fortschreitet oder der Zyklusarrest eingeleitet wird.¹⁰ AATF nimmt hier Einfluss, indem es die Histon-Deacetylasen 1 (HDAC1) aus dem Retinoblastoma-E2F-Transkriptionsfaktor (Rb-E2F)-Komplex und den für die p21-Expression verantwortlichen Transkriptionsfaktor Spezifitätsprotein 1 (Sp1) verdrängt und so die Zellproliferation bzw. den Wachstumsstopp an verschiedenen Kontrollpunkten des Zellzyklus sicherstellt.¹¹

Survival, Apoptose und DNA-Damage-Response

Wie der Name suggeriert, besitzt AATF eine anti-apoptotische Funktion. Diese wurden 1999 von Page *et al.* beschrieben und umfasst eine Interaktion mit Dlk, einer ZIP Kinase, die durch AATF antagonisiert wird.² Studien zur frühen Embryogenese zeigen, dass intaktes AATF eine grundlegende Voraussetzung für die Proliferation jeder Zelle ist.^{12,13} Weiter reguliert AATF den Mammalian Target of Rapamycin (mTOR)-Komplex unter Stressbedingungen. mTOR ist eine wichtige Serin/Threonin Proteinkinase, die das Zellwachstum, den Stoffwechsel und die Autophagie zur Aufrechterhaltung der zellulären Homöostase reguliert. Das Protein agiert über seine zwei verschiedenen funktionalen Komplexe mTORC1 und mTORC2. Während mTORC1 ein Regulator des Zellwachstums und der Proteintranslation ist, kontrolliert mTORC2 das Zellüberleben. AATF agiert hier über zwei wichtige mTORC1-Inhibitoren, Redd1 und Dep-
tor. Die Autophagie humaner Zellen wird dadurch gehemmt (mTORC1) und ein Überleben gefördert (mTOR2).¹⁴ Die Einleitung des Zelltodes ist ein wichtiger Mechanismus der DDR. Im murinen AATF Knock-Out Modell führte die Deletion von AATF in Lungentumoren zu einer deutlich gesteigerten Apoptose in den proliferativen Tumorzellen und somit zu einem Überlebensvorteil.⁷ 2012 beleuchteten Höpker *et al.* wie AATF mechanistisch Einfluss auf die p53-vermittelte Schadensantwort nimmt. Proliferierende Zellen sind auf eine intakte DDR angewiesen, um eine fehlerfreie DNA-Replikation zu gewährleisten, Zellintegrität zu wahren und Tumorentstehung zu verhindern. Diese sorgt für einen Zellzyklusarrest, um der Zelle Zeit für die Reparatur der Schäden zu geben oder den programmierten Zelltod einzuleiten, sollten irreparable Schäden vorliegen. Die DDR kann in drei Arme unterteilt werden: Zwei Signalkaskaden, die durch die Upstream Aktivator Kinase Ataxia Telangiectasia Mutated (ATM) und das Taxia

telangiectasia and Rad3-related protein (ATR). sowie deren Downstream Effektoren Checkpoint Kinase 1 (Chk1) und 2 (Chk2) agieren, sowie die p38 MAP Kinase und dessen Downstream Substrat MAPKAP Kinase-2 (MK2).¹⁵ Nach genotoxischem Stress wird AATF durch MK2 phosphoryliert, dadurch löst es sich vom zyttoplasmatischen Myosin-Leichte-Kette (MRLC3) und transloziert in den Nukleus, wo es den p53 up-regulated modulator of apoptosis (PUMA), BAX Bcl-2-associated X protein (BAX) und Bcl2-antagonist/killer (BAK) bindet, um die p53-gesteuerte Expression dieser pro-apoptischen Gene zu unterdrücken. Nach einer kürzlich ebenfalls von unserer Gruppe veröffentlichten Arbeit spielt AATF eine weitere Rolle als Modulator der DDR bei der Nephronophtise und Zilienregulation.⁶ Demnach können DNA-Schäden die proliferative oder antiproliferative Funktion von AATF auslösen, abhängig von der Schwere der verursachten Schädigung.

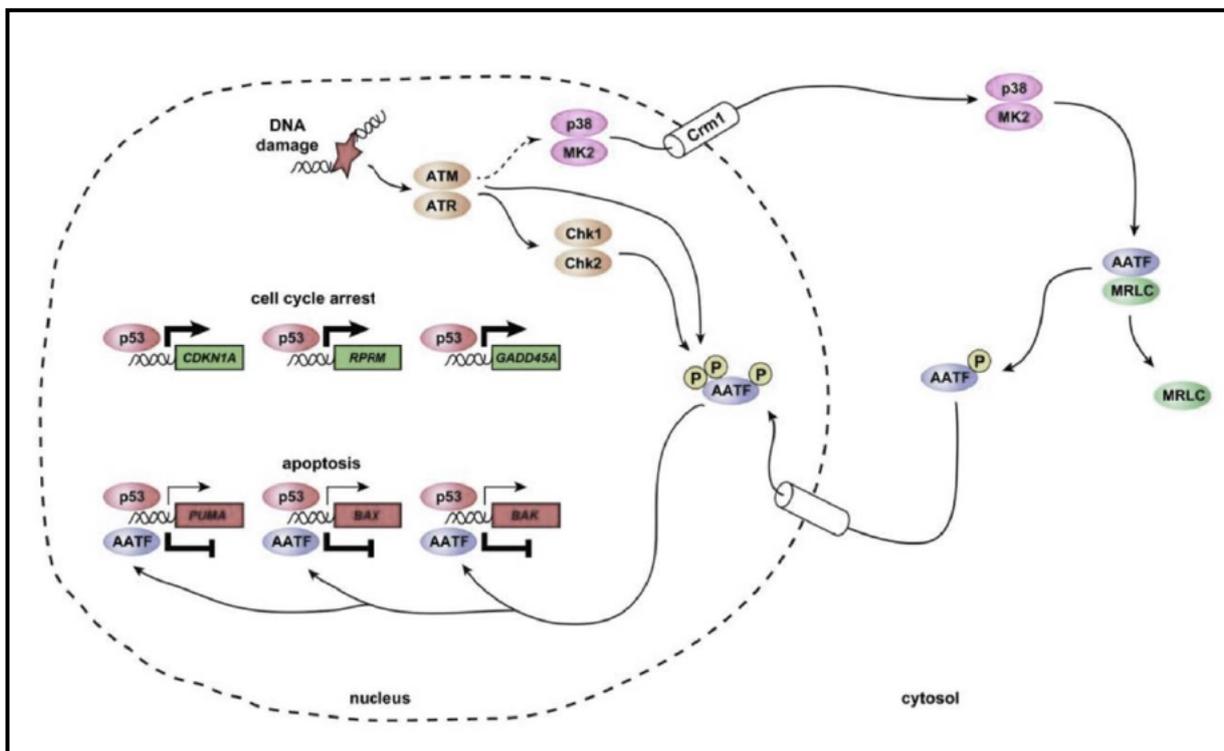


Abbildung 3: AATF ist ein Modulator der pro-apoptischen p53 Antwort.

Höpker *et al.* konnten AATF als molekularen Schalter in der DNA-Schadensantwort identifizieren. Das Protein befindet sich im Zytoplasma in einem Komplex mit MRLC3 in einem inaktiven Zustand. Die Checkpoint Kinase MK2 phosphoryliert AATF nach DNA-Schädigung und aktiviert das Protein. Dies führt zu einer Translokation in den Nukleus, wo AATF die Transkription p53-abhängiger pro-apoptischer Gene wie PUMA, BAX und BAK inhibiert. (Abbildung aus Höpker *et al.*, *EMBO Journal*, August 2012).

Translationale Überlegungen

Die oben beschriebene zentrale Rolle von AATF bei der Regulierung der Zellproliferation und Apoptose legt nahe, dass dem Protein bei der Entstehung maligner Erkrankungen fundamen-

tale Bedeutung zukommt. Damit kann AATF sowohl als Onkogen als auch als Tumorsuppressor wirken. Eine erhöhte Expression des Proteins wurde bei verschiedenen Krebsarten wie Brustkrebs, Leberzellkarzinomen, Leukämie, Lungenkrebs, Osteosarkomen und Wilms-Tumoren festgestellt, während bei Kolonkarzinomen der AATF-Spiegel runterreguliert wird.³ Bruno *et al.*, die AATF als wichtigen Faktor für die Reaktion von Kolonkarzinomzellen auf Hypoxie via Stabilisierung des Hypoxie-induzierbaren Faktors (HIF)1- α identifizierten, schlugen dies als metabolisches Ziel für die Tumorbehandlung vor.¹⁶ Auf Grundlage ihres Kirsten rat sarcoma virus (Kras) Modells in Lungenkarzinomzellen empfahl sich das Protein auch für Welcker *et al.* als vielversprechender Angriffspunkt für zielgerichtete Therapien.⁷ Höpker *et al.* konnten bereits 2012 nachweisen, dass eine Depletion von AATF die Empfindlichkeit von Tumorzellen gegenüber Chemotherapeutika erhöhen kann.¹ In der Folge und insbesondere in jüngster Vergangenheit wurden zahlreiche weitere Arbeiten veröffentlicht, die diesen Effekt bestätigten und zum Teil auch die verantwortlichen molekularen Mechanismen skizzieren konnten – in etwa bei Urothelkarzinomen,¹⁷ Kopf- und Halskarzinomen¹⁸ oder im Multiplen Myelom.¹²

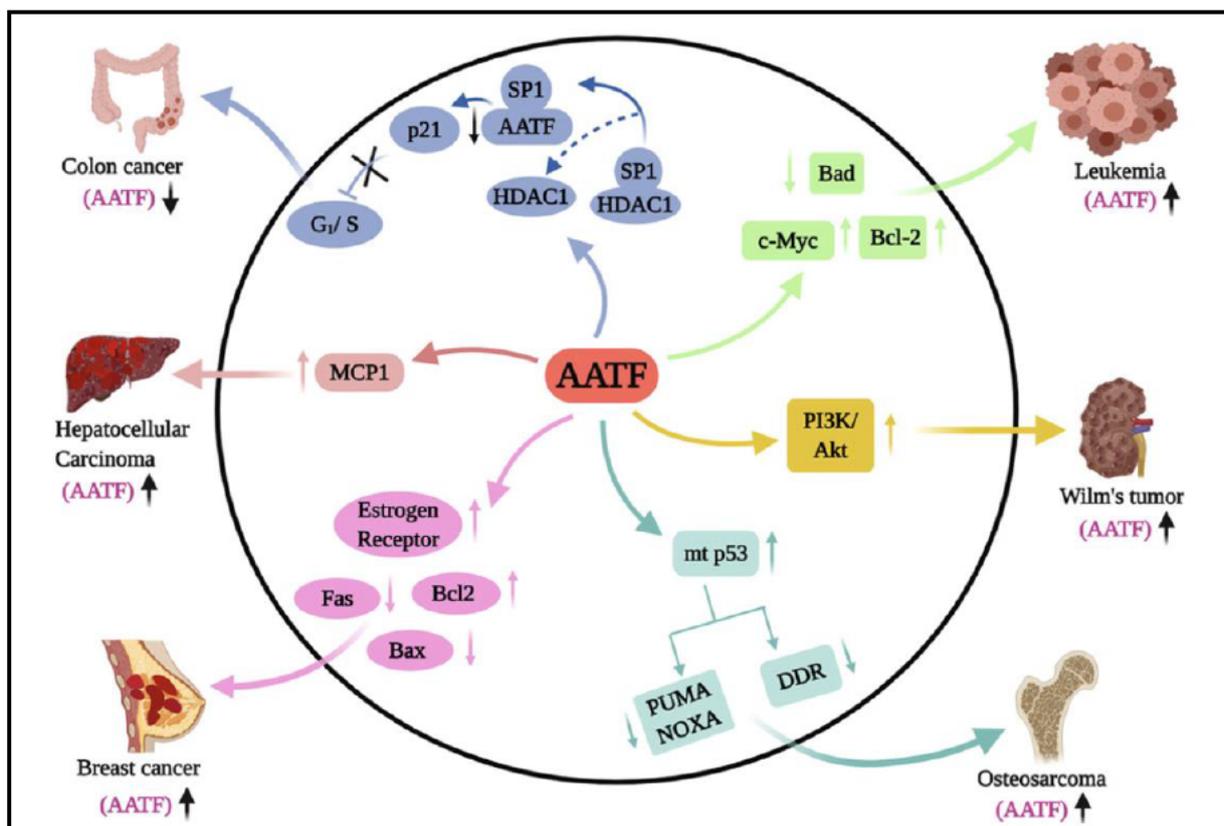


Abbildung 4: AATF in verschiedenen Tumoren

AATF fungiert als Onkogen in Brusttumoren, Lebertumoren, Leukämien, Osteosarkomen und beim Wilmstumor, in Kolonkarzinomen wird AATF jedoch runterreguliert (Abbildung aus Srinivas *et al.*, *J Cell Physiology*, Mai 2021).

Jüngste Studien haben darüber hinaus gezeigt, dass AATF auch bei nicht-malignen Erkrankungen wie dem Myokardinfarkt,⁴ Hashimoto-Thyreoiditis¹⁹ und Epilepsie²⁰ eine bedeutende

Rolle spielt. So konnte gezeigt werden, dass AATF die Hypoxie-vermittelte Apoptose von Kardiomyozyten durch Förderung des Nuclear factor erythroid like 2 (Nrf2) Signalwegs hemmt – und somit als therapeutisches Ziel für die Behandlung von Myokardinfarkten dienen könnte.⁴

2.2. Nukleolärer Stress, Integrität und Stabilisierung von p53

Der membranlose Nukleolus ist das größte Kompartiment des Zellkerns. Hier finden die ersten Schritte der Ribosomenbiogenese statt, er spielt eine bedeutende Rolle beim Aufbau von Ribonukleoprotein-Komplexen (RNP), steuert den Verlauf des Zellzyklus und erkennt Umweltstress. Die Ribosomenbiogenese verbraucht mit rund 80 % einen großen Teil der Energieresourcen einer Zelle und wird nicht zuletzt auch als ökonomische Rationale streng reglementiert.²¹ Zellulärer Stress wirkt sich dramatisch auf diese Vorgänge aus: Stoffwechselprozesse werden kompensatorisch angepasst und schließlich folgt – abhängig vom Ausmaß der Schädigung – die Entscheidung, den Zellzyklus zu stoppen oder die Apoptose einzuleiten. Dabei kommt dem Nukleolus eine tragende Rolle zu: Er kann Stress detektieren und als Schaltstelle der Stressantwort fungieren. Tut er dies, scheint der Nukleolus die Fähigkeit zu besitzen, sich völlig neu zu organisieren, sei es durch Veränderung seiner Größe, Segregation, Veränderungen der Zusammensetzung der Ribosomen-Untereinheiten oder Hemmung der ribosomalen RNA (rRNA) Synthese. „Nukleärer Stress“ ist ein eigener Terminus, der sich etabliert hat um zu beschreiben, mit welchen dynamischen Änderungen der Nukleolus auf alle Ereignisse reagiert, die die Ribosomenbiogenese beeinträchtigen könnten. Das kann jede Form von zellulärem Stress sein, wie DNA-Schäden, Nährstoffmangel, osmotischer oder thermischer Stress oder auch Hypoxie. Um nachzuvollziehen, warum dabei tiefgreifenden Änderungen der gesamten Zelle auftreten können, muss man zum einen berücksichtigen, dass der Nukleolus in fast alle Stoffwechsel- und Signalwege involviert ist. Zum anderen muss man ihn als selbst als hochdynamische Struktur begreifen.^{22 23} Zu den Anpassungen gehört die Auflösung der Nukleolarstruktur und Veränderung von Größe und Volumen des Nukleolus selbst sowie Hemmung der RNA Polymerase I (RNAPI)-vermittelten rRNA-Synthese und -prozessierung. Infolgedessen kommt es zur Störung der ribosomalen Assemblierung und der Proteintranslation. Es konnte zudem gezeigt werden, dass das nukleoläre Proteom außerordentlich anpassungsfähig ist – dass also alle Proteine, die in diese Prozesse involviert sind, stark in ihrer Expression variieren.^{24 25} Wenn man nukleoläre Proteine funktionell betrachtet wird klar, dass diese mehr als nur Akteure der Ribosomenbiogenese sind – sie sind außerdem stark verknüpft mit der Zellzykluskontrolle, Apoptose, DNA-Replikations- und Reparaturmaschinerie. Als „Hüter des Genoms“ kommt der Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 im Rahmen zellulärer Stressantworten eine zentrale Rolle zu. Mutationen finden sich in über 50 % aller humanen Krebszellen, in den meisten der verbleibenden Fälle ist der p53-Signalweg anderweitig gestört und

meist spielt hier die nukleoläre Integrität eine Rolle. Rubbi und Milner postulierten 2003, dass eine p53-Antwort in nahezu allen Fällen von einer Störung der nukleolären Integrität abhängt: Die Gruppe konnte zeigen, dass p53 tatsächlich nur dann infolge DNA-Schäden stabilisiert wird, wenn auch der Nukleolus zu Schaden kommt. Nukleoläre Schäden ohne DNA-Schäden konnten hingegen ebenfalls p53 stabilisieren.²⁶ Hiernach kann der Nukleolus als zentraler Koordinator bei der zellulären Stressreaktion begriffen werden.²³ Grundsätzlich können die Mechanismen, die zur Hochregulierung der Zielgene von p53 führen grob in die folgenden Kategorien eingeteilt werden: Veränderungen von Protein-Interaktionen, des Translationsprofils und über eine Störung des Mouse double minute 2 homolog (MDM2) Signalwegs.²⁷

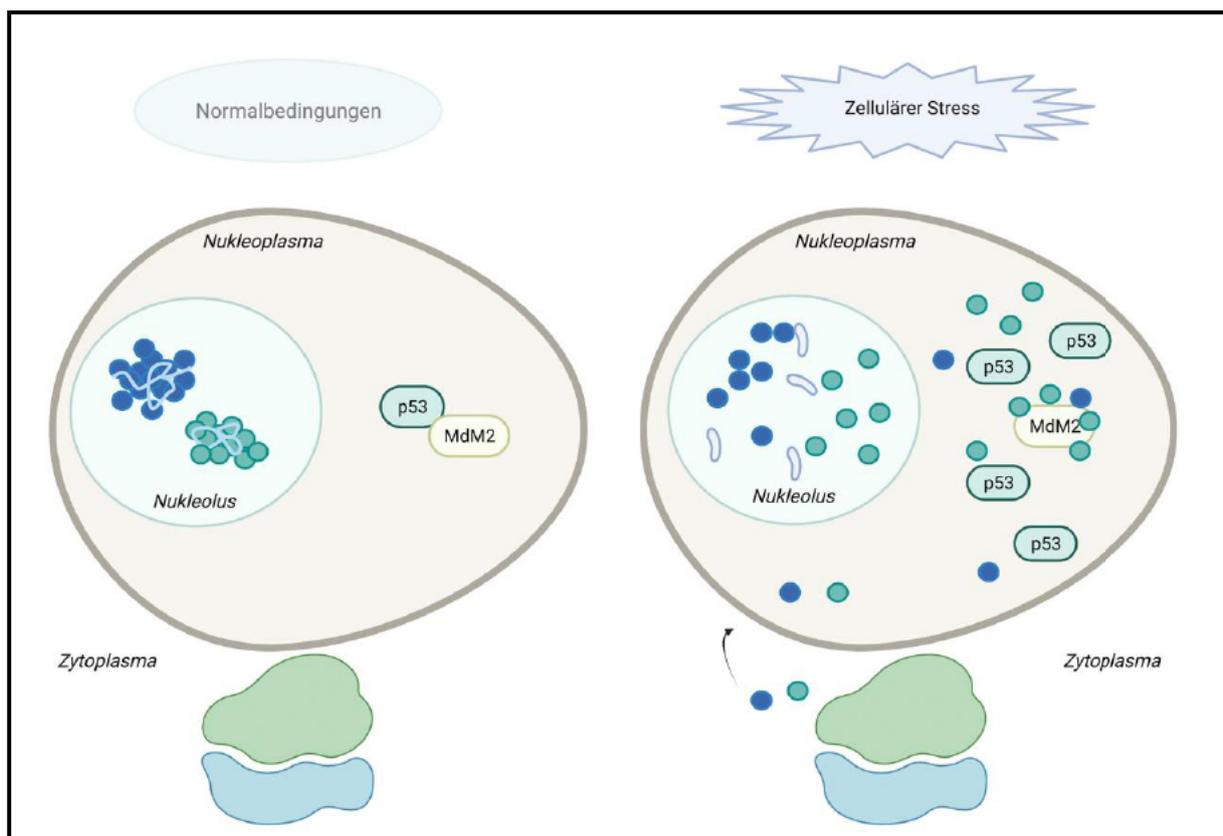


Abbildung 5: Der RP-MDM2-p53 Signalweg wird durch nukleolären Stress reguliert

Unter Normbedingungen werden die 40S und 60S Untereinheit des Ribosoms im Nukleolus zusammengesetzt und zur Proteinsynthese ins Zytoplasma überführt. Unter Stressbedingungen wird die Ribosomale Biogenese inhibiert und Ribosomale Proteine (RPL in grün und RPS in blau) ins Nukleoplasma transloziert, um dort mit MDM2 zu interagieren. Dadurch kommt es zur Stabilisierung und Aktivierung von p53. (Abbildung erstellt mit Biorender)

MDM2 fungiert auf zweifache Weise als negativer Feedback-Mechanismus für p53: Zum einen in seiner Funktion als E3 Ubiquitin Ligase, die p53 abbaut und zum anderen, indem es direkt an p53 bindet, dessen Transaktivierungsdomäne maskiert und damit eine Bindung an die Transkriptionsmaschinerie verhindert. Kommt es zu zellulärem Stress, interagieren ribosomale Proteine mit MDM2 und blockieren infolge die Ubiquitinierung und Abbau von p53²⁸ – was

zu dessen Akkumulation und Induktion eines p53-abhängigen Zellzyklusstopps und Apoptose führt. Der RP-MDM2-p53-Signalweg sorgt also für eine enge Koordinierung des Zellzyklusfortschritts (Zellproliferation) mit der Ribosomenbiogenese (Zellwachstum) und spielt eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der normalen Zellhomöostase und der Verhinderung von Zelltransformationen. Und auch für AATF wurde bereits eine wichtige mechanistische Rolle im MDM2-Signalweg beschrieben: Beim Überschreiten eines bestimmten Schwellenwerts für DNA-Schäden wird es durch die Prolyl-Isomerase 1 (PIN1) isomerisiert, durch die Homeodomain-interacting protein kinase 2 (HIPK2) phosphoryliert und zur anschließenden Ubiquitinierung dem nukleoplasmatischen MDM2 zugeführt.²⁷ Der dafür notwendige Trigger beinhaltet ebenfalls die Translokation von ribosomalen Proteinen ins Zytoplasma.

2.3. Ribosomen

Ribosomen sind hoch angereicherte, große RNA-Protein-Komplexe und stellen die Maschinerie der gesamten Proteinsynthese in der Zelle dar. Die Ribosomenbiogenese ist ein streng regulierter Prozess und besteht im Grunde aus drei Schritten: Die koordinierte Expression von rRNA und ribosomaler Proteine (RP), die Prozessierung der rRNA und die Assemblierung der ribosomalen Untereinheiten. Ribosomen kommen in allen Lebewesen vor, in Eukaryoten als 80S Ribosomen. S steht für den Sedimentationskoeffizient, gemessen in Svedberg. Dieser gibt an, wie schnell ein Teilchen in einer Zentrifuge absinken würde, er hängt also von Masse und Form ab. Das Ribosom besteht aus zwei Untereinheiten – der kleinen Untereinheit (SSU, small subunit), 18S rRNA und 33 RP und der großen Untereinheit (LSU, large subunit) mit 28S, 5.8S und 5S rRNAs und 46 RPs.³⁰ Drei der rRNAs (18S, 5.8S und 28S) werden von der RNAPI im Nukleolus transkribiert, während die 5S rRNA von der RNA-Polymerase III (RNAPIII) im Nukleoplasma transkribiert wird. Im Nukleolus erfolgt die Transkription der rRNA und die Bildung präribosomaler Strukturen, die in der Folge ins Nukleoplasma beziehungsweise Zytoplasma translozieren und dort zu funktionellen Ribosomen prozessiert werden. Eine bedeutende Rolle kommt dem SSU Prozessom zu – eine molekulare Maschinerie, die sich nochmals aufteilt in den small nucleolar ribonucleoprotein particle (snoRNP) und den U3 snoRNA (UTP) Komplex. SSU prozessieren die prä-ribosomale RNA zur Vorläufer Untereinheit 18S. Bei der Prozessierung zum funktionalen Ribosom sind über 500 Proteine involviert.³¹ Viele davon sind RNA-bindende Proteine (RBP). Dabei beinhalten einige dieser Proteine keine klassische Domäne, um rRNA zu binden. Pineiro *et al.* haben mit der Veröffentlichung ihres „RNAPI RNA Interaktoms“ bedeutend zum Verständnis darüber beigetragen, in welchem Ausmaß RNA-Protein Interaktionen hier indirekt an der Kontrolle der Ribosomenbiogenese beteiligt sind. Dafür wurde ein RNA-Protein-Interaktom nach Inhibierung der RNA Polymerase I erstellt.

Was AATF betrifft, führte ein Knock-out in Mausembryonen zu einer verringerten Anzahl an Ribosomen – diese Mäuse waren schließlich nicht lebensfähig.¹³ Bammert *et al.* zeigten mittels RNA Interferenz (RNAi) basierendem Screening, dass AATF eine Rolle in der Synthese der 40S Untereinheit der Ribosomen spielt und postulierten, dass der Komplex aus Neuroguidin (NGDN), Nucleolar Protein 10 (NOL10) und AATF im AATF-NGDN-NOL10 =ANN Komplex ein struktureller Teil des SSU Prozessoms sein könnte und damit an der Biogenese der ribosomalen 40S Untereinheit im Nukleolus beteiligt ist.³² Es konnte gezeigt werden, dass jeder Teil des Komplexes für die Reifung der 18S rRNA unerlässlich war. Die Bindungen innerhalb des Komplexes erfolgen zwischen AATF und NGDN über die konservierte Domäne von AATF (AATF/Che1/Traube-Superfamily Domain AATFD) und die UTP3 Domäne von NGDN. Die Interaktion mit NOL10 dagegen schien über eine WD40 Domäne vermittelt zu sein. Pineiro *et al* zeigten mit ihrem „RNAPI-RNA-Interaktom“ bereits, dass die Bindung zwischen dem Komplex aus AATF mit NGDN und NOL10 am ehesten RNA-Protein vermittelt ist. Die potenzielle klinische Bedeutung liegt darin, die so genau ermittelten Signalwege als Zielstrukturen für neue Tumorthérapien zu nutzen. Schließlich ist die Ribosomenbiogenese mit vielen zellulären Signalwegen verknüpft und Defekte können zu einer Vielzahl menschlicher Erkrankungen führen. Eine Interaktion mit bekannten Onkogenen wie c-myc und Tumorsuppressoren wie p53, Retinoblastom Protein (Rb) und p14ARF ist bekannt.²²

2.4. RNA-bindende Proteine sind Effektoren der Genexpression

RNA-bindende Proteine umfassen eine heterogene Gruppe von Molekülen, die Ribonukleinsäuren durch deren Lebenszyklus von der Transkription, Translation, Modifikation und beim intrazellulären Transport und Abbau begleiten. Damit bilden sie bedeutende Effektoren der Genexpression. Die RBP-Familie ist eine der größten Proteingruppen in der Zelle. Inzwischen wird postuliert, dass es über 4257 RBPs gibt³³ wohingegen drei Jahre zuvor noch von knapp 1500 RBPs ausgegangen wurde.³⁴ Dieser Zuwachs ist unter anderem Methoden wie der RNA interactome capture (RIC) zuzuschreiben.

RBPs sind an zahlreichen humanen Erkrankungen beteiligt. Die Zahl der krankheitsassoziierten RBPs umfasst über 1000 Proteine, diese spielen unter anderem bei neurodegenerativen, malignen und Infektionserkrankungen eine Rolle. Dennoch mangelt es noch an einem umfassenden pathomechanistischen Verständnis der Funktionen der einzelnen RBPs und welche Komplexe diese bilden.

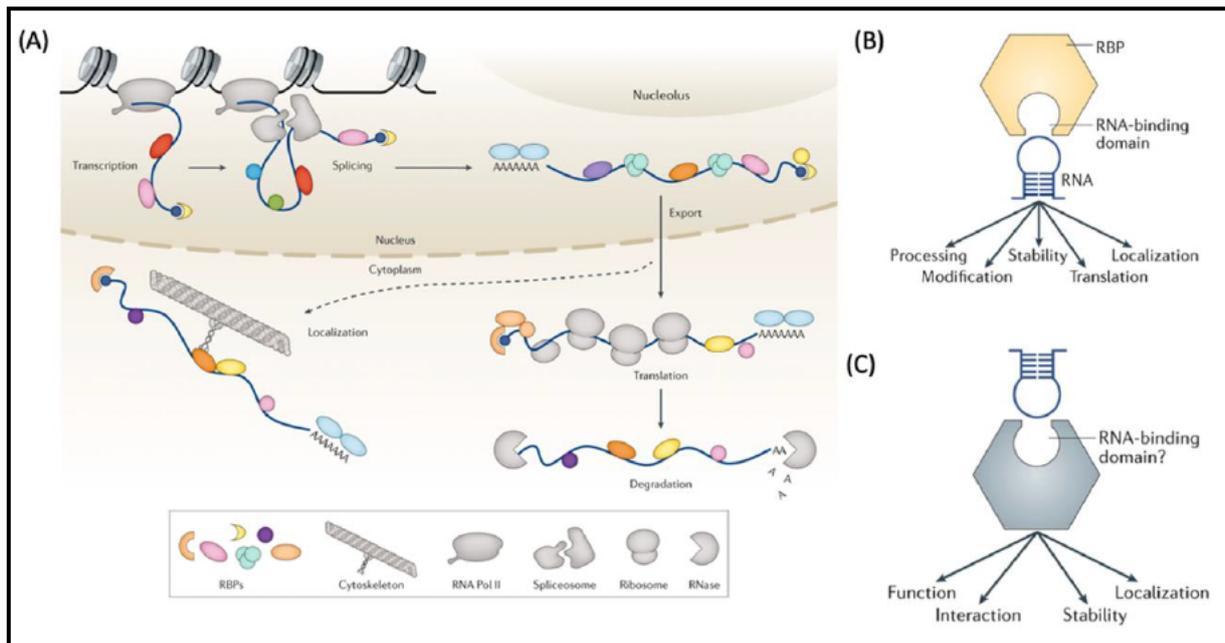


Abbildung 6: Diversität von RNP

(A) Nukleäre und zytoplasmatische Schritte des mRNA-Metabolismus. (B) Ein RBP kann über definierte RNA-bindende Domänen mit RNA interagieren. (C) Umgekehrt kann die RNA an das RBP binden, um dessen Schicksal zu beeinflussen (Abbildung aus Gebauer et al., *Nature Reviews Genetics*, März 2021).

2.5. Hypoxie und zelluläre Stressreaktion

Unter Hypoxie versteht man eine Verringerung des physiologischen Sauerstoffgehalts. Dabei führt chronische Hypoxie zu einer unkontrollierten Proliferation und Angiogenese. Im Gegensatz dazu führt eine akute Hypoxie zu einer erhöhten Konzentration von Sauerstoff im Gewebe, welches als freies Radikal wirkt und Gewebsschäden und Aktivierung von Stressantworten auslöst.³⁵ Die Regulation erfolgt hauptsächlich über die Familie der Transkriptionsfaktoren der HIF Familie insbesondere HIF-1 α .³⁶ Dieser reguliert die Expression zahlreicher Gene, die an Proliferation, Apoptose, Immunantwort, genomischer Instabilität, pH-Homöostase, Invasion und Metastasierung beteiligt sind. Zahlreiche Studien belegen die aktive Beteiligung von AATF in zellulären Adaptationsmechanismen nach unterschiedlichen Stressstimuli neben DNA-Schaden – darunter Glukosemangel, ER-Stress, hyperosmotischen Stress und Hypoxie.³ Wieviel wissen wir bisher darüber durch welche Mechanismen AATF bei Hypoxie agiert?

SIAH-2 ist ein Mitglied der E3 Ubiquitin Ligase Familie und in den Abbau der Hydroxylase Egl nine homolog 3 (EGLN3), dem Hauptmodulator der HIF-1 α Stabilität, involviert. Für die Ex-

pression von SIAH konnte eine Abhängigkeit von AATF nachgewiesen werden.¹⁶ Somit stabilisiert AATF die Bildung von HIF-1 α . Xie und Guo identifizierten AATF als zytoprotektiven Faktor gegen oxidativen Stress in Tubuluszellen der Niere.³⁷ Studien an kolorektalen Karzinomzellen haben zudem gezeigt, dass AATF für die zelluläre Anpassung an hypoxische Bedingungen und metabolische Modulationen verantwortlich ist. Im Rahmen von myokardialen Ischämien und anschließender Reperfusion führt der plötzliche Verlust der Sauerstoff- und Nährstoffzufuhr analog zu den oben beschriebenen Mechanismen zur Überproduktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und aktiviert die Apoptose. Die Rolle von AATF an diesem Mechanismus konnte anhand eines *in-vitro*-Modells gezeigt werden – das Silencing von AATF förderte die Apoptose und oxidativen Stress, während die Überexpression schützende Effekte zeigte. Die molekulare Grundlage hierzu konnte ebenfalls skizziert werden – AATF fördert die Expression von Nrf2 und damit nachgeschalteter Zielgene.⁴ Ähnliche Ergebnisse wurden in *in-vitro*-Studien an neuronalen Zellen zum Schutz vor zerebralen Ischämie-/Reperfusionsschäden erzielt. Die Überexpression von AATF schützt vor neuronaler Apoptose, die durch Sauerstoff-Glukose-Entzug und Reoxygenierung ausgelöst wurde. AATF moduliert die p53-vermittelte proapoptotische Geneexpression via PUMA, NOXA und BAK und förderte das Überleben der Zellen unter diesen Stressbedingungen.³⁷ Autophagie und Zellüberleben werden über den mTOR Signalweg gefördert. Über den oben genannten Mechanismus und Inhibierung von mTOR1-Aktivität bei Aktivierung der mTORC2-Aktivität kann AATF unter Stressstimuli den Energiebedarf drosseln.¹⁴

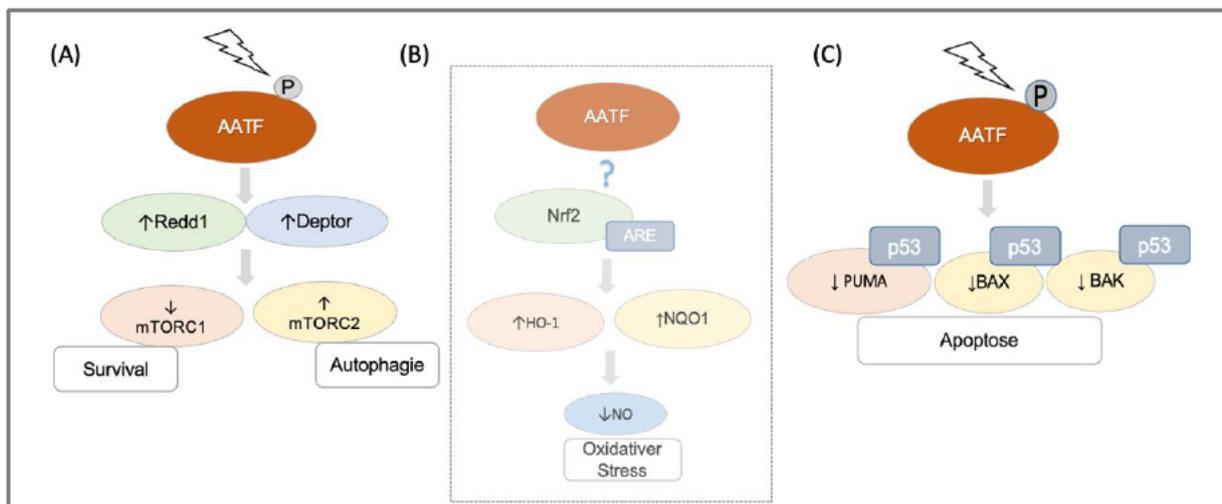


Abbildung 7: AATF und Hypoxie-vermittelter zellulärer Stress. Förderung von Zellzyklusarrest und Survival und Hemmung der Apoptose

(A) AATF wird an die Promotoren Redd1 und Deptor rekrutiert und sorgt dafür, dass bevorzugt der mTORC2 Signalweg abläuft. Hierdurch werden Autophagie und Überleben gefördert. (B) AATF fördert die Expression von Nrf2 und nachgeschalteter Zielgene wie HO-1 und NQO1 über einen bisher nicht vollständig bekannten molekularen Mechanismus. (C) AATF inhibiert die Transkription der p53-vermittelten proapoptotischen Gene wie PUMA, NOXA und BAK. (Abbildung erstellt mit Biorender)

2.6. Ziel dieser Arbeit

Unsere Gruppe erstellte 2015 ein umfangreiches AATF-Interaktom mittels Massenspektrometrie vor und nach dem Einfluss von UV-Strahlung.³⁸ Auf Grundlage des Wissens um die Phosphorylierung als molekularen Schaltermechanismus zur Aktivierung und Translokation von AATF im Rahmen der DDR sollte untersucht werden, zu welchen direkten Änderungen des Interaktionsprofils AATF dies führt. Insgesamt konnten unstimuliert 142 und nach UV-Behandlung 186 signifikant angereicherte Proteine identifiziert werden. Einige zu diesem Zeitpunkt bereits publizierte Bindungspartner wurden hier bestätigt, darunter auch die kurz zuvor publizierte Interaktion im p53-unabhängigen ANN Komplexes als Teil der Ribosomenbiogenese im Nukleolus – dies legte die Vermutung nahe, dass AATF hier eine Schnittstelle zur DNA-Schadensantwort bietet. Im direkten Vergleich der Bindungspartner vor und nach UV-Bestrahlung zeigte sich, dass ein Großteil der Interaktoren in beiden Konditionen vorkommen. Hingegen konnten 74 Proteine nur nach UV-Bestrahlung signifikant angereichert werden. Hierunter befanden sich besonders viele ribosomale Proteine. 30 Interaktoren – darunter viele Zytoskelett-assoziierte Proteine – konnten nur im Interaktom ohne UV-Bestrahlung nachgewiesen werden.

Diese Unterschiede des Interaktoms vor und nach UV-Radiation warfen die Frage auf, welche weiteren Erkenntnisse ein Experiment unter alternativen Stressfaktoren für die Zelle ergeben könnte. Schließlich gibt es wie oben skizziert mehrere Arbeiten die zeigen, dass AATF auch in die zellulären Adaptationsmechanismen bei Glukosemangel, ER-Stress, hyperosmotischen Stress und Hypoxie stark eingebunden ist.³ Daher soll hier ein Vergleich der Interaktionen nach UV-Radiation und Hypoxie-Behandlung erfolgen. Wir wählten die Hypoxie aus, da uns hierzu gut validierte Protokolle vorlagen, der Erfolg der Behandlung durch Nachweis von γ H2X zweifelsfrei nachzuweisen ist und die Literatur interessante Schnittstellen zur DDR und Karzinogenese suggerierte. Die gewonnenen Daten gaben zudem weitere Hinweise darauf, dass AATF bei der RNA-Bindung und Ribosomen-Biogenese agiert, da viele der Interaktoren ribosomale Proteine waren – insbesondere nach UV-Behandlung. Ob der AATF Komplex abhängig von direkten RNA-Bindungen ist oder AATF ein RNA-bindendes Protein ist, war allerdings zu diesem Zeitpunkt unklar. Daher sollten hier weitere proteomische Analysen des AATF-Interaktoms folgen – allerdings sollte das AATF-Immunpräzipitat unter normalen Ruhebedingungen mit RNase behandelt werden, um RNA-gerichtete Bindungspartner in den nachfolgenden Waschschritten freizusetzen. Anschließend sollen die Immunpräzipitationen der Negativkontrolle, der unbehandelten und der mit RNase behandelten F/HA.AATF-Proben miteinander verglichen werden. Spannend wäre es, Interaktoren zu identifizieren, die in den zahlreichen publizierten Signalwegen vorkommen.

Nachfolgende Arbeiten könnten dann neue Schlüsselfiguren für pathophysiologische Überlegungen herausarbeiten. Mein Ansatz war dabei, gezielt beispielsweise nach Akteuren des Nrf2 Pathways oder auch des Glukosestoffwechsels zu suchen. Ein weiteres Ziel war zudem, nach Interaktionen zu suchen, die in Zusammenhang mit metabolischen Veränderungen der Zelle stehen, da die Aktivität von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen dazu beiträgt, den Glukosestoffwechsel der Zellen von oxidativ auf glykolytisch umzustellen.

Zeitgleich sollte diese Arbeit dazu dienen, das erstellte Interaktom unserer Gruppe zu validieren – insbesondere unter dem Aspekt, dass zahlreiche bis *dato* unbekannte AATF-Interaktoren gefunden wurden. Grundsätzlich trägt die Validierung von wissenschaftlichen Ergebnissen essenziell dazu bei diese zu bewerten und gehört zur guten wissenschaftlichen Praxis.

Welche Hypothesen liegen also den geplanten Versuchen zugrunde?

Hypothese 1

Die Hypoxiebehandlung wirkt sich auf die Bindungspartner von AATF aus

Einige Interaktionen werden verloren gehen, einige Interaktoren werden vermehrt angereichert vorkommen.

Hypothese 2

Die Interaktome der unstimulierten Konditionen stimmen weitgehend miteinander überein

Das folgende Interaktom von AATF stimmt ohne die Behandlung mit Hypoxie bzw. RNase mit dem bereits publizierten Interaktom vor der UV-Radiation überein.

Hypothese 3

AATF ist ein RNA-bindendes Protein

Wir wissen bereits, dass AATF mit vielen RNA-bindenden Proteinen interagiert. Bisher wurde jedoch nicht nachgewiesen, dass es sich um eine direkte Protein-Protein-Interaktion handelt.

3. Material und Methoden

3.1. Material

Reagenzien	Hersteller
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich
cOmplete™ Protease inhibitor cocktail tablets (PIM)	Sigma-Aldrich
Deoxynucleotide (dNTP) Solution Mix	New England Biolabs
Deoxyribonukleotidtriphosphat (dNTP) Set	Thermo Scientific
Doxorubicin	Thermo Scientific
GeneRuler 1 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
GeneRuler 50 bp DNA Ladder	Thermo Scientific
HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure)	Sigma-Aldrich
Normal Donkey Serum (NDS)	Dianova/Jackson
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Thermo Scientific
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
ProLong® Gold Antifade Mountant with DAPI	Thermo Scientific
Puromycin	Invivogen
Triton® X-100	Merck Millipore
cOmplete™ Protease inhibitor cocktail tablets (PIM)	Roche
RNase I	Thermo Scientific
Benzonase	Thermo Scientific

Puffer	Zusammensetzung
2x Calciumchlorid-Lösung	0,25 M CaCl ₂
2x Hepes buffered saline (HEBS)	50 mM HEPES; 280 mM NaCl; 10mM KCl; 1,5 mM Na ₂ HPO ₄ ; 12 mM Dextrose, pH 7,09
Enhanced Chemo Luminescence (ECL)-Lösung	100 mM Tris pH 8,5, 1.25 mM Luminol, 0,2 mM Coumarinsäure, 0,75% H ₂ O ₂
Laemmli-Puffer (2x)	0,002% Bromphenolblau, 0,1 M DTT, 20% Glycerol, 4% SDS, 150 mM Tris HCl pH 6,8
Modifizierter RIPA Puffer	10 mM Tris pH 8,1 mM EDTA, 0,5 mM EGTA, 1% Triton X-100, 0,1% Natrium-Deoxycholat, Protease-Inhibitor
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (20X)	Thermo Scientific (NP0001)
NuPAGE® Transfer Buffer (20X)	Thermo Scientific (NP0006)
PFA-Fixationslösung	4% Paraformaldehyd in PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	4,5 mM Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O, 2,84 mM KCl, 1,54 mM KH ₂ PO ₄ , 144 mM NaCl
SDS-PAGE Laufpuffer	192 mM Glycin, 0,1% SDS, 25 mM Tris Base
SDS-PAGE Transferpuffer	187 mM Glycin, 0,1% SDS, 25 mM Tris Base, 15% Methanol
SDS-PAGE Waschpuffer	90 mM NaCl, 9 mM Tris HCl pH 7,5, 0,1% Tween-20
TAE-Puffer	10 mM Essigsäure, 0,0005% Ethidiumbromid, 1 mM EDTA, 22 mM Tris
IP- Wasch Puffer 1	50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5% Glycerol, 0,05 % Triton-X-100n
IP- Wasch Puffer 2	50 M HEPES, 150mM NaCl
IP- Digestions Puffer	2M UREA, 25 mM HEPES, 1 mM DTT, 5ng/ml Trypsin
IP- Elutions Puffer	2M UREA, 25 mM HEPES, 5mM Iodoacetamide

IP- RNase Puffer	1U/µl Benzonase, 0,04 U/µl RNase
Stage Tip P1	P1: 100 mM NaH ₂ PO ₄
Stage Tip P2	P2: 100 mM Na ₂ HPO ₄
Dimethyl-Labeling	A1: 600 mM NaBH ₃ CN, A2: 600 mM NaBD ₃ CN F1: 4% Formaldehyde, F2: 4% Formaldehyde Light: 1,35 ml Phosphate buffer, 75 µl A1, 75 µl F1 Medium: 1,35 ml Phosphate buffer, 75 µl A1, 75 µl F2 Heavy: 1,35 ml Phosphate buffer, 75 µl A2, 75 µl F3 Puffer A: Waschpuffer 0,1 % Ameisensäure Puffer B: Elutionspuffer 80% Acetonitril 0,1 % Ameisensäure

Zellkultur	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Thermo Scientific
DMEM F-12 HAM + HEPES	Sigma
FBS (Fetal Bovine Serum)	Biochrom AG
Hygromycin	Sigma
Doxycyclin	Sigma
Trypsin 0,05 %	Sigma

Gegenstand aller Versuche waren HEK 293T Flp-In™ T-REx™ Zellen (Invitrogen). Dabei handelt es sich um humane embryonale Nierenepithelzellen mit einem stabil integrierten, induzierbaren FLAG/HA-getagtem AATF bzw. GFP Protein (generiert von Melanie Schächter). Diese Zellen enthalten eine stabil integrierte FRT-Stelle an einem transkriptionsaktiven Genomlocus. Die Flp-In™ T-REx™ 293-Zelllinie enthält pFRT/lacZeo und pcDNA™ 6TR (aus dem T-REx™ -System). Zunächst erfolgt die Integration von zwei Plasmiden in das Genom der HEK Zelle, um eine Flp-In™ T-REx™ Wirtszelllinie zu erzeugen. Dann wird ein Expressionsvektor integriert, der den FLAG Tag mit Tetracyclin-induzierbarem Promotor enthält und in das Genom über Flp-Rekombinase-vermittelte DNA-Rekombination integriert.³⁹

Antikörper	Hersteller
Anti GFP Microbeads	Miltenyi Biotech
Anti DYKDDDDK Microbeads	Miltenyi Biotech
FLAG (M2)	Sigma-Aldrich
GFP (B2)	Santa Cruz BioTech
Hif1a	Cayman Chemical
Beta Tubulin (E7)	Developmental Studies

Geräte	Hersteller	Gerätenummer
Bioruptor® Pico sonication device	Diagenode	B01060001
Inverses Labormikroskop	Leica	DM IL LED Fluo
Massenspektrometer	Q Exactive HF EASY 1000	-
Mikrozentrifuge	VWR	MiniStar silverline
Mikrozentrifuge	Eppendorf	5415R
The Trans-Blot® SD semi-dry transfer cell	Bio-Rad	170-3940
Typhoon Scanner	GE Healthcare	-
UA-6 Detektor	Teledyne ISCO	-
Ultrazentrifuge Optima™ L-80XP BioSafe	Beckman Coulter	A20683
Zentrifuge	Eppendorf	5810R

3.2. Methoden

Zellkultur

Um Kontaminationen zu vermeiden, erfolgten alle Arbeiten an einer Werkbank mit sterilem Abzug. Die Materialien waren steril verpackt und die unter dem Abzug verwendeten Lösungen wurden vor ihrem Einsatz steril filtriert oder autoklaviert. Arbeitsfläche und Geräte wurden mit 70% Ethanol desinfiziert. Die Kultivierung der verwendeten Zelllinien erfolgte im Brutschrank bei 37°C in feuchter Atmosphäre und 5% Kohlenstoffdioxid (CO₂) Begasung. Die Subkultivierung der Zellen erfolgte mittels 1:6 Passagierung 70-80 % konfluenter 10 cm Schalen. Dies war in der Regel nach zwei Tagen Inkubation der Fall, wurde jedoch stets vorab unter dem Mikroskop überprüft. Die Zellen wurden behutsam mit eiskalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) gespült. Nach Zugabe von 1 ml Trypsin zur Ablösung erfolgte eine zweiminütige Inkubation im Brutschrank. Die gelösten Zellen wurden nun sorgfältig mit 11 ml Medium gespült und durch Auf- und Abpipettieren vereinzelt. Zur 1:6 Passagierung wurden jeweils 2 ml des Zellgemisches auf 6 Schalen ausgesät, in die bereits jeweils 8 ml frisches Medium vorgelegt worden war. Durch anschließende Zugabe von 16 µl Hygromycin erfolgte die Selektion der Hygromycin resistenten Zellklone, womit vornehmlich das Wachstum der für die nachfolgenden Experimente benötigten FLAG-getaggten Zellen gefördert wurde. Vor den jeweiligen Experimenten wurden Zellen mit im Western Blot gesicherter Expression bei kleiner Passage eingefroren. Für jedes Replikat wurden Zellen aus diesem Kontingent aufgetaut und dem Experiment zugeführt, um stets alle Replikate mit der gleichen Passagierung durchführen zu können. Pro Replikat wurden jeweils sieben zu 80% konfluente 10 cm Schalen benutzt. Eine Mykoplasmen Kontamination wurde regelmäßig mittels PCR Mycoplasma Test Kit I/C (Venor GeM, Sigma) ausgeschlossen.

Zellernte

Die Zellen wurden im Medium geerntet und in gekühlte 10 ml Falcon Röhrchen überführt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 1000 Umdrehungen (revolutions per minute, rpm) und 4°C für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet mit eiskaltem PBS gewaschen und in ein Eppendorf Gefäß (Eppi) überführt. Es erfolgte die erneute Zentrifugation bei 1000 rpm und 4°C für 5 Minuten.

Zellyse

Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet in modifiziertem Radioimmunpräzipitations (RIPA)-Puffer suspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Es erfolgt zunächst die Zentrifugation bei voller Geschwindigkeit für 15 min bei 4°C und eine erneute Ultrazentrifugation des

Überstandes für 30 min und 45000 rpm bei 4°C. Ein Teil des Überstandes (30 µl) wurde für spätere Analysen mit dem gleichen Anteil Laemmli-Puffer versetzt, bei 95°C für 5 min gekocht und eingefroren. Der restliche Überstand wurde in ein neues Eppi-Gefäß überführt und für die nachfolgende IP genutzt. Um die ganze Zelle aufzuschließen, wurden die Lysate anschließend im Ultraschallbad behandelt. Die Bestrahlung erfolgt mit dem Bioruptor Sonicator nach festgelegtem Schema: 30 sek Bestrahlung und 30 sek Pause in zehn Zyklen und anschließende Inkubation auf Eis für 10 min. Anschließend sollte die Fraktionierung der Membranen und DNA erfolgen. Dazu macht man sich die Scherkräfte zu nutzen, indem die Lysate dreimalig mithilfe einer Spritze zunächst durch eine 23G Kanüle gedrückt werden und der Kanüldurchmesser sukzessive bis auf eine 30G Kanüle reduziert wird. Das Gemisch wurde für zwei Stunden bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Unter sorgfältigem Schutz vor Kontaminationen (insbesondere in Form von Hautschuppen, Staub und Detergenzien) wurde die µMACS Säule im Kühlraum aufgestellt, um anschließend die Proben darauf zu laden. Zunächst erfolgte die Equilibrierung der Säule mit eiskaltem modifiziertem RIPA Puffer. Modifiziert wurde der RIPA Puffer in dem Sinne, dass kein Natriumdodecylsulfat (SDS) enthalten war, sondern das Detergens Nonidet P-40 (IGEPAL) und eine geringere Konzentration des ionischen Detergenz Natriumdeoxycholate (0,25%) genutzt wurde. Hintergrund ist, dass im Hinblick auf die MS Analyse physiologische Protein-Protein Interaktionen nicht durch stark ionische Detergenzien verhindert werden sollten und eine starke Denaturierung der Proteine erst nach der Immunpräzipitation erfolgen sollte. Es wurde ein Protease Inhibitor zugesetzt. Den Proben, die keiner RNase Behandlung zugeführt wurden, wurde zusätzlich ein RNase Inhibitor zugefügt. Dann wurden die Lysate mit den Beads auf die Säule geladen und der Durchfluss in einem Eppi-Gefäß aufgefangen. Dieser Schritt wurde mehrfach wiederholt, bis die durch die Proteine verursachte gelbe Färbung des Lysates vollständig verschwunden und der Durchfluss transparent war. 50 µl des Durchflusses wurde in Laemmli-Puffer resuspendiert und für weitere Immunoblot-Analysen aufbewahrt. Für die Erforschung der RNA-abhängigen Protein Interaktoren erfolgte bei der Hälfte der Proben ein RNA Verdau auf der Säule durch Zugabe von 25 µl RNase/Benzonase Puffer mit einer Inkubationszeit von 30 min. Das applizierte Volumen richtete sich dabei nach dem Hohlraumvolumen der Säule, das ebenfalls 25 µL beträgt. Für die Replikate ohne RNase Behandlung wurde stattdessen Waschpuffer 1 geladen, im Hypoxie Experiment fiel dieser Schritt aus. Nachfolgend erfolgte eine dreimalige Waschung mit Waschpuffer 1 und fünfmalige Waschung mit Waschpuffer 2. Dann wurde die partielle Digestion des gereinigten Proteinkomplexes durch Zugabe von 25 µL Digestionspuffer gestartet und für 30 min inkubiert. In diesem Schritt wurden die Proteine mittels Urea denaturiert und mittels des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) chemisch modifiziert, damit sie in einem Zustand der offenen Konformation verbleiben. DTT reduziert die Disulfidbrücken des Proteins zu freien Thiolgruppen.

Durch Trypsin erfolgte ein erster proteolytische Verdau. Anschließend wurde durch zweimalige Zugabe von 50 µL Elutionspuffer die vollständige Digestion initiiert. In diesem zweiten Schritt wurden die freien Thiolgruppen mit Iodacetamid zu S-Carboxyamidomethyl alkyliert, sodass eine Refaltung nicht mehr möglich war. Wichtig war hierbei, die Arbeiten mit dem Elutionspuffer im Dunkeln auszuführen, da Iodacetamid instabil und lichtempfindlich ist. Es folgte der proteolytische Verdau durch Trypsin über Nacht bei Raumtemperatur. Trypsin ist eine Serinendopeptidase, welche Peptide spezifisch am C-terminalen Ende von Arginin oder Lysin zu Peptiden einer Länge von 9 Aminosäuren spaltet. Der proteolytische Verdau wurde am nächsten Tag durch Zugabe von 100% Ameisensäure bis zu einem pH-Wert von 4 titriert und dadurch gestoppt. Im Anschluss wurden die Proben bei 20000 g 10 Minuten lang zentrifugiert.

SDS Page und Western Blot Analyse

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) ermöglicht eine elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Der anschließende Western Blot bezeichnet die Übertragung und Nachweis der Proteine auf eine Trägermembran. Dies kann sowohl Aufschluss über die Größe und relative Menge der Proteine geben, als auch durch die Wahl eines bestimmten Antikörpers spezifisch beispielsweise posttranslational modifizierte Proteine darstellen. Zunächst wird ein Polyacrylamidgel gegossen. Je nach Konzentration des Polyacrylamidzusatzes kann die Porengröße des Trenngels variiert und so der Größe des gesuchten Proteins angepasst werden. Bei höherer Konzentration des Gels wandern kleine Moleküle langsamer, sodass die Auflösung im kleineren Massenbereich höher wird. Das Gel enthält eine Sammelphase, welche eine gleiche „Startposition“ aller Proteine gewährleistet und eine Trennphase, in welcher die Auftrennung erfolgt. Zunächst wurden die Proben mit 2x Laemmli-Puffer versetzt und bei 95°C 5 min lang inkubiert und so denaturiert. Das Detergenz SDS solubilisiert Proteine und zerstört Quartär- und Tertiärstrukturen. Die Proteine in der Probe sind nun entfaltet und gleichmäßig negativ geladen. Das vorbereitete Polyacrylamidgel bildet die Matrix, durch die die Proteine nun durch Anlegen eines elektrischen Feldes wandern sollen. Anhand ihrer Masse werden die geladenen Proteine im Gel aufgetrennt: Kleine Proteine sind schneller und wandern weiter als große Proteine. Die Polyacrylamidgalkassetten wurden in XCell SureLock™ Mini-Cell Elektrophoresekammern befestigt. Die Kammern wurden mit einem Laufpuffer gefüllt. Unmittelbar vor der Beladung wurden die Proben bei maximaler Geschwindigkeit kurz herunterzentrifugiert. Die gleiche Menge an Proteinen einer jeden Probe wurde in die jeweilige Tasche des Gels gegeben. Die Elektrophoresekammer wurde an einen Consort Electrophoresis Power Supply E835 angeschlossen. Dieser erschuf ein elektrisches Feld, in welchem die negativ geladenen Proteine Richtung Anode wanderten. Zunächst wurde eine Spannung von 70 Volt für 30 Minuten angelegt und die Proteine wanderten gemeinsam

durch das Sammelgel Richtung Anode bis zum Trenngel. Im Anschluss wurden die Proteine bei einer Stromstärke von 20 mA pro Gel über ca. 2 Stunden lang aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wird das Gel in methanolhaltigen Transfer-Puffer gegeben, damit die Übertragung der Proteine auf die Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran erleichtert wird. Die empfangende PVDF Membran wird zunächst in Methanol aktiviert. Nach der Sandwichtechnik wird das Gel, Whatmanpapier und die Membran in einer Halb-Trockenkammer (Powerpac 200 Powersupplier) übereinandergeschichtet. Für den Transfer, das eigentliche Blotting, wird erneut ein elektrisches Feld mit einer konstanten Spannung von 12 V angelegt. Dieses verläuft diesmal senkrecht zur Oberfläche und sorgt dafür, dass die Proteine auf die unten liegende Membran wandern können, wo sie durch hydrophobe Wechselwirkungen hängen bleiben. Um unspezifische Bindungsstellen auf der Membran zu blockieren wurde 5%iges Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine, BSA) verwendet. Anschließend wurde die Membran mehrmals mit Waschpuffer gewaschen. Es erfolgt die Zugabe eines spezifischen Antikörpers für das gesuchte Protein, der wahlweise über Nacht im Kühlschrank oder 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Erneut wurde die Membran drei Mal für je 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Danach erfolgte die Zugabe des Sekundärantikörpers, der gegen den Fc-Teil des Primärantikörpers gerichtet ist und das Enzym Meerrettich Peroxidase (Horseradish Peroxidase, HRP) gebunden hat, das für die folgende Lichtreaktion sorgt, indem es die Oxidation von Luminol katalysiert. Zur Aktivierung der Peroxidase wurde die Membran für 1 min in Enhanced Chemi-Luminescence (ECL) Lösung inkubiert. Durch die entstehende Lichtreaktion konnten Fotofilme von einer Fusion SL 3500 WL Kamera belichtet, entwickelt und auf diese Weise die Protein-Banden sichtbar gemacht werden.

Immunpräzipitation

Die Immunpräzipitation (IP) dient zum *in-vitro* Nachweis von Proteinbindungen. Unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers wird das gesuchte Protein samt seiner Interaktionspartner aus einem Protein-Gemisch präzipitiert. Die gefundenen Interaktionspartner können im Anschluss mittels Western Blot Analyse dargestellt und/oder der Massenspektrometrie (MS) Analyse zugeführt werden. In dieser Arbeit erfolgte die IP mit einem gegen den FLAG-Tag gerichteten Antikörper, der kovalent an magnetische Micro-Beads gekoppelt ist. Nach Zugabe der Beads zu den Lysaten binden diese spezifisch an das getaggte Flag-Epitop unseres Zielproteins AATF. Die magnetisch markierten Proteine werden auf eine μ Säule im Magnetfeld eines μ MACS-Separators gegeben. Es folgen stringent durchgeführte Waschschriffe, um nicht-spezifische Wechselwirkungen zu entfernen. Die Zielmoleküle können anschließend eluiert werden, während die Micro-Beads in der Säule verbleiben. Unmittelbar vor Beginn des Experiments wurden die nötigen Vorbereitungen getroffen: Starten der Zentrifugen, Lagerung der

Racks bei -20° und Vorkühlung des Ultraschallgeräts. Alle nachfolgenden Schritte wurden auf Eis oder bei 4°C ausgeführt.

STop And Go Extraktion (STAGE Tips)

Vor Durchführung der MS Analyse müssen die Peptidproben gereinigt, konzentriert und häufig selektiv angereichert oder vorfraktioniert werden. Dies geschieht mithilfe von STop And Go Extraktion (STAGE)-Tips nach Protokoll von Rappsilber *et al.*⁴⁰ Diese wurden von den Mitarbeitern der Arbeitsgemeinschaft Frese (Proteomics Facility, CECAD Cologne) produziert und zur Verfügung gestellt. StageTips sind gewöhnliche Pipettenspitzen mit sehr kleinen Scheiben aus einer Membran mit Umkehrphasen-, Kationen- oder Anionenaustauschoberflächen, die in ein Teflonnetz eingebettet sind. Die Herstellung erfolgt, indem eine doppellagige C18 Siliciumdioxidplatte in die Spitze einer 200 µl Pipettenspitze gedrückt wird. Die Lösungen wurden jeweils vorsichtig in die vorbereiteten StageTip-Pipettenspitzen pipettiert. Zunächst wurden die StageTips in einer speziellen Zentrifuge aufgestellt und mit 30 µl Methanol (MeOH) equilibriert. Es folgten drei Waschschrte, dazwischen jeweils eine Zentrifugation mit 2600 rpm für 2 min: einmal mit 20 µl Puffer B und zweimal mit 20 µl Puffer A. Danach wurden die Proben in die StageTips pipettiert und bei 2600 rpm für 4 min zentrifugiert. Es folgte ein Waschschrte mit 30 µl StageTip Puffer A und erneuter Zentrifugation bei 2600 rpm für 3 min. zur Bindung an die Membran

Quantifizierung mittels Labeling

Anschließend erfolgte die Markierung der Proben mittels Triplex Dimethyl-Labeling. Diese auf stabilen Isotopen basierende chemische Markierung machte es möglich, drei Proben in einem einzigen MS Lauf zu messen. Peptide aus verschiedenen Proben werden dabei mit chemisch nahezu identischen Markierungen versehen, die jedoch jeweils eine einzigartige stabile Isotopenzusammensetzung aufweisen, was zu einer unterschiedlichen Masse führt. Die Markierung basiert auf der Reaktion von primären Peptidaminen mit Formaldehyd zur Bildung einer Schiffsbasis, die durch Zugabe von Cyanoborhydrid rasch reduziert wird. Die Kombination von normalem Formaldehyd und Cyanoborhydrid führt zu einem Massenzuwachs von 28 Dalton (Da) pro primärem Amin auf einem Peptid (Markierung Light). Die Verwendung von deuteriertem Formaldehyd führt zu einer Massenzunahme von 32 Da pro primärem Amin (Markierung Medium). Die dritte Markierung mit einer Massenzunahme von 36 Da kann durch die Kombination von deuteriertem und ¹³C-markiertem Formaldehyd mit Cyanoborodeuterid (Markierung Heavy) erzielt werden. Die markierten Proben können problemlos vermischt werden, da die verschiedenen Isotope das Verhalten der markierten Peptide in der LC-MS nicht

beeinflussen. Dabei wurde das Markierungsschema für jedes Replikat alterniert, um eine Beeinflussung der Ergebnisse zu vermeiden.⁴¹ In der MS können die verschiedenen stabilen isotopisch markierten Peptide anhand des bekannten Massenunterschieds erkannt werden. Schließlich kann durch den Vergleich der Signalintensität der unterschiedlich markierten Peptide eine Quantifizierung vorgenommen werden.

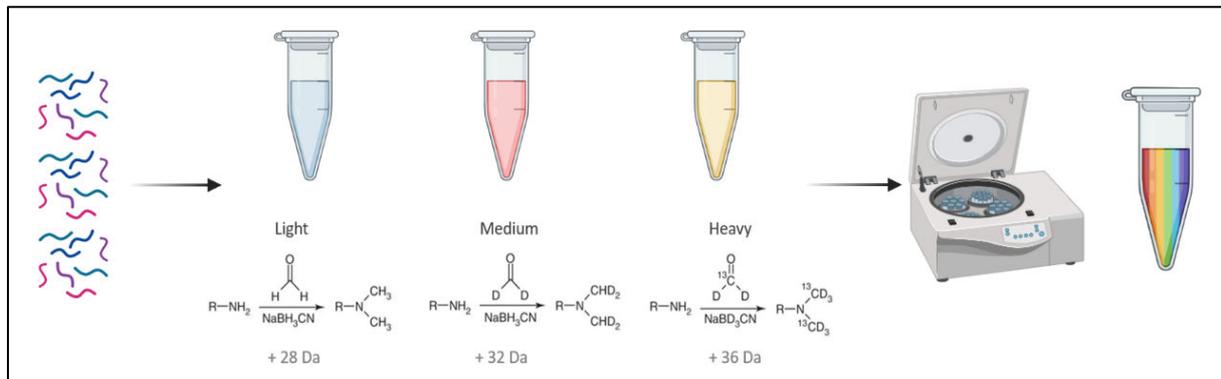


Abbildung 8: Schema des Triplex Dimethyl Labeling

Darstellung der Arbeitsschritte zur Probenmarkierung mittels Triplex Dimethyl-Labeling mit den drei verschiedenen Isotopen Zusammensetzungen (Light, Medium, Heavy).

50 µl des jeweilige Reagenz (Light, Medium, Heavy) wurde auf die StageTips geladen und bei 1000 rpm für 10 Minuten zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal wiederholt. Es erfolgte der letzte Waschschrift mit 30 µl vom Puffer A und die Zentrifugation bei 2600 rpm für 3 Minuten. Die Proben wurden mit 30 µl Puffer B eluiert, zur Konzentrierung in einer Speedvac Zentrifuge dehydriert und bis zur LC-MS Messung auf Eis gelagert.

Liquid Chromatography-Massenspektroskopie

Die MS ist ein Prozess, bei dem Ionen generiert und aufgrund ihres Masse/Ladungs-Verhältnisses (m/z) detektiert werden. Die Messung erfolgte durch die AG Frese in der Proteomics Facility, CECAD, Uniklinik Köln. Die Proben wurden mittels Liquid Chromatography - Electrospray Ionization - Tandem Mass Spectrometrie (LC-ESI-MS/MS) auf einem Q Exactive Plus Massenspektrometer analysiert, der an ein EASY nLC 1200 gekoppelt war. Die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) trennt Substanzen aufgrund ihrer chemischen Eigenschaften auf. Bei den an das Massenspektrometer gekoppelten Systemen handelt es sich um die Vanquish Horizon Binary UHPLC mit Dionex Integriertes Reagenz-Freies Ionenchromatographie (RFIC)-System, das die Trennung und Analyse von ionischen und polaren Verbindungen ermöglicht. Das Interface ist der Prozess, bei dem das Lösemittel entfernt und der Analyt geladen wird, wobei verschiedene Verfahren zur Verfügung stehen. Hier wurde die Elektrospray Ionisierung (Electrospray Ionization, ESI) gewählt, wobei die gelösten Analyten versprüht und ionisiert und die entstehenden Tröpfchen

getrocknet werden. Die Ionisierung erfolgt beim Passieren eines elektrischen Potentials von 3-5 Kilovolt. Es entsteht ein Aerosol mit kleinsten geladenen Tröpfchen. Durch Verdampfung des Lösungsmittels und Konzentration der Ladung auf den kleiner werdenden Tröpfchen bilden sich schließlich gasförmige Ionen. Folgende Einstellungen wurden gewählt: Es wurde eine Säule von 50 cm mit 75 µm Durchmesser und 2.7 µm Poroshell EC120 C18 Filter genutzt. Dabei handelt es sich um Silicagel und hydrophobe C18 (Octadecyl) Ketten, die Peptide und kleine Moleküle zurückhalten können. Die Ofentemperatur betrug 50°C, die Flussrate 250 nl/min. Die Peptide wurden unter Verwendung zwei verschiedener Gradienten chromatographisch getrennt: 10-23% Lösungsmittel B (0,1% Ameisensäure,80% Acetonitril) in 75 min, 23-39% Lösungsmittel B innerhalb von 5 min, 39-95% Lösungsmittel B in 5 min.

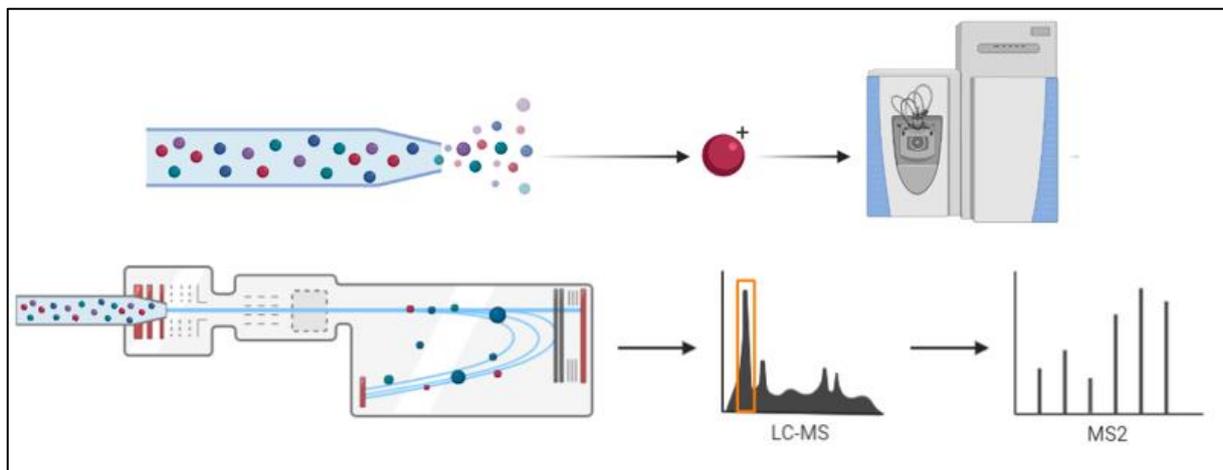


Abbildung 9: Ablauf der Massenspektroskopie

Ablauf der Massenspektroskopie mit Ionisierung, Durchflusschromatographie, Elektrosprayionisierung und Auftrennung gemäß des Masse/Ladungsverhältnisses (m/z).

Der erste MS1-Vermessungsscan wurde von 300 bis 1750 m/z mit einer Auflösung von 70.000 Thomson aufgenommen. Die 10 häufigsten Proteine wurden isoliert und einer HCD-Fragmentierung bei einer normalisierten Kollisionsenergie von 27% unterzogen. Das zweite Automatic Gain Control (AGC)-Target drückt die Anzahl von Ladungen aus, die gesammelt für den MS2-Vermessungsscan isoliert werden sollen und hat Auswirkungen auf die maximale Injektionszeit (hier 5^5 , 120 ms). Nach Passieren des Quadrupols werden die Ionen von einem Detektor aufgefangen. Die Detektion der Fragmente erfolgt mittels der Ionenfalle Orbitrap bei einer Auflösung von 35.000 Thomson. Das Orbitrap ist eine zentrale, spindelförmige Elektrode, in die Ionen injiziert werden. Diese bewegen sich aufgrund der elektrostatischen Anziehung auf Kreisbahnen (Orbits) um diese zentrale Elektrode herum. Gleichzeitig schwingen sie entlang der Achse der Zentralelektrode. Die Frequenz dieser Schwingung erzeugt in den Detektorplatten elektrische Signale, die durch Fourier-Transformation in die entsprechenden m/z -Verhältnisse umgewandelt werden.

MS Datenanalyse

Alle Rohdaten wurden mit Maxquant® (Version 1.5.3.8) unter Verwendung von Standardparametern verarbeitet. MS-Spektren enthalten Informationen zu Peptidmasse und -intensität. Durch Abgleichen dieser Spektren mit einer Sequenzdatenbank wird die Identität der Peptide abgeleitet. Die Ergebnisse werden in Form von Tabellen ausgegeben, die die identifizierten Proteine enthalten. Im Falle der hier durchgeführten quantitativen Proteomischen Analyse mit stabilen Isotopen ergeben sich die Proteinverhältnisse zwischen den Konditionen durch direkten Vergleich der Signale des jeweiligen Isotops.⁴² Die Proteinquantifizierung wurde basierend auf den Peptidionenintensitäten des MS1 Durchlaufs durchgeführt. Dazu dient der Intensitätsbasierte Quantifizierungs-Algorithmus (Intensity Based Absolute Quantification, iBAQ). Basierend darauf wurden eine Label-freie Quantifizierungs-Intensität (LFQ) nach dem Protokoll von Cox *et al.*⁴³ abgeleitet, hierzu werden die absolut gemessenen Intensitäten normalisiert. Die MS2-Spektren wurden anhand der Uniprot HUMAN.fasta-Datenbank durchsucht, dies beinhaltete auch eine Liste der häufigsten Kontaminanten. Die minimale Peptidlänge wurde auf 7 Aminosäuren eingestellt und die Carbamidomethylierung an Cysteinresten wurde als feste Modifikation angesehen. Oxidation (M) und Acetylierung (Protein N-term) wurden als variable Modifikationen einbezogen. Die Maxquant-Ausgabedateien wurden mit Perseus® (Version 1.5.5.3) weiterverarbeitet. In Kürze sind im Folgenden die Schritte der Datenverarbeitung ab diesem Punkt skizziert:

Die AATF Proben wurden mit den GFP Proben des jeweiligen Interaktoms in ein Verhältnis gesetzt (AATF/GFP). Um die signifikant angereicherten Proteine darzustellen, wurde der Quotient der LFQ Intensitäten aus AATF/GFP berechnet (Fold Change). Die erhaltenen Proteinverhältnisse wurden log₂-transformiert. Die statistische Signifikanz mutmaßlicher AATF-Interaktoren wurde dann unter Verwendung eines einseitigen t-Tests dieser Verhältnisse von AATF zum GFP-Pulldown bewertet. Es wurden Streudiagramme der einzelnen Bedingungen zwischen den einzelnen Replikaten erstellt, die eine Reproduzierbarkeit der Experimente prüfte. Hierzu wurde der negative Logarithmus des p-Wertes zur Basis 10 auf der y-Achse aufgetragen. Dadurch erschienen die hochsignifikanten Datenpunkte mit niedrigen p-Werten im oberen Bereich des Diagramms. Die x-Achse zeigt den Fold Change zwischen den beiden Bedingungen ebenfalls als Logarithmus an. Verunreinigungen wurden entfernt. Zum Vergleich der Proteinhäufigkeit bei AATF-Pulldowns mit und ohne RNase wurden die log₂-Verhältnisse so normalisiert, dass das Verhältnis von AATF unter diesen beiden Bedingungen gleich Null ist, unter der Annahme, dass AATF selbst von der RNase-Behandlung nicht beeinflusst wird. Proteine, die gegenüber der GFP-Kontrolle nicht angereichert waren wurden entfernt.

Datenanalyse

Die Rohdaten werden mittels MaxQuant® Software analysiert (<http://www.maxquant.org>) und anschließend mit der Perseus Software® (<http://www.perseus-framework.org>) hinsichtlich der Signifikanz spezifischer Interaktionen weiterverarbeitet. Für die Recherche von biologischen Hintergründen zum Zielprotein AATF, bereits publizierten Interaktoren sowie Proteinfunktionen wurden gängige Online-Datenbanken genutzt. Darunter die Seiten des National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und UniProt (<http://www.uniprot.org/>). Nach Auswertung des Interaktoms wurden zur systematischen Einordnung der gefundenen Interaktoren die Datenbanken GeneCards und Biogrid genutzt. Zu Gene Ontology Analysen wurde die Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery® (DAVID) v6.8 genutzt. (<https://david.ncifcrf.gov/>).

4. Ergebnisse

4.1. Nachweis der regelrechten Proteinexpression und DNA-Schadensantwort

Die stabile Proteinexpression des markierten AATF konnte in der für diese Arbeit genutzten 293T HEK Zelllinie mittels Expressionskontrollen im Immunoblot nachgewiesen werden. Die Banden für die Flag-getaggten Proteine liegen wie erwartet aufgrund der höheren Masse jeweils einige kDa höher als die endogenen Proteine. Um nachzuweisen, dass die relevanten Proteine mit den magnetischen Antikörpern regelrecht am Magneten zurückgehalten wurden, wurde ebenfalls eine Probe des Lysats nach Durchfluss (Flowthrough) sowie die nach Waschschrift 1 und 2 sowie das Pellet mit Flag Antikörper im Western Blot visualisiert und mit einer Probe vor dem Durchfluss verglichen.

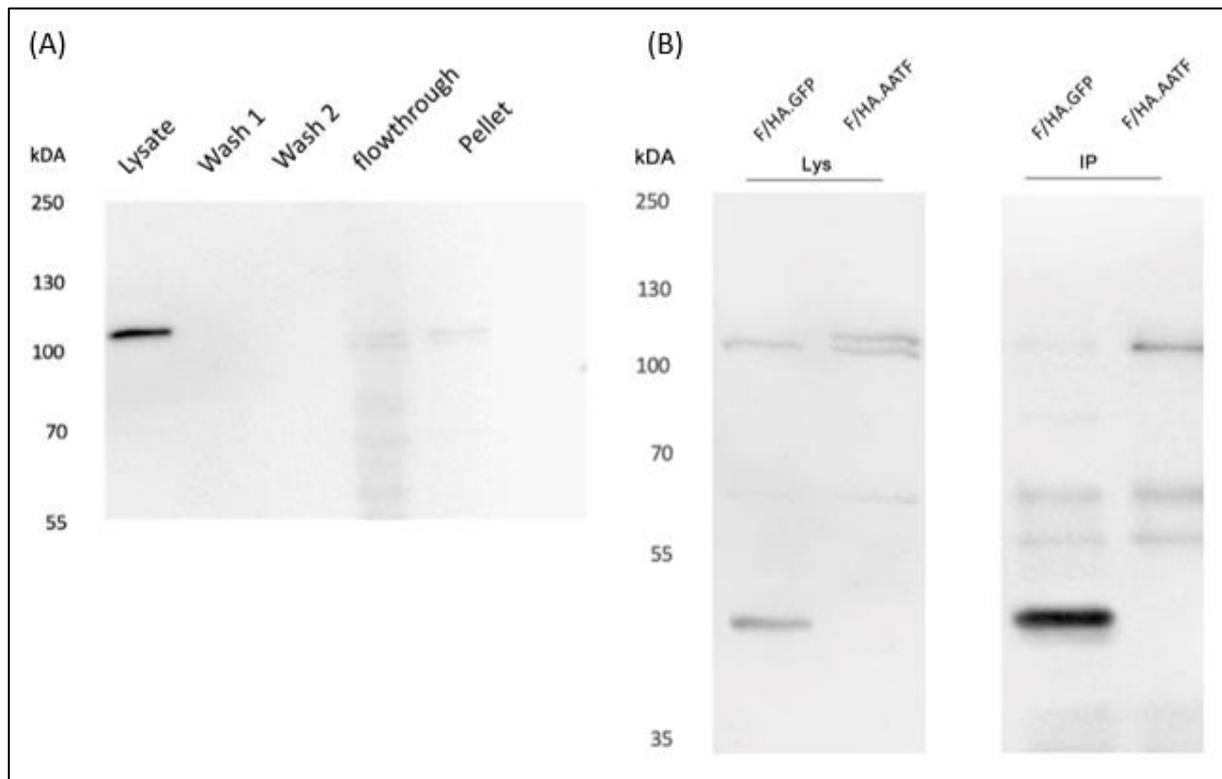


Abbildung 10: Die Expressionskontrollen der Flp/In AATF Zelllinien zeigen eine stabile Expression und die Flag-Antikörper konnten die getaggten Proteine erfolgreich präzipitieren

(A) Proteinexpression im Lysat und erfolgreiche Kontrolle der Haftung des getaggten Proteins am Magneten. Nach der IP konnte kein Protein mehr nachgewiesen werden. (B) Proteinexpressionskontrollen im Western Blot mit anti-Flag und anti-AATF zur Darstellung der endogenen sowie getaggten Bande von AATF. Wie erwartet zeigte sich die Bande mit dem getaggten Protein über dem endogenen Protein. Erfolgreiche Immunpräzipitation mittels anti-Flag Antikörper.

Um eine zelluläre Stressreaktion zu provozieren, wurden die Zellen in einem Hypoxie Schrank bei 1% Sauerstoffgehalt für acht Stunden inkubiert. Die korrekte Aktivierung der DNA-Schadensantwort nach Hypoxiebehandlung wurde mittels Nachweises des Schadenmarkers γ H2AX jeweils vor den MS Analysen nachgewiesen. H2AX ist ein Protein aus der Gruppe der Histone, das im Zellkern aller Eukaryoten vorkommt. Als Reaktion auf einen DNA-Doppelstrangbruch wird H2AX an Serin 139 phosphoryliert und fortan als γ H2AX bezeichnet. Verantwortlich dafür sind Kinasen aus der Familie der PI3 Kinasen.

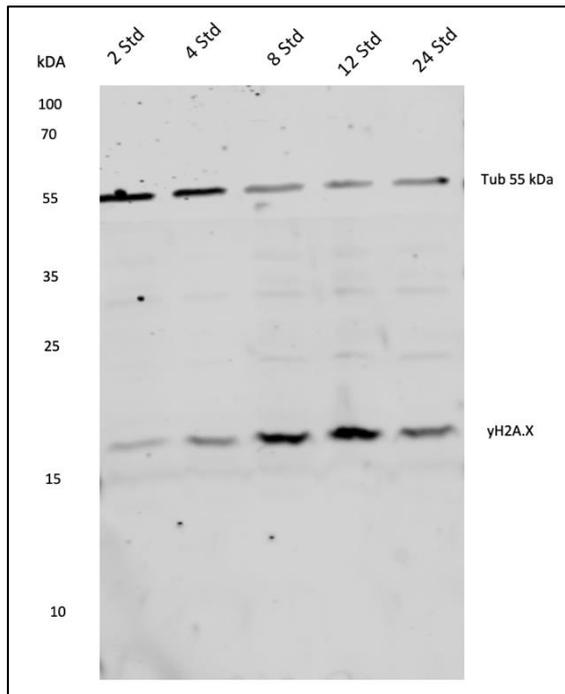


Abbildung 11: Nachweis des DNA-Schadensmarker γ -H2AX

Nach Inkubation in einer Hypoxiekammer über 2, 4, 8, 12 und 24 Stunden zeigt sich ein Anstieg des Schadensmarker γ -H2AX, am deutlichsten nach 12h. Alle Replikate für die finale Messung wurden auf eine DNA-Schadensantwort hin untersucht, bevor sie massenspektrometrisch analysiert wurden. Die Immunoblots bestätigten jeweils die Wirksamkeit der Behandlung.

4.2. Das AATF Interaktom vor Induktion der zellulären Stressantwort

Nach statistischer Aufbereitung der LFQ Intensitäten im Vergleich zu den GFP Kontrollen wie im Methodenteil dargelegt konnten die Hintergrundbinder von den signifikant angereicherten Interaktionspartnern von AATF unterschieden werden. Wenn man die logarithmierten Differenzen zwischen der Anreicherung zwischen der MS-IP von AATF respektive der Kontrollgruppe in ein Streudiagramm gegen den negativ dekadischen Logarithmus des P-Wertes auftrug, zeigten sich rechts und links oben die Proteine von größtem Interesse, da sie sich zwischen den beiden Bedingungen am stärksten unterscheiden und eine hohe statistische Sicherheit für diesen Unterschied besteht. Background Interaktionen weisen hier nahezu ein Verhältnis von 1:1 auf und befinden sich in der Nähe der vertikalen Nulllinie.

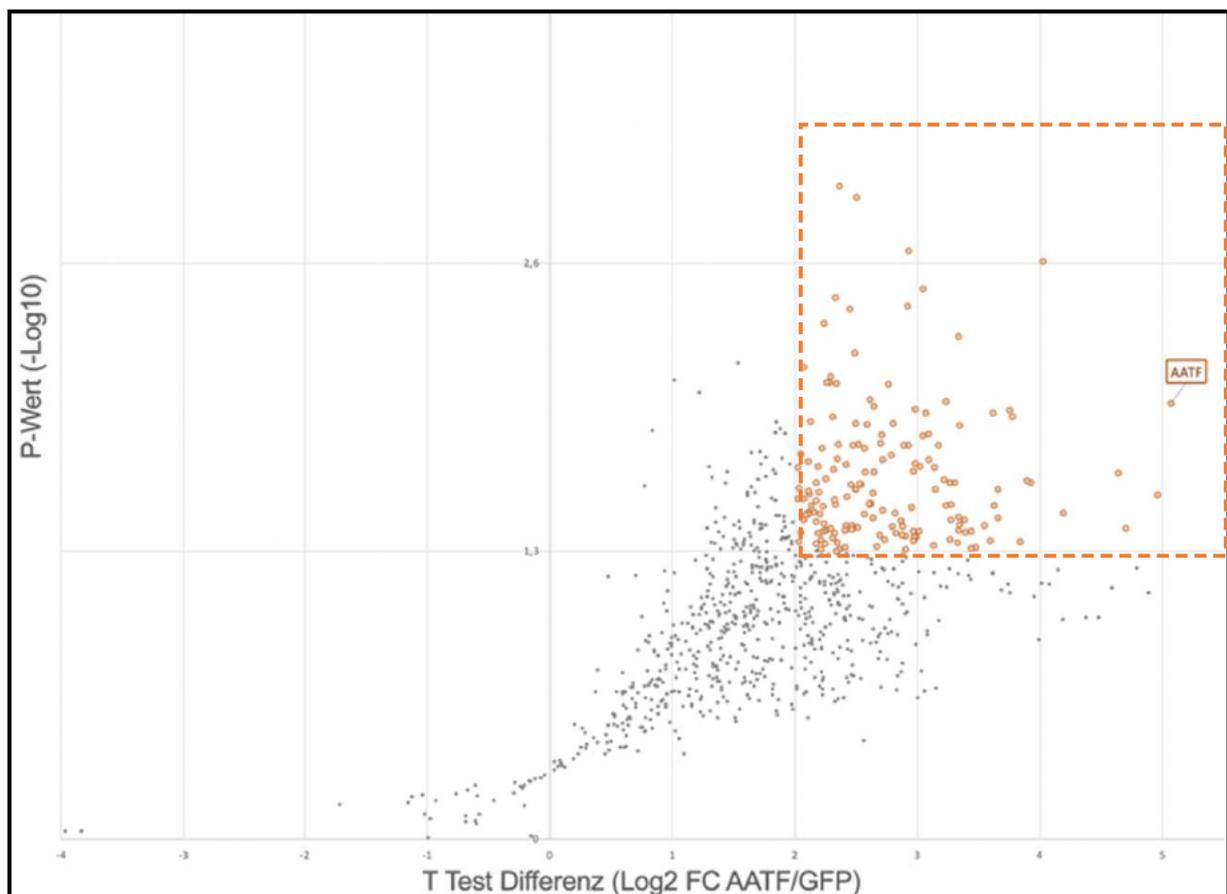


Abbildung 12: Die MS-IP identifizierte zahlreiche signifikant angereicherte Interaktionspartner von AATF

Streudiagramm des AATF Interaktoms. Die MS-IP (5 Replikate) von FLAG-AATF identifizierte 305 Interaktoren, die hoch signifikant gegenüber dem Kontrollexperiment mit Flag-GFP waren (in orange, $\log_2\text{FC} \geq 2$, $-\log_{10} p\text{-value} \geq 1,3$). Die gestrichelte Linie markiert die angesetzte FDR von $< 0,05$. AATF war mit einer FC von 5 selbst am höchsten angereichert.

AATF selbst zeigte sich wie erwartet am höchsten angereichert. Insgesamt ergab der Datensatz 282 signifikante Interaktoren. Eine vollständige Auflistung der signifikanten Interaktoren befindet sich im Anhang (Tabelle 1).

4.2.1. Identifikation von 282 Interaktoren vor der Hypoxie-Behandlung

Die Auswertung der 5 biologischen Replikate der MS IP identifizierte 282 signifikant angereicherte Proteine, die im unbehandelten Zustand mit AATF interagieren. Die gefundenen Bindungspartner von AATF waren hoch signifikant angereichert ($\log_2FC \geq 2$ und $-\log_{10}pvalue \geq 1,3$). 47% der Interaktoren konnten durch einen Abgleich mit der Datenbank Biogrid, mit den Interaktomen von Bammert *et al.*, Pineiro *et al.* und dem zuvor erstellten Interaktom unserer Gruppe validiert werden.

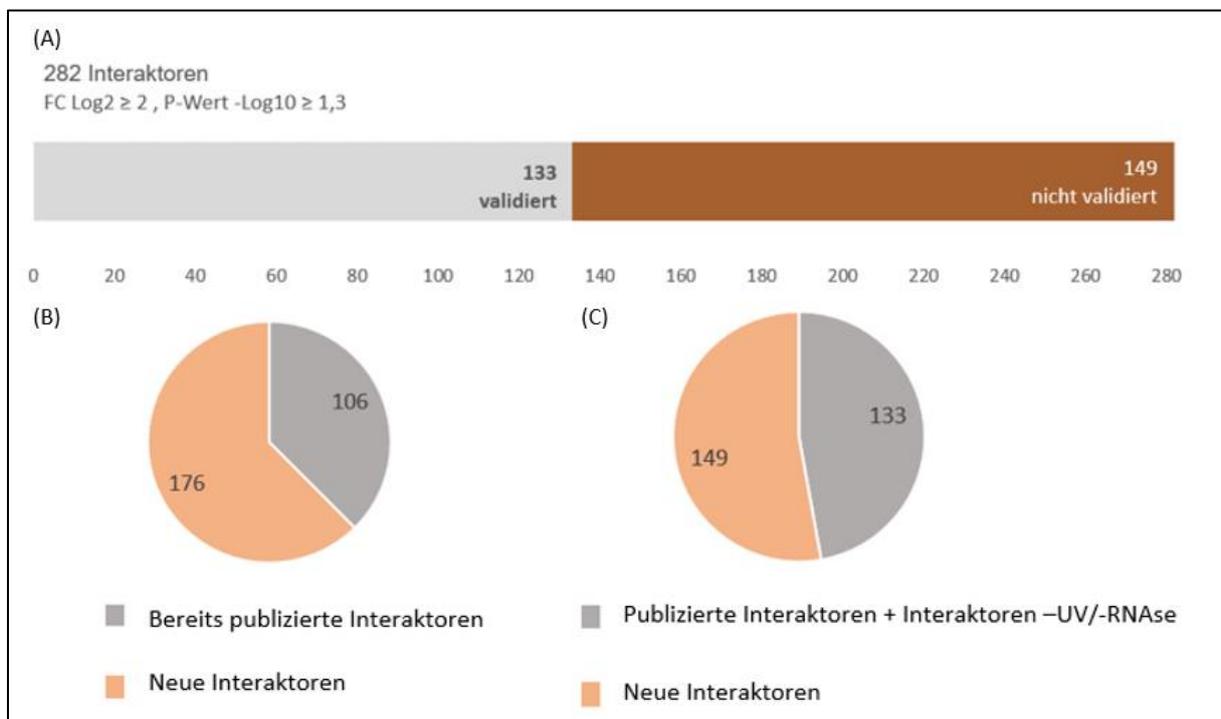


Abbildung 13: 282 Interaktoren waren signifikant, darunter fanden sich 106 bereits zuvor publizierte Bindungspartner

(A) Legte man das Signifikanzniveau bei ($\log_2FC \geq 2$ und $-\log_{10}pvalue \geq 1,3$) fest, wurden 282 Interaktoren von AATF identifiziert. Durch Literaturrecherche und Vergleich mit den bereits identifizierten Interaktoren unserer Gruppe konnten 47% der Bindungspartner validiert werden. (B) 106 Interaktoren fanden sich in den Arbeiten von Bammert *et al.*, Pineiro *et al.* Oder in der Datenbank BioGrid wieder. Duplikate wurden nicht gezählt. (C) 16 weitere Interaktoren stimmten mit dem Interaktom vor UV-Behandlung (Heide Heinen) überein, weitere 11 Interaktoren konnten in der Kondition vor RNase-Behandlung der vorliegenden Arbeit gefunden werden.

4.2.2. Bestätigung von 35 Interaktoren des AATF Interaktoms vor UV-Behandlung

Unter der Annahme, dass das AATF Interaktom in den Konditionen vor UV-Behandlung (Minus-UV) und vor Hypoxie-Behandlung (Minus-Hypoxie) trotz geringfügiger Änderungen im Protokoll weitgehend übereinstimmt, sollte die vorliegende Arbeit die zuvor erhobenen Daten unserer Gruppe validieren. Von den 142 Interaktoren der Kondition Minus-UV konnten 30 Bindungspartner in dieser Analyse bestätigt werden. Von den 10 Top Interaktoren wurden 60 Prozent wiedergefunden. Darunter befinden sich die als hoch relevant eingestuft Proteine des ANN Komplexes. Ferner fanden sich zahlreiche ribosomale Proteine und RNA-bindende Proteine sowie RNA Polymerase II Subunit B. Die im physiologischen Zustand exklusiv nachgewiesenen Myosin-Leichtketten (MYL1-3) wurden im vorliegenden Interaktom nicht gefunden.

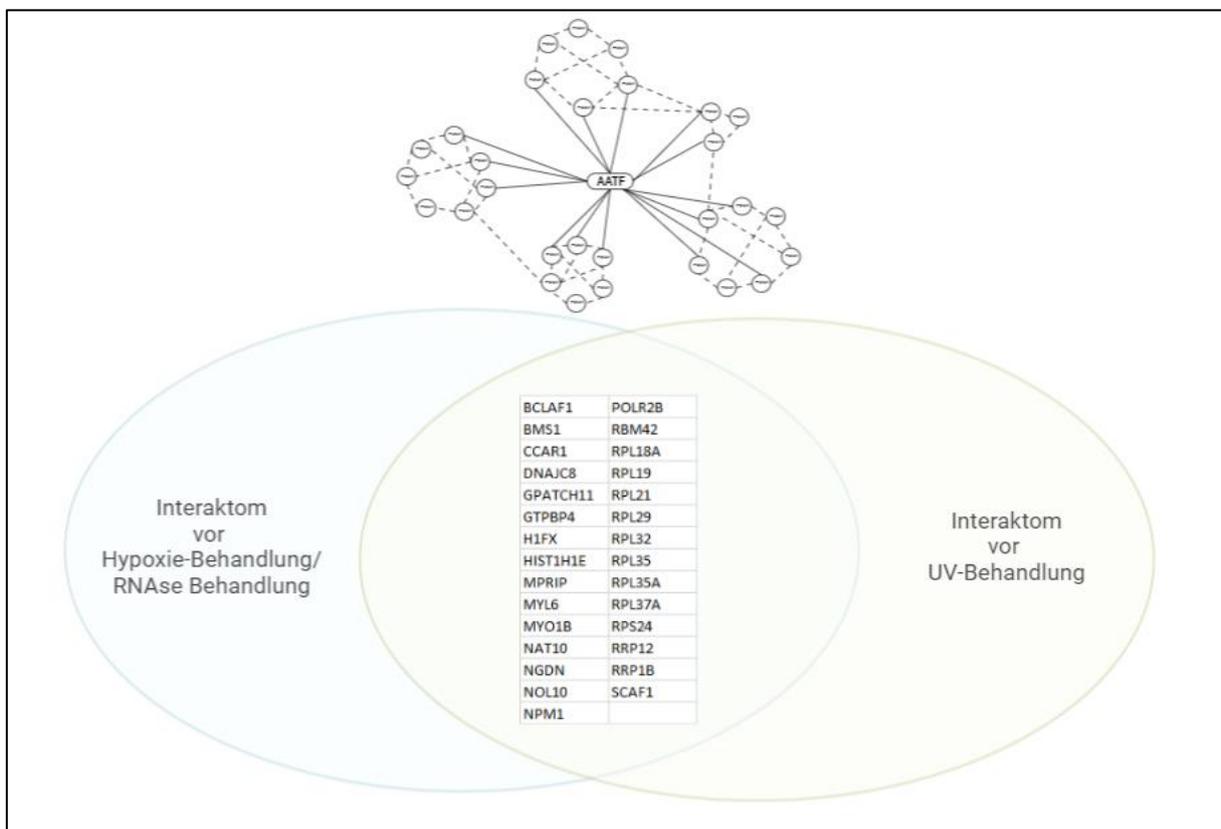


Abbildung 14: Gemeinsame Interaktoren der unstimulierten Konditionen

Dargestellt sind 30 gemeinsamen Interaktoren in den AATF Interaktomen vor UV-Behandlung und der vorliegenden Arbeit.

4.2.3. Die Bindungspartner lassen sich in funktionelle Cluster einordnen

Bereits auf einen Blick zeigte sich, dass sich unter den TOP Interaktoren bekannte Bindungspartner wie beispielsweise die Akteure des ANN-Komplexes wiederfanden. Zudem fiel die Vielzahl an ribosomalen und bekannten RNA-bindenden Proteinen auf.

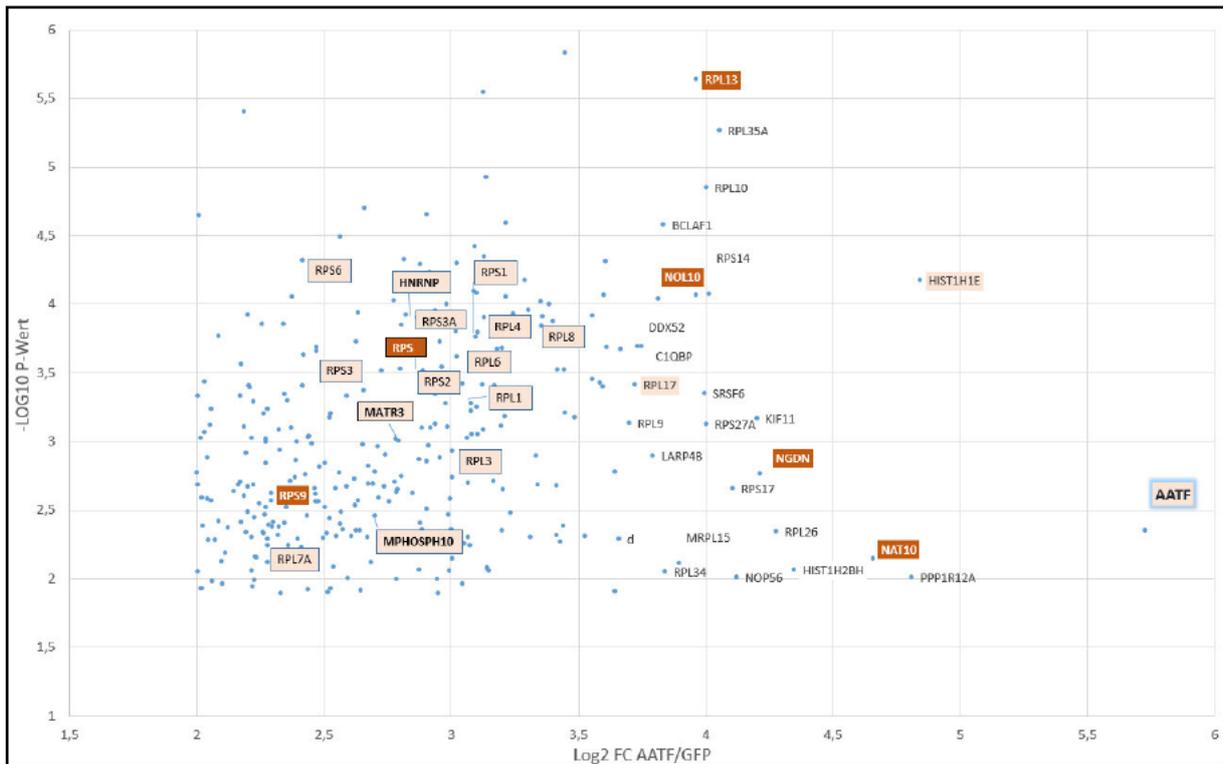


Abbildung 15: Unter den Interaktoren befinden sich zahlreiche bekannte Bindungspartner

Streudiagramm der hoch signifikant angereicherten Proteine des AATF Interaktoms ($\log_2FC \geq 2$, $-\log_{10} p\text{-value} \geq 1,3$). Kennzeichnung des ANN Komplex (Bammert *et al.*) und zahlreicher ribosomaler und RNA-bindender Proteine unter den TOP Interaktoren.

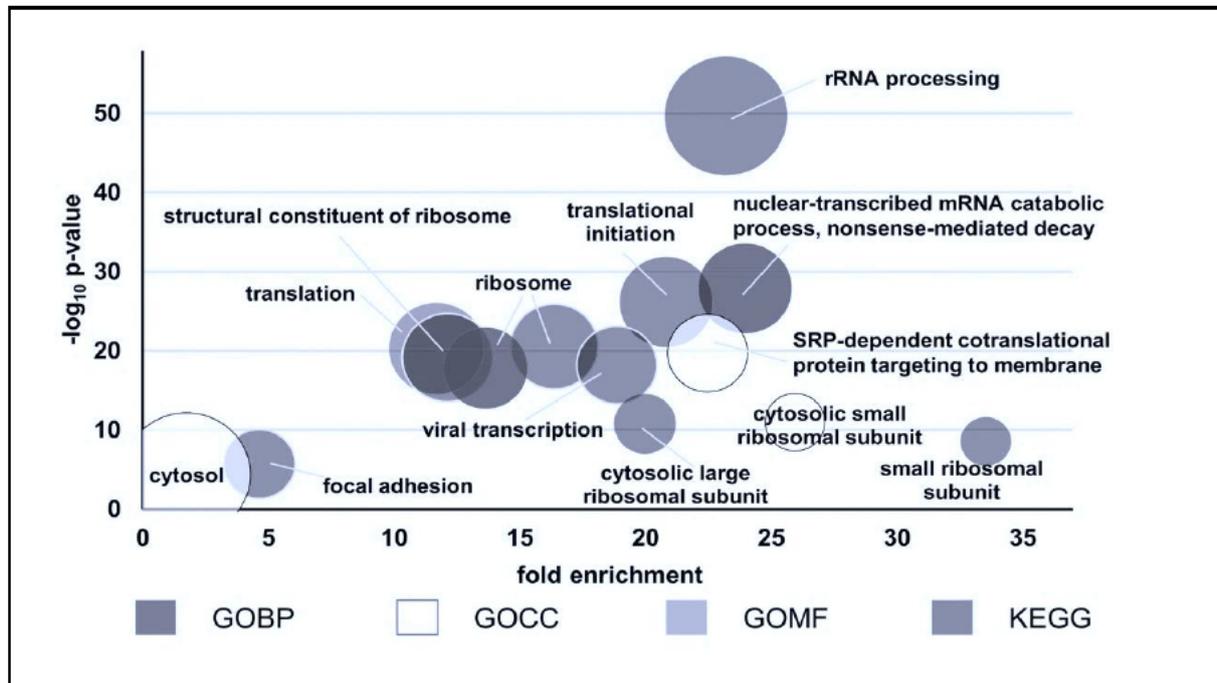


Abbildung 16: Funktionales Annotationscluster von AATF

Dargestellt ist eine funktionelle Analyse der AATF Interaktoren geordnet nach Annotationscluster mittels DAVID Bioinformatik Online Tool. GO Terms aus verschiedenen Datenbanken wurden entsprechend ihrer Fold Enrichments gegen den negativ dekadischen Logarithmus des P Wert aufgetragen. Die Größe der Blase korreliert proportional mit der Anzahl der Gene des jeweiligen Clusters.

Um die Vielzahl der gefundenen Bindungspartner nach ihrer funktionellen Bedeutung clustern zu können, wurden Datenbanken auf Grundlage der Gene Ontology Analyse genutzt. Diese deckt drei grundlegende Bereiche ab: Die zelluläre Komponente, den biologischen Prozess und die molekulare Funktion. Hier kann man erkennen, dass das Interaktom eine Vielzahl ribosomaler Proteine und rRNA prozessierender Faktoren enthält. Das Interaktom von AATF ist stark angereichert mit Proteinen, die an der Ribosomenbiogenese beteiligt sind. Die wichtigsten Annotationscluster sind in Abbildung 16 dargestellt. Hier sind die GO Terms entsprechend der Fold Change gegen den dekadischen Logarithmus des P Wertes aufgetragen, wobei die Größe der Blase jeweils mit der Anzahl der Gene eines Clusters zunimmt. Hieraus kann man entnehmen, dass die überwiegende Mehrheit der Interaktoren der rRNA Prozessierung zugeordnet wurde. Darüber hinaus finden sich viele Proteine der Translationsinitiation, ribosomale Proteine und auch Proteine der viralen Transkription.

4.3. Das AATF Interaktom nach Hypoxie

4.3.1. Identifikation von 363 Interaktoren nach der Hypoxie-Behandlung

Die Auswertung der 5 biologischen Replikate der MS IP identifizierte 363 signifikant angereicherte Proteine, die unter hypoxischen Bedingungen mit AATF interagieren.

4.3.2. AATF geht unter Hypoxie zahlreiche neue Bindungen ein

363 Interaktionspartner erfüllten im Interaktom nach der Hypoxiebehandlung die statistischen Kriterien um als signifikant betrachtet zu werden. 106 Bindungspartner konnten exklusiv nach der Hypoxiebehandlung signifikant angereichert werden. Wenn man die quantitative Anreicherung der Bindungspartner betrachtet, zeigten sich 49 Proteine hoch signifikant. 25 Interaktoren kamen dagegen nur unter normoxischen Bedingungen vor. 257 Interaktoren fanden sich in beiden Konditionen wieder.

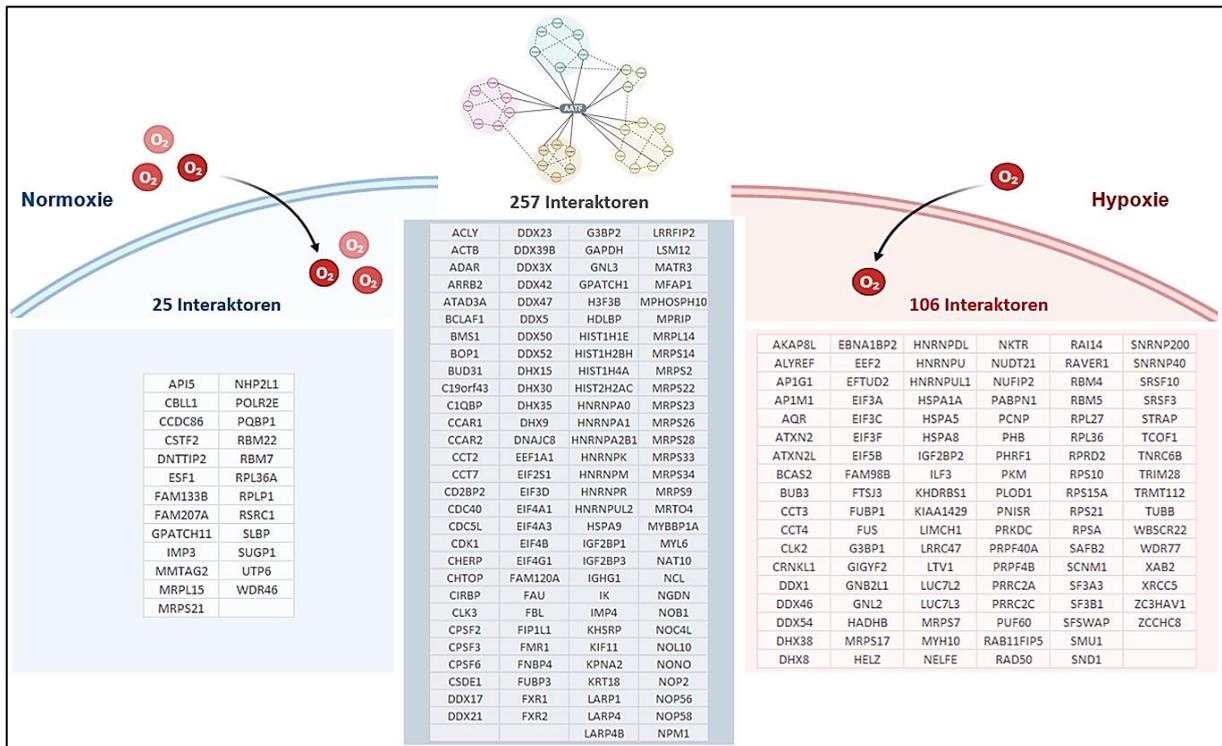
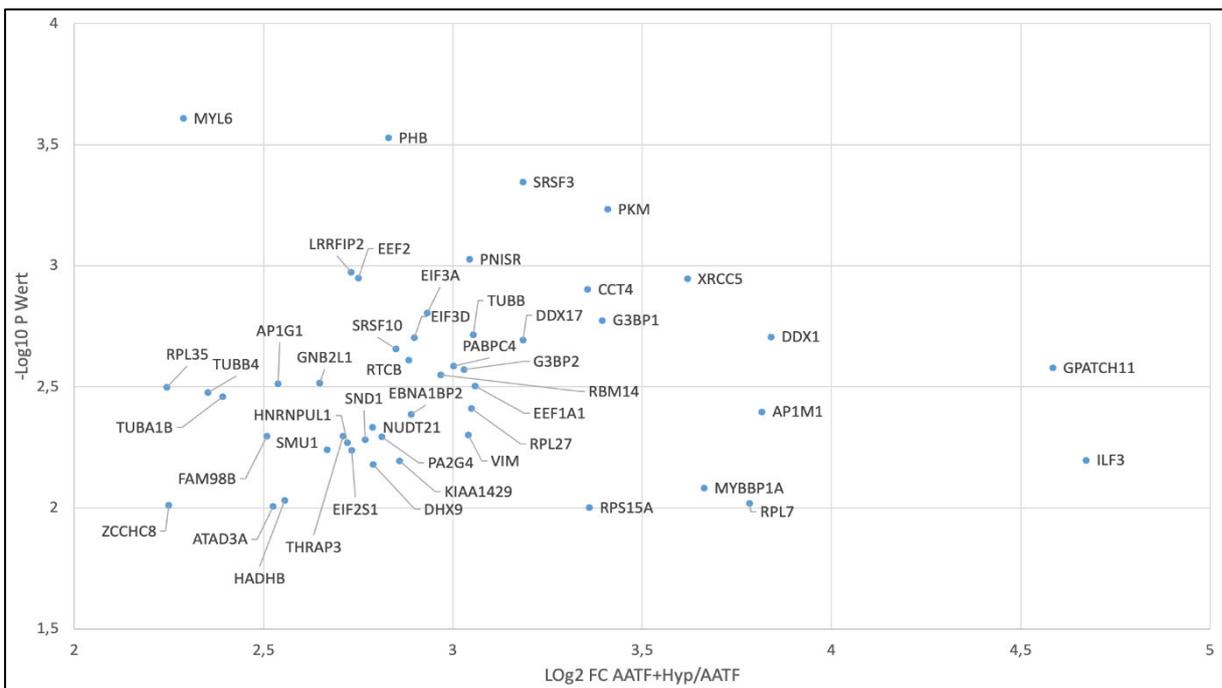


Abbildung 17: Vergleich der Interaktionen unter Normoxie vs. Hypoxie

25 Bindungspartner konnten nur im unstimulierten Interaktom angereichert werden. 257 Interaktionspartner wurden in beiden Konditionen signifikant nachgewiesen und 106 Interaktoren waren nur nach Hypoxie Behandlung signifikant angereichert. (Abbildung erstellt mit Biorender)



4.3.3. Unter Hypoxie interagiert AATF mit wichtigen RNA-bindenden und ribosomalen Proteinen

Die gefundenen Interaktoren von AATF erwiesen sich zu 77% als RNA-bindende Proteine und zu 15% als ribosomale Proteine. Durch Auslösung von zellulärem Stress im Rahmen der Hypoxiebehandlung zeigte sich ein konstanter prozentualer Anteil RNA-bindender Proteine am gesamten Interaktom (280/363). Die funktionelle Analyse der nach Hypoxie Behandlung hochregulierten Bindungspartner offenbarte jedoch eine vermehrte Interaktion einiger ribosomaler Proteine, die eine bekannte Rolle im RP-MDM2-p53 Signalweg spielen. 16 RPL sind als Bindungspartner von MDM2 bekannt. Sechs dieser Proteine wurden nach Hypoxie etwas vermindert angereichert (RPL9, RPS5, RPS, RPS 27A, RPL28), die Fold Changes lagen jedoch allesamt jeweils unter 1. In der Literatur fanden sich 18 Proteine aus diesem Interaktom wieder, die in den RP-MDM2-p53 Signalweg involviert sind.²⁹ Im Anhang abgebildet sind die 35 Bindungspartner von AATF, die mit einer FC von >3 angereichert wurden. Insgesamt zeigten sich 85 signifikante Interaktoren aus dem MDM2 Signalweg. Dahingegen zeigten sich jedoch zahlreiche Proteine vermehrt nachweisbar - das mit Abstand am höchsten angereicherten Protein war RPL26. RPL 5 konnte zwar ebenfalls als Interaktionspartner identifiziert werden, zeigte sich zunächst aber mit einer Fold-Change von 1,6 gegenüber der Kontrolle nur wenig signifikant, unter zellulärem Stress der Hypoxiebehandlung zeigte sich jedoch zumindest eine um 1,58 erhöhte Anreicherung als zuvor. Durch die RNase Behandlung wurden diese Interaktionen kaum beeinflusst, was darauf hinweist, dass es sich hier um direkte Protein-Protein Bindungen handelt. Im gesamten Interaktom konnten 16 der bekannten Faktoren des Eukaryotischen Translations-Initiation-Komplexes (eIFs) signifikant angereichert werden. Davon waren alle nach der Hypoxie Behandlung hochreguliert, lediglich in zwei Fällen war diese vermehrte Anreicherung nicht signifikant. Einige Faktoren konnten nur nach der Hypoxiebehandlung als Bindungspartner identifiziert werden (eIF2S2, eIF3I, eIF3L, eIF3E, eIF4E, eIF56A).

4.3.4. Nach Hypoxiebehandlung lassen sich Interaktoren derselben Cluster nachweisen wie nach UV-Radiation.

Da die hypoxieinduzierte Stressreaktion teils Signalwege der DDR nutzt, erfolgte anschließend noch eine Auswertung der Überschneidungen des Hypoxie Interaktoms mit den UV-behandelten Zellen. Während sich nur ein kleiner Teil der Interaktoren des unstimulierten Interaktoms validieren ließen, zeigte sich eine deutliche Zunahme der Übereinstimmungen im Vergleich der Interaktome Plus-Hypoxie und Plus-UV: Es konnten 67 gemeinsame Interaktoren identifiziert werden. Grundsätzlich beschrieb Heide Heinen eine deutliche Zunahme der Translations-

assoziierten Proteine und solche, die mit posttranskriptionellen oder posttranslationalen Prozessen assoziiert sind. Diese Beobachtung konnte auch nach der Hypoxiebehandlung bestätigt werden.

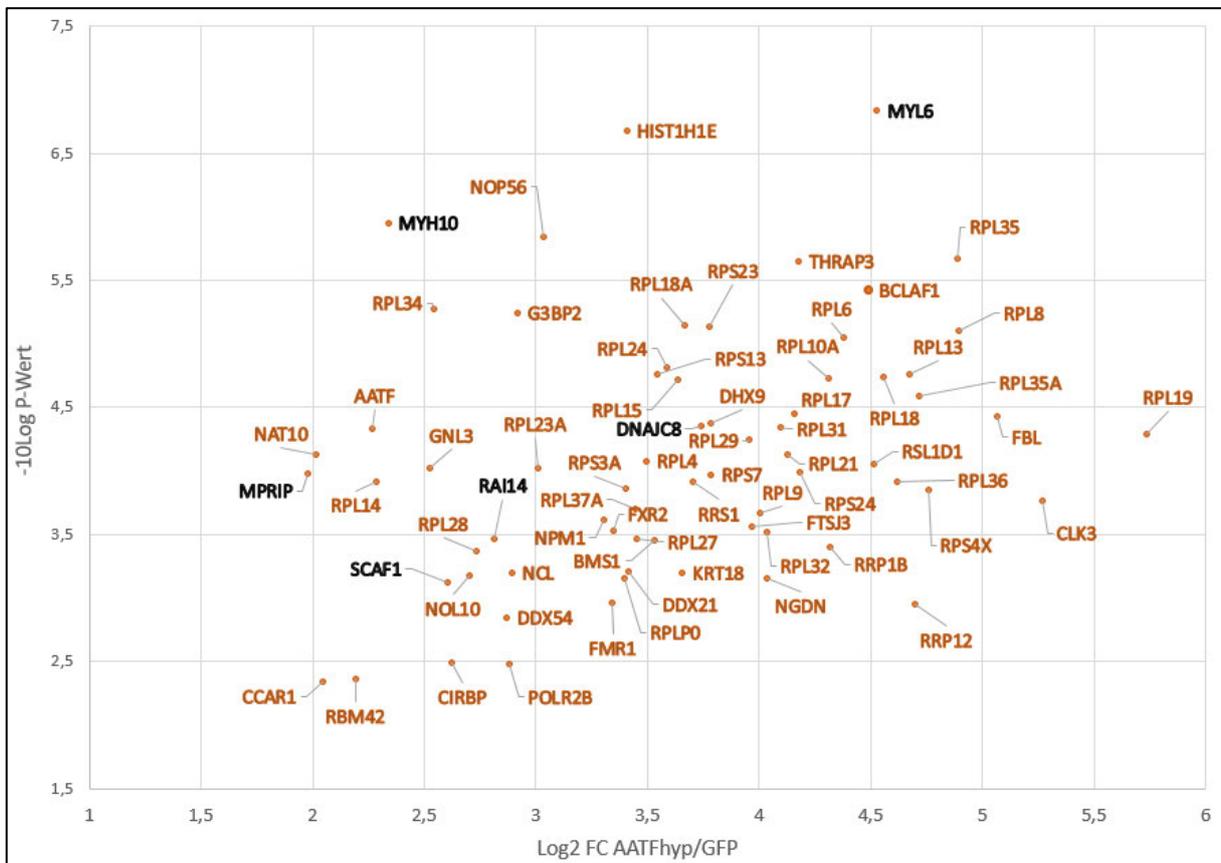


Abbildung 19: Unter Hypoxie-Behandlung zeigt sich eine hohe Übereinstimmung mit dem Interaktom unter UV-Behandlung, darunter fanden sich 90% RNA-bindende Proteine

Darstellung der gemeinsamen Interaktoren der Kondition Hypoxie und UV-Behandlung. Markierung der RNA-bindenden Proteine in orange (61/67).

4.4. Das AATF Interaktom vor und nach RNase Behandlung

4.4.1. Aus den 5 Replikaten können 164 Interaktoren von AATF mit hoher Signifikanz gegenüber der Kontroll MS-IP nachgewiesen werden

Die Auswertung der 5 biologischen Replikate der MS IP identifizierte 165 signifikant angereicherte Proteine, die im unbehandelten Zustand mit AATF interagieren. Infolge der RNase Behandlung konnten schließlich noch 122 Interaktoren wiedergefunden werden.

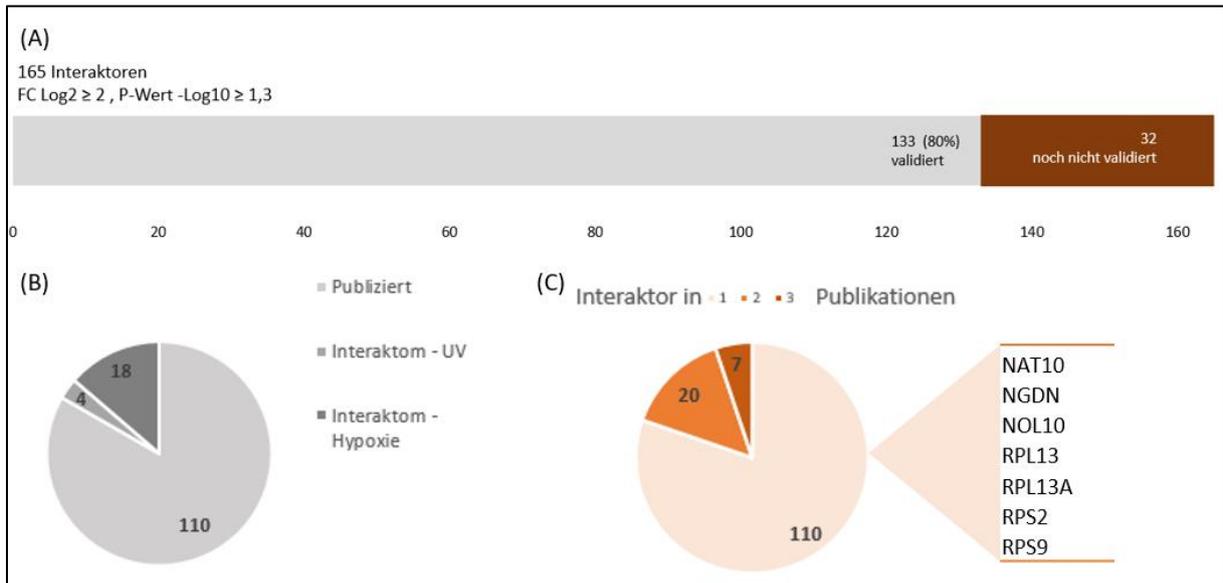


Abbildung 20: 165 Interaktoren waren signifikant, darunter fanden sich 110 bereits zuvor publizierte Bindungspartner

(A) Legte man das Signifikanzniveau bei ($\log_2FC \geq 2$ und $-\log_{10}pvalue \geq 1,3$) fest, wurden 165 Interaktoren von AATF identifiziert. Durch Literaturrecherche und Vergleich mit den bereits identifizierten Interaktoren unserer Gruppe konnten 80% der Bindungspartner validiert werden. (B) 110 Interaktoren fanden sich in den Arbeiten von Bammert *et al.*, Pineiro *et al.* Oder in der Datenbank Biogrid wieder. Duplikate wurden nicht gezählt. 4 weitere Interaktoren stimmten mit dem Interaktom Minus-UV (Heide Heinen) überein, weitere 18 konnten im Interaktom Minus RNase der vorliegenden Arbeit gefunden werden. (C) Von den publizierten Interaktoren waren 83 in einer der oben genannten Arbeiten zu finden, 20 Interaktoren fanden sich in 2 Publikationen und 7 Interaktoren in allen Arbeiten wieder.

Unter Verwendung strenger Schwellenwerte ($\log_2FC \geq 2$, $-\log_{10} P\text{-Wert} \geq 1,3$) zwischen der AATF IP mit RNase-Behandlung im Vergleich zur Kontroll-IP erreichten 93 von 165 Interaktoren, die ohne RNase identifiziert wurden, im Experiment nach der RNase-Behandlung immer noch unsere Kriterien. Wählt man die Schwelle für die statistische Signifikanz etwas niedriger ($\log_2FC \geq 1$, $-\log_{10}pvalue \geq 1,0$), konnten immer noch 122 der 165 Interaktoren nach der RNase Behandlung gefunden werden.

4.4.2. Unter den Interaktoren von AATF befinden sich rund 80% RNA-bindende

Proteine

Eine gezielte Analyse der Bindungspartner dahingehend, ob diese bereits als RNA-bindende Proteine annotiert sind, offenbart dass dies auf 80% der Interaktoren zutrifft.

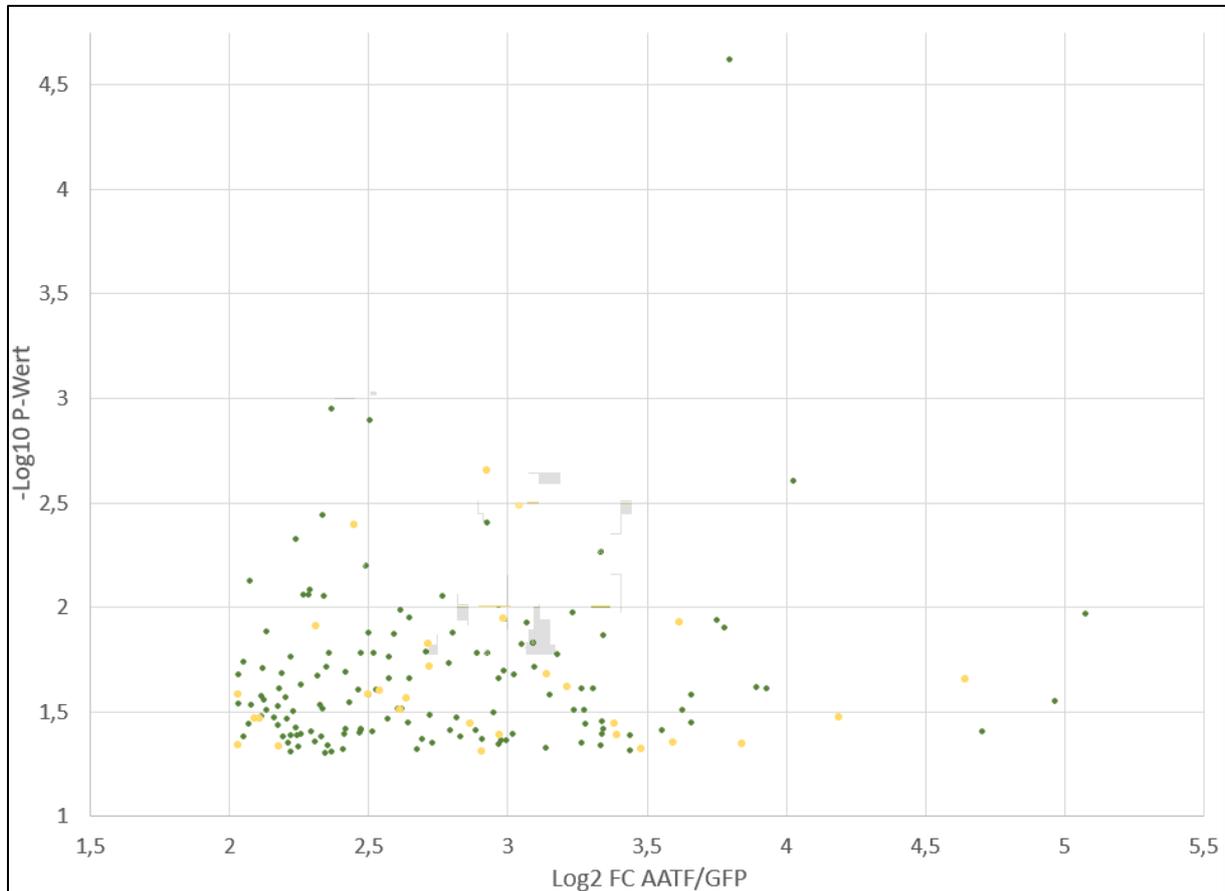


Abbildung 21: Ein Großteil der Interaktoren sind RNA-bindende Proteine

Das Streudiagramm zeigt die Interaktoren, die als RNA bindende Proteine annotiert sind (in grün). Dies trifft auf 77% der Proteine zu.

4.4.3. Eine klare RNA-Abhängigkeit zeigt sich nur bei 2 Interaktoren

Durch Vergleich der beiden Interaktome AATF +/- RNase zeigte sich: Nur zwei Interaktoren konnten nach der RNase Behandlung überhaupt nicht mehr nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um das RBP SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein (SLIRP) und die Protein Phosphatase PP1-beta catalytic subunit (PP1CB). 19 Proteine zeigten hingegen zumindest eine teilweise RNA Abhängigkeit in AATF +/- RNASE mit $\log_2 FC \leq -1$, $-\log_{10} p\text{-value} \geq 1.0$.

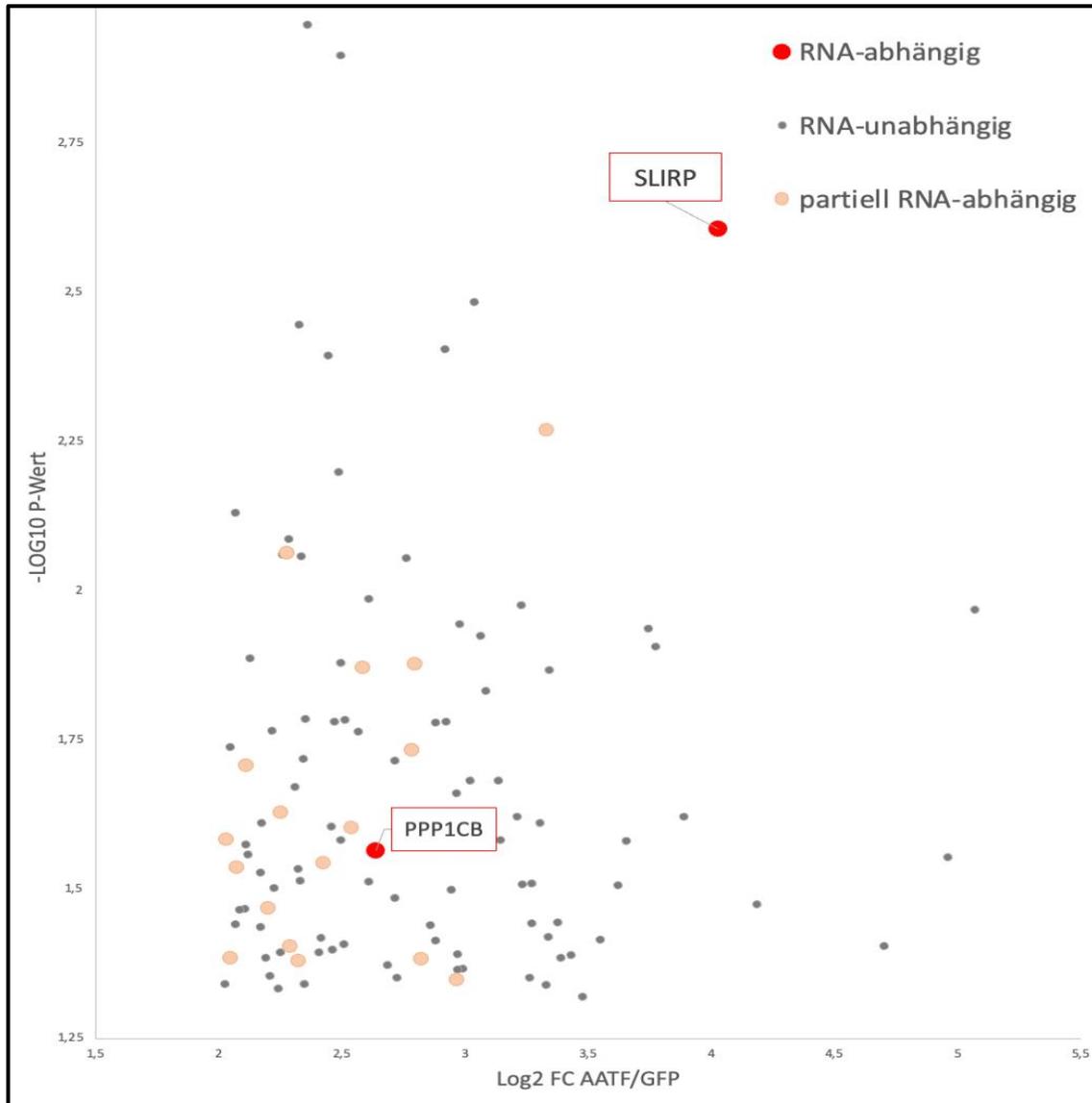


Abbildung 22: Die meisten Interaktoren sind RNA-unabhängige Bindungspartner

Streudiagramm der Bindungspartner, die auch nach der RNase-Behandlung noch hoch signifikant nachgewiesen werden konnten und somit als RNA-unabhängig klassifiziert wurden. Markierung der 93 unabhängigen Bindungspartner in grau (\log_2 FC 2, $-\log_{10}$ P Wert 1,3), der 19 partiell RNA –abhängigen Bindungspartner in orange und der RNA abhängigen Interaktoren SLIRP und PPP1C in rot.

4.4.4. AATF interagiert mit RNAPI-abhängigen und RNAPI-unabhängigen RBP

Da Pineiro *et al.* AATF als RNAPI-assoziiertes Protein identifizierten, sollte die folgende Analyse zeigen ob sich unter den zahlreichen RBPs des AATF Interaktoms weitere RNAPI-abhängige RBPs befinden. Wir konnten in einer Vergleichsanalyse der vorliegenden Daten mit den publizierten 105 Übereinstimmungen feststellen, darunter 46 RNAPI-abhängige und 59 RNAPI-unabhängige RBPs.

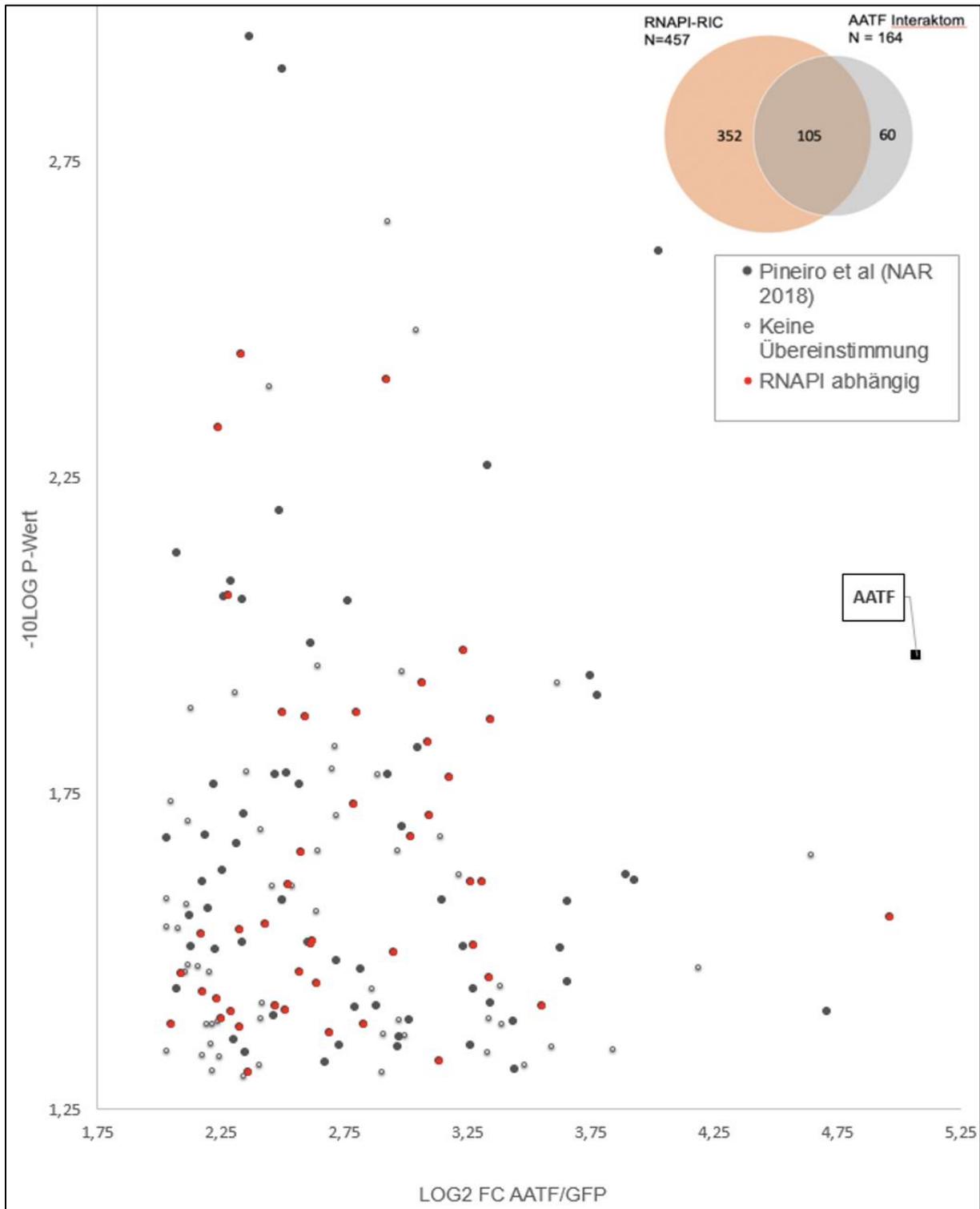


Abbildung 23: Das Interaktom zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem RNA-bindenden Interaktoren, publiziert von Pineiro et al.

Das Streudiagramm zeigt die gemeinsamen Interaktoren mit dem RNAPI-RIC Experiment. RNAPI abhängige Proteine sind in rot gekennzeichnet, RNAPI unabhängige Proteine in schwarz. Die weißen Punkte zeigen die Interaktoren an, die keine Übereinstimmung mit den RNAPI RNA Interaktom zeigen. Das Venn Diagramm zeigt die Überlappungen der beiden Interaktome an.

5. Diskussion

5.1. Versuchsaufbau und Validität der Daten

Die regelrechte Durchführung des Versuchsaufbaus wurde an mehreren Kontrollpunkten nachgewiesen. Zunächst fanden regelmäßige Expressionskontrollen des Flag-getaggen AATF in der Zellkultur statt. Die erfolgreiche Immunopräzipitation wurde ebenfalls mittels Western Blot nachgewiesen. Nach der Hypoxiebehandlung konnte der Schadensmarker γ H2AX nachgewiesen werden. Unsere Untersuchungen am AATF Protein beinhaltete die Einbringung des eines FLAG-Markers wie oben beschrieben, was nur mit einem gewissen Maß an Überexpression möglich war. Der Vorteil des Flp-In Systems besteht jedoch darin, dass eine einzelne Genkopie des Targetproteins integriert werden kann, wohingegen in konventionellen Zelllinien transfizierte DNA oft mit mehr als einer Kopie in das Genom eingebracht wird. Eine Überexpression kann zur Detektion von falsch-positiven Interaktoren führen und ist beispielsweise durch veränderte stochiometrische Eigenschaften oder posttranslationale Modifikationen bedingt. Um unspezifischen Bindungen vorzubeugen, wurden die Pull-Downs mit einer Kontroll IP verglichen und das Interaktom wurde gezielt nach Kontaminationen untersucht. Um eine Reproduzierbarkeit zu gewährleisten, wurden für die Analyse mehrere Replikate gemessen. Weiterführende Untersuchungen an Zellreihen mit endogenem Level an AATF wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt. Hierzu würden sich beispielsweise Methoden zur Modifikation des Genoms, wie das CRISPR-Cas9 System, aber auch andere Endonuklease-basierte Methoden wie TALEN (transcription activator-like endonuclease) eignen. Der Vergleich dieses Interaktoms mit dem Interaktom von Bammert *et al*, welches endogenes AATF aus HeLa Zellen mittels Gelverdau analysierte zeigt jedoch eine hohe Übereinstimmung mit den 60 gefundenen Interaktoren der Gruppe. Dazu muss bedacht werden, dass die von Bammert angewandte Methode bei Weitem nicht so sensitiv ist wie die hier durchgeführte MS-IP. Das liegt in der Methodik begründet: Um bei proteomischen Analysen falsch positive Interaktoren zu vermeiden, wurden diese in früheren Arbeiten meist mit einer Gelelektrophorese kombiniert, um sichtbare Banden zu erhalten. Das ist mit einem enormen Arbeits- und Zeitaufwand verbunden und legt die Vermutung nahe, dass einige transiente Interaktionen womöglich sogar während des Versuchs verloren gehen. Mit der dieser Arbeit zugrunde liegenden Protokoll konnte ein stringenterer Ansatz mit höherem Output verfolgt werden. Aus dem Interaktom von Pineiro *et al*. konnten sogar alle Bindungspartner durch unsere MS-IP bestätigt werden. Ein Teil dieser Arbeit bestand darin, die Interaktionspartner von AATF zu validieren, die in einer früheren Arbeit unseres Labors bereits gefunden wurden. Dies gelang für eine Minderheit der

Interaktoren von Heide Heinen in der unstimulierten Kondition. Die Gründe hierfür könnten vielfältiger Natur sein. Grundsätzlich erhält man im Rahmen von groß angelegten proteomischen Analysen lange Listen möglicher Interaktoren, deren biologische Relevanz zu beurteilen jedoch weiterer Analysen bedarf. Das Protokoll beinhaltete eine leichte Abwandlung für die MS-IP. Zudem wurde für diese Arbeit ein Dimethyl-Labeling Schema verwendet. Beides sollte allerdings in der Theorie nicht zu einer Änderung der Interaktionspartner führen. Auch die Nutzung verschiedener Antikörper muss bedacht werden. Eine Analyse der in dieser Arbeit gefundenen Bindungspartner, die im AATF UV Interaktom von Heide Heinen nicht vorkamen, zeigte, dass sich ein Großteil derer in der publizierten Literatur durchaus wiederfanden.

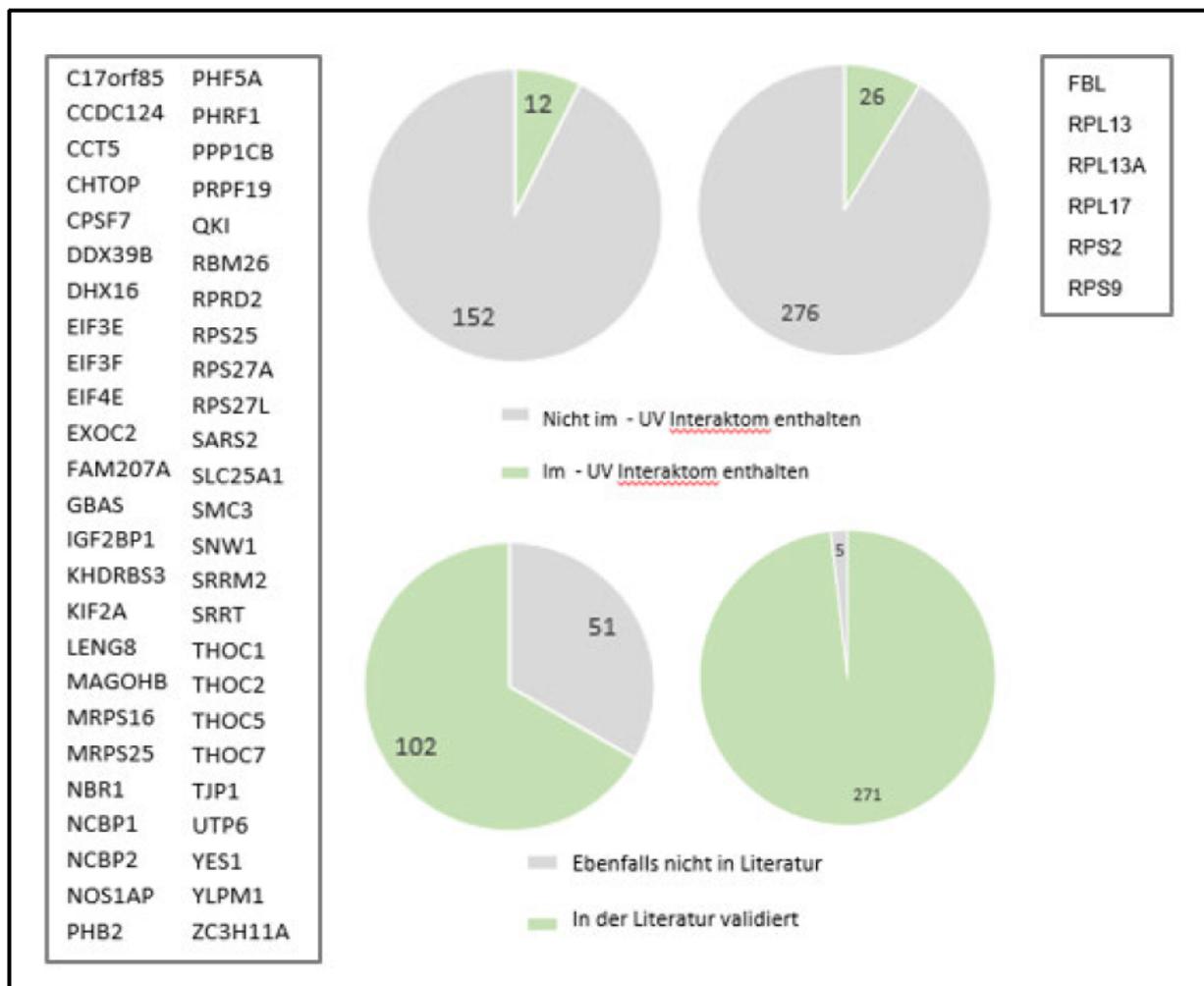


Abbildung 24: Das AATF Interaktom ließ sich durch die publizierte Literatur validieren

Dargestellt sind in grau links die 51 Interaktoren der Kondition Minus-Hypoxie und rechts die 5 Interaktoren der Kondition Minus-RNase die sich in der Literatur nicht wiederfanden.

Letztendlich ist nicht nachvollziehbar, weshalb keine größere Übereinstimmung der Interaktome gezeigt werden konnte.

5.1.1. AATF - ein RNA-bindendes Protein im Zentrum der Ribosomenbiogenese

An Ribosomen findet die Proteinsynthese statt, damit bilden sie die Grundlage für Zellwachstum und Proliferation. Kommt es beim Aufbau der Ribosomen selbst zu Defekten, kann dies eine Vielzahl an Erkrankungen nach sich ziehen, daher werden diese Vorgänge strengstens kontrolliert.⁴⁴ In den letzten Jahren häuften sich Hinweise, dass AATF eine entscheidende Rolle in der Ribosomenbiogenese spielt. Zeitgleich zu dieser Arbeit zeigten Bammert *et al.*, dass AATF Teil des ANN Komplexes ist, und postulierten eine entscheidende Bedeutung für den Aufbau der kleinen ribosomalen Untereinheit.³² Anschließend publizierten Pineiro *et al.* das RNAPI abhängige Interaktom.³⁴ In einigen weiteren Arbeiten wurden Interaktionen mit verschiedenen ribosomalen Proteinen gezeigt.⁴⁵ Unsere Gruppe hat dabei – maßgeblich durch die Arbeit meines Mitdoktoranden Rainer Kaiser – in einer umfassenden Analyse des RNA-Interaktoms die durch AATF gebundene RNA genau charakterisiert und damit einen entscheidenden Beitrag zu diesem Verständnis geleistet. In einem RNA interactome capture wurde AATF als RNA-bindendes Protein bestätigt. Mittels eCLIP Sequencing wurde gezeigt, dass neben mRNA und snoRNA vornehmlich die 45 prä-rRNA gebunden wird. Die entsprechenden Bindungsstellen konnten passend dazu nahe der SSU Cleavage Domänen lokalisiert werden. Meine hier dargelegte umfassende proteomische Analyse der Interaktionspartner von AATF konnte schließlich eine Vielzahl von Bindungspartnern identifizieren, die eine Rolle in der rRNA Reifung spielen – insbesondere solchen, die für den Aufbau der SSU verantwortlich sind. Validiert wurden die gefundenen Interaktionen im Nachgang meiner Analysen zudem durch unabhängige Versuche in unserer Gruppe mittels Co-Immunopräzipitation von drei dieser Bindungspartner, die eine bekannte Rolle im Aufbau der SSU spielen: Fibrillarin (FBL), Nucleolar Protein 2 (NOP2) und Heat repeat containing 1 protein (HEATR1). Mit diesen Daten konnten wir AATF als Schlüsselfaktor der Ribosomenbiogenese bestätigen und diese Erkenntnisse erfolgreich im Juli 2019 publizieren.⁴⁵ Die gefundenen Interaktoren der MS-IP von AATF erwiesen sich zu fast 80 Prozent als RNA-bindende Proteine und 15 Prozent der Interaktoren machten ribosomale Proteine aus. Durch Auslösung von zellulärem Stress im Rahmen der Hypoxiebehandlung konnten diese nochmal signifikant vermehrt angereichert werden. Bis auf zwei Ausnahmen – nämlich dem RBP SLIRP und der Peptidyltransferase PPP1CB – konnte ich zeigen, dass diese Interaktionen nicht RNA-abhängig sind, sondern am ehesten auf direkter Protein-Protein Bindung beruhen. Welche Relevanz hat diese Erkenntnis? Um Protein Interaktionen nicht nur zu benennen, sondern ein Verständnis der molekularen Abläufe und schließlich sogar eine Zielstruktur für einen translationalen Therapieansatz daraus abzuleiten erfordert ein weiterführendes Verständnis der Art der Proteinbindung. Betrachten wir zum Beispiel den von Bammert *et al.* publizierten und mehrfach bestätigten ANN Komplex. Dieser

Komplex aus AATF, NGDN und NOL10 bildet eine entscheidende Rolle beim Aufbau der SSU Einheit des Ribosoms. Dies konnten die Autoren zeigen, indem der Verlust von einzelnen Komponenten des Komplexes zu einem fehlerhaften Aufbau der 45S rRNA und somit der 40S Untereinheit des Ribosoms nach sich zog. Die exklusive Deletion von AATF führte zum gleichen Ergebnis. Wie genau der Komplex jedoch die rRNA bindet ist damit nicht erklärt. In der Literatur finden sich Hinweise, dass sowohl AATF selbst, aber auch NGDN und NOL10 RNA selbst binden können.^{32,33} Hätte sich nun in der Immunopräzipitation nach RNase Verdau ein Verlust eines Interaktionspartners des Komplexes gezeigt, hätte man postulieren können, dass die Bindung an AATF RNA-abhängig war. Dieser Faktor könnte damit der Teil des Komplexes gewesen sein, der RNA direkt bindet. Während Bammert *et al.* zwar zeigen konnten, dass die Interaktion zwischen AATF und NGDN durch direkte Proteinbindung über die UTP3 Domäne von NGDN und der konservierten AATF Superfamily Domain AATFD besteht, wurde die entsprechende Domäne für NOL10 nicht nachgewiesen und vermutet, dass die Interaktion am ehesten RNA-vermittelt ist. In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass es im Vergleich des Interaktoms vor und nach RNase Behandlung zu keiner signifikanten Änderung der Anreicherung von NGDN oder NOL10 kam - und somit kein Hinweis darauf besteht, dass einer der beiden Akteure der RNA-bindende Part ist. Wir sahen jedoch, dass zahlreiche Komponenten des SSU Prozessoms durch AATF gebunden werden. Möglicherweise stellt also AATF die Verbindung des ANN Komplexes und dem SSU Prozessom dar.

5.1.2. AATF als möglicher Faktor der Translationskontrolle

Betrachtet man die weiteren Schritte der Proteinsynthese am Ribosom unter zellulären Stressbedingungen, ergeben sich weitere spannende Beobachtungen. Die Translation wird in Gang gesetzt, wenn ein streng regulierter Mechanismus dafür sorgt, dass die mRNA an die kleine Ribosomenuntereinheit assoziieren kann, ein Initiationscodon an die Peptidylstelle gesetzt wird und schließlich die große Ribosomenuntereinheit den Komplex vervollständigt, um die Synthese zu starten. Da sich unter den Interaktoren zahlreiche Vertreter des Eukaryotischen Initiationskomplex befanden, befasste ich mich eingehender mit den einzelnen Faktoren und verglich deren Anreicherung unter Hypoxie-Behandlung mit der physiologischen Kondition. Eine strenge Regulation dieser Faktoren ist wichtig, da die Translationsüberwachung ein entscheidender Kontrollmechanismus der Genexpression ist. Hierbei stellte ich fest, dass alle eIFs unter zellulären Stressbedingungen eine vermehrte Interaktion mit AATF zeigten. Einige konnten sogar nur unter Hypoxie signifikant nachgewiesen werden (Tabelle im Anhang). EIF3 ist nicht nur der größte, aus 13 Untereinheiten bestehende Komplex, dieser zeigte auch die

signifikanteste Änderung nach Hypoxie-Behandlung. Ein Blick in die Literatur zeigt, dass einige eIFs in menschlichen Tumoren überexprimiert nachgewiesen wurden.^{46,47}

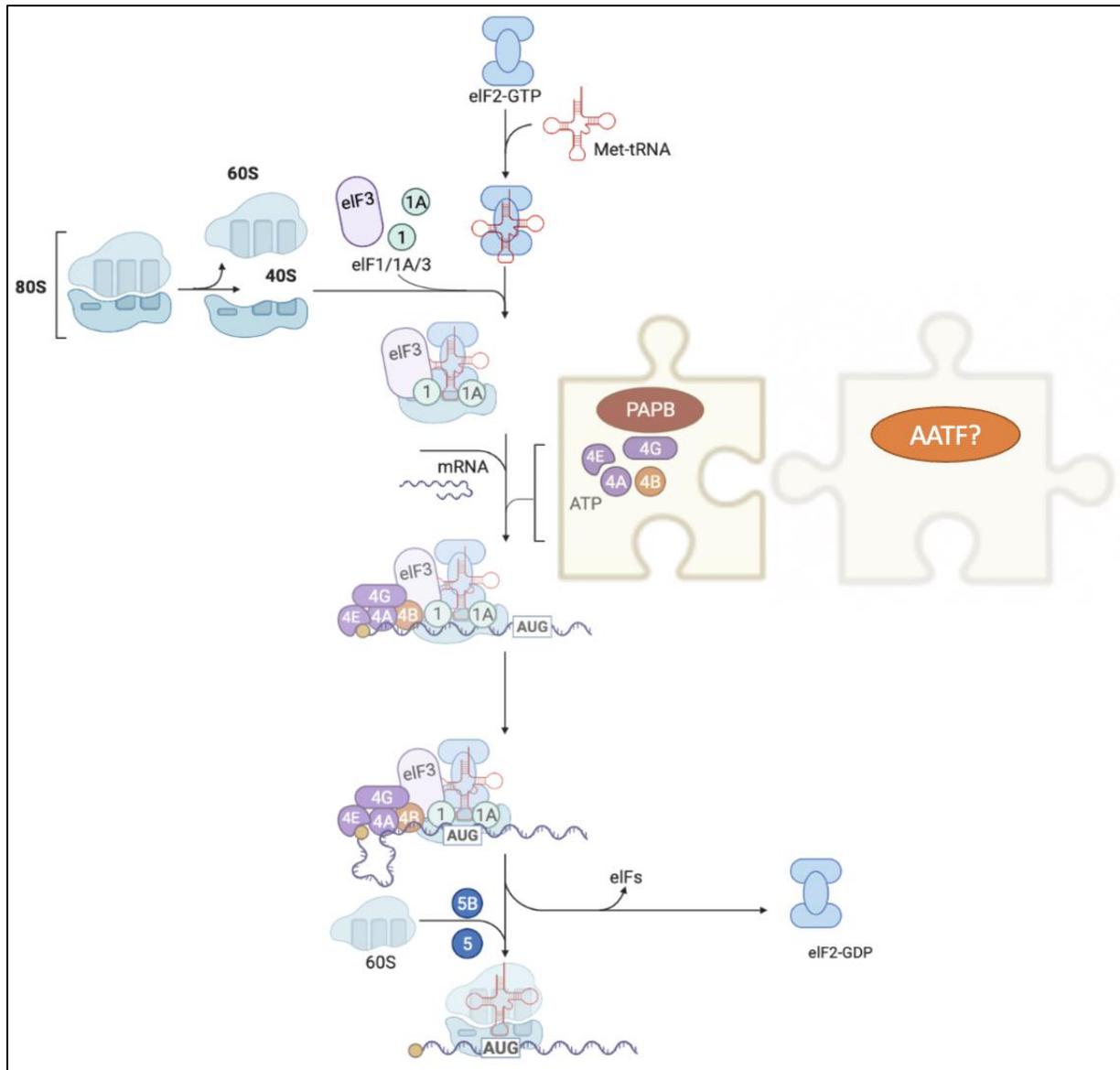


Abbildung 25: Mögliche Rolle von AATF bei der Translationsinitiation und Zusammenbau der Translationsmaschinerie mit Verbindung zum mTORC1 Pathway

Darstellung des eukaryotischen Initiationskomplexes. Die kleine ribosomale Untereinheit wird vor Synthesebeginn mit den eukaryotischen Initiations Faktoren eIF-1 und eIF-3 beladen. Die 40S Untereinheit bindet eIF-1 und eIF-3, die Initiations Met-tRNA wird von GTP beladenem eIF2 begleitet. Diese spaltet nach Auffinden des Initiationscodons AUG GTP zu GDP+P und bahnt damit den Weg für die Rekrutierung der 60S Untereinheit durch eIF-5. (Abbildung erstellt mit Biorender)

Eine Überexpression des Faktors eIF3a führte in einer Arbeit interessanterweise zu einer vermehrten Sensitivität gegenüber der Therapie mit Cisplatin⁴⁸, in einer anderen Arbeit konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Doxorubicin gezeigt werden.⁴⁹ Ein möglicher zugrunde

liegenden Mechanismus wurde erst jüngst publiziert⁵⁰ - nämlich, dass sich die Cisplatin Sensitivität infolge zellulärer Stressreaktion mTORC1 vermittelt verändert. Es konnte gezeigt werden, dass eIF3a die Raptor Synthese via Interaktion mit dem RBP HuR negativ beeinflusst und so zu einer veränderter mTORC1 Aktivität führt. Wie wir wissen, induziert auch AATF die Raptor vermittelte Inhibition von mTORC1. Damit eröffnet sich ein spannender möglicher neuer Zusammenhang und Angriffspunkt der Translationsregulation. Daneben sind jedoch auch onkogene Funktionen von eIF3a beschrieben.^{51,52} Diese beiden Erkenntnisse scheinen zunächst einmal nicht intuitiv miteinander vereinbar zu sein. In bis dato gesunde Zellen könnte der Faktor mittels Suppression von Proteinen der DDR agieren, während sich unter Stressbedingungen die Sensitivität gegenüber Therapeutika wie Cisplatin (welches ebenfalls eine DNA-Schädigung hervorruft) erhöht.

5.2. Nukleoläre Integrität und p53 - der „Hüter des Genoms“

In dieser Arbeit konnte nun eine Reihe von Veränderung der Interaktionen zwischen AATF und jener Gruppe ribosomaler Proteine gezeigt werden, die als Teil des so genannten RP-MDM2-P53 Signalwegs als zentrale Vermittler der p53 Aktivität wirken. Als Reaktion auf ribosomalen Stress können sie mit MDM2 interagieren und die MDM2-vermittelte Ubiquitinierung und Degradation von p53 hemmen, was zu einem p53-abhängigen Zellzyklusstillstand oder einer Wachstumsunterdrückung führt. Der Signalweg stellt damit einen molekularen Schalter zur Überwachung der Integrität der ribosomalen Biogenese dienen könnte. Die RPs agieren teils direkt, teils indirekt mit MDM2. Im vorliegenden Interaktom konnte eine signifikante Interaktion mit 85 ribosomalen Proteinen des MDM2 Signalwegs aufgezeigt werden. Nur sechs dieser Proteine wurden nach Hypoxie etwas vermindert angereichert (RPL9, RPS5, RPS, RPS 27A, RPL28), die Fold Changes lagen jedoch allesamt jeweils unter eins.²⁹ Im Anhang sind die 35 hochsignifikanten Bindungspartner mit einer Fold Change von über drei aufgeführt. Die meisten Interaktionspartner wurden nach der Hypoxiebehandlung noch höher angereichert als zuvor. Interessanterweise war das mit Abstand am höchsten angereicherte Protein RPL26 – welches auch in der publizierten Literatur eine Sonderrolle einnimmt: Einerseits bindet RPL26, wie andere RPs auch, an MDM2 und hemmt die MDM2-vermittelte Ubiquitinierung und den Abbau von p53, wodurch p53 stabilisiert wird. Andererseits bindet es aber auch direkt an die 5'-UTR von p53 und fördert dessen Translation. Neben p53 konnte RPL26 auch als positiver Regulator von p73 - einem weiteren Tumorsuppressorprotein der p53-Familie - identifiziert werden.⁵³ Dies geschieht zum einen auch über die Inhibierung von MDM2, zum anderen fördert RPL26 die Translation durch Bindung an die 3'UTR sowie den Initiationskomplex eIF4E von p73. Unabhängig von p53 konnte gezeigt werden, dass ein Knockdown von RPL26 zu

einer verminderten Expression von p73 führt. RPL26 ist zudem das Hauptziel vom Ubiquitin fold modifier 1 (UFM1), welches wesentliche Funktionen in der Embryonalentwicklung einnimmt und eine funktionelle Verbindung zwischen UFMylierung und ER-Proteinhomöostase herstellt. Auch RPL5, RPL11 und RPL23, drei funktionell absolut zentrale RPs des MDM2 Signalwegs wurden allesamt vermehrt nach Hypoxie als Bindungspartner identifiziert. Wir wissen bereits durch die Arbeit von De Nicola *et al.* aus 2009, dass AATF ebenfalls direkt mit MDM2 interagiert und dies zum Abbau von AATF führt. Voraussetzung hierzu ist die Bindung von Pin1 an AATF. Es konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Entscheidung zur Apoptoseeinleitung obligate Voraussetzung war, damit Pin1 AATF überhaupt bindet. Damit propagieren sie AATF hier erneut – ähnlich wie in seiner Rolle als Moderator der p53 Antwort via PUMA, BAX und BAK nach Phosphorylierung durch MK2 – als molekularen Schalter, der eine tragende Rolle bei der Entscheidung zwischen Zellzyklusarrest und Apoptose spielt: Nicht nur indem es nach DNA-Schäden phosphoryliert und daraufhin p53 und p21 aktiviert, sondern auch indem es für die Apoptoseeinleitung zwingend runterreguliert werden muss. Dieser Hintergrund macht die gefundenen zahlreichen Interaktionen von AATF mit den RPs des MDM2 Signalwegs besonders spannend, denn im Grunde suggeriert er, dass hier ein möglicher Angriffspunkt als Target Therapie in Tumoren liegen könnte. Dazu ist ein genaues mechanistisches Verständnis unabdingbar, welches aktuell noch nicht vorliegt. Pin1 selbst wurde in der vorliegenden Arbeit als Interaktor identifiziert, war jedoch nicht hoch signifikant angereichert, nach der Hypoxiebehandlung war diese zwar etwas höher, aber statistisch noch immer nicht signifikant. Ich deute dies als Zeichen dafür, dass die zellulären Stresslevel auf die Hypoxiebehandlung noch nicht zur Apoptoseeinleitung ausgereicht haben könnte. Bei zahlreichen weiteren nukleolären Proteinen konnte im Rahmen dieser Arbeit ein verändertes Interaktionsprofil mit AATF aufgedeckt werden: Das nukleoläre Protein BOP1 ist an der prä-RNA Verarbeitung und dem Zusammenbau der ribosomalen Untereinheit beteiligt. Nach Einführung einer Mutation konnte man einen p53-abhängigen Zellzyklusstillstand feststellen.⁵⁴ Fibrillarin, eine rRNA O-Methyltransferase, fungiert als Reifungsmarker der ribosomalen 40S Untereinheit. Bereits im Vergleich der Interaktome +/- UV Behandlung konnte Fibrillarin nur im +UV Interaktom nachgewiesen werden. Hier sahen wir das Protein in beiden Konditionen, jedoch 1,6-fach erhöht nach Hypoxie Behandlung. Nach der RNase Behandlung sahen wir eine geringere Anreicherung -0,6-fach, die Anreicherung war aber immer noch signifikant. NOP56 ist ein weiteres nukleares Protein, welches 1,8-fach erhöht nach Hypoxiebehandlung angereichert war – und auch in Heide Heines Interaktom nur nach UV-Behandlung nachgewiesen wurde. Nukleolin (NCL) konnte durch die Hypoxiebehandlung 1,8-fach erhöht angereichert werden. Eine Überexpression wurde in mehreren Arbeiten in malignen Erkrankungen wie Magenkrebs⁵⁵ Brustkrebs⁵⁶ und Chronisch-lymphatischer Leukämie⁵⁷ beobachtet. Ein Interaktionspartner

von Nucleolin wiederum ist Nucleophosmin, welches ebenfalls mit zahlreichen Krebserkrankungen in Verbindung gebracht wird: Nucleophosmin ist ein multifunktionales Protein der Ribosomenbiogenese. Eine protoonkogene Wirkung könnte hier über eine Inaktivierung des p53/ARF Signalwegs vermittelt werden.⁵⁸ Nach der Hypoxie-Behandlung sahen wir auch hier eine 1,3-fach erhöhte Anreicherung der Interaktion mit AATF.

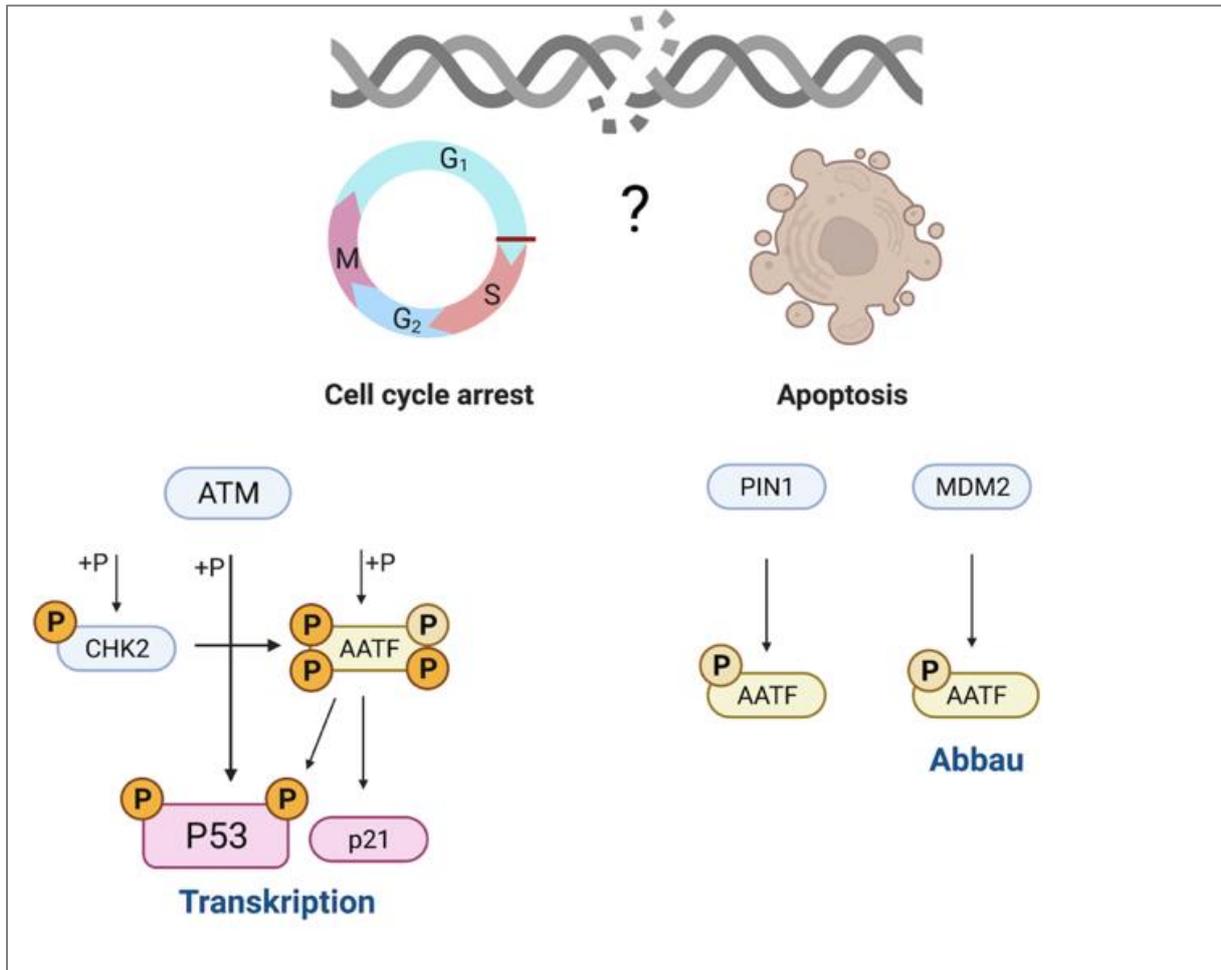


Abbildung 26: AATF als molekularer Schalter zwischen Zellzyklusarrest und Apoptose

In dem von De Nicola *et al.* suggerierten Modell induziert genotoxischer Stress die Stabilisierung von AATF durch dessen Phosphorylierung via ATM und Chk2. Hierdurch werden p53 und p21 vermehrt exprimiert. Apoptotische Schäden induzieren ebenfalls eine Phosphorylierung sowie eine Interaktion mit Pin1. Pin1 katalysiert Konformationsänderungen die für eine Interaktion mit MDM2 sorgen und AATF abbauen. (Abbildung erstellt mit Biorender)

5.2.1. Chaperone

Zum nukleolären Proteom gehören zudem zahlreiche Chaperone – einige davon finden sich auch im AATF Interaktom. HSPA1A, HSP5, HSP8 und HSP 9 konnten allesamt nach der Hypoxiebehandlung signifikant (bis zu 1,6-fach) erhöht angereichert werden. Bei der Proteinbiosynthese verhindern Chaperone, dass fehlgefaltete Proteinketten aggregieren. Klinisch spielt

dies beispielsweise bei der Entwicklung neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson oder Chorea Huntington eine Rolle. AATF wurde mit seiner anti-apoptotischen Aktivität bereits in mehreren Arbeiten mit neurodegenerativen Krankheiten assoziiert: Zunächst lokalisiert es nachweislich zu postmitotischen neuronalen Zellen. Dort wird seine Interaktion mit dem Protein Tau während der neuronalen Apoptose moduliert.⁵⁹ Tau ist am Aufbau und an der Stabilisierung des neuronalen Mikrotubuli-Netzwerks beteiligt. Es wurde nachgewiesen, dass AATF in neuronalen Zellen mit dem Protease activating receptor 4 (Par-4) interagiert, die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies inhibiert und vor Apoptose schützt.⁵ Ein genaueres Verständnis der zugrunde liegenden molekularen Mechanismen konnte erreicht werden, als AATF außerdem als Aktivator und Interaktor von Cdk5 identifiziert wurde. Die Cyclin-abhängige Kinase 5 spielt eine Rolle bei der Phosphorylierung des Tau Proteins und ist bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer dysreguliert. CDK5 Inhibitoren werden als Targets neuer Therapien gehandelt, die eine Hyperphosphorylierung von Tau reduzieren und somit die Formation neurofibrillärer Plaques vermindern könnten. AATF als direkter Interaktor von CDK5 könnte somit auch in den Fokus von neuen Behandlungen rücken, die sich auf die Regulation des apoptotischen Signalings in neuronalem Gewebe fokussieren.⁶⁰

5.2.2. Zusammenfassung

Groß angelegte proteomische Analysen bieten die Möglichkeit, ein Verständnis über Proteinkomplexe zu gewinnen und zur Entschlüsselung physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen beizutragen sowie neue Kandidaten für weitergehende Analysen zu identifizieren. Entscheidend dabei ist das Bewusstsein darüber, dass die Proteomik ein außerordentlich dynamisches Feld ist und die Anzahl und Art der Bindungspartner eines Proteins stark von exogenen Umständen abhängt. Daher ist es von besonderem Interesse die Interaktionspartner eines Proteins unter verschiedenen Konditionen zu betrachten.

Der Apoptose-antagonisierende Transkriptionsfaktor AATF, ein wahrhaftig multifunktionales Protein, wurde in dieser Arbeit einer umfassenden proteomischen Analyse unterzogen. Der Fokus wurde dabei auf die Veränderungen der Proteinbindungen unter hypoxischen Stress gelegt. Der Großteil bereits publizierter Interaktoren wurde durch diese Arbeit validiert. Während darüber hinaus zahlreiche spannende neue Interaktionen unter dem zellulären Stress der Hypoxie nachgewiesen werden konnten, wurde auch gezeigt, dass einige Interaktionspartner verloren gehen. Funktionelle Analysen der Bindungspartner, die sich zwischen den beiden Konditionen am stärksten unterscheiden, offenbarte interessante neue Aspekte der zellulären

Stressantwort. AATF konnte zudem als Protein im Fokus der ribosomalen Biogenese identifiziert werden. Fast 80% der Interaktionspartner waren RNA-bindende Proteine – daher interessierte uns besonders, ob die Bindungen RNA-vermittelt sind oder auf direkte Proteininteraktionen zurückgeführt werden können. Mittels eines zweiten Versuchsaufbaus mit RNase/Benzonase-Behandlung vor der MS-IP konnte schließlich gezeigt werden, dass die meisten Proteininteraktionen unabhängig von RNA sind. Die neuen Erkenntnisse über seine bedeutende Rolle in der Ribosomenbiogenese und die Identifikation neuer stressassoziierter Interaktionspartnern zeigten eine weitere Facette der zahlreichen Funktionen des Proteins auf und geben Anlass zur weiteren Untersuchung von AATF als mögliche Schnittstelle zwischen DNA-Schadensantwort und Zellproliferation.

5.2.3. Ausblick

Nach allem was wir heute wissen bietet AATF mehr denn je Hoffnung, künftig als potenzielles therapeutisches Target zum Einsatz zu kommen – und zwar umso mehr dieses Wissen zu einem umfassenden Verständnis jener molekularen Mechanismen zusammenwächst, die dem Protein seine vielfältige Rolle bei der Aufrechterhaltung zellulärer Homöostase verleihen. Große proteomische Analysen wie die hier vorliegende bieten eine großartige Möglichkeit, neue Targets zu identifizieren, stellen aber nur den ersten Schritt zur Erforschung möglicher Therapien dar. Interessant könnten subzelluläre Interaktome oder Interaktome in Tumorgewebe sowie die Untersuchung der Bindungspartner unter weiteren Konditionen wie osmotischem Stress sein. Eine genauere Charakterisierung der einzelnen Interaktionen und der noch nicht erforschten funktionellen Residuen zur Bindung könnte weiteren Aufschluss über mögliche Therapieansätze geben. Während hier etwa die Bindungsdomäne von einigen wichtigen Interaktoren wie p53, BRCA1 oder PIN1 bereits bekannt sind, wäre es interessant, jene in dieser Arbeit neu gefundenen Interaktoren näher zu charakterisieren, die unter Hypoxie besonders vermehrt angereichert wurden.

Neben Möglichkeiten zur zielgerichteten molekularen Tumordiagnostik im Sinne von Biomarkern oder Klassifikation von Tumoren werden vor allem zielgerichtete Therapiestrategien für Krebserkrankungen von Bedeutung sein. Wir wissen bereits viel über die Rolle von AATF in verschiedenen Signalkaskaden, die im Fokus des Zellzyklus, Apoptoseeinleitung und DNA Damage Response stehen. AATF kommt dabei eine anti-apoptotische und somit prognostisch ungünstige Rolle bei der unkontrollierten Zellteilung von Tumorgewebe zu. Eine Möglichkeit bestünde darin, AATF gezielt in Tumorgewebe auszuschalten. Wie obenstehend beschrieben

wissen wir, dass AATF beispielsweise in Brustkrebs, hepatozellulären Karzinomen, Osteosarkomen, Leukämien und im Wilms Tumor vermehrt exprimiert wird. Hier können molekulare Mechanismen wie Antikörpertherapien, RNAi und Einbringung von Nanopartikeln sowie die Nutzung des CRISPR/Cas9 Systems zum Tragen kommen, aber auch topische siRNAs Technologie – wie zuletzt zum Silencing von Onkogenen bei HPV positiven Zervix Karzinomen beschrieben⁶¹ – sind denkbar. Sind die Signalwege bekannt, ist das Ziel bei der Entwicklung neuer Krebsmedikamente vor allem, die Signaltransduktion stromabwärts liegender Zielproteine anzugreifen. Hier kommen beispielsweise PUMA, NOXA, BAX, Bcl-2 oder P13k/Akt infrage. Bei der Depletion von AATF ist zu bedenken, dass diese besonders zielgerichtet erfolgen muss, da ein vollständiger Knock-out von AATF in Tiermodellen bisher in allen Fällen zu ausgeprägten Defekten im Zielgewebe führte. Grundsätzlich muss hier ebenso über das Auftreten möglicher Sekundärtumoren nachgedacht werden, insbesondere wenn die Expression eines Proteins mit solch diversen Funktionen wie AATF verändert wird.

Insbesondere Strategien zur Steigerung der Sensitivität gegenüber bestimmten Therapeutika sind vielversprechend. Tumore, die beispielsweise resistent gegenüber strahleninduzierter DNA-Schäden sind und somit der Apoptose entgehen können, könnten in einem zweiten Behandlungszyklus durch gezielte Hemmung der AATF Funktion konditioniert werden. Dabei muss beachtet werden, dass die Proliferation anderer sich teilender Zellen – ähnlich wie beim Einsatz von Zytostatika – beeinträchtigt werden könnte. Hier wäre die Rolle von AATF beispielsweise in der Hämatopoese, Spermatogenese oder den Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts interessant zu erforschen. Besonders vielversprechend ist der Einfluss von AATF auf interkalierende Therapeutika wie Cisplatin oder Actinomycin D, bei denen bereits eine erhöhte Sensitivität nachgewiesen werden konnte.¹⁸ Auch Mitosehemmstoffe sind von großem Interesse für die Modulierung eines Proteins, welches maßgeblichen Einfluss auf den Zellzyklus nimmt.

Was können uns die Erkenntnisse zu AATF unter hypoxischen Bedingungen verraten? Zum einen können sich Therapien auf die entartete Zelle selbst anstelle auf deren Umgebung konzentrieren. Schnell wachsende Tumore sind auf eine effiziente Blutversorgung und eine ausreichende Versorgung mit Nährstoffen angewiesen. Unter hypoxischen Bedingungen kommt es zu einer Akkumulation von HIF1- β und folgend zur vermehrten Transkription von VEGF und PDGF, potente Stimulatoren der Angiogenese. Ein konkretes Beispiel ist der Wilms Tumor, bei dem bekanntermaßen AATF überexprimiert wird. Häufig liegt bei dieser Erkrankung eine Mutation der E3 Ligase VHL vor, die den Abbau von HIF1- α verzögert und somit die Angiogenese fördert. AATF kommt an dieser Stelle auch eine bekannte Rolle zu, da es den PI3/Akt

Signalweg stimuliert und damit ebenfalls HIF1- α stabilisiert. Angiogeneseinhibitoren sind heute bereits verfügbar. Auch metabolomische Analysen wären eine spannende Möglichkeit, diese rücken immer mehr in den Fokus der Erforschung verschiedenster Erkrankungen. Ansätze zur Beeinflussung der zellulären Energiegewinnung als mögliche Strategie eine fortschreitende Tumorerkrankung aufzuhalten sind Gegenstand aktueller Forschung und finden bereits translationale Ansätze. Insbesondere der mTOR Signalweg, in dem AATF eine wichtige Rolle spielt steht im Fokus dieser Überlegungen.

Vor dem Hintergrund dieser Arbeit sind vor allem Therapiestrategien interessant, die die mechanistische Rolle von AATF in der Ribosomenbiogenese – und damit bei der Proliferation – berücksichtigen. Naheliegend sind hier Inhibitoren der RNA Polymerase I. Unter Beachtung der oben dargelegten Erkenntnisse im Zusammenhang mit der Translationsregulation könnten spezifische Inhibitoren der Proteinbiosynthese entwickelt werden.

Die vielfältigen – teils dualistischen - Rollen, die AATF in unterschiedlichsten Signalwegen einnimmt, angefangen bei der Embryogenese, bei der Zellzykluskontrolle sowie in der Regulation von Proliferation und Apoptose tragen dazu bei, dass AATF ein hochkomplexes, aber auch vielversprechendes therapeutisches Target darstellt.

6. Literaturverzeichnis

1. Höpker, K. *et al.* AATF/Che-1 acts as a phosphorylation-dependent molecular modulator to repress p53-driven apoptosis. *EMBO J* **31**, 3961–3975 (2012).
2. Page, G., Lödige, I., Kögel, D. & Scheidtmann, K. H. AATF, a novel transcription factor that interacts with Dlk/ZIP kinase and interferes with apoptosis 1. *FEBS Letters* **462**, 187–191 (1999).
3. Srinivas, A. N. *et al.* Emerging roles of AATF: Checkpoint signaling and beyond. *Journal of Cellular Physiology* **236**, 3383–3395 (2021).
4. Wang, D., Chen, T.-Y. & Liu, F.-J. Che-1 attenuates hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte apoptosis by upregulation of Nrf2 signaling. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **22**, 1084–1093 (2018).
5. Xie, J. & Guo, Q. AATF protects neural cells against oxidative damage induced by amyloid beta-peptide. *Neurobiol Dis* **16**, 150–157 (2004).
6. Jain, M. *et al.* Inactivation of Apoptosis Antagonizing Transcription Factor in tubular epithelial cells induces accumulation of DNA damage and nephronophthisis. *Kidney Int* **95**, 846–858 (2019).
7. Welcker, D. *et al.* AATF suppresses apoptosis, promotes proliferation and is critical for Kras-driven lung cancer. *Oncogene* **37**, 1503–1518 (2018).
8. Lindfors, K. *et al.* Identification of novel transcription factor-like gene from human intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* **276**, 660–666 (2000).
9. Fanciulli, M. *et al.* Identification of a novel partner of RNA polymerase II subunit 11, Che-1, which interacts with and affects the growth suppression function of Rb. *FASEB J* **14**, 904–912 (2000).
10. Bruno, T. *et al.* Che-1 phosphorylation by ATM/ATR and Chk2 kinases activates p53 transcription and the G2/M checkpoint. *Cancer Cell* **10**, 473–486 (2006).
11. Bruno, T. *et al.* Che-1 affects cell growth by interfering with the recruitment of HDAC1 by Rb. *Cancer Cell* **2**, 387–399 (2002).
12. Bruno, T. *et al.* Che-1/AATF-induced transcriptionally active chromatin promotes cell proliferation in multiple myeloma. *Blood Adv* **4**, 5616–5630 (2020).
13. Thomas, T., Voss, A. K., Petrou, P. & Gruss, P. The murine gene, Traube, is essential for the growth of preimplantation embryos. *Dev Biol* **227**, 324–342 (2000).
14. Desantis, A. *et al.* Che-1-induced inhibition of mTOR pathway enables stress-induced autophagy. *EMBO J* **34**, 1214–1230 (2015).
15. Reinhardt, H. C. & Schumacher, B. The p53 network: cellular and systemic DNA damage responses in aging and cancer. *Trends Genet* **28**, 128–136 (2012).
16. Bruno, T. *et al.* Che-1 sustains hypoxic response of colorectal cancer cells by affecting Hif-1 α stabilization. *J Exp Clin Cancer Res* **36**, 32 (2017).
17. Tan, S., Fu, L. & Dong, Q. AATF is Overexpressed in Human Bladder Cancer and Regulates Chemo-Sensitivity Through Survivin. *Onco Targets Ther* **14**, 5493–5505 (2021).

18. Fu, L., Jin, Q., Dong, Q. & Li, Q. AATF is Overexpressed in Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Regulates STAT3/Survivin Signaling. *Onco Targets Ther* **14**, 5237–5248 (2021).
19. Brčić, L. *et al.* AATF and SMARCA2 are associated with thyroid volume in Hashimoto's thyroiditis patients. *Sci Rep* **10**, 1754 (2020).
20. Wang, W., Ma, Y.-M., Jiang, Z.-L., Gao, Z.-W. & Chen, W.-G. Apoptosis-antagonizing transcription factor is involved in rat post-traumatic epilepsy pathogenesis. *Exp Ther Med* **21**, 290 (2021).
21. Moss, T. & Stefanovsky, V. Y. At the Center of Eukaryotic Life. *Cell* **109**, 545–548 (2002).
22. Orsolich, I. *et al.* The relationship between the nucleolus and cancer: Current evidence and emerging paradigms. *Semin Cancer Biol* **37–38**, 36–50 (2016).
23. Boulon, S., Westman, B. J., Hutten, S., Boisvert, F.-M. & Lamond, A. I. The Nucleolus under Stress. *Mol Cell* **40**, 216–227 (2010).
24. Andersen, J. S. *et al.* Nucleolar proteome dynamics. *Nature* **433**, 77–83 (2005).
25. Moore, H. M. *et al.* Quantitative proteomics and dynamic imaging of the nucleolus reveal distinct responses to UV and ionizing radiation. *Mol Cell Proteomics* **10**, M111.009241 (2011).
26. Rubbi, C. P. & Milner, J. Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *EMBO J* **22**, 6068–6077 (2003).
27. De Nicola, F. *et al.* The prolyl isomerase Pin1 affects Che-1 stability in response to apoptotic DNA damage. *J Biol Chem* **282**, 19685–19691 (2007).
28. Pelava, A., Schneider, C. & Watkins, N. J. The importance of ribosome production, and the 5S RNP-MDM2 pathway, in health and disease. *Biochem Soc Trans* **44**, 1086–1090 (2016).
29. Liu, Y., Deisenroth, C. & Zhang, Y. RP-MDM2-p53 Pathway: Linking Ribosomal Biogenesis and Tumor Surveillance. *Trends Cancer* **2**, 191–204 (2016).
30. Gamalinda, M. & Woolford, J. L. Paradigms of ribosome synthesis: Lessons learned from ribosomal proteins. *Translation (Austin)* **3**, e975018 (2015).
31. de la Cruz, J., Karbstein, K. & Woolford, J. L. Functions of ribosomal proteins in assembly of eukaryotic ribosomes in vivo. *Annu Rev Biochem* **84**, 93–129 (2015).
32. Bammert, L., Jonas, S., Ungricht, R. & Kutay, U. Human AATF/Che-1 forms a nucleolar protein complex with NGDN and NOL10 required for 40S ribosomal subunit synthesis. *Nucleic Acids Res* **44**, 9803–9820 (2016).
33. Gebauer, F., Schwarzl, T., Valcárcel, J. & Hentze, M. W. RNA-binding proteins in human genetic disease. *Nat Rev Genet* **22**, 185–198 (2021).
34. Piñeiro, D. *et al.* Identification of the RNA polymerase I-RNA interactome. *Nucleic Acids Res* **46**, 11002–11013 (2018).
35. Prabhakar, N. R., Fields, R. D., Baker, T. & Fletcher, E. C. Intermittent hypoxia: cell to system. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **281**, L524–528 (2001).
36. Semenza, G. L. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. *Cell* **148**, 399–408 (2012).

37. Xie, J. & Guo, Q. Apoptosis antagonizing transcription factor protects renal tubule cells against oxidative damage and apoptosis induced by ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol* **17**, 3336–3346 (2006).
38. Heinen, H. Die Bedeutung und Regulation des AATF-Proteinkomplexes bei der zellulären Stressantwort. (2021).
39. O’Gorman, S., Fox, D. T. & Wahl, G. M. Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251**, 1351–1355 (1991).
40. Rappsilber, J., Mann, M. & Ishihama, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. *Nat Protoc* **2**, 1896–1906 (2007).
41. Boersema, P. J., Raijmakers, R., Lemeer, S., Mohammed, S. & Heck, A. J. R. Multiplex peptide stable isotope dimethyl labeling for quantitative proteomics. *Nat Protoc* **4**, 484–494 (2009).
42. A practical guide to the MaxQuant computational platform for SILAC-based quantitative proteomics - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19373234/>.
43. Cox, J. *et al.* Accurate proteome-wide label-free quantification by delayed normalization and maximal peptide ratio extraction, termed MaxLFQ. *Mol Cell Proteomics* **13**, 2513–2526 (2014).
44. Lempiäinen, H. & Shore, D. Growth control and ribosome biogenesis. *Current Opinion in Cell Biology* **21**, 855–863 (2009).
45. Kaiser, R. *et al.* A protein-RNA interaction atlas of the ribosome biogenesis factor AATF. *Scientific Reports* **9**, (2019).
46. Hershey, J. W. B. The role of eIF3 and its individual subunits in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1849**, 792–800 (2015).
47. Yin, J.-Y., Dong, Z., Liu, Z.-Q. & Zhang, J.-T. Translational control gone awry: a new mechanism of tumorigenesis and novel targets of cancer treatments. *Biosci Rep* **31**, 1–15 (2011).
48. Liu, R.-Y. *et al.* Role of eIF3a in regulating cisplatin sensitivity and in translational control of nucleotide excision repair of nasopharyngeal carcinoma. *Oncogene* **30**, 4814–4823 (2011).
49. Yin, J.-Y. *et al.* Effect of eIF3a on Response of Lung Cancer Patients to Platinum-Based Chemotherapy by Regulating DNA Repair. *Clinical Cancer Research* **17**, 4600–4609 (2011).
50. Ma, S., Dong, Z., Huang, Y., Liu, J.-Y. & Zhang, J.-T. eIF3a regulation of mTOR signaling and translational control via HuR in cellular response to DNA damage. *Oncogene* **41**, 2431–2443 (2022).
51. Dong, Z. *et al.* Modulation of differentiation-related gene 1 expression by cell cycle blocker mimosine, revealed by proteomic analysis. *Mol Cell Proteomics* **4**, 993–1001 (2005).
52. Zhang, L., Pan, X. & Hershey, J. W. B. Individual overexpression of five subunits of human translation initiation factor eIF3 promotes malignant transformation of immortal fibroblast cells. *J Biol Chem* **282**, 5790–5800 (2007).
53. Sun, X.-X. & Dai, M.-S. p73 to the rescue: Role of RPL26. *Oncotarget* **8**, 5641–5642 (2016).
54. Pestov, D. G., Strezoska, Z. & Lau, L. F. Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome

- biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol* **21**, 4246–4255 (2001).
55. Qiu, W. *et al.* Overexpression of nucleolin and different expression sites both related to the prognosis of gastric cancer. *APMIS* **121**, 919–925 (2013).
56. Wolfson, E., Solomon, S., Schmukler, E., Goldshmit, Y. & Pinkas-Kramarski, R. Nucleolin and ErbB2 inhibition reduces tumorigenicity of ErbB2-positive breast cancer. *Cell Death Dis* **9**, 47 (2018).
57. Otake, Y. *et al.* Overexpression of nucleolin in chronic lymphocytic leukemia cells induces stabilization of bcl2 mRNA. *Blood* **109**, 3069–3075 (2007).
58. Colombo, E., Marine, J.-C., Danovi, D., Falini, B. & Pelicci, P. G. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol* **4**, 529–533 (2002).
59. Barbato, C. *et al.* Rb binding protein Che-1 interacts with Tau in cerebellar granule neurons. Modulation during neuronal apoptosis. *Mol Cell Neurosci* **24**, 1038–1050 (2003).
60. Buontempo, S. *et al.* Che-1 enhances cyclin-dependent kinase 5 expression and interacts with the active kinase-complex. *Neuroreport* **19**, 531–535 (2008).
61. Liu, F. *et al.* SRSF10-mediated IL1RAP alternative splicing regulates cervical cancer oncogenesis via mIL1RAP-NF- κ B-CD47 axis. *Oncogene* **37**, 2394–2409 (2018).

7. Anhang

Tabelle 1: Das AATF Interaktom vor Hypoxie-Behandlung

Protein	Gen	-Log P Wert	Log2 FC
Protein AATF	AATF	2,35012	5,72692
Histone H1.4	HIST1H1E	4,17147	4,8432
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	PPP1R12A	2,00534	4,81158
N-acetyltransferase 10	NAT10	2,14149	4,66059
Histone H2B	HIST1H2B	2,05927	4,34992
60S ribosomal protein L26	RPL26	2,34023	4,27868
Neuroguidin	NGDN	2,76276	4,21411
Kinesin-like protein KIF11	KIF11	3,16308	4,20249
Nucleolar protein 56	NOP56	2,00553	4,1227
40S ribosomal protein S17	RPS17L	2,65292	4,10736
60S ribosomal protein L35a	RPL35A	5,26259	4,0547
40S ribosomal protein S14	RPS14	4,06917	4,01388
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A	3,12446	4,00356
60S ribosomal protein L10;60S ribosomal protein L10	RPL10	4,84459	4,00347
Serine/arginine-rich splicing factor 6	SRSF6	3,35043	3,99574
60S ribosomal protein L13	RPL13	5,63532	3,96552
RNA-binding protein Raly	RALY	4,06212	3,96378
39S ribosomal protein L15, mitochondrial	MRPL15	2,11054	3,89766
60S ribosomal protein L34	RPL34	2,0453	3,84164
Bcl-2-associated transcription factor 1	BCLAF1	4,57792	3,83574
Nucleolar protein 10	NOL10	4,03548	3,81521
La-related protein 4B	PA2G4	2,89169	3,79463
Complement 1 Q subcomponent-binding protein	C1QBP	3,68735	3,75044
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	DDX52	3,6892	3,73611
60S ribosomal protein L17	RPL17	3,40941	3,72297
60S ribosomal protein L9	RPL9	3,12787	3,70003
Chromatin target of PRMT1 protein	CHTOP	3,67042	3,66904
60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1	2,28529	3,65913
Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1	2,77477	3,64592
60S ribosomal protein L36a	RPL36A	1,90426	3,64519
60S ribosomal protein L28	RPL28	3,68277	3,61136
60S ribosomal protein L27a	RPL27A	4,30817	3,60743
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	ZRANB2	4,06717	3,60039
Protein BUD31 homolog	BUD31	3,3945	3,59705
60S ribosomal protein L18a	RPL18A	3,42243	3,58648
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	3,91194	3,55834
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	3,45289	3,55778
Cleavage stimulation factor subunit 2	CSTF2	2,30594	3,52632
Pre-mRNA-splicing factor RBM22	RBM22	3,16841	3,48837
Myosin light polypeptide 6	MYL6	3,20743	3,4507
Protein RRP5 homolog	PDCD11	5,82993	3,449
40S ribosomal protein S20	RPS20	3,51697	3,44525
Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	ADAR	2,37826	3,44377
PAX3- and PAX7-binding protein 1	PAXBP1	2,2651	3,43181
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4	IMP4	3,7026	3,43084
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	IGF2BP1	3,52237	3,4198
Histone RNA hairpin-binding protein	SLBP	2,67503	3,41641
Histone H4	HIST1H4A	2,31125	3,41604
Protein quaking	QKI	3,87539	3,39986
60S ribosomal protein L3	RPL3	3,99754	3,38824
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	3,90414	3,36053
60S ribosomal protein L8	RPL8	3,84047	3,35641
Nucleolar complex protein 4 homolog	NOC4L	4,01842	3,35353
Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	DNTTIP2	2,67911	3,34129

Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	2,89544	3,33345
Histone H2A type 2-C, 2-A, 1-C	HIST2H2AC	2,30046	3,31459
SNW domain-containing protein 1	SNW1	3,95745	3,30357
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	4,16976	3,29162
Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	PAIP2	3,37742	3,26003
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	3,806	3,25963
60S ribosomal protein L24	RPL24	3,92619	3,24602
rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	FBL	3,38553	3,23879
60S ribosomal protein L12	RPL12	2,47603	3,23665
40S ribosomal protein S23	RPS23	3,54565	3,23271
ATP-dependent RNA helicase DDX50	DDX50	4,59034	3,21695
Splicing factor, arginine/serine-rich 19	SCAF1	4,0508	3,21595
Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	BMS1	3,17705	3,21318
Uncharacterized protein C17orf85	C17orf85	2,64545	3,20591
60S ribosomal protein L23a	RPL23A	3,67769	3,20253
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	2,34602	3,20042
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO	3,11095	3,19916
60S ribosomal protein L6	RPL6	3,67011	3,18154
60S ribosomal protein L37a	RPL37A	3,4026	3,1737
60S ribosomal protein L10a	RPL10A	2,70976	3,16726
Mitochondrial inner membrane translocase subunit Tim8 A	TIMM8A	2,05673	3,14848
Protein DGCR14	DGCR14	2,07475	3,14256
40S ribosomal protein S25	RPS25	4,92465	3,1402
La-related protein 4	LARP4	4,34008	3,13234
60S ribosomal protein L4	RPL4	3,90257	3,13143
40S ribosomal protein S11	RPS11	5,54168	3,12682
Serine/arginine-rich splicing factor 5	SRSF5	3,08423	3,12656
40S ribosomal protein S18	RPS18	3,40895	3,12362
Pre-mRNA-processing factor 17	CDC40	3,04709	3,1062
U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	UTP14A	3,78887	3,10477
40S ribosomal protein S5	RPS5	3,24868	3,1031
ATP-citrate synthase	ACLY	4,07448	3,10033
Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6	3,75472	3,09826
SRSF protein kinase 1	SRPK1	4,41734	3,09396
Sequestosome-1	SQSTM1	4,09475	3,0921
RNA-binding protein 14	RBM14	3,05074	3,08392
Ribosomal protein L19;60S ribosomal protein L19	RPL19	3,27276	3,07987
Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	3,2186	3,07951
40S ribosomal protein S7	RPS7	2,2401	3,07435
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	2,69724	3,06803
Protein FAM207A	FAM207A	2,29913	3,06746
Eukaryotic initiation factor 4A-III	EIF4A3	3,01937	3,06428
60S ribosomal protein L35	RPL35	2,25083	3,05389
Cleavage stimulation factor subunit 3	CSTF3	1,96143	3,04729
Pinin	PNN	3,41475	3,0457
40S ribosomal protein S19	RPS19	3,6164	3,02444
28S ribosomal protein S22, mitochondrial	MRPS22	4,29552	3,02272
Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	3,83891	3,02148
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	USP39	3,8016	3,02018
Coiled-coil domain-containing protein 86	CCDC86	2,14142	3,00729
RNA-binding protein 3	RBM3	2,92307	3,00516
60S ribosomal protein L31	RPL31	2,73295	3,00404
DnaJ homolog subfamily C member 8	DNAJC8	2,35289	3,00246
Transformer-2 protein homolog beta	TRA2B	2,57657	2,99751
Serine/Arginine-related protein 53	RSRC1	2,05259	2,99506
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	2,46396	2,99
40S ribosomal protein S29	RPS29	3,10496	2,98839
Nuclear pore complex protein Nup153	NUP153	2,33435	2,98834
40S ribosomal protein S16	RPS16	3,99534	2,98307
60S ribosomal protein L15	RPL15	3,27116	2,97933
Smad nuclear-interacting protein 1	SNIP1	3,54294	2,96498
60S ribosomal protein L18	RPL18	3,72467	2,95922
28S ribosomal protein S16, mitochondrial	MRPS16	2,88068	2,95653

ESF1 homolog	ESF1	1,89358	2,9515
Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	1,99635	2,94595
Serine/arginine-rich splicing factor 8	SRSF8	3,12114	2,94049
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	3,34429	2,93812
40S ribosomal protein S3a	RPS3A	3,94619	2,93767
60S ribosomal protein L7	RPL7	3,09764	2,92104
60S ribosomal protein L21	RPL21	4,22861	2,91771
Uncharacterized protein C19orf43	C19orf43	2,96832	2,91288
Histone deacetylase complex subunit SAP18	SAP18	2,5017	2,90691
40S ribosomal protein S30	FAU	4,64954	2,90631
E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	RBBP6	2,85198	2,90418
28S ribosomal protein S34, mitochondrial	MRPS34	3,37994	2,90125
40S ribosomal protein S2	RPS2	3,5139	2,89167
40S ribosomal protein S28	RPS28	3,09848	2,8877
Protein FAM133B	FAM133B	2,35348	2,88741
60S ribosomal protein L13a	RPL13A	2,39974	2,87978
RNA-binding protein 42	RBM42	4,28891	2,87941
60S ribosomal protein L32	RPL32	2,06262	2,8765
U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	U2SURP	2,86375	2,87594
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	3,89996	2,87041
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase	DXH15	2,61991	2,85177
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 3	CPSF3	2,22467	2,84952
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RSL1D1	3,92168	2,82389
Polymerase delta-interacting protein 3	POLDIP3	4,32268	2,81844
60S ribosomal protein L23	RPL23	2,74072	2,80742
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	HNRNPUL2	3,84919	2,80734
Serrate RNA effector molecule homolog	SRRT	3,52671	2,80169
40S ribosomal protein S4, X isoform	RPS4X	3,00164	2,79615
60S ribosomal protein L11	RPL11	2,64945	2,79236
TAR DNA-binding protein 43	TARDBP	2,62756	2,78808
WD repeat-containing protein 46	WDR46	1,99378	2,78694
5-3 exoribonuclease 2	XRN2	3,01435	2,78343
Histone H3; H3.2; H3.3; H3.1; H3.1t; H3.3C	H3F3	2,70116	2,78024
40S ribosomal protein S13	RPS13	4,02475	2,77533
Splicing factor 3B subunit 5	SF3B5	2,55876	2,75822
RNA-binding protein NOB1	NOB1	2,89603	2,74153
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	IMP3	2,66742	2,74081
Tubulin beta-2B chain	TUBB2B	3,51469	2,72842
28S ribosomal protein S28, mitochondrial	MRPS28	2,58625	2,71609
Matrin-3	MATR3	2,95933	2,71485
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	MPHOSPH10	2,4563	2,70228
ELAV-like protein 1	ELAVL1	2,77402	2,7021
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	3,21976	2,7009
Myosin Phosphatase Rho Interacting Protein	MPRIP	2,6864	2,69419
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	POLR2E	2,11584	2,68655
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRNPR	2,69058	2,67777
Importin subunit alpha-1	KPNA2	2,81847	2,67703
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	2,2987	2,67393
Transcription elongation regulator 1	TCERG1	4,69639	2,66048
60S ribosomal protein L14	RPL14	3,3679	2,65937
Fragile X Mental Retardation Protein	FMR1	2,97286	2,6539
Putative RNA-binding protein 15	RBM15	1,91326	2,64645
40S ribosomal protein S27;40S ribosomal protein S27	RPS27	2,34983	2,64303
39S ribosomal protein L14, mitochondrial	MRPL14	2,56234	2,63689
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	MRPS23	3,93447	2,6355
28S ribosomal protein S2, mitochondrial	MRPS2	3,72442	2,62839
ATP-dependent RNA helicase DDX3X ; DDX3Y	DDX3X	2,34993	2,62717
Cell division cycle 5-like protein	CDC5L	2,53297	2,62406
SAP domain-containing ribonucleoprotein	SARNP	2,72239	2,62105
Dual specificity protein kinase CLK3	CLK3	2,30745	2,61145
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	2,0004	2,59461
ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42	3,3284	2,59288
28S ribosomal protein S21, mitochondrial	MRPS21	2,6696	2,5896

Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	CCAR1	2,35476	2,57665
Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR	2,48119	2,57019
Tubulin beta-4B chain;Tubulin beta-4A chain	TUBB4B	2,39609	2,56609
Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	4,48513	2,56464
T-complex protein 1 subunit eta	CCT7	2,77252	2,56338
ATPase family AAA domain-containing protein 3A	ATAD3A	2,30955	2,55098
YTH domain-containing protein 1	YTHDC1	2,65412	2,5485
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	2,08245	2,54044
RNA-binding protein with serine-rich domain 1	RNPS1	1,92243	2,52963
Microfibrillar-associated protein 1	MFAP1	3,20137	2,52688
Pre-mRNA-splicing regulator WTAP	WTAP	2,43679	2,52519
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B	3,17125	2,52483
Apoptosis inhibitor 5	API5	1,90093	2,51723
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	CPSF2	2,32442	2,51291
ADP-ribosylation factor-like protein 6-interacting protein 4	ARL6IP4	2,51434	2,50675
28S ribosomal protein S33, mitochondrial	MRPS33	2,8379	2,50567
mRNA turnover protein 4 homolog	MRT04	2,29385	2,49745
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	DDX23	2,81082	2,48574
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	DDX47	2,55575	2,47886
Regulator of nonsense transcripts 1	UPF1	3,68457	2,47231
60S ribosomal protein L29	RPL29	3,65849	2,47125
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	PLOD3	2,55818	2,47106
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3	2,61112	2,46831
Protein Red	IK	2,65347	2,46644
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	2,97917	2,4544
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	GNL3	3,03633	2,44334
DNA-directed RNA polymerase II	POLR2B	1,91504	2,44155
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3	3,02849	2,43986
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX35	DHX35	2,45643	2,43594
Nucleophosmin	NPM1	2,75556	2,42938
Far upstream element-binding protein 3	FUBP3	2,63775	2,42504
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	UTP6	3,62522	2,4212
40S ribosomal protein S6	RPS6	4,31957	2,41767
Vigilin	HDLBP	3,40531	2,41765
Nucleolar protein 58	NOP58	2,22613	2,41538
G patch domain-containing protein 11	GPATCH11	2,28909	2,39879
Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIOK1	2,99334	2,39595
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	2,85621	2,39307
Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-4A chain	TUBA1B	2,73411	2,38967
G patch domain-containing protein 1	GPATCH1	4,04776	2,37781
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	3,09987	2,37252
PHD finger-like domain-containing protein 5A	PHF5A	2,71151	2,36903
E3 ubiquitin-protein ligase Hakai	CBLL1	2,23546	2,36136
Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	3,29155	2,35782
Polyadenylate-binding protein 1	PABPC1	2,51721	2,35652
DBIRD complex subunit ZNF326	ZNF326	2,40025	2,34908
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	3,34221	2,34905
Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	NOP2	3,85153	2,34203
Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	RRS1	1,89277	2,3311
TATA-binding protein-associated factor 2N	TAF15	2,93169	2,32723
CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	CD2BP2	3,08188	2,32605
ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	2,37566	2,32527
La-related protein 1	LARP1	2,31566	2,31978
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	2,40882	2,30377
RRP12-like protein	RRP12	2,56767	2,2964
40S ribosomal protein S12	RPS12	2,62019	2,29366
RNA-binding protein 25	RBM25	2,3867	2,28289
Ribosome biogenesis protein BOP1	BOP1	2,11511	2,28025
Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	2,23971	2,2795
28S ribosomal protein S14, mitochondrial	MRPS14	2,28826	2,27946
Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	CHERP	3,23481	2,27941
Scaffold attachment factor B1	SAFB	2,99347	2,27434
Prolyl 3-hydroxylase 1	LEPRE1	2,51936	2,27366

Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	2,84061	2,2735
Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	ZC3H14	3,017	2,2719
60S ribosomal protein L7a	RPL7A	2,46269	2,27092
Splicing factor 1	SF1	2,32669	2,26638
Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	3,20178	2,26512
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	LRRFIP2	2,33364	2,26101
40S ribosomal protein S24	RPS24	3,85323	2,25957
Polyadenylate-binding protein	PABPC4	2,54312	2,2456
NHP2-like protein 1;NHP2-like protein 1	NHP2L1	2,14907	2,23647
T-complex protein 1 subunit beta	CCT2	2,15893	2,23278
WW domain-binding protein 11	WBP11	1,98299	2,22867
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1	2,44019	2,22786
40S ribosomal protein S3	RPS3	3,29015	2,2269
Protein NipSnap homolog 1	NIPSNAP1	2,68324	2,22432
28S ribosomal protein S26, mitochondrial	MRPS26	1,94134	2,22044
SAP30-binding protein	SAP30BP	2,30304	2,21854
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	SNRNP70	2,0577	2,21742
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	3,01929	2,21719
Cold shock domain-containing protein E1	CSDE1	3,38668	2,21108
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	3,4008	2,20814
DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	POLR1C	2,48632	2,20291
Beta-arrestin-2	ARRB2	2,66946	2,20244
HIV Tat-specific factor 1	HTATSF1	3,92391	2,20171
Tuftelin-interacting protein 11	TFIP11	2,91095	2,19634
Uncharacterized protein C1orf226	C1orf226	2,33522	2,19394
40S ribosomal protein S9	RPS9	2,59654	2,18949
Serine/arginine-rich splicing factor 11	SRSF11	3,10289	2,18927
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	EIF3D	5,39985	2,18669
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	3,55774	2,17798
tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB	2,40793	2,17679
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2	3,33007	2,17292
Protein LSM12 homolog	LSM12	2,703	2,1723
Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	2,68335	2,1662
Pre-mRNA 3-end-processing factor FIP1	FIP1L1	2,63639	2,14781
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	DHX30	2,37067	2,12435
Myb-binding protein 1A	MYBBP1A	2,18653	2,11297
Cold-inducible RNA-binding protein	CIRBP	1,95701	2,10278
Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM120A	2,12095	2,09919
SURP and G-patch domain-containing protein 1	SUGP1	2,41414	2,08926
Pre-mRNA-processing factor 6	PRPF6	3,7618	2,08673
RNA-binding protein 39	RBM39	2,27925	2,07486
Polyglutamine-binding protein 1	PQBP1	1,98231	2,06106
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	3,23134	2,05816
RNA-binding protein 10	RBM10	2,56792	2,05733
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	MMTAG2	3,11431	2,05515
28S ribosomal protein S9, mitochondrial	MRPS9	2,27839	2,04827
Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	RSRC2	2,87802	2,04388
Nucleolin	NCL	2,57592	2,04251
U2 small nuclear ribonucleoprotein A	SNRPA1	3,43223	2,03422
Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2	3,06068	2,03314
Leucine-rich PPR motif-containing protein	LRPPRC	2,37894	2,02674
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	2,58581	2,02204
Serine/arginine-rich splicing factor 1	SRSF1	1,9244	2,02179
RNA-binding protein 7	RBM7	1,92184	2,01959
Formin-binding protein 4	FNBP4	3,02211	2,0195
Superkiller viralicidic activity 2-like 2	SKIV2L2	4,64252	2,00948
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	3,33139	2,00671
Vimentin	VIM	2,04712	2,00664
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	2,67836	2,0065
Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	TSR1	2,76962	2,00177

Tabelle 2: Das AATF Interaktom nach Hypoxie-Behandlung

Protein	Gen	-Log P Wert	Log2 FC
Myosin light polypeptide 6	MYL6	4,52867	6,83526
Histone H1.4	HIST1H1E	3,40584	6,67795
Probable ATP-dependent RNA helicase	DDX17	3,98164	6,04787
Actin, cytoplasmic 1	ACTB	2,23987	6,02932
Myosin-10	MYH10	2,33786	5,95386
Protein phosphatase 1 regulatory subunit 12A	PPP1R12A	2,48538	5,94078
RNA-binding protein FUS	FUS	4,40301	5,93568
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	4,56174	5,88049
60S ribosomal protein L36a	RPL36A	2,38588	5,86091
60S ribosomal protein L26	RPL26	2,49634	5,85229
Nucleolar protein 56	NOP56	3,03594	5,83964
Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3	2,36611	5,72949
60S ribosomal protein L35	RPL35	4,88513	5,67391
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	4,17742	5,65016
RNA-binding protein 14	RBM14	4,20458	5,60908
40S ribosomal protein S25	RPS25	4,54565	5,45418
Bcl-2-associated transcription factor 1	BCLAF1	4,48956	5,42338
Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	4,20064	5,29183
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	LRRFIP2	4,85188	5,28133
60S ribosomal protein L34	RPL34	2,54286	5,27301
40S ribosomal protein S14	RPS14	3,59812	5,25512
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	2,91614	5,24502
Prohibitin	PHB	3,96618	5,20445
Tubulin beta-4B chain	TUBB4B	5,9292	5,15469
60S ribosomal protein L18a	RPL18A	3,66796	5,14591
40S ribosomal protein S23	RPS23	3,77808	5,1362
60S ribosomal protein L8	RPL8	4,89593	5,10173
60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1	2,74132	5,06946
60S ribosomal protein L7	RPL7	4,16091	5,05009
60S ribosomal protein L6	RPL6	4,3788	5,04825
Tubulin beta-2B chain	TUBB2B	3,90572	5,02477
TATA-binding protein-associated factor 2N	TAF15	2,99208	4,9968
60S ribosomal protein L10	RPL10	3,33925	4,99678
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	DDX5	3,26947	4,98099
tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB	4,01464	4,915
Histone RNA hairpin-binding protein	SLBP	2,32628	4,91179
ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1	4,10669	4,9109
G patch domain-containing protein 11	GPATCH11	2,92704	4,86872
Splicing factor, proline- and glutamine-rich	SFPQ	3,59381	4,84432
60S ribosomal protein L24	RPL24	3,58917	4,81381
Non-POU domain-containing octamer-binding protein	NONO	3,55662	4,76939
40S ribosomal protein S13	RPS13	3,54597	4,76474
60S ribosomal protein L13	RPL13	4,67112	4,75858
39S ribosomal protein L14, mitochondrial	MRPL14	3,25136	4,75803
60S ribosomal protein L18	RPL18	4,55437	4,73611
60S ribosomal protein L10a	RPL10A	4,31241	4,7255
60S ribosomal protein L15;Ribosomal protein L15	RPL15	3,63871	4,71901
Histone H2B	HIST1H2	2,22902	4,68124
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	3,44943	4,68111
60S ribosomal protein L27a	RPL27A	3,12842	4,67117
40S ribosomal protein S16	RPS16	3,88214	4,66318
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	EIF3D	3,42236	4,65623
60S ribosomal protein L13a	RPL13A	4,03515	4,65045
60S ribosomal protein L12	RPL12	3,62549	4,65016
Arginine/serine-rich protein PNISR	PNISR	4,14092	4,63892
Serine/arginine-rich splicing factor 6	SRSF6	4,31121	4,63435
40S ribosomal protein S17-like	RPS17	3,96946	4,60199
Serine/arginine-rich splicing factor 5	SRSF5	3,37151	4,58639
60S ribosomal protein L35a	RPL35A	4,71689	4,58546

40S ribosomal protein S18	RPS18	3,52617	4,57119
Tubulin alpha-1B chain;Tubulin alpha-4A chain	TUBA1B	3,81373	4,5437
Splicing factor 3B subunit 5	SF3B5	3,1884	4,54183
40S ribosomal protein S20	RPS20	3,28804	4,54061
Polyadenylate-binding protein	PABPC4	4,2238	4,53476
Putative RNA-binding protein 15	RBM15	2,91516	4,53175
Pre-mRNA-splicing regulator WTAP	WTAP	5,54892	4,52529
60S ribosomal protein L7a	RPL7A	4,73082	4,51283
Small nuclear ribonucleoprotein-associated protein	SNRPN	2,58655	4,49116
Pyruvate kinase PKM	PKM	4,2951	4,456
60S ribosomal protein L17	RPL17	4,15865	4,45256
rRNA 2-O-methyltransferase fibrillar	FBL	5,06737	4,42544
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	3,79594	4,42316
Tubulin beta chain	TUBB	4,91552	4,3906
40S ribosomal protein S2	RPS2	3,75699	4,38474
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	3,75346	4,38188
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	3,78069	4,37325
mRNA turnover protein 4 homolog	MRT04	3,30411	4,35492
DnaJ homolog subfamily C member 8	DNAJC8	3,73747	4,35367
Complement component 1 Q subcomponent-binding protein	C1QBP	3,05545	4,35346
X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5	3,61822	4,35134
60S ribosomal protein L31	RPL31	4,09396	4,3493
Protein virilizer homolog	KIAA1429	4,46084	4,33604
Protein AATF	AATF	2,2692	4,33411
40S ribosomal protein S19	RPS19	2,9132	4,32489
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase	DHX15	4,06111	4,30604
40S ribosomal protein S29	RPS29	3,34683	4,30132
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	HNRNPA0	4,02884	4,29946
SAP30-binding protein	SAP30BP	3,45315	4,29926
Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	3,65094	4,29652
Vimentin	VIM	3,33869	4,2963
Ribosomal protein L19;60S ribosomal protein L19	RPL19	5,73352	4,29478
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	IGF2BP1	3,55591	4,28001
Elongation factor 2	EEF2	3,96975	4,27887
Serine/arginine-rich splicing factor 10	SRSF10	2,43319	4,27085
60S ribosomal protein L29	RPL29	3,9531	4,25079
Luc7-like protein 3	LUC7L3	2,45127	4,24387
ATP-dependent RNA helicase DDX3X	DDX3X	3,89895	4,24318
Ig gamma-1 chain C region	IGHG1	3,14873	4,20372
Probable rRNA-processing protein EBP2	EBNA1BP2	4,23438	4,18642
40S ribosomal protein S11	RPS11	3,52546	4,15656
Far upstream element-binding protein 3	FUBP3	2,7629	4,14679
N-acetyltransferase 10	NAT10	2,01294	4,13467
40S ribosomal protein S15a	RPS15A	4,12227	4,1297
60S ribosomal protein L21	RPL21	4,12879	4,1293
Leucine-rich repeat-containing protein 47	LRRC47	3,61217	4,12303
Nuclear pore complex protein Nup153	NUP153	2,49982	4,09714
60S ribosomal protein L4	RPL4	3,49598	4,08045
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RSL1D1	4,51318	4,05669
Nucleolar GTP-binding protein 2	GNL2	3,78532	4,03532
40S ribosomal protein S9	RPS9	4,29448	4,02802
60S ribosomal protein L23a	RPL23A	3,00738	4,02112
Guanine nucleotide-binding protein-like 3	GNL3	2,5262	4,01994
Myb-binding protein 1A	MYBBP1A	3,63476	4,00143
40S ribosomal protein S24	RPS24	4,1837	3,99276
Histone H3	H3F3B	4,54732	3,987
40S ribosomal protein S7	RPS7	3,78619	3,97301
40S ribosomal protein S3	RPS3	3,42511	3,97275
PAX3- and PAX7-binding protein 1	PAXBP1	3,6786	3,96694
Protein BUD31 homolog	BUD31	4,85886	3,96385
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein	HNRNPUL1	3,88065	3,96325
Eukaryotic initiation factor 4A-III	EIF4A3	3,37412	3,95752
NK-tumor recognition protein	NKTR	4,66208	3,95121

ATPase family AAA domain-containing protein 3A	ATAD3A	5,60053	3,93579
Ribosome biogenesis regulatory protein homolog	RRS1	3,70187	3,91979
60S ribosomal protein L36	RPL36	4,61703	3,91747
60S ribosomal protein L14	RPL14	2,28308	3,91279
Nuclear pore complex protein Nup214	NUP214	3,98275	3,90451
Histone H2A	HIST2H2AC	2,1207	3,901
60S ribosomal protein L3	RPL3	3,35728	3,88142
AP-1 complex subunit gamma-1	AP1G1	2,79485	3,8713
Probable ATP-dependent RNA helicase DHX35	DHX35	4,08278	3,86854
Cyclin-dependent kinase 1	CDK1	3,90118	3,8659
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	2,78558	3,86111
Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3	SNRPD3	3,48819	3,86081
40S ribosomal protein S3a	RPS3A	3,40214	3,85974
40S ribosomal protein S4, X isoform	RPS4X	4,7572	3,8551
40S ribosomal protein S30	FAU	2,4853	3,85338
Protein FAM98B	FAM98B	4,28493	3,85315
Polyadenylate-binding protein	PABPC1	3,61326	3,84712
WD40 repeat-containing protein SMU1	SMU1	2,85627	3,84425
Serrate RNA effector molecule homolog	SRRT	2,64506	3,83606
Eukaryotic translation initiation factor 5B	EIF5B	4,80974	3,8347
60S ribosomal protein L23	RPL23	3,43154	3,83211
Phosphate carrier protein, mitochondrial	SLC25A3	4,40495	3,821
Kinesin-like protein KIF11	KIF11	4,0208	3,81217
SNW domain-containing protein 1	SNW1	3,05238	3,80967
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M	HNRNPM	3,50934	3,79808
T-complex protein 1 subunit beta	CCT2	3,26979	3,79716
Splicing factor 3B subunit 3	SF3B3	2,9772	3,78726
Splicing factor 1	SF1	3,23538	3,78025
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH	3,61242	3,77803
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRNPDL	2,79156	3,77317
Dual specificity protein kinase CLK3	CLK3	5,26777	3,77108
5-3 exoribonuclease 2	XRN2	3,44653	3,74875
39S ribosomal protein L15, mitochondrial	MRPL15	2,87977	3,74869
Stress-70 protein, mitochondrial	HSPA9	3,82747	3,74023
Pre-rRNA-processing protein TSR1 homolog	TSR1	4,55948	3,72798
60S ribosomal protein L37a	RPL37A	3,44752	3,70511
Cell division cycle 5-like protein	CDC5L	3,15533	3,70365
Cleavage and polyadenylation factor subunit 5	NUDT21	3,4472	3,70318
Transcription elongation regulator 1	TCERG1	3,96552	3,69745
RNA-binding protein NOB1	NOB1	3,28578	3,69288
60S ribosomal protein L9	RPL9	4,00123	3,67135
AP-1 complex subunit mu-1	AP1M1	4,25095	3,66098
Ribosome biogenesis protein BOP1	BOP1	3,26674	3,65363
RNA-binding protein with serine-rich domain 1	RNPS1	2,72746	3,64879
T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	3,39863	3,64829
Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein	SERBP1	3,38654	3,64666
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	4,57444	3,62503
Scaffold attachment factor B2	SAFB2	3,79303	3,61748
Nucleophosmin	NPM1	3,30729	3,61588
Pre-mRNA-splicing factor SPF27	BCAS2	3,68612	3,60615
Regulation nuclear pre-mRNA domain- protein 2	RPRD2	4,96396	3,59986
RNA-binding protein 3	RBM3	3,23578	3,5894
U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog	UTP14A	5,04526	3,57842
T-complex protein 1 subunit gamma	CCT3	4,29252	3,5769
Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	4,78259	3,57592
Nuclear fragile X mental retardation-interacting protein 2	NUFIP2	3,14542	3,57417
Probable 28S rRNA (cytosine(4447) methyltransferase	NOP2	3,94927	3,56771
pre-rRNA processing protein FTSJ3	FTSJ3	3,96724	3,5663
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	HNRNPK	2,99853	3,56057
Formin-binding protein 4	FNBP4	3,77707	3,55535
Scaffold attachment factor B1	SAFB	2,52415	3,54673
Serine/arginine-rich splicing factor 11	SRSF11	3,84166	3,54424
Deoxynucleotidyltransferase terminal interacting protein 2	DNTTIP2	2,53675	3,5429

Serine/arginine repetitive matrix protein 1	SRRM1	2,75435	3,53946
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	3,34736	3,53271
Very-long-chain enoyl-CoA reductase	TECR	2,95795	3,53077
U2 snRNP-associated SURP motif-containing protein	U2SURP	3,52227	3,52947
Nucleolar protein 58	NOP58	2,07842	3,52755
60S ribosomal protein L32	RPL32	4,03639	3,52328
Eukaryotic initiation factor 4A-I	EIF4A1	2,87655	3,51944
RNA-binding protein 4	RBM4	3,03527	3,51639
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	IGF2BP2	4,87421	3,5136
40S ribosomal protein S6	RPS6	3,06203	3,49409
YTH domain-containing protein 1	YTHDC1	3,07406	3,49297
Protein FAM133B; Protein FAM133A	FAM133 A/B	2,29912	3,48913
28S ribosomal protein S22, mitochondrial	MRPS22	3,37632	3,48486
60S ribosomal protein L27	RPL27	3,45278	3,4702
ATP-dependent RNA helicase DDX50	DDX50	4,14068	3,46838
Ankyrin	RAI14	2,81559	3,46159
Ribosome biogenesis protein BMS1 homolog	BMS1	3,53348	3,45232
60S ribosomal protein L11	RPL11	2,88489	3,4389
Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	3,15884	3,43656
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4	IMP4	3,86528	3,43188
Protein quaking	QKI	3,21164	3,41086
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B	4,31605	3,40612
DNA repair protein RAD50	RAD50	3,64904	3,40559
La-related protein 1	LARP1	3,43045	3,39819
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	EIF3F	3,04061	3,39632
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	2,57345	3,38814
Uncharacterized protein C19orf43	C19orf43	3,05537	3,38182
60S ribosomal protein L28	RPL28	2,73061	3,37481
ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	4,17713	3,37388
Putative RNA-binding protein Luc7-like 2	LUC7L2	2,68262	3,373
Matrin-3	MATR3	3,94231	3,34009
Probable helicase with zinc finger domain	HELZ	3,29076	3,33987
T-complex protein 1 subunit eta	CTC7	2,52615	3,33477
Mitotic checkpoint protein BUB3	BUB3	3,17165	3,3333
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 3	PLOD3	3,3838	3,3328
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2	3,86805	3,33097
KH domain-containing, RNA-binding protein 1	KHDRBS1	2,414	3,32733
Nucleolar complex protein 4 homolog	NOC4L	2,60412	3,32173
40S ribosomal protein S27	RPS27	3,26119	3,30653
RNA-binding protein Raly	RALY	3,56727	3,29972
Dual specificity protein kinase CLK2	CLK2	3,61559	3,29571
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	3,37484	3,29075
A-kinase anchor protein 8-like	AKAP8L	3,51154	3,28977
E3 ubiquitin-protein ligase Hakai	CBLL1	2,03822	3,28964
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	3,17143	3,28129
Regulator of nonsense transcripts 1	UPF1	4,14011	3,27086
Far upstream element-binding protein 1	FUBP1	3,44647	3,26406
40S ribosomal protein S28	RPS28	3,11107	3,25509
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	MRPS23	2,35877	3,25158
RNA-binding protein 7	RBM7	3,19234	3,25091
Pre-mRNA-processing factor 40 homolog A	PRPF40A	4,06273	3,24664
28S ribosomal protein S28, mitochondrial	MRPS28	5,05138	3,23132
Desmoglein-2	DSG2	3,28051	3,22744
Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	ADAR	3,86204	3,20974
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	3,41284	3,20793
Nucleolin	NCL	2,89134	3,20028
Splicing factor 3B subunit 6	SF3B6	4,79404	3,19998
Keratin, type I cytoskeletal 18	KRT18	3,65493	3,19855
Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 1	EIF4G1	2,78261	3,19788
E3 ubiquitin-protein ligase RBBP6	RBBP6	2,94085	3,19609
Heat shock cognate 71 kDa protein	HSPA8	2,56393	3,19428
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	2,15514	3,18748
Ataxin-2-like protein	ATXN2L	3,31403	3,18519

RNA-binding protein 25	RBM25	3,77814	3,18422
Pre-mRNA-splicing factor RBM22	RBM22	2,80566	3,17809
Nucleolar protein 10	NOL10	2,70467	3,17496
Trifunctional enzyme subunit beta	HADHB	2,76632	3,16832
Beta-arrestin-2	ARRB2	3,38675	3,16618
28S ribosomal protein S9, mitochondrial	MRPS9	3,82061	3,16616
60S acidic ribosomal protein P0	RPLP0	3,3979	3,15873
Putative ATP-dependent RNA helicase DHX30	DHX30	3,83356	3,15836
Neuroguidin	NGDN	4,03409	3,15811
40S ribosomal protein SA	RPSA	3,07041	3,15776
Microfibrillar-associated protein 1	MFAP1	2,98334	3,15633
28S ribosomal protein S21, mitochondrial	MRPS21	2,49742	3,15463
Pre-mRNA 3-end-processing factor FIP1	FIP1L1	3,00752	3,15005
CD2 antigen cytoplasmic tail-binding protein 2	CD2BP2	3,57596	3,1472
Sodium channel modifier 1	SCNM1	2,32621	3,14454
Lysine-rich nucleolar protein 1	KNOP1	3,84869	3,14286
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX52	DDX52	4,13776	3,13851
SRSF protein kinase 1	SRPK1	4,05836	3,13191
WD repeat-containing protein 46	WDR46	2,59101	3,13113
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 2	CPSF2	2,99513	3,12938
F-actin-capping protein subunit alpha-1	CAPZA1	2,11034	3,12683
Protein PRRC2A	PRRC2A	3,97343	3,12545
Splicing factor, arginine/serine-rich 19	SCAF1	2,60303	3,12144
Serine/threonine-protein kinase RIO1	RIOK1	2,4773	3,10638
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 6	CPSF6	2,77373	3,09709
Polyadenylate-binding protein-interacting protein 2	PAIP2	2,11716	3,09334
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3	3,79999	3,09281
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	DDX47	2,91465	3,09199
Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	ZCCHC8	3,20815	3,07425
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	MMTAG2	2,13213	3,06613
Crooked neck-like protein 1	CRNKL1	3,10115	3,06059
Pre-mRNA-processing factor 17	CDC40	3,26658	3,04939
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	2,91678	3,04903
Negative elongation factor E	NELFE	3,13588	3,04793
Enscosin	MAP7	2,62069	3,04417
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX23	DDX23	3,27328	3,03644
Trinucleotide repeat-containing gene 6B protein	TNRC6B	4,55458	3,03559
Procollagen-lysine,2-oxoglutarate 5-dioxygenase 1	PLOD1	4,05019	3,00864
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein	HNRNPUL2	3,67874	3,00482
TAR DNA-binding protein 43	TARDBP	3,46927	3,00261
Probable 18S rRNA (guanine-N(7))-methyltransferase	WBSCR22	2,83419	2,99255
RNA-binding protein Musashi homolog 1	MSI1	2,13105	2,98834
Pre-mRNA-splicing factor SYF1	XAB2	2,83559	2,98515
40S ribosomal protein S5	RPS5	4,58206	2,97698
116 kDa U5 small nuclear ribonucleoprotein component	EFTUD2	3,00799	2,96773
Fragile X Mental Retardation Protein	FMR1	3,34305	2,96455
RRP12-like protein	RRP12	4,69526	2,95683
28S ribosomal protein S34, mitochondrial	MRPS34	2,41136	2,95513
Superkiller viralicidic activity 2-like 2	SKIV2L2	3,0363	2,93659
28S ribosomal protein S33, mitochondrial	MRPS33	2,12974	2,92285
Protein PRRC2C	PRRC2C	3,2978	2,91633
28S ribosomal protein S26, mitochondrial	MRPS26	3,48415	2,91275
Methyltransferase subunit TRM112-like protein	TRMT112	2,79187	2,91097
Methylosome protein 50	WDR77	2,2589	2,91022
Coiled-coil domain-containing protein 86	CCDC86	2,04159	2,90255
Protein RRP5 homolog	PDCCD11	2,97274	2,90161
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRNPR	3,34115	2,89945
Serine/arginine-rich splicing factor 1	SRSF1	2,33001	2,8874
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	IMP3	2,21586	2,87449
Splicing factor 3B subunit 1	SF3B1	2,59343	2,87298
Polyglutamine-binding protein 1	PQBP1	2,49248	2,87153
NHP2-like protein 1;NHP2-like protein 1, N-terminally processed	NHP2L1	2,04107	2,87019
Transcription intermediary factor 1-beta	TRIM28	2,15532	2,87003

ATP-dependent RNA helicase DDX42	DDX42	2,63416	2,86979
Zinc finger Ran-binding domain-containing protein 2	ZRANB2	3,45958	2,8686
ATP-dependent RNA helicase DDX54	DDX54	2,87006	2,84772
Polyadenylate-binding protein 2	PABPN1	2,42358	2,84726
U1 small nuclear ribonucleoprotein 70 kDa	SNRNP70	2,83343	2,82957
Splicing factor 3B subunit 2	SF3B2	2,87606	2,822
Constitutive coactivator of PPAR-gamma-like protein 1	FAM120A	3,35521	2,81349
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	UTP6	2,5923	2,80296
WW domain-binding protein 11	WBP11	2,60413	2,80096
Protein Red	IK	2,3022	2,80017
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	POLR2E	2,26816	2,79854
Heat shock 70 kDa protein 1A	HSPA1A	2,59657	2,79346
Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	2,07384	2,78289
Pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA	DHX38	3,18944	2,77311
28S ribosomal protein S2, mitochondrial	MRPS2	2,53471	2,75275
Tuftelin-interacting protein 11	TFIP11	3,02233	2,75009
Zinc finger CCCH-type antiviral protein 1	ZC3HAV1	2,61763	2,74869
Intron-binding protein aquarius	AQR	3,74277	2,74199
DNA-directed RNA polymerases I and III subunit RPAC1	POLR1C	2,53094	2,73705
Protein LSM12 homolog	LSM12	2,39752	2,72626
Splicing factor, suppressor of white-apricot homolog	SFSWAP	2,3937	2,72558
28S ribosomal protein S14, mitochondrial	MRPS14	2,59613	2,71432
Smad nuclear-interacting protein 1	SNIP1	3,35951	2,71186
Chromatin target of PRMT1 protein	CHTOP	2,9452	2,70745
28S ribosomal protein S7, mitochondrial	MRPS7	3,79924	2,69451
ATP-dependent RNA helicase DHX8	DHX8	3,04764	2,6893
Protein LTV1 homolog	LTV1	2,99135	2,68852
Importin subunit alpha-1	KPNA2	2,18643	2,67179
RNA-binding protein 10	RBM10	2,35036	2,65504
Rab11 family-interacting protein 5	RAB11FIP5	3,02786	2,63762
Ataxin-2	ATXN2	2,45912	2,63728
ATP-citrate synthase	ACLY	2,57685	2,61624
Periodic tryptophan protein 1 homolog	PWP1	2,34924	2,59173
ESF1 homolog	ESF1	5,12602	2,58786
Transformer-2 protein homolog beta	TRA2B	2,42357	2,5847
Pre-mRNA-processing factor 6	PRPF6	2,87833	2,55482
PEST proteolytic signal-containing nuclear protein	PCNP	2,70678	2,54762
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	MPHOSPH10	2,90917	2,54025
DNA-dependent protein kinase catalytic subunit	PRKDC	3,56052	2,52499
Pinin	PNN	2,00391	2,52398
G patch domain-containing protein 1	GPATCH1	2,72732	2,5204
Poly(U)-binding-splicing factor PUF60	PUF60	3,81058	2,51995
Calcium homeostasis endoplasmic reticulum protein	CHERP	2,80672	2,51751
Cold-inducible RNA-binding protein	CIRBP	2,62146	2,49089
SURP and G-patch domain-containing protein 1	SUGP1	3,24066	2,48165
Serine/arginine repetitive matrix protein 2	SRRM2	2,49761	2,4812
DNA-directed RNA polymerase II	POLR2B	2,88357	2,48017
U5 small nuclear ribonucleoprotein 40 kDa protein	SNRNP40	2,42227	2,45185
78 kDa glucose-regulated protein	HSPA5	2,43786	2,45081
Vigilin	HDLBP	2,3594	2,44301
Arginine/serine-rich coiled-coil protein 2	RSRC2	2,35955	2,40734
40S ribosomal protein S10	RPS10	2,34531	2,40715
Splicing factor 3A subunit 3	SF3A3	2,62919	2,40623
Poly(rC)-binding protein 1	PCBP1	2,34073	2,40451
40S ribosomal protein S21	RPS21	2,28748	2,38891
Polymerase delta-interacting protein 3	POLDIP3	3,04333	2,38591
Treacle protein	TCOF1	2,73109	2,37642
DBIRD complex subunit ZNF326	ZNF326	2,6666	2,3739
Serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP	3,2471	2,37191
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U	HNRNPU	2,59753	2,37129
RNA-binding protein 42	RBM42	2,19162	2,3693
Serine/threonine-protein kinase PRP4 homolog	PRPF4B	2,71709	2,35974
Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	CCAR1	2,0446	2,34601

La-related protein 4	LARP4	2,63478	2,33071
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	SNRNP200	2,50668	2,33065
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX46	DDX46	2,5623	2,31674
U2 small nuclear ribonucleoprotein A	SNRPA1	2,72659	2,27674
Cold shock domain-containing protein E1	CSDE1	2,33379	2,24287
THO complex subunit 4	ALYREF	2,60762	2,24168
PHD and RING finger domain-containing protein 1	PHRF1	2,95708	2,17833
Melanoma inhibitory activity protein 3	MIA3	2,23743	2,15244
Serine/Arginine-related protein 53	RSRC1	2,44674	2,14726
Protein FAM207A	FAM207A	2,15946	2,12157
RNA-binding protein 5	RBM5	2,59565	2,09724
40S ribosomal protein S12	RPS12	2,5113	2,07551
U4/U6.U5 tri-snRNP-associated protein 2	USP39	2,46472	2,04363

Tabelle 3: Interaktoren, die nach Hypoxie-Behandlung signifikant hochreguliert wurden

Protein	Gen	RBP	-Log10 P Wert	Log2 FC
RNA-binding protein FUS	FUS	+	4,446	4,51745
Myosin light polypeptide 6	MYL6		2,288	3,60854
Prohibitin	PHB		2,829	3,52787
Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3	+	3,185	3,34627
Pyruvate kinase PKM;Pyruvate kinase	PKM	+	3,408	3,23407
LIM and calponin homology domains-containing protein 1	LIMCH1		4,038	3,10576
Arginine/serine-rich protein PNISR	PNISR	+	3,043	3,02705
Leucine-rich repeat flightless-interacting protein 2	LRRFIP2		2,731	2,97235
Elongation factor 2	EEF2	+	2,751	2,94841
X-ray repair cross-complementing protein 5	XRCC5	+	3,62	2,9454
T-complex protein 1 subunit delta	CCT4	+	3,355	2,9019
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	+	2,933	2,80478
Ras GTPase-activating protein-binding protein 1	G3BP1	+	3,395	2,77454
Tubulin beta chain	TUBB		3,054	2,71457
ATP-dependent RNA helicase DDX1	DDX1	+	3,841	2,70627
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	EIF3D	+	2,898	2,70365
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX17	DDX17	+	3,185	2,69298
Serine/arginine-rich splicing factor 10	SRSF10	+	2,849	2,65718
tRNA-splicing ligase RtcB homolog	RTCB	+	2,883	2,60967
Polyadenylate-binding protein	PABPC4	+	3,002	2,58508
Ras GTPase-activating protein-binding protein 2	G3BP2	+	3,029	2,57209
RNA-binding protein 14	RBM14	+	2,968	2,54865
Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	GNB2L1	+	2,648	2,51613
AP-1 complex subunit gamma-1	AP1G1		2,538	2,5129
Elongation factor 1-alpha 1	EEF1A1	+	3,059	2,50322
60S ribosomal protein L35	RPL35	+	2,244	2,498
Tubulin beta-4B chain	TUBB4B		2,354	2,4758
Tubulin alpha-1B chain	TUBA1B		2,391	2,45821
60S ribosomal protein L27	RPL27	+	3,048	2,41049
AP-1 complex subunit mu-1	AP1M1		3,816	2,39713
Probable rRNA-processing protein EBP2	EBNA1BP2	+	2,891	2,38534
Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	NUDT21	+	2,787	2,33347
Vimentin	VIM		3,04	2,30041
Protein FAM98B	FAM98B	+	2,509	2,29672
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	+	2,709	2,29634
Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	+	2,812	2,2944
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	+	2,768	2,28213
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 1	HNRNPUL1	+	2,722	2,27058
WD40 repeat-containing protein SMU1	SMU1		2,668	2,24076
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	+	2,732	2,23841
Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	+	4,673	2,19751
Protein virilizer homolog	KIAA1429	+	2,86	2,19455
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	+	2,789	2,17831

Myb-binding protein 1A	MYBBP1A	+	3,663	2,08197
Trifunctional enzyme subunit beta	HADHB	+	2,556	2,03102
60S ribosomal protein L7	RPL7	+	3,784	2,01793
Zinc finger CCHC domain-containing protein 8	ZCCHC8	+	2,249	2,01035
ATPase family AAA domain-containing protein 3A	ATAD3A		2,526	2,00755
40S ribosomal protein S15a	RPS15A	+	3,36	2,00132

Tabelle 4: Interaktoren, die nur vor der Hypoxie-Behandlung nachgewiesen wurden

Protein	Gen	RBP	-Log10 P Wert	Log2 FC
60S acidic ribosomal protein P1	RPLP1		2,28529	3,65913
Histone RNA hairpin-binding protein	SLBP	+	2,67503	3,41641
E3 ubiquitin-protein ligase Hakai	CBLL1		2,23546	2,36136
RNA-binding protein 7	RBM7	+	1,92184	2,01959
Multiple myeloma tumor-associated protein 2	MMTAG2		3,11431	2,05515
Polyglutamine-binding protein 1	PQBP1		1,98231	2,06106
SURP and G-patch domain-containing protein 1	SUGP1	+	2,41414	2,08926
28S ribosomal protein S21, mitochondrial	MRPS21	+	2,6696	2,5896
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	UTP6		3,62522	2,4212
Deoxynucleotidyltransferase terminal-interacting protein 2	DNTTIP2	+	2,67911	3,34129
DNA-directed RNA polymerases I, II, and III subunit RPABC1	POLR2E		2,11584	2,68655
WD repeat-containing protein 46	WDR46	+	1,99378	2,78694
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP3	IMP3	+	2,66742	2,74081
Apoptosis inhibitor 5	API5	+	1,90093	2,51723
NHP2-like protein 1	NHP2L1	+	2,14907	2,23647
Coiled-coil domain-containing protein 86	CCDC86	+	2,14142	3,00729
ESF1 homolog	ESF1	+	1,89358	2,9515
39S ribosomal protein L15, mitochondrial	MRPL15	+	2,11054	3,89766
Pre-mRNA-splicing factor RBM22	RBM22	+	3,16841	3,48837
Serine/Arginine-related protein 53	RSRC1		2,05259	2,99506
Cleavage stimulation factor subunit 2	CSTF2	+	2,30594	3,52632
Protein FAM207A	FAM207A		2,29913	3,06746

Tabelle 5: Interaktoren des EIF-Komplexes, die unter Hypoxie hochreguliert werden

Protein	Gen	nach Hypoxie hochreguliert	RBP
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1	EIF2S1	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	EIF2S2	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit C	EIF3C	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit D	EIF3D	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	EIF3F	x	
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit I	EIF3I	x	
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit L	EIF3L	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 4 A-I	EIF4A1	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 4 A-III	EIF4A3	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 4 B	EIF4B	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 4 E	EIF4E	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 4 G1	EIF4G1	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 5 A	EIF5A	x	+
Eukaryotic translation initiation factor 5B	EIF5B	x	

Tabelle 6: Signifikante Interaktoren des RP-MDM2-p53 Signalwegs

Gen	AATF/GFP		AATF.Hypoxie/AATF		AATF.Hypoxie/GFP		bindet MDM2	↓ nach Hypoxie	↑ nach Hypoxie	signifikant hochreguliert
	-Log10 P Wert	Log2 FC	-Log10 P Wert	Log2 FC	-Log10 P-Wert	Log2 FC				
RPL26	2,34	4,28	2,04	1,53	2,50	5,85	x		x	x
RPS17L	2,65	4,11	0,56	0,36	3,97	4,60			x	
RPL35A	5,26	4,05	1,38	0,78	4,72	4,59			x	
RPS14	4,07	4,01	1,68	1,26	3,60	5,26	x		x	x
RPS27A	3,12	4,00	0,30	0,00	1,78	3,20	x	x		
RPL10	4,84	4,00	1,54	1,07	3,34	5,00			x	x
RPL13	5,64	3,97	1,69	1,22	4,67	4,76			x	x
MRPL15	2,11	3,90	0,17	-0,20	2,88	3,75		x		
RPL34	2,05	3,84	1,70	2,35	2,54	5,27			x	x
RPL17	3,41	3,72	1,03	1,09	4,16	4,45			x	x
RPL9	3,13	3,70	0,56	0,48	4,00	3,67		x		
RPLP1	2,29	3,66	1,46	1,41	2,74	5,07			x	x
RPL36A	1,90	3,65	0,68	1,17	2,39	5,86			x	x
RPL28	3,68	3,61	0,04	-0,57	2,73	3,37		x		
RPL27A	4,31	3,61	1,11	1,06	3,13	4,67			x	x
RPL18A	3,42	3,59	2,06	1,32	3,67	5,15			x	x
RPS20	3,52	3,45	2,48	1,58	3,29	4,54	x		x	x
RPL3	4,00	3,39	2,05	1,00	3,36	3,88			x	
RPL8	3,84	3,36	2,67	1,69	4,90	5,10			x	x
RPL24	3,93	3,25	1,91	1,62	3,59	4,81			x	x
RPL12	2,48	3,24	1,60	1,84	3,63	4,65			x	x
RPS23	3,55	3,23	1,88	1,25	3,78	5,14			x	x
RPL23A	3,68	3,20	3,23	1,79	3,01	4,02	x		x	x
RPL6	3,67	3,18	2,69	1,99	4,38	5,05	x		x	x
RPL37A	3,40	3,17	0,78	0,70	3,45	3,71			x	
RPL10A	2,71	3,17	2,56	1,80	4,31	4,73			x	x
RPS25	4,92	3,14	1,38	3,22	4,55	5,45	x		x	x
RPL4	3,90	3,13	1,75	1,07	3,50	4,08			x	x
RPS11	5,54	3,13	1,84	1,06	3,53	4,16			x	x
RPS18	3,41	3,12	2,10	1,43	3,53	4,57			x	x
RPS5	3,25	3,10	0,58	0,36	4,58	2,98		x		
RPL19	3,27	3,08	2,12	1,63	5,73	4,29			x	x
RPS7	2,24	3,07	1,01	1,21	3,79	3,97	x		x	x
RPL35	2,25	3,05	2,24	2,50	4,89	5,67			x	x
RPS19	3,62	3,02	2,12	1,73	2,91	4,32			x	x
MRPS22	4,30	3,02	0,65	0,53	3,38	3,48			x	

Tabelle 7: RNA-unabhängige Bindungspartner

Protein	Gen	RBP	Log2 FC	-Log10 P Wert
Non-specific protein-tyrosine kinase	YES1		5,05659	1,14876
Protein AATF	AATF	+	4,81244	3,12841
N-acetyltransferase 10	NAT10	+	4,46559	2,17142
Neuroguidin	NGDN	+	4,21206	2,54421
Leukocyte receptor cluster member 8	LENG8		4,00896	1,70393
Zinc finger CCCH domain-containing protein 11A	ZC3H11A	+	3,99855	1,35245
28S ribosomal protein S16, mitochondrial	MRPS16		3,96636	1,60332
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein MPP10	MPHOSPH10	+	3,90759	1,77039
Protein FAM207A	FAM207A		3,85599	2,63761
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit E	EIF3E	+	3,82011	1,42194
RNA 3-terminal phosphate cyclase-like protein	RCL1		3,61963	2,69655
Protein PRRC2C	PRRC2C	+	3,60885	2,39083
Nucleolar protein 10	NOL10	+	3,51632	2,50604
RNA-binding protein Raly	RALY	+	3,50524	1,58156

U3 small nucleolar RNA-associated protein 14 homolog A	UTP14A	+	3,41542	2,87687
Uncharacterized protein C17orf85	C17orf85	+	3,40416	1,47366
Bcl-2-associated transcription factor 1	BCLAF1	+	3,39629	3,01563
Thyroid hormone receptor-associated protein 3	THRAP3	+	3,38754	3,1741
Protein NipSnap homolog 2	GBAS		3,34774	2,43047
Nucleolar complex protein 4 homolog	NOC4L	+	3,34317	1,92152
Nucleolar RNA helicase 2	DDX21	+	3,26977	2,00064
ATP-dependent RNA helicase DDX50	DDX50	+	3,25084	1,57973
RNA-binding protein 26	RBM26	+	3,17763	2,55118
Carboxyl-terminal PDZ ligand of neuronal nitric oxide synthase protein	NOS1AP		3,15223	1,37164
Serrate RNA effector molecule homolog	SRRT	+	3,11166	2,09485
Eukaryotic translation initiation factor 4B	EIF4B	+	3,0545	1,54565
THO complex subunit 5 homolog	THOC5		3,05391	2,0458
Cell division cycle and apoptosis regulator protein 1	CCAR1	+	3,01854	1,90417
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2	FXR2	+	3,00698	2,52066
RNA-binding protein 10	RBM10	+	2,96802	1,74147
Coiled-coil domain-containing protein 124	CCDC124	+	2,96256	2,64377
Scaffold attachment factor B2	SAFB2	+	2,93704	1,81602
Cell cycle and apoptosis regulator protein 2	CCAR2	+	2,89098	2,4559
PHD and RING finger domain-containing protein 1	PHRF1		2,8512	1,58929
Cleavage stimulation factor subunit 2	CSTF2	+	2,83484	1,70476
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 1	IGF2BP1	+	2,82066	1,90059
WD repeat-containing protein 36	WDR36	+	2,81816	1,1358
Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase	ADAR	+	2,81328	1,58197
Polyadenylate-binding protein 4	PABPC4	+	2,77526	2,21343
Far upstream element-binding protein 3	FUBP3	+	2,76749	2,66939
Splicing factor U2AF 35 kDa subunit	U2AF1	+	2,75899	1,60893
Muscleblind-like protein 1	MBNL1	+	2,72839	1,15449
Next to BRCA1 gene 1 protein	NBR1		2,72317	1,33438
Nucleolar protein 14	NOP14	+	2,7226	1,29796
Putative pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase	DHX16	+	2,7207	1,08968
Eukaryotic translation initiation factor 4E	EIF4E	+	2,71557	1,29974
Pre-mRNA-splicing factor RBM22	RBM22	+	2,70852	1,03818
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRNPC	+	2,69195	2,17208
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 3	IGF2BP3	+	2,67009	2,83202
Fragile X mental retardation syndrome-related protein 1	FXR1	+	2,66596	2,68942
La-related protein 1	LARP1	+	2,66558	2,79946
T-complex protein 1 subunit epsilon	CCT5		2,65394	1,16185
Ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RPS27A	+	2,64592	1,27277
Unconventional myosin-Ib	MYO1B		2,6093	2,0462
Spliceosome RNA helicase DDX39B	DDX39B	+	2,58572	1,61967
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R	HNRNPR	+	2,58534	2,7015
Far upstream element-binding protein 2	KHSRP	+	2,57973	2,18012
THO complex subunit 1	THOC1		2,57691	1,8331
WD repeat-containing protein 43	WDR43	+	2,57662	1,13687
Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	HNRNPA2B1	+	2,57494	2,02543
Pre-mRNA-processing factor 19	PRPF19		2,57423	1,91391
Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2	IGF2BP2	+	2,57394	5,50132
RRP12-like protein	RRP12	+	2,56729	2,09121
Nucleolar protein 6	NOL6	+	2,55198	1,42039
40S ribosomal protein S20	RPS20	+	2,53372	1,48748
5-3 exoribonuclease 2	XRN2	+	2,52009	2,8101
Polyadenylate-binding protein	PABPC1	+	2,51697	2,7957
Protein LLP homolog	LLPH	+	2,51643	1,25522
DDB1- and CUL4-associated factor 13	DCAF13	+	2,51616	1,92843
Nuclear cap-binding protein subunit 2	NCBP2	+	2,50541	1,4204
Serine/arginine-rich splicing factor 3	SRSF3	+	2,50192	1,56811
60S ribosomal protein L31	RPL31	+	2,48338	1,10013
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit A	EIF3A	+	2,46525	1,78572
U3 small nucleolar RNA-associated protein 6 homolog	UTP6		2,45794	1,15868
Matrin-3	MATR3	+	2,4537	2,83826
40S ribosomal protein S18	RPS18	+	2,43355	1,91036
Regulation of nuclear pre-mRNA domain-containing protein 2	RPRD2	+	2,40443	1,46546

DBIRD complex subunit ZNF326	ZNF326	+	2,38415	1,17566
Cellular tumor antigen p53	TP53		2,35554	1,02108
40S ribosomal protein S19	RPS19	+	2,35319	1,8034
SAFB-like transcription modulator	SLTM	+	2,35307	1,0553
Bystin	BYSL	+	2,32836	1,93821
Pumilio homolog 1	PUM1	+	2,31173	1,5613
Serine--tRNA ligase, mitochondrial	SARS2	+	2,30655	2,43548
Interleukin enhancer-binding factor 3	ILF3	+	2,30264	1,92165
28S ribosomal protein S25, mitochondrial	MRPS25		2,30165	1,16831
rRNA 2-O-methyltransferase fibrillarin	FBL	+	2,30117	2,04154
Poly(rC)-binding protein 2	PCBP2	+	2,29904	2,04864
40S ribosomal protein S16	RPS16	+	2,29426	1,9302
60S ribosomal protein L8	RPL8	+	2,29309	1,25767
28S ribosomal protein S23, mitochondrial	MRPS23	+	2,27926	1,91152
SNW domain-containing protein 1	SNW1	+	2,27116	1,43398
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L	HNRNPL	+	2,26828	1,94431
Zinc finger CCCH domain-containing protein 14	ZC3H14	+	2,26061	1,10986
Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit F	EIF3F		2,2547	1,98941
Nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NOLC1	+	2,25283	1,26275
Protein PRRC2A	PRRC2A	+	2,24948	2,02065
Ribosomal RNA processing protein 1 homolog B	RRP1B	+	2,24428	1,40081
Structural maintenance of chromosomes protein 3	SMC3		2,2316	1,40212
PHD finger-like domain-containing protein 5A	PHF5A	+	2,21536	1,48551
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX47	DDX47	+	2,21248	2,65894
Ribosomal L1 domain-containing protein 1	RSL1D1	+	2,21218	1,59845
40S ribosomal protein S10	RPS10	+	2,20108	1,44781
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	HNRNPA1	+	2,16986	1,82245
YLP motif-containing protein 1	YLPM1	+	2,16935	1,64794
ATP-dependent RNA helicase A	DHX9	+	2,14559	2,03201
40S ribosomal protein S2	RPS2	+	2,104	1,60145
Poly [ADP-ribose] polymerase 1	PARP1	+	2,10012	1,64365
U3 small nucleolar ribonucleoprotein protein IMP4	IMP4		2,08979	1,38592
Protein RRP5 homolog	PDCD11	+	2,08273	1,28839
28S ribosomal protein S34, mitochondrial	MRPS34		2,07191	2,13639
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U-like protein 2	HNRNPUL2	+	2,06866	1,81645
RNA-binding protein with serine-rich domain 1	RNPS1	+	2,05748	1,37428
Prohibitin-2	PHB2		2,05075	1,01474
Protein quaking	QKI	+	2,04563	1,24154
Small subunit processome component 20 homolog	UTP20	+	2,01652	1,56927
Cold shock domain-containing protein E1	CSDE1	+	1,98401	1,78829
60S ribosomal protein L32	RPL32	+	1,9742	1,3206
40S ribosomal protein S9	RPS9	+	1,97191	1,48673
Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	HNRNPH1	+	1,95072	2,48438
60S ribosomal protein L26;60S ribosomal protein L26-like 1	RPL26	+	1,95049	1,14429
Proliferation-associated protein 2G4	PA2G4	+	1,88409	2,00696
Pescadillo homolog	PES1	+	1,87873	1,32434
Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1	SND1	+	1,8745	1,57268
60S ribosomal protein L13	RPL13	+	1,87319	1,46962
40S ribosomal protein S23	RPS23	+	1,86131	1,16535
Regulator of nonsense transcripts 1	UPF1	+	1,85553	2,02073
Histone H1x	H1FX	+	1,82697	1,38255
60S ribosomal protein L13a	RPL13A	+	1,81876	1,02385
Nuclear cap-binding protein subunit 1	NCBP1	+	1,81164	1,55076
THO complex subunit 2	THOC2		1,80754	1,04702
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein	SLIRP	+	1,78989	1,55521
DAZ-associated protein 1	DAZAP1	+	1,78846	1,48888
40S ribosomal protein S25	RPS25	+	1,75709	1,30604
Kinesin-like protein KIF2A	KIF2A		1,74775	1,29096
60S ribosomal protein L36	RPL36	+	1,72561	2,08279
Protein mago nashi homolog 2	MAGOHB	+	1,68284	1,15127
Nucleolar GTP-binding protein 1	GTPBP4	+	1,63304	1,25824
Leucine-rich PPR motif-containing protein, mitochondrial	LRPPRC	+	1,61017	1,26824
Probable 28S rRNA (cytosine(4447)-C(5))-methyltransferase	NOP2	+	1,6024	1,82837

ADP/ATP translocase 2	SLC25A5	+	1,58419	1,55077
40S ribosomal protein S27;40S ribosomal protein S27-like	RPS27L	+	1,50305	1,48561
Histone H4	HIST1H4A	+	1,49942	1,00397
60S ribosomal protein L22	RPL22	+	1,44152	1,55849
60S ribosomal protein L6	RPL6	+	1,3623	1,14487
Nucleolin	NCL	+	1,29537	1,86765
60S ribosomal protein L35a	RPL35A	+	1,21269	1,03326

Tabelle 8: RNA-abhängige Bindungspartner

Protein	Gen	RBP	-Log10 P Wert	Log2 FC
SRA stem-loop-interacting RNA-binding protein, mitochondrial	SLIRP	+	1,6558	-2,7128
Serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PPP1CB		1,3749	-2,4101

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: AATF/Che-1 - ein Protein mit zahlreichen Funktionen	10
Abbildung 2: Aminosäurestruktur von AATF und funktionelle Residuen	11
Abbildung 3: AATF ist ein Modulator der pro-apoptotischen p53 Antwort.....	13
Abbildung 4: AATF in verschiedenen Tumoren	14
Abbildung 5: Der RP-MDM2-p53 Signalweg wird durch nukleolären Stress reguliert.....	16
Abbildung 6: Diversität von RNP	19
Abbildung 7: AATF und Hypoxie-vermittelter zellulärer Stress. Förderung von Zellzyklusarrest und Survival und Hemmung der Apoptose	20
Abbildung 8: Schema des Triplex Dimethyl Labeling	32
Abbildung 9: Ablauf der Massenspektroskopie	33
Abbildung 10: Die Expressionskontrollen der Flp/In AATF Zelllinien zeigen eine stabile Expression und die Flag-Antikörper konnten die getaggtten Proteine erfolgreich präzipitieren.....	36
Abbildung 11: Nachweis des DNA-Schadensmarker γ -H2AX	37
Abbildung 12: Die MS-IP identifizierte zahlreiche signifikant angereicherte Interaktionspartner von AATF	38
Abbildung 13: 282 Interaktoren waren signifikant, darunter fanden sich 106 bereits zuvor publizierte Bindungspartner.....	39
Abbildung 14: Gemeinsame Interaktoren der unstimulierten Konditionen	40
Abbildung 15: Unter den Interaktoren befinden sich zahlreiche bekannte Bindungspartner.....	41
Abbildung 16: Funktionales Annotationscluster von AATF	41

Abbildung 17: Vergleich der Interaktionen unter Normoxie vs. Hypoxie	43
Abbildung 18: AATF geht unter hypoxischen Bedingungen neue Bindungen ein.....	43
Abbildung 19: Unter Hypoxie-Behandlung zeigt sich eine hohe Übereinstimmung mit dem Interaktom unter UV-Behandlung, darunter fanden sich 90% RNA-bindende Proteine	45
Abbildung 20: 165 Interaktoren waren signifikant, darunter fanden sich 110 bereits zuvor publizierte Bindungspartner.....	46
Abbildung 21: Ein Großteil der Interaktoren sind RNA-bindende Proteine.....	47
Abbildung 22: Die meisten Interaktoren sind RNA-unabhängige Bindungspartner	48
Abbildung 23: Das Interaktom zeigt eine hohe Übereinstimmung mit dem RNA-bindenden Interaktoren, publiziert von Pineiro et al.	49
Abbildung 24: Das AATF Interaktom ließ sich durch die publizierte Literatur validieren	51
Abbildung 25: Mögliche Rolle von AATF bei der Translationsinitiation und Zusammenbau der Translationsmaschinerie mit Verbindung zum mTORC1 Pathway.....	54
Abbildung 26: AATF als molekularer Schalter zwischen Zellzyklusarrest und Apoptose	57

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Das AATF Interaktom vor Hypoxie-Behandlung	66
Tabelle 2: Das AATF Interaktom nach Hypoxie-Behandlung.....	71
Tabelle 3: Interaktoren, die nach Hypoxie-Behandlung signifikant hochreguliert wurden	77
Tabelle 4: Interaktoren, die nur vor der Hypoxie-Behandlung nachgewiesen wurden	78
Tabelle 5: Interaktoren des EIF-Komplexes, die unter Hypoxie hochreguliert werden	78
Tabelle 6: Signifikante Interaktoren des RP-MDM2-p53 Signalwegs	79
Tabelle 7: RNA-unabhängige Bindungspartner	79
Tabelle 8: RNA-abhängige Bindungspartner	82

8. Vorabveröffentlichungen von Ergebnissen

Kaiser RWJ, Ignarski M, Van Nostrand EL, Frese CK, Jain M, **Cukoski S**, Heinen H, Schaechter M, Seufert L, Bunte K, Frommolt P, Keller P, Helm M, Bohl K, Höhne M, Schermer B, Benzing T, Höpker K, Dieterich C, Yeo GW, Müller RU, Fabretti F.

A protein-RNA interaction atlas of the ribosome biogenesis factor AATF.

Sci Rep. 2019 Jul 30;9(1):11071. doi: 10.1038/s41598-019-47552-3. PMID: 31363146