

Funktion der Poly(A)-spezifischen Ribonuklease (PARN) im Histon-mRNA-Metabolismus

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,

vorgelegt

von Claudia Weißbach

geb. am 19.09.1986 in Leinefelde

Gutachter:

Prof. Dr. Elmar Wahle

Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier

Prof. Dr. Daniel Schümperli

Halle/Saale, Juli 2014

Verteidigung: 19.12.2014

Inhaltsverzeichnis

I	EINLEITUNG	1
1	mRNA-Synthese	1
1.1	Transkription und Prozessierung von mRNAs	1
1.2	Histon-mRNA-Prozessierung	3
1.3	Effizienz der Histon-mRNA-Prozessierung und missprozessierte Histon-mRNAs	6
2	mRNA-Abbau	8
2.1	Genereller mRNA-Abbau	8
2.2	RNA-Qualitätskontrolle	9
2.3	Regulierung des mRNA-Abbaus durch RNA-bindende Proteine	10
2.4	Deadenylierung	10
2.5	Die Poly(A)-spezifische Ribonuklease (PARN)	11
2.5.1	Die Funktion von PARN während der Entwicklung	13
2.5.2	Die Funktion von PARN in somatischen Zellen	14
2.6	Histon-mRNA-Abbau	15
	Zielstellung	17
II	MATERIAL UND METHODEN	19
1	Material	19
1.1	Verwendete Kits	19
1.2	Verwendete Oligonukleotide	19
1.3	Verwendete siRNAs	19
1.4	Verwendete Plasmide	20
1.5	Verwendeter Bakterienstamm	20
1.6	Verwendete Zelllinien	20
2	Methoden	21
2.1	Molekularbiologische Methoden	21
2.2	Klonierung der Histon-Reporter	22
2.3	Die <i>in vitro</i> -Mutagenese zur Erzeugung von Histon-Reportern	24
2.4	Mikrobiologische Methoden	25
2.4.1	Herstellung chemokompetenter Zellen	25
2.5	Biochemische Methoden	25
2.5.1	Isolierung von DNA aus Säugetierzellen	25
2.5.2	Isolierung von RNA nach der TRIZOL-Methode	26
2.5.3	Poly(A) ⁺ -Präparation	27

2.5.4	RNaseH/dT-Verdau	27
2.5.5	DNaseI-Verdau	28
2.5.6	Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA	28
2.5.6.1	Agarose-Gelelektrophorese	28
2.5.6.2	Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese	29
2.5.6.3	Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	29
2.5.7	Reverse Transkription (RT)	30
2.5.8	Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)	30
2.5.9	DNA-Sequenzierung	32
2.5.10	Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs	33
2.5.11	Präparation von Gesamtzellextrakt und Bestimmung der Protein-konzentration	34
2.5.12	<i>Western-blot</i> -Analyse	34
2.6	Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren	35
2.6.1	Die <i>in vitro</i> -Transkription	36
2.6.2	Die 5'-Markierung von Oligonukleotiden	37
2.6.3	Herstellung radioaktiv markierten Markers	37
2.7	Analyse von Nukleinsäuren mittels radioaktiv markierter Sonden	38
2.7.1	<i>Ribonuclease protection assay</i> (RPA)	38
2.7.2	<i>Northern-blot</i> -Analyse	38
2.8	Zellkultur	39
2.8.1	Kultivierung von humanen Zellen	39
2.8.2	Transfektion von Zellen mit siRNA	40
2.8.3	Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA	40
2.8.4	Hydroxyharnstoff-Applikation	40
2.8.5	Synchronisation von HeLa-Zellen	41
2.9	Fixierung von Zellen und Zellzyklusanalyse	41
2.10	Microarray-Analyse	42
III	ERGEBNISSE	45
1	Identifizierung putativer PARN-Substrate in humanen somatischen Zellen	45
2	Verifizierung polyadenylierter Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate	54
3	Verifizierung polyadenylierter Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate in einer weiteren Zelllinie	59
4	Die 3'-Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs	61
5	Verifizierung der Sequenzierdaten mittels RPA	64
6	Einfluss der PARN-Depletion auf Prozessierungsfaktoren	72

7	Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge polyadenylierter Histon-mRNAs	76
8	Einfluss des Polyadenylierungssignals und des GU-reichen Elementes auf die Polyadenylierung von Histon-mRNAs	79
9	Einfluss der PARN-Depletion auf die Zellzyklusverteilung	84
10	Einfluss von Hydroxyhamstoff auf die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs.....	86
11	Etablierung des PARN-kd-Experimentes in synchronisierten HeLa-Zellen.....	88
12	Initiales RNAi-Synchronisationsexperiment	91
IV	DISKUSSION.....	95
1	Funktion von PARN während der Entwicklung und in somatischen Zellen	95
2	Polyadenylierte Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate.....	98
3	Entstehung von polyadenylierten Histon-mRNAs	103
4	Polyadenylierte Histon-mRNAs und Zellzykluskontrolle.....	107
5	Vorkommen und Bedeutung polyadenylierter Histon-mRNAs	109
6	Effizienz der Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion	113
	Zusammenfassung	115
V	ANHANG.....	117
1	Statistische Betrachtung zur Anreicherung potenzieller PARN-Substrate in Microarray- Analysen	117
2	qRT-PCR-Ergebnisse für vier weitere Histon-mRNAs	117
3	qRT-PCR-Ergebnisse unter Verwendung speziell entworfener Oligonukleotide zur Amplifikation polyadenylierter Histon-mRNA oder Gesamt-Histon-mRNA.	118
4	Sequenzanalyse der polyadenylierten Histon-mRNAs.....	120
5	Sequenzanalyse der gespleißten Histon-mRNA	120
6	Abkürzungsverzeichnis	123
7	Abbildungsverzeichnis	125

8	Tabellenverzeichnis	126
VI	LITERATURVERZEICHNIS	127
	Lebenslauf	143
	Eidesstattliche Erklärung	145
	Danksagung	147

I Einleitung

Die Regulation der Genexpression ist ein sehr komplexer Prozess, der es ermöglicht, dass eine Vielzahl an biologischen Prozessen parallel und koordiniert ablaufen kann. Dabei gibt es zahlreiche Möglichkeiten, um die Genregulation zu realisieren.

In besonderem Maße trägt die mRNA-Stabilität zur posttranskriptionalen Genregulation bei. Durch sie wird die mRNA-Gleichgewichtsmenge einer Zelle beeinflusst. Während Modifizierungen am 3'- und am 5'-Ende die mRNA vor einem exonukleolytischen Abbau schützen und gleichzeitig für die Translation essentiell sind, können bestimmte destabilisierende Elemente im 3'-untranslatierten Bereich (3'-UTR) der mRNA den Abbau beschleunigen.

Welche Möglichkeiten des Abbaus existieren, durch welche Elemente die mRNA-Stabilität beeinflusst werden kann und welche Enzyme an dem Abbau beteiligt sind, soll in den folgenden Abschnitten näher dargestellt werden.

1 mRNA-Synthese

1.1 Transkription und Prozessierung von mRNAs

Während der Transkription werden mRNAs ausgehend von einer DNA-Matrize synthetisiert. An diesem Prozess sind zahlreiche Transkriptionsfaktoren beteiligt.

Sie führen beispielsweise die RNA-Polymerase II zur DNA und binden auch Promotorelemente. Bei Promotoren handelt es sich um DNA-Abschnitte, die den Transkriptionsstartpunkt signalisieren, wobei sie sich in der Regel 5' zum Transkriptionsstart befinden. Das bekannteste Promotorelement ist die TATA-Box, die sich in Eukaryoten zwischen 28- 34 Nukleotiden 5' zur Transkriptionsstartstelle befindet. In Promotoren eukaryotischer Zellen kommen außerdem noch weitere Elemente vor (Sandelin *et al.*, 2007). Die Transkription beginnt an der Transkriptionsstartstelle und wird von der RNA-Polymerase II katalysiert. Während der Transkription erfolgt zusätzlich die Prozessierung. In diesem Prozess werden das 5'-Ende modifiziert und Intronsequenzen eliminiert, so dass Exonsequenzen miteinander verknüpft werden können. Zusätzlich wird am 3'-Ende nach der Spaltung der Prä-mRNA ein Poly(A)-Schwanz angefügt.

Die Kopplung der Transkription an die Prozessierung wird durch die C-terminale Domäne (CTD) der RNA-Polymerase II realisiert. So wird durch die Phosphorylierung der CTD beispielsweise die Bindung zahlreicher Prozessierungsfaktoren ermöglicht (Cho *et al.*, 1997; McCracken *et al.*, 1997; Mortillaro *et al.*, 1996).

Bei der Prozessierung des 5'-Endes der mRNA entsteht ein 7-Methylguanosin, das die mRNA vor einem exonukleolytischen Abbau schützt (Schwer *et al.*, 1998). Dieser Prozess wird auch als *capping* bezeichnet. Die Cap-Struktur wird im Zellkern von dem sog. *cap binding complex* (CBC) gebunden, der aus der kleinen Untereinheit CBP-20 und der großen Untereinheit CBP-80 besteht (Izaurrealde *et al.*, 1994). Bei einem weiteren Prozessierungsschritt, dem Spleißen, werden Intronsequenzen aus der Prä-mRNA eliminiert, wobei die Intronenden ein allgemeines konserviertes Sequenzmotiv besitzen. Die GUAG-Regel des Spleißens beschreibt dabei auftretende Konsensussequenzen im Intron. Der Intronanfang wird meist durch die Basensequenz GU gekennzeichnet, während die Basensequenz AG am Intronende vorkommt. An dem Spleißprozess ist das Spleißosom beteiligt, das aus zahlreichen Spleißfaktoren und *small nuclear ribonucleoprotein particles* (snRNPs) besteht. Als Bestandteil des Spleißosoms sind die snRNAs U1, U2, U4, U5 und U6 zu nennen. Sie assoziieren mit bestimmten Proteinen in snRNPs, wobei die Proteine um die zentrale Sm-Region der snRNAs einen Sm-Ring ausbilden (Yong *et al.*, 2004). Das Spleißosom katalysiert zwei Umesterungsreaktionen, bei der eine Lariatstruktur freigesetzt wird und die Exonsequenzen verbunden werden.

Das 3'-Ende der mRNA wird außerdem polyadenyliert (Bienroth *et al.*, 1993; Colgan and Manley, 1997). Dazu wird die Vorläufer-mRNA zwischen dem Polyadenylierungssignal und dem GU-reichen Element gespalten und das freie 3'-Ende durch die Poly(A)-Polymerase (PAP) polyadenyliert. Diese Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion wird von einem Multiproteinkomplex katalysiert, der aus dem *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF)-Komplex, dem *cleavage specificity factor* (CstF), dem *cleavage factor* (CFI/II) und der Poly(A)-Polymerase (PAP) besteht. Der CPSF-Komplex besteht aus den Untereinheiten CPSF-160, CPSF-100, CPSF-73, CPSF-30, Fip1 und WDR33 (Bienroth *et al.*, 1991; Kaufmann *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2009), wobei CPSF-160 vermutlich das Polyadenylierungssignal bindet (Murthy and Manley, 1995). Das Polyadenylierungssignal befindet sich meist zwischen 10 und 30 Nukleotiden 5' zur Polyadenylierungsstelle und besitzt die Konsensussequenz A/(A/U)UAAA. Das GU-

reiche Element, oft auch als *downstream element* bezeichnet, befindet sich 3' zur Spaltstelle und wird hingegen von CstF64 gebunden (Takagaki and Manley, 1997), einer Untereinheit des CstF-Komplexes. Weitere Bestandteile des CstF-Komplexes sind CstF77 und CstF50. Darüber hinaus trägt CFI zu einer effizienten Spaltung der Prä-mRNA bei, indem es die Assoziation zwischen dem CPSF-Komplex und der Vorläufer-mRNA fördert (Venkataraman *et al.*, 2005). Das Enzym, welches die Spaltung katalysiert, ist CPSF-73 (Mandel *et al.*, 2006). Fip1 hingegen bindet U-reiche Sequenzen und stimuliert die Poly(A)-Polymerase (Kaufmann *et al.*, 2004), die durch die Interaktion mit dem CPSF-Komplex zur Prä-mRNA rekrutiert wird.

Durch die Polyadenylierung entsteht ein ca. 250 Nukleotide langer Poly(A)-Schwanz, der vom nukleären Poly(A)-Bindepotein (PABPN1) gebunden wird. Die Prozessivität und Längenkontrolle erhält die PAP durch die Interaktion mit dem CPSF-Komplex und PABPN1 (Bienroth *et al.*, 1993; Kuhn *et al.*, 2009; Wahle, 1991).

Nachdem die RNA in das Zytoplasma transportiert wurde, wird der CBC durch den zytoplasmatischen Cap-Bindungskomplex ersetzt, welcher aus den eukaryotischen Initiationsfaktoren (eIF) eIF4E, eIF4A und eIF4G besteht. eIF4G interagiert außerdem mit dem zytoplasmatischen Poly(A)-Bindepotein, so dass die RNA eine Ringstruktur ausbildet (Imataka *et al.*, 1998; Tarun and Sachs, 1996), die für die Translation notwendig ist.

Die vollständig prozessierte mRNA enthält einen 5'-untranslatierten Bereich (5'-UTR), ein offenes Leseraster (ORF) und einen 3'-UTR.

1.2 Histon-mRNA-Prozessierung

Im Gegensatz zu den regulären mRNAs werden die meisten replikationsabhängigen Histon-mRNAs nicht gespleißt, da in den Histon-Genen keine Introns vorhanden sind. Die Histon-Gene sind in Genclustern angeordnet. In humanen Zellen gibt es ein großes und zwei kleine Gencluster, wobei das große Histon-Gencluster, als HIST1 bezeichnet, auf Chromosom sechs lokalisiert ist und 55 Histon-Gene trägt (Marzluff *et al.*, 2002). Zu den zwei kleineren Histon-Clustern zählen das HIST2-Cluster und das HIST3-Cluster. Jedes Histon-Gen verfügt über einen eigenen Promotor.

Histon-mRNAs besitzen ein 7-Methyl-Guanosin am 5'-Ende, das reife 3'-Ende wird jedoch nicht von einem Poly(A)-Schwanz gebildet, sondern von einer *stem-loop*-Struktur (Marzluff *et al.*, 2008). Für die Bildung des reifen Histon-mRNA-Endes ist

eine endonukleolytische Spaltung der Prä-Histon-mRNA notwendig (Birchmeier *et al.*, 1984; Krieg & Melton, 1984). Für diesen Prozessierungsschritt spielen zwei cis-Elemente in der Prä-Histon-mRNA eine zentrale Rolle (Birchmeier *et al.*, 1983; Cotten *et al.*, 1988; Mowry & Steitz, 1987a; Mowry *et al.*, 1989). Es handelt sich dabei zum einen um den *stem-loop*, welcher 5' zur Spaltstelle liegt, zum anderen befindet sich 3' zur Spaltstelle das *histone downstream element* (HDE), eine purinreiche Sequenz, die in Vertebraten weniger stark konserviert ist (Birnstiel *et al.*, 1985). Diese zwei Elemente werden während der Histon-Prozessierung von Transfaktoren gebunden. Dabei bindet das *stem-loop-binding protein* (SLBP) die *stem-loop*-Struktur (Martin *et al.*, 1997; Tan *et al.*, 2013; Vasserot *et al.*, 1989; Wang *et al.*, 1996). Der U7snRNP-Komplex interagiert hingegen mit dem HDE (Birnstiel *et al.*, 1985; Gilmartin *et al.*, 1988; Mowry & Steitz, 1987b; Strub & Birnstiel, 1986). Er besteht neben zahlreichen Proteinen auch aus einer kleinen RNA-Komponente, der U7snRNA. Die Beteiligung einer RNA an der Histon-mRNA-Prozessierung wurde u.a. durch Untersuchungen nukleärer Extrakte mit der Micrococcus-Nuklease nachgewiesen (Gilmartin *et al.*, 1988; Mowry & Steitz, 1987a; Soldati & Schümperli, 1988). Die Länge der U7snRNA variiert zwischen verschiedenen Spezies zwischen 57 und 71 Nukleotiden, sie wird von der RNA-Polymerase II synthetisiert und trägt ein Trimethyl-Cap (Birchmeier *et al.*, 1984; Cotten *et al.*, 1988; Dominski *et al.*, 2003; Galli *et al.*, 1983; Gilmartin *et al.*, 1988). Das 3'-Ende der U7snRNA bildet einen *stem-loop* aus, während das 5'-Ende mit dem HDE komplementäre Basenpaarungen eingeht. Bei Mutationen innerhalb der U7snRNA-Sequenz, die mit dem HDE hybridisiert, wird die Histon-3'-Prozessierung inhibiert (Bond *et al.*, 1991; Schaufele *et al.*, 1986). Um die Sm-Region in der U7snRNA bilden sieben Sm-Proteine eine Ringstruktur aus, den sog. Sm-Ring, der aus den Proteinen SmB, Lsm11, Lsm10, SmD3, SmE, SmF und SmG besteht (Pillai *et al.*, 2001, 2003). Im Vergleich zur spleißosomalen Sm-Ring-Struktur der snRNPs fehlen dem Sm-Ring des U7snRNPs lediglich die Proteine SmD1 und SmD2- stattdessen kommen Lsm11 und Lsm10 darin vor.

Eine weitere Komponente, die an der Histon-mRNA-Prozessierung beteiligt ist, ist das 100kDa *zinc finger protein* ZFP100 (Azzouz *et al.*, 2005; Dominski *et al.*, 2002), welches vermutlich durch die Bindung an den SLBP-*stem-loop*-Komplex und der Assoziation mit dem U7snRNP die Interaktion zwischen der Prä-Histon-mRNA und dem U7snRNP verstärkt (Dominski *et al.*, 2002) (siehe Abbildung 1).

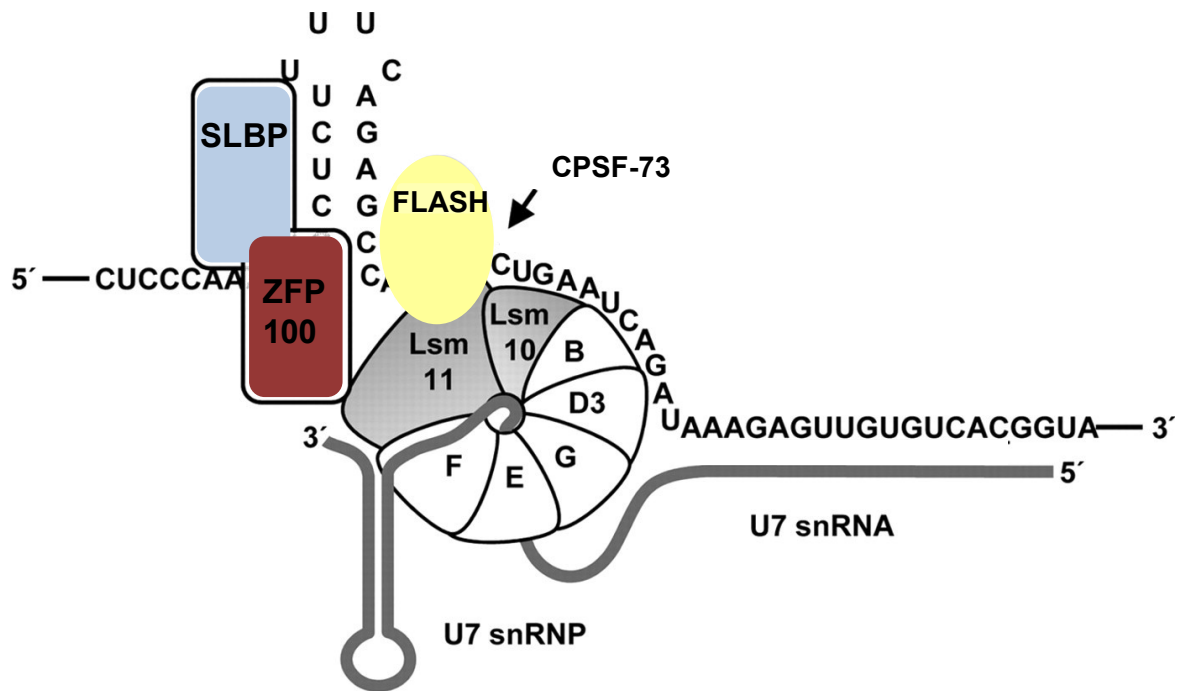


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Histon-mRNA-Prozessierung

Während der Histon-mRNA-Prozessierung kommt es zu einer endonukleolytischen Spaltung der Prä-Histon-mRNA durch CPSF-73 (durch Pfeil gekennzeichnet). Für die Rekrutierung der Endonuklease zur Spaltstelle sind zahlreiche Faktoren wichtig. Die Prä-Histon-mRNA wird von SLBP und von dem U7snRNP gebunden. Während SLBP den *stem-loop* der Histon-mRNA bindet, bildet die U7snRNA mit dem HDE der Prä-Histon-mRNA komplementäre Basenpaare aus. Desweiteren tragen ZFP100, FLASH und die Proteine des U7snRNP-Komplexes zur Prozessierung bei. (modifiziert nach: Yang *et al.*, 2011)

Eine Plattform, die die Endonuklease zur Prä-Histon-mRNA rekrutiert, wird durch den U7snRNP-FLASH-Komplex gebildet (Sabath *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013). Dabei trägt das *fllice associated huge* (FLASH)-Protein über die Interaktion mit der U7snRNP-Komponente Lsm11 zur korrekten Prozessierung von Histon-mRNAs bei (Burch *et al.*, 2011; Sabath *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2009). Dies gewährleistet, dass die Spaltung in einer relativ festgelegten Distanz zum HDE stattfinden kann.

Weitere Spaltungs- und Polyadenylierungsfaktoren, die in Säugetierzellen zur Prä-Histon-mRNA rekrutiert werden, sind Symplekin^{1,2}, der gesamte CPSF-Komplex^{1, 2}, CstF77¹ und CstF64^{1,2}.

¹ Kolev & Steitz, 2005

Die Spaltung findet meist vier bis fünf Nukleotide nach dem *stem-loop*, bevorzugt nach CCA statt (Furger *et al.*, 1998; Scharl & Steitz, 1994). Die Endonuklease ist CPSF-73 (Dominski *et al.*, 2005; Ryan *et al.*, 2004).

Nach der endonukleolytischen Spaltung werden die Histon-mRNAs zusammen mit SLBP in das Zytoplasma transportiert. An diesem Transportprozess sind sowohl der *nuclear export factor 1* (NXF1 oder TAP) als auch SLBP selbst beteiligt (Erkman *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2009). Im Zytoplasma bleibt die Histon-mRNA von SLBP gebunden, so dass es durch die Interaktion mit dem *SLBP-interacting protein 1* (SLIP1) über die eIF4G-Bindung zu einer Zirkularisierung der Histon-mRNA kommt, die für die Translation wichtig ist (Cakmakci *et al.*, 2008).

Sowohl in *D. melanogaster* als auch in Säugetierzellen sind nukleäre Strukturen beschrieben worden, in denen Histon-Prozessierungsfaktoren akkumulieren. Es handelt sich dabei um die *histone locus bodies* (HLB) (Bongiorno-Borbone *et al.*, 2008; Ghule *et al.*, 2008; Nizami *et al.*, 2010). Aufgrund des Vorkommens von Histon-Prozessierungsfaktoren wie dem *nuclear protein, ataxia-telangiectasia locus* (NPAT) oder FLASH (Bongiorno-Borbone *et al.*, 2008) wird vermutet, dass sie der Ort der Histonprozessierung sind. Die HLB sind mit den Histon-Loci assoziiert. Früher wurden die HLB aufgrund der räumlichen Nähe zu *Cajal bodies* und aufgrund der fehlenden Unterscheidung zwischen diesen beiden nukleären Strukturen oft als *Cajal bodies* bezeichnet. Sie kolokalisieren aber mit den *Cajal bodies* nur während der S-Phase des Zellzyklus, wobei die Bedeutung dieser Kolokalisation noch nicht eindeutig geklärt ist (Bongiorno-Borbone *et al.*, 2008).

1.3 Effizienz der Histon-mRNA-Prozessierung und missprozessierte Histon-mRNAs

Neben SLBP, FLASH, ZFP100 und dem U7snRNP beeinflussen weitere Faktoren die Prozessierung von Histon-mRNAs. Sowohl der *negative elongation factor* (NELF) als auch NPAT tragen zur Bildung korrektprozessierter Histon-mRNAs bei (Narita *et al.*, 2007; Pirngruber & Johnsen, 2010). Die Rolle von NELF in der Histon-Prozessierung ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass NELF einerseits mit dem CBC interagiert und andererseits der *knockdown* von NELF zu einem vermehrten Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs beiträgt (Narita *et al.*,

² Yang *et al.*, 2013

2007). NPAT hingegen ist an der Aktivierung der Histon-Transkription beteiligt (Ma *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2000). Die Phosphorylierung von NPAT durch die Cyclin E-abhängige Kinase ist dabei eine wesentliche Voraussetzung. Auch der *knockdown* von NPAT führt zum vermehrten Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs (Pirngruber & Johnsen, 2010).

Die Effizienz der korrekten Histon-mRNA-Prozessierung und damit die Bildung des korrekten Histon-3'-Endes unterscheidet sich für verschiedene Histon-mRNAs, wobei das *stem-loop*-Element und das HDE einen entscheidenden Einfluss besitzen (Georgiev & Birnstiel, 1985; Liu *et al.*, 1989). *In vitro*-Analysen mit Histon-Reporter-RNAs in nukleären Zellextrakten ergaben, dass Mutationen im *stem-loop* und im HDE die Prozessierungseffizienz beeinflussen können (Mowry *et al.*, 1989; Vasserot *et al.*, 1989). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass zusätzliche Nukleotide außerhalb der *core*-HDE-Sequenz mit der U7snRNA Basenpaarungen eingehen können, die Auswirkungen auf die Prozessierungseffizienz haben (Georgiev & Birnstiel, 1985; Spycher *et al.*, 1994).

Bei einer Störung der Histon-mRNA-Prozessierung kommt es durch eine alternative Prozessierung zur Bildung polyadenylierter, missprozessierter Histon-mRNAs. Dies ist vermutlich möglich, weil ein kryptisches Polyadenylierungssignal zumindest in einigen Histon-Genen vorhanden ist (Shepard *et al.*, 2011). Polyadenylierte Histon-mRNAs treten beispielsweise infolge von einem SLBP-, FLASH-, NELF-, oder ZFP100-*knockdown* oder bei Lsm10- und Lsm11-Mutanten auf (Godfrey *et al.*, 2009; Narita *et al.*, 2007; Pirngruber & Johnsen, 2010; Sullivan *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Diese polyadenylierten Histon-mRNAs existieren auch ohne die Beeinflussung der Histon-Prozessierungsfaktoren zu jeder Zeit in somatischen Zellen. Für die H2a-mRNA konnte beispielsweise mit 4,3% ein geringer Prozentsatz polyadenylierter Histon-mRNAs in humanen Zellen detektiert werden (Shepard *et al.*, 2011). Was mit diesen polyadenylierten Histon-mRNAs in der Zelle geschieht und welche Enzyme an der Synthese oder am Abbau beteiligt sind, ist nur sehr wenig untersucht.

In einer Studie konnte gezeigt werden, dass bei Injektion von polyadenylierten Histon-mRNA-Vorläufern in *Xenopus*-Oozyten die Prozessierung zu korrekt prozessierten Histon-mRNAs stattfindet (Masi & Johnson, 2003). Andere Untersuchungen haben wiederum gezeigt, dass polyadenylierte Histon-mRNAs mit Polysomen assoziieren und vermutlich auch translatiert werden (Kari *et al.*, 2013).

2 mRNA-Abbau

2.1 Genereller mRNA-Abbau

Die mRNA-Gleichgewichtsmenge wird sowohl von der Syntheserate als auch von der Abbaurrate bestimmt. Über die Regulation des mRNA-Abbaus kann damit wesentlich zur posttranskriptionalen Genregulation beigetragen werden. In Eukaryoten besteht meist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt im mRNA-Abbau in der Deadenylierung, die in Kapitel I, Abschnitt 2.4 näher beschrieben wird. Danach wird der mRNA-Körper entweder in 5'-3'-Richtung oder in 3'-5'-Richtung degradiert (Übersichtsartikel Garneau *et al.*, 2007).

Der erste Schritt im 5'-3'-Abbau stellt die Entfernung der Cap-Struktur dar. Diese von Dcp2 katalysierte Reaktion wird als *decapping* bezeichnet (van Dijk *et al.*, 2002; Lykke-Andersen, 2002; Wang *et al.*, 2002). Bei der Spaltung entstehen m⁷GDP und eine RNA mit einem 5'-Monophosphat. In Dcp2-Mutanten kommt es folglich zur Anhäufung von oligoadenylierten, Cap-tragenden mRNAs (Dunckley & Parker, 1999). Die Deletion des zytoplasmatischen Lsm1-7-Pat1-Komplexes führt auch zur Akkumulation von Cap-tragenden oligoadenylierten RNAs (Boeck *et al.*, 1998; Bouveret *et al.*, 2000). Dieser Komplex besitzt eine stimulierende Wirkung auf den *decapping*-Prozess (Tharun & Parker, 2001; Tharun *et al.*, 2000) und besteht aus den Lsm-Proteinen 1-7 und Pat1 (Bouveret *et al.*, 2000).

Der weitere 5'-3'-Abbau wird durch die *5'-3'-Exoribonuclease 1* (XRN1) katalysiert, wodurch Nukleosidmonophosphate freigesetzt werden (Stevens, 2001). In Hefe führt die XRN1-Deletion zur Akkumulation von nicht gecappten RNAs (Muhlrad *et al.*, 1994).

Alternativ zum 5'-3'-Abbau kann die mRNA auch in 3'-5'-Richtung durch das Exosom abgebaut werden. Das *core*-Exosom besteht aus neun Untereinheiten. Dabei bilden sechs Untereinheiten (Rrp41, Rrp42, Rrp43, Rrp46, Mtr3, Rrp45 (PM/Sci75)) eine Ring-Struktur aus, die von einer 3er-Kappen-Struktur (Rrp4, Rrp40 und Csl4) stabilisiert wird (Bonneau *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2006; Sloan *et al.*, 2012). In *S. cerevisiae* konnte die katalytische Aktivität für die assoziierten Proteine Rrp44 (Dis3) und Rrp6 nachgewiesen werden (Dziembowski *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2006). Das Exosom existiert sowohl im Nukleus als auch im Zytoplasma. Während das nukleäre Exosom in Prozessen wie der Synthese der 5,8S rRNA, der Prozessierung von rRNAs, snRNAs und snoRNAs und dem Abbau von unvollständig prozessierten

mRNA und *Promotor-upstream transcripts* (PROMPTs) involviert ist, übernimmt das zytoplasmatische Exosom eine Rolle im sog. *non-stop-decay* (Allmang *et al.*, 1999, 2000; Anderson & Parker, 1998; Preker *et al.*, 2008). Rrp6 ist ausschließlich im nukleären Exosom vorhanden (Allmang *et al.*, 1999) und ist in Nukleoli lokalisiert (Tomecki *et al.*, 2010). In humanen Zellen gibt es drei Rrp44-Homologe, Dis3, Dis3L1 und Dis3L2, wobei nur für Dis3 und Dis3L1 eine Assoziation mit dem Exosom nachgewiesen werden konnte (Tomecki *et al.*, 2010). Dis3 ist in humanen Zellen im Nukleoplasma konzentriert, während Dis3L1 im Zytoplasma lokalisiert ist (van Dijk *et al.*, 2007; Tomecki *et al.*, 2010). Die RNAi-vermittelte Depletion von Dis3 verursacht eine Akkumulation von 3'-verlängerten 5,8S rRNA-Vorläufermolekülen, während der Dis3L1-*knockdown* beispielsweise zur Stabilisierung der cMYC-mRNA beiträgt (Tomecki *et al.*, 2010). In humanen Zellen konnte anhand von *knockdown*-Experimenten gezeigt werden, dass der Doppel-*knockdown* von Rrp6 und Rrp44 zu einer Akkumulation von PROMPTs führt. Die Reaktionsprodukte des Exosoms sind Nukleosidmonophosphate (Mitchell *et al.*, 1997). Das beim 3'-5'-Abbau entstehende Cap-Dinukleotid m⁷GpppN wird von dem *scavenger decapping enzyme* (DcpS) abgebaut (Liu *et al.*, 2002), wobei m⁷GMP und das entsprechende Nukleosiddiphosphat entstehen.

2.2 RNA-Qualitätskontrolle

Es gibt darüber hinaus weitere RNA-Abbauwege, die für die Qualitätskontrolle von mRNAs wichtig sind. Beispielsweise werden Transkripte mit einem vorzeitigen Terminations-Codon (PTC) erkannt und während des sog. *nonsense mediated mRNA decay* (NMD) abgebaut. Zu den Kernproteinen, die am NMD beteiligt sind, gehören Upf1, Upf2 und Upf3. Der Exon-Junction-Komplex (EJC) wird 5' zur Exonverbindung positioniert. Das Vorhandensein eines PTC führt dazu, dass der Translationsterminationskomplex über die Upf-Proteine mit dem 3' gelegenen EJC interagieren kann. Dabei kommt es zur Phosphorylierung von Upf1, was den Abbau dieser mRNA bewirkt (Kashima *et al.*, 2006).

Fehlt der mRNA ein Stop-Codon, so kommt es zum *non-stop-decay*, in dem der sog. SKI-Komplex involviert ist (Isken & Maquat, 2007).

2.3 Regulierung des mRNA-Abbaus durch RNA-bindende Proteine

Zu den wohl bekanntesten Elementen, die Einfluss auf den Abbau von mRNAs nehmen, gehören die AU-reichen Elemente (ARE), die sich häufig im 3'-UTR von mRNAs befinden. ARE werden u.a. nach der Anzahl des typischen AUUUA-Motivs und dem Sequenzkontext in verschiedene Klassen eingeteilt (Chen & Shyu, 1995; Peng *et al.*, 1996). Diese Elemente sind häufig im 3'-UTR von Zytokin-mRNAs, Interleukin-mRNAs oder Proto-Onkogen-mRNAs anzutreffen. Spezielle Proteine können ARE binden und die entsprechenden mRNAs stabilisieren oder destabilisieren. Zu den bekanntesten ARE-Bindeproteinen gehören Hu-R, der *AU-rich binding factor-1* (AUF1), Tristetraprolin (TTP1) und *KH splicing regulatory protein* (KSRP). Sie können direkt oder indirekt mit Komponenten des RNA-Abbaus interagieren und sie in die räumliche Nähe zu den entsprechenden mRNAs bringen. Mit RNA-Interferenz-Analysen oder Überexpressionsstudien konnte der stabilisierende Einfluss von Hu-R auf ARE-haltige mRNAs gezeigt werden (Fan & Steitz, 1998; Raineri *et al.*, 2004). TTP1 hingegen wirkt destabilisierend auf seine Zieltranskripte (Carballo *et al.*, 2000; Stoecklin *et al.*, 2000). Sowohl für TTP1 als auch für KSRP wurde eine Assoziation mit dem Exosom beschrieben, was ein Indiz für die Beteiligung des Exosoms am Abbau ARE-haltiger mRNAs ist (Gherzi *et al.*, 2004; Hau *et al.*, 2007). Tristetraprolin übt auch einen destabilisierenden Einfluss auf ARE-haltige mRNAs aus, indem es über die Interaktion mit Not1 die Deadenylyase Caf1 zu diesen RNAs rekrutiert (Sandler *et al.*, 2011). Für das CUG-bindende Protein (CUG-BP), welches u.a. auch ARE bindet, konnte eine destabilisierende Wirkung auf die c-fos- und die TNF-alpha-mRNA beobachtet werden (Moraes *et al.*, 2006). Unabhängig von der Rekrutierung abbauender Enzyme durch ARE-Bindeproteine konnte ebenso gezeigt werden, dass die ARE einer mRNA spezifisch mit dem Exosom wechselwirken (Mukherjee *et al.*, 2002), was auch zu einem verstärkten Abbau der ARE-haltigen mRNAs beiträgt. Im Gegensatz dazu besitzen RNAs der sog. Haushaltsgene oft im 3'-UTR stabilisierende Elemente, die sich durch eine pyrimidinreiche Sequenz auszeichnen (Waggoner & Liebhaber, 2003).

2.4 Deadenylierung

Unter der Deadenylierung versteht man die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes einer mRNA von 3'- in 5'-Richtung. Zu den bereits identifizierten und charakterisierten

Enzymen mit Deadenylase-Aktivität gehören der PAN2/PAN3-Komplex, der CCR4-NOT-Komplex und die Poly(A)-spezifische Ribonuklease (PARN).

Der PAN2/PAN3-Komplex besteht aus den zwei Untereinheiten Pan2p und Pan3p (Boeck *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Die katalytische Aktivität des PAN2/PAN3-Komplexes konnte für Pan2p nachgewiesen werden. Pan2p baut den Poly(A)-Schwanz exonukleolytisch ab (Uchida *et al.*, 2004) und gehört zur Familie der DEDD-Nukleasen (Zuo & Deutscher, 2001), wobei die Aktivität in Hefe vom Poly(A)-Bindeprotein abhängt (Boeck *et al.*, 1996; Sachs & Deardorff, 1992; Uchida *et al.*, 2004). Pan3p trägt über die Interaktion mit dem zytoplasmatischen Poly(A)-Bindeprotein zur Aktivität bei (Sachs & Deardorff, 1992). Die Deletion von PAN2 oder PAN3 führt zu einer Verlängerung der Gesamt-Poly(A)-Schwanzlängen um 20 Nukleotide (Boeck *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Der PAN2/PAN3-Komplex ist sowohl in menschlichen Zellen als auch in Hefe-Zellen im Zytoplasma lokalisiert (Uchida *et al.*, 2004).

Der CCR4-NOT-Komplex gilt hingegen als die Hauptdeadenylase in *S. cerevisiae* und ist in Säugetierzellen und in *D. melanogaster* konserviert (Daugeron *et al.*, 2001; Temme *et al.*, 2004; Tucker *et al.*, 2001). Er enthält zwei Untereinheiten mit Ribonuklease-Aktivität. In *S. cerevisiae* verursachen Mutationen im aktiven Zentrum von Ccr4 eine verminderte Deadenylierung, so dass dieser Untereinheit die katalytische Aktivität zugeordnet werden kann (Tucker *et al.*, 2002). In *D. melanogaster* wurde hingegen die stärkste Veränderung der Gesamt-Poly(A)-Schwanzlängen durch den Caf1-*knockdown* bewirkt (Temme *et al.*, 2004), so dass die katalytische Aktivität zum großen Teil Caf1 zugeordnet wird.

Die große Untereinheit Not1 stellt eine Plattform für die Assoziation mit weiteren Komponenten dar (Boland *et al.*, 2013).

2.5 Die Poly(A)-spezifische Ribonuklease (PARN)

Die Poly(A)-spezifische Ribonuklease (PARN) wurde erstmals 1997 aus Kalbsthymus isoliert und näher charakterisiert, wobei sie anfangs noch als *deadenylating nuclease* (DAN) bezeichnet wurde (Körner & Wahle, 1997). Sie degradiert Poly(A)-RNA von 3'- in 5'-Richtung, wobei 5'-AMP-Moleküle frei gesetzt werden. Die Poly(A)-spezifische Ribonuklease degradiert spezifisch Poly(A), Poly(U) wird mit einer geringeren Rate abgebaut (Henriksson *et al.*, 2010; Körner & Wahle,

1997). Für die Katalyse sind außerdem zweiwertige Metallionen notwendig (Körner & Wahle, 1997; Ren *et al.*, 2002). Diese zweiwertigen Metallionen werden von den vier Aminosäuren Asp28, Glu30, Asp292 und Asp382, die sich im katalytischen Zentrum von humanen PARN befinden, koordiniert. Die Mutation einer dieser Aminosäuren führt zum Verlust der enzymatischen Aktivität (Wu *et al.*, 2005). PARN gehört aufgrund dieser vier Aminosäuren zur Gruppe der DEDD-Exonukleasen (Wu *et al.*, 2005). Der konservierte Histidinrest 377 im Exo-Motiv III ist Ursache für die Zuordnung von PARN in die DEDDh-Familie. Darüber hinaus weist die Nuklease-domäne von PARN eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit den Nukleasedomänen weiterer 3'-5'-Exonukleasen der DEDDh-Familie auf (Wu *et al.*, 2005).

Kristallstrukturen von C-terminal verkürzten PARN-Varianten haben gezeigt, dass die R3H-Domäne an der Bindung von Poly(A) beteiligt ist. PARN kann jedoch nicht nur Poly(A), sondern auch die Cap-Struktur von mRNAs binden (Wu *et al.*, 2005). Untersuchungen mit verschiedenen Substraten konnten zeigen, dass PARN eine RNA mit einer m⁷GpppG-Cap-Struktur effizienter deadenyliert als eine Cap-lose RNA (Dehlin *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001). Im Gegensatz zu den nicht gecapten RNAs ist sogar eine prozessive Arbeitsweise für m⁷GpppG-tragende RNAs beobachtet worden. Diese Cap-Abhängigkeit konnte nicht nur *in vitro*, sondern auch *in vivo* in reifen *Xenopus*-Oozyten rekapituliert werden (Dehlin *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2001). Aus den Kristallstrukturen geht weiterhin hervor, dass PARN als Homodimer vorliegt (Wu *et al.*, 2005). Die Aktivität von PARN wird vom CBC und vom zytoplasmatischen Poly(A)-Bindepotein inhibiert (Balatsos *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2001; Körner & Wahle, 1997).

Lokalisationsstudien in humanen, somatischen Zellen haben ergeben, dass PARN im Nukleus lokalisiert ist und in den Nukleoli und den *Cajal bodies* konzentriert vorliegt. Sowohl das Nukleoli-Markerprotein Nukleophosmin als auch das *Cajal body*-Markerprotein Coilin zeigen eine Kolo-kalisation mit PARN (Berndt *et al.*, 2012). In der Diplomarbeit von A. Zirkel wurde außerdem demonstriert, dass PARN durch die Auflösung der Kernmembran während der Prophase ins Zytoplasma gelangt (Diplomarbeit A. Zirkel, 2008). Zur gleichen Zeit lösen sich auch die *Cajal bodies* auf, ehe sie sich in der G1-Phase erneut bilden (Ma *et al.*, 2000).

In *A. thaliana* ist PARN zytoplasmatisch lokalisiert (Reverdatto *et al.*, 2004).

2.5.1 Die Funktion von PARN während der Entwicklung

Eine Beteiligung am generellen mRNA-Metabolismus konnte für PARN während der *Xenopus*-Oozytenreifung beobachtet werden. Hier entfernt PARN den Poly(A)-Schwanz maternaler mRNAs (Copeland & Wormington, 2001; Körner *et al.*, 1998), dieser Prozess ist als *default deadenylation* bekannt. Die Deadenylierung führt hier zur translationalen Stilllegung der mRNAs (Varnum & Wormington, 1990). Maternale mRNAs ohne zytoplasmatisches Polyadenylierungssignal (CPE) werden deadenyliert, CPE-haltige RNAs hingegen nicht (Kim & Richter, 2006; Varnum & Wormington, 1990). Nach dem Modell von Kim und Richter existiert ein zytoplasmatischer Polyadenylierungskomplex, der aus dem CPE-bindenden Protein (CPEB), PARN und der nichtkanonischen Poly(A)-Polymerase Gld-2 besteht (Barnard *et al.*, 2004; Kim & Richter, 2006). CPE-haltige RNAs gelangen in das Zytoplasma und werden dort durch den CPEB-enthaltenden Komplex gebunden (Dickson *et al.*, 1999; Hake & Richter, 1994). In diesem Komplex sind PARN und die Poly(A)-Polymerase Gld2 katalytisch aktiv, wobei jedoch die Deadenylierungsaktivität überwiegt, sodass die RNAs deadenyliert werden. Nach Progesteron-Gabe wird jedoch die Aurora-A-Kinase aktiviert, die CPEB phosphoryliert, wodurch PARN von dem Komplex dissoziiert. Gld2 synthetisiert den Poly(A)-Schwanz, wodurch maternale mRNAs mit CPE polyadenyliert und translational aktiviert werden (Kim & Richter, 2006). Ein anderes Modell erklärt die translationale Regulation CPE-haltiger RNAs während der *Xenopus*-Oozytenreifung und die Rolle von PARN in diesem Prozess auf einem anderen Weg (Radford *et al.*, 2008). Demnach kann sowohl CPEB, Gld2 als auch PARN mit den Pumilio-Proteinen 1 und 2 interagieren (Nakahata *et al.*, 2001; Ota *et al.*, 2011). Für Pumilio 1 wurde bereits eine Beteiligung an der translationalen Regulation von CPE-haltigen RNAs gezeigt (Ota *et al.*, 2011). PARN ist vermutlich über die Interaktion mit Pumilio 2 an der translationalen Regulation von mRNAs beteiligt, wobei der genaue Mechanismus noch nicht geklärt werden konnte.

Die Injektion eines anti-PARN-Antikörpers in *Xenopus*-Oozyten kann den *default deadenylation*-Prozess aufheben. Im Gegensatz dazu stellt die Injektion einer PARN-mRNA in entkernte Oozyten diesen Prozess wieder her (Körner *et al.*, 1998), womit die Beteiligung von PARN an der *default deadenylation* direkt demonstriert wurde.

In der frühen Embryogenese von *A. thaliana* ist PARN essentiell (Chiba *et al.*, 2004; Reverdatto *et al.*, 2004). So weisen PARN-Mutanten beispielsweise eine verzögerte

Entwicklung auf. Es gibt außerdem Indizien dafür, dass PARN an der zellulären Stressantwort in Pflanzen beteiligt ist. PARN-Mutanten zeigen in diesem Zusammenhang eine erhöhte Sensitivität auf die Abscisinsäurebehandlung (Nishimura *et al.*, 2005), die sich beispielsweise in einem verminderten Wachstum oder einer verspäteten Keimung äußern.

2.5.2 Die Funktion von PARN in somatischen Zellen

Im Gegensatz zu der Funktion von PARN während der *Xenopus*-Oozytenreifung, ist die Rolle in somatischen humanen Zellen nur wenig verstanden. In der Promotionsarbeit von M. Reuter konnte in HeLa-Zellen kein Einfluss auf die Verteilung der Gesamt-Poly(A)-Schwanzlängen beobachtet werden. Eine Funktion im generellen RNA-Abbau scheint aus diesem Grund eher unwahrscheinlich. Denkbar wäre, dass PARN spezifische RNAs deadenyliert oder erst unter bestimmten zellulären Bedingungen aktiv wird. Eine Vielzahl an *in vitro*-Experimenten wurde in diesem Zusammenhang durchgeführt. Beispielsweise wurden ARE-haltige RNAs als potenzielle PARN-Substrate identifiziert. Als Indiz für die Beteiligung von PARN am Abbau dieser mRNAs wurden Ko-Immunopräzipitationen mit den ARE-Bindeproteinen KSRP, TTP1 und CUG-BP angeführt (Gherzi *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2006). Jedoch konnten Studien mit Reporter-RNAs, deren 3'-UTR ein oder mehrere AU-reiche Sequenzen enthalten, keinen Einfluss der RNAi-vermittelten PARN-Depletion auf den Abbau dieser mRNAs bestätigen (Promotion M. Reuter, 2006). Darüber hinaus konnte auch keine Kolo-kalisation mit CUG-BP gezeigt werden (Diplomarbeit A. Zirkel, 2008). Eine Beteiligung von PARN am NMD wurde bereits publiziert, wobei PARN mit dem NMD-Faktor Upf1 kopräzipitiert (Lejeune *et al.*, 2003). In einer unabhängigen Studie konnte jedoch weder für Upf1 und Upf2, noch für Upf3 die Kopräzipitation mit PARN in HeLa-Zellen rekapituliert werden (Promotion M. Reuter, 2006).

Eine Beteiligung von PARN an der Reifung von H/ACA-box snoRNAs wurde durch H. Berndt aufgeklärt. Hier fügt die nichtkanonische Poly(A)-Polymerase PAPD5 an Vorläufer-snoRNAs einen Oligo(A)-Schwanz an und PARN entfernt diesen und vermutlich weitere Nukleotide, so dass während des *trimming*-Prozesses korrekt prozessierte snoRNAs entstehen (Berndt *et al.*, 2012). Weitere Untersuchungen zum Einfluss von PARN auf die Menge ribosomaler RNAs (rRNAs), Prä-mRNAs, Prä-rRNA oder mRNAs, die für Ribosomenproteine kodieren, zeigten keine erhöhten

Gleichgewichtsmengen infolge des PARN-*knockdown*, sodass PARN wahrscheinlich nicht in den Abbau dieser RNAs involviert ist (Diplomarbeit I. Steiner, 2007, Promotion M. Reuter, 2006).

Es gibt außerdem Untersuchungen zur Funktion von PARN in somatischen Zellen unter zellulären Stressbedingungen. In einem Modell von Cevher wird beschrieben, dass PARN unter normalen Standardbedingungen mit CBP-80 interagiert und katalytisch inaktiv ist, aber infolge der UV-Bestrahlung den CBP80-Komplex verlässt und als Bestandteil des CstF50/BARD1-Komplexes katalytisch aktiv ist. Als Folge dessen kann eine Reporter-RNA in UV-behandelten Extrakten in Abhängigkeit von PARN deadenyliert werden (Cevher *et al.*, 2010).

Außerdem bewirkt Hitzestress eine Relokalisation von PARN in das Nukleoplasma (pers. Mitteilung J. Tavanez, Diplom I. Steiner, 2007, Promotion H. Berndt, 2011). Möglicherweise übt PARN unter diesen Bedingungen aufgrund der räumlichen Nähe zu zahlreichen Prä-mRNAs oder mRNAs eine destabilisierende Wirkung auf diese RNAs aus. Damit einhergehend wurden in ersten Microarray-Studien einige potenzielle PARN-Substrate unter Hitzestressbedingungen identifiziert. Untersuchungen zum mRNA-Abbau ließen jedoch nicht auf eine Beteiligung von PARN an der Deadenylierung dieser mRNAs schließen (Masterarbeit G. Zander, 2012).

2.6 Histon-mRNA-Abbau

SLBP schützt die Histon-mRNA durch die Bindung an die *stem-loop* Struktur vor einer Degradation, wird am Ende der S-Phase jedoch selbst degradiert (Whitfield *et al.*, 2000), sodass durch das Fehlen von SLBP die Histon-mRNA nicht mehr hinreichend vor einem Angriff durch Exonukleasen geschützt ist und es zum Abbau kommt. Der zellzyklusabhängige SLBP-Abbau wird durch die Phosphorylierung zweier Threoninreste verstärkt (Whitfield *et al.*, 2000; Zheng *et al.*, 2003).

Replikationsabhängige Histon-mRNAs werden generell am Ende der S-Phase abgebaut. Dieser Degradation von Histon-mRNAs geht eine Oligouridylierung voraus (Hoefig & Heissmeyer, 2014; Hoefig *et al.*, 2013; Mullen & Marzluff, 2008; Schmidt *et al.*, 2011). Sie wird von der nichtkanonischen Poly(U)-Polymerase ZCCHC11 katalysiert (Schmidt *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2013). Die Oligouridylierung von mRNAs kann den *decapping*-Prozess stimulieren, wobei Lsm1 als eine Komponente des

decapping-Komplexes identifiziert wurde (Song & Kiledjian, 2007). Als Bestandteil des Lsm1-7-Komplexes bindet Lsm1 auch oligouridylierte Histon-mRNAs und SLBP (Mullen & Marzluff, 2008). In unabhängigen Studien wurde bestätigt, dass nach der Oligouridylierung von Histon-mRNAs bevorzugt das *decapping* erfolgt (Su *et al.*, 2013). Anschließend tragen Faktoren des 5'-3'- und des 3'-5'-mRNA-Abbaus zur Histon-mRNA-Degradation bei (Mullen & Marzluff, 2008). Weitere in den Abbau der Histon-mRNAs involvierte Faktoren sind die Exoribonuklease 1 (ERI1) und Upf1. So kommt es nach Hydroxyharnstoffapplikation, die gewöhnlich den Abbau replikationsabhängiger Histon-mRNAs induziert, in Upf1- und ERI1-depletierten Zellen zu einer Stabilisierung von replikationsabhängigen Histon-mRNAs (Hoefig *et al.*, 2013; Kaygun & Marzluff, 2005b). Es wird postuliert, dass die Helikase-Aktivität von Upf1 notwendig ist, um den Histon-*stem-loop* für ERI1 zugänglich zu machen (Hoefig *et al.*, 2013). Darüber hinaus interagiert ERI1 mit Komponenten des Lsm1-7-Komplexes und mit Upf1, sodass eine Beteiligung von ERI1 am Abbau von Histon-mRNAs wahrscheinlich ist (Hoefig *et al.*, 2013). Die Kristallstruktur von ERI1 im Komplex mit SLBP und der Histon-mRNA zeigt, dass ERI1 den 3'-Bereich des *stem-loops* und SLBP den 5'-Bereich des *stem-loops* bindet (Tan *et al.*, 2013).

Für den Abbau von Histon-mRNAs ist es außerdem wichtig, dass die Histon-Transkripte zuvor aktiv translatiert worden (Graves *et al.*, 1987; Kaygun & Marzluff, 2005a). So führt die Expression einer SLBP-Mutante, die nicht zur Translationsinitiation beiträgt und somit die Histon-Translation unterdrückt, zu einer Stabilisierung von Histon-mRNAs (Kaygun & Marzluff, 2005a).

Zielstellung

Im Gegensatz zu der Bedeutung von PARN während der Entwicklung ist die Funktion des Enzyms in somatischen Zellen lediglich für die Reifung der H/ACA-box-snoRNAs geklärt. Da PARN keinen Einfluss auf die Verteilung der Gesamt-Poly(A)-Schwanzlängen hat, besitzt die Nuklease wahrscheinlich keine Funktion im generellen mRNA-Abbau. PARN könnte jedoch *in vivo* spezifische RNAs deadenylieren.

Aus diesem Grund wurden erste Microarray-Analysen von H. Berndt (Promotion H. Berndt, 2011) durchgeführt, um potenzielle PARN-Substrate zu identifizieren. Die PARN-Proteinmenge wurde in RNA-Interferenz-Versuchen reduziert und RNA aus diesen Zellen und Kontroll-Zellen analysiert. Unter den identifizierten potenziellen PARN-Substraten befanden sich u.a. polyadenylierte Histon-mRNAs.

Ziel dieser Arbeit ist es, zum einen die polyadenylierten Histon-mRNAs als putative PARN-Substrate zu verifizieren und zum anderen diese näher zu charakterisieren.

Dazu ist es notwendig, neben der qRT-PCR eine weitere Methode zu etablieren, die die Analyse von polyadenylierten Histon-mRNAs ermöglicht.

Bei der Charakterisierung polyadenylierter Histon-mRNAs soll die Lage und die Länge des Poly(A)-Schwanzes näher untersucht werden. Mit der Verwendung von Histon-Reportern soll außerdem der Einfluss der kanonischen Polyadenylierungsmaschinerie auf die Polyadenylierung der Histon-mRNAs analysiert werden.

Darüber hinaus ist die Gleichgewichtsmenge der polyadenylierten Histon-mRNAs im Vergleich zu korrekt prozessierten Histon-mRNAs während des Zellzyklus und nach Hydroxyharnstoff-Applikation zu untersuchen, um Hinweise auf den Abbau-Mechanismus polyadenylierter Histon-mRNAs zu erhalten. Es ist außerdem von Interesse, ob der PARN-*knockdown* zu einer veränderten Zellzyklusverteilung beiträgt, wie es die *knockdown*-Analysen von zahlreichen Prozessierungsfaktoren bereits gezeigt haben. Die Beteiligung von PARN am Abbau oder an der Prozessierung von polyadenylierten Histon-mRNAs soll außerdem diskutiert werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Verwendete Kits

Tabelle 1: Verwendete Kits

Kit	Hersteller
Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosciences
High Pure PCR Product Purification Kit	Roche Diagnostics
Plasmid Mini Kit	Peqlab
RNeasy MinElute Cleanup Kit	QIAGEN
QIAGEN Plasmid Midi Kit	QIAGEN

1.2 Verwendete Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von Invitrogen erworben und sind unter dem entsprechenden Abschnitt im Methodenteil aufgeführt.

1.3 Verwendete siRNAs

Die unten angegebenen siRNAs wurden von der Firma Eurofins MWG Operon erworben.

Tabelle 2: Verwendete siRNAs

siRNA-Name	Sequenz (5'→3')
PARN1	AGG CAU UCA UGU UGA GAC U dT dT
PARN2	UCA UCU CCA UGG CCA AUU A dT dT
PARN3	GGU UAA CUU CUG UUC UUA UGC dT dT
GFP	CAA GCU GAC CCU GAA GUU C dT dT
Kontrolle	UGG GCG UCG UGG AGG CUU U dT dT

Die Sequenz für die PARN1-siRNA und für die Kontroll-siRNA sind identisch mit der in Berndt *et al.*, 2012 angegebenen PARN1-siRNA- bzw. der Kontroll-siRNA-Sequenz. Die hier als PARN2 aufgeführte siRNA entspricht der Sequenz von PARN3 aus Berndt *et al.*, 2012.

1.4 Verwendete Plasmide

Tabelle 3: Verwendete Plasmide

Plasmid	Quelle
pBlueScript-Sk ⁺	Stratagene
pBlueScript-Sk ⁺ -H2AA-RPA	diese Arbeit
pBlueScript-Sk ⁺ -H1C-RPA	diese Arbeit
pBR322	NEB
pTRE2hyg	Clontech
pTRE2hyg-H2AA-HDE _{mut} -AUA _{mut} -dse	diese Arbeit
pTRE2hyg-H2AA-HDE _{mut} -AUA _{wt} -dse ⁻	diese Arbeit
pTRE2hyg-H2AA-HDE _{mut} -AUA _{wt} -dse	diese Arbeit
pTRE2hyg-H2AA-HDE _{wt} -AUA _{mut} -dse	diese Arbeit
pTRE2hyg-H2AA-HDE _{wt} -AUA _{wt} -dse ⁻	diese Arbeit
pTRE2hyg-H2AA-HDE _{wt} -AUA _{wt} -dse	diese Arbeit

Die Plasmide, bei denen der Histon-Reporter eine Deletion im GU-reichen Element enthält, sind mit dse⁻ gekennzeichnet. Mutationen im HDE oder dem Polyadenylierungssignal sind durch die Bezeichnung HDE_{mut} oder AUA_{mut} hervorgehoben.

1.5 Verwendeter Bakterienstamm

Tabelle 4: Verwendeter Bakterienstamm

Bakterienstamm	Beschreibung
E.coli-XL1-blue	recA1 endA1 gyrA 96 thi-1 hsdR 17 supE44 relA1 lac[F' pro AB lacI ^q ΔM15Tn10(Tet ^r)]

1.6 Verwendete Zelllinien

Tabelle 5: Verwendete Zelllinien (I)

Zelllinie	Beschreibung
HeLa	ATCC number CCL-2™ menschliche Epithelzellen eines Zervixkarzinoms (SCHERER <i>et al.</i> , 1953)
U2OS	ATCC number HTB-96 humane Osteosarcoma-Zelllinie, (Heldin <i>et al.</i> , 1986)
Uta6 (U2OS-Tet-Off)	humane Osteosarcoma-Zelllinie mit stabil integriertem Tetracyclin-Transaktivator (Christoph Englert, Fritz-Lipmann-Institute (FLI), Jena) (Englert <i>et al.</i> , 1995)

Das Zellmaterial für die Extraktanalysen wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt.

Tabelle 6: Verwendete Zelllinien (II)

Zelllinie	Beschreibung	Arbeitsgruppe
Dendritische Zellen	humane dendritische Zellen	AG Behrens
HaCaT-Zellen	humane epitheliale Keratinocyten, (Boukamp <i>et al.</i> , 1988)	AG Hatzfeld
HEK-293T-Zellen	humane embryonale Nierenzellen, (Robinson & Goochee, 1991)	AG Wahle
Huh7-Zellen	humane Hepatozyten-Zelllinie, Prof. Dr. R. Bartenschlager, Universität Heidelberg, (Nakabayashi <i>et al.</i> , 1982)	AG Behrens
MCF7-Zellen	humane Brustkrebszelllinie	AG Hatzfeld

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

Enzymatische Reaktionen, wie die Dephosphorylierung mit Alkalischer Phosphatase, die Phosphorylierung mit T4-PNK, die Ligation mit T4-DNA-Ligase sowie Reaktionen mit Restriktionsendonukleasen (NEB) wurden nach den Angaben des Herstellers und mit den entsprechenden Puffern durchgeführt.

Für PCR-Ansätze und die *in vitro*-Mutagenese wurde die Pfu-Polymerase unter Einsatz der entsprechenden Puffer verwendet. In Tabelle 7 sind alle verwendeten Enzyme angegeben. Weitere Details zur Durchführung sind an den entsprechenden Stellen im Methodenteil vermerkt.

Tabelle 7: Verwendete Enzyme

Enzym	Verwendung	Hersteller
Alkalische Phosphatase	Dephosphorylierungsreaktion	Roche Diagnostics
DNase I (RNase ^{free})	Eliminierung von DNA-Kontaminationen aus RNA-Präparationen	Roche Diagnostics
M MLV-RNaseH ⁻ -Reverse Transkriptase	Synthese von cDNA aus RNA	Promega
Pfu-Polymerase	Polymerase-Kettenreaktion (PCR), <i>in vitro</i> -Mutagenese	Fermentas
Proteinase K	<i>ribonuclease protection assay</i> , Isolierung von DNA	Merck
Ribonuklease T1	<i>ribonuclease protection assay</i>	Sigma Aldrich

Enzym	Verwendung	Hersteller
RNAseA	<i>ribonuclease protection assay</i>	Sigma Aldrich
RNAseH	Verdau doppelsträngiger DNA-RNA-Hybride	Promega
T4-DNA-Ligase	Ligationsreaktion	NEB
T4-PNK	Phosphorylierungsreaktion	NEB
T7-RNA-Polymerase	Synthese von RNA	Stratagene

Sowohl für die Herstellung kleiner und großer Plasmidmengen als auch für die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Kits verwendet. Darüber hinaus erfolgten Phenol-Chloroform-Extraktionsschritte, die Ethanolfällung oder die Bestimmung der DNA- bzw. RNA-Konzentration aus wässrigen Lösungen nach den Protokollen des Methodenhandbuches von J. Sambrock, Russel, 2001.

2.2 Klonierung der Histon-Reporter

Zur Erzeugung der Histon-Reporter wurde eine Klonierung durchgeführt, bei der in 4 Schritten der komplette Histon-Reporter generiert wurde (siehe Abbildung 2).

Bei jedem Klonierungsschritt wurde ein DNA-Fragment über die EcoRV-Schnittstelle der *multiple cloning site* (MCS) in den pTRE2hyg-Vektor inseriert, wobei die EcoRV-Restriktionsschnittstelle erneut entstand und für den nächsten Klonierungsschritt verwendet werden konnte.

Die 4 zu klonierenden DNA-Fragmente waren das dse-Fragment, das SSHP-Fragment, das flag-Fragment und das Hist2H2AA-stop⁻-Fragment. Die Erläuterung zu den einzelnen Fragmenten ist der unten aufgeführten Tabelle 8 zu entnehmen.

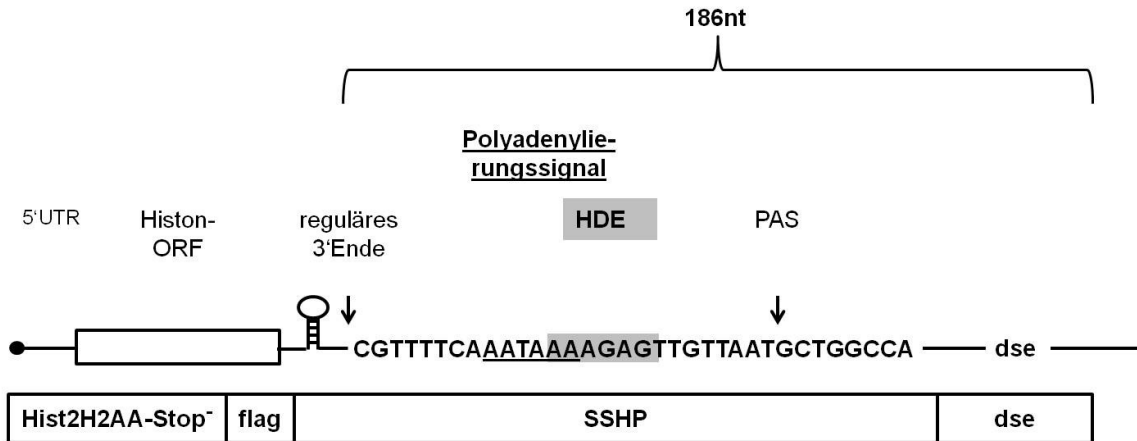


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Histon-Reporters

Dargestellt ist ein Schema des Hist2H2AA-Gens (oben) und des klonierten Histon-Reporters (unten). Das Hist2H2AA-Gen besteht aus dem 5'-UTR, dem offenen Histon-lese-ORF, dem *stem-loop*-Element, dem Polyadenylierungssignal (unterstrichen), welches mit dem HDE (grau unterlegt) überlappt und dem GU-reichen Element (dse). Die Lage des regulären Histon-3'-Endes und die Polyadenylierungsstelle (PAS) sind durch die Pfeile gekennzeichnet. Der Histon-Reporter enthält zusätzlich eine flag-Sequenz. Insgesamt enthält der Reporter 186 Nucleotide genomische Sequenz, die sich 3' des regulären Histon-3'-Endes befindet. Die Beschreibung der einzelnen DNA-Fragmente ist der Tabelle 8 zu entnehmen.

Tabelle 8: Beschreibung der klonierten DNA-Fragmente

Fragment	Beschreibung
dse	GU-reiches Element des Hist2H2AA-Gens
Flag	DNA-Sequenz für Flag-Affinitätstag
Hist2H2AA-stop ⁻	Hist2H2AA-5'-UTR + Hist2H2AA-ORF (ohne Stop-Codon)
SSHP	Stop-Codon + <i>stem-loop</i> + HDE + Polyadenylierungssignal des Hist2H2AA-Gens

Diese Fragmente, mit Ausnahme des flag-Fragmentes, wurden in einer PCR unter Verwendung der entsprechenden Oligonukleotide nach Herstellerangaben erzeugt. Nach der gelelektrophoretischen Trennung wurden die PCR-Produkte mit dem entsprechenden Kit aus dem Gel gereinigt, mit T4-PNK phosphoryliert und in den EcoRV-geschnittenen und dephosphorylierten pTRE2hyg-Vektor oder einen Zwischenvektor ligiert. Das flag-Fragment hingegen wurde durch Hybridisierung der entsprechenden Oligonukleotide gebildet. Dabei wurden 100 pmol der komplementären flag-Oligonukleotide nach einer 10 min. Inkubation bei 95°C

langsam auf Raumtemperatur abgekühlt und anschließend, in Analogie zu den übrigen Fragmenten, phosphoryliert und ligiert.

Als *template* für die PCR wurde genomische DNA zur Erzeugung des SSHP-Fragmentes und des dse-Fragmentes oder cDNA für die Erzeugung des Hist2H2AA-Stop-Fragmentes verwendet. Die cDNA wurde mit Hilfe der Reversen Transkriptase unter Anwesenheit eines *Random-Hexamer-Primers* aus U2OS-RNA synthetisiert.

Für die Generierung der Histon-Reporter mit der Mutation im HDE oder dem Polyadenylierungssignal wurden zielgerichtete Mutagenesereaktionen unter Verwendung spezifischer Mutageneseoligonukleotide durchgeführt. Dem Histon-Reporter mit der dse-Deletion fehlt das dse-Fragment. Alle erzeugten Plasmide wurden mittels Sequenzierung überprüft.

Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
dse_rev	GAAGAGCCAAGGCAGTTAC
EcoRV_dse_for	ATCGGGACGGGACGGGACGGGACGGGACGGGGCGGGGCGG
EcoRV_flag_for	ATCGATTACAAGGATGACGACGATAAG
EcoRV_SSHP_for_KI	ATCTGAGGCTGACGTCCGG
flag_rev	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAATCGAT
H2AA_for_KI	CGACTTTCCCGATCGCC
H2AA_rev-STOP_kl	CTTGCCCTTTGCCTTG TG
SSHP_rev_KI	GTCCCGTCAGCTCCAG

2.3 Die *in vitro*-Mutagenese zur Erzeugung von Histon-Reportern

In einem 50µl-Reaktionsansatz wurden 50 ng Plasmid-DNA, 30 pmol der zwei Mutageneseoligonukleotide, 2,5 Units Pfu-Polymerase mit dem entsprechenden Vol. Puffer und der entsprechenden dNTP-Menge versetzt. Nach 2 min. Denaturierung bei 95°C wurden 20 Zyklen (jeweils bestehend aus 1 min. Denaturierung bei 95°C, einer 30 sek. langen Hybridisierung bei 57°C und einer 7 min. Elongation bei 72°C) durchgeführt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 20 Units DpnI, um die nichtmutagenisierte Plasmid-DNA in einer einstündigen Inkubation bei 37°C zu fragmentieren. Von diesem Ansatz wurden 2 µl in *E.coli*-Zellen transformiert und diese ausplattiert. Aus einzelnen Klonen wurde danach Plasmid-DNA isoliert.

Tabelle 10: Oligonukleotide für die *in vitro*-Mutagenese

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
HDEmut_for	CGTTTTCAAATAAAUUCUCTTAATGCTGGCCA
HDEmut_rev	TGGCCAGCATTAAGAGAATTTTATTTGAAAACG
polyA_mut_for	CAGAGCCACCCACGTTTTCAACGCAAACCTCTGTTAATGCTGGCCACT CTCAG
polyA_mut_rev	CTGAGAGTGGCCAGCATTAACAAGAGTTTGCCTTGAAAACGTGGGTGG CTCTG

2.4 Mikrobiologische Methoden

Standardmethoden aus der mikrobiologischen Praxis, wie die Sterilisierung von Gegenständen und Lösungen wurden den Laborhandbüchern entnommen (Sambrock, Russel, 2001).

2.4.1 Herstellung chemokompetenter Zellen

Für die Herstellung chemokompetenter Zellen wurden *E.coli*-Zellen einer 100 ml Kultur, die sich in der exponentiellen Wachstumsphase befanden, bei einer optischen Dichte von 0,45 auf 4°C abgekühlt, 5 min. bei 1500 g zentrifugiert, in 30 ml TFB1-Puffer resuspendiert und für 10 min. erneut bei 4°C inkubiert. Nach einem 5 min. Zentrifugationsschritt bei 4°C wurden die Zellen in 5 ml TFB2-Puffer resuspendiert und 50 µl Aliquots hergestellt, die bei -80°C gelagert wurden.

TFB1:

30 mM KAcetat, 100 mM KCl, 10 mM CaCl₂, 50 mM MnCl₂, 15% Glycerin

TFB2:

10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM KCl, 15% Glycerin

2.5 Biochemische Methoden

2.5.1 Isolierung von DNA aus Säugetierzellen

Für die Präparation von DNA aus Säugetierzellen wurden U2OS-Zellen einer 90% konfluenten 10 cm-Schale trypsiniert, anschließend in DMEM aufgenommen und bei 3800 g für 5 min. bei 4°C zentrifugiert. Nach einem einmaligen Waschschrift mit PBS wurde das Zellpellet in 200 µl hypotonischem Puffer durch mehrmaliges Pipettieren resuspendiert und für 30 min. auf Eis inkubiert, anschließend bei 4°C für 5 min. und 310 g zentrifugiert, wodurch der zytoplasmatische Extrakt von den Zellkernen

separiert wurde. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl Resuspensionspuffer resuspendiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 300 g für 5 min. und 4°C wurde der Überstand verworfen und die Kerne in 600 µl SDS-Extraktionspuffer lysiert. Im Anschluss daran folgte ein 20 min. Proteinase K-Verdau mit 60 µg Proteinase K bei 42°C. Daraufhin wurde ein Phenol-Chloroform-Extraktionsschritt durchgeführt und im Anschluss daran eine Natriumacetat-Konzentration von 0,3 M eingestellt. Nach der Zentrifugation bei 400 g wurde die DNA in der wässrigen Phase durch Ethanol-Zugabe gefällt.

hypotonischer Puffer:

20 mM HEPES (pH 7,6), 20% Glycerin, 10 mM NaCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,2 mM EDTA, 0,1% Triton X-100, 25 mM NaF, 25 mM β-Glycerophosphat, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin

Resuspensionspuffer:

20 mM Tris (pH 7,2), 1 mM EDTA, 10 mM NaCl, 0,1% Triton X-100

SDS-Extraktionspuffer:

20 mM Tris (pH 7,2), 20 mM EDTA, 0,5% SDS

2.5.2 Isolierung von RNA nach der TRIZOL-Methode

Für die RNA-Präparation wurde die TRIZOL-Methode (Chomczynski & Sacchi, 2006) angewendet. Unabhängig von der Konfluenz einer 10-cm-Kultur-Schale mit U2OS- oder HeLa-Zellen wurden die Zellen nach der Entfernung des Mediums mit 1 ml TRIZOL von der Schale gelöst und mit dem Vortexer gemischt. 300 µl Chloroform wurden dieser Lösung zugesetzt und vermischt, ehe ein Zentrifugationsschritt bei 13000 g für 5 min. bei Raumtemperatur folgte, um die Phasen voneinander zu trennen. Die RNA in der wässrigen Phase wurde erneut mit Chloroform extrahiert und mit 0,7 Vol. Isopropanol ü.N. bei -20°C gefällt. Nach einer 30 min. Zentrifugation wurde das Präzipitat mit 80%iger Ethanol-Lösung gewaschen und anschließend in DEPC-Wasser aufgenommen, bevor die photometrische Bestimmung der Konzentration erfolgte.

TRIZOL:

0,8 M Guanidiniumthiocyanat, 0,4 M Ammoniumthiocyanat, 0,1 M NaAcetat (pH 5), 5% Glycerin, 48% Phenol für RNA-Isolierung

2.5.3 Poly(A)⁺-Präparation

Die Poly(A)⁺-Präparation erfolgte nach der im Laborhandbuch aufgeführten Methode (Sambrook, Russel, 2001). Für die Poly(A)⁺-Präparation wurde 0,5 bis 0,75 mg RNA aus U2OS-Zellen verwendet, bei denen ein PARN- bzw. ein Kontroll-*knockdown* durchgeführt wurde.

Die RNA wurde zunächst mit TES-Puffer auf 600 µl aufgefüllt und 10 min. bei 65°C inkubiert, bevor sie auf 0°C abgekühlt und mit 0,1 Vol. 5 M NaCl-Lösung versetzt wurde. 50 mg Oligo(dT)-Cellulose, in 600 µl Waschpuffer resuspendiert, wurde zu dieser RNA-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur für 15 min. unter Schwenken inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation bei 800 g wurde der Überstand abgenommen (Durchfluss, Poly(A)⁻-Fraktion). Im nächsten Schritt wurde die RNA-Oligo(dT)-Cellulose mit Waschpuffer in drei Wiederholungen gewaschen. Die Oligo(dT)-Cellulose wurde anschließend bei 55°C mit DEPC-Wasser inkubiert und die Poly(A)⁺-RNA eluiert. Dieser Elutionsschritt wurde noch zweimalig wiederholt. Die RNA in den einzelnen Fraktionen wurde mit 0,2 Vol. Ammoniumacetat (10 M), 0,7 Vol. Isopropanol und 20 µg Glykogen gefällt, anschließend mit 80%igem Ethanol gewaschen und danach in DEPC-Wasser aufgenommen und für die *Northern-blot*-Analyse oder die RPA-Analyse verwendet.

TES-Puffer:

10 mM Tris (pH 7,2), 1 mM EDTA, 0,1%SDS

Waschpuffer:

TES-Puffer mit 0,5 M NaCl

2.5.4 RNaseH/dT-Verdau

500 ng der Poly(A)⁺-RNA oder 2 µg Gesamt-RNA wurden zunächst mit 100 pmol Oligo(dT)₁₂ und DEPC-Wasser versetzt (Gesamt-Vol. 5 µl), bei 65°C für 5 min. denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Danach wurden der 5x MLV-RT-Puffer und 1 Unit RNaseH hinzugegeben. Die DNA-RNA-Hybride wurden in diesem Reaktionsansatz für 10 min. bei Raumtemperatur verdaut, bevor die Reaktion mit Formamid-Ladepuffer abgestoppt und nach Denaturierung bei 90°C auf ein Polyacrylamid-Harnstoffgel aufgetragen wurde.

2.5.5 DNaseI-Verdau

Zur Eliminierung von DNA-Kontaminationen aus RNA-Präparationen wurde ein DNaseI-Verdau vor der Reversen Transkriptionsreaktion durchgeführt.

Dafür wurden 30 Units DNaseI mit 10 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 100 µl mit 10 µl 10x Puffer versetzt und für 30 min. bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 3 mM EDTA hinzugefügt und die RNA anschließend mit einer Phenol-Chloroform-Lösung extrahiert. Nach einer 15 min. Zentrifugation bei 18000 g und 4°C wurde die wässrige Phase erneut mit Chloroform extrahiert und die RNA im Überstand mit 0,2 Vol. Ammoniumacetat und 2,5 Vol. Ethanol präzipitiert. Das Präzipitat wurde mit 80% Ethanol gewaschen und in 10 µl DEPC-Wasser resuspendiert. Zur Überprüfung möglicher RNA-Degradation wurde diese RNA in einem 1%igen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und untersucht. Für weitere Analysen wurden nur RNA-Präparationen verwendet, für die keine Degradation der rRNA im Gel beobachtet werden konnte.

2.5.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

2.5.6.1 Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde in Abhängigkeit von der DNA-Fragmentgröße in einem 0,5%igen bis 2%igen Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Aufkochen der Agarose in 0,5xTBE-Puffer wurde diesem Ansatz zusätzlich 0,5 µg/ml Ethidiumbromid zugesetzt. Die DNA-Proben wurden vor der Auftrennung mit 1/10 Vol. DNA-Ladepuffer (10x) versetzt. Als Laufpuffer wurde 0,5 x TBE verwendet. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte am UV-Tisch.

1x TBE-Puffer:

89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA

10x DNA-Ladepuffer:

30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, gelöst in 0,5 xTBE-Puffer

2.5.6.2 Denaturierende Agarose-Gelelektrophorese

Für die RNA-Qualitätskontrolle wurde RNA in einem denaturierenden 1%igen Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt und analysiert. Dazu wurde die Agarose in einem entsprechenden Vol. Wasser aufgekocht, nach Abkühlen mit 1/10 Vol. MOPS-Puffer (10x) gemischt und mit 5% (v/v) Formaldehyd versetzt. Die RNA-Proben wurden nach der Zugabe von 2x-RNA-Ladepuffer bei 65°C für 10 min. denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde MOPS-Puffer verwendet.

10x MOPS-Puffer:

0,4 M MOPS, 0,1 M NaAcetat (pH 7,2), 10 mM EDTA

RNA-Ladepuffer:

1x MOPS-Puffer, 18,5% Formaldehyd, 50% Formamid, 4% Glycerin, 25 ng/µl Ethidiumbromid, Bromphenolblau

2.5.6.3 Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In Abhängigkeit von der Größe wurde RNA entweder in einem 5%igen oder 12%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Dazu wurde eine 20%ige Polyacrylamidlösung (Acrylamid/ bis-Acrylamid: 19:1), die 8,3 M Harnstoff in 1xTBE enthielt, mit einer 8,3 M Harnstofflösung (in TBE) im entsprechenden Verhältnis gemischt. Die Polymerisation einer 25 ml Lösung wurde durch die Zugabe von 160 µl APS (10% [w/v]) und 30 µl TEMED gestartet. Als Laufpuffer wurde 1xTBE-Lösung verwendet. Vor der Beladung des Gels mit den RNA-Proben wurde die RNA mit RNA-Ladepuffer versetzt und für 3 min. bei 95°C denaturiert. Die Auftrennung erfolgte nach einem 30 min. Vorlauf für ein Gel mit einer Größe von 20 x 20 x 0,1 cm für 1-2 Stunden bei 15-20 Watt.

Ladepuffer:

95% deionisiertes Formamid, 0,025% Bromphenolblau, 0,025% Xylencyanol, 5mM EDTA

2.5.7 Reverse Transkription (RT)

Für die RNA-Mengenanalyse wurde RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

In einem Reaktionsvolumen von 17,5 µl wurden 100 pmol (dT)₁₂-Primer bzw. 100 pmol *Random-Hexamer-Primer* (R6) mit 2 µg RNA und DEPC-Wasser für 5 min. bei 70°C inkubiert und anschließend für 5 min. auf Eis abgekühlt. Diesem Ansatz wurde 7,5 µl RT-Mix, bestehend aus 25 Units Reverser Trankriptase, 10 Units Ribolock, 0,5 µM dNTPs und 5 µl 5x MLV-Puffer, zugesetzt. Dieser Ansatz wurde für 1 Stunde bei 42°C inkubiert. Die Reverse Transkriptase wurde durch eine nachfolgende 15 min. Inkubation bei 75°C inaktiviert. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

2.5.8 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Nachdem die RNA in cDNA umgeschrieben wurde (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.5.7), konnten die cDNA-Mengen mittels qPCR quantifiziert werden. In dieser Arbeit wird der Begriff qRT-PCR verwendet, um die Methode der Reversen Transkription mit nachfolgender qPCR zusammenzufassen. Bei der qPCR handelt es sich um eine spezielle PCR-Variante, bei der die Menge einer bestimmten cDNA über die Menge eines gebildeten PCR-Produktes berechnet wird. Fluoreszenzfarbstoffe interkalieren während dieser PCR in doppelsträngige DNA-Bereiche. Die gemessene Fluoreszenzintensität ist aus diesem Grund zu der gebildeten PCR-Produktmenge und somit zu dem DNA-Gehalt einer Probe proportional. Für die hier angewendete qPCR wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYBR®Green verwendet. Die qPCR-Primer überspannen in der Regel Exon-Exon-Grenzen, wodurch die Amplifikation genomischer DNA-Kontaminationen verhindert wird. Histon-mRNAs besitzen jedoch keine Introns. Um DNA-Kontaminationen vorzubeugen, wurde aus diesem Grund vor der Reversen Transkription stets ein DNaseI-Verdau durchgeführt. Die Überprüfung auf DNA-Kontaminationen erfolgte durch die Vermessung einer RT⁻-Reaktion, in der die Reverse Transkriptase nicht zugegeben wurde.

Eine qPCR-Reaktion besteht aus 1 µl cDNA, 4 µl Primer-Mix (Endkonzentration 0,33 µM) und 5 µl qPCR-Mastermix (Roche Diagnostics). Das qPCR-Programm ist unten angegeben:

qPCR-Programm: 95°C 2 min.
 95°C 15 sek. }
 60°C 25 sek. } 50 Zyklen
 72°C 25 sek. }

Für die Auswertung wurden die sog. C_t -Werte verwendet. Bei dem C_t -Wert handelt es sich um den sog. *threshold cycle*, bei dem das Fluoreszenzsignal die maximale Anstiegsänderung aufweist. Niedrige C_t -Werte geben eine hohe RNA-Menge an. Die $\Delta\Delta C_t$ -Methode wurde für die Quantifizierung relativer RNA-Mengen verwendet (Livak & Schmittgen, 2001).

Folgende Berechnung liegt der RNA-Mengenänderung (relative RNA-Menge) zu Grunde:

$$\text{rel. RNA-Menge} = 2^{[-(Ct(Xp)-Ct(Xc))-(Ct(Np)-Ct(Nc))]}$$

N	Normalisierungsgen (PPIA, RPLPO)
X	Zielgen
c	Kontroll- <i>knockdown</i>
p	PARN- <i>knockdown</i>

Es wurde zur Qualitätskontrolle eine Schmelzkurvenanalyse der qPCR-Produkte durchgeführt und die Größe der gebildeten PCR-Produkte in einem 2%igen Agarosegel überprüft. Die Identität der PCR-Produkte wurde einmalig mittels Sequenzierung kontrolliert.

Für die Berechnung der relativen RNA-Menge für das Synchronisationsexperiment:

$$\text{rel. RNA-Menge} = 2^{[-(Ct(X(Zeitx))-Ct(X(Zeit0)))-(Ct(N(Zeitx))-Ct(N(Zeit0)))]}$$

Zeit X	Zeit nach Entfernung von Thymidin (<i>release</i>): 3, 6, 9 und 12 Stunden
Zeit 0	Zeitpunkt 0: direkt nach Entfernung von Thymidin

Tabelle 11: Primer für die qPCR

Primer	Sequenz (5'→3')
Cyclophilin A_as1	CTGCTGTCTTTGGGACCTTGT
Cyclophilin A_s1	GTCAACCCACCGTGTCTT
FLASH_for	ACCAGAGAGTCGGAGGGAGT
FLASH_rev	CCATTGTCATCATCTGCTGC
Hist1H1C_for	CATCGGCGCTTTGCCACT
Hist1H1C_rev	CGCCTTCTTCTTTACAGGG
Hist1H1E_for	AGCAGCCAAGCCAAAAAAGG
Hist1H1E_rev	AAGCAGTTGGCCAAAGGAAC
Hist1H2AC_for	CTCCGTAAGGCAACTACGC
Hist1H2AC_rev	TGCGAGTCTTCTTGTGTGCG
HIST1H2AC Spl 505 for	CCCCTACCGTTTCAAAGGA
HIST1H2AC Spl 632 rev	ATTGGTAAGTTTGGCAGGCA
Hist1H2BC_for	ATTACAACAAGCGCTCGACC
Hist1H2BC_polyA_pr3_rev	AAGCTGGTGGCGAAATTATG
Hist1H2BC_rev	GGTGTTAAGACGCTTACTTG
Hist1H3D_for	CGCATCATCCCCGAC
Hist1H3D_rev	GGATGTTGGGCAGAACAC
Hist1H4A_for	TGTCACCTATACGGAGCAGC
Hist1H4A_rev	TGGTTCAGAAATGCAAGCTG
Hist1H4J_for	TGTTCTTGAGAACGTGATC
Hist1H4J_rev	ATTGATAGAAAGGGACGCTC
Hist2H2AA_for	GCTGGGCAAAGTCACCATC
HIST2H2AA_polyA_pr3_for	GACGGAGAGTCACCACAAGG
HIST2H2AA_polyA_pr3_rev	CATTAACAACCTCTTTTATTTGAAAACG
Hist2H2AA_rev	CCCCTTGGGCCGACG
Hist2H2AC_for	CAACGACGAGGAACTGAACA
Hist2H2AC_rev	GTGGCTTTCGGTTTTCTTTG
Hist2H2BE 1_for	CACTACAACAAGCGCTCCAC
Hist2H2BE 1_rev	CCGGCAGGGACTCACTTG
Hist2H3A_for	TCCAGAGCTCGGCCGT
Hist2H3A_rev	TCCGGCCGAACCGCCA
PARN_for	TCAGCATTTGTTTCCCTTAGC
PARN_rev	TCCTTCCAGCTATCTTCAGTCC
RPLP0_as	CCATCAGCACACAGCCTTC
RPLP0_s	GGCGACCTGGAAGTCCAACCT

2.5.9 DNA-Sequenzierung

Es wurden die generierten Histon-Reporter-Plasmide, die klonierten PCR-Produkte der polyadenylierten Histon-mRNAs und die qRT-PCR-Produkte nach der Didesoxymethode (Sanger *et al.*, 1977) sequenziert. Dafür wurde das Sequenzier-Kit nach Herstellerangaben verwendet, wobei der Reaktionsansatz 200 ng Plasmid-DNA oder 5 ng PCR-Produkt und 5 pmol des entsprechenden Primers beinhaltete. Die

Bedingungen für die Sequenzierreaktion sind unten aufgeführt. Nach der Sequenzierreaktion wurde der 10 µl-Ansatz auf 20 µl mit Wasser aufgefüllt und Primer und dNTPs durch zweimalige Zentrifugation bei 2000 g über Sephadex-G50-Säulchen abgetrennt. 5 µl des aufgereinigten Reaktionsansatzes wurden mit 20 µl HIDI-Puffer versetzt und für 3 min. bei 95°C denaturiert. Die Analyse der DNA-Fragmente erfolgte mit dem ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems). Die Sequenzierung der cDNA der gespleißten Histon-mRNA erfolgte kommerziell über die MWG-Biotech AG.

Sequenzierreaktion:	Denaturierung:	96°C, 30 sek.,
	Hybridisierung und Elongation:	53°C, 5 min.
		25 Zyklen

2.5.10 Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs

Für die Sequenzierung der missprozessierten und polyadenylierten Histon-mRNAs wurde RNA aus PARN-*knockdown*-Zellen unter Verwendung eines oligo-(dT)₁₆-Adapter-Primers in cDNA umgeschrieben. Diese cDNA wurde in einer PCR eingesetzt, in der ein histonspezifischer Primer und der Adapter-Primer verwendet wurden. Nachfolgend wurde eine *nested* PCR durchgeführt, bei der ein zweiter histonspezifischer Primer und der Adapter-Primer verwendet wurden. Für die Hist1H4J-RNA wurde keine *nested* PCR durchgeführt, sondern das PCR-Produkt der ersten PCR sequenziert. Die PCR-Produkte wurden aus einem 2%igen Agarosegel eluiert und am 5'-Ende mittels T4-PNK phosphoryliert, bevor sie in den EcoRV-geschnittenen und dephosphorylierten pBluescriptSK(+)-Vektor ligiert und transformiert wurden. Weiße Kolonien wurden in einer Kolonie-PCR auf das Vorhandensein einer Histonsequenz getestet. Die Plasmide einzelner Klone wurden daraufhin nach der Didesoxymethode nach Sanger sequenziert.

Tabelle 12: Primer für die Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs

Primer	Sequenz (5'→3')
Adapter-Primer	GACTCGAGTCGACATCGAT
Hist1H1C_PCR2	GGCGGCGCAACTCCG
Hist1H1C_PCR1	CATCGGCGCTTTGCCAC
Hist1H2AD_PCR2	GACTCCAGTTCCTGTGG
Hist1H2AD_PCR1	GCAAGCAAGGCGGAAAGG
Hist1H3D_PCR2	TGCTGATTCGCAACTGCCA
Hist1H3D_PCR1	CAAGAAGACTGAGAGTCACC

Primer	Sequenz (5'→3')
Hist1H4J_for	TGTTCTGGAGAACGTGATC
Hist2H2AA_PCR2	TGGGCCCAGCCCGG
Hist2H2AA_PCR1	CAAGGCAAAGGGCAAGT
oligo(dT)-Adapter	GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

Weitere Primer, die für die Sequenzanalyse der polyadenylierten Histon-mRNAs verwendet wurden, sind der Masterarbeit von L. Anders (Masterarbeit, L. Anders 2014) zu entnehmen.

2.5.11 Präparation von Gesamtzellextrakt und Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Herstellung eines Gesamtzellextraktes wurden alle Zentrifugationsschritte bei 4°C durchgeführt und die Proben stets auf Eis gelagert. U2OS-Zellen einer 80%-90% konfluenten 10 cm-Kulturschale wurden mit 1 ml Trypsin/EDTA geerntet und in DMEM aufgenommen, bei 3800 g zentrifugiert, mit 1x PBS gewaschen und erneut für 5 min. zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 30-70 µl RIPA-Puffer für 15 min. aufgeschlossen und anschließend für 10 min. bei 20800 g zentrifugiert. Der Überstand wurde als Zellextrakt abgenommen und einer Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford unterzogen.

RIPA-Puffer:

50 mM Tris (pH 7,2-7,6), 200 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0,25% Deoxycholat, 1 mM PMSF, 1 mM DTT, 1 µg/ml Leupeptin, 1 µg/ml Aprotinin

2.5.12 Western-blot-Analyse

Proteine wurden nach der gelelektrophoretischen Trennung aus einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose-Membran in einem *semi-dry*-Verfahren transferiert. Dabei wurde die Membran zuvor mit Wasser aktiviert und danach mit Transferpuffer äquilibriert. Die verwendeten Whatman-Papiere wurden auf die gleiche Weise äquilibriert. Der Transfer erfolgte bei 2 mA/cm² für 1 Stunde ehe der Proteintransfer mittels Ponceau-S-Färbung überprüft wurde. Die Membran wurde nach diesem Schritt mehrmals mit TBST-Puffer gewaschen. Unspezifische Bindungen wurden durch die einstündige Inkubation mit 5% Milchpulver-TBST-Lösung blockiert. Die Inkubation mit dem anti-PARN-Antikörper erfolgte in

entsprechender Verdünnung in 5% Milchpulver-TBST-Lösung ü.N. bei 4°C. Die jeweils verwendeten Antikörper-Verdünnungen sind der unten aufgeführten Tabelle 13 zu entnehmen. Alle folgenden Waschschrte wurden stets mit TBST-Puffer bei Raumtemperatur durchgeführt. Vor der Inkubation der Membran mit dem sekundären HRP-gekoppelten anti-Kaninchen-Antikörper wurden 4 Waschschrte für jeweils 15 min. durchgeführt. Nach einstündiger Inkubation wurde die Membran erneut durch viermaliges Waschen für jeweils 10 min. von unspezifischen Bindungen befreit. Unter Verwendung des Super Signal® West Pico Stable substrate-Systems (Thermo Scientific) erfolgte die Detektion der Chemolumineszenz nach Angaben des Herstellers. Daraufhin folgten 3 Waschschrte für 10 min. und im Anschluss die 10 min. Inkubation mit dem anti-Tubulin-Antikörper bevor die Membran erneut für 10 min. in 3 Wiederholungen gewaschen wurde. Danach erfolgte die Inkubation mit dem HRP-gekoppelten anti-Maus-Antikörper für 15 min., ehe nach dreimaliger Waschprozedur die Chemolumineszenz-Detektion erfolgte.

TBST-Puffer:

20 mM Tris (pH 7,5), 0,05% TWEEN 20, 150 mM NaCl

Transferpuffer:

48 mM Tris (pH 9,2), 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS, 20% Methanol

Ponceau S-Lösung:

0,05% PonceauS(w/v), 1% Essigsäure(v/v)

Tabelle 13: Verwendete Antikörper

Aufgeführt sind die verwendeten Antikörper und die verwendeten Verdünnungen, sowie der Wirtsorganismus und der Hersteller

Antikörper	Wirtsorganismus	Hersteller	Verdünnung
anti-Kaninchen-HRP	Schwein	DAKO	1:5000
anti-Maus-HRP	Kaninchen	DAKO	1:10000
anti-PARN-Serum	Kaninchen	Eva Dehlin	1:500
anti-Tubulin	Maus	Sigma-Aldrich	1:20000

2.6 Radioaktive Markierung von Nukleinsäuren

Die radioaktive Markierung von Nukleinsäuren erfolgte entweder durch die 5'-Markierung von Oligonukleotiden oder durch die *in vitro*-Transkription.

2.6.1 Die *in vitro*-Transkription

Die *in vitro*-Transkription wurde verwendet, um RNA-Sonden für den *ribonuclease protection assay* (RPA) oder die *Northern-blot*-Analyse herzustellen.

Als *template* für die Transkription diente ein PCR-Produkt, bei dem während der PCR eine T7-RNA-Polymerase-Promotorsequenz in das PCR-Produkt eingefügt wurde. Für die Generierung des PCR-Produktes wurde entweder genomische DNA für die Erzeugung der RPA-Sonden oder cDNA für die Erzeugung der *Northern-blot*-Sonden verwendet.

Der Reaktionsansatz für die Transkription, bestehend aus jeweils 2 mM ATP, GTP, CTP und 0,005 mM UTP, 75 Units T7-RNA-Polymerase, 1x Roche Transkriptionspuffer, 20 Units Ribolock (Fermentas), 2 mM DTT, 30 µCi [α^{32} P]-UTP und 400-600 ng PCR-Produkt, wurde für 1 bis 2 Stunden bei 37°C inkubiert.

Die *Northern-blot*-Sonden wurden direkt nach der Transkription zur Hybridisierung in den Hybridisierungspuffer gegeben.

Dem Reaktionsansatz für die *in vitro*-Transkription der radioaktiv markierten RPA-Sonde wurde nach erfolgter Transkription 10 Units DNaseI zugefügt, um das DNA-*template* vollständig zu verdauen. Nach einer 30 min. Inkubation bei Raumtemperatur wurde die RNA gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus einem 12%igen Polyacrylamid-Harnstoffgel ausgeschnitten und ü.N. bei Raumtemperatur in Gelelutionspuffer eluiert. Anschließend folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion und die Fällung der RNA mit Hilfe von 10 µg Glykogen und 2,5 Vol. Ethanol. Das Präzipitat wurde nach einem Waschschrift mit 80%igen Ethanol in 20 µl DEPC-Wasser aufgenommen und für den RPA verwendet.

Gelelutionspuffer:

500 mM Ammoniumacetat, 0,1 mM EDTA, 0,5% SDS

Tabelle 14: Oligonukleotide für die Herstellung der *in vitro*-transkribierten *Northern-blot*-Sonden

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
GAPDH_for	CAG GTG GTC TCC TCT GAC
snoRNA63_for	GGA TTC AGA CTA CAA TAT AGC
T7_GAPDH_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GTG TGG CAG GGA C
T7_snoRNA63_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GCA TGT ATG AGA CCA AGC GTC
T7_U7snRNA_rev	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA GAG GGG CTT TCC GGT AAA AAG C

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
U7snRNA_for	CAG TGT TAC AGC TCT TTT AGA ATT TG

Tabelle 15: Oligonukleotide für die Herstellung der RPA-Sonden

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
Hist1H1C_RPA_for	GAAATAGGCGAACGCCTAC
Hist1H3D_RPA_for	CAT TCG TGG GGA GAG GG
Hist2H2AA_RPA_for	CAAGTGGGCCAGCC
T7Hist1H1C_RPA_rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGGGCAGAACAAGAAAAGGCAG
T7Hist1H3D_RPA_rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGGTTTACGGACAGCAACAGT
T7Hist2H2AA_RPA2_rev	TAATACGACTCACTATAGGGAGCCCGTCAGCTCCAGGT

2.6.2 Die 5'-Markierung von Oligonukleotiden

Radioaktiv markierte Oligonukleotide für die *Northern-blot*-Analyse wurden durch Markierung des 5'-Endes mit Hilfe der T4-PNK generiert.

Dafür wurde 5 pmol DNA-Oligonukleotid mit 30-40 µCi [γ^{32}]-ATP, 1 µl 10x PNK-Puffer und 10 Units T4-PNK in einem Reaktionsvolumen von 10 µl für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der komplette Reaktionsansatz dem Hybridisierungspuffer für die *Northern-blot*-Analyse zugesetzt.

Tabelle 16: Oligonukleotide für die *Northern-blot*-Analyse

Oligonukleotid	Sequenz (5'→3')
7SL_sonde	GGA GGT CAC CAT ATT GAT GCC GAA CTT AGT
Hist1H1C_sonde	TGG TGG CTC TGA AAA GAG CCT TTT GGG TTT TAG AAG TAG GCG TTC GCC TAT TTC
Hist2H2AA_3 sonde	AAA GAG CCT TTT GAG TTC ACA GGT GCC CCT TCG AGA CGC GGG CCG

2.6.3 Herstellung radioaktiv markierten Markers

Für die Herstellung des Markers wurde HpaII-verdautes pBR322-Plasmid oder 50bp-Marker (NEB) in einer PNK-Reaktion radioaktiv markiert.

2 µg geschnittene Plasmid-DNA bzw. 1 µg 50 bp-Marker wurden mit 10-20 µCi [γ^{32}]-ATP in einer PNK-Reaktion unter Verwendung der T4-PNK nach Angaben des Herstellers radioaktiv markiert.

2.7 Analyse von Nukleinsäuren mittels radioaktiv markierter Sonden

2.7.1 Ribonuclease protection assay (RPA)

Zirka 10-100 fmol einer *in vitro*-transkribierten RPA-Sonde (10- 100 cps) wurde mit 10-15 µg U2OS-RNA versetzt und anschließend mit 0,1 Vol. Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol gefällt. Danach wurde das Präzipitat mit 80%igen Ethanol gewaschen und in 10 µl 1xHybridisierungspuffer aufgenommen.

Anschließend wurde der Ansatz für 10 min. auf 85°C erhitzt, ehe dieser langsam auf 30°C abgekühlt wurde und die Hybridisierung bei dieser Temperatur ü.N. erfolgte. Diesem Ansatz wurde 300 µl Verdau-Puffer mit 60 Units Ribonuklease T1 und 2 µg RNaseA zugesetzt und es folgte eine Inkubation für 20 min. bei Raumtemperatur. Nachdem 10 µl einer 20%igen SDS-Lösung hinzugefügt wurden, schloss sich ein 20 min. Proteinase K-Verdau mit 100 µg Proteinase K bei Raumtemperatur an. Danach folgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion, bevor die RNA-Fragmente mit 10 µg Glykogen und Ethanol gefällt wurden. Die gefällte RNA wurde direkt in Formamid-Ladepuffer aufgenommen, 5 min. bei 85°C denaturiert und anschließend auf ein 12%iges Polyacrylamid-Harnstoffgel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und die radioaktiven Signale wurden nach einigen Tagen oder nach einer Woche am Typhoon 9200 Variable Mode Imager (Amersham) ausgelesen. Die Auswertung wurde mit der Software ImageQuant Version 5.0 durchgeführt.

5x Hybridisierungspuffer:

2 M NaCl, 200 mM Pipes, 5 mM EDTA

1x Hybridisierungspuffer:

4/5 Vol. Formamid (deionisiert) + 1/5 Vol. 5x Hybridisierungspuffer

Verdaupuffer (frisch hergestellt):

0,3 M NaCl, 10 mM Tris (pH 7,5), 5 mM EDTA

Formamid-Ladepuffer:

80% Formamid, 1 mM EDTA, 0,2 mg/ml Bromphenolblau, 0,2 mg/ml Xylencyanol

2.7.2 Northern-blot-Analyse

RNA wurde aus einem 5%igen oder einem 12%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel im *semi-dry*-Verfahren auf eine Nylon-Membran per Elektrobplot transferiert.

Für diesen Zweck wurde das Gel auf Druckerpapier von der Glasplatte abgelöst und auf 2 Lagen Whatman-Papier gelegt, die zuvor in 0,5 x TBE-Lösung getränkt wurden. Daraufhin wurde die in Wasser aktivierte und in 0,5 x TBE äquilibrierte Nylon-Membran gelegt und von 2 dicken, in 0,5 x TBE getränkte Whatman-Papieren bedeckt. Bei 200 mA fand der RNA-Transfer für 1 Stunde statt. Anschließend erfolgte die kovalente Verknüpfung der RNA mit der Membran mit Hilfe des UV-Crosslinkers von Stratagene. Im Anschluss daran wurde die Nylon-Membran 30 min. mit Church-Puffer bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (42°C) im Hybridisierungssofen prähybridisiert, bevor die Sonde direkt hinzugefügt wurde, um ü.N. mit der Ziel-RNA zu hybridisieren. Für die Hybridisierung mit der GAPDH-Sonde wurde eine Prähybridisierungs- und Hybridisierungstemperatur von 65°C eingestellt. Die Membran wurde in 3 Wiederholungsschritten mit einer Lösung, bestehend aus 2 x SSC-Puffer und 0,1% SDS, für 20 min. bei 42°C (oder 65°C) gewaschen, anschließend in Klarsichtfolie eingeschlagen und mit einem Phosphorimager-Screen bedeckt. Das Auslesen der radioaktiven Signale erfolgte nach 1 bis 7 Tagen Exposition am Typhoon 9200 Variable Mode Imager. Die Auswertung wurde mit der Software ImageQuant Version 5.0 durchgeführt.

2 x SSC-Puffer:

0,3 M NaCl, 0,03 M Natriumcitrat

Church-Puffer (steril filtriert):

1% BSA, 0,5 M NaH₂PO₄ (pH 7,2), 1 mM EDTA, 7% SDS

1x TBE-Puffer:

89 mM Tris-Borat, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA

2.8 Zellkultur

2.8.1 Kultivierung von humanen Zellen

U2OS-Zellen sowie HeLa-Zellen wurden bei 37°C in DMEM (Invitrogen) mit 10% FCS (BIOCHROM AG) bei 5% CO₂-Gehalt und 90% Luftfeuchtigkeit auf 10 cm-Kulturschalen kultiviert. Alle 2 bis 4 Tage wurden die Zellen passagiert, indem das Medium abgesaugt, die Zellen 2 Mal mit PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 1 ml Trypsin/EDTA (Invitrogen) von der Schale gelöst und im Verhältnis 1:5 auf neue 10-cm-Kulturschalen ausgesetzt wurden.

1xPBS:

30 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,5 mM KH_2PO_4 , 8,5 mM Na_2HPO_4 (pH 7,4)

2.8.2 Transfektion von Zellen mit siRNA

Kurz vor der siRNA-Transfektion wurden die Zellen stets frisch passagiert. Für die Transfektion von U2OS- und HeLa-Zellen für RNA-Interferenz (RNAi)-Experimente wurde *Lipofectamine RNAiMax* (Invitrogen) verwendet. Es wurden 800 pmol siRNA in 1 ml OPTIMEM gegeben und mit einem Gemisch aus 1 ml OPTIMEM und 40 μl *Lipofectamine RNAiMax* vereinigt. Nach einer Inkubation von 20 min. bei Raumtemperatur wurde dieser Mix in das Medium einer 10-cm-Kulturschale überführt. Nach 5 Stunden Inkubation im CO_2 -Inkubator wurden die Zellen erneut passagiert und auf 3 10 cm-Schalen verteilt. 72 Stunden nach der Transfektion erfolgte dann die RNA- und Extraktpräparation (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.5.2 und 2.5.11).

2.8.3 Transfektion von Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transfektion der U2OS-Tet-Off-Zellen (Uta6) mit den Histon-Reporterplasmiden (siehe Kapitel II, Abschnitt 1.4) wurde *Lipofectamine 2000* (Invitrogen) verwendet. Für die Transfektion eines zu 80-90% konfluenten *wells* einer 6 *well*-Platte wurden zunächst 4 μg Plasmid-DNA mit 250 μl OPTIMEM gemischt und einem Mix aus 250 μl OPTIMEM und 10 μl *Lipofectamine 2000* zugegeben. Nach einer 20 min. Inkubation wurde diese Mischung auf die Zellen eines *wells* verteilt. Nach 6 Stunden wurde das alte Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Die RNA-Isolation aus den transfizierten Zellen erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion.

2.8.4 Hydroxyharnstoff-Applikation

Für die Induktion des Histon-mRNA-Abbaus wurde Hydroxyharnstoff (HU) verwendet. In das Kulturmedium von U2OS-Zellen wurde dazu 5 mM HU gegeben. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten erfolgte dann die Isolation von Gesamt-RNA (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.5.2).

2.8.5 Synchronisation von HeLa-Zellen

Zur Synchronisation von HeLa-Zellen in der G1/S-Phase wurde ein doppelter Thymidinblock durchgeführt, wobei auf eine 18-stündige Inkubation mit 2,5 mM Desoxythymidin eine 8-stündige Kultivierung mit frischem Medium folgte und sich anschließend für 18 Stunden der zweite Thymidinblock anschloss.

Für die Etablierung des Synchronisationsexperimentes mit dem RNAi-Versuch wurden verschiedene Vorgehensweisen getestet. Bei allen Tests wurden ein Tag vor der siRNA-Transfektion 2×10^6 Zellen auf eine 10 cm-Schale zur Kultivierung gegeben. Am Tag der Transfektion erfolgte die siRNA-Transfektion, wie bereits in Kapitel II, Abschnitt 2.8.2 beschrieben.

Für Prozedur A wurde der erste Thymidinblock 1 Tag nach der siRNA-Transfektion, bei Prozedur B 2 Tage nach der siRNA-Transfektion und bei Prozedur C 3 Tage nach der siRNA-Transfektion durchgeführt. In analoger Weise verschob sich die Applikation des 2. Thymidinblockes auf den Tag 2, 3 oder 4 nach der siRNA-Transfektion, so dass Extraktpräparationen an Tag 3, 4 oder 5 durchgeführt wurden. Nach unterschiedlichen Zeiten im *release* wurde RNA aus den Zellen isoliert und parallel dazu wurden Zellen für eine durchflusszytometrische Analyse mit Ethanol fixiert (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.9).

2.9 Fixierung von Zellen und Zellzyklusanalyse

Für die durchflusszytometrische Analyse wurden 1×10^6 HeLa- bzw. U2OS-Zellen trypsiniert und in DMEM aufgenommen. Die Zellen wurden für 5 min. bei 500 g pelletiert, anschließend in 1 ml PBS aufgenommen, danach mit 2,5 ml eisgekühltem Ethanol fixiert und ü.N. oder für mehrere Wochen bei -20°C gelagert. Die fixierten Zellen wurden danach zentrifugiert, zweimalig mit PBS gewaschen und mit Propidiumjodidfärbelösung resuspendiert. Die Färbung erfolgte für 10 min. bei 37°C im Dunkeln. Danach wurden die gefärbten Zellen mit PBS gewaschen und zentrifugiert, bevor sie in FACS-Messpuffer aufgenommen und im Macs Quant (Miltenyi) vermessen wurden. Die Auswertung erfolgte mit der Software Macs Quantify™. Es wurden stets 10 000 Zellen vermessen, im Histogramm dargestellt und quantifiziert. Sowohl die Messung als auch die Auswertung der Histogramme erfolgte in Zusammenarbeit mit der AG Hüttelmaier (Claudia Reinke).

Propidiumjodidlösung:

0,05 mg/ml Propidiumjodid, 0,1 mg/ml RNaseA, 0,5 mM EDTA, 1 mg/ml Natriumcitrat in PBS

FACS-Messpuffer:

PBS mit 5 mM EDTA

2.10 Microarray-Analyse

Für die Microarray-Analyse wurde analog zu dem Microarray-Experiment von H. Berndt (Promotion H. Berndt, 2011) verfahren. U2OS-Zellen wurden mit der PARN1-siRNA und parallel dazu mit der Kontroll-siRNA transfiziert (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.8.2). 72 Stunden nach der Transfektion wurde RNA nach der TRIZOL-Methode isoliert und Gesamtzellextrakte wurden präpariert (siehe Kapitel II, Abschnitt 2.5.2 und 2.5.11). Die *knockdown*-Effizienz wurde mittels *Western-blot*-Analyse bestimmt. Die RNA wurde für vergleichende Microarray-Analysen verwendet. Zunächst wurde die RNA dafür mit dem *Cleanup Kit* von QIAGEN nachgereinigt und von der Microarray Core facility des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) in Leipzig analysiert. Unter Verwendung eines oligo (dT)-T7-RNA-Polymerase-Promotor-site-Primers (Genset SA, Paris, France) wurde 5 µg Gesamt-RNA mit *Superscript II Reverse Transcriptase* (Life Technologie) in cDNA revers transkribiert. Die einzelsträngige cDNA wurde danach in doppelsträngige cDNA umgeschrieben. Anschließend erfolgte eine Phenol-Chloroform-Extraktion, ehe die cDNA für die *in vitro*-Transkription mit dem IVT-labeling kit (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) in cRNA transkribiert wurde. Bevor die Fragmentierung der cRNA erfolgte, wurde sie mit dem RNeasy kit (QIAGEN) aufgereinigt. Die fragmentierte cRNA wurde mit dem Affymetrix HG-U133_Plus_2-Chip hybridisiert und die Signale wurden mit dem third generation Affymetrix Gene Chip Scanner 3000 ausgelesen. Die durch den Scanner ausgelesenen Signalintensitäten wurden präprozessiert, was die Hintergrundkorrektur, die Normalisierung und die PM/ MM-Korrektur einschließt (Gautier *et al.*, 2004). Für die Durchführung der Präprozessierung wurde der Detektionsalgorithmus Mas5 unter Verwendung der Software R benutzt (Pepper *et al.*, 2007). Es wurden 2 Microarray-Datensets von H. Berndt und ein Datenset von C. Weißbach analysiert.

Für jedes Sondenset auf dem Chip wurde das Verhältnis der Signalintensitäten von PARN-depletierten Zellen zu Kontroll-Zellen gebildet. Aus diesen Anreicherungsfaktoren wurde desweiteren der mittlere Anreicherungsfaktor berechnet und die statistische Irrtumswahrscheinlichkeit für eine Anreicherung mit einem adaptierten T-Test, dem sog. Welch T-Test, bestimmt. Bei der Analyse der Microarray-Daten wurden alle Sondensets entfernt, bei denen für mind. eine PARN-*knockdown*-Probe eine *absent*-Klassifikation vorlag. Sondensets mit einer *absent*-Klassifikation zeichnen sich durch eine höhere Fehleranfälligkeit aus (siehe Kapitel III, Abschnitt 1). Darüber hinaus wurden nicht annotierte Sondensets im Vorfeld eliminiert. Als Schwellenwert für eine Anreicherung wurde eine mind. 1,5-fach höhere Signalintensität in PARN-depletierten Zellen gegenüber den Kontroll-Zellen gesetzt.

III Ergebnisse

1 Identifizierung putativer PARN-Substrate in humanen somatischen Zellen

Bei der Poly(A)-spezifischen Ribonuklease handelt es sich um eine 3'-Exoribonuklease, dessen *in vitro*-Eigenschaften gut charakterisiert sind.

Aufgrund der hohen Poly(A)-Spezifität (Körner & Wahle, 1997) und der Eigenschaft, die Cap-Struktur von mRNAs zu binden (Dehlin *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001; Wu *et al.*, 2005) und dadurch eine prozessive Arbeitsweise zu erhalten, liegt die Vermutung nahe, dass PARN am Abbau von mRNAs beteiligt ist.

Aus der Promotionsarbeit von M. Reuter geht hervor, dass PARN nicht die Verteilung der gesamten Poly(A)-Schwanzlängen in somatischen humanen Zellen beeinflusst (Promotion M. Reuter, 2006). Man kann jedoch den Schluss ziehen, dass PARN an der Regulation spezifischer RNAs beteiligt sein könnte. Um spezielle PARN-Substrate zu identifizieren, wurden bereits zwei vergleichende Microarray-Analysen von H. Berndt durchgeführt (Promotion H. Berndt, 2011).

Das Set von drei unabhängigen biologischen Experimenten sollte zunächst vervollständigt werden. Dazu wurde, analog zum Versuchsablauf bei H. Berndt, die PARN-Proteinmenge in U2OS-Zellen durch RNAi reduziert, RNA isoliert und Extrakte zur *Western-blot*-Analyse hergestellt (siehe Abbildung 3A). Die *Western-blot*-Analyse zeigt, dass die PARN-Proteinmenge in PARN-depletierten Zellen auf ca. 5-10% gesunken ist (siehe Abbildung 3B).

Die RNA aus PARN-*knockdown*-Zellen (PARN-kd) und Kontroll-*knockdown*-Zellen (Kontroll-kd) wurde von der *Microarray Core facility* des Interdisziplinären Zentrums für Klinische Forschung (IZKF) in Leipzig analysiert. Dazu wurde Gesamt-RNA unter Verwendung eines Oligo(dT)-T7-RNA-Polymerase-Promotor-site-Primers mit reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Durch diesen Schritt wurde lediglich polyadenylierte RNA revers transkribiert. Doppelsträngige cDNA wurde synthetisiert und daraus cRNA während einer *in vitro*-Transkription hergestellt. Die dabei entstandene cRNA wurde fragmentiert und zur Hybridisierung auf den Microarray-Chip gegeben.

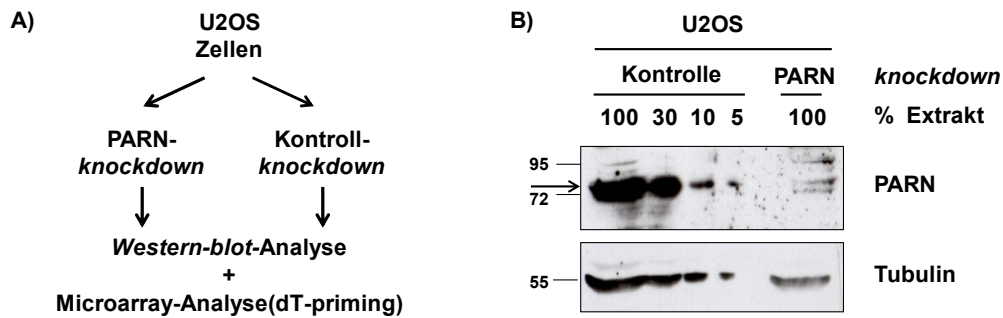


Abbildung 3: Übersicht zum Microarray-Experiment und zur Reduktion der PARN-Proteinmenge durch RNAi

(A) U2OS-Zellen wurden mit PARN1-siRNA und parallel dazu mit Kontroll-siRNA transfiziert und 72 Stunden später wurden Gesamt-Zellextrakte hergestellt und RNA wurde isoliert. Durch vergleichende Microarray-Studien wurde die RNA analysiert, wobei die cDNA-Synthese mit einem Oligo(dT)-T7-RNA-Polymerase-Promotor-site-Primer erfolgte. (B) In vergleichenden *Western-blot*-Analysen wurde die *knockdown*-Effizienz ermittelt. PARN ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Tubulin dient als Ladekontrolle (100% entspricht 100µg geladenem Extrakt).

Auf dem Chip ist eine Vielzahl an 25-Nukleotid-langen Sonden immobilisiert, die mit den entsprechenden RNA-Zielsequenzen hybridisieren können. Die Sonden sind dabei in Form von Sondensets auf dem Chip angeordnet. Ein Sondenset besteht aus 12 *Perfect Match* (PM)-Sonden und 12 zugehörigen *Mismatch* (MM)-Sonden, wobei sich die Sequenz der PM- und der MM-Sonde lediglich in einem Nukleotid an Position 13 unterscheidet (siehe Abbildung 4). Anhand der Signalintensitätsunterschiede zwischen PM- und MM-Sonde lässt sich auf die Spezifität eines Sondensets für das entsprechende Zieltranskript schließen. Meistens sind die Sonden eines Sondensets gegen das 3'-Ende der RNA gerichtet. Es ist aber auch möglich, dass für eine RNA mehrere Sondensets auf dem Chip immobilisiert sind, die mit weiteren RNA-Abschnitten hybridisieren (siehe Abbildung 4). Insgesamt sind 54519 Sondensets auf dem Affymetrix-Chip immobilisiert.

Die durch den Scanner ausgelesenen Signalintensitäten sind ein Maß für die RNA-Menge und korrelieren somit mit dem Expressionslevel.

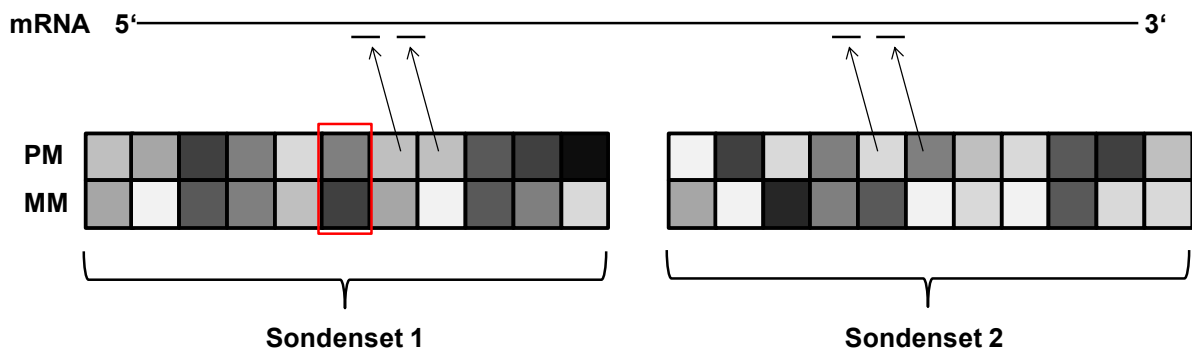


Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Sondensets

Ein Sondenset setzt sich aus 12 *Perfect Match* (PM)- und 12 *Mismatch* (MM)-Sonden zusammen, wobei eine Sonde komplementär zu einem bestimmten mRNA-Abschnitt ist. Zu jeder PM-Sonde existiert genau eine MM-Sonde, die sich lediglich in einem Nukleotid in der Mitte der Sondensequenz von der PM-Sonde unterscheidet. Verschiedene Sondensets können verschiedene mRNA-Abschnitte binden.

Für die Analyse der Signalintensitäten wurden die Roh-Intensitäten korrigiert. Diese Korrektur erfolgt in dem sog. Präprozessierungsprozess, der die Normalisierung, die Hintergrundkorrektur und die PM-Korrektur einschließt (Gautier *et al.*, 2004). Die hier vorgenommene Präprozessierung erfolgte mit dem Mas5-Detektionsalgorithmus. Er zeichnet sich u.a. dadurch aus, dass ein Faktor zur Abschätzung der Sondenspezifität berechnet wird (Archer & Reese, 2010). Dieser erlaubt die Klassifizierung eines Sondensets in *absent* oder *present*. Eine *absent*-Klassifikation resultiert beispielsweise aus einer geringen Signalintensität oder aus einer geringen Sonden-Spezifität, die sich anhand der PM- zu MM-Intensität messen lässt. Somit weisen Sondensets, die als *absent* klassifiziert werden, einen größeren Fehler auf als Sondensets, die als *present* klassifiziert werden. Für die Auswertung wurden daher alle als *absent* klassifizierten Sondensets der PARN-kd-Proben eliminiert. Eine Darstellung über die Gesamtheit der Signalintensitäten der PARN-kd-Zellen und Kontroll-kd-Zellen ist für die zwei Experimente von H. Berndt und dem nachfolgendem Einzelexperiment in Form eines Scatterplots in Abbildung 5A zusammengefasst.

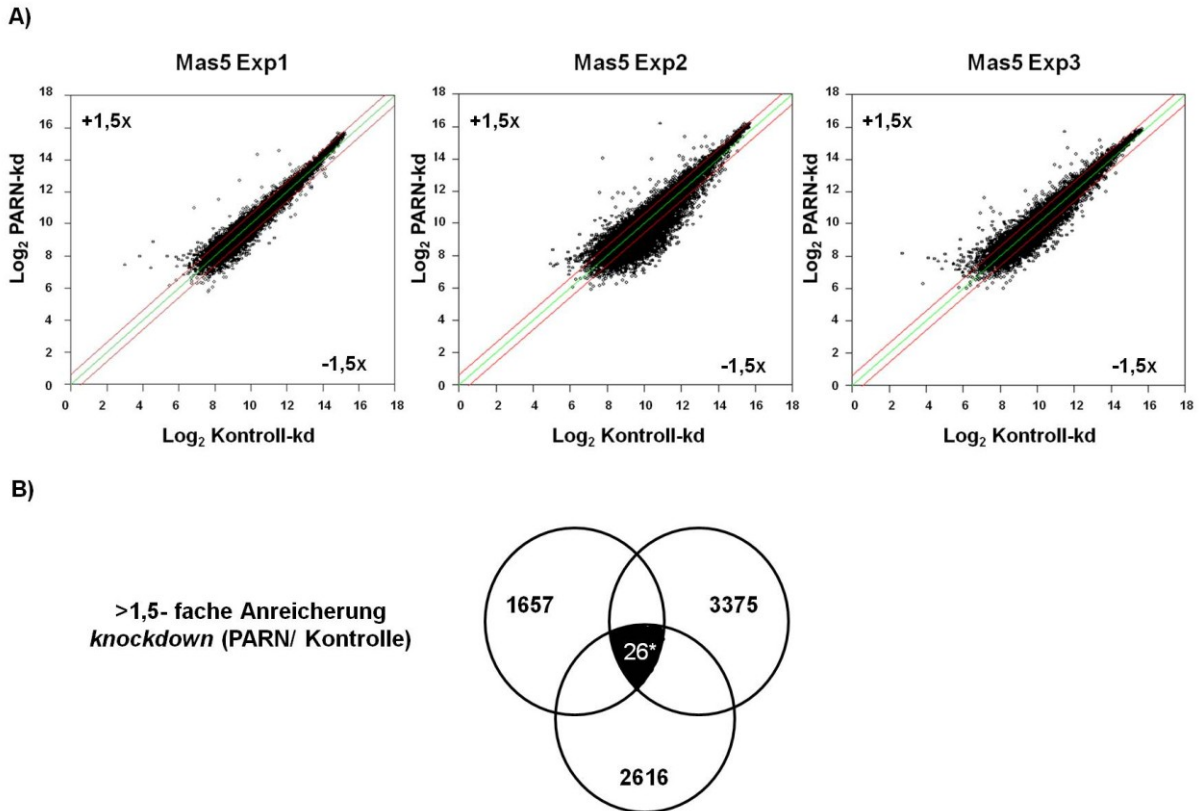


Abbildung 5: Microarray-Analyse (I)

Für die Microarray-Analyse wurde RNA aus drei biologisch unabhängigen Experimenten verwendet und analysiert. Die Rohdaten wurden unter Verwendung des Detektionsalgorithmus Mas5 präprozessiert, um Signalintensitäten für PARN-kd-Proben und Kontroll-kd-Proben zu erhalten.

(A) Die logarithmierten Signalintensitäten aller SONDENSSETS des Microarray-Chips für PARN-kd-Proben und Kontroll-Proben sind in Form eines Scatterplots für die zwei Experimente von H. Berndt (2012) (Exp1 und Exp2) und das Einzelexperiment (Exp3) dargestellt. Die grüne Linie veranschaulicht im Blot gleiche Signalintensitäten zwischen PARN-kd-Proben und Kontroll-kd-Proben. Außerhalb der roten Linien befinden sich SONDENSSETS, bei denen eine mehr als 1,5-fach veränderte Signalintensität zwischen PARN- und Kontroll-kd-Proben vorliegt.

(B) Es wurde für jedes SONDENSSET das Verhältnis aus den Signalintensitäten zwischen PARN- und Kontroll-kd-Proben berechnet. Für die Einzelexperimente ist die jeweilige Anzahl an SONDENSSETS angegeben, die mind. eine 1,5-fach höhere Signalintensität in PARN-kd-Proben gegenüber den Kontroll-Proben zeigen. Desweiteren ist die Anzahl an SONDENSSETS aufgeführt, die übereinstimmend in allen drei Experimenten eine mind. 1,5-fache Anreicherung in PARN-kd-Proben zeigen und bei denen diese Anreicherung in den drei Experimenten als statistisch signifikant mit $p < 0,05$ berechnet wurde (durch * gekennzeichnet).

Man erkennt, dass die Mehrzahl an RNAs hinsichtlich der RNA-Menge unbeeinflusst vom PARN-kd ist. So zeigen 98% der Sondensets im Mittel keine Mengenänderung infolge des PARN-kd. Als Schwellenwert für eine An- bzw. Abreicherung wurde eine mind. 1,5-fache Änderung der Signalintensität gewählt. Die Anzahl an Sondensets mit An- oder Abreicherung ist vergleichbar. Neben den Transkripten, die eine erhöhte RNA-Menge in den PARN-kd-Proben aufweisen, gibt es einige Transkripte, die infolge des PARN-kd reduziert vorliegen. Darunter befindet sich beispielsweise auch die PARN-mRNA. Desweiteren können reduzierte RNA-Mengen für spezifische mRNAs infolge der PARN-Depletion auch auf *off-target*-Effekte zurück zu führen sein. Hierbei würde die verwendete PARN1-siRNA nicht nur die Abnahme der PARN-mRNA-Menge bewirken, sondern auch die Reduktion einer weiteren RNA und damit möglicherweise auch des entsprechenden Protein-Levels zur Folge haben. Reduzierte RNA-Mengen nach dem PARN-kd könnten auch mit einem sekundären Effekt erklärt werden, bei dem PARN ein Zieltranskript destabilisiert, dessen Genprodukt letztendlich für die Destabilisierung eines weiteren Transkriptes verantwortlich ist.

Da es sich bei PARN um eine 3'-Exoribonuklease handelt, würde man PARN eine Funktion beim RNA-Abbau zuordnen. Folglich erwartet man, dass Zieltranskripte infolge der PARN-Depletion akkumulieren und eine höhere Signalintensität besitzen. Dies trifft auf zahlreiche Sondensets zu, was aus Abbildung 5B hervorgeht. Für die drei Experimente wurden jeweils 1657, 3375 und 2616 Sondensets mit erhöhten Signalintensitäten in PARN-kd-Proben identifiziert. Zwischen den einzelnen Experimenten zeigen sich jedoch nur geringfügige Überschneidungen hinsichtlich der gemeinsam auftretenden Sondensets, was möglicherweise damit begründet werden kann, dass ein Anreicherungsfaktor von 1,5 ein relativ kleiner Schwellenwert ist, sodass sich die scheinbar erhöhten Signalintensitäten für die Mehrzahl der Sondensets eher auf die biologische Variabilität zurück führen lassen.

Dennoch sollte ein zuverlässiges PARN-Substrat bestimmte Kriterien erfüllen. Neben einer mind. 1,5-fachen Anreicherung gegenüber der Kontrolle, die in allen drei Experimenten auftreten sollte, sollte auch nur eine geringe Irrtumswahrscheinlichkeit für die Anreicherung mit höchstens 0,05 gegeben sein. Zudem sollten zumindest die Sondensets für die PARN-depletierten Zellen eine *present*-Klassifikation aufweisen, weil die *present*-Klassifikation auf eine hohe Spezifität der Sonde für sein Zieltranskript und eine hohe Signalintensität schließen lässt. Es wurden desweiteren

lediglich annotierte Sondensets für die Identifizierung zuverlässiger PARN-Substrate berücksichtigt. Diese Kriterien erfüllen 26 Sondensets (siehe Tabelle 17), wobei sieben Sondensets für Histon-mRNAs kodieren, ein Sondenset für die snoRNA68 und weitere 18 Sondensets für reguläre mRNAs.

Tabelle 17: Microarray-Analyse(II)

RNAs, die bei der Verwendung des Mas5-Detektionsalgorithmus in den drei Experimenten mind. eine 1,5-fache Anreicherung in PARN-depletierten Zellen (PARN-kd) gegenüber den Kontroll-Zellen (Kontroll-kd) zeigen und bei denen die Irrtumswahrscheinlichkeit für die Anreicherung höchstens 0,05 beträgt, sind in der Tabelle aufgelistet. Zusätzlich sind die Gensymbole, die Bezeichnung der Sondensets und der mittlere Anreicherungsfaktor, sowie die Irrtumswahrscheinlichkeit p aus den drei biologisch unabhängigen Experimenten angegeben. Die snoRNA 68 (orange), 18 reguläre mRNAs sowie sieben Histon-mRNAs (gelb) zeigen nach erfolgtem PARN-kd eine Anreicherung.

Gensymbol	Sondensatz	PARN-knockdown/ Kontroll-knockdown	p
ADCK2	221893_s_at	1,71	0,04
AVPI1	218631_at	1,57	0,04
CFH /// CFHR1	215388_s_at	2,67	0,01
CTU2	1561502_x_at	1,83	0,05
CXorf21	220252_x_at	2,36	0,01
HIST1H2AD /// HIST1H3D	214472_at	3,18	0,05
HIST1H2BK	209806_at	1,77	0,05
HIST1H4H	208180_s_at	2,88	0,02
HIST1H4H	232035_at	2,21	0,05
HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	214290_s_at	3,59	0,01
HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	218280_x_at	2,81	0,00
HIST2H2BE	202708_s_at	1,61	0,05
LOC731223	1563373_at	2,80	0,00
NQO2	203814_s_at	1,76	0,01
NXPH4	221967_at	2,08	0,02
PIK3C2A	1569022_a_at	1,91	0,04
PIM3	224739_at	1,80	0,03
PLAUR	210845_s_at	1,72	0,03
PPIF	201489_at	1,70	0,03
PPP4R4	220672_at	2,01	0,02
RLN2	214519_s_at	1,83	0,02
SLC39A8	219869_s_at	1,88	0,04
snoRNA68	1566403_at	14,58	0,03
SOX17	230943_at	2,26	0,02
TMEM45A	219410_at	2,63	0,01
TRPM6	224412_s_at	1,95	0,04

Diese 26 Sondensets, die in den drei Microarray-Datensets übereinstimmend auftreten, lassen sich nicht auf ein zufälliges Ereignis zurück führen, denn statistische Berechnungen haben ergeben, dass die erwartete Anzahl an Sondensets, die

gemeinsam in den drei Microarray-Datensets zufällig angereichert vorliegen, höchstens sechs beträgt (Berechnung und weitere Ausführungen siehe Kapitel V, Abschnitt 1). Die Kriterien wurden jedoch von 26 Sondensets erfüllt, sodass die RNA-Anreicherung sehr wahrscheinlich auf den PARN-kd zurück zu führen ist und nicht mit einem zufälligen Ereignis erklärt werden kann.

Die snoRNA68-Anreicherung wurde bereits in der Promotionsarbeit von H. Berndt näher untersucht. PARN ist hier an der Prozessierung von oligoadenylierten snoRNA-Vorläufer-Molekülen zu reifen snoRNAs beteiligt (Berndt *et al.*, 2012).

Bei den regulären mRNAs handelt es sich um sehr verschiedene RNAs, die auch für Proteine kodieren, die beispielsweise während Signaltransduktionsprozessen und der Immunantwort, aber auch als Ionenkanal oder als Peptidyl-Prolyl-cis/trans-Isomerase eine Rolle spielen (siehe Tabelle 18).

Tabelle 18: mRNAs mit erhöhten Transkriptmengen infolge der PARN-Depletion

Gensymbol	Genname	Funktion
ADCK2	aarF domain containing kinase 2	Funktion unbekannt
AVPI1	arginine vasopressin-induced 1	in MAP-Kinase-Kaskade Aktivierung involviert, löst bei Injektion in <i>Xenopus</i> -Oozyten die Oozytenreifung aus (Nicod et al., 2002)
CFH /// CFHR1	complement factor H-related 1	Komplementaktivierung (Goicoechea de Jorge et al., 2013, Hellwege et al., 2002)
CTU2	cytosolic thiouridylase subunit 2 homolog	Rolle bei der t-RNA-Modifizierung (Schlieker et al., 2008)
CXorf21	chromosome X open reading frame 21	Funktion unbekannt
LOC731223	LOC731223	Subkategorie: lncRNA
NQO2	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 2	Elektronentransport (Chen et al., 2000)
NXPH4	neurexophilin 4	Funktion nicht bekannt
PIK3C2A	phosphatidylinositol-4-phosphate 3-kinase, catalytic subunit type 2 alpha	PI3-Kinase, involviert in Signaltransduktion, beeinflusst Proliferation, Zellmigration, Zellüberleben (Elis et al., 2008; Zhao et al., 2007)
PIM3	pim-3 oncogene	Ser-Threonin-Protein-Kinase, Regulation von Signaltransduktionskaskaden, Proliferation und Überleben (Beharry et al., 2011; Wang et al., 2013; 2012)
PLAUR	plasminogen activator, urokinase receptor	Rezeptor für Urokinase-Plasminogen-Aktivator, Funktion während der Plasminbildung (Lakka et al., 2005)
PPIF	peptidylprolyl isomerase F	PPIase, cis/trans-Prolyl-Isomerisierung ; (Bergsma et al., 1991)
PPP4R4	protein phosphatase 4, regulatory subunit 4	Funktion nicht bekannt
RLN2	relaxin 2	Ovarien-Hormon (Sherwood, 2004)
SLC39A8	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 8	Zinktransporter (Liu et al., 2013)
SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	Transkriptionsfaktor, zentrale Funktion während der Embryonalentwicklung (Nakajima-Takagi et al., 2013; Patterson et al., 2008)
TMEM45A	transmembrane protein 45A	Funktion nicht bekannt
TRPM6	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 6	Ionenkanal (Clark et al., 2008, Li et al., 2006)

Interessanterweise ist für die AVPI1-mRNA eine erhöhte Transkriptmenge infolge der PARN-Depletion zu beobachten. Welche Rolle PARN in der Regulation dieser mRNA in humanen somatischen Zellen spielt, ist nicht untersucht. Es ist jedoch bereits beschrieben worden, dass das AVPI1-Protein eine zentrale Funktion während der *Xenopus*-Oozyten-Reifung besitzt. So wird durch die Injektion der AVPI1-mRNA die Oozytenreifung in *X. laevis* ausgelöst (Nicod *et al.*, 2002). Ein weiterer Prozess, der allerdings erst während der *Xenopus*-Oozytenreifung abläuft, ist die Entfernung der Poly(A)-Schwänze von maternalen mRNAs durch PARN, was zu einer translationalen Stilllegung dieser mRNAs führt. Möglicherweise könnte das AVPI1-Transkript auch in *Xenopus*-Oozyten von PARN deadenyliert werden, sodass ein Rückkopplungsmechanismus vorstellbar wäre, der die AVPI1-Proteinmenge nach Initiation der Oozytenreifung wieder senkt.

Die Tatsache, dass auch sieben Histon-mRNAs in PARN-kd-Zellen angereichert vorliegen, ist überraschend, da diese RNA-Klasse normalerweise nicht polyadenyliert vorliegt und durch dT-*priming* nicht identifiziert werden sollte. Das reife 3'-Ende wird in Histon-mRNAs normalerweise von einer konservierten *stem-loop*-Struktur gebildet, die eine zentrale Rolle für die Prozessierung, die Translation und die Stabilität von Histon-mRNAs spielt. In der Literatur sind jedoch auch polyadenylierte Histon-mRNAs beschrieben worden. Sie existieren zu einem sehr geringen Prozentsatz in somatischen Zellen (Shepard *et al.*, 2011), treten jedoch vermehrt bei einer gestörten Histon-mRNA-Prozessierung auf. Generell existieren etwa 70 replikationsabhängige Histon-mRNAs in humanen Zellen, deren 3'-Ende von einer *stem-loop*-Struktur gebildet wird (Marzluff *et al.*, 2002). Sie können der H1-, H2A-, H2B-, H3- oder der H4-Klasse zugeordnet werden. Es existieren beispielsweise 14 Histon-H4-Gene, 12 Histon-H3-Gene und zahlreiche H2A- und H2B-Gene, die für die 10-12 verschiedenen H2A- und H2B-Proteine kodieren (Marzluff *et al.*, 2002).

Auf dem Microarray-Chip sind insgesamt 68 Sondensets für Histon-mRNAs immobilisiert, dies bedeutet, dass nicht für jede Histon-mRNA ein Sondenset vorhanden ist. Beispielsweise fehlen für die Hist1H2AA oder Hist1H2AH entsprechende Sonden auf dem Chip, wodurch keine Aussage für diese Histon-mRNAs im Hinblick auf eine An- oder Abreicherung in PARN-kd-Zellen getroffen werden kann. Für 22 der insgesamt 68 Histon-Sondensets konnte eine nähere Analyse erfolgen, da für diese Sondensets eine *present*-Klassifikation vorlag.

Generell konnte für 20 Histon-Sondensets eine Zunahme der Histon-mRNA-Menge um einen Faktor von 1,3 bis 3,5 infolge der PARN-Depletion festgestellt werden (siehe Tabelle 19). Darunter befinden sich RNAs aller Histon-Klassen.

Tabelle 19: Microarray-Analyse (III)

Dargestellt sind alle Histon-Sondensets des Microarray-Chips, die als *present* klassifiziert wurden. Zusätzlich sind die Gensymbole, die Bezeichnung der Sondensets sowie die mittleren Anreicherungs-faktoren und die Irrtumswahrscheinlichkeit p aufgeführt.

Gensymbol	Sondensatz	PARN-knockdown/ Kontroll-knockdown	p
HIST1H1C	209398_at	1,75	0,01
HIST1H2AC	215071_s_at	2,47	0,07
HIST1H2AD /// HIST1H3D	214472_at	3,18	0,05
HIST1H2AG	207156_at	0,69	0,34
HIST1H2BC	214455_at	1,71	0,14
HIST1H2BD	209911_x_at	1,58	0,20
HIST1H2BD	222067_x_at	1,88	0,11
HIST1H2BE	208527_x_at	1,58	0,19
HIST1H2BF	208490_x_at	1,81	0,13
HIST1H2BH	208546_x_at	1,80	0,25
HIST1H2BI	208523_x_at	1,59	0,30
HIST1H2BK	209806_at	1,77	0,05
HIST1H3H	206110_at	1,53	0,03
HIST1H4C	205967_at	0,63	0,42
HIST1H4H	208180_s_at	2,88	0,02
HIST1H4H	232035_at	2,21	0,05
HIST1H4J	214463_x_at	1,34	0,32
HIST2H2AA3	218279_s_at	1,44	0,14
HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	214290_s_at	3,59	0,01
HIST2H2AA3 /// HIST2H2AA4	218280_x_at	2,81	0,00
HIST2H2BE	202708_s_at	1,61	0,05
HIST2H4A /// HIST2H4B	207046_at	1,82	0,19

Lediglich zwei Sondensets (für Hist1H2AG und Hist1H4C) zeigen eine Abreicherung in PARN-kd-Zellen. Warum sich für diese zwei Sondensets im Vergleich zu den anderen Histon-Sondensets eine gegensätzliche Tendenz abzeichnet, ist unklar. Sie sind ebenso wie die 15 weiteren Histon-mRNAs auch Vertreter des großen Histon-Clusters 1, welches sich auf Chromosom 6 befindet. In der Literatur sind keine besonderen Unterschiede zu den zwei Histon-mRNAs vermerkt, die ein abweichendes Verhalten erklären könnten. Auffällig ist die hohe Irrtumswahrscheinlichkeit für diese zwei Sondensets, die auf eine große Variabilität bezüglich der RNA-Mengenänderung in den drei Experimenten hindeutet. Für die Hist1H2AG-RNA wurde dennoch in den drei unabhängigen Experimenten stets eine

mRNA-Abnahme angezeigt, wohingegen für die HistH1H4C in einem von drei Experimenten eine Anreicherung nachweisbar war.

Mit der Microarray-Analyse konnte aus der Vielzahl an Transkripten einer Zelle eine geringe Anzahl an potenziellen PARN-Substraten eingegrenzt werden. Lediglich ein Sondenset für die snoRNA68, 18 Sondensets für verschiedene mRNAs und sieben Sondensets für Histon-mRNAs zeigten eine statistisch signifikante Anreicherung in PARN-kd-Zellen.

2 Verifizierung polyadenylierter Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate

Mit der Analyse der Microarray-Daten konnten einige Transkripte als potenzielle PARN-Substrate identifiziert werden. Der Fokus dieser Arbeit wurde auf die Histon-mRNAs gelegt, da in den Microarray-Studien mehrere Sondensets für verschiedene Histon-mRNAs eine statistisch signifikante Anreicherung aufzeigten. Dies legt die Vermutung nahe, dass nicht nur einzelne Histon-mRNAs potenzielle PARN-Substrate sein könnten, sondern eine bedeutende Anzahl an mRNAs dieser Klasse durch PARN reguliert sein könnte. Darüber hinaus besitzen Histon-mRNAs als gemeinsames Strukturelement den *stem-loop* am 3'-Ende, welcher ein Angriffspunkt für Regulationsmechanismen ist und möglicherweise auch für die Regulation durch PARN benutzt werden könnte.

Die Validierung der Microarray-Daten wurde mit Hilfe von quantitativen RT-PCR-Messungen durchgeführt. Dafür wurden U2OS-Zellen, analog zum Microarray-Experiment, mit PARN-spezifischer siRNA und parallel mit einer Kontroll-siRNA, die keine Zielsequenz im menschlichen Genom aufweist, transfiziert. Um *off-target*-Effekte der verwendeten PARN1-siRNA auszuschließen, wurden zudem zwei weitere PARN-spezifische siRNAs für das RNAi-Experiment verwendet.

72 Stunden nach der Transfektion wurde RNA isoliert und Zellextrakte wurden präpariert. In vergleichenden *Western-blot*-Analysen wurde die *knockdown*-Effizienz bestimmt.

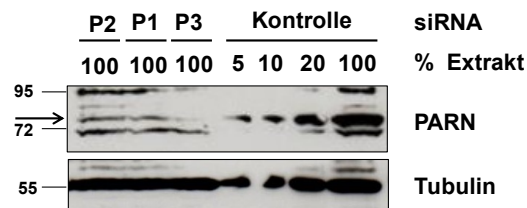


Abbildung 6: Verifizierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR (I)

In U2OS-Zellen wurden RNAi-Experimente zur Reduktion der PARN-Proteinmenge durchgeführt. Es wurden drei unterschiedliche PARN-siRNAs (P1, P2, P3) verwendet. Parallel dazu wurden Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen mit analysiert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden sowohl Gesamtzellextrakte präpariert und RNA wurde isoliert. Die PARN-Proteinmenge (durch Pfeil gekennzeichnet) in PARN-kd- und Kontroll-kd-Zellen wurde anhand von *Western-blot*-Analysen ermittelt. Aufgetragen ist die Verdünnungsreihe von Kontroll-extrakten im Vergleich zu PARN-Extrakten. Tubulin dient als Ladekontrolle.

Für die drei verwendeten PARN-siRNAs konnte eine Reduktion der PARN-Proteinmenge unter 10% erzielt werden (siehe Abbildung 6). Die Reduktion der PARN-Proteinmenge, die durch die PARN2-siRNA bewirkt wurde, war stets etwas geringer als für die PARN1-siRNA oder die PARN3-siRNA. Die scheinbar bessere *knockdown*-Effizienz durch die PARN3-siRNA gegenüber der PARN1-siRNA konnte hingegen in weiteren Experimenten nicht verifiziert werden. Für die RNA-Analyse wurden qRT-PCR-Messungen durchgeführt. Für die Auswertung wurden alle Daten einbezogen, bei denen die PARN-Proteinmenge während des *knockdown*-Experimentes im Vergleich zur Kontrolle unter 10% gesunken war. Zur Normalisierung wurden die RPLP0- und die PPIA-mRNA verwendet, die auch in der Arbeit von H. Berndt angegeben sind (Promotion H. Berndt, 2011). Die RPLP0-mRNA kodiert für ein ribosomales Protein der großen 60S-Ribosomen-Untereinheit. Bei der PPIA-mRNA handelt es sich hingegen um ein Transkript, welches für eine Peptidyl-prolyl-isomerase kodiert. Beide Transkripte zeigten keine nennenswerten Änderungen bezüglich der Ct-Werte zwischen PARN-kd und Kontroll-kd-Proben. Auch anhand der Microarray-Analysen konnte darüber hinaus keine statistisch signifikante RNA-Mengenänderung nach erfolgter PARN-Depletion nachgewiesen werden. Somit sind sie als Normalisierungsgene für die qRT-PCR-Messungen geeignet.

Für die cDNA-Synthese wurde entweder *Random-Hexamer-Primer* (R6) oder oligo(dT)₁₂-Primer (dT) verwendet, um gezielt Gesamt-RNA oder polyadenylierte RNA umzuschreiben. Histonspezifische qPCR-Primer wurden benutzt, die während der qPCR ausschließlich ein PCR-Produkt generierten. Die relativen RNA-Mengen wurden mittels qRT-PCR mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ -Methode durch Normalisierung auf die PPIA- und RPLP0-mRNA quantifiziert. In Abbildung 7 sind die relativen RNA-Mengen aus PARN-kd-Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen dargestellt.

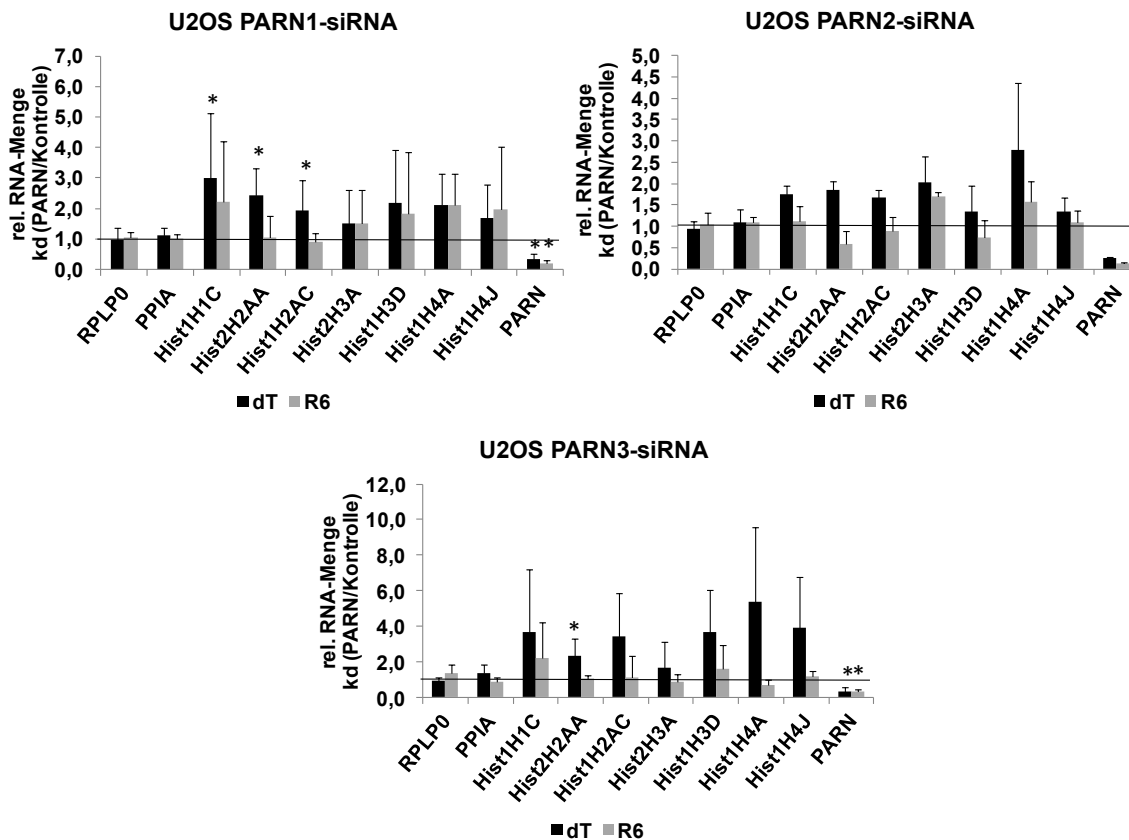


Abbildung 7: Verifizierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR (II)

2µg Gesamt-RNA aus U2OS-Zellen wurde mit *Random-Hexamer-Primer* (R6) beziehungsweise oligo (dT)₁₂-Primer (dT) revers transkribiert. Die cDNA-Menge wurde mittels histonspezifischer Primer in qPCR-Messungen quantifiziert. Relative RNA-Mengen zwischen PARN-kd-Proben und Kontroll-kd-Proben wurden durch Normalisierung auf PPIA und RPLP0 ermittelt. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die PARN1-siRNA und PARN3-siRNA basieren auf mind. vier biologisch unabhängigen Experimenten und die für die PARN2-siRNA auf zwei Experimenten. * gibt die Irrtumswahrscheinlichkeit $p < 0,05$ an.

Zur Kontrolle der *knockdown*-Effizienz innerhalb der RNA-Proben wurde die PARN-mRNA-Menge quantifiziert. Eine statistisch signifikante PARN-mRNA-Reduktion nach erfolgtem PARN-kd wurde beobachtet. Weiterhin wurde die Mengenänderung für sieben verschiedene Histon-mRNAs mittels qRT-PCR analysiert. Hierbei handelt es sich um Histon-mRNAs verschiedener Histon-Klassen, die teilweise in den Microarray-Studien bereits eine Anreicherung gezeigt hatten. Da mit dem Versuchsablauf des Microarray-Experimentes die Analyse der polyadenylierten Histon-mRNA-Menge erfolgte, sollte auch für die Validierung mittels qRT-PCR das *dT-priming* für die cDNA-Synthese verwendet werden, um die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs zu untersuchen.

Die Analyse der polyadenylierten Histon-mRNA-Mengen ergab, dass für alle analysierten Histon-mRNAs im Mittel eine geringe Anreicherung der RNA-Menge in PARN-depletierten Zellen vorliegt, wenn der *knockdown* mit der PARN1-siRNA bewirkt wurde. Diese erhöhten Histon-mRNA-Mengen wurden auch in Zellen beobachtet, in denen der PARN-kd durch andere PARN-siRNAs erfolgte. Die Anreicherungsfaktoren schwanken von Faktor 1,34 bis 5,36, wobei Histon-mRNA-Vertreter der Histon-Klassen H1, H2A, H3 und H4 durch den PARN-kd beeinflusst sind. Diese Beobachtung korreliert überdies mit den Microarray-Ergebnissen. Es ist damit wahrscheinlich, dass PARN die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs beeinflusst und somit eine Rolle im Histon-mRNA-Metabolismus spielt. Die Anzahl an Histon-mRNAs mit einer statistisch signifikanten Anreicherung, variiert in Abhängigkeit von der verwendeten PARN-siRNA, sie ist aber generell gering. Bei Verwendung der PARN1-siRNA, die auch für die Microarray-Analyse eingesetzt wurde, zeigt sich eine statistisch signifikante Erhöhung der polyadenylierten Histon-mRNA-Menge für drei der analysierten Histon-Transkripte. Bei Verwendung der PARN3-siRNA erkennt man eine Zunahme der polyadenylierten Histon-mRNA-Menge, die lediglich für eine Histon-mRNA statistisch signifikant ist. Diese Histon-mRNA zeigt auch für die PARN1-siRNA eine statistisch signifikante Anreicherung. Im Gegensatz zur Akkumulation der polyadenylierten Histon-mRNAs bleiben die Gesamt-Histon-mRNA-Mengen nach dem PARN-kd für die meisten Histon-mRNAs konstant. Fünf von sieben Histon-mRNAs zeigen im Hinblick auf das Gesamt-Histon-mRNA-Level nach PARN-Depletion mit der PARN1-siRNA eine Anreicherung, was allerdings nicht statistisch signifikant ist und auch nicht mit den anderen siRNAs bestätigt werden konnte.

Aufgrund einer besseren Übersicht sind im Anhang (siehe Kapitel V, Abschnitt 2) qRT-PCR-Ergebnisse von vier weiteren Histon-mRNAs dargestellt, die in der Regel die gleichen Tendenzen zeigen wie die in Abbildung 7 aufgeführten Histon-mRNAs. Auffällig sind die hohen Standardabweichungen. Sie sind möglicherweise darin begründet, dass die *knockdown*-Effizienz zwischen den Einzelexperimenten variiert und sich dies in geringeren Anreicherungsfaktoren widerspiegelt. Darüber hinaus handelt es sich bei den polyadenylierten Histon-mRNAs um RNAs, die eine sehr geringe Abundanz aufweisen, dadurch unterliegen die ermittelten C_t -Werte der qPCR-Messung einer großen Fehleranfälligkeit. Obwohl ein Anstieg in der Menge polyadenylierter Histon-mRNAs infolge des PARN-kd auftritt, bleibt die Gesamt-Histon-mRNA-Menge unbeeinflusst, was vermutlich mit dem geringen Anteil polyadenylierter Histon-mRNAs an der Gesamt-Histon-mRNA-Menge begründet werden kann. Die Beobachtung, dass polyadenylierte Histon-mRNAs infolge von einem PARN-kd akkumulieren, sollte weiterhin noch in einer weiteren Zelllinie verifiziert werden, um auszuschließen, dass es sich möglicherweise um eine sehr spezielle Regulation in Osteosarcomazellen handeln könnte.

Für einen effizienten *knockdown* ist nicht nur die *knockdown*-Effizienz, sondern auch die absolute Menge des Proteins in der Zelle essentiell. Daher wurden zunächst verschiedene Zelllinien im Hinblick auf die PARN-Proteinmenge untersucht. Es wurden die PARN-Proteinmengen in HEK-293T-Zellen, HeLa-Zellen, Huh7-Zellen, Dendritischen Zellen, MCF7-Zellen und HaCaT-Zellen anhand von *Western-blot*-Analysen miteinander verglichen. Das Ergebnis ist in Abbildung 8 dargestellt.

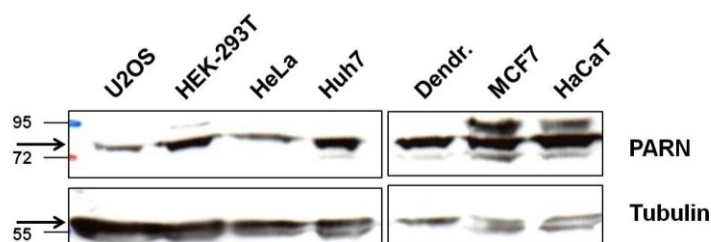


Abbildung 8: PARN-Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien

100 μ g Zellextrakt aus verschiedenen Zelllinien wurde in *Western-blot*-Analysen im Hinblick auf die PARN-Proteinmenge analysiert (durch Pfeil angezeigt). Tubulin dient als Ladekontrolle.

Der PARN-Proteingehalt ist bei den analysierten Zelllinien sehr unterschiedlich. Während U2OS-Zellen und HeLa-Zellen vergleichbar geringe PARN-Proteinmengen besitzen, ist die PARN-Proteinmenge in den anderen Zelllinien deutlich größer. Dies korreliert mit den Beobachtungen von H. Berndt, die bereits in HEK-293T-Zellen eine zirka 10-fach höhere PARN-Proteinmenge als in U2OS-Zellen detektieren konnte (Promotion H. Berndt, 2011). Bemerkenswert ist die Tatsache, dass für die Dendritischen Zellen, die MCF7- und die HaCaT-Zellen die Tubulinmenge deutlich reduziert vorliegt, obwohl gleiche Extraktmengen geladen wurden. Tubulin ist aufgrund dieser Tatsache nicht als optimale Ladekontrolle anzusehen. Neben den U2OS-Zellen verfügen auch HeLa-Zellen über einen geringen PARN-Proteingehalt. Diese Zelllinie sollte sich daher gut eignen, um die Verifizierung der polyadenylierten Histon-mRNAs als PARN-Substrate in einer weiteren Zelllinie durchzuführen.

3 Verifizierung polyadenylierter Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate in einer weiteren Zelllinie

Analog zum Vorgehen in U2OS-Zellen wurde die PARN-Proteinmenge in HeLa-Zellen mittels RNAi reduziert. Die *knockdown*-Effizienz wurde in *Western-blot*-Analysen bestimmt. Sie liegt auch hier über 90%, was anhand der Abbildung 9 deutlich wird. Die Analyse der RNA-Menge erfolgte, wie oben beschrieben, mit qRT-PCR. Für die analysierten Histon-mRNAs ist eine erhöhte Menge polyadenylierter Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen zu beobachten, wodurch die ersten Ergebnisse aus U2OS-Zellen auch in einer weiteren Zelllinie rekapituliert werden konnten. Auch die Gesamtmenge der analysierten Histon-mRNAs ist im Gegensatz zu der polyadenylierten Histon-mRNA-Menge nach dem PARN-kd nicht signifikant verändert.

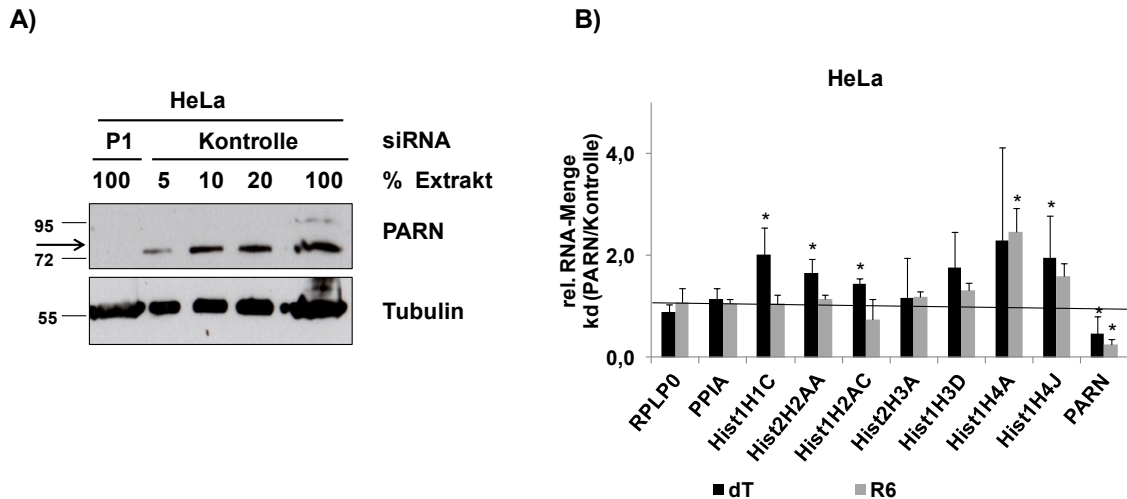


Abbildung 9: RNAi-vermittelte PARN-Reduktion und RNA-Analyse in HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden mit PARN1-siRNA und parallel mit Kontroll-siRNA transfiziert, 72 Stunden danach wurden sowohl Extrakte präpariert und Gesamt-RNA wurde isoliert.

(A) Die *knockdown*-Effizienz wurde in vergleichenden *Western-blot*-Analysen bestimmt. Tubulin dient als Ladekontrolle.

(B) Die RNA wurde mit *Random-Hexamer-Primer* (R6) oder oligo(dT)₁₂-Primer (dT) revers transkribiert und in qRT-PCR-Messungen analysiert. RPLP0 und PPIA wurden als Normalisierungsgene verwendet. Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus mind. drei biologisch unabhängigen Experimenten, wobei *p<0,05 anzeigt.

4 Die 3'-Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs

Bei der korrekten Histon-mRNA-Prozessierung erfolgt die Bildung des mRNA-3'-Endes durch eine endonukleolytische Spaltung zwischen dem *stem-loop* und dem HDE, sodass das reife Histon-3'-Ende von der *stem-loop*-Struktur gebildet wird (siehe Abbildung 10).

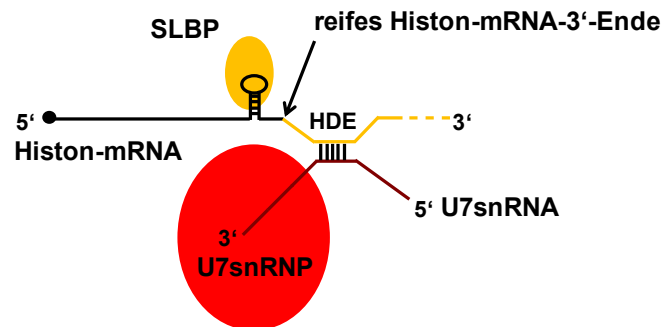


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Histon-mRNA-Prozessierung

Die Prä-Histon-mRNA wird am *stem-loop* von dem *stem-loop binding protein* (SLBP) und am HDE von dem U7snRNP-Komplex gebunden, wobei die U7snRNA partiell mit dem HDE hybridisiert. Die Prozessierung zur reifen Histon-mRNA erfolgt durch eine endonukleolytische Spaltung zwischen den beiden Elementen. Die Position des reifen Histon-mRNA-3'-Endes ist durch einen Pfeil angezeigt.

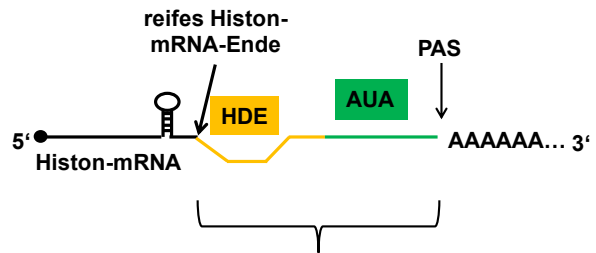
Sowohl die Microarray- als auch die qRT-PCR-Ergebnisse lieferten erste Anhaltspunkte, dass polyadenylierte Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen angereichert vorliegen. Es war daher von Interesse, an welcher Stelle der Poly(A)-Schwanz in polyadenylierten Histon-mRNAs angefügt wird und ob es sich bei den Polyadenylierungsstellen in PARN-depletierten Zellen um bereits beschriebene oder unbekannte Polyadenylierungsstellen handelt.

Aus diesem Grund wurde 72 Stunden nach der Transfektion von U2OS-Zellen mit PARN-spezifischer siRNA RNA isoliert. Anschließend wurde die RNA mit Hilfe eines oligo(dT)₁₆-Adapter-Primers in cDNA umgeschrieben und spezifische Histon-Sequenzen in einer PCR und nachfolgenden *nested*-PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden kloniert und die 3'-Enden sequenziert. Dabei wurden u.a. auch Histon-mRNAs analysiert, die bereits in den qRT-PCR-Messungen nach dem PARN-kd eine Anreicherung zeigten. Die Sequenzierergebnisse aller analysierten Histon-mRNAs sind in der Abbildung 11 A zusammengefasst.

A)

Histon-mRNA	Anzahl an Sequenzen	potenzielles Poly(A)-signal	Distanz zum reifen Histon-3' Ende (nt)
Hist1H1C	2	AATAAA	33*
	1	AATAAA	34*
Hist1H2BC	1		3*
	1	CATAAT	350*
Hist1H2AB	1	AGCAAA	0*
Hist1H2AJ	1	AAAAA	63*
Hist1H2BN	1		388*
Hist1H2BK	1	AATAAA	0*
Hist1H3A	2	AGTAAA	17
Hist1H3H	1		2
Hist1H3D	16	TATAAA	31
	1	TATAAA	43
Hist1H4J	2	AATAAA	1*
	1	AATAAA	2*
	1	AATAAA	15*
Hist2H2AA	4	AATAAA	31*
	4	AATAAA	35*
	1	AATAAA	41-39*
Hist2H2AC	2	AATAAA	0*
Hist2H4A (Hist1H4B)	1		-2*

B)



C)

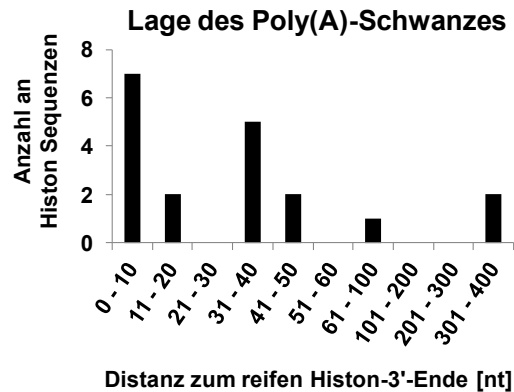


Abbildung 11: Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs

RNA wurde 72 Stunden nach der Transfektion mit der PARN1-siRNA aus U2OS-Zellen isoliert und für die reverse Transkription unter Verwendung des oligo(dT)₁₆-Adapter-Primers verwendet. Spezifische Histon-mRNA-Sequenzen wurden mit histonspezifischen Primern und dem Adapter-Primer in einer PCR-Reaktion und einer nachfolgenden *nested*-PCR amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden in einen Vektor kloniert und mit dem Adapter-Primer sequenziert. (A) Die Sequenzierergebnisse für die polyadenylierten Histon-mRNAs sind tabellarisch zusammengefasst. Angegeben sind die jeweiligen Histon-mRNAs, die Anzahl an Sequenzen, das identifizierte, potenzielle Polyadenylierungssignal und die Distanz zwischen reifem Histon-mRNA-Ende und der Polyadenylierungsstelle (PAS). Bereits publizierte PAS sind mit * markiert.

(B) Schematische Darstellung einer typischen polyadenylierten Histon-mRNA, bestehend aus dem Histon-Leseraster, der *stem-loop*-Struktur, dem HDE, dem Polyadenylierungssignal (AUA) und der PAS. Das reife Histon-mRNA-Ende und die PAS der missprozessierten Histon-mRNA sind jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

(C) Dargestellt ist die Anzahl der unterschiedlichen Histon-mRNAs zur Lage des Poly(A)-Schwanzes in Relation zum reifen Histon-mRNA-Ende (Hist2H4A nicht enthalten). Daten: C.Weißbach [Hist1H1C, Hist2H2AA, Hist1H3D, Hist1H4J, Hist2H2AC], weitere Daten: L.Anders

In Abbildung 11B ist das Schema einer typischen, polyadenylierten Histon-mRNA gezeigt. Sie besteht aus dem 5'-UTR, dem offenen Histon-Leseraster, dem 3'-UTR, welcher die *stem-loop*-Struktur einschließt, gefolgt von dem HDE, einigen weiter 3' gelegenen Nukleotiden und dem Poly(A)-Schwanz.

In 16 der 20 Histon-mRNA-Sequenzen konnte 5' der Polyadenylierungsstelle ein kanonisches Polyadenylierungssignal (AAUAAA) oder eine sehr ähnliche Sequenz identifiziert werden. Als potenzielle Polyadenylierungssignale gelten Elemente, die sich von der Konsensussequenz A(A/U)UAAA in höchstens zwei Nukleotiden unterscheiden. Der Poly(A)-Schwanz wurde 3' zum regulären Histon-mRNA-Ende angefügt. Die einzige Ausnahme bildet die Hist2H4A-RNA, bei der der Poly(A)-Schwanz 2 Nukleotide stromaufwärts zum regulären 3'-Ende detektiert wurde. Für die meisten der sequenzierten Histon-mRNAs befindet sich zusätzliche genomische Sequenz zwischen regulärem Histon-mRNA-Ende und dem Beginn des Poly(A)-Schwanzes. Der Poly(A)-Schwanz wird für die Mehrzahl dieser Histon-mRNAs bis 50 Nukleotide nach dem regulären Ende angefügt. Für drei Histon-mRNAs (Hist1H2AB, Hist1H2BK, Hist2H2AC) wurde jedoch der Poly(A)-Schwanz direkt am reifen Histon-mRNA-3'-Ende detektiert, wobei hier das Signal für die Polyadenylierung auch 5' vom *stem-loop* liegt und somit wahrscheinlich die Polyadenylierungsstelle determiniert. Für die zwei weiteren Histon-mRNA-Sequenzen (Hist1H2BC und Hist1H2BN) wurde der Poly(A)-Schwanz hunderte von Nukleotiden 3' des regulären Histon-3'-mRNA-Endes identifiziert. Es wurden insgesamt 16 Histon-mRNA-Sequenzen durch ein * markiert, deren Polyadenylierungsstellen bereits 2011 publiziert wurden (Shepard *et al.*, 2011).

Für die vier Transkripte Hist1H2BC, Hist1H2BN, Hist1H3H und Hist2H4A konnte allerdings kein Polyadenylierungssignal identifiziert werden. Für die Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion spielt neben dem Polyadenylierungssignal auch das Vorhandensein eines GU-reichen Elementes, welches sich 5' der Spaltstelle befindet, eine Rolle (Nunes *et al.*, 2010). Mit Hilfe von Datenbankeinträgen war es möglich, die genomischen Histonsequenzen im Hinblick auf das Vorhandensein eines GU-reichen Elementes zu analysieren. Für alle sequenzierten Histon-mRNAs existiert eine GU-reiche Sequenz auf genomischer Ebene, die zwischen 9 und 83 Nukleotiden 3' zur Polyadenylierungsstelle lokalisiert ist. Da es sich bei den 13 verschiedenen Histon-mRNAs um willkürlich ausgesuchte Histon-mRNAs handelt, kann man unter der Voraussetzung, dass die vorhandenen Sequenzen repräsentativ sind, auch

Rückschlüsse auf weitere Histon-mRNAs ziehen. So würde man für weitere polyadenylierte Histon-mRNAs erwarten, dass die Mehrzahl von ihnen den Poly(A)-Schwanz nahe dem reifen Histon-mRNA-Ende trägt. Allerdings lässt sich aufgrund der geringen Anzahl an Sequenzen für die verschiedenen Histon-mRNAs nicht zwingend der Schluss ziehen, dass es sich bei diesen analysierten Histon-mRNA-Sequenzen tatsächlich um repräsentative, missprozessierte Histon-mRNA-Sequenzen handelt.

5 Verifizierung der Sequenzierdaten mittels RPA

Die Sequenzierergebnisse haben aufgezeigt, dass polyadenylierte Histon-mRNAs den Poly(A)-Schwanz nahe des regulären Histon-3'-Endes tragen.

Aufgrund der geringen Anzahl an Sequenzen konnte jedoch nicht geschlussfolgert werden, dass es sich bei den gefundenen Histon-Sequenzen um repräsentative Ergebnisse im Hinblick auf die identifizierten Polyadenylierungsstellen handelt.

Aus diesem Grund wurde ein *ribonuclease protection assay* (RPA) durchgeführt. Er bietet die Möglichkeit, bei entsprechendem Sondendesign die 3'-Enden von RNAs zu analysieren und Aussagen im Hinblick auf die Abundanz von polyadenylierten Histon-mRNAs zu treffen. Auf Grundlage der Sequenzierergebnisse wurde eine Sonde entworfen, die sowohl komplementär zum 3'-Ende der reifen Histon-mRNA ist, als auch zu weiter 3' gelegenen genomischen DNA-Sequenzen (siehe Abbildung 13A). Die Sonde reicht damit über die erwartete Polyadenylierungsstelle der missprozessierten Histon-mRNA hinaus, wodurch es im RPA möglich wird, die tatsächliche Polyadenylierungsstelle eindeutig zu identifizieren, sofern diese in diesem Bereich vorhanden ist.

Prinzipiell hybridisiert im RPA die radioaktiv markierte Histon-Sonde sowohl mit der korrekt prozessierten als auch mit der polyadenylierten Histon-mRNA. Man spricht bei den RNA-Abschnitten, die komplementäre Basenpaare mit der Sonde ausbilden, von geschützten Fragmenten, da sie in der nachfolgenden RNaseA/T1-Behandlung nicht degradiert werden können. Nicht protektierte Fragmente hingegen werden verdaut (siehe Abbildung 12).

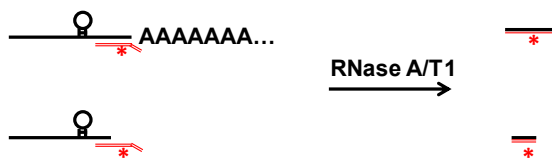


Abbildung 12: Schematische Darstellung eines *ribonuclease protection assay* (RPA)

Während des RPA hybridisiert die radioaktiv markierte Sonde (rot gekennzeichnet *) mit der korrekt prozessierten Histon-mRNA (unten) und der missprozessierten Histon-mRNA (oben). Nicht protektierte Fragmente werden durch eine RNaseA/T1-Behandlung degradiert, protektierte Fragmente bleiben hingegen intakt.

Die protektierten Fragmente können in einem denaturierenden Polyacrylamid-Harnstoffgel der Größe nach aufgetrennt und analysiert werden.

Es wurden Sonden für die Hist1H1C- und die Hist2H2AA-RNA entworfen, da für diese polyadenylierten Histon-mRNAs die C_t -Werte in der qPCR am kleinsten von allen analysierten Histon-mRNAs waren. Es ist somit wahrscheinlich, dass es sich bei diesen Histon-Transkripten um relativ abundante RNAs handelt, die im RPA detektiert werden können. Für die RPA-Analysen wurden RNAs verwendet, für die die PARN-Depletion entweder mit qRT-PCR-Messungen, mit *Western-blot*-Analysen oder mit einer snoRNA63-*Northern-blot*-Analyse verifiziert wurde. Die Ergebnisse für die Hist1H1C-mRNA und die Hist2H2AA-mRNA sind in Abbildung 13B dargestellt. Es konnten zwei Signale im RPA detektiert werden, wobei die korrekt prozessierte Histon-mRNA durch das untere Dreieck und die missprozessierte Histon-mRNA durch das obere Dreiecke gekennzeichnet sind. Sie migrieren im Fall der Hist1H1C bei den erwarteten Laufhöhen. Für die Hist2H2AA-mRNA wurden Banden für die korrekt prozessierte und missprozessierte Histon-mRNA detektiert, die um zirka 10-40 Nukleotide länger sind, als es erwartet wurde. Es wäre möglich, dass eine abundantere, der Hist2H2AA-mRNA-ähnliche Histon-mRNA im RPA durch die Hist2H2AA-Sonde detektiert wird.

(Homologe) existieren, die sich in der Sequenz sehr stark ähneln. Man detektiert also möglicherweise auch andere Histon-mRNAs mit. Darüber hinaus kommt es während der Hybridisierung zu dem sog. Atmungsphänomen. Die komplementären Enden der RNA-RNA-Hybride hybridisieren und dissoziieren, wodurch sich heterogene Fragmente infolge der RNase-Behandlung bilden können.

Die Distanz zwischen der korrekt prozessierten und missprozessierten Hist1H1C-mRNA beträgt ca. 35 Nukleotide, was mit den Sequenzierdaten korreliert. Dass die missprozessierte Histon-mRNA polyadenyliert vorliegt, wird daran erkennbar, dass nur diese mRNA in der Poly(A)⁺-Fraktion zu detektieren ist, jedoch nicht in der Poly(A)⁻-Fraktion vorkommt. In der Poly(A)⁻-Fraktion befindet sich, wie erwartet, die korrekt prozessierte Histon-mRNA. Der RPA-Analyse ist weiterhin zu entnehmen, dass sich der Poly(A)-Schwanz 3' zum reifen Histon-mRNA-Ende befindet. Es wird außerdem deutlich, dass die missprozessierte Hist1H1C-RNA in PARN-depletierten Zellen gegenüber der Kontrolle angereichert vorliegt. Während der Anteil an missprozessierter Histon-mRNA zur Gesamt-Histon-mRNA in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen bei 9% liegt, steigt dieser Anteil auf 34% in PARN-depletierten Zellen an. Da das Signal für die einzelsträngige Hist1H1C-Sonde durch die RNase-Behandlung nahezu vollständig verschwindet, existiert wahrscheinlich keine längere missprozessierte Histon-mRNA, die abundanter als die bereits identifizierte, missprozessierte Hist1H1C-RNA ist. Damit handelt es sich bei der bereits sequenzierten, missprozessierten Hist1H1C-mRNA (siehe Abbildung 11) nicht um eine unterrepräsentierte, polyadenylierte Hist1H1C-mRNA, sondern um einen repräsentativen Vertreter der polyadenylierten Hist1H1C-mRNA.

Für die Hist2H2AA-mRNA sind ähnliche Beobachtungen zu machen. Hier können ebenso zwei Signale detektiert werden, wobei die korrekt prozessierte Histon-mRNA durch das untere und die missprozessierte Histon-mRNA durch das obere Dreieck angezeigt werden. Es sind sogar zwei Banden für die missprozessierte Hist2H2AA-mRNA zu erkennen. Die Zuordnung der protektierten Fragmente zu einer bereits sequenzierten und polyadenylierten Hist2H2AA-mRNA ist schwierig, da auch die Sonde etwas langsamer migriert als erwartet. Eine Abschätzung der Größe anhand der Markerbanden ist daher problematisch. Bei den zwei Banden der missprozessierten Histon-mRNA handelt es sich um polyadenylierte Histon-mRNAs, was man anhand des Auftretens in der Poly(A)⁺-Fraktion erkennt. Die

missprozessierte Hist2H2AA-mRNA ist außerdem in PARN-depletierten Zellen angereichert.

Im Gegensatz zur missprozessierten Hist1H1C mit 9% liegt der Anteil der missprozessierten Hist2H2AA-RNA an der Gesamt-Histon-mRNA-Menge mit 1,8 % in Kontroll-Zellen deutlich niedriger.

Neben der Analyse der Hist1H1C- und der Hist2H2AA-RNA wurden noch weitere Histon-mRNAs mit Hilfe des RPA analysiert (Hist1H2AB, Hist1H3D). Es war für diese RNAs möglich, die korrekt prozessierte Histon-mRNA zu detektieren. Die missprozessierte Histon-mRNA hingegen konnte nicht visualisiert werden. Möglicherweise ist die Menge der polyadenylierten Histon-mRNA zu gering, um sie mit Hilfe des RPA zu detektieren. Selbst infolge des PARN-kd wurde keine zusätzliche Bande im RPA sichtbar, die die missprozessierte Histon-RNA darstellt (Daten für Hist1H2AB nicht gezeigt). In Abbildung 14 ist der RPA für die Hist1H3D dargestellt.

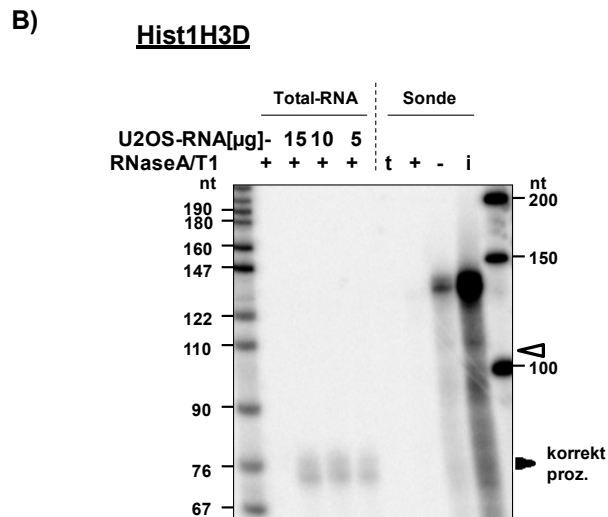
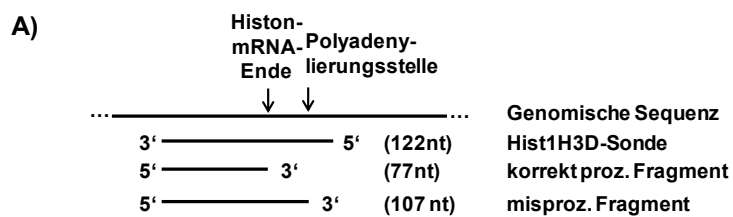


Abbildung 14: Hist1H3D-RPA

Für die Hist1H3D-RNA wurde eine RPA-Sonde hergestellt, die in A schematisch dargestellt ist. (B) Unterschiedliche Mengen U2OS-RNA wurden im Hist1H3D-RPA analysiert. Das protektierte Fragment für die korrekt prozessierte Histon-mRNA ist durch das untere Dreieck gekennzeichnet. Die erwartete Lage des missprozessierten Histon-mRNA-Fragmentes im Gel ist durch das obere Dreieck gekennzeichnet.

Es handelt sich bei dem RPA um einen sehr zuverlässigen *assay*, der die gleichzeitige Detektion polyadenylierter und korrekt prozessierter Histon-mRNAs erlaubt und in relativ wenigen Schritten die Analyse der polyadenylierten Histon-mRNAs ermöglicht. Histon-mRNAs können unter Verwendung einer spezifischen Sonde visualisiert werden, was die Bestimmung von Anreicherungs-faktoren zwischen PARN-kd-Proben und Kontroll-kd-Proben weniger fehleranfällig macht. Aus diesem Grund wurde diese Methode herangezogen, um die Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate in einem weiteren *assay* zu verifizieren.

Die Validierung der Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate mittels qRT-PCR-Messungen zeigte im Mittel eine leichte Anreicherung der polyadenylierten Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen, wobei relativ hohe Standardabweichungen zu verzeichnen waren. Nur für eine geringe Anzahl an mRNAs war diese Anreicherung statistisch signifikant. Aus diesem Grund wurde der RPA als zweite Methode gewählt, um die Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs zu verifizieren. Hierzu wurde RNA aus Zellen analysiert, bei denen der PARN-kd mit verschiedenen PARN-siRNAs bewirkt wurde. Hiermit sollten Nebeneffekte einer siRNA ausgeschlossen werden, die u.U. als Erklärung für die Anreicherung von Histon-mRNAs in Frage kommen. Es wurde darüber hinaus RNA analysiert, die aus Zellen stammt, bei denen entweder keine Transfektion erfolgte oder bei denen eine weitere Kontroll-siRNA (GFP-siRNA) transfiziert wurde. Diese Zellen dienten als weitere Kontrollen, um den Effekt der Kontroll-siRNA oder der Transfektionsprozedur auf die Histon-mRNA-Menge zu untersuchen. In Abbildung 15 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

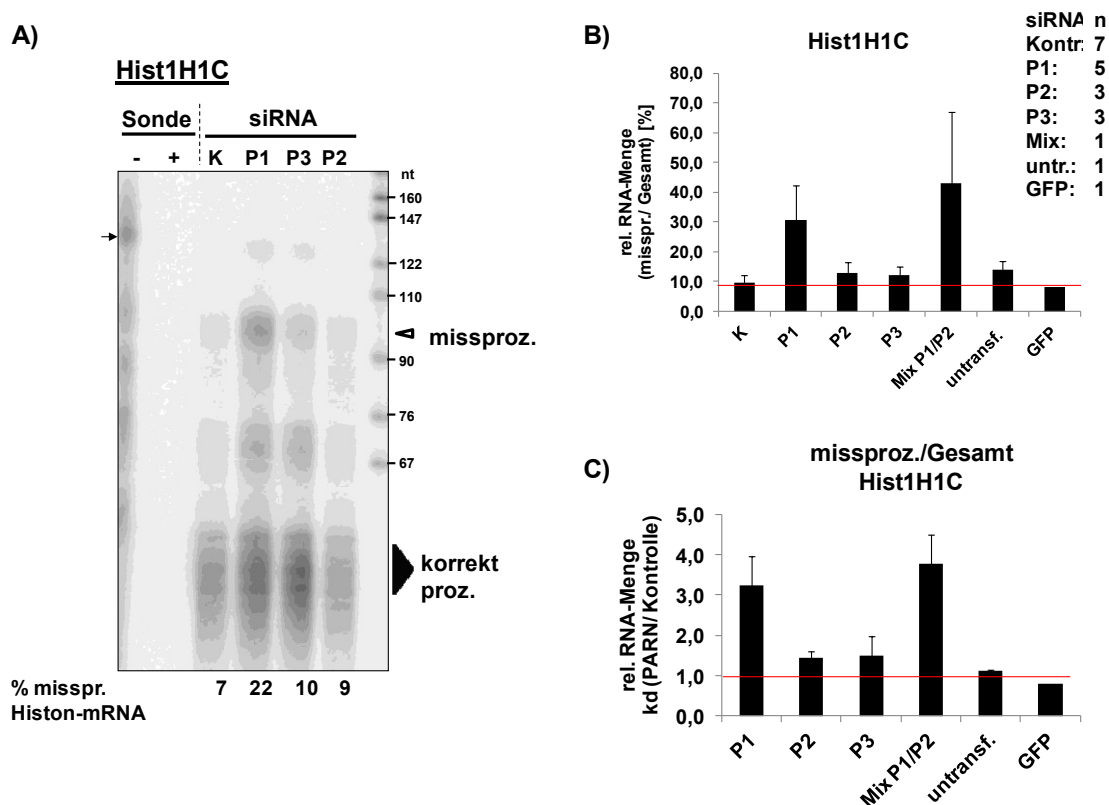


Abbildung 15: RPA-Analyse für Hist1H1C nach PARN-Depletion unter Verwendung verschiedener siRNAs

(A) Die PARN-Proteinmenge wurde in U2OS-Zellen mittels RNAi unter Verwendung verschiedener PARN-siRNAs (P1, P2, P3) reduziert. 15 µg Gesamt-RNA wurde mit einer Hist1H1C-spezifischen RPA-Sonde hybridisiert und ein RPA durchgeführt. Die protektierten Fragmente wurden in einer 12%igen Harnstoff-PAGE aufgetrennt. Sowohl die korrekt prozessierte Hist1H1C-mRNA als auch die missprozessierte Hist1H1C-mRNA sind durch Dreiecke gekennzeichnet. Das Verhältnis der Signalintensitäten aus missprozessierter zu Gesamt-Histon-mRNA ist unten angegeben (in %). Als Kontrolle wurde ein Sonden-tRNA-Gemisch mit (+) und ohne (-) RNaseA/T1 behandelt.

(B) Dargestellt ist das Verhältnis aus missprozessierter Hist1H1C-RNA zur Gesamt-Hist1H1C-mRNA für untransfizierte und transfizierte Zellen, wobei die Transfektion entweder mit GFP-siRNA (GFP), Kontroll-siRNA (K), PARN1-siRNA(P1), PARN2-siRNA(P2) oder PARN3-siRNA(P3) erfolgte. MixP1/P1 enthält RNA, die aus PARN1-kd und PARN2-kd-Zellen isoliert und anschließend gemischt wurde. n bezeichnet die Anzahl biologisch unabhängiger Experimente. Mittelwerte und Standardabweichungen für P1, P3 und K basieren auf mind. fünf RPA-Experimenten. Für alle anderen Proben resultieren die Ergebnisse aus dem Mittelwert von zwei RPA-Analysen oder einer Einfachbestimmung. (C) Dargestellt ist die rel. RNA-Menge, gebildet aus dem Verhältnis missprozessierter Hist1H1C-RNA zur Gesamt-Hist1H1C-mRNA in PARN-kd-Zellen im Vergleich zu Kontroll-kd-Zellen.

Vergleicht man den prozentualen Anteil der missprozessierten Histon-mRNA an der Gesamt-Histon-mRNA-Menge, liegen 9,5% Histon-mRNAs in Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen missprozessiert vor, während bei den Zellen, die mit einer der drei verwendeten PARN-siRNAs transfiziert wurden, im Mittel ein höherer prozentualer Anteil missprozessierter Histon-mRNAs zu beobachten ist (12,3%-30,6%). Es ist bemerkenswert, dass bei Verwendung der PARN2- und PARN3-siRNA die relativen RNA-Mengen vergleichbar sind (13%; 12,3%), während die Anreicherung bei der Verwendung der PARN1-siRNA deutlich größer ist (30,6%) und auch stärkeren Schwankungen unterliegt. In *Western-blot*-Analysen haben sich hingegen keine starken Unterschiede in der PARN-kd-Effizienz zwischen den einzelnen Experimenten gezeigt. Möglicherweise verursacht die PARN1-siRNA eine Reduktion weiterer mRNAs und damit auch eine Reduktion weiterer Proteine, die Einfluss auf die Histon-mRNA-Prozessierung nehmen und somit den höheren Prozentsatz polyadenylierter Histon-mRNAs im RPA erklären könnten.

Trotz der relativ großen Schwankungen konnte für alle verwendeten PARN-siRNAs eine erhöhte Menge polyadenylierter, missprozessierter Histon-mRNAs gegenüber den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen gezeigt werden. Der Einfluss einer zweiten Kontroll-siRNA auf den Anteil missprozessierter Histon-mRNAs zur Gesamtmenge ist relativ gering (GFP-si-RNA: 8%, Kontroll-siRNA: 9,5%). Es scheint lediglich einen kleinen Unterschied im Hinblick auf die untransfizierten Zellen zu geben. Hier ist der Anteil missprozessierter Histon-mRNAs an der Gesamt-Histon-mRNA-Menge vergleichbar mit dem Anteil missprozessierter Histon-mRNAs in PARN2- oder PARN3-siRNA-transfizierten Zellen. Die relative RNA-Menge missprozessierter Histon-mRNAs zwischen PARN-kd-Proben und Kontroll-kd-Proben ist in Abbildung 15 C dargestellt. Auch hier sind die gleichen Tendenzen zu sehen. Es gibt eine Anreicherung missprozessierter Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen gegenüber der Kontrolle (Faktor 1,4 bis 3,2). Verglichen zu den Zellen, die mit der PARN2- oder PARN3-siRNA transfiziert wurden, ist auch hier die mittlere Anreicherung der missprozessierten Histon-mRNAs in den Zellen größer, die mit der PARN1-siRNA transfiziert wurden. In wieweit diese Beobachtung auch für andere Histon-mRNAs zutrifft, kann an dieser Stelle jedoch nicht geklärt werden.

6 Einfluss der PARN-Depletion auf Prozessierungsfaktoren

Nach erfolgtem PARN-kd wurde eine Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs beobachtet. Dabei war insbesondere für die PARN1-siRNA eine stärkere Anreicherung der polyadenylierten Histon-mRNAs zu beobachten. Das Auftreten solcher polyadenylierter Histon-mRNAs kann einerseits direkt von PARN verursacht sein, es kann sich aber andererseits auch um einen sekundären Effekt handeln. So könnte in PARN-depletierten Zellen möglicherweise ein anderer Faktor reguliert sein, der die Histon-mRNA-Prozessierung stört. Folglich wäre die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs auch in diesem Fall erhöht und ließe sich auf diesen unbekanntem Faktor zurück führen. Die U7snRNA ist eine RNA, die für die Histon-mRNA-Prozessierung essentiell ist. Sie bindet im U7snRNP-Komplex das HDE der Prä-Histon-mRNA, sodass die endonukleolytische Spaltung erfolgen kann (Cotten *et al.*, 1988; Mowry & Steitz, 1987b; Schaufele *et al.*, 1986; Soldati & Schümperli, 1988).

Anhand der Microarray-Daten kann keine Aussage zur U7snRNA-Mengenänderung in PARN-depletierten Zellen getroffen werden, da keine Sonde auf dem Chip immobilisiert ist, die mit der U7snRNA hybridisieren kann. Reduzierte U7snRNA-Mengen würden ebenso zu polyadenylierten Histon-mRNAs führen (Ideue *et al.*, 2012). Um der Frage nachzugehen, ob PARN Einfluss auf die U7snRNA-Menge oder möglicherweise auf den Polyadenylierungsgrad dieser RNA nimmt, wurden *Northern-blot*-Analysen durchgeführt. RNA aus PARN-depletierten Zellen und Kontroll-Zellen wurden in einem 12%igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und nach dem Transfer auf eine Membran mit einer U7snRNA-spezifischen Sonde hybridisiert. Als Ladekontrolle diente die 7SL-RNA und zur Überprüfung der PARN-Depletion wurde die snoRNA63-RNA analysiert. Die Signalintensitäten wurden für die U7snRNA und die snoRNA63 durch Normalisierung auf die 7SL-RNA quantifiziert. Das Ergebnis ist in Abbildung 16 dargestellt.

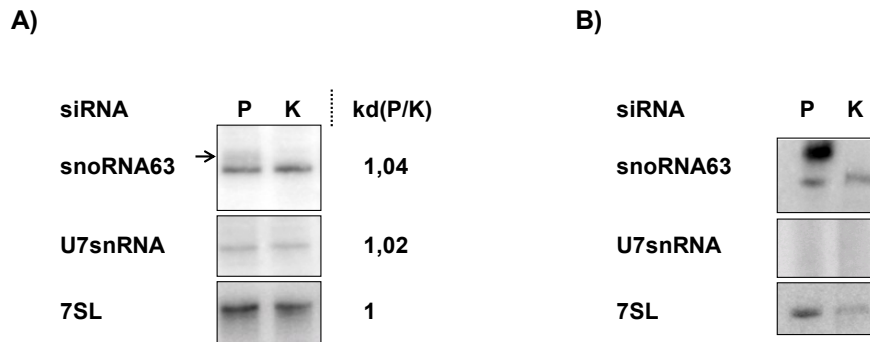


Abbildung 16: Einfluss der PARN-Depletion auf die U7snRNA-Menge

U2OS-Zellen wurden mit PARN1-siRNAs transfiziert. Parallel wurden Kontroll-Zellen mit Kontroll-siRNA transfiziert und 72 Stunden danach RNA isoliert. 1 µg Gesamt-RNA wurde in einer 12%igen Harnstoff-PAGE aufgetrennt. Für die *Northern-blot*-Analyse wurden spezifische Sonden für die U7snRNA, die snoRNA63 und die 7SL-RNA verwendet. Die 7SL-RNA dient als Ladekontrolle und die snoRNA63-RNA als Positivkontrolle für den PARN-kd.

(A) Die Signalintensitäten zwischen PARN-kd (P) und Kontroll-kd (K) wurden bestimmt und durch Normalisierung auf die 7SL-RNA quantifiziert. Die oligoadenylierte snoRNA63 ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. (B) *Northern-blot*-Analyse der Poly(A)⁺-RNA aus PARN-kd-Proben und Kontroll-kd-Proben

In PARN-depletierten Zellen ist die Menge der U7snRNA gegenüber den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen nicht verändert. Weiterhin zeigt sich auch keine zusätzliche Bande oberhalb der U7snRNA-Bande, was auf oligoadenylierte U7snRNA-Varianten hindeuten könnte. Das relativ starke Hintergrundsignal erschwert jedoch die Analyse nach einer weiteren Bande oberhalb der reifen U7snRNA. Für die snoRNA63 war hingegen in den PARN-kd-Proben neben der reifen snoRNA63 auch ein Signal für oligoadenylierte snoRNA63-Moleküle zu erkennen. In Kontroll-Zellen fehlte dieser zusätzliche „Schmier“. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass der PARN-kd effizient genug war, um eine Änderung der oligoadenylierten snoRNA63-Menge zu bewirken, aber keine Änderung der U7snRNA-Menge zu zeigen. Möglich wäre es auch, dass nur eine geringe Population der U7snRNA polyadenyliert vorliegt, aber selbst die Analyse einer Poly(A)⁺-Präparation, die aus PARN-depletierten Zellen hergestellt wurde, zeigte kein Signal für die U7snRNA, sodass es eher unwahrscheinlich ist, dass die U7snRNA polyadenyliert vorliegt und möglicherweise von PARN reguliert sein könnte (siehe Abbildung 16B).

Neben der U7snRNA gibt es eine Vielzahl weiterer Faktoren, die an der Histon-mRNA-Prozessierung mitwirken. SLBP, FLASH, ZFP100, Lsm10 und Lsm11, NPAT, und NELF sind als Proteine beschrieben, deren Reduktion zum Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs führt. Die vergleichenden Microarray-Studien wurden zur Analyse der RNA-Mengenänderung weiterer Prozessierungsfaktoren verwendet und die Ergebnisse dazu sind in Tabelle 20 dargestellt.

Tabelle 20: RNA-Mengenänderung weiterer Prozessierungsfaktoren nach PARN-kd

Die mittleren RNA-Mengenänderungen zwischen PARN-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen sind für verschiedene Prozessierungsfaktoren angegeben, die eine Rolle bei der Prozessierung von Histon-mRNAs spielen. Zusätzlich sind die Bezeichnungen der Sondensets und die entsprechenden Irrtumswahrscheinlichkeiten (p-Werte) der drei Microarray-Sets aufgeführt.

Prozessierungsfaktor	<i>knockdown</i> (PARN/Kontrolle)			Prozessierungsfaktor	<i>knockdown</i> (PARN/Kontrolle)		
	Sondensatz	Mas5	p		Sondensatz	Mas5	p
FLASH	222201_s_at	0,55	0,06	CPSF-73	225082_at	1,01	0,89
Lsm10	225593_at	1,05	0,88	CstF77	203947_at	1,29	0,60
Lsm11	241599_at	1,25	0,29	CstF77	229666_s_at	0,88	0,56
NELF	230189_x_at	1,42	0,20	CPSF-160	201638_s_at	1,42	0,56
NPAT	211584_s_at	0,73	0,16	CPSF-100	225994_at	0,91	0,51
NPAT	211585_at	0,57	0,75	CstF64	204459_at	0,89	0,11
SLBP	206052_s_at	0,89	0,42	CstF64	238821_at	1,20	0,69
ZFP100	213130_at	0,82	0,52	CPSF-30	206688_s_at	1,11	0,69
ZFP100	213124_at	1,62	0,09	Fip1	1554424_at	0,98	0,91
				Fip1	221007_s_at	0,91	0,41

Für die meisten der analysierten Faktoren bewirkt der PARN-kd keine signifikante Reduktion der RNA-Menge. Anders sieht es für die FLASH-mRNA aus. Hier liegt eine durchschnittliche Reduktion der mRNA-Menge auf 55% vor, wobei diese Verminderung auch nur eine geringe Irrtumswahrscheinlichkeit aufweist. Aus diesem Grund wurde die FLASH-mRNA-Menge in PARN-kd-Zellen und Kontroll-kd-Zellen näher analysiert.

Es wurde RNA aus PARN-siRNA- und Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen für qRT-PCR-Messungen verwendet. Zur Reduktion der PARN-Proteinmenge wurde entweder die PARN1- oder die PARN3-siRNA benutzt.

Anhand der Abbildung 17 wird deutlich, dass nach erfolgtem PARN-kd keine statistisch signifikante Reduktion des FLASH-mRNA-Levels gegenüber den Kontroll-Zellen zu beobachten ist.

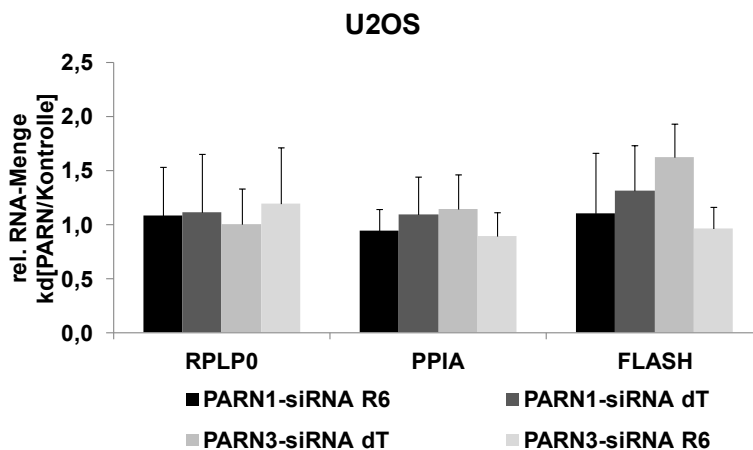


Abbildung 17: Einfluss des PARN-kd auf die FLASH-mRNA-Menge

Die PARN-Proteinmenge wurde durch RNAi in U2OS-Zellen reduziert. Es wurde dafür sowohl die PARN1- als auch die PARN3-siRNA verwendet. 72 Stunden nach der siRNA-Transfektion wurde RNA isoliert und cDNA mit Hilfe von *Random-Hexamer-Primer* (R6) oder oligo(dT)₁₂-Primer (dT) generiert. Mit FLASH-spezifischen Primern wurde die FLASH-RNA-Menge mittels qPCR-Messungen quantifiziert, wobei RPLP0 und PPIA als Normalisierungsgene verwendet wurden. Dargestellt sind die relativen RNA-Mengen zwischen PARN-depletierten Zellen im Vergleich zu Kontroll-Zellen. Angegebene Mittelwerte und Standardabweichungen resultieren aus vier biologisch unabhängigen Experimenten.

Weder für die durch PARN1-siRNA bewirkte PARN-Reduktion noch für den *knockdown*, der mit der PARN3-siRNA bewirkt wurde, ließ sich eine verminderte FLASH-mRNA-Menge nachweisen, obwohl die Menge der polyadenylierten Histon-mRNAs in zwei Experimenten mit der PARN3-siRNA und in vier Experimenten mit der PARN1-siRNA angereichert vorlagen. Auch die *Western-blot*-Analysen haben eine Reduktion der PARN-Proteinmenge auf mind. 10% in allen Experimenten ergeben. Aufgrund der unveränderten FLASH-mRNA-Menge ist es unwahrscheinlich, dass eine reduzierte FLASH-Proteinmenge für die erhöhten Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen verantwortlich ist.

An der korrekten Histon-Prozessierung sind aber nicht nur die bereits erwähnten Faktoren beteiligt, sondern auch einige Proteine, die an dem allgemeinen Spaltungs- und Polyadenylierungsprozess von mRNAs mitwirken.

Für die Polyadenylierungsfaktoren, die im Zusammenhang mit der Histon-mRNA-Prozessierung stehen, wurden die Microarray-Daten hinsichtlich einer mRNA-Mengenänderung analysiert (siehe Tabelle 20, rechte Seite).

Keiner der aufgelisteten Faktoren zeigt eine statistisch signifikante RNA-Mengenreduktion in PARN-kd-Zellen an, womit eine Änderung der Proteinmenge infolge reduzierter RNA-Mengen unwahrscheinlich ist. Folglich sind diese Faktoren vermutlich nicht für die erhöhten Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs verantwortlich. Zu WDR33 sind keine Aussagen möglich, da das eine Sondenset für WDR33 eine *absent*-Klassifikation in allen Proben aufweist.

7 Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge polyadenylierter Histon-mRNAs

Anhand des RPA-Ergebnisses konnte zumindest für die Hist1H1C-RNA gezeigt werden, dass die missprozessierte Histon-mRNA polyadenyliert vorliegt. Ob missprozessierte Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen einen relativ langen Poly(A)-Schwanz besitzen oder ob der Poly(A)-Schwanz nur aus wenigen Nukleotiden besteht, wie es für die snoRNA63 gezeigt werden konnte, ist noch nicht umfassend untersucht. Aus diesem Grund wurde eine *Northern-blot*-Analyse durchgeführt, um die Länge des Poly(A)-Schwanzes von Histon-mRNAs zu bestimmen.

Für die Analyse wurden die Hist2H2AA- und die Hist1H1C-mRNA untersucht, da es für diese RNAs bereits mit dem RPA gelungen war, missprozessierte Histon-mRNAs zu visualisieren. RNA aus Kontroll-kd und PARN-kd-Zellen wurde für die Untersuchung verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 18 dargestellt.

Bei Verwendung einer Hist1H1C-spezifischen Oligonukleotid-Sonde konnte die korrekt prozessierte Hist1H1C-mRNA in Gesamt-RNA-Präparationen detektiert werden. Es hatte sich in RPA-Analysen bereits gezeigt, dass die Abundanz der missprozessierten Histon-mRNA eher gering gegenüber der korrekt prozessierten Hist1H1C-mRNA ist. Aus diesem Grund kann die polyadenylierte Hist1H1C-mRNA wahrscheinlich auch nicht in der Gesamt-RNA-Präparation detektiert werden. Um die polyadenylierte Histon-mRNA dennoch zu visualisieren, wurde daher eine Oligo(dT)-Selektion durchgeführt und das Eluat und der Durchfluss wurden analysiert. In der Poly(A)⁺-Fraktion konnte bei Verwendung der Hist1H1C-Sonde ein bis zu 200

Nukleotide langer „Schmier“ detektiert werden, der die polyadenylierte Hist1H1C-mRNAs repräsentiert.

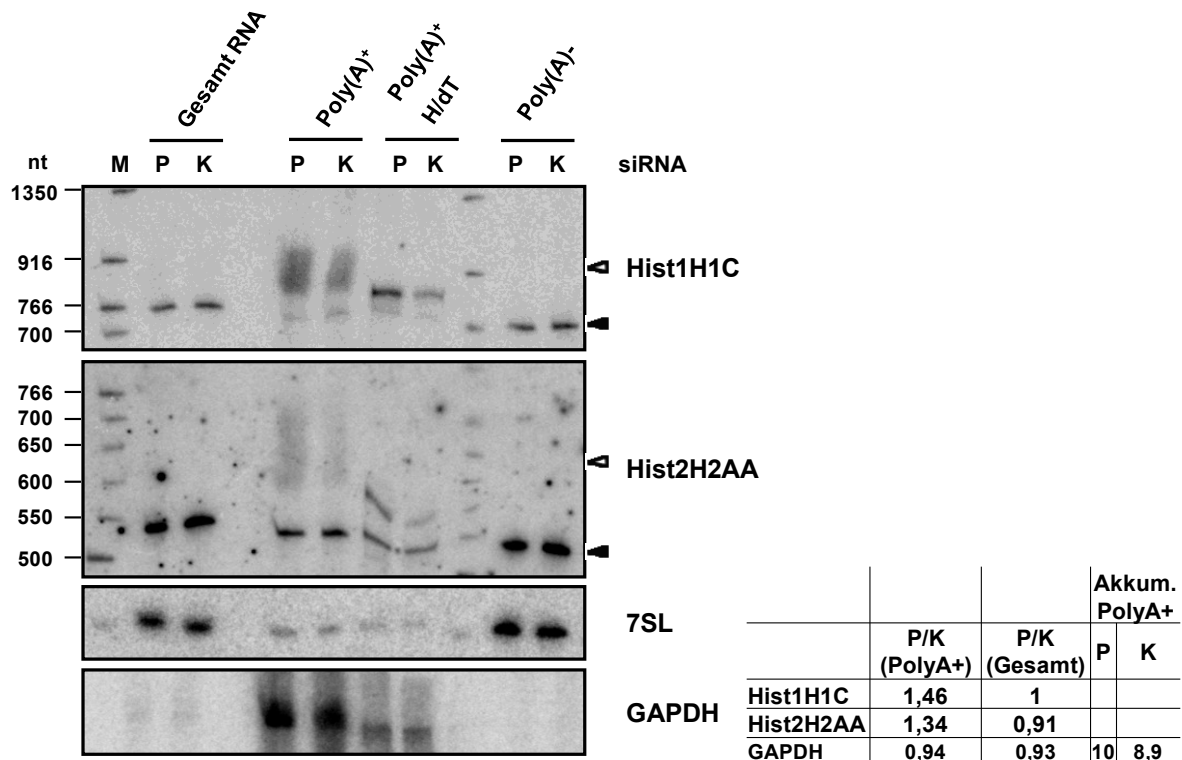


Abbildung 18: Analyse der Poly(A)-Schwanzlänge polyadenylierter Histon-mRNAs

RNA wurde aus U2OS-Zellen isoliert und gemischt, bei denen der PARN-kd (P) mit der PARN1-siRNA oder der PARN2-siRNA bewirkt wurde. Parallel dazu wurde aus Kontrollzellen (K) RNA isoliert. Beide RNA-Präparationen wurden mittels oligo(dT)-Cellulose fraktioniert. 15µg Gesamt-RNA und 15µg Poly(A)⁻-RNA, sowie 0,5 µg Poly(A)⁺-RNA (komplettiert mit 14,5µg tRNA) wurden in einer 5%igen Harnstoff-PAGE aufgetrennt und im *Northern-blot* analysiert. Ebenso wurden Proben geladen, bei denen 0,5µg Poly(A)⁺-RNA zuvor einem RNaseH/dT-Verdau unterzogen wurden. Für die *Northern-blot*-Analyse wurden zwei verschiedene Histon-Sonden verwendet (Hist2H2AA, Hist1H1C). Missprozessierte Histon-mRNAs sind durch ein weißes Dreieck gekennzeichnet, korrekt prozessierte Histon-mRNAs durch ein schwarzes Dreieck. Als Ladekontrollen wurden die 7SL-Sonde und die GAPDH-Sonde verwendet. Das dargestellte Ergebnis ist für zwei biologisch unabhängige Experimente repräsentativ. Das Verhältnis der Signalintensitäten zwischen PARN-kd-Proben und den Kontroll-kd-Proben wurde quantifiziert und ist rechts dargestellt.

Dieser „Schmier“ konnte in einem RNaseH/dT-Verdau unter Verwendung eines oligo(dT)₁₂-Primers zu einer distinkten Bande reduziert werden. Diese Bande hatte ein etwas langsames Migrationsverhalten als die korrekt prozessierte Hist1H1C-

mRNA. Die Distanz zur korrekt prozessierten Histon-mRNA beträgt ca. 30 Nukleotide. Man kann damit schlussfolgern, dass die polyadenylierte Hist1H1C-mRNA einen bis zu 200 Nukleotide langen Poly(A)-Schwanz besitzt, der nicht am regulären Histon-mRNA-Ende angefügt wird, sondern ca. 30 Nukleotide nach dem reifen Histon-mRNA-Ende. Somit kann auch mit der *Northern-blot*-Analyse gezeigt werden, dass polyadenylierte Histon-mRNAs missprozessiert sind. Dieses Ergebnis korreliert überdies mit den Sequenzier- und RPA-Resultaten (siehe Kapitel III, Abschnitt 5 und 4). In Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen ist die Menge der polyadenylierten Histon-mRNAs geringer als in den PARN-depletierten Zellen, was anhand der Quantifizierung deutlich wird. Als Ladekontrolle und zur Überprüfung der oligo(dT)-Selektion wurden die GAPDH-mRNA und die 7SL-RNA im *Northern-blot* analysiert. Wie erwartet ist die GAPDH-mRNA in der Poly(A)⁺-Fraktion mit einem Faktor von 8,9 in den Kontroll-Zellen angereichert. Da die 7SL-RNA hingegen keinen Poly(A)-Schwanz besitzt, ist lediglich ein schwaches Signal in der Poly(A)⁺-Fraktion detektierbar, was auf einer Kontamination der Poly(A)⁺-RNA mit Poly(A)⁻-RNA beruht. Für die Hist2H2AA-mRNA konnten ähnliche Beobachtungen wie für die Hist1H1C-RNA gemacht werden. Die polyadenylierte Histon-mRNA ist erst in der Poly(A)⁺-Fraktion sichtbar, wohingegen die korrekt prozessierte Histon-mRNA bereits in Gesamt-RNA-Präparationen detektiert werden kann. Der „Schmier“, der die polyadenylierte Histon-mRNA repräsentiert, ist auch hier bis zu 200 Nukleotide lang. Die missprozessierte Histon-mRNA ist auch im Fall der Hist2H2AA-RNA infolge der PARN-Depletion gegenüber der Kontrolle angereichert. Mit Hilfe der *Northern-blot*-Analyse wird auch die Polyadenylierungsstelle erkennbar. Sie befindet sich ca. 30-40 Nukleotide 3' zum reifen Histon-mRNA-Ende, womit die Sequenzierdaten bestätigt werden (siehe Abbildung 11). Anhand der geringeren Signalintensität für die Hist2H2AA-RNA im Vergleich zur Hist1H1C-mRNA lässt sich überdies abschätzen, dass der Anteil der missprozessierten Histon-mRNA zur Gesamt-Histon-mRNA-Menge geringer ist als für die Hist1H1C, was auch die RPA-Analysen bereits angedeutet haben.

Die Menge korrekt prozessierter Histon-mRNAs ist nach erfolgter PARN-Depletion und nach der Normalisierung auf GAPDH für die Hist2H2AA und die Hist1H1C unwesentlich verändert.

8 Einfluss des Polyadenylierungssignals und des GU-reichen Elementes auf die Polyadenylierung von Histon-mRNAs

Die Tatsache, dass der Poly(A)-Schwanz der Histon-mRNAs relativ lang ist und oft ein Polyadenylierungssignal 5' der Polyadenylierungsstelle identifiziert werden konnte (siehe Kapitel III, Abschnitt 4 und 7), macht es wahrscheinlich, dass die kanonische Polyadenylierungsmaschinerie in den Prozess der Histon-mRNA-Polyadenylierung involviert ist.

Um diese Hypothese zu prüfen, sollte der Einfluss des Polyadenylierungssignals und des GU-reichen Elementes auf die Polyadenylierung von missprozessierten Histon-mRNAs mit Hilfe von Reporter-Experimenten untersucht werden. Dazu wurden Histon-Reporter auf Grundlage der humanen genomischen Struktur des Hist2H2AA-Gens kloniert. Sie sind in Abbildung 19A schematisch dargestellt.

Die Histon-Reporter enthalten neben dem 5'-UTR, dem Histon-Leseraster (Histon-ORF), dem Histon-3'-UTR (einschließlich der Histon-*stem-loop*-Struktur) auch einen weiter 3' gelegenen genomischen Sequenzabschnitt. Diese weiter 3' gelegene Sequenz umfasst das HDE, das Polyadenylierungssignal (AAUAAA) und das GU-reiche Element. Insgesamt beträgt die Länge der 3' gelegenen Sequenz nach regulärem Histon-mRNA-Ende im Histon-Reporter 186 Nukleotide. Es sind somit sowohl Histon-Prozessierungs-Elemente als auch mRNA-Polyadenylierungselemente in den Reportern vorhanden, was auch der humanen genomischen Struktur entspricht. Zur Unterscheidung zwischen der endogenen Hist2H2AA-RNA und der exogenen H2AA-mRNA wurde zusätzlich noch ein flag-tag am Ende des offenen Leserasters hinzugefügt. Darüber hinaus führt die Klonierung der Histon-Sequenz in die MCS des Vektors dazu, dass durch die Lage zur TATA-Box die exogenen, prozessierten Histon-mRNAs ca. 170 Nukleotide länger sind als die entsprechenden endogenen Hist2H2AA-mRNAs.

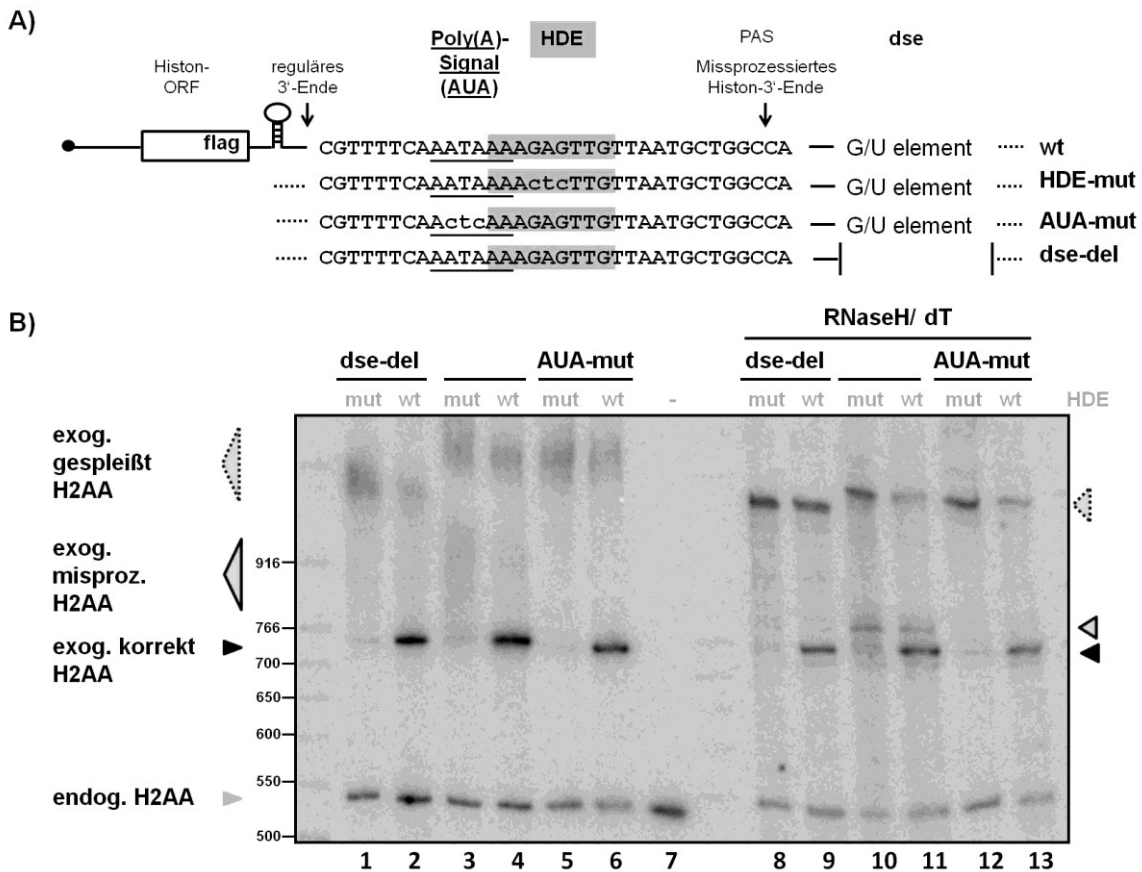


Abbildung 19: Einfluss des Polyadenylierungssignals und des GU-reichen Elementes auf die Polyadenylierung von Histon-mRNAs

Die verwendeten Histon-Reporter sind in (A) schematisch dargestellt. Sie stehen unter der Kontrolle eines Tetracyclin-regulierten Promotors und bestehen aus einem Histon-Leseraster (Histon-ORF) mit flag-tag, den 3'-UTR, sowie weiter 3' gelegenen Sequenzen, einschließlich dem HDE, dem AUA und dem GU-reichen Element (dse). Sie enthalten entweder die Wildtyp- oder mutierte HDE-Sequenz. AUA-mut-Reporter tragen eine Mutation im Polyadenylierungssignal, dse-del-Reportern fehlt das dse.

(B) U2OS-Tet-off-Zellen wurden mit den in (A) aufgeführten Reportern transfiziert und unter induzierenden Bedingungen kultiviert, ehe RNA isoliert wurde. Sowohl RNA, die einem RNaseH/dT-Verdau unterzogen wurde als auch unbehandelte RNA wurde in einer 5%igen Harnstoff-PAGE aufgetrennt und im *Northern-blot* unter Verwendung der Hist2H2AA-Sonde analysiert. Verschiedene exprimierte Histon-Varianten sind durch Dreiecke angezeigt. Histon-Varianten von unten nach oben: endogene Hist2H2AA, exogen korrekt prozessierte Hist2H2AA, exogen missprozessierte Hist2H2AA, exogen missprozessierte und gespleißte Hist2H2AA. Das dargestellte Ergebnis ist repräsentativ für drei biologisch unabhängige Experimente.

Um die Analyse der Reporterexperimente zu erleichtern, sollte zunächst der Anteil polyadenylierter Histon-mRNAs erhöht werden. Dies würde einerseits die aufwändige Poly(A)⁺-Präparation ersparen und andererseits eine relativ schnelle *Northern-blot*-

Analyse ermöglichen. Es wurden daher Histon-Reporter hergestellt, die eine Mutation im HDE tragen, um höhere Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs zu produzieren (Bond *et al.*, 1991). Da sich für die Hist2H2AA das HDE und das Polyadenylierungssignal überschneiden, wurde darauf geachtet, dass die HDE-Mutation nicht das Polyadenylierungssignal verändert. Es wurden darüber hinaus Reporter mit zusätzlicher *dse*-Deletion oder Mutation im Polyadenylierungssignal generiert. U2OS-Tet-Off-Zellen wurden mit den verschiedenen Reportern transfiziert. Unter induzierenden Bedingungen wurde 24 Stunden nach der Transfektion RNA isoliert, diese RNA wurde in einer Harnstoff-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe einer spezifischen Hist2H2AA-Sonde im *Northern-blot* analysiert. Das Ergebnis ist in Abbildung 19B dargestellt. Es wurden verschiedene Histon-mRNAs im *Northern-blot* detektiert. Die endogene Hist2H2AA-mRNA ist durch das unterste graue Dreieck gekennzeichnet und dient als Ladekontrolle. Die darüber liegende Bande ist die korrekt prozessierte, exogene Hist2H2AA-mRNA, die durch ein schwarzes Dreieck angezeigt wird. Über der exogenen, korrekt prozessierten Histon-mRNA ist ein „Schmier“ zu erkennen, der die exogene, missprozessierte und polyadenylierte Histon-mRNA repräsentiert und von einem grauen Dreieck angezeigt wird. Bei der obersten Bande im Gel handelt es sich um eine gespleißte Histon-mRNA.

Die Sequenzierung dieser Bande ergab, dass diese RNA die Histon-Prozessierungselemente (*stem-loop* und HDE) und die Spaltungs- und Polyadenylierungselemente (Polyadenylierungssignal, GU-reiches Element) enthält und zusätzlich weiter 3' gelegene Sequenzen, die vom Vektor stammen (siehe Abbildung 20).

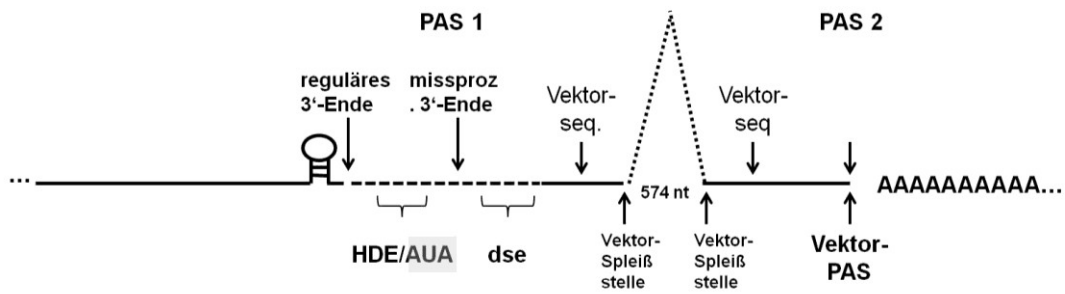


Abbildung 20: Schematische Darstellung der exogenen, gespleißten und polyadenylierten Hist2H2AA-RNA

Die cDNA-Sequenz der gespleißten Histon-mRNA beinhaltet das Histon-Leseraster, den Histon-*stem-loop*, das HDE, das Polyadenylierungssignal (AUA), das G/U-reiche Element (dse) und die weiter 3' gelegene Vektorsequenz. Die erste Polyadenylierungsstelle des Reporters (PAS1), die Spleißstellen des Vektors und die 2. Polyadenylierungsstelle innerhalb der Vektorsequenz (PAS2) sind angegeben. Eine 574 Nukleotide lange Intron-Sequenz (gestrichelt) fehlt in der gespleißten Histon-mRNA.

Sequenz: Lars Anders, Claudia Weißbach

Die in der Histon-RNA enthaltene Vektorsequenz ist dabei nicht durchgängig, sondern unterbrochen. Es fehlt ein 572 Nukleotide langer Vektorabschnitt. Diese Beobachtung deutet wiederum auf ein Spleißereignis hin. Nähere Analysen der Vektorsequenz ergaben, dass am Beginn des fehlenden Vektorabschnittes die Basensequenz GU und am Ende die Basensequenz AG vorkommt. Eben diese Basenabfolge wurde bereits für zahlreiche Introns beobachtet (GUAG-Regel). Es ist somit ein weiteres Indiz für ein Spleißereignis. Stromaufwärts zur Polyadenylierungsstelle konnte außerdem für die exogene, gespleißte RNA ein Polyadenylierungssignal identifiziert werden. Es handelt sich dabei um das erste Polyadenylierungssignal nach dem Intron. Anscheinend werden für die Bildung dieser gespleißten und polyadenylierten Histon-mRNA die Spleiß- und Polyadenylierungsstellen des Vektors benutzt. Die Tatsache, dass es zur Bildung dieser gespleißten Histon-mRNA kommt, legt die Vermutung nahe, dass das erste Polyadenylierungssignal nach der *stem-loop*-Struktur nicht stark genug ist, um eine vollständige Prozessierung an der ersten Polyadenylierungsstelle des Konstruktes zu bewirken.

Dass es sich bei den detektierten Histon-mRNA-Signalen tatsächlich um Signale handelt, die auf die Transfektion des Reporters zurück zu führen sind, lässt sich

damit belegen, dass in Spur 7 (siehe Abbildung 19B) RNA aus untransfizierten Zellen aufgetragen ist, die keine der exogenen Histon-mRNA-Signale enthält, jedoch ein Signal für die endogene Hist2H2AA-mRNA aufweist. In Abbildung 19 B auf der rechten Seite (Spur 8-13) sind die gleichen Proben wie auf der linken Seite (Spur 1-6) aufgetragen, mit dem Unterschied, dass mit diesen Proben vor der Analyse ein RNaseH/dT-Verdau durchgeführt wurde. Polyadenylierte Histon-mRNAs, die einen „Schmier“ im *Northern-blot* verursachen würden, können auf diese Weise zu einer distinkten Bande reduziert werden, womit die Analyse der missprozessierten Histon-mRNAs erleichtert wird.

Bei der Transfektion von Reportern, die die Wildtyp-HDE-Sequenz enthalten, wurden vorwiegend korrekt prozessierte Histon-mRNAs detektiert (Spur 2, 4, 6 oder 9, 11, 13). Die HDE-Mutanten hingegen (Spur 3 oder 10) produzieren vorwiegend polyadenylierte, missprozessierte Histon-mRNAs. Bei der Transfektion von Reporterkonstrukten, die zusätzlich zum mutierten HDE eine Mutation im ersten Polyadenylierungssignal oder eine Deletion im GU-reichen Element besitzen, verschwinden die polyadenylierten, missprozessierten Histon-mRNAs (Spur 1 oder 5, Spur 8 oder 12) im Vergleich zur HDE-Einzelmutante. Das verminderte Auftreten der polyadenylierten Histon-mRNAs trifft jedoch nur auf die Histon-mRNAs zu, die normalerweise an der ersten Polyadenylierungsstelle polyadenyliert werden. Zugleich erhöht sich die Signalintensität zugunsten der exogenen, gespleißten und polyadenylierten Histon-mRNA-Variante (vergl. Spur 2 zu 1, Spur 6 zu 5). Die Quantifizierung der Signalintensitäten für die Spur des Wildtyp-Reporters und der zugehörigen Mutante ergibt einen Intensitätsunterschied von 1,0 bis 1,2, so dass aufgrund dieses geringen Faktors angenommen werden kann, dass das verminderte Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs an der ersten Polyadenylierungsstelle zu einer entsprechend verstärkten Bildung polyadenylierter Histon-mRNAs an der zweiten Polyadenylierungsstelle führt.

Die Tatsache, dass die Gleichgewichtsmenge polyadenylierter, missprozessierter Histon-mRNAs bei Anwesenheit einer Deletion des GU-reichen Elementes oder einer Mutation im Polyadenylierungssignal reduziert ist, macht es wahrscheinlich, dass die kanonische Polyadenylierungsmaschinerie in den Prozess der Polyadenylierung von Histon-mRNAs involviert ist.

9 Einfluss der PARN-Depletion auf die Zellzyklusverteilung

Es wurde bereits für einige Histon-mRNA-Prozessierungsfaktoren beobachtet, dass der *knockdown* dieser Proteine zu einer veränderten Zellzyklusverteilung oder einer veränderten Zellzyklusprogression beiträgt. Beim *knockdown* von ZFP100 wurde ein Anstieg von Zellen in der G1-Phase beobachtet (Wagner & Marzluff, 2006), beim *SLBP-knockdown* hingegen war eine Akkumulation von Zellen in der S-Phase vorhanden (Wagner *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2004). Da auch nach dem PARN-kd polyadenylierte Histon-mRNAs akkumulieren, war es von Interesse, ob Zellen nach erfolgtem *knockdown* ebenso ein verändertes Zellzyklusverteilungsmuster aufweisen. In vorhergehenden Studien wurde kein Effekt des PARN-kd auf die Lebensfähigkeit von Zellen gefunden (Promotion H. Berndt, 2011). Anhand von durchflusszytometrischen Analysen sollte die Verteilung der Zellen zu den Zellzyklusphasen untersucht werden. U2OS-Zellen wurden 72 Stunden nach der Transfektion mit PARN-spezifischer siRNA oder Kontroll-siRNA mit Ethanol fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt.

Die Analyse der Zellen erfolgte im Durchflusszytometer. Die Durchflusszytometrie ist eine Methode, um eine große Zahl von Zellen hinsichtlich ihrer Eigenschaften wie Zellgröße oder DNA-Gehalt zu analysieren. Dabei passieren Zellen einzeln eine Messkammer, in die Laserlicht eingestrahlt wird. Bei der Passage des Laserlichtes wird an den Zellen das Licht gestreut. Dieses gestreute Licht wird gemessen und gibt Auskunft über die Zellgröße. Durch Fluoreszenzfarbstoffe wie Propidiumjodid, welches in doppelsträngige DNA interkaliert, kann der DNA-Gehalt einer Zelle anhand der Fluoreszenzintensität bestimmt werden. Die gemessene Fluoreszenzintensität eignet sich daher für die Bestimmung von Zellzyklusphasen. Zellen, die sich in der G2- oder Mitose-Phase befinden, fluoreszieren doppelt so stark wie Zellen, die sich in der G1- oder G0-Phase des Zellzyklus befinden. Zellen in der Synthese-Phase synthetisieren DNA, sodass die gemessene Fluoreszenzintensität zwischen der von G1- und M-Phase-Zellen liegt. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten wurden in einem Histogramm dargestellt. Das Ergebnis dieser Daten ist in Abbildung 21 zusammengefasst.

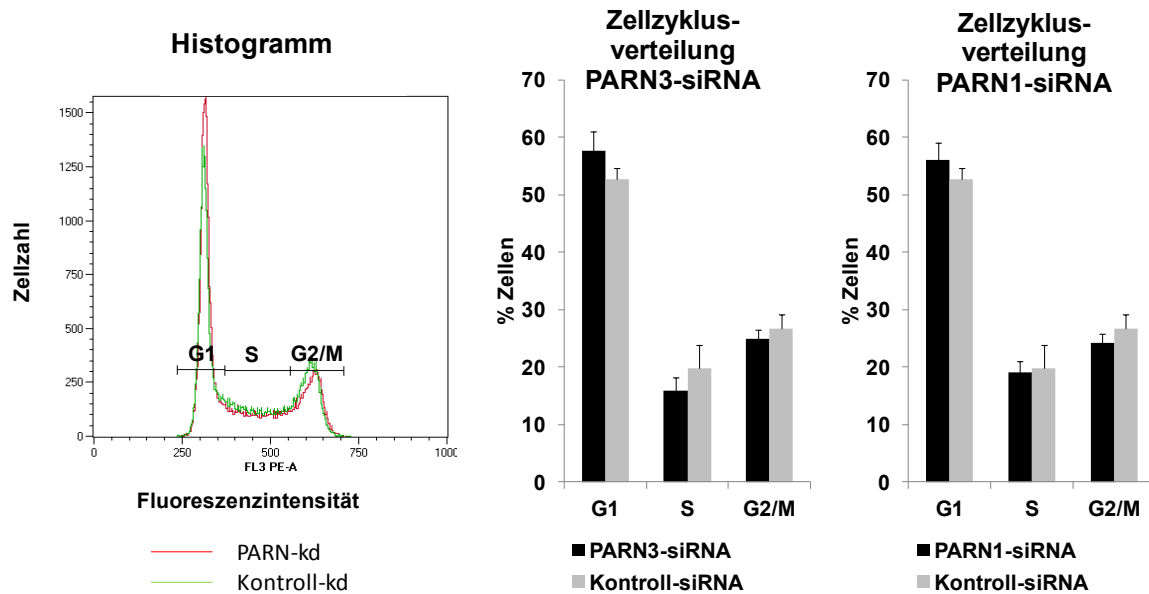


Abbildung 21: Zellzyklusverteilungsanalyse in PARN-depletierten Zellen und Kontroll-Zellen

Die PARN-Proteinmenge wurde in U2OS-Zellen in parallelen Ansätzen mit zwei verschiedenen PARN-siRNAs (PARN1 und PARN3) durch RNAi reduziert. Außerdem wurden parallel auch U2OS-Zellen mit einer Kontroll-siRNA transfiziert. 72 Stunden nach der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen mit Ethanol fixiert und mit Propidiumjodid gefärbt. Die Zuordnung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusphasen erfolgte mittels durchflusszytometrischer Analyse. Links ist ein Histogramm dargestellt, welches die Verteilung der Zellen in der G1-, S- und M/G2-Phase wiedergibt. Mittelwerte und Standardabweichung von vier biologisch unabhängigen Experimenten mit zugehöriger Standardabweichung sind in den zwei Diagrammen rechts dargestellt.

Im Vergleich zu den Kontroll-Zellen befinden sich in PARN1-siRNA-transfizierten Zellen prozentual mehr Zellen in der G1-Phase. Die gleiche Tendenz wurde auch für die zweite verwendete PARN3-siRNA festgestellt. Weiterhin sind in PARN-kd-Zellen prozentual weniger Zellen in der S- und G2/Mitose-Phase vorhanden als in den Kontroll-Zellen. Der *knockdown* von PARN trägt damit vermutlich zu einer veränderten Zellzyklusverteilung bei.

Ob diese beobachtete Tendenz auf die veränderten Mengen der polyadenylierten Histon-mRNAs zurück zu führen ist oder ob dies möglicherweise mit dem Anstieg oligoadenylierter snoRNAs erklärt werden kann, bleibt jedoch unbeantwortet.

10 Einfluss von Hydroxyharnstoff auf die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs

Da es sich bei PARN um eine 3'-Exoribonuklease handelt, liegt die Vermutung nahe, dass dieses Enzym am Abbau von polyadenylierten Histon-mRNAs beteiligt ist. Alternativ dazu wäre es auch denkbar, dass PARN an der Prozessierung der polyadenylierten Histon-mRNAs zu korrekt prozessierten Histon-mRNAs mitwirkt.

Es ist darüber hinaus auch nicht viel zum Abbau polyadenylierter Histon-mRNAs bekannt. Welche Enzyme die polyadenylierten Histon-mRNAs degradieren und zu welchem Zeitpunkt dies erfolgt, wurde noch nicht beschrieben. Es ist sowohl ein konstitutiver als auch ein zellzyklusabhängiger Abbau vorstellbar.

Eine etablierte Methode, um den Abbau von Histon-mRNAs zu induzieren, besteht in einer Hydroxyharnstoff-Behandlung. Hydroxyharnstoff (HU) inhibiert die Ribonukleotidreduktase, die bei der Synthese von dNTPs eine Rolle spielt, indem sie die Reduktion der Ribonukleosiddiphosphate zu Desoxyribonukleosiddiphosphate katalysiert. Somit kommt es nach HU-Applikation zur Inhibierung der DNA-Synthese, da keine dNTPs mehr in die neugebildeten DNA-Stränge eingebaut werden, so dass die Zellen nicht mehr die S-Phase durchlaufen können. Da es normalerweise während der S-Phase zu einem starken Anstieg der Histon-mRNA-Menge kommt, führt die HU-Behandlung in Folge der gehemmten S-Phase-Progression zu einer Abnahme korrekt prozessierter Histon-mRNAs.

Der Einfluss von HU auf die Menge missprozessierter, polyadenylierter Histon-mRNAs sollte untersucht werden, um den Abbau polyadenylierter Histon-mRNAs zu analysieren. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten mit HU wurde RNA aus Zellen isoliert und ein Hist1H1C-RPA durchgeführt. Das Ergebnis des RPA ist in Abbildung 22 dargestellt.

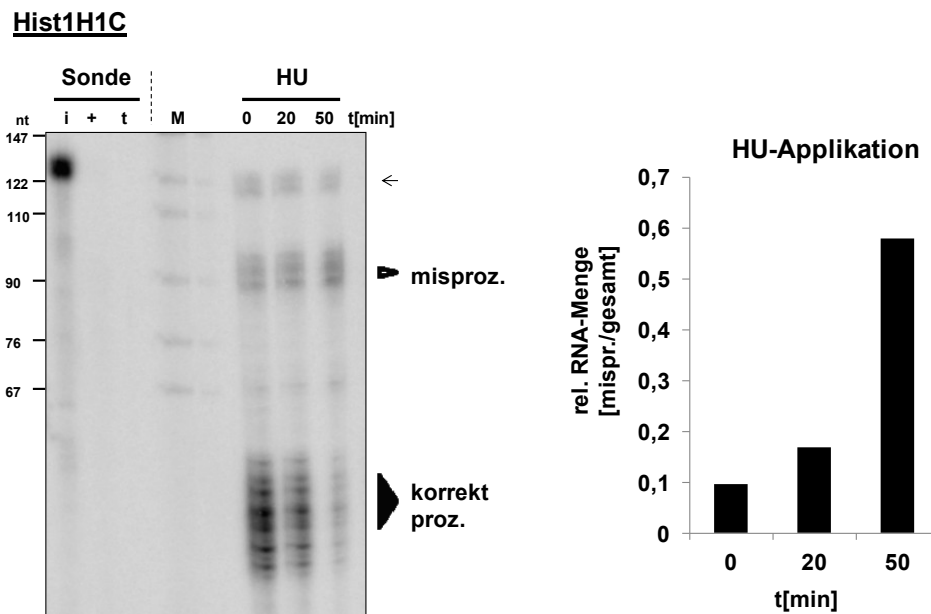


Abbildung 22: Einfluss von HU auf die polyadenylierten Histon-mRNAs

(A) HU induziert den Abbau korrektprozessierter Histon-mRNAs. U2OS-Zellen wurden mit HU inkubiert und nach unterschiedlichen Zeiten wurde RNA isoliert. Für die Analyse der Hist1H1C-mRNA-Menge wurde 15 µg Gesamt-RNA für die RPA-Analyse eingesetzt. Die protektierten Fragmente wurden in einer 12%igen Harnstoff-PAGE aufgetrennt und analysiert. Die korrektprozessierte Hist1H1C als auch die missprozessierte Hist1H1C-mRNA-Fragmente sind durch Dreiecke gekennzeichnet. Als Kontrolle wurde die Sonde (i) mit RNaseA/T1 (+) oder ein Sonden-t-RNA-Gemisch (t) mit RNaseA/T1 behandelt. Das Verhältnis der missprozessierten Histon-mRNA zur Gesamt-Histon-mRNA aus zwei biologisch unabhängigen Experimenten wurde quantifiziert und ist rechts im Diagramm als relative RNA-Menge dargestellt.

Sowohl die Menge korrektprozessierter als auch die Menge missprozessierter Histon-mRNAs wurde quantifiziert. Das Verhältnis der missprozessierten Histon-mRNA zur Gesamt-Histon-mRNA ist als relative RNA-Menge in Abhängigkeit von der Inkubationszeit mit HU in Abbildung 22 auf der rechten Seite angegeben. Wie erwartet, sinkt die Menge der korrektprozessierten Hist1H1C-mRNA bereits nach 20 min. HU-Inkubation und fällt mit längerer HU-Behandlung noch weiter ab. Die Menge der missprozessierten Histon-mRNA hingegen bleibt konstant oder steigt sogar etwas an.

Aufgrund einer fehlenden Ladekontrolle ist es schwierig, zwischen leicht steigenden und konstant bleibenden RNA-Mengen für die missprozessierte Histon-mRNA zu unterscheiden. Im Gegensatz dazu kann das Verhältnis der korrektprozessierten

Histon-mRNA zur Gesamt-Histon-mRNA quantifiziert und dargestellt werden. Dieses Verhältnis ist unabhängig von der geladenen Probenmenge. Anhand der Abbildung 22 ist zu erkennen, dass mit längerer HU-Inkubationszeit die relative Histon-mRNA-Menge steigt. In weiteren Analysen mit längeren HU-Inkubationszeiten konnte eine steigende relative RNA-Menge bis sechs Stunden nach HU-Applikationsstart beobachtet werden (Daten nicht gezeigt). Danach bleiben die RNA-Mengenänderungen konstant. Die steigenden relativen RNA-Mengen (siehe Abbildung 22) können entweder durch eine konstante Menge polyadenylierter Histon-mRNAs und gleichzeitig anhaltendem Abbau der korrekt prozessierten Histon-mRNAs erklärt werden, oder mit einer vermehrten Synthese missprozessierter Histon-mRNAs nach HU-Gabe. Da keine Informationen zur Syntheserate oder zum Abbauverhalten der polyadenylierten Histon-mRNAs vorliegen, bleiben die zwei beschriebenen Erklärungen für die steigenden relativen Histon-mRNA-Mengen möglich. Das HU-Experiment verdeutlicht jedoch, dass die Gleichgewichtsmenge der polyadenylierten Hist1H1C-mRNA nach HU-Applikation nicht mit der Gleichgewichtsmenge der korrekt prozessierten Hist1H1C-mRNA korreliert.

11 Etablierung des PARN-kd-Experimentes in synchronisierten HeLa-Zellen

Mit dem zuvor durchgeführten HU-Experiment konnte nicht geklärt werden, ob polyadenylierte Histon-mRNAs langsamer als korrekt prozessierte Histon-mRNAs abgebaut werden oder ob ein konstitutiver Abbau erfolgt. Denkbar wäre auch eine zellzyklusabhängige Regulation der polyadenylierten Histon-mRNAs, die sich in veränderten RNA-Gleichgewichtsmengen widerspiegeln könnte. Vorstellbar wäre, dass eine verstärkte Degradation der missprozessierten Histon-mRNAs während der Mitose-Phase einsetzt, denn durch die Auflösung der Kernmembran gelangen zahlreiche Proteine in das Zytoplasma und kommen in die räumliche Nähe zu polyadenylierten Histon-mRNAs, die den Abbau katalysieren könnten. Ob eine potenzielle, zellzyklusabhängige Regulation der polyadenylierten Histon-mRNAs vorliegt, sollte analysiert werden, indem Zellen synchronisiert und die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs in den unterschiedlichen Zellzyklusphasen mittels qRT-PCR bestimmt wurde. Darüber hinaus sollte der Einfluss von einem PARN-kd auf die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs im Zellzyklus analysiert werden.

Da sich die bisher verwendeten U2OS-Zellen nicht gut synchronisieren ließen, wurden HeLa-Zellen für dieses Experiment verwendet. Sie zeigten in den qRT-PCR-Messungen ebenso wie die U2OS-Zellen eine Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs nach erfolgtem PARN-kd und waren somit geeignet für diese Analyse (siehe Kapitel III, Abschnitt 3).

Die Synchronisation erfolgte mittels doppeltem Thymidinblock. Dabei wird Desoxythymidin den Zellen im Überschuss angeboten, womit eine allosterische Inhibierung der Ribonukleotidreduktase bewirkt wird. Damit wird die DNA-Synthese verlangsamt, so dass die meisten Zellen in der G1/S-Phase arretieren.

Zunächst wurde die Methode der Synchronisation in Kombination mit dem PARN-kd etabliert. Das Ziel war einerseits, einen effizienten PARN-kd zu gewährleisten und andererseits, die Zellen erfolgreich in der G1/S-Phase zu arretieren.

Dazu wurde getestet, an welchem Tag nach der siRNA-Transfektion der doppelte Thymidinblock gestartet werden sollte, sodass der effizienteste *knockdown* erzielt werden konnte. Die verschiedenen Varianten zum experimentellen Vorgehen sind in Abbildung 23A dargestellt. Es wurde entweder ein Tag, zwei Tage oder drei Tage nach der siRNA-Transfektion der erste Thymidinblock gestartet und nach Abschluss des doppelten Thymidinblockes wurden Extrakte präpariert, um anhand von *Western-blot*-Analysen die *knockdown*-Effizienz zu bestimmen. In Abbildung 23B ist das Ergebnis der *Western-blot*-Untersuchung dargestellt.

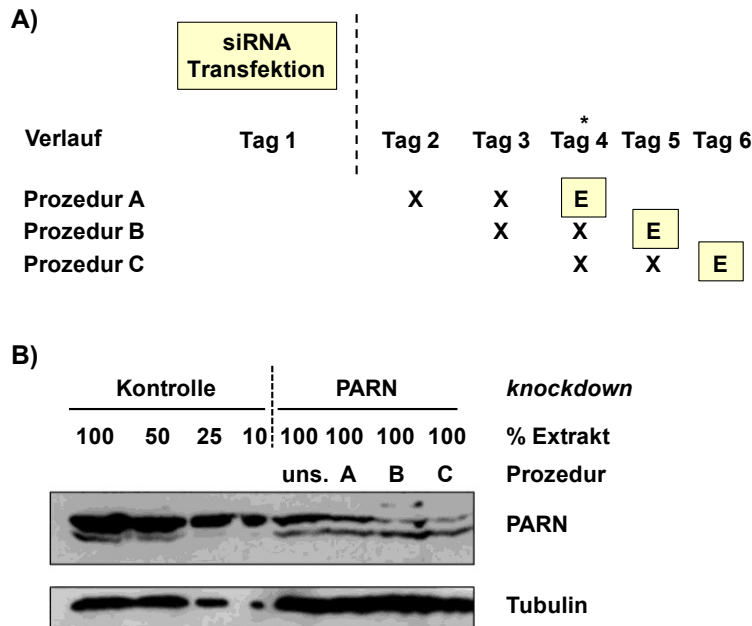


Abbildung 23: Etablierung des PARN-kd-Synchronisations-Experimentes

HeLa-Zellen wurden mittels doppeltem Thymidinblock synchronisiert. Dazu wurden HeLa-Zellen für 18 Stunden mit 2,5 mM Desoxythymidin (X) behandelt. Der zweite Thymidinblock erfolgte nach 8h Inkubation in thymidinfreiem Medium für 16 Stunden, ehe die Zellen in den Zellzyklus entlassen wurden.

(A) Für die Kombination des Synchronisationsexperimentes und des RNAi-Versuches wurden zunächst HeLa-Zellen an Tag 1 mit PARN3-siRNA oder Kontroll-siRNA transfiziert und die Synchronisationsprozedur wurde ein Tag nach der Transfektion (A), zwei Tage nach der Transfektion (B) oder drei Tage nach der Transfektion (C) gestartet, sodass die Extraktpräparationen (E) am dritten, vierten oder fünften Tag nach der Transfektion erfolgte. Das Symbol * gibt den Zeitpunkt der Extraktpräparation nach herkömmlichem siRNA-Transfektionsprotokoll an.

(B) Die PARN-Proteinmenge aus synchronisierten (Prozedur A, B, C) und unsynchronisierten Zellen (uns.) wurde mit Hilfe von vergleichenden *Western-blot*-Analysen untersucht. Tubulin dient als Ladekontrolle.

Man erkennt, dass die PARN-Proteinmenge sowohl in unsynchronisierten Zellen als auch in den synchronisierten Zellen nach der Transfektion einer spezifischen PARN-siRNA reduziert vorliegt. Die *knockdown*-Effizienz schwankt zwischen den verwendeten Methoden. In diesem Experiment ist die *knockdown*-Effizienz für die unsynchronisierten Zellen am geringsten, gefolgt von den Zellen, bei denen der Thymidinblock einen Tag nach der Transfektion gestartet wurde (Prozedur A). Die besten *knockdown*-Effizienzen wurden hingegen dann erzielt, wenn der erste

Thymidinblock zwei oder drei Tage nach der siRNA-Transfektion erfolgte. Für weitere Experimente wurde aus diesem Grund die Methode B gewählt, bei der der erste Thymidinblock zwei Tage nach der siRNA-Transfektion einsetzt.

12 Initiales RNAi-Synchronisationsexperiment

Nachdem das RNAi-Synchronisationsexperiment etabliert war, wurden in einem folgenden Experiment parallel zu PARN3-siRNA-transfizierten Zellen auch Kontroll-siRNA-transfizierte Zellen untersucht. Es wurden zum einen Extrakte präpariert, um die *knockdown*-Effizienz zu bestimmen und zum anderen wurden Zellen mit Ethanol fixiert, um die Synchronisation mittels durchflusszytometrischer Analysen zu überprüfen. Außerdem wurde RNA isoliert, um die Menge polyadenylierter und korrekt prozessierter Histon-mRNAs im Zellzyklus zu analysieren. Die *Western-blot*-Analyse ergab, dass nach PARN-siRNA-Transfektion kein effizienter PARN-kd vorhanden war, da die PARN-Proteinmenge nicht unter 30% gesunken war (siehe Abbildung 24).

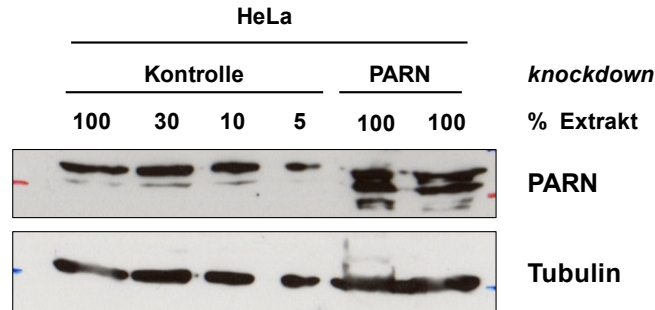


Abbildung 24: Western-blot-Analyse zum initialen RNAi-Synchronisationsexperiment

Für das RNAi-Synchronisationsexperiment wurden HeLa-Zellen nach der in Abbildung 23A dargestellte Prozedur B mit siRNAs transfiziert und synchronisiert. Es wurden 4 Tage nach der siRNA-Transfektion Extrakte präpariert.

Die Zellextrakte aus Kontroll- und PARN-depletierten Zellen wurden in *Western-blot*-Analysen hinsichtlich der PARN-Menge in synchronisierten Zellen untersucht. Infolge von dem PARN-kd ist die PARN-Menge hier nicht unter 30% gesunken.

Die durchflusszytometrische Analyse der Zellen zeigt, dass die Zellen unmittelbar nach dem doppelten Thymidinblock in der G1/S-Phase arretiert sind, was sich anhand der Quantifizierung in Abbildung 26B erkennen lässt. Während die meisten

Zellen unmittelbar nach dem Thymidinblock in der S-Phase arretiert vorliegen, befinden sie sich drei Stunden nach der Entfernung des Thymidins (im *release*) in der Synthese- und Mitose-Phase. Nach 6 Stunden befinden sich die meisten Zellen in der G2/M-Phase. Schließlich sind nach 9 Stunden eindeutig G1-Phase-Zellen und G2/M-Phase-Zellen zu detektieren. Die Zellen durchlaufen somit synchron den Zellzyklus. Die Analyse der RNA-Menge erfolgte mittels qRT-PCR-Messung. Für die Reverse Transkription wurde *Random-Hexamer-Primer* verwendet. Um polyadenylierte Histon-mRNAs zu analysieren, wurden spezielle Histon-Oligonukleotide verwendet, die lediglich die polyadenylierten, missprozessierten Histon-mRNAs binden können. Die speziellen Oligonukleotide für Hist1H2AC, Hist2H2AA und Hist1H2BC konnten auf Grundlage der Sequenzierergebnisse entworfen werden. Außerdem wurden Histon-Oligonukleotide für die Amplifikation der korrekt prozessierten und der polyadenylierten Histon-mRNAs verwendet (Gesamt-Histon-mRNA). Die Lage der Oligonukleotide ist zum besseren Verständnis in Abbildung 25 schematisch dargestellt.

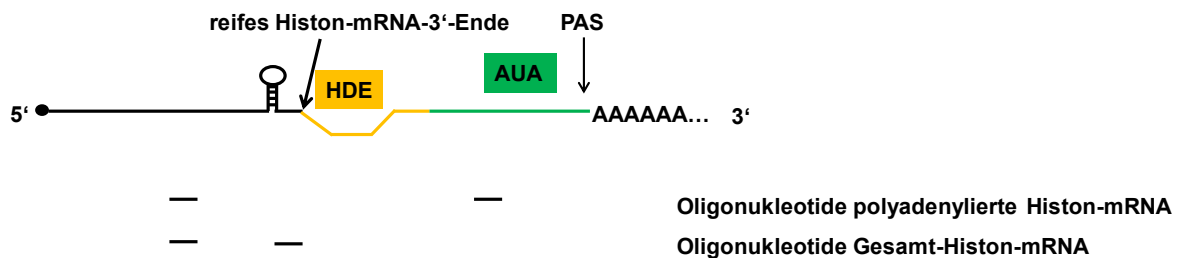


Abbildung 25: Schematische Darstellung zur Lage der Oligonukleotide für die Amplifikation polyadenylierter Histon-mRNAs und der Amplifikation von polyadenylierten und korrekt prozessierten Histon-mRNAs

Die Lage der speziell entworfenen Oligonukleotide für die qRT-PCR ist hier schematisch dargestellt. Die polyadenylierte Histon-mRNA enthält neben dem HDE auch ein Polyadenylierungssignal (AUA). Die Polyadenylierungsstelle (PAS) und die Lage des regulären Histon-3'-Endes ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Oligonukleotide zur Amplifikation polyadenylierter Histon-mRNAs sind oben und die Oligonukleotide für die Amplifikation von polyadenylierten und korrekt prozessierten Histon-mRNAs (Gesamt-Histon-mRNA) sind unten durch vertikale Striche dargestellt.

Die qRT-PCR-Produkte wurden hinsichtlich der richtigen Größe im Agarosegel analysiert, anhand der Schmelzkurvenanalyse auf das Vorhandensein lediglich eines

qPCR-Produktes überprüft und mit der Sequenzierung der qPCR-Produkte die korrekte Identität festgestellt.

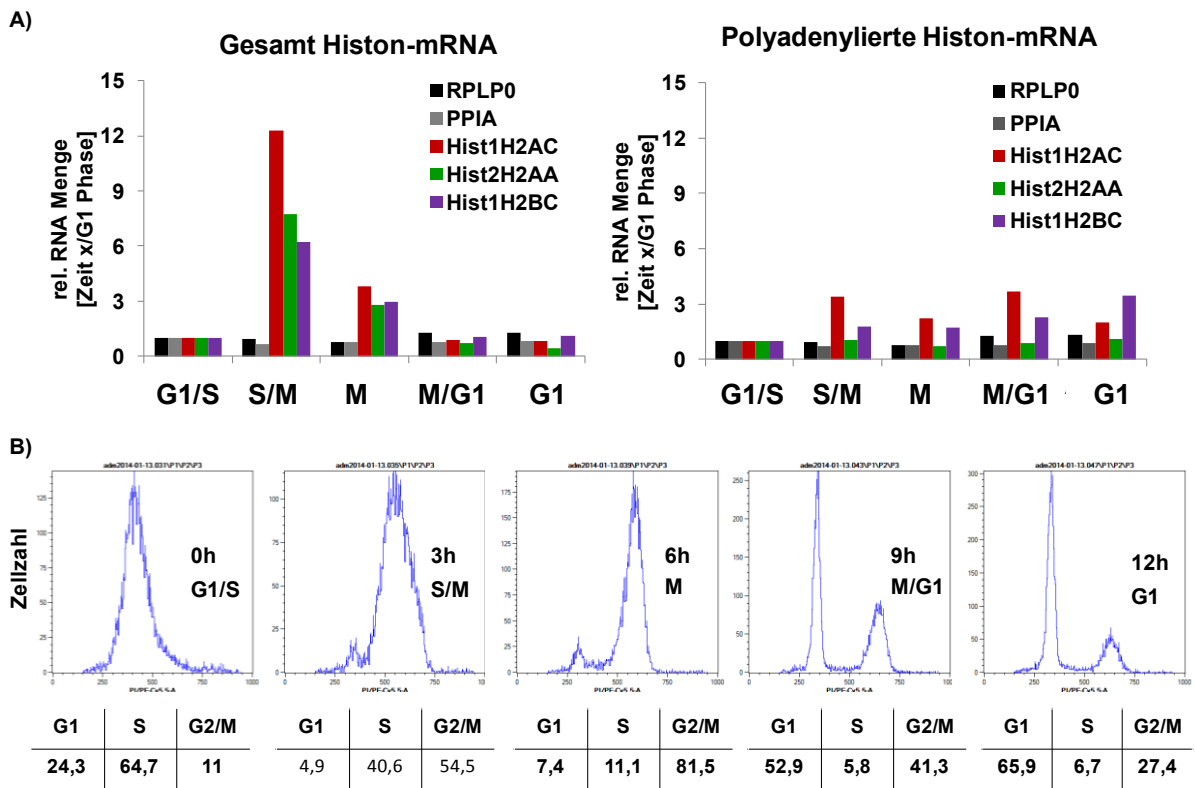


Abbildung 26: Das RNAi-Synchronisationsexperiment

Für das RNAi-Synchronisationsexperiment wurden HeLa-Zellen nach der in Abbildung 23A dargestellte Prozedur B mit der PARN3-siRNA und parallel mit der Kontroll-siRNA transfiziert und synchronisiert. Nach unterschiedlichen Zeiten im *release* wurde überdies RNA isoliert und Zellen wurden für die durchflusszytometrische Anayse fixiert. (A) Mit Radom Hexamer-Primer wurde die RNA in cDNA umgeschrieben und die Histon-mRNA-Menge mit histonspezifischen Primern für missprozessierte Histon-mRNAs und die Gesamt-Histon-mRNA in qRT-PCR-Messungen quantifiziert. Als Normalisierungsgene dienten RPLP0 und PPIA. Dargestellt sind die relativen mRNA-Mengen bezogen auf die G1/S-Phase. (B) Parallel dazu wurden die fixierten Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Histogramme für die verschiedenen Zeitpunkte sind dargestellt. Aufgetragen ist die Zellzahl gegen die Propidiumjodid-signalintensität. Zusätzlich ist die prozentuale Verteilung der Zellen zu den einzelnen Zellzyklusphasen angegeben [in %].

Darüber hinaus zeigte sich bei der Verwendung der Oligonukleotide für die missprozessierten Histon-mRNAs, analog zu den Ergebnissen in Abbildung 7, die

erwartete Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs in PARN1-siRNA transfizierten Zellen, was im Kapitel V, Abschnitt 3 dargestellt ist.

Die qRT-PCR-Ergebnisse für die Menge der Gesamt-Histon-mRNAs und die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs in den Zellzyklusphasen sind in Abbildung 26A wiedergegeben. In den Kontroll-siRNA-transfizierten Zellen steigt die Menge korrekt prozessierter Histon-mRNAs für alle analysierten Histon-mRNAs während der S/M-Phase stark an und sinkt in der M-Phase wieder. Diese Reduktion der Histon-mRNA-Menge hält auch noch über die M/G1-Phase weiter an. Die RNA-Menge der Normalisierungsgene ändert sich über den Zellzyklus hingegen nicht, womit sie als Normalisierungsgene während einer Zellzyklusanalyse geeignet sind. Die Menge der polyadenylierten, missprozessierten Histon-mRNAs bleibt mit Ausnahme der Hist1H2AC-mRNA über den gesamten Zellzyklus relativ konstant. Die Hist1H2AC-RNA zeigte mit einer RNA-Mengenänderung von drei gegenüber den Zellen in der G1/S-Phase eine geringe Anreicherung. Im Vergleich zum Anstieg der Hist1H2AC-Gesamt-Histon-mRNA-Menge um einen Faktor von 12 in der S/M-Phase ist die beobachtete Anreicherung der polyadenylierten Histon-mRNA jedoch verhältnismäßig gering.

Die Daten des Synchronisationsexperimentes zeigen deutlich, dass polyadenylierte Histon-mRNAs im Gegensatz zu replikationsabhängigen Histon-mRNAs der Zellzykluskontrolle entgehen. Zu keiner Zeit war eine Anreicherung der polyadenylierten Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen vorhanden (Daten nicht gezeigt). Mögliche Ursache könnte hier der nicht vorhandene PARN-kd sein.

IV Diskussion

1 Funktion von PARN während der Entwicklung und in somatischen Zellen

PARN zeichnet sich dadurch aus, spezifisch Poly(A) zu degradieren (Körner *et al.*, 1998). Außerdem werden polyadenylierte RNAs mit einer Cap-Struktur im Vergleich zu RNAs ohne Cap-Struktur zumindest *in vitro* von PARN verstärkt deadenyliert. Diese Eigenschaften, die mit gereinigtem PARN in *in-vitro*-Analysen ermittelt wurden, lassen vermuten, dass PARN möglicherweise auch *in vivo* am mRNA-Abbau beteiligt ist. Für die pflanzliche Embryonalentwicklung konnte dies bereits gezeigt werden. Hier führt die Expression katalytisch inaktiver PARN-Mutanten zu einer Akkumulation und zur Hyperadenylierung embryospezifischer Transkripte. Zusätzlich kommt es zum Erliegen der Embryonalentwicklung (Reverdatto *et al.*, 2004). Für den Prozess der Oozyten-Reifung in *X. laevis* konnte belegt werden, dass PARN die Deadenylierung maternaler mRNAs ohne zytoplasmatisches Polyadenylierungssignal katalysiert (Kim & Richter, 2006; Körner *et al.*, 1998), wobei die Entfernung des Poly(A)-Schwanzes hier nicht zum Abbau sondern zur translationalen Stilllegung der entsprechenden mRNAs führt. Die zentrale Rolle von PARN im mRNA-Metabolismus konnte somit bereits während der pflanzlichen Embryonalentwicklung und der *Xenopus*-Oozytenreifung demonstriert werden, während die *in vivo*-Funktion in nichtembryonalen, somatischen Zellen bisher nur wenig verstanden ist.

Bereits in den Promotionsarbeiten von M. Reuter und von H. Berndt wurde die unveränderte Verteilung der Poly(A)-Schwanzlängen nach PARN-kd gezeigt, was darauf hindeutet, dass die Deadenylierungsaktivität von PARN für die gesamte mRNA-Population einer Zelle nur eine untergeordnete Bedeutung hat (Promotion M. Reuter, 2006, Promotion H. Berndt, 2011). Man kann jedoch den Schluss ziehen, dass PARN am Abbau spezifischer Transkripte beteiligt sein könnte. Die Arbeitsgruppen von Ching-Yi Chen, Blackshear, Maquat und Wilusz konnten mit verschiedenen Analysen Hinweise finden, die für eine Beteiligung von PARN am Abbau spezifischer RNAs sprechen. So wurde PARN in unabhängigen Studien eine Funktion am Abbau von NMD-Substraten, ARE-haltigen RNAs oder CUG-BP-Substraten zugeordnet (Gherzi *et al.*, 2004; Lai *et al.*, 2003; Lejeune *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2006). Diese Untersuchungen basieren auf *in vitro*-Analysen, bei denen PARN mit dem NMD-Faktor Upf1, den ARE-Bindeproteinen KSRP oder dem

CUG-BP in Zellextakten immunopräzipitiert werden konnte. RNA-Reporteranalysen konnten diese Beobachtungen allerdings nicht bestätigen (Promotion M. Reuter, 2006). In zwei unabhängigen Microarray-Studien konnte außerdem das TP53-Transkript und die ZFP36L2-mRNA als PARN-Substrat identifiziert werden (Lee *et al.*, 2012, Devany *et al.*, 2013). Das ZFP36L2-Transkript kodiert für ein ARE-Bindeprotein, welches auch als putativer, nukleärer Transkriptionsfaktor beschrieben ist, der bei der Regulation der Antwort auf Wachstumsfaktoren eine Rolle spielt (Hacker *et al.*, 2010). Bei TP53 handelt es sich hingegen um ein Tumorsuppressorgen, das als Transkriptionsfaktor die Expression des P21-Proteins induziert, wodurch es zur Inhibierung der Zellzyklusprogression kommt. Außerdem kann TP53 mit weiteren Faktoren Apoptoseprozesse induzieren. Die Beobachtungen, dass es sich bei diesen beiden RNAs um potenzielle PARN-Substrate handelt, basieren auf *Northern-blot*-Analysen, Abbau-Kinetiken und Immunopräzipitationsstudien. In der Diplomarbeit von A. Zirkel wurden darüber hinaus die CITED1- und die MYC-RNA anhand von Microarray-Analysen als potenzielle PARN-Substrate in HEK-293T-Zellen identifiziert und mit qRT-PCR-Messungen bestätigt. Die *Western-blot*-Analysen deuteten mit erhöhten Proteinnengen für MYC und CITED1 ebenso auf eine Akkumulation dieser mRNAs nach PARN-kd hin (Diplomarbeit A. Zirkel, 2008). Durch diese Beispiele wird deutlich, dass bereits sehr verschiedene PARN-Substrate identifiziert worden sind. Sie treten allerdings nicht in den unabhängigen Analysen konsistent als PARN-Substrate auf, weshalb diese Transkripte anhand der Microarray-Daten hinsichtlich einer Anreicherung nach erfolgtem PARN-kd untersucht wurden. Weder die zwei Sondensets für TP53 noch die zwei Sondensets für ZFP36L2 zeigen höhere Signalintensitäten in PARN-depletierten Zellen. Auch für die CITED1-mRNA war keine mRNA-Anreicherung nach PARN-kd erkennbar, für die MYC-RNA war hingegen eine leichte Anreicherung mit einem Faktor von 1,5 erkennbar, die sich allerdings nicht in den qRT-PCR-Messungen von H. Berndt verifizieren ließ (Promotion H. Berndt, 2011). Die Tatsache, dass sich die bereits identifizierten PARN-Substrate nicht in dem hier verwendeten Microarray rekapitulieren ließen, ist möglicherweise auf die unterschiedlichen experimentellen Ansätze oder die unterschiedlichen Zellsysteme zurück zu führen.

Als bereits publizierte und beschriebene PARN-Substrate in U2OS- und HEK-293T-Zellen sind die H/ACA-box-snoRNAs zu nennen (Berndt *et al.*, 2012). PARN ist hier

nicht am Abbau sondern an der Reifung von snoRNA-Vorläufermolekülen beteiligt (Berndt et al., 2012). Während der snoRNA-Reifung werden verlängerte Vorläufer-snoRNAs mit Intronnukleotiden durch die nichtkanonische Poly(A)-Polymerase PAPD5 oligoadenyliert und wahrscheinlich durch PARN auf das richtige 3'-Ende getrimmt. Die Beobachtung, dass PARN an der Reifung von H/ACA-box-snoRNAs beteiligt ist, geht dabei auf Microarray-Analysen zurück, bei denen die Menge der oligoadenylierten snoRNA68 nach PARN-kd erhöht war (Promotion H. Berndt, 2011). In den hier durchgeführten Microarray-Studien konnten neben der snoRNA68 insgesamt 25 weitere RNAs als potenzielle PARN-Substrate eingegrenzt werden, wobei es sich um 18 reguläre mRNAs und sieben verschiedene, replikationsabhängige Histon-mRNAs handelt (siehe Tabelle 17). Die Histon-mRNAs wurden im Rahmen dieser Arbeit näher analysiert und werden im Kapitel IV 2 weiter diskutiert. Die Verifizierung der Microarray-Daten mit qRT-PCR-Messungen für die 18 regulären mRNAs, die nach erfolgtem PARN-kd akkumulierten, steht noch aus. Da die Microarray-Analysen mit RNAs aus Zellen durchgeführt wurden, bei denen der *knockdown* nur mit der PARN1-siRNA bewirkt wurde, sollten verschiedene PARN-siRNAs in zukünftigen Untersuchungen verwendet werden, um mögliche unspezifische Effekte einer siRNA auszuschließen. Darüber hinaus sollte für diese mRNAs die Verteilung der Poly(A)-Schwanzlänge zwischen PARN-kd-Zellen und Kontroll-Zellen untersucht werden, um den Einfluss von PARN auf die Poly(A)-Schwanzlänge zu untersuchen. Abbaukinetiken in PARN-kd- und Kontroll-Zellen könnten außerdem Auskunft darüber geben, ob PARN am Abbau dieser RNAs beteiligt ist. Da PARN zumindest *in vitro* auch oligouridylierte RNAs degradiert, könnten uridylierte RNAs auch *in vivo* potenzielle PARN-Substrate darstellen. Aufgrund der Tatsache, dass die cDNA-Synthese für die Microarray-Analyse auf einem oligo(dT)-*priming* basierte, kann keine generelle Aussage zu einer möglichen Anreicherung uridylierter RNAs nach dem PARN-kd getroffen werden. Mit dem hier verwendeten Microarray-Chip konnten lediglich polyadenylierte RNAs analysiert werden, die auf Datenbankeinträgen von GenBank®, dbEST und RefSeq von 2003 basieren. Dies bedeutet, dass beispielsweise aufgrund einer schlechten Annotation der Microarray-Sondensets oder aufgrund fehlender Sonden keine generelle Aussage zu *long non coding* RNAs oder zu *Promotor-upstream transcripts* (PROMPTs) getroffen werden kann. So besitzen RNAs dieser zwei RNA-Klassen zum einen eine 5'-Cap-Struktur und zum anderen einen Poly(A)-Schwanz (Guttman

et al., 2009; Mehler & Mattick, 2007, Preker *et al.*, 2011), wodurch sie die Kriterien für ein potenzielles PARN-Substrat erfüllen. *Long noncoding* RNAs gehören zur Gruppe der nicht kodierenden RNAs, die größer als 200 Nukleotide sind, während die sog. PROMPTs kurze, instabile, nukleäre RNAs darstellen, die von der RNA-Polymerase II synthetisiert werden (Preker *et al.*, 2011). In *knockdown*-Analysen konnte bisher keine Beteiligung von PARN an der Deadenylierung spezifischer PROMPTs gezeigt werden (Preker *et al.*, 2008), was jedoch eine Beteiligung von PARN am Abbau von PROMPTs nicht zwingend ausschließt.

Mit einer anderen Methode könnte es gelingen weitere potenzielle PARN-Substrate zu identifizieren. Die Ligation eines Adapters an das 3'-Ende der zu analysierenden RNA mit anschließendem *deep-sequencing* stellt eine Möglichkeit dar, um eine Anreicherung von potenziellen PARN-Substraten nach PARN-kd zu bestimmen und Sequenzinformationen über das 3'-Ende der jeweiligen RNAs zu erhalten. Mit der Sequenzinformation würde diese Methode zugleich Hinweise auf die Beteiligung von PARN an der Prozessierung oder dem RNA-Abbau geben.

Neben der Funktion von PARN in somatischen Zellen unter Standardbedingungen, könnte das Enzym auch am Abbau von RNAs während der zellulären Stressantwort beteiligt sein. Dies wurde bereits für UV-Stress näher untersucht. Infolge der UV-Bestrahlung assoziiert PARN mit CstF50 und BARD1 und ist katalytisch aktiv, so dass Ziel-RNAs infolge der UV-Bestrahlung deadenyliert werden können (Cevher *et al.*, 2010). Es ist bekannt, dass PARN während Hitzestress aus den *Cajal bodies* und den Nukleoli in das Nukleoplasma relokalisiert (Promotion Berndt, 2012, Diplomarbeit I. Steiner, 2007). Durch diese veränderte Lokalisation gelangen Vorläufer-mRNAs und mRNAs in die räumliche Nähe zu PARN. Erste microarray-basierte Untersuchungen wurden bereits durchgeführt, um potenzielle PARN-Substrate unter dieser Stresssituation zu identifizieren, wobei diese jedoch mit Hilfe von qRT-PCR-Messungen oder Abbaukinetiken nicht als PARN-Substrate verifiziert werden konnten (Diplomarbeit C. Weißbach, 2010, Masterarbeit G. Zander, 2012).

2 Polyadenylierte Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate

Die replikationsabhängigen Histon-mRNAs unterliegen einer strengen Zellzykluskontrolle. Dies bedeutet, dass sie zu Beginn der S-Phase verstärkt synthetisiert und am Ende der S-Phase wieder abgebaut werden. Vermutlich findet

die Transkription und Prozessierung der Histon-mRNAs in den HLB statt. Dies sind nukleäre Strukturen, in denen Histon-Prozessierungsfaktoren wie NPAT oder FLASH angereichert vorliegen. Durch die zellzyklusabhängige Regulation der Histon-mRNA-Synthese kann gewährleistet werden, dass während der S-Phase des Zellzykluses die neu synthetisierte DNA in Nukleosomen verpackt wird.

Die replikationsabhängigen Histon-mRNAs sind die einzigen mRNAs, bei denen das 3'-Ende nicht von einem Poly(A)-Schwanz gebildet wird, sondern von einer *stem-loop*-Struktur. Dieses 3'-Ende entsteht durch eine endonukleolytische Spaltung der Vorläufer-Histon-mRNA (Birchmeier *et al.*, 1983; Dominski *et al.*, 2005; Krieg & Melton, 1984; Ryan *et al.*, 2004). An diesem Prozessierungsschritt sind zahlreiche Faktoren, wie beispielsweise SLBP, U7snRNP oder FLASH beteiligt. Bei Störung der Histon-Prozessierung kommt es zum vermehrten Auftreten missprozessierter Histon-mRNAs, die einen Poly(A)-Schwanz besitzen (Godfrey *et al.*, 2009; Narita *et al.*, 2007; Pirngruber & Johnsen, 2010; Sullivan *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). Auch nach PARN-kd kommt es zu einer Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs (siehe Kapitel III, Abschnitt 1), was die hier analysierten Microarray-Daten ergeben haben. Anhand von *Northern-blot*-Analysen wurde deutlich, dass der Poly(A)-Schwanz einer missprozessierten Histon-mRNA bis zu 200 Nukleotide lang ist (siehe Kapitel III77), die Sequenzanalyse ergab außerdem, dass sich der Poly(A)-Schwanz für die meisten der analysierten Histon-mRNAs 3' vom regulären Histon-mRNA-Ende befindet und eine zusätzliche genomische Sequenz in den polyadenylierten Histon-mRNAs enthalten ist (siehe Kapitel III, Abschnitt 0). Die meisten der identifizierten Polyadenylierungsstellen stimmen dabei mit bereits publizierten Polyadenylierungsstellen überein (Shepard *et al.*, 2011; Sullivan *et al.*, 2009). In weiterführenden qRT-PCR-Messungen und RPA-Analysen konnte die Anreicherung verschiedener polyadenylierter Histon-mRNAs nach PARN-kd mit der PARN1-siRNA eindeutig verifiziert werden, während die Verwendung der PARN2- und PARN3-siRNA diese Anreicherung nicht eindeutig zeigte (siehe Kapitel III, Abschnitt 2 und 5), sodass nicht geklärt werden kann, ob PARN einen Einfluss auf die polyadenylierten Histon-mRNAs nimmt. Aufgrund der geringen Abundanz der polyadenylierten Histon-mRNAs waren die hier dargestellten Auswertungen mittels qRT-PCR und RPA mit einer großen Fehleranfälligkeit verbunden. Aus diesem Grund wäre es sinnvoll, die Verifizierung der Histon-mRNAs als PARN-Substrate erneut mit einer weiteren Methode zu überprüfen. Dafür würde sich ein *Doppel-knockdown* eignen, der zum

einen die Menge der polyadenylierten Histon-mRNAs erhöht und zum anderen die PARN-Proteinmenge reduziert. Um die polyadenylierten Histon-mRNAs anzureichern, würde sich beispielsweise ein FLASH-*knockdown* oder ein U7snRNA-*knockdown* eignen, da für diese Faktoren lediglich eine Beteiligung an der Prozessierung von Histon-mRNAs beschrieben ist. Das Signal für die missprozessierten Histon-mRNAs in den hier analysierten RPA-Analysen lag durchschnittlich mit einem Faktor von 2,9 über dem Hintergrundsignal. In Doppel-*knockdown*-Analysen könnte das Signal-Hintergrundverhältnis deutlich höher liegen, was die Quantifizierung einer vorhandenen Anreicherung nach PARN-kd zuverlässiger macht. Das Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs infolge der RNAi-vermittelten PARN-Depletion führt zu der Frage, welche Funktion PARN im Hinblick auf diese RNAs übernehmen könnte. Vorstellbar wäre zum einen, dass PARN an der Prozessierung hin zu korrekt prozessierten Histon-mRNAs oder zum anderen am Abbau der polyadenylierten Histon-mRNAs mitwirkt. Die Möglichkeit, aus polyadenylierten, missprozessierten Histon-mRNAs korrekt prozessierte Histon-mRNAs zu generieren, haben frühere Arbeiten bereits angedeutet (Masi & Johnson, 2003; Pandey *et al.*, 1994). So entsteht bei der Injektion einer polyadenylierten Histon-Reporter-RNA in *Xenopus*-Oozyten korrekt prozessierte Histon-mRNAs (Masi & Johnson, 2003). An dieser Reprozessierung polyadenylierter Histon-mRNAs könnten Exonukleasen wie PARN beteiligt sein, die den Poly(A)-Schwanz und auch die zusätzliche genomische Sequenz in polyadenylierten Histon-mRNAs entfernen. Als potenzieller Faktor für die Reprozessierung von polyadenylierten Histon-mRNAs könnte PARN in HLB lokalisiert sein. In diesem Fall würde eine Kolo-kalisation mit einem typischen HLB-Markerprotein vorliegen. Ein typisches Beispiel für ein HLB-Markerprotein ist NPAT, es vermittelt die Aktivierung der Histon-mRNA-Transkription durch eine Cyclin-abhängige Kinase (Zhao *et al.*, 2000). Anhand der Ko-Färbung mit NPAT wurde jedoch deutlich, dass PARN nicht in HLB lokalisiert ist (persönliche Mitteilung A. Zirkel). Eine Beteiligung von PARN am Histon-Metabolismus ist trotz der fehlenden HLB-Lokalisation nicht auszuschließen, denn HLB stellen dynamische Strukturen dar, die während der S-Phase mit *Cajal bodies* assoziieren (Bongiorno-Borbone *et al.*, 2008), in denen auch PARN konzentriert vorliegt. Die Funktion der HLB-*Cajal-body*-Assoziation ist jedoch noch nicht genauer untersucht. Eine andere Möglichkeit für die Reprozessierung polyadenylierter Histon-mRNAs besteht darin, dass der U7snRNP-Komplex in diesen Prozess involviert ist. Dabei würde die

U7snRNA mit dem HDE der polyadenylierten Histon-mRNA komplementäre Basenpaare ausbilden, zusammen mit weiteren Faktoren die Endonuklease CPSF-73 zu den polyadenylierten Histon-mRNAs rekrutieren und somit die Spaltung der polyadenylierten Histon-mRNAs ermöglichen. Andererseits kann nicht jederzeit im Zellzyklus eine Reprozessierung durch den U7snRNP-Komplex gewährleistet werden, denn Untersuchungen haben ergeben, dass die U7snRNA als Komponente des U7snRNP-Komplexes während der G1-Phase nicht zugänglich ist und somit keine Basenpaarung mit dem HDE der Prä-Histon-mRNA erlaubt (Hoffmann & Birnstiel, 1990). Ob eine Reprozessierung polyadenylierter Histon-mRNAs nur in bestimmten Zellzyklusphasen erfolgt und ob lediglich der U7snRNP-Komplex involviert ist oder auch Exonukleasen eine Rolle spielen, bleibt daher unbeantwortet. PARN könnte im Gegensatz dazu auch am Abbau der polyadenylierten Histon-mRNAs beteiligt sein, indem es den Poly(A)-Schwanz entfernt und somit den ersten Schritt des mRNA-Abbaus katalysiert. Analog zum generellen mRNA-Abbau könnten die missprozessierten Histon-mRNAs nachfolgend durch die Enzyme des 5'-3'-Abbaus oder des 3'-5'-Abbaus (siehe Kapitel I, Abschnitt 2.1) degradiert werden. In humanen Zellen gibt es neben PARN aber auch noch weitere Exonukleasen, die den Abbau polyadenylierter Histon-mRNAs anstelle von PARN katalysieren könnten. Zu ihnen zählen der CCR4-NOT-Komplex, der PAN2/PAN3-Komplex sowie das nukleäre oder zytoplasmatische Exosom und die Exoribonuklease 1 (ERI1). Darüber hinaus existiert der sog. Caf1z/Ccr4d-Deadenylase-Komplex, der im Gegensatz zum CCR4-NOT-Komplex in *Cajal bodies* konzentriert ist und vermutlich auch am Abbau von mRNAs beteiligt ist (Wagner *et al.*, 2007a). Mit dem *knockdown* der Exosom-Komponenten Rrp4, Rrp41 und Rrp6, sowie dem *knockdown* von NOT1, Caf1z, Ccr4d, ERI1, PAN2 und PAN3 in humanen Zellen wurde jedoch keine spezifische Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs beobachtet (persönliche Mitteilung C. Rammelt), was eine Beteiligung dieser Enzyme am spezifischen Abbau missprozessierter Histon-mRNAs unwahrscheinlich macht.

Die Frage nach der Beteiligung von PARN am Abbau oder der Reprozessierung von polyadenylierten Histon-mRNAs wurde auch anhand von stabil integrierten Histon-Reportern analysiert (siehe Masterarbeit L. Anders, 2014). Durch diese Histon-Reporter kann mit dem Vorhandensein einer Mutation im HDE und der damit einhergehenden Störung der Histon-Prozessierung eine erhöhte Menge polyadenylierter Histon-mRNAs erzeugt werden. Der Einfluss von einem PARN-kd

auf diese polyadenylierten Reporter-Histon-mRNAs kann auf diese Weise relativ einfach in einem *Northern-blot* analysiert werden und erspart eine zeit- und materialintensive Poly(A)⁺-Präparation. Bei einer Beteiligung von PARN an der Reprozessierung von Histon-mRNAs würde man infolge der PARN-Depletion erhöhte Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs und gleichzeitig eine reduzierte Menge korrekt prozessierter Histon-mRNAs erwarten. Im Gegensatz dazu würden sich bei einer Beteiligung von PARN am Histon-mRNA-Abbau nur die polyadenylierten Histon-mRNAs anreichern. Bisher hat der RNAi-vermittelte *knockdown* von PARN keinen Einfluss auf die Histon-Reporter-RNAs gezeigt (Masterarbeit L. Anders, 2014), so dass die Funktion von PARN für die polyadenylierten Histon-mRNAs noch nicht geklärt werden konnte. Zu berücksichtigen ist, dass es bei diesen Histon-Reportern aufgrund des CMV-Promotors zu einer konstitutiven Expression von polyadenylierten Histon-mRNAs kommt, was nicht der *in vivo*-Situation entspricht, da die Histon-Gene eigene Histon-Promotoren besitzen. Diese gewährleisten, dass es zu Beginn der S-Phase zu einer verstärkten Synthese der Histon-mRNAs kommt während am Ende der S-Phase eine deutliche Reduktion der Synthese einsetzt (LaBella *et al.*, 1988). Da PARN in Nukleoli und in *Cajal bodies* konzentriert vorliegt (Berndt *et al.*, 2012) und sich die Kernmembran während der Mitose-Phase auflöst, gelangt PARN zu diesem bestimmten Zeitpunkt in das Zytoplasma (Diplomarbeit A. Zirkel, 2008) und kommt möglicherweise erst dann in die räumliche Nähe zu Histon-mRNAs. Bei einer konstitutiven Expression der polyadenylierten Histon-mRNAs käme es auch außerhalb der S-Phase zu einer starken Synthese polyadenylierter Histon-mRNAs. Bei einer nur zeitlich begrenzten Interaktion zwischen PARN und seinem RNA-Substrat in der Mitose-Phase, würde die ständige Neubildung der Reporter-RNA den Einfluss von PARN auf die Menge polyadenylierter Histon-mRNAs minimieren. Eine mögliche Lösung wäre die Herstellung neuer Histon-Reporter, die einen Histon-Promotor enthalten, so dass die Synthese der Histon-mRNAs an den Zellzyklus gekoppelt ist, wodurch artifizielle Ergebnisse durch einen konstitutiven Promotor vermieden werden können. Um den möglichen Einfluss von PARN auf den Abbau polyadenylierter Histon-mRNAs zu analysieren, sollten Kinetiken zum Histon-mRNA-Abbau in PARN-kd-Zellen und Kontroll-Zellen erstellt werden. Für diese Analyse sollte eine Actinomycin D-Behandlung durchgeführt werden. Bei einer Beteiligung von PARN am Abbau würde man einen verlangsamten Abbau der Histon-mRNAs in PARN-kd gegenüber den Kontroll-kd-Zellen erwarten.

Die Hypothese, dass PARN am Histon-mRNA-Metabolismus beteiligt ist, wurde in einem weiteren Experiment analysiert. Um eine potenzielle Interaktion zwischen PARN und den polyadenylierten Histon-mRNAs nachzuweisen, wurden Immunopräzipitationsstudien durchgeführt. Jedoch konnten keine polyadenylierten Histon-mRNAs nach *crosslink* mit PARN immunopräzipitiert werden (persönliche Mitteilung A. Gerhardt). Dies kann damit erklärt werden, dass aufgrund einer transienten Interaktion zwischen Enzym und seinem Substrat eine stattfindende Interaktion in Immunopräzipitationsexperimenten nicht zwingend nachweisbar ist. So konnten auch die oligoadenylierten H/ACA-box-snoRNAs, für die die Beteiligung von PARN an der snoRNA-Reifung bereits gezeigt wurde, nicht immunopräzipitiert werden.

3 Entstehung von polyadenylierten Histon-mRNAs

Es ist nicht genau geklärt, welches Enzym die Polyadenylierung von Histon-mRNAs katalysiert, zu welchem Zeitpunkt polyadenylierte Histon-mRNAs im Zellzyklus entstehen und wovon der Anteil polyadenylierter Histon-mRNAs an der Gesamtmenge bestimmt wird. Für die regulären mRNAs einer Zelle wurde bereits gezeigt, dass an der Polyadenylierung die kanonische Polyadenylierungsmaschinerie beteiligt ist und cis-Elemente in der Prä-mRNA für die Rekrutierung von Spaltungs- und Polyadenylierungsfaktoren notwendig sind und die Lage des Poly(A)-Schwanzes determinieren. Die Polyadenylierung ist in diesem Fall zum einen von einem Polyadenylierungssignal und zum anderen von einem GU-reichen Element abhängig (Übersichtsartikel Tian & Graber, 2012). Dabei wird das Polyadenylierungssignal von dem CPSF-Komplex oder WDR33 (siehe Kapitel I, Abschnitt 1.1) und das GU-reiche Element von CstF64 gebunden. Durch die Assoziation mit weiteren Faktoren kann die Prä-mRNA daraufhin an der Polyadenylierungsstelle gespalten und polyadenyliert werden. Die hier durchgeführten Sequenzanalysen haben ergeben, dass die meisten polyadenylierten Histon-mRNAs ein kanonisches oder nichtkanonisches Polyadenylierungssignal 5' der Polyadenylierungsstelle enthalten. Die Tatsachen, dass Polyadenylierungssignale identifiziert werden konnten und der Poly(A)-Schwanz bis zu 200 Nukleotide lang ist, deuten darauf hin, dass die kanonische Polyadenylierungsmaschinerie auch an der Polyadenylierung von Histon-mRNAs beteiligt ist. Mit der Analyse von Reporter-Histon-mRNAs konnte dies

bestätigt werden. So führt die Mutation im Polyadenylierungssignal oder dem GU-reichen Element zu einer Reduktion der polyadenylierten Histon-mRNA-Gleichgewichtsmenge (siehe Kapitel III, Abschnitt 7). Es ist somit wahrscheinlich, dass die Spaltungs- und Polyadenylierungsfaktoren analog zu den mRNAs auch zu der missprozessierten Prä-Histon-mRNA rekrutiert werden und dadurch die Polyadenylierung von Histon-mRNAs ermöglicht wird. Um die Beteiligung der kanonischen Poly(A)-Polymerase (PAP) an der Histon-mRNA-Polyadenylierung zu untermauern, sollte zusätzlich ein *knockdown* gegen die kanonische Poly(A)-Polymerase durchgeführt werden, wie dies bereits in HEK-293T-Zellen gelungen ist (Lee & Glaunsinger, 2009). Neben der kanonischen PAP existieren in humanen Zellen außerdem auch noch fünf weitere nichtkanonische Poly(A)-Polymerasen, die eine solche Reaktion katalysieren könnten. Dabei handelt es sich um PAPD1, PAPD5, PAPD4, PAPD2 (Star-PAP oder U6-TUTase) und POL S (Schmidt & Norbury, 2010). Keine dieser nichtkanonischen Poly(A)-Polymerasen wurde bisher in Zusammenhang mit polyadenylierten Histon-mRNAs gebracht. PAPD4, PAPD5 und Star-PAP sind im Nukleus lokalisiert. Während die Funktion von nukleärer PAPD4 weitestgehend unverstanden ist, konnte für die U6-TUTase gezeigt werden, dass sie eine kurze oligo(U)-Sequenz an spezifische RNAs, wie die U6snRNA, anfügen kann (Trippe *et al.*, 1998). Das PAPD5-Orthologe in *S. cerevisiae* ist Trf4, welches Bestandteil des TRAMP-Komplexes ist, der außerdem aus der RNA-Helikase Mtr4 und aus dem Air2- oder Air1-Protein besteht (Vanáčová *et al.*, 2005). Dieser ist an der Oligoadenylierung nichtkodierender RNAs beteiligt, womit diese für den Abbau durch das Exosom markiert werden (Anderson & Wang, 2009). Darüberhinaus konnte für PAPD5 in weiteren Fällen eine Oligoadenylierung, jedoch keine Polyadenylierung von Substrat-RNAs beobachtet werden. So katalysiert PAPD5 in menschlichen Zellen die Adenylierung von PROMPTs (Preker *et al.*, 2011) oder von snoRNAs (Berndt *et al.*, 2012), während in murinen 3T3-Zellen eine Oligoadenylierung von unvollständig transkribierten, rRNA-Vorläufern gezeigt wurde (Shcherbik *et al.*, 2010). Lediglich für die nichtkanonische Poly(A)-Polymerase PAPD2 konnte die Polyadenylierung für bestimmte Substrat-RNAs nachgewiesen werden (Laishram *et al.*, 2011), womit eine Beteiligung dieser nichtkanonischen PAP an der Polyadenylierung von Histon-mRNAs von allen nichtkanonischen Poly(A)-Polymerasen am wahrscheinlichsten ist. Eine Beteiligung könnte durch RNAi-vermittelte *knockdown*-Analysen untersucht werden.

Generell liegt nur ein geringer Prozentsatz der Histon-mRNAs in der Zelle polyadenyliert vor (Shepard *et al.*, 2011). Es gibt verschiedene Möglichkeiten, zu welchem Zeitpunkt im Zellzyklus polyadenylierte Histon-mRNAs gebildet werden. Sie könnten entweder konstitutiv exprimiert werden oder außerhalb der S-Phase entstehen. Es gibt mehrere Indizien, die darauf hinweisen, dass polyadenylierte Histon-mRNAs außerhalb der S-Phase gebildet werden. So kommt es einerseits am Ende der S-Phase zur Degradation von SLBP (Whitfield *et al.*, 2000), wodurch die Prozessierungseffizienz der Histon-mRNAs abhängig von der HDE-U7snRNA-Komplementarität deutlich reduziert oder komplett unterbrochen wird. Außerdem ist die Zugänglichkeit der U7snRNA in der G1-Phase eingeschränkt, sodass die U7snRNA mit dem HDE keine komplementären Basenpaare ausbilden kann, was zu einer Störung der Histon-Prozessierung führt (Hoffmann & Birnstiel, 1990). Diese Faktoren tragen dazu bei, dass die reguläre Histon-mRNA-Prozessierung außerhalb der S-Phase nicht mehr stattfinden kann. Hinzu kommt, dass außerhalb der S-Phase der Histon-Promotor nicht komplett abgeschaltet ist, sondern eine basale Transkription stattfindet (Pauli *et al.*, 1987), sodass es möglicherweise zur Bildung polyadenylierter Histon-mRNAs kommen könnte. Alternativ dazu könnten polyadenylierte Histon-mRNAs auch der regulären Histon-Prozessierungsmaschinerie während der S-Phase des Zellzykluses entgehen, was als „Fehler im System“ toleriert werden könnte.

Neben der Tatsache, dass generell nur ein geringer Prozentsatz der Histon-mRNAs in der Zelle polyadenyliert vorliegt, gibt es zwischen verschiedenen Histon-mRNAs Unterschiede im Hinblick auf den prozentualen Anteil polyadenylierter Histon-mRNAs im Vergleich zur Gesamt-Menge der Histon-mRNA, was die hier durchgeführten RPAs angedeutet haben (siehe Abbildung 13). So ist der Anteil an missprozessierter Hist1H1C-RNA mit 9% in Kontroll-kd-Zellen deutlich größer als der Anteil missprozessierter Hist2H2AA-mRNAs mit 1,8% an der Gesamtmenge. Hierbei spielen möglicherweise bestimmte Nukleotide der Prä-Hist2H2AA und der Prä-Hist1H1C eine entscheidende Rolle. Von Furger konnte bereits demonstriert werden, dass die Spaltungseffizienz maßgeblich von den Nukleotiden um die Prozessierungsstelle beeinflusst wird (Furger *et al.*, 1998). In Abbildung 27 sind die 3'-Sequenzen der Prä-Hist1H1C-mRNA und der Prä-Hist2H2AA-mRNA dargestellt, wobei die Nukleotide unterstrichen sind, die laut Furger die Prozessierungseffizienz beeinflussen (siehe Abbildung 27). Zwischen der Hist1H1C- und Hist2H2AA-Prä-

mRNA gibt es in Bezug auf diese drei Nukleotide einen Unterschied an Position 2 nach der Spaltstelle. In der Hist1H1C-Prä-mRNA ist hier ein U vorhanden, während in der Hist2H2AA-Prä-mRNA ein G vorkommt. Laut Furger (Furger *et al.*, 1998) gibt es zwischen diesen zwei Nukleotiden im Hinblick auf die Spaltungseffizienz keine großen Unterschiede, so dass eine andere Erklärung für die unterschiedlichen Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs an der Gesamtmenge existieren muss. Denkbar wäre, dass die beiden Histon-mRNAs unterschiedlich stark von SLBP oder dem U7snRNP-Komplex gebunden werden, sodass die Prozessierungseffizienz beeinflusst wird. Aufgrund der identischen *stem-loop*-Sequenz zwischen Hist1H1C und Hist2H2AA ist eine unterschiedlich starke SLBP-Bindung vermutlich nicht die Ursache für ein erhöhtes Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs für Hist1H1C. Es gibt allerdings Unterschiede in der HDE-Sequenz (siehe Abbildung 27), die möglicherweise zu einer unterschiedlich starken Bindung des U7snRNP-Komplexes an die Prä-Histon-mRNA beiträgt. In der Hist2H2AA-Prä-mRNA sind im Gegensatz zur Hist1H1C-Prä-mRNA elf aufeinanderfolgende Nukleotide komplementär zur U7snRNA-Sequenz. Für die Hist1H1C-Prä-mRNA sind es hingegen nur neun Nukleotide, wobei noch zwei weitere Basenpaare weiter 3' möglich wären. Ob diese Basenpaare tatsächlich ausgebildet werden und ob die unterschiedliche HDE-U7snRNA-Komplementarität die Ursache für die unterschiedlichen Verhältnisse von polyadenylierten Histon-mRNAs zur Gesamtmenge ist, bleibt offen. Auch Unterschiede in der Stabilität von verschiedenen polyadenylierten Histon-mRNAs könnten den Grund für einen höheren Anteil polyadenylierter Histon-mRNAs an der Gesamtmenge darstellen.

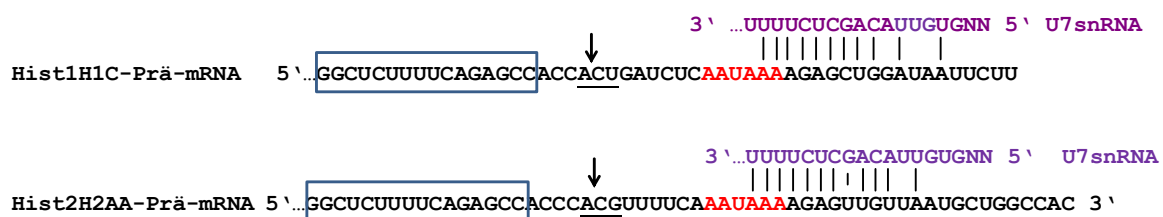


Abbildung 27: Graphische Darstellung potenzieller Basenpaare zwischen U7snRNA und Histon-mRNAs

Dargestellt sind die möglichen Basenpaare (durch senkrechte Striche symbolisiert) zwischen der U7snRNA (lila), der Prä-Hist1H1C-mRNA (oben) und der Prä-Hist2H2AA-mRNA (unten). Der Pfeil zeigt die Lage des regulären Histon-3'-Endes an. Unterstrichen sind die Nukleotide, die laut (Furger *et al.*, 1998) Einfluss auf die Prozessierungseffizienz nehmen. Die Sequenz für den *stem-loop* ist umrahmt.

Die unterschiedlichen Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs könnten auch mit einer unterschiedlich starken Regulation der jeweiligen Histon-Promotoren des Hist2H2AA- und des Hist1H1C-Gens erklärt werden. Es würden sich abhängig von der Effizienz, die Histon-Transkription am Ende der S-Phase zu senken, unterschiedliche Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs außerhalb der S-Phase bilden. Es gibt Hinweise auf die unterschiedlich starke Regulation von Histon-Promotoren verschiedener Histon-mRNA-Klassen. Beispielsweise besitzen Promotoren der Histon-Klasse 2B andere Konsensus-Sequenzen als Promotoren der Histon-H1-Klasse. Diese Sequenzelemente sind auch mit verschiedenen Faktoren assoziiert (Bella *et al.*, 1989; LaBella *et al.*, 1988), woraus eine unterschiedlich starke Regulation des Histon-Promotors resultiert. Als Folge dieser unterschiedlichen Histon-Promotor-Sequenzen und den verschiedenen assoziierten Faktoren könnte es außerhalb der S-Phase aufgrund der unterschiedlich starken Regulation der Promotoren zur Bildung unterschiedlicher Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs kommen.

4 Polyadenylierte Histon-mRNAs und Zellzykluskontrolle

Ein wesentliches Merkmal replikationsabhängiger Histon-mRNAs ist die Zellzyklusregulation. Dies bedeutet, dass die Histon-mRNAs einerseits am Ende der S-Phase weniger stark synthetisiert werden und andererseits auch abgebaut werden. Dem Abbau der Histon-mRNAs geht eine Oligouridylierung voraus, die von der Uridyltransferase ZCCHC11 katalysiert wird (Schmidt *et al.*, 2011; Su *et al.*, 2013). Nach der Oligouridylierung erfolgt wahrscheinlich das *decapping*, welches von Dcp2 katalysiert wird (Su *et al.*, 2013). Im Anschluss wird die Histon-mRNA durch Enzyme des 5'-3'- oder des 3'-5'-Abbauweges degradiert (Mullen & Marzluff, 2008). Da es am Ende der S-Phase auch zur Degradation von SLBP kommt, kann das Histon-3'-Ende nicht länger vor einem exonukleolytischen Abbau geschützt werden und wird von der Exoribonuklease-1 (Eri1) angegriffen (Hoefig *et al.*, 2013). Unter Mitwirkung der Helikase Upf1 kann vermutlich der *stem-loop* der Histon-mRNA abgebaut werden. Im Gegensatz dazu werden polyadenylierte Histon-mRNAs wahrscheinlich am Ende der S-Phase nicht verstärkt abgebaut, was das Synchronisationsexperiment angedeutet hat (siehe Abbildung 26). Über den gesamten Zellzyklus bleibt die Menge der polyadenylierten Histon-mRNAs konstant. Die Regulation polyadenylierter

Histon-mRNAs ist bereits in *S. cerevisiae* untersucht worden. Hier liegen die replikationsabhängigen Histon-mRNAs polyadenyliert vor (Fahrner *et al.*, 1980), wobei die Länge des Poly(A)-Schwanzes abhängig von der Zellzyklusphase reguliert wird. Während der S-Phase sind die Poly(A)-Schwänze mit einer Länge von 22 Nukleotiden relativ kurz, während sie in der G1-Phase 46 Nukleotide lang sind. Da die Histon-mRNAs in der G1-Phase vorwiegend nukleär lokalisiert sind, wurde geschlussfolgert, dass Histon-mRNAs mit einem längeren Poly(A)-Schwanz in der G1-Phase vermutlich schlechter exportiert werden und es zum nukleären RNA-Abbau kommt. Die Exosom-Komponente Rrp6 wurde als Faktor identifiziert, der Einfluss auf die Poly(A)-Schwanzlänge nimmt (Beggs *et al.*, 2012; Canavan & Bond, 2007). Ob es für die polyadenylierten Histon-mRNAs in somatischen, humanen Zellen in Analogie zu *S. cerevisiae* zu einer ähnlichen zellzyklusabhängigen Regulation der Poly(A)-Schwanzlängen kommt, könnte anhand eines Synchronisationsexperimentes und anschließender *Northern-blot*-Analyse ermittelt werden. Alternativ dazu könnten polyadenylierte Histon-mRNAs auch über die mRNA-Gleichgewichtsmenge reguliert werden. Wie in Kapitel IV2 diskutiert, zählen polyadenylierte Histon-mRNAs zu potenziellen PARN-Substraten, die von PARN deadenyliert werden könnten. Da es während der Mitose-Phase zur Auflösung der Kernmembran kommt und PARN damit aus dem Nukleus in das Zytoplasma gelangt, könnten polyadenylierte Histon-mRNAs zu diesem Zeitpunkt in die räumliche Nähe zu PARN gelangen. Unter der Voraussetzung, dass PARN am Abbau von missprozessierten, polyadenylierten Histon-mRNAs mitwirkt (siehe Kapitel IV, Abschnitt 2), könnte ein zellzyklusabhängiger Abbau polyadenylierter Histon-mRNAs stattfinden. Um die Beteiligung von PARN an der zellzyklusabhängigen Degradation von polyadenylierten Histon-mRNAs zu untersuchen, sollte ein PARN-kd durchgeführt werden und eine Synchronisation dieser Zellen erfolgen. Aus diesen Zellen sollte RNA aus unterschiedlichen Zellzyklusphasen analysiert werden (siehe Kapitel III, Abschnitt 12). Bei einer Beteiligung von PARN an einer zellzyklusabhängigen Regulation sollte eine Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen in der Mitose-Phase zu beobachten sein.

Die Regulation der polyadenylierten Histon-mRNA-Menge sollte ebenso wichtig sein wie die Regulation der replikationsabhängigen Histon-mRNA-Menge, denn durch eine unkontrollierte Zunahme der Histon-mRNA-Menge kann das zelluläre Gleichgewicht gestört werden und es zu einer Beeinträchtigung der Zellvitalität

kommen. Zu welchen Effekten ein Ungleichgewicht der Histon-mRNA-Menge infolge eines gestörten Histon-mRNA-Abbaus oder einer gestörten Histon-Prozessierung führen kann, haben Untersuchungen in *D. melanogaster* und in *S. cerevisiae* bereits gezeigt (Herrero & Moreno, 2011; Salzler *et al.*, 2009). Hier wurde von einer genomischen Instabilität berichtet, die nach Lsm1-Deletion in *S. cerevisiae* (Herrero & Moreno, 2011) oder in *D. melanogaster*-SLBP-Mutanten auftrat. In SLBP-Mutanten wurden erhöhte Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs, jedoch unveränderte Histon-Proteinmengen detektiert (Salzler *et al.*, 2009). Veränderte Histon-Proteinmengen infolge der SLBP-Mutation können daher nicht als Ursache für die genomische Instabilität angesehen werden. Vermutlich ist die genomische Instabilität auf die verlangsamte Chromatin-Assemblierung an der Replikationsgabel zurück zu führen (Salzler *et al.*, 2009), die Doppelstrangbrüche begünstigen kann (Ye & Adams, 2003). So treten beispielsweise auch vermehrt Chromosomen-defekte bei einer verzögerten Zellzyklusprogression in *D. melanogaster* auf (Loupart *et al.*, 2000; Pflumm & Botchan, 2001). Übereinstimmend dazu konnte ein Proliferationsdefekt in SLBP-Mutanten gezeigt werden, der in einer verlängerten S-Phase bestand. Anhand dieses Beispiels wird deutlich, dass ein Ungleichgewicht der Histon-mRNA-Menge die Zellvitalität beeinflussen kann und die Kontrolle der Histon-mRNA-Menge essentiell ist.

5 Vorkommen und Bedeutung polyadenylierter Histon-mRNAs

Zum verstärkten Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs kommt es u.a., wenn die Histon-mRNA-Prozessierung gestört ist, wie es in Kapitel I, Abschnitt 1.3 bereits erwähnt wurde. Eine Störung der Histon-mRNA-Prozessierung kann beispielsweise durch die Reduktion von Proteinen bewirkt werden, die an der Prozessierung beteiligt sind (Godfrey *et al.*, 2009; Narita *et al.*, 2007; Pirngruber & Johnsen, 2010; Sullivan *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). So führt der RNAi-vermittelte *knockdown* von SLBP, FLASH oder NPAT zum vermehrten Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs (Pirngruber & Johnsen, 2010; Sullivan *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2009). In den hier durchgeführten Microarray-Analysen wurden polyadenylierte Histon-mRNAs als PARN-Substrate identifiziert, da sie in PARN-depletierten Zellen angereichert vorlagen und auch mit dem Vorhandensein eines Poly(A)-Schwanzes und einem 5'-Cap die Strukturen besitzen, die aufgrund von *in vitro*-Analysen einem idealen

PARN-Substrat zugeordnet werden. Generell kann es in *knockdown*-Analysen immer zum Auftreten von unspezifischen Effekten, den sog. *off target effects*, kommen. Bei einem unspezifischen Effekt, der die Histon-mRNA-Prozessierung betrifft, würde es auch zum vermehrten Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs kommen, was in diesem Fall nicht mit der Funktion von PARN erklärt werden kann. Die Microarray-Analysen in PARN-depletierten Zellen zeigten lediglich für den Prozessierungsfaktor FLASH eine reduzierte mRNA-Menge. Er interagiert mit dem U7snRNP und bildet mit diesem zusammen eine Plattform, die u.a. die Endonuklease CPSF-73 zur Prä-Histon-mRNA rekrutiert und damit für die Prozessierung wichtig ist (Sabath *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2013, Burch *et al.*, 2011). Obwohl mit den qRT-PCR-Messungen keine Reduktion der FLASH-mRNA-Menge mit der PARN1-siRNA und PARN3-siRNA³ bestätigt werden konnte (siehe Abbildung 17), sollte aufgrund der gegensätzlichen Ergebnisse zwischen Microarray-Analyse und qRT-PCR-Messung eine weitere unabhängige *Northern-blot*-Analyse durchgeführt werden, um eine unveränderte FLASH-mRNA-Menge zu verifizieren. Da für die Funktion von FLASH in der Histon-Prozessierung die Proteinmenge und nicht die mRNA-Menge entscheidend ist, sollte außerdem die unveränderte FLASH-Proteinmenge in einem *Western-blot* eindeutig gezeigt werden.

Polyadenylierte Histon-mRNAs kommen in der Zelle nicht nur bei einer gestörten Histon-mRNA-Prozessierung vor, sondern sind während bestimmter Entwicklungs- und Differenzierungsprozesse und auch als replikationsunabhängige Histon-mRNAs vorhanden (Collart *et al.*, 1991; Kirsh *et al.*, 1989). Als ein Beispiel für das entwicklungsabhängige Auftreten polyadenylierter Histon-mRNAs ist die Spermatogenese in Mäusen und in Hühnern zu nennen (Moss *et al.*, 1994, Challoner, 1989). Es wird vermutet, dass hier die Abwesenheit von Prozessierungsfaktoren wie dem U7snRNP zur Ausbildung polyadenylierter Histon-mRNAs beiträgt. Auch in *Xenopus*-Oozyten wurden polyadenylierte Histon-mRNAs identifiziert, wobei der Poly(A)-Schwanz der Histon-mRNAs während der Oozyten-Reifung vollständig entfernt wird (Ballantine & Woodland, 1985), so dass im *Xenopus*-Embryo die Histon-mRNAs mit einer *stem-loop*-Struktur enden. Im Gegensatz dazu kommt es während der Zelldifferenzierung von Maus-Zelllinien zum gleichzeitigen Auftreten von Histon-mRNAs mit einer 3'-*stem-loop*-Struktur oder

³ bei Verwendung der PARN-3-siRNA wurde in zwei von vier Experimenten eine Anreicherung der polyadenylierten Histon-mRNAs beobachtet

einem 3'-Poly(A)-Schwanz (Cheng *et al.*, 1989). Die replikationsunabhängigen, Histon-mRNAs wiederum werden unabhängig vom Zellzyklus in somatischen Zellen gebildet und sind polyadenyliert (Bonner *et al.*, 1993; Brush *et al.*, 1985; Wells & Kedes, 1985). Die Proteine der replikationsunabhängigen Histon-mRNAs sind beispielsweise in Prozessen der Chromatinremodellierung oder DNA-Reparatur involviert (Ahmad and Henikoff, 2002; Fernandez-Capetillo & Nussenzweig, 2004; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Thiriet & Hayes, 2005). Sie können aber auch die Prozessierung von replikationsabhängigen Histon-mRNAs beeinflussen, was in einer genomweiten Suche nach Faktoren, die die Histon-mRNA-Prozessierung beeinflussen, aufgeklärt wurde. Die RNAi-vermittelte Depletion der replikationsunabhängigen Histone H3.3 und H2Av führt in *D. melanogaster* zu einer Störung der korrekten Histon-mRNA-Prozessierung und zur Bildung polyadenylierter Histon-mRNAs. Als Ursache für die erhöhten Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs infolge der H2Av-Depletion wurde eine Misslokalisierung des U7snRNPs außerhalb der HLB angeführt (Wagner *et al.*, 2007b). Diese Beobachtung legt die Vermutung nahe, dass Histon-Proteine der replikationsunabhängigen, polyadenylierten Histon-mRNAs die Prozessierung von replikationsabhängigen Histon-mRNAs regulieren, indem sie beispielsweise die Lokalisation des U7snRNP beeinflussen.

Die Bedeutung erhöhter Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs für die Zelle ist nicht eindeutig geklärt, obwohl die Reduktion zahlreicher Prozessierungsfaktoren, wie beispielsweise SLBP, FLASH usw. diesen Phänotyp zeigen. Es wurde bereits beschrieben, welche Auswirkung eine SLBP-Mutation oder der *knockdown* von SLBP hat. Der SLBP-*knockdown* führt in humanen Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Histon-Proteinmenge (Sullivan *et al.*, 2009), da SLBP am Transport von Histon-mRNAs beteiligt ist. Demnach gelangen nach SLBP-*knockdown* weniger Histon-mRNAs in das Zytoplasma zu den Polysomen, um dort translatiert zu werden. Darüber hinaus trägt SLBP auch zu einer effizienten Translation bei (Cakmakci *et al.*, 2008; Sanchez & He, 2002). Realisiert wird dies über die Interaktion zwischen SLBP und dem SLBP-*interacting protein* 1 (SLIP1), einem Aktivator der Histon-mRNA-Translation, der mit dem Initiationsfaktor eIF4G interagiert und wahrscheinlich eine Zirkularisierung von Histon-mRNAs bewirkt (Cakmakci *et al.*, 2008). Eine Beeinflussung von SLBP würde demnach nicht nur zu einer erhöhten Menge polyadenylierter Histon-mRNAs beitragen, sondern auch zu einem eingeschränkten

Transport aus dem Zellkern und einer verminderten Translationseffizienz, die in einer verminderten Histon-Proteinmenge resultiert. Diese zahlreichen Funktionen von SLBP erschweren es letztendlich, die alleinigen Auswirkungen erhöhter Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs für die Zelle in SLBP-*knockdown*-Studien zu bestimmen. Es existieren zahlreiche Publikationen, in denen der Anstieg polyadenylierter Histon-mRNAs infolge einer RNAi-vermittelten Depletion von Histon-Prozessierungsfaktoren beschrieben wird. Andererseits wird mit diesen Analysen auch immer die korrekte Histon-mRNA-Prozessierung unterdrückt, sodass die Auswirkungen der erhöhten Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs nicht zu unterscheiden sind von den Auswirkungen geringerer Mengen korrekt prozessierter Histon-mRNAs. In FLASH-, ZFP100-, Lsm11- und Lsm10-depletierten Zellen wurde eine höhere Anzahl an Zellen in der G1-Phase beobachtet, wohingegen die Anzahl an Zellen in der G2/Mitose-Phase oder S-Phase reduziert ist (Wagner *et al.*, 2007b). Auch in den hier durchgeführten Analysen zur Zellzyklusverteilung nach PARN-kd konnte eine leicht erhöhte Anzahl an Zellen in der G1-Phase beobachtet werden (siehe Abbildung 21). Ob dies jedoch von den leicht erhöhten Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs verursacht wird oder im Zusammenhang mit den oligoadenylierten snoRNAs oder noch weiteren Ereignissen steht, ist noch nicht untersucht. Die Auswirkungen polyadenylierter Histon-mRNAs für die Zelle sind kaum verstanden, da einzelne Aspekte, wie der Export aus dem Zellkern oder die Translation der polyadenylierten Histon-mRNAs noch nicht umfassend geklärt sind. Einige Untersuchungen deuten darauf hin, dass polyadenylierte Histon-mRNAs in das Zytoplasma transportiert werden und mit Polysomen assoziiert sind (Kari *et al.*, 2013). Die hier durchgeführten Synchronisationsstudien zeigen außerdem, dass polyadenylierte Histon-mRNAs vermutlich der Zellzykluskontrolle entgehen (siehe Abbildung 26) und nicht wie die replikationsabhängigen Histon-mRNAs am Ende der S-Phase abgebaut werden. Eine weniger starke Regulation polyadenylierter Histon-mRNAs im Vergleich zu korrekt prozessierten Histon-mRNAs wird durch die Beobachtung gestützt, dass die missprozessierten Histon-mRNAs auch weniger sensitiv auf die Inhibierung der DNA-Synthese durch HU reagieren als korrekt prozessierte Histon-mRNAs (siehe Abbildung 22). Dieses Verhalten wurde auch von weiteren Arbeitsgruppen bereits beschrieben (Mannironi *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1994). Somit könnten polyadenylierte Histon-mRNAs jederzeit im Zellzyklus translatiert werden, was zu erhöhten Histon-Proteinmengen führen könnte, wodurch

das Histon-Proteingleichgewicht gestört wäre. Ein Überangebot an freien Histon-Proteinen ist mit einer Sättigung von Histon-modifizierenden Enzymen verbunden. Darüber hinaus binden überschüssige Histon-Proteine in einer unspezifischen Weise sowohl DNA als auch RNA (Singh *et al.*, 2009), wodurch sie gravierend in zelluläre Abläufe eingreifen. Um diesem Prozess entgegen zu wirken und mögliche zelluläre Schäden zu vermeiden, existieren auch zelluläre Regulationsmöglichkeiten. So wird die Histon-Proteingleichgewichtsmenge auch stark reguliert, so dass höhere Histon-mRNA-Mengen nicht zwingend zu akkumulierenden Proteinmengen führen. In *S. cerevisiae* kommt es infolge erhöhter Histon-Proteinmengen auch zu einem vermehrten Histon-Proteinabbau, wobei die überschüssigen Histone durch die Assoziation mit der DNA *damage checkpoint kinase* Rad53 phosphoryliert und für den Abbau durch das Proteasom markiert werden (Singh *et al.*, 2009).

6 Effizienz der Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion

Die Verwendung von Histon-Reportern sollte klären, ob das Polyadenylierungssignal und das GU-reiche Element in Histon-Genen Einfluss auf die Polyadenylierung von Histon-mRNAs haben. Bei der Transfektion der Histon-Reporter, die eine Mutation im HDE tragen und somit die Histon-Prozessierung stören, trat neben der erwarteten missprozessierten, polyadenylierten Histon-mRNA auch eine längere, gespleißte und polyadenylierte Histon-mRNA auf. Vermutlich verlief die Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion an der ersten Polyadenylierungsstelle nach dem regulären Histon-mRNA-Ende nicht vollständig (siehe Abbildung 19) und es wurde die folgende Polyadenylierungsstelle im Histon-Reporter benutzt, die zur Bildung einer weiteren polyadenylierten und gespleißten Histon-mRNA führte. Da keine weitere polyadenylierte Histon-mRNA oberhalb der gespleißten Histon-mRNA im *Northern-blot* zu detektieren war, ist die Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion an dieser distalen Polyadenylierungsstelle als vollständig anzusehen. Ein wesentlicher Grund für die effizientere Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion für die gespleißte Histon-mRNA liegt sehr wahrscheinlich in dem Vorhandensein eines Introns. *In vitro*-Analysen haben ergeben, dass die Anwesenheit eines Introns in chimären Reporter-RNAs die Polyadenylierung stimulieren kann (Niwa *et al.*, 1990). Darüber hinaus ist bekannt, dass Spleißfaktoren mit 3'-Prozessierungsfaktoren, wie CFI, interagieren können und dies zu einer Stimulation der 3'-Prozessierung führt

(Millevoi *et al.*, 2006). Zusätzlich wird die Vollständigkeit der Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion auch von dem GU-reichen Element beeinflusst, was Untersuchungen mit der intronfreien Melanocortin 4-Rezeptor (MC4R)-Prä-mRNA ergeben haben (Nunes *et al.*, 2010). Da die GU-reichen Elemente der gespleißten und der nicht gespleißten Prä-Histon-Reporter-RNA verschieden waren, kann damit auch eine unterschiedlich effiziente Polyadenylierung erklärt werden.

Zusammenfassung

Zu Beginn dieser Arbeit waren bereits Microarray-Daten vorhanden, deren Analyse zur Identifizierung der polyadenylierten Histon-mRNAs als potenzielle PARN-Substrate führten. In dieser Arbeit wurde noch ein drittes Microarray-Experiment durchgeführt und zusammen mit den zwei vorhandenen Microarray-Datensets analysiert. Es wurden die polyadenylierten Histon-mRNAs mit qRT-PCR-Messungen und *Northern-blot*-Analysen unter der Verwendung der PARN1-siRNA verifiziert. Die Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs nach der RNAi-vermittelten PARN-Reduktion konnte jedoch mit den zwei weiteren PARN-siRNAs nicht eindeutig verifiziert werden. Aus diesem Grund ist es notwendig, weitere Analysen, wie beispielsweise den FLASH-PARN-Doppel-*knockdown* durchzuführen, um eine potenzielle Anreicherung polyadenylierter Histon-mRNAs in PARN-depletierten Zellen eindeutig zu quantifizieren. Anhand weiterer Experimente könnte geklärt werden, ob PARN an der Reprozessierung polyadenylierter Histon-mRNAs zu korrekt prozessierten Histon-mRNAs beteiligt ist oder eine Funktion im Abbau der polyadenylieren Histon-mRNAs übernimmt. Außerdem konnten im Rahmen dieser Dissertation Histon-RPAs etabliert werden, die die Analyse der gering abundanten polyadenylieren Histon-mRNAs ermöglicht. Die Charakterisierung der polyadenylieren Histon-mRNAs erfolgte in Bezug auf die Lage oder die Länge des Poly(A)-Schwanzes mit Sequenzier- oder *Northern-blot*-Analysen. Es konnte gezeigt werden, dass für die meisten der sequenzierten Histon-RNAs der Poly(A)-Schwanz relativ nahe zum regulären 3'-Ende angefügt wird und der Poly(A)-Schwanz eine Länge von bis zu 200 Nukleotiden besitzt. Im Zuge dieser Arbeit wurden außerdem Histon-Reporter kloniert, die neben dem Histon-Leseraster und dem 5'- und 3'-UTR auch weiter 3' gelegene genomische Sequenz enthält. Mit Hilfe dieser Reporter konnte der Einfluss des Polyadenylierungssignals und des GU-reichen Elementes auf die Gleichgewichtsmenge polyadenylierter Histon-mRNAs untersucht werden. Die reduzierte Menge polyadenylierter Histon-mRNAs war bei einer Mutation im Polyadenylierungssignal oder im GU-reichen Element zu beobachten, womit eine Beteiligung der kanonischen Polyadenylierungsmaschinerie an diesem Prozess wahrscheinlich ist. Außerdem deuten die Ergebnisse des Synchronisationsexperimentes darauf hin, dass polyadenylierte Histon-mRNAs im Gegensatz zu den korrekt prozessierten Histon-mRNA der Zellzykluskontrolle entgehen. Die durchgeführten Zellzyklusverteilungsanalysen haben außerdem eine

Tendenz aufgezeigt, nach der in PARN-depletierten Zellen ein höherer Anteil an Zellen in der G1-Phase vorhanden ist als in den Kontroll-Zellen.

V Anhang

1 Statistische Betrachtung zur Anreicherung potenzieller PARN-Substrate in Microarray-Analysen

In den drei Microarray-Analysen zeigten 1657, 3375 und 2616 Sondensets eine mind. 1,5-fach höhere Signalintensität in PARN-kd-Proben als in den Kontroll-Proben. Die Anzahl an Sondensets, die durch Zufall in diesen drei Microarray-Analysen übereinstimmend vorkommen, wird berechnet, indem man die drei Quotienten, gebildet aus der Anzahl an Sondensets mit einer mind. 1,5-fachen Anreicherung in PARN-depletierten Zellen und der Anzahl aller Sondensets des Microarray-Chips (54519), miteinander multipliziert und mit der gesamten Anzahl der Sondensets des Chips multipliziert.

$$N = \frac{1657}{54519} \times \frac{3375}{54519} \times \frac{2616}{54519} = 0,0001006 \rightarrow 0,0001006 \times 54519 = 5,5$$

5,5 übereinstimmende Sondensets in den drei Experimenten könnten mit einem rein zufälligen Ereignis erklärt werden. Es zeigten jedoch 64 Sondensets eine mind. 1,5-fache Anreicherung in PARN-depletierten Zellen, wobei für 26 Sondensets die Irrtumswahrscheinlichkeit für eine Anreicherung unter 0,05 lag. Folglich ist die beobachtete Anreicherung der Signalintensitäten für die 26 identifizierten, potenziellen PARN-Substrate nicht allein auf zufällige Ereignisse zurückzuführen, sondern in Bezug zum PARN-kd zu setzen.

2 qRT-PCR-Ergebnisse für vier weitere Histon-mRNAs

Ergänzend zu den Daten aus Kapitel III, Abschnitt 2 sind hier Ergebnisse der qRT-PCR-Messungen für vier weitere Histon-mRNAs dargestellt. Es zeigen sich die gleichen Tendenzen wie für die bereits gezeigten Histon-mRNAs. Polyadenylierte Histon-mRNAs sind mit Ausnahme der Hist1H1E im Mittel angereichert, wohingegen die Gesamt-Histon-mRNA-Menge mit Ausnahme der Hist2H2BE1 keine Anreicherung aufweist.

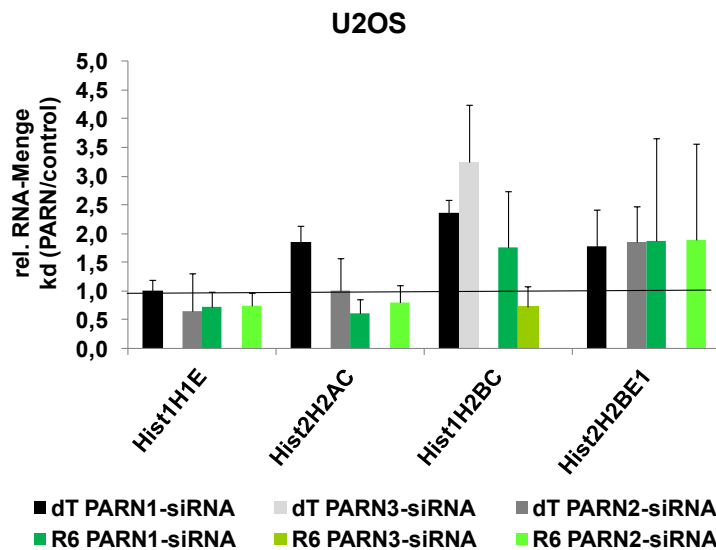


Abbildung 28: qRT-PCR-Ergebnisse

2µg RNA wurde mit *Random-Hexamer-Primer* (R6) beziehungsweise oligo (dT)₁₂-Primer (dT) revers transkribiert. Die cDNA-Menge wurde mittels histonspezifischer Primer in qPCR-Messungen quantifiziert. Relative RNA-Mengen zwischen PARN-kd-Proben und Kontroll-kd-Proben wurden auf PPIA und RPLP0 normalisiert. Die Mittelwerte und Standardabweichungen für die rel. RNA-Mengen der PARN1-siRNA- und PARN3-siRNA-transfizierten Zellen basieren auf vier biologisch unabhängigen Experimenten, für die PARN2-siRNA auf zwei Experimenten.

3 qRT-PCR-Ergebnisse unter Verwendung speziell entworfener Oligonukleotide zur Amplifikation polyadenylierter Histon-mRNA oder Gesamt-Histon-mRNA.

In der RNA-Analyse für Zellen, bei denen der *knockdown* mit der PARN1-siRNA durchgeführt wurde, ist deutlich eine Anreicherung der polyadenylierter Histon-mRNAs für Hist1H2AC und Hist2H2AA, nicht jedoch für Hist1H2BC in PARN-depletierten Zellen zu erkennen. Im Unterschied dazu weisen die Gesamt-Histon-mRNA-Mengen keine Änderung auf. Wurde der *knockdown* hingegen mit der PARN3-siRNA bewirkt, so zeigen sich weder für die Gesamtmengen noch für die Mengen polyadenylierter Histon-mRNAs eine Anreicherung infolge des PARN-kd. Die PARN-Proteinmenge ist in beiden experimentellen Ansätzen unter 10%

gesunken, obwohl die PARN-mRNA-Menge in den PARN3-siRNA transfizierten Zellen deutlich höher ist als in PARN1-siRNA-transfizierten Zellen. Geringe Schwankungen bezüglich der *knockdown*-Effizienz unterhalb von 10% sind möglicherweise die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse. Hinzu kommt, dass die Anreicherung der polyadenylierten Histon-mRNAs für die PARN3-siRNA geringer war als für die PARN1-siRNA.

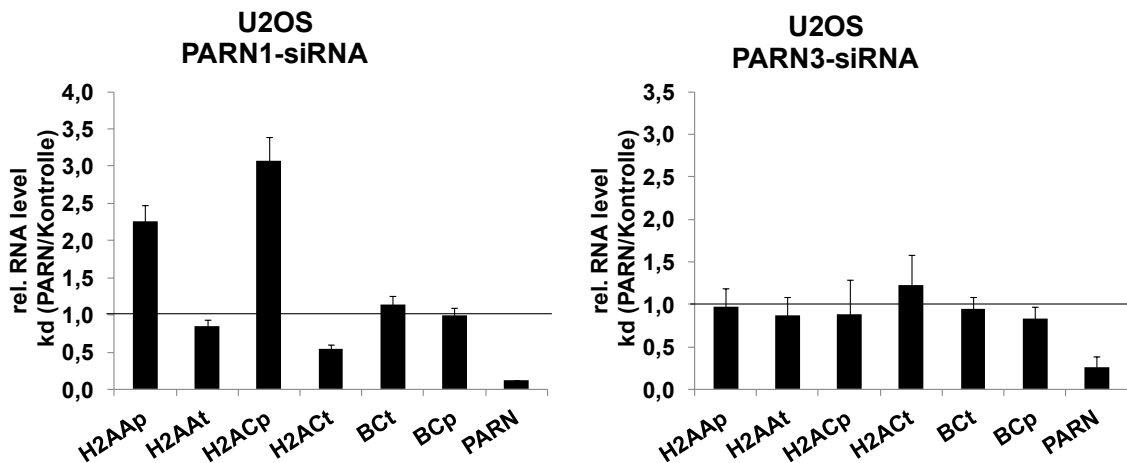


Abbildung 29: qRT-PCR-Analyse mit speziell entworfenen Primern zur Amplifikation polyadenylierter Histon-mRNAs oder Gesamt-Histon-mRNAs

RNA aus PARN-depletierten Zellen (siRNA1 und 3) und Kontroll-Zellen wurde mit *Random-Hexamer-Primer* revers transkribiert und mittels qRT-PCR analysiert. Die Änderungen der Menge polyadenylierter Histon-mRNAs infolge der PARN-Depletion sind für Hist2H2AA (H2AAp), Hist1H2AC (H2ACp) und Hist1H2BC (BCp) angegeben. Die Änderungen der Gesamt-Histon-mRNA-Menge infolge der PARN-Depletion sind für Hist2H2AA (H2AAt), Hist1H2AC (H2Act) und Hist1H2BC (BCt) dargestellt. Das Ergebnis basiert auf zwei biologisch unabhängigen Experimenten.

4 Sequenzanalyse der polyadenylierten Histon-mRNAs

Histon - mRNA	Anzahl	mRNA -Ende , korrekt prozessiert	Polyadenylierg.signal	PAS	Distanz	Sheppard et. al.
Hist1H1C	2	chr6 -26.055.968	AATAAA (chr6/26.055.954 -59)	chr6 -26.055.935	33	chr6 -26.055.934
	1		AATAAA (chr6/26.055.954 -59)	chr6 -26.055.934	34	chr6 -26.055.934
Hist1H2BC	1	chr6 -26.123.694		chr6 -26.123.961	3	chr6 -26.114.869 -5.022 -5.119 -8.344 - 20.955 -200.956 -216.414
	1		ATAAT (chr6/26.123.382 -78)	chr6 -26.123.344	350	
Hist1H2AB	1	chr6 -26.033.319	AGCAAA (chr6/26.033.346 -41)	chr6 -26.033.319	0	chr6 -26.033.282 -217.703
Hist1H2AJ	1	chr6 -27.782.080	AAAAA (chr6/27.782.070 -66)	chr6 -27.782.017	63	chr6 -27.782.023
Hist1H2BN	1	chr6 -27.806.888		chr6 -27.807.276	388	chr6 -27.927.945
Hist1H2BK	1	chr6 -27.106.072	AATAAA (chr6/27.106.092 -97)	chr6 -27.106.072	0	chr6/27.105.078 -6.37 -790 -6.073 -11.656 - 13.755 -14.133
Hist1H3A	2	chr6 -26.021.186	AGTAA (chr6/26.021.188 -93)	chr6 -26.021.204	17	
Hist1H3H	1	chr6 -27.778.314		chr6 -27.778.317	2	
Hist1H3D	16	chr6 -26.197.012	TATAAA (chr6/26.196.999 -7.004)	chr6 -26.196.981	31	
	1		TATAAA (chr6/26.196.999 -7.004)	chr6 -26.196.969	43	
Hist1H4J	2	chr6 -27.792.258	AATAAA (chr6/27.792.230 -35)	chr6 -27.792.259	1	chr6/27.900.236
	1		AATAAA (chr6/27.792.230 -35)	chr6 -27.792.260	2	chr6/27.900.236
	1		AATAAA (chr6/27.792.230 -35)	chr6 -27.792.273	15	chr6/27.900.236
Hist2H2AA	4	chr1 -149.823.161	AATAAA (chr1/149.823.170 -75)	chr1 -149.823.192	31	chr1/149.823.193 -13.751
	4		AATAAA (chr1/149.823.170 -75)	chr1 -149.823.196	35	chr1/149.823.193 -13.751
	1		AATAAA (chr1/149.823.170 -75)	chr1 -149.823.200 - 202	41-39	chr1/149.823.193 -13.751
Hist2H2AC	2	chr1 -149.858.961	AATAAA (chr1/149.858.910 -15)	chr1 -149.858.962	0	chr1 -148.125.568
Hist2H4A (Hist1H4B)	1	chr1 -149.804.616 (chr1 -149.832.330)		chr1 -149.804.614 (chr1 -149.832.332)	-2	Hist2H4A: chr1/148.098.952

(Daten: Lars Anders, Claudia Weißbach, siehe Abbildung 11)

5 Sequenzanalyse der gespleißten Histon-mRNA

Für die Sequenzanalyse der gespleißten Histon-mRNA wurde RNA aus den Zellen isoliert, mit einem oligo(dT)-Adapter-Primer revers transkribiert, die cDNA mit dem H2AA_for_KI-Primer (siehe Tabelle 9) und dem Adapter-Primer in einer PCR amplifiziert und in einen geschnittenen Vektor kloniert. Anschließend erfolgte die Sequenzierung mit dem T7- und dem T3-Promotor-Primer.

Dargestellt ist die Sequenz der gespleißten Histon-mRNA. Es handelt sich dabei um die Sequenzanalyse einer RNA, die aus transfizierten U2OS-Tet-Off-Zellen isoliert wurde. Das dabei transfizierte Plasmid war pTRE2hyg-H2AA-HDE_{mut}-AUA_{wT}-dse⁻,

6 Abkürzungsverzeichnis

ARE	<i>AU</i> -reiche Elemente
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ca.	zirka
Ci	Curie
CBC	<i>cap binding complex</i>
CUG-BP	CUG-bindendes Protein
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
eIF	eukaryotischer Initiationsfaktor
HDE	<i>histone downstream element</i>
HLB	<i>histone locus bodies</i>
HU	Hydroxyharnstoff
Kontroll-kd	Kontroll- <i>knock down</i>
kDa	kiloDalton
M	Molar
Mas5	Affymetrix Microarray suite 5.0
MCS	<i>multiple cloning site</i>
min.	Minuten
mind.	mindestens
N	Anzahl
NMD	<i>nonsense mediated decay</i>
PARN-kd	PARN- <i>knock down</i>
PAP	Poly(A)-Polymerase
PCR	Polymerasekettenreaktion
RNase	Ribonuklease
RPA	<i>ribonuclease protection assay</i>
rRNA	ribosomale RNA
RT	Reverse Transkription
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
sog.	sogenannte
u.U.	unter Umständen
ü.N.	über Nacht
UTR	untranslatierter Bereich
Vol.	Volumen
<i>X. laevis</i>	<i>Xenopus laevis</i>

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Histon-mRNA-Prozessierung	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung des Histon-Reporters	23
Abbildung 3: Übersicht zum Microarray-Experiment und zur Reduktion der PARN-Proteinmenge durch RNAi	46
Abbildung 4: Schematische Darstellung eines Sondensets	47
Abbildung 5: Microarray-Analyse (I)	48
Abbildung 6: Verifizierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR (I)	55
Abbildung 7: Verifizierung der Microarray-Daten mittels qRT-PCR (II)	56
Abbildung 8: PARN-Proteinmenge in verschiedenen Zelllinien	58
Abbildung 9: RNAi-vermittelte PARN-Reduktion und RNA-Analyse in HeLa-Zellen	60
Abbildung 10: Schematische Darstellung der Histon-mRNA-Prozessierung	61
Abbildung 11: Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs	62
Abbildung 12: Schematische Darstellung eines <i>ribonuclease protection assay (RPA)</i>	65
Abbildung 13: Analyse von Histon-mRNAs mittels <i>ribonuclease protection assay (RPA)</i>	66
Abbildung 14: Hist1H3D-RPA	68
Abbildung 15: RPA-Analyse für Hist1H1C nach PARN-Depletion unter Verwendung verschiedener siRNAs	70
Abbildung 16: Einfluss der PARN-Depletion auf die U7snRNA-Menge	73
Abbildung 17: Einfluss des PARN-kd auf die FLASH-mRNA-Menge	75
Abbildung 18: Analyse der Poly(A)-Schwanzlänge polyadenylierter Histon-mRNAs	77
Abbildung 19: Einfluss des Polyadenylierungssignals und des GU-reichen Elementes auf die Polyadenylierung von Histon-mRNAs	80
Abbildung 20: Schematische Darstellung der exogenen, gespleißten und polyadenylierten Hist2H2AA-RNA	82
Abbildung 21: Zellzyklusverteilungsanalyse in PARN-depletierten Zellen und Kontroll-Zellen	85
Abbildung 22: Einfluss von HU auf die polyadenylierten Histon-mRNAs	87
Abbildung 23: Etablierung des PARN-kd-Synchronisations-Experimentes	90
Abbildung 24: <i>Western-blot</i> -Analyse zum initialen RNAi-Synchronisationsexperiment	91
Abbildung 25: Schematische Darstellung zur Lage der Oligonukleotide für die Amplifikation polyadenylierter Histon-mRNAs und der Amplifikation von polyadenylierten und korrekt prozessierten Histon-mRNAs	92
Abbildung 26: Das RNAi-Synchronisationsexperiment	93
Abbildung 27: Graphische Darstellung potenzieller Basenpaare zwischen U7snRNA und Histon- mRNAs	106
Abbildung 28: qRT-PCR-Ergebnisse	118
Abbildung 29: qRT-PCR-Analyse mit speziell entworfenen Primern zur Amplifikation polyadenylierter Histon-mRNAs oder Gesamt-Histon-mRNAs	119

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Kits	19
Tabelle 2: Verwendete siRNAs	19
Tabelle 3: Verwendete Plasmide	20
Tabelle 4: Verwendeter Bakterienstamm	20
Tabelle 5: Verwendete Zelllinien (I).....	20
Tabelle 6: Verwendete Zelllinien (II).....	21
Tabelle 7: Verwendete Enzyme	21
Tabelle 8: Beschreibung der klonierten DNA-Fragmente	23
Tabelle 9: Oligonukleotide für die Klonierung	24
Tabelle 10: Oligonukleotide für die <i>in vitro</i> -Mutagenese	25
Tabelle 11: Primer für die qPCR	32
Tabelle 12: Primer für die Sequenzanalyse polyadenylierter Histon-mRNAs	33
Tabelle 13: Verwendete Antikörper	35
Tabelle 14: Oligonukleotide für die Herstellung der <i>in vitro</i> -transkribierten <i>Northern-blot</i> -Sonden	36
Tabelle 15: Oligonukleotide für die Herstellung der RPA-Sonden.....	37
Tabelle 16: Oligonukleotide für die <i>Northern-blot</i> -Analyse	37
Tabelle 17: Microarray-Analyse(II)	50
Tabelle 18: mRNAs mit erhöhten Transkriptmengen infolge der PARN-Depletion	51
Tabelle 19: Microarray-Analyse (III)	53
Tabelle 20: RNA-Mengenänderung weiterer Prozessierungsfaktoren nach PARN-kd.....	74

VI Literaturverzeichnis

Ahmad, K., and Henikoff, S. (2002). The histone variant H3.3 marks active chromatin by replication-independent nucleosome assembly. *Mol. Cell* 9, 1191–1200.

Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3' → 5' exonucleases. *Genes Dev.* 13, 2148–2158.

Allmang, C., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (2000). Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucleic Acids Res.* 28, 1684–1691.

Anders L. (2014): Die Rolle von PARN auf die replikationsabhängigen Histon-mRNAs, Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Anderson, J.S., and Parker, R.P. (1998). The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.* 17, 1497–1506.

Anderson, J.T., and Wang, X. (2009). Nuclear RNA surveillance: no sign of substrates tailing off. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 44, 16–24.

Archer, K.J., and Reese, S.E. (2010). Detection call algorithms for high-throughput gene expression microarray data. *Brief. Bioinform.* 11, 244–252.

Azzouz, T.N., Gruber, A., and Schümperli, D. (2005). U7 snRNP-specific Lsm11 protein: dual binding contacts with the 100 kDa zinc finger processing factor (ZFP100) and a ZFP100-independent function in histone RNA 3' end processing. *Nucleic Acids Res.* 33, 2106–2117.

Balatsos, N.A.A., Nilsson, P., Mazza, C., Cusack, S., and Virtanen, A. (2006). Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J. Biol. Chem.* 281, 4517–4522.

Ballantine, J.E., and Woodland, H.R. (1985). Polyadenylation of histone mRNA in *Xenopus* oocytes and embryos. *FEBS Lett.* 180, 224–228.

Barnard, D.C., Ryan, K., Manley, J.L., and Richter, J.D. (2004). Symplekin and xGLD-2 are required for CPEB-mediated cytoplasmic polyadenylation. *Cell* 119, 641–651.

Beggs, S., James, T.C., and Bond, U. (2012). The PolyA tail length of yeast histone mRNAs varies during the cell cycle and is influenced by Sen1p and Rrp6p. *Nucleic Acids Res.* 40, 2700–2711.

Beharry, Z., Mahajan, S., Zemskova, M., Lin, Y.-W., Tholanikunnel, B.G., Xia, Z., Smith, C.D., and Kraft, A.S. (2011). The Pim protein kinases regulate energy metabolism and cell growth. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 528–533.

Bella, F.L., Gallinari, P., McKinney, J., and Heintz, N. (1989). Histone H1 subtype-specific consensus elements mediate cell cycle-regulated transcription in vitro. *Genes Dev.* 3, 1982–1990.

Bergsma, D.J., Eder, C., Gross, M., Kersten, H., Sylvester, D., Appelbaum, E., Cusimano, D., Livi, G.P., McLaughlin, M.M., and Kasyan, K. (1991). The cyclophilin multigene family of peptidyl-prolyl isomerases. Characterization of three separate human isoforms. *J. Biol. Chem.* 266, 23204–23214.

Berndt, H., Harnisch, C., Rammelt, C., Stöhr, N., Zirkel, A., Dohm, J.C., Himmelbauer, H., Tavanez, J.-P., Hüttelmaier, S., and Wahle, E. (2012). Maturation of mammalian H/ACA box snoRNAs: PAPD5-dependent adenylation and PARN-dependent trimming. *RNA N. Y. N* 18, 958–972.

Berndt, H. (2011): Funktion der Poly(A)-spezifischen Ribonuklease (PARN) in humanen somatischen Zellen, Promotionsarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

- Bienroth, S., Wahle, E., Suter-Crazzolaro, C., and Keller, W. (1991). Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. *J. Biol. Chem.* *266*, 19768–19776.
- Bienroth, S., Keller, W., and Wahle, E. (1993). Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J.* *12*, 585–594.
- Birchmeier, C., Folk, W., and Birnstiel, M.L. (1983). The terminal RNA stem-loop structure and 80 bp of spacer DNA are required for the formation of 3' termini of sea urchin H2A mRNA. *Cell* *35*, 433–440.
- Birchmeier, C., Schümperli, D., Sconzo, G., and Birnstiel, M.L. (1984). 3' editing of mRNAs: sequence requirements and involvement of a 60-nucleotide RNA in maturation of histone mRNA precursors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *81*, 1057–1061.
- Birnstiel, M.L., Busslinger, M., and Strub, K. (1985). Transcription termination and 3' processing: the end is in site! *Cell* *41*, 349–359.
- Boeck, R., Tarun, S.J., (**) M.R., Deardorff, J.A., (**) S.M.-A., and Sachs, A.B. (1996). The Yeast Pan2 Protein Is Required for Poly(A)-binding Protein-stimulated Poly(A)-nuclease Activity. *J. Biol. Chem.* *271*, 432–438.
- Boeck, R., Lapeyre, B., Brown, C.E., and Sachs, A.B. (1998). Capped mRNA degradation intermediates accumulate in the yeast *spb8-2* mutant. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 5062–5072.
- Boland, A., Chen, Y., Raisch, T., Jonas, S., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Wohlbold, L., Weichenrieder, O., and Izaurralde, E. (2013). Structure and assembly of the NOT module of the human CCR4-NOT complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 1289–1297.
- Bond, U.M., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (1991). Multiple processing-defective mutations in a mammalian histone pre-mRNA are suppressed by compensatory changes in U7 RNA both in vivo and in vitro. *Genes Dev.* *5*, 1709–1722.
- Bongiomo-Borbone, L., De Cola, A., Vernole, P., Finos, L., Barcaroli, D., Knight, R.A., Melino, G., and De Laurenzi, V. (2008). FLASH and NPAT positive but not Coilin positive Cajal Bodies correlate with cell ploidy. *Cell Cycle Georget. Tex* *7*, 2357–2367.
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* *139*, 547–559.
- Bonner, W.M., Mannironi, C., Orr, A., Pilch, D.R., and Hatch, C.L. (1993). Histone H2A.X gene transcription is regulated differently than transcription of other replication-linked histone genes. *Mol. Cell. Biol.* *13*, 984–992.
- Boukamp, P., Petrussevska, R.T., Breitkreutz, D., Hornung, J., Markham, A., and Fusenig, N.E. (1988). Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J. Cell Biol.* *106*, 761–771.
- Bouveret, E., Rigaut, G., Shevchenko, A., Wilm, M., and Séraphin, B. (2000). A Sm-like protein complex that participates in mRNA degradation. *EMBO J.* *19*, 1661–1671.
- Brown, C.E., Tarun, S.Z., Jr, Boeck, R., and Sachs, A.B. (1996). PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 5744–5753.
- Brush, D., Dodgson, J.B., Choi, O.R., Stevens, P.W., and Engel, J.D. (1985). Replacement variant histone genes contain intervening sequences. *Mol. Cell. Biol.* *5*, 1307–1317.
- Burch, B.D., Godfrey, A.C., Gasdaska, P.Y., Salzler, H.R., Duronio, R.J., Marzluff, W.F., and Dominski, Z. (2011). Interaction between FLASH and Lsm11 is essential for histone pre-mRNA processing in vivo in *Drosophila*. *RNA N. Y. N* *17*, 1132–1147.

- Cakmakci, N.G., Lerner, R.S., Wagner, E.J., Zheng, L., and Marzluff, W.F. (2008). SLIP1, a Factor Required for Activation of Histone mRNA Translation by the Stem-Loop Binding Protein. *Mol. Cell. Biol.* 28, 1182–1194.
- Canavan, R., and Bond, U. (2007). Deletion of the nuclear exosome component RRP6 leads to continued accumulation of the histone mRNA HTB1 in S-phase of the cell cycle in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 35, 6268–6279.
- Carballo, E., Lai, W.S., and Blackshear, P.J. (2000). Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood* 95, 1891–1899.
- Cevher, M.A., Zhang, X., Fernandez, S., Kim, S., Baquero, J., Nilsson, P., Lee, S., Virtanen, A., and Kleiman, F.E. (2010). Nuclear deadenylation/polyadenylation factors regulate 3' processing in response to DNA damage. *EMBO J.* 29, 1674–1687.
- Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1995). AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.* 20, 465–470.
- Chen, S., Wu, K., and Knox, R. (2000). Structure-function studies of DT-diaphorase (NQO1) and NRH: quinone oxidoreductase (NQO2). *Free Radic. Biol. Med.* 29, 276–284.
- Cheng, G.H., Nandi, A., Clerk, S., and Skoultchi, A.I. (1989). Different 3'-end processing produces two independently regulated mRNAs from a single H1 histone gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 7002–7006.
- Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., van Erp, H., and Green, P.J. (2004). AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene* 328, 95–102.
- Cho, E.-J., Takagi, T., Moore, C.R., and Buratowski, S. (1997). mRNA capping enzyme is recruited to the transcription complex by phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes Dev.* 11, 3319–3326.
- Chomczynski, P., and Sacchi, N. (2006). The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. *Nat. Protoc.* 1, 581–585.
- Clark, K., Middelbeek, J., Dorovkov, M.V., Figdor, C.G., Ryazanov, A.G., Lasonder, E., and van Leeuwen, F.N. (2008). The alpha-kinases TRPM6 and TRPM7, but not eEF-2 kinase, phosphorylate the assembly domain of myosin IIA, IIB and IIC. *FEBS Lett.* 582, 2993–2997.
- Colgan, D.F., and Manley, J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev.* 11, 2755–2766.
- Collart, D., Ramsey-Ewing, A., Bortell, R., Lian, J., Stein, J., and Stein, G. (1991). Isolation and characterization of a cDNA from a human histone H2B gene which is reciprocally expressed in relation to replication-dependent H2B histone genes during HL60 cell differentiation. *Biochemistry (Mosc.)* 30, 1610–1617.
- Copeland, P.R., and Wormington, M. (2001). The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA N. Y.* N 7, 875–886.
- Cotten, M., Gick, O., Vasserot, A., Schaffner, G., and Birnstiel, M.L. (1988). Specific contacts between mammalian U7 snRNA and histone precursor RNA are indispensable for the in vitro 3' RNA processing reaction. *EMBO J.* 7, 801–808.
- Daugeron, M.C., Mauxion, F., and Séraphin, B. (2001). The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.* 29, 2448–2455.
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G., and Wahle, E. (2000). Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.* 19, 1079–1086.

- Dickson, K.S., Bilger, A., Ballantyne, S., and Wickens, M.P. (1999). The cleavage and polyadenylation specificity factor in *Xenopus laevis* oocytes is a cytoplasmic factor involved in regulated polyadenylation. *Mol. Cell. Biol.* *19*, 5707–5717.
- Van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E., and Séraphin, B. (2002). Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.* *21*, 6915–6924.
- Van Dijk, E.L., Schilders, G., and Pruijn, G.J.M. (2007). Human cell growth requires a functional cytoplasmic exosome, which is involved in various mRNA decay pathways. *RNA N. Y. N* *13*, 1027–1035.
- Dominski, Z., Erkmann, J.A., Yang, X., Sanchez, R., and Marzluff, W.F. (2002). A novel zinc finger protein is associated with U7 snRNP and interacts with the stem-loop binding protein in the histone pre-mRNP to stimulate 3'-end processing. *Genes Dev.* *16*, 58–71.
- Dominski, Z., Yang, X., Purdy, M., and Marzluff, W.F. (2003). Cloning and characterization of the *Drosophila* U7 small nuclear RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 9422–9427.
- Dominski, Z., Yang, X., and Marzluff, W.F. (2005). The polyadenylation factor CPSF-73 is involved in histone-pre-mRNA processing. *Cell* *123*, 37–48.
- Dunckley, T., and Parker, R. (1999). The DCP2 protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.* *18*, 5411–5422.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Séraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 15–22.
- Elis, W., Triantafellow, E., Wolters, N.M., Sian, K.R., Caponigro, G., Borawski, J., Gaither, L.A., Murphy, L.O., Finan, P.M., and Mackeigan, J.P. (2008). Down-regulation of class II phosphoinositide 3-kinase alpha expression below a critical threshold induces apoptotic cell death. *Mol. Cancer Res. MCR* *6*, 614–623.
- Englert, C., Hou, X., Maheswaran, S., Bennett, P., Ngwu, C., Re, G.G., Garvin, A.J., Rosner, M.R., and Haber, D.A. (1995). WT1 suppresses synthesis of the epidermal growth factor receptor and induces apoptosis. *EMBO J.* *14*, 4662–4675.
- Erkmann, J.A., Sánchez, R., Treichel, N., Marzluff, W.F., and Kutay, U. (2005). Nuclear export of metazoan replication-dependent histone mRNAs is dependent on RNA length and is mediated by TAP. *RNA N. Y. N* *11*, 45–58.
- Fahrner, K., Yarger, J., and Hereford, L. (1980). Yeast histone mRNA is polyadenylated. *Nucleic Acids Res.* *8*, 5725–5737.
- Fan, X.C., and Steitz, J.A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J.* *17*, 3448–3460.
- Fernandez-Capetillo, O., and Nussenzweig, A. (2004). Linking histone deacetylation with the repair of DNA breaks. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 1427–1428.
- Fernandez-Capetillo, O., Allis, C.D., and Nussenzweig, A. (2004). Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J. Exp. Med.* *199*, 1671–1677.
- Furger, A., Schaller, A., and Schumperli, D. (1998). Functional importance of conserved nucleotides at the histone RNA 3' processing site. *RNA* *4*, 246–256.
- Galli, G., Hofstetter, H., Stunnenberg, H.G., and Bimstiel, M.L. (1983). Biochemical complementation with RNA in the *Xenopus* oocyte: A small rna is required for the generation of 3' histone mRNA termini. *Cell* *34*, 823–828.

- Gao, M., Wilusz, C.J., Peltz, S.W., and Wilusz, J. (2001). A novel mRNA-decapping activity in HeLa cytoplasmic extracts is regulated by AU-rich elements. *EMBO J.* *20*, 1134–1143.
- Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 113–126.
- Gautier, L., Cope, L., Bolstad, B.M., and Irizarry, R.A. (2004). affy-analysis of Affymetrix GeneChip data at the probe level. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *20*, 307–315.
- Georgiev, O., and Birnstiel, M.L. (1985). The conserved CAAGAAAGA spacer sequence is an essential element for the formation of 3' termini of the sea urchin H3 histone mRNA by RNA processing. *EMBO J.* *4*, 481–489.
- Gherzi, R., Lee, K.-Y., Briata, P., Wegmüller, D., Moroni, C., Karin, M., and Chen, C.-Y. (2004). A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol. Cell* *14*, 571–583.
- Ghule, P.N., Dominski, Z., Yang, X.-C., Marzluff, W.F., Becker, K.A., Harper, J.W., Lian, J.B., Stein, J.L., van Wijnen, A.J., and Stein, G.S. (2008). Staged assembly of histone gene expression machinery at subnuclear foci in the abbreviated cell cycle of human embryonic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 16964–16969.
- Gilmartin, G.M., Schaufele, F., Schaffner, G., and Birnstiel, M.L. (1988). Functional analysis of the sea urchin U7 small nuclear RNA. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 1076–1084.
- Godfrey, A.C., White, A.E., Tatomer, D.C., Marzluff, W.F., and Duronio, R.J. (2009). The *Drosophila* U7 snRNP proteins Lsm10 and Lsm11 are required for histone pre-mRNA processing and play an essential role in development. *RNA N. Y. N* *15*, 1661–1672.
- Goicoechea de Jorge, E., Caesar, J.J.E., Malik, T.H., Patel, M., Colledge, M., Johnson, S., Hakobyan, S., Morgan, B.P., Harris, C.L., Pickering, M.C., et al. (2013). Dimerization of complement factor H-related proteins modulates complement activation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 4685–4690.
- Graves, R.A., Pandey, N.B., Chodchoy, N., and Marzluff, W.F. (1987). Translation is required for regulation of histone mRNA degradation. *Cell* *48*, 615–626.
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., et al. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* *458*, 223–227.
- Hacker, C., Valchanova, R., Adams, S., and Munz, B. (2010). ZFP36L1 is regulated by growth factors and cytokines in keratinocytes and influences their VEGF production. *Growth Factors Chur Switz.* *28*, 178–190.
- Hake, L.E., and Richter, J.D. (1994). CPEB is a specificity factor that mediates cytoplasmic polyadenylation during *Xenopus* oocyte maturation. *Cell* *79*, 617–627.
- Hau, H.H., Walsh, R.J., Ogilvie, R.L., Williams, D.A., Reilly, C.S., and Bohjanen, P.R. (2007). Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J. Cell. Biochem.* *100*, 1477–1492.
- Heldin, C.H., Johnsson, A., Wennergren, S., Wernstedt, C., Betsholtz, C., and Westermark, B. (1986). A human osteosarcoma cell line secretes a growth factor structurally related to a homodimer of PDGF A-chains. *Nature* *319*, 511–514.
- Hellwage, J., Jokiranta, T.S., Friese, M.A., Wolk, T.U., Kampen, E., Zipfel, P.F., and Meri, S. (2002). Complement C3b/C3d and cell surface polyanions are recognized by overlapping binding sites on the most carboxyl-terminal domain of complement factor H. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *169*, 6935–6944.

- Henriksson, N., Nilsson, P., Wu, M., Song, H., and Virtanen, A. (2010). Recognition of adenosine residues by the active site of poly(A)-specific ribonuclease. *J. Biol. Chem.* **285**, 163–170.
- Herrero, A.B., and Moreno, S. (2011). Lsm1 promotes genomic stability by controlling histone mRNA decay. *EMBO J.* **30**, 2008–2018.
- Hoefig, K.P., and Heissmeyer, V. (2014). Degradation of oligouridylated histone mRNAs: see UUUUU and goodbye. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*.
- Hoefig, K.P., Rath, N., Heinz, G.A., Wolf, C., Dameris, J., Schepers, A., Kremmer, E., Ansel, K.M., and Heissmeyer, V. (2013). Eri1 degrades the stem-loop of oligouridylated histone mRNAs to induce replication-dependent decay. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 73–81.
- Hoffmann, I., and Birnstiel, M.L. (1990). Cell cycle-dependent regulation of histone precursor mRNA processing by modulation of U7 snRNA accessibility. *Nature* **346**, 665–668.
- Ideue, T., Adachi, S., Naganuma, T., Tanigawa, A., Natsume, T., and Hirose, T. (2012). U7 small nuclear ribonucleoprotein represses histone gene transcription in cell cycle-arrested cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 5693–5698.
- Imataka, H., Gradi, A., and Sonenberg, N. (1998). A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.* **17**, 7480–7489.
- Isken, O., and Maquat, L.E. (2007). Quality control of eukaryotic mRNA: safeguarding cells from abnormal mRNA function. *Genes Dev.* **21**, 1833–1856.
- Izaurralde, E., Lewis, J., McGuigan, C., Jankowska, M., Darzynkiewicz, E., and Mattaj, I.W. (1994). A nuclear cap binding protein complex involved in pre-mRNA splicing. *Cell* **78**, 657–668.
- Kari, V., Karpiuk, O., Tieg, B., Kriegs, M., Dikomey, E., Krebber, H., Begus-Nahrmann, Y., and Johnsen, S.A. (2013). A Subset of Histone H2B Genes Produces Polyadenylated mRNAs under a Variety of Cellular Conditions. *PLoS ONE* **8**.
- Kashima, I., Yamashita, A., Izumi, N., Kataoka, N., Morishita, R., Hoshino, S., Ohno, M., Dreyfuss, G., and Ohno, S. (2006). Binding of a novel SMG-1-Upf1-eRF1-eRF3 complex (SURF) to the exon junction complex triggers Upf1 phosphorylation and nonsense-mediated mRNA decay. *Genes Dev.* **20**, 355–367.
- Kaufmann, I., Martin, G., Friedlein, A., Langen, H., and Keller, W. (2004). Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *EMBO J.* **23**, 616–626.
- Kaygun, H., and Marzluff, W.F. (2005a). Translation Termination Is Involved in Histone mRNA Degradation when DNA Replication Is Inhibited. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 6879–6888.
- Kaygun, H., and Marzluff, W.F. (2005b). Regulated degradation of replication-dependent histone mRNAs requires both ATR and Upf1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12**, 794–800.
- Kim, J.H., and Richter, J.D. (2006). Opposing polymerase-deadenylase activities regulate cytoplasmic polyadenylation. *Mol. Cell* **24**, 173–183.
- Kirsh, A.L., Groudine, M., and Challoner, P.B. (1989). Polyadenylation and U7 snRNP-mediated cleavage: alternative modes of RNA 3' processing in two avian histone H1 genes. *Genes Dev.* **3**, 2172–2179.
- Kolev, N.G., and Steitz, J.A. (2005). Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs. *Genes Dev.* **19**, 2583–2592.
- Kömer, C.G., and Wahle, E. (1997). Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.* **272**, 10448–10456.

- Körner, C.G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E., and Wahle, E. (1998). The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.* *17*, 5427–5437.
- Krieg, P.A., and Melton, D.A. (1984). Formation of the 3' end of histone mRNA by post-transcriptional processing. *Nature* *308*, 203–206.
- Kuhn, U., Gundel, M., Knoth, A., Kerwitz, Y., Rudel, S., and Wahle, E. (2009). Poly(A) Tail Length Is Controlled by the Nuclear Poly(A)-binding Protein Regulating the Interaction between Poly(A) Polymerase and the Cleavage and Polyadenylation Specificity Factor. *J. Biol. Chem.* *284*, 22803–22814.
- LaBella, F., Sive, H.L., Roeder, R.G., and Heintz, N. (1988). Cell-cycle regulation of a human histone H2b gene is mediated by the H2b subtype-specific consensus element. *Genes Dev.* *2*, 32–39.
- Lai, W.S., Kennington, E.A., and Blackshear, P.J. (2003). Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 3798–3812.
- Laishram, R.S., Barlow, C.A., and Anderson, R.A. (2011). CKI isoforms α ? and β ? regulate Star-PAP target messages by controlling Star-PAP poly(A) polymerase activity and phosphoinositide stimulation. *Nucleic Acids Res.* *39*, 7961–7973.
- Lakka, S.S., Gondi, C.S., Dinh, D.H., Olivero, W.C., Gujrati, M., Rao, V.H., Sioka, C., and Rao, J.S. (2005). Specific interference of urokinase-type plasminogen activator receptor and matrix metalloproteinase-9 gene expression induced by double-stranded RNA results in decreased invasion, tumor growth, and angiogenesis in gliomas. *J. Biol. Chem.* *280*, 21882–21892.
- Lee, Y.J., and Glaunsinger, B.A. (2009). Aberrant Herpes virus-Induced Polyadenylation Correlates With Cellular Messenger RNA Destruction. *PLoS Biol* *7*, e1000107.
- Lee, J.E., Lee, J.Y., Trembly, J., Wilusz, J., Tian, B., and Wilusz, C.J. (2012). The PARN deadenylase targets a discrete set of mRNAs for decay and regulates cell motility in mouse myoblasts. *PLoS Genet.* *8*, e1002901.
- Lejeune, F., Li, X., and Maquat, L.E. (2003). Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol. Cell* *12*, 675–687.
- Liu, H., Rodgers, N.D., Jiao, X., and Kiledjian, M. (2002). The scavenger mRNA decapping enzyme DcpS is a member of the HIT family of pyrophosphatases. *EMBO J.* *21*, 4699–4708.
- Liu, M.-J., Bao, S., Gálvez-Peralta, M., Pyle, C.J., Rudawsky, A.C., Pavlovicz, R.E., Killilea, D.W., Li, C., Nebert, D.W., Wewers, M.D., et al. (2013). ZIP8 regulates host defense through zinc-mediated inhibition of NF- κ B. *Cell Rep.* *3*, 386–400.
- Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, activities, and structure of the eukaryotic RNA exosome. *Cell* *127*, 1223–1237.
- Liu, T.J., Levine, B.J., Skoultchi, A.I., and Marzluff, W.F. (1989). The efficiency of 3'-end formation contributes to the relative levels of different histone mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* *9*, 3499–3508.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif* *25*, 402–408.
- Loupart, M.L., Krause, S.A., and Heck, M.S. (2000). Aberrant replication timing induces defective chromosome condensation in *Drosophila* ORC2 mutants. *Curr. Biol. CB* *10*, 1547–1556.
- Lykke-Andersen, J. (2002). Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 8114–8121.

- Ma, T., Van Tine, B.A., Wei, Y., Garrett, M.D., Nelson, D., Adams, P.D., Wang, J., Qin, J., Chow, L.T., and Harper, J.W. (2000). Cell cycle-regulated phosphorylation of p220(NPAT) by cyclin E/Cdk2 in Cajal bodies promotes histone gene transcription. *Genes Dev.* *14*, 2298–2313.
- Mandel, C.R., Kaneko, S., Zhang, H., Gebauer, D., Vethantham, V., Manley, J.L., and Tong, L. (2006). Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end processing endonuclease. *Nature* *444*.
- Mannironi, C., Bonner, W.M., and Hatch, C.L. (1989). H2A.X a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res.* *17*, 9113–9126.
- Martin, F., Schaller, A., Eglite, S., Schumperli, D., and Muller, B. (1997). The gene for histone RNA hairpin binding protein is located on human chromosome 4 and encodes a novel type of RNA binding protein. *EMBO J.* *16*, 769–778.
- Martínez, J., Ren, Y.G., Nilsson, P., Ehrenberg, M., and Virtanen, A. (2001). The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J. Biol. Chem.* *276*, 27923–27929.
- Marzluff, W.F., Gongidi, P., Woods, K.R., Jin, J., and Maltais, L.J. (2002). The Human and Mouse Replication-Dependent Histone Genes. *Genomics* *80*, 487–498.
- Marzluff, W.F., Wagner, E.J., and Duronio, R.J. (2008). Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. *Nat. Rev. Genet.* *9*, 843–854.
- Masi, T., and Johnson, A.D. (2003). Read-through histone transcripts containing 3' adenylate tails are zygotically expressed in *Xenopus* embryos and undergo processing to mature transcripts when introduced into oocyte nuclei. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *304*, 612–618.
- McCracken, S., Fong, N., Yankulov, K., Ballantyne, S., Pan, G., Greenblatt, J., Patterson, S.D., Wickens, M., and Bentley, D.L. (1997). The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* *385*, 357–361.
- Mehler, M.F., and Mattick, J.S. (2007). Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. *Physiol. Rev.* *87*, 799–823.
- Millevoi, S., Loulergue, C., Dettwiler, S., Karaa, S.Z., Keller, W., Antoniou, M., and Vagner, S. (2006). An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *EMBO J.* *25*, 4854–4864.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The Exosome: A Conserved Eukaryotic RNA Processing Complex Containing Multiple 3'→5' Exoribonucleases. *Cell* *91*, 457–466.
- Moraes, K.C.M., Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2006). CUG-BP binds to RNA substrates and recruits PARN deadenylase. *RNA N. Y. N* *12*, 1084–1091.
- Mortillaro, M.J., Blencowe, B.J., Wei, X., Nakayasu, H., Du, L., Warren, S.L., Sharp, P.A., and Berezney, R. (1996). A hyperphosphorylated form of the large subunit of RNA polymerase II is associated with splicing complexes and the nuclear matrix. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *93*, 8253–8257.
- Moss, S.B., Ferry, R.A., and Groudine, M. (1994). An alternative pathway of histone mRNA 3' end formation in mouse round spermatids. *Nucleic Acids Res.* *22*, 3160–3166.
- Mowry, K.L., and Steitz, J.A. (1987a). Both conserved signals on mammalian histone pre-mRNAs associate with small nuclear ribonucleoproteins during 3' end formation in vitro. *Mol. Cell. Biol.* *7*, 1663–1672.
- Mowry, K.L., and Steitz, J.A. (1987b). Identification of the human U7 snRNP as one of several factors involved in the 3' end maturation of histone premessenger RNA's. *Science* *238*, 1682–1687.

- Mowry, K.L., Oh, R., and Steitz, J.A. (1989). Each of the conserved sequence elements flanking the cleavage site of mammalian histone pre-mRNAs has a distinct role in the 3'-end processing reaction. *Mol. Cell. Biol.* **9**, 3105–3108.
- Muhrad, D., Decker, C.J., and Parker, R. (1994). Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5' → 3' digestion of the transcript. *Genes Dev.* **8**, 855–866.
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Rajmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S., and Wilusz, J. (2002). The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.* **21**, 165–174.
- Mullen, T.E., and Marzluff, W.F. (2008). Degradation of histone mRNA requires oligouridylation followed by decapping and simultaneous degradation of the mRNA both 5' to 3' and 3' to 5'. *Genes Dev.* **22**, 50–65.
- Murthy, K.G., and Manley, J.L. (1995). The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes Dev.* **9**, 2672–2683.
- Nakabayashi, H., Taketa, K., Miyano, K., Yamane, T., and Sato, J. (1982). Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res.* **42**, 3858–3863.
- Nakahata, S., Katsu, Y., Mita, K., Inoue, K., Nagahama, Y., and Yamashita, M. (2001). Biochemical identification of *Xenopus Pumilio* as a sequence-specific cyclin B1 mRNA-binding protein that physically interacts with a Nanos homolog, *Xcat-2*, and a cytoplasmic polyadenylation element-binding protein. *J. Biol. Chem.* **276**, 20945–20953.
- Nakajima-Takagi, Y., Osawa, M., Oshima, M., Takagi, H., Miyagi, S., Endoh, M., Endo, T.A., Takayama, N., Eto, K., Toyoda, T., et al. (2013). Role of SOX17 in hematopoietic development from human embryonic stem cells. *Blood* **121**, 447–458.
- Narita, T., Yung, T.M.C., Yamamoto, J., Tsuboi, Y., Tanabe, H., Tanaka, K., Yamaguchi, Y., and Handa, H. (2007). NELF interacts with CBC and participates in 3' end processing of replication-dependent histone mRNAs. *Mol. Cell* **26**, 349–365.
- Nicod, M., Michlig, S., Flahaut, M., Salinas, M., Fowler Jaeger, N., Horisberger, J.-D., Rossier, B.C., and Firsov, D. (2002). A novel vasopressin-induced transcript promotes MAP kinase activation and ENaC downregulation. *EMBO J.* **21**, 5109–5117.
- Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K., and Hirayama, T. (2005). Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **44**, 972–984.
- Niwa, M., Rose, S.D., and Berget, S.M. (1990). In vitro polyadenylation is stimulated by the presence of an upstream intron. *Genes Dev.* **4**, 1552–1559.
- Nizami, Z., Deryusheva, S., and Gall, J.G. (2010). The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2**, a000653.
- Nunes, N.M., Li, W., Tian, B., and Furger, A. (2010). A functional human Poly(A) site requires only a potent DSE and an A-rich upstream sequence. *EMBO J.* **29**, 1523–1536.
- Ota, R., Kotani, T., and Yamashita, M. (2011). Biochemical characterization of *Pumilio1* and *Pumilio2* in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* **286**, 2853–2863.
- Pandey, N.B., Williams, A.S., Sun, J.H., Brown, V.D., Bond, U., and Marzluff, W.F. (1994). Point mutations in the stem-loop at the 3' end of mouse histone mRNA reduce expression by reducing the efficiency of 3' end formation. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1709–1720.

- Patterson, E.S., Addis, R.C., Shablott, M.J., and Gearhart, J.D. (2008). SOX17 directly activates Zfp202 transcription during in vitro endoderm differentiation. *Physiol. Genomics* **34**, 277–284.
- Pauli, U., Chrysogelos, S., Stein, G., Stein, J., and Nick, H. (1987). Protein-DNA interactions in vivo upstream of a cell cycle-regulated human H4 histone gene. *Science* **236**, 1308–1311.
- Peng, S.S., Chen, C.Y., and Shyu, A.B. (1996). Functional characterization of a non-AUUUA AU-rich element from the c-jun proto-oncogene mRNA: evidence for a novel class of AU-rich elements. *Mol. Cell. Biol.* **16**, 1490–1499.
- Pepper, S.D., Saunders, E.K., Edwards, L.E., Wilson, C.L., and Miller, C.J. (2007). The utility of MAS5 expression summary and detection call algorithms. *BMC Bioinformatics* **8**, 273.
- Pflumm, M.F., and Botchan, M.R. (2001). Orc mutants arrest in metaphase with abnormally condensed chromosomes. *Dev. Camb. Engl.* **128**, 1697–1707.
- Pillai, R.S., Will, C.L., Luhrmann, R., Schumperli, D., and Muller, B. (2001). Purified U7 snRNPs lack the Sm proteins D1 and D2 but contain Lsm10, a new 14 kDa Sm D1-like protein. *EMBO J.* **20**, 5470–5479.
- Pillai, R.S., Grimmer, M., Meister, G., Will, C.L., Luhrmann, R., Fischer, U., and Schumperli, D. (2003). Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, Lsm11, in histone RNA processing. *Genes Dev.* **17**, 2321–2333.
- Pimgruber, J., and Johnsen, S.A. (2010). Induced G1 cell-cycle arrest controls replication-dependent histone mRNA 3' end processing through p21, NPAT and CDK9. *Oncogene* **29**, 2853–2863.
- Preker, P., Nielsen, J., Kammler, S., Lykke-Andersen, S., Christensen, M.S., Mapendano, C.K., Schierup, M.H., and Jensen, T.H. (2008). RNA exosome depletion reveals transcription upstream of active human promoters. *Science* **322**, 1851–1854.
- Preker, P., Almvig, K., Christensen, M.S., Valen, E., Mapendano, C.K., Sandelin, A., and Jensen, T.H. (2011). PROMoter uPstream Transcripts share characteristics with mRNAs and are produced upstream of all three major types of mammalian promoters. *Nucleic Acids Res.* **39**, 7179–7193.
- Radford, H.E., Meijer, H.A., and de Moor, C.H. (2008). Translational control by cytoplasmic polyadenylation in *Xenopus* oocytes. *Biochim. Biophys. Acta* **1779**, 217–229.
- Raineri, I., Wegmueller, D., Gross, B., Certa, U., and Moroni, C. (2004). Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1279–1288.
- Ren, Y.-G., Martinez, J., Kirsebom, L.A., and Virtanen, A. (2002). Inhibition of Klenow DNA polymerase and poly(A)-specific ribonuclease by aminoglycosides. *RNA* **8**, 1393–1400.
- Reuter M. (2006): Katalysemechanismus und in vivo-Funktion der Poly(A)-spezifischen Ribonuklease (PARN), Promotionsarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Reverdatto, S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A., and Belostotsky, D.A. (2004). mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA N. Y. N* **10**, 1200–1214.
- Robinson, P.S., and Goochee, C.F. (1991). Kidney-specific enzyme expression by human kidney cell lines generated through oncogene transfection. *J. Cell. Physiol.* **148**, 54–59.
- Ryan, K., CALVO, O., and MANLEY, J.L. (2004). Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA* **10**, 565–573.
- Sabath, I., Skrajna, A., Yang, X.-C., Dadlez, M., Marzluff, W.F., and Dominski, Z. (2013). 3'-End processing of histone pre-mRNAs in *Drosophila*: U7 snRNP is associated with FLASH and polyadenylation factors. *RNA N. Y. N* **19**, 1726–1744.

- Sachs, A.B., and Dearnof, J.A. (1992). Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell* 70, 961–973.
- Salzler, H.R., Davidson, J.M., Montgomery, N.D., and Duronio, R.J. (2009). Loss of the histone pre-mRNA processing factor stem-loop binding protein in *Drosophila* causes genomic instability and impaired cellular proliferation. *PLoS One* 4, e8168.
- Sambrook J, Russel DW (2001): *Molecular Cloning*, ColdSpring Harbour Laboratory Press, NY
- Sanchez, C.P., and He, Y.-Z. (2002). Alterations in the growth plate cartilage of rats with renal failure receiving corticosteroid therapy. *Bone* 30, 692–698.
- Sandelin, A., Carninci, P., Lenhard, B., Ponjavic, J., Hayashizaki, Y., and Hume, D.A. (2007). Mammalian RNA polymerase II core promoters: insights from genome-wide studies. *Nat. Rev. Genet.* 8, 424–436.
- Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H.T.M., and Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic Acids Res.* 39, 4373–4386.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.
- Scharl, E.C., and Steitz, J.A. (1994). The site of 3' end formation of histone messenger RNA is a fixed distance from the downstream element recognized by the U7 snRNP. *EMBO J.* 13, 2432–2440.
- Schaufele, F., Gilmartin, G.M., Bannwarth, W., and Birstiel, M.L. (1986). Compensatory mutations suggest that base-pairing with a small nuclear RNA is required to form the 3' end of H3 messenger RNA. *Nature* 323, 777–781.
- SCHERER, W.F., SYVERTON, J.T., and GEY, G.O. (1953). Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J. Exp. Med.* 97, 695–710.
- Schlieker, C.D., Van der Veen, A.G., Damon, J.R., Spooner, E., and Ploegh, H.L. (2008). A functional proteomics approach links the ubiquitin-related modifier Urm1 to a tRNA modification pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 18255–18260.
- Schmidt, M.-J., and Norbury, C.J. (2010). Polyadenylation and beyond: emerging roles for noncanonical poly(A) polymerases. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 1, 142–151.
- Schmidt, M.-J., West, S., and Norbury, C.J. (2011). The human cytoplasmic RNA terminal U-transferase ZCCHC11 targets histone mRNAs for degradation. *RNA* 17, 39–44.
- Schwer, B., Mao, X., and Shuman, S. (1998). Accelerated mRNA decay in conditional mutants of yeast mRNA capping enzyme. *Nucleic Acids Res.* 26, 2050–2057.
- Shcherbik, N., Wang, M., Lapik, Y.R., Srivastava, L., and Pestov, D.G. (2010). Polyadenylation and degradation of incomplete RNA polymerase I transcripts in mammalian cells. *EMBO Rep.* 11, 106–111.
- Shepard, P.J., Choi, E.-A., Lu, J., Flanagan, L.A., Hertel, K.J., and Shi, Y. (2011). Complex and dynamic landscape of RNA polyadenylation revealed by PAS-Seq. *RNA N. Y. N* 17, 761–772.
- Sherwood, O.D. (2004). Relaxin's physiological roles and other diverse actions. *Endocr. Rev.* 25, 205–234.
- Shi, Y., Di Giammartino, D.C., Taylor, D., Sarkeshik, A., Rice, W.J., Yates, J.R., Frank, J., and Manley, J.L. (2009). Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. *Mol. Cell* 33, 365–376.

- Singh, R.K., Kabbaj, M.-H.M., Paik, J., and Gunjan, A. (2009). Histone levels are regulated by phosphorylation and ubiquitylation-dependent proteolysis. *Nat. Cell Biol.* *11*, 925–933.
- Sloan, K.E., Schneider, C., and Watkins, N.J. (2012). Comparison of the yeast and human nuclear exosome complexes. *Biochem. Soc. Trans.* *40*, 850–855.
- Soldati, D., and Schümperli, D. (1988). Structural and functional characterization of mouse U7 small nuclear RNA active in 3' processing of histone pre-mRNA. *Mol. Cell. Biol.* *8*, 1518–1524.
- Song, M.-G., and Kiledjian, M. (2007). 3' Terminal oligo U-tract-mediated stimulation of decapping. *RNA N. Y. N* *13*, 2356–2365.
- Spycher, C., Streit, A., Stefanovic, B., Albrecht, D., Koning, T.H., and Schümperli, D. (1994). 3' end processing of mouse histone pre-mRNA: evidence for additional base-pairing between U7 snRNA and pre-mRNA. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4023–4030.
- Steiner I. (2007): Funktionelle Charakterisierung der Poly(A)-spezifischen Ribonuklease PARN im Rahmen der "integrated stress response" (ISR), Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Stevens, A. (2001). 5'-exoribonuclease 1: Xrn1. *Methods Enzymol.* *342*, 251–259.
- Stoecklin, G., Ming, X.F., Looser, R., and Moroni, C. (2000). Somatic mRNA turnover mutants implicate tristetraprolin in the interleukin-3 mRNA degradation pathway. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 3753–3763.
- Strub, K., and Bimstiel, M.L. (1986). Genetic complementation in the *Xenopus* oocyte: co-expression of sea urchin histone and U7 RNAs restores 3' processing of H3 pre-mRNA in the oocyte. *EMBO J.* *5*, 1675–1682.
- Su, W., Slepnev, S.V., Slevin, M.K., Lyons, S.M., Ziemniak, M., Kowalska, J., Darzynkiewicz, E., Jemielity, J., Marzluff, W.F., and Rhoads, R.E. (2013). mRNAs containing the histone 3' stem-loop are degraded primarily by decapping mediated by oligouridylation of the 3' end. *RNA N. Y. N* *19*, 1–16.
- Sullivan, K.D., Mullen, T.E., Marzluff, W.F., and Wagner, E.J. (2009). Knockdown of SLBP results in nuclear retention of histone mRNA. *RNA N. Y. N* *15*, 459–472.
- Takagaki, Y., and Manley, J.L. (1997). RNA recognition by the human polyadenylation factor CstF. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 3907–3914.
- Tan, D., Marzluff, W.F., Dominski, Z., and Tong, L. (2013). Structure of histone mRNA stem-loop, human stem-loop binding protein and 3' hExo ternary complex. *Science* *339*, 318–321.
- Tarun, S.Z., Jr, and Sachs, A.B. (1996). Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.* *15*, 7168–7177.
- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M., and Wahle, E. (2004). A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J.* *23*, 2862–2871.
- Tharun, S., and Parker, R. (2001). Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell* *8*, 1075–1083.
- Tharun, S., He, W., Mayes, A.E., Lennertz, P., Beggs, J.D., and Parker, R. (2000). Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature* *404*, 515–518.
- Thiriet, C., and Hayes, J.J. (2005). Chromatin in need of a fix: phosphorylation of H2AX connects chromatin to DNA repair. *Mol. Cell* *18*, 617–622.
- Tian, B., and Graber, J.H. (2012). Signals for pre-mRNA cleavage and polyadenylation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *3*, 385–396.

- Tomecki, R., Kristiansen, M.S., Lykke-Andersen, S., Chlebowski, A., Larsen, K.M., Szczesny, R.J., Drazkowska, K., Pastula, A., Andersen, J.S., Stepien, P.P., et al. (2010). The human core exosome interacts with differentially localized processive RNases: hDIS3 and hDIS3L. *EMBO J.* 29, 2342–2357.
- Trippe, R., Sandrock, B., and Benecke, B.J. (1998). A highly specific terminal uridylyl transferase modifies the 3'-end of U6 small nuclear RNA. *Nucleic Acids Res.* 26, 3119–3126.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L., and Parker, R. (2001). The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* 104, 377–386.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrud, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 1427–1436.
- Uchida, N., Hoshino, S.-I., and Katada, T. (2004). Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J. Biol. Chem.* 279, 1383–1391.
- Vanáčová, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., and Keller, W. (2005). A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol.* 3, e189.
- Varnum, S.M., and Wormington, W.M. (1990). Deadenylation of maternal mRNAs during *Xenopus* oocyte maturation does not require specific cis-sequences: a default mechanism for translational control. *Genes Dev.* 4, 2278–2286.
- Vasserot, A.P., Schaufele, F.J., and Birnstiel, M.L. (1989). Conserved terminal hairpin sequences of histone mRNA precursors are not involved in duplex formation with the U7 RNA but act as a target site for a distinct processing factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86, 4345–4349.
- Venkataraman, K., Brown, K.M., and Gilmartin, G.M. (2005). Analysis of a noncanonical poly(A) site reveals a tripartite mechanism for vertebrate poly(A) site recognition. *Genes Dev.* 19, 1315–1327.
- Waggoner, S.A., and Liebhaber, S.A. (2003). Regulation of alpha-globin mRNA stability. *Exp. Biol. Med.* Maywood NJ 228, 387–395.
- Wagner, E.J., and Marzluff, W.F. (2006). ZFP100, a component of the active U7 snRNP limiting for histone pre-mRNA processing, is required for entry into S phase. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6702–6712.
- Wagner, E., Clement, S.L., and Lykke-Andersen, J. (2007a). An Unconventional Human Ccr4-Caf1 Deadenylation Complex in Nuclear Cajal Bodies. *Mol. Cell. Biol.* 27, 1686–1695.
- Wagner, E.J., Berkow, A., and Marzluff, W.F. (2005). Expression of an RNAi-resistant SLBP restores proper S-phase progression. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 471–473.
- Wagner, E.J., Burch, B.D., Godfrey, A.C., Salzler, H.R., Duronio, R.J., and Marzluff, W.F. (2007b). A genome-wide RNA interference screen reveals that variant histones are necessary for replication-dependent histone pre-mRNA processing. *Mol. Cell* 28, 692–699.
- Wahle, E. (1991). A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 66, 759–768.
- Wang, C., Li, H.-Y., Liu, B., Huang, S., Wu, L., and Li, Y.-Y. (2013). Pim-3 promotes the growth of human pancreatic cancer in the orthotopic nude mouse model through vascular endothelium growth factor. *J. Surg. Res.* 185, 595–604.
- Wang, Z., Jiao, X., Carr-Schmid, A., and Kiledjian, M. (2002). The hDcp2 protein is a mammalian mRNA decapping enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 12663–12668.

- Wang, Z.F., Whitfield, M.L., Ingledue, T.C., Dominski, Z., and Marzluff, W.F. (1996). The protein that binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. *Genes Dev.* *10*, 3028–3040.
- Weißbach C. (2010): Identifizierung von Substraten der poly(A)-spezifischen Ribonuklease (PARN), Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Wells, D., and Kedes, L. (1985). Structure of a human histone cDNA: evidence that basally expressed histone genes have intervening sequences and encode polyadenylylated mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *82*, 2834–2838.
- Whitfield, M.L., Zheng, L.-X., Baldwin, A., Ohta, T., Hurt, M.M., and Marzluff, W.F. (2000). Stem-Loop Binding Protein, the Protein That Binds the 3' End of Histone mRNA, Is Cell Cycle Regulated by Both Translational and Posttranslational Mechanisms. *Mol. Cell. Biol.* *20*, 4188–4198.
- Williams, A.S., Ingledue, T.C., 3rd, Kay, B.K., and Marzluff, W.F. (1994). Changes in the stem-loop at the 3' terminus of histone mRNA affects its nucleocytoplasmic transport and cytoplasmic regulation. *Nucleic Acids Res.* *22*, 4660–4666.
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., and Song, H. (2005). Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.* *24*, 4082–4093.
- Yang, X., Xu, B., Sabath, I., Kunduru, L., Burch, B.D., Marzluff, W.F., and Dominski, Z. (2011). FLASH Is Required for the Endonucleolytic Cleavage of Histone Pre-mRNAs but Is Dispensable for the 5' Exonucleolytic Degradation of the Downstream Cleavage Product ▽. *Mol. Cell. Biol.* *31*, 1492–1502.
- Yang, X.-C., Burch, B.D., Yan, Y., Marzluff, W.F., and Dominski, Z. (2009). FLASH, a proapoptotic protein involved in activation of caspase-8, is essential for 3' end processing of histone pre-mRNAs. *Mol. Cell* *36*, 267–278.
- Yang, X.-C., Sabath, I., Dębski, J., Kaus-Drobek, M., Dadlez, M., Marzluff, W.F., and Dominski, Z. (2013). A complex containing the CPSF73 endonuclease and other polyadenylation factors associates with U7 snRNP and is recruited to histone pre-mRNA for 3'-end processing. *Mol. Cell. Biol.* *33*, 28–37.
- Ye, X., and Adams, P.D. (2003). Coordination of S-phase events and genome stability. *Cell Cycle Georget. Tex* *2*, 185–187.
- Yong, J., Golembe, T.J., Battle, D.J., Pellizzoni, L., and Dreyfuss, G. (2004). snRNAs Contain Specific SMN-Binding Domains That Are Essential for snRNP Assembly. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2747–2756.
- Zander G (2012): Hitzestressabhängige mRNA-Substrate der Poly(A)-spezifischen Ribonuklease (PARN), Masterarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- Zhao, J., Kennedy, B.K., Lawrence, B.D., Barbie, D.A., Matera, A.G., Fletcher, J.A., and Harlow, E. (2000). NPAT links cyclin E-Cdk2 to the regulation of replication-dependent histone gene transcription. *Genes Dev.* *14*, 2283–2297.
- Zhao, X., McKillop-Smith, S., and Müller, B. (2004). The human histone gene expression regulator HBP/SLBP is required for histone and DNA synthesis, cell cycle progression and cell proliferation in mitotic cells. *J. Cell Sci.* *117*, 6043–6051.
- Zhao, Y., Gaidarov, I., and Keen, J.H. (2007). Phosphoinositide 3-kinase C2alpha links clathrin to microtubule-dependent movement. *J. Biol. Chem.* *282*, 1249–1256.
- Zheng, L., Dominski, Z., Yang, X.-C., Elms, P., Raska, C.S., Borchers, C.H., and Marzluff, W.F. (2003). Phosphorylation of Stem-Loop Binding Protein (SLBP) on Two Threonines Triggers Degradation of SLBP, the Sole Cell Cycle-Regulated Factor Required for Regulation of Histone mRNA Processing, at the End of S Phase. *Mol. Cell. Biol.* *23*, 1590–1601.

Zirke AM (2008): Funktionelle Charakterisierung der Poly(A)-spezifischen Ribonuklease PARN in vivo-Identifizierung und Validierung durch PARN regulierter mRNAs, Diplomarbeit, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Zuo, Y., and Deutscher, M.P. (2001). Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.* 29, 1017–1026.

Lebenslauf

Name: Claudia Weißbach
Geburtsdatum: 19.09.1986
Geburtsort: Leinefelde
Nationalität: Deutsch

Ausbildung:

08/1993 - 07/1997 Grund-und Regelschule „Albert-Schweitzer“ in Leinefelde
08/1997 - 06/2005 Staatliches Gymnasium „Gottfried-Wilhelm-Leibniz“ in Leinefelde
06/2005 **Allgemeine Hochschulreife** (Abschlussnote: 1,3)

10/2005- 10/2010 Hochschulstudium, Studiengang Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
10/2010 **Diplom-Abschlussprüfung** (Gesamtnote: 1,3)

11/2010- 02/2014 **Dissertation im Rahmen des Graduiertenkollegs 1591**
unter der Leitung von Prof. E. Wahle, Abt. Allgemeine Biochemie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Thema:
„The role of the Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) in histone-
mRNA metabolism“

Halle/Saale, den

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Aus anderen Untersuchungen bzw. Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommene Stellen sind durch Quellenangaben sowie die entsprechenden Verweise gekennzeichnet. Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Halle/Saale, den

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. E. Wahle für die Vergabe und die Betreuung meines Promotionsthemas bedanken. Außerdem geht ein großer Dank an Herr Prof. S. Hüttelmaier und Herr Prof. D. Schümperli, die sich freundlicherweise für die Erstellung der Zweitgutachten bereit erklärt haben.

Als Mitglied des Graduiertenkolleg 1591 möchte ich auch allen Mitgliedern des GRK1591 für die gelungene Zusammenarbeit, die Hilfsbereitschaft und die schöne Zeit, vor allem bei den Tagungen, Meetings und den Workshops, danken.

Ich hatte die Gelegenheit während meiner Promotion für einen dreimonatigen Forschungsaufenthalt an der University of North Carolina in Chapel Hill in der Arbeitsgruppe von Prof. W. Marzluff zu arbeiten. Für diese Kolaboration und die interessante Erfahrung möchte ich vor allem Prof. W. Marzluff meinen Dank aussprechen. Auch den Mitstreitern im Labor und Prof. Z. Dominski gilt mein Dank, die mich jederzeit unterstützt haben.

Für die Betreuung und die technischen Hilfestellungen möchte ich Frau Dr. C. Harnisch und Frau Dr. C. Rammelt danken. Natürlich möchte ich an dieser Stelle auch der AG Wahle für die schöne Zeit und die interessanten Besprechungen danken. Lars Anders möchte ich dafür danken, dass wir vor allem in der letzten Zeit viel über das PARN-Thema diskutiert haben und eine gute Zusammenarbeit bei der Sequenzierung der gespleißten Histon-mRNA und der Sequenzierung anderer polyadenylierter Histon-mRNAs möglich war.

Besonderer Dank gilt den Korrekturlesern Lars Schönemann, Michael Götze, Lars Anders, Marcel Koehn, Andreas Weißbach, Rebekka Balogh, Mario Fiedler und Dr. C. Rammelt, die sich Zeit genommen haben für meine Arbeit und mir wertvolle Hinweise geben konnten und so maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Abschließend möchte ich mich vor allem bei meinen Freunden, meinen Eltern, Geschwistern, dem Rest meiner Familie und bei Mario Fiedler bedanken, die mich während dieser Zeit begleitet und ertragen haben und mich jederzeit unterstützen konnten.