

In-Vitro-Rekonstitution
des 3'-Prozessierungsfaktors CPSF
(cleavage and polyadenylation specificity factor)

Dissertation

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

der Naturwissenschaftlichen Fakultät I – Biowissenschaften –

der Martin-Luther-Universität
Halle-Wittenberg,

vorgelegt von

Herrn **Lars Frederic Schönemann**

geboren am 18.09.1987 in Rinteln

Gutachter:

Prof. Dr. Elmar Wahle
Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier
Prof. Dr. Katja Sträßer

Halle (Saale), 19.04.2017
Arbeit öffentlich verteidigt am 14.09.2017

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Genexpression in Eukaryoten.....	1
1.1.1	5'-capping.....	2
1.1.2	Spleißen.....	3
1.2	3'-Prozessierung von Prä-mRNAs in Säugetieren.....	4
1.2.1	Die Spaltungsreaktion	6
1.2.2	Die Polyadenylierungsreaktion.....	7
1.3	Etablierte Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren	8
1.3.1	RNA-Polymerase II.....	9
1.3.2	<i>Cleavage and polyadenylation specificity factor</i> (CPSF).....	11
1.3.3	Poly(A)-Polymerase (PAPOL α).....	14
1.3.4	Nukleäres Poly(A)-bindendes Protein 1 (PABPN1).....	15
1.3.5	<i>Cleavage stimulatory factor</i> (CstF).....	16
1.3.6	<i>Cleavage factor</i> I (CF I).....	16
1.3.7	<i>Cleavage factor</i> II (CF II).....	17
1.4	Weitere und putative Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren.....	19
1.4.1	CTD-spezifische Phosphatase Ssu72.....	19
1.4.2	<i>Retinoblastoma binding protein 6</i> (Rbbp6).....	19
1.4.3	<i>WD-repeat containing protein 82</i> (WDR82).....	20
1.4.4	Isoform α der katalytischen Untereinheit von Proteinphosphatase 1 (PP1 α)	20
1.5	Nicht-publizierte Vorarbeiten zur Rekonstitution der 3'-Prozessierung.....	21
1.6	Zielstellung dieser Arbeit.....	22
2	Ergebnisse	23
2.1	Rekonstitution der Polyadenylierung.....	23
2.1.1	Analyse von CPSF-Subkomplexen.....	23
2.1.2	Systematische Analyse von 4er-, 5er- und 6er-Komplexen	31
2.1.3	Definition eines minimalen CPSF-Komplexes für die Polyadenylierung	34
2.1.4	Darstellung und Reinigung des mPSF-Komplexes	35
2.1.5	Charakterisierung des mPSF-Komplexes	38
2.1.6	Koexpression von mPSF und Symplekin	42
2.2	Versuche zur Rekonstitution der Prä-mRNA Spaltung.....	44
2.2.1	Präparation von CstF, CF I und CF II	44
2.2.2	Versuch zur Präparation von Rbbp6.....	45
2.2.3	Präparationen von WDR82, PP1 α , Ssu72 und phosphorylierter CTD	46
2.2.4	Präparation von CPSF-Komplexen für die Spaltungsreaktion	46
2.2.5	Reinigung und Charakterisierung eines CPSF-Komplexes aus sieben Untereinheiten	49
2.2.6	Rekonstitutionsversuche der Spaltungsreaktion	53
2.3	Spaltungsaktivität in HeLa-Kernextrakt.....	55
2.3.1	Charakterisierung der Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt	55
2.3.2	Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt	61
3	Diskussion.....	68
3.1	Vier Proteine rekonstituieren die Aktivität von CPSF in der Polyadenylierung	68

3.1.1	WDR33 ist eine essentielle Untereinheit des CPSF-Komplexes und bindet direkt an das Polyadenylierungssignal von Prä-mRNAs	70
3.1.2	CPSF30 und CPSF160 bilden einen definierten CPSF-Subkomplex	71
3.1.3	Rekombinantes hFip1 steigert die Aktivität der Poly(A)-Polymerase, zusammen mit dem CPSF30-CPSF160-Subkomplex.....	71
3.1.4	Symplekin zeigt keine Interaktionen mit mPSF, wohl aber mit größeren CPSF-Komplexen.....	72
3.1.5	mPSF ist funktional in der Poly(A)-Längenkontrolle <i>in vitro</i>	72
3.2	<i>In-Vitro</i> -Rekonstitution der Spaltungsreaktion bleibt erfolglos.....	73
3.2.1	Rekombinante Präparationen von Poly(A)-Polymerase, CstF und CF II sind aktiv in der Spaltungsreaktion	75
3.3	Spaltungsaktivität von HeLa-Kernextrakt ist limitiert	76
3.4	Fraktionierung von HeLa-Kernextrakt zur Identifikation unbekannter 3'-Prozessierungsfaktoren.....	77
4	Zusammenfassung.....	78
5	Material und Methoden	79
5.1	Chemikalien und Lösungen	79
5.2	Verbrauchsmittel.....	80
5.3	Geräte.....	81
5.4	Software	81
5.5	DNA-Konstrukte.....	82
5.5.1	Bacmide und Baculoviren.....	82
5.5.2	MutiBac-Transfervektoren	83
5.5.3	sonstige Plasmide und Nukleinsäuren	83
5.6	Proteine	84
5.6.1	Antikörper	84
5.6.2	(Rekombinante) Proteinpräparationen.....	84
5.6.3	Enzyme	85
5.7	Chromatographiematerial und Säulen.....	85
5.8	Zellstämme	85
5.8.1	Bakterienstämme	85
5.8.2	Insektenzelllinien.....	86
5.8.3	Nährmedien.....	86
5.8.4	Medienzusätze für bakterielle Kulturen.....	86
5.9	Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken.....	87
5.9.1	Sterilisation.....	87
5.9.2	Isolation und Vermehrung einzelner bakterieller Klone	87
5.9.3	Herstellung elektrokompenter Bakterien	87
5.9.4	Transformation elektrokompenter Bakterien.....	87
5.9.5	Herstellung von Glycerinkulturen	87
5.10	Das MultiBac-System.....	88
5.10.1	Allgemeiner Arbeitsablauf.....	88
5.10.2	Klonierung von Zielgenen in Transfervektoren	88
5.10.3	Translokation von Expressionskassetten mittels Multiplikationsmodul.....	88
5.10.4	Fusion von Transfervektoren via Cre-loxP-Rekombination <i>in vitro</i>	89
5.10.5	Herstellung elektrokompenter DH10-MultiBac ^{Cre} -Zellen.....	90
5.10.6	Integration von Transfervektoren in Bacmide via Cre-loxP-Rekombination <i>in vivo</i>	90

5.10.7	Herstellung elektrokompetenter DH10-MultiBac-Zellen für die Tn7-Transposition	90
5.10.8	Integration von Transfervektoren in Bacmide via Tn7-Transposition.....	90
5.10.9	Isolation rekombinanter Bacmid-DNA	91
5.11	Insektenzellkultur	92
5.11.1	Aussaat und Kultivierung adhärent wachsender Kulturen.....	92
5.11.2	Aussaat und Kultivierung von Insektenzellen in Suspension	92
5.11.3	Bestimmung der Zelldichte von Zellsuspensionen	92
5.11.4	Herstellung von tiefgefrorenen Vorratskulturen (<i>cryo stocks</i>)	93
5.11.5	Transfektion von Sf21-Zellen mit Bacmid-DNA.....	93
5.11.6	Propagation von Baculoviren, Herstellung größerer Virustiter.....	94
5.11.7	Infektion von Expressionskulturen.....	95
5.11.8	Aufschluss von Insektenzellen und Präparation von Zelllysaten	95
5.12	Nukleinsäurebiochemische Methoden	96
5.12.1	Standardmethoden	96
5.12.2	Agarose-Gelelektrophorese	96
5.12.3	Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	96
5.12.4	Radioaktive 5'-Markierung von Nukleinsäuren.....	97
5.12.5	Präparation radioaktiv markierter RNAs durch <i>In-Vitro</i> -Transkription.....	97
5.13	Proteinbiochemische Methoden.....	99
5.13.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen.....	99
5.13.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	99
5.13.3	Western-Blot-Analyse	101
5.14	Techniken zur Fraktionierung und Reinigung von Proteinen.....	102
5.14.1	Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC)	102
5.14.2	Strep-Affinitätschromatographie	102
5.14.3	Flag-Affinitätschromatographie	103
5.14.4	Ammoniumsulfatpräzipitation	103
5.14.5	Anionenaustauschchromatographie	103
5.14.6	Größenausschlusschromatographie.....	104
5.14.7	Fraktionierung mittels Poly(A)-Sephrose	104
5.15	Aktivitätsassays	105
5.15.1	Filterbindungsassay.....	105
5.15.2	<i>In-Vitro</i> -Polyadenylierung	106
5.15.3	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> (EMSA).....	106
5.15.4	Spaltungsassay	107
6	Literaturverzeichnis.....	108
6.1	Publikationen.....	108
6.2	Dissertationen und Studienarbeiten	119
6.3	Internetquellen.....	120
7	Tabellen- und Abbildungsverzeichnis.....	121
8	Abkürzungsverzeichnis	122
9	Anhang	124
9.1	Zusätzliche Abbildungen	124
9.2	<i>Curriculum vitae</i>	134
9.3	Publikationsliste	135
9.4	Eidesstattliche Erklärung.....	136
9.5	Danksagung	137

1 Einleitung

1.1 Genexpression in Eukaryoten

Die Erbinformationen aller bekannten Lebewesen sind in Form von Desoxyribonukleinsäure (DNA) gespeichert. Eine Grundvoraussetzung für das Leben ist die Expression der in dieser DNA kodierten Gene, im Besonderen die Expression von proteinkodierenden Genen. Ausgehend von der genomischen DNA werden die proteinkodierenden Sequenzen zunächst durch die RNA-Polymerase II in Transkripte aus Ribonukleinsäure (RNA), die sogenannte Boten-RNA (mRNA, *messengerRNA*), übersetzt. Diese mRNAs dienen später in der Translation als Vorlage für die Proteinbiosynthese. Während mRNAs in Prokaryoten direkt translatiert werden können, liegt die DNA in eukaryotischen Lebewesen in Form von Chromosomen im Zellkern vor, die Translation findet aber im Zytoplasma statt. Dementsprechend stellen die mRNAs ein wichtiges Bindeglied zwischen den beiden lokal getrennten Prozessen der Transkription und Translation dar. In Eukaryoten werden zunächst mRNA-Vorläufer gebildet, die sogenannten Prä-mRNAs. Diese enthalten neben den proteinkodierenden Sequenzen zum Einen nicht-translatierte Regionen am 5'- und 3'-Ende (5'-, bzw. 3'-UTRs, *untranslated regions*), sowie meist auch intronische Sequenzen (Introns), welche den Bereich der proteinkodierenden Sequenz unterbrechen (Abbildung 1.1).

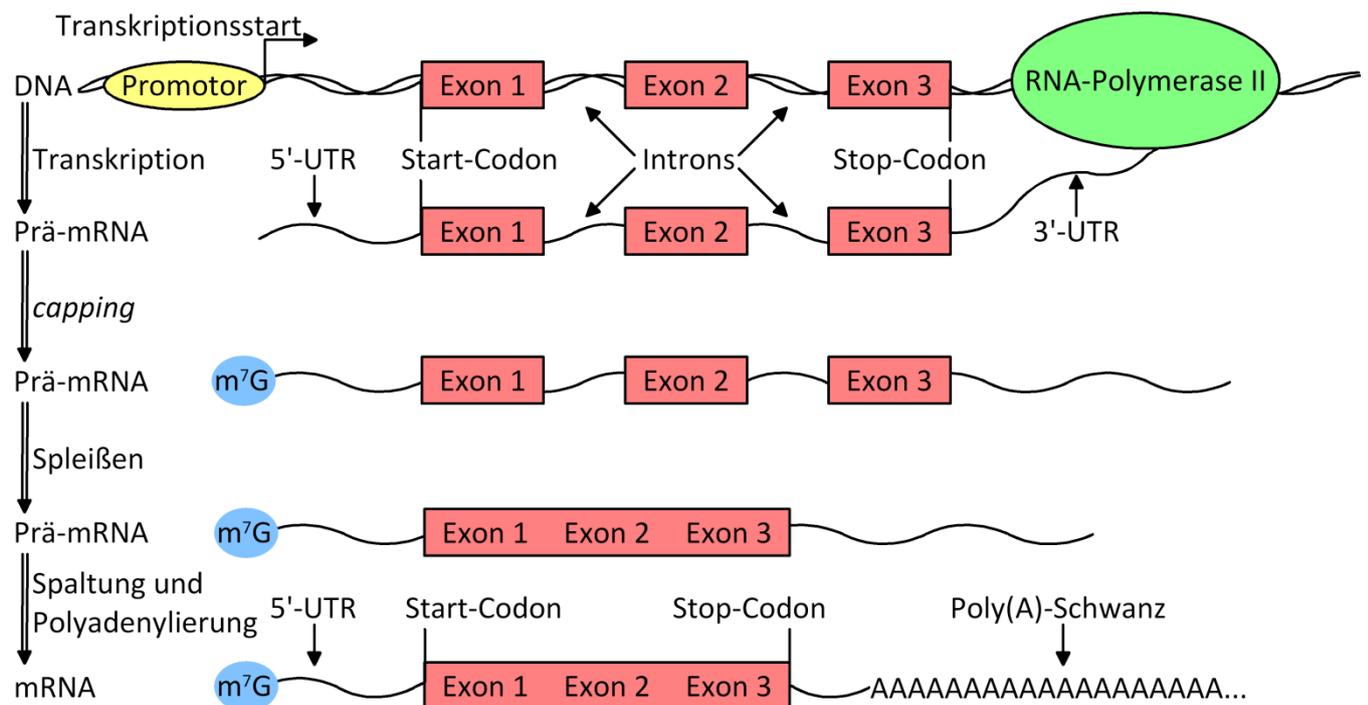


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Transkription und Prozessierung von Prä-mRNAs in Eukaryoten.

Gezeigt ist ein sehr vereinfachtes Schema der eukaryotischen Transkription durch die RNA-Polymerase II (in grün) sowie der kotranskriptional verlaufenden Prozessierung der Prä-mRNA. Die Transkription beginnt am Transkriptionsstart, welcher durch die Promotorsequenz (gelbes Feld) definiert wird. Die Prä-mRNA enthält sowohl proteinkodierende (Exons, rote Felder), als auch intronische Sequenzen (Introns), sowie nicht-translatierte Regionen am 5'- und 3'-Ende (5'-, bzw. 3'-UTR). 5'- und 3'-Ende der proteinkodierenden Sequenz werden jeweils durch Start- und Stop-Codons definiert. Das 3'-Ende der Prä-mRNA wird durch die Transkriptionstermination bestimmt. Während des *cappings* erhält die reifende mRNA ein 7-Methylguanidin-*cap* (m^7GpppN), das Spleißen entfernt die Introns und durch Spaltung und Polyadenylierung wird ein Teil des ursprünglichen Transkriptes durch einen Poly(A)-Schwanz ersetzt.

Mit Ausnahme von denjenigen mRNAs, die für die Histon-Proteine H2A, H2B, H3 und H4 kodieren, werden alle eukaryotischen Prä-mRNAs noch während der Transkription in drei Schritten prozessiert. Weiterhin werden die reifen mRNAs in Ribonukleoproteinpartikel (mRNPs) verpackt und als solche aus dem Zellkern exportiert, so dass sie für die Proteinbiosynthese im Zytoplasma zur Verfügung stehen. Eine schematische Übersicht über die drei Schritte der Prä-mRNA-Prozessierung ist in Abbildung 1.1 dargestellt.

Die Prozessierung der Prä-mRNA durch *capping*, Spleißen, Spaltung und Polyadenylierung erfolgt kotranskriptional, und die an der Prä-mRNA-Reifung beteiligten Enzyme und Proteinkomplexe sind mit der Carboxy-terminalen Domäne der großen Untereinheit der RNA-Polymerase II (CTD) assoziiert. Dadurch verlaufen Transkription und Prozessierung der Prä-mRNA *in vivo* sowohl räumlich als auch zeitlich eng aneinander gekoppelt und beeinflussen sich gegenseitig in Spezifität und Effizienz. Dies führt zu komplexen Regulationsmechanismen, welche die Reifung und somit auch die Natur der gebildeten mRNA maßgeblich beeinflussen [Übersichtsartikel Bentley, 2014]. Im Folgenden sollen die wesentlichen Eigenschaften der beiden Prä-mRNA-Prozessierungsschritte *capping* und Spleißen in Säugetieren erläutert werden. Im Anschluss daran erfolgt in Abschnitt 1.2 eine detailliertere Darstellung der 3'-Prozessierung in Säugetieren. Einzelne Faktoren der 3'-Prozessierung sowie deren genaue Funktionen werden später separat behandelt. Die für die Darstellung gewählte Reihenfolge von *capping*, Spleißen und 3'-Prozessierung gilt dabei nicht zwangsläufig für alle Reifungsprozesse *in vivo*. Vielmehr laufen diese Prozesse simultan ab, anstatt in strenger Reihenfolge sequenziell nacheinander [Übersichtsartikel Bentley, 2014].

1.1.1 5'-*capping*

Bereits nachdem die ersten 20 bis 30 Nukleotide der wachsenden Prä-mRNA durch die RNA-Polymerase II polymerisiert wurden findet das *capping* am 5'-Ende der Prä-mRNA statt [Rasmussen & Lis, 1993]. Dabei wird zunächst das γ -Phosphat am 5'-Ende der Prä-mRNA durch eine Triphosphatase abgespalten. Anschließend überträgt eine RNA-Guanylyltransferase ein Guanodinmonophosphat so auf das 5'-Ende der Prä-mRNA, dass eine 5'-ppp-5'-Verbindung entsteht. In Säugetieren werden die beiden Reaktionen der γ -Phosphat-Abspaltung und die Übertragung des Guanodinmonophosphates gemeinsam durch ein Enzym, das mRNA *capping enzyme*, katalysiert. Im dritten Schritt wird die endständige Guanin-Base am Stickstoff in Position sieben schließlich durch eine RNA-(Guanin-7)-Methyltransferase methyliert. Beide beteiligten Enzyme (mRNA *capping enzyme* und Guanin-7-Methyltransferase) interagieren mit an Serin5 phosphorylierter CTD und werden durch diese Interaktion aktiviert [McCracken *et al.*, 1997b; Ho & Shuman, 1999].

Als Folge des *cappings* weist die Prä-mRNA ein sogenanntes 7-Methylguanosin-*cap* (m7GpppN) am 5'-Ende auf, welches die reife mRNA stabilisiert und entscheidenden Einfluss sowohl auf den Export in das Zytoplasma, als auch auf die Translationseffizienz der mRNA hat [Übersichtsartikel Beelman & Parker, 1995; Sachs *et al.*, 1995]. Zudem werden fehlerhafte *cap*-Strukturen im Rahmen von zytoplasmatischer RNA-Qualitätskontrolle spezifisch erkannt und abgespalten, um einen Abbau defekter mRNAs in 5'→3'-Richtung zu ermöglichen [Jiao *et al.*, 2013].

Das *capping* stellt einen nahezu universellen Schritt der Prä-mRNA-Prozessierung dar, es scheint aber auch Ausnahmen vom kotranskriptionalen *capping* zu geben: So wurden zytoplasmatische *capping*-Ereignisse beschrieben [Otsuka *et al.*, 2009]. Weiterhin wurden auch Mechanismen beschrieben, welche scheinbar gezielt die Effizienz des *cappings* regulieren [Fernandez-Sanchez *et al.*, 2009].

1.1.2 Spleißen

Beim Spleißen werden die nicht kodierenden, intronischen Sequenzen aus der reifenden Prä-mRNA ausgeschnitten und die Exons miteinander ligiert. Die Spleißreaktion wird durch einen Ribonukleoproteinkomplex, das Spleißosom, katalysiert. Komponenten des Spleißosoms (snRNPs, *small nuclear ribonucleoprotein particles*) binden *cis*-Elemente in der Prä-mRNA, sobald diese durch die RNA-Polymerase II freigegeben wurden. Die Erkennung der entsprechenden Sequenzen in der Prä-mRNA erfolgt dabei durch Basenpaarungen mit Teilen der snRNAs der einzelnen snRNPs. Die Assoziation des Spleißosoms erfolgt schrittweise und für jedes Spleißereignis von Neuem: Zuerst wird die 5'-Spleißstelle durch das U1 snRNP gebunden (E-Komplex). Das U2 snRNP bindet mit Hilfe des Faktors U2AF (U2 *auxiliary factor*) an den Verzweigungspunkt innerhalb des Introns, nahe der 3'-Spleißstelle, U1 und U2 begeben sich dabei miteinander in Interaktion (A-Komplex). Es folgt die Assoziation der U4, U5 und U6 snRNPs, der sogenannte B-Komplex wird gebildet. Während der ersten Umesterung wird die Prä-mRNA an der 5'-Spleißstelle gespalten und das 5'-Ende des Introns mit dem Verzweigungspunkt verbunden, das Intron nimmt eine Lasso-förmige Struktur (Lariat) ein. Vor dieser Umsetzung erfolgt die Dissoziation der snRNPs U1 und U4, wodurch das katalytisch aktive Spleißosom entsteht (C-Komplex). Nun erfolgt ein nukleophiler Angriff der 3'-OH-Gruppe des ersten Exons auf die 3'-Spleißstelle, wodurch die Exons in der zweiten Umesterung miteinander verbunden werden. Das Intron wird als Lariat frei und die übrigen snRNPs U2, U5 und U6 dissoziieren [Übersichtsartikel Chen & Cheng, 2012].

Wie auch das *capping* findet das Spleißen in der Regel kotranskriptional statt, es scheint aber auch hier Ausnahmen in Form von posttranskriptionalem Spleißen zu geben [Denis *et al.*, 2005; Bhatt *et al.*, 2012]. Alternatives Spleißen ermöglicht weiterhin die Generierung unterschiedlicher reifer mRNAs und somit auch unterschiedlicher Genprodukte, ausgehend von einer Prä-mRNA-Spezies.

1.2 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs in Säugetieren

Die 3'-Prozessierung eukaryotischer Prä-mRNAs setzt sich aus zwei Teilschritten zusammen: Im ersten Schritt wird die wachsende mRNA endonukleolytisch gespalten. Anschließend wird das 3'-Ende der Prä-mRNA durch die Poly(A)-Polymerase polyadenyliert, wodurch die Prä-mRNA einen Poly(A)-Schwanz von etwa 250 Nukleotiden Länge erhält [Übersichtsartikel Ogorodnikov *et al.*, 2016]. Die zwei Schritte der 3'-Prozessierung sind in Abbildung 1.2 schematisch zusammengefasst.

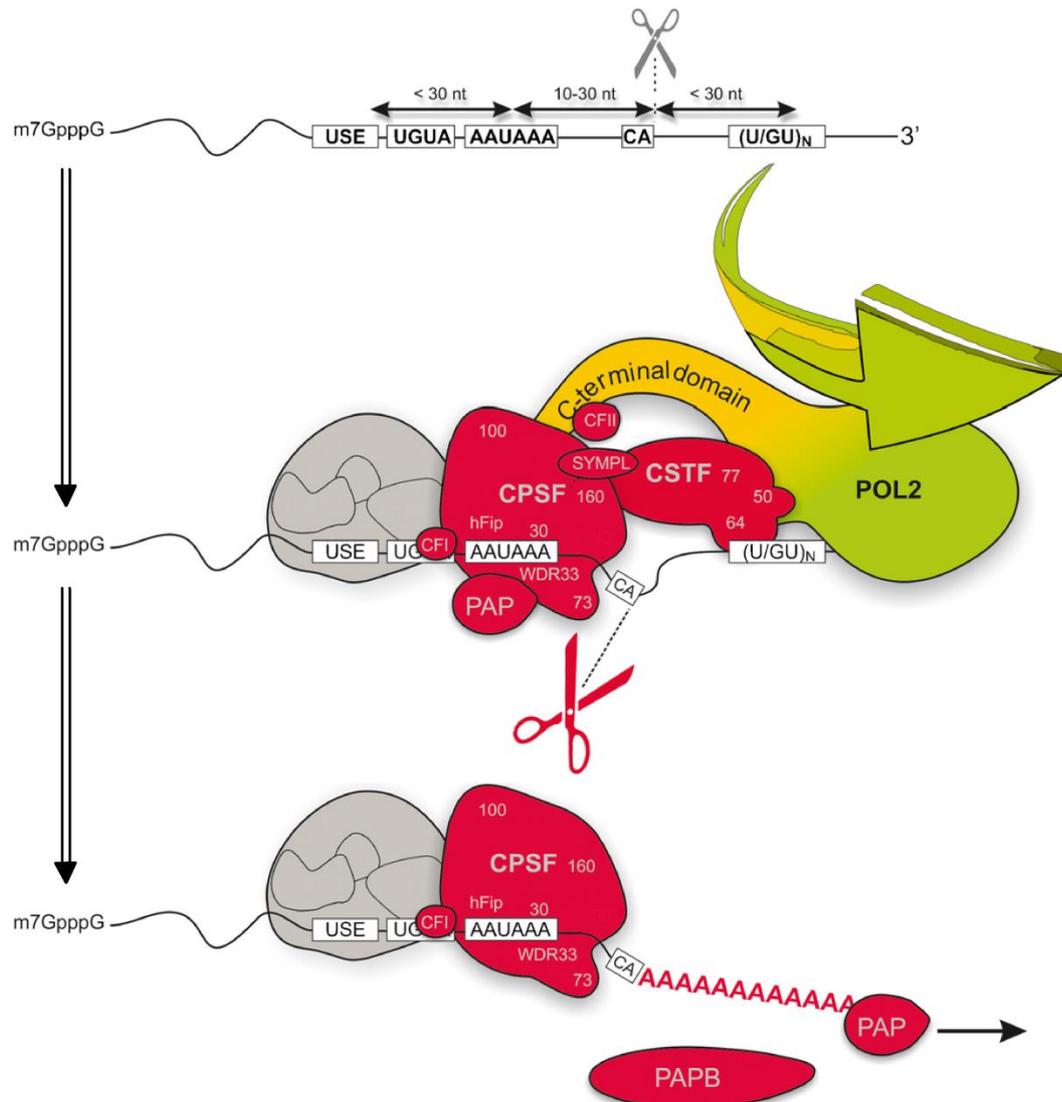


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der 3'-Prozessierung eukaryotischer Prä-mRNAs.

Abbildung modifiziert nach [Ogorodnikov *et al.*, 2016]. Schematische Darstellung einer Prä-mRNA mit Sequenzelementen in der 3'-UTR sowie assoziierten 3'-Prozessierungsfaktoren. Das Polyadenylierungssignal AAUAAA wird durch den CPSF-Komplex (rot) gebunden, CstF (rot) bindet an das U-, bzw. GU-reiche DSE und CF I (rot) an die stromaufwärts liegende UGUA-Sequenz. Die Prozessierungsfaktoren Poly(A)-Polymerase, CF II und Symplekin (ebenfalls rot) liegen assoziiert vor. Zusätzlich gezeigt sind die CTD (gelb) der sich noch in der Transkription befindlichen RNA-Polymerase II (grün) sowie weitere (nicht-) kanonische Prozessierungsfaktoren (grau), welche an USEs binden. Nach der Spaltung durch die Endonuklease CPSF73 dissoziiert ein Teil des Prozessierungsapparates mit dem 3'-Fragment der Prä-mRNA und das 5'-Fragment wird von der Poly(A)-Polymerase (PAP, rot) polyadenyliert. Der reife Poly(A)-Schwanz wird von mehreren Molekülen PABPN1 (PABP, rot) gebunden, sobald genügend Poly(A)-Schwanz für die Bindung zur Verfügung steht.

Der Poly(A)-Schwanz, wie auch ein intaktes 5'-*cap*, ist essentiell für einen effizienten Export der mRNA aus dem Zellkern in das Zytoplasma [Izaurralde *et al.*, 1992; Huang & Carmichael, 1996]. Des Weiteren trägt der Poly(A)-Schwanz maßgeblich zur Stabilität der reifen mRNA bei: Der Abbau des Poly(A)-Schwanzes durch 3'-Exonukleasen (Deadenylierung) ist in der Regel der erste Schritt der mRNA-Degradation. Noch während der Polyadenylierung bindet das nukleäre Poly(A)-bindende Protein 1 (PABPN1) den wachsenden Poly(A)-Schwanz und bedeckt diesen vollständig [Wahle, 1991b]. Sobald sich die mRNA im Zytoplasma befindet, wird der Poly(A)-Schwanz durch mehrere Kopien des zytoplasmatischen Poly(A)-bindenden Proteins (PABPC) gebunden und die mRNA so im Zytoplasma vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt [Ford *et al.*, 1997]. Schließlich bewirkt der mit PABPC bedeckte Poly(A)-Schwanz eine effiziente Initiation der Translation: PABPC unterstützt auf der einen Seite den essentiellen Kontakt zwischen mRNA und dem Translationsinitiationsfaktor eIF4G. Auf der anderen Seite ermöglicht der Poly(A)-Schwanz der mRNA, durch Interaktion von eIF4G mit dem 5'-*cap*-bindenden Protein eIF4E, eine zirkuläre Form einzunehmen, welche vermutlich für eine effiziente Initiation der Translation notwendig ist [Übersichtsartikel Sachs *et al.*, 1997].

Die 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs in Säugetieren ist abhängig von mehreren Sequenzelementen in der RNA selbst, das am besten definierte Sequenzelement stellt dabei das sogenannte Polyadenylierungssignal dar. Hierbei handelt es sich um die konservierte Hexamer-Sequenz AAUAAA, oder ähnliche Varianten dieser Sequenz. Dieses Sequenzelement wird durch den *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) erkannt [Keller *et al.*, 1991]. Das Polyadenylierungssignal liegt zwischen 10 und 30 Nukleotiden stromaufwärts der Spaltstelle, welche wiederum in den meisten Fällen in Form eines CA-Dinukleotids vorliegt. Die Spaltung der Prä-mRNA erfolgt unmittelbar 3' dieses Dinukleotids. Ein weiterhin für die 3'-Prozessierung charakteristisches Sequenzelement ist ein U- bzw. GU-reicher Bereich stromabwärts der Spaltstelle (DSE, *downstream element*). Das DSE wird durch den *cleavage stimulatory factor* (CstF) gebunden. Die Bindung der Prä-mRNA durch CPSF und CstF erfolgt dabei kooperativ [Murthy & Manley, 1995]. Stromaufwärts des Polyadenylierungssignals beinhalten die meisten Prä-mRNAs eine oder mehrere Kopien der Konsensussequenz UGUA, diese wird durch den *cleavage factor I* (CF I) erkannt [Brown & Gilmartin, 2003]. Zusätzlich zu diesen Sequenzelementen besitzen viele mRNAs noch U-reiche Elemente stromaufwärts der Spaltstelle (USEs, *upstream auxiliary elements*). Die Kombination der in einer Prä-mRNA jeweils vorhandenen Sequenzelemente sowie deren genaue Beschaffenheit und Lage in der 3'-UTR bestimmen die Stärke einer jeden Spaltstelle. In vielen Fällen beinhalten Prä-mRNAs gar nur einen Teil der genannten Sequenzelemente, wodurch die Effizienz der 3'-Prozessierung der jeweiligen RNAs maßgeblich beeinflusst wird [Übersichtsartikel Gruber *et al.*, 2014]. Das Zusammenspiel mehrerer, aber jeweils nicht unbedingt notwendiger Sequenzelemente erlaubt eine genspezifische Regulation der Prä-mRNA-Prozessierungsereignisse und somit eine strikte Kontrolle über die Produktion reifer mRNAs [Übersichtsartikel Ogorodnikov *et al.*, 2016]. Neben den genannten Proteinen sind weitere Proteinfaktoren an der 3'-Prozessierung beteiligt, zu diesen gehören beispielsweise die Carboxy-terminale Domäne der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II (CTD), die Poly(A)-Polymerase und der *cleavage factor II* (CF II). Die genauen Funktionen und Eigenschaften der einzelnen Proteinfaktoren in der 3'-Prozessierung werden in späteren Abschnitten behandelt.

Die zwei Teilreaktionen der 3'-Prozessierung verlaufen *in vivo* miteinander verknüpft sowie an Transkription, *capping* und Spleißen gekoppelt. Dies wird zum Einen durch die kotranskriptionale Natur der Prä-mRNA-Prozessierung bedingt, welche dazu führt, dass alle Prozessierungsschritte zeitlich parallel zueinander ablaufen. Zum Anderen durch die räumliche Nähe aller Prozessierungsreaktionen, welche aus der Assoziation der Prozessierungsfaktoren mit der CTD der RNA-Polymerase II resultiert. Durch Wahl geeigneter Reaktionsbedingungen und Substrat-RNAs lassen sich die Reaktionen *in vitro*, beispielsweise mittels Nutzung von HeLa-Kernextrakt, jedoch auch getrennt voneinander und entkoppelt von der Transkription betrachten [Moore & Sharp, 1985; Übersichtsartikel Wahle & Kühn,

1997]. Die natürliche Kopplung der Reaktionen untereinander bedingt allerdings ein komplexes Netzwerk von Interaktionen zwischen den einzelnen Reaktionen, wodurch sich Transkription, *capping*, Spleißen und 3'-Prozessierung *in vivo* gegenseitig in Spezifität und Effizienz beeinflussen. Dieses Regulationsnetzwerk lässt sich entsprechend *in vitro* nur sehr begrenzt analysieren und nachvollziehen. Beispiele für die zahlreichen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Prozessen der Reifung eukaryotischer Prä-mRNAs sind: Die Repression vorzeitiger Spaltungs- und Polyadenylierungsereignisse durch das U1 snRNP [Berg *et al.*, 2012], die Rekrutierung und allosterische Aktivierung der *capping*-Enzyme durch Phosphorylierung der CTD an Serin5 [Ho & Schuman, 1999], die Notwendigkeit eines intakten Polyadenylierungssignals für das effiziente Spleißen des letzten Introns [Niwa & Berget, 1991], oder das Einleiten der Transkriptionstermination durch die Spaltung der 3'-UTR [Connelly & Manley, 1988].

Etwa 70% aller mRNAs beinhalten mehr als eine potentielle Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle und bieten daher die Möglichkeit zur sogenannten alternativen Polyadenylierung [Übersichtsartikel Ogorodnikov *et al.*, 2016]. Dadurch können ausgehend von einer Prä-mRNA mehrere reife mRNAs entstehen, welche sich in der Länge ihrer 3'-UTR unterscheiden, je nachdem ob eine proximale oder eine distale Position für die 3'-Prozessierung ausgewählt wird. Reife Transkripte mit längeren 3'-UTRs (Nutzung einer distalen Polyadenylierungsstelle) gelten in der Regel als besser regulierbar, da das Schicksal der entsprechenden mRNAs durch eine höhere Anzahl an Bindestellen für regulatorische Proteine oder microRNAs beeinflusst werden kann. Dem entgegengesetzt sind die Produkte proximaler Polyadenylierungsereignisse meist in geringerem Maße reguliert. Die alternative Polyadenylierung stellt eine eigene Kontrollebene in der Genregulation dar, mit enorm vielfältigen Regulationsmechanismen und beteiligten Faktoren. Ebenso zahlreich wie die bislang untersuchten Fälle von alternativer Polyadenylierung zur Regulation physiologischer Prozesse (etwa bei der Aktivierung von B- und T-Zellen, beim Klassenwechsel der Immunglobuline, oder der Differenzierung embryonischer Stammzellen zu Neuronen), sind Beispiele für Ereignisse alternativer Polyadenylierung, bei welchen eine veränderte Auswahl der genutzten Polyadenylierungsstellen bestimmter Prä-mRNAs zu pathologischen Erscheinungsbildern führt [Übersichtsartikel Ogorodnikov *et al.*, 2016; Gruber *et al.*, 2014]. So ist es nicht verwunderlich, dass die alternative Polyadenylierung in den letzten Jahren vermehrt in den Fokus der Ursachenforschung von Krebs- und Autoimmunerkrankungen gerückt ist.

1.2.1 Die Spaltungsreaktion

Die endonukleolytische Spaltung der Prä-mRNA findet in der Regel hinter einem konservierten CA-Dinukleotid statt, welches 10 bis 30 Nukleotide stromabwärts des Polyadenylierungssignals AAUAAA und stromaufwärts des U-, bzw. GU-reichen DSE liegt (Abbildung 1.2). Zu den lange bekannten Faktoren der 3'-Prozessierung gehören die Poly(A)-Polymerase, der CPSF-Komplex, CstF, CF I, CF II und die CTD der RNA-Polymerase II [Übersichtsartikel Mandel *et al.*, 2008]. Neben diesen Proteinen wurden im Laufe der Jahre zudem weitere Faktoren sowie neue Untereinheiten der bekannten Proteinkomplexe mit essentiellen Funktionen in der Spaltungsreaktion identifiziert. Die entsprechenden Proteine und Proteinkomplexe sowie deren bekannte Funktionen werden in späteren Abschnitten der Einleitung separat im Detail vorgestellt.

Der wesentliche Ablauf der Spaltungsreaktion ist wie folgt: Die reifende Prä-mRNA wird noch während der fortlaufenden Transkription durch die Spaltungsfaktoren gebunden. Die genaue Reihenfolge der Assoziation von CPSF, CstF, CF I, CF II und Poly(A)-Polymerase mit der Prä-mRNA ist bislang weitgehend ungeklärt. Denkbar ist, dass die Bindung der Prä-mRNA durch CPSF und CstF (respektive am Polyadenylierungssignal und am DSE) zu den ersten Assoziationsschritten gehört, da diese Interaktionen die Spaltstelle maßgeblich definieren. Auf der anderen Seite sind aber auch zahlreiche Interaktionen zwischen den Prozessierungsfaktoren und der CTD der RNA-Polymerase II beschrieben, welche teilweise

bereits zu Beginn der Transkription etabliert sind [Übersichtsartikel Hsin & Manley, 2012; Shi & Manley, 2015].

Nach abgeschlossener Assemblierung des Spaltkomplexes erfolgt die Spaltung der Prä-mRNA durch die CPSF-Untereinheit CPSF73, einer Zink-abhängigen Hydrolase der Metallo- β -Laktamase-Superfamilie [Mandel *et al.*, 2006].

Die Spaltung der Prä-mRNA gibt die reife mRNA als 5'-Fragment frei, das 3'-Fragment verbleibt in Kontakt mit der RNA-Polymerase II und wird durch die fortlaufende Transkription weiter verlängert. Nach dem sogenannten Torpedo-Modell initiiert die Spaltung der Prä-mRNA den exonukleolytischen Abbau des 3'-Fragments in 5'→3'-Richtung, wodurch letztendlich auch die Dissoziation des RNA-Polymerase II-Komplexes eingeleitet und die Transkription terminiert wird [Connelly & Manley, 1988].

Es ist wahrscheinlich, dass auch die Prozessierungsfaktoren CstF, CFI und CFII nach Abschluss der Spaltung dissoziieren, da mit dem 3'-Fragment entsprechende Bindestellen dieser Faktoren verloren gehen (CstF) und die Faktoren keine essentiellen Funktionen in der nachfolgenden Polyadenylierung erfüllen (Abbildung 1.2).

1.2.2 Die Polyadenylierungsreaktion

Für eine effiziente Synthese von Poly(A)-Schwänzen korrekter Länge (in Säugetieren etwa 250 Nukleotide) sind die Proteine CPSF, PABPN1 und selbstverständlich die Poly(A)-Polymerase notwendig. Der CPSF-Komplex ist weiterhin an das Polyadenylierungssignal der Prä-mRNA gebunden und vermittelt so die Spezifität der Polyadenylierung. PABPN1 bindet in mehreren Kopien an den wachsenden Poly(A)-Schwanz und bedeckt diesen dadurch vollständig. Die Poly(A)-Polymerase interagiert sowohl mit CPSF, als auch mit auf dem Poly(A)-Schwanz gebundenem PABPN1. Dadurch wird das Enzym auf der Substrat-mRNA gehalten und kooperativ durch CPSF und PABPN1 stimuliert. In der Folge findet eine prozessive Polyadenylierungsreaktion statt, das heißt die Poly(A)-Polymerase bleibt relativ lange an eine Substrat-mRNA gebunden und verlängert diese um viele Adenylatreste [Wahle, 1991b; Bienroth *et al.*, 1993].

Die Länge des gebildeten Poly(A)-Schwanzes wird durch die Abdeckung desselben mit PABPN1 begrenzt. Ist die Polyadenylierung ausreichend fortgeschritten, führt die steigende Anzahl der auf dem Poly(A)-Schwanz gebundenen PABPN1-Moleküle zum Abbruch des Kontaktes zwischen Poly(A)-Polymerase und CPSF. Die Poly(A)-Polymerase agiert in der Folge distributiv, das heißt sie dissoziiert bereits nach der Addition weniger Adenylatreste wieder von der Substrat-mRNA. Für eine weitere Verlängerung der entsprechenden mRNA müsste eine erneute Assoziation der Poly(A)-Polymerase an das 3'-Ende stattfinden. Der Mechanismus der Längenkontrolle und seine physiologische Relevanz ist ausführlich beschrieben in [Kühn *et al.*, 2009; Kühn *et al.*, 2017]. Beim Export der reifen mRNA aus dem Zellkern wird PABPN1 durch das zytoplasmatische Poly(A)-bindende Protein (PABPC) ersetzt.

1.3 Etablierte Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren

Die Identifikation der 3'-Prozessierungsfaktoren in Säugetieren erfolgte durch Fraktionierung der entsprechenden Proteine und Proteinkomplexe aus Kalbsthymus oder HeLa-Kernextrakt und begann etwa im Jahr 1988. In diesen Arbeiten wurden maßgeblich fünf an der 3'-Prozessierung beteiligte Faktoren identifiziert: Die kanonische Poly(A)-Polymerase [Christofori & Keller, 1988, 1989; Takagaki *et al.*, 1988], der *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) [Christofori & Keller, 1988; Takagaki *et al.*, 1988; Gilmartin & Nevins, 1989], der *cleavage stimulatory factor* (CstF) [Takagaki *et al.*, 1989, 1990], der *cleavage factor I* (CF I) [Takagaki *et al.*, 1989] und der *cleavage factor II* (CF II) [Takagaki *et al.*, 1989]. Etwas später wurde gezeigt, dass das nukleäre Poly(A)-bindende Protein 1 (PABPN1) eine Rolle in der 3'-Prozessierung besitzt [Wahle, 1991b]. Weiterhin wurden Interaktionen zwischen den identifizierten 3'-Prozessierungsfaktoren und der Carboxy-terminalen Domäne der größten Untereinheit der RNA-Polymerase II (CTD) gefunden. Diese Interaktionen vermitteln zum einen die direkte Kopplung von Transkription und 3'-Prozessierung, weiterhin hat die CTD aber auch einen stimulierenden Einfluss auf die Reaktionen der 3'-Prozessierung *in vivo* und wurde für die 3'-Prozessierung *in vitro* sogar als essentiell beschrieben [McCracken *et al.*, 1997a; Hirose & Manley, 1998]. Mit Hilfe der gereinigten Faktoren und geeigneten RNA-Substraten können beide Reaktionen der 3'-Prozessierung *in vitro* durchgeführt werden [Christofori & Keller, 1988; Takagaki *et al.*, 1989; Wahle, 1991b; Bienroth *et al.*, 1993].

Die einzelnen Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren wurden im Laufe der folgenden Jahre in rekombinanter Form dargestellt und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Aktivitäten charakterisiert, wie es in den nachfolgenden Abschnitten für die einzelnen Faktoren detailliert dargelegt wird. Die Rekonstitution der Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktionen allein aus rekombinant hergestellten Faktoren ist bislang allerdings nicht gelungen. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass nicht alle für die 3'-Prozessierung essentiellen Faktoren in den gereinigten Fraktionen identifiziert wurden und weitere, bislang unbekannte Komponenten an der 3'-Prozessierung in Säugetieren beteiligt sind. Unterstützt wird diese Vermutung durch den Vergleich der identifizierten Faktoren aus Säugetieren mit den 3'-Prozessierungsfaktoren aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*). Während einige der Faktoren als eindeutige Homologe in beiden Modellorganismen gefunden werden konnten, unterscheiden sich andere Proteine mitunter deutlich bezüglich ihrer enthaltenen Domänen und deren Anordnung zueinander. Wiederum andere Proteine scheinen sogar exklusiv in der Bäckerhefe oder in Säugetieren vorzukommen. Dabei ist es natürlich möglich, dass entsprechende homologe Proteine schlichtweg noch nicht als solche identifiziert wurden [Übersichtsartikel Zhao *et al.*, 1999a; Mandel *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2014]. Die bekannten und putativen 3'-Prozessierungsfaktoren aus Bäckerhefe und Säugetieren sind in Tabelle 1.1 zusammenfassend gegenübergestellt.

Durch eben solche Vergleiche der bekannten 3'-Prozessierungsfaktoren aus Säugetieren und Bäckerhefe sowie durch Interaktionsstudien an der 3'-Prozessierungsmaschinerie in Säugetieren wurden in den letzten Jahren weitere Proteine mit potentiellen Funktionen in der 3'-Prozessierung von Säugetieren identifiziert [Takagaki & Manley, 2000; Hofmann *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2009; Di Giammartino *et al.*, 2014].

Die einzelnen bekannten sowie putativen Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren sollen einzeln in den nachfolgenden Abschnitten hinsichtlich ihrer generellen Eigenschaften und Funktionen in der 3'-Prozessierung detailliert vorgestellt werden.

<i>Homo sapiens</i>		<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
RNA-Polymerase II-Untereinheit Rpb1, CTD		RPB1p, CTD	
PABPN1			
CstF-50	CstF-Komplex	Rna15p	CF IA-Komplex
CstF-64			
CstF-64τ		Rna14p	
CstF-77			
Clp1	CF II-Komplex	Clp1p	
Pcf11		Pcf11p	
CF I-25	CF I-Komplex		
CF I-59			
CF I-68			
CF I-72			
CPSF73	CPSF-Komplex	Ysh1p / Brr5p	CF II-Komplex
CPSF100		Ydh1p / CFT2	
CPSF160		Yhh1p / CFT1	
Symplekin		Pta1p	
CPSF30		Yth1p	PF-Komplex
hFip1		Fip1p	
WDR33		Pfs2p	
Poly(A)-Polymerase (PAPOLα)		Pap1p	CPF-Komplex
Ssu72		Ssu72p	
WDR82		Swd2p	
Rbbp6		Mpe1p	
PP1α		Glc7p	
CstF-64τ ?		Pti1p	
PNUTS / PPP1R10 ?		Ref2p	
RC-68 / Int11 ?		Syc1p	
		Hrp1p	CF IB-Komplex

Tabelle 1.1: Gegenüberstellung von 3'-Prozessierungsfaktoren aus Säugetieren und Bäckerhefe.

Bekannte Homologe aus Säugetieren und Bäckerhefe stehen sich in den Zeilen der Tabelle gegenüber. Die Zugehörigkeit einzelner Untereinheiten zu Proteinkomplexen ist durch grau hinterlegte Felder gekennzeichnet. Der CPF-Komplex der Bäckerhefe beinhaltet die beiden Komplexe CF II und PF sowie acht weitere Proteine. Unklar ist die Homologie von CstF-64τ zu Pti1p, von PNUTS zu Ref2p und von RC-68 zu Syc1p. Die entsprechenden Säugerproteine sind daher mit Fragezeichen versehen. Informationen entnommen aus [Übersichtsartikel Mandel *et al.*, 2008].

1.3.1 RNA-Polymerase II

Die RNA-Polymerase II nimmt zum Einen über ihre Carboxy-terminale Domäne großen Einfluss auf die Prozessierung reifender mRNAs. Über variable Elongationsraten ermöglicht sie zum Anderen aber auch eine Regulation der Prä-mRNA-Prozessierung etwa durch Transkriptionsinitiationsfaktoren oder Histonmodifikationen. Detailliert untersucht sind die Zusammenhänge zwischen Transkriptionselongationsraten und der Auswahl alternativer Spleißstellen. Aber auch die 3'-Prozessierung, und damit verbunden die Auswahl von Prozessierungsstellen in der alternativen Polyadenylierung, wird entsprechend reguliert [Enriquez-Harris *et al.*, 1991; Peterson *et al.*, 2002; Übersichtsartikel Bentley, 2014].

Auf die besondere Rolle der CTD in der 3'-Prozessierung soll im folgenden Abschnitt gesondert eingegangen werden.

1.3.1.1 Carboxy-terminale Domäne der RNA-Polymerase II-Untereinheit RPB1 (CTD)

Die C-terminale Domäne der größten RNA-Polymerase II-Untereinheit RPB1 besteht in Säugetieren aus 52 Wiederholungen der Aminosäuresequenz Tyr-Ser-Pro-Thr-Ser-Pro-Ser (Konsensussequenz, leichte Variationen dieser Sequenz sind in 31 der 52 Wiederholungen zu finden) [Übersichtsartikel Egloff *et al.*, 2012]. Jedes Heptapeptid kann an den Positionen Tyr1, Ser2, Thr4, Ser5 und Ser7 phosphoryliert werden. An zwei Positionen können Peptidyl-Prolyl-Bindungen isomerisiert werden und die Positionen Thr4, Ser5 und Ser7 stellen Substrate für mögliche Glykosylierungen dar [Ranuncolo *et al.*, 2012; Übersichtsartikel Egloff *et al.*, 2012]. Durch das Zusammenspiel dieser Modifikationen besitzt die CTD eine unvorstellbar hohe Anzahl theoretisch möglicher Isoformen. Dem entgegengesetzt haben neuere massenspektrometrische Untersuchungen an der CTD aus Bäckerhefe und Säugetieren gezeigt, dass die Variabilität tatsächlich auftretender Modifikationen deutlich geringer ist. So finden Phosphorylierungen hauptsächlich an den Positionen Serin2 und 5 statt und die doppelte Phosphorylierung beider dieser Positionen innerhalb einer Wiederholung der CTD ist selten [Schüller *et al.*, 2016; Suh *et al.*, 2016].

Die Modifikationen der CTD scheinen einem generellen Trend zu folgen: Im Fortlauf der Transkription werden bestimmte Modifikationen von der CTD entfernt, während andere Modifikationen ko-transkriptional auf der CTD akkumulieren. So liegen zum Beispiel die Positionen Ser5 und Ser7 in der Regel zu Beginn der Transkription vorrangig phosphoryliert vor und werden im Laufe der Transkription dephosphoryliert. Dem entgegengesetzt verhält sich die Phosphorylierung an den Positionen Tyr1, Ser2, und Thr4, welche mit fortlaufender Transkription zunimmt. Diese Veränderungen an den Modifikationen der CTD beeinflussen maßgeblich die Assoziation und Dissoziation von Prä-mRNA-Prozessierungsfaktoren an die CTD [Komarnitsky *et al.*, 2000]. Man bezeichnet die Modifikationen der CTD, sowie die damit einhergehende Modulation der assoziierten Proteinkomplexe, zusammenfassend als „CTD-Code“. Die CTD dient als Plattform für die Assoziation von Prä-mRNA-Prozessierungsfaktoren und so auch für Faktoren der 3'-Prozessierung. So wurde beispielsweise die direkte Bindung der CF II-Untereinheit Pcf11 in Abhängigkeit von der Phosphorylierung an Position Ser2 sowie die Bindung der CTD durch die CPSF-Untereinheit CPSF160 und die CstF-Untereinheit CstF-50 gezeigt [McCracken *et al.*, 1997a; Licatalosi *et al.*, 2002]. Die Assoziation von Prozessierungsfaktoren mit der CTD und die damit einhergehende mechanistische Kopplung von Transkription und Prä-mRNA-Prozessierung bedingt die räumliche und zeitliche Koordination dieser Prozesse sowie Möglichkeiten der gegenseitigen Regulation [Übersichtsartikel Bentley, 2014]. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Konzentrierung von Prozessierungsfaktoren auf der CTD eine allosterische Aktivierung der *capping*-Enzyme und somit ein effizienteres *capping* bedingt [Ho & Shuman, 1999], oder dass einzelne 3'-Prozessierungsfaktoren kooperativ an mehrere Wiederholungen des CTD-Heptapeptids binden, um so die effiziente Rekrutierung der 3'-Prozessierungsmaschinerie nur an hinreichend modifizierte CTDs zu ermöglichen. Eine vorzeitige Assoziation von 3'-Prozessierungsfaktoren und die Erkennung frühzeitiger Polyadenylierungsstellen wird so möglicherweise verhindert [Lunde *et al.*, 2010].

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die CTD im Laufe der Transkription einer großen Anzahl an Modifikationen sowie Assoziations- und Dissoziationsereignissen unterliegt und dass die Mechanismen zur Regulation dieses enormen Verkehrsaufkommens (also der CTD-Code) bislang nicht vollständig verstanden sind.

1.3.2 *Cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)*

Der CPSF-Komplex stellt ein Kernelement der 3'-Prozessierungsmaschinerie dar, da er durch die Erkennung des Polyadenylierungssignals AAUAAA maßgeblich für die Definition der Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle verantwortlich ist.

Ursprünglich wurde CPSF, in Folge biochemischer Fraktionierungen und Identifikation der Zusammensetzung, als Komplex aus vier Untereinheiten beschrieben, welche nach ihrem apparenten Molekulargewicht benannt sind: CPSF30, CPSF73, CPSF100 und CPSF160 [Bienroth *et al.*, 1991]. Später wurden weitere Proteine als Faktoren der 3'-Prozessierung identifiziert und aufgrund von Assoziationen mit den bekannten CPSF-Untereinheiten ebenfalls als mögliche Komponenten des CPSF-Komplexes klassifiziert. Diese Proteine tragen die Bezeichnungen hFip1 [Kaufmann *et al.*, 2004], Symplekin [Takagaki & Manley, 2000; Hofmann *et al.*, 2002] und WDR33 [Shi *et al.*, 2009].

1.3.2.1 CPSF30

CPSF30 ist mit einem Molekulargewicht von 30 kDa die kleinste bekannte Untereinheit des CPSF-Komplexes und besteht aus fünf Zinkfinger-Motiven im N-terminalen Bereich sowie einem sogenannten *zinc knuckle* nahe dem C-Terminus. Im homologen Protein aus der Bäckerhefe, Yth1p, ist der *zinc knuckle* nicht konserviert [Barabino *et al.*, 1997]. Die Domänenstruktur des humanen Proteins ist in Abbildung 9.1 im Anhang schematisch dargestellt.

Während CPSF30 für Spaltung und Polyadenylierung essentiell ist, führt die Deletion des Yth1p Proteins in der Bäckerhefe nur zu Einschränkungen in der Polyadenylierung [Barabino *et al.*, 1997, 2000].

CPSF30 bindet an RNA mit Präferenz für Poly(U)-Sequenzen und die Bindung des Hefe-Homologs Yth1p an Prä-mRNAs nahe der Polyadenylierungsstelle wurde gezeigt. Die RNA-Bindung wird sowohl durch die N-terminalen (insbesondere dem zweiten) Zinkfinger, als auch durch den C-terminalen *zinc knuckle* vermittelt. Die Deletion des *zinc knuckles* führt zu einer verminderten Bindung, die Spezifität für Poly(U) bleibt jedoch erhalten [Barabino *et al.*, 1997, 2000].

In einer Genom-weiten Analyse der RNA-Bindung von 3'-Prozessierungsfaktoren zeigte CPSF30 *in vivo* eine geringfügig spezifische Assoziation mit Sequenzen etwa 60 Nukleotide stromaufwärts der Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle [Martin *et al.*, 2012].

CPSF30 interagiert mit der putativen CPSF-Untereinheit hFip1 [Kaufmann *et al.*, 2004] und scheint weiterhin in Kontakt mit der RNA-Polymerase II zu stehen, allerdings nicht mit der CTD, sondern dem „Körper“ der Polymerase selbst [Nag *et al.*, 2007].

1.3.2.2 CPSF73

CPSF73 besitzt ein Molekulargewicht von 73 kDa und ist eines der namensgebenden Mitglieder der β -CASP Proteinfamilie, einer Gruppe von Nukleasen mit DNA- oder RNA-Substraten und komplexierten Metallionen im aktiven Zentrum. Die Proteine der β -CASP-Familie stellen eine Untergruppe der weit verbreiteten Metallo- β -Laktamasen (M β L) dar, welche zusätzlich zur klassischen M β L-Faltung eben noch die sogenannte β -CASP-Domäne beinhalten [Callebaut *et al.*, 2002; Übersichtsartikel Dominski, 2007]. Entsprechend dieser Zuordnung und weiteren experimentellen Hinweisen wird davon ausgegangen, dass es sich bei CPSF73 um die Endonuklease handelt, welche die Spaltungsreaktion in der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs sowie auch Histon-Prä-mRNAs katalysiert [Ryan *et al.*, 2004; Dominski *et al.*, 2005b; Mandel *et al.*, 2006]. Das aktive Zentrum der Endonuklease liegt direkt N-terminal der β -CASP-Domäne. An dieser Stelle werden zwei Metallionen (wahrscheinlich Zinkionen) komplexiert, wie es auch in einer Röntgenkristallstruktur der ersten 460 Aminosäuren von CPSF73 beobachtet wurde [Mandel *et al.*, 2006]. Der C-Terminus des Proteins ist weniger strikt definiert, weist aber starke Ähnlichkeit zum C-Terminus von CPSF100 auf. Der C-Terminus von CPSF73 wird für Interaktionen mit

CPSF100 und Symplekin benötigt [Dominski *et al.*, 2005a; Zhelkovsky *et al.*, 2006]. Eine Übersicht über die Domänenstruktur von CPSF73 ist in Abbildung 9.1 im Anhang gegeben.

Ähnlich zu CPSF30 zeigte CPSF73 in einer Genom-weiten Analyse der RNA-Bindung von 3'-Prozessierungsfaktoren *in vivo* eine geringfügig spezifische Assoziation mit Sequenzen etwa 60 Nukleotide stromaufwärts der Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle [Martin *et al.*, 2012].

In Säugetieren existiert eine weitere Isoform von CPSF73, welche den Namen RC-68 trägt und mit einer zweiten Isoform von CPSF100 (RC-74) interagiert. RC-68 und -74 sind Bestandteile des Integrator-Komplexes und an der Prozessierung von snRNAs beteiligt. RC-68 scheint in diesem Zusammenhang endonukleolytische Aktivität zu besitzen und die Spaltung von snRNA-Vorläufern zu katalysieren [Dominski *et al.*, 2005a; Baillat *et al.*, 2005].

1.3.2.3 CPSF100

CPSF100 besitzt sehr starke Ähnlichkeit mit CPSF73, wie es auch unschwer an den Domänenstrukturen der beiden Proteine in Abbildung 9.1 im Anhang zu erkennen ist. Die beiden Proteine sind zu 23% identisch und besitzen eine Ähnlichkeit von 49% [Jenny *et al.*, 1996]. Dementsprechend gehört CPSF100 ebenfalls zur Familie der β -CASP-Proteine.

Im Gegensatz zu CPSF73 beinhaltet CPSF100 eine etwa 118 Aminosäuren große Insertion innerhalb der β -CASP-Domäne, welche relativ stark geladen ist, aber keine bekannte Funktion besitzt [Callebaut *et al.*, 2002]. Zusätzlich dazu sind die Zink-koordinierenden Aminosäuren N-terminal der β -CASP-Domäne in CPSF100 (sowie auch im homologen Protein aus der Bäckerhefe, Ydh1p) nicht konserviert. CPSF100 besitzt dementsprechend keine Nukleaseaktivität [Callebaut *et al.*, 2002; Mandel *et al.*, 2006]. Die Röntgenkristallstruktur für die ersten 720 Aminosäuren des Hefe-Homologs Ydh1p wurde gelöst. Die für β -CASP Proteine typische Faltung sowie die Entartung des aktiven Zentrums wurden dabei bestätigt [Mandel *et al.*, 2006].

CPSF 100 interagiert mit CPSF73, wahrscheinlich maßgeblich über die C-Termini der beiden Proteine [Dominski *et al.*, 2005a]. Die Bildung von Homodimeren zur Erzeugung eines gemeinsamen aktiven Zentrums ist eine typische Eigenschaft von Proteinen der β -CASP-Familie. Die Dimerisierung von CPSF73 mit CPSF100 stellt somit einen möglichen Mechanismus zur Bildung der Endonuklease der 3'-Prozessierung dar [Übersichtsartikel Dominski, 2007]. Eine eigene Funktion für CPSF100 ist nicht beschrieben.

Auch von CPSF100 existiert in Säugetieren eine weitere Isoform, RC-74. Wie auch CPSF100 beinhaltet dieses Protein eine Insertion geladener Aminosäuren innerhalb der β -CASP-Domäne und ein degeneriertes aktives Zentrum und somit vermutlich keine Nukleaseaktivität [Baillat *et al.*, 2005; Dominski *et al.*, 2005a].

1.3.2.4 CPSF160

CPSF160 ist die größte Untereinheit des CPSF-Komplexes und besteht größtenteils aus Wiederholungen von WD40-Domänen, welche zusammen die Form von drei sogenannten β -Propellern einnehmen [Neuwald & Poleksic, 2000]. Die Domänenstruktur von CPSF160 ist in Abbildung 9.1 im Anhang schematisch dargestellt.

WD40 *repeats* sind im Proteom von Säugetieren sehr weit verbreitet und können sowohl Protein-Protein-Interaktionen als auch Interaktionen mit Nukleinsäuren vermitteln [Scrima *et al.*, 2008; Übersichtsartikel Stirnimann *et al.*, 2010]. Entsprechend wurden für rekombinantes CPSF160 sowohl Interaktionen mit CstF-77 und der Poly(A)-Polymerase nachgewiesen als auch Bindung an RNAs [Murthy & Manley, 1995]. Aus Kalbsthymus gereinigtes CPSF wurde weiterhin für UV-*crosslinks* mit RNA genutzt, dabei wurden *crosslinks* zu einem Protein von 160 kDa gefunden. Da CPSF160 derzeit die einzige bekannte CPSF-Untereinheit mit einem entsprechenden Molekulargewicht darstellte, wurden die

beobachteten *crosslinks* entsprechend CPSF160 zugesprochen. Die *crosslinks* waren dabei sehr spezifisch für das Polyadenylierungssignal: RNAs, welche die mutierte Variante AAGAAA des Polyadenylierungssignals enthielten, wurden vom Protein nicht gebunden [Gilmartin & Nevins, 1989; Keller *et al.*, 1991]. Die für das rekombinante CPSF160 beobachtete RNA-Bindung zeigte entgegengesetzt nur eine sehr geringe Spezifität für das Polyadenylierungssignal [Murthy & Manley, 1995]. Entsprechend wurde CPSF160 die größte Rolle bei der Erkennung des Polyadenylierungssignals durch den CPSF-Komplex beigemessen, für eine wirklich spezifische Bindung scheinen aber zusätzlich weitere CPSF-Untereinheiten notwendig zu sein.

Interessanter Weise zeigte CPSF160 in einer Genom-weiten Analyse der RNA-Bindung keine *In-Vivo*-Assoziation mit dem Polyadenylierungssignal. Stattdessen wurde das Protein mit geringfügiger Spezifität mit Sequenzen von Prä-mRNAs verknüpft, welche etwa 60 bis 75 Nukleotide stromaufwärts der Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle und somit auch deutlich stromaufwärts des Polyadenylierungssignals liegen [Martin *et al.*, 2012].

Wie auch das homologe Protein aus der Bäckerhefe, Yhh1p, scheint CPSF160 auch mit der CTD der RNA-Polymerase II zu interagieren [Dichtl *et al.*, 2002a; McCracken *et al.*, 1997a]. Weiterhin scheint CPSF160 auch an der Kopplung der 3'-Prozessierung an die Transkription beteiligt zu sein: So konnten direkte Kontakte zwischen CPSF160 und dem Transkriptionsfaktor TFIID nachgewiesen werden [Dantonel *et al.*, 1997].

1.3.2.5 hFip1

Das Protein Fip1p aus der Bäckerhefe ist bereits länger als essentieller Faktor der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs bekannt [Preker *et al.*, 1995]. Maßgeblich aufgrund der Sequenzhomologie in einem begrenzten Bereich des Proteins wurde fast zehn Jahre später das humane Homolog hFip1 identifiziert [Kaufmann *et al.*, 2004].

hFip1 ist wesentlich größer als sein Homolog aus der Bäckerhefe, da es im C-Terminus zwei Domänen enthält, welche im Hefeprotein nicht konserviert sind. hFip1 ist durch diese beiden Arginin- und Aspartat-reichen, bzw. Arginin-reichen Bereiche in der Lage an RNA zu binden, mit starker Präferenz für Poly(U)-Sequenzen [Kaufmann *et al.*, 2004]. Eine entsprechende *In-Vivo*-Assoziation von hFip1 mit U-reichen USEs von Prä-mRNAs wurde in einer Genom-weiten Analyse nachgewiesen [Martin *et al.*, 2012]. Über den konservierten N-Terminus interagiert hFip1, analog zu Fip1p, mit der Poly(A)-Polymerase (über den sauren Bereich des Proteins), CPSF30 (über den konservierten Bereich), sowie mit CPSF160 und CstF-77 (über den gesamten N-Terminus) [Helmling *et al.*, 2001; Kaufmann *et al.*, 2004]. Die Domänenstruktur von hFip1 ist in Abbildung 9.1 im Anhang schematisch dargestellt.

Rekombinantes hFip1 ist in der Lage die Poly(A)-Polymerase *in vitro* zu stimulieren. Diese Aktivität ist abhängig von U-reichen Elementen in der RNA [Kaufmann *et al.*, 2004]. Entgegengesetzt wurde für das Hefeprotein Fip1p gezeigt, dass es die Poly(A)-Polymerase *in vitro* inhibiert [Helmling *et al.*, 2001]. Aufgrund der recht spezifischen Bindung von U-reichen Sequenzen, wie sie auch in USEs von Prä-mRNAs vorkommen, dem engen Kontakt zu anderen CPSF-Untereinheiten, sowie dem Einfluss auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase, wird hFip1 als Untereinheit des CPSF-Komplexes in Säugetieren angesehen. hFip1 werden dabei essentielle Funktionen in der Erkennung der Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle sowie bei der Rekrutierung der Poly(A)-Polymerase zugesprochen [Kaufmann *et al.*, 2004].

1.3.2.6 WDR33

Während das Homolog von WDR33 aus der Bäckerhefe, Pfs2p, schon lange als essentieller Faktor der 3'-Prozessierung bekannt ist, wurde WDR33 erst wesentlich später als 3'-Prozessierungsfaktor identifiziert [Shi *et al.*, 2009]. Der N-Terminus des Proteins ist konserviert und beinhaltet sieben Wiederholungen des WD40-Motifs, welche zusammen einen β -Propeller bilden. Nicht konserviert sind die nachfolgende

Kollagen-ähnliche Domäne, sowie der C-Terminus des Proteins, welcher reich an Glycin, Prolin und Arginin ist [Ito *et al.*, 2001]. Die Domänenstruktur von WDR33 ist in Abbildung 9.1 im Anhang schematisch dargestellt.

Entsprechend dem Hefeprotein Pfs2p interagiert WDR33 mit mehreren Untereinheiten des CPSF-Komplexes, kann zusammen mit CPSF gereinigt werden und eluiert in einer Größenausschlusschromatographie zusammen mit dem CPSF-Komplex [Ohnacker *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2009; Ghazy *et al.*, 2012]. Da gezeigt werden konnte, dass WDR33 essentiell für Spaltung und Polyadenylierung *in vitro* ist, sowie aufgrund der beschriebenen Assoziationen mit CPSF-Untereinheiten, stellt WDR33 eine putative Untereinheit des CPSF-Komplexes dar [Shi *et al.*, 2009]. Die Tatsache, dass WDR33 nicht in zuvor gereinigtem CPSF gefunden wurde, lässt sich möglicherweise durch das Migrationsverhalten des Proteins in der denaturierenden Gelelektrophorese (SDS-PAGE) erklären: WDR33 läuft, trotz eines Molekulargewichts von nur 146 kDa, in Gelen bei etwa 160 kDa, exakt auf gleicher Höhe mit CPSF160.

1.3.2.7 Symplekin

Das Protein Symplekin wurde zunächst im Zusammenhang mit *tight junctions* beschrieben [Keon *et al.*, 1996], wurde später aber als Faktor der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs gefunden [Takagaki & Manley, 2000; Hofmann *et al.*, 2002]. Der N-Terminus von Symplekin besteht aus sieben Paaren antiparalleler α -Helices, welche zusammen die Form eines sogenannten HEAT *repeats* einnehmen und wahrscheinlich an Protein-Protein-Interaktionen beteiligt sind [Übersichtsartikel Andrade *et al.*, 2001; Kennedy *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2010]. Im mittleren Teil von Symplekin wurden Interaktionen mit CstF-77 und CPSF73 nachgewiesen [Takagaki & Manley, 2000; Hofmann *et al.*, 2002; Sullivan *et al.*, 2009]. Für den C-Terminus von Symplekin ist weder eine Domänenzuordnung noch eine Funktion bekannt. Eine schematische Übersicht über die Domänenstruktur von Symplekin ist in Abbildung 9.1 im Anhang gegeben.

Das homologe Protein von Symplekin aus der Bäckerhefe, Pta1p, ist als essentieller 3'-Prozessierungsfaktor bekannt [Preker *et al.*, 1997; Zhao *et al.*, 1999b]. Zwar besitzen Symplekin und Pta1p nur eine geringe Sequenzhomologie (begrenzt auf den N-terminalen Bereich von Symplekin), die beiden Proteine assoziieren aber mit einem sehr ähnlichen Set von 3'-Prozessierungsfaktoren [Takagaki & Manley, 2000; Übersichtsartikel Xiang *et al.*, 2014].

Aufgrund der beschriebenen Interaktionen mit Untereinheiten von CPSF und CstF sowie der beobachteten Assoziation mit der CTD der RNA-Polymerase II wird Symplekin die mögliche Funktion eines *Scaffold*-Proteins zugeschrieben, es stellt also möglicherweise eine Art Plattform für die Assemblierung der 3'-Prozessierungsmaschinerie dar [Takagaki & Manley, 2000; Übersichtsartikel Mandel *et al.*, 2008; Xiang *et al.*, 2010].

Neben der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs ist für Symplekin, in Zusammenarbeit mit CPSF73 und CPSF100, auch eine Beteiligung an der 3'-Prozessierung von Histon-Prä-mRNAs beschrieben [Kolev & Steitz, 2005; Sullivan *et al.*, 2009]. Aufgrund der starken Interaktion mit CPSF73 wird diskutiert, dass Symplekin möglicherweise einen regulativen Einfluss auf die Nukleaseaktivität von CPSF73 haben könnte [Übersichtsartikel Dominski, 2010].

Zuletzt wurde Symplekin in nahezu stöchiometrischen Mengen in affinitätsgereinigtem CPSF aus HEK-Zellen gefunden, während andere 3'-Prozessierungsfaktoren (Clp1) nicht mitgereinigt wurden [Shi *et al.*, 2009]. Symplekin könnte daher als mögliche Untereinheit des CPSF-Komplexes angesehen werden.

1.3.3 Poly(A)-Polymerase (PAPOL α)

Inzwischen sind in Säugetieren mindestens vier Poly(A)-Polymerasen mit nukleärer Lokalisation bekannt. Die kanonische Poly(A)-Polymerase PAPOL α ist dabei am besten untersucht und spielt wohl die größte Rolle in der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs. Das Protein bewerkstelligt die enzymatische Aktivität

während der Polyadenylierungsreaktion, wird aber auch für die Spaltung der Prä-mRNA benötigt [Wahle, 1991a; Übersichtsartikel Chan *et al.*, 2011]. Mehrere Röntgenkristallstrukturen zeigen, dass die Poly(A)-Polymerase hauptsächlich aus drei Domänen besteht, welche eine U-förmige Struktur einnehmen, so dass N- und C-Terminus miteinander interagieren. Im N-Terminus liegt das aktive Zentrum des Enzyms, hier erfolgen die essentielle Koordination zweier Metallionen (Mg^{2+} oder Mn^{2+}), sowie die Bindung des Substrates ATP. Die Bindung von ATP im aktiven Zentrum induziert eine deutliche Konformationsänderung, durch welche die Poly(A)-Polymerase in ihre aktive Form übergeht (*induced fit*). Die Substratspezifität der Poly(A)-Polymerase wird dadurch gewährleistet, dass nur ATP in der Lage ist, diese Konformationsänderung hervorzurufen [Martin *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2004; Balbo & Bohm, 2007]. Die mittlere Domäne der Poly(A)-Polymerase vermittelt die unspezifische Bindung der Substrat-RNA, wobei nur die letzten drei Nukleotide des 3'-Endes gebunden werden [Balbo & Bohm, 2007]. Der C-Terminus ist in Säugetieren sehr variabel gestaltet: Durch alternatives Spleißen und alternative Polyadenylierung werden unterschiedliche Isoformen der Poly(A)-Polymerase gebildet, welche sich im C-Terminus unterscheiden [Zhao & Manley, 1996]. Weiterhin unterliegt der C-terminale Bereich einer Vielzahl an möglichen Modifikationen, welche auch die Aktivität der Poly(A)-Polymerase beeinflussen können [Colgan *et al.*, 1996; Shimazu *et al.*, 2007; Vethantham *et al.*, 2008; Di Giammartino *et al.*, 2013]. Eine schematische Übersicht der Domänenstruktur der kanonischen Poly(A)-Polymerase aus Säugetieren ist in Abbildung 9.1 im Anhang dargestellt.

Die Poly(A)-Polymerase zeigt Interaktionen mit Untereinheiten mehrerer 3'-Prozessierungsfaktoren, darunter CPSF-160, hFip1, PABPN1 und CF I-25 [Martin *et al.*, 2002; Kerwitz *et al.*, 2003; Dettwiler *et al.*, 2004; Kaufmann *et al.*, 2004].

Die Poly(A)-Polymerase per se besitzt lediglich die beschriebene Substratspezifität für ATP und polyadenyliert freie 3'-OH-Gruppen jeder angebotenen RNA. Weiterhin agiert die Poly(A)-Polymerase alleine distributiv, d.h. das Enzym verlängert Substrat-RNAs nur um eines oder wenige Nukleotide, bevor es wieder von der Substrat-RNA dissoziiert [Wahle, 1991a]. Durch den CPSF-Komplex wird die Poly(A)-Polymerase zu den zu prozessierenden Prä-mRNAs rekrutiert. Während der Polyadenylierung wird die Poly(A)-Polymerase durch den gemeinsamen Einfluss von CPSF und PABPN1 stimuliert. Dadurch erhält die Poly(A)-Polymerase eine prozessive Aktivität, d.h. polyadenyliert einzelne Substrat-RNAs um viele Adenylatreste, ohne zwischenzeitlich zu dissoziieren [Wahle, 1991b; Bienroth *et al.*, 1993]. Ebenfalls durch den gemeinsamen Einfluss von CPSF und PABPN1 auf die Poly(A)-Polymerase wird die Länge der gebildeten Poly(A)-Schwänze reguliert [Wahle, 1995; Kühn *et al.*, 2009; Kühn *et al.*, 2017].

1.3.4 Nukleäres Poly(A)-bindendes Protein 1 (PABPN1)

PABPN1 ist einer der wenigen bekannten 3'-Prozessierungsfaktoren aus Säugetieren, welcher kein funktionales homologes Protein in der Bäckerhefe besitzt [Winstall *et al.*, 2000; Übersichtsartikel Kühn & Wahle, 2004]. Die Domänenstruktur von PABPN1 aus Säugetieren ist in Abbildung 9.1 im Anhang schematisch dargestellt. Der N-Terminus des Proteins ist reich an Glutamat und entsprechend sauer. Nachfolgend besitzt PABPN1 eine sogenannte *Coiled-Coil*-Domäne, welche essentiell für die Stimulation der Poly(A)-Polymerase ist [Kerwitz *et al.*, 2003]. Der zentrale Bereich des Proteins wird durch eine RRM-Domäne und der C-Terminus durch einen Arginin-reichen und somit basischen Bereich gebildet. Beide letztgenannten Domänen sind essentiell für die Bindung an den Poly(A)-Schwanz und vermutlich an der Dimerisierung des Proteins beteiligt [Kühn *et al.*, 2003; Ge *et al.*, 2008].

Während der Polyadenylierung bindet PABPN1 an den wachsenden Poly(A)-Schwanz und stimuliert, zusammen mit CPSF, die Poly(A)-Polymerase. Zusätzlich dazu spielt das Protein eine entscheidende Rolle in der Längenkontrolle der Polyadenylierung [Wahle, 1991b; Wahle, 1995; Kühn *et al.*, 2009; Kühn *et al.*, 2017]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass PABPN1 Einfluss auf die Auswahl von Prozessierungsstellen in der alternativen Polyadenylierung nimmt [Jenal *et al.*, 2012].

1.3.5 *Cleavage stimulatory factor (CstF)*

Der CstF-Komplex besteht aus jeweils zwei Kopien der drei Untereinheiten CstF-50, CstF-64 und CstF-77 [Takagaki *et al.*, 1990; Gilmartin & Nevins, 1991]. Eine schematische Übersicht der Domänenstrukturen der drei CstF-Untereinheiten ist in Abbildung 9.1 im Anhang gegeben.

Der N-Terminus von CstF-77 dimerisiert und bewerkstelligt so, zusammen mit dem N-Terminus von CstF-50, die Bildung eines CstF-Komplexes aus sechs Untereinheiten. Weiterhin interagiert CstF-77 über den N-Terminus mit der C-terminal gelegenen WD40-Domäne aus CstF-50. Die Bindestelle für CstF-64 konnte auf den C-terminalen Bereich von CstF-77 kartiert werden. Durch diese Interaktionen stellt CstF-77 die zentrale Untereinheit des Komplexes dar, die anderen beiden Untereinheiten interagieren nicht direkt miteinander [Takagaki & Manley, 2000; Bai *et al.*, 2007].

CstF-64 besitzt im N-Terminus ein RNA-Erkennungsmotif und ist damit für die Bindung von CstF an U- oder GU-reiche DSEs in Prä-mRNAs verantwortlich [Takagaki *et al.*, 1992; MacDonald *et al.*, 1994]. Die nachfolgende Scharnierdomäne (*hinge region*) interagiert entweder mit CstF-77 oder Symplekin [Takagaki & Manley, 2000; Ruepp *et al.*, 2011]. Der C-Terminus von CstF-64 ist bislang nicht gut charakterisiert.

Im Gegensatz zu den anderen beiden CstF-Untereinheiten besitzt CstF-50 kein bekanntes Homolog in der Bäckerhefe. Wie schon beschrieben, bewerkstelligt der N-Terminus des Proteins die Dimerisierung von CstF-50. Der C-Terminus besteht aus sieben WD-40 Wiederholungen, welche unterschiedliche Protein-Protein-Wechselwirkungen ermöglichen, so zum Beispiel die Interaktion mit CstF-77 [Takagaki & Manley, 2000].

CstF wurde, entsprechend der Benennung des Komplexes, ursprünglich nur als stimulierender Faktor der 3'-Prozessierung beschrieben. Später konnte aber gezeigt werden, dass der Proteinkomplex doch essentiell für die Spaltungsreaktion ist. Die Aktivität von CstF in der Spaltungsreaktion besteht in der kooperativen Bindung von Prä-mRNAs mit CPSF und somit in der Definition der Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle [Takagaki *et al.*, 1989; Wilusz *et al.*, 1990; Gilmartin & Nevins, 1991].

Neben Kontakten zu CPSF interagiert der CstF-Komplex auch mit der CTD der RNA-Polymerase II und trägt damit zur kotranskriptionalen Natur der 3'-Prozessierung bei [McCracken *et al.*, 1997a].

Für CstF-64 existiert in Säugetieren ein paraloges Protein namens CstF-64 τ (auf einem separaten Genlokus kodiert). Nach derzeitigem Kenntnisstand werden beide Versionen des Proteins in CstF-Komplexe integriert und agieren maßgeblich redundant [Shi *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 2013].

1.3.6 *Cleavage factor I (CF I)*

Der CF I-Komplex ist exklusiv in höheren Eukaryoten vorhanden und besitzt keine homologen Proteine in der Bäckerhefe. In der Literatur wird diskutiert, dass CF I-68 das funktionale Homolog zu Hrp1p aus der Bäckerhefe darstellen könnte [Übersichtsartikel Zhao *et al.*, 1999a]. Wie auch CPSF und CstF, assoziiert CF I bereits früh während der Transkription mit dem 3'-Prozessierungskomplex. Da CF I ebenfalls mit Faktoren der Spleißreaktion interagiert, stellt dieser Komplex eine weitere Verknüpfung der 3'-Prozessierung mit anderen Prozessen der mRNA-Reifung dar [Dettwiler *et al.*, 2004; Venkataraman *et al.*, 2005].

CF I ist ein Heterotetramer aus zwei Kopien der Untereinheit CF I-25, welche ein Homodimer bilden, sowie der Kombination von zwei Kopien der Untereinheiten CF I-59, -68 oder -72 [Rüegsegger *et al.*, 1996, 1998]. Während CF I-72 eine Spleißvariante der 68 kDa-Untereinheit darstellt, wird CF I-59 von einem separaten Gen kodiert, besitzt aber große Sequenzhomologie zu CF I-68. Die großen Untereinheiten von CF I verhalten sich in ihren Funktionen vermutlich redundant [Rüegsegger *et al.*, 1996, 1998].

CF I-25 besteht größtenteils aus einer Nudix-Domäne. Nudix-Proteine agieren meist als Pyrophosphat-hydrolasen, das aktive Zentrum der Hydrolasen ist in CF I-25 allerdings nicht vollständig konserviert, und es konnte auch keine Hydrolaseaktivität für diese CF I-Untereinheit nachgewiesen werden [Dettwiler *et al.*, 2004; Übersichtsartikel McLennan, 2005; Coseno *et al.*, 2008]. Stattdessen dient die Nudix-Domäne, zusammen mit dem N-Terminus des Proteins, zur Bindung an UGUA-Sequenzelemente stromaufwärts der Spaltungs- und Polyadenylierungsstelle in Prä-mRNAs. Die Bindung von CF I an diese Sequenzelemente stabilisiert die Bindung des CPSF-Komplexes an das Polyadenylierungssignal [Rüegsegger *et al.*, 1996]. Das UGUA-Sequenzmotiv wurde in SELEX-Experimenten als Bindestelle für CF I gefunden, eine spätere Röntgenkristallstruktur der 25 kDa-Untereinheit mit RNA bestätigte die Bindung des Proteins an entsprechende Sequenzen [Brown & Gilmartin, 2003; Yang *et al.*, 2010]. Neben der RNA-Bindung interagiert CF I-25 über die Nudix-Domäne auch mit der 68 kDa-Untereinheit sowie der Poly(A)-Polymerase und PABPN1 [Dettwiler *et al.*, 2004].

CF I-68 besitzt ein N-terminales RNA-Erkennungsmotiv (RRM), einen zentral gelegenen Prolin-reichen Bereich sowie einen Arginin- und Serin-reichen C-Terminus [Rüegsegger *et al.*, 1998]. Die RNA-Bindungsaktivität der RRM-Domäne ist selbst recht gering, verhält sich aber kooperativ mit der RNA-Bindung von CF I-25 [Dettwiler *et al.*, 2004]. Eine schematische Übersicht über die Domänenstrukturen von CF I-25 und -68 ist in Abbildung 9.1 im Anhang dargestellt.

Es konnte gezeigt werden, dass Unterschiede in der CF I-Expression Einfluss auf die Auswahl von Spaltungs- und Polyadenylierungsstellen haben können, CF I gilt daher auch als Regulator der alternativen Polyadenylierung [Kubo *et al.*, 2006; Martin *et al.*, 2012].

1.3.7 *Cleavage factor II (CF II)*

Unter den bekannten Faktoren der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs ist CF II der am dürftigsten charakterisierte Komplex. Man geht davon aus, dass CF II in Säugetieren aus den zwei Untereinheiten Clp1 und Pcf11 besteht, welche klare homologe Proteine in der Bäckerhefe besitzen [de Vries *et al.*, 2000].

Im Vergleich zu den anderen Komponenten der 3'-Prozessierungsmaschinerie, scheint der CF II-Komplex weniger fest mit dem 3'-Prozessierungskomplex assoziiert zu sein: In gereinigten 3'-Prozessierungskomplexen lagen die Untereinheiten von CF II stöchiometrisch unterrepräsentiert vor (Pcf11) oder wurden überhaupt nicht detektiert (Clp1) [Shi *et al.*, 2009].

Pcf11 besteht aus einer N-terminalen Domäne, welche mit der CTD der RNA-Polymerase II interagiert (CID, *CTD interacting domain*), vorrangig nach Phosphorylierung der CTD [Sadowski *et al.*, 2003; Meinhart & Cramer, 2004]. Der C-Terminus des Proteins ist weniger gut definiert. Im Protein der Bäckerhefe, Pcf11p, liegt hier zunächst ein Bereich, welcher die Assoziation mit den Proteinen Rna14p und Rna15p (Homologe von CstF-64 und -70) bewerkstelligt. Dieser Bereich ist in Pcf11 aus Säugetieren recht gut konserviert, entsprechende Interaktionen mit Untereinheiten des CstF-Komplexes wurden bislang aber nicht gezeigt. Weiter C-terminal beinhaltet Pcf11 einen Kollagen-ähnlichen Bereich ohne bekannte Funktion sowie einen Bereich zur Interaktion mit Clp1, welcher von konservierten Zinkfingerdomänen umrandet wird. Eine schematische Übersicht über die Domänenstruktur von Pcf11 (und Clp1) ist in Abbildung 9.1 im Anhang dargestellt.

Neben der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs scheint Pcf11 auch an der Transkriptionstermination, genauer der Demontage des Transkriptionselongationskomplexes, beteiligt zu sein. Dabei soll insbesondere eine RNA-Bindungsaktivität, ausgehend von der CID in Pcf11, eine essentielle Rolle spielen [Zhang *et al.*, 2005; Hollingworth *et al.*, 2006].

In der eigenen Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass Pcf11 maßgeblich über die C-terminal gelegenen Zinkfinger an RNA binden kann, mit Präferenz für G-reiche Sequenzen (nicht-veröffentlichte Daten von Peter Schäfer).

Clp1 besitzt ein konserviertes sogenanntes Walker A-Motiv, welches in der Regel die Bindung (und Hydrolyse) von ATP oder GTP ermöglicht. Entsprechend wurde für das Säugetierprotein eine 5'-Polynukleotidkinaseaktivität nachgewiesen, welche scheinbar am Spleißen von tRNA-Vorläufern beteiligt ist [Weitzer & Martinez, 2007; Ramirez *et al.*, 2008]. Das homologe Protein aus der Bäckerhefe beinhaltet zwar auch das Walker A-Motiv und ist in der Lage ATP zu binden, zeigt aber keine entsprechende 5'-Polynukleotidkinaseaktivität [Noble *et al.*, 2007]. Weiterhin vermittelt Clp1 Interaktionen zwischen dem CF II-Komplex und CF I sowie CPSF [de Vries *et al.*, 2000].

1.4 Weitere und putative Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren

Im Laufe der Erforschung der 3'-Prozessierungsreaktionen in Säugetieren und der beteiligten Faktoren wurden weitere Proteine als wahrscheinliche Komponenten der 3'-Prozessierungsmaschinerie identifiziert. Alle diese Proteine haben gemeinsam, dass die homologen Proteine in der Bäckerhefe bekannte Bestandteile der 3'-Prozessierung sind. Einige dieser neuen Faktoren werden zudem als essentiell für die 3'-Prozessierung in Säugetieren beschrieben.

Die weiteren und putativen Proteinfaktoren, welche im Rahmen dieser Arbeit behandelt wurden, werden in den nachfolgenden Abschnitten kurz einzeln vorgestellt.

1.4.1 CTD-spezifische Phosphatase Ssu72

Ssu72 ist eine Proteinphosphatase, welche maßgeblich für die Dephosphorylierung von Serin5 und Serin7 der C-terminalen Domäne der RNA-Polymerase II verantwortlich ist. In der Bäckerhefe ist Ssu72p schon länger als Faktor der 3'-Prozessierung und Untereinheit des CPF-Komplexes bekannt. Hefe-Ssu72p ist notwendig für die Spaltungsreaktion, die Phosphataseaktivität des Enzyms spielt in diesem Zusammenhang aber scheinbar keine essentielle Rolle [Dichtl *et al.*, 2002b; Krishnamurthy *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2012]. Das humane Homolog wurde zunächst in Assoziation mit dem Tumorsuppressorprotein Retinoblastoma (Rb) gefunden [St-Pierre *et al.*, 2005]. Starke Interaktionen des Proteins mit dem 3'-Prozessierungsfaktor Symplekin sowie die deutliche Homologie zum Hefe-Ssu72p deuten aber darauf hin, dass auch das humane Ssu72 ein Bestandteil der 3'-Prozessierungsmaschinerie sein könnte [Ghazy *et al.*, 2009; Xiang *et al.*, 2010; Luo *et al.*, 2013]. Unterstützt wird diese Vermutung von Wani und Kollegen, welche nachweisen konnten, dass die Deletion von Ssu72 in Hühnerzellen zu Defekten in der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs führt (nur gezeigt für die GAPDH mRNA) [Wani *et al.*, 2014]. In einer Proteom-weiten Suche nach Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren ist Ssu72 nicht gefunden worden [Shi *et al.*, 2009].

Die von Ssu72 vermittelte Dephosphorylierung von Serin5 der CTD wird beeinflusst durch die Konformation des benachbarten Prolin-6 (*cis*-Prolin-6 verstärkt die Ssu72-Aktivität). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Threonin-4 einen negativen Einfluss auf die Aktivität von Ssu72 hat. Eine Einflussnahme dieser CTD-Modifikationen auf die 3'-Prozessierung wurde bislang aber nicht nachgewiesen. Ebenso ist nicht bekannt, ob die Phosphataseaktivität von Ssu72 in Säugetieren für die 3'-Prozessierung notwendig ist [Zhang *et al.*, 2012; Luo *et al.*, 2013].

1.4.2 Retinoblastoma binding protein 6 (Rbbp6)

Rbbp6 wurde in Säugetieren zuerst in Assoziation mit den Tumorsuppressorproteinen Retinoblastoma (Rb) und p53 gefunden, mit entsprechenden Funktionen in Apoptose und Regulation des Zellzyklus [Sakai *et al.*, 1995; Simons *et al.*, 1997]. Pugh und Kollegen untersuchten die Domänenzusammensetzung von Rbbp6 und entdeckten die Homologie zum 3'-Prozessierungsfaktor und CPF-Untereinheit Mpe1p aus der Bäckerhefe. Die N-terminalen drei Domänen des Proteins sind zwischen Hefe und Säugetieren konserviert: Eine Domäne mit Ubiquitin-ähnlicher Faltung (DWNN, *domain with no name*), ein *zinc knuckle* und eine Domäne mit Ubiquitin-E3-Ligasefunktion (RING, *really interesting new gene*) [Pugh *et al.*, 2006]. Der C-Terminus von Rbbp6 beinhaltet weiterhin eine Prolin-reiche und eine Serin- und Arginin-reiche Domäne (RS-Domäne) sowie Bereiche zur Interaktion mit Rb und p53, welche in Mpe1p nicht vorhanden sind. Eine schematische Übersicht über die Domänenstruktur von Rbbp6 ist in Abbildung 9.2 im Anhang gegeben. Es wurde gezeigt, dass die drei konservierten Domänen des N-Terminus sowohl in der Bäckerhefe als auch in Säugetieren notwendig und hinreichend für die Spaltungsreaktion der 3'-Prozessierung sind [Lee & Moore, 2014; Di Giammartino *et al.*, 2014].

Weiterhin interagiert Rbbp6 über die N-terminale DWNN-Domäne mit anderen Faktoren der 3'-Prozessierung, besonders stark ist dabei der Kontakt zu CstF-64 [Di Giammartino *et al.*, 2014].

In einer Proteom-weiten Suche nach Faktoren der 3'-Prozessierung wurde Rbbp6 schließlich auch in gereinigten 3'-Prozessierungskomplexen gefunden [Shi *et al.*, 2009].

Neben Rbbp6 in voller Länge wurde in Säugetieren auch eine wesentlich kürzere Isoform des Proteins identifiziert, welche lediglich die DWNN-Domäne umfasst (Abbildung 9.2). Dieses Protein kompetiert mit Rbbp6 in voller Länge um die Bindung an CstF-64 und wirkt inhibierend auf die Spaltungsreaktion *in vitro* [Pugh *et al.*, 2006; Di Giammartino *et al.*, 2014].

Schließlich scheint Rbbp6 auch die Auswahl von schwachen (proximalen) Spaltungs- und Polyadenylierungsstellen in der alternativen Polyadenylierung zu begünstigen [Di Giammartino *et al.*, 2014].

1.4.3 WD-repeat containing protein 82 (WDR82)

WDR82 stellt aufgrund der Homologie zu Swd2p aus der Bäckerhefe einen möglichen Bestandteil der 3'-Prozessierungsmaschinerie in Säugetieren dar. Gemeinsam haben die beiden homologen Proteine Interaktionen mit der CTD der RNA-Polymerase II, Histon-Methyltransferasekomplexen und dem PP1-Komplex [Cheng *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2010]. Swd2p ist eine Untereinheit des CPF-Komplexes in der Bäckerhefe, aber nicht essentiell für Spaltung oder Polyadenylierung [Dichtl *et al.*, 2002b; Cheng *et al.*, 2004].

Wie der Name vermuten lässt, besteht WDR82 maßgeblich aus sieben WD-40 Wiederholungen und keinen weiteren annotierten Domänen [Dichtl *et al.*, 2004]. Diese Strukturierung passt gut zu den umfangreichen Protein-Protein-Interaktionen, welche WDR82 eingeht.

In einer Proteom-weiten Suche nach Faktoren der 3'-Prozessierung in Säugetieren wurde WDR82 nicht gefunden [Shi *et al.*, 2009].

1.4.4 Isoform α der katalytischen Untereinheit von Proteinphosphatase 1 (PP1 α)

PP1 α wurde zusammen mit PP1 β sowie der regulatorischen PP1-Untereinheit PNUTS in einer Proteom-weiten Suche nach 3'-Prozessierungsfaktoren in gereinigten 3'-Prozessierungskomplexen identifiziert. Weiterhin wurde in der gleichen Arbeit gezeigt, dass die Depletion von PP1 keinen Einfluss auf die Spaltungsreaktion hat, die Effizienz der Polyadenylierung allerdings verringert wird [Shi *et al.*, 2009]. Der Effekt der Depletion konnte dabei durch Zugabe rekombinanter PP1 kompensiert werden. Entsprechende Folgen wurden für die Depletion des homologen Proteins aus der Bäckerhefe, Glc7p, gezeigt [He & Moore, 2005]. In der Bäckerhefe dephosphoryliert Glc7p spezifisch Pta1p, das Homolog von Symplekin [He & Moore, 2005]. Ob auch Symplekin von PP1 dephosphoryliert wird, ist bislang nicht untersucht.

1.5 Nicht-publizierte Vorarbeiten zur Rekonstitution der 3'-Prozessierung

Neben den publizierten Arbeiten zur Identifikation von Faktoren der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs in Säugetieren, wie beispielsweise [Kaufmann *et al.*, 2004; Shi *et al.*, 2009; Di Giammartino *et al.*, 2014], wurden auch in der eigenen Arbeitsgruppe Versuche unternommen, bislang unbekannte 3'-Prozessierungsfaktoren zu finden.

Anne Knoth hat Versuche unternommen, die Reaktionsbedingungen für die Spaltung zu optimieren. Weiterhin hat sie versucht, affinitätsgereinigte Proteinkomplexe massenspektrometrisch zu analysieren, um so gegebenenfalls darin enthaltene, bislang unbekannte Proteinfaktoren zu identifizieren. Die Reinigung der entsprechenden Proteinkomplexe erfolgte zum Einen aus HeLa-Kernextrakt über immobilisierte RNA-Substrate, zum Anderen via Affinitätsreinigung aus stabilen HEK293-Zelllinien nach Expression einzelner bekannter 3'-Prozessierungsfaktoren mit entsprechenden Fusionspeptiden zur Affinitätsreinigung. Weiterhin wurden die gereinigten Proteinkomplexe für Rekonstitutionsversuche der Spaltungsreaktion genutzt, allerdings ohne Erfolg [Dissertation Knoth, 2008].

Andrea Ringel hat sich in ihrer Doktorarbeit verstärkt mit der Polyadenylierungsreaktion beschäftigt und dafür die Arbeiten mit den stabilen HEK293-Zelllinien fortgeführt und versucht, in der Polyadenylierung aktiven CPSF-Komplex zu reinigen. Dabei hat sie zwar erfolgreich Fraktionen generiert, welche CPSF-Aktivität in der Polyadenylierung zeigten, die angeschlossene massenspektrometrische Analyse dieser Fraktionen war allerdings wenig aufschlussreich. Die Proteinzusammensetzung war auch nach der durchgeführten Affinitätsreinigung noch sehr komplex und es konnten keine putativen, neuen Untereinheiten von CPSF identifiziert werden. Die inzwischen bekannten, putativen CPSF-Untereinheiten hFip1, WDR33 und Symplekin waren in den entsprechenden Fraktionen aber enthalten.

Neben diesen Arbeiten wurden Vorversuche zur Rekonstitution der 3'-Prozessierungsreaktionen aus rekombinanten Proteinen geleistet. Klonierungen und Expressionsversuche zum CPSF-Komplex wurden sowohl im Rahmen meiner eigenen Bachelor- und Masterarbeit durchgeführt [Bachelorarbeit Schönemann, 2010; Masterarbeit Schönemann, 2012], als auch von Ludwig Sinn [Bachelorarbeit Sinn, 2011] sowie durch Uwe Kühn. Klonierungen und Expressionsversuche zu den Proteinkomplexen CstF und CFI wurden Mathias Lorbeer begonnen und später durch Peter Schäfer, im Rahmen seiner Doktorarbeit, fortgeführt [Diplomarbeit Lorbeer, 2012]. Ebenso beschäftigte sich Peter Schäfer mit der Klonierung und Expression des CF II-Komplexes. Bestandteil all dieser Arbeiten waren Versuche zur Rekonstitution der Spaltungs- und / oder Polyadenylierungsreaktion.

1.6 Zielstellung dieser Arbeit

Die 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs in Säugetieren wird bereits seit rund 30 Jahren untersucht, dennoch sind die genauen Reaktionsmechanismen, die distinkten Aufgaben der beteiligten Proteine, sowie das strukturelle Zusammenspiel der beteiligten Proteinkomplexe, bis heute nur unzureichend bekannt. Auch ist es bislang nicht gelungen, die beiden Teilreaktionen der 3'-Prozessierung ausschließlich durch rekombinante Proteine zu rekonstituieren. Die Möglichkeit, Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion *in vitro* ablaufen zu lassen und dafür lediglich gut charakterisierbare, rekombinant hergestellte Proteine zu nutzen, würde aber detaillierte mechanistische und strukturelle Untersuchungen an Spaltungs- bzw. Polyadenylierungskomplex deutlich vereinfachen. Besonders für Analysen der an der 3'-Prozessierung beteiligten Regulationsmechanismen, etwa bei der Auswahl von Prozessierungsstellen in der alternativen Polyadenylierung, wäre ein funktionales *In-Vitro*-System sehr wünschenswert.

Aus diesem Grund sollten in dieser Arbeit Versuche unternommen werden, die bekannten 3'-Prozessierungsfaktoren rekombinant darzustellen und mit Hilfe dieser Faktoren schließlich Spaltungs- und Polyadenylierungsreaktion *in vitro* zu rekonstituieren.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird zunächst die Rekonstitution des zweiten Reaktionsschritts der 3'-Prozessierung, also der Polyadenylierung, behandelt. Dieses Vorgehen wurde gewählt, da an der Polyadenylierung, im Vergleich zur Spaltungsreaktion, deutlich weniger Proteinkomponenten beteiligt sind und eine Rekonstitution der Polyadenylierung somit einfacher zu realisieren erschien. Zentraler Bestandteil der Polyadenylierungsreaktion ist der CPSF-Komplex, es wird daher maßgeblich die Darstellung eines in der Polyadenylierung aktiven CPSF-Komplexes beschrieben. Ziel dabei war es, die minimale Zusammensetzung an CPSF-Untereinheiten zu definieren, die für eine Rekonstitution der Polyadenylierung notwendig ist. In diesem Zusammenhang werden ferner Versuche beschrieben, die bekannten Funktionen von CPSF in der Polyadenylierung den einzelnen Untereinheiten des Komplexes zuzuordnen.

Die Rekonstitution der Polyadenylierungsreaktion wurde bereits veröffentlicht [Schönemann *et al.*, 2014], die publizierten Daten werden in dieser Arbeit durch weitere Versuche ergänzt.

Der zweite Teil der Arbeit behandelt alsdann Versuche zur Rekonstitution der deutlich komplexeren Spaltungsreaktion. Hierzu werden zunächst die Proteinpräparationen der einzelnen bekannten und putativen 3'-Prozessierungsfaktoren vorgestellt, welche später für Rekonstitutionsversuche genutzt wurden. Ebenso wird hier die Herstellung eines CPSF-Komplexes für die Spaltungsrekonstitution beschrieben.

Da die rekombinant hergestellten Proteinfaktoren nicht ausreichten, um die Spaltungsreaktion der 3'-Prozessierung *in vitro* zu rekonstituieren, wurden im Anschluss Versuche unternommen, bislang unbekannte 3'-Prozessierungsfaktoren, bzw. bekannte Faktoren in aktiver Form, mittels klassischer, biochemischer Fraktionierungsmethoden aus HeLa-Kernextrakt zu isolieren. Dieser Teil der Arbeit konnte nicht abgeschlossen werden und stellt daher einen noch fortlaufenden und hoffentlich einmal zielführenden Arbeitsablauf dar.

2 Ergebnisse

2.1 Rekonstitution der Polyadenylierung

Da der CPSF-Komplex die Kernkomponente der Polyadenylierung darstellt, werden im Folgenden maßgeblich Versuche zu Darstellung und Charakterisierung eines in der Polyadenylierung aktiven CPSF-Komplexes gezeigt. Die beiden anderen an der Polyadenylierung beteiligten Proteine, PABPN1 und Poly(A)-Polymerase, lagen schon vor Beginn dieser Arbeit in rekombinanter Form vor und sind bezüglich ihrer Rollen in der Polyadenylierungsreaktion bereits gut charakterisiert [Wahle, 1991b; Wahle, 1995; Kerwitz *et al.*, 2003; Kühn *et al.*, 2003; Kühn *et al.*, 2009; Kühn *et al.*, 2017].

Für die Herstellung rekombinanter CPSF-Komplexe, bzw. putativer Untereinheiten, wurde die Baculovirus-vermittelte Expression in Insektenzellen ausgewählt. Wir haben dabei MultiBac als Vektorsystem ausgewählt, da dieses speziell für die rekombinante Expression von großen Proteinkomplexen in Insektenzellen entwickelt wurde [Berger *et al.*, 2004, Fitzgerald *et al.*, 2006, Bieniossek *et al.*, 2008]. Die Darstellung rekombinanter Proteine aus Säugetieren in Insektenzellen ermöglicht gute Ausbeuten und durch Bereitstellung säugetierähnlicher posttranslationaler Modifikationen und Chaperonaktivität in der Regel eine gute Löslichkeit der exprimierten Proteine. Es wurden entweder einzelne Proteine mit Fusionspeptiden zur Affinitätsreinigung (*tags*) in Insektenzellen hergestellt oder mehrere Proteine koexprimiert, wobei immer mindestens eine Untereinheit mit einem Affinitätsreinigungs-Fusionspeptid versehen wurde. Die Reinigung der einzelnen Proteine oder Proteinkomplexe erfolgte anschließend hauptsächlich durch Affinitätschromatographien unter Nutzung der entsprechenden Fusionspeptide.

Entsprechend den Funktionen von CPSF in der Polyadenylierung wurden die rekombinanten Proteine und Proteinkomplexe nicht nur hinsichtlich Löslichkeit, Aggregationsverhalten und Interaktionen zwischen den einzelnen Proteinen charakterisiert, sondern es wurden auch die Bindung an RNA sowie das Vermögen zur Stimulation der Poly(A)-Polymerase in *In-Vitro*-Polyadenylierungsreaktionen untersucht. Die entsprechenden Assays sind in Abschnitt 5.15 des Material- und Methodenteils eingehend beschrieben.

2.1.1 Analyse von CPSF-Subkomplexen

In vorhergehenden Versuchen wurde mehrfach beobachtet, dass die klassischen CPSF-Untereinheiten CPSF30, CPSF73, CPSF100 und CPSF160 eine nur sehr geringe Löslichkeit aufweisen und daher nicht in ausreichenden Mengen als einzelne Proteine rekombinant dargestellt werden können. Die Löslichkeit mancher Proteine ließ sich aber durch die Koexpression mit weiteren Untereinheiten deutlich verbessern. Daher wurden zunächst Paare aus klassischen CPSF-Untereinheiten und putativen Polyadenylierungsfaktoren exprimiert, gereinigt und untersucht. Die gewählten Kombinationen aus koexprimierten Proteinen sind dabei entweder an bekannte Interaktionen zwischen den CPSF-Untereinheiten angelehnt (im Fall von CPSF73 und CPSF100), oder ergaben sich schlichtweg aus der angewandten Klonierungsstrategie zur Darstellung von Baculoviren (in den Fällen von CPSF30 und CPSF160 sowie hFip1 und WDR33).

2.1.1.1 CPSF30-CPSF160-Subkomplex

Für die nachfolgend beispielhaft präsentierte Präparation des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes wurden die Sf21-Zellen einer V₁-Generation (127 ml, etwa $1,6 \times 10^8$ Zellen) des Virus pBac-YFP^{loxP}-F160-30^{Tn7} geerntet und aufgeschlossen. Die größere Untereinheit (CPSF160) ist hierbei mit einem N-terminalen Flag-*tag* versehen. Das so gewonnene Zelllysate wurde anschließend einer Flag-Affinitätschromatographie unterzogen, um die rekombinanten Proteine zu isolieren. Die Haupteluatfraktion „E2“

der Flag-Reinigung ist in Abbildung 2.1.A zu sehen, die Koelution der kleineren CPSF-Untereinheit CPSF30 mit Flag-CPSF160 ist deutlich erkennbar. Neben diesen beiden Hauptbestandteilen der Präparation sind zwei kontaminierende Proteinbanden schwächerer Intensität bei respektive etwa 115 und 70 kDa sichtbar. Insgesamt wurden in dieser Reinigung etwa 60 µg CPSF30-CPSF160-Subkomplex gewonnen (ca. 320 pmol bei einem 1:1-Komplex, densitometrische Bestimmung der CPSF160-Bande aus Coomassie-gefärbtem Gel).

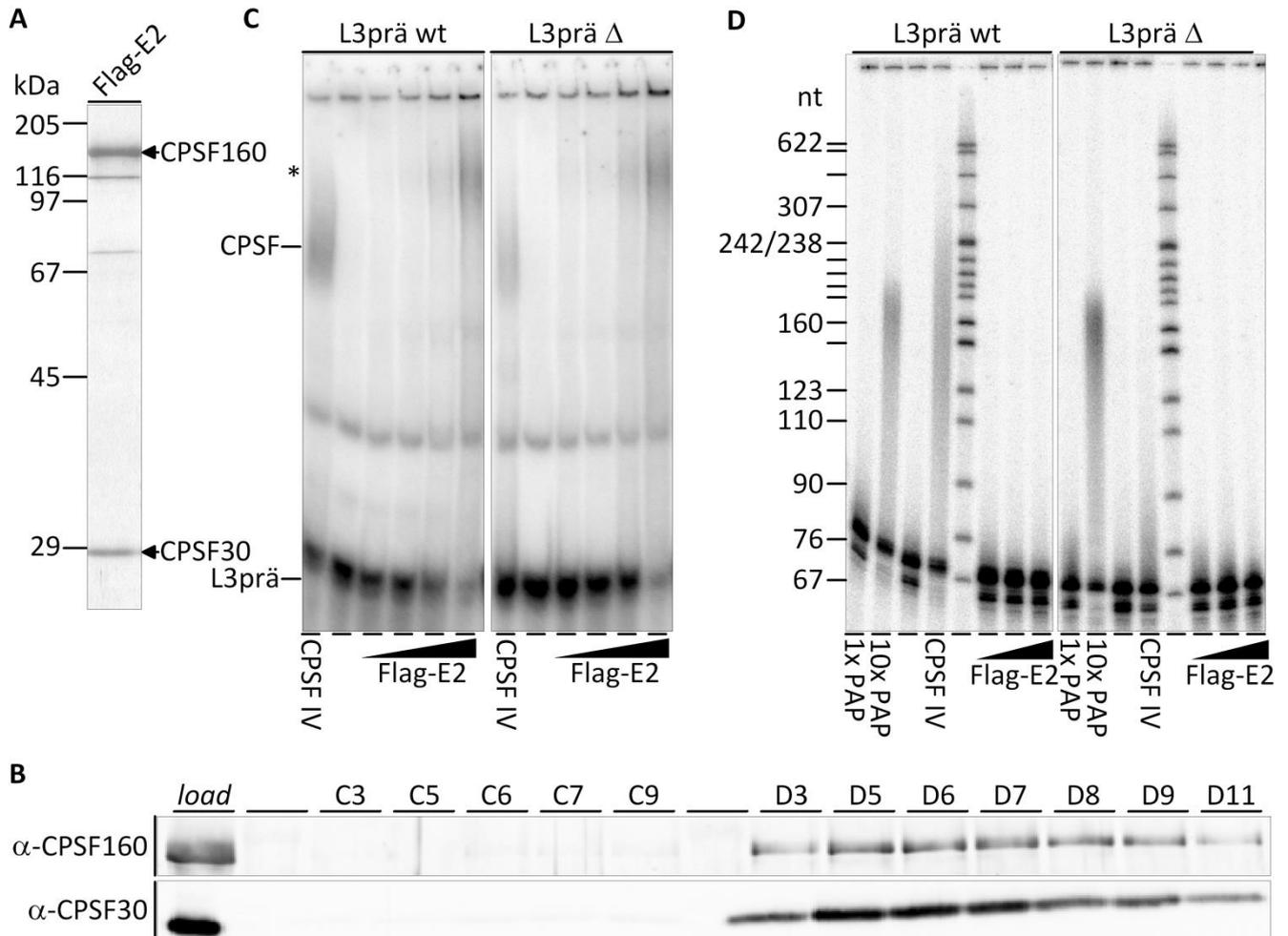


Abbildung 2.1: Reinigung und Charakterisierung des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes.

A: Gelspur aus einem silbergefärbten 11% SDS-PA-Gel zur Analyse der Haupteluatfraktion „E2“ nach Flag-Affinitätsreinigung. Die Markerbanden und die entsprechenden Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben. Die Proteinbanden für CPSF30 und CPSF160 sind rechts der Gelspur markiert. **B:** Western-Blot-Analyse von Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie (Superdex 200). Die untersuchten Fraktionen sind oben benannt, die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind auf der linken Seite angegeben. Die Fraktion „C5“ entspricht dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot. **C:** Autoradiogramm eines *electrophoretic mobility shift assays* zur Analyse der Bindung der Flag-Eluatfraktion „E2“ an L3prä wt und Δ RNA. Als Positivkontrolle dienen Reaktionen mit aus Kalbsthymus präpariertem CPSF (CPSF IV). Der CPSF30-CPSF160-Subkomplex wurde zu 2,5, 5, 12,5, bzw. 25 nM in den Bindungsreaktionen eingesetzt. Auf der linken Seite sind die Laufhöhen der ungebundenen RNA (L3prä), der von CPSF gebundenen RNA (CPSF IV) und der durch den dargestellten CPSF-Subkomplex gebundenen RNA (*) markiert. **D:** Autoradiogramm eines denaturierenden Gels nach *In-Vitro*-Polyadenylierung auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, es wurden 7,5, 15, bzw. 22,5 nM des CPSF-Subkomplexes eingesetzt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (dritte Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, erste Spur von links für beide RNAs), zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs), Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind auf der linken Seite angegeben.

Zur Beurteilung des Aggregationsverhaltens und zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes wurden 7,5 µg der gewonnenen Proteinpräparation einer Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) unterzogen. Die beiden CPSF-Untereinheiten wurden anschließend mittels Western-Blot-Analysen in den Eluatfraktionen detektiert: Die entsprechenden Western-Blots sind in Abbildung 2.1.B gezeigt. Die Koelution der beiden rekombinanten CPSF-Untereinheiten ist deutlich erkennbar, der Elutionspeak für beide Proteine liegt in der Fraktion „D5“, welche einem nativen Molekulargewicht von etwa 300 kDa entspricht und klar hinter dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule (Fraktion „C5“) liegt. Das apparente native Molekulargewicht liegt damit höher, als es für einen 1:1-Komplex aus CPSF30 und CPSF160 zu erwarten wäre. Möglicherweise assoziiert eine CPSF160-Untereinheit mit mehreren CPSF30-Molekülen oder der Komplex nimmt eine nicht-globuläre Form ein und eluiert daher mit einem scheinbar höheren Molekulargewicht von der Gelfiltrationssäule.

Um den CPSF30-CPSF160-Subkomplex auf CPSF-Funktionen in der Polyadenylierung hin zu untersuchen, wurde die in Abbildung 2.1.A gezeigte Proteinpräparation in einem *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) eingesetzt. Das entsprechende Autoradiogramm ist in Abbildung 2.1.C gezeigt. Im EMSA ist eine stärker werdende Retardation der L3prä RNA mit steigenden Mengen des zugegebenen CPSF30-CPSF160-Subkomplexes zu erkennen (in der Abbildung durch einen Stern markiert). Die Bindung des Subkomplexes an die L3prä RNA ist allerdings nicht spezifisch für das Polyadenylierungssignal AAUAAA, da die RNA mit mutiertem Polyadenylierungssignal (L3prä Δ) gleichermaßen von den Proteinen im Gel zurückgehalten wird. Weiterhin wurde die in Abbildung 2.1.A gezeigte Proteinpräparation in einem *In-Vitro*-Polyadenylierungsassay auf die Fähigkeit zur Stimulation der Poly(A)-Polymerase getestet. Im in Abbildung 2.1.D gezeigten Polyadenylierungsassay bewirkt die Zugabe des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes keine Änderung der Poly(A)-Polymerase-Aktivität: Es wird nur eine geringfügige Polyadenylierung der Substrat-RNA beobachtet, vergleichbar mit den Reaktionen, welche nur Poly(A)-Polymerase enthalten. Folglich ist der CPSF30-CPSF160-Subkomplex nicht in der Lage die Poly(A)-Polymerase in ihrer Aktivität zu stimulieren.

Die Peakfraktion „D5“ der Größenausschlusschromatographie wurde auf gleiche Weise auf CPSF-Aktivität in der Polyadenylierung hin untersucht, wobei ebenfalls lediglich eine unspezifische Bindung an die L3prä RNA und kein Einfluss auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die hier präsentierte Präparation des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes besteht aus bovinen Proteinen. Die gezeigten Experimente wurden aber, mit identischen Ergebnissen, zu einem späteren Zeitpunkt mit den entsprechenden humanen Homologen wiederholt. Der CPSF30-CPSF160-Subkomplex aus humanen Proteinen wurde von Peter Schäfer präpariert, das Verhalten der Proteine in der *In-Vitro*-Polyadenylierung ist in Abbildung 9.3 im Anhang dokumentiert.

2.1.1.2 CPSF73-CPSF100-Subkomplex

Als nächstes wurden die anderen beiden klassischen CPSF-Untereinheiten CPSF73 und CPSF100 dargestellt. Hierzu wurden Sf21-Zellen einer V₂-Generation des Virus pBac-mCherry-S73-100^{Tn7} (200 ml, etwa 1,4x10⁸ Zellen) geerntet und aufgeschlossen und das gewonnene Zelllysate einer Strep-Affinitätsreinigung unterzogen. In dieser Präparation trägt die kleinere CPSF-Untereinheit CPSF73 einen N-terminalen Strep-tag. Die ersten vier Eluatfraktionen der Strep-Reinigung sind in Abbildung 2.2.A dargestellt, die Koelution der zweiten klassischen CPSF-Untereinheit CPSF100 mit CPSF73 ist deutlich zu erkennen. Es wurden etwa 1,5 mg CPSF73-CPSF100-Subkomplex gereinigt (ca. 9 nmol bei einem 1:1-Komplex, photometrische Konzentrationsbestimmung).

Zur Beurteilung des Aggregationsverhaltens und zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts des CPSF73-CPSF100-Subkomplexes wurde ein Teil der Strep-Eluatfraktion „E2“ (etwa 50 µg Protein) einer

Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) unterzogen. Die beiden CPSF-Untereinheiten wurden anschließend mittels Western-Blot-Analysen in den Eluatfraktionen nachgewiesen. In der entsprechenden Abbildung 2.2.B ist zu erkennen, dass CPSF73 und CPSF100 zwar gemeinsam von der Gelfiltrationssäule eluieren, sich der Elutionspeak allerdings im Ausschlussvolumen der Säule befindet (Fraktion „C5“). Dies spricht dafür, dass CPSF73 und CPSF100 nicht in Form definierter Komplexe vorliegen, sondern lösliche Aggregate bilden. Für CPSF73 allein ist ein zweiter, kleinerer Elutionspeak um die Fraktion „D12“ erkennbar, hier handelt es sich womöglich um überschüssiges CPSF73, welches nicht an CPSF100 gebunden und daher löslich ist (die Eluatfraktion „D12“ entspricht einem nativen Molekulargewicht von etwa 120 kDa).

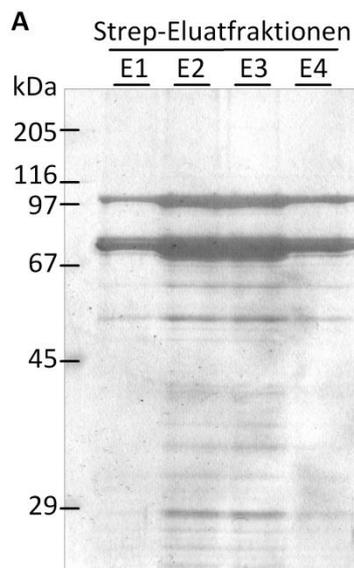
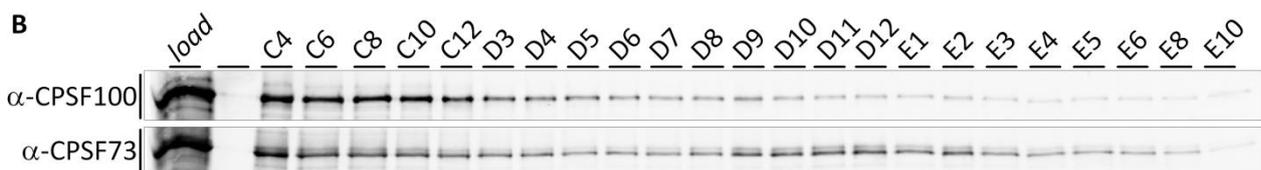


Abbildung 2.2.: Reinigung und Charakterisierung des gereinigten CPSF73-CPSF100-Subkomplexes.

A: Ausschnitt eines silbergefärbten 11% SDS-PA-Gels zur Analyse der ersten vier Eluatfraktionen nach Strep-Affinitätsreinigung des CPSF73-CPSF100-Subkomplexes. Die Markerbanden und die entsprechenden Molekulargewichte sind auf der linken Seite angegeben. **B:** Western-Blot-Analyse von Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie (Superdex 200). Die untersuchten Fraktionen sind oben benannt, die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind auf der linken Seite angegeben. Die Fraktion „C4“ entspricht dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot.



Für die Präparation des CPSF73-CPSF100-Subkomplexes konnte im *electrophoretic mobility shift assay* keine RNA-Bindung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Ebenso wurde keine Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch diesen Subkomplex beobachtet, auch nicht nach Komplementation mit dem CPSF30-CPSF160-Subkomplex (Abbildungen 2.4.B und 2.5.B).

Mit der Absicht, die Löslichkeit des CPSF73-CPSF100-Subkomplexes zu verbessern, bzw. dessen Aggregation zu unterbinden, wurden etwa äquimolare Mengen des hier präsentierten CPSF-Subkomplexes mit der CPSF30-CPSF160-Präparation aus Abbildung 2.1.A für eine Stunde bei 37°C inkubiert und das Gemisch anschließend einer Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) unterzogen. Die Eluatfraktionen der Gelfiltration wurden dann mittels Western-Blot-Analysen auf die Verteilung der vier klassischen CPSF-Untereinheiten hin untersucht (Abbildung 2.3).

Es ist zu erkennen, dass CPSF73 und CPSF100, identisch zur vorherigen Größenausschlusschromatographie des CPSF73-CPSF100-Subkomplexes allein, größtenteils im Ausschlussvolumen der Gelfiltration von der Säule eluieren (Abbildung 2.2.B). Lediglich ein kleiner Anteil des CPSF73 eluiert erneut später von der Säule, bei einem nativen Molekulargewicht von ca. 120 kDa. Die beiden anderen CPSF-Untereinheiten CPSF30 und CPSF160, welche zuvor als definierter Komplex von der Gelfiltrationssäule eluierten (Abbildung 2.1.B), sind in diesem Experiment ebenfalls im Ausschlussvolumen der Säule zu finden, liegen also vermutlich ebenso in Form von löslichen Aggregaten vor. Das

Ziel dieses Versuchs, die Löslichkeit des CPSF73-CPSF100-Subkomplexes durch Inkubation mit den beiden anderen klassischen CPSF-Untereinheiten zu verbessern, wurde folglich nicht erreicht. Das Mischen der beiden Subkomplexe führte gar dazu, dass auch der CPSF30-CPSF160-Subkomplex aggregiert. Aus der Größenausschlusschromatographie kann aber zumindest geschlussfolgert werden, dass die beiden rekombinanten CPSF-Subkomplexe miteinander interagieren.

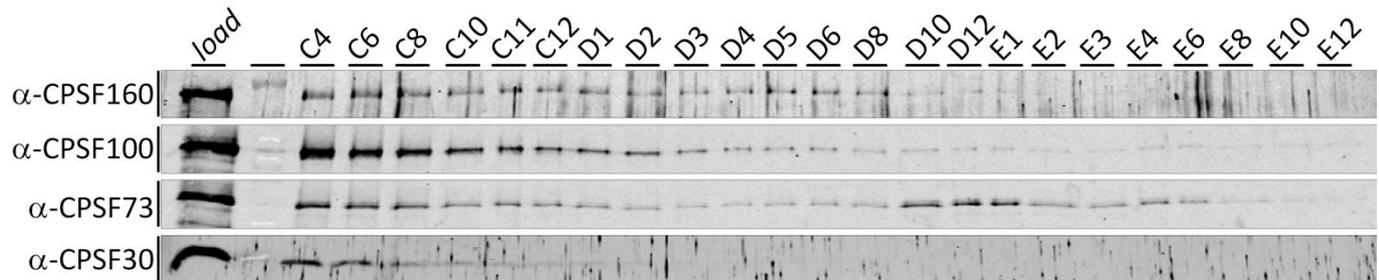


Abbildung 2.3: Gelfiltration von gemischten Subkomplexen CPSF30-CPSF160 und CPSF73-CPSF100.

Western-Blot-Analyse von Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) hinsichtlich der Verteilung der vier klassischen CPSF-Untereinheiten. Die untersuchten Fraktionen sind oben benannt, die zum Nachweis genutzten Antikörper sind auf der linken Seite angegeben. Die Fraktion „C4“ entspricht dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot.

2.1.1.3 hFip1

Die putative CPSF-Untereinheit hFip1 wurde zunächst mit N-terminalem Strep-tag allein aus Sf21-Zellen der V₁-Generation (62 ml, etwa 5,1x10⁷ Zellen) des Virus pBac-YFP^{loxP}-ShFip1^{Tn7} gereinigt. Wie in den Strep-Eluatfraktionen in Abbildung 2.4.A zu sehen ist, konnte hFip1 als einzelnes Protein in hoher Reinheit erhalten werden. Es wurden hier etwa 70 µg Protein gewonnen (ca. 1 nmol, densitometrische Bestimmung aus Coomassie-gefärbtem Gel).

Eine RNA-Bindung für hFip1 konnte im *electrophoretic mobility shift assay* nicht nachgewiesen werden, getestet wurde dabei sowohl die Bindung an L3prä-, als auch an die längere L3short RNA (Daten nicht gezeigt, Substrat-RNAs vergleichend dargestellt in Abbildung 9.9 im Anhang).

Die gezeigte hFip1-Präparation wurde hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Stimulation der Poly(A)-Polymerase untersucht. Im entsprechenden *In-Vitro*-Polyadenylierungsassay wurde hFip1 sowohl allein, als auch in Kombination mit den zuvor hergestellten CPSF-Subkomplexen eingesetzt. Wie in Abbildung 2.4.B zu erkennen ist, ist hFip1 erwartungsgemäß allein in der Lage, die Poly(A)-Polymerase in ihrer Aktivität zu steigern; in den Reaktionen mit hFip1 wurde etwas längere Poly(A)-Schwänze gebildet. Die beobachtete Stimulation ist allerdings nicht spezifisch für das Polyadenylierungssignal, da die Poly(A)-Polymerase in gleichem Maße auf der L3prä Δ RNA von hFip1 stimuliert wird (Vergleich der fünften Spur von links beider RNA-Substrate).

Interessanter Weise bewirkt die Zugabe des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes zu Polyadenylierungsreaktionen mit hFip1 eine zusätzliche Stimulation der Poly(A)-Polymerase, obwohl der CPSF30-CPSF160-Subkomplex allein keinen Einfluss auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase aufweist. Allerdings ist auch diese kooperative Stimulation der Poly(A)-Polymerase nicht spezifisch für das Polyadenylierungssignal, da die L3prä Δ RNA gleichwertig polyadenyliert wird. Die Zugabe der anderen beiden CPSF-Untereinheiten CPSF73 und CPSF100 hat weder Einfluss auf die stimulierende Aktivität von hFip1 allein, noch auf die verstärkte Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch hFip1 und den CPSF30-CPSF160-Subkomplex.

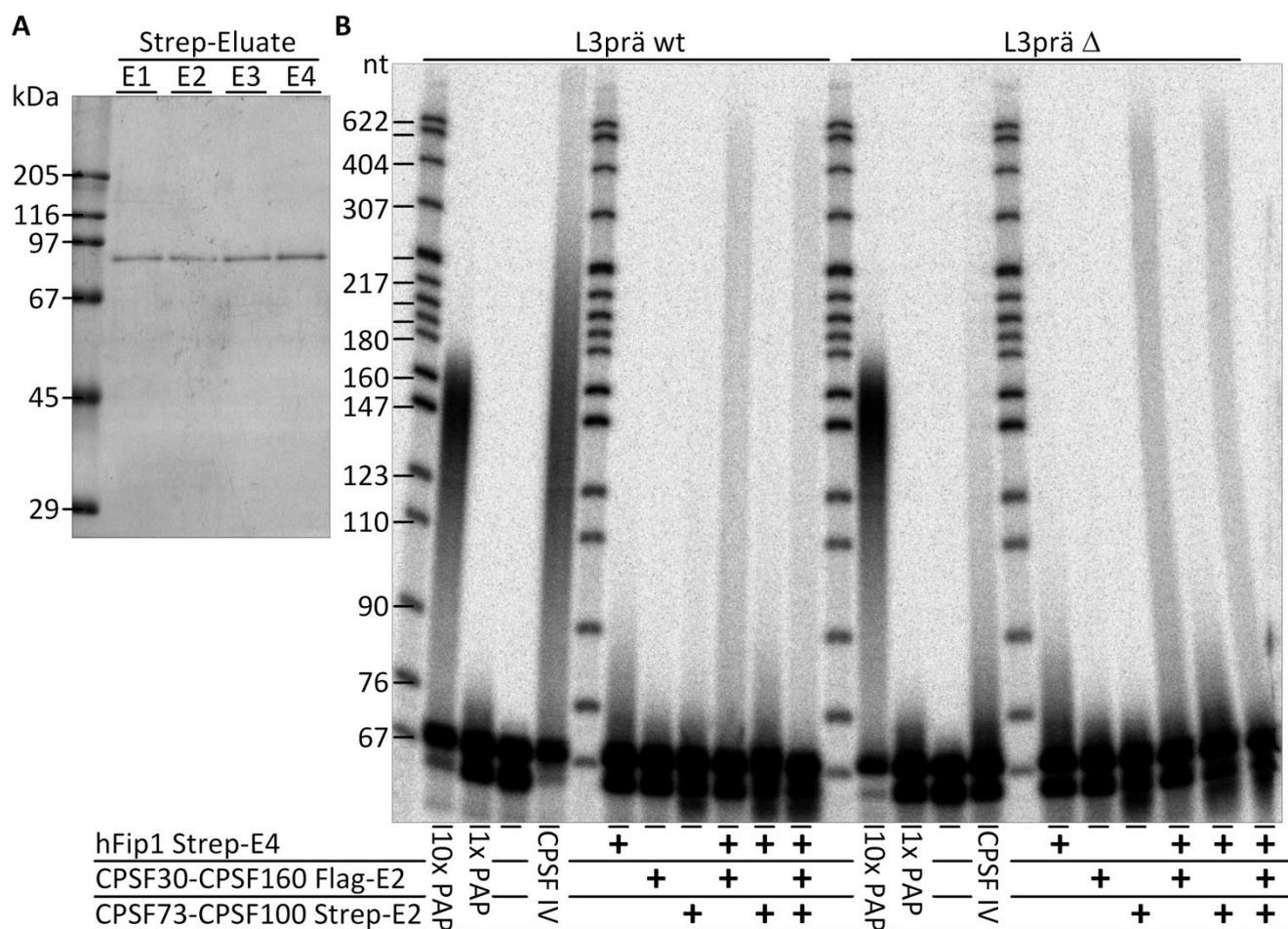


Abbildung 2.4: Charakterisierung der hFip1-Präparation.

A: Coomassie-gefärbtes 9% SDS-PA-Gel zur Analyse der Eluatfraktionen nach Strep-Affinitätsreinigung von hFip1. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind links zugeordnet. **B:** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels nach *In-Vitro*-Polyadenylierung auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, die links-unten angegebenen Proteinpräparationen wurden jeweils zu etwa 12 nM eingesetzt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (dritte Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs), zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, erste Spur von links für beide RNAs), Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind links angegeben.

2.1.1.4 WDR33-hFip1-Subkomplex

Als letzter Subkomplex sollten die putativen CPSF-Untereinheiten hFip1 und WDR33 gemeinsam dargestellt werden. Zu diesem Zweck wurden Sf21-Zellen der V1-Generation (288 ml, etwa $2,8 \times 10^8$ Zellen) des Virus pBac-MycHisWDR33-hFip1-CFP^{Tn7} geerntet, aufgeschlossen und das gewonnene Zelllysate einer Affinitätsreinigung an immobilisierten Metallionen (IMAC) unterzogen. In Abbildung 2.5.A sind die ersten vier Eluatfraktionen dieser Affinitätsreinigung gezeigt. Eine Anreicherung von WDR33 (mit N-terminalem MycHis-tag) ist bei einer Laufhöhe von 160 kDa deutlich zu erkennen, ebenfalls sichtbar ist die effiziente Koelution von hFip1 als angereicherte Bande bei 80 kDa. Die Identität dieser beiden Proteinbanden wurde durch Western-Blot-Analysen bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Die Präparation des WDR33-hFip1-Subkomplexes wurde anschließend in einer *In-Vitro*-Polyadenylierung auf CPSF-Aktivität hin untersucht, das entsprechende Autoradiogramm ist in Abbildung 2.5.B dargestellt. Im Assay wurde die Präparation allein und in Kombination mit den beiden zuvor präparierten CPSF-Subkomplexen getestet.

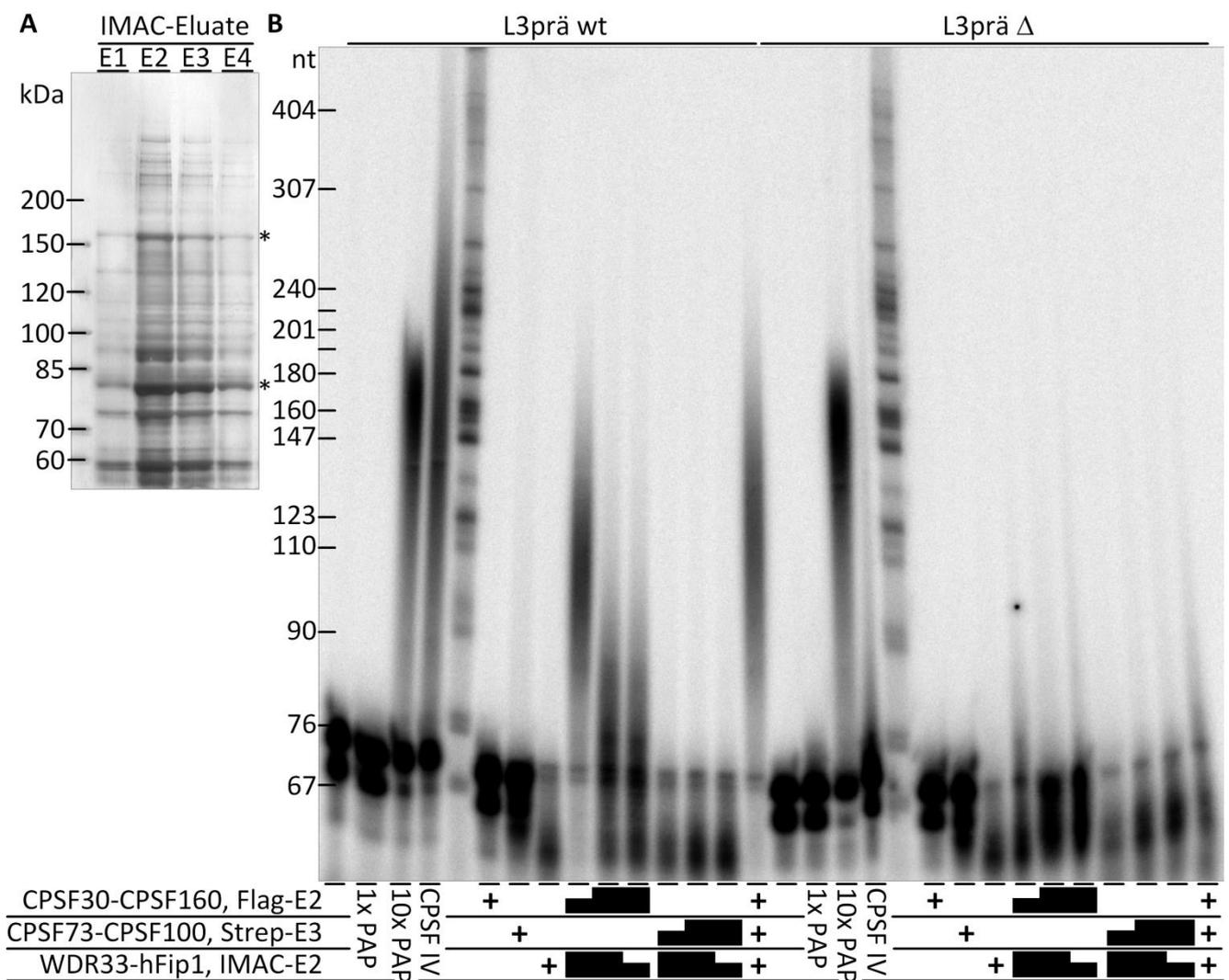


Abbildung 2.5: Darstellung des WDR33-hFip1-Subkomplexes, Rekonstitution spezifischer Polyadenylierung.

A: Silbergefärbtes 6% SDS-PA-Gel zur Analyse der Eluatfraktionen nach IMAC des WDR33-hFip1-Subkomplexes. Die Banden, welche WDR33 und hFip1 zuzuordnen sind, wurden durch Sterne an der rechten Seite markiert. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind an der linken Seite zugeordnet. **B:** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels nach *In-Vitro*-Polyadenylierung auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, von den links-unten angegebenen Proteinpräparationen wurde jeweils 1 µl eingesetzt. In Reaktionen welche Kombinationen der Proteinpräparationen enthalten, wurden verschiedene Verhältnisse der Proteinpräparationen eingesetzt (je mit 1 oder 2 µl der Präparationen, angegeben durch schwarze Balken). Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs), zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs), Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind auf der linken Seite angegeben.

Es ist zu sehen, dass der WDR33-hFip1-Subkomplex, genauso wie die zuvor dargestellten Subkomplexe aus klassischen CPSF-Untereinheiten, allein nicht zur Stimulation der Poly(A)-Polymerase führt. In Kombination mit dem CPSF30-CPSF160-Subkomplex allerdings wird die L3prä wt RNA deutlich polyadenyliert. Dieser Effekt ist für die L3prä Δ RNA nicht zu beobachten, wodurch die Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch die Kombination der CPSF30-CPSF160- und WDR33-hFip1-Subkomplexe als spezifisch für das Polyadenylierungssignal zu bewerten ist. Die Kombination der WDR33-hFip1-Präparation mit dem anderen Subkomplex aus CPSF73 und CPSF100 zeigt keine stimulierende Aktivität und die Reaktion mit allen drei Subkomplexen zeigt einen vergleichbaren Grad der Polyadenylierung wie die Reaktionen mit nur WDR33-hFip1 und CPSF30-CPSF160. Die CPSF-Aktivität der vom Poly-

adenylierungssignal abhängigen Stimulation der Poly(A)-Polymerase kann also durch die Kombination von vier Proteinen, CPSF30, CPSF160, WDR33 und hFip1, *in vitro* rekonstituiert werden. Die beiden anderen klassischen CPSF-Untereinheiten, CPSF73 und CPSF100, scheinen weder notwendig für die Stimulation der Poly(A)-Polymerase zu sein, noch einen Einfluss auf die stimulierende Aktivität der anderen Proteine zu haben. CPSF73 und CPSF100 scheinen demnach nicht maßgeblich an der Aktivität von CPSF in der Polyadenylierung beteiligt zu sein.

Wie aus Abbildung 2.5.A ersichtlich ist, enthält die hier präsentierte erste Präparation des WDR33-hFip1-Subkomplexes noch viele kontaminierende Proteinbanden, wodurch die beobachtete Aktivität in der Polyadenylierung nicht einwandfrei auf WDR33 und hFip1 zurückgeführt werden kann. Es wurden daher weitere Versuche unternommen, den WDR33-hFip1-Subkomplex in reinerer Form zu darzustellen und anschließend näher zu charakterisieren.

Es erfolgte eine größere Expression, indem eine Sf21-Suspensionskultur (1000 ml bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit den zwei Viren pBac-YFP^{loxP}-ShFip1^{Tn7} und pBac-MycHisWDR33-CFP^{Tn7} koinfiziert wurde. Nach Ernte und Aufschluss der Zellen erfolgte erneut eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) als erster Reinigungsschritt. Die Eluatfraktionen „E1“ und „E2“ nach IMAC wurden anschließend vereinigt, dialysiert und über eine Anionenaustauschchromatographie (Resource Q) weiter aufgetrennt. Ausgewählte Eluatfraktionen dieser ersten beiden Reinigungsschritte sind in Abbildung 2.6.A gezeigt. Im Vergleich der Eluatfraktionen nach IMAC und Resource Q-Fraktionierung ist zu erkennen, dass mit der Anionenaustauschchromatographie eine weitere Anreicherung von WDR33 und hFip1 erzielt werden konnte. Die Fraktion „B5“ der Resource Q-Fraktionierung führt, nach Komplementation mit dem CPSF30-CPSF160-Subkomplex, zu einer vergleichbaren Stimulation der Poly(A)-Polymerase, wie die zuvor in Abbildung 2.5.A gezeigte Präparation des WDR33-hFip1-Subkomplexes (Abbildung 9.3 im Anhang). Allerdings enthält das Resource Q-Eluat deutlich weniger kontaminierende RNasen. Im gezeigten Polyadenylierungsassay wurden relativ große Mengen des Resource Q-Eluats eingesetzt, wodurch die Spezifität der Poly(A)-Polymerase-Stimulation für das Polyadenylierungssignal nur gering ausgeprägt ist.

Die Fraktionen „B3“, „B4“, „B6“ und „B7“ der Anionenaustauschchromatographie wurden vereinigt, via Ultrafiltration aufkonzentriert und für einen letzten Reinigungsschritt schließlich auf eine Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) appliziert. Die Fraktionen der Gelfiltration sind in Abbildung 2.6.B gezeigt, WDR33 und hFip1 wurden, zusätzlich zur Coomassie-Färbung, via Western-Blot in den entsprechenden Fraktionen nachgewiesen. Es wurde beobachtet, dass WDR33 hauptsächlich im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule (Fraktion „C4“, entspricht etwa 1,3 MDa) eluiert, während hFip1 größtenteils in späteren Fraktionen zu finden ist (Peak in Fraktion „D3“ und „D4“, entspricht einem nativen Molekulargewicht von etwa 300 kDa). Der Komplex aus WDR33 und hFip1 ist folglich auf der Gelfiltrationssäule dissoziiert, so dass die Reinigung des gewünschten Subkomplexes via Größenausschlusschromatographie nicht erfolgreich war. In einer *In-Vitro*-Polyadenylierung mit Komplementation durch den CPSF30-CPSF160-Subkomplex konnte lediglich im *load* der Gelfiltrationssäule eine für das Polyadenylierungssignal spezifische Stimulation der Poly(A)-Polymerase nachgewiesen werden. Die späteren Fraktionen „D1“ bis „D8“, welche ausschließlich hFip1 enthalten, zeigten in diesem Assay lediglich eine unspezifische Stimulation (Daten nicht gezeigt). Bei genauerer Betrachtung der Resource Q-Eluatfraktionen (Abbildung 2.6.A) fällt auf, dass WDR33 und hFip1 bereits bei dieser Chromatographie leicht versetzt von der Säule eluierten. Womöglich ist der WDR33-hFip1-Subkomplex bei diesem Reinigungsschritt schon (teilweise) dissoziiert.

Entsprechend der Elution (eines Teils) des Subkomplexes im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule wurde in *electrophoretic mobility shift assays* zwar eine RNA-Bindung für die Kombination aus WDR33 und hFip1 detektiert, die RNA wurde allerdings in den Geltaschen des *Shift*-Gels zurückgehalten und war nicht spezifisch für das Polyadenylierungssignal (Daten nicht gezeigt).

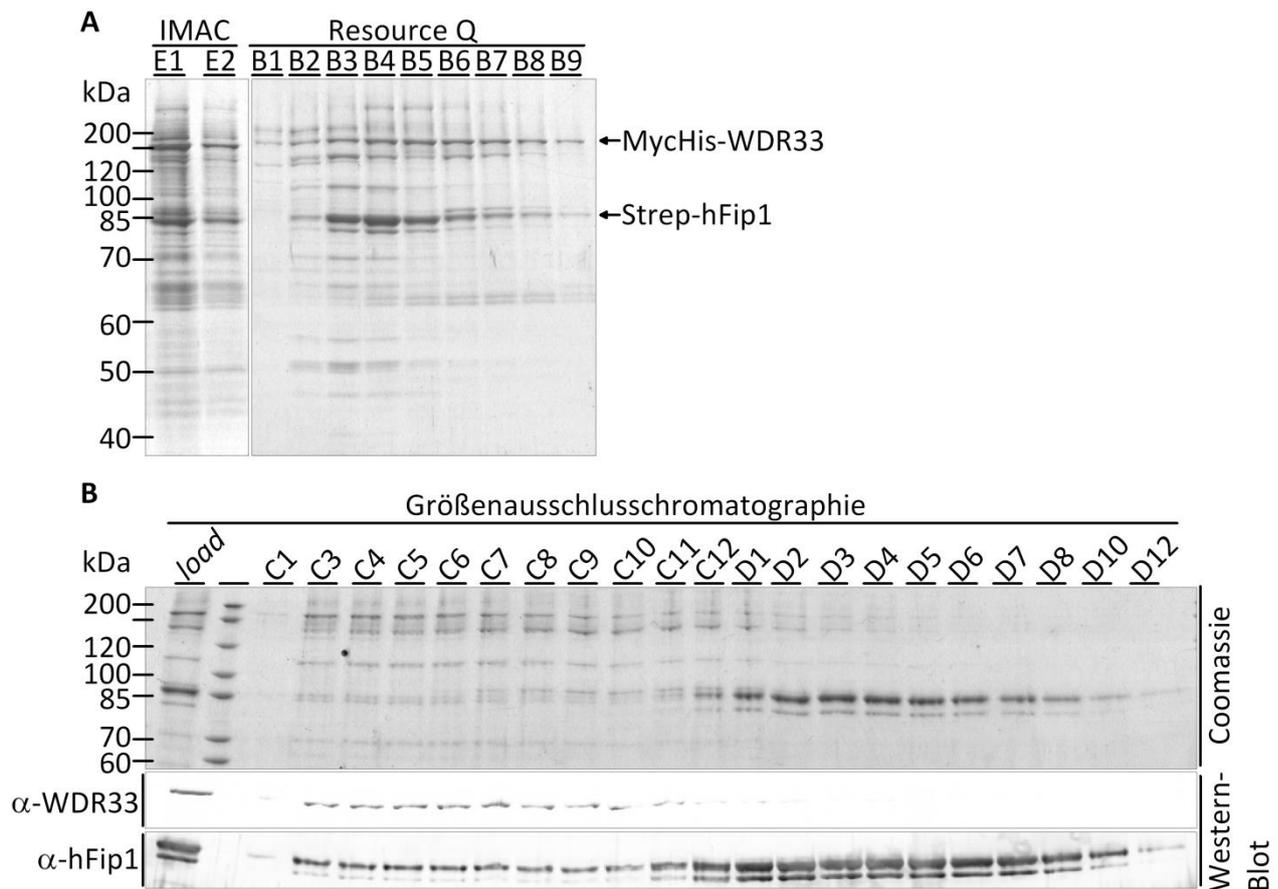


Abbildung 2.6: Zweite Reinigung des WDR33-hFip1-Subkomplexes und Größenausschlusschromatographie.

A: Coomassie-gefärbtes 9% SDS-PA-Gel zur Analyse der Eluatfraktionen nach IMAC und Anionenaustauschchromatographie (Resource Q) des WDR33-hFip1-Subkomplexes. Die Laufhöhen von WDR33 und hFip1 sind an der rechten Seite gekennzeichnet. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind an der linken Seite zugeordnet.

B: Coomassie-gefärbtes 9% SDS-PA-Gel zur Analyse der Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) sowie Western-Blot-Analyse der entsprechenden Fraktionen. Die Fraktion „C4“ repräsentiert das Ausschlussvolumen der Säule. Die Molekulargewichte der Markerbanden des Coomassie-Gels sind an der linken Seite zugeordnet. Ebenso links angegeben sind die in der Western-Blot-Analyse verwendeten Antikörper. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot.

2.1.2 Systematische Analyse von 4er-, 5er- und 6er-Komplexen

Die zuvor gezeigten Ergebnisse implizieren, dass WDR33 und hFip1 essentielle Untereinheiten von CPSF für die Polyadenylierung repräsentieren. Da der Subkomplex aus WDR33 und hFip1 nicht bis zur vollständigen Homogenität gereinigt werden konnte, ist bislang aber nicht sicher, ob die beobachtete Polyadenylierungsaktivität wirklich auf hFip1 und WDR33 zurückzuführen ist und nicht etwa durch kontaminierende Proteine aus den Sf21-Zellen verursacht wird. Um diese Unsicherheit zu beseitigen, wurde das folgende Experiment durchgeführt: Drei Suspensionskulturen von Sf21-Zellen (je 333 ml bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) wurden mit verschiedenen Kombinationen der Viren pBac-YFP^{loxP}-F160-30^{Tn7}, pBac-mCherry-S73-100^{Tn7}, pBac-YFP^{loxP}-ShFip1^{Tn7} und pBac-MycHisWDR33-hFip1-CFP^{Tn7} koinfiziert, so dass die folgenden Proteine in den drei Expressionskulturen produziert wurden (Schema in Abbildung 2.7.A):

- A) CPSF30, Strep-CPSF73, CPSF100, Flag-CPSF160
- B) CPSF30, Strep-CPSF73, CPSF100, Flag-CPSF160, Strep-hFip1
- C) CPSF30, Strep-CPSF73, CPSF100, Flag-CPSF160, hFip1, MycHis-WDR33

Die Zelllysate der drei Expressionskulturen wurden jeweils einer Flag-Affinitätschromatographie unterzogen (N-terminaler Flag-*tag* an der CPSF160).

Die Expression und Reinigung der gewünschten CPSF-Untereinheiten wurde mittels Western-Blots analysiert, die entsprechenden Ergebnisse sind in Abbildung 2.7.B dargestellt. Silbergefärbte 11% SDS-PA-Gele zur vergleichenden Analyse aller Fraktionen der drei Flag-Reinigungen sind in Abbildung 9.4 im Anhang gezeigt. Wie in Abbildung 2.7.B zu erkennen ist, enthält die Expression A) die vier klassischen CPSF-Untereinheiten, Expression B) zusätzlich hFip1 und Expression C) sowohl die vier klassischen Untereinheiten, als auch hFip1 und WDR33. Auch in den Eluatfraktionen „E2“ der drei Flag-Reinigungen konnten alle exprimierten Proteine nachgewiesen werden. Es ist demzufolge davon auszugehen, dass die rekombinanten Proteine miteinander interagieren und dadurch als Komplexe mit CPSF160 gereinigt werden konnten.

Die Flag-Eluate wurden zur weiteren Analyse in einer *In-Vitro*-Polyadenylierung untersucht. Im in Abbildung 2.7.C dargestellten Polyadenylierungsassay wurden die Haupteluatfraktionen „E2“ der drei Expressionen A), B) und C) titriert und so auf ihre Fähigkeit zur Stimulation der Poly(A)-Polymerase getestet. Es ist zu erkennen, dass lediglich die Eluatfraktion der Expression C) in der Lage ist, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren. Die beobachtete Stimulation ist dabei spezifisch für das Polyadenylierungssignal, da die L3prä Δ RNA deutlich weniger effizient polyadenyliert wird. Der aus Expression C) gereinigte Komplex ist folglich in der Lage, die Funktion von CPSF in der Polyadenylierung zu rekonstituieren. Da nur die Proteinpräparation aus der Expression C) CPSF-Aktivität zeigt, die Bedingungen für alle drei Flag-Reinigungen aber identisch gewählt wurden, bestätigt dieses Ergebnis die vorherige Vermutung, dass es sich bei WDR33 um eine für die Polyadenylierung essentielle Untereinheit des CPSF-Komplexes handelt. Es ist unwahrscheinlich, dass endogene Proteine aus den Sf21-Zellen für die beobachtete Aktivität verantwortlich sind und diese Proteine lediglich mit der Präparation C) mit gereinigt wurden.

In der Polyadenylierungsreaktion mit der größten Menge des Flag-Eluats der Expression B) ist eine gewisse Stimulation der Poly(A)-Polymerase zu beobachten, diese ist aber nicht spezifisch für das Polyadenylierungssignal und auf die bereits beobachtete, unspezifische Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch hFip1 in Kombination mit CPSF30 und CPSF160 zurückzuführen (Abbildung 2.4.B).

Die Bindung der drei dargestellten Komplexe an RNA (Wigley10-Oligonukleotide, vgl. Abbildung 9.9 im Anhang) wurde von Peter Schäfer mittels Filterbindungsassays untersucht [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 1.C]. Dabei konnte nur für den 6er-Komplex eine signifikante Bindung der RNA beobachtet werden, der apparente K_D lag bei etwa 20 nM. Zusätzlich war die RNA-Bindung des 6er-Komplexes spezifisch für das Polyadenylierungssignal, das Oligonukleotid mit mutiertem Polyadenylierungssignal (Wigley10 Δ) wurde nicht gebunden.

In *electrophoretic mobility shift assays* wurde weiterhin beobachtet, dass die Eluatfraktionen aller drei Reinigungen die eingesetzte RNA (L3prä wt und Δ , vgl. Abbildung 9.9 im Anhang) in den Geltaschen des *Shift*-Gels zurückhalten, die Eluatfraktion der Expression C) allerdings zeigte eine klare Präferenz für die wt RNA (stärkeres Signal für L3prä wt in den Geltaschen, Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass der Komplex aus sechs Proteinen möglicherweise spezifisch an RNAs mit intaktem Polyadenylierungssignal bindet, die sechs Untereinheiten aber nicht in definierten Komplexen, sondern in Form von löslichen Aggregaten vorliegen. Diese Vermutung wird durch die Elution des 6er-Komplexes im Ausschlussvolumen einer analytischen Größenausschlusschromatographie bestätigt (Superdex 200, Daten nicht gezeigt). Das hier beobachtete Aggregationsverhalten der rekombinanten CPSF-Untereinheiten entspricht somit den vorangegangenen Beobachtungen zum CPSF73-CPSF100-Subkomplex (Abbildung 2.2.B) sowie zur Kombination der klassischen vier CPSF-Untereinheiten (Abbildung 2.3).

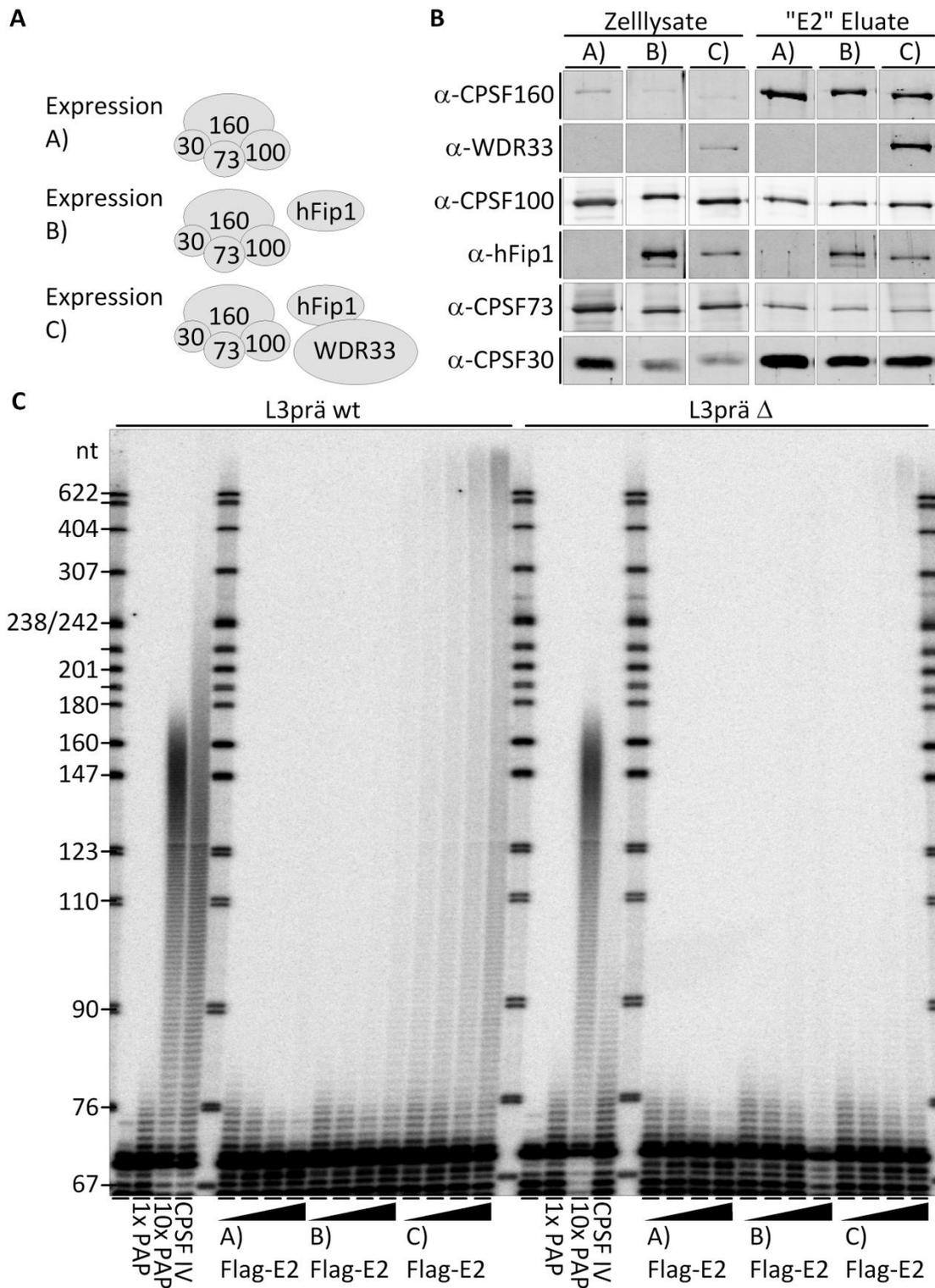


Abbildung 2.7: Charakterisierung der dargestellten 4er-, 5er und 6er-Komplexe.

A: Schematische Darstellung der in drei Expressionen jeweils koexprimierten Proteine. **B:** Western-Blot-Analyse von Zelllysaten und Eluatfraktionen nach Flag-Affinitätschromatographie aus den drei Koexpressionen. Die untersuchten Fraktionen sind oben benannt, die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind auf der linken Seite angegeben. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot. **C:** Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PA-Gels nach *In-Vitro*-Polyadenylierung auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, von den Flag-Eluatfraktionen wurden jeweils 0,5, 1, 2 und 4 μ l eingesetzt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs), zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs), Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind links angegeben.

2.1.3 Definition eines minimalen CPSF-Komplexes für die Polyadenylierung

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass wahrscheinlich nicht alle der sechs zuvor koexprimierten Proteine für die Polyadenylierung benötigt werden und die Kombination aus CPSF30, CPSF160, hFip1 und WDR33 möglicherweise ausreichend ist, um die CPSF-Aktivität in der Polyadenylierung zu rekonstituieren (Abbildung 2.5.B). Das vorhergehende Experiment zeigt weiterhin, dass WDR33 essentiell für die Aktivität ist (Abbildung 2.7.C). Als Nächstes sollte untersucht werden, ob alle der übrigen drei Proteine (CPSF30, CPSF160 und hFip1) ebenfalls für die Polyadenylierung essentiell sind, oder ob die minimale Zusammensetzung des CPSF-Komplexes in dieser Reaktion noch weiter eingeschränkt werden kann. Zu diesem Zweck wurden vier Expressionskulturen (jeweils 200 ml bei $1,4 \times 10^6$ Zellen/ml) mit verschiedenen Kombinationen der Viren pBac-YFP^{loxP}-F160-30^{Tn7}, pBac-MycHisWDR33-CFP^{Tn7}, pBac-YFP^{loxP}-ShFip1^{Tn7}, pBac-S160^{Tn7} und pBac-S30^{Tn7} infiziert, so dass die Kultur A) alle vier verbliebenen CPSF-Untereinheiten koexprimierte und in den Kulturen B), C) und D) jeweils eine Untereinheit fehlte (respektive hFip1, CPSF30, bzw. CPSF160). Aus den vier Expressionskulturen wurden Zelllysate präpariert und anschließend vier separate Affinitätschromatographien an immobilisierten Metallionen (IMAC, N-terminaler MycHis-tag an WDR33) durchgeführt. Die Eluatfraktionen der einzelnen Reinigungen wurden dann vereinigt und dialysiert, um das im Polyadenylierungsassay störende Imidazol zu entfernen.

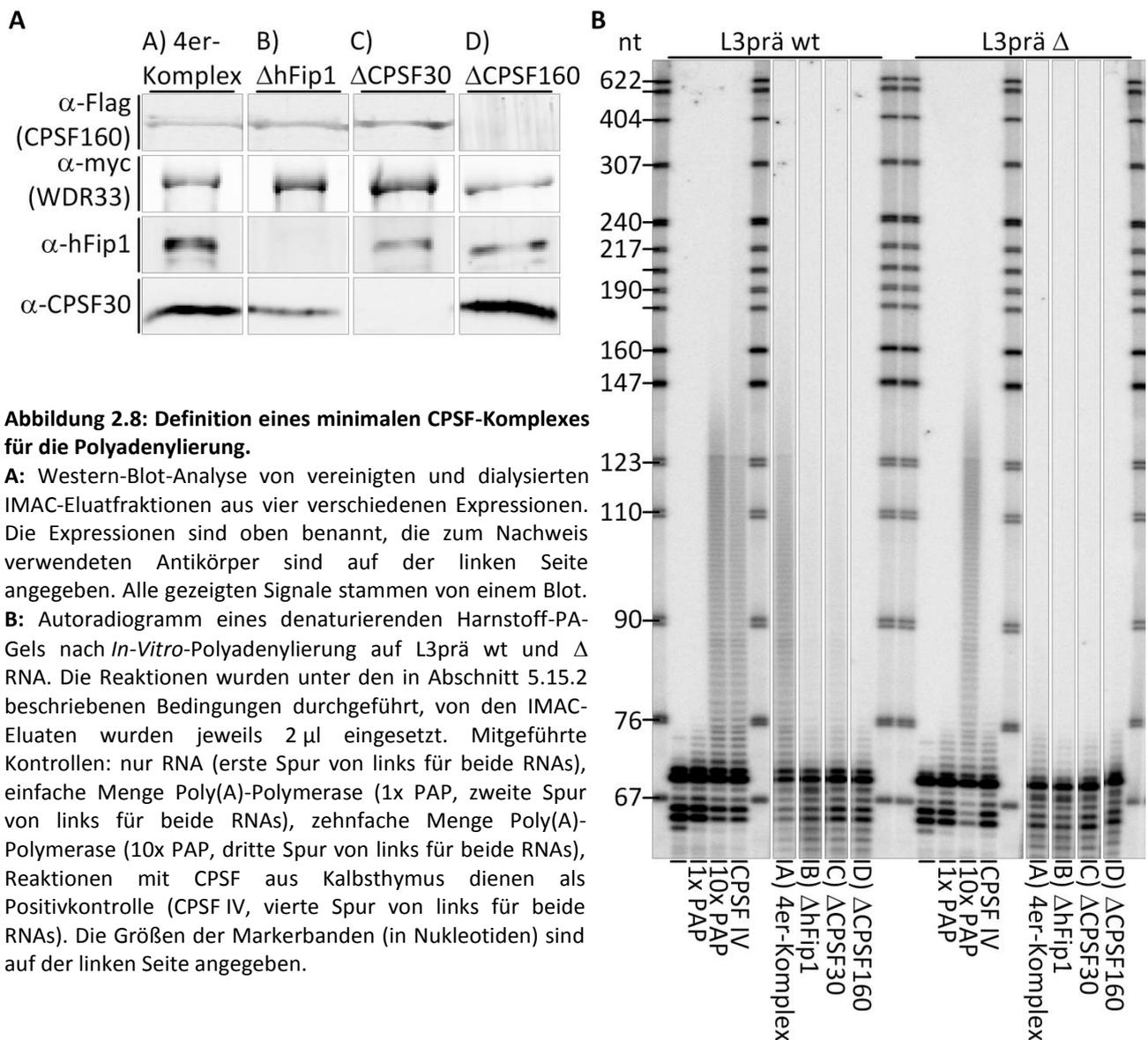


Abbildung 2.8: Definition eines minimalen CPSF-Komplexes für die Polyadenylierung.

A: Western-Blot-Analyse von vereinigten und dialysierten IMAC-Eluatfraktionen aus vier verschiedenen Expressionen. Die Expressionen sind oben benannt, die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind auf der linken Seite angegeben. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot.

B: Autoradiogramm eines denaturierenden Harnstoff-PAGE-Gels nach *In-Vitro*-Polyadenylierung auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, von den IMAC-Eluaten wurden jeweils 2 μ l eingesetzt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs), zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs), Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind auf der linken Seite angegeben.

Die Anwesenheit aller vier rekombinanten Proteine konnte mittels Western-Blot-Analysen, sowohl in den Zelllysaten (Daten nicht gezeigt), als auch in den dialysierten IMAC-Eluaten nachgewiesen werden (Abbildung 2.8.A). Wie erwartet, konnten aus der Kultur A) alle vier Proteine gereinigt werden, in den Eluaten der Kulturen B), C) und D) sind, respektive hFip1, CPSF30, bzw. CPSF160 nicht nachweisbar.

Die dialysierten IMAC-Eluatfraktionen wurden in einer *In-Vitro*-Polyadenylierung auf CPSF-Aktivität hin untersucht. Im entsprechenden Polyadenylierungsassay in Abbildung 2.8.B ist zu sehen, dass nur der gereinigte Komplex aus Kultur A) eine Stimulation der Poly(A)-Polymerase bewirkt, also nur der Komplex aus vier Untereinheiten CPSF-Aktivität besitzt. Aus der Western-Blot-Analyse (Abbildung 2.8.A) geht hervor, dass sich die Konzentrationen der Proteine CPSF30, CPSF160 und hFip1 zwischen den Eluatfraktionen zumindest nicht stark voneinander unterscheiden. Somit ist darauf zu schließen, dass ein Fehlen jedes dieser drei Proteine das Ausbleiben der CPSF-Aktivität bewirkt. Demzufolge konnte hier gezeigt werden, dass nicht nur WDR33, sondern auch CPSF30, CPSF160 und hFip1 essentielle CPSF-Untereinheiten in der Polyadenylierung sind.

In einem sehr ähnlichen Versuchsaufbau wurde nach Expression entsprechender Kombinationen von CPSF30, CPSF160, WDR33 und hFip1 die Polyadenylierungsaktivität direkt in den Lysaten der Sf21-Zellen untersucht. Auch dabei konnte CPSF-Aktivität lediglich nach Koexpression aller vier Proteine nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Beobachtung schließt eine Beeinflussung der oben gezeigten Ergebnisse durch die angewendete Reinigungsstrategie (IMAC via MycHis-tag an WDR33) aus. Um weitere Beschreibungen und Diskussionen zu vereinfachen, wurde dem hier definierten und für die Polyadenylierung minimalen CPSF-Komplex aus CPSF30, CPSF160, hFip1 und WDR33 entsprechend seiner Funktion der Name „mPSF“ (*mammalian polyadenylation specificity factor*) gegeben.

2.1.4 Darstellung und Reinigung des mPSF-Komplexes

Der zuvor definierte mPSF-Komplex wurde im Folgenden bis zur Homogenität gereinigt und anschließend hinsichtlich seiner Aktivitäten in der Polyadenylierung weiter untersucht. Zu diesem Zweck wurde zunächst der Baculovirus pBac-MycHisWDR33-hFip1^{loxP}-F160-30^{Tn7} generiert, welcher für alle vier Untereinheiten des mPSF-Komplexes kodiert. Im Gegensatz zu den zuvor gezeigten Experimenten, bei welchen die CPSF-Untereinheiten CPSF30 und CPSF160 bovinen Ursprungs waren, handelt es sich bei den hier kodierten Untereinheiten ausschließlich um Proteine humanen Ursprungs. WDR33 trägt einen N-terminalen MycHis-tag, CPSF160 einen N-terminalen Flag-tag.

Nach mehreren Pilotversuchen wurde folgende Reinigungsstrategie angewendet, um den mPSF-Komplex zu reinigen: Das Zellpellet einer mit dem oben genannten Virus infizierten Expressionskultur (1000 ml bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml, High-Five-Zellen) wurde aufgeschlossen und zur Präparation des Zelllysats in Puffer mit 250 mM Kaliumchlorid aufgenommen. Nach dem Zellaufschluss wurde das Material über eine Anionenaustauscher-Säule (DEAE-Sepharose) gegeben und der Durchfluss in mehreren Fraktionen gesammelt. Die Durchflussfraktionen „D2“ bis „D5“ wurden anschließend vereinigt und einer Affinitätsreinigung an immobilisierten Metallionen (IMAC) unterzogen, um den mPSF-Komplex anhand des N-terminalen MycHis-tags an WDR33 zu isolieren. In Abbildung 2.9.A sind ausgewählte Fraktionen dieser ersten beiden Reinigungsschritte dargestellt, die rekombinanten Proteine wurden zusätzlich in Western-Blot-Analysen detektiert. Eine Anreicherung der vier Proteine ist in den ersten beiden IMAC-Eluaten deutlich erkennbar. Die zwei hier sichtbaren Proteinbanden für CPSF30 wurden in allen Präparationen mit humanem CPSF30 beobachtet. Auch bei der späteren Fraktionierung von Spaltungsfaktoren aus HeLa-Kernextrakt wurden regelmäßig entsprechende Doppelbanden für CPSF30 in Western-Blot-Analysen detektiert (Abbildung 2.30). Die Existenz von zwei CPSF30-Spezies (in HeLa-Zellen) wurde auch in anderen Arbeiten beobachtet. Dort handelt es sich dabei um zwei verschiedene Isoformen des Proteins, womöglich als Folge alternativen Spleißens [Chan *et al.*, 2014].

Entsprechend der Anreicherung der mPSF-Untereinheiten ist in Abbildung 2.9.B eine Anreicherung der Polyadenylierungsaktivität in den IMAC-Eluatfraktionen „E1“ und „E2“ zu sehen. Schon das Zelllysat bewirkt eine leichte, spezifische Stimulation der Poly(A)-Polymerase, ebenso die Durchfluss-Fraktionen der DEAE-Säule. Die vereinigten DEAE-Fraktionen „D2“ bis „D5“ (*pool*) zeigen im dargestellten Assay unerwarteter Weise keine Aktivität. In den IMAC-Eluaten „E1“ bis „E3“ ist die Aktivität schließlich deutlich angereichert. Hierbei sollte aber beachtet werden, dass die entsprechenden Eluatfraktionen nicht dialysiert sind und die tatsächliche Polyadenylierungsaktivität in den Fraktionen höher sein dürfte (partielle Inhibition der Polyadenylierung durch Imidazol in den Fraktionen). Die IMAC-Eluatfraktionen zeigen in der Polyadenylierung nur noch eine geringe Spezifität für das Polyadenylierungssignal, wahrscheinlich da im gezeigten Assay zu viel Protein eingesetzt wurde.

Für die weitere Reinigung des mPSF-Komplexes wurde die IMAC-Eluatfraktion „E2“ dialysiert und einer Flag-Affinitätschromatographie unterzogen (N-terminaler Flag-*tag* an CPSF160). Eine Gelanalyse der Flag-Eluate ist in Abbildung 2.10 dargestellt; die Identität der im Coomassie-gefärbten Gel sichtbaren Banden wurde mittels Western-Blot-Analysen bestätigt. Es ist zu erkennen, dass in den Eluaten der Flag-Reinigung lediglich vier markante Proteinbanden enthalten sind, welche den erwarteten vier mPSF-Untereinheiten entsprechen. Um sicherzustellen, dass auch keine kleineren Proteine oder Proteinfragmente in der Präparation vorhanden sind, wurden die Flag-Eluatfraktionen auch auf einem höherprozentigen Gel analysiert (Abbildung 2.10, 15% PAGE): Neben den vier erwarteten Proteinen sind keine weiteren Proteinbanden im Gel erkennbar, die Präparation des mPSF-Komplexes ist somit ausreichend rein. Die Reinigung eines (nahezu) homogenen mPSF-Komplexes ist demnach gelungen.

Da in *In-Vitro*-Polyadenylierungsassays auch Aktivität im Durchfluss der Flag-Affinitätschromatographie gefunden wurde (Daten nicht gezeigt), wurde dieser Durchfluss, nach Reäquilibration der anti-Flag-Agarose-Säule, für eine zweite Flag-Affinitätschromatographie genutzt. Hierdurch konnte weiterer mPSF-Komplex vergleichbarer Reinheit gewonnen werden (Daten nicht gezeigt). Insgesamt wurden durch die zwei Flag-Reinigungen etwa 580 µg mPSF-Komplex gereinigt (entspricht ca. 1,4 nmol mPSF). Die chemische Konzentration des Komplexes in den Haupteluatfraktionen („E2“) der beiden Reinigungen wurde densitometrisch mit 690, bzw. 340 nM bestimmt (anhand der hFip1-Bande in Coomassie-gefärbten Gelen).

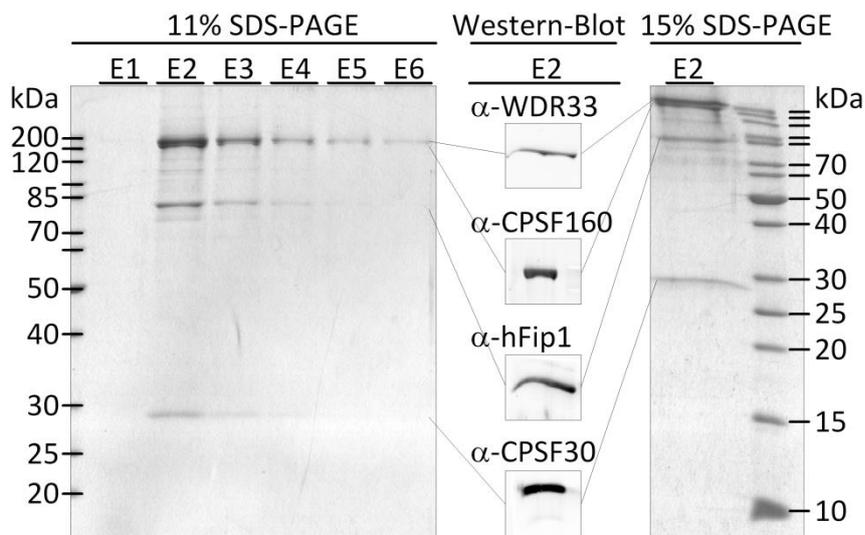


Abbildung 2.10: mPSF nach Flag-Affinitätschromatographie.

Ausschnitte von Coomassie-gefärbten 11%, bzw. 15% SDS-PA-Gelen, sowie Western-Blot-Analyse der Flag-Eluatfraktion „E2“ (finale Reinigungsfraktion). Die untersuchten Fraktionen sind oben benannt, Molekulargewichte der Markerbanden sind jeweils an den Außenseiten zugeordnet. Zum Nachweis verwendete Antikörper sind über den jeweiligen Western-Blot-Signalen angegeben. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot.

2.1.5 Charakterisierung des mPSF-Komplexes

Mit der densitometrischen Quantifizierung der Proteinbanden für alle vier mPSF-Untereinheiten aus einem Coomassie-gefärbten Gel nach SDS-PAGE als Grundlage wurde versucht, die Stöchiometrie der mPSF-Untereinheiten im Komplex abzuschätzen. Da CPSF160 und WDR33 im Gel nicht voneinander getrennt werden, konnte über das Verhältnis dieser beiden Proteine zueinander keine Aussage getroffen werden. Nach diesen Bestimmungen scheint hFip1 etwa in 1,8-fachem Überschuss und CPSF30 in ca. dreifachem Überschuss gegenüber CPSF160 und WDR33 vorzuliegen. Diese Angaben sind jedoch stark von der Anfärbbarkeit der entsprechenden Proteine in der Coomassie-Färbung beeinflusst. Um den Anteil aktiven Proteins in der mPSF-Präparation zu bestimmen, wurden stöchiometrische *In-Vitro*-Polyadenylierungsreaktionen durchgeführt. Anhand dieser ließ sich die Konzentration an aktivem mPSF-Komplex berechnen: Zunächst wurden Polyadenylierungskinetiken mit äquimolaren Mengen von L3prä wt RNA und Poly(A)-Polymerase (4 nM) sowie ebenso äquimolaren Mengen oder einem Überschuss (16 nM) an mPSF aufgenommen. Proteine und RNA wurden zusammen vorinkubiert und die Reaktionen durch ATP-Zugabe gestartet (Assay zu sehen in Abbildung 9.5.A im Anhang). In Abbildung 2.11.A ist die graphische Auswertung der Polyadenylierungskinetiken dargestellt. Man sieht, dass die Reaktionen in zwei Phasen abliefen: In den ersten zehn Sekunden oder weniger war ein sprunghafter Anstieg polyadenylierter RNA (*burst phase*) zu beobachten, danach nahm die Reaktionsrate deutlich ab (*steady-state phase*). Die Phase des sprunghaften Anstiegs reflektiert vermutlich die Aktivität der während der Vorinkubation geformten Polyadenylierungskomplexe, während die zweite Phase der Reaktion den Umsatz der RNA im Fließgleichgewicht widerspiegelt. Im nächsten Schritt wurden Polyadenylierungsreaktionen mit Vorinkubation und einer anschließenden Inkubationszeit von nur zehn Sekunden durchgeführt, es wurde also lediglich in der Phase des sprunghaften Anstiegs gemessen. Zu gleichbleibenden Mengen an mPSF (4 bzw. 16 nM) wurden dabei steigende Mengen L3prä wt RNA und Poly(A)-Polymerase im 1:1-Verhältnis titriert (Assay zu sehen in Abbildung 9.5.B im Anhang). Die graphische Auswertung dieses Experiments in Abbildung 2.11.B zeigt, dass bei der höchsten Konzentration an RNA und Poly(A)-Polymerase die Menge an polyadenylierter RNA ungefähr der eingesetzten chemischen Menge an mPSF entsprach (4,8 nM bei 4 nM eingesetztem mPSF, bzw. 13,8 nM bei 16 nM eingesetztem mPSF). Kontrollreaktionen ohne mPSF zeigen, dass der Hintergrund an mPSF-unabhängiger Polyadenylierung, auch bei hohen Konzentrationen an RNA und Poly(A)-Polymerase, vernachlässigbar war. Für die hier verwendete mPSF-Präparation mit einer chemischen Konzentration von 340 nM konnte eine Konzentration zwischen 300 und 420 nM aktiven mPSF-Komplexes nachgewiesen werden. Die Menge an aktivem mPSF-Komplex in der betrachteten Präparation entspricht somit sehr gut der densitometrisch bestimmten, chemischen Menge an mPSF. Der dargestellte mPSF-Komplex ist folglich vollständig aktiv. Weiterhin beweist dieses Experiment, dass die beobachtete Polyadenylierungsaktivität wirklich auf die rekombinanten Proteine und nicht auf Kontaminationen geringer Konzentration (endogene Proteine aus den Sf21-Zellen) zurückzuführen ist. Möglicherweise unterschätzt diese Bestimmung noch die tatsächliche Konzentration an aktivem mPSF, da in den gezeigten Reaktionen eine Sättigung des mPSF-Komplexes mit RNA und Poly(A)-Polymerase nicht erreicht werden konnte.

Peter Schäfer hat gezeigt, dass mPSF für verschiedene RNA-Substrate (Wigley10-Oligonukleotide und L3prä RNA, vgl. Abbildung 9.9 im Anhang) einen apparenten K_D von etwa 2 nM aufweist [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 3.C und D]. Die Bindung von mPSF an RNA-Varianten mit mutiertem Polyadenylierungssignal (Wigley10 Δ und L3prä Δ) lag im Hintergrundbereich. Der mPSF-Komplex besitzt folglich eine hohe Affinität für RNA, die Bindung ist außerdem sehr spezifisch für das Polyadenylierungssignal.

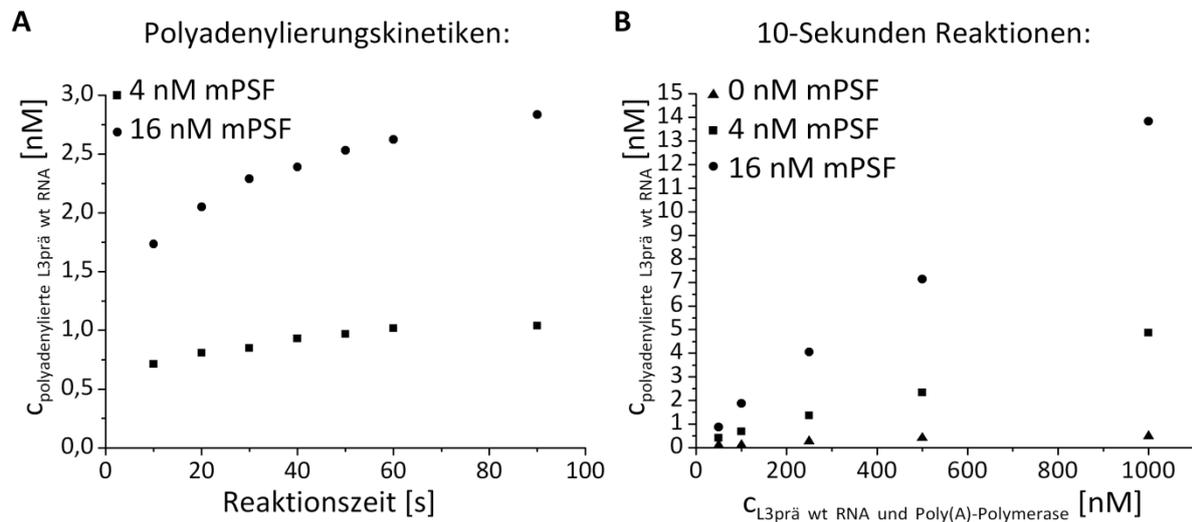


Abbildung 2.11: Graphische Auswertungen zur Quantifizierung von aktivem mPSF-Komplex.

A: Es wurden Polyadenylierungskinetiken (Abbildung 9.5.A im Anhang) mit 4 nM L3prä wt RNA, äquimolarer Menge an Poly(A)-Polymerase und 4, bzw. 16 nM mPSF aufgenommen. Signale polyadenylierter RNA wurden densitometrisch aus dem Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE quantifiziert. **B:** Gleichbleibende Mengen an mPSF (0, 4, bzw. 16 nM) wurden mit steigenden Mengen L3prä wt RNA und Poly(A)-Polymerase versetzt. Nach Vorinkubation von Proteinen und RNA wurden die Reaktionen durch ATP-Zugabe gestartet und nach einer Reaktionszeit von zehn Sekunden gestoppt (Abbildung 9.5.B im Anhang). Die Reaktionen ohne mPSF (Dreiecke) zeigen, dass der mPSF-unabhängige Hintergrund an Polyadenylierung vernachlässigbar war. Signale polyadenylierter RNA wurden densitometrisch aus dem Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE quantifiziert.

Die RNA-Bindung durch mPSF wurde weiterhin von Peter Schäfer mittels *crosslinking* untersucht. Dabei wurden hauptsächlich zwei *crosslinks* mit Proteinen von 160 und 30 kDa nachgewiesen [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 4.A]. Der Einsatz von Oligonukleotiden mit 5-Iod-Uridin-Austausch im Polyadenylierungssignal (iWigley10) führte zu einer erhöhten *crosslinking*-Effizienz, aber identischen Ergebnissen. Diese Vernetzungsreaktionen wurden denaturiert und einer Präzipitation mit Nickel-NTA-Agarose (N-terminaler MycHis-tag an WDR33), bzw. Immunopräzipitation mit CPSF30-Antikörper unterzogen [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 4.A und B]. Die Immunopräzipitation von CPSF30 führte zur Anreicherung des *crosslinks* bei 30 kDa, entsprechend belegt diese chemische Vernetzung die Bindung von CPSF30 an das eingesetzte Oligonukleotid. GleichermäÙen führte die Präzipitation von WDR33 zu einer Anreicherung des *crosslinks* bei 160 kDa, wodurch dieser *crosslink* dem WDR33-Protein zugeordnet werden konnte. Im Folgenden wurden entsprechende *crosslink*-Reaktionen nach der Denaturierung und vor der Präzipitation mit Nickel-NTA-Agarose mit der Protease Lys-C partiell verdaut [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 4.C]. Dabei wurde ein *crosslink* mit einem N-terminalen Fragment von WDR33 isoliert. Die beobachtete RNA-Bindung von WDR33 wird folglich durch den N-Terminus und somit durch die WD40-repeats bewerkstelligt.

In der Arbeitsgruppe von Michaela Zavolan (Universität Basel) wurden schließlich auch PAR-CLIP-Experimente mit WDR33 durchgeführt, welche die Bindung des Proteins *in vivo* an mRNAs im oder in direkter Nähe zum Polyadenylierungssignal belegen [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 5.A und B].

Zur Abschätzung des nativen Molekulargewichts vom mPSF wurde eine Größenausschlusschromatographie (Superdex 200) durchgeführt. Wie in Abbildung 2.12 zu erkennen ist, eluierte ein Teil der rekombinanten Proteine im Ausschlussvolumen der Säule („V₀“). In den Fraktionen „A1“ bis „A5“, welche kurz hinter dem Ausschlussvolumen liegen, war jedoch ein zusätzlicher Elutionspeak für alle vier Proteine zu verzeichnen. Die Identität der in Abbildung 2.12 sichtbaren Proteinbanden wurde durch

Western-Blot-Analysen bestätigt (Daten nicht gezeigt). Die Fraktionen der Gelfiltration wurden auf ihre Aktivität hin überprüft: Die höchste Aktivität in der Polyadenylierung (Abbildung 9.6 im Anhang), als auch in Filterbindungsassays (Daten nicht gezeigt) wurde in der Fraktion „A3“ gemessen. Im Ausschlussvolumen war jedoch auch CPSF-Aktivität zu verzeichnen. Die ermittelte Aktivität geht also mit dem Elutionsprofil der Proteine einher. Der Bereich der Fraktion „A3“ entspricht einem nativen Molekulargewicht von über 800 kDa, was höher liegt, als man es für einen Komplex aus den vier Proteinen CPSF30, CPSF160, hFip1 und WDR33 erwarten würde (etwa 400 kDa wenn jede Untereinheit einmal im Komplex vertreten ist). Die Elution eines nicht unerheblichen Teils von mPSF im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule deutet zudem zumindest auf eine partielle Aggregation der rekombinanten Proteine hin. Auf einer anderen Gelfiltrationssäule mit größerem Trennbereich für hohe Molekulargewichte (Superose 6) eluierte nur ein sehr kleiner Teil von mPSF im Ausschlussvolumen (weniger als 1%). Stattdessen verteilte sich der mPSF-Komplex sehr breit über spätere Fraktionen mit einem nativen Molekulargewicht zwischen 0,1 und 20 MDa (Daten nicht gezeigt). Dies spricht ebenfalls für eine zumindest partielle Aggregation der rekombinanten Proteine.

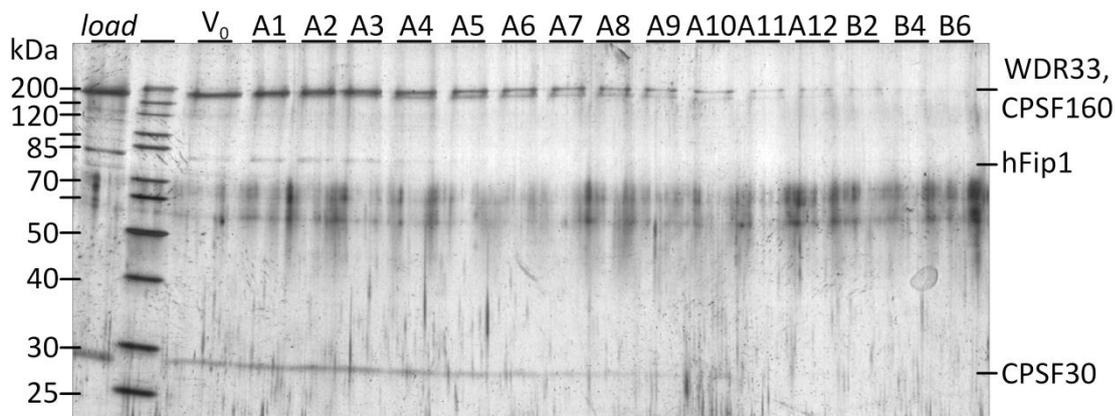


Abbildung 2.12: Größenausschlusschromatographie von mPSF.

Silbergefärbtes 11% SDS-PA-Gel. Die untersuchten Fraktionen sind oben angegeben, die Molekulargewichte der Markerbanden am linken Bildrand zugeordnet und die Laufhöhen der mPSF-Untereinheiten an der rechten Seite gekennzeichnet. Die Identität der sichtbaren Proteinbanden wurde mittels Western-Blot-Analysen überprüft (Daten nicht gezeigt). Die Fraktion des Ausschlussvolumens ist mit „V₀“ benannt.

Eine sehr interessante Funktion von CPSF in der Polyadenylierung ist die kooperative Stimulation der Poly(A)-Polymerase zusammen mit dem nukleären Poly(A)-bindenden Protein 1 (PABPN1) und die damit verbundene Längenkontrolle der Polyadenylierung (zusammengefasst in Abschnitt 1.2.2 der Einleitung, ausführlich beschrieben in Kühn *et al.*, 2009). Um zu untersuchen, ob auch der rekombinante mPSF-Komplex in der Lage ist, kooperativ mit PABPN1 in der Polyadenylierung zu agieren und die Größe der gebildeten Poly(A)-Schwänze zu limitieren, wurden *In-Vitro*-Polyadenylierungen mit mPSF und rekombinantem PABPN1 (Protein in voller Länge ohne Fusionspeptid, beschrieben in [Fronz *et al.*, 2008]) durchgeführt (Abbildung 2.13). Damit PABPN1 von Beginn an Einfluss auf die Reaktion nehmen kann, wurde für diese Polyadenylierungsreaktionen ein oligoadenyliertes RNA-Substrat (L3prä-A₁₅ wt, vgl. Abbildung 9.9 im Anhang) verwendet. PABPN1 kann somit schon von Beginn der Reaktion an auf dem kurzen Oligo(A)-Schwanz von 15 Nukleotiden der Substrat-RNA binden und die Poly(A)-Polymerase stimulieren. Aus Abbildung 2.13 wird ersichtlich, dass sowohl PABPN1 als auch der mPSF-Komplex die Aktivität der Poly(A)-Polymerase steigerten. Diese Stimulation wurde verstärkt (kooperativer Effekt) wenn PABPN1 und mPSF in den Reaktionen vorhanden waren. Hier ist dann auch zu beobachten, dass die Poly(A)-Polymerase sehr schnell und prozessiv agierte und bereits nach kurzer Reaktionszeit (30 Sekunden) wenige, aber sehr lange Poly(A)-Schwänze gebildet wurden. In der fortlaufenden Reaktion

wurden diese Poly(A)-Schwänze dann deutlich langsamer verlängert, stattdessen wurde weitere Substrat-RNA polyadenyliert. Das beobachtete Reaktionsverhalten von PABPN1 und mPSF entspricht dementsprechend den Erwartungen: Die beiden Proteinpräparationen haben einen kooperativen Effekt auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase und die Polyadenylierung ist auf Poly(A)-Schwänze einer bestimmten Länge (ca. 300 Nukleotide in den hier gezeigten Reaktionen) limitiert.

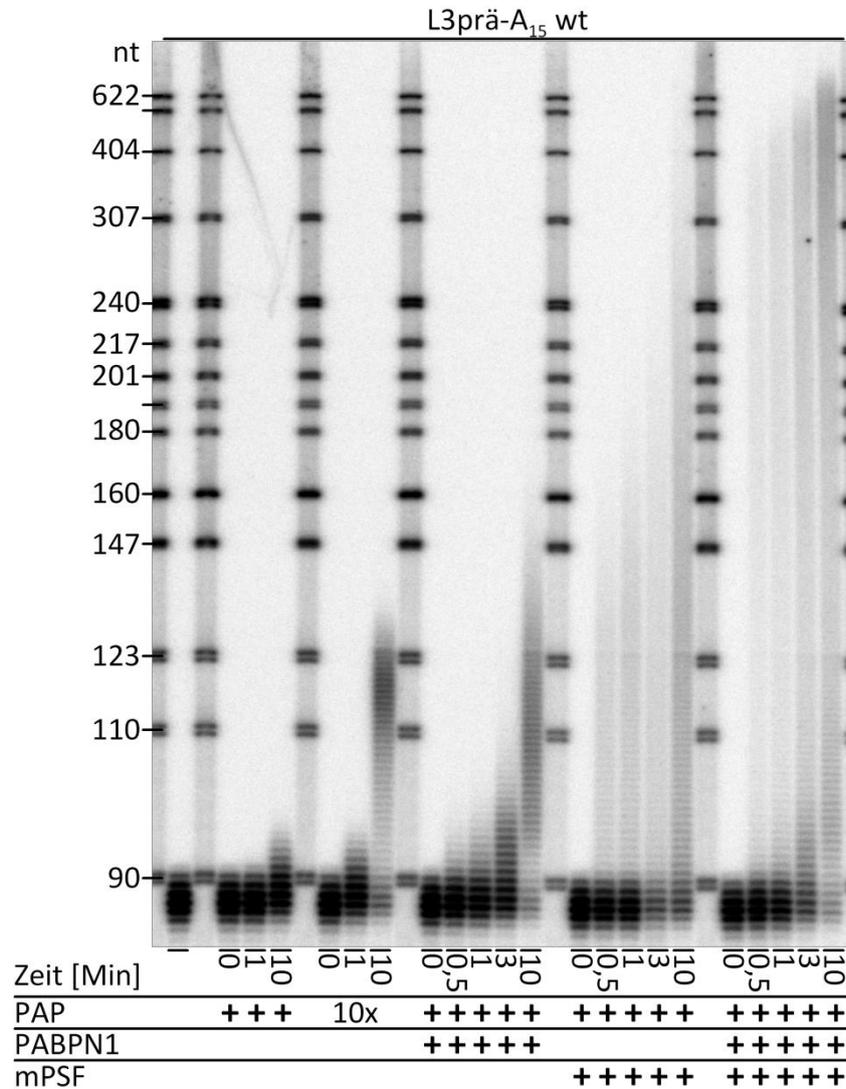


Abbildung 2.13: Längenkontrolle in der Polyadenylierung mit mPSF.

Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse der Längenkontrolle der Polyadenylierung. Es wurden Polyadenylierungskinetiken mit 4 nM L3prä-A₁₅ wt RNA, 0,4 nM Poly(A)-Polymerase (PAP), 4 nM mPSF und 60 nM rekombinantem PABPN1 aufgenommen. Die Reaktionszeiten sind unten (in Minuten) angegeben. Die erste Spur von links zeigt nur die eingesetzte RNA, es folgen drei Spuren mit der einfachen Menge an Poly(A)-Polymerase und drei Spuren mit der zehnfachen Menge an Poly(A)-Polymerase. Anschließend sind Kinetiken mit PABPN1, mPSF und beiden Proteinpräparationen zu sehen. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind an der linken Seite zugeordnet.

2.1.6 Koexpression von mPSF und Symplekin

Eine putative Untereinheit von CPSF stellt das Protein Symplekin dar. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob Symplekin mit dem mPSF-Komplex interagiert und ob das Protein einen Einfluss auf die Aktivität des mPSF-Komplexes in der Polyadenylierung ausübt. Zu diesem Zweck wurde eine weitere Expression von mPSF angesetzt (High-Five-Zellen, 500 ml bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml, Baculovirus pBac-MycHisWDR33-hFip1^{loxP}-F160-30^{Tn7}) und mit dem Baculovirus pBac-CFP-HisSymplekin^{Tn7} koinfiziert. Die Reinigung des Komplexes erfolgte analog zur Reinigung des mPSF-Komplexes: Nach dem Zellaufschluss bei 250 mM Kaliumchlorid wurde das Zelllysate auf eine Anionenaustauschchromatographie (DEAE-Sepharose) appliziert, der Durchfluss der Säule gesammelt und auf eine IMAC-Säule gegeben. Die Reinigung an immobilisierten Metallionen wird hier vermutlich ausschließlich über den N-terminalen MycHis-tag an WDR33 gewährleistet, da der His-tag an Symplekin nicht funktionstüchtig ist, selbst wenn das Protein einzeln exprimiert wird (Daten nicht gezeigt). Die Haupteluatfraktion nach IMAC wurde dialysiert und einer Flag-Affinitätschromatographie unterzogen.

Wie in Abbildung 2.14.A zu sehen ist, ähnelt das Gelbild des hier gereinigten Komplexes nach der Flag-Affinitätsreinigung sehr dem zuvor präparierten mPSF-Komplex. Eine zusätzliche Bande für Symplekin (bei etwa 135 kDa) ist im Coomassie-gefärbten Gel nicht erkennbar. Um den Verbleib des Proteins Symplekin während der Reinigung zu klären, wurden Western-Blot-Analysen mit Fraktionen aller Reinigungsstufen durchgeführt. In der entsprechenden Abbildung 2.14.B sieht man, dass Symplekin zwar bis zum Ende der Reinigung (in der Haupteluatfraktion der Flag-Affinitätschromatographie) nachweisbar ist, im Laufe der Reinigung aber sowohl im Durchfluss der IMAC als auch im Durchfluss der Flag-Säule Teile des Proteins zurückbleiben. Daher scheint Symplekin zumindest nicht sehr stabil mit den Untereinheiten des mPSF-Komplexes zu interagieren. Da dennoch eine nachweisbare Menge an Symplekin in der finalen Eluatfraktion „E2“ der Flag-Säule vorhanden war, sollte ein möglicher Einfluss dieses Proteins auf die mPSF-Aktivität in der Polyadenylierung getestet werden. Zu diesem Zweck wurde die neue mPSF-Präparation mit Symplekin, vergleichend zum zuvor präparierten mPSF, in einer *In-Vitro*-Polyadenylierung analysiert. Der entsprechende Polyadenylierungsassay ist in Abbildung 2.14.C gezeigt. Es ist zu erkennen, dass der neu präparierte mPSF-Komplex mit Symplekin zu einer vergleichbaren Stimulation der Poly(A)-Polymerase führt wie der mPSF-Komplex für sich. Die Spezifität der Polyadenylierung für das Polyadenylierungssignal ist ebenso vergleichbar ausgeprägt. Die verbleibenden Mengen an Symplekin in der Flag-Eluatfraktion haben demnach keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivität von mPSF in der Polyadenylierung.

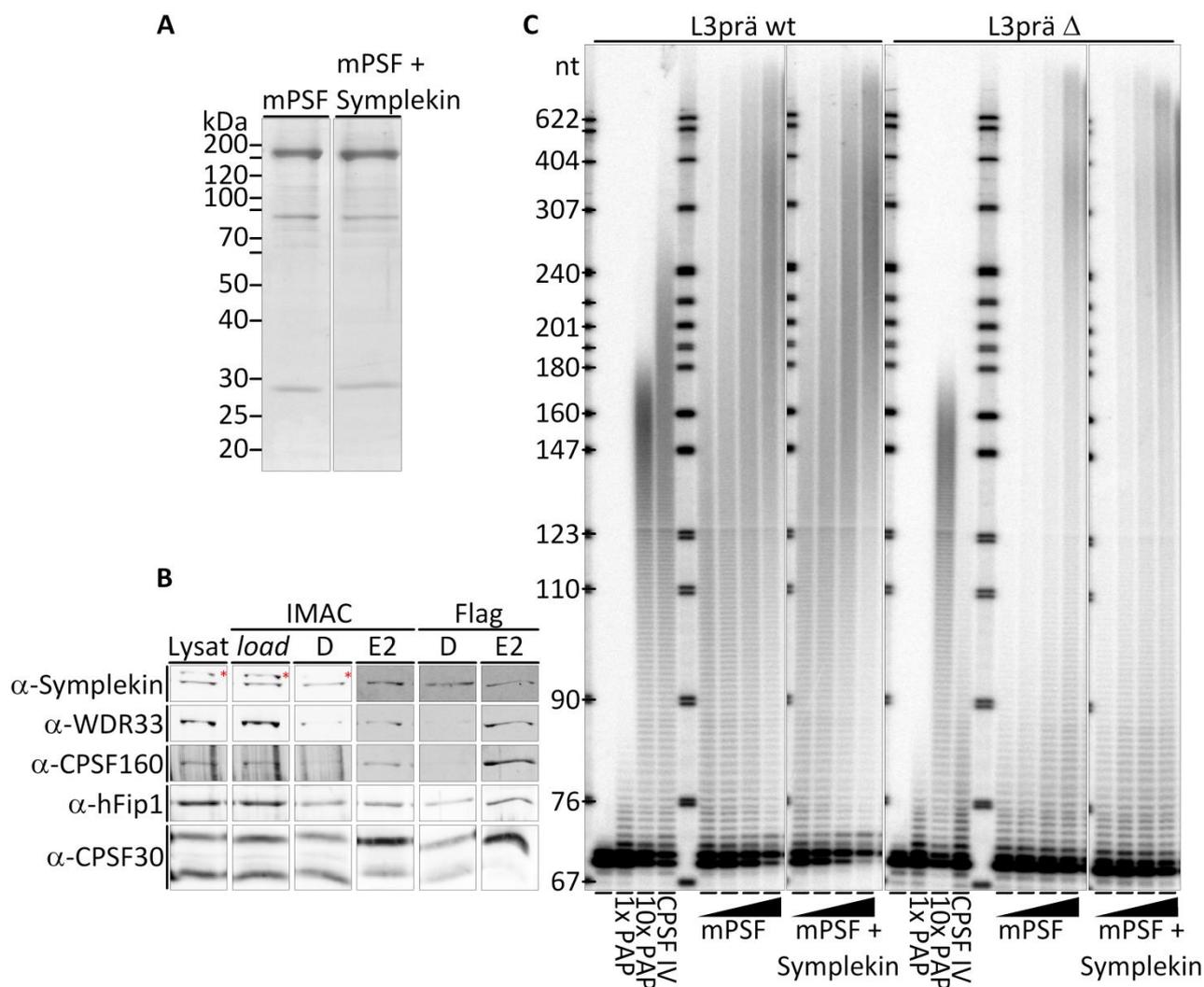


Abbildung 2.14: Koexpression von mPSF mit Symplekin, vergleichende *In-Vitro*-Polyadenylierung.

A: Ausschnitte eines Coomassie-gefärbten 11% SDS-PA-Gels zur vergleichenden Analyse der Haupteluatfraktionen nach Flag-Affinitätschromatographie für mPSF allein und mPSF mit Symplekin. Untersuchte Fraktionen sind oben angegeben, die Größen der Markerbanden sind an der linken Seite zugeordnet. **B:** Ausgewählte Signale der Western-Blot-Analyse zur Reinigung von mPSF mit Symplekin. Die untersuchten Fraktionen (D = Durchfluss, E2 = Haupteluatfraktion) sind oben angegeben, die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind links aufgeführt. Die mit roten Sternen markierten Signale in den ersten drei Spuren für Symplekin sind verbleibende Signale für WDR33, welches zuvor auf dem Blot detektiert wurde. Alle Signale der ersten drei Spuren sowie alle Signale der letzten drei Spuren stammen jeweils von einem Blot. **C:** Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur vergleichenden Analyse der Polyadenylierungsaktivität von mPSF und mPSF mit Symplekin auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, es wurden vier verschiedene Mengen (1, 2, 4 und 8 nM) der beiden Proteinpräparationen eingesetzt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs) und zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs). Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind an der linken Seite zugeordnet.

2.2 Versuche zur Rekonstitution der Prä-mRNA Spaltung

An der Spaltungsreaktion der 3'-Prozessierung eukaryotischer mRNAs sind neben Poly(A)-Polymerase und CPSF noch die Multiproteinkomplexe CstF, CF I und CF II beteiligt. Zusätzlich zu diesen etablierten 3'-Prozessierungsfaktoren sind aber möglicherweise noch weitere Proteine essentiell für die Spaltungsreaktion (vgl. Abschnitt 1.4 der Einleitung). Für Rekonstitutionsversuche der Spaltungsreaktion (Abschnitt 2.2.6) wurden die im Folgenden beschriebenen Proteinpräparationen von CstF, CF I, CF II, Rbbp6, Ssu72, phosphorylierter CTD und WDR82 verwendet.

2.2.1 Präparation von CstF, CF I und CF II

CstF, CF I und CF II wurden von Peter Schäfer gereinigt. Die drei 3'-Prozessierungsfaktoren wurden mit Hilfe der Baculoviren pBac-mCherry^{loxP}-CstF^{Tn7}, pBac-YFP^{loxP}-CF I^{Tn7} und pBac-YFP^{loxP}-CF II^{Tn7} in Sf21-Zellen als Komplexe exprimiert und anschließend gereinigt. Als erster Reinigungsschritt wurde bei allen drei Proteinkomplexen eine Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC) angewandt (N-terminale His-tags an CstF-77, CF I-25 und Clp1). Im Falle von CstF erfolgte anschließend eine Anionenaustauschchromatographie (Resource Q), von welcher die in Abbildung 2.15 gezeigte Haupteluatfraktion „A12“ für die späteren Rekonstitutionsversuche verwendet wurde. Der CF I-Komplex wurde im zweiten Schritt mittels Strep-Affinitätschromatographie (N-terminaler Strep-tag an CF I-25) weiter gereinigt, die Eluatfraktion „E4“ dieser Reinigung ist in Abbildung 2.15 dargestellt und wurde für Rekonstitutionsversuche verwendet. CF II wurde, analog zum CstF-Komplex, mittels Anionenaustauschchromatographie (Mono Q) weiter gereinigt, hier wurde die Eluatfraktion „B11“ für die später gezeigten Rekonstitutionsversuche ausgewählt. Auch diese Fraktion ist in Abbildung 2.15 dargestellt.

Die drei 3'-Prozessierungskomplexe wurden hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Bindung an RNA sowie im Falle von CF II zusätzlich hinsichtlich der 5'-Polynukleotidkinaseaktivität von Clp1 untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass alle drei Proteinkomplexe an das RNA-Substrat SV40late wt (vgl. Abbildung 9.9 im Anhang) binden, die bestimmten Affinitäten (K_{50} -Werte) für die angebotene Substrat-RNA betragen im Fall von CstF 10 nM, für CF I 100 nM und für CF II 0,5 nM (nicht-veröffentlichte Daten von Elmar Wahle und Peter Schäfer). Hinsichtlich ihrer RNA-Bindung sind die präparierten Komplexe folglich aktiv. Für Clp1 konnte weiterhin eine eindeutige 5'-Polynukleotidkinaseaktivität nachgewiesen werden (nicht-veröffentlichte Daten von Peter Schäfer).

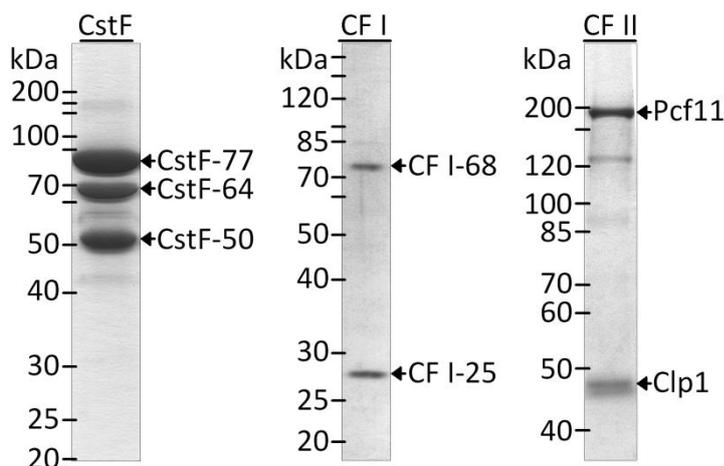


Abbildung 2.15: Präparationen von CstF, CF I und CF II für die Rekonstitution der Spaltung.

Ausschnitte von Coomassie-gefärbten Gelen nach SDS-PAGE (11% für CstF und CF I, 9% für CF II). Bei dem gezeigten CstF handelt es sich um Fraktion „A12“ nach Resource Q-Fraktionierung, die Abbildung für CF I zeigt die vierte Eluatfraktion einer Strep-Affinitätschromatographie und von CF II ist die Fraktion „B11“ nach Mono Q-Fraktionierung gezeigt. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind links jeden Gelausschnitts zugeordnet.

2.2.2 Versuch zur Präparation von Rbbp6

Es wurden mehrere Versuche unternommen, Rbbp6 einzeln darzustellen und zu reinigen. Jedoch wurde das Protein nur sehr ineffizient in voller Länge in Insektenzellen produziert und war im Laufe der Reinigungen weiterhin sehr anfällig für proteolytischen Abbau (Daten nicht gezeigt). Um dennoch rekombinantes Rbbp6 zu gewinnen, wurde versucht das Protein zusammen mit CPSF (7er-Komplex, Abschnitte 2.2.4 und 2.2.5), CstF, CF I oder CF II zu exprimieren und zu reinigen. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass rekombinantes Rbbp6 Interaktionen mit dem CF I-Komplex eingeht und zusammen mit diesem Komplex gereinigt werden kann. Für das Experiment wurden High-Five-Zellen (90 ml bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) mit den Baculoviren pBac-YFP^{loxP}-Strep-Rbbp6^{Tn7} und pBac-YFP^{loxP}-CF I^{Tn7} koinfiziert, um die Expression von Rbbp6 und des CF I-Komplexes zu induzieren. Das gewonnene Zelllysat wurde einer IMAC unterzogen (N-terminaler His-tag an CF I-68) und die Eluatfraktionen mittels Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Rbbp6 hin untersucht. Die entsprechende Reinigung ist in Abbildung 2.16 gezeigt. Rbbp6 konnte (mittels Western-Blot, in voller Länge) in der Eluatfraktion „E2“ der IMAC nachgewiesen werden, wurde also mit dem CF I-Komplex mitgereinigt. Obwohl die IMAC-Eluatfraktionen noch viele kontaminierende Proteinbanden enthält, wurde zunächst auf eine weitere Reinigung des Komplexes aus CF I und Rbbp6 verzichtet und die Fraktionen „E2“ und „E4“ direkt für Rekonstitutionsversuche der Spaltung genutzt.

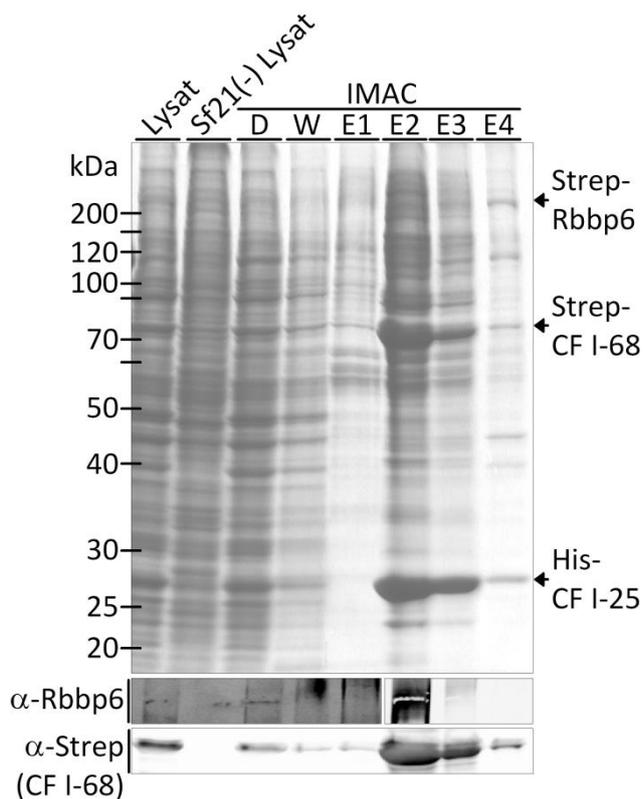


Abbildung 2.16: Reinigung eines Komplexes aus CF I und Rbbp6.

Coomassie-gefärbtes 11% SDS-PA-Gel sowie Western-Blot-Analyse von Fraktionen der IMAC zur Reinigung von CF I und Rbbp6. Die untersuchten Fraktionen sind oben benannt (Sf21(-) SL = lösliches Zelllysat aus unbehandelten Sf21-Zellen, D = Durchfluss, W = Waschfraktion, E = Eluate), die erwarteten Laufhöhen der rekombinanten Proteine sind rechts angegeben. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind an der linken Seite zugeordnet. Ebenso links angegeben sind die in der Western-Blot-Analyse verwendeten Antikörper. Für die Detektion von Rbbp6 wurde ein separater Blot aus einem 6% SDS-PA-Gel angefertigt.

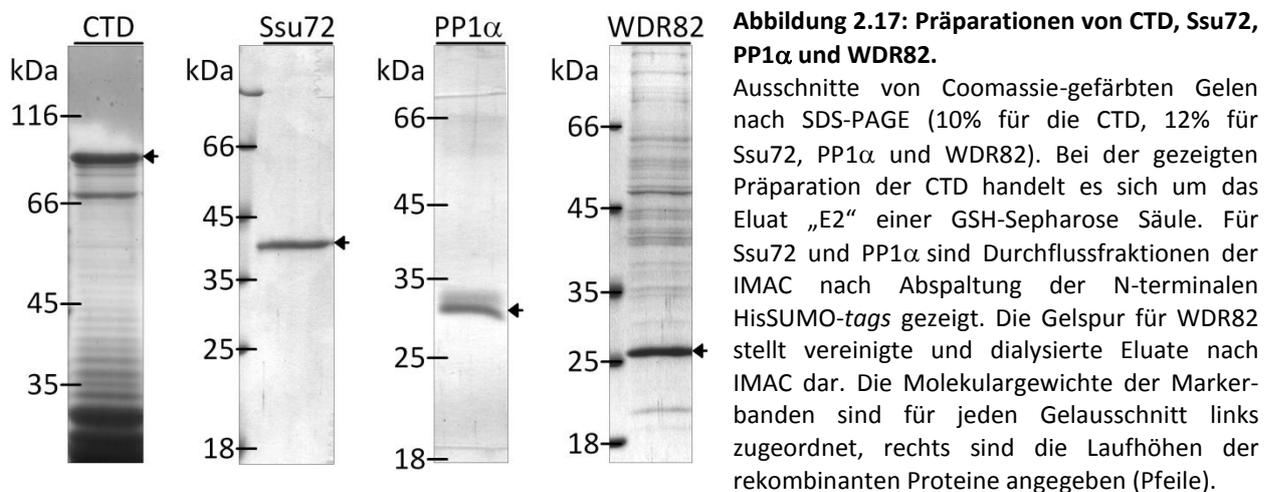
Als Kontrolle für die Spezifität der beobachteten Reinigung von Rbbp6 mit CF I wurde Rbbp6 parallel auch mit dem CF II-Komplex (N-terminaler His-tag an Clp1) koexprimiert und mittels IMAC gereinigt. Es konnte aber kein Rbbp6 in den Eluatfraktionen dieser Affinitätschromatographie nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), die Koreinigung des Proteins mit CF I scheint daher spezifisch und kein Resultat unspezifischer Bindung von Rbbp6 an die verwendete Säulenmatrix zu sein.

2.2.3 Präparationen von WDR82, PP1 α , Ssu72 und phosphorylierter CTD

Die C-terminale Domäne der RNA-Polymerase II (CTD) wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* hergestellt, die Reinigung erfolgte mittels einer Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose [Bachelorarbeit Schmidt, 2015]. Die Eluatfraktion „E2“, welche für spätere Rekonstitutionsversuche verwendet wurde, ist in Abbildung 2.17 dargestellt. Um den nativen Status der CTD zu simulieren, wurde das präparierte Protein weiterhin mit p42 MAP Kinase *in vitro* phosphoryliert, dabei wurden ca. 10 bis 20% aller Serin- und Threonin-Seitenketten mit einem Phosphatrest versehen [Bachelorarbeit Schmidt, 2015].

Die beiden Phosphatasen Ssu72 und PP1 α wurden als HisSUMO-Fusionsproteine in *E. coli* hergestellt. Die Reinigung beider Proteine erfolgte über eine doppelte Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC). Zwischen den beiden Reinigungsschritten wurde vorhandenes Imidazol durch Dialyse entfernt und der HisSUMO-tag durch Inkubation mit der SUMO-spezifischen Protease Ulp1 abgespalten. Bei der zweiten IMAC verblieben die Phosphatasen Ssu72 und PP1 α entsprechend im Durchfluss der Säule, die gesammelten Durchflussfraktionen sind für beide Proteine in Abbildung 2.17 gezeigt. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass beide rekombinanten Phosphatasen in der Lage sind, para-Nitrophenylphosphat *in vitro* zu dephosphorylieren, also folglich aktiv vorliegen [Bachelorarbeit Schmidt, 2015], (nicht-veröffentlichte Daten von Uwe Kühn).

WDR82 wurde unter Nutzung des Baculovirus pBac-YFP^{loxP}-HisWDR82^{Tn7} mit N-terminalem His-Fusionspeptid in High-Five-Zellen exprimiert. Die Reinigung des Proteins erfolgte via IMAC, die gewonnenen Eluatfraktionen wurden vereinigt und dialysiert. Die so erhaltene Präparation ist ebenfalls in Abbildung 2.17 dargestellt und wurde in späteren Rekonstitutionsversuchen verwendet.



2.2.4 Präparation von CPSF-Komplexen für die Spaltungsreaktion

Nachdem mPSF als minimaler CPSF-Komplex in der Polyadenylierung identifiziert werden konnte, sollte nun ein Komplex aus CPSF-Untereinheiten zusammengesetzt werden, welcher auch in der Spaltungsreaktion aktiv ist. Da sich der mPSF-Komplex einigermaßen gut löslich, daher auch handhabbar verhielt und weiterhin auch die spezifische Bindung des Polyadenylierungssignals als Aktivität in der Spaltungsreaktion notwendig ist, sollte der mPSF-Komplex als Grundlage für die Assemblierung größerer, in der Spaltungsreaktion aktiver Komplexe genutzt werden. Der mPSF-Komplex allein kann nicht spaltungsaktives CPSF repräsentieren, da die für die 3'-Prozessierung verantwortliche Endonuklease CPSF73 im mPSF-Komplex nicht vorhanden ist.

Es wurden Koexpressionen (je 500 ml Sf21-Zellen bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) von CPSF-Untereinheiten für die Herstellung der folgenden beiden Komplexe angesetzt: Ein 6er-Komplex bestehend aus mPSF und den beiden klassischen CPSF-Untereinheiten CPSF73 und CPSF100 (analog zum Komplex C in Abschnitt 2.1.2) sowie ein 7er-Komplex, welcher zusätzlich die putative CPSF-Untereinheit Symplekin enthält. Dafür wurden die Baculoviren pBac-MycHisWDR33-hFip1^{loxP}-F160-30^{Tn7} und pBac-mCherry-S73-100^{Tn7}, bzw. pBac-MycHisWDR33-hFip1^{loxP}-F160-30^{Tn7}, pBac-mCherry-S73-100^{Tn7} und pBac-HisSymplekin-CFP^{Tn7} verwendet. Die Expressionskulturen wurden geerntet, die Zellen aufgeschlossen und Zellysate präpariert. Mit dem Ziel, erste Aussagen über die Löslichkeit der Komplexe treffen zu können, wurde zunächst untersucht, welche Anteile der einzelnen Untereinheiten nach Zentrifugation löslich im Überstand (Zellysate), bzw. unlöslich im Pellet verblieben. Hierfür wurden Western-Blot-Analysen mit den entsprechenden Fraktionen der Zellaufschlüsse durchgeführt und die Anteile der Proteine in Überstand und Pellet densitometrisch quantifiziert. Die entsprechende Analyse sowie die Ergebnisse der Quantifizierung sind in Abbildung 2.18 dargestellt.

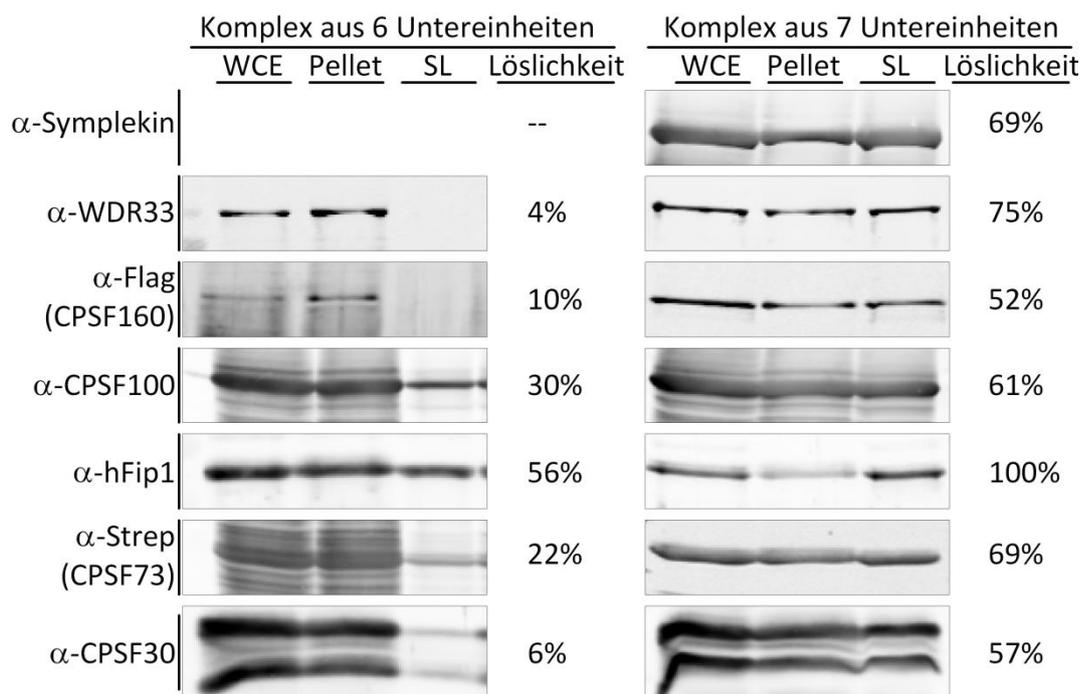


Abbildung 2.18: Analyse der Löslichkeit von Untereinheiten der 6er- und 7er-Komplexe nach Zellaufschluss.

Western-Blot-Analyse zur Beurteilung der Löslichkeit einzelner Untereinheiten nach Zellaufschluss für 6er- und 7er-Komplex. Die untersuchten Fraktionen der Zellaufschlüsse sind oben benannt (WCE = *whole cell extract* = Komplettzellextrakt, Pellet = Pellet nach Zentrifugation, SL = *soluble lysate* = löslicher Überstand nach Zentrifugation). Die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind an der linken Seite aufgeführt. Die Signalstärken für WCE und SL wurden densitometrisch quantifiziert und daraus der lösliche Anteil der einzelnen Proteine (in %) berechnet. Die Löslichkeit ist jeweils rechts der Western-Blot-Signale angegeben. Alle Signale eines Zellaufschlusses stammen jeweils von einem Blot.

Es ist zu erkennen, dass der lösliche Anteil nach Zellaufschluss für alle Proteine im Fall des 7er-Komplexes deutlich größer ist. Die Proteine WDR33, CPSF160 und CPSF30 sind im Zellaufschluss des 6er-Komplexes fast vollständig präzipitiert, während für den 7er-Komplex mehr als die Hälfte der genannten Proteine in Lösung blieb. Da die Aufschlussbedingungen für beide Präparationen vergleichbar waren, scheint die zusätzliche Koexpression von Symplekin einen positiven Einfluss auf die Löslichkeit der übrigen CPSF-Untereinheiten zu haben.

Die Zelllysate beider Präparationen wurden für einen initialen Reinigungsversuch zunächst einer Anionenaustauschchromatographie (DEAE-Sepharose) unterzogen, und der Durchfluss dieser ersten Säule wurde anschließend auf eine IMAC-Säule appliziert (N-terminaler MycHis-tag an WDR33). Für den 6er-Komplex konnten dabei nur minimale Mengen an Protein gewonnen werden (Daten nicht gezeigt), während für den 7er-Komplex alle Untereinheiten in den Eluatfraktionen der IMAC angereichert und somit zusammen eluiert werden konnten. Abbildung 2.19.A zeigt die Haupteluatfraktion der IMAC-Säule zur Reinigung des 7er-Komplexes im Vergleich zum zuvor präparierten mPSF-Komplex.

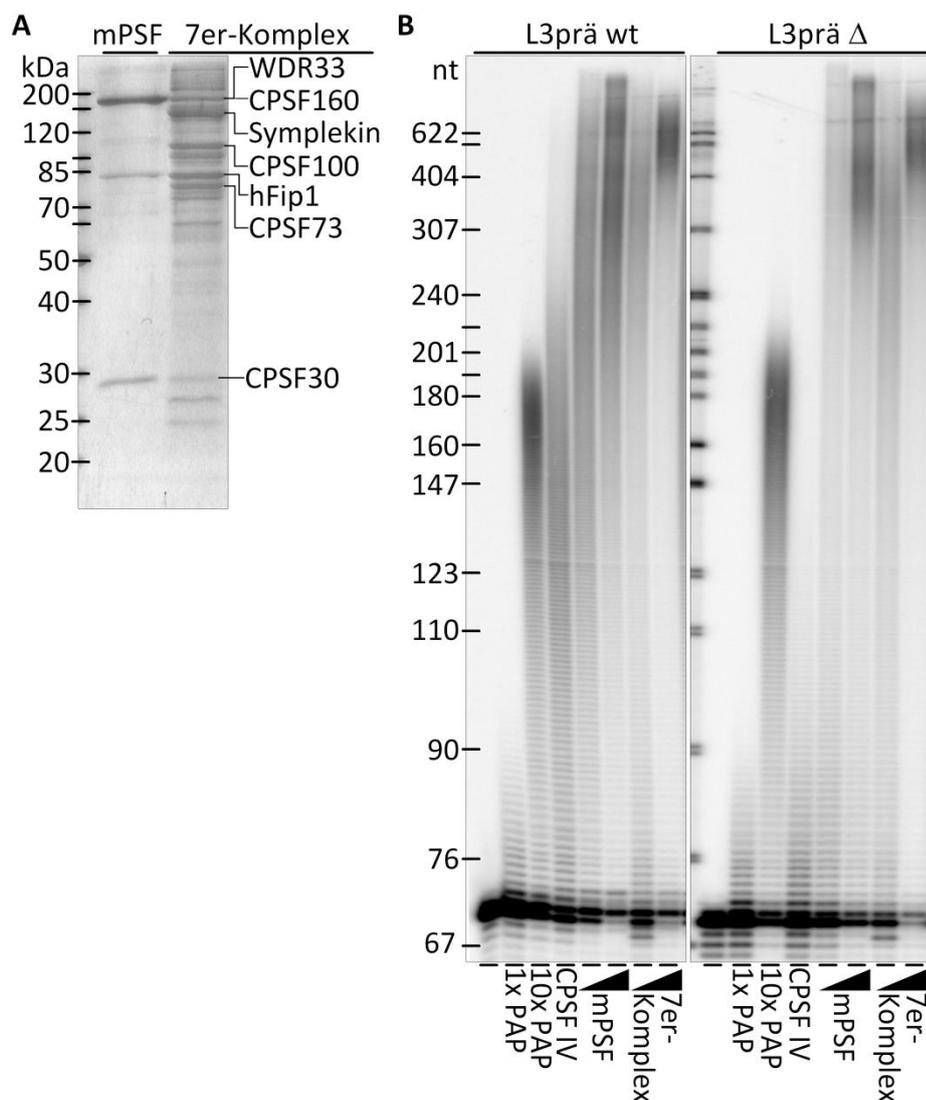


Abbildung 2.19: Vergleich von mPSF und einem CPSF-Komplex aus sieben Untereinheiten.

A: Ausschnitt eines Coomassie-gefärbten 11% SDS-PA-Gels zur vergleichenden Analyse von mPSF und einem 7er-Komplex aus CPSF-Untereinheiten. Die Proteinbanden in der rechten Gelspur wurden mittels Western-Blot-Analyse den respektiven CPSF-Untereinheiten zugeordnet (Daten nicht gezeigt), die entsprechende Zuordnung findet sich rechts des Gelbildes. Die Molekulargewichte der Markerbanden sind auf der linken Seite angegeben.

B: Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse der Polyadenylierungsaktivität von mPSF und 7er-Komplex auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt, es wurden jeweils zwei verschiedene Mengen (0,2 und 0,5 μ l) der beiden Proteinpräparation eingesetzt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs) und zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs). Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind an der linken Seite zugeordnet.

Die Anwesenheit aller koexprimierten Proteine des 7er-Komplexes in der IMAC-Eluatfraktion wurde mittels Western-Blot-Analyse bestätigt (Daten nicht gezeigt). Wie in Abbildung 2.19.B zu sehen ist, konnte ein stimulierender Einfluss dieser ersten Präparation des 7er-Komplexes auf die Poly(A)-Polymerase in der *In-Vitro*-Polyadenylierung nachgewiesen werden. Die Aktivität des 7er-Komplexes in der Polyadenylierung zeigte allerdings nur eine geringe Spezifität für das Polyadenylierungssignal, dies ist möglicherweise auf die relativ großen Mengen an hFip1 in der Präparation zurückzuführen. In Abbildung 2.19.A ist zu erkennen, dass die IMAC-Eluatfraktion, neben den gewünschten CPSF-Untereinheiten, noch etliche kontaminierende Proteinbanden aufweist, daher wurde im Folgenden eine weitere Reinigung des 7er-Komplexes versucht.

2.2.5 Reinigung und Charakterisierung eines CPSF-Komplexes aus sieben Untereinheiten

Zur weiteren Reinigung des Komplexes aus sieben CPSF-Untereinheiten wurde eine neue Expressionskultur (500 ml Sf21-Zellen bei $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml) durch Koinfektion mit den drei Baculoviren pBac-MycHisWDR33-hFip1^{loxP}-F160-30^{Tn7}, pBac-YFP^{loxP}-S73-100^{Tn7} und pBac-HisSymplekin-CFP^{Tn7} angesetzt. Im ersten Schritt der Reinigung wurde das Zelllysat einer Affinitätsreinigung unter Nutzung des N-terminalen MycHis-tags an WDR33 unterzogen. Die Haupteluatfraktion der IMAC wurde vereinigt, dialysiert und mittels Poly(A)-Säule (Poly(A)-Sepharose 4B) weiter fraktioniert. Ausgewählte Fraktionen dieser Reinigung sind in Abbildung 2.20 gezeigt; es wurden zusätzlich Western-Blot-Analysen durchgeführt, um die Anwesenheit aller sieben Untereinheiten in den entsprechenden Fraktionen nachzuweisen.

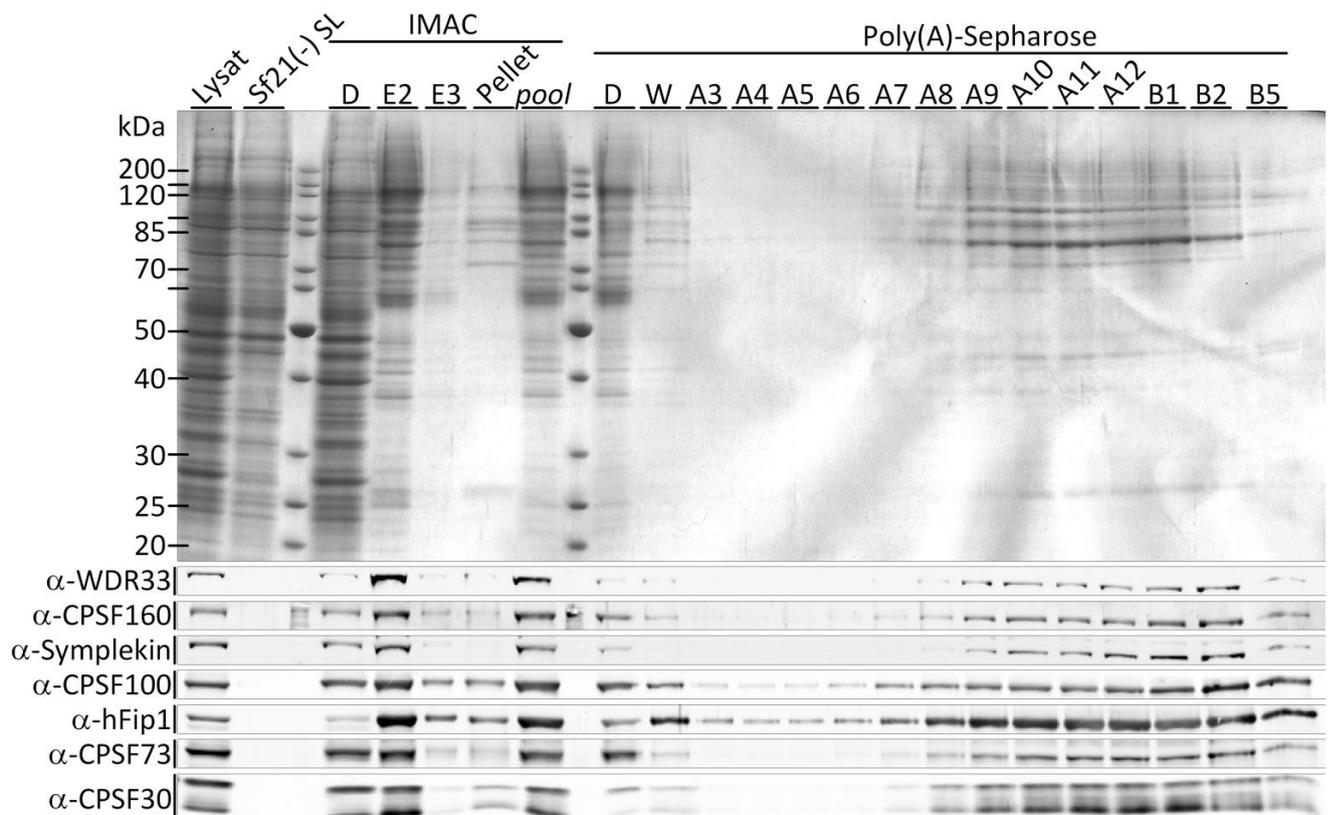


Abbildung 2.20: Wiederholung der Reinigung eines CPSF-Komplexes aus sieben Untereinheiten.

Ausschnitt eines Coomassie-gefärbten 11% SDS-PA-Gels zur Analyse der Reinigungsfraktionen des CPSF-7er-Komplexes. Untersuchte Fraktionen sind oben angegeben (Sf21(-) SL = Zelllysat unbehandelter Sf21-Zellen, D = Durchfluss, E = Eluat, Pellet = Pellet nach Dialyse und Zentrifugation, *pool* = vereinigte und dialysierte Eluate, W = Waschfraktion). Die CPSF-Untereinheiten wurden zusätzlich mittels Western-Blot-Analysen in den entsprechenden Fraktionen detektiert. Die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind links angegeben. Ebenso links findet sich die Zuordnung der Molekulargewichte der Markerbanden des Coomassie-gefärbten Gels.

Wie zu sehen ist, sind in den Eluatfraktionen der IMAC alle sieben CPSF-Untereinheiten deutlich angereichert. Der Großteil der Proteine bindet auf der Poly(A)-Säule und eluiert in einem breiten Peak. hFip1 wird in dieser Fraktionierung besonders stark angereichert, die entsprechende Bande bei rund 80 kDa ist im Coomassie-gefärbten Gel deutlich zu erkennen. Im Vergleich zu den anderen CPSF-Untereinheiten scheint hFip1 stöchiometrisch überrepräsentiert vorzuliegen.

Die Fraktionen „A7“ bis „B5“ der Poly(A)- Säule wurden vereinigt und mittels Ultrafiltration konzentriert, gleichzeitig wurde der Salzgehalt auf 100 mM Kaliumchlorid reduziert. Dieser Vorgang ist in Abbildung 2.21.A dokumentiert. Die Aktivität des Komplexes in der Polyadenylierung wurde vor und nach der Konzentrierung überprüft (Abbildung 2.21.B). Weder Protein, noch Polyadenylierungsaktivität scheint beim Prozess des Konzentrierens eingebüßt worden zu sein. Wie schon zuvor stimuliert der dargestellte 7er-Komplex die Poly(A)-Polymerase nur mit geringer Spezifität für das Polyadenylierungssignal. Je mehr Protein in der *In-Vitro*-Polyadenylierung eingesetzt wird, desto unspezifischer wird die Reaktion. Vermutlich ist die geringe Spezifität erneut durch einen Überschuss an hFip1 in dieser Proteinpräparation bedingt.

Um den 7er-Komplex in reinerer Form zu präparieren wurden weitere Versuche der Reinigung unternommen. Allerdings führten diese Versuche stets zum Zerfall des Komplexes und / oder Verlust der Polyadenylierungsaktivität (Daten nicht gezeigt). Beispielsweise verblieben in einer Strep-Affinitätschromatographie (N-terminaler Strep-tag an CPSF73) die vier mPSF-Untereinheiten im Durchfluss, während CPSF73, CPSF100 und Symplekin an die Strep-Säulenmatrix gebunden und eluiert werden konnten. Auf Säulen von anti-Flag-Agarose (N-terminaler Flag-tag an CPSF160) wurde nahezu kein Protein an die Säulenmatrix gebunden, vermutlich wird der Flag-tag im Komplex verdeckt und ist daher nicht mehr, wie noch im kleineren mPSF-Komplex, für Interaktionen mit der Säulenmatrix zugänglich. Bei der Dialyse zur Vorbereitung einer Anionenaustauschchromatographie (Verringerung des Salzgehaltes im Puffer) präzipitierte ein Großteil des Proteins und der Polyadenylierungsaktivität während der anschließenden Zentrifugation. Schließlich wurde geprüft, ob eine Größenausschlusschromatographie (Superose 6) als möglicher Reinigungsschritt für den 7er-Komplex in Frage kommt. Mit dieser analytischen Gelfiltration sollten außerdem Aussagen über das native Molekulargewicht sowie ein mögliches Aggregationsverhalten des Komplexes getroffen werden. Die Proteine des Komplexes eluierten zwar deutlich hinter dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule, es zeigten aber nicht alle Untereinheiten das gleiche Elutionsprofil: Die einzelnen Proteine eluierten versetzt zueinander (z.B. eluierten CPSF73 und CPSF100 früher, während hFip1, WDR33 und CPSF160 später von der Säule kamen), wodurch ein sehr breiter Elutionspeak entstand, welcher einen Bereich von etwa 50 bis 500 kDa für das native Molekulargewicht umschloss. In den Eluatfraktionen der Größenausschlusschromatographie konnte weiterhin keine Polyadenylierungsaktivität mehr nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt), was zu der Vermutung führt, dass der dargestellte Komplex während der Gelfiltration zerfallen ist (wie es schon zuvor für den CPSF-Subkomplex aus WDR33 und hFip1 beobachtet wurde, Abschnitt 2.1.1.4). Da alle Bemühungen den 7er-Komplex weiter zu reinigen misslungen sind, wurden Eluatfraktionen aus der gezeigten Poly(A)-Sephrose-Fraktionierung (Abbildung 2.20) für Rekonstitutionsversuche der Spaltungsreaktion verwendet.

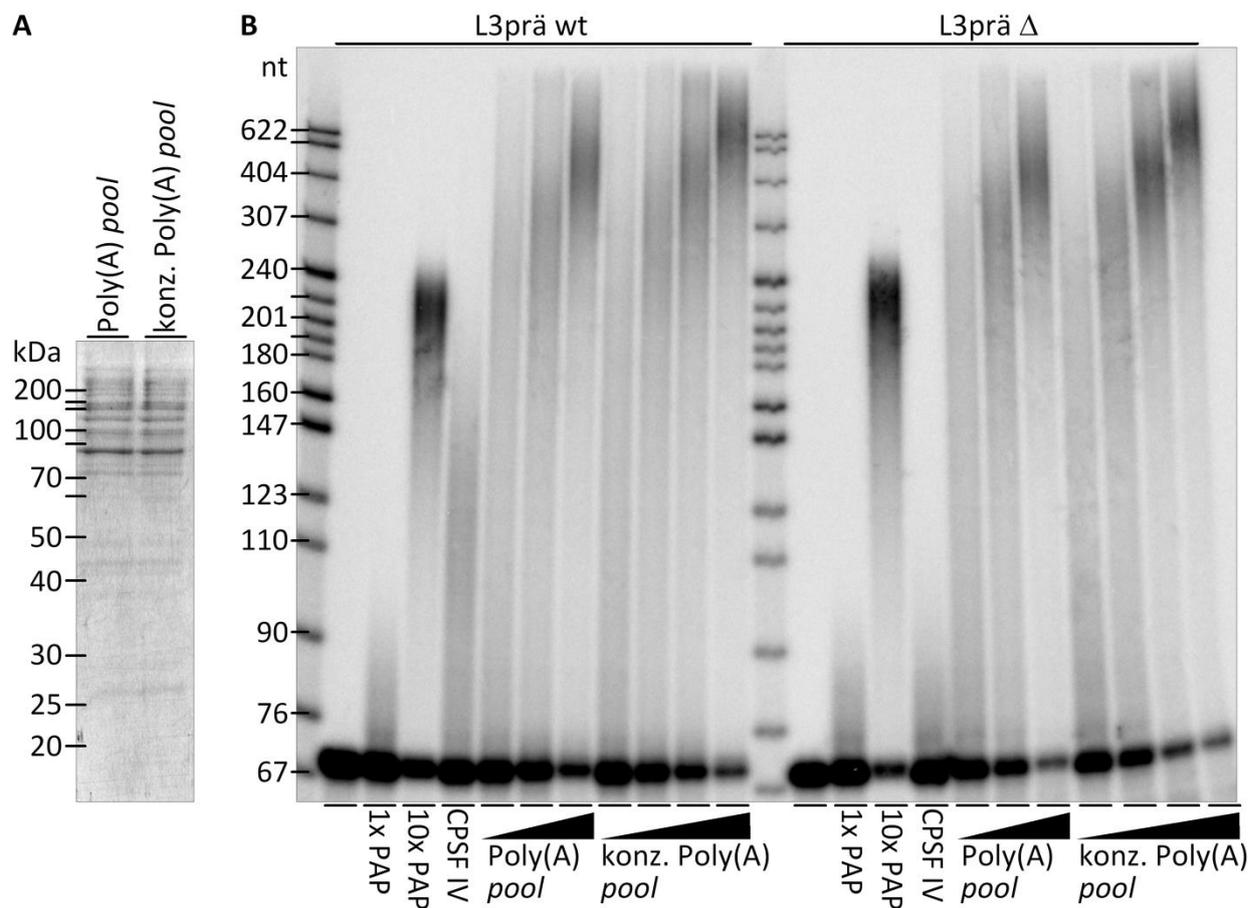


Abbildung 2.21: Konzentrierung vereinigter Poly(A)-Sepharose-Fractionen und *In-Vitro*-Polyadenylierung.

A: Ausschnitt eines Coomassie-gefärbten 11% SDS-PA-Gels zur Analyse der Konzentrierung vereinigter Poly(A)-Sepharose-Fractionen des 7er-Komplexes. Der Salzgehalt wurde parallel durch mehrere Waschschrte mit entsprechendem Puffer auf 100 mM Kaliumchlorid reduziert. Die Präparation wurde etwa zehnfach konzentriert, dementsprechend wurde von den vereinigten Poly(A)-Sepharose-Fractionen (Poly(A)-pool) 5 µl und von der Probe nach Konzentrierung (konz. Poly(A)-pool) 0,5 µl auf dem Gel analysiert. Die Größen der Markerbanden sind an der linken Seite angegeben. **B:** Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse der Polyadenylierungsaktivität des 7er-Komplexes auf L3prä wt und Δ RNA vor und nach Konzentrierung der Präparation. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Vom Poly(A)-pool vor Konzentrierung wurden drei verschiedene Mengen (0,1, 0,2 und 0,5 µl), von der konzentrierten Fraktion vier verschiedene Mengen (0,01, 0,02, 0,05 und 0,1 µl) eingesetzt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs) und zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs). Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind an der linken Seite zugeordnet.

Nachdem der 7er-Komplex in *In-Vitro*-Polyadenylierungen (Abbildung 2.19.B und 3.21.B), im Vergleich zum zuvor präparierten mPSF-Komplex, nur eine geringe Spezifität für das Polyadenylierungssignal aufwies, sollten die Aktivitäten von mPSF und 7er-Komplexes im Folgenden eingehender charakterisiert und verglichen werden. Um einen quantitativen Vergleich der beiden Proteinpräparationen zu erlauben, wurde die Bindung der beiden Komplexe an verschiedene RNA-Substrate mittels Filterbindungsassays untersucht. Abbildung 2.22.A zeigt die Ergebnisse der Bindung an L3short RNA (147 Nukleotide lang, wt und Δ), die Ergebnisse der Bindung an SV40late RNA (230 Nukleotide lang, nur wt) sind in Abbildung 2.22.B zu sehen. Die RNA-Substrate sind im Anhang in Abbildung 9.9 vergleichend dargestellt.

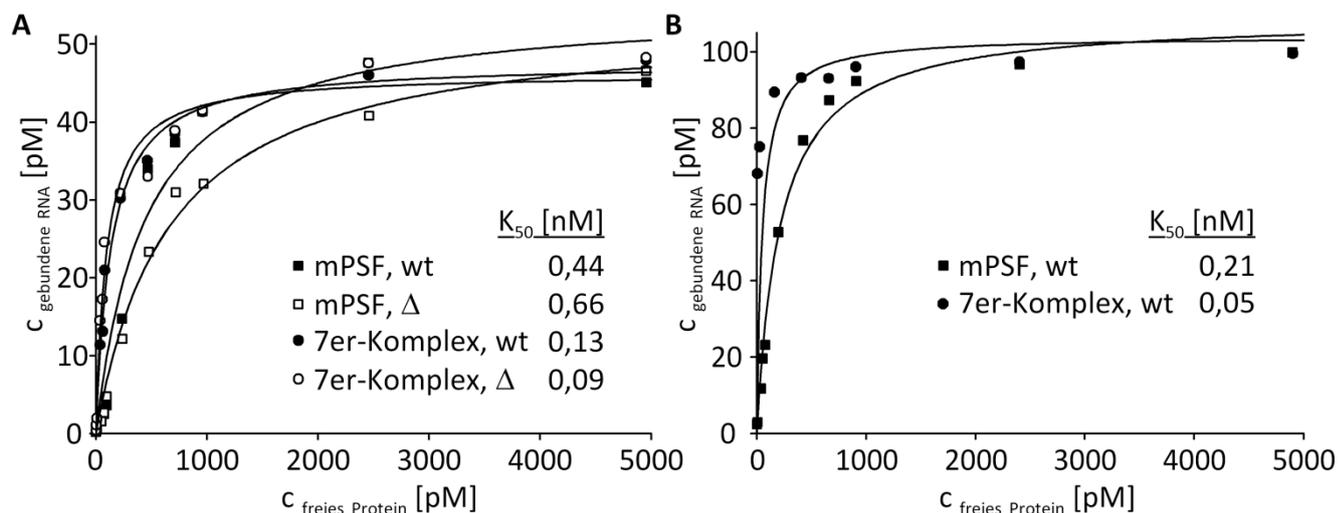


Abbildung 2.22: Vergleich der RNA-Bindung von mPSF und 7er-Komplex mittels Filterbindungsassays.

Graphische Auswertung von Filterbindungsassays zum Vergleich der RNA-Bindungsaktivitäten von mPSF und 7er-Komplex. 0,1 nM der jeweiligen RNA wurden mit steigenden Mengen der jeweiligen Proteinpräparation (1 pM bis 5 nM) titriert. Die Konzentration des freien Proteins (X-Achse) wurde berechnet, indem die Konzentration an gebildeten RNA-Protein-Komplexen (Y-Achse) von der Konzentration des jeweils eingesetzten Proteins subtrahiert wurde. Die aus den Experimenten ermittelten Bindungsaffinitäten (K_{50} -Werte) sind jeweils in den Abbildungsteilen angegeben. Die Datenpunkte wurden hyperbol angepasst, die entsprechenden Regressionskurven sind eingezeichnet. **A:** Es wurde die Bindung der beiden Proteinkomplexe an L3short wt und Δ RNA gemessen. **B:** Es wurde die Bindung der beiden Proteinkomplexe an SV40late RNA (nur wt) gemessen.

Aus den Bindungsdaten mit L3short RNA (Abbildung 2.22.A) wird deutlich, dass beide untersuchten Proteinkomplexe eine hohe Bindungsaffinität für die RNA aufweisen. Die Affinität des 7er-Komplexes für die L3short wt RNA war dabei im Vergleich zum mPSF-Komplex etwa vierfach höher (vgl. gefüllte Kreise und gefüllte Quadrate). Die Abhängigkeit der RNA-Bindung durch beide Komplexe für das Polyadenylierungssignal war äußerst gering ausgeprägt (vgl. jeweils gefüllte und leere Quadrate und Kreise). Vergleichbar dazu verhielt sich die Bindung der beiden Komplexe auf L3prä RNA (65 Nukleotide lang), dort waren die bestimmten Affinitäten insgesamt etwa zweifach niedriger, die Spezifität des mPSF-Komplexes für das Polyadenylierungssignal aber etwas stärker ausgeprägt (zweifach stärkere Bindung der wt RNA über die Δ Variante, Daten nicht gezeigt). Die SV40late RNA (Abbildung 2.22.B) wird von beiden Proteinkomplexen mit einer noch leicht höheren Affinität gebunden als die L3short RNA. Dabei ist die RNA-Bindung des 7er-Komplexes im Vergleich zu mPSF erneut etwa vierfach stärker. Wesentlich kürzere RNA-Substrate (Wigley10-Oligonukleotide, vgl. Abbildung 9.9 im Anhang) wurden durch den mPSF-Komplex mit deutlicher Spezifität für das Polyadenylierungssignal gebunden [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 3.C]. Vermutlich bilden die rekombinanten CPSF-Komplexe auf längeren RNA-Substraten außerhalb der AAUAAA-Sequenz zusätzliche Kontakte zur RNA aus, wodurch die Bindung der RNA unabhängig vom Polyadenylierungssignal wird. Die Bindung des 7er-Komplexes an Wigley10-Oligonukleotide wurde nicht untersucht.

Analog zum zuvor dargestellten 7er-Komplex wurde ein Komplex mit Mutationen im aktiven Zentrum von CPSF73 (D75K/H76A, übernommen aus [Mandel *et al.*, 2006]) präpariert. Dieser Komplex verhielt sich in der Reinigung identisch und zeigte unveränderte Aktivität in Polyadenylierungsreaktionen (Daten nicht gezeigt).

2.2.6 Rekonstitutionsversuche der Spaltungsreaktion

Die in den Abschnitten 2.2.1 bis 2.2.5 dargestellten Proteinpräparationen sowie rekombinante bovine Poly(A)-Polymerase (His-PAP, [Dissertation Knoth, 2008]), wurden in verschiedenen Kombinationen für *In-Vitro*-Rekonstitutionsversuche (Spaltungsassays) genutzt. Reaktionsbedingungen wurden angelehnt an Arbeiten von Anne Knoth [Dissertation Knoth, 2008] gewählt und in Spaltungsreaktionen mit HeLa-Kernextrakt auf Eignung zur Analyse der Spaltung geprüft. Reaktionen mit HeLa-Kernextrakt wurden weiterhin als Positivkontrolle in jedem Spaltungsassay mitgeführt.

Abbildung 2.23 zeigt vier Rekonstitutionsversuche mit den rekombinant dargestellten 3'-Prozessierungsfaktoren, bzw. putativ beteiligten Proteinen. In Abbildung 2.23.A wurden die fünf etablierten Faktoren der 3'-Prozessierung, Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I und CF II eingesetzt. Der Protein-Mix aus Abbildung 2.23.B enthielt zusätzlich Rbbp6, welches im Komplex mit CF I gewonnen wurde. Die entsprechenden Reaktionen in Abbildung 2.23.C beinhalteten Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I, CF II, Ssu72 und *in vitro* phosphorylierte CTD. Der Protein-Mix aus Abbildung 2.23.D enthielt schließlich die umfassendste Zusammenstellung an rekombinanten Proteinen mit Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I im Komplex mit Rbbp6, CF II, Ssu72, phosphorylierter CTD und WDR82. Die rekombinanten Proteine wurden für alle hier gezeigten Reaktionen im zweifachen molaren Überschuss über die Substrat-RNA eingesetzt. Für alle vier der dargestellten Versuche ist in der Positivkontrolle (Reaktionen mit HeLa-Kernextrakt) eine deutliche Bande für das erwartete 5'-Spaltprodukt erkennbar. Die Spaltung der RNA war dabei sehr spezifisch für das Polyadenylierungssignal, das RNA-Substrat mit mutiertem Polyadenylierungssignal (L3 Δ) wurde praktisch nicht gespalten. In den Reaktionen zur Untersuchung der Spaltungsaktivität der rekombinanten Proteinfaktoren ist für keinen der vier Rekonstitutionsversuche eine Bande auf Höhe des erwarteten 5'-Spaltproduktes zu sehen. Entsprechend scheinen die hier getesteten Kombinationen von rekombinanten Proteinen und Proteinkomplexen nicht ausreichend für eine Rekonstitution der Spaltung gewesen zu sein. Analog zu den in Abbildung 2.23 gezeigten Ergebnissen konnte auch in vielen weiteren Rekonstitutionsexperimenten keine Spaltungsaktivität mit ausschließlich rekombinanten Faktoren nachgewiesen werden. In diesen weiteren Rekonstitutionsversuchen wurden etwa die 3'-Prozessierungsfaktoren in anderen Kombinationen getestet, die Spaltung unter veränderten Reaktionsbedingungen, andere Endkonzentrationen der rekombinanten Proteine und auch Spaltung von anderen RNA-Substraten untersucht (L3short, SV40late und PAPOLA; vgl. Abbildung 9.9 im Anhang). Die dargestellten Proteinpräparationen reichten folglich nicht aus, um die Spaltungsreaktion der 3'-Prozessierung *in vitro* zu rekonstituieren.

2.3 Spaltungsaktivität in HeLa-Kernextrakt

Die bislang nicht gelungene Rekonstitution der Spaltungsreaktion mit rekombinanten Proteinfaktoren lässt den Schluss zu, dass für die Spaltung einer oder mehrere weitere Faktoren notwendig sind, welche in den bisher dargestellten Proteinpräparationen nicht vorliegen. Weiterhin ist es möglich, dass einer oder mehrere der rekombinanten Faktoren, zum Beispiel wegen fehlender Aktivierung durch post-translationalen Modifikation(en), nicht spaltungsaktiv vorliegen. Um systematisch nach bislang fehlenden Faktoren der 3'-Prozessierung, bzw. bekannten Faktoren in spaltungsaktiver Form zu suchen, wurde folgender experimenteller Ansatz gewählt: Es sollte spaltungsaktiver Kernextrakt aus HeLa-Zellen fraktioniert werden. Ziel sollte sein, Fraktionen zu erhalten, welche an sich keine Spaltungsaktivität mehr besitzen, sich jedoch durch Komplementation mit den rekombinanten Proteinpräparationen komplementieren lassen. Die entsprechende Fraktion muss dann alle für die Spaltung essentiellen Faktoren beinhalten, welche bislang nicht in den vorhandenen Proteinpräparationen vorliegen. Der oder die komplementierende(n) Faktor(en) sollen schließlich identifiziert und dann ebenfalls in rekombinanter Form dargestellt werden. Wurde der richtige, fehlende Faktor identifiziert, so sollte sich die Spaltungsreaktion schlussendlich aus nur rekombinanten Proteinen rekonstituieren lassen.

Als Ausgangsmaterial für die bevorstehende Fraktionierung wurde kommerziell erhältlicher HeLa-Kernextrakt der Firma IpraCell® verwendet. Im Vergleich zu selbst präpariertem Kernextrakt aus gefrorenen HeLa-Zellpellets besaß der kommerzielle Extrakt eine höhere Aktivität in der Spaltungsreaktion sowie deutlich weniger kontaminierende RNasen (Daten nicht gezeigt). Bei der Präparation des kommerziellen Kernextraktes wurde auf den letzten Schritt der Dialyse des Extraktes auf Puffer mit 50 mM Kaliumchlorid verzichtet, um die maximale Menge an Spaltungsaktivität beizubehalten. Wie nachfolgend erläutert wird, präzipitiert ein beträchtlicher Teil der Spaltungsaktivität unter Niedrigsalzbedingungen.

2.3.1 Charakterisierung der Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt

Vor der Etablierung einer Reinigungs-, bzw. Fraktionierungsstrategie sollte zunächst die Spaltungsaktivität des Kernextraktes charakterisiert werden. In ersten Experimenten zeigte sich schnell, dass eine Verringerung der Ionenstärke des Extraktes, etwa durch Dialyse gegen Niedrigsalzpuffer, zur Präzipitation eines großen Teils der Spaltungsaktivität führt. Ein Beispiel für dieses Präzipitationsverhalten ist in Abbildung 2.24 gegeben. Im dargestellten Versuch wurde eine kleine Menge des Kernextraktes gegen Puffer mit 300 mM Kaliumchlorid (Kontrolle), bzw. Puffer mit 50 mM Kaliumchlorid dialysiert. Nach abgeschlossener Dialyse wurden die Proben zentrifugiert, Überstände abgenommen und präzipitiertes Material wieder in Puffer mit 300 mM Kaliumchlorid resuspendiert. Für eine quantitative Abschätzung wurde die prozentuale Spaltungsausbeute in den einzelnen Reaktionen densitometrisch anhand der Signale für das 5'-Spaltprodukt bestimmt. Es ist zu erkennen, dass nach der Kontrolldialyse gegen Puffer mit 300 mM Kaliumchlorid nahezu keine Spaltungsaktivität in der Pelletfraktion zu finden war (lediglich ein bis zwei Prozent der eingesetzten RNA wurde gespalten). Im entsprechenden Überstand wurden hingegen acht bis neun Prozent der eingesetzten L3 RNA gespalten. Nach der Dialyse gegen Niedrigsalzpuffer befand sich ein beträchtlicher Anteil der Spaltungsaktivität in der Pelletfraktion (fünf bis sechs Prozent Spaltung), der Überstand führte nur noch zur Spaltung von etwa sieben Prozent der eingesetzten L3 RNA.

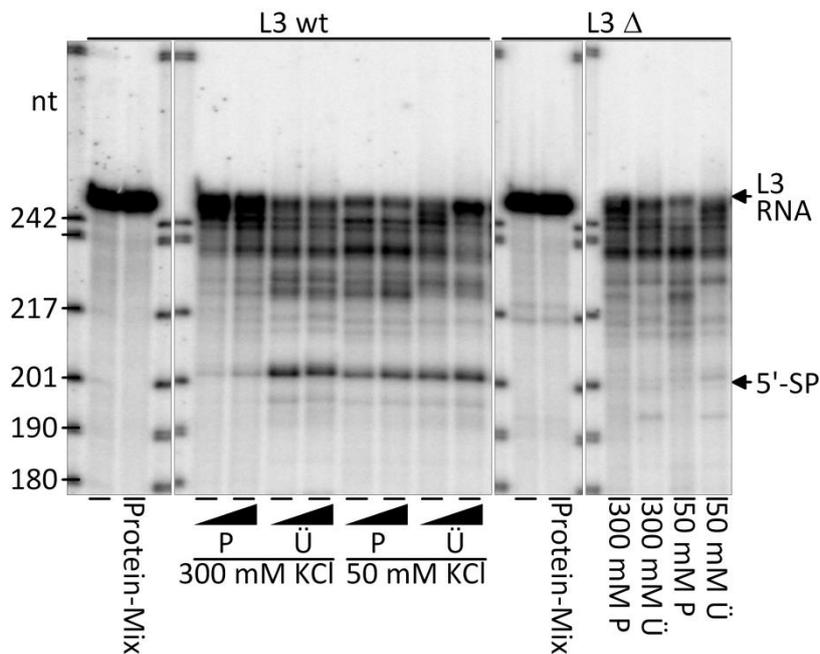


Abbildung 2.24: Präzipitation der Spaltungsaktivität von HeLa-Kernextrakt unter Niedrigsalzbedingungen.

Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse von Spaltungsreaktionen auf L3 wt und Δ RNA. Die erste Spur von links für beide RNAs zeigt Reaktionen mit nur RNA, die zweite Spur Reaktionen mit einem Mix aus den rekombinanten Proteinpräparationen für Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I, CF II, Ssu72, phosphorylierte CTD und WDR82 (Protein-Mix). Alle weiteren gezeigten Spaltungsreaktionen enthalten ebenfalls diesen Protein-Mix. Analysiert wurde die Spaltungsaktivität in resuspendierten Pellets (P) und Überständen (Ü) nach Dialyse gegen Puffer mit 50, bzw. 300 mM Kaliumchlorid. Für Reaktionen mit L3 wt RNA wurden jeweils zwei unterschiedliche Mengen (0,5 und 2 μ l, entspricht 2,5 und 10% des Reaktionsvolumens) der entsprechenden Fraktionen eingesetzt, für die Spaltungsreaktionen mit L3 Δ jeweils nur 2 μ l (10% des Reaktionsvolumens). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind an der linken Seite für alle Abbildungsteile zugeordnet. Auf der rechten Seite sind die Laufhöhen der nicht-gespaltenen L3 RNA sowie des erwarteten 5'-Spaltprodukts (5'-SP) angegeben.

Eine Verdünnung des Kernextraktes auf einen Salzgehalt von 50 mM Kaliumchlorid führte vergleichbar zur Präzipitation der Spaltungsaktivität wie die durchgeführte Dialyse. Wurde das Pellet nach Präzipitation nicht zügig wieder resuspendiert, war deutlich weniger Spaltungsaktivität in der Pelletfraktion nachzuweisen, es ging also ein Teil der Spaltungsaktivität nach längerer Zeit im Pellet verloren. Es wurde weiterhin mehrfach versucht, die Präzipitation unter Niedrigsalzbedingungen durch Zusatz verschiedener Additive (z.B. Saccharose) oder Nutzung anderer Puffersubstanzen (z.B. Ammoniumacetat oder Kaliumcitrat) zu unterbinden, allerdings ohne signifikanten Erfolg (Daten nicht gezeigt).

Das beobachtete Präzipitationsverhalten bedingt Einschränkungen in der Auswahl geeigneter Fraktionierungsmethoden für die beabsichtigte Isolation von bislang fehlenden 3'-Prozessierungsfaktoren. Um ungewünschte Präzipitationsereignisse zu vermeiden, wurde zumindest zu Beginn der Fraktionierung auf die Anwendung von Reinigungsmethoden verzichtet, welche eine Herabsetzung der Ionenstärke des zu reinigenden Materials bedingen (wie etwa Ionenaustauschchromatographien).

In bisherigen Spaltungsreaktionen mit HeLa-Kernextrakt wurde nach zweistündiger Inkubation maximal die Hälfte der eingesetzten L3 RNA umgesetzt, meist lag die Spaltungseffizienz sogar nur bei rund zehn Prozent. Um zu untersuchen, wie schnell die Umsetzung der Substrat-RNA in den Spaltungsreaktionen erfolgt und welche Faktoren den Umsatz limitieren, wurden mehrere Spaltungskinetiken mit HeLa-Kernextrakt aufgenommen. Für das erste Experiment dieser Art in Abbildung 2.25 wurde die Spaltungsaktivität des HeLa-Kernextraktes vergleichend auf L3 (Abbildung 2.25.A) und L3short RNA (Abbildung

2.25.B) getestet. Die entsprechenden RNA-Substrate sind vergleichend in Abbildung 9.9 im Anhang dargestellt. Die Signale für das 5'-Spaltprodukt wurden für jede Reaktion in Relation zur eingesetzten RNA densitometrisch aus den Autoradiogrammen quantifiziert (Abbildung 2.25.C). Die graphische Auswertung des Experiments zeigt, dass beide RNA-Substrate gleichermaßen durch den HeLa-Kernextrakt gespalten wurden. Im gezeigten Experiment lag die Ausbeute an Spaltprodukt nach zweistündiger Inkubation bei ca. 700 pM, dies entspricht einem Umsatz von lediglich 7 fmol RNA, bzw. 14% der jeweils eingesetzten Substrat-RNA. Auffällig ist, dass die Reaktionen für beide RNAs bereits nach 30 Minuten nahezu und nach 60 Minuten vollständig abgeschlossen waren. Im Fortlauf der Inkubation wurde kein weiteres Spaltprodukt mehr produziert. Die Spaltungsreaktion scheint daher unter den gewählten Bedingungen durch einen bisher unbekanntem Umstand limitiert zu sein.

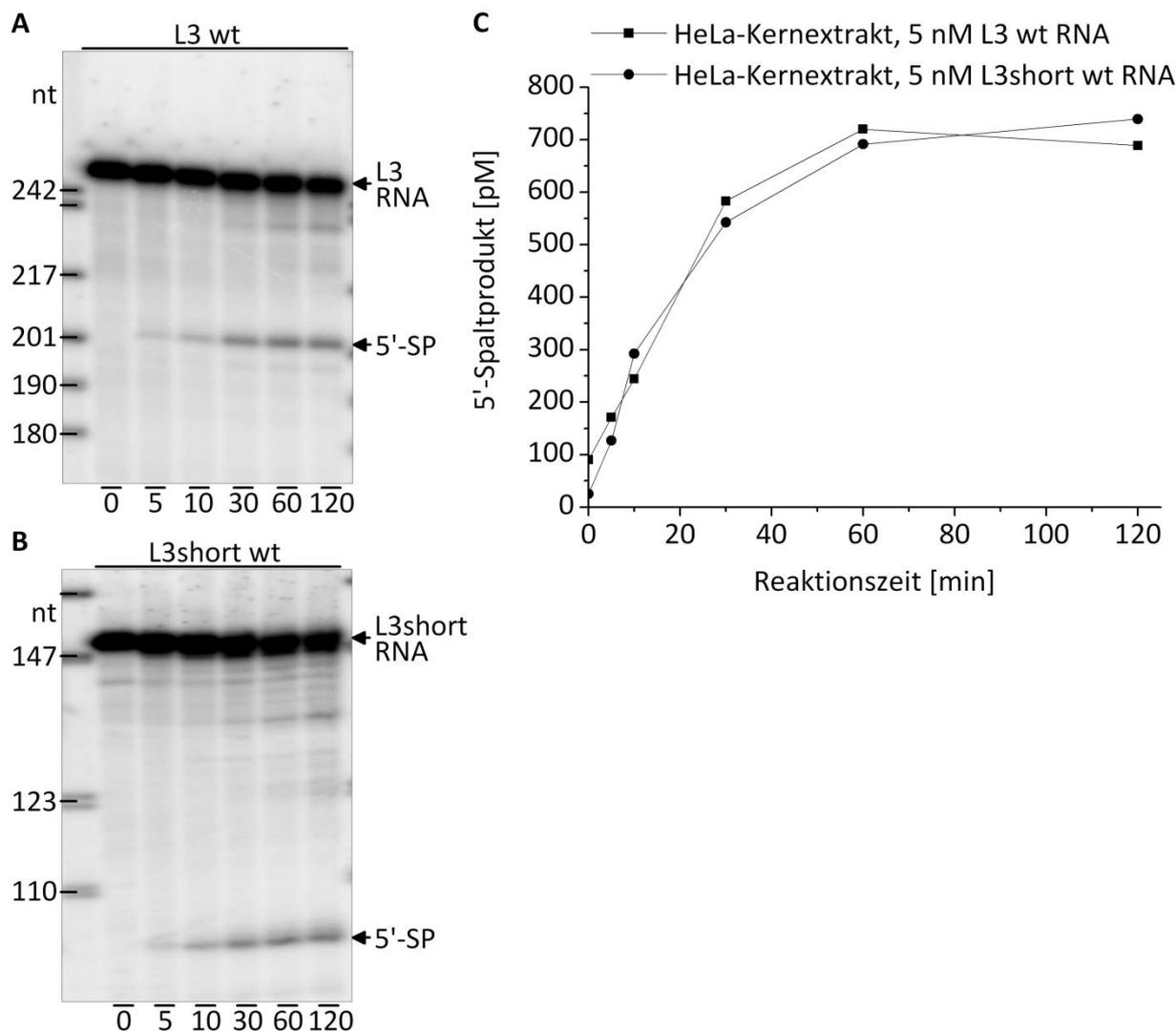


Abbildung 2.25: Vergleich der Spaltungseffizienz von HeLa-Kernextrakt auf L3 und L3short RNA.

A und **B**: Ausschnitte eines Autoradiogramms nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse von Spaltungskinetiken mit HeLa-Kernextrakt auf L3 (**A**), bzw. L3short (**B**) wt RNA. Pro Reaktion / Zeitpunkt wurden 5 nM RNA mit 1 μ l HeLa-Kernextrakt (10% des Reaktionsvolumens) versetzt. Die Reaktionszeiten (in Minuten), nach welchen die entsprechenden Proben für die Gelanalyse entnommen und gestoppt wurden, sind jeweils unten genannt. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind für beide Abbildungsteile links zugeordnet. Rechts sind jeweils die Laufhöhen der nicht-gespaltenen RNAs sowie der erwarteten 5'-Spaltprodukte (5'-SP) angegeben. **C**: Graphische Auswertung der Spaltungskinetiken aus **A** und **B**. Signale für das 5'-Spaltprodukt wurden densitometrisch aus dem Autoradiogramm quantifiziert und die Menge an Spaltprodukt für jeden Reaktionszeitpunkt berechnet. Zur Veranschaulichung wurden die Datenpunkte durch Striche verbunden.

Da die kürzere L3short RNA gleichermaßen geeignet ist, um die Spaltung durch HeLa-Kernextrakt *in vitro* zu studieren, wurde diese Substrat-RNA hauptsächlich für die weiteren Versuche verwendet. Aufgrund der geringeren Länge ist diese RNA leichter in größeren Mengen darzustellen und weniger anfällig gegenüber kontaminierenden RNasen. Dies ist beispielsweise in Abbildung 2.25.C zu sehen: Für die L3 RNA wurde bereits zum Zeitpunkt Null ein Signal für das 5'-Spaltprodukt erhalten und quantifiziert. Dieses Signal ist auf unspezifischen Abbau der L3 RNA durch kontaminierende RNasen zurückzuführen. Um zu untersuchen, ob die Konzentration des Spaltungssubstrates einen Einfluss auf die Spaltungseffizienz des HeLa-Kernextraktes hat, wurde unter ansonsten identischen Reaktionsbedingungen eine definierte Menge Kernextrakt mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an Substrat-RNA inkubiert (Abbildung 2.26.A) und anschließend die Bildung des 5'-Spaltproduktes über die Zeit quantifiziert (Abbildung 2.26.B). Nach zweistündiger Reaktion wurden in beiden Fällen etwa 250 pM (2,5 fmol) an 5'-Spaltprodukt nachgewiesen. Für die Reaktion mit 0,5 nM Substrat-RNA entspricht dies einem Umsatz von 50%, in der Reaktion mit 5 nM Substrat-RNA sind lediglich fünf Prozent der eingesetzten RNA umgesetzt worden. Wie zuvor waren auch hier die Reaktionen nach 30 Minuten nahezu abgeschlossen, danach wurde fast kein zusätzliches Spaltprodukt mehr gebildet.

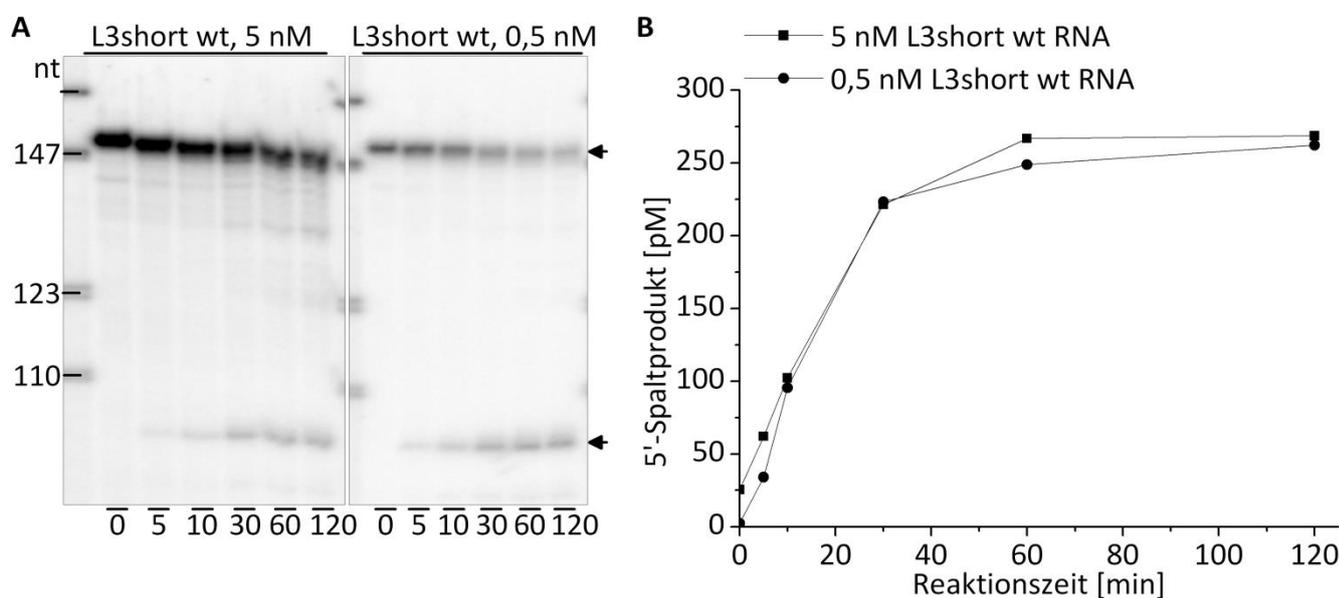


Abbildung 2.26: Spaltungskinetiken mit verschiedenen Konzentrationen an Substrat-RNA.

A: Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse von Spaltungskinetiken mit HeLa-Kernextrakt auf L3short wt RNA. Pro Reaktion / Zeitpunkt wurde 1 μ l Kernextrakt (10% des Reaktionsvolumens) mit entweder 5 oder 0,5 nM RNA versetzt. Die Reaktionszeiten (in Minuten), nach welchen die entsprechenden Proben für die Gelanalyse entnommen und gestoppt wurden, sind jeweils unten genannt. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind für beide Abbildungsteile an der linken Seite zugeordnet. Auf der rechten Seite sind die Laufhöhen der nicht-gespaltenen L3short RNA sowie des erwarteten 5'-Spaltproduktes (5'-SP) angegeben. **B:** Graphische Auswertung der Spaltungskinetiken aus A. Signale für das 5'-Spaltprodukt wurden densitometrisch aus dem Autoradiogramm quantifiziert und die gebildete Menge an Spaltprodukt für jede Reaktion berechnet. Zur Veranschaulichung wurden die Datenpunkte durch Striche verbunden.

Die eingesetzte Konzentration der RNA hat keinen signifikanten Einfluss auf die Rate und die Ausbeute der Spaltungsreaktion. Der HeLa-Kernextrakt scheint in seiner Kapazität zur Spaltung von Substrat-RNA begrenzt zu sein. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass der Spaltungsapparat nach der Reaktion nicht von der Substrat-RNA dissoziiert und daher nicht für weitere Reaktionszyklen bereitsteht. Weiterhin ist es möglich, dass der Spaltungskomplex während der Inkubationszeit inaktiviert wird. Um diesen Umstand weiter zu untersuchen wurden Spaltungskinetiken mit verschiedenen Mengen an HeLa-

Kernextrakt sowie mit unter Reaktionsbedingungen vorinkubiertem Kernextrakt aufgenommen. Für das Experiment in Abbildung 2.27.A wurden pro Reaktion 2 μ l Kernextrakt für die angegebenen Zeiten unter Reaktionsbedingungen vorinkubiert, anschließend die Reaktion durch Zugabe der Substrat-RNA gestartet und nach 60 Minuten wieder gestoppt. Das gebildete 5'-Spaltprodukt wurde anschließend für jede Gelspur densitometrisch aus dem Autoradiogramm quantifiziert (Abbildung 2.27.B).

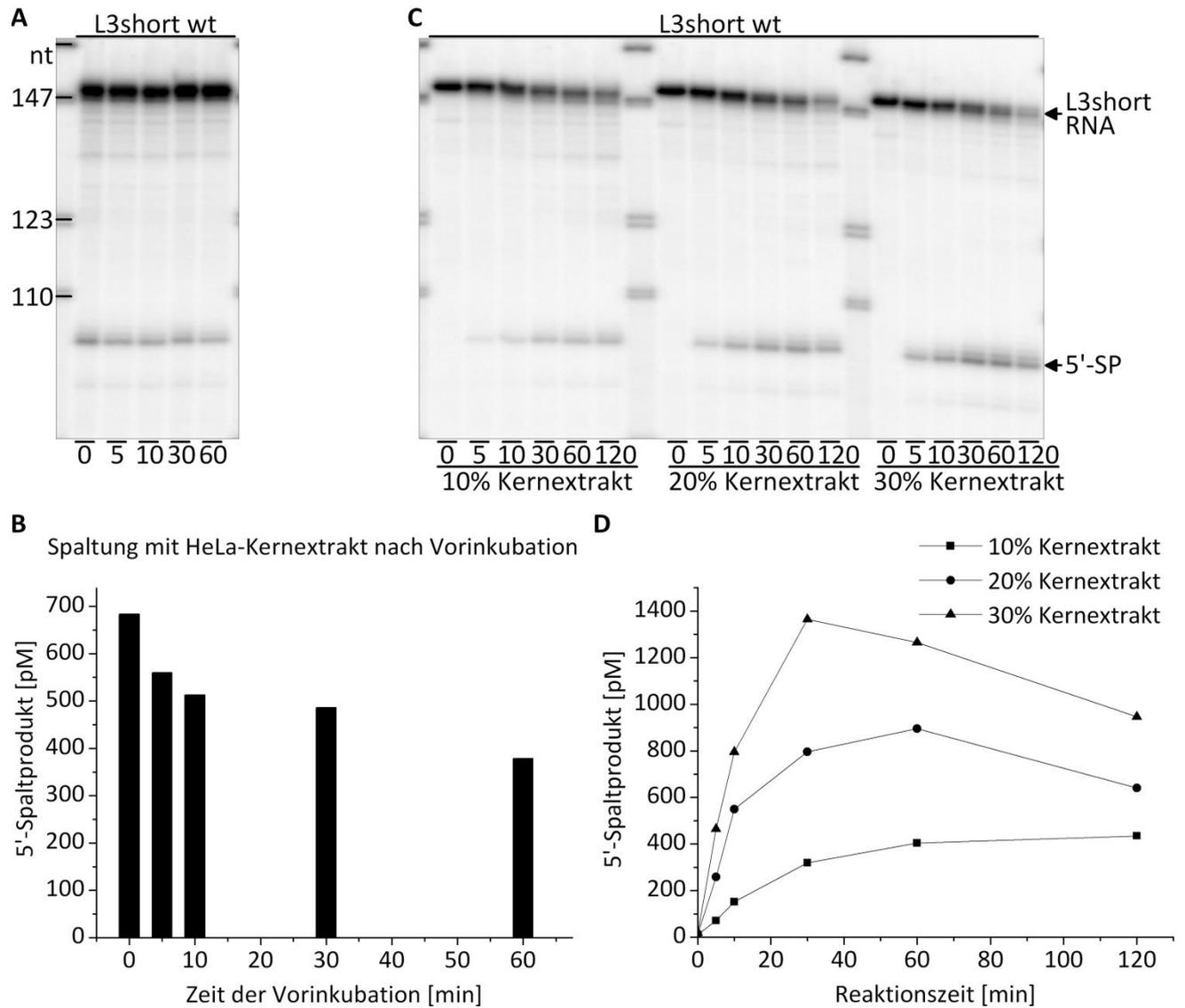


Abbildung 2.27: Spaltungskinetiken nach Vorinkubation und Titration von HeLa-Kernextrakt.

A und **C**: Ausschnitte aus einem Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse von Spaltungskinetiken mit HeLa-Kernextrakt auf L3short wt RNA. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind für beide Abbildungsteile an der linken Seite zugeordnet. Auf der rechten Seite sind die Laufhöhen der nicht-gespaltenen L3short RNA sowie des erwarteten 5'-Spaltprodukts (5'-SP) angegeben. **A**: 2 μ l HeLa-Kernextrakt (20% des Reaktionsvolumens) wurden für die unten angegebenen Zeiten (in Minuten) unter Reaktionsbedingungen vorinkubiert. Die Reaktionen wurden anschließend durch Zugabe der Substrat-RNA (4 nM) gestartet und nach 60 Minuten Inkubation wieder gestoppt. **B**: Graphische Auswertung der Spaltungskinetik aus **A**. Signale für das 5'-Spaltprodukt wurden densitometrisch aus dem Autoradiogramm quantifiziert und die gebildete Menge an Spaltprodukt für jede Reaktion berechnet. **C**: 1, 2 oder 3 μ l Kernextrakt (respektive 10, 20, bzw. 30% des Reaktionsvolumens) wurden mit 4 nM Substrat-RNA für die unten angegebenen Reaktionszeiten (in Minuten) inkubiert. **D**: Graphische Auswertung der Spaltungskinetiken aus **C**. Signale für das 5'-Spaltprodukt wurden densitometrisch aus dem Autoradiogramm quantifiziert und die gebildete Menge an Spaltprodukt für jede Reaktion berechnet. Zur Veranschaulichung wurden die Datenpunkte durch Striche verbunden.

In Abbildung 2.27.A und B ist zu sehen, dass die Aktivität des Kernextraktes durch die Vorinkubation um bis zu 40% reduziert wird (nach einer Vorinkubation von 60 Minuten von etwa 680 pM auf 380 pM gebildetem 5'-Spaltprodukt). Es wurde also eine Inaktivierung des Kernextraktes durch Inkubation unter Reaktionsbedingungen nachgewiesen. Dieses Verhalten erklärt den beobachteten Abbruch der Spaltungsreaktion nach etwa 30 Minuten Reaktionszeit (Abbildung 2.27.D) jedoch nicht vollständig. Wurde der Kernextrakt in diesem Experiment für 30 Minuten unter Reaktionsbedingungen vorinkubiert, so ist anschließend noch 70% der vollständigen Aktivität vorhanden (490 pM gebildetes 5'-Spaltprodukt im Vergleich zu 680 pM ohne Vorinkubation des Extraktes). Die Aktivität des Extraktes muss daher zusätzlich durch einen weiteren Umstand limitiert sein.

Im Versuch aus Abbildung 2.27.C wurden drei Spaltungskinetiken mit entweder 10, 20 oder 30% HeLa-Kernextrakt in den Spaltungsreaktionen aufgenommen. Auch hier erfolgte die Auswertung anhand der densitometrischen Quantifizierung des 5'-Spaltproduktes aus dem Autoradiogramm (Abbildung 2.27.D). Es ist zu sehen, dass eine größere Menge eingesetzten Kernextraktes zu einer erhöhten Ausbeute an Spaltprodukt führt. Bei Vergleich der Ausbeuten nach 30 Minuten Reaktionszeit zeigt sich eine etwa lineare Abhängigkeit zwischen eingesetztem Kernextrakt und gebildetem 5'-Spaltprodukt (320, 800 und 1360 pM 5'-Spaltprodukt bei 10, 20, bzw. 30% Extrakt). In den Reaktionen mit 30% Kernextrakt wird allerdings schon ein beträchtlicher Teil des gebildeten 5'-Spaltproduktes weiter abgebaut, was durch die Abnahme des entsprechenden Signals bei fortlaufender Inkubation deutlich wird. Die lineare Abhängigkeit der maximalen Ausbeute an 5'-Spaltprodukt von der Menge an eingesetztem HeLa-Kernextrakt spricht dafür, dass eine Substanz oder ein Faktor aus dem Kernextrakt selbst limitierend für die Spaltungsreaktion ist. Mit 1 µl HeLa-Kernextrakt wurden in dem hier gezeigten Experiment in 30 Minuten etwa 4 fmol an 5'-Spaltprodukt produziert. Dies spiegelt in etwa die gleiche Kapazität des Kernextraktes zur Spaltung wieder, welche auch schon in vorhergehenden Experimenten beobachtet wurde (Abbildungen 2.25 und 2.26).

Es wurden weitere Versuche unternommen, um den Bestandteil des HeLa-Kernextraktes, welcher für die eingeschränkte Kapazität zur Spaltung verantwortlich ist, zu identifizieren: Die Zugabe eines ATP-regenerierenden Systems zu Spaltungsreaktionen hatte keinen Einfluss auf die Spaltungsausbeute, entsprechend führte auch der Entzug von ATP aus dem Extrakt (durch Zugabe von Glukose und Hexokinase) zu keinem Verlust an Spaltungsaktivität (Daten nicht gezeigt). Adenosintriphosphat ist dementsprechend wahrscheinlich nicht limitierend für die Spaltungsreaktion. Auch konnte die Spaltungskapazität des Extraktes nicht wesentlich durch die Zugabe von rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren gesteigert werden, lediglich die Zugabe von CF II zeigte in manchen Experimenten einen leicht stimulierenden Einfluss auf den HeLa-Kernextrakt (Abbildung 2.29). Eine Behandlung des Kernextraktes mit unspezifischer Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*) führte dagegen zur fast vollständigen Inaktivierung der Spaltungsaktivität (Daten nicht gezeigt).

2.3.2 Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt

Um bislang unbekannte, bzw. eventuell bekannte aber in rekombinanter Form inaktive 3'-Prozessierungsfaktoren aus dem HeLa-Kernextrakt zu isolieren und identifizieren, wurde der Kernextrakt im Folgenden mit verschiedenen Methoden fraktioniert. Die Abfolge von Ammoniumsulfatpräzipitation, Größenausschlusschromatographie (Superose 6) und Anionenaustauschchromatographie (Resource Q) hat dabei den größten Erfolg erbracht, die entsprechend durchgeführten Fraktionierungen sowie assoziierte Experimente werden nachfolgend dargestellt.

2.3.2.1 Ammoniumsulfatpräzipitation

Es wurden Ammoniumsulfatfällungen aus HeLa-Kernextrakt mit verschiedenen Konzentrationen an Ammoniumsulfat durchgeführt. Dabei wurde festgestellt, dass eine Fällung mit 30% Ammoniumsulfat am besten geeignet ist, um die Spaltungsaktivität aus dem Kernextrakt zu präzipitieren und anschließend wieder in Lösung zu bringen. Für den in Abbildung 2.28 gezeigten Versuch wurden drei Ammoniumsulfatpräzipitationen (mit 20, 25 und 30% Ammoniumsulfat) aus HeLa-Kernextrakt durchgeführt, die Überstände abgenommen, präzipitiertes Material resuspendiert und Überstand- sowie Pelletfraktionen dialysiert, um das Ammoniumsulfat wieder vollständig aus den Fraktionen zu entfernen. Die entsprechenden Fraktionen wurden schließlich in *In-Vitro*-Spaltungsassays auf ihre Spaltungsaktivität hin untersucht. Zusätzlich wurden dabei die Fraktionen der Fällung auch mit rekombinanten Proteinfaktoren (Protein-Mix, enthielt Präparationen von Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I und CF II) komplementiert.

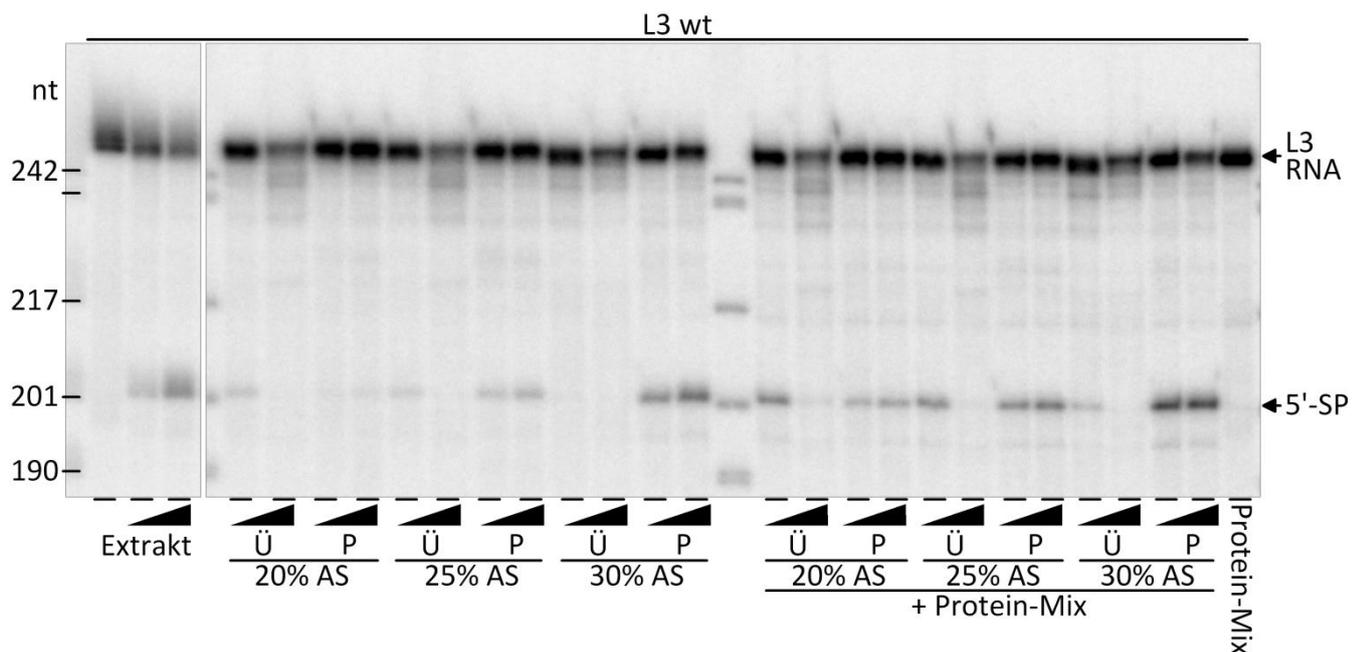


Abbildung 2.28: Spaltungsaktivität von Fraktionen nach Ammoniumsulfatpräzipitation aus HeLa-Kernextrakt.

Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse der Spaltungsaktivität von Fraktionen der Ammoniumsulfatfällungen aus HeLa-Kernextrakt auf L3 wt RNA. Die erste Spur von links enthält nur RNA, die zweite und dritte Gelspur zeigt die Aktivität des Kernextraktes (1 und 3 µl des Kernextraktes eingesetzt, entspricht 5, bzw. 15% des Reaktionsvolumens). In den nachfolgenden Reaktionen wurden entsprechende Mengen von Überständen (Ü) und Pelletfraktionen (P) der drei Ammoniumsulfatpräzipitationen eingesetzt. Im rechten Teil der Abbildung wurden die gleichen Fraktionen zusätzlich mit einem Mix aus rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren (Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I und CF II, jeweils zu 5 nM) versetzt. Die Reaktion ganz rechts enthielt nur den Protein-Mix. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind für beide Abbildungsteile an der linken Seite zugeordnet. Auf der rechten Seite sind die Laufhöhen der nicht-gespaltenen L3 RNA sowie des erwarteten 5'-Spaltprodukts (5'-SP) angegeben.

Wie in Abbildung 2.28 zu sehen ist, enthalten die Überstände nach Fällung mit 20 oder 25% Ammoniumsulfat noch erhebliche Mengen an Spaltungsaktivität, nach Fällung mit 30% Ammoniumsulfat ist fast ausschließlich in der Pelletfraktion Spaltungsaktivität nachweisbar. Lediglich nach Komplementation mit den rekombinanten Proteinfaktoren wird auch hier im Überstand eine geringe Aktivität detektiert. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Spaltungsaktivität in der Pelletfraktion der 30% Fällung im Vergleich zum Kernextrakt angereichert ist. Es wurden entsprechende Volumina der jeweiligen Fraktionen im Spaltungsassay eingesetzt, so dass die Aktivitäten direkt miteinander vergleichbar sind. Die Spaltungsaktivität aller getesteten Fraktion wird durch die Zugabe der rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren verstärkt, der Protein-Mix allein zeigt nach wie vor keine Spaltungsaktivität. In manchen Assays wurde auch der Kernextrakt selbst durch die rekombinanten Proteine in seiner Aktivität stimuliert, dort war dieser Effekt allerdings, falls überhaupt vorhanden, nicht so deutlich ausgeprägt (Abbildung 2.29). Später wurde zudem herausgefunden, dass die in Abbildung 2.28 sichtbare Stimulation der Spaltungsaktivität durch die rekombinanten Faktoren hauptsächlich auf die Zugabe von CF II zurückzuführen ist (Abbildung 2.32). Die dargestellte Spaltungsaktivität der Fällungsfractionen ist spezifisch für RNAs mit Polyadenylierungssignal, die Spezifität wurde in separaten Assays überprüft (Abbildung 2.29). Da die Präzipitation mit 30% Ammoniumsulfat die beste Anreicherung der Spaltungsaktivität erbrachte, wurde diese Methode im größeren Maßstab zur Fraktionierung von HeLa-Kernextrakt angewendet. Bezogen auf die Proteinkonzentrationen im Kernextrakt und der Pelletfraktion, konnte die Spaltungsaktivität etwa zweieinhalbfach angereichert werden, diese Anreicherung war in späteren Ammoniumsulfatfällungen reproduzierbar. Etwa 60% der Spaltungsaktivität des Kernextraktes wurde dabei in der Pelletfraktion wiedergefunden. Fällungen mit 35% Ammoniumsulfat ergaben eine höhere Ausbeute aber eine geringere Anreicherung der Spaltungsaktivität.

2.3.2.2 Größenausschlusschromatographie

Die Pelletfraktion einer präparativen Ammoniumsulfatpräzipitation mit 30% Ammoniumsulfat aus HeLa-Kernextrakt wurde einer Größenausschlusschromatographie (Superose 6) unterzogen. Auf den Dialyseschritt nach der Ammoniumsulfatfällung wurde dabei verzichtet, da das Ammoniumsulfat ohnehin während der Gelfiltration aus der Probe entfernt wird. Das Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie (UV-Profil und Fraktionierung) ist in Abbildung 9.7 im Anhang dargestellt. Im UV-Profil der Reinigung ist ein deutlicher Peak im Ausschlussvolumen der Säule (bei ca. 38,5 ml, Fraktion „A4“) zu erkennen, gefolgt von mehreren, wesentlich kleineren Peaks. Die Fraktionen der Reinigung (Kernextrakt, Ammoniumsulfatpräzipitation und Eluatfraktionen) wurden anschließend auf ihre Aktivität in der *In-Vitro*-Spaltung untersucht. Der entsprechende Assay ist in Abbildung 2.29 dargestellt.

Die Spaltungsaktivität des Kernextraktes war sowohl in der Pelletfraktion der Ammoniumsulfatfällung als auch in den Fraktionen „A5“ und „A6“ erhalten. Die Spaltungsaktivität eluierte folglich nach dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule. Während die Zugabe rekombinanter 3'-Prozessierungsfaktoren (Protein-Mix, enthielt Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I, CF II, WDR82, Ssu72 und phosphorylierte CTD) lediglich zu einer leichten Erhöhung der Spaltungsaktivität des Kernextraktes führte, wurde die Pelletfraktion der Ammoniumsulfatpräzipitation deutlich von den zugegebenen Proteinen stimuliert. Die Spaltungsaktivität in den Eluatfraktionen „A5“ und „A6“ der Größenausschlusschromatographie war sogar abhängig von der Zugabe der rekombinanten Proteinfaktoren, die Eluatfraktionen allein zeigten keine Spaltungsaktivität mehr. Die nach Komplementation sichtbare Spaltungsaktivität in Fraktion „A5“ und „A6“ war weiterhin spezifisch für das Polyadenylierungssignal, für die L3short Δ RNA wurde kein 5'-Spaltprodukt detektiert.

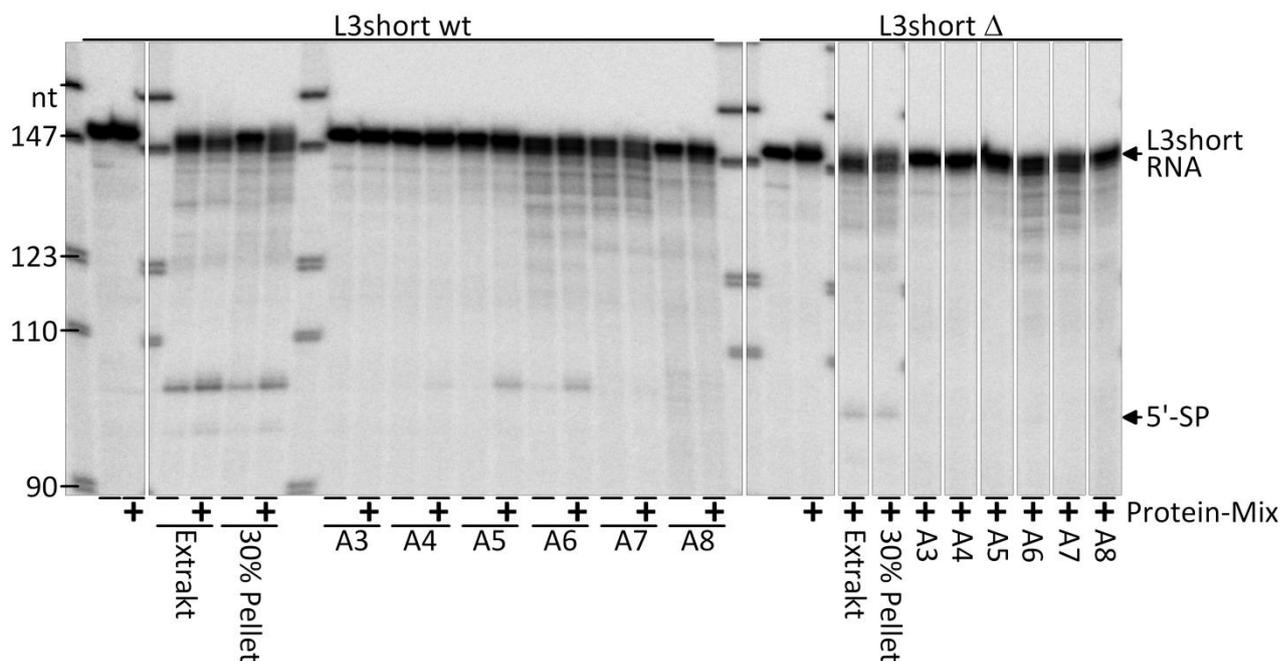


Abbildung 2.29: Spaltungsaktivität nach Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie.

Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse der Spaltungsaktivität von Fraktionen der Größenausschlusschromatographie (Superose 6) auf L3short wt und Δ RNA. Die Reaktionen in der ersten Spur von links für beide RNAs enthielten jeweils nur RNA, die zweite Gelspur zeigt Reaktionen mit Protein-Mix aus rekombinanter Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I, CF II, WDR82, Ssu72 und phosphorylierter CTD zu je 5 nM. In den nachfolgenden Gelspuren wurden Reaktionen mit Kernextrakt, nicht-dialysierter Pelletfraktion nach Präzipitation mit 30% Ammoniumsulfat und Fraktionen der Größenausschlusschromatographie („A3“ bis „A8“) durchgeführt. Für die L3short wt RNA sind die Aktivitäten für alle Fraktionen jeweils allein und nach Komplementation durch Protein-Mix gezeigt, für die L3short Δ RNA nur nach Komplementation mit Protein-Mix. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind für beide Abbildungsteile an der linken Seite zugeordnet. Auf der rechten Seite sind die Laufhöhen der nicht-gespaltenen L3short RNA sowie des erwarteten 5'-Spaltprodukts (5'-SP) angegeben.

Quantifizierungen des 5'-Spaltproduktes aus dem gezeigten Spaltungsassay ergaben, im Zusammenhang mit Proteinkonzentrationsbestimmungen der entsprechenden Fraktionen nach [Bradford, 1976], dass die spezifische Spaltungsaktivität durch die Ammoniumsulfatpräzipitation etwa zweifach und durch die Größenausschlusschromatographie ca. zweieinhalbfach angereichert wurde (bei einer Ausbeute an Spaltungsaktivität von etwa 80 bzw. 60%, Daten nicht gezeigt). Die gewünschte Generierung von Fraktionen aus HeLa-Kernextrakt, welche selbst nicht mehr spaltungsaktiv sind, aber mit Hilfe rekombinanter 3'-Prozessierungsfaktoren komplementiert werden können, ist folglich bereits mit zwei Reinigungsschritten gelungen. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass lediglich die Zugabe von Poly(A)-Polymerase und CF II ausreicht, um die Eluatfraktionen vollständig zu komplementieren (Daten nicht gezeigt). Dementsprechend ist davon auszugehen, dass diese beiden Faktoren durch die Größenausschlusschromatographie zumindest größtenteils abgetrennt wurden, alle weiteren essentiellen Faktoren der 3'-Prozessierung aber noch in den Eluatfraktionen nach Gelfiltration unvermindert enthalten sind. Mit dem Ziel, die Spaltungsaktivität von der Zugabe weiterer rekombinanter Faktoren abhängig zu machen, wurde versucht, die Eluatfraktionen „A5“ und „A6“ der Größenausschlusschromatographie weiter zu fraktionieren.

2.3.2.3 Anionenaustauschchromatographie

In Vorbereitung einer Anionenaustauschchromatographie (Resource Q) wurde ein Teil der Eluatfraktion „A5“ der zuvor gezeigten Größenausschlusschromatographie mit geeignetem Puffer verdünnt. Die Salzkonzentration in der Probe wurde dabei von 300 mM Kaliumchlorid auf 80 mM herabgesetzt. Weitere Experimente mit Eluatfraktionen der Größenausschlusschromatographie hatten gezeigt, dass die anfangs für den Kernextrakt beobachtete Sensibilität gegenüber Niedrigsalzbedingungen in den Fraktionen nach Gelfiltration deutlich geringer ausgeprägt ist (Daten nicht gezeigt). Entsprechend wurde auch beim Zentrifugationsschritt nach der hier angewandten Verdünnung kein sichtbares Proteinpellet produziert und auch keine Spaltungsaktivität in dieser Pelletfraktion nachgewiesen (Abbildung 2.31). Im Überstand war aufgrund der starken Verdünnung keine Spaltungsaktivität nachweisbar. Nach Verdünnung und Zentrifugation wurde der Überstand auf eine Resource Q-Säule geladen und mit einem steilen Gradienten steigender Kaliumchloridkonzentration eluiert. Das entsprechende Chromatogramm (mit UV-Profil, angelegtem Gradienten, Leitfähigkeit und Fraktionierung) ist in Abbildung 9.8 im Anhang dargestellt. Alle gesammelten Fraktionen wurden direkt im Anschluss an die Chromatographie mit 60% Ammoniumsulfat vollständig präzipitiert, die Pellets in Puffer mit 300 mM Kaliumchlorid resuspendiert und die erhaltenen Pelletfraktionen schließlich dialysiert. Durch den Fällungsschritt wurden die Fraktionen etwa fünffach konzentriert, durch die anschließende Dialyse wurde das Ammoniumsulfat aus den Fraktionen entfernt. Ausgewählte Fraktionen der Reinigung wurden mittels Western-Blot-Analysen auf den Verbleib der bekannten 3'-Prozessierungsfaktoren CPSF, CstF, CF I und CF II hin untersucht, dabei erfolgte der Nachweis anhand einzelner Untereinheiten der entsprechenden Proteinkomplexe. In Abbildung 2.30 ist zu erkennen, dass die einzelnen Komplexe versetzt voneinander von der Säule eluierten. Zunächst eluierte CstF in den Fraktionen „A6“ bis „A8“, gefolgt von CF II (Fraktion „A7“ und „A8“) und CF I (Fraktion „A8“), während der CPSF-Komplex zuletzt in einem recht breiten Peak eluierte (Fraktion „A8“ bis „A11“).

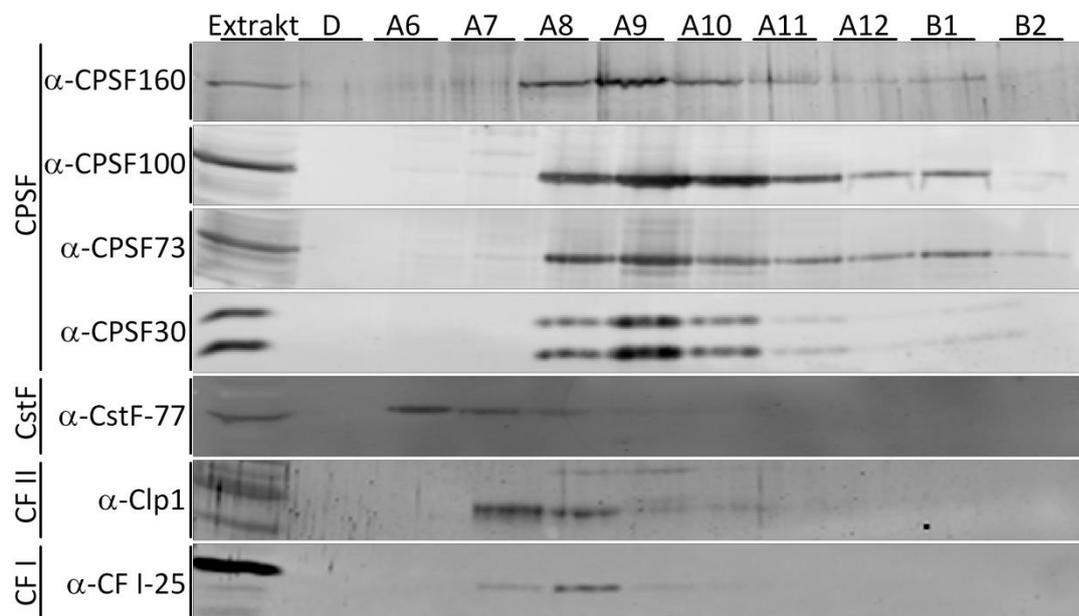


Abbildung 2.30: Western-Blot-Analysen von Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie.

Western-Blot-Analyse zum Nachweis bekannter 3'-Prozessierungsfaktoren in Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie (Resource Q). Die untersuchten Fraktionen der Reinigung sind oben benannt (Extrakt = HeLa-Kernextrakt, D = Durchfluss der Säule). Die zum Nachweis verwendeten Antikörper sind an der linken Seite aufgeführt, ebenso wie die Zugehörigkeit der detektierten Untereinheiten zu den Proteinkomplexen der 3'-Prozessierung. Alle gezeigten Signale stammen von einem Blot.

Da bereits die Eluatfraktion „E5“ der Größenausschlusschromatographie, welche für die hier angewandte Fraktionierung eingesetzt wurde, allein keine Spaltungsaktivität mehr besaß, war erwartungsgemäß auch keine der hier generierten Eluatfraktionen allein in der *In-Vitro*-Spaltung aktiv (Daten nicht gezeigt). Nach Komplementation der Reinigungsfraktionen mit Protein-Mix (Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I, CF II, Ssu72 und phosphorylierte CTD), konnte in den Eluatfraktionen „A8“ bis „A11“ Spaltungsaktivität wiederhergestellt werden. Der entsprechende *In-Vitro*-Spaltungsassay ist in Abbildung 2.31 zu sehen. Die Quantifizierung der Signale für das 5'-Spaltprodukt ergab, dass die Spaltungsaktivität in den Fraktionen „A8“, „A9“ und „A10“ im Vergleich zum *load* achtfach, fünffach und dreifach angereichert wurde. Insgesamt wurde etwa 50% der eingesetzten Spaltungsaktivität in den Eluatfraktionen wiedergefunden. Das in der Spaltungsreaktion der Durchflussfraktion detektierte Signal für das 5'-Spaltprodukt ist auf kontaminierende RNasen zurückzuführen, da ein entsprechendes Signal auch für die L3short Δ RNA sichtbar ist (neben weiteren Abbaufragmenten).

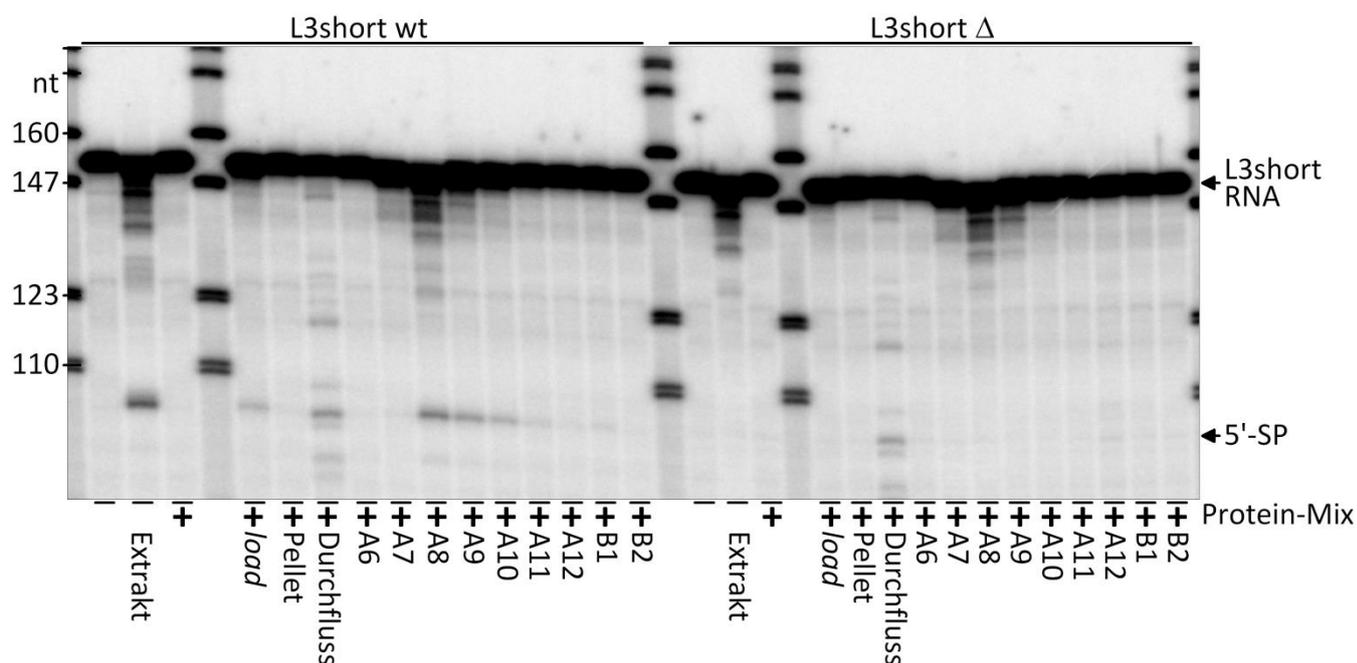


Abbildung 2.31: Spaltungsaktivität nach Fraktionierung mittels Anionenaustauschchromatographie.

Autoradiogramm nach denaturierender Harnstoff-PAGE zur Analyse der Spaltungsaktivität von Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie (Resource Q) auf L3short wt und Δ RNA. Die erste Spur von links für beide RNAs enthält jeweils nur RNA, die zweite Gelspur Reaktionen mit HeLa-Kernextrakt, die dritte Gelspur zeigt Reaktionen mit Protein-Mix aus rekombinanter Poly(A)-Polymerase, CPSF (7er-Komplex), CstF, CF I, CF II, Ssu72 und phosphorylierter CTD, jeweils zu 2,5 nM. In den nachfolgenden Gelspuren wurden Reaktionen mit dem *load* (unverdünnte Eluatfraktion „A5“ der Größenausschlusschromatographie), resuspendiertem Pellet nach Verdünnung und Zentrifugation und Fraktionen der Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Die Reinigungsfraktionen wurden in allen gezeigten Reaktionen mit Protein-Mix komplementiert. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind an der linken Seite zugeordnet. Auf der rechten Seite sind die Laufhöhen der nicht-gespaltenen L3short RNA sowie des erwarteten 5'-Spaltprodukts (5'-SP) angegeben.

Um herauszufinden, welche der rekombinanten Proteinfaktoren tatsächlich für die Komplementation der Spaltungsaktivität in den Eluatfraktionen der Anionenaustauschchromatographie notwendig sind, wurden die Eluatfraktionen „A9“ und „A10“ für einen weiteren *In-Vitro*-Spaltungsassay mit einzelnen sowie Kombinationen der rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren versetzt. Das Ergebnis dieses Experiments ist für die Eluatfraktion „A10“ in Abbildung 2.32 zu sehen, die Eluatfraktion „A9“ zeigte ein

2.3.2.4 Weitere Versuche zur Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt

Neben den gezeigten Reinigungen wurde auch versucht, 3'-Prozessierungsfaktoren des HeLa-Kernextraktes über Poly(A)-Sephrose (Affinitätschromatographie), Hydroxylapatit (Affinitätschromatographie), DEAE-Sephrose (Anionenaustauschchromatographie), Butyl-Sephrose (Hydrophobe Interaktionschromatographie) und Glycerin-Gradientenzentrifugation zu fraktionieren. In den Eluaten von entsprechenden Chromatographieschritten konnte allerdings, auch nach Komplementation mit rekombinanten Proteinfaktoren, keine Spaltungsaktivität nachgewiesen werden. Problematisch bei einigen dieser Reinigungsschritte war allerdings das zu Beginn beschriebene Präzipitationsverhalten der Spaltungsaktivität des Kernextraktes unter Niedrigsalzbedingungen (Abbildung 2.24). Da die Sensibilität gegenüber Niedrigsalz nach der Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie nicht mehr kritisch zu sein scheint (Abbildung 2.31), sollten einige dieser Fraktionierungsmethoden noch einmal auf ihre Tauglichkeit zur Fraktionierung der Spaltungsaktivität, im Anschluss an eine Gelfiltration, getestet werden.

3 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war die *In-Vitro*-Rekonstitution der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs in Säugetieren. Der erste Teil der Arbeit beschreibt die erste erfolgreiche Rekonstitution der Polyadenylierungsreaktion und die Definition eines minimalen CPSF-Komplexes für diese Reaktion. Im zweiten Teil wurden Versuche zur Rekonstitution der Spaltung und Isolation bislang unbekannter 3'-Prozessierungsfaktoren aus HeLa-Kernextrakt vorgestellt.

3.1 Vier Proteine rekonstituieren die Aktivität von CPSF in der Polyadenylierung

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine Kombination aus vier Polypeptiden ausreicht, um die Aktivität von CPSF in der Polyadenylierung, also die Stimulation der Poly(A)-Polymerase in Abhängigkeit vom Polyadenylierungssignal, zu rekonstituieren. Bei zweien dieser Proteine handelt es sich um die lange bekannten CPSF-Untereinheiten CPSF30 und CPSF160. Weiterhin sind die beiden Proteine hFip1 und WDR33 notwendig.

Die erste Rekonstitution der Polyadenylierungsaktivität von CPSF erfolgte mit den zwei Subkomplexen CPSF30-CPSF160 und WDR33-hFip1, welche separat voneinander dargestellt wurden (Abschnitte 2.1.1.1 und 2.1.1.4). Bei diesen Experimenten zeigte sich bereits, dass die beiden anderen etablierten CPSF-Untereinheiten CPSF73 und CPSF100 für die Polyadenylierung nicht notwendig sind und scheinbar auch keinen Einfluss auf die Reaktion ausüben.

Zwei Versuche, die Polyadenylierung mit weniger als den genannten vier Proteinen zu rekonstituieren, waren nicht erfolgreich. Einer dieser beiden Versuche wurde in Abschnitt 2.1.3 präsentiert. Das Auslassen jedes einzelnen der vier Proteine führte zum totalen Verlust der Polyadenylierungsaktivität. Die Löslichkeit und in der Folge auch die Konzentration der übrigen Proteine war in diesen Präparationen zwar recht variabel, diese Schwankungen sollten aber nicht ausreichend gewesen sein, um den vollständigen Ausfall der Polyadenylierungsaktivität zu bewirken. Folglich scheinen die vier Polypeptide CPSF30, CPSF160, hFip1 und WDR33 alle essentiell für die CPSF-Aktivität in der Polyadenylierung zu sein.

Der Komplex aus diesen vier Untereinheiten wurde entsprechend seiner Aktivität „mPSF“ (*mammalian polyadenylation specificity factor*) genannt und konnte im weiteren Verlauf der Arbeit als Komplex hergestellt und bis zur Homogenität gereinigt werden (Abschnitt 2.1.4). Das Verhalten des mPSF-Komplexes in Größenausschlusschromatographien deutet darauf hin, dass die Proteine zumindest teilweise in Form von Aggregaten vorliegen. Möglicherweise bilden die vier Proteine zwar einen Komplex, durch freiliegende (und möglicherweise hydrophobe) Bereiche kommt es aber zusätzlich zu Interaktionen zwischen den gebildeten Komplexen und größere, Aggregat-ähnliche Komplexe werden gebildet.

Durch Quantifizierung des aktiven Komplexes (quantitative Polyadenylierungsassays, Abbildungen 2.11 und 9.5) konnte gezeigt werden, dass der rekombinant präparierte mPSF-Komplex zu 100% aktiv vorliegt. Ferner hat Peter Schäfer die RNA-Bindung von mPSF genauer untersucht: mPSF bindet mit hoher Affinität an RNAs mit intaktem Polyadenylierungssignal (K_D von etwa 2 nM für kurze Wigley10-Oligonukleotide und die 65-Nukleotid lange L3prä RNA [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 3.C und D]). In Filterbindungsexperimenten mit der 147-Nukleotid langen L3short RNA zeigte mPSF eine nur gering ausgeprägte Spezifität für das Polyadenylierungssignal (Abbildung 2.22). Vermutlich vermitteln CPSF160 und hFip1 außerhalb des Polyadenylierungssignals weitere Interaktionen mit der RNA und erlauben dadurch auch die effiziente Bindung von RNA-Substraten mit mutiertem Polyadenylierungssignal. Die Abhängigkeit der RNA-Bindung des später untersuchten 7er-Komplexes aus CPSF-Untereinheiten von einem intakten Polyadenylierungssignal in der RNA war wiederum noch geringer ausgeprägt.

Womöglich fanden hier noch umfassendere Interaktionen zur RNA statt, welche die Gesamtbindung weiter verstärkten und vom Polyadenylierungssignal unabhängig gestalteten.

Interessant ist, dass verschiedene Präparationen der rekombinanten Proteine zu sehr unterschiedlichen Mustern in der Polyadenylierung führen: In der ersten Rekonstitution der Polyadenylierung aus CPSF-Subkomplexen wurde die L3prä RNA-Substrate sehr gleichmäßig, aber nur um etwa 20 bis 100 Adenylatreste verlängert (Abbildung 2.5.B). Der später gereinigte 6er-Komplex aus CPSF30, CPSF73, CPSF100, CPSF160, hFip1 und WDR33 führte hingegen zur Bildung von Poly(A)-Schwänzen sehr variabler Länge, teilweise mit über 500 Nukleotiden, wobei aber nur wenige der angebotenen RNA-Substratmoleküle verlängert wurden (Abbildung 2.7.C). Der 6er-Komplex hatte zudem eine etwa zehnfach geringere Affinität in der RNA-Bindung, im Vergleich zum mPSF-Komplex (K_D von etwa 20 nM für die AAUAAA-haltigen Wigley10-Oligonukleotide [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 1.C]). Der zuletzt gereinigte mPSF-Komplex führte ebenso zur Bildung von Poly(A)-Schwänzen sehr unterschiedlicher Länge, wobei hier aber nahezu die gesamte Substrat-RNA umgesetzt wurde (z.B. Abbildung 2.13). Weiterhin war die Spezifität der Poly(A)-Polymerase-Stimulation für das Polyadenylierungssignal in den Assays unterschiedlich stark ausgeprägt. Eine mögliche Erklärung für dieses unterschiedliche Verhalten in der Stimulation der Poly(A)-Polymerase und der Sequenzspezifität von mPSF besteht in den unterschiedlichen Konzentrationen und Reinheitsgraden der eingesetzten Proteinpräparationen. Erst für die später durchgeführten Polyadenylierungsassays (z.B. Abbildungen 2.13 und 2.14.C) wurden definierte Mengen an mPSF-Komplex eingesetzt. Bei vorhergehenden Assays wurden lediglich bestimmte Volumina der jeweiligen Proteinpräparationen genutzt. In den späteren Assays zeigten mPSF und aus Kalbsthymus gereinigtes CPSF (CPSF IV) sehr ähnliche Polyadenylierungsmuster. Weiterhin ist in der *In-Vitro*-Polyadenylierung in Abbildung 2.14.C zu erkennen, dass steigende Mengen eingesetzten mPSF-Komplexes zu einer sinkenden Spezifität der Poly(A)-Polymerase-Stimulation führten. Ebenfalls findet die Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch CPSF (und so vermutlich auch durch mPSF) auf RNA-Substraten mit wachsenden Poly(A)-Schwänzen zunehmend unabhängig vom Polyadenylierungssignal statt [Kühn *et al.*, 2009]. Liegen im Polyadenylierungsassay bereits adenylierte RNA-Substrate vor, so kann CPSF bzw. mPSF statt an das Polyadenylierungssignal auch an den Poly(A)-Schwanz dieser RNA-Substrate binden (durch die starke Sequenzähnlichkeit des Polyadenylierungssignals AAUAAA zum Poly(A)-Schwanz). Die Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch CPSF bzw. mPSF ist in diesen Fällen weniger abhängig vom Polyadenylierungssignal. Weiterhin ist bekannt, dass die Poly(A)-Polymerase selbst eine gewisse Präferenz für RNA-Substrate hat, welche auf einen Adenylatrest enden [Wahle, 1991b]. Schließlich ist es möglich, dass Unterschiede in den Reaktionsbedingungen, z.B. durch unterschiedliche Mengen an Salz, welche mit den Proteinpräparationen eingetragen werden, entsprechende Auswirkungen auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase und das Muster sowie die Spezifität der Polyadenylierung haben.

Es wurde weiterhin versucht, die Stöchiometrie der Untereinheiten innerhalb des mPSF-Komplexes zu analysieren; dies ist bislang jedoch nicht gelungen und weitere Untersuchungen in dieser Richtung stehen aus. Für strukturelle Untersuchungen am mPSF-Komplex (sowie auch an größeren CPSF-Komplexen und den anderen Proteinkomplexen der Spaltungsreaktion) wurde eine Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Elena Conti (Abteilung Strukturbiologie, Max-Planck-Institut, Martinsried) initiiert. Bis zum Abschluss dieser Arbeit lagen jedoch noch keine nennenswerten Ergebnisse aus dieser Zusammenarbeit vor.

3.1.1 WDR33 ist eine essentielle Untereinheit des CPSF-Komplexes und bindet direkt an das Polyadenylierungssignal von Prä-mRNAs

Shi und Kollegen haben gezeigt, dass die Depletion von WDR33 die Effizienz beider 3'-Prozessierungsreaktionen, Spaltung und Polyadenylierung, drastisch reduziert. Weiterhin haben sie postuliert, dass das Protein eine bislang unbekannte Untereinheit des CPSF-Komplexes darstellen könnte [Shi *et al.*, 2009].

Die Experimente in Abschnitt 2.1.2 (systematische Analyse von 4er-, 5er- und 6er-Komplexen) bestätigten, dass WDR33 eine Untereinheit des CPSF-Komplexes und essentiell für die Aktivität von CPSF in der Polyadenylierung ist: Erst die Koexpression von WDR33 mit den anderen CPSF-Untereinheiten (CPSF30, CPSF73, CPSF100, CPSF160 und hFip1) führte zu einer Proteinpräparation, welche die Poly(A)-Polymerase in Abhängigkeit vom Polyadenylierungssignal stimulierte.

In *Crosslink*-Experimenten konnte Peter Schäfer zeigen, dass WDR33, in Kooperation mit CPSF30, direkt an das Polyadenylierungssignal von RNAs bindet und somit maßgeblich für die Erkennung dieser Sequenz durch den CPSF-Komplex verantwortlich ist. Die RNA-Bindung wird dabei durch die N-terminale WD40-Domäne von WDR33 gewährleistet. Ein in der Arbeitsgruppe von Michaela Zavolan durchgeführtes PAR-CLIP-Experiment zur Analyse der RNA-Bindung von WDR33 *in vivo* bestätigte die direkte Assoziation von WDR33 an das Polyadenylierungssignal von Prä-mRNAs [Schönemann *et al.*, 2014, Abbildung 5.A und B]. Die bisherige Annahme, dass CPSF160 für die Erkennung und Bindung des Polyadenylierungssignals verantwortlich ist, beruhte maßgeblich auf UV-*crosslinks* mit aus Gewebe gereinigten CPSF-Komplexen, bei welchen eine Proteinbande von 160 kDa beobachtet wurde [Gilmartin & Nevins, 1989; Keller *et al.*, 1991]. WDR33 zeigt in Gelelektrophoresen ein identisches Migrationsverhalten zu CPSF160, die beiden Proteine werden daher in SDS-PAGEs nicht voneinander getrennt (Abbildung 2.10). Da WDR33 damals noch nicht als Untereinheit von CPSF bekannt war, wurden die beobachteten UV-*crosslinks* CPSF160 zugeschrieben. Die aktuelle Datenlage lässt nun aber den Schluss zu, dass die seinerzeit beobachteten *crosslinks* auf WDR33 zurückzuführen sind. Dieser Sachverhalt erklärt zusätzlich die kontroverse Beobachtung, dass die RNA-Bindung von rekombinantem CPSF160 unabhängig von einem vorhandenen Polyadenylierungssignal war [Murthy & Manley, 1995].

Die Bindung des Polyadenylierungssignals durch WDR33 und CPSF30 wurde, zusätzlich zu unseren eigenen Daten, auch von Chan und Kollegen beobachtet [Chan *et al.*, 2014]. In der entsprechenden Arbeit wurden *Crosslink*-Experimente mit CPSF durchgeführt, welches zuvor via Immunopräzipitation gereinigt wurde; so wurde gezeigt, dass sowohl WDR33, als auch CPSF30 essentiell für die Erkennung des Polyadenylierungssignals sind.

Passend zu den beschriebenen Interaktionen der Proteine zur Poly(A)-Polymerase, scheint die vorrangige Funktion von CPSF160 und hFip1 in der Polyadenylierung die Rekrutierung der Poly(A)-Polymerase zum mPSF-, bzw. CPSF-Komplex zu sein [Murthy & Manley, 1995; Kaufmann *et al.*, 2004].

3.1.2 CPSF30 und CPSF160 bilden einen definierten CPSF-Subkomplex

CPSF30 und CPSF160 wurden koexprimiert und konnten anhand des N-terminalen Flag-tags an CPSF160 als Komplex nahezu bis zur Homogenität gereinigt werden (Abschnitt 2.1.1.1). Die beiden CPSF-Untereinheiten scheinen daher in direktem Kontakt miteinander zu stehen. Eine entsprechende Interaktion zwischen CPSF30 und CPSF160 ist bislang weder für die humanen, noch für die homologen Proteine aus der Bäckerhefe (Yth1p und Yhh1p) beschrieben, existiert aber in *Arabidopsis thaliana* [Hunt *et al.*, 2008].

Im Gegensatz zu den anderen dargestellten CPSF-Subkomplexen eluierte der CPSF30-CPSF160-Subkomplex in der Größenausschlusschromatographie außerhalb des Ausschlussvolumens der Säule (Abbildung 2.1.B). Die beobachtete Elution des Komplexes entspricht etwa einem nativen Molekulargewicht von 300 kDa. Die geringe Auflösung der Gelfiltration lässt keine verlässliche Schlussfolgerung hinsichtlich der Stöchiometrie von CPSF30 und CPSF160 im Komplex zu. Der Subkomplex scheint aber zumindest nicht wie der Subkomplex aus CPSF73 und CPSF100 Aggregate zu bilden, sondern in definierter Form vorzuliegen.

Der CPSF30-CPSF160-Subkomplex bindet an RNA, allerdings nicht in Abhängigkeit vom Polyadenylierungssignal (Abbildung 2.1.C). Entsprechende RNA-Bindungsaktivitäten sind bereits für beide einzelnen Proteine beschrieben [Murty & Manley, 1995; Barabino *et al.*, 1997, 2000].

Ein Einfluss dieses CPSF-Subkomplexes auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase wurde nicht beobachtet (Abbildung 2.1.D).

3.1.3 Rekombinantes hFip1 steigert die Aktivität der Poly(A)-Polymerase, zusammen mit dem CPSF30-CPSF160-Subkomplex

Es wurde bereits gezeigt, dass rekombinantes hFip1 in der Lage ist, die Poly(A)-Polymerase unabhängig vom Polyadenylierungssignal in ihrer Aktivität zu stimulieren [Kaufmann *et al.*, 2004]. hFip1 bindet dabei wahrscheinlich an das RNA-Substrat und rekrutiert die Poly(A)-Polymerase. Dieser Effekt konnte im Rahmen dieser Arbeit reproduziert werden (Abbildung 2.4.B). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Zugabe des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes zu Polyadenylierungsreaktionen mit hFip1 zu einer verstärkten Stimulation der Poly(A)-Polymerase führt (Abbildung 2.4.B). Da CPSF30 und CPSF160 allein keinen Einfluss auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase haben, führt die Präsenz dieses Subkomplexes vermutlich zu einer verstärkten Bindung von hFip1 an die RNA und über diesen Weg zu einer effizienteren Rekrutierung der Poly(A)-Polymerase zur Substrat-RNA. Zu dieser Hypothese passende Interaktionen zwischen CPSF30 und hFip1 wurden von Rolland und Kollegen beobachtet [Rolland *et al.*, 2014].

3.1.4 Symplekin zeigt keine Interaktionen mit mPSF, wohl aber mit größeren CPSF-Komplexen

In dieser Arbeit wurde versucht, Symplekin zusammen mit dem mPSF-Komplex zu reinigen. Dabei wurde Symplekin jedoch mit jedem Reinigungsschritt weiter abgereichert und es konnten lediglich Spuren des Proteins in den finalen Fraktionen nachgewiesen werden (Abschnitt 2.1.6). Die verbliebenen Mengen an Symplekin in der mPSF-Präparation hatten zudem keinen sichtbaren Einfluss auf die Aktivität von mPSF in der Polyadenylierung. Entsprechend den präsentierten Ergebnissen sind in der Literatur bislang auch keine Interaktionen zwischen Symplekin und den Komponenten des mPSF-Komplexes beschrieben. Die Assoziation von Symplekin mit CPSF scheint folglich auf die beiden CPSF-Untereinheiten CPSF73 und CPSF100 beschränkt zu sein, entsprechende Interaktionen sind in der Literatur beschrieben [Kolev *et al.*, 2008; Sullivan *et al.*, 2009]. Passend dazu konnte Symplekin zwar nicht mit mPSF, wohl aber nach Koexpression mit größeren CPSF-Komplexen, welche entsprechend auch CPSF73 und CPSF100 enthielten, gereinigt werden. In diesem Zusammenhang hatte Symplekin zudem einen deutlichen positiven Einfluss auf die Löslichkeit der anderen CPSF-Untereinheiten (Abschnitte 2.2.4 und 2.2.5).

3.1.5 mPSF ist funktional in der Poly(A)-Längenkontrolle *in vitro*

Es konnte gezeigt werden, dass mPSF in der *In-Vitro*-Polyadenylierung kooperativ mit rekombinatem PABPN1 agiert und die Länge der gebildeten Poly(A)-Schwänze limitiert ist: Im Polyadenylierungsassay in Abbildung 2.13 wurden in der Reaktion mit mPSF und PABPN1 bereits nach kurzer Inkubationszeit (30 Sekunden) sehr lange Poly(A)-Schwänze detektiert, welche im weiteren Verlauf der Reaktion nicht mehr wesentlich verlängert wurden. Stattdessen wurden weitere RNA-Substratmoleküle mit Poly(A)-Schwänzen entsprechender Länge versehen. Der Mechanismus der Längenkontrolle in der Polyadenylierung, welcher mit Hilfe von aus Kalbsthymus gereinigtem CPSF-Komplex beschrieben wurde [Kühn *et al.*, 2009], scheint sich daher auch mit dem rekombinanten mPSF-Komplex rekapitulieren zu lassen. Folglich verhält sich der dargestellte mPSF-Komplex nach derzeitigem Kenntnisstand in der Polyadenylierung identisch zu aus Gewebe gereinigtem CPSF und ist in der Lage, alle bekannten Funktionen von CPSF in der Polyadenylierung zu bewerkstelligen.

3.2 *In-Vitro*-Rekonstitution der Spaltungsreaktion bleibt erfolglos

In Abschnitt 2.2.6 sind vier Versuche gezeigt, die Spaltungsreaktion mit Hilfe verschiedener Kombinationen der rekombinanten Proteinfaktoren zu rekonstituieren. In keinem der entsprechenden Assays konnte eine spezifische Spaltung der Substrat-RNA detektiert werden. Ebenso wurde in vielen weiteren Rekonstitutionsversuchen keine Spaltungsaktivität mit ausschließlich rekombinanten Proteinen erzielt. Die Rekonstitution des ersten Schrittes der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs, der Spaltungsreaktion, ist demnach nicht gelungen.

Sämtliche Proteinpräparationen wurden auch zu Spaltungsreaktionen mit HeLa-Kernextrakt gegeben, dabei wurde für keinen der rekombinanten Proteinfaktoren ein inhibitorischer Einfluss auf die Spaltung detektiert (Daten nicht gezeigt). Interessant ist der Umstand, dass der HeLa-Kernextrakt durch Behandlung mit unspezifischer Phosphatase (*calf intestinal phosphatase*) inaktiviert werden kann, die Zugabe der Phosphatasen Ssu72 und PP1 α hingegen aber keine Auswirkung auf die Spaltungsaktivität des Kernextraktes hat, obwohl für beide Enzyme gezeigt wurde, dass sie *in vitro* aktiv sind (Daten nicht gezeigt). Eine Inhibition der Spaltung durch Phosphatasen ist in der Literatur beschrieben, in der entsprechenden Arbeit wurde auch die Inhibition der Spaltung durch PP1 α gezeigt [Ryan, 2007]. Später haben Shi und Kollegen hingegen beobachtet, dass die Depletion von PP1 α keinen Einfluss auf die Spaltungseffizienz von HeLa-Kernextrakt hat und PP1 α lediglich an der Polyadenylierungsreaktion beteiligt ist [Shi *et al.*, 2009]. Für die in dieser Arbeit beschriebene Rekonstitution der Polyadenylierung wurde das Protein jedoch nicht benötigt. Es ist also fraglich, ob PP1 α , bzw. der PP1-Komplex im Gesamten eine essentielle Funktion in der 3'-Prozessierung erfüllt und ob diese Funktion auf die Spaltung oder die Polyadenylierung beschränkt ist.

Die rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren Poly(A)-Polymerase, CstF, CF I und CF II konnten bis zur Homogenität gereinigt werden und verhalten sich in ihren Aktivitäten entsprechend den Erwartungen: Die Poly(A)-Polymerase zeigt katalytische Aktivität. CstF, CF I und CF II binden an RNA und Clp1 (aus dem CF II-Komplex) ist eine aktive 5'-Polynukleotidkinase. Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Poly(A)-Polymerase, CstF und CF II in der Spaltungsreaktion aktiv sind (Abschnitte 2.3.2.3 und 3.2.1). Problematisch gestaltete sich Präparation von rekombinantem CPSF: Zum Einen ist es nicht gelungen, einen definierten Komplex aus mehr als vier CPSF-Untereinheiten bis zur Homogenität zu reinigen. Zum Anderen haben sich die dargestellten CPSF-Komplexe problematisch hinsichtlich ihrer Löslichkeit verhalten und neigten zur Aggregation. Weiterhin ist auffällig, dass mehrere der Peptidfusionen an einzelnen CPSF-Untereinheiten nach Koexpressionen nicht mehr für Affinitätsreinigungen zur Verfügung standen, wahrscheinlich da sie im Komplex verdeckt vorlagen und daher nicht mit der Affinitätsreinigungsmatrix interagieren konnten. Dies wurde sowohl für den N-terminalen Flag-*tag* an CPSF160, als auch für die N-terminalen Strep-, bzw. His-*tags* an CPSF73 und Symplekin beobachtet. Schließlich wurde auch die Dissoziation von CPSF-Komplexen während bestimmter Reinigungsschritte beobachtet (Anionenaustauschchromatographie (Resource Q) und Größenausschlusschromatographie (Superose 6), Daten nicht gezeigt). Ähnliche Probleme bei der Präparation von Proteinkomplexen aus CPSF-Untereinheiten wurden auch in der Arbeitsgruppe von Elena Conti (Abteilung Strukturbiologie, Max-Planck-Institut, Martinsried) verzeichnet (persönliche Korrespondenz mit Dr. Christian Benda). Eine mögliche Erklärung für das bislang fragwürdige Verhalten von rekombinanten CPSF-Komplexen ist, dass weitere Proteine notwendig sind, um stabile Proteinkomplexe zu bilden. Ohne diese weiteren Proteine liegen zu viele ungenutzte (und möglicherweise hydrophobe) Interaktionsflächen an der Oberfläche der Komplexe vor, welche unspezifische Interaktionen eingehen können und so zur Aggregation führen. Aufgrund der beschriebenen Probleme bei der Präparation von handhabbaren Proteinkomplexen steht CPSF derzeit im Fokus der Suche nach Ursachen für die bislang erfolglose Rekonstitution der Spaltung.

Da die Rekonstitution der Spaltungsreaktion bislang nicht gelungen ist wird davon ausgegangen, dass entweder noch nicht alle essentiellen Faktoren in rekombinanter Form vorliegen, oder dass mindestens einer der rekombinanten Faktoren inaktiv in der Spaltung ist. Letzteres ist beispielsweise möglich, wenn einer der 3'-Prozessierungsfaktoren eine bestimmte Modifikation benötigt, um in der Spaltungsreaktion aktiv zu sein, diese Modifikation aber im Zuge der rekombinanten Expression in Insektenzellen nicht gewährleistet wird oder im Laufe der Reinigung verloren geht. So wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Poly(A)-Polymerase, zusätzlich zu Phosphorylierungen und Acetylierungen, auch sumoyliert wird. Die Sumoylierung beeinflusst über mehrere Mechanismen die Funktion der Polymerase: So ist die Sumoylierung beispielsweise essentiell für die nukleäre Lokalisation der Poly(A)-Polymerase *in vivo*, reduziert aber die enzymatische Aktivität *in vitro* [Vethantham *et al.*, 2008]. Wie groß der Einfluss von Sumoylierungen auf die Aktivität der Poly(A)-Polymerase *in vivo* ist und ob die Sumoylierung der Polymerase die Interaktionen des Enzyms mit CPSF und PABPN1 beeinflusst, ist bislang nicht untersucht. Weitere Beispiele für Modifikationen von 3'-Prozessierungsfaktoren sind in der Literatur zu finden: CPSF73 und Symplekin wurden als Sumoylierungssubstrate identifiziert und die Inhibition der Sumoylierung in Kernextrakten, sowie die Behandlung von Kernextrakten mit SUMO-Protease, führen zu einer verminderten Aktivität der Kernextrakte in Spaltung und Polyadenylierung [Vethantham *et al.*, 2007]. Weiterhin wurde die spezifische symmetrische Dimethylierung von Argininseitenketten des 3'-Prozessierungsfaktors CF I-68 nachgewiesen. Ein möglicher Einfluss der entsprechenden Modifikationen auf die Funktion des CF I-Komplexes in der 3'-Prozessierung wurde in der entsprechenden Arbeit zwar diskutiert, aber nicht untersucht [Martin *et al.*, 2010]. In der Arbeitsgruppe wurde damit begonnen Sumoylierungsfaktoren herzustellen, so dass der Einfluss von Sumoylierungen auf die einzelnen Aktivitäten der rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren sowie deren Aktivität in der Spaltungsreaktion untersucht werden kann.

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Proteinen wird in der Arbeitsgruppe an der Darstellung weiterer putativer 3'-Prozessierungsfaktoren gearbeitet. Noch zu testende Faktoren sind zum Beispiel die zweite Variante der CstF-Untereinheit CstF-64, CstF-64 τ , oder die kleinere Variante von CF I-68, CF I-59. Weiterhin wird versucht, das Protein Rbbp6 in definierterer Form zu präparieren, da dieser Faktor nach derzeitigem Kenntnisstand essentieller Bestandteil des Spaltungskomplexes ist [Shi *et al.*, 2009; Di Giammartino *et al.*, 2014].

Schrieck und Kollegen konnten den CPF-Komplex aus der Bäckerhefe durch Tandemaffinitätschromatographie (*tag* an Ref2p) mit allen 15 Untereinheiten in hoher Reinheit isolieren [Schrieck *et al.*, 2014]. Für einige Komponenten des CPF-Komplexes sind bislang keine eindeutigen homologen Proteine in Säugetieren beschrieben (vgl. Tabelle 1.1): So ist die Sequenzhomologie der Hefefaktoren Pti1p, Ref2p und Syc1p zu den Säugetierproteinen CstF-64 τ , PNUTS und RC-68 ist nur äußerst gering ausgeprägt. Die Annahme, dass es sich bei den entsprechenden Proteinen um Homologe handelt, resultiert überwiegend aus der intensiven Suche nach homologen Proteinen im Ausschlussverfahren und daher einem Mangel an Alternativen. Die Homologie der CPF-Komponenten Ssu72p, Swd2p und Glc7p zu Ssu72, WDR82 und PP1 α ist hingegen etwas eindeutiger, ein funktionaler Zusammenhang zwischen diesen Proteinen und der 3'-Prozessierung ist bislang aber nur für PP1 α beschrieben [Ryan, 2007, Shi *et al.*, 2009]. Der von Schrieck und Kollegen isolierte Komplex soll ausreichend sein, um geeignete Prä-mRNA-Substrate *in vitro* spezifisch zu spalten (persönliche Kommunikation mit Lori Passmore, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge). Aus diesem Grund und aufgrund der anderen bekannten Parallelen zwischen den 3'-Prozessierungsapparaten aus Säugetieren und Bäckerhefe, werden die Arbeiten zur rekombinanten Darstellung der putativen 3'-Prozessierungsfaktoren Ssu72, WDR82, PP1 α , CstF-64 τ , PNUTS und RC-68 in der Arbeitsgruppe weitergeführt.

3.2.1 Rekombinante Präparationen von Poly(A)-Polymerase, CstF und CF II sind aktiv in der Spaltungsreaktion

Durch das in Abbildung 2.32 dargestellte Experiment konnte, mit fraktioniertem HeLa-Kernextrakt als Hilfsmittel, gezeigt werden, dass die rekombinanten Präparationen von Poly(A)-Polymerase, CstF und CF II aktiv in der Spaltungsreaktion sind. In der entsprechenden Fraktion „A10“ nach Anionenaustauschchromatographie aus Kernextrakt sind die entsprechenden Faktoren in Western-Blot-Analysen nicht mehr detektierbar (gezeigt für CstF-77 und Clp1, Abbildung 2.30). Die Fraktion „A10“ selbst besitzt keine Spaltungsaktivität mehr, lässt sich aber durch Komplementation mit Poly(A)-Polymerase, CstF und CF II reaktivieren. Die Komplementation mit einzelnen dieser Faktoren reichte nicht aus, um die Spaltungsaktivität wiederherzustellen.

Über die Aktivität der rekombinanten Präparationen von CPSF (7er-Komplex) und CF I in der Spaltung kann bislang keine Aussage getroffen werden. Für entsprechende Experimente muss der Kernextrakt zunächst weiter fraktioniert werden, um die Spaltungsaktivität von der Zugabe dieser weiteren Faktoren abhängig zu machen.

3.3 Spaltungsaktivität von HeLa-Kernextrakt ist limitiert

In Spaltungskinetiken mit HeLa-Kernextrakt sowie Spaltungsassays mit aus Kernextrakt gewonnenen Fraktionen wurde stets ein begrenzter Umsatz der eingesetzten Substrat-RNA beobachtet (etwa 2,5 bis 7,5 fmol RNA wurde durch 1 μ l Kernextrakt gespalten). Es konnte gezeigt werden, dass diese Limitierung unabhängig von der gewählten Substrat-RNA (gezeigt für L3 und L3short RNA, weiterhin getestet für SV40late und PAPOLA RNA) und der eingesetzten RNA-Konzentration ist (Abbildungen 2.25 und 2.26). Stattdessen ist die Spaltungsausbeute durch den Kernextrakt selbst begrenzt (Abbildung 2.27.C und D). Weiterhin wurde gezeigt, dass die Limitierung der Spaltung nicht ausschließlich durch eine Inaktivierung des Extraktes über die Zeit der Inkubation zu erklären ist (Abbildung 2.27.A und B). Es gibt mehrere mögliche Mechanismen, welche für die Begrenzung der Spaltungsaktivität im Kernextrakt verantwortlich sein könnten: Eine Möglichkeit ist, dass der Spaltungsapparat nach vollzogener Spaltung nicht in der Lage ist vollständig von der gespaltenen RNA zu dissoziieren und somit nicht für die Spaltung weiterer RNA-Substrate zur Verfügung steht. *In vivo* verbleiben einige der Spaltungsfaktoren nach der Spaltung auf dem 5'-Fragment der RNA und vermitteln dessen Polyadenylierung. In den durchgeführten Spaltungsassays wurde Cordycepintriphosphat verwendet, um eine Polyadenylierung des 5'-Spaltproduktes zu verhindern. Möglicherweise führt diese künstliche Blockierung der Polyadenylierungsreaktion zum Verbleib (eines Teils) des Spaltungsapparates auf der RNA. Entsprechende Beobachtungen wurden von Zarkower und Wickens beschrieben: Werden RNAs mit intaktem Polyadenylierungssignal in Gegenwart von Cordycepin in Kernextrakt inkubiert, so bildet sich ein stabiler Komplex auf den RNAs. Dieser Komplex ist über einen Zeitraum von zwei Stunden stabil und nicht in der Lage weitere Reaktionszyklen (der Spaltung) zu durchlaufen [Zarkower & Wickens, 1987]. Andere Methoden, die Polyadenylierung des 5'-Spaltproduktes in Spaltungsreaktionen zu unterbinden (Spaltung in Gegenwart von EDTA oder α,β -Methylenadenosin-5'-Triphosphat (AMPCPP)), wurden in dieser Arbeit nicht getestet. Weiterhin ist es möglich, dass während der Spaltung auch eine Komponente des Kernextraktes umgesetzt wird und der Extrakt nach Verbrauch dieser Komponente keine Spaltungsaktivität mehr besitzt. Vorstellbar wäre zum Beispiel eine Inaktivierung des Spaltungskomplexes durch Kinasen oder Phosphatasen, parallel zur Katalyse der Spaltung.

Weitere Experimente sind notwendig, um die limitierte Kapazität des Kernextraktes zur Spaltung zu klären. Entsprechende Erkenntnisse könnten hilfreich für eine effizientere Fraktionierung der Spaltungsaktivität sowie für die Rekonstitution der Spaltungsreaktion sein.

3.4 Fraktionierung von HeLa-Kernextrakt zur Identifikation unbekannter 3'-Prozessierungsfaktoren

Bei der Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt wurde zunächst beobachtet, dass eine niedrige Ionenstärke zur Präzipitation eines Großteils der Spaltungsaktivität führt (Abbildung 2.24). Aus diesem Grund wurde nicht-dialysierter Kernextrakt als Ausgangsmaterial für die Fraktionierung gewählt und zu Beginn der Fraktionierung auf Reinigungsschritte verzichtet, welche eine Verringerung der Ionenstärke im zu fraktionierenden Material voraussetzen.

Mittels Ammoniumsulfatpräzipitation konnte die Spaltungsaktivität zweieinhalbfach angereichert werden, bei einer Ausbeute von etwa 80% (Abbildung 2.28). In der nachfolgenden Größenausschlusschromatographie wurde die Spaltungsaktivität weiterhin etwa zweifach angereichert, bei einer Ausbeute von 60%. Die Fraktionen der Gelfiltration mussten mit rekombinanter Poly(A)-Polymerase und CF II komplementiert werden, um Spaltungsaktivität zu gewährleisten. Dies spricht für die Abreicherung der entsprechenden Proteine während der Fraktionierung (Abbildung 2.29). Das Elutionsvolumen der komplementierbaren Fraktionen nach Größenausschlusschromatographie entspricht einem nativen Molekulargewicht von 2 bis 15 MDa.

Es wurde beobachtet, dass die Spaltungsaktivität in Fraktionen der Gelfiltration (nach Komplementation) wenig empfindlich gegenüber Niedrigsalzbedingungen war. Entsprechend konnte eine Anionenaustauschchromatographie als dritter Schritt zur Fraktionierung der Spaltungsaktivität gewählt werden (Abschnitt 2.3.2.3). Mittels Resource Q-Fraktionierung konnte die Spaltungsaktivität zum Einen weiter angereichert werden (etwa achtfache Anreicherung in der Peakfraktion „A8“), zum Anderen ist nun zusätzlich eine Komplementation mit rekombinantem CstF notwendig, um die Spaltungsaktivität wiederherzustellen (Abbildung 2.32). Eine Abreicherung von CstF in den entsprechenden Fraktionen konnte mittels Western-Blot-Analysen nachgewiesen werden (Abbildung 2.30). Die Ausbeute an Spaltungsaktivität nach Anionenaustauschchromatographie betrug etwa 50%.

Um die Spaltungsaktivität von der Komplementation durch weitere rekombinante Proteinfaktoren abhängig zu machen und somit bislang unbekannte Spaltungsfaktoren weiter zu isolieren, sind weitere Schritte der Fraktionierung notwendig. Da die Spaltungsaktivität inzwischen weniger sensitiv gegenüber Niedrigsalzbedingungen zu sein scheint, stehen mehrere mögliche Techniken für die weitere Reinigung zur Verfügung. Strategien zur Reinigung von 3'-Prozessierungsfaktoren legen nahe, dass etwa eine Kationenaustauschchromatographie, hydrophobe Interaktionschromatographie oder die Reinigung über eine Heparin-Matrix eine weitere Abreicherung der bekannten 3'-Prozessierungsfaktoren bewirken sollte [Takagaki *et al.*, 1989]. Entsprechende Literaturvergleiche lassen vermuten, dass auch eine Wiederholung der Anionenaustauschchromatographie unter Anwendung eines flacheren Salzgradienten bei der Elution zu einer weiteren Auftrennung der bekannten Spaltungsfaktoren führen würde.

Weiterhin ist geplant, den fraktionierten Kernextrakt mit einem biotinylierten RNA-Substrat zu inkubieren und den assemblierten Spaltungskomplex anschließend mittels Streptavidin-*pull down* anzureichern. Gegebenenfalls müsste der auf dem RNA-Substrat assemblierte Spaltungskomplex für eine effiziente Reinigung durch mildes *crosslinking* stabilisiert werden. Ebenfalls ist es möglich, dass das RNA-Substrat durch chemische Modifikation unspaltbar gemacht werden muss, um eine Umsetzung der RNA und die damit vermutlich verbundene Dissoziation (eines Teils) des Spaltkomplexes zu unterbinden.

4 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde der zweite Teilschritt der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs in Säugetieren, die Polyadenylierung, zum ersten Mal *in vitro* rekonstituiert. Es wurde gezeigt, dass ein Komplex aus vier rekombinanten Proteinen ausreicht, um die Aktivität von CPSF in der Polyadenylierung zu gewährleisten. Dieser Komplex wurde entsprechend seiner Funktion mPSF (*mammalian polyadenylation specificity factor*) genannt und besteht aus CPSF30, CPSF160, WDR33 und hFip1. Die beiden anderen etablierten CPSF-Untereinheiten CPSF73 und CPSF100 sind nicht notwendig für die Funktion von CPSF in der Polyadenylierung.

Weiterhin ist der mPSF-Komplex in der Lage, kooperativ mit PABPN1 zu agieren und die Längenkontrolle der Polyadenylierung *in vitro* zu rekapitulieren.

Ferner wurde gezeigt, dass die Erkennung des Polyadenylierungssignals durch die Proteine WDR33 und CPSF30 bewerkstelligt wird und nicht, wie lange vermutet wurde, durch CPSF160. Dieser Befund wurde, parallel zu dieser Arbeit, durch Chan und Kollegen bestätigt [Chan *et al.*, 2014].

Ungeklärt sind bislang die Stöchiometrie und die Anordnung der mPSF-Untereinheiten im Komplex. Entsprechende strukturelle Untersuchungen an mPSF sowie an größeren rekombinanten CPSF-Komplexen wurden begonnen, waren bislang aber nicht von Erfolg gekrönt. Weiterhin stehen Versuche aus, um den Beitrag von CPSF160 und hFip1 zur RNA-Bindung des mPSF-Komplexes zu klären.

Die Darstellung von rekombinanten CPSF-Komplexen mit mehr als vier Untereinheiten gestaltete sich problematisch: Ein Komplex aus sieben Untereinheiten besitzt eine ausreichende Löslichkeit, um die Reinigung des Komplexes zu ermöglichen und zeigte weiterhin auch Aktivität in RNA-Bindung und Polyadenylierung. Eine homogene Präparation des 7er-Komplexes konnte jedoch nicht generiert werden und der Komplex neigt zur Aggregation.

Die *In-Vitro*-Rekonstitution des ersten Teilschritts der 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs, der Spaltungsreaktion, ist bislang nicht gelungen. Die bekannten 3'-Prozessierungsfaktoren Poly(A)-Polymerase, CPSF, CstF, CF I und CF II wurden in rekombinanter Form hergestellt und auf ihre separaten Aktivitäten hin charakterisiert. Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass die Präparationen von Poly(A)-Polymerase, CstF und CF II aktiv in der Spaltungsreaktion sind.

Zusätzlich zu den bekannten Faktoren wurden die putativen 3'-Prozessierungsfaktoren WDR82, Ssu72, PP1 α und die CTD der RNA-Polymerase II rekombinant hergestellt und in der *In-Vitro*-Spaltung getestet. Für keines der Proteine wurde ein Einfluss auf die Spaltungsaktivität von HeLa-Kernextrakt beobachtet und auch für die *In-Vitro*-Rekonstitution der Spaltung waren die Faktoren nicht hilfreich. Der Beitrag von Rbbp6 zur Spaltung *in vitro* konnte bislang nicht gut untersucht werden, da sich die rekombinante Präparation des Proteins als schwierig erwies. In der Arbeitsgruppe sind Arbeiten zur Herstellung weiterer, putativ an der Spaltung beteiligter Proteine im Gange.

Mit dem Ziel, bislang unbekannte 3'-Prozessierungsfaktoren zu identifizieren, wurde mit der Fraktionierung von Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt begonnen. Mit drei konsekutiven Reinigungsschritten konnten dabei Fraktionen generiert werden, welche selbst keine Spaltungsaktivität mehr besitzen, durch die Zugabe von rekombinanter Poly(A)-Polymerase, CstF und CF II aber komplementiert werden können. Die fortlaufende Fraktionierung sowie die schlussendliche Identifikation der komplementierenden Proteine durch massenspektrometrische Analysen stehen noch bevor.

5 Material und Methoden

5.1 Chemikalien und Lösungen

2-Mercaptoethanol, ≥99%	Sigma-Aldrich
3'-O-Me-m ⁷ G(5')ppp(5')G RNA <i>cap structure analog</i>	New England Biolabs
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES Ultrapure)	Gerbu
α- ³² P-UTP, 3000 Ci/mmol	PerkinElmer
Acrylamid, 4X (vierfach kristallisiert)	Serva
Acrylamid:Bisacrylamid 37,5:1, 30% (w/v)	Serva
Acrylamid:Bisacrylamid 19:1, 40% (w/v)	Serva
Agar-Agar, Kobe 1, für die Mikrobiologie	Carl Roth
Agarose, UltraPure	Invitrogen
Ampicillin, Natriumsalz, 99%	Carl Roth
Baktotrypton (Pepton aus Casein), tryptisch verdaut, für die Mikrobiologie	Carl Roth
Bovines Serumalbumin (BSA), Fraktion V, für biochemische Zwecke	Merck
Cellfectin II <i>reagent</i> (Transfektionsreagenz)	Invitrogen
Coomassie-Brilliant-Blau R-250, <i>pure</i>	Serva
Cordycepintriphosphat	Sigma-Aldrich
D-Desthiobiotin	IBA
Diethylpyrocarbonat (DEPC), 97% NMR	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT), <i>for molecular biology</i>	Gerbu
Essigsäure, 100%, <i>p.a.</i>	Carl Roth
Ethanol, ≥99,8%	Sigma-Aldrich
Flag-Peptid, lyophilisiertes Pulver	Sigma-Aldrich
Formaldehyd, mindestens 36,5%, <i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich
γ- ³² P-ATP, 6000 Ci/mmol	PerkinElmer
Gentamycinsulfat, für die Biochemie	Carl Roth
Glycerin, ≥99,5%, <i>p.a.</i>	Carl Roth
Glycin, <i>premium grade</i>	Serva
Glycogen, <i>from oyster, research grade</i>	Serva
Harnstoff, ≥99,5%, <i>p.a.</i>	Carl Roth
Hefeextrakt, SERVABACTER	Serva
Isopropanol, ≥99,8%, <i>p.a.</i>	Carl Roth
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Peqlab
Kalibrier-Kit für Gelfiltrationen (HMW)	Pharmacia
Kalibrier-Kit für Gelfiltrationen (LMW)	Pharmacia
Kanamycinsulfat	Carl Roth
Kreatinphosphat, Dinatriumsalz	Sigma-Aldrich
L-Arabinose, ≥99%	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Roche
Magermilchpulver	Sucofin (Edeka)
Methanol, ≥99%	Carl Roth
N,N'-Methylenbisacrylamid (Bisacrylamid), ≥99,5%	Gibco
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin (TEMED), <i>p.a.</i>	Merck
Natriumchlorid, <i>p.a.</i>	Carl Roth
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Serva

Nonidet P 40-Ersatzprodukt (NP-40)	Fluka
PageRuler <i>prestained protein ladder</i>	Fermentas
PageRuler <i>unstained protein ladder</i>	Fermentas
Pepstatin	Roche
Phenol, Roti-Phenol (TE-gesättigt)	Carl Roth
Phenol, Roti-Aqua-Phenol (Wasser-gesättigt)	Carl Roth
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF), ≥99%	Sigma-Aldrich
Plasmid Midi Kit	Qiagen
Plasmid Mini Prep Kit PeqGOLD I	Peqlab
Plasmid Mini Prep Kit PeqGOLD II	Peqlab
Proteaseinhibitor-Cocktail, EDTA-frei, in DMSO	Sigma-Aldrich
Ribonukleosidtriphosphate (NTPs)	Fermentas
Roentogen liquid (Entwicklerlösung)	Tetenal
Roentogen superfix (Fixierlösung)	Tetenal
Roti-Quant Bradford-Reagenz, für lösliche Proteine	Carl Roth
SOB-Trockenmedium, für Molekularbiologie	Carl Roth
Spectinomycin-dihydrochlorid-pentahydrat	Sigma-Aldrich
Tetracyclin-hydrochlorid, 96%	Calbiochem
Trypanblau-Lösung, 0,4% in PBS	BioRad
Tween-20, für die Synthese	Merck
X-Gal	Peqlab
Zeocin	Invitrogen

Alle hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck in *p.a.*-Qualität bezogen.

5.2 Verbrauchsmittel

Chromatographiesäulen aus Polypropylen, 10 ml, mit Fritte	BioRad
Cryokonservierungsgefäße, 2 ml	Greiner
Einwegpipetten für die Zellkultur, 2 bis 50 ml	Corning
Filme für Autoradiographie, Amersham Hyperfilm MP	GE Healthcare
Filterpapier	Whatman
Nitrozellulose Membranfilter NC20 und RC58, Porengröße 0,2 µm	Whatman
Parafilm „M“	Pechiney
Photospektrometrie-Einwegküvetten, Plastibrand	Brand
Protran Nitrozellulosemembran	Whatman
Reaktionsgefäße, Quali-Mikrozentrifugengefäße, 1,5 ml	Kisker
Reaktionsgefäße, 2 ml, <i>safe-lock</i>	Eppendorf
Reaktionsgefäße, 5 ml, <i>safe-lock</i>	Eppendorf
Schnappdeckelröhrchen, 12 ml, Polypropylen	Greiner
Schraubdeckelgefäße, 15 und 50 ml	Greiner
Szintillationscocktail Irgasafe Plus	PerkinElmer
Ultrafiltrationseinheit Amicon Ultra-2, MWCO30, 2 ml	Merck
Ultrafiltrationseinheit Amicon Ultra-4, MWCO30, 4 ml	Merck
Zellkulturflaschen, 25, 75 und 150 cm ²	TPP
Zellkulturtestplatten, 6 Vertiefungen	TPP
Zellschaber, 13 mm Breite	TPP

5.3 Geräte

Automatischer Zellzähler TC20	BioRad
Einweg-Zählkammern für Zellzähler TC20	BioRad
Blotting-Apparatur, 20 x 20 cm, <i>semi dry</i>	OWL
Blotting-Apparatur, <i>wet blot</i>	OWL
Brutschränke	Heraeus Instruments
Cryopräservationskontainer 5100, Mr. Frosty	Nalgene
Elektroporationsgerät Eporator	Eppendorf
Elektroporationsküvetten, Elektrodenabstand 1 mm	CellProjects
Fluoreszenz- und Autoradiographie-Imager Typhoon 9200	GE Healthcare
<i>storage phosphor</i> Autoradiographiefilme	Molecular Dynamics
FPLC-System ÄKTA <i>purifier</i>	GE Healthcare
Fraktionssammler Frac-950	GE Healthcare
Infrarot <i>imaging</i> System Odyssey Classic	Li-Cor
Kammer für horizontale Gelelektrophorese	OWL
Kammern für vertikale Gelelektrophorese, Gelbreiten 10, 20 und 35 cm	OWL
Kühl-Tischzentrifuge 5180 R	Eppendorf
Kühl-Tischzentrifuge 5427 R	Eppendorf
Kühlzentrifuge Avanti J-25	Beckman
Rotor JA-25.50	Beckman
Rotor JA-16.250	Beckman
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss
MultiMode <i>reader</i> Tristar ² S, LB 942	Berthold Technologies
Mikrotestplatten mit 96 Vertiefungen, für Absorptionsmessungen	Greiner
Sterilfiltrationsapparaturen, 250 und 500 ml	Nalgene
Schüttelinkubatoren für Bakterien- und Insektenzellkulturen	Infors
Spektrophotometer U-3000	Hitachi
UV-Vis Quarzglasküvetten, 20, 80 und 200 µl	Hellma
Sterilbank HERASafe HS 15	Heraeus Instruments
Szintillationszähler Tri-Carb 2100TR, Liquid Scintillation Analyzer	Packard
Thoma-Zählkammer und geschliffene Deckgläschen	Brand
Tischzentrifuge, Biofuge <i>pico</i>	Heraeus Instruments
Ultraschallgerät und -sonde, Branson Sonifier 250	Branson

5.4 Software

Designer, Version 9.0 (2001)	Micrografx
ICE, Version 1.0.8.1 (2014)	Berthold Technologies
ImageQuant, Version 5.2 (1999)	GE Healthcare
Lasergene, Version 4.00 (1999)	DNASTAR
Odyssey, Version 2.1.12 (2006)	Li-Cor
Origin, Verion 7.5 (2004)	OriginLab
Photoshop CS6, Version 13.0.1 (2012)	Adobe
SigmaPlot, Version 12.5 (2011)	Systat Software
SnapGene Viewer, Version 3.1.4 (2017)	GSL Biotech
Unicorn (Chromatographiesteuerung), Version 5.11 (2006)	GE Healthcare
UV Solutions, Version 2.2 (2010)	Hitachi

5.5 DNA-Konstrukte

5.5.1 Bacmide und Baculoviren

Bacmid / Baculovirus	kodierte ORFs	Ursprungsvektoren
pBac-CFP-His-Symplekin ^{Tn7}	His-Symplekin (human) CFP	MultiBac-Bacmid pFBDM-CFP-His-Symplekin
pBac-mCherry-S73-100 ^{Tn7}	Strep-CPSF73 (bovin) CPSF100 (bovin) mCherry	MultiBac-Bacmid pKL-mCherry-S73-100
pBac-MycHis-WDR33-hFip1-CFP ^{Tn7}	MycHis-WDR33 (human) hFip1 (human) CFP	MultiBac-Bacmid pWFC
pBac-MycHis-WDR33-hFip1 ^{loxP}	MycHis-WDR33 (human) hFip1 (human)	MultiBac-Bacmid pUCDM-MycHis-WDR33-hFip1
pBac-MycHis-WDR33-hFip1 ^{loxP} - F160-30 ^{Tn7}	MycHis-WDR33 (human) hFip1 (human) Flag-CPSF160 (human) CPSF30 (human)	pBac-MycHis-WDR33-hFip1 ^{loxP} pKL-Flag-hCPSF1-hCPSF4
pBac-S30 ^{Tn7}	Strep-CPSF30 (bovin)	MultiBac-Bacmid pKL-Strep-CPSF30
pBac-S160 ^{Tn7}	Strep-CPSF160 (bovin)	MultiBac-Bacmid pKL-Strep-CPSF160
pBac-YFP ^{loxP}	YFP	MultiBac-Bacmid pUCDM-YFP-MCS2
pBac-YFP ^{loxP} -F160-30 ^{Tn7}	Flag-CPSF160 (bovin) CPSF30 (bovin) YFP	pBac-YFP ^{loxP} pKL-F160-30
pBac-YFP ^{loxP} -S73-100 ^{Tn7}	Strep-CPSF73 (human) CPSF100 (human) YFP	pBac-YFP ^{loxP} pFPDM-hCPSF2-Strep-hCPSF3
pBac-YFP ^{loxP} -ShFip1 ^{Tn7}	Strep-hFip1 (human) YFP	pBac-YFP ^{loxP} pFBDM-Strep-hFip1
pBac-YFP ^{loxP} -Strep-Rbbp6 ^{Tn7}	Strep-Rbbp6 (human) YFP	pBac-YFP ^{loxP} pFBDM-Strep-Rbbp6

Die aufgeführten Bacmidkonstrukte existieren sowohl in Form von Bacmid-DNA (gelagert bei 4°C in Raum 403, entsprechende Glycerinkulturen gelagert bei -70°C in T-1.9, Raum 404) als auch als Baculoviren (Aliquots von V₁-Titern aller Viren gelagert bei -80°C in F-16.11/12, Raum 404).

5.5.2 MutiBac-Transfervektoren

Plasmid	Klon	Konzentration	Lagerort	Ursprung
pFBDM-CFP-His-Symplekin	5.1	1,14 µg/µl	14.10	diese Arbeit
pFPDM-hCPSF2-Strep-hCPSF3	16	290 ng/µl	15.21	diese Arbeit
pFBDM-Strep-hFip1	8	104 ng/µl	13.59	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pFBDM-Strep-Rbbp6	18	592 ng/µl	15.50	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pKL-F160-30	10	1,4 µg/µl	11.71	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pKL-Flag-hCPSF1-hCPSF4	11	382 ng/µl	14.62	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pKL-mCherry-S73-100	4	382 ng/µl	13.41	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pKL-Strep-CPSF160	20	148 ng/µl	13.54	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pKL-Strep-CPSF30	12	153 ng/µl	13.52	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pUCDM-MycHis-WDR33-hFip1	28	154 ng/µl	13.79	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pUCDM-YFP-MCS2	1	975 ng/µl	11.65	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pWFC	3	376 ng/µl	12.84	Gudrun Scholz, Uwe Kühn

5.5.3 sonstige Plasmide und Nukleinsäuren

Plasmid	Klon	Konzentration	Lagerort	Ursprung
pBADZ-HisCre	21	934 ng/µl	11.36	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pBR322, <i>HpaII</i> -verd., dephos.		500 ng/µl	12.12	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pSP64-L3	15*	1,4 µg/µl	AK.15	Anne Knoth
<i>DraI</i> -verdaut		500 ng/µl	Substrate.49	diese Arbeit
pSP64-L3 Δ	16	2,51 µg/µl	AK.16	Anne Knoth
<i>DraI</i> -verdaut		500 ng/µl	Substrate.50	diese Arbeit
pSP64-L3prä	5.1	2 µg/µl	9.70	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
<i>RsaI</i> -verdaut		500 ng/µl	Substrate.1	diese Arbeit
pSP64-L3prä Δ	3	1,92 µg/µl	9.46	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
<i>RsaI</i> -verdaut		500 ng/µl	Substrate.3	diese Arbeit
pSP64-L3prä-A ₁₅ , <i>BbsI</i> -verd.		500 ng/µl	Substrate.19	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pSP64-L3prä-A ₁₅ Δ, <i>BbsI</i> -verd.		500 ng/µl	Substrate.20	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
pSP64-L3short	107	1,07 µg/µl	AK.64	Anne Knoth
<i>DraI</i> -verdaut		500 ng/µl	Substrate.83	diese Arbeit
pSP64-L3short Δ	66	0,96 µg/µl	AK.54	Anne Knoth
<i>DraI</i> -verdaut		500 ng/µl	Substrate.84	diese Arbeit
pSP64-SV40late, <i>DraI</i> -verdaut		1,37 µg/µl	AK.temp	Anne Knoth
Wigley10 wt RNA-Oligonukleotid		90 µM	S-10-4 (-80°C)	MWG Eurofins
Wigley10 Δ RNA-Oligonukleotid		630 µM	S-10-4 (-80°C)	MWG Eurofins

Die Angaben der Lagerorte beziehen sich auf die Plasmidkisten von Uwe Kühn bzw. Anne Knoth, welche bei -20°C in Raum 403 gelagert werden. Die ursprünglichen Leervektoren des MultiBac-Systems stammen von T. J. Richmond und Kollegen, ETH Zürich [Berger *et al.*, 2004].

5.6 Proteine

5.6.1 Antikörper

Antikörperbezeichnung	Wirtsorganismus	Verdünnung	Herkunft
α -CF I-25, „CF I 30K“	Kaninchen	1:2000	AG Keller, Universität Basel
α -Clp1, #171	Kaninchen	1:2000	AG Keller, Universität Basel
α -CPSF30, SA1368	Kaninchen	1:2000	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
α -CPSF73, #009	Kaninchen	1:2000	AG Keller, Universität Basel
α -CPSF100, SA1366	Kaninchen	1:2000	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
α -CPSF160, #105	Kaninchen	1:2000	AG Keller, Universität Basel
α -CstF-77, monoklonal	Maus	1:2000	Abnova
α -Flag, M2, monoklonal	Maus	1:1000	Sigma-Aldrich
α -hFip1, SZ1005	Kaninchen	1:2000	AG Keller, Universität Basel
α -myc, monoklonal	Maus	1:1000	Invitrogen
α -Rbbp6, (N)	Kaninchen	1:2000	Biomol
α -Strep, monoklonal	Maus	1:1000	IBA
α -Symplekin, A301-465A	Kaninchen	1:2000	Biomol
α -WDR33, A301-152A	Kaninchen	1:2000	Biomol
α -Kaninchen, IRDye 800CW	Esel	1:10000	Li-Cor
α -Maus, IRDye 800CW	Ziege	1:10000	Li-Cor

5.6.2 (Rekombinante) Proteinpräparationen

Protein, Fraktionsbezeichnung	Konzentration	Herkunft
CF I, I Ni-NTA-Strep #E4	0,5 μ M	Peter Schäfer
CF II, IV Ni-NTA_RQ_Mono Q #B11	0,86 μ M	Peter Schäfer
CPSF (7er-Komplex), I_IMAC #E2	0,5 μ M	diese Arbeit
CPSF (7er-Komplex), II_poly(A) #A9	0,5 μ M	diese Arbeit
CPSF IV, präpariert aus Kalbsthymus		Gudrun Scholz, Uwe Kühn
CPSF30-CPSF160-Subkomplex, Flag-E2	0,15 μ M	diese Arbeit
CPSF73-CPSF100-Subkomplex, Strep-E2	5,8 μ M	diese Arbeit
CstF, I Ni-NTA_RQ #A12	3 μ M	Peter Schäfer
CTD, I GSH-Sepharose #E2	0,35 μ M	Moritz Schmidt
<i>In vitro</i> phosphorylierte CTD	0,35 μ M	Moritz Schmidt
hFip1, Strep-E4	0,3 μ M	diese Arbeit
Methyliertes BSA	16,4 mg/ml	Uwe Kühn
mPSF, 1. Flag E2	0,69 μ M	diese Arbeit
mPSF, 2. Flag E2	0,34 μ M	diese Arbeit
PABPN1 wt, rekombinant, H.F. ω -11	11 μ M	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
Poly(A)-Polymerase wt,	10,93 μ M	Anne Knoth, Gudrun Scholz
PP1 α , I_2.Ni-NTA 1.FT	16,4 μ M	Moritz Schmidt
Rbbp6 (Koexpression mit CF I), IMAC #E2	0,5 μ M	diese Arbeit
Rbbp6 (Koexpression mit CF I), IMAC #E4	0,1 μ M	diese Arbeit
Ssu72, II. Ni-NTA FT	5 μ M	Gudrun Scholz, Uwe Kühn
WDR33-hFip1-Subkomplex, III_RQ #B5	1 μ M	diese Arbeit
WDR82, I. 2.Ni-NTA_FT-pool_RQ-load	2,5 μ M	Gudrun Scholz, Uwe Kühn

5.6.3 Enzyme

<i>Calf intestinal phosphatase</i> (CIP)	Roche
Cre-Rekombinase und Reaktionspuffer	New England Biolabs
Proteinase K, lyophilisiert	Merck
Rekombinanter RNase-Inhibitor, rRNi	Promega
Restriktionsendonukleasen und Reaktionspuffer	New England Biolabs
SP6 RNA-Polymerase und Reaktionspuffer	Roche
T4 5'-Polynukleotidkinase (PNK) und Reaktionspuffer	New England Biolabs
T4 DNA-Ligase	New England Biolabs

5.7 Chromatographiematerial und Säulen

Anti-Flag M2 <i>affinity gel</i> (anti-Flag-Agarose)	Sigma-Aldrich
DEAE-Sepharose Chromatographiematerial	Pharmacia
HiTrap DEAE-FF Anionenaustauschersäule, 1 ml	GE Healthcare
Ni-NTA-Agarose, 50% Suspension	Qiagen
Poly(A)-Sepharose 4B Chromatographiematerial	Pharmacia
Resource Q Anionenaustauschersäule, 1 ml	GE Healthcare
Superdex 200 HR 10/30 Größenausschlusschromatographiesäule, 24 ml	Pharmacia
Superose 6 Chromatographiematerial, <i>prep grade</i>	Pharmacia
Superose 6 3.2/300 Größenausschlusschromatographiesäule, 2,4 ml	GE Healthcare
Strep-Tactin-Sepharose, 50% Suspension	IBA

5.8 Zellstämme

5.8.1 Bakterienstämme

BW23474	Stamm zur Propagation von Donorplasmiden des MultiBac-Systems (pUCDM und pSPL), erhalten von T. J. Richmond, ETH Zürich [Berger <i>et al.</i> , 2004]. Genotyp: <i>E. coli</i> , F-, $\Delta(\text{argF-lac})169$, $\Delta\text{uidA4::pir-116}$, <i>recA1</i> , <i>rpoS396(Am)</i> , <i>endA9(del-ins)::FRT</i> , <i>rph-1</i> , <i>hsdR514</i> , <i>rob-1</i> , <i>creC510</i> [Wanner & Haldimann, 2004].
DH10B	Genotyp: <i>E. coli</i> , F-, <i>mcrA</i> , $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$, $\phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, ΔlacX74 , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(\text{ara, leu})7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda\text{-rpsL}$, <i>nupG/pMON14272/pMON7124</i>
DH10-MultiBac	Stamm enthält das MultiBac-Bacmid, zur Verfügung gestellt von T. J. Richmond und Kollegen, ETH Zürich [Berger <i>et al.</i> , 2004]. Genotyp: <i>E. coli</i> , F-, <i>mcrA</i> , $\Delta(\text{mrr-hsdRMS-mcrBC})$, $\Phi 80\text{lacZ}\Delta\text{M15}$, ΔlacX74 , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>araD139</i> , $\Delta(\text{ara, leu})7697$, <i>galU</i> , <i>galK</i> , $\lambda\text{-rpsL}$, <i>nupG/pMON14272/pMON7124</i>
DH10-MultiBac^{Cre}	Stamm DH10-MultiBac transformiert mit Plasmid pBADZ-HisCre, Expression der Cre-Rekombinase nach Induktion mit L-Arabinose.

5.8.2 Insektenzelllinien

Sf21	IPLB-Sf21AE, Immortalisierte Zelllinie aus Ovarzellen von <i>Spodoptera frugiperda</i> [Vaughn <i>et al.</i> , 1977], Zellen erworben bei Invitrogen.
High-Five	BTI-TN-5B1-4, Immortalisierte Zelllinie aus Ovarzellen von <i>Trichoplusia ni</i> [Wickham <i>et al.</i> , 1992]. Zellen zur Verfügung gestellt von Elena Conti, Abteilung Strukturbiologie, Max-Planck-Institut Martinsried.

5.8.3 Nährmedien

LB	10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH mit Natriumhydroxid auf 7,5 eingestellt, autoklaviert.
LB-Agar	10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, pH mit Natriumhydroxid auf 7,5 eingestellt, 15 g/l Agar-Agar, autoklaviert.
SOC	30,7 g/l SOB-Trockenmedium (Roth), 20 mM Glukose, autoklaviert.
TY (Niedrigsalz)	10 g/l Baktotrypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l Natriumchlorid, pH mit Natriumhydroxid auf 7,5 eingestellt, autoklaviert.
ExCell 420 SFM	Serumfreies Medium für die Kultivierung von Insektenzellen, mit L-Glutamin, sterilfiltriert, erworben bei Sigma-Aldrich.

5.8.4 Medienzusätze für bakterielle Kulturen

Substanz	Hersteller/Lieferant	Endkonzentration	Stammlösung
Ampicillin	Carl Roth	100 µg/ml	100 mg/ml in 50% Ethanol
Chloramphenicol	Merck	30 µg/ml	30 mg/ml in Ethanol
Gentamycin	Carl Roth	10 µg/ml	10 mg/ml in Wasser
IPTG	Peqlab	0,5 mM	400 mM in Wasser
Kanamycin	Carl Roth	30 µg/ml	30 mg/ml in Wasser
L-Arabinose	Sigma-Aldrich	1 g/l	
Spectinomycin	Sigma-Aldrich	50 µg/ml	50 mg/ml in Wasser
Tetracyclin	Calbiochem	12,5 µg/ml	12,5 mg/ml in 50% Ethanol
X-Gal	Peqlab	200 µg/ml	20 mg/ml in Dimethylformamid
Zeocin (Lösung)	Invitrogen	25 µg/ml	100 mg/ml

5.9 Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken

5.9.1 Sterilisation

Hitzebeständige Glasgeräte, Lösungen und Nährmedien wurden mindestens 30 Minuten bei 121°C autoklaviert. Hitzelabile Lösungen wurden durch Nitrozellulosefilter mit einer Porengröße von 0,2 µm sterilfiltriert. Hitzelabile Kunststoffgeräte wurden durch Bestrahlung mit UV-Licht und / oder Behandlung mit technischem Ethanol sterilisiert.

5.9.2 Isolation und Vermehrung einzelner bakterieller Klone

Zur Isolation einzelner Klone wurden Bakterien auf selektiven LB-Agarplatten ausgesät und nach Inkubation bei 37°C über Nacht einzelne Kolonien gepickt. Die Selektion erfolgte zum Einen über in den LB-Agarplatten enthaltene Antibiotika, in einigen Fällen wurde zusätzlich die Blau-Weiß-Selektion zur Identifikation positiver Klone genutzt (blaue Färbung von Kolonien, welche die β -Galactosidase exprimieren). Bei sehr langsam wachsenden Bakterien sowie für eine sichere Blau-Weiß-Selektion wurde die Inkubationszeit auf LB-Agar auf bis zu 48 Stunden verlängert.

Die Kultivierung von Bakterien in Suspension erfolgte in LB-Medium, ebenfalls unter stetiger Selektion durch Antibiotika.

5.9.3 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Die Aufnahme von Fremd-DNA aus der Umgebung findet bei *Escherichia coli* von Natur aus nur in sehr geringem Maße statt. Um die Aufnahmefähigkeit für DNA zu erhöhen, werden die Bakterien elektrokompetent gemacht.

Zu diesem Zweck wurden 400 ml LB-Medium mit 1 bis 5 ml einer Übernachtskultur inokuliert und bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,6 bis 0,8 (OD_{600}) schüttelnd inkubiert. Sobald die Zellen die gewünschte Zelldichte erreicht haben, wurde die Kultur für 15 Minuten auf Eis abgekühlt und anschließend geerntet (Zentrifugation für 15 Minuten bei 4.000 xg und 4°C). Das Zellpellet wurde in 400 ml eiskalter Glycerinlösung [10% (v/v)] resuspendiert. In drei weiteren Zentrifugationsschritten (gleiche Bedingungen) wurde das Volumen der Zellsuspension schrittweise auf 200 ml, 40 ml und schließlich 800 µl reduziert. Die finale Zellsuspension wurde zu 40 bis 80 µl aliquotiert und die Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der elektrokompetenten Zellen erfolgte bei -80°C.

5.9.4 Transformation elektrokompetenter Bakterien

Die Transformation elektrokompetenter *Escherichia coli* mit Fremd-DNA erfolgte mittels Elektroporation. Dafür wurden Aliquots elektrokompetenter Zellen auf Eis aufgetaut, mit 100 bis 250 ng der zu transformierenden DNA versetzt, kurz auf Eis inkubiert und in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt. Die Elektroporation erfolgte durch einen Stromstoß von 5 ms bei 1.800 V. Unmittelbar nach der Elektroporation wurde der Transformationsansatz mit 1 ml SOC-Medium versetzt, in ein geeignetes Röhrchen überführt und für etwa eine Stunde bei 37°C inkubiert (Erholungszeit). Schließlich wurden geeignete Mengen des Transformationsansatzes auf selektiven LB-Agarplatten ausgestrichen und auf positive Klone selektiert.

5.9.5 Herstellung von Glycerinkulturen

Für die dauerhafte Lagerung bakterieller Klone eignet sich das Anlegen von Glycerinkulturen. Dazu wurden 750 µl einer Übernachtskultur mit 250 µl steriler Glycerinlösung [60% (v/v)] vermischt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die so erhaltenen Glycerinkulturen enthalten 10% Glycerin und können über lange Zeit bei -70 bis -80°C gelagert werden.

5.10 Das MultiBac-System

Das MultiBac-System ist ein Vektorsystem für die Baculovirus-vermittelte Expression rekombinanter Proteine in Insektenzellen. Das MultiBac-System wurde von T. J. Richmond und Kollegen an der ETH Zürich, ausgehend vom Bac-to-Bac-System von Invitrogen, entwickelt. Ziel dieser Entwicklung war die Etablierung eines Baculovirus-Systems zur Expression von (großen) Proteinkomplexen [Berger *et al.* 2004]. Da die Klonierung von Zielgenen in rekombinante Baculoviren über mehrere Schritte verläuft, ist eine gut durchdachte Klonierungsstrategie essentiell für die erfolgreiche Nutzung des MultiBac-Systems.

5.10.1 Allgemeiner Arbeitsablauf

Zunächst müssen die gewünschten Zielgene in die Transfervektoren des MultiBac-Systems kloniert werden. Nach erfolgreicher Klonierung aller gewünschten Zielgene können mehrere Transfervektoren zunächst miteinander fusioniert oder direkt in das rekombinante Baculovirusgenom integriert werden. Die rekombinanten Bacmide werden anschließend aus *E. coli* präpariert und in Sf21-Insektenzellen transfiziert. Die transfizierten Insektenzellen bilden einen initialen Virustiter (V_0), welcher durch Infektion von Sf21-Suspensionskulturen zu größeren Virustitern (V_1 , V_2 , usw.) propagiert werden kann. Wurde ein ausreichend großer Virustiter generiert, so kann dieser zur Infektion von Expressionskulturen verwendet werden. Die Expression der gewünschten Zielgene kann frühestens in den Zellen des initialen Virustiters (V_0) überprüft werden.

5.10.2 Klonierung von Zielgenen in Transfervektoren

Herzstück des MultiBac-Systems sind sechs Transfervektoren, diese sind in Abbildung 9.10 im Anhang dargestellt. Alle Transfervektoren enthalten jeweils zwei *multiple cloning sites* (MCSs) unter der Kontrolle starker viraler Promotoren (p10 und polH). Die Integration von Zielgenen in die MCSs der Transfervektoren erfolgte durch Restriktions- und Ligations-basierte Klonierung. Enzyme für die Klonierung (Restriktionsendonukleasen, Ligase, usw.) wurden bei New England Biolabs erworben und nach Herstellerangaben verwendet.

Die in den Vektoren enthaltenen Replikationsursprünge bedingen die Unterscheidung zwischen Akzeptorplasmiden (pFL, pKL, pFBDM und pKDM; ColE1-, bzw. BR322-Replikationsursprung) und Donorplasmiden (pUCDM und pSPL; konditionaler R6K γ -Replikationsursprung).

Zusätzlich zu den zwei MCSs enthalten alle Vektoren unterschiedliche Antibiotika-Resistenzgene und ein sogenanntes Multiplikationsmodul (M), durch welches die MCS eines Vektors in die MCS eines zweiten Vektors transferiert werden kann (Abschnitt 5.10.3). Weiterhin besteht die Möglichkeit zur Fusion der Donorplasmide mit den Akzeptorplasmiden pFL und pKL mittels *In-Vitro*-Cre-loxP-Rekombination (loxP-Elemente in den entsprechenden Vektoren, Abschnitt 5.10.4). Durch diese Fusionen können Transfervektorkonstrukte mit mehr als zwei enthaltenen Zielgenen erzeugt werden.

Für die Integration von Transfervektoren in das rekombinante Baculovirusgenom können entweder erneut die loxP-Elemente (Cre-loxP-Rekombination *in vivo*, Abschnitt 5.10.6) oder die Tn7-Transpositionselemente in den Akzeptorplasmiden (Tn7-Transposition *in vivo*, Abschnitt 5.10.8) genutzt werden.

5.10.3 Translokation von Expressionskassetten mittels Multiplikationsmodul

Die Fusion von Transfervektoren, bzw. die Translokation des MCS-Bereichs eines Transfervektors in einen zweiten Transfervektor des MultiBac-Systems erfolgt durch Restriktions- und Ligations-basierte Klonierung. Dabei wird die gesamte Expressionskassette eines Vektors mit den Restriktionsendonukleasen *PmeI* und *AvrII* ausgeschnitten und in das Multiplikationsmodul eines zweiten Vektors integriert, welches zuvor mit den kompatiblen Restriktionsendonukleasen *BstZ17I* und *SpeI* geöffnet

wurde. Dieser Vorgang ist nachfolgend in Abbildung 5.1 schematisch dargestellt. Die konsekutive Translokation mehrerer Expressionskassetten in einen Transfervektor ist möglich, solange die klonierten ORFs nicht entsprechende Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen des Multiplikationsmoduls enthalten.

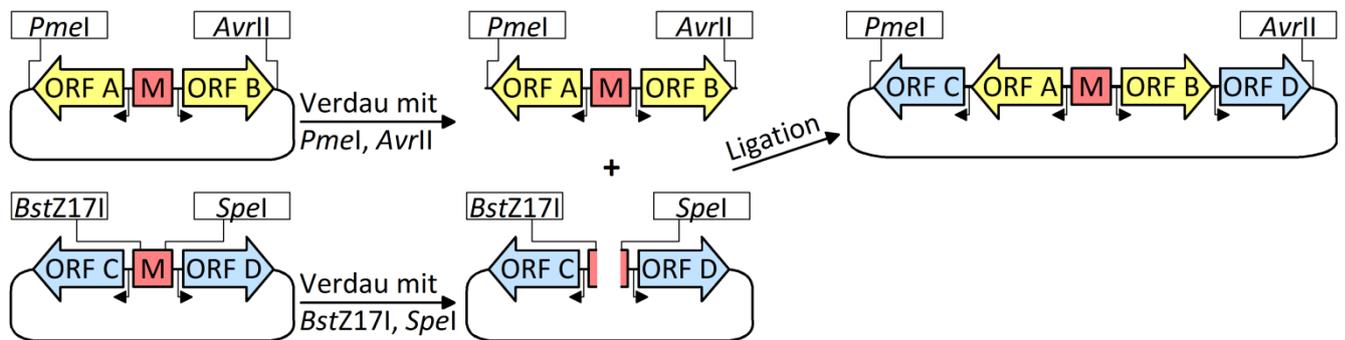


Abbildung 5.1: Schema zur Herstellung multigener Transfervektorkonstrukte mittels Multiplikationsmodul.

5.10.4 Fusion von Transfervektoren via Cre-loxP-Rekombination *in vitro*

Akzeptor- und Donorplasmide lassen sich durch *In-Vitro*-Cre-loxP-Rekombination fusionieren, die fusionierten Konstrukte können anschließend via Tn7-Transposition in das rekombinante Baculovirusgenom integriert werden. Die Fusion der Vektoren (schematisch dargestellt in Abbildung 5.2) erfolgte in einer 10 µl-Reaktion mit der folgenden Zusammensetzung:

- 1x Cre-Reaktionspuffer
- 500 ng Donorplasmid A
- (500 ng Donorplasmid B)
- 500 ng Akzeptorplasmid
- 1 U Cre-Rekombinase
- dd. H₂O *ad.* 10 µl

Nach halbstündiger Inkubation bei 37°C wurden 1 bis 5 µl des Reaktionsansatzes in elektrokompente *E. coli*-Bakterien transformiert und positive Klone anhand von Antibiotikaresistenzen selektiert. Da die Donorplasmide den konditionalen Replikationsursprung R6Kγ beinhalten und die entsprechenden Vektoren daher nicht in regulären *E. coli*-Zellen (*pir*⁻) propagiert werden, bleibt die Antibiotikaresistenz der Donorplasmide nur erhalten wenn die Fusion mit dem Akzeptorplasmid erfolgreich war.

Wie aus der Zusammensetzung des Reaktionsansatzes hervorgeht können in einer Reaktion auch zwei Donorplasmide mit einem Akzeptorplasmid fusioniert werden. Die Bildung von trimeren Fusionsprodukten ist allerdings sehr unwahrscheinlich und daher wenig effizient.

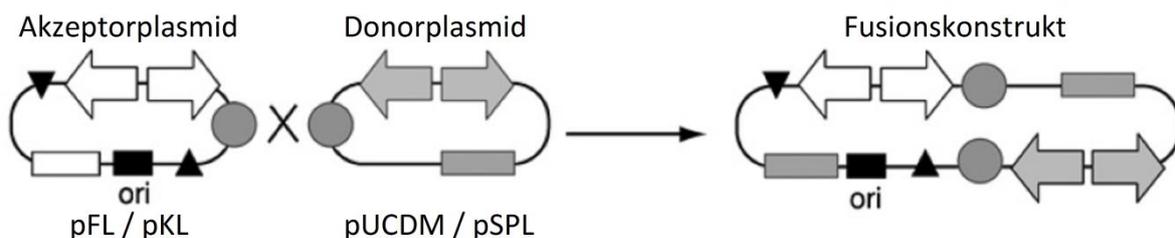


Abbildung 5.2: Schema zur Herstellung von Vektorfusionen mittels *In-Vitro*-Cre-loxP-Rekombination.

Abbildung modifiziert übernommen aus [Bieniossek *et al.*, 2008].

5.10.5 Herstellung elektrokompenter DH10-MultiBac^{Cre}-Zellen

Für die Integration von Transfervektoren in das MultiBac-Baculovirusgenom via *In-Vivo*-Cre-loxP-Rekombination werden *E. coli*-Bakterien benötigt, welche sowohl das MultiBac-Bacmid beinhalten, als auch die Cre-Rekombinase exprimieren. Zur Herstellung der entsprechenden Zellen wurden DH10-MultiBac-Zellen mit dem Plasmid pBADZ-HisCre transformiert und positive Klone durch Selektion mit Zeocin (pBADZ-HisCre), Kanamycin (MultiBac-Bacmid) und Tetracyclin (Tn7-Helferplasmid) identifiziert. Dabei ist zu beachten, dass die Selektion mit Zeocin einen niedrigen Salzgehalt in den entsprechenden LB-Agarplatten voraussetzt. Ausgehend von einem vereinzelteten Klon wurde eine Kultur von 400 ml inokuliert (gleiche Antibiotika, Medium mit verringertem Salzgehalt). Bei Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,25 wurde die Expression der Cre-Rekombinase durch Zugabe von 0,1% (w/v) L-Arabinose induziert. Die Zellen wurden weiter inkubiert und nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 auf Eis abgekühlt. Das weitere Vorgehen entsprach der regulären Prozedur zur Erstellung elektrokompenter *E. coli* (Abschnitt 5.9.3). Die Expression der Cre-Rekombinase wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung des Gels überprüft. Eine gute Überexpression der Cre-Rekombinase ist entscheidend für den Erfolg von *In-Vivo*-Cre-loxP-Rekombinationen [Fitzgerald *et al.*, 2006].

5.10.6 Integration von Transfervektoren in Bacmide via Cre-loxP-Rekombination *in vivo*

Konstrukte auf Basis von Donorplasmiden können via *In-Vivo*-Cre-loxP-Rekombination in das MultiBac-Baculovirusgenom integriert werden. Dazu wurden 250 ng der entsprechenden Plasmide in DH10-MultiBac^{Cre}-Zellen transformiert. Das Vorgehen der Elektroporation entsprach der in Abschnitt 5.9.4 beschriebenen Prozedur, mit der Abweichung, dass die Erholungszeit in SOC-Medium auf sechs bis acht Stunden ausgedehnt wurde, um die Rekombinationsreaktion zu gestatten. Die anschließende Selektion positiver Klone erfolgte durch entsprechende Antibiotika und Blau-Weiß-Selektion (blaue Kolonien wurden hier ausgewählt). Positive Klone wurden entweder direkt zur Gewinnung von Bacmid-DNA (Abschnitt 5.10.9) oder zur erneuten Herstellung elektrokompenter Zellen und Integration weiterer Transfervektoren via Tn7-Transposition genutzt (Abschnitt 5.10.7).

5.10.7 Herstellung elektrokompenter DH10-MultiBac-Zellen für die Tn7-Transposition

Nach erfolgreicher Integration von Donorplasmiden in das MultiBac-Bacmid via *In-Vivo*-Cre-loxP-Rekombination können weitere Transfervektorkonstrukte über Tn7-Transposition in das rekombinante Bacmid integriert werden. Dazu wurden elektrokompente Zellen aus positiven Klonen der Cre-loxP-Rekombination hergestellt. Das Vorgehen entsprach dabei der in Abschnitt 5.9.3 beschriebenen Verfahrensweise. Alternativ können auch DH10-MultiBac-Zellen genutzt werden, welche das Wildtyp-Bacmid tragen. Bei der Vorbereitung von DH10-MultiBac-Zellen für die Tn7-Transposition ist darauf zu achten, dass stets auch mit Tetracyclin selektiert werden muss (Helferplasmid für Tn7-Transposase).

5.10.8 Integration von Transfervektoren in Bacmide via Tn7-Transposition

Für die Integration von Transfervektoren in das MultiBac-Baculovirusgenom wurden 250 ng der entsprechenden Akzeptorplasmide in elektrokompente DH10-MultiBac-Zellen transformiert. Das Vorgehen der Elektroporation entsprach der in Abschnitt 5.9.4 beschriebenen Prozedur, mit der Abweichung dass die Erholungszeit in SOC-Medium auf sechs bis acht Stunden ausgedehnt wurde, um die Transpositionsreaktion zu gestatten. Die anschließende Selektion positiver Klone erfolgte durch entsprechende Antibiotika und Blau-Weiß-Selektion (positive Klone erscheinen weiß). Positive Klone wurden zur Gewinnung von Bacmid-DNA genutzt.

5.10.9 Isolation rekombinanter Bacmid-DNA

Die Isolation von Bacmid-DNA erfolgte mittels alkalischer Lyse und Fällung mit Isopropanol. Ausgehend von einer positiven Kolonie wurde eine 5 ml-Kultur in LB-Medium inokuliert und über Nacht inkubiert.

Puffer I (Resuspensionspuffer)

50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A

Puffer II (Lysepuffer)

200 mM Natriumhydroxid
1% (w/v) SDS

Puffer III (Neutralisationspuffer)

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

Die Zellen wurden mittels Zentrifugation (15 Minuten bei 4.000 xg und 4°C) geerntet, gründlich in 250 µl Puffer I resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach kurzer Inkubation auf Eis erfolgte die Zugabe von 250 µl Puffer II und 350 µl Puffer III. Nach jeder Pufferzugabe wurde das Zelllysate durch sanftes Invertieren des Reaktionsgefäßes gemischt. Genomische DNA und andere Zellbestandteile (weißes Präzipitat) wurden durch Zentrifugation (20 Minuten bei 18.000 xg und Raumtemperatur) pelletiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Es erfolgte die Zugabe von 650 µl Isopropanol, eine Inkubation von 15 Minuten auf Eis und ein Zentrifugationsschritt von 15 Minuten bei 18.000 xg und Raumtemperatur. Das Pellet der Bacmid-DNA wurde zweifach mit 180 µl Ethanol [80% (v/v)] gewaschen, an der Raumluft getrocknet und schließlich in 50 µl steriler HEPES-Lösung [10mM, pH 7,0] resuspendiert. Auf diese Weise präparierte Bacmid-DNA ist keinesfalls frei von Verunreinigungen, dennoch aber zur Transfektion von Sf21-Insektenzellen geeignet, solange zumindest die Sterilität der Lösung sichergestellt ist.

5.11 Insektenzellkultur

Alle nachfolgend aufgeführten Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Werkbank durchgeführt. Die meisten der nachfolgend beschriebenen Techniken entsprechen den Angaben von Invitrogen (bzw. ThermoFischer), dem Lieferanten der in dieser Arbeit verwendeten Sf21-Zellen [Internetquelle 1].

Sf21-Zellen eignen sich für die Transfektion mit Bacmid-DNA, Propagation von Baculoviren und Expressionskulturen. High-Five-Zellen sind ausschließlich für Expressionskulturen zu verwenden und eignen sich nicht für die Propagation von Baculoviren.

5.11.1 Aussaat und Kultivierung adhärent wachsender Kulturen

In der Regel wurden Sf21-Zellen, ausgehend von einer gefrorenen Stammkultur (*cryo stock*), zunächst als adhärente Kultur ausgesät. Sind ausreichend Zellen in einem *cryo stock* vorhanden (mindestens 2×10^7 Zellen) kann dieser Schritt auch übersprungen und die Zellen direkt als Suspensionskultur ausgesät werden. High-Five-Zellen wurden generell direkt in Suspension ausgesät, da diese Zellen nicht ausreichend stark an Oberflächen haften, um ein Wachstum als adhärente Kultur zu erlauben.

Zur Inokulation einer adhären Kultur wurden pro 75 cm^2 (eine mittlere Zellkulturflasche) etwa 1×10^7 Zellen im Wasserbad fast vollständig aufgetaut und rasch in 10 ml vorgewärmten Mediums resuspendiert. Nach 30 bis 60 Minuten wurde der Zellüberstand abgesaugt und die Zellen mit 25 ml frischen Mediums überschichtet. Adhären Kulturen wurden bei 28°C inkubiert und das Wachstum der Zellen täglich mikroskopisch überprüft. Bei Erreichen von 90 bis 100% Konfluenz wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers in etwa 10 ml Medium geerntet und für die Inokulation neuer Zellkulturflaschen genutzt (vierfache Verdünnung). Bei der Kultivierung adhärenter Sf21-Kulturen dürfen die Zellen niemals unter eine Konfluenz von 20% gebracht werden, da sonst die Teilungsfähigkeit der Zellen drastisch abnimmt.

5.11.2 Aussaat und Kultivierung von Insektenzellen in Suspension

Suspensionskulturen wurden in sterilen Erlenmeyerkolben bei $27,5^\circ\text{C}$ und 125 rpm inkubiert. Die verwendeten Erlenmeyerkolben wurden zweifach gespült (zweiter Spülgang ohne Spülmittel), autoklaviert und schließlich für mindestens drei Stunden bei 180°C gebacken.

Eine konfluent gewachsene Sf21-Kultur auf einer Wachstumsfläche von 150 cm^2 (eine große Zellkulturflasche) besteht aus etwa $2,3 \times 10^7$ Zellen [Internetquelle 1]. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber in etwa 10 ml Medium geerntet und gezählt (Abschnitt 5.11.3). Anschließend wurden die Zellen in einen sterilen Erlenmeyerkolben überführt und mit frischem Medium auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml verdünnt.

Das Wachstum der Suspensionskulturen wurde dreimal wöchentlich überprüft; Sf21-Kulturen wurden dabei jeweils zu $0,8 \times 10^6$ Zellen/ml und High-Five-Kulturen jeweils zu $0,6 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät. Bei der Vermehrung von Insektenzellen in Suspension muss darauf geachtet werden, dass das Volumen des Erlenmeyerkolbens an das wachsende Volumen der Zellsuspension angepasst wird; Die Suspensionskultur sollte nicht mehr als 20% des Erlenmeyerkolbens einnehmen.

5.11.3 Bestimmung der Zelldichte von Zellsuspensionen

Insektenzellsuspensionen wurden zeitgleich zur Zellzählung einer Vitalfärbung mit Trypanblau unterzogen, um Aussagen über die Viabilität der Zellen treffen zu können. Trypanblau ist ein sogenannter Perforationsfarbstoff welcher intakte Zellmembranen nicht durchdringt und daher nur tote Zellen anfärbt [Übersichtsartikel Louis & Siegel, 2011].

5.11.3.1 Manuelles Zählen mittels Thoma-Zählkammer

Zur Zählung wurden 50 µl der jeweiligen Zellsuspension mit 50 µl Trypanblaulösung [0,4% (w/v) Trypanblau in 1x PBS] versetzt und für kurze Zeit bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µl der gefärbten Zellsuspension in die Thoma-Zählkammer überführt und weiße und blaue Zellen in der Zählkammer gezählt. Das Volumen der Thoma-Zählkammer beträgt 0,1 mm³ (0,1 µl). Mit Hilfe der folgenden Gleichungen lässt sich aus der Zahl der Zellen in der Zählkammer die Zelldichte und der Anteil lebender Zellen der ursprünglichen Zellsuspension berechnen:

$$\text{Zelldichte} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{ml}} \right] = 2 * \frac{\sum \text{wei\ss e Zellen}}{0,0001 \text{ ml}} * 10^4$$

$$\text{Zellviabilität [\%]} = \left(1 - \frac{\sum \text{blaue Zellen}}{\sum \text{blaue Zellen} + \sum \text{wei\ss e Zellen}} \right) * 100$$

Die Viabilität einer gesunden Insektenzellsuspension sollte stets bei 90% oder höher liegen.

5.11.3.2 Automatische Zellzählung mit dem TC20 Zellzähler

Für die automatische Zellzählung wurde nach Angaben des Herstellers (BioRad) des Zellzählers verfahren [Internetquelle 2].

5.11.4 Herstellung von tiefgefrorenen Vorratskulturen (*cryo stocks*)

Für die dauerhafte Lagerung von Insektenzellen eignet sich das Anlegen von *cryo stocks*. Zu diesem Zweck wurden Suspensionskulturen (Sf21- oder High-Five-Zellen) einen Tag nach der Aussat durch sanfte Zentrifugation geerntet (zehn Minuten bei 200 xg und Raumtemperatur) und das Zellpellet in Cryopräservationsmedium zu einer Zelldichte von 1 bis 2x10⁷ Zellen/ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend zu 1 bis 2 ml in Cryokonservierungsgefäße aliquotiert und auf Eis gehalten. Schließlich erfolgte ein langsames Abkühlen der Cryokonservierungsgefäße (-1°C/min) im Cryopräservationskontainer „Mr. Frosty“ auf -80°C. Zur dauerhaften Lagerung wurden die Vorratskulturen in einen Stickstofftank überführt.

Cryopräservationsmedium:

- 45% (v/v) Zellüberstand
- 45% (v/v) frisches Medium
- 10% (v/v) DMSO

5.11.5 Transfektion von Sf21-Zellen mit Bacmid-DNA

Für die Transfektion von Bacmid-DNA wurde das Transfektionsreagenz Cellfectin II (Invitrogen, bzw. ThermoFischer) verwendet, das Vorgehen bei der Transfektion ist an die Angaben des Herstellers angelehnt [Internetquelle 3].

Pro zu transfizierendem Bacmid-Klon wurden in eine Vertiefung einer Zellkulturtestplatte (*six well plate*) etwa 1,5x10⁶ Sf21-Zellen ausgesät. Die Zellen müssen dazu nicht an adhärenthes Wachstum gewöhnt sein und können aus einer Suspensionskultur stammen. Um ein Anhaften der Zellen in der Zellkulturtestplatte zu erlauben, wurde die Platte für etwa 30 Minuten bei 28°C inkubiert. Der Transfektionsmix wurde aus 200 µl Medium, 8 µl Cellfectin II und 10 µl Bacmid-Lösung hergestellt und für etwa 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abgeschlossener Inkubationszeit wurde der Transfektionsmix mit Medium auf ein Volumen von 1 ml aufgefüllt, der Zellüberstand abgesaugt und der Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen gegeben. Die Zellkulturtestplatte wurde dann für drei bis fünf

Stunden bei 28°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde der Zellüberstand erneut abgesaugt und durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und bei 28°C inkubiert. Nach etwa 72 Stunden wurde der Zellüberstand (initialer Virustiter V_0) vorsichtig abgenommen und in ein geeignetes Röhrchen überführt. V_0 -Virustiter, wie auch spätere Virustiter, wurden bei 4°C gelagert. Die transfizierten Sf21-Zellen können nach Abnahme des initialen Virustiters mit frischem Medium versehen und weiter inkubiert werden, um später die Transfektionseffizienz und Expression von Zielgenen (Abschnitt 5.11.5.1) zu untersuchen.

5.11.5.1 Kontrolle der Transfektionseffizienz

Wurden mit den Zielgenen auch ORFs in das rekombinante Baculovirusgenom integriert, welche für fluoreszierende Proteine kodieren, so lässt sich die Transfektionseffizienz der Bacmid-DNA durch Fluoreszenzmessung der Sf21-Zellen kontrollieren. Die Expression des fluoreszierenden Proteins YFP wurde im Fluoreszenzimager gemessen, das Scannen der Zellkulturtestplatte erfolgte mit den folgenden Einstellungen:

Anregungswellenlänge	523 nm
Detektionsfilter	526 SP
Photomultiplier-Spannung	600 V

Um die Expression der im Bacmid enthaltenen Zielgene zu überprüfen, wurden die transfizierten Zellen nach Abnahme des initialen Virustiters mit frischem Medium versetzt und für weitere drei Tage bei 28°C inkubiert. Nach dieser Inkubation wurden die Zellen in 1 ml PBS aufgeschwemmt und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Ernte der Zellen erfolgte durch kurze Zentrifugation (fünf Minuten bei 4.000 xg und Raumtemperatur), das Zellpellet wurde anschließend in 100 µl Lysepuffer aufgenommen und für mindestens 30 Minuten auf Eis inkubiert.

Lysepuffer:	1x PBS:
300 mM Natriumchlorid	137 mM Natriumchlorid
30 mM Tris-HCl, pH 7,5	2,7 mM Kaliumchlorid
1% (v/v) NP-40	10,1 mM Dikaliumhydrogenphosphat
1 mM DTT	1,8 mM Kaliumdihydrogenphosphat
1 µg/ml Leupeptin	
1 µg/ml Pepstatin	
1 mM PMSF	

Das Zelllysate wurde mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Western-Blot-Analysen auf die Expression der entsprechenden Zielgene hin untersucht.

5.11.6 Propagation von Baculoviren, Herstellung größerer Virustiter

Zur Vermehrung eines Virustiters wurden 100 ml einer Sf21-Suspensionskultur ($0,8 \times 10^6$ Zellen/ml) mit 200 bis 500 µl des initialen Virustiters V_0 infiziert. Der Baculovirus wird hier im Überschuss zugesetzt, damit zu Beginn nur wenige Zellen infiziert werden und der Virus sich entsprechend in der Kultur effizient vermehren kann. Die Kultur wurde täglich gezählt und stets wieder mit frischem Medium auf 1 bis $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml verdünnt. Ein bis zwei Tage nach Einsetzen des Proliferationsarrests wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet (5 Minuten bei 1.000 xg und Raumtemperatur) und der Überstand (Virustiter V_1) in für die Lagerung geeignete Gefäße (z.B. 150 cm²-Zellkulturflaschen) überführt.

Wurde eine größere Menge eines Baculovirus benötigt, so wurden entweder direkt größere V_1 -Kulturen angesetzt oder der V_1 -Virustiter genutzt, um eine V_2 -Kultur zu infizieren.

Die Konzentration funktionaler Viruspartikel in einem Virustiter kann mittels Plaque-Assay quantifiziert werden. Bei den meisten der durchgeführten Plaque-Assays ergaben sich Virustiter zwischen 1 und 3×10^7 pfu/ml, woraufhin schließlich gänzlich auf die Durchführung aufwendiger Plaque-Assays verzichtet und stets ein Titer von 1×10^7 pfu/ml angenommen wurde.

5.11.7 Infektion von Expressionskulturen

Für die Erstellung einer Expressionskultur wurden Insektenzellen zu einer Zelldichte von $1,5 \times 10^6$ Zellen/ml ausgesät und mit einer Infektionsmultiplizität von mindestens Eins ($\text{MOI} \geq 1$) oder einem leichten Überschuss an Baculovirus infiziert. Dies gewährleistet die unverzügliche und simultane Infektion vieler Zellen und führt so zu einem rasch einsetzenden Proliferationsarrest. Die Zellen wurden in der Regel etwa 72 Stunden nach Infektion durch sanfte Zentrifugation geerntet (5 Minuten bei 200 xg und 4°C) und das Zellpellet entweder direkt aufgeschlossen oder in flüssigem Stickstoff eingefroren.

5.11.8 Aufschluss von Insektenzellen und Präparation von Zelllysaten

Insektenzellen aus Suspensionskulturen wurden entweder direkt nach der Zellernte oder nach zwischenzeitlicher Lagerung der Zellpellets bei -80°C aufgeschlossen. Das Zellpellet wurde dazu so in Lysepuffer resuspendiert, dass sich eine Zelldichte von 2×10^7 Zellen/ml ergab (es wurden stets nur lebende Zellen berücksichtigt). Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall (10x 10 Sekunden, 50% Betriebszeit, 60% Intensität). Durch Zentrifugation (20 bis 30 Minuten bei 20.000 xg und 4°C) wurden unlösliche Zellbestandteile abgetrennt und lösliches Zelllysat gewonnen. Der nachfolgend aufgeführte Lysepuffer steht exemplarisch für die in dieser Arbeit verwendeten Rezepturen. Je nach Präparation wurde der Salzgehalt des Puffers angepasst, ein leicht veränderter pH verwendet, Komponenten wie NP-40, DTT oder EDTA ausgelassen oder weitere Additive hinzu gegeben.

Lysepuffer:

200 mM Kaliumchlorid
50 mM Tris-HCl, pH 7,5
10% (w/v) Saccharose
1 mM EDTA
1 mM DTT
0,02% NP-40
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin
1 mM PMSF

5.12 Nukleinsäurebiochemische Methoden

5.12.1 Standardmethoden

Ethanol-fällungen, Isopropanol-fällungen und Phenol- / Chloroformextraktionen wurden entsprechend den Protokollen aus [Sambrook & Russel, 2001] durchgeführt. Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit entsprechenden Kits von Peqlab und Qiagen, es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Konzentrationsbestimmungen von Nukleinsäurelösungen wurden photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm (A_{260}) durchgeführt. Eine A_{260} von 1 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 ng/ μ l und einer RNA-Konzentration von 40 ng/ μ l.

5.12.2 Agarose-Gelelektrophorese

Restriktionsanalysen von Plasmid-DNAs wurden mittels horizontaler Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Je nach Größe der erwarteten Restriktionsfragmente wurden Agarosegele mit 0,8 bis 1,5% (w/v) Agarose in 0,5x TBE verwendet.

0,5x TBE:

45 mM Tris-Base
45 mM Borsäure
0,5 mM EDTA

Die Gelelektrophorese wurde bei konstanten 10 bis 20 V pro Zentimeter Gellänge durchgeführt.

5.12.3 Denaturierende Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von (radioaktiv markierten) RNAs wurde das System der Harnstoff-PAGE verwendet. Es wurden 20x20x0,04 cm-Gele (maximal 30 Proben, 25 ml Gellösung benötigt) und 35x45x0,04 cm-Gele (bis zu 60 Proben, 100 ml Gellösung benötigt) verwendet. Gellösungen wurden durch Verdünnung einer Acrylamid-Stammlösung mit frisch eingewogenem Harnstoff und 1x TBE hergestellt.

Gellösung:

8,3 M Harnstoff
1x TBE
5 bis 20 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)

1x TBE:

90 mM Tris-Base
90 mM Borsäure
1 mM EDTA

Acrylamid-Stammlösung:

40% (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (19:1)

Formamid-Ladepuffer:

80 % (v/v) deionisiertes Formamid
10 mM EDTA
0,25% (w/v) Xylencyanol
0,25% (w/v) Bromphenolblau
1x TBE

Für die Polymerisation wurden zu 25 ml Gellösung 100 μ l APS [10% (w/v)] und 20 μ l TEMED gegeben, kurz gemischt und das Gel zügig zwischen vorbereitete Glasplatten gegossen. Die Polymerisation von 100 ml Gellösung wurde mit 500 μ l APS [10% (w/v)] und 100 μ l TEMED initiiert. Um eine vollständige Polymerisation des Gels zu erlauben wurden die Gele etwa eine Stunde stehen gelassen. Damit die Gelelektrophorese wirklich unter denaturierenden Bedingungen stattfindet, muss ein Harnstoff-PA-Gel eine Betriebstemperatur von mindestens 40°C besitzen. Zu diesem Zweck wurden die Gele vor dem Laden der Proben einem mindestens 30 minütigen Vorlauf unterzogen. Elektrophoresen mit 20x20x0,04 cm-Gelen wurden bei konstanten 20 W durchgeführt, für 35x45x0,04 cm-Gele wurde eine Leistung von konstanten 50 W angelegt.

RNA-Proben wurden für fünf Minuten bei 95°C in Formamid-Ladepuffer aufgekocht und bis zum Beladen des Gels auf Eis gehalten. Das Laufverhalten der Farbstoffe Xylencyanol und Bromphenolblau diente als Referenz für das Fortschreiten der Elektrophorese.

Gele mit radioaktiv markierten RNAs wurden nach beendeter Elektrophorese auf einer Glasplatte belassen, in Frischhaltefolie gewickelt und zur Detektion der RNAs auf einen *storage phosphor* Autoradiographiefilm gelegt. Der Autoradiographiefilm wurde nach geeigneter Expositionszeit (meist über Nacht) im Fluoreszenzimager gescannt.

Als Größenstandard für Harnstoff-PAGEs wurden radioaktiv markierte Fragmente des Plasmids pBR322 verwendet (Abschnitt 5.12.4).

5.12.4 Radioaktive 5'-Markierung von Nukleinsäuren

Zur Markierung von RNA-Oligonukleotiden (Wigley10-Oligonukleotide) und pBR322-Markerfragmenten wurde die T4 5'-Polynukleotidkinase (T4 PNK) verwendet. Für die Herstellung des pBR322-Markers wurde zunächst das Plasmid pBR322 mit der Restriktionsendonuklease *Hpa*II geschnitten und anschließend dephosphoryliert. Die Restriktionsfragmente wurden dann wie nachfolgend beschrieben mittels T4 PNK markiert. Radioaktive Markierungen mit der T4 PNK wurden in der Regel in Reaktionen von 30 µl durchgeführt:

1xT4 PNK Puffer
etwa 500 ng DNA (kann variiert werden)
20 µCi γ -³²P-ATP
20 U T4 PNK
dd. H₂O *ad.* 30 µl

Die Reaktion wurde für mindestens eine Stunde bei 37°C inkubiert, anschließend mit Wasser auf 200 µl aufgefüllt und einer Ethanol-fällung unterzogen. Das Pellet wurde schließlich in 20 µl HEPES-Lösung [10 mM, pH 7,0] aufgenommen.

Der radioaktive pBR322-Marker wurde so in Elektrophoresen eingesetzt, dass die Radioaktivität in den Markerspuren in etwa der Radioaktivität der zu analysierenden Proben entsprach.

5.12.5 Präparation radioaktiv markierter RNAs durch *In-Vitro*-Transkription

Für *In-Vitro*-Polyadenylierungen und Spaltungsassays wurden radioaktiv markierte Substrat-RNAs benötigt. Diese wurden mittels SP6-*In-Vitro*-Transkription ausgehend von linearisierten Plasmid-DNAs hergestellt (*run-off transcription*). Transkriptionen zur Darstellung kurzer RNA-Substrate (L3prä) wurden als 25 µl-Reaktionen durchgeführt, längere RNA-Substrate (L3short, L3, SV40late) in 50 µl-Reaktionen. Eine 50 µl-Transkriptionsreaktion besaß die folgende Zusammensetzung:

1x SP6 Puffer
1x NTP-Mix [5x]
2,5 mM DTT
0,01% (v/v) NP-40
8 mM 3'-O-Me-m⁷G(5')ppp(5')G Cap-Analogon
3 µg DNA (linearisiertes Plasmid)
40 U rRNi
60 U SP6-Polymerase
40 µCi α -³²P-UTP
dd. H₂O *ad.* 50 µl

NTP-Mix [5x]:

2,5 mM ATP
2,5 mM CTP
0,5 mM GTP
0,5 mM UTP

Gelelutionspuffer:

500 mM Ammoniumacetat
10 mM Magnesiumchlorid
0,1 mM EDTA
0,1% (w/v) SDS

Die Reaktionen wurden für drei bis fünf Stunden bei 37°C inkubiert und anschließend mit Wasser auf 100 µl aufgefüllt, einer Ethanol-fällung unterzogen und das Pellet in einem möglichst kleinen Volumen HEPES-Lösung [10 mM, pH 7,0] und Formamid-Ladepuffer aufgenommen. Die Transkriptionsprodukte wurden anschließend mittels denaturierender Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Laufhöhe der gewünschten RNAs mittels Autoradiographie bestimmt. Entsprechende Stücke wurden aus dem Gel ausgeschnitten und mit 400 µl Gelelutionspuffer über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Schließlich wurde die RNA mit Phenol und Chloroform extrahiert, einer Ethanol-fällung unterzogen und in 100 µl HEPES-Lösung [10 mM, pH 7,0] aufgenommen. Anhand von Aliquots, welche vor und nach der Gelelution entnommen wurden, konnte die spezifische Aktivität des eingesetzten UTPs sowie die Ausbeute und Konzentration der gereinigten RNA berechnet werden.

5.13 Proteinbiochemische Methoden

5.13.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

5.13.1.1 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Sind Proteinpräparationen frei von kontaminierenden Proteinen, so kann die Proteinkonzentration durch photometrische Messung bei 280 nm (A_{280}) ermittelt werden. Dabei kann davon ausgegangen werden, dass eine A_{280} von 1 einer Proteinkonzentration von 1 mg/ml entspricht. Für eine genauere Bestimmung kann der Extinktionskoeffizient des jeweiligen Proteins berechnet werden und die Relation zwischen Absorption und Proteinkonzentration über das Lambert-Beersche Gesetz hergestellt werden:

$$E = \varepsilon * c * d \rightarrow c = \frac{E}{\varepsilon * d} \quad \text{mit: } E = \text{gemessene Absorption, } \varepsilon = \text{Extinktionskoeffizient,} \\ d = \text{gemessene Schichtdicke, } c = \text{Konzentration}$$

5.13.1.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Eine weitere Möglichkeit die Gesamtproteinkonzentration in einer Lösung zu bestimmen ist die Proteinbestimmung nach [Bradford, 1976]. Dabei wurden unterschiedliche Verdünnungen der zu bestimmenden Proteinlösung in einem Volumen von je 10 μ l in Vertiefungen einer Mikrottestplatte zur Absorptionsmessung (96 well plate) gegeben und mit 190 μ l Bradford-Reagenz (1:5-Verdünnung in Wasser) versetzt. Nach zehnmütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption der Gemische im MultiMode reader vergleichend zu einer BSA-Eichreihe (100 ng bis 4 μ g) gemessen. Die Einstellungen zur Messung im MultiMode reader entsprachen dabei den Angaben des Herstellers.

5.13.1.3 Densitometrische Konzentrationsbestimmung aus SDS-PA-Gelen

Um die Konzentration einzelner Proteine in Proteingemischen zu bestimmen, wurden Coomassie-gefärbte SDS-PA-Gele der entsprechenden Proteinpräparationen gescannt und die Signalstärken einzelner Proteinbanden densitometrisch quantifiziert. Durch Vergleich mit einer BSA-Eichreihe (50 bis 500 ng), welche auf das identische Gel geladen wurde, konnte die ungefähre Konzentration einzelner Proteine berechnet werden. Bei dieser Methode ist jedoch zu beachten, dass unterschiedliche Proteine von Coomassie-Brilliant-Blau mit unterschiedlicher Effizienz angefärbt werden. Neben weiteren Faktoren ist dies ein Grund für die relativ große Ungenauigkeit dieser Art der Proteinkonzentrationsbestimmung.

5.13.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen wurde das diskontinuierliche Gelsystem aus Sammel- und Trenngel nach [Laemmli, 1970] verwendet:

Sammelgel:

3,5% (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
0,05% (w/v) SDS

Trenngel:

6 bis 15% (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1)
375 mM Tris-HCl, pH 8,8
0,1% (w/v) SDS

SDS-Probenpuffer [2x]:

10% (v/v) Glycerin
62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
2% (w/v) SDS
715 mM 2-Mercaptoethanol
0,125% (w/v) Bromphenolblau

Laemmli-Laufpuffer [1x]:

50 mM Tris-Base
380 mM Glycin
0,1% (w/v) SDS

Die Acrylamidkonzentration des Trenngels wurde je nach Größe der aufzutrennenden Proteine angepasst. Für ein 10x20x0,1 cm-Gel wurden etwa 10 ml Sammelgel- und 20 ml Trenngellösung benötigt. Die Polymerisation des Sammelgels wurde durch Zugabe von 40 µl APS [10% (w/v)] und 10 µl TEMED gestartet, für die Polymerisation des Trenngels wurden 120 µl APS [10% (w/v)] und 40 µl TEMED verwendet. Die Gele wurden für mindestens eine Stunde stehen gelassen, um die vollständige Polymerisation zu erlauben.

Proteinproben wurden vor Beladen des Gels mit gleichem oder größerem Volumen SDS-Probenpuffer versetzt und für fünf Minuten bei 95°C denaturiert. Die Elektrophorese wurde mit konstanten 0,1 bis 0,2 mA/cm² Gel durchgeführt (20 bis 40 mA für ein 10x20x0,1 cm-Gel). Je nach Proteinprobe und Anwendungszweck der Elektrophorese wurden unterschiedliche Größenstandards verwendet.

5.13.2.1 Kolloidalfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blau

Proteinbanden in SDS-PA-Gelen können mit Coomassie-Brilliant-Blau (unspezifisch) gefärbt werden, dabei lagert sich der blaue Farbstoff an basische Aminosäureseitenketten an. Zu Färbung wurde das Gel nach beendeter Elektrophorese für 20 Minuten in Fixierlösung gelegt, kurz mit Wasser gespült und anschließend für etwa zwei Stunden gefärbt. Schließlich wird das Gel mit Essigsäurelösung [10% (v/v)] so lange entfärbt, bis das gewünschte Verhältnis von Bandenintensität zu Hintergrundfärbung erreicht ist.

Fixierlösung:

25% (v/v) Isopropanol
10% (v/v) Essigsäure

Färbelösung:

10% (v/v) Essigsäure
0,01% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R-250

5.13.2.2 Silberfärbung

Eine sehr sensitive Methode zur Anfärbung von Proteinen in SDS-PA-Gelen stellt die Silberfärbung dar. Dabei werden Silberionen an negativ geladene Aminosäureseitenketten angelagert und dort zu elementarem Silber reduziert.

Fixierlösung:

50% (v/v) Ethanol
12% (v/v) Essigsäure
0,05% (v/v) Formaldehyd

Sensibilisierungslösung:

0,02% (w/v) Natriumthiosulfat

Färbelösung:

0,2% (w/v) Silbernitrat
0,076% (v/v) Formaldehyd

Entwicklerlösung:

6% (w/v) Natriumcarbonat
0,0004% (w/v) Natriumthiosulfat
0,05% (v/v) Formaldehyd

Nach beendeter Elektrophorese wurde das zu färbende Gel zunächst in 100 ml Fixierlösung gegeben und für mindestens eine Stunde (meistens über Nacht) schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit 250 ml Ethanollösung [20% (v/v)] für 20 Minuten gewaschen, die Ethanollösung wurde dabei zweimal erneuert. Das Gel wurde für zwei Minuten in 100 ml Sensibilisierungslösung und anschließend zweimal je eine Minute in Wasser geschwenkt. Die Färbung des Gels erfolgte für 20 Minuten in 100 ml Färbelösung, woraufhin das Gel nochmals zweimal in Wasser geschwenkt wurde (jeweils für 30 Sekunden). Zur Entwicklung wurde das Gel mit 100 ml Entwicklerlösung versetzt und die Entwicklung bei Erreichen des gewünschten Färbegrads mit 100 ml Essigsäurelösung [12% (v/v)] gestoppt.

5.13.3 Western-Blot-Analyse

Für Western-Blot-Analysen wurden die zu untersuchenden Proteingemische zunächst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend im *Semi-Dry*-Verfahren auf eine Nitrozellulosemembran übertragen (*blotting*).

Transferpuffer [1x]:

50 mM Tris-Base
40 mM Glycin
0,37% (w/v) SDS
20% (v/v) Methanol

Ponceau S-Lösung:

0,5% (w/v) Ponceau S
1% (v/v) Essigsäure

TN-Puffer:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM Natriumchlorid

TN-Tween:

20 mM Tris-HCl, pH 7,5
150 mM Natriumchlorid
0,05% (v/v) Tween-20

Strip-Puffer [1x]:

0,2 M Glycin, pH 2,0
2,5% (w/v) SDS
100 mM 2-Mercaptoethanol

Blocking-Reagenz:

2,5% (w/v) Magermilchpulver
in TN-Puffer

Der Aufbau der Blot-Apparatur entsprach den Angaben des entsprechenden Herstellers. Der Transfer wurde für eineinhalb Stunden bei konstanten 3 mA/cm^2 Gel durchgeführt. Nach beendeter Elektrophorese wurde die Nitrozellulosemembran mit Ponceau S reversibel gefärbt, um Markerbanden und Laufspuren mit einem Bleistift markieren zu können. Zu Absättigung überschüssiger Bindestellen wurde die Membran für eine Stunde in Blocking-Reagenz inkubiert. Die Inkubation der Membran mit primärem Antikörper (geeignete Verdünnung in TN-Tween mit 0,5% (w/v) Magermilchpulver) erfolgte für mindestens zwei Stunden bei Raumtemperatur. Nach gründlichem Spülen der Membran mit TN-Tween erfolgte die halbstündige Inkubation mit sekundärem Antikörper unter Ausschluss von Licht (Fluoreszenzgekoppelte Antikörper, geeignete Verdünnung in TN-Tween). Schließlich wurde die Membran nochmals gründlich mit TN-Tween und dreifach mit TN-Puffer gewaschen. Zur Detektion des sekundären Antikörpers wurde die Membran nach Herstellerangaben auf dem Li-Cor Fluoreszenzscanner gescannt.

Nach der Detektion wurden die Nitrozellulosemembranen ggf. mit Strip-Puffer behandelt (dreimal 20 bis 30 Minuten in jeweils etwa 15 ml Strip-Puffer bei Raumtemperatur) und so für weitere Western-Blot-Analysen regeneriert (eine erneute Inkubation mit Blocking-Reagenz ist notwendig).

5.14 Techniken zur Fraktionierung und Reinigung von Proteinen

Die nachfolgenden Erläuterungen zu Techniken der Fraktionierung und Reinigung von Proteinen und Proteinkomplexen gelten sowohl für die Reinigung von rekombinanten Proteinen, als auch für die durchgeführte Fraktionierung von HeLa-Kernextrakt. Alle diese Arbeiten wurden bei verminderter Temperatur, falls möglich gar auf Eis durchgeführt.

Bei der Fraktionierung von HeLa-Kernextrakt wurde die Rezeptur aller verwendeten Puffer an die Pufferbedingungen des Kernextraktes selbst angelehnt. Gegebenenfalls wurde die Kaliumchloridkonzentration herabgesetzt, um etwa eine Anionenaustauschchromatographie zu erlauben.

Puffer zur Kernextraktfraktionierung:

300 mM Kaliumchlorid
20 mM HEPES, pH 8,0
1,5 mM Magnesiumchlorid
0,2 mM EDTA
0,5 mM DTT
25% (v/v) Glycerin
1% (v/v) Proteaseinhibitor-Cocktail [100x]

5.14.1 Affinitätschromatographie an immobilisierten Metallionen (IMAC)

Die Reinigung von Proteinen mit His-Fusionspeptiden erfolgte über eine Matrix aus Nickel-Nitrilotriessigsäure-Agarose (Ni-NTA-Agarose). Das His-Fusionspeptid ist in der Lage Nickelionen zu komplexieren, wodurch die Bindung von Proteinen mit His-Fusionspeptiden an Ni-NTA-Agarose gewährleistet wird. Die generelle Zusammensetzung der verwendeten Puffer ergab sich aus den Bedingungen des jeweiligen Zellaufschlusses. Gemein ist allen IMAC-Reinigungen, dass die Zellysate mit 10 mM Imidazol versetzt wurden und Wasch- und Elutionspuffer 20, bzw. 250 mM Imidazol enthielten.

Zellysate wurde mit einer geeigneten Menge äquilibrierter Ni-NTA-Agarose vermischt und bei 6 bis 8°C für mindestens zwei Stunden schüttelnd inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch in eine Leersäule gegeben. Dabei setzte sich das Säulenmaterial langsam ab, der Durchfluss wurde aufgefangen. Nach dem vollständigen Beladen der Säule folgten drei Waschschriffe mit jeweils acht Säulenvolumen an Waschpuffer. Für die erste Elution wurden 0,5 Säulenvolumen Elutionspuffer auf die Säule gegeben und für etwa zehn Minuten inkubiert. Die anschließenden fünf Elutionsschritte erfolgten mit jeweils einem Säulenvolumen an Elutionspuffer.

5.14.2 Strep-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit Strep-Fusionspeptiden erfolgte über eine Matrix aus Strep-Tactin-Sepharose. Das Strep-Peptid geht dabei eine nicht-kovalente aber äußerst stabile Bindung mit dem Säulenmaterial ein. Die generelle Zusammensetzung der verwendeten Puffer ergab sich aus den Bedingungen des jeweiligen Zellaufschlusses. Die Elution erfolgte bei allen Strep-Affinitätschromatographien durch Konkurrenz mit 5 mM D-Desthiobiotin im Elutionspuffer. Vor Applikation des Zellysats wurde ein geeignetes Volumen an Strep-Tactin-Sepharose in eine Leersäule gegeben und das Säulenmaterial entsprechend der Herstellerangaben äquilibriert [Internetquelle 5].

Das Zellysate wurde langsam über die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Nach dem vollständigen Beladen der Säule folgten fünf Waschschriffe mit jeweils einem Säulenvolumen an Waschpuffer. Die Elution erfolgte in sechs Schritten mit jeweils 0,5 Säulenvolumen an Elutionspuffer.

Die Strep-Tactin-Sepharose wurde nach abgeschlossener Chromatographie nach Herstellerangaben regeneriert [Internetquelle 5]. Es wurde allerdings beobachtet, dass die Reinigungsleistung des Säulenmaterials bereits bei einer zweiten Nutzung, im Vergleich zu frischer Strep-Tactin-Sepharose, deutlich geringer ausfällt (Daten nicht gezeigt).

5.14.3 Flag-Affinitätschromatographie

Die Reinigung von Proteinen mit Flag-Fusionspeptiden erfolgte über eine Matrix aus an Agarose gekoppelten Flag-Antikörpern (anti-Flag-Agarose). Die generelle Zusammensetzung der verwendeten Puffer ergab sich aus den Bedingungen des jeweiligen Zellaufschlusses. Die Elution erfolgte bei allen Flag-Affinitätschromatographien durch Konkurrenz mit Flag-Peptid, der Elutionspuffer enthielt entsprechend 150 ng/μl Flag-Peptid.

Vor Applikation des Zelllysats wurde ein geeignetes Volumen an anti-Flag-Agarose in eine Leersäule gegeben und das Säulenmaterial entsprechend der Herstellerangaben äquilibriert [Internetquelle 4].

Das Zelllysate wurde langsam über die Säule gegeben und der Durchfluss aufgefangen. Nach dem vollständigen Beladen der Säule folgten fünf Waschschritte mit jeweils fünf Säulenvolumen an Waschpuffer. Für die erste Elution wurden 0,5 Säulenvolumen Elutionspuffer auf die Säule gegeben und für etwa zehn Minuten inkubiert. Die anschließenden fünf Elutionsschritte erfolgten mit jeweils einem Säulenvolumen an Elutionspuffer.

Um die anti-Flag-Agarose mehrfach verwenden zu können, wurde das Säulenmaterial entsprechend der Herstellerangaben regeneriert und gelagert [Internetquelle 4]. Nach eigener Erfahrung kann eine Säule aus anti-Flag-Agarose für mindestens drei konsekutive Reinigungen verwendet werden, ohne dass die Reinigungsleistung der Säule signifikant beeinträchtigt wird.

5.14.4 Ammoniumsulfatpräzipitation

Die Zugabe von großen Mengen Ammoniumsulfat zu Proteinlösungen führt zum reversiblen Aussalzen der Proteine. Durch Wahl geeigneter Ammoniumsulfatkonzentrationen wird nur ein Teil der Proteine aus komplexen Proteingemischen präzipitiert. So kann diese Methode auch zur Anreicherung bestimmter Proteine genutzt werden [Pingoud & Urbanke, 1997].

Ammoniumsulfatfällungen mit verschiedenen Konzentrationen an Ammoniumsulfat wurden genutzt, um HeLa-Kernextrakt zu fraktionieren. Dafür wurde die gewünschte Menge an Kernextrakt aus Eis aufgetaut und mit einer geeigneten Menge an Ammoniumsulfat versetzt. Die Mengen an Ammoniumsulfat, welche benötigt wurden um eine bestimmte Sättigung des Kernextraktes zu erzeugen, wurden Tabelle 3-4 aus [Pingoud & Urbanke, 1997] entnommen. Die Fällungsreaktion wurde für mindestens eine Stunde auf Eis geschüttelt oder gerührt. Anschließend wurde präzipitiertes Material durch Zentrifugation abgetrennt (20 Minuten bei 20.000 xg und 0°C). Der Überstand nach Zentrifugation wurde in ein frisches Röhrchen überführt und das Präzipitat in einer geeigneten Menge Puffer ohne Ammoniumsulfat resuspendiert. In der Regel folgte die Dialyse von Überstand und Pelletfraktion zur vollständigen Entfernung des Ammoniumsulfats aus den Fraktionen.

5.14.5 Anionenaustauschchromatographie

In dieser Arbeit wurden verschiedene Anionenaustauscher-Säulen genutzt: Selbstgepackte Säulen (30 und 80 ml) aus DEAE-Sepharose, 1 ml HiTrap DEAE-Sepharose-Säulen und eine 1 ml Resource Q-Säule.

Allen Säulen gemein ist, dass das zu reinigende Material mit niedriger Salzkonzentration auf die Säule gebunden und anschließend mit einem Gradienten steigender Ionenstärke eluiert wird. Anionenaustauschchromatographien wurden stets mit dem Chromatographiesystem ÄKTA *purifier* und der entsprechenden Software gesteuert und überwacht. Die Fraktionierung des Eluates erfolgte automatisch durch einen angeschlossenen Fraktionssammler.

Gerade bei dem schwachen Anionenaustauscher-Material DEAE-Sepharose ist eine geringe Flussrate von entscheidender Bedeutung für eine effiziente Chromatographie. In der Regel wurde das zu reinigende Material bei einer Salzkonzentration von 75 oder 100 mM Kaliumchlorid auf die entsprechenden Säulen geladen. Auf DEAE-Sepharose erfolgte die Elution mit einem

Kaliumchloridgradienten bis 500 mM und auf Resource Q-Säulen bis 1M. In manchen Fällen wurden DEAE-Sepharose-Säulen auch mit höherer Salzkonzentration beladen (200 bis 250 mM Kaliumchlorid) und die Durchflussfraktion gesammelt. Dieses Vorgehen ermöglichte die Entfernung von Nukleinsäuren aus einer Proteinpräparation, ohne dass die Präparation zwischenzeitlich auf eine niedrige Ionenstärke gebracht werden musste.

5.14.6 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie (oder Gelfiltration) bietet die Möglichkeit zur Bestimmung des nativen Molekulargewichts von Proteinpräparationen und gewährt ggf. Informationen zum Oligomerisierungs- oder Aggregationsstatus von Proteinen. Bei diesem Verfahren wird eine Mischung von Proteinen verschiedener Durchmesser der Größe nach aufgetrennt. Große Proteine migrieren schneller durch das Gel während kleine Proteine vermehrt in die Kavitäten der Gelmatrix eindringen können und dadurch länger auf der Säule verbleiben. Durch Kalibrierung einer Gelfiltrationssäule mit Proteinen bekannter Molekulargewichte kann eine Korrelation zwischen Elutionsvolumen und Molekulargewicht eines Proteins hergestellt werden.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Fertigsäulen zur Gelfiltration sowie auch eine selbstgepackte Superose 6-Säule (100 ml) verwendet. Chromatographien wurden stets mit dem Chromatographiesystem ÄKTA *purifier* und der entsprechenden Software gesteuert und überwacht. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer ergab sich aus dem jeweils zu reinigenden Material. Der Ablauf der Chromatographien und der Kalibrierung der Säulen entsprach dabei den Angaben der Hersteller der Säulen, des Säulenmaterials und der Kalibrier-Kits [Internetquellen 6, 7, 8, 9]. Die Fraktionierung des Eluats erfolgte automatisch durch einen angeschlossenen Fraktionssammler.

5.14.7 Fraktionierung mittels Poly(A)-Sepharose

Viele RNA-bindende Proteine lassen sich effizient über Poly(A)-Sepharose reinigen; So wurde diese Technik in dieser Arbeit auch zur Reinigung rekombinanter CPSF-Komplexe genutzt. Das Vorgehen bei der Chromatographie über Poly(A)-Sepharose ähnelt der Anionenaustauschchromatographie: Das zu reinigende Material wird bei geringer Ionenstärke auf die Säule geladen und bei der Elution werden die Protein-Poly(A)-Interaktionen durch steigender Ionenstärke (Salzgradient) kompetiert. Es wurden mehrere Poly(A)-Sepharose-Säulen verschiedener Größe gepackt, die Chromatographien wurden stets mit dem Chromatographiesystem ÄKTA *purifier* und der entsprechenden Software gesteuert und überwacht. Die genaue Pufferzusammensetzung war jeweils abhängig vom zu reinigenden Material. Beim Packen der Säulen, Äquilibrierung des Säulenmaterials und allen Chromatographien wurde nach Herstellervorgaben gearbeitet [Internetquelle 10].

5.15 Aktivitätsassays

5.15.1 Filterbindungsassay

Der Filterbindungsassay stellt eine relativ einfache Methode zur Analyse von RNA-Proteininteraktionen dar und wurde in dieser Arbeit genutzt, um die Affinität von CPSF-Präparationen für verschiedene RNA-Substrate zu bestimmen. Komplexe aus Proteinen und radioaktiv markierten RNAs werden bei diesem Assay über Nitrozellulosefilter gegeben und die von den Proteinen auf den Filtern zurückgehaltene RNA anschließend quantifiziert. Alle Bindungsreaktionen wurden in FBK50-Puffer durchgeführt. Für einen Assay wurde eine feste Menge radioaktiv markierter RNA mit verschiedenen Mengen der zu testenden Proteinpräparation versetzt. Nach einer Inkubationszeit von etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Reaktionen über Nitrozellulosefilter gesaugt, die Filter mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gespült und schließlich die auf dem Filter verbliebene Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

FBK50-Puffer:

50 mM Kaliumchlorid
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10% (v/v) Glycerin
0,01% (v/v) NP-40
0,2 mg/ml methyliertes BSA
1 mM DTT
1 mM EDTA

Filterbindungs-Waschpuffer:

100 mM Natriumchlorid
50 mM Tris-HCl, pH 8,0
10% (v/v) Glycerin
1 mM EDTA

Neben den beschriebenen Reaktionen wurde eine Eingangskontrolle mitgeführt, zu welcher kein Protein gegeben wurde. Diese Kontrolle wird nicht über einen Nitrozellulosefilter abgesaugt, sondern direkt im Szintillationszähler gemessen und dient zur Berechnung der spezifischen Radioaktivität der eingesetzten Substrat-RNA:

$$A_{\text{spez.}} = \frac{A_{\text{Eingangskontrolle}}}{n_{\text{eingesetzte RNA}}}$$

Über diese spezifische Radioaktivität wurde dann die Menge proteingebundener RNA für die anderen Reaktionen berechnet:

$$n_{\text{gebundene RNA}} = \frac{A_{\text{gebundene RNA}}}{A_{\text{spez.}}}$$

Die Menge gebundener RNA entspricht der Menge an gebildeten RNA-Proteinkomplexen. Damit ließ sich die Menge an freiem Protein berechnen, welche nach der Bindungsreaktion übrig blieb:

$$n_{\text{freies Protein}} = n_{\text{eingesetztes Protein}} - n_{\text{gebundene RNA}}$$

Es folgte die graphische Auftragung des freien Proteins (X-Achse) gegen die Menge an gebundener RNA (Y-Achse). Es wurde eine hyperbole Anpassung durch die Datenpunkte gelegt. Die Konzentration an freiem Protein bei halbmaximaler Bindung entspricht dem K_{50} des jeweils getesteten Proteins zum gewählten RNA-Substrat.

5.15.2 *In-Vitro*-Polyadenylierung

Eine Aktivität des CPSF-Komplexes besteht in der Stimulation der Poly(A)-Polymerase. Die Poly(A)-Polymerase an sich ist wenig prozessiv und besitzt nur eine sehr geringe Affinität zu RNA. Durch den Kontakt zu CPSF wird die Poly(A)-Polymerase an RNA-Substrate assoziiert und zu einem prozessiv-agierenden Enzym; eine effiziente Polyadenylierung wird ermöglicht. Daher wird die *In-Vitro*-Polyadenylierung genutzt, um die Aktivität von CPSF-Präparationen in der Polyadenylierung zu bestimmen. Gemessen wird der Einfluss von zugegebenen CPSF-Präparationen auf die Polyadenylierung geeigneter Substrat-RNAs (L3prä oder L3prä-A₁₅, Abbildung 9.9 im Anhang) durch die Poly(A)-Polymerase. Die Substrate für *In-Vitro*-Polyadenylierungen sind radioaktiv markiert und enthalten entweder ein intaktes (AAUAAA) oder ein mutiertes (AAGAAA) Polyadenylierungssignal. Standardkontrollen bei allen Polyadenylierungen waren Reaktionen ohne Poly(A)-Polymerase, Reaktionen mit der einfachen Menge (0,8 bis 1 nM) Poly(A)-Polymerase sowie mit der zehnfachen Menge (8 bis 10 nM) Poly(A)-Polymerase und Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus (CPSF IV). Polyadenylierungsreaktionen wurden jeweils in einem Volumen von 20 bis 25 µl durchgeführt und besaßen die folgende Zusammensetzung:

1x Polyadenylierungspuffer	Polyadenylierungspuffer [2x]:
1 mM DTT	50 mM HEPES, pH 8,0
4 U rRNi	100 mM Kaliumchlorid
50 ng/µl tRNA	4% (w/v) PEG-6000
2 mM Magnesiumchlorid	0,1 mM EDTA
0,5 mM rATP	0,02% (v/v) NP-40
4 nM Substrat-RNA	0,8 mg/ml methyliertes BSA
0,8 bis 1 nM Poly(A)-Polymerase	20% (v/v) Glycerin
1 bis 4 µl CPSF-Präparation	
dd. H ₂ O <i>ad.</i> 20 oder 25 µl	

Alle Reaktionen wurden für etwa fünf Minuten bei 37°C vorinkubiert und durch Zugabe des rATPs gestartet. Die Standard-Reaktionszeit betrug 30 Minuten, nach Ablauf dieser Zeit wurden die Reaktionen durch Zugabe von jeweils 75 oder 80 µl Stop-Mix beendet und für weitere 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

Stop-Mix [1x]:	Proteinase K-Puffer [2x]:
1x Proteinase K-Puffer	200 mM Tris-HCl, pH 8,0
0,1 mg/ml Glycogen	25 mM EDTA
0,2 mg/ml Proteinase K	300 mM Natriumchlorid
	2% (w/v) SDS

Die RNAs wurden mittels Ethanolfällung aus den beendeten Reaktionen isoliert, in kleinen Mengen HEPES-Lösung [10 mM, pH 7,0] und Formamid-Ladepuffer aufgenommen und mittels Harnstoff-PAGE und Autoradiographie analysiert. Gegebenenfalls wurden die Signale des Autoradiograms densitometrisch quantifiziert, um konkrete Aussagen über den Anteil polyadenylierter RNAs treffen zu können.

5.15.3 *Electrophoretic mobility shift assay* (EMSA)

Im *electrophoretic mobility shift assay* kann die Bindung von Proteinen an RNA durch die Retention proteingebundener RNAs im nativen Gel untersucht werden. Auf diese Weise wurde auch die Bindung von CPSF-Präparationen an RNA-Substrate in Abhängigkeit von einem intakten Polyadenylierungssignal analysiert. Nach Inkubation der zu untersuchenden Proteine mit radioaktiv markierter Substrat-RNA

wurde das Reaktionsgemisch auf ein natives *Composite*-Gel geladen und elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach abgeschlossener Elektrophorese im Vakuum bei 60°C getrocknet und gegenüber einem *storage phosphor* Autoradiographiefilm gelagert. Nach ausreichender Exposition (meistens über Nacht) wurde der Autoradiographiefilm auf dem Fluoreszenzscanner gescannt. In entsprechenden Autoradiogrammen sind freie (nicht-gebundene) RNA-Substrate, sowie langsamer migrierende RNA-Proteinkomplexe sichtbar. Die Reaktionsbedingungen entsprachen denen der *In-Vitro*-Polyadenylierung (Abschnitt 5.15.2), mit der Ausnahme, dass bei diesem Assay keine Poly(A)-Polymerase zugesetzt wurde. Die Bindungsreaktionen wurden für 30 Minuten bei Raumtemperatur oder 37°C inkubiert, bevor Aliquots der Reaktionen auf das native Gel aufgetragen wurden. Die Elektrophorese erfolgte bei konstanten 360 V und 6 bis 8°C. Das Gel wurde einem mindestens 30 minütigen Vorlauf unterzogen und unter angelegter, aber reduzierter Spannung (180V) beladen.

Natives *Composite*-Gel:

6% Acrylamid:Bisacrylamid (80:1)
0,5% (w/v) Agarose
0,5x TBE

Für zwei Gele mit den Maßen 20x20x0,1 cm werden etwa 100 ml Gellösung benötigt. Diese wurde durch Mischen zweier Lösungen (50 ml Acrylamidlösung in 1x TBE und 50 ml Agaroselösung in Wasser bei 55°C) hergestellt. Unverzüglich nach dem Mischen wurde die Polymerisation des Acrylamids durch Zugabe von 170 µl APS [10% (w/v)] und 170 µl TEMED gestartet und die Gellösung zwischen vorbereitete Glasplatten gegossen.

5.15.4 Spaltungsassay

Zur Analyse von Proteinpräparationen auf Spaltungsaktivität wurden diese mit spaltbaren, radioaktiv markierten RNA-Substraten inkubiert. Die Spezifität der Spaltung für das Polyadenylierungssignal wurde adressiert, indem auch RNA-Substrate mit mutiertem Polyadenylierungssignal angeboten wurden (Abbildung 9.9 im Anhang). Die durchgeführten Spaltungsreaktionen hatten ein Volumen von 20 oder 25 µl und besaßen die folgende Zusammensetzung:

1x Spaltungspuffer
2,5 nM RNA-Substrat
1 bis 8 µl Proteinpräparation(en)
FBK50 *ad.* 20 oder 25 µl

Spaltungspuffer [2x]:
150 mM Kaliumchlorid
40 mM HEPES, pH 8,0
4 mM DTT
2 mM Magnesiumchlorid
40 mM Kreatinphosphat
7% (w/v) PEG-6000
1 mM Cordycepintriphosphat

Spaltungsreaktionen wurden für zwei Stunden bei 30°C inkubiert und analog zu *In-Vitro*-Polyadenylierungen gestoppt. Für den vollständigen Verdau der in den Reaktionen enthaltenen Proteine wurde die Inkubation mit Proteinase K auf eine Stunde ausgedehnt. Anschließend wurden die RNAs mittels Ethanol-fällung isoliert, in einer kleinen Menge HEPES-Lösung [10 mM, pH 7,0] und Formamid-Ladepuffer aufgenommen und einer Harnstoff-PAGE unterzogen. Das entsprechende Gel wurde via Autoradiographie ausgewertet. Gegebenenfalls wurden die Signale des Autoradiograms densitometrisch quantifiziert, um konkrete Aussagen über den Anteil gespaltener RNA-Substrate und somit die Spaltungsaktivität der eingesetzten Proteinpräparation(en) treffen zu können. Bei der Berechnung von Spaltungsaktivitäten wurde der Signalverlust durch das 3'-Spaltprodukt berücksichtigt.

6 Literaturverzeichnis

6.1 Publikationen

Die nachfolgend aufgeführten Publikationen wurden alphabetisch nach Nachnamen der Erstautoren gelistet. Publikationen mit identischen Erstautorschaften wurden jeweils chronologisch geordnet.

Andrade, M. A.; Petose, C.; O'Donoghue, S. I.; Müller, C. W.; Bork, P. (2001): Comparison of ARM and HEAT Protein Repeats. *Journal of Molecular Biology* 309(1):1-18

Bai, Y.; Auperin, T. C.; Chou, C.-Y.; Chang, G.-G.; Manley, J. L.; Tong, L. (2007): Crystal Structure of Murine CstF-77: Dimeric Association and Implications for Polyadenylation of mRNA Precursors. *Molecular Cell* 25(6):863-75

Baillat, D.; Hakimi, M.-A.; Näär, A. M.; Shilatifard, A.; Cooch, N.; Shiekhatar, R. (2005): Integrator, a Multiprotein Mediator of Small Nuclear RNA Processing, Associates with the C-Terminal Repeat of RNA Polymerase II. *Cell* 123(2):265-76

Balbo, P. B.; Boum, A. (2007): Mechanism of Poly(A) Polymerase: Structure of the enzyme-MgATP-RNA ternary complex and kinetic analysis. *Structure* 15(9):1117-31

Barabino, S. M. L.; Hübner, W.; Jenny, A.; Minvielle-Sebastia, L.; Keller, W. (1997): The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins. *Genes & Development* 11(13):1703-16

Barabino, S. M. L.; Ohnacker, M.; Keller, W. (2000): Distinct roles of two Yth1p domains in 3'-end cleavage and polyadenylation of yeast pre-mRNAs. *EMBO Journal* 19(14):3778-87

Beelman, C. A.; Parker, R. (1995): Degradation of mRNA in Eukaryotes. *Cell* 81(2):179-83

Bentley, D. L. (2014): Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nature Reviews Genetics* 15(3):163-75

Berg, M. H.; Singh, L. N.; Younis, I.; Liu, Q.; Pinto, A. M.; Kaida, D.; Zhang, Z.; Cho, S.; Sherrill-Mix, S.; Wan, L.; Dreyfuss, G. (2012): U1 snRNP Determines mRNA Length and Regulates Isoform Expression. *Cell* 150(1):53-64

Berger, I.; Fitzgerald, D. J.; Richmond, T. J. (2004): Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature Biotechnology* 22(12):1583-7

Bertani, G. (2004): Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems. *Journal of Bacteriology* 186(3):595-600

Bhatt, D. M.; Pandya-Jones, A.; Tong, A.-J.; Barozzi, I.; Lissner, M.; Natoli, G.; Black, D. L.; Smale, S. T. (2012): Transcript Dynamics of Pro-Inflammatory Genes Uncovered by RNA-Seq Analysis of Subcellular RNA fractions. *Cell* 150(2):279-90

Bieniossek, C.; Richmond, T. J.; Berger, I. (2008): MultiBac: Multigene Baculovirus-Based Eukaryotic Protein Complex Production. *Current Protocols in Protein Science* Chapter 5: Unit 5.20

Bienroth, S.; Wahle, E.; Suter-Crazzolara, C.; Keller, W. (1991): Purification of the Cleavage and Polyadenylation Factor Involved in the 3'-Processing of Messenger RNA Precursors. *Journal of Biological Chemistry* 266(29):19768-76

Bienroth, S.; Keller, W.; Wahle, E. (1993): Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO Journal* 12(2):585-94

- Bradford, M. M. (1976):** A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-54
- Brown, K. M.; Gilmartin, G. M. (2003):** A Mechanism for the Regulation of Pre-mRNA 3' Processing by Human Cleavage Factor I_m. *Molecular Cell* 12(6):1467-76
- Callebaut, I.; Moshous, D.; Mornon, J.-P.; de Villartay, J.-P. (2002):** Metallo-β-lactamase fold within nucleic acids processing enzymes: the β-CASP family. *Nucleic Acids Research* 30(16):3592-601
- Chan, S.; Choi, E.-A.; Shi, Y. (2011):** Pre-mRNA 3'-end processing complex assembly and function. *WIREs RNA* 2(3):321-35
- Chan, S.; Huppertz, I.; Yao, C.; Weng, L.; Moresco, J. J.; Yates III, J. R.; Ule, J.; Manley, J. L.; Shi, Y. (2011):** CPSF30 and Wdr33 directly bind to AAUAAA in mammalian mRNA 3' processing. *Genes & Development* 28(21):2370-80
- Chen, H.-C.; Cheng, S.-C. (2012):** Functional roles of protein splicing factors. *Bioscience Reports* 32(4):245-59
- Cheng, H.; He, X.; Moore, C. (2004):** The Essential WD Repeat Protein Swd2 Has Dual Functions in RNA Polymerase II Transcription Termination and Lysine 4 Methylation of Histone H3. *Molecular and Cellular Biology* 24(7):2932-43
- Christofori, G.; Keller, W. (1988):** 3' Cleavage and Polyadenylation of mRNA Precursors In Vitro Requires a Poly(A) Polymerase, a Cleavage Factor, and a snRNP. *Cell* 54(6):875-89
- Christofori, G.; Keller, W. (1989):** Poly(A) Polymerase Purified from HeLa Cell Nuclear Extract Is Required for Both Cleavage and Polyadenylation of Pre-mRNA In Vitro. *Molecular and Cellular Biology* 9(1):193-203
- Colgan, D. F.; Murthy, K. G. K.; Prives, C.; Manley, J. L. (1996):** Cell-cycle related regulation of poly(A) polymerase by phosphorylation. *Nature* 384(6606):282-5
- Conelly, S.; Manley, J. L. (1988):** A functional mRNA polyadenylation signal is required for transcription termination by RNA polymerase II. *Genes & Development* 2(4):440-52
- Coseno, M.; Martin, G.; Berger, C.; Gilmartin, G.; Keller, W.; Doublé, S. (2008):** Crystal structure of the 25 kDa subunit of human cleavage factor I_m. *Nucleic Acids Research* 36(10):3474-83
- Dantonel, J.-C.; Murthy, K. G. K.; Manley, J. L.; Tora, L. (1997):** Transcription factor TTFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature* 389(6649):399-402
- de Vries, H.; Rügsegger, U.; Hübner, W.; Friedlein, A.; Langen, H.; Keller, W. (2000):** Human pre-mRNA cleavage factor II_m contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors. *EMBO Journal* 19(21):5895-904
- Denis, M. M.; Tolley, N. D.; Bunting, M.; Schwertz, H.; Jiang, H.; Lindemann, S.; Yost, C. C.; Rubner, F. J.; Albertine, K. H.; Swoboda, K. J.; Fratto, C. M.; Tolley, E.; Kraiss, L. W.; McIntyre, T. M.; Zimmerman, G. A.; Weyrich, A. S. (2005):** Escaping the Nuclear Confines: Signal-Dependent Pre-mRNA Splicing in Anucleate Platelets. *Cell* 122(3):179-91
- Dettwiler, S.; Aringhieri, C.; Cardinale, S.; Keller, W.; Barabino, S. M. L. (2004):** Distinct Sequence Motifs within the 68-kDa Subunit of Cleavage Factor I_m Mediate RNA Binding, Protein-Protein Interactions, and Subcellular Localization. *Journal of Biological Chemistry* 279(34):35788-97
- Di Giammartino, D. C.; Shi, Y.; Manley, J. L. (2013):** PARP1 Represses PAP and Inhibits Polyadenylation during Heat Shock. *Molecular Cell* 49(1):7-17

- Di Giammartino, D. C.; Li, W.; Ogami, K.; Yashinski, J. J.; Hoque, M.; Tian, B.; Manley, J. L. (2014):** RBBP6 isoforms regulate the human polyadenylation machinery and modulate expression of mRNAs with AU-rich 3'-UTRs. *Genes & Development* 28(20):2248-60
- Dichtl, B.; Blank, D.; Sadowski, M.; Hübner, W.; Weiser, S.; Keller, W. (2002a):** Yhh1p/Cft1p directly links poly(A) site recognition and RNA polymerase II transcription termination. *EMBO Journal* 21(15):4125-35
- Dichtl, B.; Blank, D.; Ohnacker, M.; Friedlein, A.; Roeder, D.; Langen, H.; Keller, W. (2002b):** A Role for SSU72 in Balancing RNA Polymerase II Transcription Elongation and Termination. *Molecular Cell* 10(5):1139-50
- Dichtl, B.; Aasland, R.; Keller, W. (2004):** Functions for *S. cerevisiae* Swd2p in 3' end formation of specific mRNAs and snoRNAs and global histone 3 lysine 4 methylation. *RNA* 10(6):965-77
- Dominski, Z.; Yang, X.; Purdy, M.; Wagner, E. J.; Marzluff, W. F. (2005a):** A CPSF-73 Homologue Is Required for Cell Cycle Progression but Not Cell Growth and Interacts with a Protein Having Features of CPSF-100. *Molecular and Cellular Biology* 25(4):1489-500
- Dominski, Z.; Yang, X.; Marzluff, W. F. (2005b):** The Polyadenylation Factor CPSF-73 Is Involved in Histone-Pre-mRNA Processing. *Cell* 123(1):37-48
- Dominski, Z. (2007):** Nucleases of the Metallo- β -lactamase Family and Their Role in DNA and RNA Metabolism. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 42(2):67-93
- Dominski, Z. (2010):** The hunt for the 3' endonuclease. *WIREs RNA* 1(2):325-40
- Egloff, S.; Dienstbier, M.; Murphy, S. (2012):** Updating the RNA polymerase CTD code: adding gene-specific layers. *Trends in Genetics* 28(7):333-41
- Enriquez-Harris, P.; Levitt, N.; Briggs, D.; Proudfoot, N. J. (1991):** A pause site for RNA polymerase II is associated with termination of transcription. *EMBO Journal* 10(7):1833-42
- Fernandez-Sanchez, M. E.; Gonatopoulos-Pournatzis, T.; Preston, G.; Lawlor, M. A.; Cowling, V. H. (2009):** S-Adenosyl Homocysteine Hydrolase Is Required for Myc-Induced mRNA Cap Methylation, Protein Synthesis, and Cell Proliferation. *Molecular and Cellular Biology* 29(23):6182-91
- Fitzgerald, D. J.; Berger, P.; Schaffitzel, C.; Yamada, K.; Richmond, T. J.; Berger, I. (2006):** Protein complex expression by using multigene baculoviral vectors. *Nature Methods* 3(12):1021-32
- Ford, L. P.; Bagga, P. S.; Wilusz, J. (1997):** The Poly(A) Tail Inhibits the Assembly of a 3'-to-5' Exonuclease in an In Vitro RNA Stability System. *Molecular and Cellular Biology* 17(1):398-406
- Fronz, K.; Otto, S.; Kölbl, K.; Kühn, U.; Friedrich, H.; Schierhorn, A.; Beck-Sickinger, A. G.; Ostareck-Lederer, A.; Wahle, E. (2008):** Promiscuous Modification of the Nuclear Poly(A)-binding Protein by Multiple Protein-arginine Methyltransferases Does Not Affect the Aggregation Behavior. *Journal of Biological Chemistry* 283(29):20408-20
- Ghazy, M. A.; He, X.; Singh, B. N.; Hampsey, M.; Moore, C. (2009):** The Essential N Terminus of the Pta1 Scaffold Protein Is Required for snoRNA Transcription Termination and Ssu72 Function but Is Dispensable for Pre-mRNA 3'-End Processing. *Molecular and Cellular Biology* 29(8):2296-307
- Ghazy, M. A.; Gordon, J. M. B.; Lee, S. D.; Singh, B. N.; Boum, A.; Hampsey, M.; Moore, C. (2012):** The interaction of Pcf11 and Clp1 is needed for RNA 3'-end formation and is modulated by aminoacids in the ATP-binding site. *Nucleic Acids Research* 40(3):1214-25

- Gilmartin, G. M.; Nevins, J. R. (1989):** An ordered pathway of assembly of components required for polyadenylation site recognition and processing. *Genes & Development* 3(12B):2180-90
- Gilmartin, G. M.; Nevins, J. R. (1991):** Molecular Analyses of Two Poly(A) Site-Processing Factors That Determine the Recognition and Efficiency of Cleavage of the Pre-mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 11(5):2432-8
- Gruber, A. R.; Martin, G.; Keller, W.; Zavolan, M. (2014):** Means to an end: mechanisms of alternative polyadenylation of messenger RNA precursors. *WIREs RNA* 5(2):183-96
- He, X.; Moore, C. (2005):** Regulation of Yeast mRNA 3' End Processing by Phosphorylation. *Molecular Cell* 19(5):619-29
- Helmling, S.; Zhelkovsky, A.; Moore, C. L. (2001):** Fip1 Regulates the Activity of Poly(A) Polymerase through Multiple Interactions. *Molecular and Cellular Biology* 21(6):2026-37
- Hirose, Y.; Manley, J. L. (1998):** RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395(6697):93-6
- Ho, C. K.; Shuman, S. (1999):** Distinct Roles for CTD Ser-2 and Ser-5 Phosphorylation in the Recruitment and Allosteric Activation of Mammalian mRNA Capping Enzyme. *Molecular Cell* 3(3):405-11
- Hofmann, I.; Schnölzer, M.; Kaufmann, I.; Franke, W. W. (2002):** Symplekin, a Constitutive Protein of Karyo- and Cytoplasmic Particles Involved in mRNA Biogenesis in *Xenopus laevis* Oocytes. *Molecular Biology of the Cell* 13(5):1665-76
- Hollingworth, D.; Noble, C. G.; Taylor, I. A.; Ramos, A. (2006):** RNA polymerase II CTD phosphopeptides compete with RNA for the interaction with Pcf11. *RNA* 12(4):555-60
- Hsin, J.-P.; Manley, J. L. (2012):** The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes & Development* 26(19):2119-37
- Huang, Y.; Carmichael, G. G. (1996):** Role of Polyadenylation in Nucleocytoplasmic Transport of mRNA. *Molecular and Cellular Biology* 16(4):1534-42
- Hunt, A. G.; Xu, R.; Addepalli, B.; Rao, S.; Forbes, K. P.; Meeks, L. R.; Xing, D.; Mo, M.; Zhao, H.; Bandyopadhyay, A.; Dampanaboina, L.; Marion, A.; Von Lanken, C.; Quinn Li, Q. (2008):** Arabidopsis mRNA polyadenylation machinery: comprehensive analysis of protein-protein interactions and gene expression profiling. *BMC Genomics* 9:220
- Ito, S.; Sakai, A.; Nomura, T.; Miki, Y.; Ouchida, M.; Sasaki, J.; Shimizu, K. (2001):** A Novel WD40 Repeat Protein, WDC146, Highly Expressed during Spermatogenesis in a Stage-Specific Manner. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 280(3):656-63
- Izaurralde, E.; Stepinski, J.; Darzynkiewicz, E.; Mattaj, I. W. (1992):** A Cap Binding Protein That May Mediate Nuclear Export of RNA Polymerase II-transcribed RNAs. *Journal of Cell Biology* 118(6):1287-95
- Jenal, M.; Elkon, R.; Loayza-Puch, F.; van Haften, G.; Kühn, U.; Menzies, F. M.; Oude Vrielink, J. A. F.; Bos, A. J.; Drost, J.; Rooijers, K.; Rubinsztein, D. C.; Agami, R. (2012):** The Poly(A)-Binding Protein Nuclear 1 Suppresses Alternative Cleavage and Polyadenylation Sites. *Cell* 149(3):538-53
- Jenny, A.; Minvielle-Sebastia, L.; Preker, P. J.; Keller, W. (1996):** Sequence Similarity Between the 73-Kilodalton Protein of Mammalian CPSF and a Subunit of Yeast Polyadenylation Factor I. *Science* 274(5292):1514-7

- Jiao, X.; Chang, J. H.; Kilic, T.; Tong, L.; Kiledjian, M. (2013):** A mammalian pre-mRNA 5'-end capping quality control mechanism and an unexpected link of capping to the pre-mRNA processing. *Molecular Cell* 50(1):104-15
- Kaufmann, I.; Martin, G.; Friedlein, A.; Langen, H.; Keller, W. (2004):** Human Fip1 is a subunit of CPSF that binds to U-rich RNA elements and stimulates poly(A) polymerase. *EMBO Journal* 23(3):616-26
- Keller, W.; Bienroth, S.; Lang, K. M.; Christofori, G. (1991):** Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA. *EMBO Journal* 10(13):4241-9
- Kennedy, S. A.; Frazier, M. L.; Steiniger, M.; Mast, A. M.; Marzluff, W. F.; Redinbo, M. R. (2009):** Crystal Structure of the HEAT Domain from the Pre-mRNA Processing Factor Symplekin. *Journal of Molecular Biology* 392(1):115-28
- Keon, B. H.; Schäfer, S.; Kuhn, C.; Grund, C.; Franke, W. W. (1996):** Symplekin, a Novel Type of Tight Junction Plaque Protein. *Journal of Cell Biology* 134(4):1003-18
- Kerwitz, I.; Kühn, U.; Lilie, H.; Knoth, A.; Scheuermann, T.; Friedrich, H.; Schwarz, E.; Wahle, E. (2003):** Stimulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO Journal* 22(14):3705-14
- Kolev, N. G.; Steitz, J. A. (2005):** Symplekin and multiple other polyadenylation factors participate in 3'-end maturation of histone mRNAs. *Genes & Development* 19(21):2583-92
- Kolev, N. G.; Yario, T. A.; Benson, E.; Steitz, J. A. (2008):** Conserved motifs in both CPSF73 and CPSF100 are required to assemble the active endonuclease for histone mRNA 3'-end maturation. *EMBO Reports* 9(10):1013-8
- Komarnitsky, P.; Cho, E.-J.; Buratowski, S. (2000):** Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes & Development* 14(19):2452-60
- Krishnamurthy, S.; He, X.; Reyes-Reyes, M.; Moore, C.; Hampsey, M. (2004):** Ssu72 Is an RNA Polymerase II CTD Phosphatase. *Molecular Cell* 14(3):387-94
- Kubo, T.; Wada, T.; Yamaguchi, Y.; Shimizu, A.; Handa, H. (2006):** Knock-down of 25 kDa subunit of cleavage factor I_m in HeLa cells alters alternative polyadenylation within 3'-UTRs. *Nucleic Acids Research* 34(21):6264-71
- Kühn, U.; Nemeth, A.; Meyer, S.; Wahle, E. (2003):** The RNA Binding Domains of the Nuclear poly(A)-binding Protein. *Journal of Biological Chemistry* 278(19):16916-25
- Kühn, U.; Wahle, E. (2004):** Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 1678(2-3):67-84
- Kühn, U.; Gündel, M.; Knoth, A.; Kerwitz, Y.; Rüdell, S.; 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. *Journal of Biological Chemistry* 284(34):22803-14
- Kühn, U.; Buschmann, J.; Wahle, E. (2017):** The nuclear poly(A) binding protein of mammals, but not of fission yeast, participates in mRNA polyadenylation. *RNA* 23(4):473-82
- Laemmli, U. K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680-685
- Lee, J.-H.; Tate, C. M.; You, J.-S.; Skalnik, D. G. (2007):** Identification and Characterization of the Human Set1B Histone H3-Lys⁴ Methyltransferase Complex. *Journal of Biological Chemistry* 282(18):13419-28

- Lee, J.-H.; You, J.-S.; Dobrota, E.; Skalnik, D. G. (2010):** Identification and Characterization of a Novel Human PP1 Phosphatase Complex. *Journal of Biological Chemistry* 285(32):24466-76
- Lee, S. D.; Moore, C. L. (2014):** Efficient mRNA Polyadenylation Requires a Ubiquitin-Like Domain, a Zinc Knuckle, and a RING Finger Domain, All Contained in the Mpe1 Protein. *Molecular and Cellular Biology* 34(21):3955-67
- Licalatosi, D. D.; Geiger, G.; Minet, M.; Schroeder, S.; Cilli, K.; McNeil, J. B.; Bentley, D. L. (2002):** Functional Interaction of Yeast Pre-mRNA 3' End Processing Factors with RNA Polymerase II. *Molecular Cell* 9(5):1011-11
- Louis, K. S.; Siegel, A. C. (2011):** Cell Viability Analysis Using Trypan Blue: Manual and Automated Methods. *Methods in Molecular Biology* 740:7-12
- Lunde, B. M.; Reichow, S. L.; Kim, M.; Suh, H.; Leeper, T. C.; Yang, F.; Mutschler, H.; Buratowski, S.; Meinhart, A.; Varani, G. (2010):** Cooperative interaction of transcription termination factors with the RNA polymerase II C-terminal domain. *Nature Structural and Molecular Biology* 17(10):1195-201
- Luo, Y.; Yogesha, S. D.; Cannon, J. R.; Yan, W.; Ellington, A. D.; Brodbelt, J. S.; Zhang, Y. (2013):** Novel Modifications on C-terminal Domain of RNA Polymerase II Can Fine-tune the Phosphatase Activity of Ssu72. *ACS Chemical Biology* 8(9):2042-52
- MacDonald, C. C.; Wilusz, J.; Shenk, T. (1994):** The 64-Kilodalton Subunit of the CstF Polyadenylation Factor Binds to Pre-mRNAs Downstream of the Cleavage Site and Influences Cleavage Site Location. *Molecular and Cellular Biology* 14(10):6647-54
- Mandel, C. R.; Kaneko, S.; Zhang, H.; Gebauer, D.; Vethantham, V.; Manley, J. L.; Tong, L. (2006):** Polyadenylation factor CPSF-73 is the pre-mRNA 3'-end processing endonuclease. *Nature* 444(7121):953-6
- Mandel, C. R.; Bai, Y.; Tong, L. (2008):** Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cellular and Molecular Life Sciences* 65(7-8):1099-122
- Martin, G.; Keller, W.; Doublé, S. (2002):** Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *EMBO Journal* 19(16):4193-203
- Martin, G.; Möglich, A.; Keller, W.; Doublé, S. (2004):** Biochemical and Structural Insights into Substrate Binding and Catalytic Mechanism of Mammalian Poly(A) Polymerase. *Journal of Biological Chemistry* 341(4):911-25
- Martin, G.; Ostareck-Lederer, A.; Chari, A.; Neuenkirchen, N.; Dettwiler, S.; Blank, D.; Rügsegger, U.; Fischer, U.; Keller, W. (2010):** Arginine methylation in subunits of mammalian pre-mRNA cleavage factor I. *RNA* 16(8):1646-59
- Martin, G.; Gruber, A. R.; Keller, W.; Zavolan, M. (2012):** Genome-wide Analysis of Pre-mRNA 3' End Processing Reveals a Decisive Role of Human Cleavage Factor I in the Regulation of 3' UTR Length. *Cell Reports* 1(6):753-63
- McCracken, S.; Fong, N.; Yankulov, K.; Ballantyne, S.; Pan, G.; Greenblatt, J.; Patterson, S. D.; Wickens, M.; Bentley, D. L. (1997a):** The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* 385(6614):357-61

- McCracken, S.; Fong, N.; Rosonina, E.; Yankulov, K.; Brothers, G.; Siderovski, D.; Hessel, A.; Foster, S.; Amgen EST Program; Shuman, S.; Bentley, D. L. (1997b):** 5'-Capping enzymes are targeted to pre-mRNA by binding to the phosphorylated carboxy-terminal domain of RNA polymerase II. *Genes & Development* 11(24):3306-18
- McLennan, A. G. (2006):** The Nudix hydrolase superfamily. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63(2):123-43
- Meinhart, A.; Cramer, P. (2004):** Recognition of RNA polymerase II carboxy-terminal domain by 3'-RNA-processing factors. *Nature* 430(6996):223-6
- Moore, C. L.; Sharp, P. A. (1985):** Accurate Cleavage and Polyadenylation of Exogenous RNA Substrate. *Cell* 41(3):845-55
- Murthy, K. G. K.; Manley, J. L. (1995):** The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes & Development* 9(21):2672-83
- Nag, A.; Narsinh, K.; Martinson, H. G. (2007):** The poly(A)-dependent transcriptional pause is mediated by CPSF acting on the body of the polymerase. *Nature Structural and Molecular Biology* 14(7):662-9
- Neuwald, A. F.; Poleksic, A. (2000):** PSI-BLAST searches using hidden Markov models of structural repeats: prediction of an unusual sliding DNA clamp and of b-propellers in UV-damaged DNA-binding protein. *Nucleic Acids Research* 28(18):3570-80
- Niwa, M.; Berget, S. M. (1991):** Mutation of the AAUAAA polyadenylation signal depresses in vitro splicing of proximal but not distal introns. *Genes & Development* 5(11):2086-95
- Noble, C. G.; Beuth, B.; Taylor, I. A. (2007):** Structure of a nucleotide-bound Clp1-Pcf11 polyadenylation factor. *Nucleic Acids Research* 35(1):87-99
- Ogorodnikov, A.; Kargapolova, Y.; Danckwardt, S. (2016):** Processing and transcriptome expansion at the mRNA 3' end in health and disease: finding the right end. *Pflügers Archiv – European Journal of Physiology* 468(6):993-1012
- Ohnacker, M.; Barabino, S. M. L.; Preker, P. J.; Keller, W. (2000):** The WD-repeat protein Pfs2p bridges two essential factors within the yeast pre-mRNA 3'-end-processing complex. *EMBO Journal* 19(1): 37-47
- Otsuka, Y.; Kedersha, N. L.; Schoenberg, D. R. (2009):** Identification of a Cytoplasmic Complex That Adds a Cap onto 5'-Monophosphate RNA. *Molecular and Cellular Biology* 29(8):2155-67
- Peterson, M. L.; Bertolino, S.; Davis, F. (2002):** An RNA Polymerase Pause Site Is Associated with the Immunoglobulin μ Poly(A) Site. *Molecular and Cellular Biology* 22(15):5606-15
- Pingoud, A.; Urbanke, C. (1997):** Arbeitsmethoden der Biochemie, Kapitel 3.3.1.2 (Ammoniumsulfat-fällung). *Walter de Gruyter*
- Preker, P. J.; Lingner, J.; Minvielle-Sebastia, L.; Keller, W. (1995):** The *FIP1* Gene Encodes a Component of a Yeast Pre-mRNA Polyadenylation Factor That Directly Interacts with Poly(A)-Polymerase. *Cell* 81(3):379-89
- Preker, P. J.; Ohnacker, M.; Minvielle-Sebastia, L.; Keller, W. (1997):** A multisubunit 3' end processing factor from yeast containing poly(A) polymerase and homologues of the subunits of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor. *EMBO Journal* 16(15):4727-37
- Pugh, D. J. R.; Ab, E.; Faro, A.; Lutya, P. T.; Hoffmann, E.; Rees, D. J. G. (2006):** DWNN, a novel ubiquitin-like domain, implicates RBBP6 in mRNA processing and ubiquitin-like pathways. *BMC Structural Biology* 6:1

- Rasmussen, E. B.; Lis, J. T. (1993):** *In vivo* transcriptional pausing and cap formation on three *Drosophila* heat shock genes. *Proceedings in the National Academy of Sciences* 90(17):7923-7
- Ramirez, A.; Shuman, S.; Schwer, B. (2008):** Human RNA 5'-kinase (hClp1) can function as a tRNA splicing enzyme in vivo. *RNA* 14(9): 1737-45
- Ranuncolo, S. M.; Ghosh, S.; Hanover, J. A.; Hart, G. W.; Lewis, B. A. (2012):** Evidence of the Involvement of O-GlcNAc-modified Human RNA Polymerase II CTD in Transcription *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of Biological Chemistry* 287(28):23549-61
- Rolland, T.; Tasan, M.; Charlotheaux, B.; Pevzner, S. J.; Zhong, Q.; Sahni, N.; Yi, S.; Lemmens, I.; Fontanillo, C.; Mosca, R.; Kamburov, A.; Ghiassian, S. D.; Yang, X.; Ghamsari, L.; Balcha, D.; Begg, B. E.; Braun, P.; Brehme, M.; Broly, M. P.; Carvunis, A.-R.; Convery-Zupan, D.; Corominas, R.; Coulombe-Huntington, J.; Dann, E.; Dreze, M.; Dricot, A.; Fan, C.; Franzosa, E.; Gebreab, F.; Gutierrez, B. J.; Hardy, M. F.; Jin, M.; Kang, S.; Kiros, R.; Ning Lin, G.; Luck, K.; MacWilliams, A.; Menche, J.; Murray, R. R.; Palagi, A.; Poulin, M. M.; Rambout, X.; Rasla, J.; Reichert, P.; Romero, V.; Ruysinck, E.; Sahalie, J. M.; Scholz, A.; Shah, A. A.; Sharma, A.; Shen, Y.; Spirohn, K.; Tam, S.; Tejada, A. O.; Trigg, S. A.; Twizere, J.-C.; Vega, K.; Walsh, J.; Cusick, M. E.; Xia, Y.; Barabasi, A.-L.; Iakucheva, L. M.; Aloy, P.; De Las Rivas, J.; Tavernier, J.; Calderwood, M. A.; Hill, D. E.; Hao, T.; Roth, F. P.; Vidal, M. (2014):** A Proteome-Scale Map of the Human Interactome Network. *Cell* 159(5):1212-26
- Rüegsegger, U.; Beyer, K.; Keller, W. (1996):** Purification and Characterization of Human Cleavage Factor I_m Involved in the 3' End Processing of Messenger RNA Precursors. *Journal of Biological Chemistry* 271(11):6107-13
- Rüegsegger, U.; Blank, D.; Keller, W. (1998):** Human Pre-mRNA Cleavage Factor I_m Is Related to Spliceosomal SR Proteins and Can Be Reconstituted In Vitro from Recombinant Subunits. *Molecular Cell* 1(2):243-53
- Ruepp, M. D.; Schweingruber, C.; Kleinschmidt, N.; Schümperli, D. (2011):** Interactions of CstF-64, CstF-77, and symplekin: Implications on localization and function. *Molecular Biology of the Cell* 22(1):91-104
- Ryan, K.; Calvo, O.; Manley, J. L. (2004):** Evidence that polyadenylation factor CPSF-73 is the mRNA 3' processing endonuclease. *RNA* 10(4):565-73
- Ryan, K. (2007):** Pre-mRNA 3' Cleavage is Reversibly Inhibited In Vitro by Cleavage Factor Dephosphorylation. *RNA Biology* 4(1):26-33
- Sachs, A. B.; Sarnow, P.; Hentze, M. W. (1997):** Starting at the Beginning, Middle, and End: Translation Initiation in Eukaryotes. *Cell* 89(6):831-8
- Sadowski, M.; Dichtl, B.; Hübner, W.; Keller, W. (2003):** Independent functions of yeast Pcf11p in the pre-mRNA 3' end processing and in transcription termination. *EMBO Journal* 22(9):2167-77
- Sakai, Y.; Saijo, M.; Coelho, K.; Kishino, T.; Niikawa, N.; Taya, Y. (1995):** cDNA Sequence and Chromosomal Localization of a Novel Human Protein, RBQ-1 (RBBP6), That Binds to the Retinoblastoma Gene Product. *Genomics* 30(1):98-101
- Sambrook, J.; Russel, D. W. (2001):** Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbour Laboratory Press*, 3. Edition.
- Schönemann, L.; Kühn, U.; Martin, G.; Schäfer, P.; Gruber, A. R.; Keller, W.; Zavolan, M.; Wahle, E. (2014):** Reconstitution of CPSF active in polyadenylation: recognition of the polyadenylation signal by WDR33. *Genes & Development* 28(21):2381-93

- Schrieck, A.; Easter, A. D.; Etzold, S.; Wiederhold, K.; Lidschreiber, M.; Cramer, P.; Passmore, L. A. (2014):** RNA polymerase II termination involves CTD tyrosine dephosphorylation by CPF subunit Glc7. *Nature Structural and Molecular Biology* 21(2):175-9
- Schüller, R.; Forné, I.; Straub, T.; Schrieck, A.; Texier, Y.; Shah, N.; Decker, T.-M.; Cramer, P.; Imhof, A.; Eick, D. (2016):** Heptad-Specific Phosphorylation of RNA Polymerase II CTD. *Molecular Cell* 61(2):305-14
- Scrima, A.; Konícková, R.; Czyzewski, B. K.; Kawasaki, Y.; Jeffrey, P. D.; Groisman, R.; Nakatani, Y.; Iwai, S.; Pavletich, N. P.; Thomä, N. H. (2008):** Structural Basis of UV DNA-Damage Recognition by the DDB1-DDB2 Complex. *Cell* 135(7):1213-23
- Shi, Y.; Di Giammartino, D. C.; Taylor, D.; Sarkeshik, A.; Rice, W. J.; Yates III, J. R.; Frank, J.; Manley J. L. (2009):** Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. *Molecular Cell* 33(3):365-76
- Shi, Y.; Manley J. L. (2015):** The end of the message: multiple protein-RNA interactions define the mRNA polyadenylation site. *Genes & Development* 29(9):889-97
- Shimazu, T.; Horinouchi, S.; Yoshida, M. (2007):** Multiple Histone Deacetylases and the CREB-binding Protein Regulate Pre-mRNA 3'-End Processing. *Journal of Biological Chemistry* 282(7):4470-8
- Simons, A.; Melamed-Bessudo, C.; Wolkowicz, R.; Sperling, J.; Sperling, R.; Eisenbach, L.; Rotter, V. (1997):** PACT: cloning and characterization of a cellular p53 binding protein that interacts with Rb. *Oncogene* 14(2):145-55
- St-Pierre, B.; Liu, X.; Kha, L.-C. T.; Zhu, X.; Ryan, O.; Jiang, Z.; Zacksenhaus, E. (2005):** Conserved and specific functions of mammalian *ssu72*. *Nucleic Acids Research* 33(2):464-77
- Stirnimann, C. U.; Petsalaki, E.; Russel, R. B.; Müller, C. W. (2010):** WD40 proteins propel cellular networks. *Trends in Biochemical Sciences* 35(10):565-74
- Suh, H.; Ficarro, S. B.; Kang, U.-B.; Chun, Y.; Marto, J. A.; Buratowski, S. (2016):** Direct Analysis of Phosphorylation Sites on the Rpb1 C-Terminal Domain of RNA Polymerase II. *Molecular Cell* 61(2):297-304
- Sullivan, K. D.; Steiniger, M.; Marzluff, W. F. (2009):** A core complex of CPSF73, CPSF100 and Symplekin may form two different cleavage factors for processing of poly(A) and histone mRNAs. *Molecular Cell* 34(4):322-32
- Takagaki, Y.; Ryner, L. C.; Manley, J. L. (1988):** Separation and Characterization of a Poly(A) Polymerase and a Cleavage/Specificity Factor Required for Pre-mRNA Polyadenylation. *Cell* 52(5):731-42
- Takagaki, Y.; Ryner, L. C.; Manley, J. L. (1989):** Four factors are required for 3'-end cleavage of pre-mRNAs. *Genes & Development* 3(11):1711-24
- Takagaki, Y.; Manley, J. L.; MacDonald, C. C.; Wilusz, J.; Shenk, T. (1990):** A multisubunit factor, CstF is required for polyadenylation of mammalian pre-mRNAs. *Genes & Development* 4(12A):2112-20
- Takagaki, Y.; MacDonald, C. C.; Shenk, T.; Manley, J. L. (1992):** The human 64-kDa polyadenylation factor contains a ribonucleoprotein-type RNA binding domain and unusual auxiliary motifs. *Proceedings in the National Academy of Sciences* 89(4):1403-7
- Takagaki, Y.; Manley, J. L. (2000):** Complex Protein Interactions within the Human Polyadenylation Machinery Identify a Novel Component. *Molecular and Cellular Biology* 20(5):1515-25

- Vaughn, J. L.; Goodwin, R. H.; Tompkins, G. J.; McCawley, P. (1977):** The Establishment of Two Cell Lines From the Insect *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera; Noctuidae). *In Vitro* 13(4):213-7
- Vethantham, V.; Rao, N.; Manley, J. L. (2007):** Sumoylation Modulates the Assembly and Activity of the Pre-mRNA 3' Processing Complex. *Molecular and Cellular Biology* 27(24):8848-58
- Vethantham, V.; Rao, N.; Manley, J. L. (2008):** Sumoylation regulates multiple aspects of mammalian poly(A) polymerase function. *Genes & Development* 22(4):499-511
- Venkataraman, K.; Brown, K. M.; Gilmartin, G. M. (2005):** Analysis of a noncanonical poly(A) site reveals a tripartite mechanism for vertebrate poly(A) site recognition. *Genes & Development* 19(11):1315-27
- Wahle, E. (1991a):** Purification and Characterization of a Mammalian Polyadenylate Polymerase Involved in the 3' End Processing of Messenger RNA Precursors. *Journal of Biological Chemistry* 266(5):3131-9
- Wahle, E. (1991b):** A Novel Poly(A)-Binding Protein Acts As a Specificity Factor in the Second Phase of Messenger RNA Polyadenylation. *Cell* 66(4):759-68
- Wahle, E. (1995):** Poly(A) Tail Length Control Is Caused by Termination of Processive Synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 270(6):2800-8
- Wahle, E.; Kühn, U. (1997):** The Mechanism of 3' Cleavage and Polyadenylation of Eukaryotic Pre-mRNA. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 57:41-71
- Wani, S.; Yuda, M.; Fujiwara, Y.; Yamamoto, M.; Harada, F.; Ohkuma, Y.; Hirose, Y. (2014):** Vertebrate Ssu72 Regulates and Coordinates 3'-End Formation of RNAs Transcribed by RNA Polymerase II. *PLoS One* 9(8):e106040
- Wanner, B.; Haldimann, A. (2004):** Plasmids, strains, and methods of use. Patentschrift US 20040033608 A1. *Perdue Research Foundation* (West Lafayette, IN, USA)
- Weitzer, S.; Martinez, J. (2007):** The human RNA kinase hCtp1 is active on 3' transfer RNA exons and short interfering RNAs. *Nature* 447(7141):222-6
- Wickham, T. J.; Davis, T.; Granados, R. R.; Shuler, M. L.; Wood, H. A. (1992):** Screening of Insect Cell Lines for the Production of Recombinant Proteins and Infectious Virus in the Baculovirus Expression System. *Biotechnology Progress* 8(5):391-6
- Wilusz, J.; Shenk, T.; Takagaki, Y.; Manley, J. L. (1990):** A Multicomponent Complex Is Required for the AAUAAA Dependent Cross-Linking of a 64-Kilodalton Protein to Polyadenylation Substrates. *Molecular and Cellular Biology* 10(3):1244-8
- Winstall, E.; Sadowski, M.; Kühn, U.; Wahle, E.; Sachs, A. B. (2000):** The *Saccharomyces cerevisiae* RNA-binding Protein Rbp29 Functions in Cytoplasmic mRNA Metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 275(29):21817-26
- Xiang, K.; Nagaike, T.; Xiang, S.; Kilic, T.; Beh, M. M.; Manley, J. L.; Tong, L. (2010):** Crystal structure of the human symplekin-Ssu72-CTD phosphopeptide complex. *Nature* 467(7316):729-33
- Xiang, K.; Tong, L.; Manley, J. L. (2014):** Delineating the Structural Blueprint of the Pre-mRNA 3'-End Processing Machinery. *Molecular and Cellular Biology* 34(11):1894-910
- Yang, Q.; Gilmartin, G. M.; Doublé, S. (2010):** Structural basis of UGUA recognition by the Nudix protein CFI_m25 and implications for a regulatory role in mRNA 3' processing. *Proceedings in the National Academy of Sciences* 107(22):10062-7

Yao, C.; Choi, E.-A.; Weng, L.; Xie, X.; Wan, J.; Xing, Y.; Moresco, J. J.; Tu, P. G.; Yates III, J. R.; Shi, Y. (2013): Overlapping and distinct functions of CstF64 and CstF64 τ in mammalian mRNA 3' processing. *RNA* 19(12):1781-90

Zarkower, D.; Wickens, M. (1987): Formation of mRNA 3' termini: stability and dissociation of a complex involving the AAUAAA sequence. *EMBO Journal* 6(1):177-86

Zhang, M.; Wang, X. J.; Chen, X.; Bowman, M. E.; Luo, Y.; Noel, J. P.; Ellington, A. D.; Etkorn, F. A.; Zhang, Y. (2012): Structural and kinetic analysis of prolyl-isomerization/phosphorylation cross-talk in the CTD code. *ACS Chemical Biology* 7(8):1462-70

Zhang, Z.; Fu, J.; Gilmour, D. S. (2005): CTD-dependent dismantling of the RNA polymerase II elongation complex by the pre-mRNA 3'-end processing factor, Pcf11. *Genes & Development* 19(13):1572-80

Zhao, J.; Hyman, L.; Moore, C. (1999a): Formation of mRNA 3' Ends in Eukaryotes: Mechanism, Regulation, and Interrelationships with Other Steps in mRNA Synthesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63(2):405-445

Zhao, J.; Kessler, M.; Helmling, S.; O'Connor, J. P.; Moore, C. (1999b): Pta1, a Component of Yeast CF II, Is Required for Both Cleavage and Poly(A) Addition of mRNA Precursor. *Molecular and Cellular Biology* 19(11):7733-40

Zhao, W.; Manley, J. L. (1996): Complex Alternative RNA Processing Generates an Unexpected Diversity of Poly(A) Polymerase Isoforms. *Molecular and Cellular Biology* 16(5):2378-86

Zhelkovsky, A.; Tacahashi, Y.; Nasser, T.; He, Y.; Sterzer, U.; Jensen, T. H.; Domdey, H.; Moore, C. (2006): The role of the Brr5/Ysh1 C-terminal domain and its homolog Syc1 in mRNA 3'-end processing in *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* 12(3):435-45

6.2 Dissertationen und Studienarbeiten

Die nachfolgend aufgeführten Arbeiten sind chronologisch geordnet und wurden alle in der Abteilung für Allgemeine Biochemie (AG Wahle) am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Naturwissenschaftlichen Fakultät I (Biowissenschaften) der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg angefertigt.

Dissertation Knoth (2008): Analysis of the mammalian pre-mRNA 3' end processing cleavage complex and attempts of its reconstitution

Bachelorarbeit Schönemann (2010): Arbeiten zur Rekonstitution des *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF)

Bachelorarbeit Sinn (2011): Arbeiten zur Darstellung von Prä-mRNA 3'-Polyadenylierungsfaktoren

Diplomarbeit Lorbeer (2012): Darstellung und Charakterisierung der 3'-Prozessierungsfaktoren CF I_m und CstF

Masterarbeit Schönemann (2012): Rekombinante Expression des *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF) in Sf21-Insektenzellen

Bachelorarbeit Schmidt (2015): Bakterielle Expression der Carboxy-terminalen Domäne der RNA-Polymerase 2 und ihrer spezifischen Phosphatase Ssu72

6.3 Internetquellen

- [1] **ThermoFischer (2017):** Growth and maintenance of insect cell lines, Catalog numbers B82101, B82501 and B85502, Publication number MAN0000030, Revision B.0,
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/Insect_Cell_Lines_UG.pdf
(Zugriff: 15.04.2017)
- [2] **BioRad (2011):** TC20 Automated Cell Counter, Instruction Manual., Catalog #145-0101,
<http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/10024423.pdf> (Zugriff: 15.04.2017)
- [3] **ThermoFischer (2013):** Cellfectin II Reagent, Cellfectin II Transfection Protocol., Protocol publication number MAN0007821, Revision 1.0,
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/CellfectinIIReagent_protocol.pdf
(Zugriff: 15.04.2017)
- [4] **Sigma-Aldrich (2010):** Product Information, ANTI-FLAG M2 Affinity Gel, Technical Bulletin,
<http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Bulletin/a2220bul.pdf>
(Zugriff: 16.04.2017)
- [5] **IBA (2014):** Expression and purification of proteins using Strep-tag or Twin-Strep-tag, A comprehensive manual, Version PR02-0026,
https://www.iba-lifesciences.com/isotope/2/2-1201-010-Strep-Tactin_Purification_Manual.pdf
(Zugriff: 16.04.2017)
- [6] **GE Healthcare (1998):** Superdex 200 HR 10/30, Instructions, Manual number 71-7059-00 AE,
http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/71705900ae.pdf (Zugriff: 16.04.2017)
- [7] **GE Healthcare (2014):** Instructions 71-5017-95 AI, High Performance Columns, Superose 6 10/300 GL and Superose 12 10/300 GL,
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1314807262343/litdoc71501795_20161014020055.pdf (Zugriff: 16.04.2017)
- [8] **GE Healthcare (2005):** Instructions 52-1782-00 AF, Gel filtration Media, Superose 6 prep grade and Superose 12 prep grade,
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1486980688367/litdoc52178200_20170213111115.pdf (Zugriff: 16.04.2017)
- [9] **GE Healthcare (2011):** Gel Filtration Calibration Kits, Product booklet, 28-4038-41PL, Revision AE
https://www.gelifesciences.com/gehcls_images/GELS/Related%20Content/Files/1326706518989/litdoc28951560_20161014092124.pdf (Zugriff: 16.04.2017)
- [10] **GE Healthcare (2007):** INSTRUCTIONS for Poly(A)-Sepharose 4B, Manual number 17-0860-01 AA,
http://www.gelifesciences.co.jp/tech_support/manual/pdf/17086001.pdf (Zugriff: 16.04.2017)

7 Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

Tab. 1.1: Gegenüberstellung von 3'-Prozessierungsfaktoren aus Säugetieren und Bäckerhefe.	9
Abb. 1.1: Schematische Darstellung der Transkription und Prozessierung von Prä-mRNAs in Eukaryoten.	1
Abb. 1.2: Schematische Darstellung der 3'-Prozessierung eukaryotischer Prä-mRNAs.	4
Abb. 2.1: Reinigung und Charakterisierung des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes.	24
Abb. 2.2: Reinigung und Charakterisierung des gereinigten CPSF73-CPSF100-Subkomplexes.	26
Abb. 2.3: Gelfiltration von gemischten Subkomplexen CPSF30-CPSF160 und CPSF73-CPSF100.	27
Abb. 2.4: Charakterisierung der hFip1-Präparation.	28
Abb. 2.5: Darstellung des WDR33-hFip1-Subkomplexes, Rekonstitution spezifischer Polyadenylierung.	29
Abb. 2.6: Zweite Reinigung des WDR33-hFip1-Subkomplexes und Größenausschlusschromatographie.	31
Abb. 2.7: Charakterisierung der dargestellten 4er-, 5er und 6er-Komplexe.	33
Abb. 2.8: Definition eines minimalen CPSF-Komplexes für die Polyadenylierung.	34
Abb. 2.9: Anionenaustauschchromatographie und IMAC zur Reinigung von mPSF.	36
Abb. 2.10: mPSF nach Flag-Affinitätschromatographie.	37
Abb. 2.11: Graphische Auswertungen zur Quantifizierung von aktivem mPSF-Komplex.	39
Abb. 2.12: Größenausschlusschromatographie von mPSF.	40
Abb. 2.13: Längenkontrolle in der Polyadenylierung mit mPSF.	41
Abb. 2.14: Koexpression von mPSF mit Symplekin, vergleichende <i>In-Vitro</i> -Polyadenylierung.	43
Abb. 2.15: Präparationen von CstF, CF I und CF II für die Rekonstitution der Spaltung.	44
Abb. 2.16: Reinigung eines Komplexes aus CF I und Rbbp6.	45
Abb. 2.17: Präparationen von CTD, Ssu72, PP1 α und WDR82.	46
Abb. 2.18: Analyse der Löslichkeit von Untereinheiten der 6er- und 7er-Komplexe nach Zellaufschluss.	47
Abb. 2.19: Vergleich von mPSF und einem CPSF-Komplex aus sieben Untereinheiten.	48
Abb. 2.20: Wiederholung der Reinigung eines CPSF-Komplexes aus sieben Untereinheiten.	49
Abb. 2.21: Konzentrierung vereinigter Poly(A)-Sephrose-Fractionen und <i>In-Vitro</i> -Polyadenylierung.	51
Abb. 2.22: Vergleich der RNA-Bindung von mPSF und 7er-Komplex mittels Filterbindungsassays.	52
Abb. 2.23: Rekonstitutionsversuche der Spaltung mit rekombinanten 3'-Prozessierungsfaktoren.	54
Abb. 2.24: Präzipitation der Spaltungsaktivität von HeLa-Kernextrakt unter Niedrigsalzbedingungen.	56
Abb. 2.25: Vergleich der Spaltungseffizienz von HeLa-Kernextrakt auf L3 und L3short RNA.	57
Abb. 2.26: Spaltungskinetiken mit verschiedenen Konzentrationen an Substrat-RNA.	58
Abb. 2.27: Spaltungskinetiken nach Vorinkubation und Titration von HeLa-Kernextrakt.	59
Abb. 2.28: Spaltungsaktivität von Fraktionen nach Ammoniumsulfatpräzipitation aus HeLa-Kernextrakt.	61
Abb. 2.29: Spaltungsaktivität nach Fraktionierung mittels Größenausschlusschromatographie.	63
Abb. 2.30: Western-Blot-Analysen von Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie.	64
Abb. 2.31: Spaltungsaktivität nach Fraktionierung mittels Anionenaustauschchromatographie.	65
Abb. 2.32: Komplementation der Eluatfraktion „A10“ nach Anionenaustauschchromatographie.	66
Abb. 5.1: Schema zur Herstellung multigener Transfervektorkonstrukte mittels Multiplikationsmodul.	89
Abb. 5.2: Schema zur Herstellung von Vektorfusionen mittels <i>In-Vitro</i> -Cre-loxP-Rekombination.	89
Abb. 9.1: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von etablierten 3'-Prozessierungsfaktoren.	124
Abb. 9.2: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen der Rbbp6-Isoformen 1 und 3.	125
Abb. 9.3: <i>In-Vitro</i> -Polyadenylierung mit humanem CPSF30 und CPSF160, WDR33 und hFip1.	126
Abb. 9.4: Vergleichende Analyse von Flag-Reinigungen der 4er-, 5er-, und 6er-Komplexe.	127
Abb. 9.5: Polyadenylierungskinetiken und 10-Sekunden Reaktionen zur Quantifizierung von aktivem mPSF.	128
Abb. 9.6: <i>In-Vitro</i> -Polyadenylierung mit Fraktionen der Größenausschlusschromatographie von mPSF.	129
Abb. 9.7: Größenausschlusschromatographie zur Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus Kernextrakt.	130
Abb. 9.8: Anionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus Kernextrakt.	131
Abb. 9.9: RNA-Substrate für RNA-Bindung, <i>In-Vitro</i> -Polyadenylierung und <i>In-Vitro</i> -Spaltung.	132
Abb. 9.10: Schematische Darstellung der Transfervektoren des MultiBac-Systems.	133

8 Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
A ₂₈₀	Absorption bei 280 nm
Abb.	Abbildung
Δ	allgemeine Bezeichnung für (Deletions-) Mutanten
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
kDa	Kilo-Dalton
l	Liter
M	Molar (Mol/l)
MDa	Mega-Dalton
min	Minuten
nt	Nukleotide
<i>p.a.</i>	<i>per analysi</i>
U	<i>units</i> (Allgemeine Einheit für enzymatische Aktivität)
UV-Licht	ultraviolettes Licht
wt	Wildtyp
xg	Einheit für Schwerebeschleunigung
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Masse pro Volumen
A	Adenin
ATP	Adenosintriphosphat
C	Cytosin
CTP	Cytidintriphosphat
G	Guanin
GTP	Guanosintriphosphat
T	Thymin
TTP	Thymidintriphosphat
U	Uracil
UTP	Uridintriphosphat
CF I	<i>cleavage factor I</i>
CF IA	<i>cleavage factor IA (aus Saccharomyces cerevisiae)</i>
CF IB	<i>cleavage factor IB (aus Saccharomyces cerevisiae)</i>
CF II	<i>cleavage factor II (aus Homo sapiens und Saccharomyces cerevisiae)</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CPF	<i>cleavage and polyadenylation factor (aus Saccharomyces cerevisiae)</i>
CPSF	<i>cleavage and polyadenylation specificity factor</i>
CstF	<i>cleavage stimulatory factor</i>
PAP	Poly(A)-Polymerase
PABPN1	Nukleäres Poly(A)-bindendes Protein 1
PP1α	α-Isoform der katalytischen Untereinheit der Proteinphosphatase 1
Rbbp6	<i>Retinoblastoma-binding protein 6</i>
WDR33	<i>WD-repeat protein 33</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

5'-SP	5'-Spaltprodukt
APS	Ammoniumperoxodisulfat
C-Terminus	Carboxy-Terminus (von Proteinen)
CTD	Carboxy-terminale Domäne
dd. H ₂ O	bidestilliertes Wasser
DEAE	Diethylaminoethyl (-Zellulose)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSE	<i>downstream element</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HCl	Salzsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
LB (-Medium)	<i>lysogeny broth</i> (-Medium) [Übersichtsartikel Bertani, 2004]
m ⁷ GpppN	7-Methylguanosin- <i>cap</i>
MβL (-Familie)	Metallo-β-Laktamase (-Familie)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messengerRNA</i>
mRNP	<i>messenger</i> Ribonukleoproteinpartikel
N-Terminus	Amino-Terminus (von Proteinen)
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Prä-mRNA	mRNA-Vorläufer
rATP	riboATP
RNA	Ribonukleinsäure
RRM	<i>RNA recognition motif</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
(SDS-) PA-Gel	(SDS-) Polyacrylamid-Gel
(SDS-) PAGE	(SDS-) Polyacrylamid-Gelelektrophorese
snRNA	<i>small nuclear ribonucleic acid</i>
snRNP	<i>small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
SOC (-Medium)	<i>super optimal broth</i> -Medium mit 20 mM Glukose
Tris (-Base)	Trishydroxymethylaminomethan
Tris-HCl	Tris-Lösung, pH mit HCl eingestellt
TY (-Medium)	<i>tryptone yeast</i> (-Medium)
USE	<i>upstream auxiliary element</i>
UTR	nicht-translatierte Region

9 Anhang

9.1 Zusätzliche Abbildungen

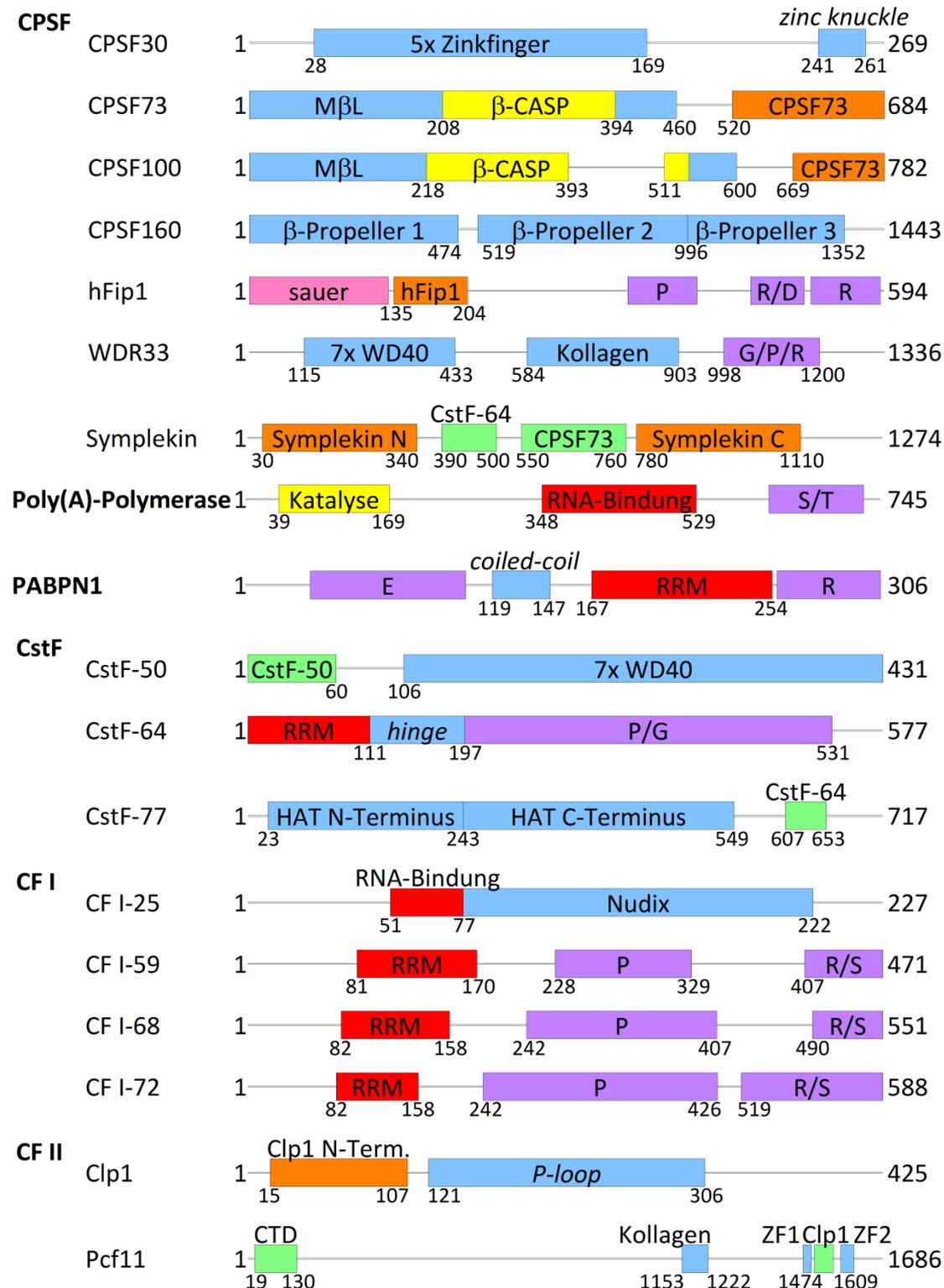


Abbildung 9.1: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen von etablierten 3'-Prozessierungsfaktoren.

Abbildung angelehnt an [Xiang *et al.*, 2014]. RNA-Erkennungsmotive (RRM) oder andere bekannte Bereiche mit RNA-Bindungsaktivität sind in Rot dargestellt. Bekannte Strukturen sind mit entsprechender Benennung in Blau, Bereiche für Interaktionen mit anderen 3'-Prozessierungsfaktoren in Grün und Domänen mit katalytischer Aktivität in Gelb eingefärbt. Konservierte Domänen ohne spezifische Struktur sind in Orange und Bereiche, welche reich an bestimmten Aminosäuren sind, in Lila dargestellt. Auf die dargestellten Proteine, ihre Domänen sowie deren bekannte Funktionen wird in entsprechenden Abschnitten der Einleitung eingegangen.

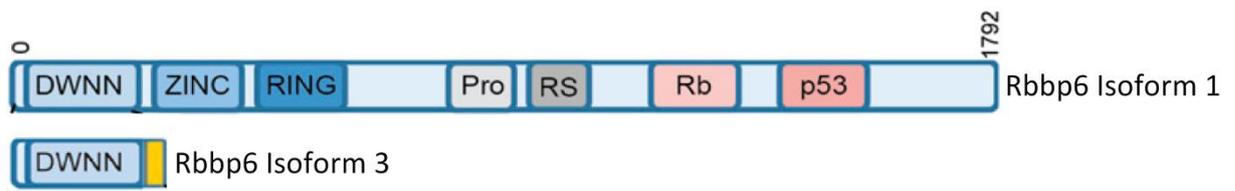


Abbildung 9.2: Schematische Darstellung der Domänenstrukturen der Rbbp6-Isoformen 1 und 3.
Abbildung modifiziert entnommen aus [Di Giammartino *et al.*, 2014].

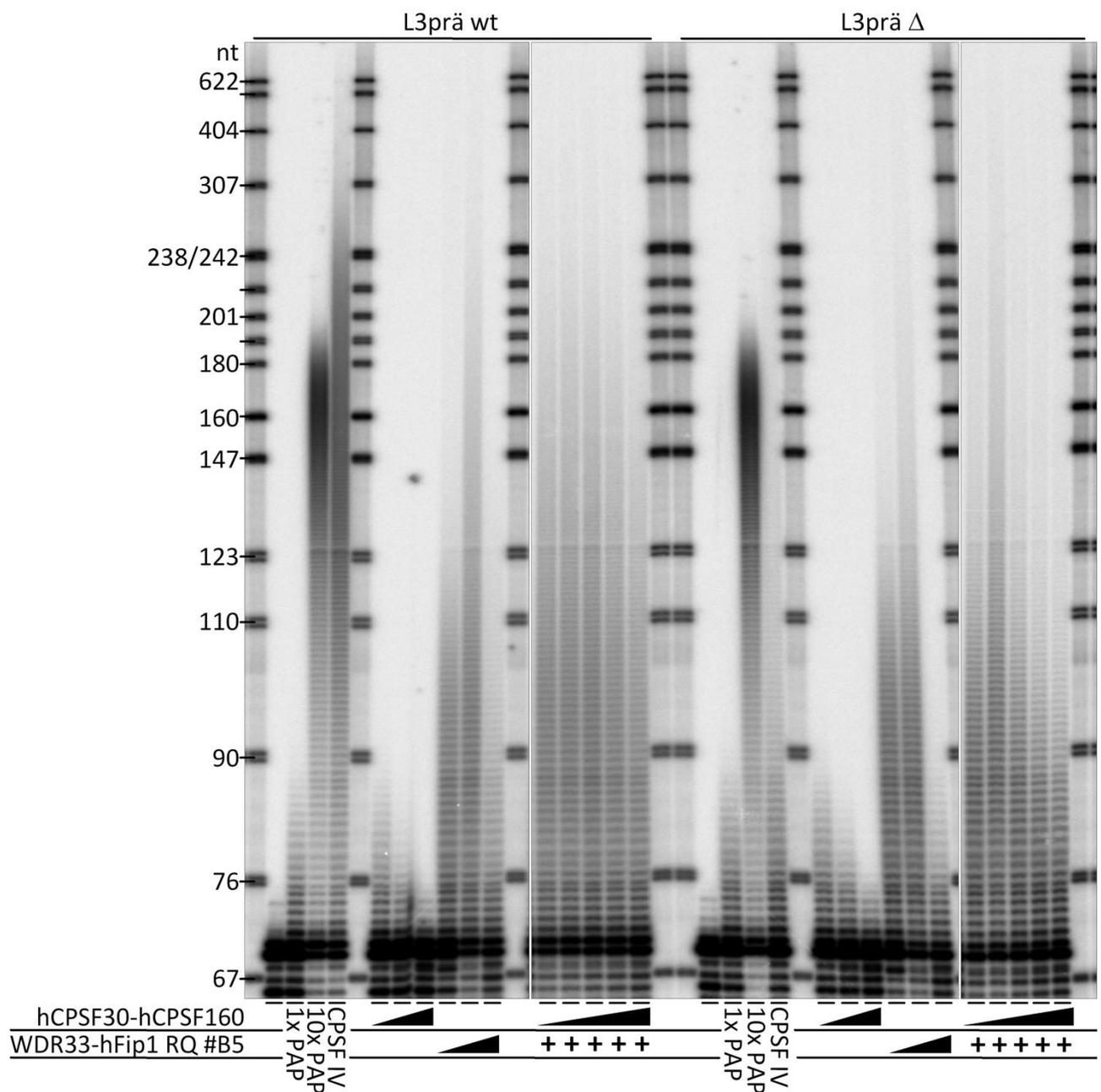


Abbildung 9.3: In-Vitro-Polyadenylierung mit humanem CPSF30 und CPSF160, WDR33 und hFip1.

Autoradiogramm einer *In-Vitro*-Polyadenylierung zur Analyse einer möglichen Stimulation der Poly(A)-Polymerase auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs), zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs), Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind auf der linken Seite angegeben. In den Reaktionen links der Kontrollen wurden die beiden Proteinpräparationen (CPSF30-CPSF160-Subkomplex, humane Proteine, vereinigte Flag-Eluatfraktionen, präpariert von Peter Schäfer; WDR33-hFip1-Subkomplex, zweite Präparation Fraktion „B5“ nach Resource Q-Fraktionierung) einzeln titriert, es wurden je Reaktion 0,1, 1 und 3 μ l eingesetzt. In den nachfolgenden Reaktionen wurde der CPSF30-CPSF160-Subkomplex zu einer gleichbleibenden Menge (1 μ l) der WDR33-hFip1-Präparation titriert (0,1, 0,5, 1, 2 und 3 μ l). Der Assay zeigt, dass der WDR33-hFip1-Subkomplex allein die Poly(A)-Polymerase unspezifisch für das Polyadenylierungssignal stimuliert. Die Zugabe des CPSF30-CPSF160-Subkomplexes zu Reaktionen mit WDR33 und hFip1 führt, ab einer zugegebenen Menge von 1 μ l, zur spezifischen Stimulation der Poly(A)-Polymerase.

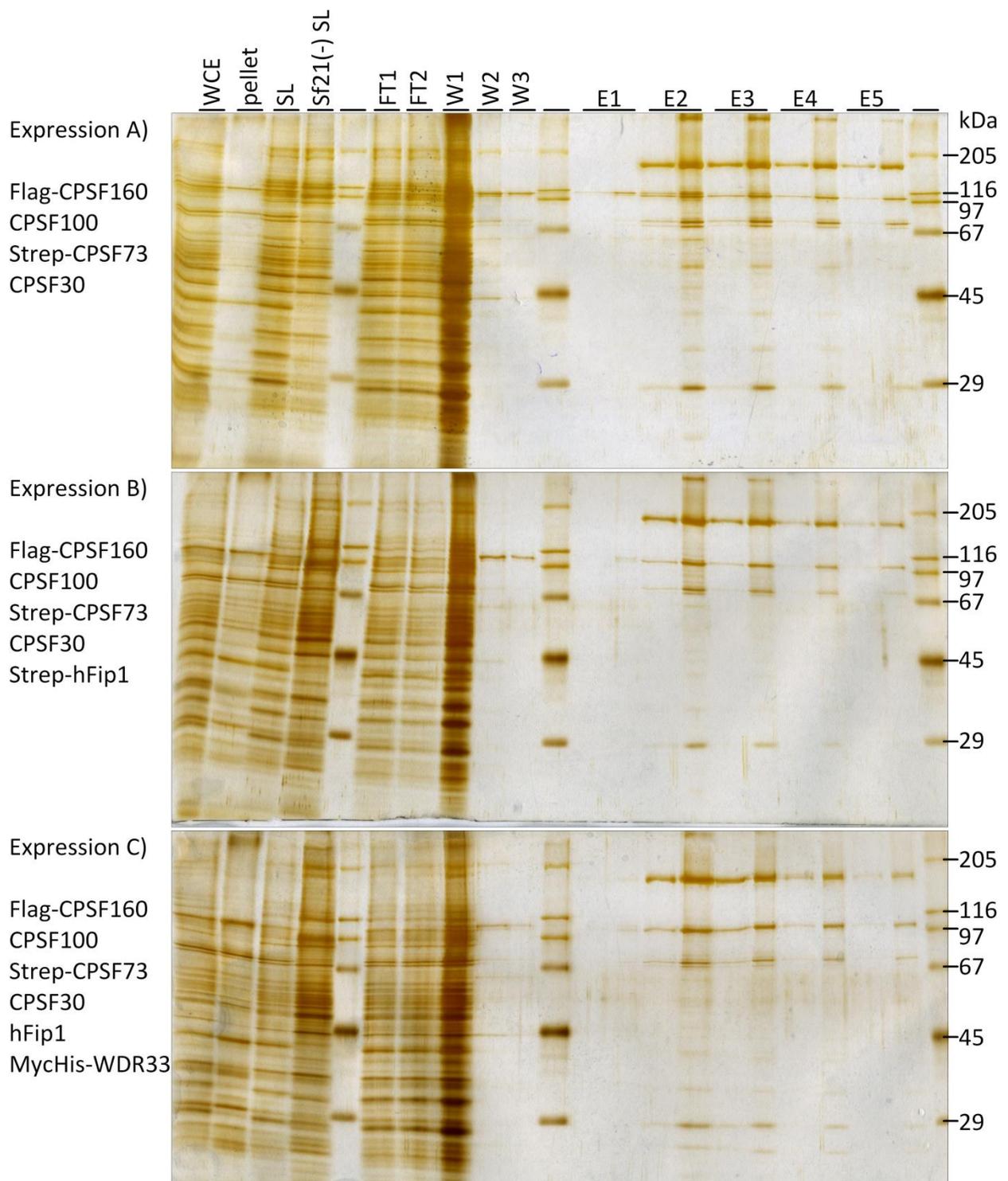


Abbildung 9.4: Vergleichende Analyse von Flag-Reinigungen der 4er-, 5er-, und 6er-Komplexe.

Gezeigt sind drei silbergefärbte 11% SDS-PA-Gele zur Analyse der Fraktionen aus drei verschiedenen Flag-Reinigungen. Die jeweils in den drei Expressionen koexprimierten Proteine sind auf der linken Seite angegeben. Die Fraktionen sind an der oberen Seite des Bildes beschriftet; WCE = *whole cell extract* = Kompletzelleextrakt, pellet = Pellet nach Zellaufschluss und Zentrifugation, SL = *soluble lysate* = löslicher Überstand nach Zentrifugation, Sf21(-) SL = lösliches Zelllysate aus unbehandelten Sf21-Zellen, FT = *flow-through* = Durchfluss (der erste Durchfluss wurde erneut über die Säule gegeben), W = Waschfraktionen, E = Eluate. Von den Eluates wurden jeweils zwei Mengen auf das Gel geladen (2 und 10 µl). Die Molekulargewichte der Markerproteine sind auf der rechten Seite zugeordnet.

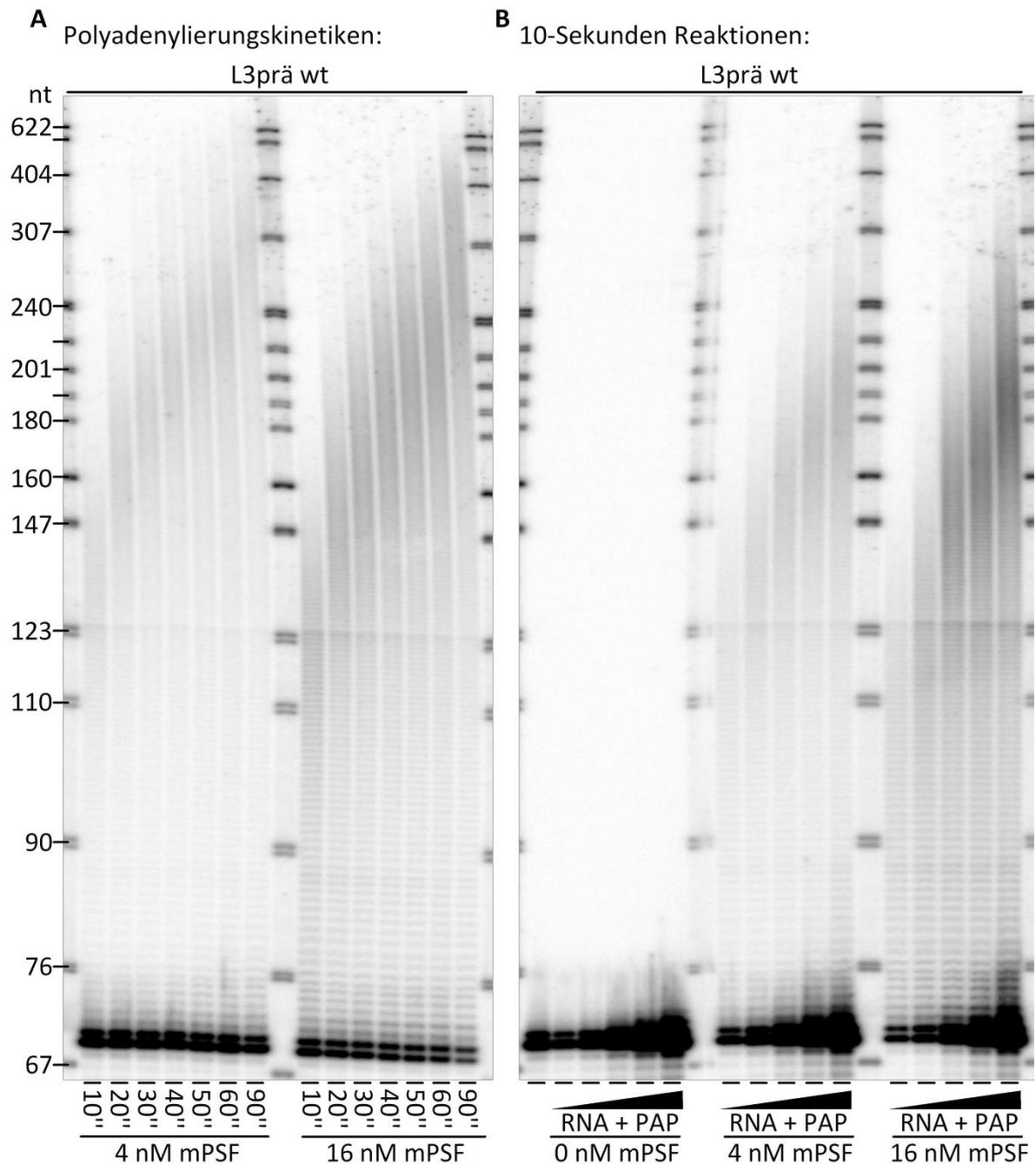


Abbildung 9.5: Polyadenylierungskinetiken und 10-Sekunden Reaktionen zur Quantifizierung von aktivem mPSF.
A: Autoradiogramm von Polyadenylierungskinetiken mit 4 nM L3prä wt RNA, einer äquimolaren Menge an Poly(A)-Polymerase und 4, bzw. 16 nM mPSF. Nach zweiminütiger Vorinkubation von RNA und Proteinen wurden die Reaktionen durch ATP-Zugabe gestartet. Die Inkubationszeiten der einzelnen Reaktionen sind am unteren Bildrand (in Sekunden) angegeben. Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind links zugeordnet. **B:** Autoradiogramm von 10-Sekunden Polyadenylierungsreaktionen auf L3prä wt RNA. Die erste Spur von links enthält nur RNA. Gleichbleibende Mengen an mPSF (0, 4, bzw. 16 nM) wurden mit steigenden Konzentrationen von RNA und Poly(A)-Polymerase versetzt (2, 4, 10, 20 und 40 nM). Nach einminütiger Vorinkubation wurden die Reaktionen durch ATP-Zugabe gestartet und nach einer Inkubationszeit von 10 Sekunden gestoppt. Die Größen der Markerbanden entsprechen den Angaben in Abbildungsteil A.

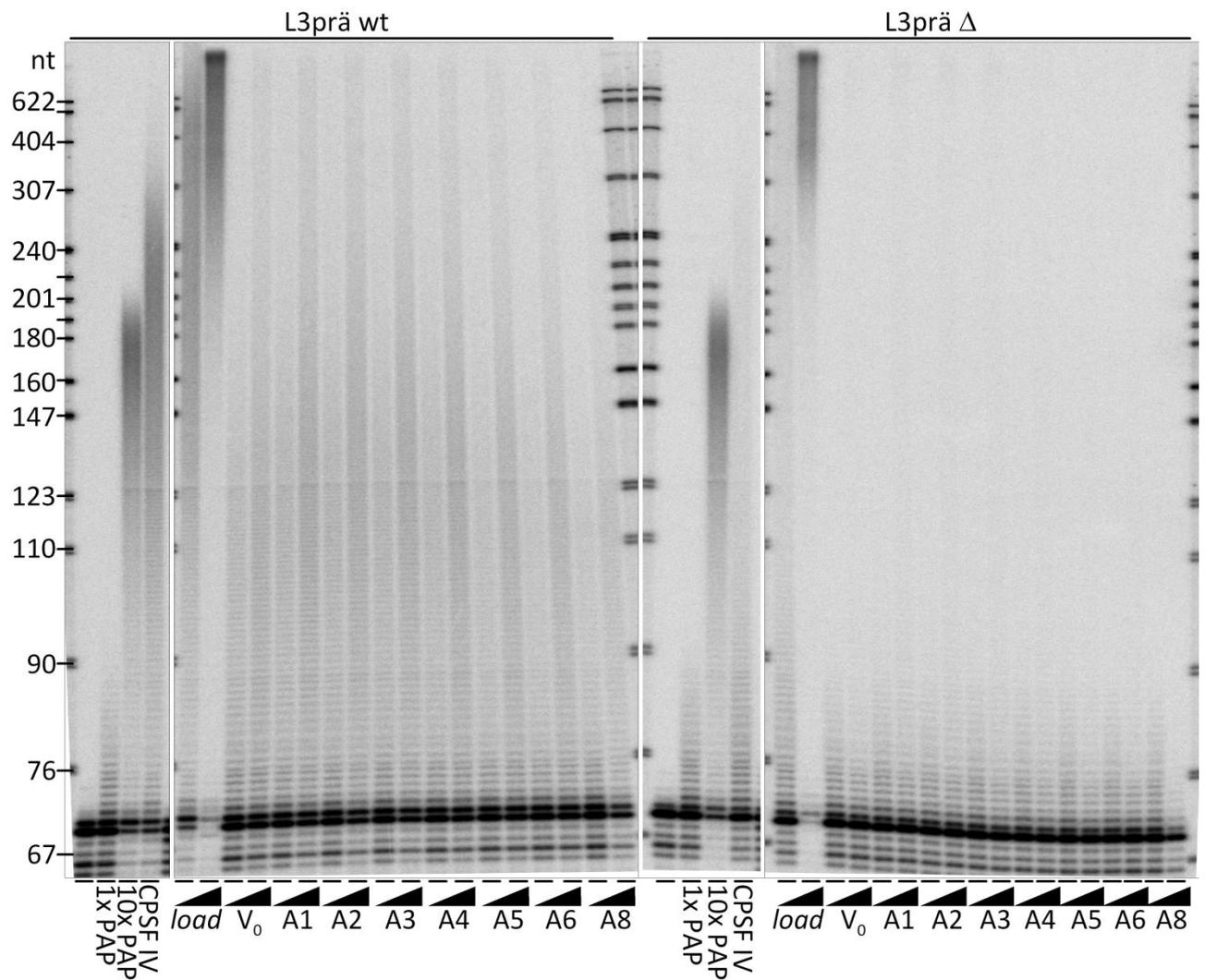


Abbildung 9.6: *In-Vitro*-Polyadenylierung mit Fraktionen der Größenausschlusschromatographie von mPSF.

Autoradiogramm einer *In-Vitro*-Polyadenylierung zur Analyse einer möglichen Stimulation der Poly(A)-Polymerase auf L3prä wt und Δ RNA. Die Reaktionen wurden unter den in Abschnitt 5.15.2 beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Mitgeführte Kontrollen: nur RNA (erste Spur von links für beide RNAs), einfache Menge Poly(A)-Polymerase (1x PAP, zweite Spur von links für beide RNAs), zehnfache Menge Poly(A)-Polymerase (10x PAP, dritte Spur von links für beide RNAs), Reaktionen mit CPSF aus Kalbsthymus dienen als Positivkontrolle (CPSF IV, vierte Spur von links für beide RNAs). Die Größen der Markerbanden (in Nukleotiden) sind auf der linken Seite angegeben. Von Fraktionen der Größenausschlusschromatographie von mPSF (Fraktionen unten benannt) wurden je Reaktion 0,5, bzw. 2 μ l eingesetzt.

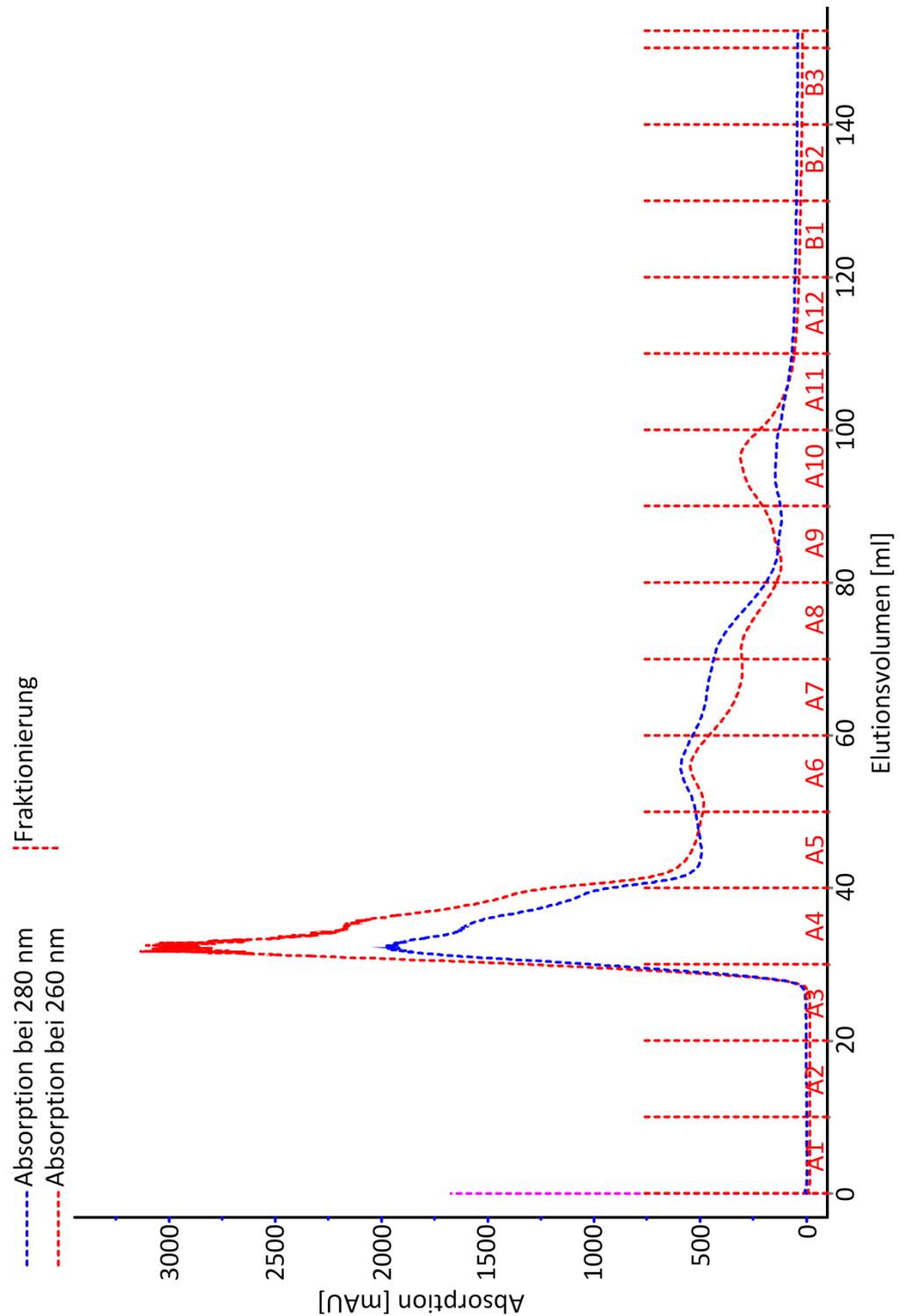


Abbildung 9.7: Größenausschlusschromatographie zur Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus Kernextrakt.

Gezeigt ist das aufgenommene Chromatogramm der Größenausschlusschromatographie (Superose 6), welche als zweiter Reinigungsschritt bei der Fraktionierung von Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt angewendet wurde. Die Unterteilung (rote Striche) an der X-Achse stellt die Fraktionierung dar (Fraktionen á 10 ml). In Blau ist die Absorption bei 280 nm dargestellt, in Rot die Absorption bei 260 nm (jeweils in mAU). Die Fraktion „A4“ entspricht dem Ausschlussvolumen der Gelfiltrationssäule (bei etwa 38,5 ml).

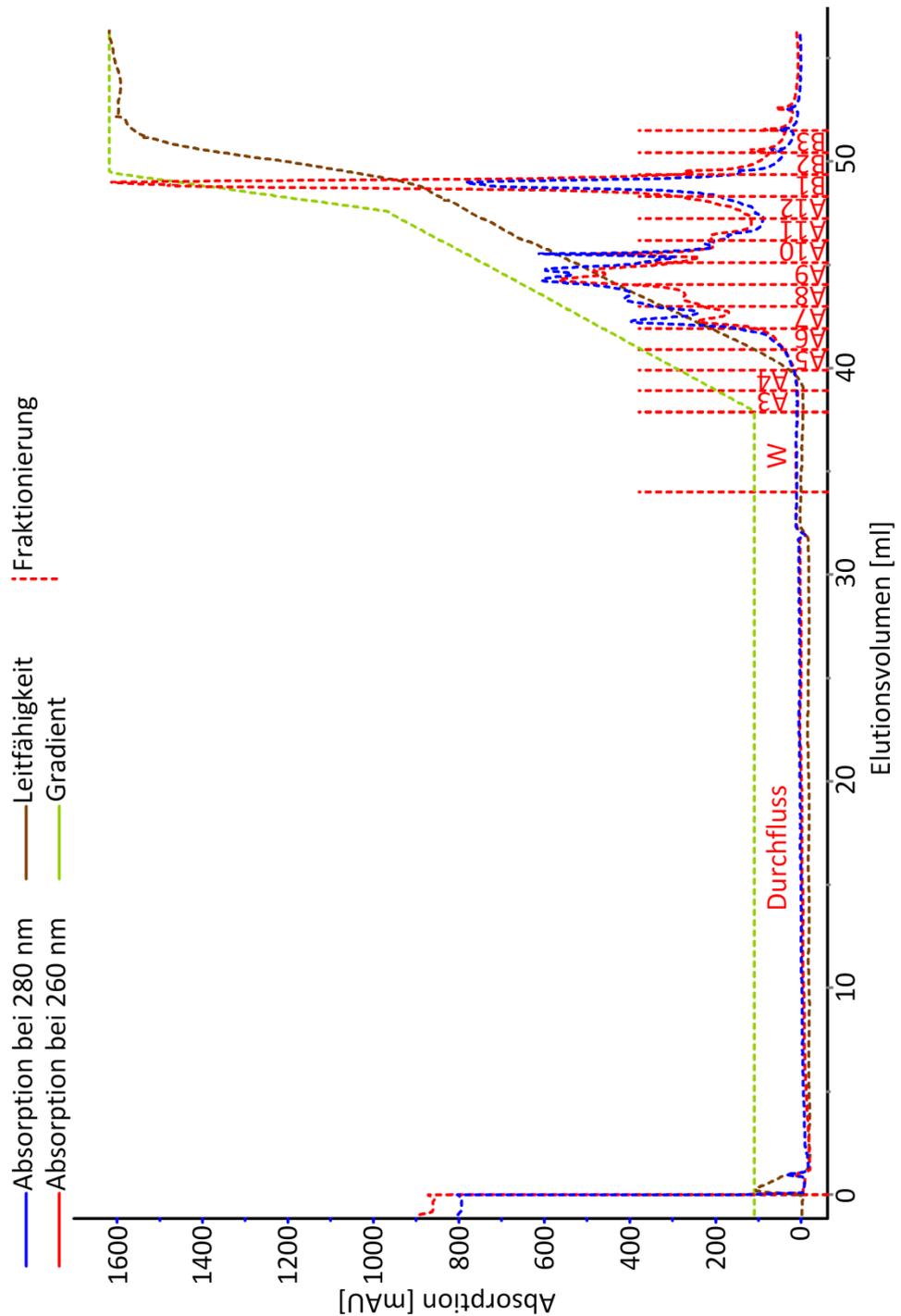


Abbildung 9.8: Anionenaustauschchromatographie zur Fraktionierung der Spaltungsaktivität aus Kernextrakt.

Gezeigt ist das aufgenommene Chromatogramm der Anionenaustauschchromatographie (Resource Q), welche als dritter Reinigungsschritt bei der Fraktionierung von Spaltungsaktivität aus HeLa-Kernextrakt angewendet wurde. Die Unterteilung (rote Striche) an der X-Achse stellt die Fraktionierung dar (Durchfluss mit 34 ml, W = Waschfraktion mit 5 ml, Eluatfraktionen „A3“ bis „B3“ jeweils 1 ml). In Blau ist die Absorption bei 280 nm dargestellt, in Rot die Absorption bei 260 nm (jeweils in mAU). Die grüne Kurve gibt den zur Elution angelegten Kaliumchloridgradienten an, von 80 mM auf 600 mM über 10 ml, dann auf 1 M über 2 ml. Die braune Kurve stellt die während der Elution gemessene Leitfähigkeit dar.

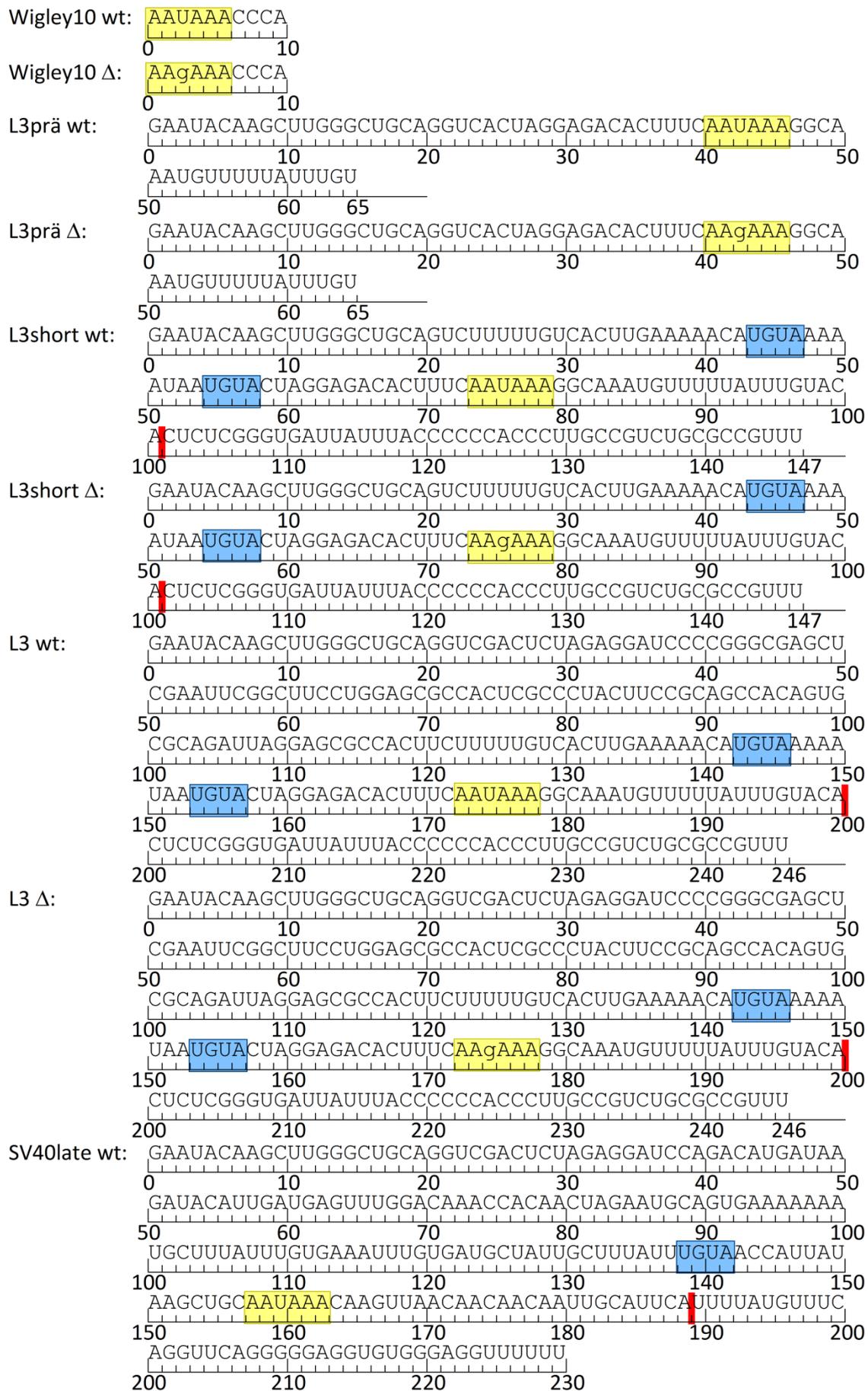
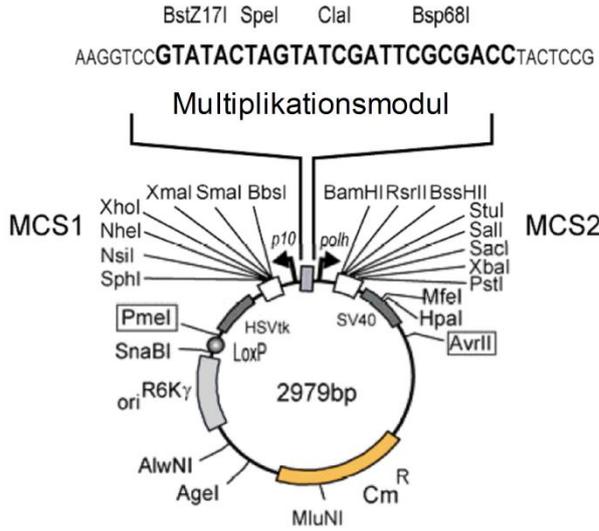
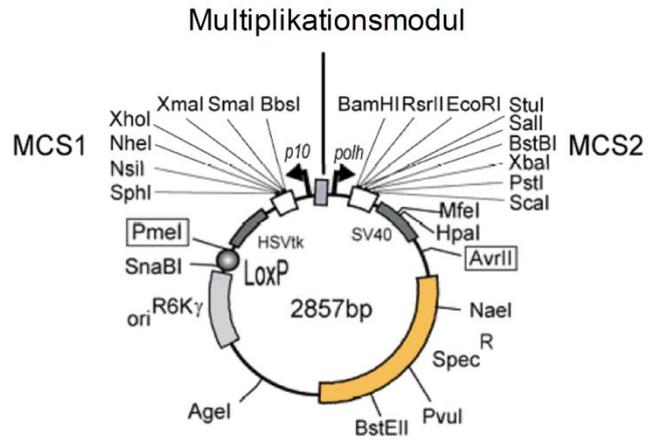


Abbildung 9.9: RNA-Substrate für RNA-Bindung, *In-Vitro*-Polyadenylierung und *In-Vitro*-Spaltung.
Das Polyadenylierungssignal ist in Gelb hervorgehoben, die Konsensussequenz zur Bindung von CF I in Blau und die Spaltstelle in Rot.

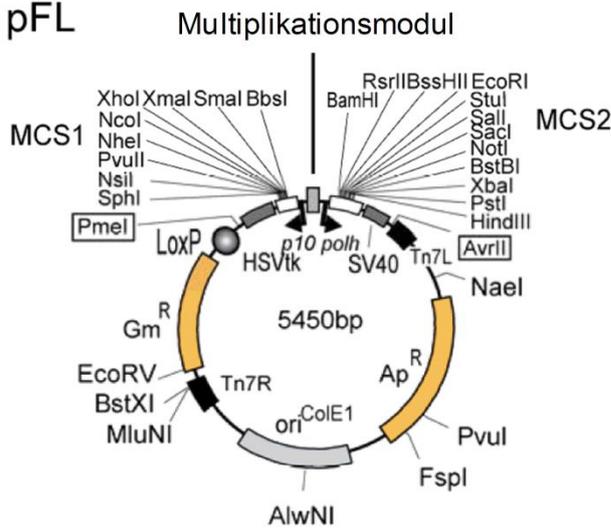
pUCDM



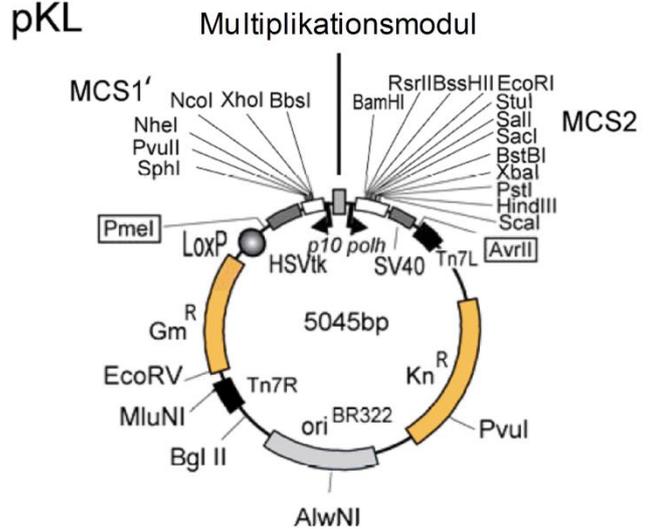
pSPL



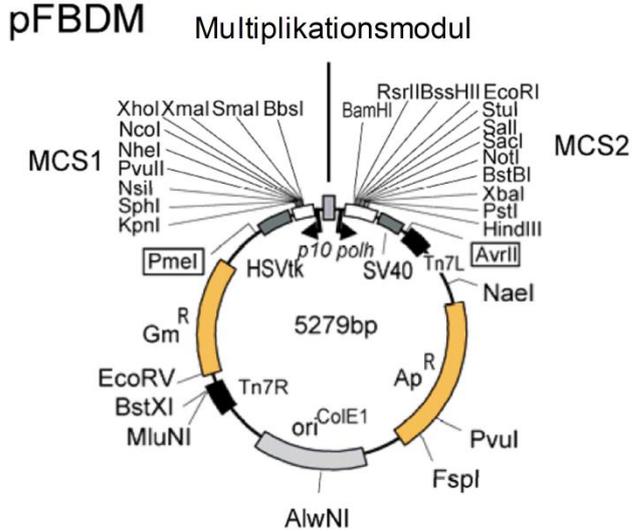
pFL



pKL



pFBDM



pKDM

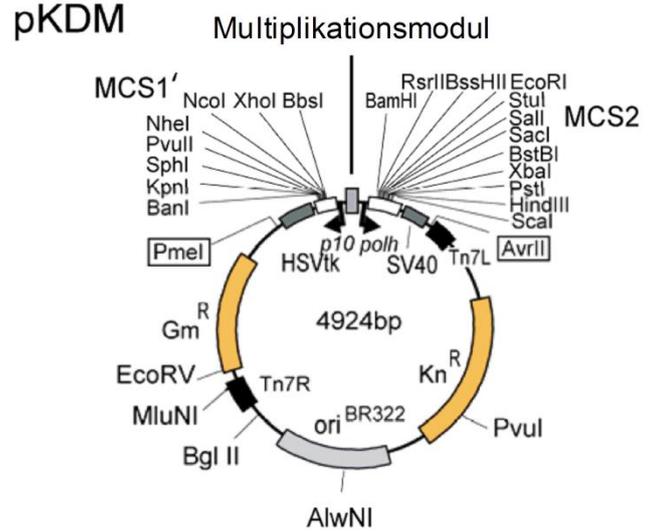


Abbildung 9.10: Schematische Darstellung der Transfervektoren des MultiBac-Systems. Abbildung modifiziert übernommen aus [Fitzgerald *et al.*, 2006].

9.3 Publikationsliste

Schönemann, L.; Kühn, U.; Martin, G.; Schäfer, P.; Gruber, A. R.; Keller, W.; Zavolan, M.; Wahle, E. (2014): Reconstitution of CPSF active in polyadenylation: recognition of the polyadenylation signal by WDR33. *Genes & Development* 28(21):2381-93

Vortrag: „*In vitro* reconstitution of mRNA 3'-end processing“
04.11.2016, Jährlicher Retreat des Graduiertenkollegs GRK 1591, Quedlinburg, Deutschland

Vortrag: „Baculovirus-Mediated Expression of Multi-Protein Complexes“
18.04.2016, Methodenseminar des Graduiertenkollegs GRK 1591, Freyburg, Deutschland

Vortrag: „Reconstitution of CPSF active in polyadenylation“
28.11.2014, Jährlicher Retreat des Graduiertenkollegs GRK 1591, Freyburg, Deutschland

Vortrag: „*In vitro* reconstitution of the mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)“
05.06.2014, Annual meeting of the RNA society, Québec, Canada

Vortrag: „*In vitro* reconstitution of the cleavage and polyadenylation specificity factor (CPSF)“
09.04.2013, Treffen der Forschergruppe FOR 855, Köln, Deutschland

9.4 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die eingereichte schriftliche Fassung der Arbeit entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Weiterhin versichere ich, dass die vorliegende Arbeit noch nicht als Abschlussarbeit an anderer Stelle eingereicht wurde.

Lars Schönemann
Halle (Saale), 19.04.2017

9.5 Danksagung

Ich möchte mich bedanken bei ...

... meinem Chef **Elmar Wahle**, für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe anzufertigen, für die stetige Diskussionsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit und einfach generell, da man sich keinen besseren Chef wünschen kann.

... Herrn **Prof. Dr. Stefan Hüttelmaier** und Frau **Prof. Dr. Katja Sträßer**, dafür dass sie sich bereit erklärt haben diese Arbeit zu begutachten.

... **Uwe Kühn**, für die hervorragende Betreuung während meiner Bachelor- und Masterarbeit, durch welche ich so unendlich viel gelernt habe. Weiterhin danke ich Uwe für die stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und den enorm großen Fleiß, mit welchem er über viele Jahre das CPSF-Projekt voran getrieben hat.

... **Peter Schäfer**, dafür dass er sich entschlossen hat mich auf dem Schlachtzug zur Rekonstitution der 3'-Prozessierung zu begleiten. Es konnte ja keiner ahnen, wie beschwerlich diese Reise werden sollte.

... allen Studenten, welche über die Jahre ihre Arbeitskraft in das Projekt investiert haben: Sarah Jurischka, Ludwig Sinn, Babette Pinkwart, Mathias Lorbeer, Sandra Grund, Moritz Schmidt und Tobias Zeitler. Ihr habt dafür gesorgt, dass es im Labor nie langweilig wurde.

... **Gudrun Scholz**, welche mir im Labor immer hilfsbereit zur Seite stand und mit mir die (aus meiner Sicht) vielen Jahre im Labor 403 durchstanden hat.

... der gesamten **AG Wahle**, inklusive allen ehemaligen Mitarbeitern, mit denen ich die Ehre hatte gelegentlich mal einen Kaffee (oder Tee) trinken zu dürfen.

... meiner **Familie**, meinen **Freunden** und ganz besonders meiner Freundin **Angela**, welche mich in meiner Arbeit und auch sonst ganz viel unterstützt und motiviert haben.

... der **DFG**, welche das CPSF-Projekt finanziert und meine Arbeit somit erst möglich gemacht hat.