

**Katalysemechanismus und *in vivo*-Funktion der  
Poly(A)-spezifischen Ribonuklease (PARN)**

**Dissertation**

Zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Michael Reuter

geb. am 24.12.1975 in Halle/Saale

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elmar Wahle
2. Prof. Dr. Alfred Bindereif

Tag der Verteidigung: 25.10.2006

**urn:nbn:de:gbv:3-000010796**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010796>]

## Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Die Biogenese der mRNA ( <i>capping</i> , <i>splicing</i> , Polyadenylierung)	1
1.1.1	Kopplung von Transkription und Prozessierung der Prä-mRNA	3
1.2	Verschiedene Ebenen der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression	3
1.2.1	Translationsinitiation	3
1.2.2	Einfluss der mRNA-Stabilität auf die Regulation der Genexpression	5
1.2.2.1	Die allgemeinen Wege des mRNA-Abbaus in Eukaryoten	5
1.2.2.2	Abbau von mRNA mit <i>in frame</i> -Stopkodon ( <i>Nonsense-Mediated mRNA-Decay</i> (NMD))	8
1.2.2.3	Regulation der mRNA-Stabilität über AREs (AU-reiche Sequenzen)	9
1.2.2.3.1	Die Faktoren und Enzyme der Deadenylierungsreaktion	11
1.2.2.3.1.1	Der PAN (Pan2p/Pan3p)-Komplex	11
1.2.2.3.1.2	Der CCR4-NOT-Komplex	12
1.2.2.3.1.3	Poly(A)- <i>specific ribonuclease</i> (PARN)	14
1.3	Zielstellung der Arbeit	17
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
2.1	Material	18
2.1.1	Bakterienstämme	18
2.1.2	Zelllinien	18
2.1.3	Kulturmedien	18
2.1.4	Enzyme, Proteine und Antikörper	19
2.1.5	Nukleinsäuren und Nukleotide	20
2.1.6	Plasmide	20
2.1.7	Oligonukleotide	21
2.1.8	Säulen und Säulenmaterialien	23
2.1.9	Feinchemikalien	23
2.1.10	Systeme	24
2.1.11	Sonstiges	24
2.2	Mikrobiologische Methoden	25
2.2.1	Expression von PARN sowie der Punkt- und Deletionsmutanten von PARN	25
2.3	Zellkultur-Methoden	25
2.3.1	Kultivierung von HeLa-Zellen	25
2.3.2	Transfektion von HeLa-Zellen	26
2.3.2.1	Transfektion von siRNAs mit OligofectAMIN <sup>TM</sup>	26
2.3.2.2	Transfektion von Plasmid-DNA durch Calciumphosphatfällung	27
2.3.3	Immunfluoreszenz von PARN in HeLa-Zellen	28
2.4	Protein-Methoden	29
2.4.1	Proteinreinigung	29
2.4.1.1	Reinigung von rekombinantem PARN sowie der Punkt- und Deletionsmutanten von PARN	29
2.4.1.2	Reinigung von rekombinantem PARNn (1-430)	30
2.4.1.3	Präparation von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen	31
2.4.1.4	Reinigung von transient exprimierten FLAG-Fusionsproteinen aus HeLa-Zellen (Kopräzipitation)	31
2.4.1.5	Affinitätsreinigung von Anti-PARN-Antikörpern aus Immuns serum	32

2.4.2	Western blot-Analyse	32
2.5	Nukleinsäure-Methoden	33
2.5.1	Isolation von Nukleinsäuren	33
2.5.1.1	Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i>	33
2.5.1.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen	33
2.5.1.3	Isolierung von zytoplasmatischer und nukleärer RNA aus HeLa-Zellen	34
2.5.1.4	Isolierung von Poly(A) <sup>+</sup> -RNA aus HeLa-Zellen	35
2.5.2	Die elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA	35
2.5.2.1	Agarosegel-Elektrophorese	35
2.5.2.2	Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese	36
2.5.3	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	37
2.5.4	DNA-Sequenzierung	37
2.5.5	Die Herstellung von Punktmutanten von PARN durch <i>in vitro</i> -Mutagenese	37
2.5.6	Herstellung der Expressionsplasmide:	38
2.5.6.1	pGMMCSΔPARN(175-245)	38
2.5.6.2	pGMMCSΔPARN(134-269)	39
2.5.6.3	pTETBBB <sup>TNFα</sup>	39
2.5.6.4	GFP-PARN	40
2.5.6.5	pcDNA3-HA-PARN	40
2.5.7	Methoden mit radioaktiv markierten Nukleinsäuren	40
2.5.7.1	Herstellung radioaktiv markierter Substrate	40
2.5.7.1.1	Die Herstellung von homogen markiertem Poly(A)	40
2.5.7.1.2	Radioaktive 5'-Markierung	41
2.5.7.1.3	Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten ( <i>random primed labelling</i> )	41
2.5.7.1.4	<i>In vitro</i> -Transkription	42
2.5.7.2	Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten RNA- bzw. DNA-Sonden (Northern Blot)	43
2.5.7.3	TCA-Fällungsassay	44
2.5.7.4	Bestimmung der Längenverteilung von Poly(A)	45
2.5.7.5	Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge spezifischer mRNAs: PAT Assay (Sallés & Strickland, 1999)	45
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>47</b>
3.1	Zusammenhänge zwischen der Struktur und dem Katalysemechanismus von PARN	47
3.1.1	Die kinetischen Parameter von PARN <sub>n</sub>	47
3.1.2	Struktur von PARN <sub>n</sub>	49
3.1.2.1	Das aktive Zentrum von PARN	50
3.1.2.2	Substratbindung	51
3.1.2.3	Die Dimerisierung der Nuklease-Domäne	52
3.1.3	Funktionelle Analysen mit Punktmutanten von PARN	53
3.1.4	Die R3H-Domäne von PARN	58
3.2	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> -Funktion von PARN in HeLa-Zellen	62
3.2.1	<i>Knockdown</i> von PARN durch RNA-Interferenz (RNAi)	62
3.2.1.1	PARN hat keinen Einfluss auf die <i>steady-state</i> -Poly(A)-Längenverteilung in HeLa-Zellen	63
3.2.1.2	Der Einfluss von PARN auf die mRNA-Stabilität bzw. mRNA-Abbauraten	67
3.2.1.2.1	Auswirkungen eines PARN- <i>knockdowns</i> auf die Stabilität transient exprimierter mRNAs	67

3.2.1.2.2	Einfluss eines PARN- <i>knockdowns</i> auf die Stabilität einer endogenen mRNA in HeLa-Zellen	72
3.2.1.2.3	Die Beteiligung von PARN am <i>Nonsense-Mediated mRNA-Decay</i> (NMD) konnte nicht bestätigt werden	74
3.3	Weiterführende Untersuchungen zur <i>in vivo</i> -Aktivität von PARN	79
3.3.1	Intrazelluläre Lokalisation von PARN	79
3.3.2	RNA-Spezies im Nukleolus	83
3.3.2.1	Einfluss von PARN auf die Biogenese von snoRNAs	83
3.3.2.2	Untersuchungen zur Beteiligung von PARN an der Biogenese der rRNA	85
3.3.2.3	Einfluss von PARN auf die Biogenese von snRNAs	92
3.3.2.4	Der Einfluss eines PARN- <i>knockdowns</i> auf die Stabilität der pri-miRNA-21	94
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>97</b>
4.1	Struktur und Katalysemechanismus von PARN	97
4.1.1	Das aktive Zentrum und der Katalysemechanismus von PARN	97
4.1.2	Das Dimer von PARN als strukturelle Einheit für die enzymatische Katalyse	98
4.1.3	Die Substratbindung sowie die Poly(A)-Spezifität von PARN	101
4.2	Die <i>in vivo</i> -Funktion von PARN in somatischen Zellen	102
4.2.1	Beteiligung von PARN am NMD	107
4.2.2	Die intrazelluläre Lokalisation von PARN	109
4.2.3	Hat PARN eine katalytische Funktion im Nukleus ?	110
4.3	Ausblick	113
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>114</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>116</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>128</b>
7.1	Abkürzungsverzeichnis	128
7.2	Lebenslauf	130
7.3	Publikationen	131
7.4	Erklärung	132
7.5	Danksagung	133

## 1 Einleitung

Die Steuerung der Genexpression ist ein vielschichtiger komplexer Vorgang. Die Kompartimentierung von mRNA- und Proteinsynthese, die damit verbundenen Transportvorgänge zwischen Zytoplasma und Nukleus sowie die Vielzahl der nukleär lokalisierten Prozessierungsschritte, welche die Bildung einer translatierbaren reifen mRNA voraussetzen, sind die Basis für eine Reihe verschiedener Regulationsmechanismen. Dabei wird allgemein zwischen Prozessen unterschieden, die während (ko-transkriptional) bzw. im Anschluss an die Transkription der DNA-Sequenz (post-transkriptional) stattfinden. Einen erheblichen Anteil an der post-transkriptionalen Kontrolle der Proteinsynthese hat u.a. die RNA-Stabilität. Über die Modifizierung der mRNA-Abbauraten kann die *steady state*-Menge der mRNA und damit auch das Ausmaß von deren Translation in Abhängigkeit wechselnder physiologischer Bedingungen variiert werden.

Der mRNA-Abbau ist ein sequentieller Prozess, welcher mit der exonukleolytischen Degradation des Poly(A)-Schwanzes, der in Verbindung mit der *Cap*-Struktur für eine effektive Translation essentiell ist, beginnt. Eine Regulation wird dabei durch verschiedene Faktoren sowie Sequenzen, die im 3'-UTR der mRNA lokalisiert sind, vermittelt. Eine detailliertere Darstellung dieser Prozesse einschließlich der wesentlichen strukturellen Voraussetzungen sowie der beteiligten Faktoren ist Gegenstand der folgenden Betrachtungen.

### 1.1 Die Biogenese der mRNA (*capping, splicing, Polyadenylierung*)

Gesteuert durch Transkriptionsfaktoren und *cis*-aktive Sequenzen, wie Promotoren, *Enhancer* und *Silencer*, wird die mRNA als Vorläufer (Prä-mRNA) durch die RNA-Polymerase II (Pol II) vom entsprechenden DNA-Template transkribiert. Mehrere Prozessierungsschritte sind für die Umwandlung der Prä-mRNA in eine reife bzw. translatierbare mRNA notwendig. Der erste Vorgang ist die Anfügung einer 7-methyl-Guanosin-Kappe (*Cap*) an das 5'-Ende. Diese erfolgt unmittelbar nachdem das 5'-Ende der RNA aus dem Transkriptionskomplex auftaucht und wird in drei aufeinanderfolgenden Schritten durch eine 5'-Triosephosphatase (RTP), Guanylyltransferase (GT) sowie Methyltransferase (MT) katalysiert. Die *Cap*-Struktur wird im Nukleus vom *cap binding complex* (CBC), einem Heterodimer, gebunden (Shatkin & Manley, 2000).

Die überwiegende Zahl der Gene in höheren Eukaryoten ist durch einen alternierenden Wechsel aus kodierenden (Exons) und nichtkodierenden (Introns) Sequenzen gekennzeichnet.

Die Ableitung eines funktionellen Transkripts vom entsprechenden DNA-Template erfordert daher die Entfernung der Intronsequenzen aus der Prä-mRNA sowie die Verknüpfung der Exons zu einem *open reading frame* (ORF), ein Vorgang, welcher als *splicing* bezeichnet wird. Das *splicing* verläuft in zwei aufeinanderfolgenden Transester-Reaktionen. Die Spaltung der 5'-Spleißposition unter gleichzeitiger Verknüpfung der Verzweigungsstelle mit dem 5'-Ende des Introns erfolgt im ersten Schritt. Dem schließt sich die Spaltung der 3'-Spleißposition und die Verknüpfung der 3'- bzw. 5'-Enden der entsprechenden Exons an, wobei das Intron als Lariat ausgeschnitten wird. Die massiven strukturellen Veränderungen der Prä-mRNA während des Spleißvorganges sowie die Transester-Reaktionen werden durch fünf snRNPs (U1, U2, U4, U5, U6) gefördert. Heterogene Partikel, welche sich aus einer kurzen RNA (snRNA) sowie aus verschiedenen Proteinen zusammensetzen. Diese lagern sich zu einem Komplex, dem *spliceosom*, zusammen (Burge *et al.*, 1999).

Ein strukturelles Merkmal, das alle proteinkodierenden mRNAs gemeinsam haben (Ausnahme sind mRNAs, die für Histone kodieren), ist ein aus ca. 250 AMP-Resten bestehendes 3'-Ende. Der Poly(A)-Schwanz hat wesentliche Bedeutung bei der Translationsinitiation sowie bei der Regulation der mRNA-Stabilität (siehe unten). In höheren Eukaryoten sind zwei Sequenzelemente für die Prozessierung des 3'-Endes notwendig: das hochkonservierte Hexanukleotid AAUAAA sowie ein U- oder GU-reicher Bereich (*downstream element* (DSE)), der sich stromabwärts davon befindet. Die Sequenzmotive werden von verschiedenen Proteinkomplexen gebunden. Diese sind sowohl für die Spaltung, welche überwiegend an einem CA-Dinukleotid zwischen dem Hexamer und dem DSE erfolgt, als auch für die Polyadenylierung essentiell. Der *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF), ein Heterotetramer, bindet an die AAUAAA-Sequenz. Der *cleavage stimulation factor* (CstF), ein Heterotrimer, interagiert mit dem DSE. Zwei weitere Faktoren, der *cleavage factor* I (CF I<sub>m</sub>) und II (CF II<sub>m</sub>) sowie die Poly(A)-Polymerase sind ebenfalls an der endonukleolytischen Reaktion beteiligt. Nach der Spaltung wird an das entstandene 3'-Ende der Poly(A)-Schwanz angefügt. Diese Reaktion wird durch die Poly(A)-Polymerase katalysiert. Das Enzym allein hat nur eine sehr geringe distributive Aktivität, was durch die niedrige Affinität zur RNA begründet ist. Durch die Interaktion mit dem an die AAUAAA-Sequenz gebundenen CPSF wird die spezifische Bindung an das Substrat und damit die Initiation der Polymerisierungsreaktion gewährleistet. Ein weiterer stimulierender Faktor ist das nukleäre Poly(A)-Bindepotein (PABN 1), welches den Oligo(A)-Schwanz bindet, nachdem dieser eine Mindestlänge von 10 Nukleotiden erreicht hat. CPSF und PABN 1

wirken synergistisch und stabilisieren die Assoziation der Polymerase mit dem Substrat wodurch eine maximale Prozessivität erreicht wird. Dabei werden 250 AMP-Nukleotide, was einem vollständigen Poly(A)-Schwanz entspricht, in einer Reaktion angefügt, ohne dass die Polymerase vorzeitig dissoziiert (Wahle & Rügsegger, 1999).

### 1.1.1 Kopplung von Transkription und Prozessierung der Prä-mRNA

Die verschiedenen Prozesse der mRNA-Reifung, die alle während der Transkription erfolgen, sind untereinander gekoppelt und beeinflussen sich gegenseitig sowohl in der Spezifität als auch in der Effektivität (Proudfoot *et al.*, 2002). Den überwiegenden Anteil an dieser Integration trägt die C-terminale Domäne der großen Untereinheit der Pol II (CTD), welche aus einem sich mehrfach (52 bei Vertebraten, 26 bei Hefe) wiederholenden Aminosäureheptamer (YSPTSPS) besteht (Cramer *et al.*, 2001). Der Grad und das Verhältnis der Phosphorylierung der Serine an den Positionen 2 und 5 innerhalb dieser Sequenz bestimmt die Aktivität der Polymerase während der verschiedenen Transkriptionsphasen und beeinflusst die Assoziation verschiedener Proteine, zu denen auch Faktoren gehören, welche in die Prozessierung der mRNA involviert sind (Komarnitsky *et al.*, 2000). So interagiert GT (siehe oben) mit der hyperphosphorylierten CTD und wird dabei allosterisch aktiviert (Ho & Shuman, 1999). CPSF ist als eine Komponente des TFIID am Promotor lokalisiert und wird unmittelbar nach dem Transkriptionsstart auf die CTD transferiert (Dantonel *et al.*, 1997).

Weitere Faktoren, die während der Transkription u.a. über die CTD von Pol II mit der mRNA in Verbindung treten, sind Adapterproteine (REF bzw. Yra1p in *S. cerevisiae*), die für den späteren Transport der reifen mRNA in das Zytoplasma erforderlich sind. Transportrezeptoren (NXF1 bzw. Mex67p in *S. cerevisiae*) binden die Adapterproteine und vermitteln den Transfer durch den *nuclear pore complex* (NPC) (Stutz & Izaurralde, 2003; Erkmann & Kutay, 2004).

## 1.2 Verschiedene Ebenen der post-transkriptionalen Regulation der Genexpression

### 1.2.1 Translationsinitiation

Mit dem Transport der reifen mRNA in das Zytoplasma ist der Austausch des CBC (siehe oben) gegen eIF4F, den zytoplasmatischen *Cap*-Bindekomplex, sowie des PABN1 mit dem zytoplasmatischen Poly(A)-Bindeprotein (PABPC1) verbunden. Beide Faktoren sind für die Translation der mRNA essentiell und haben außerdem erheblichen Einfluss auf die Stabilität des Transkripts. Der eIF4F-Komplex besteht aus drei Untereinheiten: dem *Cap*-Bindeprotein

eIF4E, der RNA-abhängigen ATPase und Helikase eIF4A sowie dem Adaptor-Protein eIF4G, welches mit den genannten Untereinheiten interagiert. Außerdem rekrutiert eIF4G über eine Interaktion mit eIF3 die ribosomale 40S-Untereinheit zum 5'-Ende der mRNA und hat damit wesentlichen Anteil an der Assemblierung des Translationsinitiationskomplexes. Dieser gleitet entlang der mRNA (*scanning*) und assoziiert mit der ribosomalen 60S-Untereinheit, nachdem das entsprechende Start-ATG erreicht wurde. Die ATPase-Aktivität von eIF4A erleichtert das *scanning*, wobei dies vermutlich auf die Auflösung von Sekunderstrukturen des 5'-UTRs zurückzuführen ist. Der Faktor eIF4B bindet und stimuliert eIF4A. Die Bildung des Initiationskomplexes wird durch den Poly(A)-Schwanz zusätzlich gefördert, wobei der stimulierenden Einfluss durch das zytoplasmatische Poly(A)-Bindepotein (PABPC1) vermittelt wird. PABPC1 bindet ebenfalls eIF4G, was die Interaktion zwischen eIF4E und der *Cap*-Struktur stabilisiert. Damit verbunden ist weiterhin eine Zunahme der Affinität zwischen PABPC1 und Poly(A). Auf diese Weise wird einmal die Effektivität der Assemblierung des Initiationskomplexes gesteigert. Die enge Assoziation zwischen dem 5' und dem 3'-Ende der mRNA (*closed-loop model*) befähigt eventuell die Ribosomen zu einer Reinitiierung der Translation auf der gleichen mRNA im Anschluss an die Termination. Die Interaktion zwischen dem C-Terminus von PABPC1 und dem N-Terminus des Terminationsfaktors eRF3 ist in diesem Zusammenhang von Bedeutung (Uchida *et al.*, 2002). Ein weiterer stimulierender Einfluss von PABPC1 auf die Translationsinitiation ergibt sich aus der Assoziation mit eIF4B (siehe oben). Außerdem fördert PABPC1 die Verbindung der ribosomalen 40S- mit der 60S-Untereinheit. Der stimulierende Einfluss von PABPC1 erfolgt auch unabhängig von einer Bindung mit eIF4G bzw. mit Poly(A) (Stimulierung in *trans*) (Mangus *et al.*, 2003; Sonenberg & Dever, 2003; Kühn & Wahle, 2004; von der Haar *et al.*, 2004).

Die strukturellen und funktionellen Beziehungen zwischen einer effektiven Translationsinitiation und dem Poly(A)-Schwanz sind u.a. bei der Oozytenreifung bzw. in der frühen Embryonalentwicklung von besonderer Bedeutung. Diese Phasen sind aufgrund von intensiven mitotischen und meiotischen Zellteilungen durch eine verminderte Transkriptionsaktivität charakterisiert. Die Regulation der Genexpression wird daher überwiegend über die Translation der mRNA kontrolliert und gesteuert, wobei die Länge des Poly(A)-Schwanzes bestimmenden Einfluss hat (Richter, 1996; de Moor *et al.*, 2005). So wird die Genexpression durch eine zytoplasmatische Polyadenylierung aktiviert. Diese, während der Oozytenreifung induzierte Reaktion, findet im Zytoplasma statt und ist von

regulatorischen Sequenzen, welche im 3'-UTR der mRNA lokalisiert sind (*cytoplasmic polyadenylation element* (CPE)), abhängig. Eine Deaktivierung erfolgt dagegen durch die exonukleolytische Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes, wobei zwischen verschiedenen Mechanismen unterschieden werden kann. Die Deadenylierung von maternaler mRNA während der Oozytenreifung verläuft unabhängig von *cis*-aktiven Sequenzen und führt zur progressiven Verminderung der Poly(A)-Schwanzlänge aller mRNAs, die nicht von einer kompensatorischen Polyadenylierung im Zytoplasma betroffen sind (siehe oben). Diese Reaktion (*default deadenylation*) bleibt auch nach der Befruchtung bis in die frühe Phase der Embryonalentwicklung bestehen (Fox & Wickens, 1990; Legagneux *et al.*, 1995; Paillard & Osborne, 2003). Dem steht die sequenzspezifische Deadenylierung gegenüber. Diese wird durch die Befruchtung induziert und durch regulatorische Sequenzen, welche sich ebenfalls im 3'-UTR befinden, vermittelt. Dazu gehören u.a. AU-reiche Sequenzen (ARE, siehe unten) oder das, in einigen *Xenopus* mRNAs enthaltene, *embryonic deadenylation element* (EDEN) (Paillard *et al.*, 1998; Paillard & Osborne, 2003). Die mRNAs, deren Poly(A)-Schwanz durch die verschiedenen Deadenylierungsreaktionen verkürzt wurden, sind stabil und werden erst in einer späteren Phase der Embryonalentwicklung vollständig degradiert. Dies steht im Gegensatz zu den Prozessen in somatischen Zellen, wo die Deadenylierung der primäre und geschwindigkeitsbestimmende Schritt des mRNA-Abbaus ist (siehe unten).

## 1.2.2 Einfluss der mRNA-Stabilität auf die Regulation der Genexpression

### 1.2.2.1 Die allgemeinen Wege des mRNA-Abbaus in Eukaryoten

Die Genexpression wird zu einem großen Anteil über die mRNA-Stabilität reguliert. Allgemein sind mRNAs durch eine hohe Umsatzrate (Rate aus Synthese und Abbau) gekennzeichnet. Die Halbwertszeiten verschiedener Transkripte innerhalb einer Zelle können dabei um mehr als den Faktor 10 differieren. Der Vorzug einer geringen Halbwertszeit besteht in einer schnellen Änderung der *steady state*-Menge der mRNA als Folge einer modifizierten Abbau- bzw. Syntheserate. Dies ermöglicht eine sofortige Anpassung der Proteinexpression in Abhängigkeit wechselnder physiologischer Bedingungen (Ross 1995; Meyer *et al.*, 2004). Die Mechanismen des mRNA-Abbaus wurden zuerst in *S. cerevisiae* detaillierter charakterisiert. Allgemein kann zwischen zwei Abbauwegen unterschieden werden. Die exonukleolytische Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes leitet in beiden Fällen die Degradation der mRNA ein. Die Deadenylierung ist dabei auch der geschwindigkeitsbestimmende Schritt. Die Rate der Poly(A)-Verkürzung unterliegt einer stringenten Kontrolle und ist für jedes

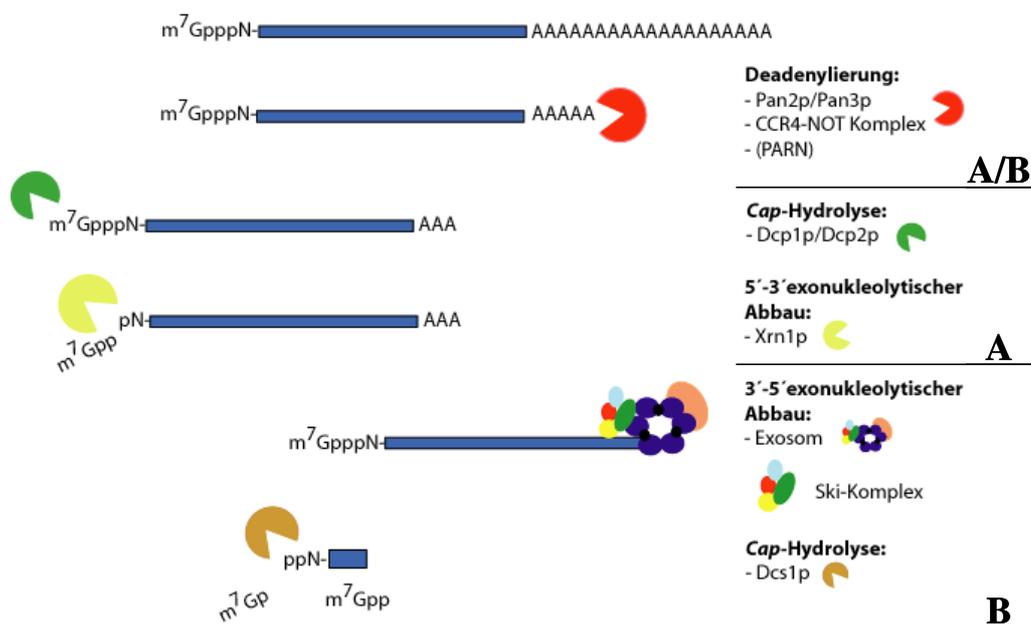
Transkript spezifisch. Mehrere poly(A)-spezifische 3'-Exonukleasen, die nachfolgend näher charakterisiert werden, katalysieren diese Reaktion. Beim überwiegenden Teil der mRNAs löst die Reduktion der Poly(A)-Schwanzlänge auf 10 Nukleotide die Hydrolyse der *Cap*-Struktur (*decapping*) aus. Dabei kommt es zur Freisetzung von  $m^7GDP$  sowie der entsprechenden mRNA, welche ein Monophosphat am 5'-Ende enthält. Das *decapping* wird durch ein Dimer katalysiert, das aus den Untereinheiten Dcp1p und Dcp2p besteht, wobei Dcp2p die katalytisch aktive Untereinheit ist. Im Anschluss an die *Cap*-Hydrolyse erfolgt der exonukleolytische Abbau der mRNA durch die 5'-Exonuklease Xrn1p. Das Enzym bevorzugt RNA mit einem 5'-Monophosphat gegenüber RNA, welche eine 5'-Hydroxylgruppe aufweist. RNA mit einem *Cap* ist dagegen resistent gegen den exonukleolytischen Angriff.

In einem alternativen Weg folgt der Deadenylierung ein exonukleolytischer Abbau vom 3'-Ende. Diese Reaktion wird durch das Exosom katalysiert, einem Komplex, der aus mehreren 3'-Exonukleasen sowie assoziierten Proteinen besteht. Das Exosom ist sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus lokalisiert, wobei sich dessen Zusammensetzung in dem jeweiligen Kompartiment durch die Interaktion mit spezifischen Faktoren bzw. Untereinheiten unterscheidet. Die Grundstruktur beider Varianten wird durch 10 Untereinheiten gebildet (Rrp40p-46p, Rrp4p; Csl4p/Ski4p, Mtr3p). 6 dieser Proteine weisen Sequenzhomologien zur Polynukleotidphosphorylase (PNPase) bzw. RNase PH von *E. coli* auf. Von 2 Untereinheiten konnte eine 3'-Exonukleaseaktivität *in vitro* detektiert werden (Rrp4p und Rrp44p). Spezifische, mit dem nukleären Exosom assoziierte Faktoren, sind die 3'-Exonuklease Rrp6p sowie die Helikase Mtr4p. Das nukleäre Exosom ist u.a. an der Prozessierung von rRNA, snoRNA und snRNA beteiligt (Butler, 2002). Das im Zytoplasma lokalisierte Exosom interagiert mit dem Ski-Komplex (Ski2p, Ski3p, Ski7p und Ski8p).

Das *Cap*-Dinukleotid  $m^7GpppN$ , welches nach dem vollständigen Abbau der RNA durch das Exosom verbleibt, wird durch Dcs1p (DcpS in Säugetierzellen) hydrolytisch gespalten, wobei  $m^7GMP$  und das entsprechende Nukleosiddiphosphat entstehen. Die *Cap*-Struktur als Bestandteil von kurzen Oligonukleotiden, kann auch als Substrat für Dcs1p fungieren. Weiterhin wird  $m^7GDP$ , das Reaktionsprodukt der *decapping*-Reaktion, ebenfalls durch Dcs1p zu  $m^7GMP$  und Phosphat hydrolysiert (Meyer *et al.*, 2004; Parker & Song, 2004).

Die allgemeinen Mechanismen des mRNA-Abbaus von *S. cerevisiae* können auch auf höhere Eukaryoten bzw. Säugetierzellen übertragen werden. Zum einen sind die Enzyme, welche die verschiedenen Abbauewege katalysieren, konserviert. Weiterhin wurden für einige dieser Faktoren die entsprechenden katalytischen Aktivitäten *in vitro* bestätigt (Meyer *et al.*, 2004). Die Deadenylierung als primärer Schritt des mRNA-Abbaus kann in HeLa-Zellen direkt *in*

*in vivo* beobachtet werden (Shyu *et al.*, 1991; Chen & Shyu, 1995). Außerdem sind die verschiedenen Schritte des mRNA-Abbaus vom 3'-Ende anhand von HeLa-Zellextrakten nachvollziehbar (Wang & Kiledjian, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002). Weiterhin konnten die 5'-Monophosphatintermediate der *decapping*-Reaktion detektiert werden, wobei der Nachweis auf einer Zirkularisierung der RNA und einer sich anschließenden *reversen* Transkription sowie PCR (RT-PCR) basierte. In diesem Zusammenhang erfolgte außerdem der Nachweis, dass auch in HeLa-Zellen die *Cap*-Hydrolyse von einer Deadenylierung abhängig ist (Couttet *et al.*, 1997). In der Abb. 1 sind die beiden Abbauwege von mRNA schematisch dargestellt.



**Abb. 1: mRNA-Abbau in *S. cerevisiae*.** Schematische Darstellung der beiden Hauptabbauwege von mRNA **A**: 5'-3'-Abbauweg; **B**: 3'-5'-Abbauweg, A und B werden durch die Deadenylierung der mRNA eingeleitet (Erläuterungen siehe Text). Die Enzyme, welche die einzelnen Schritte katalysieren, sind rechts angegeben.

Die allgemeinen Wege des mRNA-Abbaus sowie die Enzyme, welche die einzelnen Reaktionsschritte katalysieren, sind auch in Prozesse involviert, über die fehlerhafte mRNAs selektiv degradiert werden. Die Defekte entstehen u.a. durch nicht exakt verlaufende Prozessierungsschritte der Prä-mRNA oder durch Mutationen. Sie können aber auch die Folge von intramolekularen Rekombinationen sein. Der überwiegende Teil der fehlerhaft prozessierten mRNAs, die meist auch transportinkompetent sind, wird sofort im Nukleus durch das Exosom abgebaut. Die zentrale Komponente ist dabei die Exosom-Untereinheit Rrp6p (*S. cerevisiae*) (Vasudevan & Peltz, 2003; Sommer & Nehrass, 2005). Weitere Kontrollmechanismen existieren im Zytoplasma, über die defekte Transkripte, denen durch eine vorzeitige 3'-Prozessierung und Polyadenylierung ein Terminationskodon fehlt, für den

Abbau selektiert werden (Frischmeyer *et al.*, 2002; van Hoof *et al.*, 2002). Die Degradation von mRNAs, welche ein Terminationskodon im ORF enthalten, erfolgt über einen komplexen Vorgang, der sowohl zytoplasmatische als auch nukleäre Prozesse einschließt und als NMD bezeichnet wird (siehe unten).

#### 1.2.2.2 Abbau von mRNA mit *in frame*-Stopkodon (*Nonsense-Mediated mRNA-Decay (NMD)*)

NMD bezeichnet einen Mechanismus durch den mRNAs, die ein *in frame*-Stopkodon (*premature translation termination codon*, (PTC)) enthalten, selektiv degradiert werden. Das PTC entsteht dabei entweder durch Mutationen oder ist die Folge einer fehlerhaften Prozessierung. Durch den NMD wird die Bildung von potentiell toxischen C-terminal verkürzten Proteinen verhindert (Conti & Izaurralde, 2005; Maquat, 2005). Zusätzlich zu dieser Kontrollfunktion hat der NMD wesentlichen Anteil an der Regulation der Genexpression (He *et al.*, 2003; Mendell *et al.*, 2004). Von Bedeutung in diesem Zusammenhang sind u.a. kurze ORFs, die im 5'-UTR (*upstream-ORF*) lokalisiert sind. Die vorzeitige Termination der Translation im 5'-UTR aktiviert den NMD, was zu einer starken Reduktion des Expressionslevels der mRNA führt (Mignone *et al.*, 2002).

Strukturelle Basis für die Identifizierung eines PTC ist die Interaktion des terminierenden Ribosoms mit Faktoren, welche stromabwärts an die entsprechende mRNA gebunden sind. Diese Konstellation führt unter definierten Bedingungen zur Assemblierung eines Proteinkomplexes, der aus den Untereinheiten Upf1, Upf2 und Upf3 (NMD-Komplex) besteht und unmittelbar den Abbau der mRNA auslöst (Lykke-Andersen *et al.*, 2000). In Säugetieren erfolgt die Erkennung des PTC über den *exon junction complex* (EJC). Dieser wird durch das Spleißosom sequenzunspezifisch 20-25 Nukleotide stromaufwärts an jeder Verknüpfungsstelle zweier Exons (*exon junction*) deponiert (Le Hir *et al.*, 2000). Befindet sich das PTC mehr als 50-55 Nukleotide stromaufwärts einer *exon junction*, wird der Abbau der mRNA induziert (Nagy & Maquat, 1998). Neben Proteinen, die in die Spleißreaktion (SR-Proteine) sowie in den Transport der mRNA (REF) involviert sind, enthält der EJC den NMD-Faktor Upf3 bzw. die paraloge Version Upf3X (Kim *et al.*, 2001; Le Hir *et al.*, 2001). Das perinukleär lokalisierte Upf2 bindet Upf3 bzw. Upf3X unmittelbar nach dem die mRNA aus dem Nukleus ins Zytoplasma transportiert wurde (Maquat, 2005). Terminiert das Ribosom bei der primären Translation (*pioneer round of translation*) an einem PTC, das sich in einem entsprechenden Abstand zum EJC befindet, erfolgt die Bildung des NMD-Komplexes. Upf1 wird dabei über die Terminationsfaktoren eRF1 bzw. eRF3 zum EJC rekrutiert und bindet direkt an Upf2 (Czaplinski *et al.*, 1998, Ishigaki *et al.*, 2001).

In *S. cerevisiae*, wo der überwiegende Teil der mRNAs keine Introns enthält, erfolgt die Identifizierung eines PTC u.a. über stromabwärts gelegene Sequenzen (*downstream sequence elements* (DSE)), die von Proteinen, z.B. Hrp1p, gebunden werden (Gonzalez *et al.*, 2000). Ebenfalls von Bedeutung ist die unmittelbare Umgebung des Stopkodons, die für eine akkurate Termination der Translation sowie für die Freigabe des Ribosoms erforderlich ist. Beide Vorgänge sind bei PTCs gestört, was den NMD aktiviert (Amrani *et al.*, 2004; Conti & Izaurralde, 2005).

Der Abbau der mRNA, der mit der Bildung des NMD-Komplexes induziert wird, erfolgt in Säugetierzellen und *S. cerevisiae* über die allgemeinen Abbauwege (siehe oben), wobei zumindest in *S. cerevisiae* die Hydrolyse der *Cap*-Struktur von einer vorherigen Deadenylierung unabhängig ist (Muhlrad & Parker, 1994; Chen & Shyu, 2003; Lejeune *et al.*, 2003; Mitchell & Tollervey, 2003; Couttet & Grange, 2004). In *D. melanogaster* wird dagegen die mRNA in der Nähe des PTC endonukleolytisch gespalten. Die 5'- und 3'-Fragmente werden durch das Exosom bzw. Xrn1 exonukleolytisch abgebaut (Gatfield & Izaurralde, 2004).

### 1.2.2.3 Regulation der mRNA-Stabilität über AREs (AU-reiche Sequenzen)

Die *steady state*-Konzentration der mRNA hat wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß der Genexpression, wobei die Menge des Transkripts durch dessen Synthese- und Abbaurate determiniert wird. Bei einer Reihe von Proteinen, zu denen u.a. Cytokine, Wachstumsfaktoren und Proto-Onkogene gehören, erfolgt die Kontrolle der Genexpression zum überwiegenden Teil über die Modulation der mRNA-Stabilität (Chen & Shyu, 1995). Die mRNAs, die diese vornehmlich regulatorischen Proteine kodieren, sind allgemein durch eine sehr geringe Halbwertszeit gekennzeichnet. Die hohe Abbaurate wird dabei durch Sequenzen vermittelt, die im 3'-UTR der mRNA lokalisiert sind und eine hohe Anzahl von Adenosin- und Uridin-Nukleotiden aufweisen (*AU-rich elements* (AREs)). Ein charakteristisches Motiv dieser destabilisierenden Sequenzen ist das AUUUA-Pentamer. Basierend auf dessen Anzahl und Verteilung erfolgt die Unterteilung der ARE-Sequenzen in drei verschiedene Klassen. Zur Klasse I gehören AREs, deren AUUUA-Motive in U-reichen Regionen verteilt liegen. Die AUUUA-Motive der Klasse II AREs überlagern sich, wobei ein funktionelles ARE aus mindestens zwei überlappenden (UUAUUUA(U/A)(U/A)-Nanomeren besteht. Die Uridin-reichen AREs der Klasse III enthalten kein AUUUA-Motiv. Die Klassifikation basiert dabei ausschließlich auf den allgemeinen Sequenzcharakteristika und repräsentiert keine funktionelle Einteilung. Weiterhin existieren keine Konsensussequenzen für die

verschiedenen ARE-Klassen. Diese Heterogenität ist u.a. darin begründet, dass die Kontrolle der mRNA-Stabilität für jedes Transkript bzw. für spezifische Gruppen von mRNAs individuellen Charakter trägt und durch ein Set verschiedener Proteine, die an die ARE-Sequenz binden (ARE-BP), gesteuert wird (Bevilacqua *et al.*, 2003; Barreau *et al.*, 2006). Beispiele für ARE-BP, die den Abbau der mRNA induzieren, sind TPP und KSRP. *M. musculus* mit einer homozygoten TTP-Deletion weisen in verschiedenen Zelltypen eine erhöhte mRNA- und Proteinkonzentration für TNF- $\alpha$  und GM-CSF auf, was für die Ausbildung von systemischen Entzündungsreaktionen verantwortlich ist. Ursache dafür ist die Stabilisierung der kodierenden Transkripte, die ein ARE der Klasse II enthalten (Carballo *et al.*, 2000; Stoecklin *et al.*, 2001). Die Reduktion der Expression von KSRP in HeLa-Zellen durch RNAi bzw. eine Depletion *in vitro* hat die Stabilisierung von mRNAs, deren AREs allen Klassen zugeordnet werden können, zur Konsequenz (Gherzi *et al.*, 2004). Weitere ARE-BP, die den mRNA-Abbau stimulieren sind BRF1 und AUF1 (hnRNPD), wobei für AUF1 in Abhängigkeit des Zelltyps und der experimentellen Bedingungen auch stabilisierende Effekte nachgewiesen wurden (Xu *et al.*, 2001). Einen ausnahmslos stabilisierenden Einfluss, der alle ARE-Klassen einschließt, hat das ARE-BP HuR (Barreau *et al.*, 2006). Verschiedene ARE-BP können simultan über separate Bindestellen mit dem gleichen ARE assoziieren oder um die gleiche Bindestelle konkurrieren, wobei die Überlagerung der stimulierenden bzw. hemmenden Einflüsse synergistische oder antagonistische Effekte auf die mRNA-Abbauraten hervorrufen. Die Zusammensetzung der ARE-BP ist von der Abundanz des jeweiligen Proteins sowie von dessen Affinität zur Nukleotidsequenz abhängig (Lal *et al.*, 2004; Linker *et al.*, 2005). Die Bindung wird außerdem durch eine Phosphorylierung reguliert (Winzen *et al.*, 1999; Carballo *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2003).

Die durch ein ARE vermittelte beschleunigte Degradation der mRNA resultiert sowohl aus einer Erhöhung der Deadenylierungsrate als auch aus einem geförderten exonukleolytischen Abbau, der in höheren Eukaryoten zumindest *in vitro* vom 3'-Ende aus erfolgt und durch das Exosom katalysiert wird (Chen *et al.*, 2001; Mukherjee *et al.*, 2002;). Beide Phasen können dabei separat reguliert werden. So stimuliert TPP die Deadenylierungsreaktion *in vivo* und *in vitro* und destabilisiert außerdem Transkripte, die nicht polyadenyliert sind (Carballo *et al.*, 2000; Lai & Blackshear, 2001; Lai *et al.*, 2003). Die Degradation von snRNAs kann ebenfalls durch AREs gefördert werden, wobei der beschleunigte Abbau aufgrund des Fehlens eines Poly(A)-Schwanzes nicht von einer erhöhten Deadenylierungsrate bestimmt wird (Fan *et al.*, 1997). Die Aktivierung der Deadenylierung bzw. des 3'-5'-Abbauweges beruht u.a. auf einer

direkten oder indirekten Rekrutierung des Exosoms bzw. von Deadenylasen zur mRNA. So interagieren AUF1 und KSRP direkt mit dem Exosom, letzteres außerdem mit PARN (Chen, *et al.*, 2001; Gherzi *et al.*, 2004). Für RHAU, ein ARE-BP, welches mit dem ARE der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-mRNA assoziiert ist und deren Abbau stimuliert, konnte ebenfalls eine direkte Bindung mit dem Exosom und PARN nachgewiesen werden (Tran *et al.*, 2004). TTP und BRF1 interagieren vornehmlich über ihre N-terminalen Domänen mit einer Reihe von Enzymen, die in den mRNA-Abbau involviert sind. Über Ko-Immunopräzipitationen mit endogenem TTP bzw. mit dessen transient exprimierter N-terminaler Domäne, können Ccr4, Xrn1 und Dcp2 sowie die Exosomuntereinheiten Rps4 und PM-Scf75 aber nicht PARN (siehe unten) aus Extrakten von HEK 293T-Zellen isoliert werden (Lykke-Andersen & Wagner, 2005). Die Bedeutung des N-Terminus von TTP als Aktivator-domäne für den RNA-Abbau wird anhand verschiedener experimenteller Daten belegt. Die Deletion des N-Terminus von TTP hat im Vergleich zum Wildtypprotein eine Reduktion des destabilisierenden Effektes, welcher durch die exogene Expression auf eine Reporter-mRNA hervorgerufen wird, zur Folge. Eine Fusion des N-Terminus von TTP mit dem heterologen RNA-Bindeprotein MS2 löst bei exogener Expression spezifisch den beschleunigten Abbau von RNA-Konstrukten aus, die über die entsprechende MS2-Bindestelle verfügen. Die exogene Überexpression des N-Terminus von TTP inhibiert den ARE vermittelten Abbau von Reporter-mRNAs (Lykke-Andersen & Wagner, 2005).

### 1.2.2.3.1 Die Faktoren und Enzyme der Deadenylierungsreaktion

#### 1.2.2.3.1.1 Der PAN (Pan2p/Pan3p)-Komplex

Der PAN-Komplex von *S. cerevisiae* besteht aus den Untereinheiten Pan2p und Pan3p und ist in höheren Eukaryoten bzw. Säugetierzellen konserviert (Boeck *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996; Uchida *et al.*, 2004). PAN2 ist die katalytische Untereinheit und baut in einem distributiven Mechanismus spezifisch Poly(A) exonukleolytisch vom 3'-Ende ab. Bei dieser  $Mg^{2+}$ -abhängigen Reaktion wird 5'-AMP freigesetzt (Uchida *et al.*, 2004). Die C-terminale Domäne von PAN2 ist zu Nukleasen der DEDD-Superfamilie homolog. Enzyme dieser Gruppe enthalten vier stark konservierte Aminosäuren (DEDD), die in 3 Sequenzmotiven (ExoI-III) lokalisiert sind. Der Katalysemechanismus ist von zwei divalenten Kationen abhängig, die über die invarianten Aminosäuren der Exo-Motive gebunden werden (Zuo & Deutscher 2001). Die Aktivität von Pan2p wird durch das Poly(A)-Bindepotein Pab1p (PABPC1 in Säugetierzellen) stimuliert (Sachs & Deardorff, 1992; Lowell *et al.*, 1992; Uchida *et al.*, 2004). Die Untereinheit Pan3 bindet direkt PABPC1, wodurch die Spezifität

und die Affinität von Pan2 zum Substrat gesteigert wird (Uchida *et al.*, 2004). Der PAN-Komplex in *S. cerevisiae* ist nicht essentiell. Die Deletion der PAN-Untereinheiten, einzeln oder in Kombination, hat keinen Einfluss auf die Zellvitalität. Einziger Effekt ist eine Zunahme der *steady-state*-Poly(A)-Schwanzlänge um ca. 20 Nukleotide (Boeck *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1996). Wesentlich massivere Auswirkungen auf die Poly(A)-Schwanzlänge als Folge einer PAN-Deletion konnte anhand der entsprechenden Zellextrakte *in vitro* beobachtet werden (Brown & Sachs, 1998). Der PAN-Komplex ist nicht die dominierende Deadenylase in *S. cerevisiae*. Er katalysiert vielmehr unter der Beteiligung von Pabp1p die sequenzspezifische, primäre Verkürzung der Poly(A)-Schwänze auf eine Länge von 60-80 Nukletiden (*initial trimming*) (Brown & Sachs, 1998; Caponigro & Parker, 1995). In Säugetierzellen ist der Komplex ebenfalls in eine frühe Phase der Deadenylierung involviert (Yamashita *et al.*, 2005). Dass der PAN-Komplex darüber hinaus Anteil an der fortschreitenden Verkürzung der Poly(A)-Schwänze hat, ist anhand von Hefe-Mutanten ersichtlich, bei denen neben CCR4, der katalytischen Untereinheit des CCR4-NOT-Komplexes (siehe unten), zusätzlich PAN2 deletiert wurde. Die verbliebene stark dezimierte Deadenylaseaktivität, welche in *ccr4Δ* noch detektierbar war, konnte in der Doppelmutante *ccr4Δ/pan2Δ* nicht mehr beobachtet werden (Tucker *et al.*, 2001). Beide Untereinheiten sind sowohl in *S. cerevisiae* (Huh *et al.*, 2003) als auch in Säugetierzellen (Uchida *et al.*, 2004, Yamashita *et al.*, 2005) überwiegend im Zytoplasma lokalisiert.

#### 1.2.2.3.1.2 Der CCR4-NOT-Komplex

Die dominierende Deadenylase in *S. cerevisiae* ist der CCR4-NOT-Komplex. Dieser kommt in zwei unterschiedlichen Zusammensetzungen vor. Der kleinere (1,0 MDa), besteht aus den Untereinheiten Ccr4p, Pop2p/Caf1p, fünf NOT-Proteinen (Not1p-Not5p) sowie Caf40p und Caf130p (Chen *et al.*, 2001). Die C-terminale Domäne von Ccr4p weist Homologien zur ExoIII/HAP1-Nukleasefamilie auf. Diese Gruppe von Enzymen ist durch fünf konservierte Sequenzmotive charakterisiert, die u.a. in die Bindung von  $Mg^{2+}$ , welches für die Katalyse essentiell ist, involviert sind (Chen *et al.*, 2002). Der N-Terminus enthält eine hohe Anzahl von Glutaminen, weshalb ihm eine Funktion als Aktivator-domäne in der Transkriptionsregulation zugeschrieben wurde (Collart, 2003; Denis & Chen, 2003). Die Region zwischen den terminalen Domänen ist durch leucinreiche Sequenzwiederholungen (LRR) gekennzeichnet, über die Ccr4p u.a. mit Pop2p interagiert (Liu *et al.*, 1998; Bai *et al.*, 1999; Clark *et al.*, 2004). Pop2p ist homolog zu Nukleasen der RNaseD-Familie, einer Unterfamilie der DEDD-Superfamilie (siehe oben), wobei zwei der vier invarianten

Aminosäuren des aktiven Zentrums nicht konserviert sind (Daugeron *et al.*, 2001). Deletionsmutanten von CCR4 (*ccr4Δ*) und POP2 (*pop2Δ*) wachsen wesentlich langsamer als Wildtypzellen und sind durch eine verminderte Rate der Deadenylierung gekennzeichnet. Damit verbunden ist gleichzeitig eine Verringerung der mRNA-Abbaurrate (Daugeron *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2002). Im Verhältnis zu Ccr4p ist der katalytische Anteil von Pop2p an der Deadenylaseaktivität des CCR4-NOT-Komplexes *in vivo* eher von untergeordneter Bedeutung. Zum einen komplementiert die Überexpression von Ccr4p die Defekte einer *pop2Δ*-Mutation (Tucker *et al.*, 2001 & 2002). Umgekehrt ist dies jedoch nicht der Fall. Außerdem bewirken Punktmutationen, die ausschließlich Aminosäuren des putativen aktiven Zentrums von Pop2p betreffen, keinen Phänotyp. Eine Umwandlung der putativen katalytisch relevanten Aminosäuren von Ccr4p in Alanine löst dagegen die phänotypischen Effekte einer *ccr4Δ*-Mutante aus (Chen *et al.*, 2002). Für Ccr4p und Pop2p konnte unabhängig von den NOT-Untereinheiten eine poly(A)-spezifische 3'-Exonukleaseaktivität *in vitro* nachgewiesen werden. Punktmutationen der putativen katalytisch aktiven Aminosäuren von Ccr4p haben den Verlust der *in vitro*-Nukleaseaktivität zur Konsequenz (Daugeron *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2002). Die Aktivität des CCR4-NOT-Komplexes wird im Gegensatz zu Pan2p (siehe oben) durch Pab1p gehemmt, die *Cap*-Struktur der mRNA hat dagegen keinen Einfluss (siehe unten) (Tucker *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 2003).

Die überwiegende Zahl der Untereinheiten des CCR4-NOT-Komplexes sind in höheren Eukaryoten konserviert, wobei mehrere Varianten von CCR4 vorkommen. Zusätzlich zu den CCR4-Homologen, welche die Nukleasedomäne und den LRR enthalten, existieren paraloge Versionen, bei denen der LRR fehlt. Letztere werden in drei unterschiedliche Familien gruppiert (Dupressoir *et al.*, 2001). Repräsentant einer dieser Familien ist Nocturnin, das in der Retina von *Xenopus* im circadianen Rhythmus exprimiert wird (Green & Besharse, 1996). Für Nocturnin und das humane CCR4-Homologe konnte eine poly(A)-spezifische 3'-Exonukleaseaktivität *in vitro* gezeigt werden (Chen *et al.*, 2002; Baggs & Green, 2003). Humane Zellen enthalten außerdem eine zweite Version von CAF1 (CALIF), wobei eine Identität von 75% zwischen beiden Proteinen besteht (Albert *et al.*, 2000). Homologe Proteine zu Not5p konnten weder in humanen Zellen noch in *D. melanogaster* identifiziert werden (Albert *et al.*, 2001; Temme *et al.*, 2004). Eine erste Charakterisierung der *in vivo*-Funktion des CCR4-NOT-Komplexes in höheren Eukaryoten erfolgte in S2-Zellen von *D. melanogaster*. Ausgangspunkt war die Verringerung der Expression verschiedener Untereinheiten des CCR4-NOT-Komplexes durch RNAi. Der *knockdown* von dCcr4, dCaf1 und dNot2 hatte Verschiebungen in der *steady-state*-Poly(A)-Längenverteilung zur Folge.

Unter gleichzeitiger Verringerung des Anteils von Poly(A), dessen Länge geringer als 40 Nukleotide war, nahm die Population von Poly(A)-Schwänzen mit einer Länge größer als 70 Nukleotide zu. Dieser Effekt war am deutlichsten für den *Caf1-knockdown*, am schwächsten dagegen für den *Ccr4-knockdown* ausgeprägt. Des Weiteren wurde die rapide Deadenylierung der *Hsp70*-mRNA, welche für den Abbau des Transkripts in der Erholungsphase nach einem Hitzeschock kennzeichnend ist, durch die Depletion von dCaf1, dCcr4 und dNot2 massiv beeinträchtigt (Temme *et al.*, 2004). Ähnliche Auswirkungen auf die *steady-state*-Poly(A)-Längenverteilung sowie die verminderte Rate der Deadenylierung der *Hsp70*-mRNA konnten in homozygoten *Ccr4-knockout*-Tieren detektiert werden (Temme *et al.*, 2004).

#### 1.2.2.3.1.3 Poly(A)-specific ribonuclease (PARN)

Eine weitere Deadenylase, die in vielen Eukaryoten, wie Säugetieren, einigen Pilzen (*S. pombe*, *N. crassa*) und *C. elegans*, aber nicht in *S. cerevisiae* und *D. melanogaster*, vorkommt, ist PARN. Das Enzym gehört der DEDD-Superfamilie an. Es enthält die für diese Gruppe von Nukleasen charakteristischen konservierten Aminosäuren (DEDD), welche über drei Sequenzmotive (ExoI-III) verteilt und in die Bindung des für die Katalyse essentiellen  $Mg^{2+}$  involviert sind (Ren *et al.*, 2002). PARN baut Poly(A) spezifisch und distributiv vom 3'-Ende ab, wobei 5'-AMP freigesetzt wird. Neben  $Mg^{2+}$  sind eine freie 3'-OH Gruppe sowie monovalente Kationen ( $K^+$ ) für diese Reaktion erforderlich. Für PARN wurde eine oligomere Struktur postuliert, welche überwiegend aus drei Untereinheiten bestehen soll (Körner & Wahle, 1997; Martinez *et al.*, 2000). Die Stimulierung der katalytischen Aktivität durch die *Cap*-Struktur ( $m^7GpppN$ ) der mRNA ist ein wesentliches Charakteristikum von PARN, das dieses Enzym von anderen Deadenylasen unterscheidet. Die direkte Bindung hat die Umwandlung des distributiven in einen prozessiven Abbaumodus zur Konsequenz, wenn das *Cap* Bestandteil der Substrat-mRNA ist. Freies  $m^7GpppG$  hingegen wirkt als nicht-kompetitiver Inhibitor, (Dehlin *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000; Martinez *et al.*, 2001). Die Aktivität von PARN wird *in vitro* durch das zytoplasmatische Poly(A)-Bindeprotein (PABPC1) gehemmt. Unter Standardbedingungen (100 mM KCl) blockiert ein Überschuss von PABPC1 gegenüber Poly(A) die Deadenylierung von mRNA. In Gegenwart äquimolarer Mengen dagegen erfolgt die Degradation des Poly(A)-Schwanzes langsamer unter Anreicherung von Intermediaten, die sich in der Länge um ca. 30 Nukleotide unterscheiden. Ein nahezu identisches Abbaumuster kann ebenfalls bei der Deadenylierung von mRNAs durch HeLa-Zellextrakte detektiert werden, wobei die Bildung der Intermediate sowie eine effektive Degradation von der *Cap*-Struktur abhängt (Dehlin *et al.*, 2000; Gao *et al.*, 2000).

Über verschiedene Experimente mit Oozyten von *Xenopus* erfolgte der Nachweis, dass xPARN in die *default deadenylation* von maternaler mRNA (siehe oben) involviert ist (Körner *et al.*, 1998; Copeland & Wormington, 2001). Diese Reaktion wird zusammen mit der Oozytenreifung, dem abschließenden Schritt der Oogenese, durch Progesteron induziert. Kennzeichnend ist dabei der Übergang von der Prophase I in die Metaphase II. Die mit dieser Teilung verbundene Auflösung des Zellkernes hat die Freisetzung des im Kern lokalisierten xPARN ins Zytoplasma zur Konsequenz. Dort wird das Enzym vermutlich durch eine Phosphorylierung aktiviert. In entkernten Oozyten kann daher, der durch Progesteron induzierte, Poly(A)-Abbau nicht mehr nachgewiesen werden (Fox & Wickens, 1990; Varnum *et al.*, 1992). Dieser Defekt wird durch die Injektion einer PARN-kodierenden mRNA aufgehoben bzw. komplementiert, wobei der Nachweis anhand eines ko-injizierten Reporter-RNA-Konstruktes erfolgte. Andererseits führt die Injektion von Anti-PARN-Antikörpern in progesteronbehandelte Oozyten zur Aufhebung der Deadenylierung von endogenen mRNAs (Körner *et al.*, 1998).

Indirekte Anhaltspunkte für eine Beteiligung von PARN am mRNA *turnover* in somatischen Zellen ergeben sich u.a. aus funktionellen oder strukturellen Interaktionen mit ARE-BP (siehe oben). So fördert TTP die von PARN katalysierte Deadenylierung von mRNAs *in vitro*, wobei dieser stimulierende Effekt die Bindung des TTP an das ARE erfordert (Lai *et al.*, 2003). Weiterhin wird PARN aus Zellextrakten mit KSRP und RAUH koimmunopräzipitiert. Beide Proteine sind mit AREs verschiedener mRNAs assoziiert und fördern deren Abbau. Während KSRP als universeller Faktor alle ARE-Klassen (siehe oben) direkt bindet, ist RAUH nur mit dem ARE der Urokinase-Plasminogen-Aktivator-mRNA assoziiert (Gherzi *et al.*, 2004; Tran *et al.*, 2004).

Hinweise für eine Beteiligung von PARN am NMD (siehe oben) basieren u.a. auf Experimenten, bei denen die Reduktion der Expression durch RNAi mit dem Anstieg der *steady-state*-Menge einer mRNA mit *in frame*-Stopkodon korreliert. In diesem Zusammenhang wurde jedoch nicht gezeigt, dass die Stabilisierung des NMD-Substrats auf einer verminderten Rate der Deadenylierung basiert (Lejeune *et al.*, 2003).

*A. thaliana* enthält ein hPARN-Homologes, welches ubiquitär exprimiert wird. Ein zweiter ORF, welcher ebenfalls Homologien zu hPARN aufweist, ist durch Aminosäureaustausche an drei der vier konservierten Positionen des aktiven Zentrums gekennzeichnet und daher vermutlich nicht funktionell (Reverdatto *et al.*, 2004). In *A. thaliana* ist PARN ein essentieller Faktor der Embryogenese. Der *knockout* des Enzyms ist mit einer massiven Verzögerung der Embryonalentwicklung verbunden, wobei sich dieser Effekt vor allem in morphologischen

Unterschieden äußert (Reverdatto *et al.*, 2004; Chiba *et al.*, 2004). Während die Embryonen der Mutanten sich morphologisch in einer frühen Phase der Entwicklung befinden (Herz-Stadium), haben die der Wildtyppflanzen ihre Entwicklung bereits abgeschlossen. Letztlich führt diese Verzögerung zum Absterben der Embryonen, da diese keine Toleranz gegenüber der Vertrocknung entwickeln. Deren Erwerb erfolgt erst in einer späten Phase der Embryogenese. Der Zusammenhang zwischen diesen phänotypischen Effekten und der katalytischen Aktivität von AtPARN konnte dabei jedoch nicht aufgeklärt werden (Reverdatto *et al.*, 2004). Eine weitere PARN-Mutante von *A. thaliana* resultiert aus einem *frame shift* und ist durch eine stark verminderte Expression des funktionellen Enzyms, das in diesem Fall durch differentielles Spleißen gebildet wird, gekennzeichnet. Diese Mutante weist eine Hypersensitivität gegenüber ABA in verschiedenen Entwicklungsstadien (z.B. Keimung) sowie massive Änderungen im Expressionsmuster verschiedener stressinduzierter Gene auf (Nishimura *et al.*, 2005).

### 1.3 Zielstellung der Arbeit

PARN ist eine poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuklease. Auf Grundlage der Kristallstrukturen einer C-terminal verkürzten Variante von PARN (PARN<sub>n</sub>[1-430]) in substratfreier sowie substratgebundener Form sollten wesentliche strukturelle Voraussetzungen und Bedingungen für den Katalysemechanismus, die Substratbindung bzw. Poly(A)-Spezifität sowie die Oligomerisierung untersucht werden. Die Analysen erfolgten dabei mit entsprechenden Punkt- und Deletionsmutanten des vollständigen Enzyms.

In *Xenopus* konnte eine Beteiligung von PARN an der sequenzunspezifischen Deadenylierung von mRNA während der Oozytenreifung sowie der frühen Embryonalentwicklung nachgewiesen werden (*default deadenylation*). Welchen Anteil PARN am mRNA-*turnover* in somatischen Zellen hat, wurde dagegen noch nicht detaillierter untersucht. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit bestand daher in einer ausführlichen Charakterisierung der *in vivo*-Funktion von PARN, wobei der *knockdown* des Enzyms in HeLa-Zellen durch RNAi als allgemeiner experimenteller Ansatz diente.

Die in *S. cerevisiae* identifizierten kurzen Poly(A)-Schwänze von snRNAs, snoRNAs sowie rRNAs sind auf die Aktivität der nukleär lokalisierten Poly(A)-Polymerasen Trf4p bzw. Trf5p zurückzuführen. Beide Enzyme sind in Verbindung mit dem Exosom an der Qualitätskontrolle verschiedener RNA-Spezies beteiligt. Erste Untersuchungen sollten zeigen, ob PARN als poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuklease in einen analogen Prozess in Säugetierzellen involviert ist.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) Codon <sup>+</sup>	<i>E. coli</i> B, F <sup>-</sup> , <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> ( <sub>r<sub>B</sub></sub> - <sub>m<sub>B</sub></sub> -), <i>galλ</i> (DE3) [Codon <sup>+</sup> ]
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>E. coli</i> K12, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> <sup>-</sup> , {F', <i>proAB</i> , <i>lacI</i> <sup>q</sup> ZΔM15, Tn10 (Tet) <sup>r</sup> }

#### 2.1.2 Zelllinien

##### HeLa-Zellen

Diese Zelllinie leitet sich von menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms ab. Sie sind mit dem humanen Papillomavirus befallen und durch eine hohe Teilungsrate sowie durch Unsterblichkeit gekennzeichnet (Gey *et al.*, 1952; Scherer *et al.*, 1953).

##### HeLa<sub>Tet-Off</sub>-Zellen

(Clontech). HeLa-Zelllinie, die eine regulierte Genexpression ermöglicht. Die Zellen exprimieren stabil den Transkriptionsaktivator tTA (*tetracycline-controlled transactivator*). Die Promotorbindung von tTA wird in Gegenwart von Doxycyclin aufgehoben, wodurch die Transkription der entsprechenden Zielsequenz verhindert wird (Gossen & Bujard, 1992).

#### 2.1.3 Kulturmedien

##### LB (Luria Bertani)

1% (w/v) Bactotrypton, 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) NaCl, Einstellung pH 7,5 mit konz. NaOH-Lösung, Zur Herstellung von LB-Agar wurden 1,2 % (w/v) Agar zugesetzt.

##### DMEM

(Gibco/BRL). Es kamen sowohl das komplette Flüssigmedium als auch die pulverförmige Variante, dessen Verarbeitung nach den Angaben des Herstellers erfolgte, zur Anwendung. Frisch hergestelltes Medium wurde durch eine OE 66-Membran (Schleicher & Schüll) sterilfiltriert.

Opti-MEM (GIBCO/BRL). Dieses Medium wurde ausschließlich für die Transfektion von siRNAs in HeLa-Zellen benutzt.

Fötales Kalbsserum (FBS) (Biochrom)

#### 2.1.4 Enzyme, Proteine und Antikörper

Alkalische Phosphatase	CIP, Roche Diagnostics
bovine Poly(A)-Polymerase (PAP 513)	Temme, C. 1998
BSA	Merck
DNaseI	Roche Diagnostics
hInterleukin-1 $\alpha$	<i>E. coli</i> , Calbiochem
His <sub>6</sub> -humanPARN	<i>E. coli</i> , C. Körner, diese Arbeit
humanPARN-Antikörper	Kaninchen, Dehlin, E. 2003
humanPARN-Antikörper (affinitätsgereinigt)	Kaninchen, diese Arbeit
methyliertes BSA	C. Körner
M-MLV-RNaseH <sup>-</sup> Reverse Transkriptase	Promega
PreScission <sup>TM</sup> Protease	Amersham Biosciences
Proteinase K	Merck
Proteinstandard SDS-6H	Roche Diagnostics
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Haybaid AGS, PeqLab
Restriktionsendonukleasen und Puffer	New England Biolabs (NEB)
RNase A	Roth
RNase T1	Sigma Aldrich
RNase-Inhibitor (RNasin)	Promega
Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper HRP	DAKO
Kaninchen-anti-Maus-Antikörper HRP	DAKO
SP6-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	NEB
T4-Polynukleotidkinase	NEB
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	A. Jenny
Tubulin-Antikörper	Sigma Aldrich

### 2.1.5 Nukleinsäuren und Nukleotide

( $\alpha$ - <sup>32</sup> P) 3'-dATP (Cordycepin)	NEN
( $\alpha$ - <sup>32</sup> P) ATP, ( $\alpha$ - <sup>32</sup> P) UTP	Amersham Pharmacia
( $\gamma$ - <sup>32</sup> P) ATP	Amersham Pharmacia
( $\alpha$ - <sup>32</sup> P) dCTP	Amersham Pharmacia
DNA-Größenstandart	1 kb Ladder, Invitrogen
dNTPs, NTPs	Amersham Pharmacia
Oligo(A) <sub>20</sub>	U. Kühn
Poly(A)	Roche Diagnostics
rRNA ( <i>E. coli</i> )	16S und 23S, Roche Diagnostics
Hefe-RNA	Merck

### 2.1.6 Plasmide

p $\beta$ -glEx.3	(Thermann <i>et al.</i> , 1998)
p $\beta$ -globin-NS39	(Thermann <i>et al.</i> , 1998)
p $\beta$ -globin-wt	(Thermann <i>et al.</i> , 1998)
p $\beta$ -globin-wt+300+3e	(Neu-Yilik <i>et al.</i> , 2001)
pBR322	New England Biolabs
pBKS- $\beta$ -Globin	(Winzen <i>et al.</i> , 1999)
pEGFP-N1	Clontech
pEMBL8 <sup>(+)</sup> -U5	Hartmut, K., 2003
pFLAG-hUpf1	Gehring, N., 2004
pFLAG-hUpf2	Gehring, N., 2004
pFLAG-hUpf3	Gehring, N., 2004
pFLAG-hDcp2	Gehring, N., 2004
pGMMCS 645295	(Körner <i>et al.</i> , 1998)
pGEX-6p-1 PARNn	(Wu <i>et al.</i> , 2005)
pHU1a	(Patton & Wieben, 1987)
pMRG3U2	(Jacobson <i>et al.</i> , 1993)
pSP6-L3pre(A) <sub>80</sub>	(Kerwitz <i>et al.</i> , 2003)
pTET-BBB	(Xu <i>et al.</i> , 1998)
pTET-BBB-IL8 <sub>ARE</sub>	(Winzen <i>et al.</i> , 1999)

pTET-BBB-c-fos <sub>ARE</sub>	(Xu <i>et al.</i> , 1998)
pTET-BBB-GM-CSF <sub>ARE</sub>	(Xu <i>et al.</i> , 1998)
pUC13-U4	Hartmut, K., 2003
pUC13-U6	Hartmut, K., 2003

### 2.1.7 Oligonukleotide

Oligonukleotide, die für PCR, Sequenzierung verwendet bzw. als siRNAs sowie als Sonden in Northern-Hybridisierungen eingesetzt wurden, sind in der Tab. 1 aufgeführt. DNA-Oligonukleotide wurden ausschließlich von Invitrogen, siRNAs von IBA bezogen.

**Tab. 1: Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide**

**A:** Folgende Oligonukleotide wurden als 5'-markierte Sonden in Northern-Hybridisierungen eingesetzt:

Name	(nt)	Sequenz (5'-3')
5,8S rRNA	58	Cgg ggC CgC AAg TgC gTT CgA AgT gTC gAT gAT CAA TgT gTC CTg CAA TTC ACA TAA A
18S rRNA	62	TCA Cag ACC TgT TAT TgC TCA ATC TCg ggT ggC TgA Acg CCA CTT gTC CCT CTA AgA AgT Tg
28S rRNA	58	CTC gCC CAT CTC TCA ggA CCg ACT gAC CCA TgT TCA ACT gCT gTT CAC Atg gAA CCC T
hITS1_5'	51	Cgg ggA CCg CTC CCC gCC gCC CgC Cgg CCC CAC gAC Acg CgC ACA CCA ACg
hITS1_3'	51	Agg TCg ATT Tgg CgA ggg CgC TCC CgA CgA CgC ACC ggg Agg Agg CCC TTC
hITS2_3'	50	Cgg ACg gAC ggA Cgg AAT CgC gCC ggC CCg ACC gCC CgC CCg ACg CTC Cg
U3-probe	70	gCA ACg CCA gAA AgC Cgg CTT CAC gCT CAg

**B:** Folgende Oligonukleotide wurden für PCRs, Sequenzierungen oder als DNA-Linker benutzt\*):

Name	(nt)	Sequenz (5'-3')
28SrRNAhsfor1	21	CCT ACT gAT gAT gTg TTg TTg
28SrRNAhsfor2	19	ATA gCC ggT CCC CCg CCT g
645295 A	20	gTg Agg ATC TAT TgA Agg gT
645295 B	20	CCT TCA ATA gAT CCT CAC CA
645295 D	20	CAA gTC Tgg TCC TTC CAA gT
645295 G	19	TTT CCA ATT CCg CAA ggg A
645295 H	20	AAg TCT CAA CAT gAA TgC CT
645295 I	19	TgC CTg Cgg ACT TAA gTg A
AUTNFfor	37	gAT CgA TTT ATT ATT TAT TTA TTA TTT ATT TAT TTA G
AUTNFrev		gAT CCT AAA TAA ATA AAT AAT AAA TAA ATA ATA AAT C
del(134-269)for	51	ATA TAT <u>ggT CTC</u> ACC ATA TTT TTC TA <sub>g</sub> AgT CAT TCA CgC CAT TgC TAA TTC
del(134-269)rev	47	ATA TAT <u>ggT CTC</u> TAT ggA ATT CCA TTT CgA AAA ACT TTA TTA AAA TC

del(175-245)for	47	ATA TAT <u>ggT CTC</u> ATC CTg AAg AAg AAC gCA AAA gAA gAg AgC AgC Ag
del(175-245)rev	41	ATA TAT <u>ggT CTC</u> TA <sub>g</sub> gAA TC <sub>g</sub> TgA CA <sub>g</sub> gAC ATT TT <sub>g</sub> AA <sub>g</sub> Tg
(dT) <sub>12</sub>	12	TTT TTT TTT TTT
(dT) <sub>30</sub>	30	TTT
GAPDH-3'	19	GCC ATg Tgg gCC ATg Agg T
GAPDH-5'	20	TTT ggT CgT ATT ggg CgC CT
hGAPDHf_2	22	CCT CAA CgA CCA CTT TgT CAA G
HAtagfor	42	TAT ggg TAC CAT gTA CCC CTA CgA CgT gCC CgA CTA CgC CCA
HAtagrev	42	TAT ggg CgT AgT Cgg gCA CgT CgT Agg ggT ACA Tgg TAC CCA
hpri-miR-21for	25	CTT Tag gAg CAT TAT gAg CAT TAT g
hpri-miR-21rev	23	gTC ATg AAg ACT ATC CCC ATT TC
L3pre+1ffw	23	GAA TAC AAg CTT ggg CTg CAg gT
NdeI 645295	29	AgT gTC <u>gCA TAT ggA</u> gAT AAT Cag gAg CA
Oligo(dT) anchor	30	gCg AgC TCC gCg gCC gCg TTT TTT TTT TTT
PARNGFPfor	35	TCC ggC <u>ggT CTC</u> gCT gAA Tgg AgA TAA TCA ggA gC
PARNGFPprev	35	CCC TCA <u>ggT CTC</u> CgA TCC CAT gTg TCA ggA ACT TC
SeqbG11	21	ggC AAC gTg CTg gTT ATT gTg
SeqbG12	20	TCC AAC ACA CTA TTg CAA Tg
T7	16	
U1for	18	ACT TAC CTg gCA ggg gAg
U1rev	42	TTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg AgA Cag ggg AAA gCg CgA ACg
U2for	19	ATC gCT TCT Cgg CCT TTT g
U2rev	42	TTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg AgA ggg TgC ACC gTT CCT ggA
U4for	18	AgC TTT gCg Cag Tgg CAg
U4rev	42	TTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg AgA AAA AAT TCA gTC TCC gTA
U6for	19	gTg CTC gCT TCg gCA gCA C
U6rev	42	TTA ATA CgA CTC ACT ATA ggg AgA AAA AAT ATg gAA CgC TTC
XhoI 645295	29	AgT ACT CgA <u>gCA</u> gCg gTT TgC TgC CCT CA

\*) Die Schnittstellen für Restriktionsenzyme sind unterstrichen.

C: Die nachfolgend angegebenen Oligonukleotide wurden für die *in vitro* Mutagenese von PARN verwendet\*):

Name	(nt)	Sequenz (5'-3')
PF31A	39	s: CTT CgC CAT CgA Tgg ggA <u>ggC CTC</u> Agg AAT CAg TgA Tgg as: CCA TCA CTg ATT CCT <u>gAg gCC</u> TCC CCA TCg ATg gCg AAg
PS32A	39	s: CgC CAT CgA Tgg ggA gTT TgC Cgg AAT CAg TgA Tgg ACC as: ggT CCA TCA CTg ATT CCg <u>gCA</u> AAC TCC CCA TCg ATg gCg
PI34A	39	s: gAT ggg gAg TTT TCA ggA <u>gCC</u> AgT gAT ggA CCT TCA gTC as: gAC TgA Agg TCC ATC ACT <u>ggC</u> TCC TgA AAA CTC CCC ATC
PF115A	40	s: CAg AgC TCC AgC ATT gAC <u>gCT</u> CTA gCA AgC CAg ggA TTT g as: CAA ATC CCT ggC TTg CTA <u>gAg CgT</u> CAA TgC Tgg AgC TCT g
PF123A	40	s: gCA AgC CAg ggA TTT gAT <u>gCA</u> AAT AAA gTT TTT CgA AAT g as: CAT TTC gAA AAA CTT TAT TTg CAT CAA ATC CCT ggC TTg C
PF127A	41	s: gAT TTg ATT TTA ATA AAg TTg CgC gAA ATg gAA TTC CAT AT as: ATA Tgg AAT TCC ATT TCg <u>CgC</u> AAC TTT ATT AAA ATC AAA TC
PH287A	41	s: Cgg gAA AAC TTg TTA TTg <u>gAg CCA</u> ATA TgC TCT Tgg Acg TC as: gAC gTC CAA gAg CAT ATT <u>ggC</u> TCC AAT AAC AAg TTT TCC Cg
PN288A	41	s: gAA AAC TTg TTA TTg gAC ACg CCA TgC TCT Tgg ACg TCA Tg as: CAT gAC gTC CAA gAg CAT <u>ggC</u> gTg TCC AAT AAC AAg TTT TC
PL291A	43	s: gTT ATT ggA CAC AAT ATg CTC <u>gCg</u> gAC gTC ATg CAC ACA gTT C as: gAA CTg TgT gCA TgA CgT <u>CCg CgA</u> gCA TAT TgT gTC CAA TAA C
PK326A	40	s: CCC AgA CTC TTg gAT ACT <u>gCC</u> TTg ATg gCC AgC ACA CAA C as: gTT gTg TgC Tgg CCA TCA <u>Agg</u> CAg TAT CCA AgA gTC Tgg g

PH377A	40	s: CAC AgC CTC TgA ACA ACT CgC <u>ggA</u> ggC Agg CTA CgA TgC C as: ggC ATC gTA gCC TgC CTC <u>CgC</u> gAg TTg TTC AgA ggC TgT g
M/ΔL	46	s: CCA TAT TTT TCT CgA gTC ATT CAC gCC ATT gCT AAT TCg ggA AAA C as: gTT TTC CCg AAT TAg CAA Tgg CgT gAA TgA CTC gAg AAA AAT ATg g

\*) Dargestellt sind jeweils *sense* (s) und *antisense* (as) Oligonukleotid, veränderte Aminosäurekodons sind unterstrichen.

D: Folgende Oligoribonukleotide wurden als siRNAs verwendet\*):

Name	Gen	Sequenz (5'-3')
heIF4E	heIF4E	s: gCA AAC CUg Cgg CUg AUC U dT dT as: AgA UCA gCC gCA ggU UUg C dT dT
K	dCAF	s: CCU ggA ggA ggA gUU CCg C dT dT as: GCg gAA CUC CUC CUC CAg g dT dT
Luci	Luciferase	s: CgU ACg Cgg AAU ACU Ucg A dT dT as: UCg AAg UAU UCC gCg UAC g dT dT
PI	hPARN	s: gUA CCA ggC CAU AgA ggA g dT dT as: CUC CUC UAU ggC CUg gUA C dT dT
PII	hPARN	s: Agg CAU UCA UgU UgA gAC U dT dT as: AgU CUC AAC AUg AAU gCC U dT dT
P ExI	hPARN	s: gUg AAU UCC gUg UUg CUC UUg as: AgA gCA ACA Cgg AAU UCA CUg
P ExII	hPARN	s: gUU gCA gCC CUC ggU UAg UCU as: ACU AAC gCA ggg CUg CAA CUg
Upf1-2	hUpf1	s: gAU gCA gUU CCg CUC CAU U dT dT as: AAU ggA gCg gAA CUg CAU C dT dT

\*) Dargestellt sind jeweils *sense* (s) und *antisense* (as) Oligoribonukleotid. dT: Desoxythymidinnukleotid

### 2.1.8 Säulen und Säulenmaterialien

Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia
MonoQ	Amersham Pharmacia
Ni-NTA-Agarose	Qiagen
Sephadex G-50	Amersham Pharmacia
Superdex 200 HS	Amersham Pharmacia

### 2.1.9 Feinchemikalien

Alle Standardchemikalien wurden in der Qualität p.A. von Merck, Sigma Aldrich oder Roth bezogen.

40% Acrylamid/bis-Acrylamid (19:1)	Accugel, National Diagnostics
40% Acrylamid	Bio-Rad

Agarose	Invitrogen
Benzamidin	Sigma Aldrich
Bis-Acrylamid	Merck
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck
DEPC	Sigma Aldrich
DTT	Gerbu
Glycogen	Roche Diagnostics
Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	peQLab
Leupeptin-Hemisulfat	Sigma Aldrich
Pepstatin	Roche Diagnostics
SDS	Fluka
Nonidet P-40	Fluka
Pepstatin A	Fluka
Phenol	Aqua-Roti-Phenol, Roth
Phenol, TE-gesättigt	Roti-Phenol, Roth
PMSF	Merck
Ponceau S	Sigma
Reagenzien für Bakterienmedien und Platten	Gibco
Reagenzien für HeLa-Zellkultur	Gibco
TEMED	Merck
Tween 20	Merck

#### 2.1.10 Systeme

Big Dye <sup>TM</sup> Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	PE Applied Biosystems
PCR Purification Kit	Roche
Plasmid Midi Kit	Qiagen
QuickPrep <i>micro</i> mRNA Purification Kit	Amersham Biosciences

#### 2.1.11 Sonstiges

Biorad Protein Assay	Proteinbestimmung nach Bradford (Biorad)
Blotmembran	Protran Nitrozellulose, Schleicher & Schüll
Dialyseschläuche	Serva

Membranfilter	RC 58, Porengröße 0,2 $\mu\text{m}$ , Schleicher & Schüll
PhosphoImager-Screens	Molecular Dynamics, Fuji
Röntgenfilme	Scientific Imaging Film X-Omat AR, Kodak
Scintillationscocktail	Lumasafe <sup>TM</sup> Plus, Lumac LSC
Western blot-Detektion	Super Signal, Pierce

## 2.2 Mikrobiologische Methoden

Allgemeine mikrobiologische Methoden, wie die Sterilisierung von Lösungen und Gegenständen, die Kultivierung von *E. coli* in Medien bzw. auf selektiven Agarplatten, die Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen sowie deren Transformation durch Elektroporation wurden anhand von Standardprotokollen durchgeführt.

### 2.2.1 Expression von PARN sowie der Punkt- und Deletionsmutanten von PARN

Die verschiedenen Expressionsplasmide (ca. 50 ng) wurden in *E. coli* BL21 (DE3) Codon<sup>+</sup> durch Elektroporation transformiert. Mit den transformierten Zellen wurde eine Vorkultur von 25 ml LB-Medium, welche 100  $\mu\text{g/ml}$  Ampicillin und 30  $\mu\text{g/ml}$  Chloramphenicol enthielt, angesetzt und ü.N. bei 37°C unter schütteln inkubiert. Mit 8 ml dieser Vorkultur wurden 400 ml LB-Medium, welches mit den entsprechenden Antibiotika versetzt war, angeimpft und bis zu einer OD<sub>600nm</sub> von 0,4 bei 37°C inkubiert. Die weitere Kultivierung erfolgte dann bei 25°C. Die Expression wurde bei einer OD<sub>600nm</sub> von 0,5-0,6 durch die Zugabe von IPTG (100  $\mu\text{M}$  Endkonzentration) induziert. Nach weiteren 5 Stunden Inkubation bei 25°C erfolgte die Ernte der Zellen durch Zentrifugation bei 4000xg für 10 min. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

## 2.3 Zellkultur-Methoden

### 2.3.1 Kultivierung von HeLa-Zellen

Die Kultivierung von HeLa-Zellen erfolgte in DMEM-Medium mit 10% (v/v) hitzeinaktiviertem FCS und einer Penicillin/Streptomycin-Lösung (1xPEST, GIBCO) bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> (Brutschrank). Standardmäßig wurden 25 cm<sup>2</sup>- oder 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflaschen mit 5 bzw. 15 ml Medium verwendet. Für experimentelle Ansätze dagegen erfolgte die Anzucht in 6 well-Platten oder in 5 cm- bzw. 10 cm-Petrischalen. Für Immunfluoreszenzanalysen kamen außerdem 24 well-Platten zur Anwendung. Pro well wurden dabei 0,5 ml bzw. 2 ml, für die Petrischalen entsprechend 4 und 10 ml Medium benutzt. Alle 3-4 Tage oder

beim Erreichen einer Zelldichte von ca. 100% erfolgte eine Neuaussaat, wobei die Adhärenz durch eine Behandlung mit Trypsin (GIBCO) aufgehoben wurde. Nach der Entfernung des Mediums und einem Waschschrift mit reichlich PBS wurde pro 25 cm<sup>2</sup> Kulturfläche 0,5 ml Trypsin-Lösung zugegeben und so lange bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen durch ein leichtes Anschlagen von der Oberfläche abtrennen ließen. Mit 10% der im Medium resuspendierten Zellen wurde die neue Kultur angeimpft.

#### **Phosphatpuffer (PBS), pH 7,3**

30 mM KCl  
137 mM NaCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### **2.3.2 Transfektion von HeLa-Zellen**

#### **2.3.2.1 Transfektion von siRNAs mit OligofectAMIN™**

Durch die Transfektion von siRNAs wurde die Expression verschiedener Proteine reduziert. Die siRNAs (Tab. 1D) wurden aus zwei synthetischen Oligonukleotiden (IBA), welche jeweils aus 19 vollständig komplementären Ribonukleotiden sowie 2 am 3'-Ende gelegenen Desoxythymidinen bestanden, durch eine Hybridisierungsreaktion hergestellt. Diese erfolgte mit 20 µM der Einzelstränge in 30 mM HEPES pH 7,4, 100 mM Kaliumacetat und 2 mM Magnesiumacetat durch Erhitzen bei 95°C für ca. 5 min und die anschließende Inkubation bei 37°C für ca. 1 Stunde. Die Lösung wurde bei -20°C gelagert. Die beiden Desoxythymidine bildeten dabei jeweils einen 3'-Überhang. Die *antisense*-Sequenz des RNA-Doppelstranges ist komplementär zur entsprechenden mRNA und sollte im Bereich ab 50 Nukletide stromabwärts vom Startkodon hybridisieren. Die Sequenz wurde dabei z.T. so gewählt, dass die zwei Desoxythymidine an der Paarung beteiligt sind.

In Abhängigkeit des experimentellen Ansatzes betrug die Zelldichte am Tag der Transfektion 15-50%, wobei die Aussaat 12-17 Stunden zuvor erfolgte (0,25-0,75x10<sup>6</sup> Zellen pro 10 cm-Petrischale). Für eine 10 cm-Petrischale wurden 60 µl siRNA-Lösung (20 µM) mit 1,050 ml Opti-MEM gemischt. Parallel dazu wurden 18 µl OligofectAMIN™ und 90 µl Opti-MEM gemischt. Beide Lösungen wurden nach einer 5-minütigen Inkubation bei RT vereinigt und für weitere 15 Minuten bei RT aufbewahrt. Vor der Zugabe dieser Mischung zu den Zellen wurden diese zweimal mit jeweils 5 ml Opti-MEM gewaschen sowie 3,8 ml Opti-MEM pro Petrischale vorgelegt. Die Transfektionslösung wurde anschließend gleichmäßig und tropfenweise über die gesamte Fläche der Petrischale verteilt. Nach einer vorsichtigen Durchmischung wurden die Zellen für 4 Stunden im Brutschrank inkubiert und im Anschluss

5 ml DMEM-Medium mit 20 % FCS und 2x PEST dazugegeben. Die Analyse des *knockdowns* erfolgte 72 Stunden nach der Transfektion. Bei Verwendung von 6-*well*-Platten bestanden die Ansätze pro *well* aus 10 µl siRNA-Lösung (20 µM) und 175 µl Opti-MEM bzw. 3 µl OligofectAMIN<sup>TM</sup> und 15 µl Opti-MEM.

Schloss sich eine weitere Transfektion, z.B. mit Plasmid-DNA an, so erfolgte diese generell nach 24 Stunden in der selben 10 cm-Petrischale bzw. im entsprechenden *well* der 6 *well*-Platten unter Verwendung der oben bzw. unter (2.3.2.2) beschriebenen Methode. Für Doppeltransfektionen wurden die Zellen in einer Menge ausgesät, sodass deren Dichte am Tag der zweiten Transfektion 60-80% betrug, wobei die Kalkulation allgemein auf einer Verdopplungszeit von 24 Stunden basierte.

### 2.3.2.2 Transfektion von Plasmid-DNA durch Calciumphosphatfällung

Diese Methode basiert auf der Kopräzipitation von DNA als Folge der kontrollierten Mischung einer Calciumchloridlösung mit einer gepufferten Phosphatlösung. Das Präzipitat wird von den Zellen durch Endocytose aufgenommen. Die Transfektion erfolgte ausschließlich unter Verwendung von 10 cm-Petrischalen, wobei die Zelldichte durchschnittlich 60-70% betrug. Zwei Stunden vor der Prozedur wurde altes Medium (DMEM, 10% (v/v) FCS, 1xPEST) durch frisches ersetzt. Pro Ansatz bzw. 10 cm Petrischale wurden 5-15 µg Plasmid-DNA mit 55 µl einer 2,5 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung gemischt und mit H<sub>2</sub>O auf ein Volumen von 550 µl aufgefüllt. Dieser Mix wurde tropfenweise unter permanentem rühren (*Vortexer*) in 550 µl 2xHEBS-Puffer gegeben. Alternativ kam außerdem 2xBBS zur Anwendung. Im Anschluss an eine 15 bis 20-minütige Inkubation bei RT erfolgte die gleichmäßige und tropfenweise Verteilung dieser Transfektionslösung über die gesamte Fläche der Petrischale. Nach einem vorsichtigen Durchmischen wurden die Zellen für genau 16 Stunden inkubiert. Danach erfolgte die Entfernung des restlichen Präzipitats durch ein zweimaliges Waschen mit DMEM-Medium, welches kein FCS sowie Antibiotikum enthielt. Alternativ wurde außerdem TBS verwendet. In Abhängigkeit des experimentellen Ansatzes wurden die transfizierten Zellen entweder nach einer weiteren Inkubation von ca. 24 Stunden geerntet oder nach ca. 8-10 Stunden neu ausgesät.

**2xHEBS-Puffer (100 ml)**

1,64 g NaCl (280 mM)  
1,19g HEPES (50 mM)  
0,21g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> oder  
0,26g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (1,5 mM)  
pH 7,05 (Einstellung mit HCl)

**2xBBS**

50 mM BES (N, N-bis(Hydroxyethyl)-2-Aminoethansulfonat)  
1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
280 mM NaCl  
pH 6,96

**TBS**

150 mM NaCl  
10 mM Tris/HCl, pH 7,5

**2.3.3 Immunfluoreszenz von PARN in HeLa-Zellen**

Für Immunfluoreszenzen erfolgte die Kultivierung der HeLa-Zellen in 24 *well*-Platten, die vor dem Animpfen mit sterilisierten *cover slips* (Abflammen mit 100% Ethanol) bestückt wurden. In den *wells* erfolgte ebenfalls, soweit nicht gesondert erwähnt, der überwiegende Teil der Inkubationsschritte (Fixierung, Permeabilisierung, Blocken sowie alle Waschschrte). Mit dem Erreichen der entsprechenden Zelldichte oder nach Ablauf des experimentellen Ansatzes wurden die Zellen, nach einem Waschschrte mit PBS (500 µl), in 4% (w/v) Paraformaldehyd (400 µl) für 20 Minuten bei RT fixiert. Nach dem zweimaligen Waschen mit PBS (je 500 µl) schloss sich die Permeabilisierung mit 0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS (500 µl) für 20 Minuten bei RT an. Zur Absättigung von unspezifischen Bindestellen erfolgte danach eine Inkubation mit 1 ml 10% (v/v) FCS in PBS (*blocking*-Lösung) für mind. 30 Minuten. Die Deckgläschen wurden nach dem Blocken aus den *wells* entnommen, mit 30 µl des in *blocking*-Lösung 1:500 verdünnten Anti-PARN-Antikörpers bedeckt und für mind. 1 Stunde bei RT inkubiert. Nach dem viermaligen Waschen mit PBS (500µl) für jeweils 10 Minuten folgte die Zugabe des sekundären Antikörpers (FluoroLink™Cy™3 labelled goat anti-rabbit IgG (H+L), *Amersham Pharmacia Biotech*). Dieser wurde in *blocking*-Lösung 1:250 verdünnt. Die Inkubation erfolgte mit 30 µl pro Deckgläschen für 45 Minuten bei RT im Dunkeln. Anschließend wurde weitere vier mal mit PBS (500 µl) für jeweils 10 Minuten im Dunkeln gewaschen. Die Deckgläschen wurden abschließend auf einem Objektträger befestigt. Dazu wurde die Zellseite auf 5 µl Moviol (Calbiochem) gelegt. Die Aushärtung erfolgte ü. N. bei 4°C.

**Phosphatpuffer PBS (10x), pH 7,4**

**A:** 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,3 M NaCl  
**B:** 0,2 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1,3 M NaCl

Lösung **A** vorlegen und mit Lösung **B** einen pH-Wert von 7,4 einstellen

## 2.4 Protein-Methoden

Allgemeine Praktiken wie Dialyse, Konzentrationsbestimmung, die Aufkonzentrierung von Proteinlösungen sowie die elektrophoretische Trennung und Färbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte unter Verwendung von Standardprotokollen (Laemmli, 1970; Sambrook, 1989) bzw. entsprechender Materialien nach den Angaben des Herstellers.

### 2.4.1 Proteinreinigung

#### 2.4.1.1 Reinigung von rekombinantem PARN sowie der Punkt- und Deletionsmutanten von PARN

Soweit nicht gesondert erwähnt, erfolgten alle Reinigungsschritte bei 4°C oder auf Eis. Das *E. coli*-Zellpellet einer 400 ml-Kultur wurde in 5 ml Puffer A vollständig resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschallbehandlung. Die Zellsuspension wurde dafür drei mal für 30 Sekunden mit jeweils 1 Minute Pause beschallt (Branson Sonifier, Einstellung: 50% *duty cycle*, Stufe 7). Das Lysat wurde anschließend zur Abtrennung der Zelltrümmer und unlöslichen Bestandteile 30 Minuten bei 10000xg zentrifugiert. Der gewonnene Extrakt wurde mit 0,5 ml in Puffer A äquilibrierter Ni-NTA-Agarose gemischt. Nach einer zweistündigen Inkubation auf einem Rollschüttler wurde diese Mischung in eine Säule (Bio Rad) unter Schwerkraftbedingungen gefüllt. Nach dem sukzessiven Waschen des Säulenmaterials mit je 20 ml Puffer A und 20 ml Puffer B, erfolgte die schrittweise Elution der gebundenen Proteine mit jeweils 6 x 0,5 ml Puffer B, welcher zusätzlich 250 mM Imidazol enthielt. Die Elutionsfraktionen wurden anschließend vereinigt und gegen Puffer C unter dreimaligem Pufferwechsel dialysiert (Volumenverhältnis zwischen Probe und Puffer ca. 1:100). Das dialysierte Ni-NTA-Eluat wurde dann bei 20.000xg für 20 Minuten zentrifugiert und auf eine 1 ml MonoQ FPLC Säule gegeben, welche mit Puffer C äquilibriert war. Nach dem Waschen der Säule mit 5 ml Äquilibrierungspuffer erfolgte die Elution der Proteine mit einem Salzgradienten von 50 bis 500 mM KCl in insgesamt 30 ml, wobei Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt wurden. Alle Chromatographieschritte erfolgten bei einer Flussrate von 0,5-0,8 ml/min.

**Lysispuffer (Puffer A)**

50 mM Tris/HCl, pH 7,9  
300 mM KCl  
0,1 mM MgAcetat  
1 mM Imidazol  
1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,4  $\mu$ g/ml Leupeptin  
0,7  $\mu$ g/ml Pepstatin  
0,5 mM PMSF

**Puffer B**

50 mM Tris/HCl, pH 7,9  
300 mM KCl  
10% Glycerin  
0,02% (v/v) NP40  
20 mM Imidazol (Elution: 250 mM)  
1 mM  $\beta$ -Mercaptoethanol  
0,4  $\mu$ g/ml Leupeptin  
0,7  $\mu$ g/ml Pepstatin  
0,5 mM PMSF

**Puffer C**

50 mM Tris/HCl, pH 7,9  
50 mM KCl  
10% Glycerin  
1 mM DTT  
0,02% (v/v) NP40  
0,5 mM PMSF  
(Elution: 500 mM)

**2.4.1.2 Reinigung von rekombinantem PARNn (1-430)**

Die Präparation des *E. coli*-Zellextrakts erfolgte in der gleichen Weise wie unter (2.4.1.1) beschrieben, wobei die Zusammensetzung des Lysispuffers (Puffer A1) leicht modifiziert war. Der gewonnene Extrakt wurde mit 0,25 ml in Puffer A1 äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4B gemischt, für ca. eine Stunde unter vorsichtigem Schütteln inkubiert und anschließend in eine Säule unter Schwerkraftbedingungen gefüllt. Nach dem Waschen der Affinitätsmatrix mit jeweils 3 x 10 ml Puffer A1 erfolgte die schrittweise Elution des gebundenen Proteins mit 3 x 0,5 ml GSH-Elutionspuffer. Für die Abspaltung des GST-tag wurden die Elutionsfraktionen nach der Vereinigung zuerst gegen *cleavage*-Puffer unter mehrmaligem Pufferwechsel dialysiert (Volumenverhältnis zwischen Probe und Puffer ca. 1:100), anschließend mit PreScission<sup>TM</sup> Protease versetzt und bei 4°C ü. N. inkubiert. Es wurden dabei 40 *units* Protease (2 *units*/μl) pro ml Glutathion-Sepharose 4B eingesetzt. Um ein Großteil des freien GST sowie des nicht gespaltenen GST-Fusionsproteins zu entfernen, erfolgte im Anschluss an den Proteaseverdau eine weitere Chromatographie an Glutathion-Sepharose 4B, wobei 2 ml der Proteinlösung mit ca. 0,2 ml in *cleavage*-Puffer äquilibrierter Affinitätsmatrix unter vorsichtigem Schütteln für 30 Minuten inkubiert wurde. Die Mischung wurde erneut in eine Säule gefüllt und das Säulenmaterial 2 x mit jeweils 0,5 ml *cleavage*-Puffer gewaschen. Der Durchfluss und die beiden Waschfraktionen wurden vereinigt und nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 20 000 x g auf eine mit Puffer D (Puffer C mit NaCl statt KCl) äquilibrierte MonoQ-FPLC-Säule aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 10 ml Äquilibrierungspuffer erfolgte die Elution der Proteine mit einem Salzgradienten von 50 mM bis 1 M KCl in insgesamt 50 ml, wobei Fraktionen von jeweils 1 ml gesammelt wurden. Elutionsfraktionen, die PARNn enthielten, wurden vereinigt und unter Verwendung von Centricons (Millipore) anhand der Herstellerangaben aufkonzentriert. Für die abschließende Gelfiltration wurden max. 0,5 ml des aufkonzentrierten Ansatzes auf eine, mit Puffer D äquilibrierte, Superdex 200-Säule aufgetragen. Nach 5 ml wurde bei einer Flussrate

von 0,2 ml/min mit dem Sammeln von 0,5 ml-Fractionen begonnen. Nach insgesamt 35 ml erfolgte der Abbruch des Chromatographielaufes.

**Lysispuffer (Puffer A1)**

50 mM Tris/HCl, pH 8,5  
500 mM NaCl  
2 mM DTT  
2 mM Benzamidin  
2 mM MgAcetat

**GSH-Elutionspuffer**

50 mM Tris/HCl, pH 8,0  
500 mM NaCl  
20 mM Glutathion  
2 mM DTT

**cleavage Puffer**

50 mM Tris/HCl, pH 7,0  
150 mM NaCl  
1 mM EDTA  
1 mM DTT  
0,01% (v/v) NP40

**2.4.1.3 Präparation von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen**

Die Isolation von Proteinen aus zytoplasmatischen, nukleären sowie Gesamtzellextrakten von HeLa-Zellen, welche hauptsächlich in *Western blots* eingesetzt wurden, erfolgte nach der unter (2.5.1.2) beschriebenen Methode.

**2.4.1.4 Reinigung von transient exprimierten FLAG-Fusionsproteinen aus HeLa-Zellen (Kopräzipitation)**

Standardmäßig wurden die Zellen in 10 cm-Petrischalen kultiviert. Soweit nicht gesondert erwähnt, fanden alle Arbeitsschritte bei 4°C oder auf Eis statt. Die Ernte bzw. Zelllyse erfolgte 48 Stunden nach Transfektion der entsprechenden Expressionsplasmide. Dafür wurden die Zellen zweimal in jeweils 10 ml PBS gewaschen, in 1 ml Lysispuffer aufgenommen und nach dem Abkratzen zur Homogenisierung mehrere Male (ca. 6x) durch eine Spritze gezogen. Das Lysat wurde 10 Minuten bei 20 000xg und 4°C zentrifugiert. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 960 µl des Überstandes mit 30 µl in Lysispuffer äquilibrierter FLAG-Affinitätsmatrix vermischt und für 1 Stunde unter permanentem Schwenken inkubiert. Nach dem Abfüllen der Mischung in eine *spin column* wurde die Affinitätsmatrix fünf mal mit jeweils 1 ml Lysispuffer gewaschen. Dem schlossen sich drei zusätzliche Waschschritte an, bei denen die Affinitätsmatrix in der verschlossenen Säule mit jeweils 1 ml Lysispuffer für 10 Minuten schüttelnd inkubiert wurde. Zum Abschluss der Wasch-Prozedur wurde noch zwei mal jeweils 1 ml Lysispuffer auf die Säule gegeben. Nach der Entfernung des restlichen Lysispuffers durch eine kurze Zentrifugation (30 Sekunden, 500xg, 4°C) erfolgte die Elution des gebundenen Proteins mit 2x 20 µl Elutionspuffer, wobei bei jedem Elutionsschritt kurz zentrifugiert wurde (500xg, 10 Sekunden). Die Hälfte des Eluats sowie 5% des gewonnenen Zellextraktes wurden in einer SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und mit den entsprechenden Antikörpern über *Western blots* analysiert.

**Lysis-Puffer**

50 mM Tris/HCl, pH 7,2  
150 mM NaCl  
0,5% (v/v) Triton X-100  
0,25% (w/v) Deoxycholat  
1 mM PMSF  
(20 µg/ml RNase)

**Elutionspuffer**

200 mM Glycin, pH 2,5  
150 mM NaCl  
0,5% (v/v) Triton X-100  
1 mM PMSF

**Phosphatpuffer (PBS), pH 7,3**

30 mM KCl  
137 mM NaCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**2.4.1.5 Affinitätsreinigung von Anti-PARN-Antikörpern aus Immuns serum**

25 µg rekombinantes PARN wurde in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Protein wurde mit PonceauS-Lösung angefärbt und die Bande aus der Membran ausgeschnitten. Die Membranstücke wurden für 1 Stunde mit 5% Magermilchpulver in TN-Tween (*blocking*-Lösung) behandelt und anschließend in Anti-PARN-Immuns serum, welches mit *blocking*-Lösung 1:20 verdünnt war, ebenfalls für 1 Stunde inkubiert. Nach intensivem Waschen mit TN-Tween erfolgte die Elution der gebundenen Antikörper in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 200 µl 0,2 M Glycin pH 2,8, 1 mM EGTA. Der Ansatz wurde dafür bei RT 5 min schüttelnd inkubiert. Mit 20 µl 1 M Tris/HCl pH 8,0 erfolgte die Neutralisation des Eluats. Die isolierten Antikörper wurden nach einer Dialyse gegen 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10% (v/v) Glycerin, 0,02% (v/v) NP40 und 0,1 mg/ml BSA zu 50 µl aliquotiert und in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren.

**2.4.2 Western blot-Analyse**

Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine in einem SDS-Polyacrylamidgel, erfolgte deren Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit einer *Semi-dry*-Blotapparatur (Hofer) in Transferpuffer nach dem Verfahren von Kyhse-Andersen (1984). Die Membran wurde ca. 1 Minute mit PonceauS-Lösung für die Kennzeichnung der Markerproteine angefärbt. Die Entfärbung erfolgte durch mehrmaliges Waschen in TN-Tween. Danach wurde die Membran zur Absättigung von unspezifischen Bindestellen für min. 1 Stunde in einer Lösung aus 5% (w/v) Magermilchpulver in TN-Tween (*blocking*-Lösung) inkubiert. Immuns serum bzw. affinitätsgereinigte Antikörper wurden je nach Spezifität und Affinität in einem Bereich von 1:500 bis 1:7500 mit *blocking*-Lösung verdünnt und für 1 Stunde mit der Membran unter leichtem Schwenken inkubiert. Vor der Zugabe des sekundären Antikörpers wurde fünfmal für jeweils 5 Minuten in TN-Tween gewaschen. Als sekundärer Antikörper diente ein Peroxidase-gekoppelter Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper, der 1:5000 in TN-Tween verdünnt und für 1 Stunde mit der Membran inkubiert wurde. Nach dem erneuten fünfmaligen Waschen für jeweils 5 Minuten in TN-Tween erfolgte die Detektion unter

Verwendung des Super-Signal-Substrats (Pierce) entsprechend den Herstellerangaben. Die entstandene Chemilumineszenz wurde durch Exposition eines Röntgenfilms visualisiert.

**Transferpuffer**

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

**PonceauS-Lösung**

0,5% (w/v) PonceauS  
1% (v/v) Essigsäure

**TN-Tween**

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

## 2.5 Nukleinsäure-Methoden

Die Protokolle für grundlegende Methoden wie z.B. Ethanol-fällung, die Phenol-Chloroformextraktion von Nukleinsäuren oder die Bestimmung der Konzentration von DNA- und RNA-Lösungen wurden allgemein gebräuchlichen Laborhandbüchern entnommen (Ausubel *et al.*, 1996; Sambrook *et al.*, 1989). Enzymatische Reaktionen, wie Ligation, Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung, *reverse* Transkription (RT) oder die Restriktionsspaltung von DNA erfolgten nach den Angaben des Herstellers unter Verwendung der entsprechenden Enzyme und Puffer.

### 2.5.1 Isolation von Nukleinsäuren

#### 2.5.1.1 Plasmid-Präparation aus *E. coli*

Die Präparation geringer Mengen (1-2 µg) Plasmid-DNA erfolgte nach Birnboim & Doly, 1979. Es wurden standardmäßig 2 ml einer Über-Nacht-Kultur eingesetzt. Die Herstellung größerer Mengen (200 µg) Plasmid-DNA erfolgte unter Verwendung des „Plasmid-Midi-Kits“ von QIAGEN entsprechend den Herstellerangaben.

#### 2.5.1.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen

Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte unter Verwendung der TRIZOL-Methode (GIBCO/BRL). HeLa-Zellen wurden standardmäßig nach der Entfernung des Kulturmediums direkt auf den Kulturplatten durch mehrmaliges, vorsichtiges Auf- und Abpipettieren in Extraktionspuffer lysiert. Unabhängig von der Konfluenz wurden dabei 30 µl/cm<sup>2</sup> Kulturfläche eingesetzt. Zum Zelllysat wurde anschließend Chloroform (30% des Extraktionspuffervolumens) gegeben und vorsichtig gemischt. Nach einer Inkubation für ca. 10 Minuten bei RT erfolgte die Trennung des Phasengemisches durch Zentrifugation (12 000xg, 15 min, 4°C). Der RNA-haltige, wässrige Überstand wurde vorsichtig, unter

Vermeidung eines Kontaktes mit der proteinhaltigen Interphase, abgenommen und nach einer zweiten Chloroformextraktion mit Isopropanol (ca. 0,7 Vol. des Überstandes) versetzt. Im Anschluss an eine 10-minütige Inkubation bei RT wurden die ausgefällten Nukleinsäuren durch Zentrifugation bei 10 000xg für 10 min und 4°C pelletiert, in 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O (ca. 0,5-1 µl/µg RNA) aufgenommen.

Für die Isolation der Proteine wurde nach der vollständigen Abnahme des wässrigen, RNA-haltigen Überstandes 100% Ethanol (40% des Extraktionspuffervolumens) zum verbliebenen Phasengemisch gegeben und die Interphase durch vorsichtiges Schwenken vollständig solubilisiert. Nach einer Zentrifugation bei 2000xg für 5 Minuten, die der Entfernung der unlöslichen DNA diente, wurde der erhaltene Überstand mit Isopropanol (2-fache Volumen des Extraktionspuffers) gemischt und bei RT für 10 Minuten inkubiert. Die Präzipitation der Proteine erfolgte durch eine Zentrifugation bei 12 000xg für 10 Minuten. Das erhaltene Pellet wurde anschließend dreimal für jeweils 20 Minuten in reichlich Waschpuffer bei RT gewaschen, wobei zwischen den einzelnen Waschschrritten eine Zentrifugation bei 10 000xg für 10 Minuten erfolgte. Das Pellet wurde nach einem weiteren 20-minütigen Waschschrritt in 95% Ethanol bei RT unter Verwendung der *SpeedVac* vollständig getrocknet und in 25 mM Tris/HCl pH 8,5, 6% SDS, 70 mM β-Mercaptoethanol bei 37°C unter schütteln für 2-5 Stunden resuspendiert.

#### **RNA-Extraktionspuffer**

0,8 M Guanidiniumthiocyanat  
0,4 M Ammoniumthiocyanat  
0,1 M NaAcetat, pH 5,0  
5% (v/v) Glycerin  
38% (v/v) Phenol (in Wasser gesättigt)

#### **Waschpuffer**

0,3 M Guanidiniumhydrochlorid  
95% (v/v) Ethanol

### **2.5.1.3 Isolierung von zytoplasmatischer und nukleärer RNA aus HeLa-Zellen**

HeLa-Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-Kultur, welche eine Konfluenz von 90-100% aufwiesen, wurden durch Trypsin-Behandlung von der Kulturfläche abgelöst, in 10 ml Phosphatpuffer (PBS) resuspendiert und zwei mal in jeweils 15 ml PBS gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschschrritten wurde bei 200xg für 10 Minuten bei 4°C durchgeführt. Das erhaltene Zellpellet (ca. 0,5-1x10<sup>7</sup> Zellen) wurde anschließend in 1,5 ml Lysis-Puffer vollständig resuspendiert und für ca. 5 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 1,5 ml Lysis-Puffer, welcher zusätzlich 1% NP40 (0,5% Endkonzentration) enthielt. Nach einer weiteren 5-minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat zur Abtrennung

der Zellkerne bei 470xg für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Vom Überstand, welcher dem zytoplasmatischen Extrakt entspricht, wurden jeweils 250 µl-Aliquots sofort mit 750 µl RNA-Extraktionspuffer gemischt. Das Pellet, welches die Zellkerne repräsentiert, wurde nach der vorsichtigen und vollständigen Entfernung des restlichen Überstandes ebenfalls direkt in 750 µl RNA-Extraktionspuffer aufgenommen. Die sich anschließenden weiteren Schritte zur Isolation von RNA und Protein sind unter (2.5.1.2) erläutert.

**Lysis-Puffer**

10 mM Tris/HCl, pH 8,4  
0,14 M NaCl  
10 mM EDTA  
0,5% (v/v) NP40

**Phosphatpuffer (PBS), pH 7,3**

30 mM KCl  
137 mM NaCl  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
8,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

**2.5.1.4 Isolierung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus HeLa-Zellen**

Die Präparation von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA erfolgte über eine Chromatographie an Oligo(dT)-Cellulose unter Verwendung des *QuickPrep micro mRNA Purification Kits* (Amersham/Bioscience) nach den Angaben des Herstellers. Standardmäßig wurden HeLa-Zellen einer 75 cm<sup>2</sup>-Kultur mit einer Konfluenz von 90 % (ca. 0,5x10<sup>7</sup> Zellen) pro Prozedur eingesetzt. Für die Isolierung von nukleärer Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurden die Zellkerne von ca. 1,5x10<sup>7</sup> Zellen wie unter (2.5.1.3) beschrieben präpariert und direkt in 400 µl des im Kit enthaltenen *extraction buffer* aufgenommen.

**2.5.2 Die elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA****2.5.2.1 Agarosegel-Elektrophorese**

Die Auftrennung von DNA erfolgte in Agarosegelen unter Verwendung von 1xTBE als Laufpuffer. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8-4% (w/v) in 1xTBE-Puffer verwendet. Zum Zwecke der Detektion und Auswertung, die mit einem UV-Leuchttisch und einem Videosystem (INTAS) erfolgte, wurden 0,5 µg Ethidiumbromid pro ml Gel zugefügt. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit 1/10 Vol. eines 10-fach konzentrierten DNA-Ladepuffers gemischt. Als Größenstandard dienten die *1 kb-* sowie die *0,1 kb-ladder* (GIBCO).

**TBE-Puffer**

90 mM Tris-Borat  
90 mM Borsäure  
4 mM EDTA

**DNA-Ladepuffer (10x)**

30% (v/v) Glycerin  
0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol  
In 1xTBE-Puffer

Eine denaturierende Agarosegel-Elektrophorese kam für die Auftrennung von RNA, welche nachfolgend für Northern Hybridisierungen eingesetzt wurde, zur Anwendung (Fourney *et al.*, 1988). Standardmäßig wurden 1%-ige Gele in 1xMOPS und 2,5% Formaldehyd hergestellt. 1xMOPS-Puffer diente ebenfalls als Laufpuffer. Die Agarose wurde zuerst durch Aufkochen in Wasser gelöst und nach dem Abkühlen mit den entsprechenden Mengen 10xMOPS-Puffer sowie einer 37% (v/v) Formaldehydlösung versetzt. Die RNA-Proben, deren Präparation anhand des in Tab. 2 gezeigten Schemas erfolgte, wurden vor dem Auftragen auf das Gel bei 65°C für 15 Minuten denaturiert und mit 1/10 Vol. 10xRNA-Ladepuffer auf Eis gemischt. Weiterhin wurde jede Probe für die spätere Detektion mit 0,1 µg Ethidiumbromid vermengt. Die Auftrennung erfolgte standardmäßig ü. N. bei 8°C.

#### **10xMOPS-Puffer**

0,2 M MOPS  
0,05 M NaAcetat, pH 7,0  
0,01 M EDTA

#### **RNA-Ladepuffer (10x)**

0,25% (w/v) Bromphenolblau  
0,25% (w/v) Xylencyanol  
25% (w/v) Ficoll<sup>TM</sup> 400  
in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O

**Tab. 2: Zusammensetzung der RNA-Proben für die denaturierende Agarosegel-Elektrophorese**

	Vol. (µl)	Endkonzentration
RNA	X	(2-10 µg)
37% (v/v) Formaldehyd	5,5	6,8 %
Formamid	15	50%
10xMOPS-Puffer	1,5	0,5x
H <sub>2</sub> O (DEPC-behandelt)	8-X	-
Gesamtvolumen	30	-

### **2.5.2.2 Denaturierende Polyacrylamidgel-Elektrophorese**

RNA wurde in Abhängigkeit der Größe in 5-10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Für die Herstellung der Gele wurde eine 20%-ige Polyacrylamidlösung (Acrylamid/bis-Acrylamid 19:1), die 8,3 M Harnstoff in 1x TBE enthielt in einem entsprechenden Verhältnis mit einer Lösung gemischt, die ebenfalls aus 8,3 M Harnstoff in 1xTBE bestand. Durch die Zugabe von 125 µl 10% (w/v) APS und 25 µl TEMED pro 25 ml Gel-Lösung wurde die Polymerisierung gestartet. Als Laufpuffer diente 1xTBE. Vor dem Beladen des Gels wurden die Proben mit Formamid-Ladepuffer gemischt, bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Die Auftrennung erfolgte bei konstanter Leistung (20 Watt für eine Gel-Größe von 20x20x0,1cm) nach einem 30-minütigen Vorlauf. Als Größenstandard dienten die 5'-markierten DNA-Fragmente des *HpaII*-verdauten pBR322-Vektors.

#### **Formamid-Ladepuffer**

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

### 2.5.3 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die mittels PCR selektiv vervielfältigten DNA-Fragmente wurden für präparative und analytische Zwecke verwendet. In einer standardmäßigen 50 µl-Reaktion wurden 50 ng Plasmid-DNA oder 0,5-2 µl einer RT-Reaktion als *template* eingesetzt. Für Kolonie-PCRs wurde eine *E. coli*-Kolonie gepickt und in 5 µl Wasser resuspendiert. Der Ansatz enthielt außerdem PCR-Puffer, 25-50 pmol der entsprechenden Primer, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>, 0,2 mM einer dNTP-Mischung sowie 0,5-2,5 U thermostabile DNA-Polymerase. Nach einer Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten wurden 25-30 Reaktionszyklen durchgeführt, wobei die Höhe der Temperaturen sowie die Dauer der einzelnen Zyklusschritte (Denaturierung, Hybridisierung und Synthese) von den verwendeten Primern, der Länge der zu amplifizierenden DNA und den eingesetzten Polymerasen abhängig war. Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten, die zu präparativen Zwecken hergestellt wurden, erfolgte ausschließlich mit der *Pwo*-DNA-Polymerase, da diese über eine *proof-reading*-Aktivität verfügte. Für alle weiteren Reaktionen wurde dagegen *Taq*-DNA-Polymerase verwendet.

### 2.5.4 DNA-Sequenzierung

Durch eine Sequenzierung wurde überprüft, ob Klonierungsschritte bzw. *in vitro* Mutagenese-Reaktionen korrekt verlaufen bzw. erfolgreich waren. Das angewandte Verfahren basierte auf dem enzymatischen Kettenabbruch (Sanger *et al.*, 1977), wobei die verwendeten Didesoxynukleotide fluoreszenzmarkiert waren. Die Sequenzreaktion wurde mit dem *Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Standardmäßig wurden 200 ng Plasmid-DNA aus einer Midi-Präparation und 3,5 pmol des entsprechenden Primers in einen 10 µl-Ansatz eingesetzt. Die Proben wurden nach der Reaktion mit Wasser auf 20 µl aufgefüllt und zur Entfernung von nicht eingebauten Nukleotiden über eine G50-Sepharosesäule gereinigt. Nach der Denaturierung erfolgte die Auftrennung und Analyse der Fragmente über eine Kapillarelektrophorese unter Verwendung des ABI PRISM 310 *Genetic Analyzer* (PE Applied Biosystems)

### 2.5.5 Die Herstellung von Punktmutanten von PARN durch *in vitro*-Mutagenese

Die spezifische Umwandlung einzelner Aminosäurekodons von PARN erfolgte mit Hilfe einer PCR unter Verwendung von *Pwo*-DNA-Polymerase. In einen 50 µl-Reaktionsansatz wurden dafür 50 ng pGMMCS645295 sowie je 30 pmol von zwei Mutageneseprimern (Tab.

1C) eingesetzt. Diese waren vollständig komplementär und enthielten die veränderte Nukleotidsequenz. Die Modifizierung der einzelnen Nukleotide erfolgte dabei so, dass zusätzlich zum veränderten Kodon eine Restriktionsschnittstelle hergestellt wurde. Dies ermöglichte die schnelle Identifizierung der mutierten Sequenzen. Es wurden pro Reaktion 2,5 U Enzym verwendet. Nach einer Denaturierung bei 94°C für 2 Minuten wurden insgesamt 18 Reaktionszyklen durchgeführt, wobei ein Zyklus aus je einem Denaturierungsschritt bei 94°C für 1 min, einem Hybridisierungsschritt bei 55°C für 30 Sekunden sowie einem Syntheseschritt bei 68°C für 7 Minuten und 50 Sekunden bestand. Im Anschluss an die Reaktion wurde das *template*, das im Gegensatz zur neu synthetisierten, mutierten DNA methyliert ist, durch *DpnI*, welches ausschließlich methylierte DNA spaltet, verdaut. Es wurde 1 µl *DpnI* zum Ansatz zugefügt, dessen Inkubation bei 37°C für ca. 1 Stunde erfolgte. Die unverdaute, mutierte Plasmid-DNA wurde gefällt und das Pellet in 10 µl 10 mM Tris/HCl pH 7,5 resuspendiert. Von dieser Lösung wurden 1-2 µl in *E. coli* XL1-blue transformiert. Die Identifizierung der entsprechenden Mutanten erfolgte über einen Restriktionsverdau. Dafür wurden entweder das vollständige Plasmid oder über Kolonie-PCR mit 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase amplifizierte DNA-Fragmente eingesetzt. Die isolierten Punktmutanten von PARN wurden durch eine Sequenzierung kontrolliert.

## 2.5.6 Herstellung der Expressionsplasmide:

### 2.5.6.1 pGMMCS $\Delta$ PARN(175-245)

Unter Verwendung von jeweils 50 pmol der Primer *del(175-245)for* (Tab. 1B) und *del(175-245)rev* sowie von 100 ng pGMMCS645295 wurde eine PCR mit 2,5 U *Pwo*-DNA-Polymerase in Gegenwart von 2,5 mM Mg<sup>2+</sup> durchgeführt (Zahl der Zyklen: 20, pro Zyklus 94°C für 50 s, 55°C für 30 s und 68°C für 7 min und 50 s). Beide Primer enthalten eine *BsaI*-Schnittstelle am 5'-Ende. Der 50 µl-Reaktionsansatz wurde im Anschluss an einen *DpnI*-Verdau gefällt und in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. Die beiden äußeren Enden des PCR-Produkts, welches die gesamte Sequenz von pGMMCS645295 mit Ausnahme des zu deletierenden Bereichs umfasste, wurden darauf in einem *BsaI*-Verdau gespalten. Nach einer erneuten Fällung sowie der Resuspension der DNA in 10 µl H<sub>2</sub>O erfolgte die Ligation der überhängenden und komplementären 5'-bzw. 3'-Enden. In einer Kolonie-PCR mit den Primern NdeI 645295 und G 645295 erfolgte die Identifizierung von positiven Klonen, die anschließend durch eine Sequenzierung überprüft wurden.

### 2.5.6.2 pGMMCS $\Delta$ PARN(134-269)

In jeweils einer PCR, welche unter Verwendung von 30 pmol der Primer NdeI 645295 (Tab. 1B) und *del(134-269)rev* (Fragment 1) bzw. *del(134-269)for* und XhoI 645295 (Fragment 2) erfolgte, wurden der 5'-bzw. 3'-Bereich des PARN-ORFs unter Aussparung der zu deletierenden Sequenz amplifiziert. Für beide Reaktionen wurden 25 ng pGMMCS645295, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup> und 2,5 U *Pwo*-DNA-Polymerase eingesetzt (Zahl der Zyklen: 30, pro Zyklus 94°C für 30 s, 55°C für 30 s und 72°C für 1 min). Im Anschluss an eine Reinigung, welche mit dem PCR Purification Kit (Roche) nach den Angaben des Herstellers erfolgte, wurde das 5'-Ende des PCR-Fragments 1 mit *NdeI*, das 3'-Ende des PCR-Fragment 2 dagegen mit *XhoI* gespalten. Beide 50  $\mu$ l-Ansätze wurden nach dem Verdau vereinigt und erneut mit dem PCR Purification Kit gereinigt. Mit *BsaI* wurde dann das 3'-Ende von Fragment 1 sowie das 5'-Ende von Fragment 2 geschnitten. Nach einer Fällung und der Resuspension in 10  $\mu$ l H<sub>2</sub>O wurden die Fragmente untereinander, über ihre durch *BsaI* generierten Enden, sowie mit dem durch *NdeI* und *XhoI* gespaltenen pGMMCS645295 ligiert. In einer Kolonie-PCR mit den Primern NdeI 645295 und G 645295 erfolgte die Identifizierung der Deletionsvariante. Die Sequenzierung eines der isolierten Klone ( $\Delta$ PL8) ergab einen *frame shift*, der durch ein fehlendes C in der Nukleotidsequenz von *del(134-269)for* verursacht war. Dieses wurde in einer *in vitro* Mutagenese unter Verwendung der Mutagenese-Primer M/ $\Delta$ L*for* und M/ $\Delta$ L*rev* (Tab. 1C) nachträglich eingefügt.

### 2.5.6.3 pTETBBB<sup>TNF $\alpha$</sup>

Das Plasmid pTETBBB wurde mit *BgIII* geschnitten, aus einem Agarosegel gereinigt und dephosphoryliert. Die Oligonukleotide AUTNF*for* und AUTNF*rev* (Tab. 1B), welche das ARE des humanen TNF $\alpha$ -Gens kodieren, wurden zur Hybridisierung für 2 min bei 95°C und anschließend für 1 Stunde bei 37°C inkubiert (siehe 2.3.2.1). Darauf erfolgte eine Phosphorylierung unter Verwendung der T4-Polynukleotidkinase. Nach der Fällung und Resuspension in H<sub>2</sub>O wurde der DNA-Linker in den *BgIII*-verdauten pTETBBB-Vektor ligiert. Positive Klone wurden durch eine PCR mit den Primern SeqbG11 und SeqbG12 isoliert. Die Kontrolle der richtigen Orientierung erfolgte abschließend durch eine Sequenzierung.

#### 2.5.6.4 GFP-PARN

In einer PCR mit jeweils 30 pmol der Primer PARNGFP<sub>for</sub> und PARNGFP<sub>rev</sub> (Tab. 1B), 50 ng pGMMCS645295, 2,5 mM Mg<sup>2+</sup> sowie 2,5 U *Pwo*-DNA-Polymerase wurde der ORF von PARN amplifiziert (Zahl der Zyklen: 30, pro Zyklus 94°C für 30 s, 52°C für 30 s und 72°C für 2 min). Die verwendeten Primer verfügen über eine *BsaI*-Schnittstelle am 5'-Ende. Das PCR-Fragment wurde anschließend aus einem Agarosegel gereinigt und die 5'- bzw. 3'-Enden mit *BsaI* geschnitten. Nach einer Fällung und der Resuspension in H<sub>2</sub>O wurde das PCR-Fragment über die entsprechenden überhängenden 5'-bzw. 3'-Enden in die *XhoI*- und *BamHI*-Schnittstellen von pEGFP-N1 (Clontech) ligiert. Der verwendete Vektor wurde dafür nach dem *XhoI* und *BamHI*-Verdau ebenfalls aus einem Agarosegel gereinigt und dephosphoryliert. Eine Kontrolle erfolgte abschließend durch eine Sequenzierung.

#### 2.5.6.5 pcDNA3-HA-PARN

Das Plasmid pGMMCS645295 wurde mit *NdeI* gespalten und nach der Reinigung aus einem Agarosegel dephosphoryliert. Die Oligonukleotide HA-*tagfor* und HA-*tagrev* (Tab. 1B), welche für einen HA-*tag* kodieren, wurden zur Hybridisierung für 2 Minuten bei 95°C und anschließend 1 Stunde bei 37°C inkubiert (siehe 2.3.2.1). Im Anschluss an eine Phosphorylierung mit T4-Polynukleotidkinase wurde der HA-Linker gefällt und nach der Resuspension in H<sub>2</sub>O in die *NdeI*-Schnittstelle von pGMMCS645295 ligiert. Die Identifizierung von positiven Klonen erfolgte anhand eines Verdau mit *KpnI* und *XhoI*. Die richtige Orientierung des HA-*tag* wurde mittels einer Sequenzierung überprüft. Die Fusion aus HA-*tag* und PARN wurde dann mit *KpnI* und *XhoI* ausgeschnitten, das Fragment aus dem Agarosegel gereinigt und mit dem *KpnI*- und *XhoI*-verdauten pcDNA3 (Invitrogen) ligiert. Der geschnittene Vektor war zuvor ebenfalls aus einem Agarosegel gereinigt und dephosphoryliert worden. Isolierte positive Klone wurden durch eine Sequenzierung kontrolliert.

### 2.5.7 Methoden mit radioaktiv markierten Nukleinsäuren

#### 2.5.7.1 Herstellung radioaktiv markierter Substrate

##### 2.5.7.1.1 Die Herstellung von homogen markiertem Poly(A)

Das für den TCA-Fällungsassay (2.5.7.3) verwendete, homogen markierte Poly(A) wurde durch die Verlängerung eines Oligo(A)<sub>20</sub> in einer Polyadenylierungsreaktion erzeugt. Dafür

wurden in einer 50 µl-Reaktion 0,02 mM des Oligonukleotids (als Mononukleotide) mit Polyadenylierungspuffer, 0,5 mM DTT, 1 mM ATP, ca. 50 µCi [ $\alpha$ - $^{32}$ P] ATP, 20 U RNasin, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub> sowie 2 pmol bPAP 513 für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend mit Phenol-Chloroform extrahiert und in 2,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat mit Ethanol gefällt. Nach der Resuspension des Pellets in DEPC-behandeltem Wasser erfolgte die Abtrennung von nicht inkorporierten Nukleotiden durch die Reinigung über eine Sephadex G-50 *spin column* (Amersham). Die Radioaktivität von einem Aliquot der Präparation wurde im Scintillationszähler gemessen. Die Länge des, anhand dieser Methode hergestellten, Poly(A) betrug durchschnittlich 400-600 Nukleotide.

#### **Polyadenylierungspuffer**

25 mM Tris/HCl, pH 8,3  
40 mM KCl  
10% (v/v) Glycerin  
0,05 mM EDTA  
0,2 mg/ml mBSA  
0,02% (v/v) NP40

#### **2.5.7.1.2 Radioaktive 5'-Markierung**

Diese Methode wurde für die radioaktive Markierung von DNA- und RNA-Oligonukleotiden verwendet. Die markierte DNA wurde als Sonde für *Northern blots* (2.5.7.2), markierte RNA dagegen als Substrat für enzymatische Reaktionen benutzt. In einem standardmäßigen 10 µl-Reaktionsansatz erfolgte die Inkubation von 10-500 pmol der Oligonukleotide mit PNK-Puffer (NEB), 5-15 µCi [ $\gamma$ - $^{32}$ P] ATP (3000 Ci/mmol) und 5 U T4-Polynukleotidkinase (PNK) für 1 Stunde bei 37°C. PNK katalysiert dabei die Übertragung der [ $\gamma$ - $^{32}$ P]-Gruppe auf die 5'-Hydroxylgruppen der DNA bzw. RNA. Die Proben wurden nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion gefällt und in Wasser (DEPC-behandelt bei RNA) aufgenommen. Von einem Aliquot der Präparation wurde die Radioaktivität im Scintillationszähler gemessen.

#### **2.5.7.1.3 Radioaktive Markierung von DNA-Fragmenten (*random primed labelling*)**

Radioaktiv markierte DNA wurde als Sonde in Northern-Hybridisierungen (2.5.7.2) eingesetzt. Basis dieser Methode ist eine Mischung aus Hexanukleotiden zufälliger Sequenz (*random primer*), die als Primer für das Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I fungieren, wobei eine Markierung durch die Inkorporierung von [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP in die neu synthetisierten DNA-Stränge erfolgt. Für die Markierungsreaktion, die unter Verwendung des *Megaprime-DNA Labeling Kit* (Amersham Pharmacia Biotech) entsprechend der Herstellerangaben erfolgte, wurden 25-50 ng DNA eingesetzt. Nach der Reaktion wurden die Proben mit

Phenol-Chloroform extrahiert und entweder gefällt oder zur Abtrennung von nicht eingebauten Nukleotiden über eine G50-Sepharosesäule gereinigt.

#### 2.5.7.1.4 *In vitro*-Transkription

*In vitro* synthetisierte RNA wurde entweder als Sonde in Northern-Hybridisierungen (2.5.7.2) eingesetzt oder diente als Kontrolle, z.B. für den PAT-Assay (2.5.7.5) bzw. für die Poly(A)-Schwanzlängenbestimmung. Standardmäßig wurde eine 10 µl- oder 50 µl-Reaktion mit 1-2 µg linearisierter Plasmid-DNA, 5 mM DTT, 0,5 mM ATP, GTP, CTP, 0,1 mM UTP, 1-4 U RNasin (Promega), 20-50 µCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] UTP und 20 U SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase im entsprechenden Transkriptionspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Bei Verwendung der SP6-RNA-Polymerase enthielt der Ansatz zusätzlich 0,01% (v/v) NP40. Die Herstellung von unmarkierten Transkripten erfolgte mit 0,5 mM UTP. Alternativ wurden ca. 100 ng über PCR amplifizierte DNA-Fragmente, die einen T7-Promotor enthielten, eingesetzt. Nach der Reaktion wurde die RNA mit Phenol-Chloroform extrahiert und entweder zur Abtrennung von nicht eingebauten radioaktiven Nukleotiden über eine Sephadex G-50 *spin column* (Amersham) gereinigt oder mit 2,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat und Ethanol gefällt. Das Pellet wurde in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O resuspendiert oder für eine weitere Reinigung in Formamid-Ladepuffer aufgenommen und in einem 5-8%-igen denaturierenden Polyacrylamid-harnstoffgel aufgetrennt. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Transkripte aus dem Gel ausgeschnitten. Die Lokalisation erfolgte dabei mittels eines kurz auf das Gel aufgelegten Röntgenfilmes. Für die Detektion von unmarkierten Transkripten wurde das Gel über einer fluoreszierenden Siliciumplatte mit UV-Licht bestrahlt. Die Elution der RNA aus dem Gel erfolgte durch eine ü. N.-Inkubation in Elutionspuffer unter Verwendung eines Thermoschüttlers bei 37°C. Nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die RNA gefällt und in DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O resuspendiert.

Folgende Plasmide wurden für die *in vitro* Transkription verwendet:

- pSP6-L3preA<sub>(80)</sub> -enthält die Sequenz von L3-pre und einen plasmidkodierten Poly(A)-Schwanz aus 80 Nukleotiden (Kerwitz *et al.*, 2003). Die Linearisierung erfolgte mit *Bbs*I, die Transkription mit SP6-RNA-Polymerase.
- pβ-GIEx.3 -enthält die Sequenz des dritten Exons des humanen β-Globin-Gens. Für die Linearisierung wurde *Bam*HI, für die Transkription SP6-RNA-Polymerase verwendet (Gehring *et al.*, 2003).
- pBKS-β-Globin -enthält Teile der genomischen Sequenz des β-Globin-Gens von Kaninchen (Winzen *et al.*, 1999). Für die Linearisierung wurde *Hind*III, für die Transkription T7-RNA-Polymerase verwendet.

**Elutionspuffer**

500 mM Ammoniumacetat

1 mM EDTA

0,5% (w/v) SDS

10% (v/v) Phenol (in H<sub>2</sub>O gesättigt)

Es wurde nur die wässrige Phase verwendet.

**2.5.7.2 Hybridisierung von RNA mit radioaktiv markierten RNA- bzw. DNA-Sonden (*Northern blot*)**

Im Anschluss an die elektrophoretische Trennung der RNA wurde das Agarosegel (2.5.2.1) sukzessive zwei mal für jeweils 10 Minuten in H<sub>2</sub>O, für 15 Minuten in 50 mM NaOH sowie für min. 20 Minuten in 20xSSC unter leichtem Schwenken inkubiert. Mittels eines Kapillar-Blots (Southern, 1975; Sambrook, 1989) erfolgte danach die Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran (Hybond-N, *Amersham Pharmacia Biotech*). Der Transfer wurde mit 20xSSC für ca. vier Stunden unter häufigem Wechsel des Saugpapiers durchgeführt. Bei der Auftrennung der RNA in einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgte dagegen die Übertragung unmittelbar nach der Elektrophorese mit einer *Semi-dry*-Blotapparatur in 1xTBE bei 200 mA für 1 Stunde. Das Polyacrylamidgel wurde dabei mit 3 mm Blot-Papier (Schleicher & Schüll) von der Glasplatte separiert. Das *cross linking* der RNA mit der Membran erfolgte mit dem UV Stratalinker (Stratagene) im *Auto Cross Link*-Modus. Die Membran wurde danach kurz in 2xSSC gewaschen und entweder zwischen Filterpapier bei Raumtemperatur getrocknet oder sofort in *Church*-Puffer für mind. 1 Stunde bei 65°C prähybridisiert. Je nach Membrangröße wurden 15 cm oder 30 cm Hybridisierungsröhren (Biometra) verwendet und entsprechend mit 5 ml bzw. 10-15 ml Puffer befüllt. Als Sonden wurden 5'-markierte DNA-Oligonukleotide, markierte DNA-Fragmente oder *in vitro* synthetisierte RNA benutzt (siehe 2.5.7.1). Für die Hybridisierung wurden pro ml Hybridisierungspuffer  $0,5-2 \times 10^6$  cpm der markierten Sonde bei 95°C für 5 Minuten denaturiert und nach dem vollständigen Abkühlen auf Eis direkt in den zuvor erneuerten *Church*-Puffer gegeben. Die Hybridisierung erfolgte ü. N. bei 65°C. Anschließend wurde die Membran jeweils zwei mal mit ca. 200 ml Waschpuffer I und II gewaschen. Nach dem Trocknen der Membran bei Raumtemperatur wurde diese in Klarsichtfolie eingeschlagen und auf *PhosphoImager-Screens* bzw. Röntgenfilmen exponiert.

**Church-Puffer**

0,25 M NaPhosphat-Puffer, pH 7,2\*  
1 mM EDTA  
1% (w/v) BSA  
7% (w/v) SDS

\* 1M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (A)  
1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (B)  
0,5 M, pH 7,2 (1l):  
342 ml A+158 ml B+500 ml H<sub>2</sub>O

**20xSSC**

3 M NaCl  
0,3 M NaCitrat

**Waschpuffer I**

2xSSC  
0,1% (w/v) SDS

**Waschpuffer II**

0,2xSSC  
0,1% (w/v) SDS

**2.5.7.3 TCA-Fällungsassay**

Anhand des TCA-Fällungsassays erfolgte die Ermittlung der enzymatischen Aktivität sowie der kinetischen Konstanten der verschiedenen Varianten von PARN. Als Substrat wurde pro Reaktion eine Mischung aus 0,05 mM (als Mononukleotide) nicht größenfraktioniertem Poly(A) und homogen markiertem Poly(A) mit einer Aktivität von 5000 bis 10 000 cpm verwendet (2.5.7.1.1). Die eingesetzte Menge an Poly(A) entspricht der fünffachen  $K_M$ -Konzentration von WT-PARN. In einem standardmäßigen 20 µl-Ansatz wurde das Substrat in Gegenwart von Deadenylierungspuffer, 120 mM KCl, 2 mM DTT und 1,5 mM MgAcetat mit 0,5-2 µl Enzym bei 37°C umgesetzt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch die Zugabe von 60 µl eiskalter 16%-iger TCA. Die Proben wurden im Anschluss 15 Minuten bei 15000xg und 4°C zentrifugiert. Dabei verbleiben die freigesetzten Mononukleotide aufgrund ihrer Säurelöslichkeit im Überstand. Polynukleotide dagegen werden durch TCA vollständig präzipitiert. Die Hälfte des Überstandes wurde mit 3 ml Scintillationsflüssigkeit gemischt und die Radioaktivität im Scintillationszähler ermittelt. Die Menge an gebildetem AMP wurde aus dem Verhältnis zwischen der eingesetzten Menge an Substrat und der Ausgangsaktivität des markierten Poly(A) sowie aus den im Überstand gemessenen cpm abgeleitet.

Für die Bestimmung von  $V_{max}$  und  $K_M$  wurden mind. 5 verschiedene Poly(A)-Konzentrationen in einem Bereich von 0,01 mM bis 0,3 mM unter Konstanthaltung der spezifischen Radioaktivität verwendet. Niedrigere Konzentrationen wurden aufgrund der geringen Differenzen der Messwerte zum radioaktiven Hintergrund nicht eingesetzt. Die Umsetzung des Substrates erfolgte unter Standardbedingungen mit jeweils konstanten Enzymmengen und identischen Inkubationszeiten, wobei pro Messansatz mind. 4 Inkubationsintervalle benutzt wurden. Die Auswertung der Daten erfolgte nach HANES bzw. Lineweaver-Burk. Alternativ wurden die Konstanten unter Verwendung von SigmaPlot durch eine direkte Anpassung der ermittelten Werte an die Michaelis-Menten-Gleichung bestimmt.

**Deadenylierungspuffer**

20 mM HEPES, pH 7,0  
10% (v/v) Glyzerin  
0,2 mg/ml mBSA  
0,02% (v/v) NP40

**2.5.7.4 Bestimmung der Längenverteilung von Poly(A)**

Für die Selektion und Detektion von Poly(A)-Schwänzen wurde Gesamt-RNA bzw. zytoplasmatische oder nukleäre RNA am 3'-Ende in einer Polyadenylierungsreaktion mit 3'-dATP radioaktiv markiert und anschließend mit den RNasen T1 und A verdaut. RNase T1 spaltet spezifisch an einem Guanosin, RNase A dagegen an einem Pyrimidin, so dass die markierten Poly(A)-Schwänze bestehen bleiben. Standardmäßig wurde eine 20 µl-Reaktion mit 1 µg RNA, 5 mM DTT, 0,5 mM MnCl<sub>2</sub>, 10 µCi 3'-dATP und 2 pmol bPAP 513 in Polyadenylierungspuffer für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die markierte RNA wurde mit Phenol-Chloroform extrahiert, mit 2,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat und Ethanol gefällt und nach der Resuspension in 25 µl DEPC-behandeltem H<sub>2</sub>O im Scintillationszähler vermessen. Der RNase-Verdau erfolgte unter Verwendung gleicher Mengen Radioaktivität (100000-500000 cpm) in einem 20 µl-Ansatz mit 10 ng RNase A, 20 U RNase T1 in 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 100 mM KCl und 20 µg Hefe-RNA für 30 Minuten bei 30°C. Die Reaktion wurde durch einen Proteinase K-Verdau gestoppt. Dazu wurde der Ansatz auf 100 µl mit 20 µg Proteinase K, 10 µg rRNA, 12,5 µg Glykogen, 2xPK-Puffer sowie H<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert. Nach der Ethanol-Fällung der markierten Poly(A)-Schwänze in 2,5 M NH<sub>4</sub>-Acetat erfolgte deren Auftrennung in einem 10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel. Als Kontrolle diente 1 pmol *in vitro* synthetisierte L3-preA<sub>(80)</sub>-RNA. Von der markierten RNA wurden 10 000 cpm im RNase-Verdau verwendet.

**PK-Puffer (2x)**

0,2 M Tris/HCl, pH 7,9  
0,3 M NaCl  
25 mM EDTA  
2% (w/v) SDS

**2.5.7.5 Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge spezifischer mRNAs: PAT Assay (Sallés & Strickland, 1999)**

Basis dieser Methode ist die Synthese von cDNA, die von Primern aus erfolgt, welche mit den Poly(A)-Schwänzen über die gesamte Länge hybridisieren. Diese Primer werden durch zwei aufeinanderfolgende Reaktionen hergestellt. Mit phosphoryliertem Oligo(dT)<sub>12</sub>, das zusammen mit der RNA inkubiert und durch Ligase untereinander verknüpft wird, erfolgt die

Bildung eines Poly(T), welches den überwiegenden Teil der Poly(A)-Schwänze abdeckt. Kurze ungepaarte Bereiche am äußersten 3'-Ende des Poly(A)-Schwanzes hybridisieren bei einer niedrigeren Temperatur mit dem Oligo(dT)-Bereich eines *anchor*-Primers. Dieser wird ebenfalls durch die Ligase mit dem gebildeten Poly(T)-Strang verbunden. Im Anschluss an die *reverse* Transkription erfolgt die Vervielfältigung der entsprechenden Sequenz durch eine PCR unter Verwendung des *anchor*-Primers sowie eines gen-spezifischen Primers.

Standardmäßig wurden in eine Reaktion 2,5 µg Gesamt-RNA oder 5 µg zytoplasmatische RNA bzw. 0,25 µg nukleäre RNA eingesetzt. Als Kontrolle wurde außerdem zu jedem Ansatz zusätzlich 2 ng L3-preA(80) zugegeben. Die RNA wurde mit 25 ng phosphoryliertem Oligo(dT)<sub>12</sub> in 7 µl H<sub>2</sub>O gemischt und zur Auflösung von Sekundärstrukturen bei 95°C für 5 Minuten denaturiert, wobei keine Abkühlung auf Eis erfolgte. Ein bei 42°C präinkubierter Parallelansatz, der 4 µl 5xM-MLV-Puffer, 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 10 mM ATP sowie 10 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 13 µl enthielt, wurde anschließend mit der denaturierten RNA gemischt und 30 Minuten bei 42°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 µg *anchor*-Primer erfolgte die weitere Inkubation bei 12°C für 2 Stunden. Anschließend wurde der Ansatz wieder auf 42°C transferiert und die *reverse* Transkription mit 200 U M-MLV-RNase H<sup>-</sup> bei 42°C für 1 Stunde durchgeführt. Abschließend erfolgte eine Inaktivierung der Enzyme bei 70°C für 30 Minuten. Vom Reaktionsansatz wurden 1-2 µl in eine PCR eingesetzt, die mit 25 pmol der entsprechenden Primer und 0,5 U *Taq*-DNA-Polymerase erfolgte. Die gen-spezifischen Primer wurden für die spätere Detektion am 5'-Ende radioaktiv markiert. Die im Reaktionsansatz verwendete Radioaktivität betrug standardmäßig 200.000 cpm. Die PCR-Proben wurden nach einer Phenol-Chloroform-Extraktion gefällt und nach der Resuspension in 10 µl Formamid-Ladepuffer in einem 5%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Trocknen mit *PhosphoImager-Screens* exponiert.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Zusammenhänge zwischen der Struktur und dem Katalysemechanismus von PARN

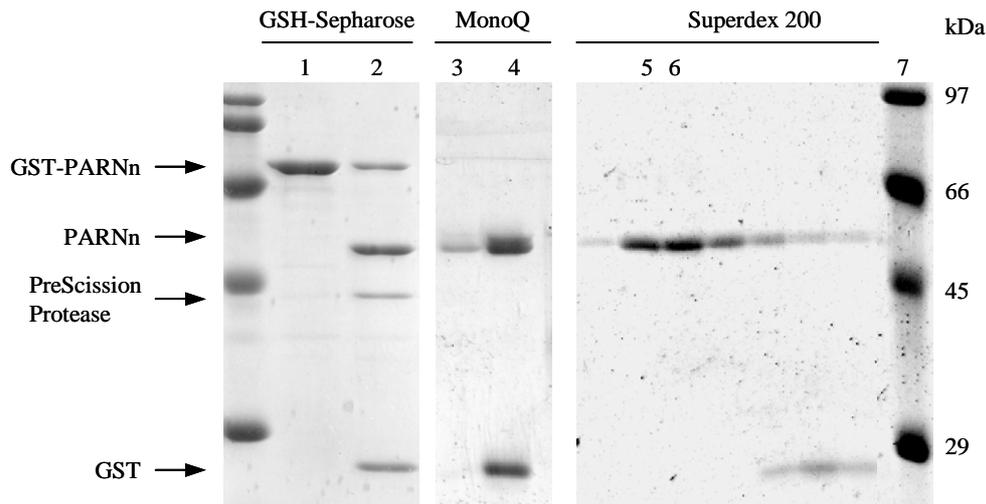
PARN ist eine 3'-Exoribonuklease mit hoher Spezifität für einzelsträngiges Poly(A). Eine 3'-Hydroxylgruppe ist dabei essentiell für die Katalyse (Körner & Wahle, 1997). Die am 5'-Ende von mRNAs lokalisierte *Cap*-Struktur wird von PARN gebunden, was die deadenylierende Aktivität stimuliert und die Prozessivität steigert (Martinez *et al.*, 2001; Dehlin *et al.*, 2000). Die strukturellen Voraussetzungen, die diesem Katalysemechanismus bzw. der Substratspezifität zugrunde liegen, wurden im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von H. Song aus Singapur näher untersucht. Grundlage der Analyse waren die Kristallstrukturen einer C-terminal verkürzten Version von PARN (PARNn) in substratfreier bzw. substratgebundener (PARNn-RNA) Form, wobei die Kokristallisation mit einem (A)<sub>10</sub>-Nukleotid erfolgte. Für beide Strukturen betrug die Auflösung 2,6 Å (Wu *et al.*, 2005).

PARNn (Aminosäuren 1-430) besteht aus der Nuklease-Domäne und der R3H-Domäne. Die Fähigkeit an m<sup>7</sup>GTP-Sepharose zu binden, ist dagegen nicht mehr vorhanden (Wu *et al.*, 2005). Kristallisationsversuche mit vollständigem PARN bzw. mit einer C-terminal verkürzten Version, welche noch über die Eigenschaft der *Cap*-Bindung verfügte (PARN[1-537]), waren erfolglos (pers. Mitteilung H. Song).

Die funktionellen Analysen zur Substratbindung, Poly(A)-Spezifität sowie zum katalytischen Mechanismus, welche außerdem mit vollständigem PARN durchgeführt wurden, sind Bestandteil dieser Arbeit und werden im Folgenden näher vorgestellt.

##### 3.1.1 Die kinetischen Parameter von PARNn

PARNn wurde als GST-Fusionsprotein in *E. coli* synthetisiert und anschließend über eine Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose isoliert. Nach der proteolytischen Abspaltung des GST-tag erfolgte über eine Chromatographie an MonoQ sowie über eine Gelfiltration an Superdex 200 die weitere Aufreinigung zur Homogenität (Abb. 2).



**Abb. 2: Reinigung von PARNn.** PARNn wurde als GST-Fusion in *E. coli* synthetisiert und über sukzessive Chromatographieschritte an GSH-Sepharose, MonoQ und Superdex 200 zur Homogenität gereinigt. Dargestellt sind drei SDS-Polyacrylamidgelle. Die Elutionsfraktionen der Affinitätschromatographie an GSH-Sepharose wurden vereint (1) und zur Abspaltung des GST-tag mit PreScission Protease behandelt (2). Nach einer Chromatographie an MonoQ erfolgte abschließend eine Gelfiltration an Superdex 200. (3, 4): Elutionsfraktionen von MonoQ, die für die Gelfiltration eingesetzt wurden. (5, 6): Fraktionen mit dem höchsten Gehalt an PARNn wurden für die weiteren enzymatischen Assays verwendet. Die verschiedenen Proteine sind links bezeichnet. Das Molekulargewicht der Markerproteine (7) ist rechts angegeben.

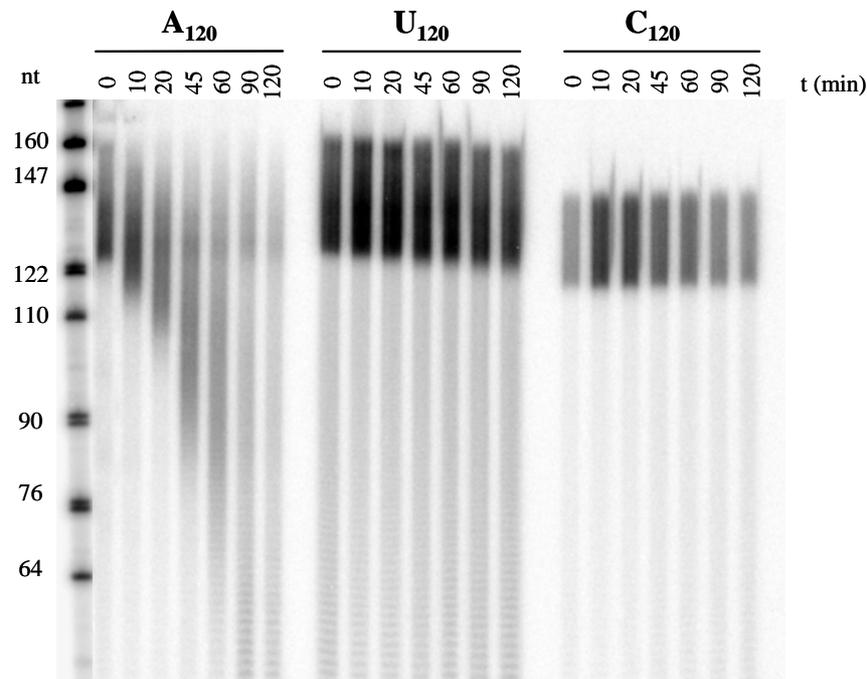
Um zu überprüfen, inwieweit die C-terminale Deletion die Substratbindung bzw. den Substratumsatz beeinflusst, wurde die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) sowie der  $K_M$ -Wert von PARNn unter Verwendung des TCA-Präzipitationsassays (2.5.7.3.) bestimmt und mit vollständigem PARN verglichen. Es zeigte sich, dass die C-terminale Verkürzung mit einer massiven Reduktion des Substratumsatzes verbunden ist. Die für PARNn bestimmte  $V_{\max}$  war im Vergleich zu vollständigem PARN um einen Faktor von ca. 30 vermindert. Gleichzeitig war der  $K_M$ -Wert um einen Faktor von 50 erhöht. Die Tab. 3 fasst die ermittelten kinetischen Parameter für PARNn und PARN zusammen.

**Tab. 3: Kinetische Konstanten von PARN und PARNn**

Protein	$V_{\max}$ (nmol AMP/mg*min)	$K_M$ (mM)
PARN	8400	0,01
PARNn	270	0,5

Für den Nachweis, dass die verringerte Substrataffinität, die sich in einem erhöhten  $K_M$ -Wert äußert, nicht gleichzeitig mit dem Verlust der Spezifität für Poly(A) verbunden ist, wurde 5'-markiertes, größenfraktioniertes (A)<sub>120</sub>, (U)<sub>120</sub> und (C)<sub>120</sub> mit jeweils 0,45 pmol PARNn umgesetzt. Das Abstoppen der Reaktionsansätze erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten durch die Zugabe von EDTA (25 mM). Nach einer Fällung wurden die Proben in einem

denaturierenden 10%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3). Während Oligo(C) vollständig resistent gegen den exonukleolytischen Angriff durch PARNn war, konnte für (U)<sub>120</sub> ein minimaler Abbau, für (A)<sub>120</sub> dagegen eine starke Degradation nachgewiesen werden, wobei diese, aufgrund der gleichmäßigen Verkürzung der Oligo(A)-Nukleotide, über einen distributiven Mechanismus erfolgte.



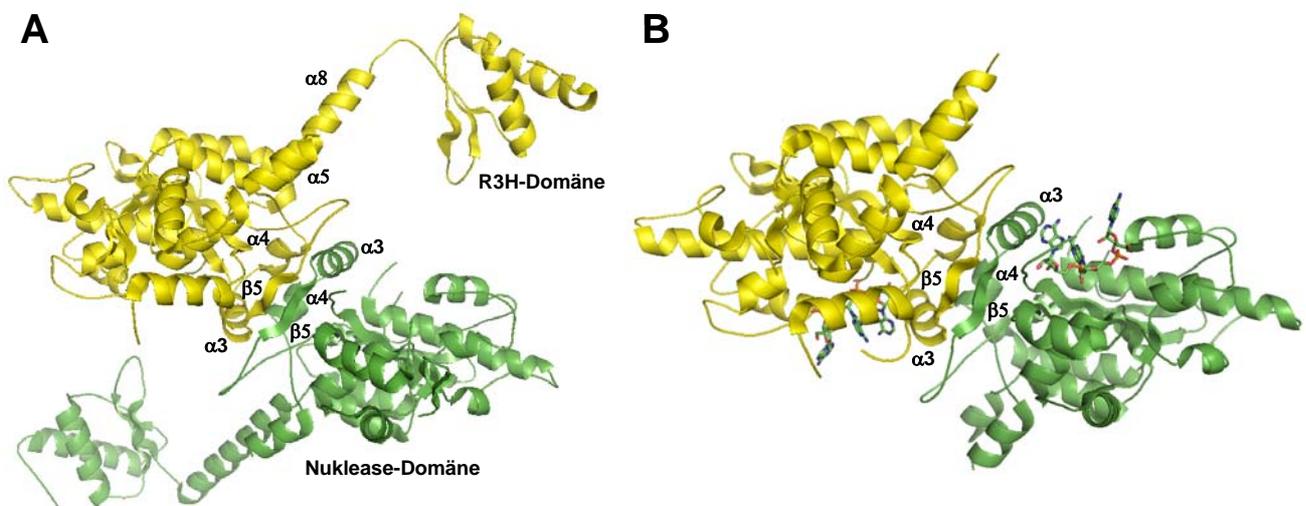
**Abb. 3: Poly(A)-Spezifität von PARNn.** PARNn wurde mit 5'-markiertem, größenfraktioniertem Oligo(A), Oligo(U) und Oligo (C) inkubiert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten erfolgte das Abstoppen der Reaktion durch die Zugabe von 25 mM EDTA. Nach dem Fällen wurden die Proben in einem 10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Pro Zeitpunkt wurden 0,45 pmol Protein und 1-2 pmol RNA (als Mononukleotide) eingesetzt.

Die Deletion der letzten 209 Aminosäuren (431-369) vom C-Terminus von PARN hat eine massive Verringerung der Substrataffinität und der Reaktionsgeschwindigkeit zur Konsequenz, beeinflusst aber nicht die Poly(A)-Spezifität. Wie diese Eigenschaft letztlich strukturell determiniert ist, sollte anhand der Kristallstrukturen von PARNn bzw. PARNn-RNA aufgezeigt werden.

### 3.1.2 Struktur von PARNn

Fasst man die wesentlichen Charakteristika der Kristallstrukturen von freiem und substratgebundenem PARNn zusammen, so kann der folgende Aufbau abgeleitet werden (Wu *et al.*, 2005). PARNn ist ein Homodimer. Dies entspricht Untersuchungen, bei denen das native Molekulargewicht des vollständigen Proteins mittels einer analytischen Ultrazentrifugation ermittelt wurde (Dehlin, 2004). Eine Untereinheit des Dimers besteht

dabei jeweils aus einer Nuklease-Domäne und einer R3H-Domäne, die über zwei  $\alpha$ -Helices ( $\alpha 5$  und  $\alpha 8$ ) miteinander verbunden sind (Abb. 4). Die Dimerisierung wird ausschließlich über die Nuklease-Domäne vermittelt. Diese enthält eine negativ geladene Vertiefung, in der die Bindung des Substrats erfolgt. In der Dimerstruktur liegen diese Vertiefungen auf entgegengesetzten Seiten, wobei die R3H-Domäne der einen Untereinheit die Poly(A)-Bindestelle der anderen Untereinheit überdeckt. In der Kristallstruktur von PARNn-RNA, welches mit einem (A)<sub>10</sub>-Nukleotid kokristallisiert wurde (PARNn-RNA), ist die R3H-Domäne nicht aufgelöst. Des Weiteren sind pro Untereinheit nur die letzten drei Adenosin-Nukleotide A<sub>8</sub>-A<sub>10</sub>, die in der Vertiefung der Nuklease-Domäne gebunden sind, klar definiert.



**Abb. 4: Struktur von PARNn in freier und substratgebundener Form.** **A:** Struktur von PARNn ohne Substrat, die Untereinheiten des Homodimers sind in gelb bzw. grün dargestellt. R3H-Domäne und Nuklease-Domäne sind durch die  $\alpha$ -Helices  $\alpha 5$  und  $\alpha 8$  verbunden. Wesentliche, an der Dimerisierung beteiligte, Strukturen ( $\alpha$ -Helices  $\alpha 3$ ,  $\alpha 4$  sowie das  $\beta$ -Faltblatt  $\beta 5$ ) sind bezeichnet. **B:** Struktur von PARNn, welches mit (A)<sub>10</sub> kokristallisiert wurde (PARNn-RNA). Die Nuklease-Domänen des Dimers sind in gelb bzw. grün dargestellt. Die R3H-Domäne konnte in der Struktur nicht aufgelöst werden, nur die letzten drei Adenosin-Nukleotide A<sub>8</sub>-A<sub>10</sub> (dargestellt als Strichmodell), welche in der Poly(A)-Bindestelle lokalisiert sind, waren klar definiert.

### 3.1.2.1 Das aktive Zentrum von PARN

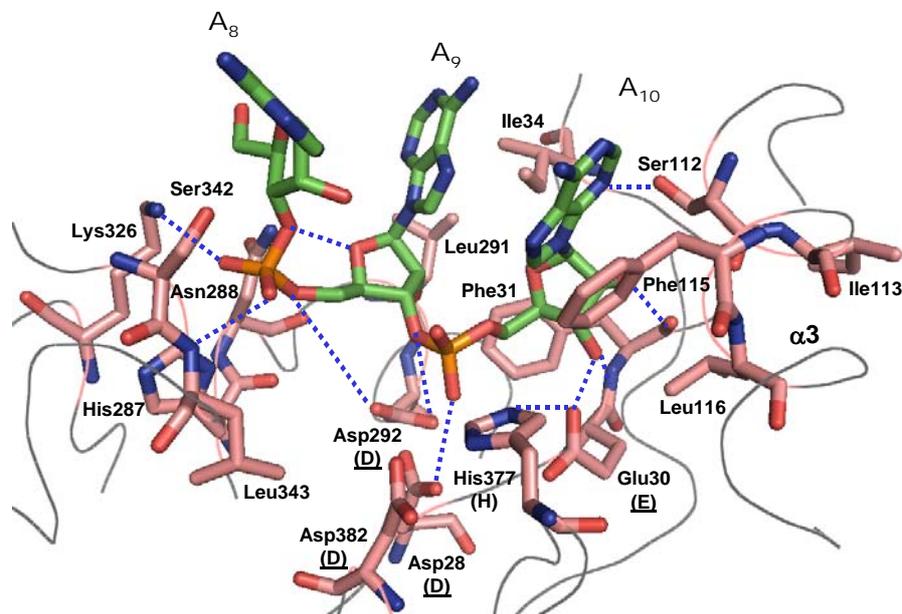
Das aktive Zentrum von Nukleasen, die der DEDD-Familie zugeordnet werden, enthält als wesentliches Charakteristikum vier stark konservierte saure Aminosäuren, drei Aspartate und ein Glutamat. Diese sind über drei separate Sequenzmotive verteilt (ExoI-ExoII) und für die koordinative Bindung von zwei divalenten Kationen ( $Mg^{2+}$  oder  $Mn^{2+}$ ), über die letztlich die Katalyse erfolgt, essentiell. Eine weitere konservierte Aminosäure (Histidin oder Tyrosin), die ein H<sub>2</sub>O-Molekül aktiviert bzw. für den nukleophilen Angriff auf die Phosphatgruppe positioniert, ist ebenfalls für die Katalyse von Bedeutung (Beese & Steitz, 1991; Zuo & Deutscher, 2001). Das aktive Zentrum von PARN wird durch die konservierten Aminosäuren

D28, E30, D292, D382 konstituiert (Ren *et al.*, 2002). Diese sind, genauso wie das konservierte Histidin 377, in einer negativ geladenen Vertiefung der Nuklease-Domäne lokalisiert, in welcher auch die Bindung des Trinukleotids erfolgt (Abb. 5). Die Substratbindung hat keine signifikanten Konformationsänderungen der genannten Aminosäurereste zur Konsequenz, was den experimentellen Befund bestätigt, dass sie an der Stabilisierung des Enzym-Substratkomplexes nicht beteiligt sind (Ren *et al.*, 2002).  $Mg^{2+}$  konnte im aktiven Zentrum von PARNn nicht nachgewiesen werden, obwohl 5 mM  $MgCl_2$  zum Kristallisationsansatz hinzugesetzt wurden. Die Kristallisation von PARNn-RNA erfolgte dagegen in Gegenwart von 5 mM EDTA, um den Abbau des Oligo(A)<sub>10</sub> zu unterbinden. Das aktive Zentrum von PARNn weist genauso wie die gesamte Nuklease-Domäne hohe strukturelle Ähnlichkeiten zu anderen Enzymen der DEDD-Familie auf, wie z.B. zur Nuklease-Domäne der Exonuklease I (Exo I) von *E. coli* (Breyer & Matthews, 2000) oder zu Pop2p, einer Untereinheit des CCR4-NOT-Komplexes von *S. cerevisiae* (Thore *et al.*, 2003), wobei ein wesentlicher Unterschied darin besteht, dass diese keine R3H-Domäne enthalten und ausschließlich als Monomere vorkommen.

### 3.1.2.2 Substratbindung

Die Bindung des Adenosin-Trinukleotids (A<sub>8</sub>-A<sub>10</sub>) in die Vertiefung der Nuklease-Domäne wird über eine Vielzahl von Wasserstoffbrückenbindungen, hydrophoben Interaktionen sowie van der Waals-Wechselwirkungen (VDW) gewährleistet (Abb. 5). So interagiert die Adeninbase von A<sub>10</sub> mit dem aromatischen Ring von F115. Das N3-Atom (Nomenklatur PDB-Datenbank) der Adeninbase ist weiterhin mit der Hydroxylgruppe des S112 über eine Wasserstoffbrücke verbunden. Zwischen dem Carbonylsauerstoff und dem Aminostickstoff von F31 und den 2'- bzw. 3'-Hydroxylgruppen der Ribose von A<sub>10</sub> bestehen Wasserstoffbrückenbindungen, wohingegen die Aminosäureseitenkette mit dem Ribose-Rest sowie mit der Phosphatgruppe über VDW interagiert. Die 3'-Hydroxylgruppe der Ribose von A<sub>10</sub> ist außerdem über eine Wasserstoffbrücke mit dem OE1-Atom des E30 verbunden, wobei dieses wiederum mit dem NE2-Atom des H377, ebenfalls über eine Wasserstoffbrücke, in Kontakt steht. Zwischen der Seitenkette des H377 und der Phosphatgruppe von A<sub>10</sub> bestehen VDW. Das O2P-Atom der Phosphatgruppe ist dabei mit dem OD2-Atom des D28 durch eine Wasserstoffbrücke verknüpft. Die Interaktion des A<sub>9</sub> mit dem Protein wird u.a. durch die Seitenketten von I34 und L291, die entsprechend mit der Adeninbase bzw. mit dem Ribose-Rest über VDW in enger Verbindung stehen, vermittelt. Weiterhin interagieren die O1P- und O2P-Atome der Phosphatgruppe von A<sub>9</sub> mit der NZ-Gruppe des K326 bzw. dem

Aminostickstoff von L343 über Wasserstoffbrücken. Weitere Wasserstoffbrücken existieren außerdem zwischen dem ND2-Atom von N288 und dem O4'-Atom der Ribose sowie zwischen den 2'-und 3'-Hydroxylgruppen der Ribose und der Seitenkette von D292, wobei letztere durch Wasser vermittelt werden. Weitere Kontakte sind zwischen der Seitenkette von H287 und der Phosphatgruppe vorhanden. Die Adeninbase von A<sub>8</sub> ist ins Lösungsmittel exponiert. VDW bestehen dabei zwischen dem Ribose-Ring und den Seitenketten von S342 und K326. Bis auf eine Ausnahme existieren keine Wasserstoffbrücken zwischen dem Protein und den Adeninbasen. Ein Großteil der Interaktionen zwischen Substrat und Enzym erfolgt über Ribose-Reste und die Phosphatgruppen, so dass die Poly(A)-Spezifität sich nicht ausschließlich aus den Strukturdaten ableiten lässt.

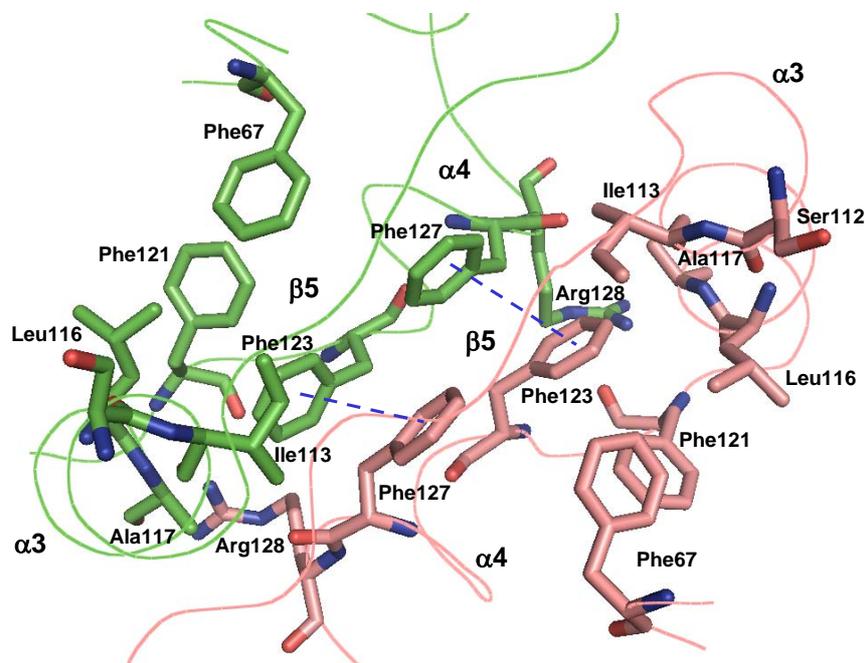


**Abb. 5: Struktur der Substratbindestelle von PARNn.** Die Aminosäurekette ist in grau dargestellt. An der Substratbindung beteiligte Aminosäuren und das Trinukleotid sind als Strichmodelle in magenta bzw. grün gezeigt. Sauerstoff- und Stickstoffatome sind rot bzw. blau gefärbt. Aminosäuren, die das aktive Zentrum von PARN konstituieren sowie der in die Katalyse involvierte konservierte Histidinrest sind zusätzlich durch die entsprechenden Buchstabensymbole gekennzeichnet. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte blaue Linien angegeben.

### 3.1.2.3 Die Dimerisierung der Nuklease-Domäne

Die Dimerisierung von PARNn wird durch intensive hydrophobe Interaktionen zwischen den Nuklease-Domänen gewährleistet. Zentrale strukturelle Komponenten sind dabei ein antiparalleles  $\beta$ -Faltblatt, welches sich aus jeweils einem  $\beta$ -Faltblatt pro Untereinheit ( $\beta$ 5) zusammensetzt sowie zwei  $\alpha$ -Helices von jeder Untereinheit ( $\alpha$ 3 und  $\alpha$ 4), die untereinander in enger Verbindung stehen (Abb. 4 und 6). Ein bedeutender hydrophober Kontakt wird durch die konservierten Phenylalanine 123 und 127 vermittelt. Das F123 der einen Untereinheit,

welches sich in einem hydrophoben Kern befindet, der von den Aminosäureresten F67, I113, L116, A117, F121 und F127 gebildet wird, interagiert dabei mit dem F127 sowie mit der Methylengruppe eines Argininrestes (R128) der anderen Untereinheit (Abb. 6). Die starken Wechselwirkungen zwischen den Nuklease-Domänen, deren Vermittlung z.T. über konservierte Aminosäuren sowie durch Strukturen, die in die Bindung des Substrats involviert sind (Helix  $\alpha_3$ , Abb. 5), erfolgt, könnten Hinweise dafür sein, dass das Dimer als strukturelle Einheit für die enzymatische Katalyse fungiert. Ein weiterer Anhaltspunkt ergibt sich außerdem aus der wechselseitigen Überlagerung der Substratbindestellen durch die entsprechenden R3H-Domänen, für die eine Funktion bei der Substratbindung angenommen wird (siehe unten, Abb. 4A).



**Abb. 6: Struktur der Kontaktfläche zwischen den Nuklease-Domänen von PARNn.** Dargestellt sind Ausschnitte der beiden Untereinheiten von PARNn, entsprechend grün bzw. magenta gefärbt, die sich ausschließlich auf die Kontaktfläche des Dimers beschränken. Die  $\alpha$ -Helices  $\alpha_3$  und  $\alpha_4$  sowie das  $\beta$ -Faltblatt  $\beta_5$  der jeweiligen Untereinheit sind bezeichnet. Die an der Dimerisierung beteiligten Aminosäurereste sind als Strichmodelle dargestellt. Carbonylsauerstoff und Aminostickstoff der Peptidkette sind rot bzw. blau gefärbt. Blaue, gestrichelte Linien demonstrieren bedeutende hydrophobe Interaktionen.

### 3.1.3 Funktionelle Analysen mit Punktmutanten von PARN

Um die Funktion der in den Kristallstrukturen von PARNn und PARNn-RNA identifizierten Aminosäuren für die Substratbindung, Dimerisierung und Katalyse zu bestätigen, wurden diese in vollständigem PARN mittels *in vitro*-Mutagenese durch Alanine ersetzt und die Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität näher analysiert. Über einen identischen experimentellen Ansatz erfolgte bereits der Nachweis, dass die konservierten sauren Aminosäuren des aktiven Zentrums (D28, E30, D292, D382) für die enzymatische Katalyse

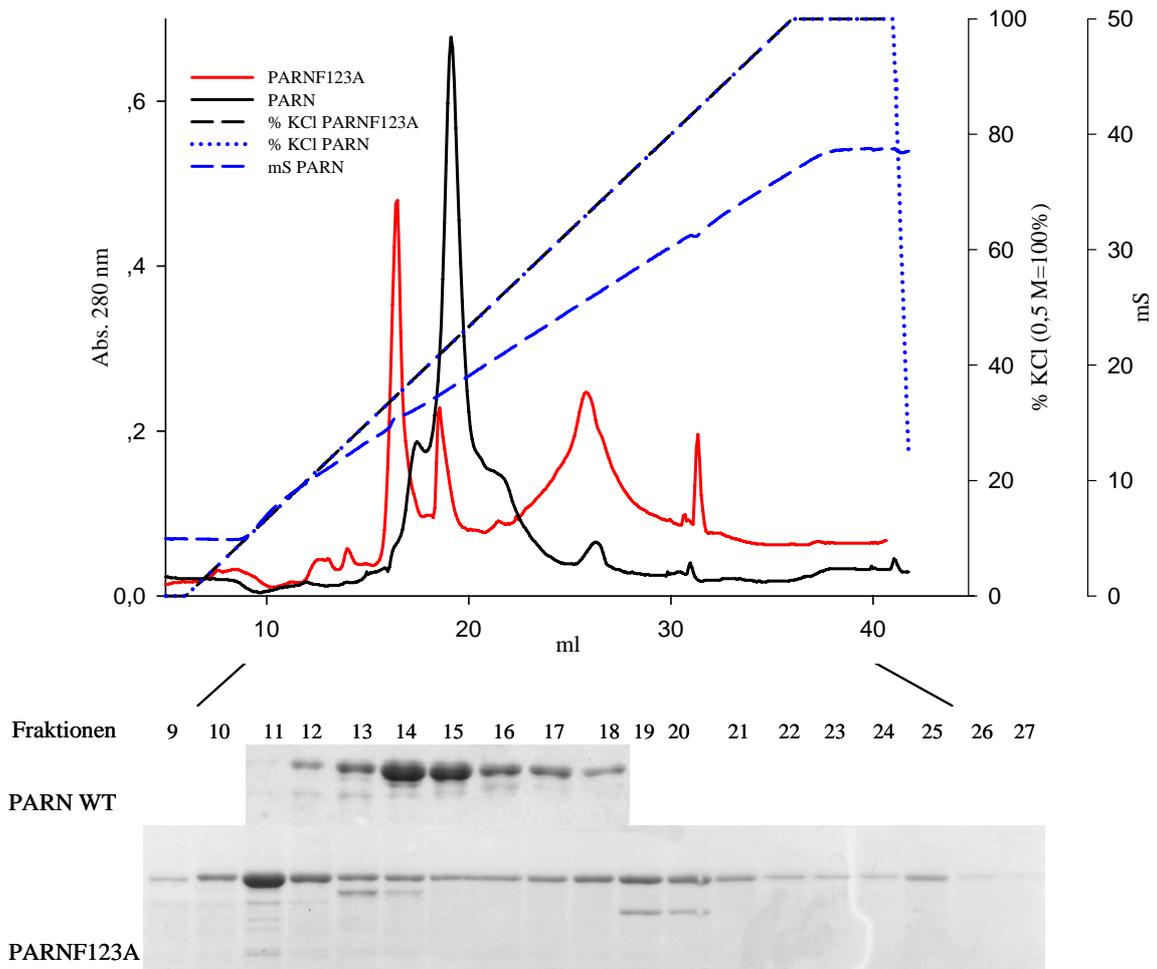
essentiell sind (Ren *et al.*, 2002). Die Substitution der entsprechenden Reste durch Alanin hatte für alle Mutanten den vollständigen Verlust der katalytischen Aktivität zur Konsequenz. Über eine  $\text{Fe}^{2+}$ -vermittelte Hydroxylradikal-Spaltung von PARN konnte dabei außerdem demonstriert werden, dass D28, E30 und D282 direkt in die Bindung von divalenten Kationen involviert sind. Die Bedeutung des H377 für die enzymatische Katalyse wurde in diesem Zusammenhang aber nicht überprüft.

Die Untersuchungen zur Substratbindung und Dimerisierung beschränkten sich vorwiegend auf Aminosäuren, für deren Substitution aufgrund der strukturellen Gegebenheiten ein deutlicher Effekt hinsichtlich der katalytischen Aktivität zu erwarten war. Von den, in die Substratbindung involvierten, Reste wurden daher F31, I34, F115, N288, L291 und K326 (Abb. 5), von den an der Dimerisierung beteiligten Aminosäuren F123 und F127 (Abb. 6) entsprechend durch Alanine ersetzt. In der Tab. 4 sind die untersuchten Aminosäuren mit den entsprechenden Funktionen zusammengefasst.

**Tab. 4: Aminosäuren von PARN und deren Funktion**

Aminosäure	Funktion
F31	Substratbindung
I34	Substratbindung
F115	Substratbindung
F123	Dimerisierung
F127	Dimerisierung
N288	Substratbindung
L291	Substratbindung
K326	Substratbindung
H377	Katalyse

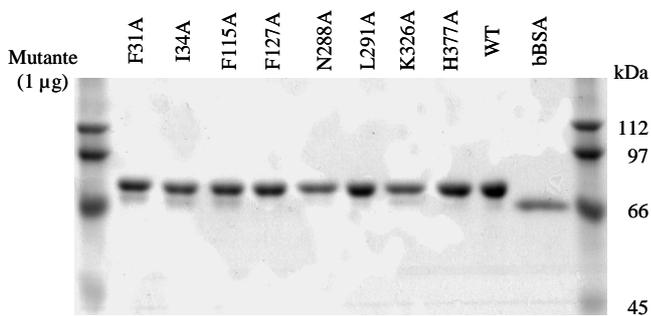
Die Varianten von PARN wurden in *E. coli* als His-tag-Fusionsproteine synthetisiert und anschließend über eine Affinitätschromatographie an Ni-NTA-Agarose isoliert. Die weitere Aufreinigung zur Homogenität erfolgte über eine Chromatographie an MonoQ, wobei diese für die verschiedenen Proteine unter identischen Bedingungen verlief. Dabei zeigten alle Punktmutanten sowie das Wildtypprotein ein annähernd identisches Elutionsverhalten. Eine Ausnahme war die PARN-Mutante F123A, deren Elution über einen sehr weiten Bereich des KCl-Gradienten erfolgte (Abb. 7).



**Abb. 7: Chromatographie der His-tag-Fusionen von PARN und der Mutante F123A an MonoQ.** Während PARN in einem engen Bereich des KCl-Gradienten (0,25-0,3 M) eluiert, ist die Punktmutante F123A über einen großen Teil des Gradientenbereichs diskontinuierlich verteilt. Dies wird zusätzlich durch die SDS-Polyacrylamidgele (10%) veranschaulicht, in denen die elektrophoretische Auftrennung der Elutionsfraktionen (ca. 1,5 µg Protein) erfolgte.

Von den Elutionsfraktionen der Chromatographie an MonoQ, in denen die verschiedenen Versionen von PARN enthalten waren, wurde unter Verwendung des TCA-Präzipitationsassays (2.5.7.3) die Volumenaktivität (nmol AMP/ml\*min) bestimmt. Zusätzlich zu einer vorläufigen Bewertung, inwieweit die einzelnen Mutationen in PARN die enzymatische Aktivität beeinflussen, konnte dabei gezeigt werden, dass der Proteingehalt mit der Menge an umgesetztem Substrat korrelierte. Ausnahme war die Mutante F123A, wo diese Beziehung nicht bestand. Das meiste Protein wurde in der Elutionsfraktion 11, die größte Volumenaktivität dagegen in der Elutionsfraktion 14 (Abb. 7, Daten nicht gezeigt) nachgewiesen. Die Ausbildung der nativen Proteinstruktur wird durch die Mutation F123A vermutlich massiv behindert. Das isolierte Protein wurde daher in die sich anschließenden Untersuchungen nicht weiter mit einbezogen.

Anhand der Elutionsfraktionen, welche die höchste Reinheit bzw. Volumenaktivität aufwiesen (Abb. 8), erfolgte die Ermittlung der spezifischen Aktivität der Punktmutanten von PARN unter Standardbedingungen. Dafür wurden jeweils steigende Mengen der entsprechenden Proteine unter Substratüberschuss (100-5000-fach in Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität) mit 0,05 mM Poly(A), was der fünffachen  $K_M$ -Konzentration von PARN entspricht (Tab. 3), umgesetzt. Die Reaktion erfolgte dabei unter Bedingungen, bei denen ein proportionales Verhältnis zwischen den im Ansatz verwendeten Enzymmengen und dem in der entsprechenden Reaktionszeit gebildeten AMP bestand. Die ermittelten spezifischen Aktivitäten sind in der Tab. 5 dargestellt.



**Abb. 8: His-tag-Fusionen der Punktmutanten von PARN.** Die Abbildung zeigt ein 10%-iges SDS-Polyacrylamidgel, in dem jeweils 1 µg der für die Aktivitätsassays verwendeten Elutionsfraktionen (Chromatographie an MonoQ) der verschiedenen Mutanten von PARN elektrophoretisch aufgetrennt wurden.

**Tab. 5: spezifische Aktivität der verschiedenen Punktmutanten von PARN sowie des Wildtypproteins unter Standardbedingungen**

Mutante	spezifische Aktivität <sup>*)</sup> (nmol AMP/min*mg)
Wildtyp	5440
F31A	95
I34A	430
F115A	650
F127A	3800
N288A	3200
L291A	4800
K326A	240
H377A	31

<sup>\*)</sup>Substratkonzentration 0,05 mM Poly(A) entspricht fünffacher  $K_M$ -Konzentration von PARN

Für die Mutation H377A konnte der drastischste Effekt auf die spezifische Aktivität ermittelt werden. Diese war um den Faktor 200 verringert, was die Vermutung stützt, dass H377 maßgeblich an der enzymatischen Katalyse beteiligt ist. Unter den Aminosäuren, denen eine Funktion für die Substratbindung zugewiesen wird, hatte die Umwandlung des F31 in Alanin

die stärksten Auswirkungen mit einer um den Faktor 50 reduzierten spezifischen Aktivität. Bei den Mutanten I34A, F115A und K326A dagegen war der Substratumsatz nur um einen Faktor von 10 bzw. 20 vermindert. Keinen deutlichen Einfluss hatten die Mutationen N288A und L291A. Der Austausch der Aminosäure F127 zu Alanin führte, zumindest unter Standardbedingungen, ebenfalls nicht zu einer signifikanten Abnahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

Mit Ausnahme von N288A und L291A, hatte die Mutation der Aminosäuren, für die eine Funktion bei der Substratbindung postuliert wird (F31, I34, F115 und K326), eine deutliche Reduktion der enzymatischen Aktivität zur Folge. Ob diese allein auf einer verringerten Affinität zwischen Enzym und Poly(A) beruht oder ob die strukturellen Veränderungen zusätzlich den katalytischen Mechanismus beeinflussen, wurde anhand der  $K_M$ - bzw.  $V_{max}$ -Werte, die in der Tab. 6 dargestellt sind, analysiert.

**Tab. 6: kinetische Konstanten der Punktmutanten von PARN sowie des Wildtypproteins**

Mutante	$V_{max}$ (nmol AMP/mg*min)	$K_M$ (mM)
Wildtyp	8400	0,01
F31A	160	0,05
I34A	420	0,03
F115A	780	0,02
K326A	560	0,08

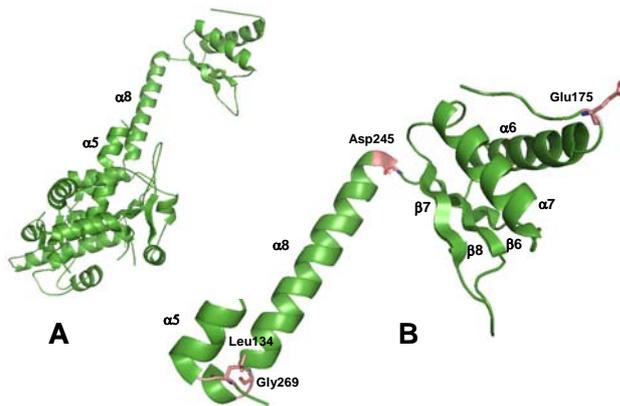
Für alle Punktmutanten konnte ein  $K_M$ -Wert bestimmt werden, der im Vergleich zum Wildtypprotein moderat erhöht war. Den eindeutigsten Einfluss hatten dabei die Mutationen K326A und F31A, die eine Steigerung des  $K_M$ -Wertes um den Faktor 8 bzw. 5 bewirkten. Ein wesentlich geringerer Effekt wurde für die Mutationen I34A und F115A nachgewiesen, welche lediglich zu einer Zunahme des  $K_M$ -Wertes um den Faktor 3 bzw. 2 führten. Gleichzeitig war die  $V_{max}$  im Vergleich zum Wildtypprotein für alle Punktmutanten signifikant verringert und zwar in Verhältnissen, die in etwa denen der spezifischen Aktivitäten, welche unter Standardbedingungen bestimmt wurden, entsprachen (Tab. 5). Die Verminderung des Substratumsatzes ist also nicht ausschließlich die Folge der reduzierten Affinität zwischen Enzym und Substrat. Die strukturellen Veränderungen scheinen zusätzlich Einfluss auf den Katalysemechanismus zu haben.

Die kinetischen Konstanten der Mutante F127A entsprachen in etwa den vom Wildtypprotein ( $V_{\max}=5120$  nmol AMP/mg\*min,  $K_M=0,01$  mM). Daher wird, unter der Annahme, dass das Homodimer als strukturelle Einheit für die enzymatische Katalyse essentiell ist (siehe oben), durch die Substitution des F127 in Alanin die Interaktion zwischen den Untereinheiten, zumindest in vollständigem PARN, nicht signifikant beeinflusst. Die gleiche Mutation in einer C-terminal verkürzten Version (PARN[1-537]) bewirkte dagegen eine deutliche Reduktion der katalytischen Aktivität sowie die Auflösung der Dimerstruktur (Wu *et al.*, 2005). Noch drastischere Effekte verursachte die Umwandlung des F123 in Alanin. Während beim vollständigen Protein anscheinend die Ausbildung der nativen Struktur behindert wird (siehe oben), liegt die verkürzte Version PARN[1-537] ausschließlich als Monomer vor und ist enzymatisch inaktiv (Wu *et al.*, 2005, siehe Diskussion: 4.1.2).

### 3.1.4 Die R3H-Domäne von PARN

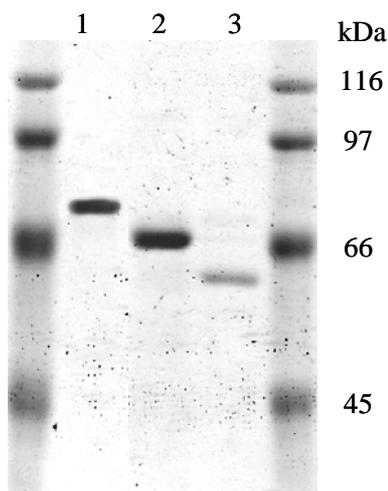
Die R3H-Domäne, ein konserviertes Sequenzmotiv und Bestandteil von einer Vielzahl von Proteinen, ist strukturell durch drei anti-parallele  $\beta$ -Faltblattstrukturen und zwei  $\alpha$ -Helices charakterisiert (Abb. 9B). Ein weiteres wesentliches Merkmal ist ein invariantes Arginin sowie ein hoch konserviertes Histidin. Beide sind durch drei Aminosäurereste getrennt. Als Funktion wird für die Domäne eine Beteiligung an der Bindung von RNA, ssDNA und dsDNA postuliert (Grishin, 1998; Liepinsh *et al.*, 2003). In der Dimerstruktur von PARNn sind die jeweiligen R3H-Domänen so angeordnet, dass die Substratbindestellen der Nuklease-Domänen wechselseitig überdeckt werden (Abb. 4). Die enge Assoziation weist auf eine Beteiligung der R3H-Domänen an der enzymatischen Reaktion hin, wobei diese in einer Erhöhung der Substrataffinität bzw. Poly(A)-Spezifität bestehen könnte. Ein weiterer Anhaltspunkt für einen Kontakt zwischen Substrat und R3H-Domäne ergibt sich aus der Überlagerung der Strukturen von PARNn und PARNn-RNA. Die Adeninbasen von A<sub>8</sub>, welche aus dem aktiven Zentrum exponiert sind (siehe oben, Abb. 5), würden dabei der R3H-Domäne direkt gegenüber stehen. Die R3H-Domäne könnte außerdem als Prozessivitätsfaktor fungieren, wobei die deckelartige Struktur die vorzeitige Dissoziation des Poly(A) von der Substratbindestelle unterbindet.

Die funktionelle Bedeutung der R3H-Domäne in PARN, sollte anhand von zwei Deletionsmutanten näher untersucht werden. Dafür wurde die R3H-Domäne einmal allein ( $\Delta$ PARN175-245) und einmal mit den als Linker fungierenden  $\alpha$ -Helices 5 und 8 ( $\Delta$ PARN134-269) aus dem vollständigen Protein entfernt (Abb. 9).



**Abb. 9: Deletionsmutanten von PARN.** (A) Dargestellt ist eine Untereinheit des PARN-Dimers mit Nuklease-Domäne und R3H-Domäne. (B) Bei den Deletionsmutanten von vollständigem PARN wurde die R3H-Domäne einmal allein ( $\Delta$ PARN175-245) sowie mit den als Linker zur Nuklease-Domäne fungierenden  $\alpha$ -Helices 5 und 8 ( $\Delta$ PARN134-269) entfernt. Die Aminosäuren, welche die entsprechenden deletierten Bereiche eingrenzen, sind als Strichmodelle dargestellt. Die zwei  $\alpha$ -Helices sowie drei  $\beta$ -Faltblattstrukturen der R3H-Domäne sind bezeichnet.

Die Synthese und Präparation der Deletionsvarianten sowie die erste grundlegende Charakterisierung der enzymatischen Aktivität erfolgte in Analogie zu den Punktmutanten von PARN. Die Variante  $\Delta$ PARN134-269 war durch eine geringe Löslichkeit gekennzeichnet. Ein Großteil des Proteins befand sich in *inclusion bodies* und präzipitierte während der sukzessiven Reinigungsschritte an Ni-NTA-Agarose und MonoQ. Der lösliche Anteil, welcher letztlich über die Chromatographie an MonoQ isoliert wurde (Abb. 10), war enzymatisch inaktiv.



**Abb. 10: Deletionsmutanten von PARN,** Dargestellt ist ein 8%-iges SDS-Polyacrylamidgel, in dem ca. 1  $\mu$ g PARN (1) sowie die Deletionsvarianten  $\Delta$ PARN175-245 (2) und  $\Delta$ PARN134-269 (3) elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die Proteinfraktion von  $\Delta$ PARN175-245 wurde für die enzymatischen Assays verwendet.  $\Delta$ PARN134-269 war enzymatisch inaktiv.

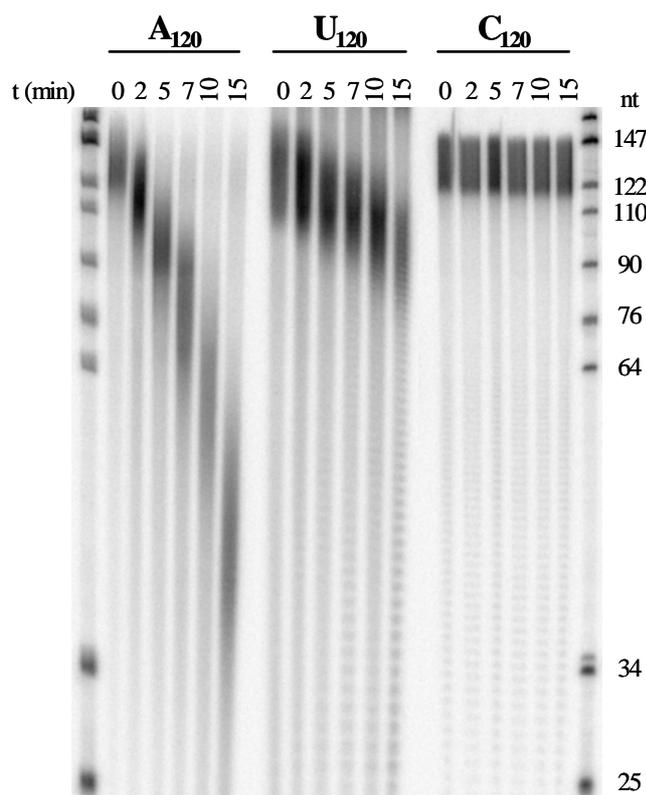
Die spezifische Aktivität von  $\Delta$ PARN175-245 unter Standardbedingungen betrug 1500 nmol AMP/min\*mg und war damit im Vergleich zum Wildtypprotein um den Faktor 3 reduziert (Tab. 5). Anhand der kinetischen Parameter (Tab. 7) ist ersichtlich, dass diese Verringerung des Substratumsatzes ausschließlich auf einer verminderten Affinität zwischen Enzym und Substrat beruht. Der  $K_M$ -Wert von  $\Delta$ PARN175-245 war im Vergleich zum Wildtypprotein um einen Faktor von 16 erhöht. Dem stand sogar eine moderat gesteigerte  $V_{max}$  (um den Faktor 2) gegenüber.

**Tab. 7: Kinetische Parameter von PARN und  $\Delta$ PARN134-269**

Protein	Spezifischen Aktivität <sup>*)</sup> (nmol AMP/min*mg)	V <sub>max</sub> (nmol AMP/min*mg)	K <sub>M</sub> (mM)
PARN	5440	8400	0,01
$\Delta$ PARN175-245	1500	16500	0,16

<sup>\*)</sup>Substratkonzentration 0,05 mM Poly(A) entspricht der fünffachen K<sub>M</sub>-Konzentration von PARN

Die aufgezeigte Abnahme der Affinität zwischen der Deletionsmutante und dem Substrat könnte auch Ausdruck einer verminderten Spezifität für Poly(A) sein. Um dies näher zu untersuchen, wurde größenfraktioniertes, 5'-markiertes (A)<sub>120</sub>, (U)<sub>120</sub> und (C)<sub>120</sub> mit 0,04 pmol  $\Delta$ PARN175-245 umgesetzt. Oligo(C) war dabei vollständig resistent gegen einen exonukleolytischen Verdau. Im Gegensatz dazu konnte bei Oligo(U) eine geringfügige Degradation, bei Oligo(A) dagegen ein starker Abbau nachgewiesen werden (Abb. 11). Die Verkürzung des (A)<sub>120</sub> erfolgte dabei relativ gleichmäßig, was für einen distributiven Abbaumechanismus sprechen würde.



**Abb. 11: Poly(A)-Spezifität der Deletionsmutante  $\Delta$ PARN175-245.** Gröößenfraktioniertes und 5'-markiertes (A)<sub>120</sub>, (U)<sub>120</sub> und (C)<sub>120</sub> wurde mit  $\Delta$ PARN175-245 umgesetzt. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten mit 25 mM EDTA. Die Reaktionsansätze wurden gefällt und in einem 10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Pro Zeitpunkt wurden 0,04 pmol Protein und 1-2 pmol RNA (als Mononukleotide) eingesetzt

Die R3H-Domäne ist also erheblich in die Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes involviert und könnte in diesem Zusammenhang auch wesentlichen Anteil an der Prozessivität von PARN haben. Gleichzeitig ist die Bedeutung für die Poly(A)-Spezifität eher gering einzuschätzen.

Aus den Kristallstrukturen von PARNn in substratfreier bzw. substratgebundener Form sowie über die durchgeführten funktionellen Analysen mit den Punkt- bzw. Deletionsmutanten können zumindest in Ansätzen wesentliche Voraussetzungen für die Poly(A)-Bindung und den Katalysemechanismus abgeleitet werden. Für andere Eigenschaften, wie die Poly(A)-Spezifität oder den Einfluss der *Cap*-Struktur auf den Mechanismus des Substratumsatzes, ist dies dagegen nur eingeschränkt oder überhaupt nicht möglich. Vor allem die Bindung des *Cap* und die damit verbundene Umwandlung des distributiven in einen prozessiven Abbaumechanismus könnten für die physiologische Funktion von PARN von entscheidender Bedeutung sein. Darüber hinaus sind diese Eigenschaften deutliche Hinweise für eine Beteiligung von PARN am *turnover* von mRNAs bzw. allgemein von RNAs, die durch die RNA-Polymerase II synthetisiert werden.

Die Bedeutung bzw. Funktion von PARN in somatischen Zellen wurde bisher noch nicht genauer untersucht. Ein experimenteller Ansatz ergibt sich dabei aus der dsRNA-*interference* (RNAi) in HeLa-Zellen (Elbashir *et al.*, 2001). Die Reduktion der Expression von PARN sollte den Ausfall bzw. die deutliche Reduktion der biologischen Funktion des Enzyms zur Folge haben und spezifische phänotypische Effekte verursachen.

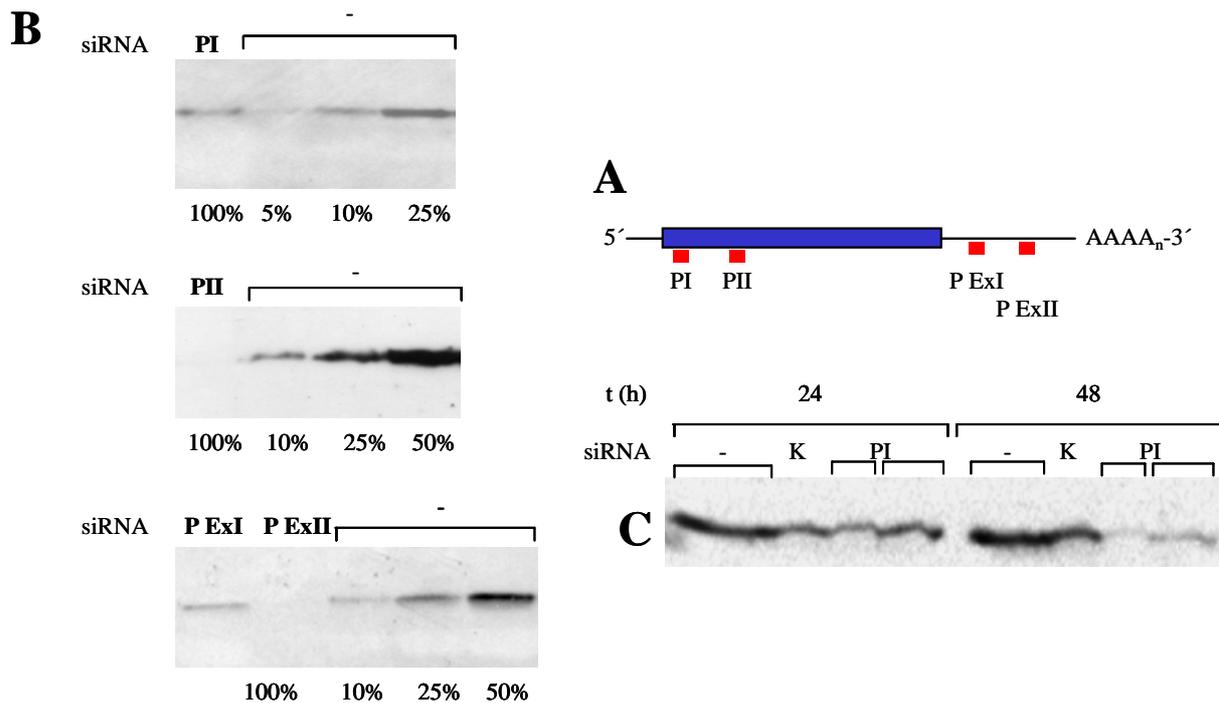
In den sich anschließenden Abschnitten werden diese Untersuchungen näher vorgestellt.

## 3.2 Untersuchungen zur *in vivo*-Funktion von PARN in HeLa-Zellen

### 3.2.1 *Knockdown* von PARN durch RNA-Interferenz (RNAi)

Experimentelle Grundlage für die Untersuchung der *in vivo*-Aktivität von PARN war die Depletion des Proteins in HeLa-Zellen mittels RNAi. Eine signifikante Verringerung der *steady-state*-Proteinkonzentration sollte idealerweise den Ausfall oder zumindest eine signifikante Reduktion der biologischen Funktion zu Folge haben.

Mit den siRNAs (Tab. 1D), welche für den *knockdown* von PARN in HeLa-Zellen transfiziert wurden, konnte eine Verringerung der Proteinmenge bis auf 10% (PI, P Ex I) bzw. bis unter 10% (PII, PExII) erreicht werden (Abb. 12A). Eine deutliche Reduktion von PARN war bereits 48 h nach der Transfektion zu detektieren (Abb. 12B). Titrationsexperimente mit der siRNA PI (15; 7,5; 3; 1,5; 1; 0,75 pmol/cm<sup>2</sup> Kulturfläche) zeigten, dass eine Menge von 7,5 pmol/cm<sup>2</sup> Kulturfläche bereits einen vollständigen *knockdown* bewirkte. Ab einer Menge von 3 pmol/cm<sup>2</sup> war dagegen keine Reduktion von PARN mehr nachzuweisen (nicht gezeigt).



**Abb. 12: *Knockdown* von PARN durch RNAi.** Für den *knockdown* von PARN wurden vier verschiedene siRNAs in HeLa-Zellen transfiziert. **A** zeigt ein Schema der Sequenzbereiche der PARN-mRNA, von denen sich die siRNAs ableiten (blauer Balken: ORF, rote Balken: siRNAs, Linien: 5'- bzw. 3'-UTR, AAAAA<sub>n</sub>: Poly(A)-Schwanz). **B**: Die Quantifizierung des Proteinlevels von PARN 72 h nach der Transfektion erfolgte anhand von *Western blots* mit einem Anti-PARN-Antikörper. Extrakte von HeLa-Zellen, welche mit jeweils einer der siRNAs (fett hervorgehoben) transfiziert waren, wurden dabei mit unterschiedlichen Extraktmengen (Angabe als prozentualer Anteil) von unbehandelten Zellen (-) verglichen. **C**: Zeitverlauf des PARN-*knockdowns*. Die angegebenen Zeitpunkte entsprechen den Stunden nach der Transfektion, (-) unbehandelte Zellen, (K) als Kontrolle wurde eine siRNA ohne Zielsequenz transfiziert.

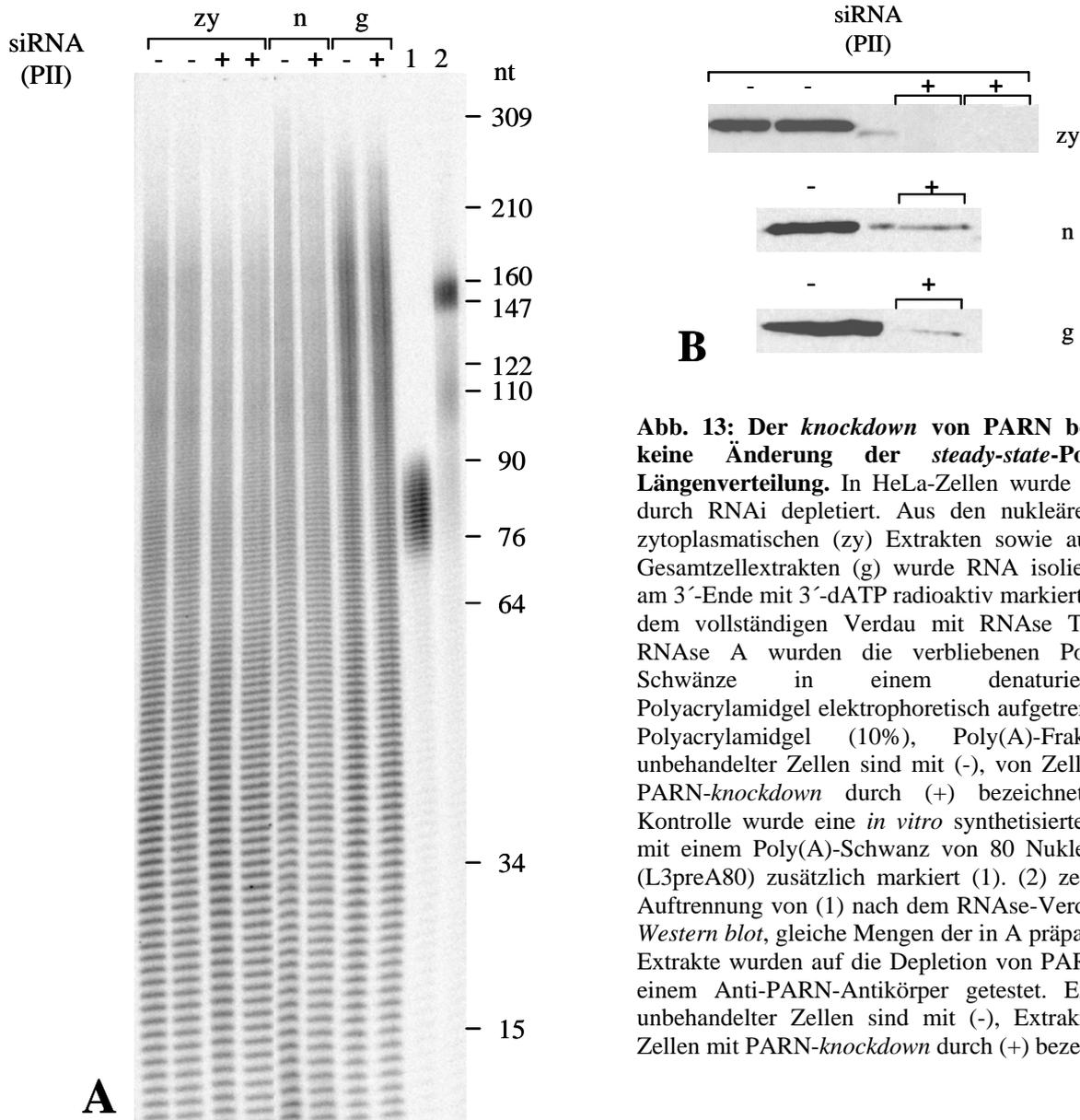
Der Eingriff in komplexe Prozesse wie den mRNA-*turnover*, wie er durch den *knockdown* von PARN in HeLa-Zellen bewirkt werden soll, könnte vielfältige phänotypische Effekte zur Folge haben. Am direktesten zugänglich wären dabei generelle Veränderungen im Poly(A)-Status mit den zu erwartenden Konsequenzen einer erhöhten Stabilität bzw. einer verringerten Abbaurrate von mRNA. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen werden nachfolgend näher vorgestellt.

### 3.2.1.1 PARN hat keinen Einfluss auf die *steady-state*-Poly(A)-Längenverteilung in HeLa-Zellen

Um zu analysieren, ob eine Verringerung der Proteinkonzentration von PARN in HeLa-Zellen eine generelle Veränderung der *steady-state*-Poly(A)-Schwanzlänge zur Folge hat, wurde die Poly(A)-Längenverteilung im Nukleus sowie im Zytoplasma nach einem PARN-*knockdown* untersucht und mit der von unbehandelten Zellen verglichen. Ausgangspunkt dafür waren RNA-Präparationen aus nukleären und zytoplasmatischen sowie Gesamtzellextrakten. Nach einer radioaktiven Markierung der 3'-Enden durch 3'-dATP erfolgte ein vollständiger Verdau mit der RNase T1 und der RNase A. Die nach dieser Prozedur verbliebenen Poly(A)-Schwänze wurden abschließend in einem 10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Depletion von PARN sollte eine Verschiebung in der Längenverteilung hin zu längerem Poly(A) verursachen, wie dies anhand des *knockdowns* der Deadenylase Caf1 in *Drosophila*-S2-Zellen demonstriert wurde (Temme *et al.*, 2004).

Ein solcher Effekt konnte jedoch nach einem *knockdown* von PARN nicht beobachtet werden. Sowohl bei unbehandelten als auch bei RNAi-behandelten Zellen wurde eine maximale Poly(A)-Länge von ca. 200 AMP-Resten im zytoplasmatischen Extrakt sowie im Gesamtzellextrakt bestimmt (Abb. 13A). In der nukleären Präparation dagegen wurde diese erwartungsgemäß noch etwas überschritten. Die maximale Poly(A)-Länge in der nukleären Präparation von unbehandelten Zellen war sogar leicht erhöht im Vergleich zu Zellen, bei denen PARN depletiert wurde. Die verschiedenen Poly(A)-Längenpopulationen sind in allen Präparationen gleichmäßig verteilt. Die *steady-state*-Längenverteilung von Poly(A) wurde also weder im Zytoplasma noch im Kern durch den PARN-*knockdown* beeinflusst.



**Abb. 13: Der knockdown von PARN bewirkt keine Änderung der steady-state-Poly(A)-Längenverteilung.** In HeLa-Zellen wurde PARN durch RNAi depletiert. Aus den nukleären (n), zytoplasmatischen (zy) Extrakten sowie aus den Gesamtzell-extrakten (g) wurde RNA isoliert und am 3'-Ende mit 3'-dATP radioaktiv markiert. Nach dem vollständigen Verdau mit RNase T1 und RNase A wurden die verbliebenen Poly(A)-Schwänze in einem denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. **A:** Polyacrylamidgel (10%), Poly(A)-Fraktionen un behandelter Zellen sind mit (-), von Zellen mit PARN-knockdown durch (+) bezeichnet. Als Kontrolle wurde eine *in vitro* synthetisierte RNA mit einem Poly(A)-Schwanz von 80 Nukleotiden (L3preA80) zusätzlich markiert (1). (2) zeigt die Auftrennung von (1) nach dem RNase-Verdau. **B:** Western blot, gleiche Mengen der in A präparierten Extrakten wurden auf die Depletion von PARN mit einem Anti-PARN-Antikörper getestet. Extrakten un behandelter Zellen sind mit (-), Extrakten von Zellen mit PARN-knockdown durch (+) bezeichnet.

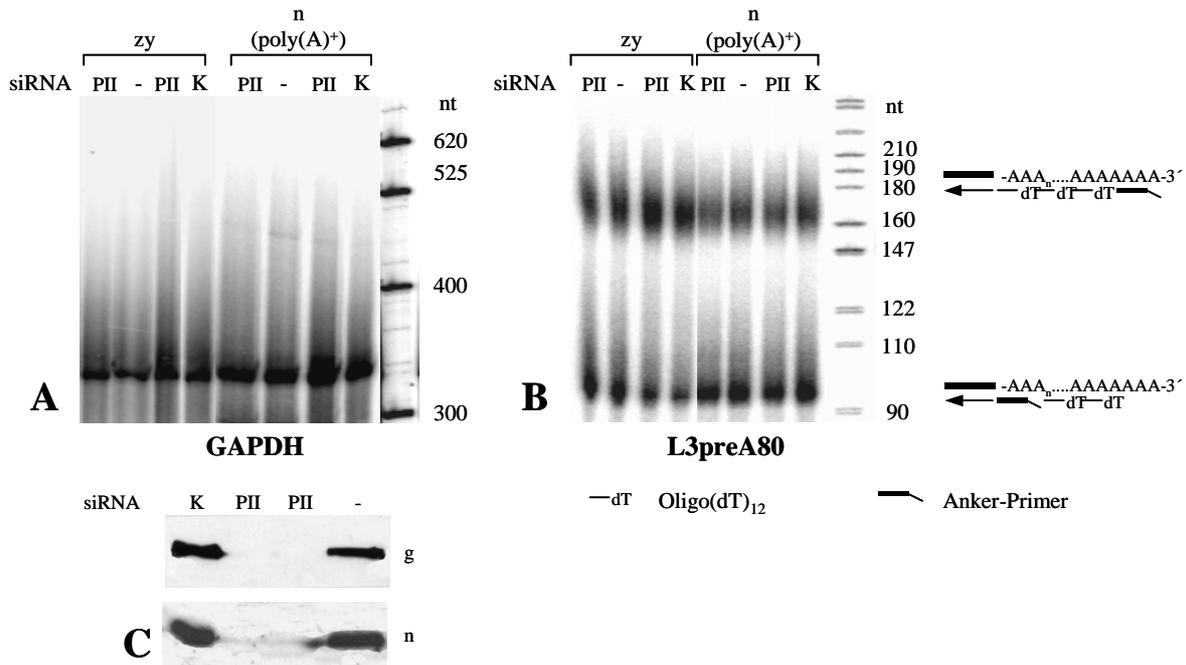
Die Aktivität von PARN wird zumindest *in vitro* maßgeblich durch die *Cap*-Struktur am 5'-Ende der mRNA beeinflusst. Eine direkte Interaktion bewirkt eine Zunahme der Deadenylierungsrate sowie die Steigerung des prozessiven Abbaumodus. Um die Bindung der *Cap*-Struktur konkurriert PARN vermutlich mit dem Translationsinitiationsfaktor eIF4E. Dieser bildet zusammen mit eIF4G einen Komplex, über den letztlich die Assoziation der mRNA mit der 60S-Untereinheit des Ribosoms initiiert wird. Aktuelle Untersuchungen haben gezeigt, dass unter modifizierten Wachstumsbedingungen (Serummangel) die Interaktion von eIF4E mit der 5'-*Cap*-Struktur vermindert, die von PARN dagegen verstärkt ist (Seal *et al.*,

2005). Die modifizierte Affinität basiert dabei auf Veränderungen im Phosphorylierungsstatus beider Proteine und hat eine erhöhte Abbaurate verschiedener mRNAs zur Konsequenz. Eine Möglichkeit, die Zugänglichkeit der *Cap*-Struktur für PARN zu erhöhen, wäre die Depletion von eIF4E durch RNAi. Dies müsste zu einer verstärkten Degradierung von Poly(A) führen. Dieser Effekt könnte dann, vorausgesetzt PARN ist die dominierende Deadenylase in HeLa-Zellen, durch einen PARN/eIF4E Doppel-*knockdown* komplementiert werden. Diese theoretischen Überlegungen wurden experimentell jedoch nicht bestätigt. Weder RNAi gegen eIF4E noch der *knockdown* beider Proteine hatte einen Einfluss auf die Poly(A)-Längenverteilung in HeLa-Zellen (nicht gezeigt).

Als Ergänzung zu den Untersuchungen der Poly(A)-Längenverteilung in den Zellkompartimenten wurde weiterhin analysiert, ob die Reduktion der Proteinkonzentration von PARN durch Änderungen in der Poly(A)-Schwanzlänge einer einzelnen mRNA detektiert werden kann. So besteht die Möglichkeit, dass PARN in die Poly(A)-Längenkontrolle involviert ist und überschüssige AMP-Reste, welche nach der Polyadenylierung der Prä-mRNA angefügt werden, entfernt. Grundlage des experimentellen Ansatzes waren zytoplasmatische RNA-Präparationen sowie nukleäre Poly(A)<sup>+</sup>-RNA von HeLa-Zellen, die mit der siRNA PII transfiziert wurden. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen sowie Zellen, deren Transfektion mit einer siRNA ohne Zielsequenz erfolgte. Mit einem PAT-Assay (Sallés *et al.*, 1999, siehe 2.5.7.5) und unter Verwendung eines Oligonukleotids, welches 100 Nukleotide stromaufwärts vom Stopkodon der Glycerinaldehyd-3'-Phosphat-Dehydrogenase-(GAPDH)-Sequenz bindet, erfolgte die Bestimmung der Poly(A)-Schwanzlänge der GAPDH-mRNA. Als Kontrolle diente eine *in vitro* synthetisierte RNA, welche einen Poly(A)-Schwanz von 80 AMP-Resten aufwies (L3preA80). Dieses aus insgesamt 170 Nukleotiden bestehende Transkript wurde zu jedem Reaktionsansatz zugefügt.

Die Länge des PCR-Fragments von GAPDH vom 5'-Ende des verwendeten Oligonukleotids bis einschließlich des ersten AMP des Poly(A)-Schwanzes beträgt ca. 310 Nukleotide. Berücksichtigt man zusätzlich den Poly(A)-Schwanz mit einer Länge von ca. 200 AMP-Resten, dann sind Fragmente im Größenbereich von 320-520 Nukleotiden zu erwarten. Die durch PCR erhaltenen GAPDH-Fragmente decken genau diesen Größenbereich ab (Abb. 14A). Ein Unterschied in der maximalen Nukleotidlänge sowie in der Längenverteilung der PCR-Produkte zwischen den verschiedenen Ansätzen konnte dabei nicht beobachtet werden. Die amplifizierte DNA bei 320 Nukleotiden würde einem GAPDH-Fragment ohne Poly(A)-

Schwanz entsprechen. Dieses entsteht wahrscheinlich dann, wenn der Anker-Primer nicht nur mit den ungepaarten AMP-Resten am 3'-Ende, sondern zusätzlich am Beginn des Poly(A)-Schwanzes hybridisiert. Dies wird durch die erhaltenen PCR-Produkte der L3preA80-Kontrolle bestätigt. Neben einem Fragment von ca. 165-170 Nukleotiden, was der vollständigen Länge entspricht, ist ein weiteres Fragment von ca. 95 Nukleotiden amplifiziert worden. Dies stimmt mit der Länge der L3pre-Sequenz inklusive Anker-Primer-Sequenz überein. Eine schematische Darstellung ist in der Abb. 14B gegeben.



**Abb. 14:** Die Poly(A)-Schwanzlänge der GAPDH-mRNA wurde durch einen PARN-knockdown nicht beeinflusst. HeLa-Zellen wurden mit der siRNA PII transfiziert, um das Expressionslevel von PARN zu reduzieren. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-) sowie Zellen, deren Transfektion mit einer siRNA ohne Zielsequenz (K) erfolgte. Zytoplasmatische RNA (zy) und nukleare (n) Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde präpariert und in einen PAT-Assay eingesetzt. Als Kontrolle wurde zu jedem Reaktionsansatz eine *in vitro* synthetisierte RNA mit einem Poly(A)-Schwanz von 80 AMP-Resten hinzugefügt (L3preA80). Mit 5'-markierten Oligonukleotiden, welche das 5'-Ende von L3preA80 sowie die GAPDH-Sequenz 100 Nukleotide stromaufwärts von Stopkodon binden, wurde eine PCR durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 5%-igen denaturierenden Polyacrylamidgelen. **A:** PCR-Produkte der GAPDH-Sequenz. **B** PCR-Produkte der L3preA80-Sequenz. Die Entstehung der beiden Produktvarianten ist rechts schematisch dargestellt. Die Markerbanden sind mit den entsprechenden Nukleotidlängen (nt) rechts gekennzeichnet. **C:** Western blot, gleiche Mengen der nuklearen (n) Extrakte sowie der Gesamtzellextrakte (g) wurden mit einem Anti-PARN-Immunsereum auf die Reduktion der Proteinkonzentration von PARN untersucht.

Weder die maximale Länge des Poly(A)-Schwanzes von nukleärer noch die *steady-state*-Länge von zytoplasmatischer GAPDH-mRNA wurde durch die Reduktion des Expressionslevels von PARN beeinflusst.

### 3.2.1.2 Der Einfluss von PARN auf die mRNA-Stabilität bzw. mRNA-Abbaurate

#### 3.2.1.2.1 Auswirkungen eines PARN-knockdowns auf die Stabilität transient exprimierter mRNAs

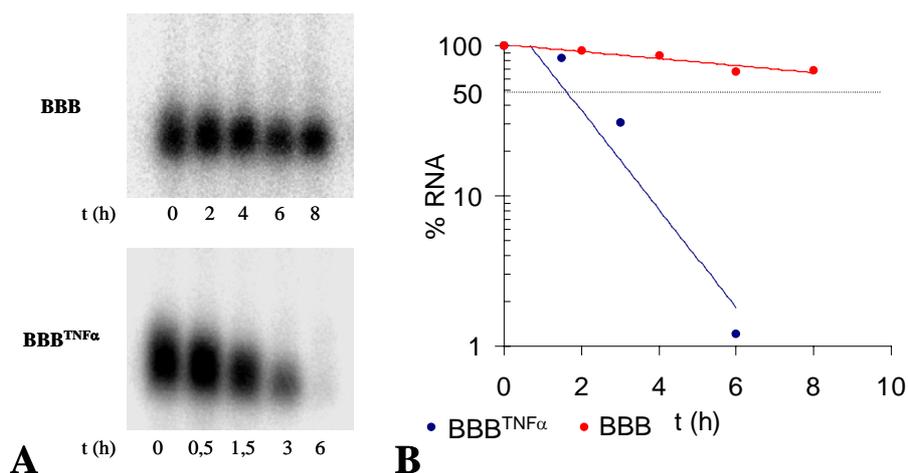
Dass die PARN-Depletion keine Veränderungen bei der *steady-state*-Poly(A)-Längenverteilung verursachte, könnte u.a. dadurch begründet sein, dass nur spezifische mRNAs von PARN deadenyliert werden bzw. dass dies nur unter definierten Bedingungen stattfindet. Aus diesem Grund wurde die Analyse auf einzelne Transkripte ausgeweitet, wobei der Schwerpunkt auf mRNAs lag, die destabilisierende Elemente (AREs) im 3'-UTR enthielten. Deren Degradation ist aufgrund einer sehr geringen Halbwertszeit mit den verwendeten experimentellen Methoden leichter kinetisch zu erfassen. Neben den technischen Vorteilen existieren außerdem Hinweise, dass in den beschleunigten Abbau, der u.a. durch eine erhöhte Deadenylierungsrate ausgelöst wird, auch PARN involviert sein könnte. Die Aktivität wird dabei von Proteinen vermittelt, welche an die ARE-Sequenzen entweder direkt binden (ARE-BP) oder über zusätzliche Faktoren mit diesen assoziiert sind (Tran *et al.* 2004; Gherzi *et al.* 2004). So wird z.B. die von PARN katalysierte Deadenylierung von RNAs, welche das ARE der humanen TNF $\alpha$ -RNA enthalten, durch das ARE-BP Tristetraprolin (TPP) *in vitro* stimuliert (Lai *et al.* 2003).

Es wird zwischen drei verschiedenen Klassen von ARE-Sequenzen unterschieden. Die Zuordnung basiert dabei hauptsächlich auf der Anzahl bzw. Anwesenheit von AUUUA-Motiven. Klasse II AREs enthalten fünf AUUUA-Motive. Typische Vertreter sind das TNF $\alpha$ -ARE und das *granulocyte-macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF)-ARE. Zur Klasse I gehören AREs die nur ein bis drei (AUUUA)-Motive besitzen, wie z.B. die AREs der Interleukin 8 (IL8)- bzw. *c-fos*-mRNA. Zur dritten Klasse werden AREs ohne AUUUA-Sequenz gerechnet (Xu *et al.*, 1997).

Für die Analysen wurde die  $\beta$ -Globin-mRNA aus Kaninchen (fortlaufend mit BBB bezeichnet) verwendet. Diese war durch die Einfügung verschiedener, humaner ARE-Sequenzen im 3'-UTR modifiziert, was gleichzeitig mit einer massiven Reduktion der Halbwertszeit des sehr stabilen Transkripts ( $t_{1/2} > 16$  h, Xu *et al.*, 1998) korreliert. Die entsprechenden kodierenden Sequenzen lagen bereits kloniert im pTet-Vektor vor. Es wurden Varianten mit den IL8- (Winzen *et al.* 1999), GM-CSF- und *c-fos*- AREs benutzt (Xu, *et al.* 1989). Eine weitere Variante, welche die ARE-Sequenz des humanen TNF $\alpha$ -Gens enthielt, wurde im Rahmen dieser Arbeit hergestellt (siehe unten, 2.5.6.3). Die Expression der verschiedenen BBB-Versionen erfolgte transient in HeLa<sub>Tet-Off</sub>-Zellen. Diese Zelllinie

ermöglicht eine regulierte Genexpression. Basis ist ein konstitutiv exprimierter Transkriptionsaktivator (*tetracyclin-controlled transactivator* (tTA)), dessen Bindung an die Promotorsequenz des pTet-Vektors durch Tetracyclin gesteuert wird. In HeLa<sub>Tet-Off</sub>-Zellen ist in Gegenwart von Tetracyclin (alternativ Doxycyclin) die Promotorbindung und damit die Transkription der entsprechenden Sequenz unterbunden.

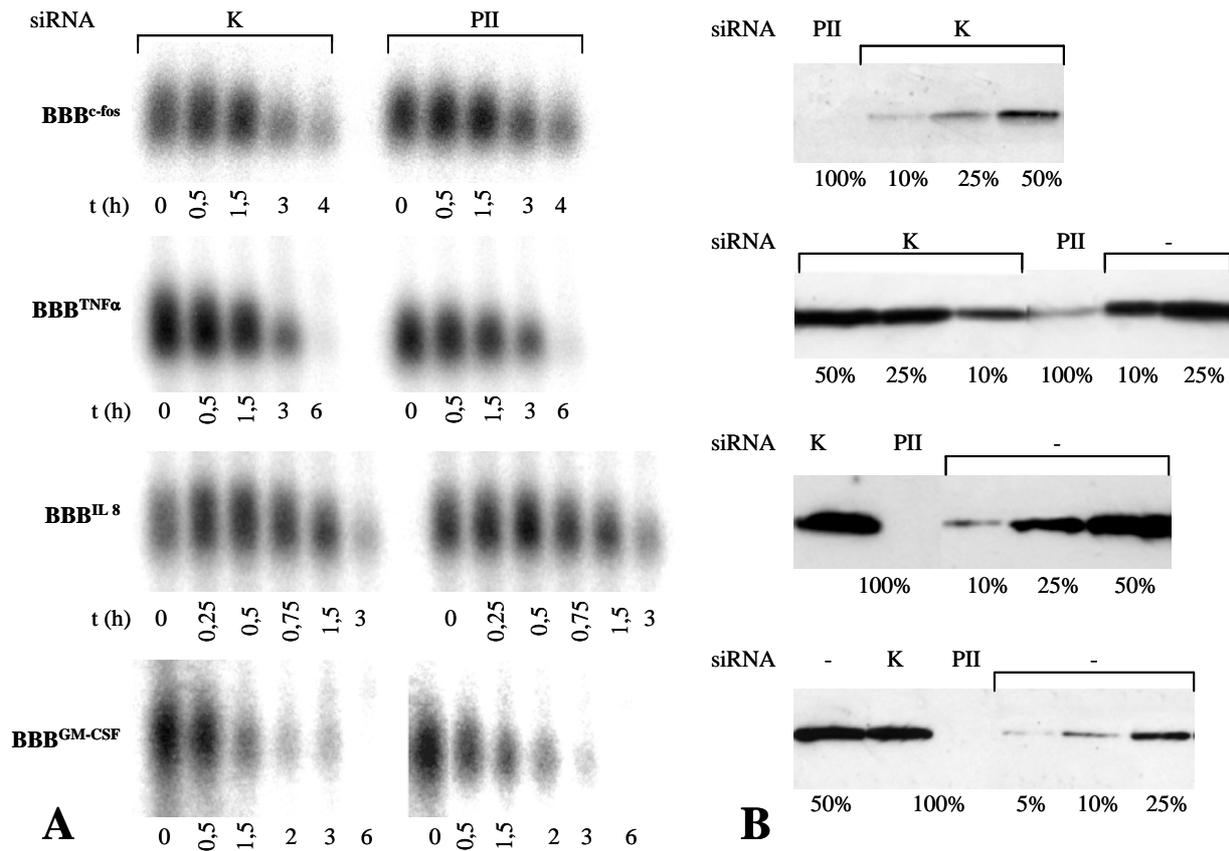
Für die Ermittlung der Halbwertszeit der BBB<sup>TNF $\alpha$</sup> -mRNA wurden HeLa-Zellen 20 Stunden nach dem Aussäen mit der entsprechenden Plasmid-DNA transfiziert. In einem Parallelansatz, der als Vergleich diente, erfolgte die Transfektion mit dem unmodifizierten BBB-Konstrukt. 24 Stunden danach wurden die Zellen für die Probenahme den verschiedenen Zeitpunkten entsprechend auf neue Kulturschalen gleichmäßig verteilt. Das Ausschalten der Transkription erfolgte im Anschluss an eine weitere 15-stündige Inkubation durch die Zugabe von Doxycyclin. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, RNA präpariert und die BBB-Konstrukte über *Northern blot* detektiert. In der Abb. 15 sind die *Northern blots* der BBB- und BBB<sup>TNF $\alpha$</sup> -mRNAs sowie die quantitative Auswertung von deren Abbau dargestellt. Die Einfügung der ARE-Sequenz des humanen TNF $\alpha$ -Gens in den 3'-UTR der  $\beta$ -Globin-mRNA hat eine deutliche Reduktion der Halbwertszeit zur Konsequenz (Abb. 15B). Für BBB wurden ca. 16 h, für BBB<sup>TNF $\alpha$</sup>  dagegen 95 Minuten ermittelt, wobei die Reduktion des Hybridisierungssignals von BBB überwiegend auf die Deadenylierung zurückzuführen war.



**Abb. 15: Destabilisierung von BBB durch die ARE-Sequenz des hTNF $\alpha$ -Gens.** HeLa<sub>Tet-Off</sub> Zellen wurden mit BBB sowie mit einem BBB-Konstrukt, welches die ARE-Sequenz des humanen TNF $\alpha$ -Gens im 3'-UTR enthielt (BBB<sup>TNF $\alpha$</sup> ) transfiziert. Die Transkription wurde 48 h nach der Transfektion durch Doxycyclin gestoppt. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde RNA isoliert und ein *Northern blot* durchgeführt. **A:** *Northern blot*, die dargestellten Zeiten entsprechen den Stunden nach der Zugabe von Doxycyclin (t=0). Die Konstrukte sind links angegeben. **B:** Die *Northern blot*-Signale von A wurden quantifiziert und in einem Diagramm gegen die Zeit (h) aufgetragen.

Um zu untersuchen, ob die Depletion von PARN in HeLa-Zellen einen Einfluss auf die Stabilität der BBB-Konstrukte hat, wurde der folgende experimentelle Ansatz verwendet: ca. 12 Stunden nach dem Aussäen der HeLa<sub>Tet-Off</sub>-Zellen wurden diese für die Reduktion des Expressionslevels von PARN mit der siRNA PII transfiziert. Als Kontrolle diente eine siRNA, welche keine in HeLa-Zellen vorkommende Zielsequenz besaß. 30 Stunden danach erfolgte die Transfektion der BBB-Konstrukte. Hierbei wurde zusätzlich ein Drittel der Ausgangsmenge der verschiedenen siRNAs zum Ansatz zugefügt. Nach weiteren 24 Stunden wurden die Zellen für die Probenahme den verschiedenen Zeitpunkten entsprechend auf neue Kulturgefäße gleichmäßig verteilt. 12 Stunden danach erfolgte die Ausschaltung der Transkription durch die Zugabe von Doxycyclin. Die Zellen wurden geerntet, RNA präpariert und die verschiedenen BBB-Konstrukte über *Northern blot* detektiert.

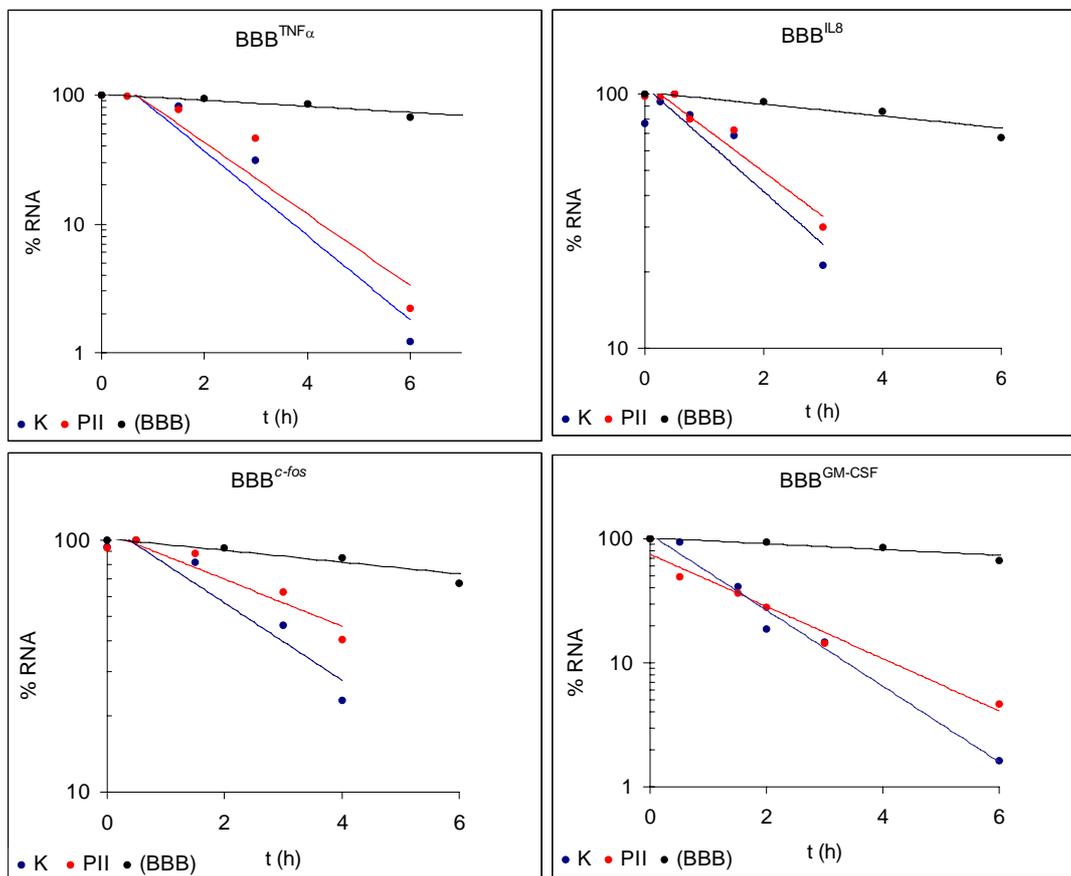
Ein PARN-*knockdown* sollte zu einer verzögerten Deadenylierung und damit zu einer Erhöhung der Halbwertszeiten der entsprechenden mRNAs führen. Dies müsste weiterhin mit einer erhöhten *steady-state*-Menge der entsprechenden Transkripte korrelieren. In der Abb. 16 sind *Northern blots*, welche den Abbau der verschiedenen BBB-Konstrukte wiedergeben, dargestellt.



**Abb. 16: Der knockdown von PARN hat keinen Effekt auf die Halbwertszeit von transient exprimierter mRNA.** HeLa<sub>Tet-Off</sub>-Zellen wurden für die Depletion von PARN mit der siRNA PII sowie mit einer siRNA ohne Zielsequenz (K) transfiziert.  $\beta$ -Globin-Konstrukte (BBB), die ARE-Sequenzen im 3'-UTR enthielten, wurden im Anschluss (nach 24 Stunden) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte das Abstoppen der Transkription durch die Zugabe von 3  $\mu$ g/ml Doxycyclin (t=0). Zu unterschiedlichen Zeiten wurde RNA isoliert und der Abbau der BBB-mRNAs anhand von *Northern blots* analysiert. **A:** *Northern blots* der verschiedenen BBB-Konstrukte (links angegeben). Die dargestellten Zeiten entsprechen den Stunden nach dem Transkriptionsstopp durch Doxycyclin. **B:** *Western blot*, Die Quantifizierung des Proteinlevels von PARN erfolgte anhand der für A präparierten Zellysate zum Zeitpunkt 0 h unter Verwendung eines Anti-PARN-Antikörpers. Unterschiedliche Mengen Extrakt (Angabe als prozentualer Anteil) wurden dabei verglichen. HeLa-Zellen, die nicht mit siRNA transfiziert waren (-), wurden ebenfalls verwendet.

Setzt man für die unterschiedlichen RNAi-Bedingungen eine unveränderte Transkriptionsrate der BBB-Konstrukte voraus, dann wäre ein erster Hinweis für die Erhöhung der Halbwertszeit die Zunahme von deren *steady-state*-Menge. Dies müsste bei gleicher DNA- bzw. RNA-Menge, welche entsprechend für die Transfektion bzw. den *Northern blot* eingesetzt wurde, durch ein erhöhtes Hybridisierungssignal zu detektieren sein. Dies konnte aber in keinem der in Abb. 16A gezeigten *Northern blots* eindeutig nachgewiesen werden. Gleichzeitig wäre die Abbaurrate, der Quotient aus abgebauter mRNA pro Zeiteinheit, signifikant erhöht. Anhand der quantitativen Auswertung der in Abb. 16A dargestellten *Northern blots*, konnte dies ebenfalls nicht eindeutig gezeigt werden (Abb. 17).

Für die Halbwertszeiten der  $BBB^{TNF\alpha}$ - und  $BBB^{IL8}$ -mRNAs wurden im Kontrollansatz 95 Minuten, unter den Bedingungen eines PARN-*knockdowns* jeweils etwa 110 Minuten bestimmt. Die Halbwertszeit der  $BBB^{GM-CSF}$ -mRNA war geringer und betrug 65 Minuten für die Kontrolle bzw. 50 Minuten für den PARN-*knockdown*. Aufgrund der geringen Differenzen wurden diese Unterschiede jedoch nicht als signifikant betrachtet. Die höchste Halbwertszeit sowie die größte Abweichung zwischen Kontrollansatz und PARN-Depletion wurde für die  $BBB^{c-fos}$ -mRNA ermittelt, welche entsprechend bei 135 Minuten bzw. 210 Minuten lag. Diese konnte aber in weiteren Experimenten nicht reproduziert werden. Die bestimmten Werte sind im Vergleich zu publizierten Daten (Bsp. Winzen *et al.*, 1998) stark erhöht (Faktor 2-4), was sich vermutlich aus erheblichen Unterschieden des experimentellen Ansatzes erklärt (siehe Diskussion: 4.2).



**Abb. 17: Abbaukinetiken verschiedener BBB-Konstrukte nach einem PARN-*knockdown*.** Die Hybridisierungssignale der in Abb. 16A gezeigten *Northern blots* wurden quantifiziert und in Diagramme in Abhängigkeit der Zeit (h) aufgetragen. Zur Veranschaulichung ist weiterhin die Abbaukinetik des unmodifizierten Konstrukts (BBB) dargestellt (siehe Abb. 15). Eine Standardisierung aller Quantitäten erfolgte anhand der 18S rRNA, welche mit der verwendeten Sonde kreuzhybridisierte (in Abb. 16 nicht gezeigt).

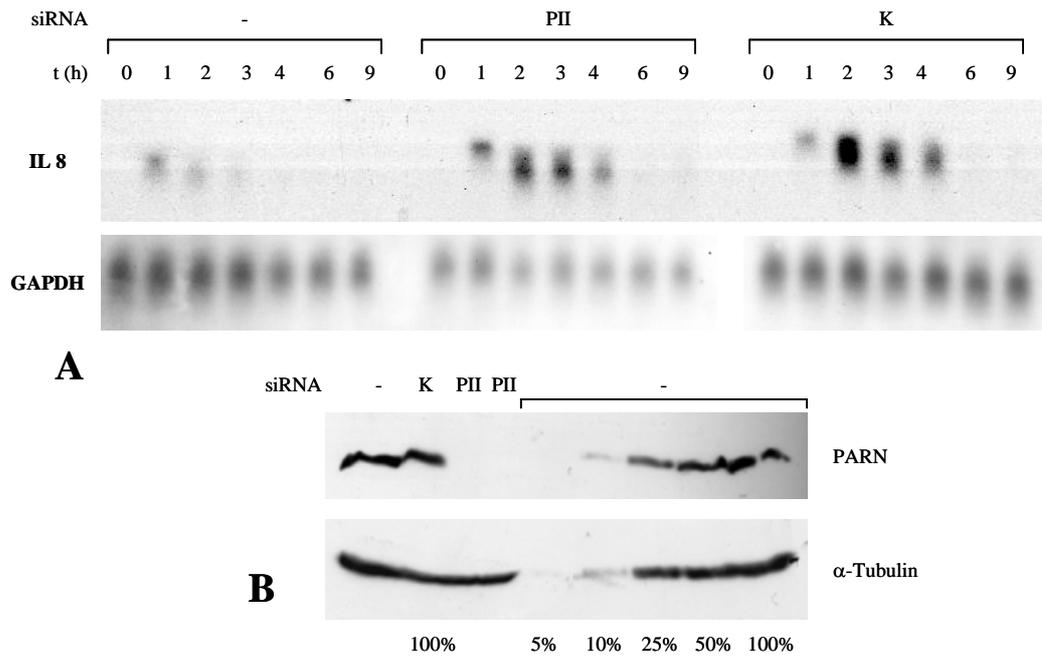
Die Reduktion des Expressionslevels von PARN hatte für keines der untersuchten BBB-Konstrukte eine signifikante Zunahme der Halbwertszeit zur Folge. Der experimentelle Ansatz wurde für die verschiedenen BBB-Varianten mehrfach wiederholt.

#### 3.2.1.2.2 Einfluss eines PARN-knockdowns auf die Stabilität einer endogenen mRNA in HeLa-Zellen

Über den Abbau transient exprimierter mRNA können die Abläufe des mRNA-*turnover*, wie er *in vivo* stattfindet, möglicherweise nur bedingt erfasst werden. Zum einen handelt es sich um Sequenzkonstrukte, die in der verwendeten Zelllinie nicht natürlich vorkommen. Des weiteren erfolgt die Transkription der mRNA konstitutiv ohne den entsprechenden chromosomalen Hintergrund. Gerade mRNAs, welche destabilisierende Elemente im 3'-UTR enthalten, werden nur durch extrazelluläre Stimuli und dann nur kurzzeitig exprimiert. Durch eine Vielzahl von Genkopien pro Zelle und die Verwendung starker Promotoren ist die Transkriptmenge im Vergleich zu endogenen mRNAs um ein Vielfaches erhöht. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Abbau der Interleukin 8 (IL 8)-mRNA analysiert, sowie der Einfluss eines PARN-knockdowns untersucht. Die Expression dieses Transkripts wird durch das Interleukin 1 (IL 1)-Peptid kurzzeitig induziert. Durch ein ARE im 3'-UTR der IL 8-mRNA ist deren Halbwertszeit sehr gering.

Für die Reduktion des Expressionslevels von PARN wurden HeLa-Zellen ca. 12 Stunden nach dem Aussäen mit der siRNA PII transfiziert. Als Kontrolle diente eine siRNA, welche keine in HeLa-Zellen vorkommende Zielsequenz besaß. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für die Probennahme den verschiedenen Zeitpunkten entsprechend auf neue Kulturgefäße verteilt. Nach 72 Stunden erfolgte die Induktion der IL 8-mRNA durch Zugabe des IL 1-Peptides. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen geerntet, RNA präpariert und die IL 8-mRNA über *Northern blot* detektiert.

In Analogie zu den transient exprimierten mRNAs sollte die Verringerung der Proteinkonzentration von PARN eine Erhöhung der Halbwertszeit des Transkripts bewirken. Dies müsste gleichzeitig mit einer verzögerten Deadenylierung korrelieren. Ähnliche Effekte wurden für die IL 8-mRNA als Auswirkungen nach einer Behandlung mit UV-Licht beschrieben (Gowrishankar *et al.*, 2005). Eine höhere *steady-state*-Menge der mRNA ist dagegen nicht zu erwarten. Die Abb. 18A zeigt einen *Northern blot*, der den Abbau von IL 8-mRNA nach Induktion mit IL 1 unter verschiedenen Bedingungen wiedergibt.



**Abb. 18: PARN hat keinen Einfluss auf den Abbau von endogener IL 8-mRNA in HeLa-Zellen.** HeLa-Zellen wurden für die Depletion von PARN mit der siRNA PII transfiziert. Als Vergleich dienten uninduzierte Zellen (-) sowie Zellen, deren Transfektion mit einer siRNA ohne Zielsequenz erfolgte (K). Die Transkription von IL 8 wurde durch die Zugabe des IL 1-Peptids (1ng/ml) induziert. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Induktion wurde RNA isoliert und mittels *Northern blot* analysiert. **A:** *Northern blot*, die angegebenen Zeiten entsprechen den Stunden nach der IL 8-Induktion. Der Zeitpunkt t=0 entspricht uninduzierten Zellen. Die verwendeten Sonden sind links angegeben. Die Hybridisierung mit GAPDH diente als Ladekontrolle. **B:** *Western blot*, Die Reduktion des Expressionslevels von PARN wurde anhand der für A präparierten Zelllysate zum Zeitpunkt 0 h mit einem Anti-PARN-Antikörper analysiert. Unterschiedliche Extraktmengen (Angabe als prozentualer Anteil) wurden dabei verglichen. Als Ladekontrolle diente ein Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper.

Zum Zeitpunkt 0 h, welcher uninduzierte Zellen repräsentiert, war keine IL 8-mRNA detektierbar. Diese wurde erst 1 Stunde nach der Induktion als diskrete Bande nachgewiesen. Bereits nach 2 Stunden war eine deutliche Verkürzung des Ausgangsprodukts zu beobachten. Gleichzeitig wurde die detektierbare Mindestlänge der mRNA schon erreicht. Im weiteren Zeitverlauf erfolgte die komplette Degradation, so dass nach 6 Stunden keine RNA mehr nachweisbar war. Dies würde mit dem allgemeinen Schema des mRNA-Abbaus übereinstimmen. Der erste Schritt ist die Deadenylierung, dem die komplette Degradation des deadenylierten Zwischenprodukts folgt. Durch den *knockdown* von PARN wurde das beobachtete Abbau-Schema jedoch nicht beeinflusst bzw. konnte dies unter den verwendeten experimentellen Bedingungen nicht nachgewiesen werden. Ein Vergleich auf Basis der GAPDH-Ladekontrolle in Abb. 18A zeigt, dass die IL 8-mRNA-Menge der Zellen, welche mit RNAi behandelt wurden, die der uninduzierten weit übersteigt. Der Mengenunterschied könnte auch aus einer erhöhten Stabilität des Transkriptes resultieren. Dies wäre dann aber kein spezifischer Effekt, welcher auf der Verringerung der Proteinkonzentration von PARN beruht, da mit der Kontroll-siRNA ähnliche Ergebnisse erhalten wurden.

### 3.2.1.2.3 Die Beteiligung von PARN am *Nonsense-Mediated mRNA-Decay* (NMD) konnte nicht bestätigt werden

NMD beschreibt einen komplexen Mechanismus über den mRNAs detektiert und eliminiert werden, welche ein *in frame*-Stopkodon (*premature translation termination codon* (PTC)) enthalten. Auf diese Weise wird die Bildung von potentiell toxischen C-terminal verkürzten Proteinen verhindert. Eine Reihe von Faktoren und strukturellen Voraussetzungen, welche unter (1.2.2.2) näher erläutert werden, sind für die Erkennung des PTC notwendig. Letztlich ist der entscheidende Vorgang die Interaktion zwischen den NMD-Faktoren Upf 1 und Upf 2. Upf2 ist dabei außerdem mit dem NMD-Faktor Upf3 assoziiert. Die Bildung des Upf- bzw. NMD-Komplexes hat die Degradation der mRNA zur Konsequenz, wobei der zugrunde liegende Mechanismus unbekannt ist. Untersuchungen mit transient exprimierten  $\beta$ -Globin-Konstrukten zeigen, dass, zumindest im Zytoplasma, der beschleunigte Abbau mit einer forcierten Deadenylierung korreliert (Chen & Shyu, 2003; Yamashita *et al.*, 2005). Eine Reduktion des Expressionslevels von Dcp2 sowie der Exosom-Untereinheit PM/Sci100 hat eine Hemmung des NMD zur Konsequenz, was darauf hinweist, dass die Degradation der mRNA mit PTC über die allgemeinen mRNA-Abbauwege vom 3'- bzw. vom 5'-Ende her erfolgt (Lejeune *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* löst die vorzeitige Termination der Translation die Hydrolyse der *Cap*-Struktur aus, wobei diese Reaktion, im Unterschied zu normalen mRNAs, unabhängig von einer vorangehenden Deadenylierung erfolgt (Muhlrad & Parker, 1994). Im Gegensatz dazu könnte in Säugetierzellen zumindest die partielle Deadenylierung auch für den 5'-3'-Abbau von mRNAs mit PTC von Bedeutung sein (Couttet & Grang, 2004; Yamashita *et al.*, 2005).

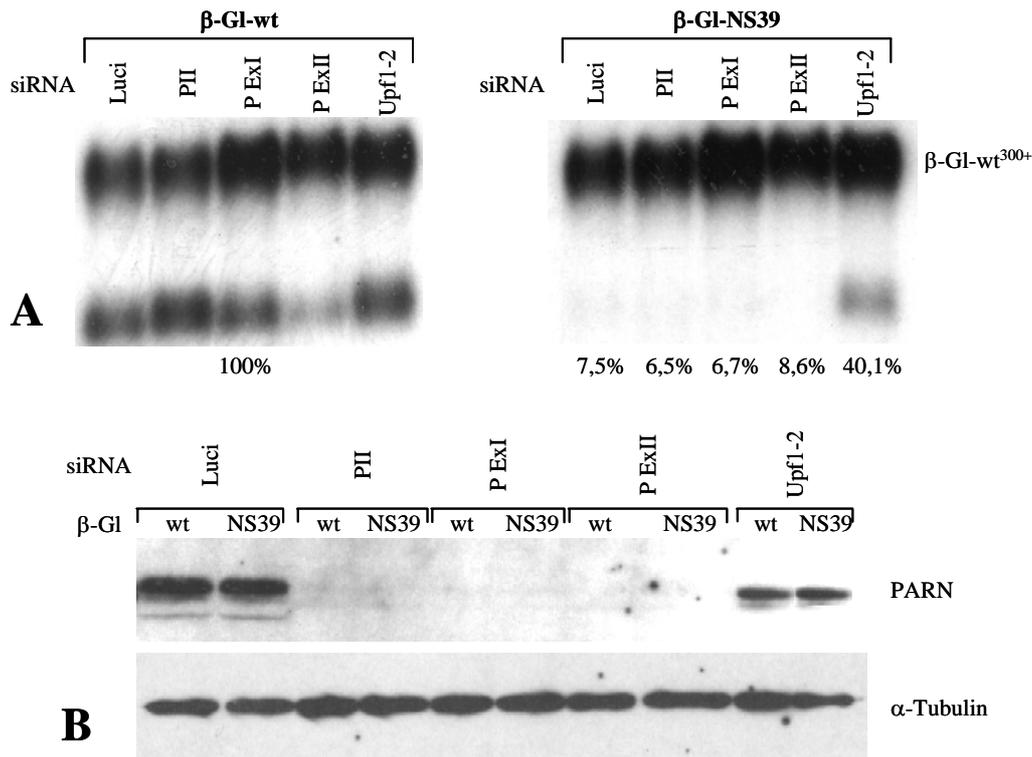
Erste Anhaltspunkte, dass PARN in den NMD involviert ist, ergeben sich aus der Stabilisierung einer mRNA mit PTC als Folge der Reduktion des Expressionslevels von PARN durch RNAi (Lejeune *et al.*, 2003). Dabei blieb aber der Nachweis, dass die verringerte Abbaurate auf einer verminderten Deadenylierung basiert, aus. In diesem Zusammenhang wurden außerdem erste Hinweise für die direkte Interaktion von PARN mit den NMD-Faktoren Upf1, Upf 2 und Upf3 erhalten.

Leicht modifizierte experimentelle Ansätze wurden verwendet, um die Beteiligung von PARN am NMD sowie die Interaktion mit den NMD-Faktoren Upf1, Upf2 und Upf3 zu überprüfen. Gleichzeitig sollte dabei eine methodische Basis für eine detailliertere Analyse der, durch PARN katalysierten, Deadenylierung im Zusammenhang mit dem NMD

geschaffen werden. Grundlage der Experimente war eine  $\beta$ -Globin-mRNA humanen Ursprungs mit einem PTC an der Nukleotidposition 39 ( $\beta$ -GI-NS39), deren Expression transient in HeLa-Zellen erfolgte. Ob der *knockdown* von PARN Auswirkungen auf die Stabilität von  $\beta$ -GI-NS39 hat, wurde mittels *Northern blots* analysiert. Als Vergleich diente dabei die unveränderte  $\beta$ -Globin-mRNA ( $\beta$ -GI-wt). Die quantitative Auswertung erfolgte über eine modifizierte  $\beta$ -Globin-mRNA ( $\beta$ -GI-wt<sup>300+</sup>). Diese unterschied sich zu  $\beta$ -GI-wt in der Länge um 300 Nukleotide und wurde in jedem Ansatz zusätzlich exprimiert.

Über das folgende experimentelle Schema sollte die Beteiligung von PARN am NMD demonstriert bzw. reproduziert werden. HeLa-Zellen wurden ca. 12 Stunden nach dem Aussäen für die Reduktion des Expressionslevels von PARN mit verschiedenen siRNAs transfiziert. Als Positiv-Kontrolle diente eine siRNA, deren Zielsequenz die mRNA des NMD-Faktors Upf1 war. Als Negativ-Kontrolle wurde eine siRNA, die keine in HeLa-Zellen vorkommende Zielsequenz besaß, verwendet. Ca. 30 Stunden danach erfolgte die Transfektion des NMD-Substrats ( $\beta$ -GI-NS39). In einem parallelen Ansatz wurde dagegen  $\beta$ -GI-wt verwendet. In jedem Ansatz wurde außerdem  $\beta$ -GI-wt<sup>300+</sup> zusätzlich transfiziert. Nach weiteren 48 Stunden erfolgte die Ernte der Zellen und die Präparation von zytoplasmatischer RNA. Diese wurde für die Detektion der  $\beta$ -Globinkonstrukte in einen *Northern blot* eingesetzt.

Eine deutliche Reduktion der Proteinmenge von PARN bis weit unter 10% der Ausgangslevels wurde mit jeder der für den *knockdown* transfizierten siRNAs erreicht (Abb. 19B) Basierend auf den publizierten Daten über den Abbau verschiedener NMD-Substrate (Lejeune *et al.*, 2003), müsste eine Reduktion von PARN auf 10% der Ausgangskonzentration bereits ausreichen, um die *steady-state*-Menge der  $\beta$ -GI-NS39-mRNA signifikant zu erhöhen. Dies konnte aber auch bei einer wesentlich effektiveren Depletion nicht nachgewiesen werden (Abb. 19A). Es war kein Unterschied in der Menge des  $\beta$ -GI-NS39-Transkripts zwischen der Negativkontrolle und den verschiedenen RNAi-Ansätzen von PARN zu detektieren. Diese betrug durchschnittlich 7%, legt man das *steady-state*-Level von  $\beta$ -GI-wt mit 100% zugrunde. Der *knockdown* von Upf1 dagegen hatte eine Steigerung der *steady-state*-Menge von  $\beta$ -GI-NS39 auf etwa 40% zur Konsequenz. Verglichen mit den 7,5 % der Negativkontrolle entspricht dies einer fünffachen Stabilisierung. Die Verringerung der Proteinkonzentration von Upf1 konnte im Western Blot nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 19: PARN ist nicht in den NMD involviert.** HeLa-Zellen wurden mit verschiedenen siRNAs für die Reduktion des Expressionslevels von PARN (PII, P ExI, P ExII) und des NMD-Faktors Upf1 (Upf1-2) transfiziert. Als Negativkontrolle diente eine siRNA ohne Zielsequenz (Luci). Ein NMD-Konstrukt mit einem PTC an der Nukleotidposition 39 ( $\beta$ -GI-NS39) sowie die unveränderte Sequenz ( $\beta$ -GI-wt) wurden als Parallelansätze im Anschluss transfiziert und transient exprimiert. Die Quantifizierung der *steady-state*-Mengen der Konstrukte erfolgte über *Northern blots* mit zytoplasmatischer RNA. **A:** *Northern blot*, Die verschiedenen RNAi-Ansätze sind durch die verwendeten siRNAs gekennzeichnet. Die jeweilige  $\beta$ -Globin-Variante ist oben angegeben. Die *steady-state*-Menge von  $\beta$ -GI-NS39 wurde im Verhältnis zur  $\beta$ -GI-wt-Menge bestimmt und ist für die jeweiligen Ansätze unten in % angegeben. Der Abgleich unterschiedlicher Transfektionseffizienzen erfolgte über das kotransfizierte Konstrukt  $\beta$ -GI-wt<sup>300+</sup>. **B:** *Western blot*, Gleiche Mengen der in A präparierten Extrakte bzw. Zellysate wurden mit einem Anti-PARN-Antikörper auf die Depletion von PARN untersucht. Als Ladekontrolle diente ein Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper.

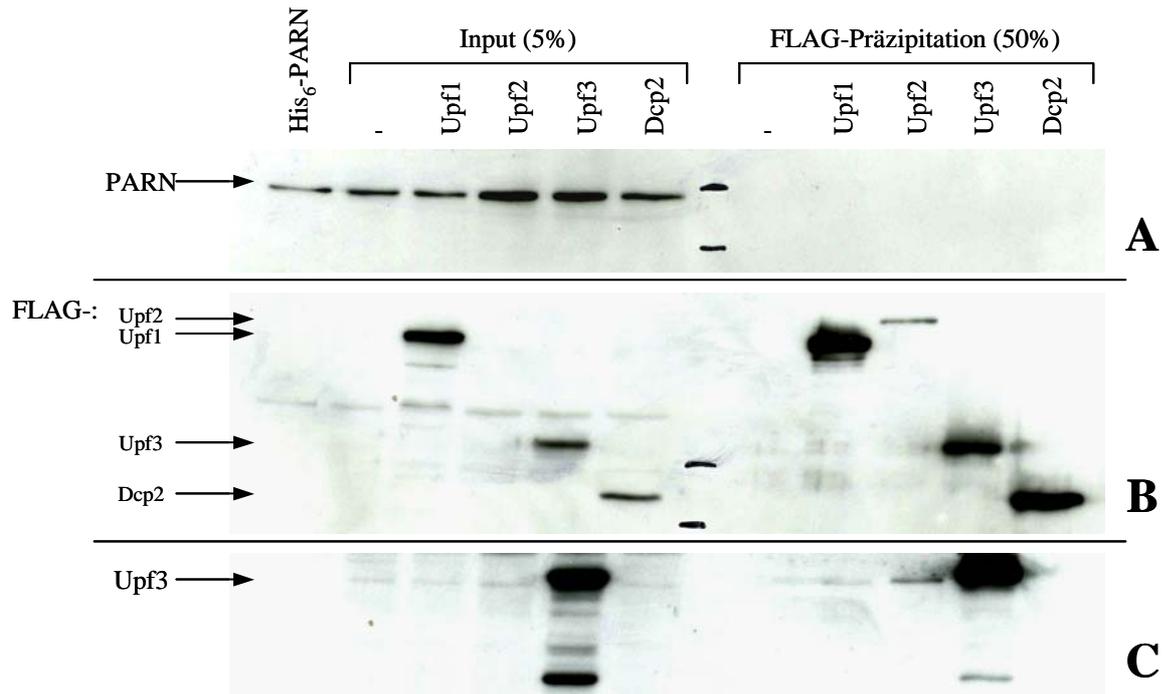
Wie bereits erwähnt, ist ein weiterer Anhaltspunkt für die Beteiligung von PARN am NMD dessen Interaktion mit den NMD-Faktoren Upf1, Upf 2 und Upf 3. Unter Bedingungen, welche die Integrität von mRNPs bewahrt, wurde PARN mit Antikörpern gegen Upf1, Upf2 und Upf3 koimmunopräzipitiert (Lejeune *et al.*, 2003).

Für eine Bestätigung dieser Ergebnisse und eine gleichzeitige Analyse, inwieweit die gezeigte Interaktion auf einer direkten Assoziation zwischen den Proteinen oder nur auf der Integrität von mRNPs beruht, wurden diese Untersuchungen unter Verwendung eines stark modifizierten Ansatzes wiederholt. Ausgangspunkt war dabei eine N-terminale HA-Fusion von PARN, deren Koexpression mit jeweils einer FLAG-Fusion von hUpf1, hUpf2 und hUpf3 transient in HeLa-Zellen erfolgte. Als Negativkontrolle diente die FLAG-Fusion von hDcp2 sowie ein FLAG-Peptid ohne Fusion. Zellextrakte wurden einmal in Gegenwart von

RNase A sowie ohne RNase unter Zusatz von RNase-Inhibitor präpariert. Die Isolierung der FLAG-Fusionsproteine aus den Extrakten erfolgte unter Verwendung der entsprechenden Affinitäts-Matrix (FLAG-beads). Die gereinigten FLAG-Fusionen wurden abschließend im *Western blot* mit einem Anti-PARN-Antikörper hinsichtlich einer Kopräzipitation untersucht. Antikörper gegen hUpf1 und hUpf3 wurden außerdem verwendet, um die Interaktion der transient exprimierten NMD-Faktoren mit den entsprechenden Bindungspartnern aus HeLa-Zellen nachzuweisen. Der Nachweis der FLAG-Fusionsproteine erfolgte mit einem Anti-FLAG-Antikörper.

In den präparierten Zellextrakten wurden die HA-Fusion von PARN sowie die FLAG-Fusionsproteine von Upf1, Upf3 und Dcp2 detektiert (Abb. 20A und B). Der Nachweis erfolgte dabei mit jeweils 5% des für die Isolation der jeweiligen FLAG-Fusion eingesetzten Extrakts (*Input*). In den Reinigungen aller verwendeten FLAG-Fusionen konnte eine Kopräzipitation von PARN nicht beobachtet werden und zwar unabhängig davon, ob die Herstellung des Zellextrakts in Gegenwart bzw. Abwesenheit von RNase A (unter Zusatz von RNase-Inhibitor) durchgeführt wurde (Abb. 20A). Für den Western Blot kamen dabei jeweils 50% des von den FLAG-beads gewonnenen Eluats zur Anwendung.

Als Kontrolle wurden die verschiedenen FLAG-Reinigungen weiterhin mit Antikörpern gegen hUpf1 und hUpf3 in *Western blots* untersucht. Wie zuvor erläutert, ist eine wesentliche strukturelle Voraussetzung für den NMD die Interaktion zwischen Upf2 und Upf3 als Bestandteile des *exon junction complex* (EJC) sowie die Interaktion zwischen Upf2 und Upf1, die letztlich den Abbau der mRNA einleitet bzw. bedingt. Zumindest die Assoziation von Upf2 und Upf3 ist dabei unabhängig von intaktem mRNP. Weiterhin interagiert Upf1 als Bestandteil des NMD-Komplexes mit Dcp2 (Lykke-Andersen, 2002). In den Reinigungen der FLAG-Fusionen von Upf3, Upf2, Upf1 und Dcp2 sollten demzufolge die entsprechenden Upf-Proteine von HeLa-Zellen kopräzipitieren. So konnte Upf3 nach RNase-Behandlung in den Präzipitationen der FLAG-Fusionen von Upf1 und Upf2 detektiert werden (Abb. 20C), wobei die Anreicherung über FLAG-Upf1 ca. 10%, die über FLAG-Upf2 ca. 30% betrug. Gemessen an der detektierten Menge von FLAG-Upf2 (Abb. 20B), ist dieser Anteil hoch einzuschätzen und weist auf eine starke Assoziation zwischen Upf2 und Upf3 hin. Mit dem selben Verfahren war ein Nachweis von Upf1 in den entsprechenden FLAG-Präzipitaten erfolglos.



**Abb. 20: PARN kann nicht mit Upf1, Upf2 und Upf3 kopräzipitiert werden.** PARN wurde als N-terminale HA-Fusion zusammen mit jeweils einer FLAG-Fusion von hUpf1, hUpf2 und hUpf3 in HeLa-Zellen transient exprimiert. Als Negativkontrolle wurde die FLAG-Fusion von hDcp2 sowie ein FLAG-Peptid ohne Fusion (-) verwendet. Proteinextrakte wurden unter Zusatz von RNase A präpariert und die FLAG-Fusionen unter Verwendung von FLAG-beads isoliert. 5% des Zelllysats (*Input*) und 50% des Eluats der FLAG-Reinigung (FLAG-Präzipitation) wurden in einem Western Blot jeweils mit einem Anti-PARN-Antikörper (A), einem Anti-FLAG-Antikörper (B) sowie mit einem Anti-hUpf3-Antikörper (C) untersucht. Die unterschiedlichen FLAG-Fusionen sind oben angegeben. His<sub>6</sub>-PARN: rekombinantes in *E. coli* synthetisiertes His-tag-Fusion von hPARN.

### 3.3 Weiterführende Untersuchungen zur *in vivo*-Aktivität von PARN

Entgegen den Erwartungen gestaltete sich der Nachweis der deadenylierenden Aktivität von PARN *in vivo* mit den verwendeten experimentellen Ansätzen als sehr schwierig. Obwohl die Proteinmenge von PARN durch RNAi deutlich reduziert wurde, hatte dies keine signifikanten Auswirkungen auf die Abbaurate aller analysierten mRNAs sowie auf die Stabilität von NMD-Substraten. Ein genereller Einfluss auf die Poly(A)-Längenverteilung war ebenfalls nicht zu detektieren. Dies widerspricht wesentlichen enzymatischen Eigenschaften von PARN, wie der Poly(A)-Spezifität oder der *Cap*-Abhängigkeit. Außerdem existieren experimentelle Daten, die darauf hinweisen, dass PARN in die Deadenylierung von mRNAs in HeLa-Zellen involviert sein könnte. So erfolgt die Degradierung von Poly(A) in zytoplasmatischen HeLa-Zellextrakten anhand eines typischen Musters bestehend aus Intermediaten, die sich in der Länge um ca. 30 Nukleotide unterscheiden. Dieses Abbau-Muster ist abhängig von einer *Cap*-Struktur am 5'-Ende der RNA und konnte mit den homogenen PARN- und PABPC1-Präparationen aus Kalbsthymus *in vitro* reproduziert werden (Körner *et al.*, 1997, Dehlin *et al.*, 2000). Wird PARN durch Anti-PARN-Antikörper bzw. Anti-PARN-Immunsereum aus HeLa-Zellextrakten depletiert, dann hat dies eine massive Reduktion bzw. den Verlust der deadenylierenden Aktivität *in vitro* zur Konsequenz. Durch die Zugabe von rekombinatem PARN wird diese wieder hergestellt (Gao *et al.*, 2000). Lässt man verschiedene Gesichtspunkte außer Betracht (siehe Diskussion: 4.2), dann ergibt sich aus diesem Gegensatz die Frage nach der Funktion und damit nach dem Substrat von PARN *in vivo*. Ein möglicher Hinweis könnte dabei aus der intrazellulären Lokalisation von PARN abgeleitet werden.

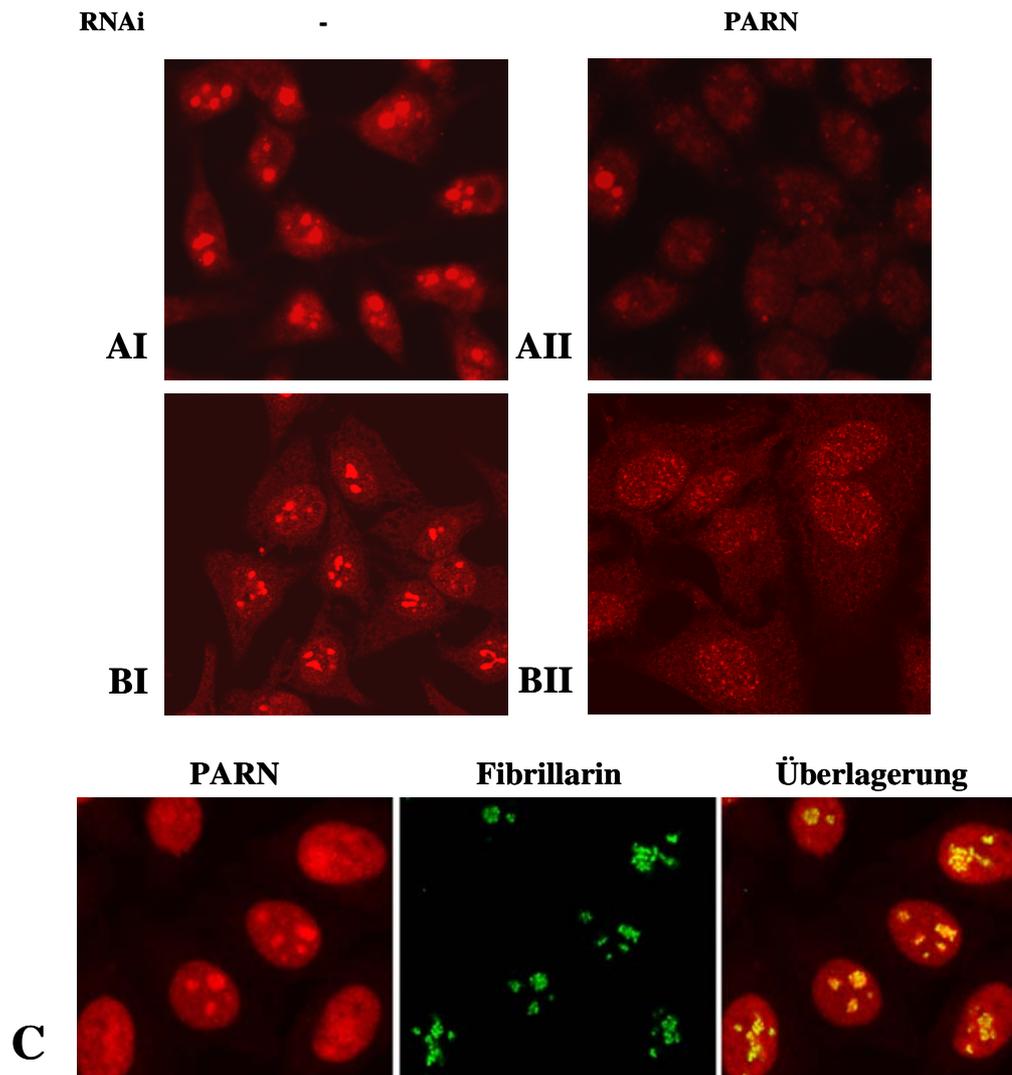
#### 3.3.1 Intrazelluläre Lokalisation von PARN

Erste Immunfluoreszenzanalysen ergaben, dass PARN überwiegend im Zytoplasma sowie in geringeren Mengen im Kern lokalisiert ist. In einigen Fällen konnte auch eine Färbung der Nukleoli nachgewiesen werden, wobei diese im Vergleich zum Nukleoplasma wesentlich intensiver war (Körner *et al.*, 1998). Zwei unabhängig durchgeführte proteomische Analysen detektierten PARN ebenfalls im Nukleolus (Andersen *et al.*, 2002, Scherl *et al.*, 2002).

Um letztlich Klarheit über die genaue Lokalisation von PARN zu erhalten, wurde diese erneut anhand von Immunfluoreszenzen untersucht. Entscheidend war dabei einmal, dass über die Depletion von PARN durch RNAi eine Beurteilung der Spezifität der Färbungen möglich ist und das ein Anti-PARN-Immunsereum zur Verfügung stand, welches zumindest im *Western*

*blot* keine Kreuzreaktion mit anderen Proteinen aufwies. Weiterhin kamen eine N-terminale Fusion von PARN mit dem *green fluorescent protein* (GFP) sowie eine N-terminale Fusion mit dem HA-Peptid zur Anwendung.

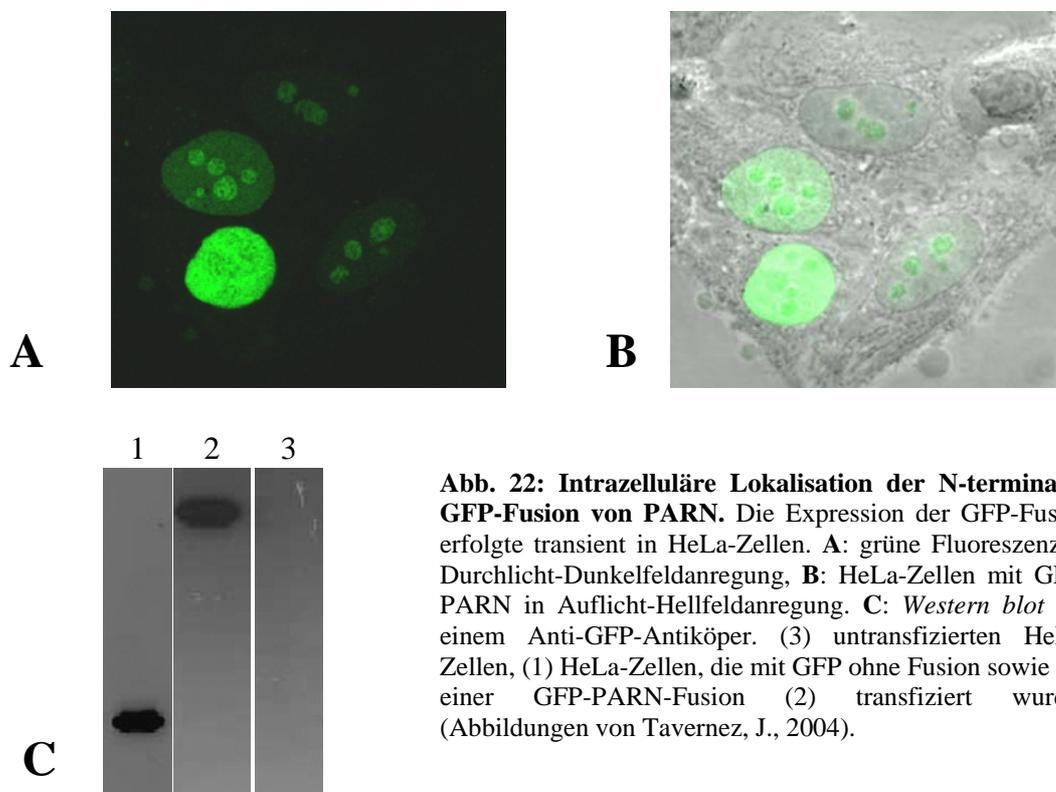
In Immunfluoreszenzanalysen, bei denen HeLa-Zellen mit PFA (4%) fixiert und anschließend mit Triton X 100 permeabilisiert wurden, konnte, unter Verwendung des Anti-PARN-Immunsersums, sowohl eine Färbung der Nukleoli als auch des Nukleus und des Zytoplasmas nachgewiesen werden (Abb. 21A<sub>I</sub>). Die Intensität der nukleolären Färbung war dabei am stärksten, die des Zytoplasmas dagegen am geringsten ausgeprägt. Die Bestätigung, dass es sich bei den intensiv gefärbten Strukturen um Nukleoli handelt, erfolgte anhand von Koimmunfluoreszenzfärbungen mit einem affinitätsgereinigten Anti-Fibrillarin-Antikörper (Abb. 21C). Die Depletion von PARN durch RNAi hatte den Verlust der Markierung der Nukleoli zur Folge, während das Ausmaß der zytoplasmatischen und nukleären Färbungen kaum verändert war (Abb. 21A<sub>II</sub>). Die Anwendung von alternativen Methoden der Zellfixierung (Methanol, Präextraktion mit Detergenz) sowie die Benutzung eines affinitätsgereinigten Anti-PARN-Antikörpers beeinflussten die Intensität sowie die Verteilung der Färbungen zwischen den Zellkompartimenten nur geringfügig (Abb. 21B<sub>I, II</sub>).



**Abb. 21: Intrazelluläre Lokalisation von PARN.** Immunfluoreszenzfärbungen von PARN unter Verwendung eines Anti-PARN-Immunsersums (A) sowie eines affinitätsgereinigten Anti-PARN-Antikörpers (B). Die Fixierung von HeLa-Zellen erfolgte entweder in 4% PFA (A, C) oder Methanol (B). Die Spezifität der Markierungen wurde anhand des PARN-*knockdowns* durch RNAi bewertet (AII und BII). C: Koimmunfluoreszenzfärbung mit einem affinitätsgereinigten Anti-Fibrillarin-Antikörper bestätigen die überwiegend nukleoläre Lokalisation von PARN.

Ergänzende Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von PARN wurden mit einer N-terminalen GFP-Fusion, deren Expression transient in HeLa-Zellen erfolgte, durchgeführt. Dabei konnten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzanalysen überwiegend bestätigt werden. Die Nukleoli und der Nukleus waren deutlich gefärbt, wobei die Intensität der nukleären Markierung maßgeblich vom Expressionslevel des Fusionsproteins abhing. Exprimierten HeLa-Zellen geringe Mengen der GFP-Fusion, waren die Nukleoli deutlich, der Nukleus dagegen nur sehr schwach markiert. Dagegen hatten höhere GFP-PARN-Konzentrationen eine deutliche Färbung des Nukleus zur Folge. Eine Markierung des Zytoplasmas war indessen auch bei einer hohen Menge der GFP-Fusion nicht zu beobachten (Abb. 22A). Eine

vollständige und annähernd gleichmäßig verteilte Färbung, mit Ausnahme der Nukleoli zeigten dagegen HeLa-Zellen, in denen GFP ohne Fusion exprimiert wurde (nicht gezeigt). Die N-terminale HA-Fusion von PARN lag ebenfalls angereichert in den Nukleoli sowie in geringeren Mengen im Nukleus vor. Wie bei der GFP-Fusion von PARN konnte auch hier eine Abhängigkeit zwischen dem Expressionslevel des Fusionsproteins und der Intensität der nukleären Färbung nachgewiesen werden. Bei der Expression geringer Mengen wurde die HA-Fusion überwiegend in den Nukleoli detektiert. Der Anteil im Nukleus war dagegen gering. Eine erhöhte Konzentration der HA-Fusion führte zur Zunahme des Anteils im Nukleus (nicht gezeigt).



**Abb. 22: Intrazelluläre Lokalisation der N-terminalen GFP-Fusion von PARN.** Die Expression der GFP-Fusion erfolgte transient in HeLa-Zellen. **A:** grüne Fluoreszenz in Durchlicht-Dunkelfeldanregung, **B:** HeLa-Zellen mit GFP-PARN in Auflicht-Hellfeldanregung. **C:** *Western blot* mit einem Anti-GFP-Antikörper. (3) untransfizierten HeLa-Zellen, (1) HeLa-Zellen, die mit GFP ohne Fusion sowie mit einer GFP-PARN-Fusion (2) transfiziert wurden (Abbildungen von Tavernez, J., 2004).

Aus den Immunfluoreszenzanalysen und den intrazellulären Lokalisationen der GFP- und HA-Fusionen kann geschlussfolgert werden, dass PARN vorwiegend im Nukleolus akkumuliert. Der Anteil im Zytoplasma sowie im Nukleus ist dagegen eher als gering einzuschätzen. Dies bestätigen auch Ergebnisse von *Western blots*, wo der verhältnismäßige Anteil von PARN in nukleären Zellextrakten den in zytoplasmatischen Fraktionen weit übersteigt.

Weiterführende Analysen zur *in vivo* Aktivität von PARN sowie zur Identifizierung eines entsprechenden Substrats erfolgten auf Grundlage der nachgewiesenen Anreicherung im Nukleolus. Diese Untersuchungen werden nachfolgend näher vorgestellt.

### 3.3.2 RNA-Spezies im Nukleolus

Der Nukleolus ist eine Substruktur bzw. ein Kompartiment des Nukleus, welches funktionell vor allem durch die Prozessierung und Reifung der ribosomalen RNA (rRNA) charakterisiert ist. Dabei werden aus einem polycistronischen Vorläufertranskript durch eine Vielzahl von aufeinander folgenden *exo*- und *endonukleolytischen* Schritten die 5,8S und 28S rRNA sowie ein Vorläufer der 18S rRNA (21S rRNA) gebildet. Die vollständig prozessierten rRNAs werden anschließend an spezifischen Positionen durch eine 2'-O-Methylierung bzw. eine Pseudouridylierung modifiziert. Komponenten, die für einige dieser Prozessierungsschritte sowie für die posttranskriptionalen Modifikationen notwendig sind oder diese vermitteln bzw. katalysieren, sind snoRNPs. Dabei handelt es sich um heterogene Komplexe, die aus einer kurzen RNA (snoRNA) und verschiedenen Proteinen bestehen. Die Basenpaarung zwischen der rRNA und der snoRNA determiniert u.a. die spezifische Position der Modifizierung oder fungiert als *Chaperone* für einen *endonukleolytischen* Verdau. (Filipowicz *et al.*, 2002; Fromont-Racine *et al.*, 2003).

PARN wurde in Immunfluoreszenzanalysen überwiegend im Nukleolus detektiert. Es besteht daher die Möglichkeit, dass es in Mechanismen, die mit der Biogenese der rRNA im Zusammenhang stehen, direkt involviert ist. Ein weiterer indirekter Einfluss könnte sich aus einer Beteiligung an den Prozessen der snoRNA-Reifung ergeben. Es erfolgte daher die Analyse, inwieweit die Depletion von PARN durch RNAi Auswirkungen hinsichtlich der rRNA-Reifung sowie der snoRNA-Prozessierung hat.

#### 3.3.2.1 Einfluss von PARN auf die Biogenese von snoRNAs

Unter strukturellen und funktionellen Gesichtspunkten wird zwischen zwei Klassen von snoRNAs unterschieden. Ein wesentliches Merkmal der C/D *box* snoRNAs sind zwei kurze, konservierte, am 5'- und 3'-Ende gelegene Sequenzen (*box C* und *box D*). Im Bereich der *box D* erfolgt die Bindung der *target* RNA sowie die Methylierung der entsprechenden Ribose an der 2'-OH-Gruppe. H/ACA *box* snoRNAs sind ebenfalls durch zwei kurze, konservierte Sequenzelemente (*box H* und *box ACA*) sowie eine typische Sekundärstruktur (*hairpin-hinge*-

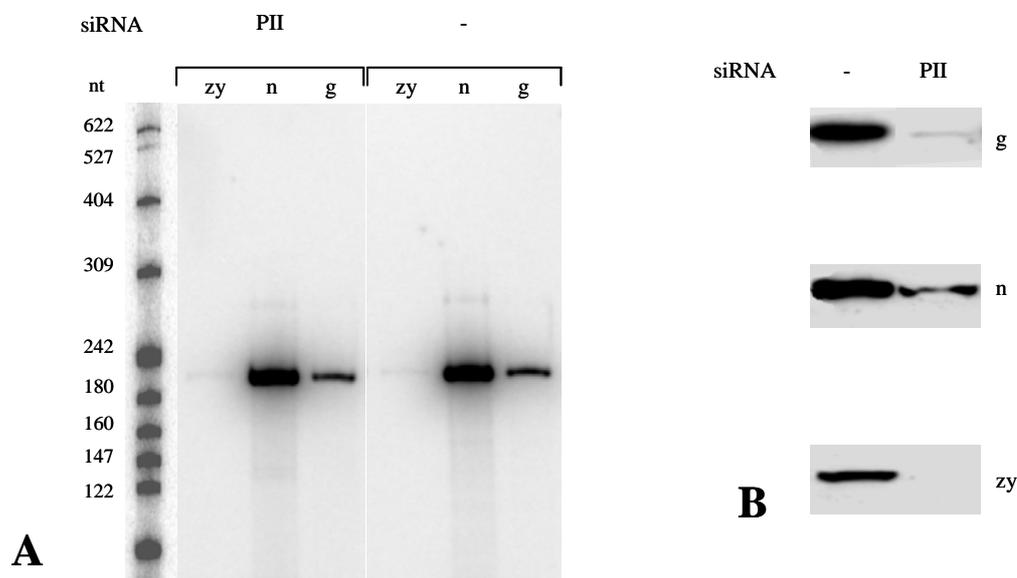
*hairpin-tail*) charakterisiert. Die Synthese der snoRNAs erfolgt über verschiedene Wege. Allgemein kennzeichnend ist ein Reifeprozess, der mehrere endo- und exonukleolytische Schritte umfasst. In Vertebraten sind snoRNAs hauptsächlich in Introns von proteinkodierenden bzw. nichtkodierenden mRNAs enthalten. Die Freisetzung der intronkodierten snoRNAs erfolgt einmal durch *splicing*, wobei die gebildete Lariat-Struktur durch ein *debranching*-Enzyme linearisiert wird, oder durch eine endonukleolytische Spaltung. Die dabei gebildeten 5'- und 3'-Enden dienen als Ansatzpunkte für die weitere exonukleolytische Prozessierung (5'-, 3'-*trimming*) (Kiss, 2002; Filipowicz & Pogacic, 2002). Alternativ werden snoRNAs auch als eigenständige, 3'-verlängerte Transkripte durch die RNA-Polymerase II synthetisiert. Die Vorläufer weisen eine *Cap*-Struktur am 5'-Ende auf. Die Freisetzung der 3'-Enden kann dabei durch Faktoren erfolgen, die auch in die 3'-Prozessierung der Prä-mRNA involviert sind. In diesem Fall ist aber die endonukleolytische Spaltung von der Polyadenylierung entkoppelt (Fatica *et al.*, 2000; Morlando *et al.*, 2002).

Die Anwesenheit einer *Cap*-Struktur, die Transkription durch die RNA-Polymerase II sowie die enge Assoziation mit Komponenten, die an der 3'-Prozessierung der Prä-mRNA und damit auch an deren Polyadenylierung beteiligt sind, können, zumindest für die eigenständig synthetisierten snoRNAs, als hinreichende strukturelle Kriterien für ein mögliches Substrat von PARN gewertet werden. Ein weiterer Anhaltspunkt sind polyadenylierte snoRNA-Spezies, die in *S. cerevisiae* detektiert wurden und die sich in *knockout*-Mutanten der Exosom-Untereinheit Rrp6p anhäufen (siehe unten) (Allmang *et al.*, 1999; van Hoof *et al.*, 2000).

Eine Beteiligung von PARN an den Prozessen der snoRNA-Reifung ist daher nicht auszuschließen. In einer ersten Analyse wurden deshalb verschiedene snoRNAs hinsichtlich der Auswirkungen eines PARN-*knockdowns* in *Northern blots* untersucht. Das Augenmerk lag dabei vor allem auf quantitativen Effekten sowie auf der Akkumulation von Prozessierungsintermediaten.

Es wurden insgesamt drei verschiedene snoRNAs analysiert: U99, welche zur Klasse der H/ACA *box* snoRNAs gehört, sowie U3 und U106, die den C/D *box* snoRNAs zugeordnet werden. U3 wird als eigenständiges Transkript durch die RNA-Polymerase II synthetisiert, während U99 und U106 Intron-kodiert sind (Vitali *et al.*, 2003; Lestrade & Weber, 2006). Für die Depletion von PARN in HeLa-Zellen wurden verschiedene siRNAs verwendet. Die Präparation der RNA erfolgte aus zytoplasmatischen, nuklearen sowie Gesamtzellextrakten.

Für keine der untersuchten snoRNAs konnte ein durch den *knockdown* von PARN bewirkter signifikanter Effekt nachgewiesen werden. In den entsprechenden *Northern blots* wurden weder zusätzliche 3'-verlängerte Spezies noch quantitative Unterschiede zwischen den verschiedenen Ansätzen detektiert. Ein *Northern blot* der U3 snoRNA ist in der Abb. 23 gezeigt. Eine zusätzliche Bande im Bereich von ca. 270 nt war in der nukleären Präparation sowohl des Kontrollansatzes als auch des RNAi-Ansatzes vorhanden. Dabei handelt es sich vermutlich um ein unspezifisches Hybridisierungssignal, da sich der in HeLa-Zellen detektierbare Vorläufer der U3 snoRNA zur vollständig prozessierten Sequenz nur um 8 nt unterscheidet (Watkins *et al.*, 2004). In *Northern blots*, welche mit Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Präparationen durchgeführt wurden, konnten weder U3 noch 3'-verlängerte Spezies, welche sich von U3 ableiten, nachgewiesen werden (nicht gezeigt).



**Abb. 23: Der *knockdown* von PARN hat keinen Effekt auf die Biogenese der U3 snoRNA.** PARN wurde in HeLa-Zellen durch RNAi depletiert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen (-). RNA (2,5 µg) wurde aus den nukleären (n), zytoplasmatischen (zy) sowie Gesamtzellextrakten (g) präpariert und in einem 10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion von U3 erfolgte mittels *Northern blot* mit einem 5'-markierten DNA-Oligonukleotid. **A:** *Northern blot*, die verwendete siRNA sind oben angegeben, die Markerbanden sind mit den Nukleotidlängen (nt) links bezeichnet. **B:** *Western blot*, gleiche Proteinmengen von den in A analysierten Extrakten wurden mit einem Anti-PARN-Immunsereum auf die Depletion von PARN untersucht.

### 3.3.2.2 Untersuchungen zur Beteiligung von PARN an der Biogenese der rRNA

Die rRNA-Gene werden durch die RNA-Polymerase I als polycistronische Einheit (Prä-rRNA) transkribiert. Eine Transkriptionseinheit enthält dabei die Sequenzen der reifen 18S, 5,8S und 28S rRNA. Diese sind untereinander durch die *internal transcribed spacer* (ITS1 und ITS2) getrennt. Sequenzbereiche, welche die Einheit flankieren werden als *external transcribed spacer* (5'ETS und 3'ETS) bezeichnet. Durch endonukleolytische Spaltungen in

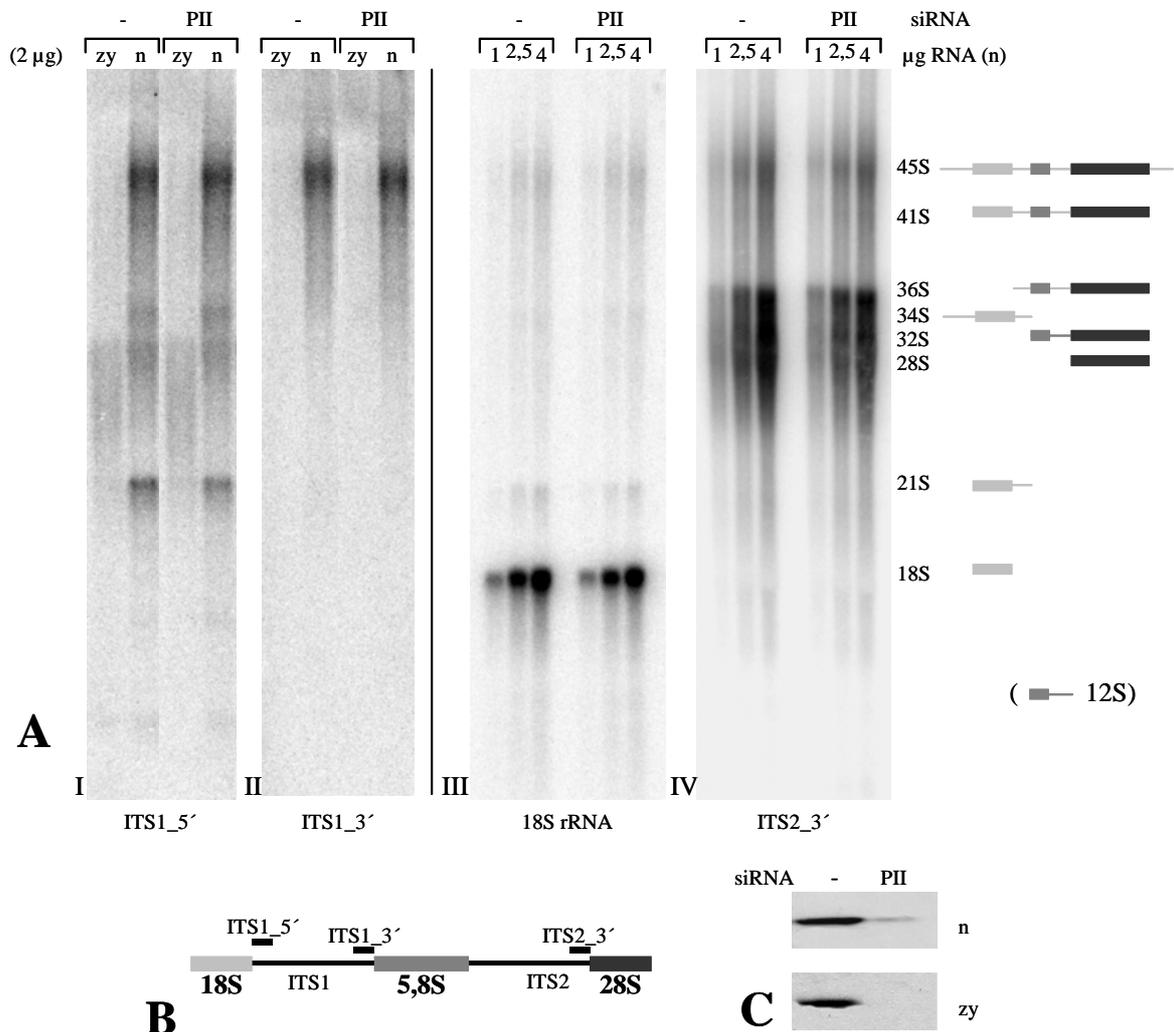
den ETS- und ITS-Sequenzen werden die einzelnen rRNAs aus dem Primärtranskript als Vorläufer freigesetzt. In *S. cerevisiae* wird 18S rRNA durch vier sukzessive endonukleolytische Schritte gebildet. Die Synthese der 5,8S und 28S rRNA dagegen ist wesentlich komplexer. Sie bedarf sowohl einer endonukleolytischen als auch einer exonukleolytischen Prozessierung der 5'- bzw. 3'-Enden. In Abhängigkeit der Reihenfolge bzw. der Position der endonukleolytischen Schnitte erfolgt die Reifung der 5,8S und 28S rRNA auf zwei verschiedenen Wegen, die durch das Auftreten charakteristischer Intermediate gekennzeichnet sind (Fatica & Tollervey, 2002; Fromont-Racine *et al.*, 2003). In humanen Zellen werden die reifen rRNAs über einen ähnlichen Weg erzeugt (Hadjiolova *et al.*, 1993). Neben Endo- und Exonukleasen sind an der rRNA-Prozessierung auch snoRNPs beteiligt. Der snoRNP U3 fungiert z.B. als RNA-*Chaperone* für die Spaltung im 5'-ETS der 18S rRNA (Borovjagin *et al.*, 2004).

Ein großer Anteil der ribosomalen Biogenese, vor allem die Synthese der Prä-rRNA sowie die ersten Prozessierungsschritte, finden im Nukleolus statt. Die polycistronische Struktur der Prä-rRNA, die Synthese durch die RNA-Polymerase I sowie die endonukleolytische Prozessierung an den ETS-Sequenzen durch den snoRNP U3 und das Fehlen eines *cleavage/polyadenylation element* (1.1) bedingen, dass die Transkripte keine *Cap*-Struktur besitzen bzw. nicht durch den Prä-mRNA *cleavage and polyadenylation*-Komplex modifiziert werden können. Eine 3'-Prozessierung und damit Polyadenylierung in Analogie zur Prä-mRNA-Synthese ist daher ausgeschlossen. Trotzdem wurden in *S. cerevisiae* polyadenylierte rRNAs identifiziert, wobei diese in *knockout*-Mutanten der Exosomuntereinheit Rrp6p bzw. in Gegenwart von 5-Fluorourazil, einem Inhibitor des Exosoms, akkumulieren (Kuai *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2004). Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass die Addition dieser Poly(A)-Schwänze durch den TRAMP-Komplex katalysiert wird. Dieser besteht aus der Poly(A)-Polymerase Trf4p oder Trf5p. Beide Proteine sind zu 48% identisch und funktionell redundant. Weitere Bestandteile sind die putative RNA-Helikase Mtr4p, welche auch mit dem nukleären Exosom assoziiert ist, sowie jeweils eines der Zink-Finger-Proteine Air1p bzw. Air2p. Letztere vermitteln die Substratbindung des TRAMP-Komplexes. Im Unterschied zu Pap1p, verfügt weder Trf4p noch Trf5p über eine RNA-Bindedomäne (Vanacova *et al.*, 2005; LaCava *et al.*, 2005; Houseley & Tollervey, 2006). Die kurzen Poly(A)-Schwänze fungieren vermutlich als unstrukturierte Ansatzpunkte für das Exosom und markieren somit RNA für den exonukleolytischen Abbau, wobei die Mtr4p Sekundärstrukturen auflöst bzw. gebundene Proteine entfernt. Außerdem wird zumindest *in vitro* das Exosom durch den TRAMP-

Komplex stimuliert (Vanacova *et al.*, 2005; LaCava *et al.*, 2005). Die Aktivität des TRAMP-Komplexes im Zusammenhang mit dem Exosom ist für die Qualitätskontrolle von Bedeutung. So werden z.B. tRNAs, die aufgrund von unmodifizierten Nukleotiden fehlerhafte Sekundärstrukturen aufweisen, über diesen Mechanismus selektiv degradiert (Kadaba *et al.*, 2004, Vanacova *et al.*, 2005). Transkripte der RNA-Polymerase II, welche sich aus intergenischen Regionen ableiten, werden ebenfalls über diesen Weg abgebaut (Wyers *et al.*, 2005). Der Nachweis von polyadenylierten snoRNAs, snRNAs und rRNAs, wobei diese Modifikation von Trf4p bzw. Trf5p abhängig ist, kann als Hinweis dafür gelten, dass dieser Mechanismus der Qualitätskontrolle auch bei den letztgenannten RNA-Spezies stattfindet. Unter der Annahme, dass diese Prozesse auch in höheren Eukaryoten konserviert sind, besteht die Möglichkeit, dass PARN in diese Vorgänge involviert ist.

Es wurde daher überprüft, ob der *knockdown* von PARN in HeLa-Zellen Auswirkungen auf die rRNA-Biogenese hat, wobei sich die Untersuchungen anfänglich auf quantitative Unterschiede der reifen rRNAs beschränkten. Erste Analysen, die auf RT-PCRs basierten, lieferten Anhaltspunkte dafür, dass die Depletion von PARN durch RNAi mit der Anreicherung der 5,8S; 18S und 28S rRNA verbunden ist (pers. Mitteilung J. Tavernez, 2005). Ein Problem bei diesem experimentellen Ansatz ergibt sich aus der optischen Quantifizierung der RNA-Konzentration. Da diese, aufgrund des hohen Anteils von ca. 90%, auf der 28S und 18S rRNA beruht, können ohne einen entsprechenden Vergleichsparameter Mengenunterschiede nur grob ermittelt werden. Daher wurden die verschiedenen Prozessierungsintermediate der rRNAs sowie die Prä-rRNA in die Analysen mit einbezogen. Diese sind wesentlich instabiler und im Nukleus lokalisiert. Mit 5'-markierten DNA-Oligonukleotiden, welche u.a. in den Bereichen der ITS1 und 2 hybridisieren (Abb. 24B), wurde zytoplasmatische und nukleare RNA von HeLa-Zellen, in denen PARN durch RNAi depletiert war, in *Northern blots* auf quantitative Unterschiede der rRNA-Vorläufer untersucht. Der Vergleich erfolgte mit einem Ansatz, der von unbehandelten Zellen stammte. Es konnten dabei sowohl die zwei Prä-rRNA-Spezies (45S und 41S) als auch die verschiedenen Prozessierungsintermediate der reifen rRNAs nachgewiesen werden (Hadjiolova *et al.* 1993). Mit einer, gegen den 5'-Bereich des ITS1 sowie gegen die reife 18S rRNA gerichteten, Sonde wurden die 34S und 21S Vorläufer der 18S rRNA detektiert. Der Nachweis der 32S und 36S Intermediate erfolgte mit einer Sonde, welche im 3'-Bereich des ITS 2 hybridisierte (Abb. 24A<sub>I-IV</sub>). Zwischenstufen der 5,8S rRNA-Reifung (12S) konnten

dagegen nicht beobachtet werden, was sich durch die verwendeten Sonden begründet (Hadjilova *et al.* 1993, Bowman *et al.*, 1981).



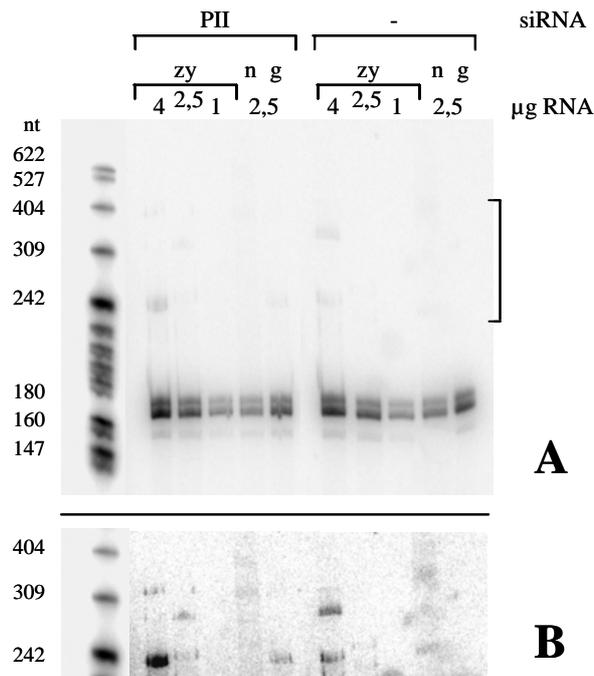
**Abb. 24: Ein *knockdown* von PARN hat keinen Effekt auf die Prozessierung von Prä-rRNA.** HeLa-Zellen wurden für die Depletion von PARN mit der siRNA PII transfiziert. Als Kontrollen dienten unbehandelte Zellen (-). Nukleäre (n) und zytoplasmatische (zy) RNA wurde präpariert, in einem Agarosegel (1%) elektrophoretisch aufgetrennt und in *Northern blots* untersucht. Als Sonden dienten 5'-markierte DNA-Oligonukleotide. **A:** vier verschiedene *Northern blots*, die verwendeten Sonden sind unter den Blots angegeben. Ein Schema der Prä-rRNA wird unter **B** gezeigt und gibt die Sequenzbereiche wieder, in denen die entsprechenden Sonden hybridisieren. Die verschiedenen detektierten rRNA-Intermediate sind rechts bezeichnet und durch ein Schema zusätzlich beschrieben. Die RNA-Mengen bzw. Fraktionen sind oben angegeben. **C:** *Western blot*, gleiche Mengen der in A analysierten Extrakte wurden auf die Reduktion des Expressionslevels von PARN mit einem Anti-PARN-Immunserum untersucht.

Signifikante quantitative Unterschiede, die auf den *knockdown* von PARN zurückzuführen wären, konnten generell nicht beobachtet werden. Die RNA-Menge des RNAi-Ansatzes, die mit der Sonde ITS2\_3' nachgewiesen wurde, ist im Vergleich zu der von unbehandelten Zellen leicht reduziert (Abb. 24A<sub>IV</sub>). Diese Verringerung schließt alle detektierten RNA-Spezies ein und ist darüber hinaus auch mit der gegen die 18S rRNA gerichteten Sonde zu

beobachten (Abb. 24A<sub>III</sub>). Da für beide *Northern blots* die gleichen RNA-Proben zur Anwendung kamen, resultieren diese Abweichungen vermutlich aus Unterschieden in der Beladung. Bei einer genauen Betrachtung der RNA-Spezies, die mit der Sonde gegen die 18S rRNA detektiert wurden, fällt auf, dass die elektrophoretische Mobilität der 34S rRNA des Kontrollansatzes im Vergleich zum RNAi-Ansatz leicht erhöht war (Abb. 24A<sub>III</sub>). Ein ähnlicher Unterschied konnte jedoch mit der gegen den 5'-Bereich des ITS gerichteten Sonde (ITS1\_5'), welche ebenfalls die 34S rRNA detektierte, nicht nachgewiesen werden (Abb. 24A<sub>I</sub>). Die Wiederholung des experimentellen Ansatzes unter Verwendung höherer RNA-Mengen sowie alternativer Sonden, welche die betreffende rRNA-Intermediate selektiv detektieren, müssten klarstellen, ob diese Differenz auf die Depletion von PARN zurückzuführen ist. Die mit der Sonde ITS1\_5' in den zytoplasmatischen RNA-Präparation detektierten Banden (Abb. 24A<sub>I</sub>) sind vermutlich auf eine Kreuzreaktion mit der 28S rRNA zurückzuführen, wobei der Schmier auf einen Abbau hinweist.

Aufgrund der Größe der verschiedenen rRNA-Vorläufer von mehreren kB ist der Nachweis von Intermediaten, die nur durch wenige Nukleotide verlängert sind, allein anhand des Laufverhaltens nicht möglich (siehe unten).

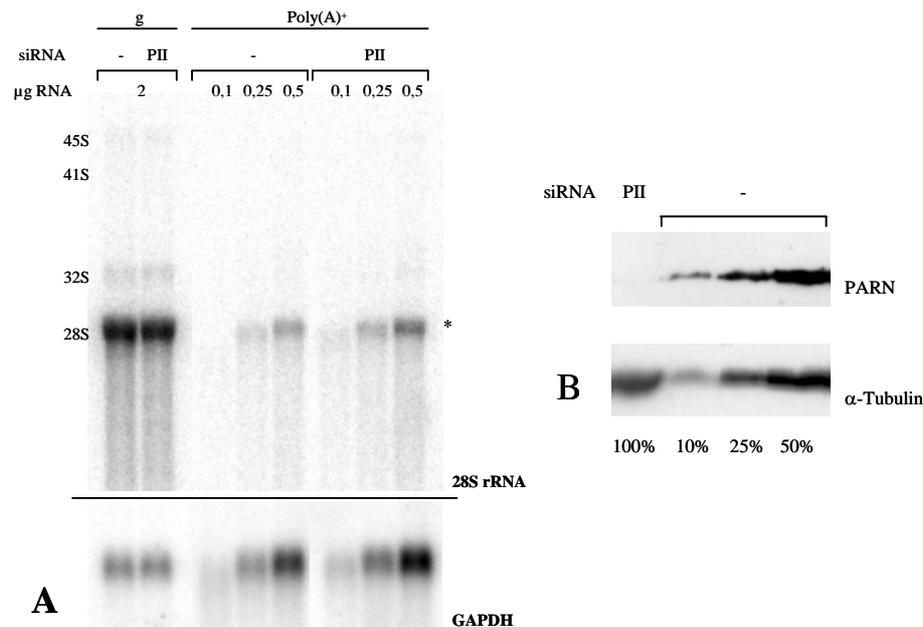
Für die Detektion der 5,8S rRNA erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der RNA-Proben in einem 8%-igen Polyacrylamidgel. Mit einer Sonde gegen die 5,8S rRNA wurden drei RNA-Spezies nachgewiesen, die sich nur wenig in der Nukleotidlänge aber relativ deutlich in der vorhandenen Menge unterschieden (Abb. 25A). Reife 5,8S rRNA besteht aus ca. 160 nt und wird vermutlich durch die Bande oberhalb der 160 nt-Markerbande repräsentiert. Im Vergleich zu den RNA-Spezies im Bereich von 150 bzw. 170 nt liegt diese in den zytoplasmatischen und Gesamt-RNA-Präparationen angereichert vor. Die Zuordnung der zusätzlichen detektierten RNAs war nicht möglich. Das 12S rRNA-Intermediat, welches aus der reifen 5,8S rRNA sowie einem großen Anteil des ITS2 besteht und demzufolge eine Länge von ca. 1000 nt aufweist, wurde entweder durch das verwendete Gel nicht aufgetrennt oder konnte aufgrund der geringen Abundanz nicht nachgewiesen werden (Hadjiolova *et al.*, 1993). Ein quantitativer Effekt, der sich von einem *knockdown* von PARN ableitet, wurde nicht beobachtet. Bei den Banden im Bereich von 240 nt bzw. 300 nt handelt es sich um unspezifische Hybridisierungen, da die Signalintensität nicht über die aufgetragenen RNA-Mengen entsprechend titriert wurde (Abb. 25B).



**Abb. 25: Ein Effekt auf die Prozessierung der 5,8S rRNA durch den *knockdown* von PARN kann nicht nachgewiesen werden.** HeLa-Zellen wurden mit siRNAs gegen PARN (PII) transfiziert. Verschiedene Mengen RNA aus zytoplasmatischen (zy), nuklearen (n) sowie Gesamtzellextrakten (g) wurde in einem 8%-igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im *Northern blot* mit einer Sonde gegen die 5,8S rRNA hybridisiert. **A:** *Northern blot* der 5,8S rRNA, die RNA-Fractionen bzw. Mengen sind oben, die Nukleotidlängen des Markers (nt) links angegeben. **B** zeigt einen Ausschnitt von A (gekennzeichnet durch eine Klammer), welcher länger exponiert wurde. Ein *Western blot*, der die Depletion von PARN in den verschiedenen Extrakten demonstriert, ist in Abb. 23B dargestellt.

Es wurde weiterhin untersucht, ob in Analogie zu Kuai *et al.*, 2004 und Fang *et al.*, 2004 auch in HeLa-Zellen polyadenylierte rRNA-Spezies, in diesem speziellen Fall der 28S rRNA, nachweisbar sind bzw. ob diese detektierbar werden, wenn die Proteinkonzentration von PARN durch RNAi reduziert wird. Ausgangspunkt der Experimente waren Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Präparationen, deren Analyse in *Northern blots* erfolgte. 5'-markierte DNA-Oligonukleotide, welche neben der reifen 28S rRNA auch gegen den ITS2 sowie gegen die reife 5,8S rRNA gerichtet waren, kamen dabei zur Anwendung.

In den Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Präparationen, welche mit einer Sonde gegen die 28S rRNA hybridisiert wurden, konnte eine RNA-Spezies detektiert werden (Abb. 26). Ein Vergleich mit der dazugehörigen Gesamt-RNA-Präparation zeigt, dass diese sich in der Länge zur reifen 28S rRNA nicht bzw. kaum unterschied. Anhand einer Kontrollhybridisierung, die mit einer Sonde gegen die GAPDH-mRNA erfolgte, ist ersichtlich, dass die Poly(A)<sup>+</sup>-RNA im Vergleich zur Gesamt-RNA-Präparation um ca. das zehnfache angereichert vorlag. Die höhere Menge der RNA-Spezies, die in den *knockdown*-Proben detektiert wurde, ist ebenfalls für die GAPDH-mRNA nachweisbar, so dass diese vermutlich aus Unterschieden der Beladung resultiert.



**Abb. 26: Polyadenylierte 28S rRNA kann in HeLa-Zellen auch nach dem *knockdown* von PARN nicht nachgewiesen werden.** HeLa-Zellen wurden für die Reduktion der Proteinkonzentration von PARN mit der siRNA PII transfiziert. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen (-). Aus den Zellextrakten wurde Gesamt-RNA (g) sowie Poly(A)<sup>+</sup>-RNA isoliert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung in einem Agarosegel (1%) erfolgte die Analyse im *Northern blot*. **A:** *Northern blot* mit einer Sonde gegen die 28S rRNA. Als Kontrolle wurde eine Sonde gegen die GAPDH-mRNA verwendet. Die RNA-Fractionen bzw. Mengen sind oben, die verwendeten Sonden rechts angegeben. Detektierte RNA-Spezies, welche durch (\*) gekennzeichnet wurden, sind nicht polyadenyliert (siehe Text). **B:** *Western blot*, Verschiedene Mengen von den in A verwendeten Zellextrakten wurden mit einem Anti-PARN-Immunsersum auf die Reduktion der Proteinkonzentration untersucht. Als Ladekontrolle diente ein Anti- $\alpha$ -Tubulin-Antikörper. Die Extraktmengen sind in % unten, die Antikörper rechts angegeben.

Die 28S rRNA besteht aus ca. 5000 nt. Ob es sich bei der, in den Poly(A)<sup>+</sup>-Präparation nachgewiesenen, RNA um eine polyadenylierte Spezies der 28S rRNAs handelt, kann daher allein anhand von Unterschieden im Laufverhalten nicht erfasst werden. Aus diesem Grund wurde untersucht, ob eine polyadenylierte Spezies der 28S rRNA mittels RT-PCR nachweisbar ist. Dafür wurde Poly(A)<sup>+</sup>-RNA in einer *reversen* Transkription mit einem Oligo(dT)<sub>12</sub> eingesetzt. Unter Verwendung spezifischer Primer konnten aber weder für den PARN-*knockdown* noch für den Kontrollansatz Fragmente der 28S rRNA-Sequenz amplifiziert werden. Der Nachweis der 28S rRNA in den Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Präparationen ist vermutlich auf eine unspezifische Bindung an die Oligo(dT)-Affinitätsmatrix, welche für die Reinigung verwendet wurde, zurückzuführen.

In Analogie zur 28S rRNA wurde zusätzlich ein *Northern blot* mit einer Sonde gegen die 5,8S rRNA durchgeführt. Dafür erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der RNA in einem 8%-igen Polyacrylamidgel. Auch hier konnten RNA-Spezies in den Poly(A)<sup>+</sup>-Präparationen detektiert werden, wobei kein Unterschied in der Quantität und Länge zwischen den

verschiedenen Ansätzen (PARN-*knockdown* und unbehandelte Zellen) sowie im Vergleich zu einer Gesamt-RNA-Präparation beobachtet wurde (nicht gezeigt). Mit einer Sonde, die gegen den ITS2 gerichtet war, konnten keine RNA-Spezies in den Poly(A)<sup>+</sup>-Präparationen detektiert werden.

### 3.3.2.3 Einfluss von PARN auf die Biogenese von snRNA

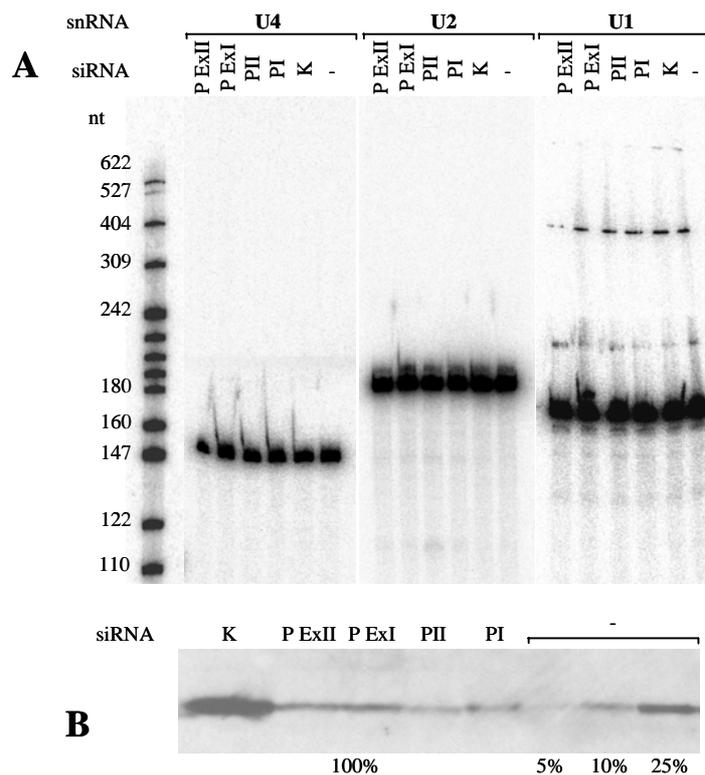
Eine weitere RNA-Spezies, die Ähnlichkeiten mit einigen snoRNAs hinsichtlich der Biogenese aufweisen, sind snRNAs. Diese werden, mit Ausnahme von U6, durch die RNA-Polymerase II als Vorläufer synthetisiert. Das primäre Transkript wird prozessiert, wobei es zur exonukleolytischen Verkürzung des 3'-Endes kommt. Zusätzlich wird das m7G *Cap* in ein 3m (2, 2, 7-trimethyl-Guanosin) *Cap* umgewandelt. Dem Reifeprozess der snRNAs liegt ein reversibler Transfer vom Kern in das Zytoplasma zu Grunde. snRNAs sind Bestandteile der snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*). Diese heterogenen, aus verschiedenen Proteinen und RNA bestehenden Komplexe, bilden zusammen mit anderen Proteinkomponenten das *spliceosom*, welches die Introns von Prä-mRNAs prozessiert. Die Zusammensetzung des *spliceosom* bzw. die Assoziation der verschiedenen snRNPs variiert dabei in Abhängigkeit des Intron-Typs. Die Mehrzahl der Introns werden durch ein *spliceosom* prozessiert, welches die snRNPs U1, U2, U4, U5 und U6 enthält (Will & Lührmann, 2001).

Ebenso wie snoRNAs (siehe oben) erfüllen auch snRNAs wesentliche strukturelle Kriterien für ein mögliches Substrat von PARN. Bis auf die snRNA U6 werden alle durch die RNA-Polymerase II synthetisiert und enthalten eine *Cap*-Struktur. Die 3'-Enden der snRNA-Vorläufer werden durch Faktoren, die auch in die 3'-Prozessierung von Prä-mRNAs involviert sind, gebildet. Dabei ist, wie bei den snoRNAs, die endonukleolytische Spaltung von der Polyadenylierung entkoppelt (Morlando *et al.*, 2002). Ungeachtet dessen konnten polyadenylierte snRNA-Spezies in *S. cerevisiae* detektiert werden, wobei deren Akkumulation auf dem *knockout* der Exosom-Untereinheit Rrp6p beruht (van Hoof *et al.*, 2000). Die Addition des Poly(A)-Schwanzes ist dabei von der RNA-Polymerase Trf4p abhängig (Wyers *et al.*, 2005). Wie zuvor erläutert ist Trf4p Bestandteil des TRAMP-Komplexes, und zusammen mit dem nukleären Exosom in die Qualitätskontrolle verschiedener RNA-Spezies, z.B. tRNAs, involviert (siehe oben).

Es wurde untersucht, ob der *knockdown* von PARN in HeLa-Zellen die Biogenese der snRNAs beeinflusst. Die Analysen beschränkten sich dabei auf Unterschiede in der *steady*

state-Menge bzw. auf zusätzliche 3'-verlängerte snRNA-Spezies. Grundlage der Experimente waren Gesamt-RNA-Präparationen, die in *Northern blots* mit *in vitro* transkribierter asRNA gegen U1, U2, U4 und U6 eingesetzt wurden. Die Depletion von PARN erfolgte unter Verwendung aller zur Verfügung stehenden siRNAs. Als Vergleich dienten unbehandelte Zellen bzw. Zellen, die mit einer Kontroll-siRNA ohne entsprechende Zielsequenz transfiziert wurden.

Im *Northern blot* von U4 und U6 (Abb. 27A) war nur eine Bande zu detektieren, welche mit der jeweiligen reifen snRNA, 107 nt für U6 (nicht gezeigt) bzw. 144 nt für U4, korrespondiert. Für U1 dagegen konnten gleich zwei zusätzliche Spezies nachgewiesen werden, die um ca. 50 bzw. 215 nt länger als die reife snRNA (164 nt) waren. Bei U2 wurde ebenfalls eine längere RNA detektiert, die sich um ca. 10 nt zur reifen snRNA U2 (187 nt) unterschied.



**Abb. 27: Der knockdown von PARN hat keinen Effekt auf die Biogenese von snRNAs.** In HeLa-Zellen wurde PARN durch RNAi depletiert. Als Kontrolle dienten Zellen, welche mit unspezifischen siRNAs (K) transfiziert wurden bzw. unbehandelte Zellen (-). RNA wurde isoliert und in einem 10%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die Detektion der snRNAs U1, U2, U4 erfolgte im *Northern blot*. **A:** *Northern blot*, die in den verschiedenen RNAi-Ansätzen verwendeten siRNAs sowie die für die Hybridisierung verwendeten Sonden sind oben angegeben. Die Markerbanden sind mit den entsprechenden Nukleotidlängen (nt) links bezeichnet. **B:** *Western blot*, Die Proben von A wurden auf die Depletion von PARN mit einem Anti-PARN-Antikörper untersucht. Die in den verschiedenen RNAi-Ansätzen verwendeten siRNAs sind oben, die verwendeten Extraktmengen in % unten angegeben.

Ob die zusätzlich detektierten RNAs sich überhaupt von den jeweiligen snRNAs ableiten und ob es sich dabei um 3'-verlängerte Spezies handelt und inwieweit diese polyadenyliert sind, war letztlich nicht relevant, da für den *knockdown* von PARN kein Effekt beobachtet werden konnte. Weder wurde eine zusätzliche 3'-verlängerte Spezies für die getesteten snRNAs nachgewiesen, noch wurden quantitative Unterschiede zwischen den Ansätzen beobachtet. Anhand des *Western blots* in Abb. 27B wird die unterschiedliche Effektivität der PARN-Depletion in den verschiedenen RNAi-Ansätzen ersichtlich. Diese Unterschiede in der Proteinmenge könnten mit unterschiedlich stark ausgeprägten phänotypischen Effekten korrelieren. Dies wurde jedoch auch nicht beobachtet.

#### 3.3.2.4 Der Einfluss eine PARN-*knockdowns* auf die Stabilität der pri-miRNA-21

Die zuvor betrachteten RNA-Spezies (snRNA, snoRNA, rRNA) werden einer Kategorie von Transkripten zugeordnet, die, aufgrund der allgemeinen funktionellen Eigenschaft nicht für Proteine zu kodieren, als nc (*non-protein-coding*) RNA bezeichnet wird. Der Anteil von proteinkodierenden Sequenzen im menschlichen Genom beträgt nur 1,2%. Dem steht ein transkribierter Anteil von wenigstens 50% gegenüber, so dass ca. 97% der synthetisierten RNA aus Sequenzen besteht, die nicht für Protein kodieren. Dies schließt Intronsequenzen mit ein (Mattick & Makunin, 2005).

Zu den ncRNAs gehören u.a. miRNAs. Diese kurzen (~22 nt) RNAs sind für die Regulation der Genexpression von Bedeutung. miRNAs leiten sich von Vorläufern ab (pri-miRNA), die u.a. in Introns von proteinkodierenden bzw. nichtkodierenden Prä-mRNAs lokalisiert sind. Alternativ können verschiedene miRNAs auch als polycistronische Einheit zusammengefasst sein oder sie kommen als eigenständige Transkripte vor, wobei in beiden Fällen die Synthese durch die RNA-Polymerase II erfolgt. Ein charakteristisches Merkmal der pri-miRNA ist eine Sekundärstruktur, die eine Länge von 60-70 nt umfasst und aus kurzen Doppelsträngen sowie ungepaarten Nukleotiden (*stem loop*) besteht. Diese wird im Nukleus durch die Endonuklease Drosha aus der RNA ausgeschnitten. Der entstandene miRNA-Vorläufer (pre-miRNA) wird nach dem Transport ins Zytoplasma (über Ran-GTP und Exportin-5) durch die endonuklease Dicer erneut gespalten, wobei es zur Freisetzung eines ~22 nt-Doppelstränges kommt, der an beiden 3'-Enden einen Überhang von jeweils 2 Nukleotiden besitzt. Ein Strang des Hybrides (miRNA) wird in den RISC-Komplex inkoooperiert. Der RISC-Komplex vermittelt die Paarung der miRNA mit der entsprechenden Zielsequenz. Diese kann z.B. in 3'-UTRs von mRNAs lokalisiert sein. Bei nahezu vollständiger Komplementarität löst die Paarung die Degradation der mRNA aus. Ist der gebildete Doppelstrang aus miRNA und mRNA dagegen

nicht vollständig komplementär, kommt es über einen noch unbekanntem Mechanismus zur Hemmung der Translation (Bartel, 2004).

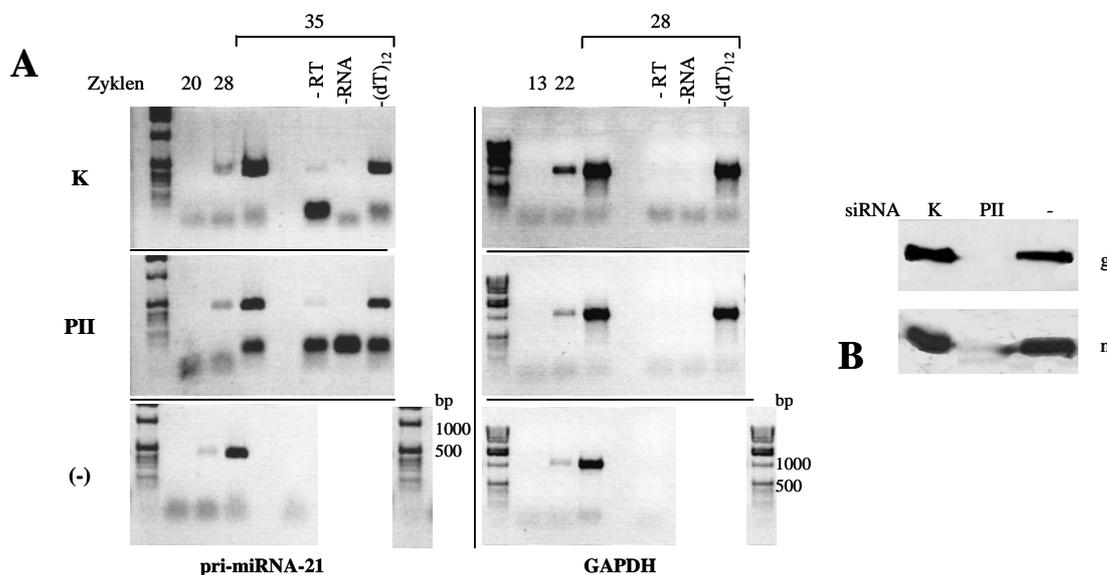
pri-miRNAs, die als eigenständige Transkripte durch die RNA-Polymerase II synthetisiert werden, sind polyadenyliert und enthalten eine *Cap*-Struktur am 5'-Ende. Sie erfüllen damit alle strukturellen Kriterien für ein Substrat von PARN (Cai *et al.*, 2004). Da miRNAs in regulatorische Prozesse involviert sind, ist davon auszugehen, dass ihre Synthese ebenfalls einer stringenten Kontrolle unterliegt. Diese könnte theoretisch auch über die Halbwertszeit der pri-miRNA erfolgen, wobei die Rate der Deadenylierung entscheidenden Einfluss hätte. In diesem Zusammenhang könnte die Aktivität von PARN von Bedeutung sein.

Es erfolgte daher die Untersuchung, ob der *knockdown* von PARN eine Änderung der Stabilität bzw. Halbwertszeit der pri-miRNA 21 (miR-21) zur Folge hat. Diese wird in HeLa-Zellen in leicht detektierbaren Mengen exprimiert (Lagos-Quintana *et al.*, 2001). Für die Reduktion des Expressionslevels von PARN wurden HeLa-Zellen mit der siRNA PII transfiziert. Als Kontrollen dienten einmal eine siRNA, die keine in HeLa-Zellen vorkommende Zielsequenz besitzt, sowie unbehandelte Zellen. Grundlage der Analyse waren nukleäre Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Präparationen, die in einer RT in Gegenwart eines Oligo(dT)<sub>12</sub> eingesetzt wurden. Mit Oligonukleotiden, welche 170 nt stromauf- bzw. stromabwärts der pre-miRNA-Sequenz binden, wurde im Anschluss eine semiquantitative PCR durchgeführt. Zusätzlich erfolgte eine Kontrollreaktion mit Oligonukleotiden, welche die Sequenz der GAPDH binden.

Nach 28 von insgesamt 35 Zyklen war ein PCR-Fragment mit der erwarteten Länge von ca. 400 nt (exakte Länge: 428 nt) in den verschiedenen Reaktionen des pri-miR-21-Ansatzes detektierbar (Abb. 28A). Dabei konnte ein geringer Unterschied in der Quantität der PCR-Produkte beobachtet werden. Die meiste DNA wurde in den Proben amplifiziert, welche sich von der Kontrolltransfektion ableiteten. Die niedrigste DNA-Menge war in den Ansätzen vorhanden, welche von unbehandelten Zellen stammten. Für GAPDH dagegen waren schon nach 22 von insgesamt 28 PCR-Zyklen die entsprechenden Fragmente nachweisbar, obwohl die PCR mit einer um 50% verringerten *template*-Menge erfolgte. Die quantitativen Abweichungen, welche zwischen den pri-miRNA-21-Reaktionen beobachtet wurden, waren in den Reaktionen der GAPDH-Kontrolle ebenfalls in nahezu identischen Verhältnissen vorhanden. Als Kontrollen dienten RTs, bei denen *reverse* Transkriptase, Poly(A)<sup>+</sup>-RNA bzw. Oligo(dT)<sub>12</sub> jeweils durch Wasser ersetzt wurden. Damit wurde überprüft, ob die Amplifikation der PCR-Fragmente von einem Poly(A)-Schwanz abhängig ist und nicht auf DNA-Kontaminationen beruht. Für den Ansatz von unbehandelten Zellen wurde nur eine

Kontrollreaktion (ohne RNA) durchgeführt, da die Poly(A)<sup>+</sup>-RNA-Mengen nicht ausreichten. Sowohl für GAPDH als auch für die pri-miR-21 konnten die entsprechenden Fragmente ebenfalls in Abwesenheit des Oligo(dT)<sub>12</sub> nachgewiesen werden. Die Synthese der cDNA erfolgte also auch unabhängig von einer Poly(A)-Sequenz. Die dafür notwendige freie 3'-OH Gruppe könnte von, im 3'-Bereich der RNA gebundenen, Oligonukleotiden stammen oder sie leitet sich letztlich von der eigenen Sequenz ab, wobei das 3'-Ende der RNA eine Schleife bildet. Aufgrund der Verwendung von Poly(A)<sup>+</sup>-RNA in den Reaktionsansätzen repräsentieren die PCR-Produkte trotzdem die Quantität der polyadenylierten RNA-Spezies. Hinweise für eine Kontamination mit genomischer DNA gaben Fragmente in den Kontrollansätzen der pri-miR-21, die ohne *reverse* Transkriptase durchgeführt wurden. Diese machen aber nur einen minimalen zusätzlichen Anteil am Produkt der cDNA Amplifikation aus.

Die *steady-state*-Menge der pri-miR-21 wurde durch einen *knockdown* von PARN nicht beeinflusst. Die Mengen an Produkt, welche in der semiquantitativen PCR der *knockdown*-Probe erhalten wurde, war zwar leicht erhöht im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Jedoch konnte im Ansatz der Kontrolltransfektion eine noch größere Menge detektiert werden. Die für die pri-miR-21 beobachteten quantitativen Verhältnisse waren außerdem auch für GAPDH nachzuweisen, so dass sie vermutlich durch technische Abweichungen begründet sind.



**Abb. 27:** Die *steady-state*-Menge der pri-miRNA-21 wird durch den *knockdown* von PARN in HeLa-Zellen nicht beeinflusst. **A:** Agarosegele (1,2%), in denen die Produkte semiquantitativer RT-PCRs elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Die RT erfolgte mit nukleärer Poly(A)<sup>+</sup>-RNA in Gegenwart eines Oligo(dT)<sub>12</sub>. Drei Kontrollen, bei denen *reverse* Transkriptase (-RT), RNA (-RNA) oder Oligo(dT)<sub>12</sub> (-(dT)<sub>12</sub>) jeweils durch Wasser ersetzt waren, wurden zusätzlich durchgeführt. Die Reduktion des Expressionslevels von PARN erfolgte durch Transfektion der siRNA PII. Zum Vergleich dienten unbehandelte Zellen (-) sowie HeLa-Zellen, die mit einer siRNA ohne Zielsequenz (K) transfiziert wurden. **B:** *Western blot*, gleiche Mengen der nukleären (n) Extrakte sowie der Gesamtzellextrakte (g) wurden mit einem Anti-PARN-Immunsersum auf die Reduktion des Expressionslevels untersucht.

## 4 Diskussion

### 4.1 Struktur und Katalysemechanismus von PARN

#### 4.1.1 Das aktive Zentrum und der Katalysemechanismus von PARN

PARN gehört der DEDD-Superfamilie von Nukleasen an. Es enthält die für diese Gruppe von Enzymen charakteristischen vier konservierten Aminosäuren, drei Aspartate (D28, D292 und D382) und ein Glutamat (E30), die in drei Sequenzmotiven (Exo-Motiv I-III) lokalisiert sind. Diese Aminosäuren sind für die Katalyse essentiell. Ihre Umwandlung in Alanin führt zum vollständigen Verlust der enzymatischen Aktivität. Die Substrataffinität wird dabei jedoch nicht beeinflusst. Alle vier Reste sind an der Bindung von insgesamt zwei divalenten Kationen beteiligt (Ren *et al.*, 2002; 2004).

Diese Eigenschaften sind Anhaltspunkte dafür, dass die von PARN katalysierte Reaktion über einen *two-metal-ion phosphoryl-transfer mechanism* erfolgen könnte, der erstmals für die Nuklease-Domäne der DNA-Polymerase I von *E. coli* postuliert wurde (Beese & Steitz, 1991; Steitz & Steitz; 1993). Die divalenten Kationen vermitteln dabei den Katalysemechanismus, indem sie einmal eine genaue Positionierung und Orientierung des Substrates gewähren, den Übergangszustand stabilisieren und die Bildung bzw. Freisetzung des 3'-Oxyanions erleichtern. Als Lewis-Säure fördert eines der Kationen außerdem die Deprotonierung eines H<sub>2</sub>O-Moleküls, wobei über das gebildete Hydroxidion der nukleophile Angriff auf das Phosphat erfolgt. In der Pol I von *E. coli* ist dabei ein Tyrosin (Y497) von Bedeutung, welches zusammen mit dem entsprechenden Metallion sowie dem konservierten Glutamat des Exo-Motivs I die exakte Ausrichtung des Hydroxidions für den nukleophilen Angriff ermöglicht (Derbyshire *et al.*, 1991; Steitz & Steitz; 1993). Das Tyrosin ist im Exo-Motiv III (-Y-x(3)-D-) lokalisiert und nur in einigen Enzymen der DEDD-Familie konserviert. Andere Nukleasen, zu denen auch PARN gehört, enthalten dagegen ein konserviertes Histidin (-H-x(4)-D) an vergleichbarer Position. Basierend auf dieser Sequenzvariation erfolgt die Unterteilung der DEDD-Familie in Untergruppen, die entsprechend mit DEDDy bzw. DEDDh bezeichnet werden (Zuo & Deutscher, 2001). In Analogie zum Tyrosin könnte das Histidin der DEDDh-Nukleasen an der Ausrichtung des nukleophil angreifenden Hydroxidions beteiligt sein. Weiterhin wäre denkbar, dass ihm als Protonenakzeptor ein wesentlicher Anteil an der Bildung dieses Hydroxidions und damit zusätzlich ein aktivierender Einfluss zukommt (Hamdan *et al.*, 2002). Die Mutation dieser konservierten Aminosäure müsste sich daher in einer deutlichen Reduktion der enzymatischen Aktivität auswirken. Dies wurde durch unsere Analysen gezeigt. Die Umwandlung des H377 in Alanin

ist mit einem drastischen Verlust der katalytischen Aktivität von PARN verbunden. Im Vergleich zum Wildtypprotein war die spezifische Aktivität um den Faktor 200 verringert. Der gleiche Effekt konnte mit einer C-terminal verkürzten Mutante (PARN[1-537]) beobachtet werden. Das H377 ist daher eine weitere Aminosäure, die für die enzymatische Katalyse wichtig ist. Die Substitution des H377 in Alanin hatte keine signifikanten Auswirkungen auf die Substratbindung (Wu *et al.*, 2005). Die Umwandlung des Y497 in Alanin in der Pol I von *E. coli* hat dagegen einen weniger drastischen Effekt auf die katalytische Aktivität (Derbyshire *et al.*, 1991).

In der Kristallstruktur von PARNn wurden erstaunlicherweise keine  $Mg^{2+}$ -Ionen im aktiven Zentrum nachgewiesen, obwohl 5 mM  $MgCl_2$  im Kristallisationsansatz enthalten waren und genug Raum für deren Inkorporation zur Verfügung steht. Die Aktivität von PARN ist absolut von  $Mg^{2+}$  bzw. divalenten Kationen abhängig (Körner *et al.*, 1997; Ren *et al.*, 2002). Die optimale  $Mg^{2+}$ -Konzentration für die enzymatische Katalyse beträgt dabei 0,75-1 mM. Zumindest bei einem der divalenten Kationen erfolgt die Assoziation mit dem Protein unabhängig von der Bindung des Substrats (Ren *et al.*, 2002). Die Kokristallisation von PARNn mit dem Oligo(A)<sub>10</sub> wurde dagegen in Gegenwart von 5 mM EDTA durchgeführt, um den Abbau des Nukleotids zu verhindern. Dies erklärt zum einen die Abwesenheit der divalenten Kationen und beweist weiterhin, dass die Bindung des Substrates unabhängig von deren Gegenwart erfolgt. Der strukturelle Vergleich des aktiven Zentrums von PARNn-RNA mit dem des  $\epsilon$ 186-TMP-Komplexes ( $\epsilon$ 186 ist die N-terminale Domäne der  $\epsilon$ -Untereinheit der Pol III von *E. coli* (Hamdan *et al.*, 2002)), zeigt hohe Übereinstimmungen in Anordnung und Position der konservierten Aminosäurereste. Die Seitenketten von D28, E30, D292 und D382 sind mit den entsprechenden Seitenketten von  $\epsilon$ 186 (D12, E14, D103 und D167), abgesehen von geringen Abweichungen, kongruent. Dies schließt die Seitenketten der konservierten Histidine, des H377 von PARN (siehe oben) bzw. des H162 von  $\epsilon$ 186, mit ein (Wu *et al.*, 2005). Aufgrund dieser Identität könnte die Katalyse für beide Enzyme über einen identischen Mechanismus verlaufen. Die in PARNn-RNA fehlenden divalenten Kationen müssten dann an den entsprechenden Positionen der  $Mn^{2+}$ -Ionen des  $\epsilon$ 186-TMP-Komplexes lokalisiert sein. Ein  $Mg^{2+}$ -Ion würde dann von den Seitenketten des D28, D382 und E30, das weitere entsprechend von D28 und D292 gebunden werden.

#### 4.1.2 Das Dimer von PARN als strukturelle Einheit für die enzymatische Katalyse

Auf der Grundlage von Gelfiltrations- und Protein-Protein-*crosslink*-Experimenten, welche mit einem 54 kDa-Fragment des bovinen PARN bzw. mit dem rekombinanten humanen

Protein erfolgten, wurde eine oligomere Struktur für PARN postuliert, wobei ein Trimer überwiegen sollte (Martinez *et al.*, 2000).

Die Kristallstrukturen von PARNn in substratfreier und substratgebundener Form zeigen eindeutig, dass es sich bei dem Protein um ein Homodimer handelt. Eine Untereinheit besteht jeweils aus Nuklease-Domäne und R3H-Domäne. Dass vollständiges PARN in Lösung auch als Dimer vorliegt, wurde durch Ultrazentrifugationsanalysen nachgewiesen (Dehlin, 2004). Die analytische Gelfiltrationschromatographie der Deletionsvariante PARN[1-537] ergab ebenfalls eine Zusammensetzung aus zwei Untereinheiten (Wu *et al.*, 2005). Die Dimerisierung in PARNn wird durch starke hydrophobe Kontakte zwischen den Nuklease-Domänen vermittelt. Die Substratbindestellen befinden sich dabei auf entgegengesetzten Seiten und werden entsprechend von der R3H-Domäne der jeweilig gegenüberliegenden Untereinheit überdeckt (Abb. 4). Für die R3H-Domäne, ein konserviertes Sequenz- und Strukturmotiv, das in einer Reihe verschiedener Proteine vorkommt, wird eine Beteiligung an der Bindung von Nukleinsäuren postuliert (Grishin, 1998). Aufgrund der engen Assoziation mit der Substratbindestelle sowie der deckelartigen Anordnung könnte die R3H-Domäne in die Poly(A)-Bindung involviert sein und dabei die Affinität bzw. Spezifität beeinflussen. Das Dimer würde demnach als strukturelle Einheit für die enzymatische Katalyse fungieren. Eine Auflösung der Dimerstruktur müsste unter diesen Voraussetzungen zu einer Beeinträchtigung der enzymatischen Aktivität oder der Poly(A)-Spezifität führen. Vergleichbare Effekte wären dann auch nach einer Deletion der R3H-Domäne zu erwarten.

Ein bedeutender hydrophober Kontakt wird durch die Phenylalanine 123 und 127 gewährleistet. Beide sind in der Helix  $\alpha 4$  lokalisiert, über welche die Nuklease-Domänen unter anderem in Verbindung stehen (Abb. 4, 6). Im Dimer kommt es zu einer wechselseitigen Interaktion zwischen dem F123 der einen Untereinheit und dem F127 der anderen Untereinheit. F123 ist dabei jeweils in einem hydrophoben Kern lokalisiert, der durch eine Reihe von hydrophoben Aminosäureresten gebildet wird und von dem auch F127 ein Bestandteil ist (Abb. 6).

Die Umwandlung des F123 in Alanin im vollständigen Protein hatte massive Auswirkungen. Die Mutante eluierte bei der Chromatographie an MonoQ über fast den gesamten KCl-Gradienten in schwankenden Proteinmengen (Abb. 7). Die höchste enzymatische Aktivität (U/ml), die im Vergleich zum Wildtypprotein erheblich verringert war, fiel dabei nicht mit der Fraktion zusammen, die über die größte Proteinmenge verfügte. Dies ist kennzeichnend für eine fehlerhafte Proteinfaltung und Aggregation und deutet daher auf F123 als eine wesentliche Komponente für die Struktur von PARN hin. Dagegen hatte die Substitution des

F127 in Alanin keine Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität sowie die Substrataffinität von vollständigem PARN. Die kinetischen Parameter  $V_{\max}$  und  $K_M$  entsprachen denen vom Wildtypprotein.

F127 und F123 wurden auch in der verkürzten Variante PARN[1-537] durch Alanine ersetzt (Wu *et al.*, 2005). Für die Mutante F127A konnten dabei im Gegensatz zum vollständigen Protein deutliche Effekte auf die enzymatische Aktivität sowie die Substrataffinität beobachtet werden. Eine analytische Gelfiltration der Mutanten zeigte, dass F127A überwiegend, F123A dagegen ausschließlich als Monomer vorlag. Dies war mit der Inaktivierung von F123A bzw. mit einer signifikanten Reduktion der enzymatischen Aktivität von F127A verbunden. Weiterhin besaß F123A keine Affinität gegenüber Oligo(A)<sub>15</sub>, die von F127A war im Vergleich zu unverändertem PARN[1-537] stark vermindert. Ein Vergleich der Ergebnisse der untersuchten Varianten von F127A lässt vermuten, dass offenbar Regionen innerhalb der deletierten Bereiche von PARN[537] und damit auch von PARNn ebenfalls Anteil an der Dimer-Stabilisierung haben. Weiterhin sind sie Hinweise für eine enge Beziehung zwischen Dimerstruktur, Substratbindung bzw. -affinität und katalytischer Aktivität. Die Bedeutung, die in diesem Zusammenhang der R3H-Domäne zukommt, wird anhand der entsprechenden Deletionsmutanten verdeutlicht. Die Entfernung der R3H-Domäne in vollständigem PARN ( $\Delta$ PARN175-245) ist mit einer starken Verringerung der Substrataffinität verbunden. Dies äußerte sich in einem im Vergleich zum Wildtypprotein um den Faktor 16 erhöhten  $K_M$ -Wert. Die  $V_{\max}$  war dagegen nicht signifikant verändert. Die Deletion hatte keinen Einfluss auf die Poly(A)-Spezifität.

Die Entfernung der R3H-Domäne einschließlich der, als Linker fungierenden,  $\alpha$ -Helices 5 und 8 ( $\Delta$ PARN134-269) führte zu einer verminderten Löslichkeit des Proteins und zum Verlust der katalytischen Aktivität. PARN[1-537] mit der gleichen Deletion wies eine erheblich verminderte katalytische Aktivität und Substrataffinität auf (Wu *et al.*, 2005). Die R3H-Domäne ist also in die Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes involviert, was gleichzeitig bedeuten würde, dass nur das Dimer die maximale katalytische Aktivität aufweisen kann.

Enge strukturelle Verknüpfungen bestehen zwischen der Poly(A)-Bindestelle und der Dimer-Kontaktfläche. Ein Beispiel ist die  $\alpha$ -Helix  $\alpha_3$ , über die beide Untereinheiten unter anderem interagieren (Abb. 4). Diese enthält einmal Aminosäuren, welche den hydrophoben Kern um F123 bilden (siehe oben) sowie Aminosäuren, die an der Bindung des 3'-Nukleotids beteiligt sind. So z.B. das S112, welches mit dem N3-Atom der Adeninbase von A<sub>10</sub> (siehe unten) über

eine Wasserstoffbrücke interagiert oder das F115, welches mit der Adeninbase von A<sub>10</sub> über hydrophobe Wechselwirkungen in Verbindung steht (Abb. 5, 6). Eine Veränderung der Strukturen, welche die Assoziation der Nuklease-Domänen vermitteln, könnte demnach gleichzeitig die Integrität der Substratbindestelle aufheben; ein Gesichtspunkt, der für die Mutante F123A von PARN[1-537] in Betracht kommt (siehe oben).

#### 4.1.3 Die Substratbindung, sowie die Poly(A)-Spezifität von PARN

Poly(A) wird in einer Vertiefung der Nuklease-Domäne gebunden. Diese ist negativ geladen und enthält außerdem das aktive Zentrum mit den konservierten für die Katalyse essentiellen Aminosäuren (Abb. 4, 5). Die Poly(A)-Bindestellen des Dimers befinden sich auf entgegengesetzten Seiten und werden von den entsprechenden R3H-Domänen, die an der Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes beteiligt sind, überdeckt (siehe oben). In der Ko-Kristallstruktur von PARNn mit RNA sind die R3H-Domänen nicht aufgelöst. Dies könnte darauf hinweisen, dass bei PARNn die Kooperation zwischen Nuklease- und R3H-Domäne beeinträchtigt ist. Dies wäre gleichzeitig eine Erklärung für die stark verminderte enzymatische Aktivität sowie Substrataffinität von PARNn. Demnach würden Bereiche, die in den deletierten Regionen von PARNn liegen für eine stabile und damit funktionelle Interaktion der Domänen von Bedeutung sein.

Von dem für die Kokristallisation verwendeten Oligo(A)<sub>10</sub> sind nur die letzten drei Nukleotide (A<sub>8</sub>-A<sub>10</sub>) in der Struktur von PARNn-RNA sichtbar. Zwischen dem in der Poly(A)-Bindestelle lokalisierten Adenosin-Trinukleotid A<sub>8</sub>-A<sub>10</sub> und dem Protein bestehen eine Reihe von Wasserstoffbrückenbindungen sowie hydrophobe bzw. van der Waals-Wechselwirkungen (VDW). Bis auf das S112, welches mit dem N3 der Adeninbase von A<sub>10</sub> über eine Wasserstoffbrücke in Kontakt steht, existieren keine basenspezifischen Wasserstoffbrückenbindungen. Die Interaktion mit den Basen erfolgt hauptsächlich über VDW und hydrophobe Wechselwirkungen. Die Poly(A)-Spezifität kann daher nicht auf eine selektive Bindung der Adenine zurückgeführt werden. Worauf letztlich die Poly(A)-Spezifität beruht ist unklar. Jedenfalls wird sie nicht durch die in PARNn deletierten Bereiche bestimmt, da auch PARNn selektiv Poly(A) degradiert (Abb. 3).

Das Ausmaß der Kontakte ist für das am 3'-Ende gelegene Nukleotid A<sub>10</sub> am stärksten, für das am 5'-Ende lokalisierte dagegen am schwächsten ausgeprägt. Die Adeninbase von A<sub>8</sub> ist aus der Substratbindestelle exponiert und könnte mit der R3H-Domäne in Verbindung stehen.

Die intensiven Wechselwirkungen zwischen dem Protein und A<sub>10</sub> gewährleisten vermutlich eine genaue Positionierung der Phosphatgruppe für den nukleophilen Angriff und sind daher nicht nur für die Bindung von Poly(A), sondern darüber hinaus auch für die Katalyse von entscheidender Bedeutung. Dies wird durch die entsprechenden Mutanten bestätigt. F31 interagiert mit seiner Seitenkette über VDW mit dem Ribose-Ring, sowie mit der Phosphatgruppe von A<sub>10</sub> (Abb. 5). Die Substitution von F31 in Alanin führte zu einer moderaten Erhöhung des K<sub>M</sub> um den Faktor 5 im Vergleich zum Wildtypprotein und beeinflusste daher die Affinität zwischen Enzym und Substrat nur geringfügig. Gleichzeitig war die V<sub>max</sub> mit einem Faktor von 50 erheblich reduziert, was auf eine Beeinträchtigung des Katalysemechanismus hinweist. Ähnliche Effekte wurden für die Mutanten I34A und K326A beobachtet. I34 interagiert mit der Adeninbase von A<sub>9</sub>, K326 ist über eine Wasserstoffbrücke mit dem O1P-Atom der Phosphatgruppe von A<sub>9</sub> verbunden. Die Umwandlung der entsprechenden Aminosäure in Alanin hatte ebenfalls nur eine mäßige Steigerung des K<sub>M</sub> (Faktor 3 für I34A bzw. Faktor 8 für K326A) aber eine signifikante Verminderung des Substratumsatzes (Faktor 20) im Vergleich zum unveränderten Protein zur Konsequenz.

#### 4.2 Die *in vivo*-Funktion von PARN in somatischen Zellen

Vor allem wesentliche enzymatische Eigenschaften von PARN, wie die Spezifität für einzelsträngiges Poly(A) sowie die *Cap*-Abhängigkeit, sind Hinweise für eine Beteiligung des Enzyms an der Deadenylierung und damit am Abbau von mRNA. Inwieweit PARN *in vivo* in diese Prozesse involviert ist bzw. welche Bedeutung dem Enzym bei der Regulation der mRNA-Stabilität *in vivo* zukommt, wurde bisher nicht genauer untersucht.

Eine erste Charakterisierung der *in vivo*-Funktion von PARN erfolgte anhand von *Xenopus*-Oozyten. Dabei konnte gezeigt werden, dass PARN die sequenzunspezifische Deadenylierung von maternaler mRNA (*default deadenylation*) katalysiert (Körner *et al.*, 1998).

Dass PARN als Deadenylase auch in somatischen Zellen von erheblicher Bedeutung sein könnte, lässt sich aus verschiedenen experimentellen Daten folgern. So wurde bei zwei unabhängigen Reinigungen von PARN aus Kalbsthymusextrakt bei allen Chromatographieschritten jeweils nur ein Aktivitäts-*Peak* detektiert (Körner *et al.*, 1997, Martinez *et al.*, 2000). Dies schließt zwar die Existenz von anderen poly(A)-spezifischen Deadenylenen nicht aus, ist aber u.a. ein Hinweis auf die hohe katalytische Aktivität des Enzyms.

Weiterhin führt die Depletion von PARN aus Zellextrakten zum Verlust bzw. zu einer signifikanten Reduktion der deadenylierenden Aktivität *in vitro*. Diese kann durch die Zugabe des rekombinanten Proteins wieder hergestellt werden (Gao *et al.*, 2000).

Außerdem erfolgt die Deadenylierung von mRNAs in HeLa-Zellextrakten unter Anreicherung von Intermediaten, die sich in der Länge um ca. 30 Nukleotide unterscheiden. Dieses charakteristische Abbaumuster, das vermutlich auf einem inhibierenden Einfluss von PABPC1 beruht, hängt von einer *Cap*-Struktur ab und kann unter definierten Bedingungen allein mit den homogenen PARN- und PABPC1-Präparationen aus Kalbsthymus *in vitro* reproduziert werden (Körner *et al.*, 1997, Dehlin *et al.*, 2000). Die *Cap*-Abhängigkeit ist dabei eine spezifische Eigenschaft von PARN. Ccr4p, die katalytische Untereinheit des CCR4-NOT-Deadenylasekomplexes von *S. cerevisiae*, wird zwar auch durch das Poly(A)-bindende Protein (Pab1p) gehemmt, die *Cap*-Struktur hat dagegen keine Auswirkungen auf die katalytische Aktivität (Tucker *et al.*, 2002; Viswanathan *et al.*, 2003).

Ein möglicher experimenteller Ansatz für die Untersuchung der *in vivo*-Funktion von PARN basiert auf der Depletion des Enzyms durch RNAi. Unter Verwendung verschiedener siRNAs konnte die Proteinkonzentration von PARN in HeLa-Zellen standardmäßig bis auf 10% der Ausgangsmenge verringert werden. Dieser sehr effektive *knockdown* müsste mit einer deutlichen Beeinträchtigung der biologischen Funktion korrelieren und anhand spezifischer phänotypischer Effekte detektierbar sein.

Wenn PARN für den Abbau von Poly(A) in somatischen Zellen von wesentlicher Bedeutung ist, dann sollte die Reduktion der Proteinkonzentration zu Änderungen in der *steady-state*-Poly(A)-Längenverteilung führen. Der Anteil von langen Poly(A)-Schwänzen müsste dabei zunehmen, der von kurzen Poly(A)-Schwänzen sich dagegen gleichzeitig verringern. Ein Effekt, der z.B. mit dem *knockdown* von Caf1 und Not2, zwei Untereinheiten des CCR4-NOT-Komplexes, in S2-Zellen von *D. melanogaster* verbunden war (Temme *et al.*, 2004). Entsprechende Auswirkungen eines PARN-*knockdowns* in HeLa-Zellen konnten jedoch nicht beobachtet werden. Obwohl die Proteinmenge bis unter 10% der Ausgangskonzentration reduziert wurde, hatte dies keine Auswirkungen auf die *steady-state*-Längenverteilung von Poly(A) im Kern bzw. Zytoplasma.

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben des erwarteten phänotypischen Effekts wäre, dass sich die Aktivität von PARN nur auf bestimmte mRNAs beschränkt. Dazu könnten auch Transkripte gehören, die AREs im 3'-UTR enthalten. Diese sind allgemein durch eine sehr geringe Halbwertszeit gekennzeichnet. Die hohe Abbaurate wird dabei durch Proteine vermittelt, welche die AREs entweder direkt binden (ARE-BP) oder über weitere Faktoren

mit diesen indirekt assoziiert sind. So wurde eine direkte Interaktion zwischen PARN und KSRP, einem ARE-BP, das alle ARE-Klassen bindet und den Abbau der entsprechenden mRNAs fördert, nachgewiesen (Gherzi *et al.*, 2004). Weiterhin wird PARN *in vitro* durch TTP, ein ARE-BP, welches ausschließlich mit AREs der Klasse II assoziiert ist, stimuliert. Dies erfordert die Bindung des vollständigen TTP an die ARE-Sequenz des entsprechenden Reportertranskripts. Eine Mutation der für die Katalyse essentiellen Aminosäuren von PARN hebt die forcierte Deadenylierung auf (Lai *et al.*, 2003).

Um zu untersuchen ob bzw. inwieweit PARN in den *turnover* von mRNAs mit destabilisierenden Elementen involviert ist, wurden die Auswirkungen eines PARN-*knockdowns* auf die Stabilität bzw. Halbwertszeit verschiedener RNA-Konstrukte analysiert, welche die AREs des humanen *c-fos*-, GM-CFF-, IL-8- und TNF $\alpha$ -Gens enthielten. Die Synthese der mRNAs erfolgte transient in HeLa<sub>Tet-Off</sub>-Zellen, bei denen in Gegenwart von Doxycyclin die Transkription der entsprechenden Zielsequenz gestoppt wird. Nach der Zugabe von Doxycyclin wurde die Abnahme der *steady-state*-Menge der verschiedenen RNA-Konstrukte entsprechend verfolgt.

Dabei konnte für keines der untersuchten Transkripte ein, durch die PARN-Depletion verursachter, Effekt auf die RNA-Stabilität nachgewiesen werden. Die Reduktion der Konzentration von PARN bis deutlich unter 10% der Ausgangsmenge war weder mit erhöhten *steady-state*-Mengen noch mit einer signifikanten Zunahme der Halbwertszeiten bzw. mit einer sichtbaren Verringerung der Deadenylierungsraten verbunden.

Die ermittelten Halbwertszeiten der verwendeten RNA-Konstrukte sind, verglichen mit publizierten Werten, stark erhöht (Winzen *et al.*, 1999). Dies ist sicherlich z.T. auf den experimentellen Ansatz zurückzuführen. Zwei sukzessive Transfektionen (siRNA und Plasmid-DNA) könnten die Zellen stressen und somit zu einer unspezifischen Stabilisierung der mRNA beitragen (Kedersha *et al.*, 1999; Bolling *et al.*, 2002). Weiterhin kann nicht ausgeschlossen werden, dass hohe Transkriptmengen die zellulären Abbaumechanismen übersättigen. Neben einer reduzierten Abbaurrate würde es dabei auch zu einer Überlagerung der zu erwartenden phänotypischen Effekte kommen.

Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Einfluss eines PARN-*knockdowns* auf die Stabilität einer endogenen mRNA von HeLa-Zellen untersucht. Durch Zugabe des Interleukin 1-Peptids kann die Expression von Interleukin 8 (IL8) kurzzeitig induziert werden. Die IL 8-mRNA enthält ein ARE, welches der Klasse I angehört, und das unter Standardbedingungen die geringe Halbwertszeit des Transkripts vermittelt. Doch auch für die endogene mRNA wurden keine spezifischen Auswirkungen auf die Stabilität als Folge der PARN-Depletion detektiert.

Die Proteinkonzentration war ebenfalls bis unter 10% gegenüber unbehandelten Zellen reduziert. Allerdings wurden in den Zellen, deren Transfektion mit der PARN-spezifischen bzw. der Kontroll-siRNA erfolgte, signifikant erhöhte IL8-mRNA-Mengen im Vergleich zu untransfizierten Zellen nachgewiesen (Abb. 18A). Diese Unterschiede sind anscheinend nicht auf veränderte Transkriptionsraten zurückzuführen, da die mRNA-Menge 1 h nach der Induktion bei allen Ansätzen in vergleichbaren Bereichen lag. Wenn die Differenzen auf einer erhöhten mRNA-Stabilität beruhten, dann war dies keine spezifische Auswirkung der reduzierten Proteinkonzentration von PARN, da die Kontrolle nahezu identische Charakteristika aufwies. Als Ursache wäre eine allgemeine stressbedingte Stabilisierung des Transkripts, die durch die Transfektion der siRNAs ausgelöst wurde, denkbar (siehe oben).

Keiner der verwendeten experimentellen Ansätze für den Nachweis einer Beteiligung von PARN am mRNA-Abbau, bzw. an der Deadenylierung als geschwindigkeitsbestimmenden Schritt dieses Prozesses, in somatischen Zellen (HeLa-Zellen) resultierte in den erwarteten phänotypischen Effekten. Obwohl die Proteinkonzentration durch RNAi erheblich reduziert werden konnte, hatte dies keine Auswirkungen auf den Poly(A)-Status sowie auf die Stabilität der getesteten mRNAs bzw. RNA-Konstrukte. Gleiche Ergebnisse wurden auch bei unabhängigen Untersuchungen, die nach identischen bzw. leicht modifizierten experimentellen Konzepten erfolgten, erhalten (Chang *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005).

Eine mögliche Erklärung wäre, dass die durch RNAi erreichte Depletion des Proteins nur partiell ist. Die geringen Restmengen könnten für die Aufrechterhaltung der *in vivo*-Funktion ausreichend sein. Weiterhin ist denkbar, dass der Verlust von PARN durch andere Enzyme mit vergleichbarer Aktivität komplementiert wird. So sind die Untereinheiten des CCR4-NOT-Komplexes, dessen generelle Bedeutung für den Abbau von Poly(A) in *S. cerevisiae* und *D. melanogaster* demonstriert wurde, auch in Säugetieren konserviert (Dupressoir *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2001 & 2002; Temme *et al.*, 2003). Für humanes CCR4 konnte außerdem eine poly(A)-spezifische 3'-Exoribonukleaseaktivität *in vitro* und darüber hinaus eine Beteiligung am Abbau verschiedener mRNAs *in vivo* gezeigt werden (Chen *et al.*, 2002; Chang *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005).

Bei der Suche nach PARN-Homologen in entsprechenden Datenbanken wurde eine Aminosäuresequenz mit hoher Ähnlichkeit zu PARN (28%) identifiziert. Beide Proteine zeigen weiterhin große Übereinstimmungen in den Bereichen der Exo-Motive I-III. Die für die Katalyse essentiellen Aminosäuren sind ebenfalls konserviert. Eine Expression dieser

PARN-Variante konnte jedoch mittels RT-PCR, unter Verwendung verschiedener Primer, zumindest in HeLa-Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Auch in *C. elegans* bewirkt der *knockdown* der entsprechenden PARN-Homologen keine sichtbaren phänotypischen Effekte (Kamath *et al.*, 2003; Reverdatto *et al.*, 2004). Der *knockout* des Enzyms in *S. pombe* hat ebenfalls keine Konsequenzen auf das Zellwachstum oder wichtige physiologische Prozesse. In Analogie zu HeLa-Zellen wurden außerdem keine Veränderungen in der Poly(A)-Längenverteilung nachgewiesen (Reverdatto *et al.*, 2004). Letztlich deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass PARN nicht die dominierende Deadenylase in somatischen Zellen ist bzw. unter den verwendeten experimentellen Bedingungen keinen detektierbaren Einfluss auf die Stabilität verschiedener Transkripte hat.

In Pflanzen dagegen ist die katalytische Aktivität von PARN zumindest für die Embryogenese essentiell. In *A. thaliana* führt der *knockout* des Enzyms zu einer massiv verzögerten Embryonalentwicklung, was letztlich mit dem Absterben der Samen verbunden ist. Von den, in diesem Zusammenhang analysierten, embryospezifischen Transkripten konnte aber nur bei einem eine geringe Zunahme der *steady-state*-Poly(A)-Schwanzlänge nachgewiesen werden (Reverdatto *et al.*, 2004; Chiba *et al.*, 2004). Eine weitere Mutante, bei der die Expression des funktionellen Enzyms infolge eines *frame shifts* stark reduziert ist (eine geringe Menge von enzymatisch aktivem PARN wird dabei durch differentielles Spleißen gebildet) zeichnet sich durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber Abscisinsäure (ABA) aus (Nishimura *et al.*, 2005). ABA ist ein Pflanzenhormon, das diverse physiologische Prozesse, wie Keimung und Samenentwicklung, sowie die Anpassung an abiotischen Stress steuert bzw. kontrolliert (Merlot & Giraudat, 1997). Pflanzen mit dieser Mutation weisen eine vermehrte Expression stressinduzierter Gene auf. Sie sind außerdem durch eine Vielzahl von morphologischen Abnormalitäten und Abweichungen in verschiedenen Entwicklungsstadien gekennzeichnet. In diesem Zusammenhang wurde weiterhin demonstriert, dass abiotischer Stress (Salz oder osmotischer Stress) eine Steigerung der PARN-Expression in Wildtyppflanzen zur Konsequenz hat.

Die Beziehung zwischen den phänotypischen Effekten und der katalytischen Aktivität des Enzyms konnte zwar für beide Mutanten nicht abgeleitet werden. Die Ergebnisse deuten jedoch an, dass AtPARN in die durch ABA gesteuerten Entwicklungsprozesse bzw. Anpassungsmechanismen an verschiedene Formen von abiotischem Stress involviert sein könnte, wobei der regulatorische Einfluss über die Destabilisierung verschiedener mRNAs erfolgen würde (Nishimura *et al.*, 2005). Die Modulation der mRNA-Stabilität als ein Teil der

adaptiven Prozesse an unterschiedliche Stressbedingungen ist ein Mechanismus, der auch in Säugetierzellen vorkommt (Fan *et al.*, 2002).

#### 4.2.1 Beteiligung von PARN am NMD

An der selektiven und beschleunigten Degradation von mRNAs mit einem *in frame*-Stopkodon (*premature translation termination codon* (PTC)) sind Enzyme und Faktoren beteiligt, die auch die allgemeinen Wege des mRNA-Abbaus katalysieren. Über welchen genauen Mechanismus der Abbau in Säugetierzellen erfolgt und ob dabei die Deadenylierung in Analogie zur Degradation von normalen mRNAs als erster und geschwindigkeitsbestimmender Schritt von Bedeutung ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Einige Untersuchungen zeigen, dass der NMD im Zytoplasma hauptsächlich auf einer gesteigerten Rate der Deadenylierung beruht (Chen & Shyu, 2003; Yamashita *et al.*, 2005). Die vorzeitige Termination der Translation an einem PTC kann aber auch die verstärkte, von einer vorangehenden Deadenylierung weitestgehend unabhängige, Hydrolyse der *Cap*-Struktur auslösen (Couttet & Grange, 2004). Beide Untereinheiten des *decapping*-Komplexes (Dcp1, Dcp2) interagieren mit Upf1, wobei die Assoziation vornehmlich in Anwesenheit von Upf2 und Upf3 erfolgt (NMD-Komplex) (Lykke-Andersen, 2002). Die Reduktion der Proteinkonzentration von Dcp2 durch RNAi hemmt den NMD, was sich in der erhöhten *steady-state*-Menge einer mRNA mit PTC ausdrückt (Lejeune *et al.*, 2003).

In *S. cerevisiae* wird der überwiegende Teil der mRNAs mit PTC über den 5'-3'-Abbauweg degradiert. Die Hydrolyse der *Cap*-Struktur ist dabei, im Gegensatz zu normalen mRNAs, unabhängig von einer vorangehenden Deadenylierung (Muhlrads & Parker, 1994). In Säugetierzellen dagegen scheint der Zusammenhang zwischen *decapping* und exonukleolytischer Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes zumindest partiell auch für mRNAs mit PTC zu bestehen (Couttet & Grange, 2004; Yamashita *et al.*, 2005).

Hinweise für die Beteiligung des Exosoms am NMD in Säugetierzellen leiten sich u.a. vom *knockdown* der Exosom-Untereinheit PM/Sci100 ab, wobei die Reduktion der Proteinkonzentration mit der Stabilisierung eines NMD-Substrats verbunden ist (Lejeune *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae*, wo der NMD nur zu einem geringen Teil über den 3'-5'-Abbauweg erfolgt, geht der Aktivität des Exosoms eine beschleunigte Deadenylierung voraus (Mitchell & Tollervey, 2003).

Erste Anhaltspunkte, dass PARN in den NMD involviert ist, ergeben sich ebenfalls aus der Stabilisierung von transient exprimierten NMD-Substraten als Auswirkung der Depletion des Enzyms durch RNAi. Dieser Effekt ist aber, verglichen mit einem Dcp2- bzw. PM/Sci100-

*knockdown*, nicht so stark ausgeprägt (Lejeune *et al.*, 2003). Außerdem erfolgte kein Nachweis, ob die erhöhte *steady-state*-Menge der untersuchten NMD-Konstrukte durch eine verminderte Rate der Deadenylierung verursacht wird. Dahingehende ergänzende Untersuchungen wurden jedoch in dieser Arbeit nicht durchgeführt, da eine durch die Depletion von PARN bewirkte Stabilisierung von NMD-Substraten nicht bestätigt werden konnte. Obwohl die Proteinkonzentration unter Verwendung verschiedener siRNAs bis weit unter 10% der Ausgangsmenge reduziert war, hatte dies keine Auswirkungen auf die Stabilität der transient exprimierten  $\beta$ -Gl-NS39-mRNA. Die *steady-state*-Menge lag für alle RNAi-Ansätze von PARN sowie für die Negativkontrolle in annähernd identischen Bereichen und betrug, verglichen mit der entsprechenden *steady-state*-Menge des unveränderten Transkripts ( $\beta$ -Gl-wt), durchschnittlich 7%. Der *knockdown* von Upf1 dagegen hatte die Stabilisierung der  $\beta$ -Gl-NS39-mRNA zur Konsequenz. Die *steady-state*-Menge betrug im Verhältnis zu  $\beta$ -Gl-wt 40% und war damit im Vergleich zur Negativkontrolle um den Faktor 5 gesteigert.

Unabhängige Analysen, die auf identischen oder leicht modifizierten experimentellen Ansätzen basierten, konnten die Beteiligung von PARN am NMD ebenfalls nicht bestätigen (Yamashita *et al.*, 2005).

Nach dem Modell der *pioneer round of translation* erfolgt die Identifizierung des PTC bei der ersten bzw. vorläufigen Translation, wobei diese entweder unmittelbar nach dem Transport der entsprechenden mRNA bzw. des mRNP-Komplexes ins Zytoplasma oder in enger Assoziation mit dem Zellkern stattfindet. Terminiert dabei das Ribosom in einem Abstand von mehr als 50-55 Nukleotiden stromaufwärts einer Exon-Exon-Verknüpfung wird die Bildung des NMD-Komplex ausgelöst, was den Abbau der entsprechenden mRNA im Zytoplasma oder im Zellkern einleitet. Während dieser Prozesse ist die *Cap*-Struktur der mRNA mit dem *cap binding complex* (CBC), einem Dimer, das aus den Untereinheiten CBP20 und CBP80 besteht, assoziiert (Ishigaki *et al.*, 2001; Maquat, 2005). CBP20 interagiert direkt mit dem *Cap*. CBP80 bindet CBP20 und induziert einen Konformationswechsel, der die CBP20-*Cap*-Assoziation verstärkt (Mazza *et al.*, 2002). Die Aktivität von PARN wird *in vitro* durch CBP80 gehemmt. Der inhibierende Einfluss beruht dabei nicht auf einer verminderten Zugänglichkeit der *Cap*-Struktur, sondern ist auf die direkte Interaktion des C-Terminus von PARN mit CBP80 zurückzuführen (Balatsos *et al.*, 2005). Da PARN auch im Nukleus lokalisiert ist (siehe unten), könnte die Inaktivierung des Enzyms durch den CBC die Prä-mRNA bzw. die nukleär assoziierte reife mRNA vor einer

vorzeitigen Deadenylierung schützen. Darüber hinaus würde sie die Beteiligung von PARN am NMD ausschließen.

Die enge Assoziation zwischen Upf1 und Dcp1 bzw. Dcp2 weist darauf hin, dass der Abbau von NMD-Substraten im Zytoplasma in *processing bodies* (PBs) erfolgen könnte (siehe unten). Zwei weitere essentielle Faktoren des NMD in höheren Eukaryoten, SMG5 und SMG7, sind ebenfalls in PBs lokalisiert. Beide Proteine interagieren mit phosphoryliertem Upf1. Die Bindung (*tethering*) von SMG7 an ein Reportertranskript hat den beschleunigten Abbau der entsprechenden mRNA zur Folge und zwar unabhängig davon, ob diese ein PTC enthält (Unterholzner & Izaurralde, 2004). Die Deadenylierung des Transkripts könnte dabei durch den CCR4-NOT- bzw. PAN-Komplex katalysiert werden, denn beide sind vornehmlich im Zytoplasma lokalisiert, CCR4 akkumuliert darüber hinaus auch in PBs (Cougot *et al.*, 2004; Yamashita *et al.*, 2005).

#### 4.2.2 Die intrazelluläre Lokalisation von PARN

Der Abbau von mRNA erfolgt im Zytoplasma. Entsprechend sind die an den verschiedenen mRNA-Abbauwegen beteiligten Enzyme und Faktoren sowohl in *S. cerevisiae* als auch in Säugetierzellen überwiegend im Zytoplasma lokalisiert. Das Exosom kommt in beiden Zellkompartimenten vor und hat im Zellkern wesentlichen Anteil an der Prozessierung von rRNA, snRNA und snoRNA. Des Weiteren katalysiert es den 3'-exonukleolytischen Abbau von mRNA. Dabei ist die Aktivität des Exosoms vom Ski-Komplex, einem Heterotrimer (Ski2p, Ski3p, Ski8p), welches im Zytoplasma lokalisiert ist, abhängig (Anderson & Parker, 1998; Brown *et al.*, 2000). Enzyme und Faktoren, welche die verschiedenen Schritte des 5'-3'-Abbauweges von mRNA katalysieren bzw. in diese involviert sind, wie die 5'-Exonuklease Xrn1, der *decappig*-Komplex Dcp1/Dcp2 oder der LSM1-7-Komplex, sind ebenfalls im Zytoplasma lokalisiert und darüber hinaus in diskreten Strukturen (*foci*) angereichert. Diese zytoplasmatischen Kompartimente dienen weniger der Lagerung. Sie stellen vielmehr Zentren dar, in denen der mRNA-Abbau konzentriert erfolgt (*Processing Bodies* (PBs)) (Ingelfinger *et al.*, 2002; Sheth & Parker, 2003; Cougot *et al.*, 2004).

Der Abbau der mRNA wird generell durch die exonukleolytische Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes eingeleitet. Die Untereinheiten des PAN-Komplexes sowie CCR4, die katalytische Untereinheit des CCR4-NOT-Komplexes, sind im Zytoplasma lokalisiert. In Säugetierzellen akkumuliert Ccr4 in PBs, was über Kolokalisationsanalysen mit Dcp1 nachgewiesen werden konnte (Cougot *et al.*, 2004). In den Ovarien von *D. melanogaster* wurde Ccr4 sowie Caf1, eine weitere Untereinheit des CCR4-NOT-Komplexes, auch im Zytoplasma detektiert, wobei

beide Proteine in diskreten *foci* angereichert vorliegen. In *S. cerevisiae* dagegen ist Ccr4p eher gleichförmig im Zytoplasma verteilt (Sheth & Parker, 2003; Temme *et al.*, 2004; Uchida *et al.*, 2004).

Wenn PARN in die Prozesse des mRNA-Abbaus *in vivo* involviert ist, dann wäre eine überwiegend zytoplasmatische Lokalisation zu erwarten. In Immunfluoreszenzanalysen wurde PARN dagegen hauptsächlich in den Nukleoli detektiert. Der Anteil sowohl im Zytoplasma als auch im Nukleus war dagegen gering. Mit einer GFP- und HA-Fusion von PARN, deren Expression transient in HeLa-Zellen erfolgte, konnten die Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden. Beide Fusionen akkumulierten vornehmlich in den Nukleoli und waren darüber hinaus auch im Nukleus eindeutig nachweisbar. Die Abundanz des entsprechenden Fusionsproteins im Nukleus hing dabei von dessen Expressionslevel ab, wobei hohe Konzentrationen allgemein zu einer Zunahme des nukleären Anteils führten. Die Anreicherung von PARN in den Nukleoli sowie die verhältnismäßig geringe Menge des Enzyms im Zytoplasma sind weitere Anhaltspunkte, dass der Anteil von PARN am mRNA-Abbau *in vivo*, zumindest unter den verwendeten experimentellen Bedingungen, von untergeordneter Bedeutung ist.

#### 4.2.3 Hat PARN eine katalytische Funktion im Nukleus?

Aufgrund der überwiegend nukleären Lokalisation von PARN sowie der Akkumulation in den Nukleoli kann vermutet werden, dass sich die katalytische Funktion und damit auch das Substrat des Enzyms auf dieses Kompartiment beschränkt.

Eine generelle Deadenylierung von nukleärer mRNA oder Prä-mRNA ist vermutlich auszuschließen, da die Depletion von PARN keine detektierbaren Auswirkungen auf die *steady-state*-Poly(A)-Längenverteilung im Nukleus hatte. Die maximale Poly(A)-Schwanzlänge der kernlokalisierten GAPDH-mRNA wurde durch den *knockdown* von PARN ebenfalls nicht beeinflusst.

Wesentliche strukturelle Kriterien für ein Substrat von PARN sind ein am 3'-Ende gelegener Poly(A)-Strang sowie die *Cap*-Struktur am 5'-Ende der RNA. Einige ausschließlich nukleär lokalisierte RNA-Spezies werden durch die RNA-Polymerase II synthetisiert und enthalten demzufolge ein *Cap*. Dazu gehört z.B. die snoRNA U3. Die meisten snRNAs, mit Ausnahme von U6, deren Synthese durch Pol III erfolgt und die eine  $\gamma$ -monomethyl-*Cap*-Struktur enthält, werden ebenfalls durch Pol II gebildet (Will & Lührmann, 2001). Diese nicht kodierenden RNAs unterliegen allgemein einem Reifeprozess, der sowohl endo- als auch exonukleolytische Schritte umfasst. Die Freisetzung der 3'-Enden der entsprechenden

Vorläufertranskripte erfolgt dabei u.a. durch Faktoren, die auch an der 3'-Prozessierung von mRNAs beteiligt sind, wobei aber die endonukleolytische Spaltung von der sich anschließenden Polyadenylierung entkoppelt ist (Fatica *et al.*, 2000; Morlando *et al.*, 2002). Bei snRNAs erfolgt die exonukleolytische Prozessierung der Vorläufer im Zytoplasma. Dem geht die Umwandlung des  $m^7Cap$  in ein  $m^3Cap$  (2, 2, 7-tri-methyl-Guanosin) unmittelbar voraus. Die reife, mit Sm-Proteinen assoziierte snRNA (snRNP Sm Core) wird anschließend in den Zellkern zurücktransportiert, wo es zur Assemblierung des entsprechenden vollständigen snRNP kommt (Will & Lührmann, 2001).

Im Nukleolus findet die Reifung der rRNAs statt. Das polycistronische Transkript, welches die 18S, 5,8S sowie die 28S rRNA enthält, wird dabei durch Pol I synthetisiert. Endonukleolytische Spaltungen der Prä-rRNA setzen die entsprechenden rRNAs als Vorläufer frei, deren weitere exonukleolytische Prozessierung sowohl vom 3'-Ende als auch vom 5'-Ende erfolgt. Die Erzeugung der reifen 3'- bzw. 5'-Enden und die Synthese durch Pol I schließt die Anfügung einer Cap-Struktur sowie eine Polyadenylierung in Analogie zu den Mechanismen der Prä-mRNA-Prozessierung für alle rRNAs aus.

In Rrp6p-Mutanten von *S. cerevisiae* wurden dennoch verschiedene rRNA- und auch snRNA- sowie snoRNA-Spezies mit kurzen Poly(A)-Schwänzen nachgewiesen (Allmang *et al.*, 1999; van Hoof *et al.*, 2000; Kuai *et al.*, 2004; Fang *et al.*, 2004). Diese sind auf die Aktivität der kernlokalisierten Poly(A)-Polymerasen Trf4p bzw. Trf5p zurückzuführen. Trf4p bildet zusammen mit Mtr4p sowie dem Zink-Finger-Protein Air2p einen Komplex (TRAMP-Komplex). Die putative ATP-abhängige RNA-Helikase Mtr4p ist genauso wie Rrp6p mit dem Exosom im Zellkern assoziiert und hat dabei u.a. Anteil an der Prozessierung der 5,8S rRNA (Allmang *et al.*, 1999; de la Cruz *et al.*, 1998). Alternativ zu Air2p kann Air1p, ebenfalls ein Zink-Finger-Protein, im TRAMP-Komplex enthalten sein. Beide Proteine sind zu 48% identisch und vermitteln die Substratbindung der Polymerase. Diese enthält, im Gegensatz zur Pap1p, kein RNA-Bindemotiv. Trf5p, das zu 57% mit Trf4p identisch und ebenfalls mit Mtr4p und Air1p assoziiert ist, bildet einen alternativen TRAMP-Komplex, der zumindest partiell eine funktionelle Redundanz aufweist (LaCava *et al.*, 2005; Vanacova *et al.*, 2005; Houseley & Tollervey, 2006). Der TRAMP-Komplex in Verbindung mit dem Exosom ist u.a. für die selektive Degradation von fehlerhaften tRNA-Spezies sowie für den Abbau von intergenischen Transkripten, die sich eventuell von zufälligen promotorähnlichen Sequenzen ableiten, von Bedeutung (Kadaba *et al.*, 2004; Wyers *et al.*, 2005). Die kurzen Poly(A)-Schwänze markieren dabei vermutlich die RNA für den Abbau. Es wäre denkbar, dass sie als unstrukturierte Ansatzpunkte für das Exosom fungieren und somit dessen Aktivität fördern.

Eine weitere Stimulierung des Exosoms könnte durch Mtr4p erfolgen, das z.B. Sekundärstrukturen in tRNAs auflöst oder gebundene Proteine entfernt (Anderson, 2005). Dieser postulierte Reaktionsmechanismus konnte zumindest in Ansätzen *in vitro* bestätigt werden (LaCava *et al.*, 2005; Vanacova *et al.*, 2005). Was die polyadenylierten rRNA-, snoRNA bzw. snRNA-Spezies repräsentieren; ob es sich dabei um normale Prozessierungsintermediate mit sehr geringer Halbwertszeit oder um fehlerhafte, für den Abbau selektierte Transkripte handelt, ist nicht klar. Ihr Anteil an der Gesamtmenge der entsprechenden RNA-Spezies ist sehr gering. Außerdem hat der *knockout* der verschiedenen TRAMP-Komponenten keinen Einfluss auf die Abundanz der reifen Transkripte (Wyers *et al.*, 2005; LaCava *et al.*, 2005).

Trf4p bzw. Trf5p typisieren innerhalb der strukturell, sowie funktionell sehr heterogenen Gruppe von Nukleotidyltransferasen, die aufgrund ihrer Aminosäuresequenzhomologien zur eukaryotischen DNA-Polymerase  $\beta$  als *Pol- $\beta$ -like nucleotidyltransferase superfamily* bezeichnet wird, eine eigenständige Familie (*Trf-family*). Zur *Trf-family* gehören eine Reihe von stark konservierten Aminosäuresequenzen, die auch von höheren Eukaryoten einschließlich *H. sapiens* stammen und die eine hohe Ähnlichkeit mit konventionellen eukaryotischen Poly(A)-Polymerasen aufweisen (Aravind & Koonin, 1999). Charakteristisch ist u.a. die am N-Terminus lokalisierte katalytische Domäne mit drei hoch konservierten Aspartaten. Eine RNA-Bindedomäne ist im Gegensatz zu konventionellen Poly(A)-Polymerasen nicht vorhanden. Die Existenz eines Proteinkomplexes in Analogie zum TRAMP-Komplexes von *S. cerevisiae* ist daher auch in Säugetierzellen denkbar. Dabei könnte PARN für den *turnover* der verschiedenen polyadenylierten RNA-Spezies von Bedeutung sein.

In ersten Untersuchungen wurde daher überprüft, ob der *knockdown* von PARN durch RNAi mit Auswirkungen auf verschiedene snoRNAs, snRNAs oder rRNAs verbunden ist, wobei die Analyse sich überwiegend auf allgemeine quantitative Unterschiede sowie auf das Auftreten von polyadenylierten Spezies oder 3'-verlängerten Prozessierungsintermediaten beschränkte. Jedoch konnten für keines der untersuchten RNA-Spezies ein solcher Effekt deutlich nachgewiesen werden, auch wenn die Konzentration von PARN erheblich reduziert war.

Die Detektion der RNAs erfolgte mittels *Northern blot*, wobei für die verschiedenen snRNAs Gesamt-RNA, für die snoRNA U3 zusätzlich noch Kern-RNA verwendet wurde. In *S. cerevisiae* weisen die polyadenylierten Spezies eine sehr niedrige Abundanz auf (siehe oben). Es ist daher möglich, dass die eingesetzten Mengen an Gesamt- bzw. Kern-RNA nicht ausreichend waren, um die modifizierten RNAs bzw. die entsprechenden Intermediate zu

detektieren. Durch die Verwendung von nukleärer Poly(A)<sup>+</sup>-RNA könnte deren verhältnismäßiger Anteil jedoch signifikant erhöht werden. Poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde dagegen für die Nachweise von polyadenylierten Spezies der 5,8S und 28S rRNA eingesetzt. Entsprechend modifizierte rRNAs konnten jedoch nicht eindeutig identifiziert werden.

### 4.3 Ausblick

Mit den verwendeten experimentellen Konzepten konnte die *in vivo*-Funktion von PARN in somatischen Zellen nicht nachgewiesen werden. Mit unterschiedlichen siRNAs wurde generell ein sehr effizienter *knockdown* erreicht. Die ermittelte Depletion von weniger als 10% der Ausgangsmenge repräsentiert dabei nur einen Durchschnittswert. Ein Großteil der Zellen enthielt demnach vermutlich eine noch niedrigere PARN-Konzentration. Es ist nicht zu erwarten, dass die *in vivo*-Funktion mit diesen geringen Enzymmengen vollständig aufrechterhalten wird. Aufgrund der überwiegend nukleären Lokalisation von PARN sowie der Akkumulation in den Nukleoli kann mit hoher Wahrscheinlichkeit außerdem eine funktionelle Redundanz mit anderen Deadenylasen ausgeschlossen werden. Wesentliche enzymatische Eigenschaften, wie die Poly(A)-Spezifität und die *Cap*-Abhängigkeit, bringen PARN direkt mit dem mRNA-Abbau in Verbindung. Außerdem katalysiert das Enzym die Deadenylierung von mRNA in *Xenopus*-Oozyten, ohne das dabei ein eingeschränktes Substratspektrum vorliegt. Es besteht daher die Möglichkeit, dass die enzymatische Aktivität von PARN in somatischen Zellen einer stringenten Kontrolle unterliegt und das eine Beteiligung am mRNA-Abbau nur unter bestimmten Bedingungen erfolgt. Ein erster Anhaltspunkt, der diese Vermutung stützt, ist eine gesteigerte PARN-Expression in *A. thaliana*, welche durch verschiedene Formen von abiotischen Stress ausgelöst wird (siehe oben). Die adaptiven Prozesse an Stress korrelieren allgemein mit einer komplexen Änderung im Gen-Expressionsmuster, wobei die Modulation der mRNA-Stabilität in diesem Zusammenhang ebenfalls bedeutsam ist. Ein starkes Indiz, dass PARN in diese regulatorischen Mechanismen involviert ist, basiert auf der Beobachtung, dass ein Hitzeschock innerhalb nur weniger Minuten zur nahezu vollständigen Translokation des Enzyms von den Nukleoli ins Zytoplasma führt (pers. Mitteilung J. Tavernez). Es ist daher interessant zu sehen, ob mit den verwendeten experimentellen Strategien unter verschiedenen Stressbedingungen (Hitzeschock, osmotischer Stress usw.) die erwarteten phänotypischen Effekte zu beobachten sind.

## 5 Zusammenfassung

PARN ist eine poly(A)-spezifische 3'-Exoribonuklease. Durch verschiedene Punkt- und Deletionsmutanten konnten im Rahmen dieser Arbeit wesentliche Erkenntnisse über strukturelle Voraussetzungen und Bedingungen für die von PARN katalysierte Reaktion gewonnen werden. Grundlage waren dabei die Kristallstrukturen einer C-terminal verkürzten Version des Enzyms (PARNn) in substratfreier bzw. substratgebundener Oligo(A)<sub>10</sub> Form.

PARNn ist ein Homodimer. Eine Untereinheit besteht jeweils aus Nuklease-Domäne und R3H-Domäne. Die Dimerisierung wird durch starke hydrophobe Kontakte zwischen den Nuklease-Domänen vermittelt. Die Bindung von Poly(A) erfolgt in einer Vertiefung der Nuklease-Domänen, die das aktive Zentrum enthält und negativ geladen ist. Die Substratbindestellen liegen im Dimer auf entgegengesetzten Seiten und werden von den R3H-Domänen der entsprechend gegenüberliegenden Untereinheit überdeckt.

Das aktive Zentrum von PARN wird durch die vier hoch konservierten Aminosäuren D28, D292, D382 und E30 gebildet. Diese binden zwei divalente Kationen, welche für die Katalyse essentiell sind. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der konservierte, im Exo-Motiv III lokalisierte, Histidinrest 377 ebenfalls für die enzymatische Katalyse von Bedeutung ist.

Die Bindung von Poly(A) erfolgt zu einem großen Anteil über hydrophobe bzw. van der Waals-Wechselwirkungen. Dass diese nicht nur für eine stabile Interaktion zwischen Substrat und Enzym sondern darüber hinaus für die Katalyse von Bedeutung sind, indem sie vermutlich die Positionierung und Orientierung des Substrates im aktiven Zentrum gewährleisten, wurde in dieser Arbeit anhand der entsprechenden Punktmutanten gezeigt.

Dass die R3H-Domäne an der Stabilisierung des Enzym-Substrat-Komplexes beteiligt ist, konnte durch verschiedene Deletionsmutanten demonstriert werden. Da die Assoziation der R3H-Domänen mit den Substratbindestellen wechselseitig erfolgt, fungiert das Dimer als strukturelle Einheit für die enzymatische Katalyse.

Für die Beeinträchtigung der Dimerbildung wurden F123 und F127 als wesentliche Bestandteile der hydrophoben Strukturen, welche den Kontakt zwischen den Nuklease-Domänen vermitteln, durch Alanine ersetzt. Die Mutation F127A hatte zumindest in vollständigem PARN keine Auswirkungen auf die enzymatische Aktivität. Die Mutante F123A konnte nicht in nativer Form aufgereinigt werden.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der *in vivo*-Funktion von PARN in somatischen Zellen. Die Poly(A)-Spezifität sowie die *Cap*-Abhängigkeit weisen allgemein auf eine Beteiligung an der Deadenylierung und folglich am mRNA-Abbau hin. Ausgangspunkt aller in dieser Arbeit durchgeführten experimentellen Ansätze war die Depletion von PARN in HeLa-Zellen durch RNAi. Mit verschiedenen siRNAs konnte die Proteinkonzentration dabei bis unter 10% der Ausgangsmenge reduziert werden.

Trotz des sehr effizienten PARN-*knockdowns*, wurden weder Änderungen in der *steady-state*-Poly(A)-Längenverteilung im Kern bzw. Zytoplasma nachgewiesen, noch war mit der stark reduzierten Proteinkonzentration eine sichtbare Verringerung der Deadenylierungsraten bzw. eine signifikante Zunahme der Halbwertszeiten verschiedener mRNAs verbunden. Neben der endogenen Interleukin 8-mRNA wurden dabei transient exprimierte RNA-Konstrukte mit AREs im 3'-UTR analysiert. Im Gegensatz zu publizierten Daten, konnte die Stabilisierung einer mRNA mit *in frame*-Stopkodon als Folge einer PARN-Depletion nicht beobachtet und damit die Beteiligung des Enzyms am *Nonsense-Mediated mRNA-Decay* (NMD) nicht bestätigt werden.

Die sich aus den Analysen zur *in vivo*-Funktion ableitende Feststellung, dass PARN unter normalen Wachstumsbedingungen für den mRNA-Abbau in somatischen Zellen von untergeordneter Bedeutung ist, wird durch die intrazelluläre Lokalisation zusätzlich gestützt. Mittels Immunfluoreszenzanalysen konnte gezeigt werden, dass PARN in den Nukleoli akkumuliert. Der Anteil des Enzyms im Nukleus bzw. Zytoplasma ist dagegen gering. Mit transient exprimierten HA- und GFP-Fusionen konnten die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden.

Die nukleäre Lokalisation sowie die Anreicherung von PARN in den Nukleoli lassen vermuten, dass sich die Aktivität des Enzyms und damit auch das Substrat auf dieses Kompartiment beschränkt. Ein weiterer Hinweis sind polyadenylierte snRNA-, snoRNA- und rRNA-Spezies, die in *S. cerevisiae* identifiziert wurden. Die kurzen Poly(A)-Schwänze sind im Zusammenhang mit dem Exosom für die Qualitätskontrolle von Bedeutung.

Ausgehend von der Möglichkeit, dass in Säugetierzellen analoge Mechanismen existieren, wurde in dieser Arbeit analysiert, ob ein PARN-*knockdown* mit qualitativen bzw. quantitativen Auswirkungen auf verschiedene rRNAs, snoRNAs und snRNAs verbunden ist.

## 6 Literaturverzeichnis

- Albert, T. K., Lemaire, M., van Berkum, N. L., Gentz, R., Collart, M. A., Timmers, H. T. (2000) Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucleic Acids Res.*, **28** (3):809-17.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., Tollervey, D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *EMBO J.*, **18** (19):5399-410.
- Amrani, N., Ganesan, R., Kervestin, S., Mangus, D. A., Ghosh, S., Jacobson, A. (2004) A faux 3'-UTR promotes aberrant termination and triggers nonsense-mediated mRNA decay. *Nature*, **432** (7013):112-8.
- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., Lamond, A. I. (2002) Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr Biol.*, **12** (1):1-11.
- Anderson, J. S., Parker, R. P. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.*, **17** (5):1497-506.
- Anderson, J. T. (2005) RNA turnover: unexpected consequences of being tailed. *Curr Biol.*, **15** (16):R635-8.
- Aravind, L., Koonin, E. V. (1999) DNA polymerase beta-like nucleotidyltransferase superfamily: identification of three new families, classification and evolutionary history. *Nucleic Acids Res.*, **27** (7):1609-18.
- Ausubel, S. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Baggs, J. E., Green, C. B. (2003) Nocturnin, a deadenylase in *Xenopus laevis* retina: a mechanism for posttranscriptional control of circadian-related mRNA. *Curr Biol.*, **13** (3):189-98.
- Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y. C., Collart, M. A., Liu, H. Y., Denis, C. L. (1999) The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Mol Cell Biol.*, **19** (10):6642-51.
- Balatsos, N. A., Nilsson, P., Mazza, C., Cusack, S., Virtanen, A. (2005) Inhibition of mRNA deadenylation by the nuclear cap binding complex (CBC). *J Biol Chem.*, **281** (7):4517-22.
- Barreau, C., Paillard, L., Osborne, H. B. (2006) AU-rich elements and associated factors: are there unifying principles? *Nucleic Acids Res.*, **33** (22):7138-50.
- Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, **116** (2):281-97.
- Beese, L. S., Steitz, T. A. (1991) Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J.*, **10** (1):25-33.
- Bevilacqua, A., Ceriani, M. C., Capaccioli, S., Nicolini, A. (2003) Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol.*, **195** (3):356-72.

- Birnboim, H. H., Doly, J. (1976) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513-1523.
- Boeck, R., Tarun, S. Jr., Rieger, M., Dearnorff, J. A., Muller-Auer, S., Sachs, A. B. (1996) The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J Biol Chem.*, **271** (1):432-8.
- Bollig, F., Winzen, R., Kracht, M., Ghebremedhin, B., Ritter, B., Wilhelm, A., Resch, K., Holtmann, H. (2002) Evidence for general stabilization of mRNAs in response to UV light. *Eur J Biochem.*, **269** (23):5830-9.
- Bowman, L. H., Rabin, B., Schlessinger, D. (1981) Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acid Res.*, **9**, 4951-66
- Borovjagin, A. V., Gerbi, S. A. (2004) *Xenopus* U3 snoRNA docks on pre-rRNA through a novel base-pairing interaction. *RNA*, **10** (6):942-53.
- Breyer, W. A., Matthews, B. W. (2000) Structure of *Escherichia coli* exonuclease I suggests how processivity is achieved. *Nat Struct Biol.*, **7** (12):1125-8.
- Brown, C. E., Tarun, S. Z. Jr., Boeck, R., Sachs, A. B. (1996) PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.*, **16** (10):5744-53.
- Brown, C. E., Sachs, A. B. (1998) Poly(A) tail length control in *Saccharomyces cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol Cell Biol.*, **18** (11):6548-59.
- Brown, J. T., Bai, X., Johnson, A. W. (2000) The yeast antiviral proteins Ski2p, Ski3p, and Ski8p exist as a complex in vivo. *RNA*, **6** (3):449-57.
- Burge, C. B., Tuschl, T., Sharp, P. A. (1999) Splicing of precursors to mRNA by the spliceosomes. In *The RNA World*, R. F. Gesteland, T. R. Cech, J. F. Atkins, eds. (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 525-560
- Butler, J. S. (2002) The yin and yang of the exosome. *Trends Cell Biol.*, **12** (2):90-6.
- Cai, X., Hagedorn, C. H., Cullen, B. R. (2004) Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, **10** (12):1957-66.
- Chang, T. C., Yamashita, A., Chen, C. Y., Yamashita, Y., Zhu, W., Durdan, S., Kahvejian, A., Sonenberg, N., Shyu, A. B. (2004) UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev.*, **18** (16):2010-23.
- Caponigro, G., Parker, R. (1995) Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes Dev.*, **9** (19):2421-32.
- Carballo, E., Lai, W. S., Blackshear, P. J. (2000) Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood*, **95** (6):1891-9.
- Carballo, E., Cao, H., Lai, W. S., Kennington, E. A., Campbell, D., Blackshear, P. J. (2001) Decreased sensitivity of tristetraprolin-deficient cells to p38 inhibitors suggests the involvement of tristetraprolin in the p38 signaling pathway. *J Biol Chem.*, **276** (45):42580-7.

- Chen, C. Y., Shyu, A. B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem Sci.*, **20** (11):465-70.
- Chen, C. Y., Gherzi, R., Ong, S. E., Chan, E. L., Rajmakers, R., Pruijn, G. J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., Karin, M. (2001) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, **107** (4):451-64.
- Chen, C. Y., Shyu, A. B. (2003) Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. *Mol Cell Biol.*, **23** (14):4805-13.
- Chen, J., Chiang, Y. C., Denis, C. L. (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J.*, **21** (6):1414-26.
- Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, Y. C., Russell, P., Mann, M., Denis, C. L. (2001) Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT complex identifies two novel components of the complex. *J Mol Biol.*, **314** (4):683-94.
- Chiba, Y., Johnson, M. A., Lidder, P., Vogel, J. T., van Erp, H., Green, P. J. (2004) AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in Arabidopsis. *Gene*, **328**:95-102.
- Clark, L. B., Viswanathan, P., Quigley, G., Chiang, Y. C., McMahon, J. S., Yao, G., Chen, J., Nelsbach, A., Denis, C. L. (2004) Systematic mutagenesis of the leucine-rich repeat (LRR) domain of CCR4 reveals specific sites for binding to CAF1 and a separate critical role for the LRR in CCR4 deadenylase activity. *J Biol Chem.*, **279** (14):13616-23.
- Collart, M. A. (2003) Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene*, **313**:1-16.
- Conti, E., Izaurralde, E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay: molecular insights and mechanistic variations across species. *Curr Opin Cell Biol.*, **17** (3):316-25.
- Copeland, P. R., Wormington, M. (2001) The mechanism and regulation of deadenylation: identification and characterization of *Xenopus* PARN. *RNA*, **7** (6):875-86.
- Cougot, N., Babajko, S., Seraphin, B. (2004) Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol.*, **165** (1):31-40.
- Couttet, P., Fromont-Racine, M., Steel, D., Pictet, R., Grange, T. (1997) Messenger RNA deadenylation precedes decapping in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **94** (11):5628-33.
- Couttet, P., Grange, T. (2004) Premature termination codons enhance mRNA decapping in human cells. *Nucleic Acids Res.*, **32** (2):488-94.
- Cramer, P., Srebrow, A., Kadener, S., Werbajh, S., de la Mata, M., Melen, G., Nogues, G., Kornblihtt, A. R. (2001) Coordination between transcription and pre-mRNA processing. *FEBS Lett.*, **498** (2-3):179-82.
- Czaplinski, K., Ruiz-Echevarria, M. J., Paushkin, S. V., Han, X., Weng, Y., Perlick, H. A., Dietz, H. C., Ter-Avanesyan, M. D., Peltz, S. W. (1998) The surveillance complex interacts with the translation release factors to enhance termination and degrade aberrant mRNAs. *Genes Dev.*, **12** (11):1665-77.

- Dantoni, J. C., Murthy, K. G., Manley, J. L., Tora, L. (1997) Transcription factor TFIID recruits factor CPSF for formation of 3' end of mRNA. *Nature*, **389** (6649):399-402.
- Daugeron, M. C., Mauxion, F., Seraphin, B. (2001) The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucleic Acids Res.*, **29** (12):2448-55.
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C. G., Wahle, E. (2000) Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.*, **19** (5):1079-86.
- Dehlin, E. (2004) Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät, Cap-dependence of the poly(A)-specific ribonuclease PARN.
- de la Cruz, J., Kressler, D., Tollervey, D., Linder, P. (1998) Dob1p (Mtr4p) is a putative ATP-dependent RNA helicase required for the 3' end formation of 5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **17** (4):1128-40.
- de Moor, C. H., Meijer, H., Lissenden, S. (2005) Mechanisms of translational control by the 3' UTR in development and differentiation. *Semin Cell Dev Biol.*, **16** (1):49-58.
- Denis, C. L., Chen, J. (2003) The CCR4-NOT complex plays diverse roles in mRNA metabolism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol.*, **73**:221-50.
- Derbyshire, V., Grindley, N. D., Joyce, C. M. (1991) The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction. *EMBO J.*, **10** (1):17-24.
- Dupressoir, A., Morel, A. P., Barbot, W., Loireau, M. P., Corbo, L., Heidmann, T. (2001) Identification of four families of yCCR4- and Mg<sup>2+</sup>-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics*, **2** (1):9.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., Tuschl, T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, **411** (6836):494-8.
- Erkman, J. A., Kutay, U. (2004) Nuclear export of mRNA: from the site of transcription to the cytoplasm. *Exp Cell Res.*, **296** (1):12-20.
- Fan, J., Yang, X., Wang, W., Wood, W. H. 3rd, Becker, K. G., Gorospe, M. (2002) Global analysis of stress-regulated mRNA turnover by using cDNA arrays. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99** (16):10611-6.
- Fan, X. C., Myer, V. E., Steitz, J. A. (1997) AU-rich elements target small nuclear RNAs as well as mRNAs for rapid degradation. *Genes Dev.*, **11** (19):2557-68.
- Fang, F., Hoskins, J., Butler, J. S. (2004) 5-fluorouracil enhances exosome-dependent accumulation of polyadenylated rRNAs. *Mol Cell Biol.*, **24** (24):10766-76.
- Fatica, A., Morlando, M., Bozzoni, I. (2000) Yeast snoRNA accumulation relies on a cleavage-dependent/polyadenylation-independent 3'-processing apparatus. *EMBO J.*, **19** (22):6218-29.
- Fatica, A., Tollervey, D. (2002) Making ribosomes. *Curr Opin Cell Biol.*, **14** (3):313-8.

- Filipowicz, W., Pogacic, V. (2002) Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.*, **14** (3):319-27.
- Fox, C. A., Wickens, M. (1990) Poly(A) removal during oocyte maturation: a default reaction selectively prevented by specific sequences in the 3' UTR of certain maternal mRNAs. *Genes Dev.*, **4** (12B):2287-98.
- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerrierio, A. L., Parker, R., Dietz, H. C. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*, **295** (5563):2258-61.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C., Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, **313**:17-42.
- Gao, M., Fritz, D. T., Ford, L. P., Wilusz, J. (2000) Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol Cell.*, **5** (3):479-88.
- Gatfield, D., Izaurralde, E. (2004) Nonsense-mediated messenger RNA decay is initiated by endonucleolytic cleavage in *Drosophila*. *Nature*, **429** (6991):575-8.
- GEY, G. O., COFFMAN, W. D., KUBICEK, M. T. (1952) Tissue culture studies of the proliferation capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Research.*, **12**:264-265.
- Gherzi, R., Lee, K. Y., Briata, P., Wegmuller, D., Moroni, C., Karin, M., Chen, C. Y. (2004) A KH domain RNA binding protein, KSRP, promotes ARE-directed mRNA turnover by recruiting the degradation machinery. *Mol Cell.*, **14** (5):571-83.
- Gonzalez, C. I., Ruiz-Echevarria, M. J., Vasudevan, S., Henry, M. F., Peltz, S. W. (2000) The yeast hnRNP-like protein Hrp1/Nab4 marks a transcript for nonsense-mediated mRNA decay. *Mol Cell.*, **5** (3):489-99.
- Gossen, M., Bujard, H. (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89** (12):5547-51.
- Gowrishankar, G., Winzen, R., Bollig, F., Ghebremedhin, B., Redich, N., Ritter, B., Resch, K., Kracht, M., Holtmann, H. (2005) Inhibition of mRNA deadenylation and degradation by ultraviolet light. *Biol Chem.*, **386** (12):1287-93.
- Green, C. B., Besharse, J. C. (1996) Identification of a novel vertebrate circadian clock-regulated gene encoding the protein nocturnin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93** (25):14884-8.
- Grishin, N. V. (1998) The R3H motif: a domain that binds single-stranded nucleic acids. *Trends Biochem Sci.*, **23** (9):329-30.
- Hadjiolova, K. V., Nicoloso, M., Mazan, S., Hadjiolov, A. A., Bachellerie, J. P. (1993) Alternative pre-rRNA processing pathways in human cells and their alteration by cycloheximide inhibition of protein synthesis. *Eur J Biochem.*, **212** (1):211-5.
- Hamdan, S., Carr, P. D., Brown, S. E., Ollis, D. L., Dixon, N. E. (2002) Structural basis for proofreading during replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Structure*, **10** (4):535-46.

- He, F., Li, X., Spatrick, P., Casillo, R., Dong, S., Jacobson, A. (2003) Genome-wide analysis of mRNAs regulated by the nonsense-mediated and 5' to 3' mRNA decay pathways in yeast. *Mol Cell.*, **12** (6):1439-52.
- 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. *Mol Cell.*, **3** (3):405-11.
- Houseley, J., Tollervey, D. (2006) Yeast Trf5p is a nuclear poly(A) polymerase. *EMBO Rep.*, **7** (2):205-11.
- Huh, W. K., Falvo, J. V., Gerke, L. C., Carroll, A. S., Howson, R. W., Weissman, J. S., O'Shea, E. K. (2003) Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, **425** (6959):686-91.
- Ingelfinger, D., Arndt-Jovin, D. J., Luhrmann, R., Achsel, T. (2002) The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrn1 in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, **8** (12):1489-501.
- Ishigaki, Y., Li, X., Serin, G., Maquat, L. E. (2001) Evidence for a pioneer round of mRNA translation: mRNAs subject to nonsense-mediated decay in mammalian cells are bound by CBP80 and CBP20. *Cell*, **106** (5):607-17.
- Jacobson, M. R., Rhoadhouse, M., Pederson, T. (1993) U2 small nuclear RNA 3' end formation is directed by a critical internal structure distinct from the processing site. *Mol Cell Biol.*, **13** (2):1119-29.
- Kadaba, S., Krueger, A., Trice, T., Krecic, A. M., Hinnebusch, A. G., Anderson, J. (2004) Nuclear surveillance and degradation of hypomodified initiator tRNA<sup>Met</sup> in *S. cerevisiae*. *Genes Dev.*, **18** (11):1227-40.
- Kamath, R. S., Ahringer, J. (2003) Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods.*, **30** (4):313-21.
- Kedersha, N. L., Gupta, M., Li, W., Miller, I., Anderson, P. (1999) RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 alpha to the assembly of mammalian stress granules. *J Cell Biol.*, **147** (7):1431-42.
- Kerwitz, Y., Kuhn, 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 J.*, **22** (14):3705-14.
- Kim, V. N., Kataoka, N., Dreyfuss, G. (2001) Role of the nonsense-mediated decay factor hUpf3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science*, **293** (5536):1832-6.
- Kiss, T. (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*, **109** (2):145-8.
- Komarnitsky, P., Cho, E. J., Buratowski, S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.*, **14** (19):2452-60.
- Körner, C. G., Wahle, E. (1997) Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J Biol Chem.*, **272** (16):10448-56.

- Körner, C. G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E., Wahle, E. (1998) The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.*, **17** (18):5427-37.
- Kuai, L., Fang, F., Butler, J. S., Sherman, F. (2004) Polyadenylation of rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101** (23):8581-6.
- Kühn, U., Wahle, E. (2004) Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochim Biophys Acta.*, **1678** (2-3):67-84.
- LaCava, J., Houseley, J., Saveanu, C., Petfalski, E., Thompson, E., Jacquier, A., Tollervey, D. (2005) RNA degradation by the exosome is promoted by a nuclear polyadenylation complex. *Cell*, **121** (5):713-24.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680-685
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., Tuschl, T. (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, **294** (5543):853-8.
- Lai, W. S., Blackshear, P. J. (2001) Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail. *J Biol Chem.*, **276** (25):23144-54.
- Lai, W. S., Kennington, E. A., Blackshear, P. J. (2003) Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease. *Mol Cell Biol.*, **23** (11):3798-812.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., Gorospe, M. (2004) Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs. *EMBO J.*, **23** (15):3092-102. Epub 2004 Jul 15.
- Legagneux, V., Omilli, F., Osborne, H. B. (1995) Substrate-specific regulation of RNA deadenylation in *Xenopus* embryo and activated egg extracts. *RNA*, **1** (10):1001-8.
- Le Hir, H., Izaurralde, E., Maquat, L. E., Moore, M. J. (2000) The spliceosome deposits multiple proteins 20-24 nucleotides upstream of mRNA exon-exon junctions. *EMBO J.*, **19** (24):6860-9.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E., Moore, M. J. (2001) The exon-exon junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and nonsense-mediated mRNA decay. *EMBO J.*, **20** (17):4987-97.
- Lejeune, F., Li, X., Maquat, L. E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in mammalian cells involves decapping, deadenylating, and exonucleolytic activities. *Mol Cell.*, **12** (3):675-87.
- Lestrade, L., Weber, M. J. (2006) snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res.*, **34** (Database issue):D158-62.
- Linker, K., Pautz, A., Fechir, M., Hubrich, T., Greeve, J., Kleinert, H. (2005) Involvement of KSRP in the post-transcriptional regulation of human iNOS expression-complex interplay of KSRP with TTP and HuR. *Nucleic Acids Res.*, **33** (15):4813-27.
- Liepinsh, E., Leonchiks, A., Sharipo, A., Guignard, L., Otting, G. (2003) Solution structure of the R3H domain from human Smubp-2. *J Mol Biol.*, **326** (1):217-23.

- Liu, H. Y., Badarinarayana, V., Audino, D. C., Rappsilber, J., Mann, M., Denis, C. L. (1998) The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *EMBO J.*, **17** (4):1096-106.
- Lowell, J. E., Rudner, D. Z., Sachs, A. B. (1992) 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev.*, **6** (11):2088-99.
- Lykke-Andersen, J. (2002) Identification of a human decapping complex associated with hUpf proteins in nonsense-mediated decay. *Mol Cell Biol.*, **22** (23):8114-21.
- Lykke-Andersen, J., Shu, M. D., Steitz, J. A. (2000) Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*, **103** (7):1121-31.
- Lykke-Andersen, J., Wagner, E. (2005) Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.*, **19** (3):351-61.
- Maquat, L. E. (2005) Nonsense-mediated mRNA decay in mammals. *J Cell Sci.*, **118** (Pt 9):1773-6.
- Mangus, D. A., Evans, M. C., Jacobson, A. (2003) Poly(A)-binding proteins: multifunctional scaffolds for the post-transcriptional control of gene expression. *Genome Biol.*, **4** (7):223.
- Martinez, J., Ren, Y. G., Thuresson, A. C., Hellman, U., Virtanen, J. A., Virtanen, A. (2000) A 54-kDa Fragment of the Poly(A)-specific Ribonuclease Is an Oligomeric, Processive, and Cap-interacting Poly(A)-specific 3' Exonuclease. *J Biol Chem.*, **275** (31):24222-30
- Martinez, J., Ren, Y. G., Nilsson, P., Ehrenberg, M., Virtanen, A. (2001) The mRNA cap structure stimulates rate of poly(A) removal and amplifies processivity of degradation. *J Biol Chem.*, **276** (30):27923-9.
- Mattick, J. S., Makunin, I. V. (2005) Small regulatory RNAs in mammals. *Hum Mol Genet.*, **14** Spec No 1:R121-32.
- Mazza, C., Segref, A., Mattaj, I. W., Cusack, S. (2002) Large-scale induced fit recognition of an m(7)GpppG cap analogue by the human nuclear cap-binding complex. *EMBO J.*, **21** (20):5548-57.
- Mendell, J. T., Sharifi, N. A., Meyers, J. L., Martinez-Murillo, F., Dietz, H. C. (2004) Nonsense surveillance regulates expression of diverse classes of mammalian transcripts and mutes genomic noise. *Nat Genet.*, **36** (10):1073-8.
- Merlot, S., Giraudat, J. (1997) Genetic analysis of abscisic acid signal transduction. *Plant Physiol.*, **114** (3):751-7.
- Meyer, S., Temme, C., Wahle, E. (2004) Messenger RNA turnover in eukaryotes: pathways and enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol.*, **39** (4):197-216.
- Mignone, F., Gissi, C., Liuni, S., Pesole, G. (2002) Untranslated regions of mRNAs. *Genome Biol.*, **3** (3)
- Mitchell, P., Tollervey, D. (2003) An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'→5' degradation. *Mol Cell.*, **11** (5):1405-13.

- Morlando, M., Greco, P., Dichtl, B., Fatica, A., Keller, W., Bozzoni, I. (2002) Functional analysis of yeast snoRNA and snRNA 3'-end formation mediated by uncoupling of cleavage and polyadenylation. *Mol Cell Biol.*, **22** (5):1379-89.
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J. P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C. S., Wilusz, J. (2002) The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.*, **21** (1-2):165-74.
- Muhlrad, D., Parker, R. (1994) Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature*, **370** (6490):578-81.
- Nagy, E., Maquat, L. E. (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem Sci.*, **23** (6):198-9.
- Neu-Yilik, G., Gehring, N. H., Thermann, R., Frede, U., Hentze, M. W., Kulozik, A. E. (2001) Splicing and 3' end formation in the definition of nonsense-mediated decay-competent human beta-globin mRNPs. *EMBO J.*, **20** (3):532-40.
- Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K., Hirayama, T. (2005) Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in Arabidopsis. *Plant J.*, **44** (6):972-84.
- Paillard, L., Omilli, F., Legagneux, V., Bassez, T., Maniey, D., Osborne, H. B. (1998) EDEN and EDEN-BP, a cis element and an associated factor that mediate sequence-specific mRNA deadenylation in *Xenopus* embryos. *EMBO J.*, **17** (1):278-87.
- Parker, R., Song, H. (2004) The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol.*, **11** (2):121-7.
- Paillard, L., Osborne, H. B. (2003) East of EDEN was a poly(A) tail. *Biol Cell.*, **95** (3-4):211-9.
- Patton, J. G., Wieben, E. D. (1987) U1 precursors: variant 3' flanking sequences are transcribed in human cells. *J Cell Biol.*, **104** (2):175-82.
- Proudfoot, N. J., Furger, A., Dye, M. J. (2002) Integrating mRNA Processing with Transcription. *Cell*, **108**, 501-512
- Ren, Y. G., Martinez, J., Virtanen, A. (2002) Identification of the active site of poly(A)-specific ribonuclease by site-directed mutagenesis and Fe<sup>2+</sup>-mediated cleavage. *J Biol Chem.*, **277** (8):5982-7. Epub 2001 Dec 12.
- Ren, Y. G., Kirsebom, L. A., Virtanen, A. (2004) Coordination of divalent metal ions in the active site of poly(A)-specific ribonuclease. *J Biol Chem.*, **279** (47):48702-6.
- Reverdatto, S. V., Dutko, J. A., Chekanova, J. A., Hamilton, D. A., Belostotsky, D. A. (2004) mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA*, **10** (8):1200-14.
- Richter J.D. (1996) Dynamics of poly(A) addition and removal during development. In Hershey, J., Sonenberg, N. and Mathews, M. (eds), *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 481–503.
- Ross, J. (1995) mRNA stability in mammalian cells. *Microbiol. Rev.*, **59**, 423–450.

- Sachs, A. B., Deardorff, J. A. (1992) Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell*, **70** (6):961-73.
- Salles, F. J. and Strickland, S. (1999) Analysis of Poly(A) tail lengths by PCR: The PAT-assay. *Methods in Molecular Biology*, **118**, 441-448
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, **74**, 5463-5467
- SCHERER, W. F., SYVERTON, J. T., GEY, G. O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.*, **97** (5):695-710.
- Scherl, A., Coute, Y., Deon, C., Calle, A., Kindbeiter, K., Sanchez, J. C., Greco, A., Hochstrasser, D., Diaz, J. J. (2002) Functional proteomic analysis of human nucleolus. *Mol Biol Cell.*, **13** (11):4100-9.
- Seal, R., Temperley, R., Wilusz, J., Lightowlers, R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2005) Serum-deprivation stimulates cap-binding by PARN at the expense of eIF4E, consistent with the observed decrease in mRNA stability. *Nucleic Acids Res.*, **33** (1):376-87.
- Shatkin, A. J., Manley, J. L. (2000) The ends of the affair: capping and polyadenylation. *Nat Struct Biol.*, **7** (10):838-42.
- Sheth, U., Parker, R. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, **300** (5620):805-8.
- Shyu, A. B., Belasco, J. G., Greenberg, M. E. (1991) Two distinct destabilizing elements in the c-fos message trigger deadenylation as a first step in rapid mRNA decay. *Genes Dev.*, **5** (2):221-31.
- Sommer, P., Nehrbass, U. (2005) Quality control of messenger ribonucleoprotein particles in the nucleus and at the pore. *Curr Opin Cell Biol.*, **17** (3):294-301.
- Sonenberg, N., Dever, T. E. (2003) Eukaryotic translation initiation factors and regulators. *Curr Opin Struct Biol.*, **13** (1):56-63.
- Southern, E. M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol.*, **98** (3):503-17.
- Steitz, T. A., Steitz, J. A. (1993) A general two-metal-ion mechanism for catalytic RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90** (14):6498-502.
- Stoecklin, G., Stoeckle, P., Lu, M., Muehlemann, O., Moroni, C. (2001) Cellular mutants define a common mRNA degradation pathway targeting cytokine AU-rich elements. *RNA*, **7** (11):1578-88.
- Stutz, F., Izaurralde, E. (2003) The interplay of nuclear mRNP assembly, mRNA surveillance and export. *Trends Cell Biol.*, **13** (6):319-27.

- Temme, C., Zaessinger, S., Meyer, S., Simonelig, M., Wahle, E. (2004) A complex containing the CCR4 and CAF1 proteins is involved in mRNA deadenylation in *Drosophila*. *EMBO J.*, **23** (14):2862-71.
- Thermann, R., Neu-Yilik, G., Deters, A., Frede, U., Wehr, K., Hagemeier, C., Hentze, M. W., Kulozik, A. E. (1998) Binary specification of nonsense codons by splicing and cytoplasmic translation. *EMBO J.*, **17** (12):3484-94.
- Thore, S., Mauxion, F., Seraphin, B., Suck, D. (2003) X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *EMBO Rep.*, **4** (12):1150-5.
- Tran, H., Schilling, M., Wirbelauer, C., Hess, D., Nagamine, Y. (2004) Facilitation of mRNA deadenylation and decay by the exosome-bound, DExH protein RHAU. *Mol Cell.*, **13** (1):101-11.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M. A., Staples, R. R., Chen, J., Denis, C. L., Parker, R. (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, **104** (3):377-86.
- Tucker, M., Staples, R. R., Valencia-Sanchez, M. A., Muhlrud, D., Parker, R. (2002) Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, **21** (6):1427-36.
- Uchida, N., Hoshino, S., Imataka, H., Sonenberg, N., Katada, T. (2002) A novel role of the mammalian GSPT/eRF3 associating with poly(A)-binding protein in Cap/Poly(A)-dependent translation. *J Biol Chem.*, **277** (52):50286-92.
- Uchida, N., Hoshino, S., Katada, T. (2004) Identification of a human cytoplasmic poly(A) nuclease complex stimulated by poly(A)-binding protein. *J Biol Chem.*, **279** (2):1383-91.
- Unterholzner, L., Izaurralde, E. (2004) SMG7 acts as a molecular link between mRNA surveillance and mRNA decay. *Mol Cell.*, **16** (4):587-96.
- Vanacova, S., Wolf, J., Martin, G., Blank, D., Dettwiler, S., Friedlein, A., Langen, H., Keith, G., Keller, W. (2005) A new yeast poly(A) polymerase complex involved in RNA quality control. *PLoS Biol.*, **3** (6):e189.
- van Hoof, A., Lennertz, P., Parker, R. (2000) Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol Cell Biol.*, **20** (2):441-52.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P. A., Dietz, H. C., Parker, R. (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, **295** (5563):2262-4.
- Varnum, S. M., Hurney, C. A., Wormington, W. M. (1992) Maturation-specific deadenylation in *Xenopus* oocytes requires nuclear and cytoplasmic factors. *Dev Biol.*, **153** (2):283-90.
- Vasudevan, S., Peltz, S. W. (2003) Nuclear mRNA surveillance. *Curr Opin Cell Biol.*, **15** (3):332-7.
- Viswanathan, P., Chen, J., Chiang, Y. C., Denis, C. L. (2003) Identification of multiple RNA features that influence CCR4 deadenylation activity. *J Biol Chem.*, **278** (17):14949-55.
- Vitali, P., Royo, H., Seitz, H., Bachellerie, J. P., Huttenhofer, A., Cavaille, J. (2003) Identification of 13 novel human modification guide RNAs. *Nucleic Acids Res.*, **31** (22):6543-51.

- von der Haar, T., Gross, J. D., Wagner, G., McCarthy, J. E. (2004) The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. *Nat Struct Mol Biol.*, **11** (6):503-11.
- Wahle, E., Ruesegger, U. (1999) 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev.*, **23** (3):277-95.
- Wang, Z., Kiledjian, M. (2001) Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell*, **107** (6):751-62.
- Watkins, N. J., Lemm, I., Ingelfinger, D., Schneider, C., Hossbach, M., Urlaub, H., Luhrmann, R. (2004) Assembly and maturation of the U3 snoRNP in the nucleoplasm in a large dynamic multiprotein complex. *Mol Cell.*, **16** (5):789-98.
- Will, C. L., Luhrmann, R. (2001) Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr Opin Cell Biol.*, **13** (3):290-301.
- Winzen, R., Kracht, M., Ritter, B., Wilhelm, A., Chen, C. Y., Shyu, A. B., Muller, M., Gaestel, M., Resch, K., Holtmann, H. (1999) The p38 MAP kinase pathway signals for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *EMBO J.*, **18** (18):4969-80.
- Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., Song, H. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.*, **24** (23):4082-93.
- Wyers, F., Rougemaille, M., Badis, G., Rousselle, J. C., Dufour, M. E., Boulay, J., Regnault, B., Devaux, F., Namane, A., Seraphin, B., Libri, D., Jacquier, A. (2005) Cryptic pol II transcripts are degraded by a nuclear quality control pathway involving a new poly(A) polymerase. *Cell*, **121** (5):725-37.
- Xu, N., Chen, C. Y., Shyu, A. B. (1997) Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol Cell Biol.*, **17** (8):4611-21.
- Xu, N., Loflin, P., Chen, C. Y., Shyu, A. B. (1998) A broader role for AU-rich element-mediated mRNA turnover revealed by a new transcriptional pulse strategy. *Nucleic Acids Res.*, **26** (2):558-65.
- Xu, N., Chen, C. Y., Shyu, A. B. (2001) Versatile role for hnRNP D isoforms in the differential regulation of cytoplasmic mRNA turnover. *Mol Cell Biol.*, **21** (20):6960-71.
- Yamashita, A., Chang, T. C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C. Y., Shyu, A. B. (2005) Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol.*, **12** (12):1054-63.
- Zuo, Y., Deutscher, M. P. (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.*, **29** (5):1017-26.

## 7 Anhang

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström
Abb.	Abbildung
Abs <sub>280nm</sub>	Absorption bei 280 nm
ARE	<i>AU-rich element</i>
as	<i>antisense</i>
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
ca.	zirka
Cap	G(5')ppp(5')N-Struktur
Ci	Curie (3,7x10 <sup>10</sup> Bequerel)
cpm	<i>counts per minute</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ds	doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraacetat
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GSH	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
HA	Hämagglutinin
h	<i>human</i> oder Stunde
HEPES	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-thigalactosid
KAc	Kaliumacetat
kDa	kilo-Dalton
LB	Luria Bertani
max.	maximal
MgAc	Magnesiumacetat
mind.	mindestens
min	Minute(n)
miRNA	micro RNA
mS	milli-Siemens
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
Ni-NTA	Nickel-nitrilo-tri-acetic-acid
NMD	<i>Nonsense-Mediated mRNA-Decay</i>
NP40	Nonidet P40
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pers.	persönlich
PFA	Paraformaldehyd
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase

Pol	RNA-Polymerase
PTC	<i>premature translation termination codon</i>
RNAi	RNA-Interferenz
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription
s	<i>sense</i>
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
S2-Zellen	Schneider2-Zellen
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Sacharomyces cerevisiae</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
snoRNA	<i>small nucleolar RNA</i>
ss	<i>single strand</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
u.a.	unter anderem
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Masse/Volumen
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

## 7.2 Lebenslauf

**Name:** Michael Reuter  
**geboren am:** 24.12.1975  
**in:** Halle/Saale  
**Familienstand:** ledig  
**Staatsangehörigkeit:** deutsch

### Schulausbildung

06/1994 Abitur am Adolf-Reichwein-Gymnasium Halle/Saale  
07/1994 bis 06/1995 Grundwehrdienst in Bad Frankenhausen und Dietersdorf

### Studium

10/1995 bis 9/1997 Grundstudium Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
10/1997 Vordiplom in Biologie  
10/1997 bis 9/1999 Hauptstudium Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Schwerpunkte: Mikrobiologie, Biochemie, Genetik, Immunologie, Organische Chemie  
11/1999 bis 12/2000 Diplomarbeit: „Funktion von Thiolen und Zink in den Untereinheiten des Proteins C der Glycin-Reduktase von *Eubacterium acidaminophilum*“  
12/2000 Hochschulabschluss, Diplom-Biologe

### Berufstätigkeit

2/2001 bis 4/2001 wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe „Allgemeine Mikrobiologie“ von Herrn Prof. Dr. J. R. Andreasen  
8/2001-6/2006 Doktorarbeit an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe „Allgemeine Biochemie, Prozessierung und Abbau von mRNA in Eukaryoten“ von Herrn Prof. Dr. E. Wahle

Halle/Saale, den

Michael Reuter

### 7.3 Publikationen

Kohlstock, U. M., Rucknagel, K. P., Reuter, M., Schierhorn, A., Andreesen, J. R., Sohling, B. (2001) Cys359 of GrdD is the active-site thiol that catalyses the final step of acetyl phosphate formation by glycine reductase from *Eubacterium acidaminophilum*. *Eur J Biochem.*, **268** (24):6417-25

Wu, M., Reuter, M., Lilie, H., Liu, Y., Wahle, E., Song, H. (2005) Structural insight into poly(A) binding and catalytic mechanism of human PARN. *EMBO J.*, **24** (23):4082-93.

## **7.4 Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Quellen angefertigt habe. Aus anderen Untersuchungen bzw. Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommene Stellen, sind durch Quellenangaben sowie die entsprechenden Verweise gekennzeichnet.

Weiterhin versichere ich, dass die Arbeit an keiner anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Halle/Saale, den

Michael Reuter

## 7.5 Danksagung

In erster Linie möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Elmar Wahle für die engagierte wissenschaftliche Betreuung sowie das stete Interesse am Fortgang der Arbeit bedanken. Unter anderem geht die Kooperation mit der Arbeitsgruppe von H. Song, die letztlich zu den wichtigen Ergebnissen führte, auf seine Initiative zurück.

Bei Herrn Prof. Albrecht Bindereif bedanke ich für die Übernahme der Begutachtung dieser Arbeit.

Weiterhin gilt mein Dank Joao Tavernez, der den überwiegende Anteil an den Untersuchungen zur intrazellulären Lokalisation von PARN hat.

Bei Prof. Helmut Holtmann, Prof. Andreas Kulozik und Prof. Reinhard Lührmann bedanke ich mich für die Möglichkeit in ihren Arbeitsgruppen zu arbeiten. Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppen, besonders bei Reinhard Winzen, Niels Gehring und Tilman Achsel bedanke ich mich für die freundlichen Aufnahme und Unterstützung, die dafür gesorgt haben, dass aus einem kurzen ein kurzweiliger, effektiver Aufenthalt wurde.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Allgemeine Biochemie, Prozessierung und Abbau von mRNA in Eukaryoten“ danke ich herzlich für die gute Zusammenarbeit, besonders aber den momentanen bzw. früheren „Lebendinventar“ des Labors 412, Claudia Temme, Bodo Moritz, Clemens Bönisch, Isabell Nahrman, Eva Dehlin und Ulla Niesbach-Klösger, für die angenehme Atmosphäre, die fachlichen und weniger fachlichen Debatten und die Hilfsbereitschaft.

Im Besonderen gilt der Dank meiner Familie, meinen Eltern, Großeltern und meinem Bruder, die mich in jeder Form und zu jeder Zeit mit allen Mitteln unterstützt, motiviert und Anteil an meiner Arbeit genommen haben.