

Die Stimulierung der Polyadenylierung durch das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1

Dissertationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Naturwissenschaften

- Dr. rer. nat.-

der Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg

von

Yvonne Kerwitz

geboren am 12.10.1972

in Nordhausen

vorgelegt

urn:nbn:de:gbv:3-000004079

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000004079>]

1. Gutachter: Prof. Dr. E. Wahle
2. Gutachter: PD Dr. E. Schwarz
3. Gutachter: Prof. Dr. W. Keller

Halle, den 02. Oktober 2002

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Die Prozessierung von prä-mRNA	1
1.2.	Prozessierung des 3'-Endes der prä-mRNA	3
1.2.1.	Die endonukleolytische Spaltung	5
1.2.2.	Die Polyadenylierungsreaktion	7
1.2.3.	Das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPN1)	8
1.2.4.	Die Längenkontrolle des Poly(A)-Schwanzes	11
1.2.5.	Protein-Protein-Wechselwirkungen	12
1.2.6.	Die Rolle der Polyadenylierung	13
1.3.	Das cytosolische Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPC1)	13
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	14
2.	MATERIALIEN UND METHODEN	15
2.1.	Material	15
2.1.1.	Bakterienstämme	15
2.1.2.	Medien und Platten	15
2.1.3.	Enzyme, Proteine, Peptide und Systeme	16
2.1.4.	Nukleinsäuren und Nukleotide	17
2.1.4.1.	Oligonukleotide	17
2.1.4.2.	Nukleinsäuren und Nukleotide	19
2.1.5.	Plasmide	19
2.1.6.	Säulen und Säulenmaterialien	20
2.1.7.	Feinchemikalien	20
2.1.8.	Sonstiges	20
2.2.	Allgemeine mikrobiologische Methoden	21
2.2.1.	Sterilisation	21
2.2.2.	Herstellung elektrokompenter Zellen	21

2.2.3.	Transformation	22
2.3.	Nukleinsäuretechniken	22
2.3.1.	Allgemeine Techniken	22
2.3.2.	Gelelektrophorese	23
2.3.2.1.	Agarose-Gelelektrophorese	23
2.3.2.2.	Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	23
2.3.3.	Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)	23
2.3.4.	Sequenzierung	24
2.3.5.	Klonierung von PABPN1-PABPC1 Chimären	25
2.3.5.1.	Klonierung von H12	25
2.3.5.2.	Klonierung von H4C und HR4	25
2.3.6.	Herstellung von PABPN1-Punktmutanten	27
2.4.	Herstellung radioaktiver RNA-Substrate	29
2.4.1.	Radioaktive 5' Markierung von Nukleinsäuren	29
2.4.2.	In vitro-Transkription	29
2.4.3.	Präparation von L3pre-A ₂₅₀₋₃₀₀	30
2.4.4.	DEAE-Methode zur Quantifizierung radioaktiver Markierungen	31
2.5.	Proteinmethoden	31
2.5.1.	Expression von Proteinen in <i>E. coli</i>	31
2.5.2.	Zellernte und -aufschluss	32
2.5.3.	Reinigung rekombinanter Proteine	33
2.5.4.	Proteinbestimmung	34
2.5.5.	SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung	34
2.5.6.	<i>Western-Blot</i> -Analyse	34
2.6.	Bestimmung der RNA-Bindung	35
2.6.1.	Nitrocellulose-Filterbindungsassays	35
2.6.2.	Quantifizierung der Polyadenylierung	36
2.6.2.1.	Bestimmung von k_M und V_{max}	36
2.6.2.2.	Bestimmung der Anzahl von PABPN1, welche mit der PAP interagieren	37
2.6.3.	Gelretardationsexperimente	37
2.7.	Polyadenylierungsexperimente	38

2.7.1.	Verlängerung von A ₈₀	38
2.7.2.	Prozessive Polyadenylierung von L3pre-A ₁₅	38
2.7.3.	Polyadenylierung von L3pre-A ₂₅₀	39
3.	ERGEBNISSE	40
3.1.	Der Einfluss von PABPN1 auf K_M und v_{max} der Poly(A)-Polymerase	40
3.2.	Der Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Stimulierung der Polyadenylierung	42
3.2.1.	Klonierung und Überexpression der Punktmutanten	43
3.2.2.	Die RNA-Bindung der Punktmutanten in der RNP-Domäne	44
3.2.3.	Ist die RNA-Bindung von PABPN1 Voraussetzung für die Stimulation der Polyadenylierung?	45
3.3.	Die Mutante DN113	47
3.3.1.	Die Überexpression von ΔN113	48
3.3.2.	Die RNA-Bindung von ΔN113	50
3.3.3.	Die Aminosäuren 114-160 von PABPN1 sind nötig für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase	51
3.4.	Chimäre Proteine	53
3.4.1.	Herstellung der chimären Proteine	53
3.4.2.	Die RNA-Bindung der chimären Proteine	56
3.4.3.	Die Helikale Domäne ist nicht ausreichend für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase	57
3.4.4.	Die chimären Proteine in der prozessiven Polyadenylierung	60
3.5.	Die Punktmutanten in der Helikalen Domäne von PABPN1	61
3.5.1.	Die RNA-Bindung der Punktmutanten	62
3.5.2.	Die Aminosäure Leucin 136 ist essentiell für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase	63
3.5.3.	L136S ist ein kompetitiver Inhibitor für PABPN1	65
3.5.4.	Nur ein PABPN1 auf dem Poly(A)-Schwanz interagiert mit der Poly(A)-Polymerase	66
3.6.	Die Polyadenylierung von vollständig verlängerter RNA	67

3.6.1.	Charakterisierung des Polyadenylierungskomplexes auf L3pre-A ₂₅₀	68
3.6.2.	Die Mutante L136S unterbindet den CPSF-Effekt bei der Polyadenylierung von langem Poly(A)	70
3.6.3.	Wie viele Moleküle L136S sind nötig, um die CPSF-abhängige Stimulierung der Poly(A)-Polymerase auf langem Poly(A) zu unterbinden?	72
4.	DISKUSSION	74
4.1.	PABPN1 erhöht die Affinität der Poly(A)-Polymerase für Poly(A)	74
4.2.	Für die Stimulierung der Polyadenylierung ist die RNA-Bindung von PABPN1 nötig	76
4.3.	Die Helikale Domäne von PABPN1 ist notwendig aber nicht ausreichend für die Stimulierung der Polyadenylierung	77
4.3.1.	Ist die Helikale Domäne eine <i>coiled-coil</i> -Domäne?	78
4.3.2.	RNA-Bindung und Kooperativität	79
4.3.3.	Die Stimulation der Polyadenylierung durch Δ N113 und die chimären Proteine	80
4.4.	Der Einfluss von Punktmutationen auf die Stimulierung der Polyadenylierung	83
4.5.	Leucin 136 ist bedeutsam für die Stimulation der Polyadenylierung	84
4.6.	Nur ein Molekül PABPN1 interagiert mit der Poly(A)-Polymerase	85
4.7.	Die Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze	85
4.8.	Ein Modell der Längenkontrolle	87
5.	ZUSAMMENFASSUNG	89
6.	LITERATURVERZEICHNIS	91
7.	ANHANG	103
7.1.	Verwendete Proteine	103
7.2.	Ein- und Drei-Buchstabensymbole für Aminosäuren	104

7.3.	Aminosäuresequenzen der chimären Proteine	104
7.4.	Danksagung	105
7.5.	Abkürzungsverzeichnis	106
7.6.	Lebenslauf	108

1. Einleitung

1.1. Die Prozessierung von prä-mRNA

Die Transkription eukaryotischer DNA wird durch die RNA-Polymerase II im Zellkern durchgeführt. Als Produkt entsteht prä-mRNA, welche einer Reihe von Modifikationen unterworfen werden muss, bevor sie als reife mRNA ins Cytoplasma transportiert und dort translatiert werden kann.

Die drei wesentlichen Prozessierungsschritte der prä-mRNA sind die Addition eines 5'-Cap, die Prozessierung des 3'-Endes der RNA und das Spleissen. Eine Übersicht über die Prozessierungsschritte gibt Abbildung 1.1.

prä-mRNA

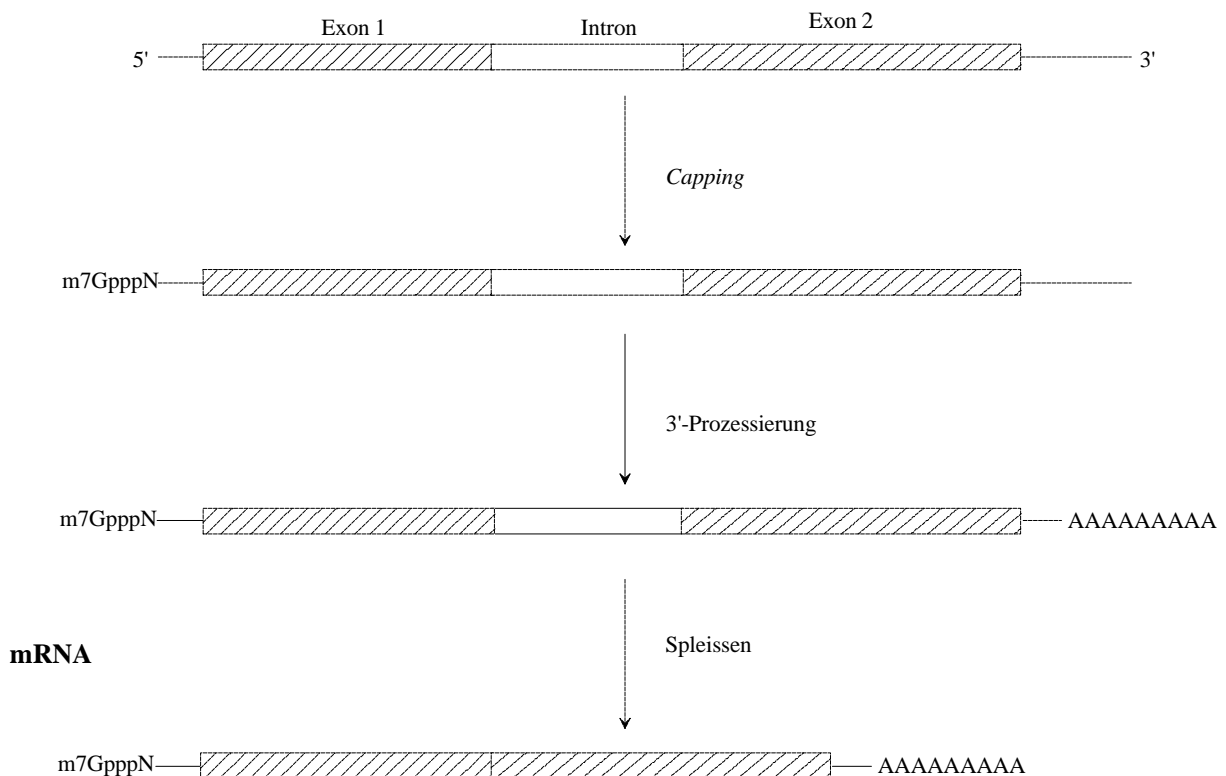


Abbildung 1.1: Prozessierung von prä-mRNA zur reifen mRNA

Das 5'-Ende der prä-mRNA erhält noch während der Transkription ein m⁷GpppN-Cap, das 3'-Ende der transkribierten RNA wird endonukleolytisch gespalten und polyadenyliert. Die Introns werden mittels Spleissen entfernt.

Capping der RNA

Ein 7-Methylguanosin-Cap (m^7GpppN) wird schon während der Transkription an das 5'-Ende der prä-mRNA angehängt (Shatkin, 1976; Coppola *et al.*, 1983; Jove & Manley, 1984). Eine RNA-Triphosphatase entfernt den γ -Phosphat-Rest des ersten Nukleotids der RNA, gefolgt vom Transfer eines GMP ($5'-5'$) zum resultierenden Diphosphat-Ende der RNA. In Position 7 wird das Guanosin methyliert. Das entstandene m^7GpppN -Cap hat eine entscheidende Funktion in der Initiation der Translation durch die Bindung des eukaryotischen Translations-Initiationsfaktors 4E (eIF4E; Sonenberg, 1988; Strudwick & Borden, 2002). Ebenso spielt das 5'-Cap eine Rolle beim Spleissen (Konarska *et al.*, 1984; Edery & Sonenberg, 1985) und dem Export der mRNA aus dem Kern ins Cytoplasma (Hamm & Mattaj, 1990). Allgemein ist eine mit m^7GpppN -Cap versehene RNA stabiler als eine RNA ohne Cap (Wang & Kiledjian, 2001).

Spleissen der mRNA

Der Großteil aller transkribierten mRNA enthält neben den Exons nichtcodierende Bereiche innerhalb der offenen Leseraster von Genen (Introns), welche vor der Translation der mRNA durch einen Zwei-Schritt-Prozess entfernt werden müssen.

Durch Umesterung wird die 5'-Spleissstelle geöffnet. Im zweiten Schritt wird die 3'-Spleissstelle geöffnet, die beiden Exons werden miteinander verbunden und das Intron in Form der Lasso-Struktur wird frei (Bougueleret & Claverie, 1985; Zhang & Doudna, 2002)

Die Spleissreaktionen werden durch das Spleissosom katalysiert (Grabowski *et al.*, 1985; Rio, 1992; Scott, 1998). Es besteht u.a. aus einer Anzahl von *small nuclear ribonucleoprotein*-Komplexen (snRNPs), welche sich aus RNA-Komponenten (U1-, U2-, U4-, U5-, U6-snRNA), je einem Satz aus acht kleinen Proteinen (*Core*- oder *Sm*-Proteine) und weiteren spezifischen Proteinen (wie z.B. U1A) zusammensetzen.

3' Prozessierung

Ein wichtiger Schritt in der Reifung von mRNA ist die Prozessierung des 3'-Endes, die Polyadenylierung. Die prä-mRNA wird endonukleolytisch gespalten, gefolgt von der Addition von Adenylatresten an das 3'-Ende der mRNA (siehe 1.2).

1.2. Prozessierung des 3'-Endes der prä-mRNA

Alle prä-mRNAs werden in zwei Reaktionsschritten 3'-prozessiert. Eine Ausnahme bilden nur mRNAs, welche für replikationsabhängige Histone codieren (Adesnik *et al.*, 1972). Diese Histone-mRNAs enthalten kein AAUAAA-Signal (siehe 1.2.1). Für die Herstellung der korrekten 3'-Enden dieser mRNAs ist ein Mechanismus verantwortlich, für den die Bindung eines snRNP-Partikels (U7-snRNP) vonnöten ist (Müller & Schümperli, 1997; Dominski *et al.*, 1999).

Der erste Reaktionsschritt der 3'-Prozessierung in allen anderen mRNAs der Eukaryoten ist eine endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA. Das 3'-Spaltprodukt wird degradiert. An das 5'-Spaltprodukt der mRNA wird der Poly(A)-Schwanz addiert. Da die zwei Reaktionsschritte *in vivo* sehr eng gekoppelt sind, können keine Zwischenprodukte detektiert werden. Einige der an den Reaktionen beteiligten Proteine (Poly(A)-Polymerase und CPSF, siehe 1.2.1) sind sowohl in die Spaltungs- als auch die Polyadenylierungsreaktion involviert (Wahle & Kühn, 1997; Barabino & Keller, 1999). Die Prozessierung des 3'-Endes der mRNA wird im Gegensatz zum Spleissen nur von Proteinen, nicht jedoch durch RNA katalysiert.

Da die Transkription, das *Capping*, die Polyadenylierung, das Spleissen und als letzter Schritt der Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Plasma miteinander verzahnt sind, spricht man auch von einer „mRNA-Fabrik“ (McCracken *et al.*, 1997; Reviews in Barabino & Keller, 1999; Bentley, 1999). So rekrutiert z.B. der Transkriptionsfaktor TFIID den *cleavage and polyadenylation specificity*-Faktor (CPSF), welcher eine wichtige Rolle in der 3'-Prozessierung spielt und verbindet damit die Transkription mit der Polyadenylierung (Dantonel *et al.*, 1997). Hirose & Manley (1998, 2000) konnten zeigen, dass die RNA-Polymerase II die 3'-Prozessierung stimuliert (siehe auch Bentley, 1999).

Die endonukleolytische Spaltung und die Polyadenylierung sind *in vivo* eng gekoppelt, können jedoch *in vitro* getrennt voneinander untersucht werden (Wahle & Rügsegger, 1999; Barabino & Keller, 1999). Durch die Zugabe von geringen Mengen EDTA oder ATP-Analoga, welche eine weitere Kettenverlängerung verhindern, ist es möglich, die Polyadenylierung zu blockieren, so dass sich das 5'-Spaltprodukt akkumuliert. Die Polyadenylierung von vorgespaltener RNA kann ebenso als isolierter Prozess beobachtet werden. Eine Übersicht über die einzelnen Schritte der 3'-Prozessierung gibt Abbildung 1.2.

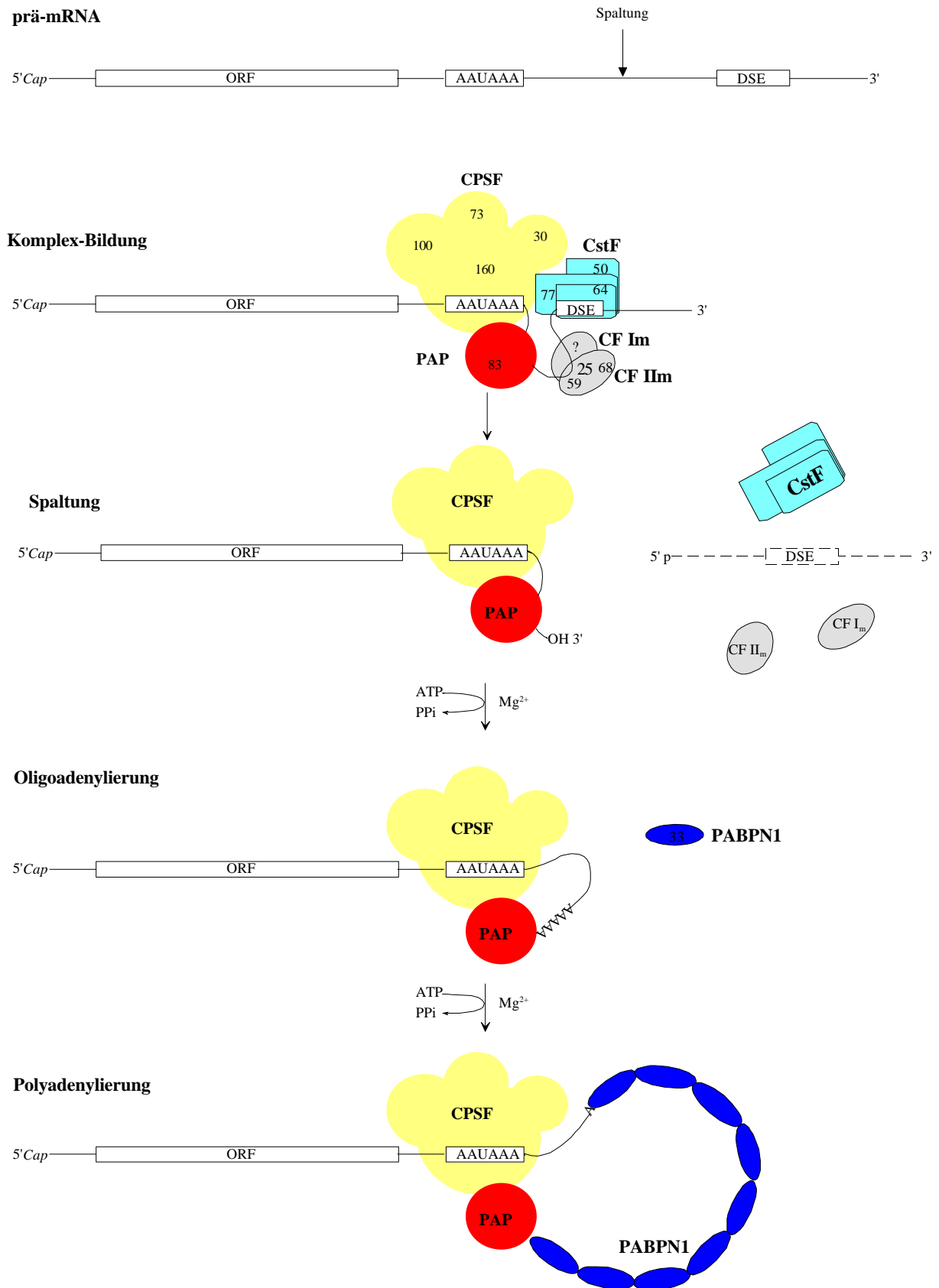


Abbildung 1.2: Die 3'-Prozessierung von prä-mRNA in Säugern

Für die Beschreibung des Ablaufs der 3'-Prozessierung siehe Text. 5'-Cap: m⁷GpppN-Cap, ORF: offenes Leseraster, AAUAAA: Polyadenylierungssignal, DSE: *Downstream-Element*, CPSF: *cleavage and polyadenylation specificity-Faktor*, PAP: Poly(A)-Polymerase, CstF: *cleavage stimulation-Faktor*, CF: *cleavage-Faktoren*, PPi: Pyrophosphat, PABPN1: nukleäres Poly(A)-Bindungsprotein 1, (Abbildung nach Nemeth, Doktorarbeit 1998)

1.2.1. Die endonukleolytische Spaltung

Polyadenylierungssignale

Im 3'-nichttranslatierten Bereich jeder zu prozessierenden mRNA ist ein wichtiges Sequenzmotiv enthalten, welches als Polyadenylierungssignal wirkt. Es wird von den beteiligten Proteinen erkannt und vermittelt die Spezifität der Reaktion. Dieses Polyadenylierungssignal ist das AAUAAA-Motiv. Es befindet sich 10-30 Nukleotide vor der späteren Spaltstelle und ist stark konserviert (Proudfoot, 1991; Beadoing *et al.*, 2000). Die Sequenz AUUAAA wird ebenfalls erkannt, kommt aber seltener vor. Bis zu 30 Nukleotide stromabwärts der Spaltstelle befindet sich das weniger konservierte *downstream*-Element. Es ist meist U- bzw. GU-reich (Beyer *et al.*, 1997). Der Abstand zwischen AAUAAA-Motiv und *downstream*-Element bestimmt die Region, in welcher die Spaltung durchgeführt wird. Die Spaltstelle befindet sich bevorzugt hinter einem Adenosin, oft wird das Dinukleotid CA verwendet (Chen *et al.*, 1995). Weitere Sequenzmotive, welche die Effizienz der Spaltstelle beeinflussen, wurden an anderen Positionen gefunden (Gilmartin *et al.*, 1995; Moreira *et al.*, 1995, 1998; Chen & Wilusz, 1998).

Der Spaltkomplex baut sich aus folgenden Proteinen auf: *cleavage and polyadenylation specificity factor* (CPSF), *cleavage factors* I_m und II_m (CF I_m, CF II_m, m für Mammalia), *cleavage stimulation factor* (CstF) und Poly(A)-Polymerase (PAP).

CPSF

CPSF besteht aus vier Untereinheiten (160K, 100K, 73K, 30K; Bienroth *et al.*, 1991; Jenny *et al.*, 1994; Murthy & Manley, 1995). Die 160 kDa-Untereinheit (CPSF-160K) bindet die AAUAAA-Sequenz gemeinsam mit der 30 kDa-Untereinheit (CPSF-30K). Während in CPSF-160K keine bekannte RNA-Bindungsdomäne gefunden werden konnte, verfügt CPSF-30K über fünf Zink-Finger-Domänen und das *Zink-knuckle*-Motiv (Burd & Dreyfuß, 1994; Barabino *et al.*, 1997). Da CPSF-160K allein eine nur geringe Affinität für das Polyadenylierungssignal AAUAAA aufweist, erhöht CPSF-30K möglicherweise diese Affinität (Murthy & Manley, 1995). Für CPSF-30K wird die endonukleolytische Funktion vorgeschlagen, da es über Homologien zum Protein *clipper* aus *Drosophila* verfügt. *clipper* kann möglicherweise Haarnadelstrukturen endonukleolytisch spalten (Bai & Tolias, 1996). Cft2, ein Homologes von CPSF-100K aus Hefe konnte mittels *crosslink* an RNA gebunden

werden (Zhao *et al.*, 1997). CPSF-73K zeigt Sequenzähnlichkeiten zu CPSF-100K, die Funktionen dieser beiden Proteine ist bisher noch nicht bekannt.

CF I_m, CF II_m

CF I_m besteht aus 2 Untereinheiten, einer 25 kDa Untereinheit und einer großen Untereinheit, die in drei Versionen (59 kDa, 68 kDa bzw. 72 kDa, Rügsegger *et al.*, 1996, 1998) auftritt. Die 68 kDa-Untereinheit enthält eine RNP-Domäne und repetitive SR-Sequenzelemente. Diese spielen in anderen Proteinen eine wichtige Rolle bei der Bildung des Spleissosoms auf der prä-mRNA (Fu, 1995). CF I_m bindet früh an die RNA und fördert wahrscheinlich die Rekrutierung der anderen Proteine des 3'-Prozessierungskomplexes (Rügsegger *et al.*, 1998). Der Faktor CF II_m ist ebenfalls essentiell für die Spaltungsreaktion. De Vries *et al.* (2000) konnten CF II_m aus HeLa-Zellextrakten reinigen. Sie erhielten zwei Komponenten, CF IIA_m, (bestehend aus hClp1 und hPCf11), welches essentiell für die endonukleolytische Spaltung war und CF II B_m, welches lediglich die Reaktion stimulierte.

CstF

Der *cleavage stimulation factor* CstF enthält drei Untereinheiten der Größen 77 kDa, 64 kDa und 50 kDa. CstF bindet mittels seiner 64 kDa-Untereinheit an das *downstream*-Element (Takagaki *et al.*, 1990; MacDonald *et al.*, 1994). Diese Untereinheit enthält ein RNP-Motiv und interagiert mit CstF77-K. Die 77 kDa-Untereinheit bindet an CPSF-160K, CstF64-K und CstF-50K und stabilisiert auf diesem Weg wahrscheinlich den Polyadenylierungskomplex (Murthy & Manley, 1995). In der dritten Untereinheit von CstF, mit einer Größe von 50 kDa, wurden repetitive Sequenzelemente, sogenannte WD-40 *repeats*, gefunden. Diese könnten für Protein-Protein-Wechselwirkungen zuständig sein.

Poly(A)-Polymerase

Obwohl die Poly(A)-Polymerase hauptsächlich die *template*-unabhängige Addition der Adenylatreste an das 3'-Ende der mRNA katalysiert, ist sie auch an der Spaltungsreaktion beteiligt (Takagaki *et al.*, 1988, 1989; Christofori, 1989). Sie ist nicht essentiell für die Spaltung aller mRNAs, stimuliert jedoch die Reaktion. Die Poly(A)-Polymerase ist ein monomeres Protein mit einem Molekulargewicht von ca. 80 kDa. Durch alternatives *Splicing*

entstehen Poly(A)-Polymerase-Varianten, welche sich im C-Terminus unterscheiden (Raabe *et al.*, 1991; Wahle *et al.*, 1991; Zhao & Manley, 1996). Die katalytische Aktivität der Polymerasen ist jedoch ähnlich. Die Struktur eines Cordycepin/Poly(A)-Polymerase-Komplexes konnte von Martin *et al.* (2000) durch Röntgenstrukturanalysen gelöst werden. Das katalytische Zentrum zeigt starke Strukturhomologien zu anderen Nukleotidyltransferasen, z.B. dem der DNA-Polymerase β (Davies *et al.*, 1994; Sawaya *et al.*, 1997). Unerwartet war, dass sich der C-terminale Abschnitt der kristallisierten (C-terminal verkürzten) Poly(A)-Polymerase zu einer kompakten Domäne faltet, die ähnlich wie ein RNA-Erkennungsmotiv aussieht. Die drei konservierten Aspartate der katalytischen Triade rekrutieren zwei der drei Metallionen im aktiven Zentrum. Eines dieser Metallionen kontaktiert den Adenin-Ring des ATP und positioniert es auf diese Weise im aktiven Zentrum. Weitere konservierte Aminosäurereste sind ebenfalls an der ATP-Bindung beteiligt. All diese Kontakte sorgen für die Substratspezifität der Poly(A)-Polymerase für ATP (Martin *et al.*, 2000).

Mechanismus

Der erste Schritt der Spaltung der prä-mRNA ist die Zusammenlagerung des Spaltkomplexes auf der RNA. CPSF bindet das Polyadenylierungssignal AAUAAA, CstF lagert sich an das *downstream*-Element an. Dadurch wird ein stabiler ternärer Komplex gebildet (Gilmartin & Nevis, 1989). Weiterhin lagern sich CF I_m, CF II_m und die Poly(A)-Polymerase an der RNA an. Es konnte bisher nicht geklärt werden, welches der Proteine für die endonukleolytische Spaltung der RNA verantwortlich ist. Nach der Spaltung verlassen CstF, CF I_m und CF II_m den Polyadenylierungskomplex. Das abgespaltene 3'-RNA-Fragment inklusive des *downstream*-Elements wird rasch abgebaut. (Übersicht: Keller, 1995; Manley, 1995; Wahle & Kühn, 1997; Wahle & Rügsegger, 1999). Wahrscheinlich sind jedoch an der Spaltungsreaktion noch andere Proteine beteiligt (Takagaki & Manley, 2000).

1.2.2. Die Polyadenylierungsreaktion

Durch die endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA entsteht ein neues 3'OH-Ende. An dieses wird in der nun folgenden Polyadenylierungsreaktion ein Poly(A)-Schwanz mit einer Länge von ca. 250 Adenylatresten aus ATP synthetisiert (Sheets & Wickens, 1989; Bienroth

et al., 1993; Wahle & Kühn, 1997; Wahle & Rügsegger, 1999). Die Reaktion wird template-unabhängig von der Poly(A)-Polymerase katalysiert. Das Substrat der Reaktion ist ATP. AMP wird in den wachsenden Poly(A)-Schwanz eingefügt, das Pyrophosphat wird abgespalten. Die Poly(A)-Polymerase weist nur eine geringe Affinität zu RNA auf. Diese kann durch die unphysiologische Zugabe von Mn^{2+} anstelle von Mg^{2+} erhöht werden, *in vivo* ist jedoch CPSF für die Erhöhung der Affinität der Poly(A)-Polymerase zur mRNA verantwortlich (Murthy & Manley, 1992; Bienroth *et al.*, 1991, 1993). Die Synthese des Poly(A)-Schwanzes erfolgt in zwei Schritten. Die ersten ca. 10 Nukleotide werden in einer langsamen, wenig prozessiven Art an das 3'-Ende der prä-mRNA angehängt. Dies bedeutet, dass die Poly(A)-Polymerase nach einigen Syntheseschritten von der RNA dissoziiert und an einen anderen prä-mRNA-Strang bindet. Eine vollständig distributive Synthese wird von der Poly(A)-Polymerase allein durchgeführt. Für die wenig prozessive Reaktion ist neben der Poly(A)-Polymerase nur CPSF nötig. Dieses ist noch an die AAUAAA-Sequenz gebunden. Durch Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen der Poly(A)-Polymerase und CPSF wird einerseits sichergestellt, dass nur prä-mRNAs mit einem Polyadenylierungssignal einen Poly(A)-Schwanz erhalten als auch andererseits eine begrenzte Prozessivität der Poly(A)-Polymerase erreicht. Hat der Poly(A)-Schwanz eine Länge von ca. 10 Nukleotiden erreicht, beginnt die zweite Phase der Polyadenylierungsreaktion. Das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPN1) kann an den Poly(A)-Schwanz binden. Dadurch wird der Komplex stabilisiert und die Prozessivität der PAP maximal (Bienroth *et al.*, 1993). Der quarternäre Komplex aus Poly(A)-Polymerase, CPSF und PABPN1 ist jetzt stabil, und die Poly(A)-Polymerase synthetisiert einen Poly(A)-Schwanz von ca. 250 nt Länge, ohne von der RNA zu dissoziieren. Mit Erreichen von ca. 250 Adenylat-Resten wird die Reaktion wieder distributiv. Die weitere Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes erfolgt daher nur langsam.

1.2.3. Das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPN1)

PABPN1 ist ein RNA-Bindungsprotein mit einem Molekulargewicht von 32,3 kDa. Es bindet RNA mit hoher Affinität und Spezifität. PABPN1 besteht aus drei Domänen, dem sauren N-Terminus, einer RNA-Bindungsdomäne und dem basischen C-Terminus (Nemeth *et al.*, 1995). Abbildung 1.3 gibt einen Überblick über den Aufbau von PABPN1.

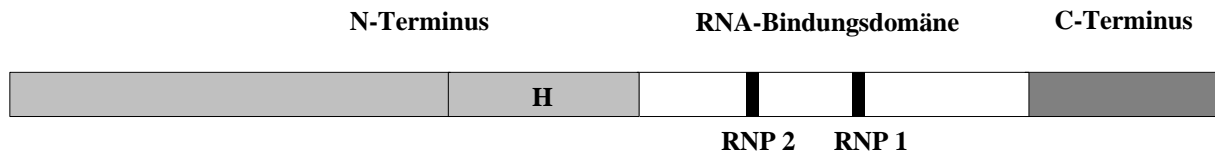


Abbildung 1.3: Der Aufbau von PABPN1

Der N-Terminus mit der Helikalen Domäne (H) ist hellgrau dargestellt, die RNA-Bindungsdomäne mit den zwei RNP-Motiven (RNP 1 und 2) ist in weiß mit schwarzen Balken abgebildet, der C-Terminus erscheint in dunkelgrau.

Der N-Terminus ist reich an sauren Aminosäuren, insbesondere Glutamat. Eine Wiederholungssequenz von Alaninen befindet sich im N-Terminus von PABPN1. Die Erhöhung der Zahl der Alanine verursacht die Krankheit Oculopharyngeale Muskeldystrophie (OPMD, Brais *et al.*, 1998). Diese Krankheit wird autosomal vererbt. Im C-terminalen Teil des N-Terminus befindet sich eine Helikale Domäne (H). Der C-Terminus verfügt über eine große Anzahl basischer Aminosäuren und enthält RXR-Motive (Smith *et al.*, 1999), welchen ähnliche Funktionen wie RGG-Motiven zugeschrieben wird. RGG-Motive sind für RNA-Bindung (Kiledjian & Dreyfuss, 1992) und Protein-Protein-Wechselwirkungen (Bouvet *et al.*, 1998) sowie die nukleare Lokalisation (Lee *et al.*, 1996, 1998; Mears & Rice, 1996) zuständig. An 13 Positionen im C-Terminus enthält PABPN1 N^G , N^G -Dimethylarginin. Zwei weitere Arginine sind partiell methyliert. Alle methylierten Arginine findet man in den RXR-Motiven. Die Methylierung könnte wichtig sein für den Export von PABPN1 aus dem Zellkern (Shen *et al.*, 1998). Sie beeinflusst die Polyadenylierung jedoch nicht (Smith *et al.*, 1999). Auf die RNA-Bindung des Proteins hat die Methylierung ebenfalls keinen Einfluss (Kühn *et al.*, in Vorbereitung).

Die RNA-Bindungsdomäne (RBD) im mittleren Teil des Proteins ist vom RNP-Typ. Dieses enthält zwei hochkonservierte Motive, RNP-1 und RNP-2 und weitere konservierte, meist hydrophobe Aminosäuren (Burd & Dreyfuss, 1994). Das RNP 1 ist ein Oktamer mit folgender Sequenz: [(Lys/Arg)-Gly-(Phe/Tyr)-(Gly/Ala)-Phe-Val-X-(Phe/Tyr), wobei X jede Aminosäure sein kann, RNP 2 ist eine hexamere Sequenz [(Leu/Ile)-(Phe/Tyr)-(Val/Ile)-(Gly/Lys)-(Asn/Gly)-(Leu/Met)] (Übersicht in Nagai, 1996). Oubridge *et al.* (1994) konnten die RNA-Bindungsdomäne von U1A mit RNA kokristallisieren. Zwei α -Helices und vier β -Faltblätter nehmen solch eine Struktur ein, dass die Faltblätter eine Interaktionsfläche für die RNA bilden, hinter der sich die beiden Helices befinden (siehe Abbildung 1.4). Für die RNA-Bindungsdomäne von PABPN1 wird eine ähnliche Struktur erwartet.

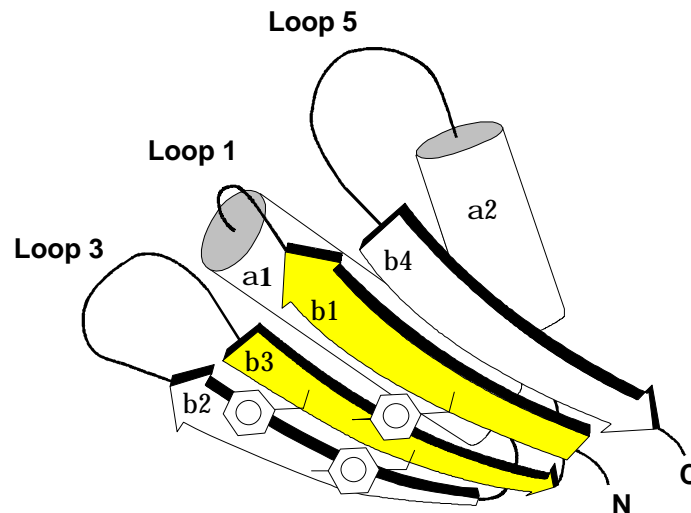


Abbildung 1.4: Die Struktur der RNP-Domäne (nach Kenan *et al.*, 1991)

Die α -Helices sind mit $\alpha 1$, $\alpha 2$, die Faltblätter mit $\beta 1$ - $\beta 4$ bezeichnet. N und C kennzeichnen den N- bzw. C-Terminus des Proteins

An der RNA-Bindung sind sowohl die RNP-Domäne als auch der C-Terminus beteiligt. Die Bindung ist spezifisch für Purin-Ribonukleotide mit einer Präferenz für Poly(A). (U. Kühn, persönliche Mitteilung). PABPN1 bedeckt 12-14 Nukleotide, interagiert jedoch nur mit 11 (Meyer *et al.*, 2002). Das Protein bindet mit einer schwachen Kooperativität an Poly(A) verschiedener Länge (Keller *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2002).

PABPN1 befindet sich vorwiegend im Zellkern (Krause *et al.*, 1994; Schul *et al.*, 1998), pendelt jedoch auch zwischen Kern und Cytoplasma (Chen *et al.*, 1999). So scheint es möglich, dass PABPN1 an den Poly(A)-Schwanz gebunden ist, während die mRNA ins Cytoplasma transportiert wird, wo PABPN1 aufgrund von Konzentrationsunterschieden vom cytosolischen Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPC1, siehe 1.3) verdrängt wird.

Die Bindung von PABPN1 an den Poly(A)-Schwanz erfolgt wahrscheinlich stöchiometrisch. Aus diesem Grund wird eine Funktion in der Längenmessung der Poly(A)-Schwänze vermutet, welche für die Beendigung der prozessiven Synthese vonnöten ist (siehe 1.2.4).

1.2.4. Die Längenkontrolle des Poly(A)-Schwanzes

Die prozessive Synthese des Poly(A)-Schwanzes endet bei einer Länge von etwa 250 Adenylatresten (Wahle, 1995). Die weitere Synthese ist langsam und distributiv. Die *in vitro* erreichte Länge der Poly(A)-Schwänze von 250 AMP entspricht der *in vivo* bestimmten (Wahle, 1995). mRNAs mit Poly(A)-Schwänzen verschiedener Länge als Substrat wurden unabhängig von der Länge des ursprünglichen Poly(A)-Schwanzes durch die Poly(A)-Polymerase auf jeweils etwa 250 AMP-Reste verlängert, bevor die prozessive Synthese in eine distributive überging (Wahle, 1995). Es gibt also einen Mechanismus, der die effektive Länge der entstandenen Poly(A)-Schwänze misst (und nicht die Anzahl angefügter Adenylat-Reste) und darauf folgend wird die prozessive Synthese des Poly(A)-Schwanzes eingestellt. Der Polyadenylierungskomplex wird auf mRNA mit vollständig verlängerten Poly(A)-Schwänzen auf noch unbekannte Weise derart verändert, dass die Poly(A)-Polymerase nur noch sehr langsam Adenylatreste addiert. Da die volle Prozessivität der Reaktion erst durch die gemeinsame Reaktion von PABPN1 und CPSF hervorgerufen wird und eine stöchiometrische Bedeckung des Poly(A)-Schwanzes mit PABPN1 beobachtet werden kann, liegt es nahe, dass PABPN1 für die Längenmessung verantwortlich ist. Komplexe aus mit PABPN1 gesättigtem hochmolekularem Poly(A) wurden mittels Elektronenmikroskopie und *scanning force microscopy* beobachtet (Keller *et al.*, 2000). Die Komplexe nahmen zwei verschiedene Strukturen ein, lineare Filamente und kompakte Partikel. Wurden Bedingungen gewählt, bei denen Poly(A)-Bindungsstellen im Überschuss gegenüber PABPN1 vorlagen, wurde eine Mischung aus Filamenten und Partikeln gefunden, bei sättigenden Bedingungen (alle Poly(A)-Bindungsstellen sind mit PABPN1 besetzt), lagen vorwiegend Partikel vor. Die maximale Größe der Partikel betrug 21 nm. Die Partikel nahmen auf Poly(A) mit einer durchschnittlichen Länge von ca. 600 bis 1000 Adenylatresten eine Struktur ähnlich einer Perlenkette ein. Die Länge des Poly(A) in einem Partikel betrug dabei ca. 300 Nukleotide und entsprach damit etwa der Länge eines vollständig mit PABPN1 besetzten Poly(A)-Schwanzes *in vivo*. Möglicherweise wird durch die Beschränkung der Partikelgröße die Länge der Poly(A)-Schwänze determiniert.

Der Mechanismus der Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze unterscheidet sich von Organismengruppe zu Organismengruppe. In Bakterien wird im Gegensatz zu den Säugetieren die Länge der Poly(A)-Schwänze durch eine Balance zwischen der Poly(A)-Polymerase I und den Exoribonukleasen (PNPase, RNase II) kontrolliert (Hajnsdorf *et al.*, 1996; Coburn & Mackie, 1999). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* hingegen

beschränkt das Poly(A)-Bindungsprotein 1 (Pab1p), ein Homologes des cytoplasmatischen Poly(A)-Bindungsproteins 1 (PABPC1), die Aktivität der Poly(A)-Polymerase, wenn vollständig verlängerte Poly(A)-Schwänze vorliegen (A₇₀₋₉₀; Amrani *et al.*, 1997). Anschließend an diese Polymerisation wird der Poly(A)-Schwanz durch die Pab1p-abhängige Poly(A)-Nuklease (PAN) auf etwa 55-70 Adenylatreste gekürzt (Brown & Sachs, 1998). Ein etwas anderer Mechanismus für die Längenkontrolle in Hefe wird von Hector *et al.*, 2002 beschrieben. Dabei ist das Protein Nab2p für die Längenkontrolle und den Export der mRNA aus dem Kern verantwortlich.

1.2.5. Protein-Protein-Wechselwirkungen

In die 3'-Prozessierung sind ca. 15-20 Polypeptide integriert. Die Polypeptide binden nicht nur auf der RNA sondern interagieren auch miteinander. Vielfältige Protein-Protein-Wechselwirkungen konnten innerhalb der Komplexe mittels funktioneller Assays, Gelretardationsexperimenten, Immunpräzipitation, Vernetzungsexperimenten (*crosslink*) u.s.w. nachgewiesen werden. Das zentrale Element in der 3'-Prozessierung ist CPSF. Es bindet spezifisch die AAUAAA-Sequenz der RNA (Keller *et al.*, 1991) und bildet damit eine Plattform für alle folgenden Moleküle des Komplexes. CPSF-160K interagiert mit der PAP und stimuliert auf diese Weise die Polyadenylierung (Murthy & Manley, 1995). Ebenfalls an CPSF-160K bindet CPSF-30K, wodurch die Affinität zur AAUAAA-Sequenz gesteigert wird (Barabino *et al.*, 1997). Eine Interaktion zwischen CPSF-30K und PABPN1 konnte von Chen *et al.* (1999) nachgewiesen werden. Eine weitere Komponente, welche mit CPSF-160K interagiert, ist die 77 kDa-Untereinheit von CstF (Murthy & Manley, 1995). Dadurch wird die kooperative Bindung von CPSF und CstF an die prä-mRNA ermöglicht. Die zwei weiteren Untereinheiten von CstF (CstF-50K und CstF-64K) sind mit der oben genannten 77 kDa-Untereinheit ebenfalls durch Protein-Protein-Wechselwirkungen verbunden. CstF-64K ist die Untereinheit, welche das *downstream*-Element bindet (Takagaki & Manley, 1997). Interaktionen zwischen CF I_m und CF II_m konnten de Vries *et al.* (2000) nachweisen. *Last but not least* dimerisieren bzw. aggregieren PABPN1-Moleküle bei höheren Proteinkonzentrationen (U. Kühn, persönliche Mitteilung). Die genannten Protein-Protein-Wechselwirkungen müssen jedoch nicht zwangsläufig eine funktionelle Relevanz beinhalten bzw. ist diese nicht in allen Fällen nachgewiesen.

1.2.6. Die Rolle der Polyadenylierung

Die 3'-Prozessierung wird nicht nur von höheren Eukaryoten durchgeführt. Auch die mRNAs von Viren, Bakterien und Hefen verfügen über Poly(A)-Schwänze. Viele eukaryotische und virale mRNAs enthalten alternative Polyadenylierungsstellen, welche gewebe- und entwicklungspezifisch genutzt werden. Durch die Wahl der Polyadenylierungsstelle kann somit die Expression der betroffenen Gene beeinflusst werden (Rong Zeng *et al.*, 2000).

Die wahrscheinlich wichtigste Funktion des Poly(A)-Schwanzes ist bei der Initiation der Translation zu suchen. Der Poly(A)-Schwanz der mRNA ist nach dem Transport ins Cytosol mit dem cytosolischen Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPC1, siehe 1.3) besetzt. PABPC1 bindet gemeinsam mit dem Initiationsfaktor eIF4E, welcher an das 5'-Cap bindet, eIF4G. Dieser rekrutiert die 40S-Untereinheit der Ribosomen auf der mRNA. Dadurch wird die Initiation der Translation stimuliert (Sachs *et al.*, 1997; Borman *et al.*, 2000; Svitkin *et al.*, 2001). Die aus der Wechselwirkung von PABPC1, eIF4E und eIF4G resultierende Zirkularisierung der mRNA konnte durch *atomic force microscopy* sichtbar gemacht werden (Wells *et al.*, 1998). Des Weiteren ist der Poly(A)-Schwanz für die Regulation der mRNA-Stabilität (Sachs, 1990; Beermann & Parker, 1995; Sachs *et al.*, 1997; Wahle & Rügsegger, 1999) und den Export ins Cytoplasma von Bedeutung (Wickens & Stephenson, 1984; Eckner *et al.*, 1991; Huang & Carmichael, 1996; Hilleren *et al.*, 2001).

Auch das Spleissen steht mit der Polyadenylierung in Verbindung. Vagner *et al.* (2000) beschreiben U2AF 65, ein Protein des Spleissosoms (siehe 1.1), welches mit dem C-Terminus der Poly(A)-Polymerase in direkte und spezifische Wechselwirkungen treten kann und dadurch die 3'-Prozessierung und das Spleissen koppelt (siehe auch Gunderson *et al.*, 1997).

1.3. Das cytosolische Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPC1)

Nachdem die mRNA prozessiert wurde, folgt der Transport der mRNA aus dem Zellkern ins Cytoplasma. Der Poly(A)-Schwanz ist nach der Prozessierung der mRNA im Zellkern mit PABPN1 besetzt. Calado *et al.* (2000) konnten zeigen, dass PABPN1 durch einen trägervermittelten Mechanismus zwischen Zellkern und Cytoplasma pendelt. Beim Transport durch die Kernmembran ist der Poly(A)-Schwanz der mRNA möglicherweise an PABPN1 gebunden. Im Cytosol wird der Poly(A)-Schwanz mit dem cytosolischen Poly(A)-

Bindungsprotein 1 (PABPC1) besetzt. Wo und auf welche Art und Weise der Austausch zwischen PABPN1 und PABPC1 stattfindet, ist bisher ungeklärt. Möglich wäre aber eine Verdrängung von PABPN1 durch PABPC1 aufgrund anderer Konzentrationsverhältnisse im Kern und im Cytoplasma.

PABPC1 ist ein 72 kDa-Protein und baut sich auf aus vier N-terminalen RNA-Bindungsdomänen (RBD 1-4) und einem C-terminalen Bereich, welcher glutamin- und prolinreich ist und RNA nicht binden kann (Nietfeld *et al.*, 1990). Die Funktion des C-Terminus wird von Kozlov *et al.* (2001) als Peptid-Bindungsdomäne beschrieben. Neben Poly(A) wird von PABPC1 *in vitro* mit verringerter Affinität auch Poly(U) und Poly(G) gebunden (Swanson & Dreyfuss, 1988; Burd *et al.*, 1991). Nietfeld *et al.* (1990) konnten außerdem zeigen, dass auch die isolierten RBDs in der Lage sind, Homopolymere zu binden. Die Kombination aus RBD 1 und 2 von PABPC1 bindet *in vitro* mit Wildtypaffinität Oligo(A). Die isolierten Domänen RBD 2, 3 bzw. 4 binden mit etwa hundertfach abgeschwächter Affinität an Oligo(A). Für RBD 4 konnte gezeigt werden, dass sie eine dem U1A entsprechende RNA-Bindungsfläche ausbildet (U. Kühn, persönliche Kommunikation).

PABPC1 ist nicht in der Lage, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren. Sie wird im Gegensatz sogar durch PABPC1 gehemmt (Wahle *et al.*, 1993). PABPC1 spielt eine wichtige Rolle in der Initiation der Translation und beim mRNA-Abbau (Munroe & Jacobson, 1990; Gallie, 1991; Tarun & Sachs, 1996).

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPN1) ist neben CPSF verantwortlich für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase zu einer prozessiven Reaktion. Sein Aufbau aus saurem N-Terminus, RNP-Domäne und basischem C-Terminus ist bekannt, die genauen Funktionen von N- und C-Terminus sind nicht zweifelsfrei geklärt. Die Wirkung des Proteins in der Längenkontrolle ist bisher auch noch nicht verstanden.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten die Interaktionen zwischen der Poly(A)-Polymerase und PABPN1 näher untersucht und gegebenenfalls die interagierenden Domänen von PABPN1 identifiziert werden. Es sollte das „Rekrutierungs-Modell“ bewiesen werden, wonach PABPN1 eine zusätzliche Bindungsstelle für die Poly(A)-Polymerase auf der RNA darstellt und dadurch die Polyadenylierung stimuliert. Des Weiteren sollten Experimente zur Aufklärung des Mechanismus der Längenkontrolle durchgeführt werden.

2. Materialien und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
BL21 (DE3) pLys S	<i>E. coli</i> B, F' <i>dcm ompT hsdS</i> (_{r_B} - _{m_B} -) <i>gal</i> λ(DE3) [pLysS]
BL21 (DE3) pUBS	<i>E. coli</i> B, F' <i>dcm ompT hsdS</i> (_{r_B} - _{m_B} -) <i>gal</i> λ(DE3) [pUBS]
BMH 71-18 <i>mutS</i>	<i>E. coli</i> B, <i>thi supE</i> Δ(<i>lac-proAB</i>) [<i>mutS:Tn10</i>] [F' <i>proA+B+</i> <i>lacI</i> ^q ΔM15]
DH5α	<i>E. coli</i> K12, F- <i>endA hsdR17</i> (_{r_K} - _{m_{K+}}) <i>supE44 thi-1 recA1 gyrA</i> (Nal ^r) <i>relA1</i> D(<i>lacIZYA-argF</i>)U169 <i>deoR</i> (Φ80 <i>dlacD(lacZ)</i> M15)
JM 109	<i>E. coli</i> K12, <i>e14</i> -(MrcA-) <i>endA1 recA1 gyrA96 thi hsdR17</i> (_{r_K} - _{m_{K+}}) <i>relA supE44</i> λ- Δ(<i>lac-proAB</i>) [F' <i>traD36 proA+B+</i> <i>lacI</i> ^q ΔM15]
XL1-blue	<i>E. coli</i> K12, <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacI</i> ^q ΔM15 Tn10 (Tet ^r)]

2.1.2. Medien und Platten

Medien:

LB (Luria Bertani) 1 % (w/v) Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefeextrakt, 1 % (w/v) NaCl auf pH 7,5 mit NaOH eingestellt

SB (Super Broth) Lösung A: 1,3 % (w/v) Bactotrypton, 2,7 % (w/v) Hefeextrakt, 0,6 % (v/v) Glycerin, autoklavieren

Lösung B: 170 mM KH₂PO₄, 720 mM K₂HPO₄, sterilfiltrieren

Lösung A und B im Verhältnis A:B = 9:1 mischen

LB-Platten wie LB-Medium, plus 1,5 % (w/v) Agar

2.1.3. Enzyme, Proteine, Peptide und Systeme

Alle im folgenden Text genannten Restriktionsendonukleasen und die zugehörigen Puffer und Zusätze wurden von *New England Biolabs* (NEB) bzw. Fermentas bezogen.

Alkalische Phosphatase	Roche Diagnostics
T4-DNA-Ligase	NEB
T4-DNA-Polymerase	NEB
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	A. Jenny
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	Hybaid AGS
<i>Pfu</i> -DNA-Polymerase	Stratagene
SP6-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4-Polynukleotidkinase	NEB
RNase A	Roth
DNase	Roche Diagnostics
Pepstatin	Roche Diagnostics
Leupeptin	Roche Diagnostics
PMSF	Merck
Proteinase K	Merck
BSA (bovines Serumalbumin)	Merck
Methyliertes BSA	durch reduktive Methylierung von BSA (C. Körner)
Sekundärer Antikörper	Peroxidase-gekoppelter Schwein-anti- Kaninchen-Antikörper (DAKO A/S)
α -PABPN1-Antikörper	Kaninchenserum (Krause <i>et al.</i> 1994)
α -CPSF-100K-Antikörper	Kaninchenserum (W. Keller, Basel)
RNasin	RNase-Inhibitor, Promega
Proteinstandard SDS-6H	Molekulargewichtsstandard für SDS-Gelelektrophoresen, (29, 45, 66, 97, 116, 205 kDa, Sigma)

Polyadenylierungsfaktoren

PAP	bovine [His] ₆ -Poly(A)-Polymerase (G. Martin)
CPSF	CPSF II und CPSF III, Präparationen aus Kalbsthymus (E. Wahle 1995, 2001)

PABPN1 Fraktion 33, Präparation aus Kalbsthymus (Wahle *et al.*, 1993)
 Rekombinantes Protein mit einem [His]₆-tag, überexprimiert in
 Baculvirus-infizierten Sf21-Zellen (S. Meyer)

Systeme

Plasmid-Midi-Kit	QIAGEN
QIAEX Gel Extraction Kit	QIAGEN
Big Dye TM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	PE Applied Biosystems
Supersignal Substrate	zur Immunfärbung, Pierce
Biorad Protein Assay	Bradford-Assay zur Proteinbestimmung
<i>Gene Editor Site Directed Mutagenesis Kit</i>	Promega

2.1.4. Nukleinsäuren und Nukleotide

DNA-Größenstandard 1 kb DNA Ladder, Gibco

2.1.4.1. Oligonukleotide

Die für Klonierung, Sequenzierung und PCR verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: zur Klonierung und Sequenzierung verwendete Oligonukleotide

Die fett gedruckten Nukleotide stellen eingeführte Mutationen dar. Die in Klammern hinter den Restriktionsschnittstellen angegebenen Zahlen bezeichnen das Basenpaar in der Sequenz von PABPN1, an welcher die angegebene Restriktionsschnittstelle eingefügt (durch ein + vor dem Restriktionsenzym erkennbar) bzw. zerstört wurde (- vor dem Enzym, Bsp: +A/w N I (381) bedeutet, dass an Basenpaar 381 in der Sequenz von PABPN1 eine A/w N I-Restriktionsschnittstelle eingefügt wurde). Die Bezeichnung Nr. bezieht sich auf eine arbeitsgruppeninterne Nummerierung der Oligonukleotide.

Nr.	Oligonukleotid	Sequenz 5'-3'	Schnittstelle (Basenpaar)
	PABPN1-Primer		
92	syn PABP2 L119A	gAA gAT CCA gAA gCT gAA gCA ATA AAA g	+AlwNI (381)
125	syn PABP2 E120A	gAA gAT CCA gAA TTg gCC gCA ATA AAA gCT Cg	+HaeIII (383)
93	syn PABP2 I122Q	CCA gAA TTA gAA gCC CAA AAg gCT CgA gTT Agg	+BglI (393)
93B	syn PABP2 I122Q rev	CCT AAC TCg AgC CTT TTg ggC TTC TAA TTC Tgg	+BglI (393)
135	syn PABP2 K123A	gAA TTA gAA gCA ATA gCC gCT CgA gTT Agg g	+MbiI (396)
126	syn PABP2 A124S	gAA gCA ATA AAA TCC CgA gTT Agg gAg ATg	-XhoI (397)
94	syn PABP2 V126S	gCA ATA AAA gCT CgA TCC Cgg gAg Atg gAg	+SmaI (405)
104	syn PABP2 M129A	gAg TTA ggg Agg Cgg AAg Agg AAg CTg AgA AgC	+EarI (419)
104A	syn PABP2 M129A rev	GCT TCT CAg CTT CCT CCg CCT CCC TAA CTC	+EarI (419)
105	syn PABP2 E131A	gAT ggA ggC AgA AgC TgA g	+AlwNI (423)
95	syn PABP2 A133S	ggA ggA AgA ATC ggA gAA gCT AAA gg	-DdeI (424)
136	syn PABP2 K135A	gAg gAA gAA gCT gAA gCg CTA AAg gAg CTA C	-DdeI (424)
96	syn PABP2 L136A	gAA gCT gAg AAg gCC AAg gAg CTA CAg	+StyI (433)
96A	syn PABP2 L136A rev	CTg Tag CTC CTT ggC CTT CTC AgC TTC	+StyI (433)
97	syn PABP2 L136S	ggA AgA AgC TgA AAA gTC AAA ggA gCT ACA g	-DdeI (424)
98	syn PABP2 V143A	CAG AAC gAg gCT gAg AAg CAg ATg	+DdeI (454)
98A	syn PABP2 V143A rev	CAT CTg CTT CTC AgC CTC gTT CTg	+DdeI (454)
128	PABP2 E187A	gTg CAA CAg CAg AAg CTT TAg AAg CAC ACT TTC	+HindIII (583)
129	PABP2 E189A	CAG CAg AAg AgC TCg CAg CAC ACT TTC ATg	+SacI (+589)
127	PABP2 A190S	CAG AAg AgC TAG AAT CCC ACT TTC ATg gCT g	+BstXI (604)
132	PABP2 E234A	CTg gCC TTA gAT gCA AgC TTA TTT AgA ggA Ag	+HindIII (728)
100	PHID-Kpn-RRM	CTg Atg CCC gTg gTA CCA TCT Atg TTg	+KpnI (206)
100A	PHID-Kpn-RRM rev	CAA CAT AgA Tgg TAC CAC ggg CAT CAg	+KpnI (206)
101	RRM-Kpn-C-Term	CCA ggC ATC AgC ggT ACC gAC CgA ggC TTC	+KpnI (770)
116	PABP2-Kpn-Stop-pGM	CAT ggT ATT CCg gTA CCT AAA AAA AAg Tg	+KpnI (917)
116A	PABP2-Kpn-Stop-pGM rev	CAC TTT TTT TTA ggT ACC ggA ATA CCA Tg	+KpnI (917)
103	PAB 681 rev	TCT AAg gCC Agg gAA gTC	
61	N-Term-Stop-Dra-Bam	GgA TCC TTT AAA TCA CTg ggC CAg CA	+DraI, +BamHI
45	bPAB II d113	CAT ATg gAg gAC CCg gAg CTg gAA gCg ATC AAA	
	PABPC1-Primer		
62	N-Term PAB1-N12-Start	TgA Tgg ATC CCA gTg CTC CCA gCT A	
63	N-Term PAB1-N12-Stop	TTA AAA TTC CTT ggC TCT ggC A	
119	N-Term-PAB 1-N12-Stop-Bgl II	gAA gAT CTT TAA AAT TCC TTg gCT CTg gCA	+BglII
117	PAB1-RBD4-Kpn-C-Term	ggg ggT ACC Agg ATT Tgg TAC ACg AAC AC	+KpnI
	Vektorprimer		
AN 54	pGM up	ACg ACT CAC TAT Agg gAg ACC ACA	
AN 55	pGM down	gCA gCA gCC AAC TCA gCT TCC TTT	
AN 52	C-pGM His ₆	gCT TCC TTT Cgg gCT TTg T	
99	Selection Top	gAT AAA TCT ggA gCC TCC AAg ggT ggg TCT CgC gg	
	Sequenzierprimer		
118	PABP2 rev seq 508	CAG CCT CCA TCT TCT CCT	
91	T7 seq	TAA TAC gAC TCA CTA TAG gg	

2.1.4.2. Nukleinsäuren und Nukleotide

Homopolymere definierter Länge wurden durch alkalische Hydrolyse von kommerziell erworbenem Poly(A) mit 0,1 N NaOH 5 Min. bis 1 h bei 37 °C inkubiert, im denaturierenden Acrylamidgel aufgetrennt, fraktioniert aus dem Gel ausgeschnitten und eluiert. Bei den angegebenen Längen handelt es sich um einen Mittelwert, um welchen die Länge der Homopolymere schwankte (z.B. beinhaltet A₉₄ die Polymere A₈₆ bis A₁₀₀). Die Konzentrationen der Homopolymere bezieht sich immer auf 3'OH-Enden.

Homopolymer	hergestellt von	Konzentration (µM 3'OH Enden)
A ₈₀	U. Kühn	19,36
A ₁₅	S. Mayer	1,19
A ₂₅	S. Mayer	10,8
A ₉₄	S. Mayer	5,85

Poly(A)	Roche Diagnostics
dNTPs, NTPs	Amersham Pharmacia
ATP	Sigma
rRNA (<i>E. coli</i>)	16S und 23 S rRNA, Roche Diagnostics
[α- ³² P] ATP, [γ- ³² P] ATP, [α- ³² P] UTP	Amersham Pharmacia

2.1.5. Plasmide

pGM syn PABPN1	das Insert wurde als Ausgangspunkt für die Klonierung der chimären Proteine und der Punktmutanten genutzt (U. Kühn)
pUK syn PABPN1	der Vektoranteil wurde für die Klonierung der chimären Proteine und Punktmutanten eingesetzt (U. Kühn)
pGM Δ N113	C. Temme/ U. Kühn
pUK Δ N113	U. Kühn & G. Scholz

pSP6-L3pre-A₁₅ wird zur Transkription von L3pre-A₁₅ genutzt (Christofori & Keller, 1989; U. Kühn & G. Scholz)

2.1.6. Säulen und Säulenmaterialien

FPLC-Mono S	1 ml und 8 ml Säule, fertig gepackt, Pharmacia
FPLC-Mono Q	1 ml Säule, fertig gepackt, Pharmacia
Ni ²⁺ -NTA-Agarose	Qiagen
Sephadex G-50	Pharmacia

2.1.7. Feinchemikalien

Alle nicht genannten Chemikalien wurden von der Firma Merck bezogen.

40 % Acrylamid (19:1)	Accugel, National Diagnostics
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma
Dithiothreitol (DTT)	Gerbu
Glycogen	Roche Diagnostics
Leupeptin-Hemisulfat	Sigma
N, N, N', N'; Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Fluka
Nonidet P40	Fluka
Pepstatin A	Fluka
Phenol, TE-gesättigt	Aqua-Roti [®] -Phenol, Roth
Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)	Merck
Piperazin-Di-Acrylamid (PDA)	Bio-Rad

2.1.8. Sonstiges

Blotmembran	Protran Nitrocellulose, Schleicher & Schuell
Dialyseschläuche	Serva

Röntgenfilme	Scientific Imaging Film X-OMAT AR, Kodak
DEAE-Papier	Whatman
NC 20	Nitrocellulose- Membranfilter, Schleicher & Schuell
Glasfaser-Mikrofilter GF/C	Fischer
Proteinkonzentratoren	Centricon, amicon; Vivaspın, Vivascience
Scintillationscocktail	Lumasafe™ Plus, Lumac LSC

2.2. Allgemeine mikrobiologische Methoden

2.2.1. Sterilisation

Die Sterilisation von hitzebeständigen Glasgeräten, Lösungen und Medien wurden für 30 Min. bei 121 °C im Wasserdampf mit Überdruck durchgeführt. Hitzelabile Lösungen wurden mittels einer Filtrationsapparatur (Nalgene) durch Membranfilter (RC 58, Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schuell) sterilisiert.

2.2.2. Herstellung elektrokompetenter Zellen

400 ml LB-Medium (siehe 2.1.2) wurde mit 400 µl einer frischen Vorkultur der Bakterien und den entsprechenden Antibiotika beimpft. Die Kultur wurde bei 37 °C in einem Schüttler bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,6-0,8 angezogen (Ultrospec 1000, Pharmacia Biotech) und anschließend auf Eis gestellt. Die Zellen wurden bei 4°C mit 2000 g zentrifugiert, zur Entfernung von Salzen dreimal mit abnehmendem Volumen mit 10 % sterilem, eiskaltem Glycerin gewaschen und in ca. 0,75 ml sterilem, eiskaltem Glycerin resuspendiert. Aliquots von 50 µl wurden sofort zur Transformation eingesetzt oder in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Verwendung bei -70 °C gelagert. Ein Aliquot wurde zur Transformation mit einem Testplasmid (1 ng pGEM 3 Zf+) genutzt, um die Transformationsrate der Zellen zu ermitteln. Die untransformierten Zellen wurden auf verschiedenen Selektivagarplatten auf Kontaminationen und Identität getestet.

2.2.3. Transformation

50 µl elektrokompente Zellen wurden mit 200-500 ng Plasmidlösung in eine eisgekühlte Transformationsküvette (0,1 cm) überführt. Eingeschlossene Luftblasen wurden durch Klopfen entfernt. Mittels eines Stromstoßes (2500 V, 25 µF, 5 ms) im Elektroporator (Easyject Plus, Equibio) wurden die Zellen transformiert. Sofort wurde 1ml LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 20-200 µl der Kultur wurden auf Selektiv-Agar-Platten ausgestrichen oder der gesamte Transformationsansatz wurde zum Animpfen einer Flüssigkultur für Expressionen in Selektivmedium überführt.

Einige käuflich erworbene kompetente Zellen (z.B. im *Gene Editor Site Directed Mutagenesis*-Kit enthaltene Zellen) wurden mittels Hitzeschock transformiert. Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut, mit 200-500 ng Plasmid versetzt und 10 Min. auf Eis inkubiert. Es folgte eine Inkubation von 45 s bei exakt 42 °C im Wasserbad. Danach wurden die Zellen sofort für 2 Min. auf Eis gestellt, mit 1 ml LB-Medium versetzt und dann wie mit elektrokompenten Zellen verfahren.

2.3. Nukleinsäuretechniken

2.3.1. Allgemeine Techniken

Standardtechniken für das Arbeiten mit Nukleinsäuren wie Restriktionsendonuklease-Verdaue, Phosphorylierungen, Dephosphorylierungen und Ligationen wurden nach Herstellerangaben in den jeweiligen mitgelieferten Puffern durchgeführt. Ethanol-Fällungen und Phenol/Chloroform Behandlungen wurden nach Literaturangaben (Sambrock *et al.*; Maniatis *et al.*) durchgeführt. Plasmide für Restriktionsanalysen wurden aus 1,5 ml-Kulturen nach Birnboim & Doly (1979) isoliert. Wurden Plasmide zum Zwecke der Sequenzierung und weiteren Klonierung benötigt, wurde eine Plasmid-Präparation mittels Plasmid-Midi-Kits von QIAGEN laut Herstellerangaben vorgenommen. Die Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgte mittels des Gel Extraction Kit von QIAGEN. Konzentrationsbestimmungen von DNA und RNA wurde photometrisch durch Messung der Absorption bei 260 nm bestimmt. Dabei entsprach einer OD₂₆₀ von 1 einer Konzentration von 50µg/ml bei doppelsträngiger DNA, 33 µg/ml bei Oligonukleotiden, 34 µg/ml bei Poly(A) und 40 µg/ml bei RNA.

2.3.2. Gelelektrophorese

2.3.2.1. Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren trennen sich im elektrischen Feld der Größe nach in Agarose-Gelen auf. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden 0,5 – 2 g Agarose in 100 ml 1 x TBE (90 mM Tris-Borat, , 4 mM EDTA) aufgekocht, etwas abgekühlt und gegossen. Die DNA wurde mit DNA-Ladepuffer (30 % (v/v) Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol) versetzt und gemeinsam mit einem Marker (1 kb Ladder, Gibco) auf das Gel gegeben. Mit 15 V/cm wurde die Elektrophorese durchgeführt, bis eine hinreichende Trennung erreicht war (zu erkennen am Laufverhalten der gefärbten DNA-Marker-Banden). Das Gel wurde anschließend im Ethidiumbromid-Bad (5µg/ml) inkubiert. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert unter UV-Licht. Die DNA-Banden konnten mittels eines Videosystems (intas, Göttingen) dokumentiert werden.

2.3.2.2. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur denaturierenden Auftrennung von RNA wurden Polyacrylamid-Gele (Polyacrylamid/Bisacrylamid 19:1) mit 8,3 M Harnstoff in 1 x TBE (2.3.2.1) angefertigt. Die Polyacrylamid-Konzentration richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden RNA. Sie schwankte zwischen 4 % (RNA ab ca. 300 nt) und 20 % (Oligonukleotide). Die Proben wurden in Formamid-Ladepuffer (80 % Formamid, 1 mM EDTA, 200 µg/ml Bromphenolblau, 200 µg/ml Xylencyanol) resuspendiert, 5 Min. bei 95 °C inkubiert und auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel auf einem Phosphor-Imager-Screen exponiert und die Radioaktivität mittels Phosphor-Imager (Storm, Molekular Dynamics) detektiert.

2.3.3. Polymerasen-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR wird zur Vervielfältigung von DNA verwendet. Sie dient zur Einführung von Mutationen, Schnittstellen und wird zur Sequenzierung von DNA benutzt.

Eine 50 µl Standard-PCR-Reaktion enthält folgende Bestandteile: 50-200 ng Template-DNA, je 20-50 pmol Primer, 200 µM dNTPs, die thermostabile DNA-Polymerase und einen Reaktionspuffer. Die zyklisch ablaufende Reaktion besteht aus den drei Teilen, Denaturierung, *Annealing* und Extension. Dieser Zyklus wird im Normalfall 30 mal durchlaufen. Anschließend wird der Ansatz auf 4 °C abgekühlt. Die *Annealing*-Temperatur wird meist so gewählt, dass sie etwa 5 °C unter der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer lag. Diese wird von der Primer-synthetisierenden Firma (metabion bzw. Invitrogen) angegeben bzw. durch die sogenannte 2 + 4 Regel (jedes hybridisierende Guanosin oder Cytidin des Oligonukleotids steuert 4 °C, jedes Adenin oder Thymin 2 °C zur Schmelztemperatur bei) bestimmt. Für analytische PCRs wurde *Taq*-Polymerase, für präparative Zwecke wurden die *Pwo*- bzw. *Pfu*-Polymerasen, welche eine Proof-Reading-Funktion besitzen, verwendet.

2.3.4. Sequenzierung

Mutagenisierte Plasmide und neu hergestellte Konstrukte wurden mittels Sequenzierung nach Sanger (modifiziert) überprüft. Der Big DyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix, welcher neben einer thermostabilen Polymerase und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) auch verschieden markierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTPs) im geeigneten Puffer enthält, fand dabei Anwendung. Wird ein mittels Fluorophor (Fluoreszenz-Farbstoff) markiertes ddNTP eingebaut, kann die Polymerase keine weiteren Nukleotide anhängen und bricht die Reaktion ab. Dies passiert statistisch an jeder Stelle der DNA. Die Auftrennung der DNA-Fragmente nach ihrer Größe erfolgt mittels einer vollautomatischen Kapillarelektrophorese (ABI Prism 310 Genetic Analyser, ABI). Die markierten ddNTPs werden durch Laserstrahlung angeregt und können somit detektiert werden.

0,5 – 1 µg DNA wurden im 10 µl Reaktionsansatz mit 10 pmol Primer und 2 µl Premix (s.o.) in einem Thermocycler inkubiert (2 Min. 98 °C; 30 Zyklen (30 s 96 °C, 4 Min. 55 °C); 20 °C). Nicht eingebaute Nukleotide wurden durch eine Gelfiltration mit Sepharose G50 in einer Zentrifugations-Mikrosäule nach Herstellerangaben abgetrennt. 5 µl des Sequenzierungsansatzes wurden mit 20 µl *Template Supression Buffer* vermischt, 2 Min. bei 95 °C denaturiert und im *Genetic Analyser* analysiert.

2.3.5. Klonierung von PABPN1-PABPC1 Chimären

Folgende chimäre Proteine wurden hergestellt: H12, H4C, HR4. Sie weisen die folgende Zusammensetzung auf: H12 besteht aus der Helikalen Domäne des N-Terminus von PABPN1 (Aminosäuren (AS) 114-160) und den RNP-Motiven 1 und 2 von PABPC1 (AS 1-190). H4C enthält die Helikale Domäne von PABPN1 (AS 114-160), das RNP-Motiv 4 aus PABPC1 (AS 295-395) und den C-Terminus von PABPN1 (AS 258-306). HR4 umfasst die Helikale Domäne des N-Terminus und die RNP-Domäne von PABPN1 (AS 114-257) und das RNP-Motiv 4 von PABPC1 (AS 295-395). Die in Klammern angegebenen Aminosäuren beziehen sich auf das jeweilige Ursprungprotein. Eine Übersicht über die Proteine ist im Anhang dargestellt.

2.3.5.1. Klonierung von H12

Unter Nutzung der Oligonukleotide Nr. 45 und 61 (2.1.4.1) und pGM Δ N113 (2.1.5) als Template wurde die Helikale Domäne von PABPN1 amplifiziert (2.3.3). Die PCR-Produkte wurden phosphoryliert, aufgereinigt und in *Sma* I geöffneten pGEM-3Zf(+) (Promega) ligiert. *E. coli* XL 1 blue wurde mit diesen Ligationsansätzen transformiert. Die Plasmide der Transformanten wurden präpariert und einer *Nde* I/*Dra* I-Restriktion unterzogen.

Mittels der Primer 62 und 119 (siehe 2.1.4.1) wurde 12 mit einer zusätzlichen *Bgl* II-Schnittstelle hinter dem Stop-Codon amplifiziert. Bei der Restriktion mit *Bgl* II entstehen überhängende Enden, welche mit *Bam* HI-geschnittener DNA ligiert werden können. Das PCR-Produkt wurde phosphoryliert und mit *Bgl* II geschnitten. Durch die Ligation von *Bam* HI/*Nde* I geöffnetem pGM10[His]₆ mit *Nde* I/*Dra* I geschnittener Helikaler Domäne und dem phosphorylierten und *Bgl* II geschnittenem PCR-Produkt 12 und nachfolgender Transformation der DNA in *E. coli* XL 1 blue konnte das gewünschte Plasmid erhalten werden. Es wurde durch Restriktionsverdau und Sequenzierungen überprüft.

2.3.5.2. Klonierung von H4C und HR4

Zur Herstellung der RNA-Bindungsdomäne 4 (RBD 4) von PABPC1, welche mit flankierenden *Kpn* I-Schnittstellen versehen sein sollte, wurde der Klon N4C von U. Kühn

eingesetzt. Dieser Klon enthält den N-Terminus, die RBD 4 und den C-Terminus von PABPC1 im Vektor pRSET B. Zwischen dem N-Terminus und der RBD 4 befindet sich bereits eine *Kpn* I-Restriktionsschnittstelle. Zwischen dem RBD 4 und dem C-Terminus musste noch eine *Kpn* I-Schnittstelle eingefügt werden. Es wurde eine PCR (2.3.3) unter Nutzung der Primer Nr. 91 und 117 (siehe 2.1.4.1) durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde direkt mit *Kpn* I verdaut. Die RBD 4 mit flankierenden *Kpn* I-Schnittstellen konnten aus dem Agarosegel isoliert werden.

Unter Nutzung des Plasmids pGM Δ N113 (2.1.5) wurde mittels *Gene Editor Site Directed Mutagenesis* jeweils eine der zwei *Kpn* I-Schnittstellen an den Positionen 206bp (*Kpn* 1), 770 bp (*Kpn* 1) bzw. 917 bp (*Kpn* 4) eingefügt. Es entstanden die Plasmide pGM PABPN1-*Kpn* 1, pGM PABPN1-*Kpn* 2 und pGM PABPN1-*Kpn* 4 (siehe Abbildung 2.1). Ausgehend vom Plasmid pGM PABPN1-*Kpn* 2 wurde nach der Methode der *Quick Change Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) die jeweils zweite *Kpn* I-Schnittstelle eingefügt. Es wurden die Klone pGM PABPN1-*Kpn* 12 und pGM PABPN1-*Kpn* 24 erhalten (siehe Abbildung 2.1).

Aus dem Klon pGM PABPN1-*Kpn* 12 wurde die RNP-Domäne mittels Restriktionsverdau mit *Kpn* I entfernt. In das so linearisierte Plasmid wurde die RBD 4 mit flankierenden *Kpn* I-Schnittstellen ligiert und das Plasmid in *E. coli* transformiert. Es wurden Klone erhalten, in welchen die RBD 4 sowohl in richtiger als auch in falscher Orientierung vorlagen. Diese wurde mittels Restriktionsverdau mit *Eco* RI und *Hind* III überprüft.

Aus dem Plasmid pGM PABPN1-*Kpn* 24 wurde mittels *Kpn* I-Verdau der C-Terminus entfernt und RBD 4 in das linearisierte Plasmid ligiert. Nach der Transformation konnten Plasmide mit eingefügten RBD 4 nachgewiesen werden. Klone, bei denen RBD 4 in der richtigen Orientierung vorlag, wurden mittels Restriktionsverdau mit *Eco* RI und *Hind* III identifiziert. Sowohl die Inserts von H4C als auch von HR4 wurden mittels *Nde* I und *Bam* HI-Restriktion und anschließender Ligation in den Vektor pUK umgesetzt und daraufhin pUK HR4-Klone erhalten. Alle Klone wurden mittels Sequenzierung überprüft.

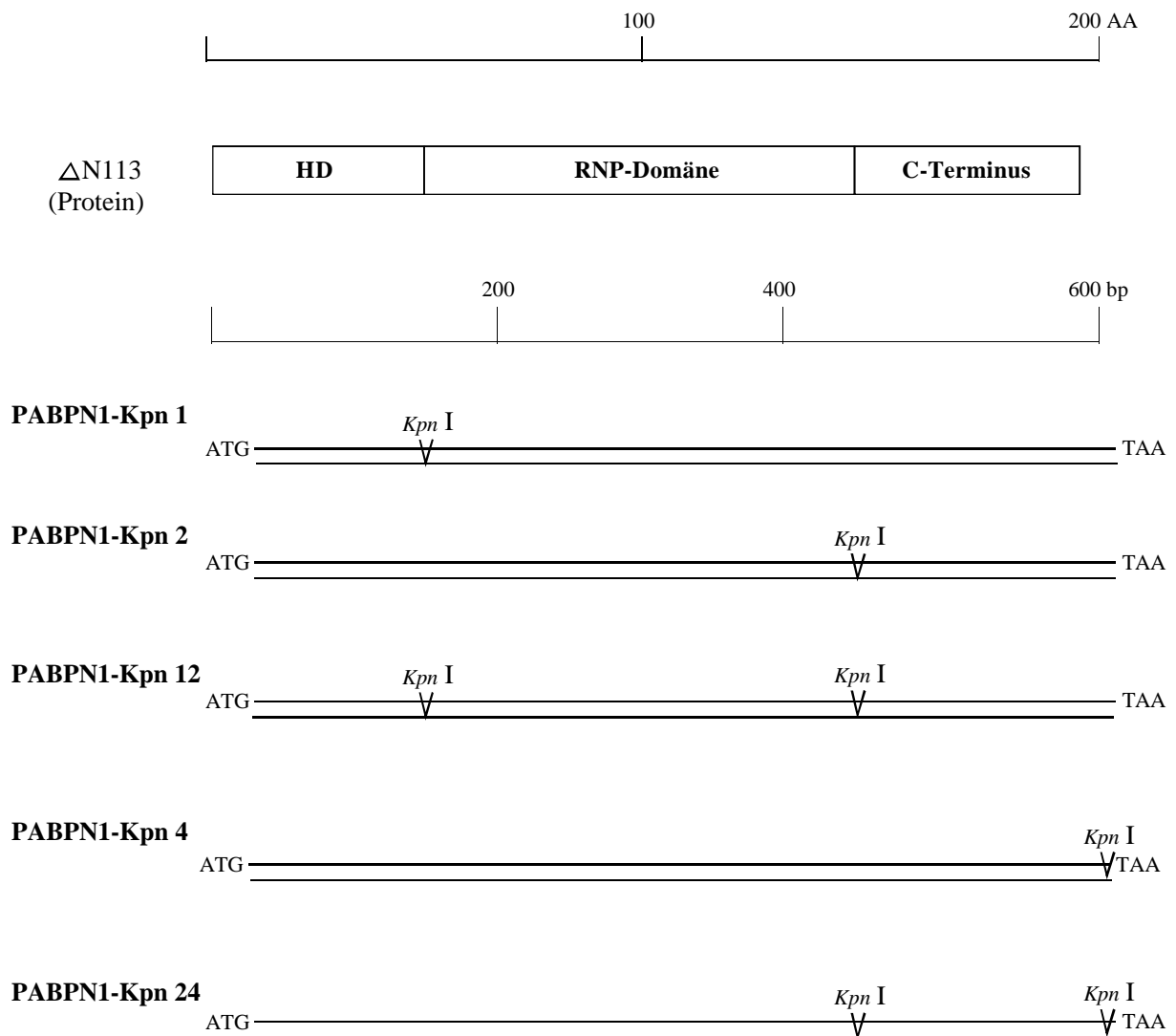


Abbildung 2.1: Inserts der PABPN1-Klone mit eingefügten *Kpn* I-Schnittstellen

Als Vergleich ist im oberen Teil das Wildtyp-Protein dargestellt, darunter sind die Inserts der PABPN1-Klone auf DNA-Ebene mit den eingefügten *Kpn* I-Schnittstellen abgebildet. ATG: Startcodon, TAA: Stopcodon, AA: Aminosäuren, HD: Helikale Domäne, bp: Basenpaare

2.3.6. Herstellung von PABPN1-Punktmutanten

Als Grundlage für die Klonierung aller Punktmutanten wurde das Plasmid pGM synPABPN1 (Kühn *et al.*, in Vorbereitung) eingesetzt. Das Plasmid enthält im N-Terminus des synthetischen Gens eine große Anzahl stiller Mutationen, wodurch der GC-Gehalt von ca. 75 % im Wildtyp-Gen auf ca. 50 % reduziert und damit die Expression des Gens erleichtert wird. Bei der Expression entsteht ein Fusionsprotein, welches einen N-terminalen Histidin-tag ([His]₆-tag: Met-Ala-His₆) und PABPN1 enthält.

Alle Punktmutanten wurden mit Hilfe der zielgerichteten Mutagenese hergestellt. Dazu stand der *Gene Editor Site Directed Mutagenesis*-Kit (Promega) zur Verfügung. Nach dem Protokoll der *Quick Change Site Directed Mutagenesis* (Stratagene) wurden weitere Punktmutanten hergestellt. Im ersteren Fall wird das Plasmid, welches die Wildtypsequenz enthält, denaturiert. Es folgt die Anlagerung des Mutagenese-Oligonukleotids und eines zweiten Oligonukleotids, welches eine Erweiterung der Ampicillin-Resistenz bewirkt. Mittels T4-DNA-Polymerase und T4-DNA-Ligase wird der mutierte Strang an den Wildtypstrang synthetisiert und in *E. coli* BMH 81-17 transformiert. Dieser Stamm verfügt über einen Defekt in der DNA-Reparatur und die mutierte DNA wird nicht repariert sondern vervielfältigt. Durch Zugabe eines Antibiotikagemisches zum Medium, in welchem nur Zellen mit mutierten Plasmiden überleben können, wird die Effizienz des Systems erhöht. Die Plasmide werden aus dem Stamm BMH 81-17 präpariert und in den Stamm JM 109 transformiert. Die aus diesem Stamm isolierten Plasmide werden auf den Erfolg der Mutation getestet.

Das *Quick Change Site Directed Mutagenesis*-Protokoll nutzt komplementäre Primer, welche beide die Mutation enthalten. Sie binden an die *wt*-DNA und mittels PCR (2.3.3) wird das vollständige Plasmid amplifiziert. Die parentale DNA wird unter Zuhilfenahme von *Dpn* I, welches nur methylierte und hemimethylierte DNA erkennt, verdaut. Die mutierte DNA wird in *E. coli* XL1 blue transformiert. Die Bakterien ligieren die Strangenden und mutierte Plasmide können präpariert werden. Die Oligonukleotide wurden nach Herstellerangaben konstruiert.

Der Erfolg der Mutationen konnte durch (als stille Mutationen) eingefügte Restriktionsschnittstellen überprüft werden. Ein Teil der Punktmutanten wurde noch in den Vektor pUK (2.1.5) über die Restriktionsschnittstellen *Nde* I und *Bam* HI umkloniert. Die *Inserts* aller Punktmutanten wurden durch Sequenzierung überprüft. Tabelle 2 gibt eine Übersicht über die hergestellten Punktmutanten von PABPN1 und die zur Herstellung verwendete Methode.

Tabelle 2: Die Punktmutanten von PABPN1

Es sind alle hergestellten Punktmutanten von PABPN1, die zur Herstellung verwendete Methode sowie der Vektor, in welchem die Mutante vorliegt, aufgelistet. *Quick Change: Quick Change Site Directed Mutagenesis* (nach einem Protokoll von Stratagene), *Gene Editor: Gene Editor Site Directed Mutagenesis* (Promega)

Punktmutante	Methode der Herstellung	Vektor
L119A	<i>Gene Editor</i>	pGM
E120A	<i>Gene Editor</i>	pUK
I122Q	<i>Quick Change</i>	pGM
K123A	<i>Gene Editor</i>	pUK
A124S	<i>Quick Change</i>	pGM
V126S	<i>Gene Editor</i>	pGM
M129A	<i>Quick Change</i>	pUK
E131A	<i>Gene Editor</i>	pUK
A133S	<i>Gene Editor</i>	pGM
K135A	<i>Quick Change</i>	pGM
L136A	<i>Quick Change</i>	pUK
L136S	<i>Gene Editor</i>	pGM
V143A	<i>Quick Change</i>	pGM
E187A	<i>Gene Editor</i>	pUK
E189A	<i>Quick Change</i>	pUK
A190S	<i>Quick Change</i>	pUK
E234A	<i>Gene Editor</i>	pUK

2.4. Herstellung radioaktiver RNA-Substrate

2.4.1. Radioaktive 5' Markierung von Nukleinsäuren

Zur 5'-Markierung von Nukleinsäuren wurde die γ -Phosphat-Gruppe von $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP auf das 5'-OH-Ende der RNA übertragen. Diese Reaktion wird von der Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert.

In einer 20 μl -Reaktion wurde das Substrat mit 10 U PNK (NEB) und 5-20 μCi $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ ATP (5000 Ci/nmol) in PNK-Puffer 90 Min. bei 37 °C inkubiert. Die markierte RNA wurde durch Ethanolfällung präzipitiert, während überschüssige Mononukleotide in Lösung blieben. Resuspendiert wurde die markierte RNA in 10 mM Tris-HCl, pH 8,0. Mittels DEAE-Methode (2.4.4) wurde die spezifische Aktivität der RNA bestimmt.

2.4.2. In vitro-Transkription

Substrat für die *in vitro*-Transkription ist das Plasmid pSP6-L3pre-A₁₅ (Kühn & Scholz). Es codiert für L3pre-A₁₅, welches sich von der L3-Polyadenylierungssequenz der Adenovirus-2 *major-late*-Transkriptionseinheit ableitet (Christofori & Keller, 1989). Das Substrat ist schon

gespalten (*precleaved*) und wird standardmäßig für die Untersuchung der von der Spaltung getrennten Polyadenylierungsreaktion verwendet, da es ein Wildtyp-Polyadenylierungssignal (AAUAAA) und einen Oligo(A₁₅)-Schwanz besitzt. Das Plasmid pSP6-L3pre-A₁₅ wird mit *Bbs* I geschnitten und direkt in der Transkription eingesetzt. Die transkribierte RNA hat eine Länge von 80 Nukleotiden (65 nt L3pre + 15 A).

Der Transkriptionsansatz von 20 µl setzte sich folgendermaßen zusammen: 1 x SP6-Puffer, 0,4 mM ATP, GTP, CTP, 0,1 mM UTP, 10 mM DTT, 1 µg pSP6-L3pre-A₁₅ (*Bbs* I geschnitten), 20 U RNasin, und 20 µCi [α -³²P] UTP. Durch Zugabe von 20 U SP6-RNA-Polymerase wurde die Reaktion gestartet. Nach 2 h Inkubation bei 37 °C wurden weitere 20 U SP6-RNA-Polymerase zugegeben und weitere 2 h bei 37 °C inkubiert. Die transkribierte RNA wurde mittels Ethanolfällung präzipitiert und auf ein 6 %-iges Polyacrylamidgel (2.3.2.2.) aufgetragen. Die radioaktiven Transkripte wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Diejenigen mit voller Länge wurden aus dem Gel ausgeschnitten und in 400 µl Gelelutionspuffer (500 mM Ammoniumacetat, 0,1 mM EDTA, 0,5 % (w/v) SDS) über Nacht im Thermoblock bei 37 °C leicht schüttelnd eluiert. Der Überstand wurde mit 400 µl Phenol/Chloroform-Gemisch (1:1) extrahiert und anschließend einer Ethanolfällung unterzogen. Das präzipitierte radioaktive L3pre-A₁₅ wurde in 20-50 µl Wasser resuspendiert und die spezifische Aktivität mittels DEAE-Papier bestimmt (2.4.4.). Pro *in vitro*-Transkription wurden 80-130 pmol Transkript erhalten.

2.4.3. Präparation von L3pre-A₂₅₀₋₃₀₀

L3pre-A₁₅ wurde mit einem Poly(A)-Schwanz von ca. 250-300 Adenylat-Resten versehen, um als Substrat für Experimente mit vollständig synthetisiertem Poly(A)-Schwanz zu dienen. Um den Oligo(A)-Schwanz von L3pre-A₁₅ zu verlängern, wurde zuerst mit wenig RNA getestet, nach welcher Reaktionszeit der Poly(A)-Schwanz aus ca. 250-300 AMP-Resten bestand. Ein einfacher Reaktionsansatz enthielt: 1 x SPAB (*Specific Polyadenylation Buffer*, 50 µM EDTA, 10 % Glycerin (v/v), 50 mM KCl, 0,01 % Nonidet P40, 25 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,4 mg/ml methyliertes BSA, 2,6 % Polyvinylalkohol (w/v), 1 mM DTT), 0,5 mM MnCl₂, 0,5 mM ATP, 5 U RNasin, 2 pmol L3pre-A₁₅ und 1,8 pmol Poly(A)-Polymerase. Es wurde ein Vielfachansatz der Reaktion pipettiert und nach den verschiedenen Zeitpunkten (1 Min. bis 30 Min.) wurden Aliquots entnommen und in Proteinase-K Mix (4 µg rRNA, 2 x Proteinase-K-Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,9, 150 mM NaCl, 12,5 mM EDTA, 1 % (w/v) SDS) 200 µg/ml Proteinase K) gegeben. Die RNA wurde präzipitiert, im Polyacrylamidgel

(2.3.2.2) aufgetrennt und dieses autoradiographiert. Der Zeitpunkt, zu welchem die Poly(A)-Schwänze die entsprechende Länge (ca. 250-300 AMP) aufwiesen, wurde für die Verlängerung der gesamten L3pre-A₁₅-RNA verwendet. Es wurde ein Vielfaches des Testansatzes pipettiert, die entsprechende Zeit inkubiert und die Reaktion abgestoppt. Die Auftrennung und Separation des L3pre-A₂₅₀ wurde wie unter 2.4.2. für L3pre-A₁₅ beschrieben durchgeführt.

2.4.4. DEAE-Methode zur Quantifizierung radioaktiver Markierungen

Die spezifische Aktivität von radioaktiv markierter RNA wurde mittels DEAE (Diethylaminoethyl)-Papier bestimmt. DEAE-Papier bindet Oligo- und Polynukleotide, währenddessen Mononukleotide nicht zurückgehalten werden.

Das DEAE-Papier wurde mit 10 mM Natriumpyrophosphat behandelt und mit Ethanol gewaschen und getrocknet. Es wurden verdünnte Proben des Reaktionsansatzes vor und nach der Reaktion und der aufgereinigten RNA auf DEAE-Papier gegeben und mehrere Male mit DE 81-Puffer (0,3 M Ammoniumformiat, pH 7,8 10 mM Natriumpyrophosphat, 0,1 % (w/v) SDS) gewaschen (Stayton & Kornberg, 1983). Die DEAE-Papiere wurden in Scintillationsflüssigkeit gegeben und die gebundene Radioaktivität im Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer, Packard) vermessen. Zur Bestimmung der eingesetzten Radioaktivität wurde ein Aliquot des Reaktionsansatzes ohne DEAE-Papier vermessen. Die Einbauraten von [γ -³²P] ATP und [α -³²P] UTP lagen zwischen 50 und 95 %. Die spezifische Aktivität der RNAs kann durch Bestimmung der eingebauten und der gefällten Radioaktivität berechnet werden.

2.5. Proteinmethoden

2.5.1. Expression von Proteinen in *E. coli*

Um neue Proteine herstellen zu können, wurden die Plasmide in *E. coli* BL21 pUBS transformiert (2.2.3). Das Plasmid pUBS kodiert für eine Arginin-tRNA, deren Codon (AGG) in Bakterien nur selten genutzt wird, in höheren Eukaryoten jedoch häufiger Verwendung

findet. Dadurch kann die Menge an hergestelltem Zielprotein erhöht werden. Die Zellen wurden nach der Transformation eine Stunde in 1 ml SB-Medium (2.1.2) bei 37 °C geschüttelt, und danach wurden weitere zwei ml SB-Medium mit den Selektionsantibiotika zugegeben. Es wurde anstelle von Ampicillin Carbenicillin (50 µg/µl) verwendet, ein Struktur analogon, welches hydrolyseresistenter ist. Dazu wurde zur Erhaltung des pUBS-Plasmides Kanamycin (50 µg/µl) ins Medium gegeben. Nach ca. drei Stunden Wachstum bei 37 °C wurde das Medium mit den Antibiotika gewechselt und die Menge an Medium schrittweise bis 800 ml Endvolumen erhöht. Da die schrittweise Erhöhung des Volumens auf 800 ml mehrere Tage in Anspruch nahm, wurden die Zellen über Nacht in frischem Medium im Kühlschrank gelagert. Bei einer OD₆₀₀ von eins bis zwei wurde die Synthese der T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 0,4 mM) und somit die Translation und Transkription des Zielproteins induziert. Die Kulturen wurden weitere drei bis vier Stunden bei 37 °C inkubiert. Um die Expression des Zielproteins verfolgen zu können, wurden vor der Induktion und vor der Zellernte 10 µl Kultur entnommen und mittels SDS-Gelelektrophorese (2.5.5) aufgetrennt.

2.5.2. Zellernte und -aufschluss

Bakterienkulturen wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 2000 g und 4 °C geerntet. Das Zellpellet wurde in 40 ml Lysispuffer (50 mM Tris-HCl, pH 8,0, 200 mM KCl, 10 % Glycerin (v/v), 0,01 % Nonidet P40, 1 mM PMSF, 2 µg/ml Leupeptin, 2 µg/ml Pepstatin, 15 µg/ml DNase I) resuspendiert. Die Zellen wurden in einem Eis-Salzbad mittels Ultraschall (Branson Sonifier, 6 mal jeweils 30 s Puls 50 % *duty cycle* bei Stufe 7 und 30 s Pause) aufgeschlossen. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 24000 g für 30 Min. bei 4 °C, um die Zelltrümmer zu präzipitieren. Als Rohextrakt wird der Überstand der Zentrifugation bezeichnet. Dieser wird direkt weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.5.3. Reinigung rekombinanter Proteine

Ni^{2+} -NTA-Agarose bildet Chelate mit dem $[\text{His}]_6$ -Fusionsanteil rekombinanter Proteine. Dadurch wird eine sehr effiziente Bindung der Proteine an das Säulenmaterial erreicht. Unspezifisch bindende Proteine können durch Waschen abgetrennt werden. Die Elution der Zielproteine vom Säulenmaterial erfolgte mittels eines Überschusses an Imidazol, einem Strukturanalogon von Histidin.

Alle rekombinanten Proteine wurden nativ bei 8-12 °C mit Ni^{2+} -NTA-Agarose (Qiagen) aufgereinigt. Die Reinigung erfolgte weitgehend nach Herstellerangaben. Für den Rohextrakt aus einer 800 ml Kultur wurde 300-500 μl Ni^{2+} -NTA-Agarose eingesetzt. Diese wurde mit Lysispuffer (2.5.2) equilibriert und zum Rohextrakt gegeben. Es folgte eine 4 bis 14-stündige Inkubation des Säulenmaterials mit dem Rohextrakt auf einem Rollenschüttler (Cat RM 5). Der gesamte Ansatz wurde über eine vorbereitete Leersäule (Econo-Säulen, Biorad) gegeben, dabei wurde der Durchfluss aufgefangen und ein zweites Mal auf die Säule appliziert. Unspezifisch bindende Proteine wurden durch einen Waschschrift mit zehn Säulenvolumen Lysispuffer entfernt, schwach bindende Proteine wurden durch zehn Säulenvolumen Lysispuffer mit 50 mM Imidazol vom Säulenmaterial gelöst. Die Elution erfolgte mittels zehn Säulenvolumen Lysispuffer, welcher 500 mM Imidazol enthielt. Das Eluat wurde aufgefangen, in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -70 °C aufbewahrt. Ein Aliquot für die SDS-Gelelektrophorese wurde vorher entnommen,

Die weitere Aufreinigung der rekombinanten Proteine erfolgte mittels FPLC (Fast Protein Liquid Chromatographie, Amersham Pharmacia). Dabei kamen Anionenaustauscher (MonoQ-Säulen) bzw. Kationenaustauscher (MonoS-Säulen) zur Anwendung. Die Ni^{2+} -NTA-Agarose-Eluate wurden gegen die Auftragspuffer der FPLC (Puffer D für MonoQ (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,01 % Nonidet P40, 50 mM KCl); bzw. Puffer E für MonoS (20 mM Hepes pH 8,0, 10 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 0,01 % Nonidet P40, 50 mM KCl)) dialysiert. Die Proteinlösung wurde 30 Min. bei 24000 g und 4 °C zentrifugiert und auf die FPLC-Säule appliziert. Der Durchfluss wurde aufgefangen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Proteine wurden mittels eines Salzgradienten (20-40 Säulenvolumen) von 50-750 mM KCl eluiert. Alle rekombinanten Proteine lagen nach der FPLC in reiner Form vor.

Waren rekombinante Proteine nach der FPCL nur in sehr verdünnter Form vorhanden, wurden sie mittels Centricon bzw. Vivaspin (2.1.8) nach Herstellerangaben konzentriert.

2.5.4. Proteinbestimmung

Bei der Bestimmung von Proteinkonzentrationen fanden verschiedene Methoden Verwendung: in den meisten Fällen wurde die Konzentration eines Proteins mittels Bio-Rad Protein-Assay (Bradford-Assay) nach Herstellerangaben ermittelt. Die Konzentration wurde durch Vergleiche mit der mitgeführten Standardproteinlösung (BSA) aus einer Eichgeraden ermittelt. In einigen Fällen wurde die Konzentrationsbestimmung anhand von Eichgelen durchgeführt. Dazu wurden verschiedene Mengen Eichprotein (BSA) und zu bestimmendes Protein im SDS-Gel (2.5.5) aufgetrennt, angefärbt und mittels Videodokumentationssystem (intas) digitalisiert. Die Intensität der Banden wurde im Computer quantitativ ausgewertet. Durch Vergleich der Intensitäten mit denen der BSA-Eichreihe lässt sich die Proteinkonzentration des Zielproteins bestimmen. Für einige Proteine wurde ein UV-Spektrum bestimmt, um die Proteinpräparation auf Kontaminationen mit DNA bzw. RNA zu überprüfen.

2.5.5. SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung

Zur Analyse von Proteinen wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophoresen nach Laemmli (1970) eingesetzt. Die Proteinlösungen wurden mit 2 x SDS-Probenpuffer (20 % (v/v) Glycerin, 10 mM Tris-HCl pH 6,8, 6 % (w/v) SDS, 5 % β -Mercaptoethanol, 0,01 % (w/v) Bromphenolblau) versetzt und 5 Min. bei 95 °C denaturiert. Bei konstanter Stromstärke (20 mA) wurden die Proteine im SDS-Laufpuffer (50 mM Tris, 0,38 M Glycin, 0,1 % (w/v) SDS) im elektrischen Feld aufgetrennt. Dabei fand der Molekulargewichtsmarker SDS-6H (2.1.3) Anwendung. Die Gele wurden nach der Elektrophorese mit Coomassie-Brillant Blue R 250 gefärbt und auf Filter-Papier (Whatmann) bei 60 °C unter Vakuum getrocknet.

2.5.6. Western-Blot-Analyse

Zum Nachweis geringer Proteinmengen wurden *Western-Blots* mit nachfolgender Antikörperbehandlung durchgeführt. Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine wurden mittels

einer *Semi-dry*-Blotapparatur (Pharmacia bzw. OWL) auf eine Nitrocellulose-Membran (Schleicher & Schuell) transferiert. Die auf der Membran gebundenen Proteine wurden mittels Ponceau S-Lösung (2 % Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure) sichtbar gemacht. Die enthaltene Trichloressigsäure fixiert die Proteine auf der Membran. Die Lage der Markerproteine wurde auf der Membran gekennzeichnet. Zur Absättigung freier Bindungsstellen wurde die Membran in TN-Tween-Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,05 % (v/v) Tween 20) mit 2,5 % Milchpulver für eine Stunde inkubiert. Der primäre Antikörper wurde in TN-Tween und 1,25 % Milchpulver 1:1000 bis 1:5000 verdünnt und darin die Membran für ein bis zwei Stunden inkubiert. Antikörper gegen PABPN1 wurden 1:1000 und gegen CPSF-100K 1:5000 verdünnt. Nachfolgend wurde die Membran dreimal mit TN-Tween-Puffer ohne Milchpulver gewaschen und mit 1:5000 verdünntem sekundären Antikörper (Schwein-Anti-Kaninchen-Antikörper mit gekoppelter Peroxidase, Dako) für eine Stunde inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TN-Tween wurde das Detektionssystem (Chemilumineszens Super Signal Substrat, Pierce) appliziert. Auf einem Röntgenfilm konnten die mit dem primären Antikörper interagierenden Proteine als schwarze Banden sichtbar gemacht werden.

2.6. Bestimmung der RNA-Bindung

2.6.1. Nitrocellulose-Filterbindungsassays

Zur Quantifizierung von Protein-RNA-Bindungen wurden Nitrocellulose-Filterbindungsassays durchgeführt. Als Substrate kamen 5'-³²P-markiertes A₁₅, A₂₅ und A₈₀ (2.1.4.2 und 2.4.1) zur Anwendung. Freie RNA kann den Nitrocellulose-Filter passieren, währenddessen Protein-gebundene RNA durch die Bindung des Proteins an den Filter zurückgehalten wird. Die Menge an Protein-gebundener radioaktiver RNA kann im Szintillationszähler (Liquid Scintillation Analyzer, Packard) bestimmt werden.

Die RNA wurde in 1 x Bindungspuffer (50 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5 mM DTT) mit der entsprechenden Proteinmenge in gleichbleibendem Volumen 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das Volumen an zugegebenem Protein betrug maximal 20 % des Gesamtvolumens, Proteinverdünnungen wurden mit 1 x Bindungspuffer hergestellt. Es wurden Vielfachreaktionen angesetzt, auf die Reaktionsröhrchen verteilt und die Proteine zugegeben. Die Nitrocellulose-Filter wurden in Waschpuffer mit rRNA (50 mM

Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 5 µg/ml rRNA (2.1.4.2)) vorinkubiert. 90 % des Ansatzes wurden auf den Filter gegeben, mit 5 ml eisgekühltem Waschpuffer wurde ungebundene RNA abgespült. Der Filter wurde in 3 ml Scintillationsflüssigkeit (2.1.8) gegeben und die gebundene Radioaktivität bestimmt. In jeder Versuchsreihe wurde der *Background* und die Menge an eingesetzter RNA ebenfalls ermittelt.

2.6.2. Quantifizierung der Polyadenylierung

2.6.2.1. Bestimmung von k_M und V_{max}

Um den Einfluss von PABPN1 auf die Enzymparameter der Poly(A)-Polymerase zu untersuchen, wurde der Einbau von [α - 32 P] ATP in den Poly(A)-Schwanz bestimmt. Als Substrat diente unfraktioniertes Poly(A). Die durchschnittliche Länge des Poly(A) betrug 170 Adenylat-Reste, dieses wurde durch Auftrennung im Acrylamidgel gleichzeitig mit einem Größenmarker bestimmt.

Zur Bestimmung von k_M und V_{max} der Poly(A)-Polymerase wurden folgende Komponenten in einen 25 µl-Ansatz gegeben: 1 x SPAB (2.4.3), 20 fmol PAP und 3-200 nmol Poly(A). Die Reaktion wurde 2 Min. bei 37 °C vorinkubiert und durch Zugabe von ATP (0,5 mM Endkonzentration, ca. 1.250.000 cpm) gestartet und nach 10 Min. durch 100 µl 10 % Trichloressigsäure (TCA), 100 mM Natriumpyrophosphat abgestoppt. Der gesamte Reaktionsansatz wurde auf einen Glasfaserfilter appliziert und viermal mit je ca. 1,5 ml 1 % TCA, 10 mM Natriumpyrophosphat und einmal mit ca. 1,5 ml Ethanol gewaschen. Die Filter wurden in je 3 ml Scintillationscocktail gegeben und die eingebaute Radioaktivität bestimmt.

Um den Einfluss von PABPN1 auf k_M und v_{max} der PAP zu beleuchten, wurde zunächst das optimale Verhältnis von Poly(A) zu PABPN1 bestimmt. In 25 µl wurde zu 0,1 µg Poly(A) 200 fmol PAP und 20-60 pmol PABPN1 gegeben und der Einbau von ATP wie oben beschrieben bestimmt. Eine 25 µl Reaktion für die Bestimmung von k_M und V_{max} mit PABPN1 enthielt folgende Bestandteile: 200 fmol PAP und 14-580 pmol PABPN1 besetztes Poly(A). Die RNA-Konzentrationen beziehen sich auf die 3'-OH-Enden. Die Vorgehensweise entsprach derer der unstimulierten Reaktion.

2.6.2.2. Bestimmung der Anzahl von PABPN1, welche mit der PAP interagieren

Um zu bestimmen, wie viele Moleküle PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase interagieren, wurde der Einbau von [α - 32 P] ATP in den Poly(A)-Schwanz wie unter 2.6.2.1 beschrieben, bestimmt. Der Poly(A)-Schwanz wurde zu 80 % mit PABPN1 bedeckt und der Einbau von radioaktivem AMP detektiert. Ein 25 μ l-Ansatz enthielt 1,7 pmol 3'ends A₉₄, 200 fmol PAP, 8,5 pmol PABPN1, 0,5 mM ATP. Der PABPN1-Pool enthielt 0 bis 100 % L136S.

2.6.3. Gelretardationsexperimente

Protein-RNA-Komplexe können im nativen Gelsystem sichtbar gemacht werden. Dabei bewegt sich an Proteine gebundene RNA langsamer als freie. Wird radioaktiv markierte RNA eingesetzt, können die Komplexe auf Röntgenfilm bzw. mittels eines Phosphor-Imagers sichtbar gemacht werden.

Es wurden 50 ml 4 % Polyacrylamid (80:1) in 0,5 x TBE (2.3.2.1) hergestellt, gemischt und mit je 170 μ l 10 % Ammoniumpersulfat (APS) und TEMED wurde die Polymerisation des Gels gestartet. Die Gellösung wurde zwischen die Gelplatten (20 x 20 x 0,1 cm) gefüllt, bei Raumtemperatur polymerisierte das Gel aus. Nach 30-minütigem Vorlauf (20 V/cm) in 0,5 x TBE wurden die Reaktionen ohne Verwendung von jeglichem Probenpuffer bei angelegter Spannung auf das Gel geladen. Als Markierung für das Fortschreiten der Elektrophorese diente DNA-Ladepuffer (2.3.2.1) in den äußersten Taschen des Gels. Das Gel wurde bei Raumtemperatur einer Elektrophorese unterzogen.

Die Bindungsreaktionen von PAP/CPSF/PABPN1 an die RNA erfolgte unter Polyadenylierungsbedingungen (2.7.2), es wurde jedoch kein ATP zum Start der Polyadenylierung zugegeben. Die Formation der Protein-RNA-Komplexe erfolgte für 30 Min. bei 37 °C, danach wurden die Proben direkt auf oben beschriebene native Gele aufgegeben.

Um die Zusammensetzung des Polyadenylierungskomplexes auf L3pre-A₂₅₀ zu untersuchen, wurden folgende Komponenten im 50 μ l Reaktionsansatz zusammengegeben: 1 x SPAB (2.4.3), 5 U RNasin, 160 fmol PAP, 240 fmol CPSF, 3,2 pmol PABPN1 bzw. PABPN1-Punktmutanten und 160 fmol L3pre-A₂₅₀. Die Reaktionen wurden 30 Min. bei 37 °C inkubiert und im nativen Gel aufgetrennt. Die Detektion der Radioaktivität erfolgte bei -70 °C durch Autoradiographie. Die Position des Filmes auf dem Gel wurde eindeutig gekennzeichnet. Die

Separation der radioaktiven RNA bzw. RNA-Protein-Komplexe erfolgte durch Ausschneiden aus dem gefrorenen Gel an den Stellen, wo der Röntgenfilm eine Schwärzung aufwies. Die Gelstücke mit den RNA-Protein-Komplexen wurden bis zum Auftragen auf das SDS-Gel bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Auftrennung der in den Komplexen enthaltenen Proteine erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese (2.5.5). Dazu wurden die gefrorenen Gelstücke direkt in die Taschen des SDS-Gels gegeben und aufgetrennt. Die Proteine wurden auf Nitrocellulose transferiert und durch Immunfärbung mit α -CPSF-100K analysiert (2.5.6).

2.7. Polyadenylierungsexperimente

2.7.1. Verlängerung von A_{80}

Die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase durch verschiedene PABPN1-Punktmutanten bzw. chimäre Proteine wurde auf A_{80} getestet. Dazu wurden Polyadenylierungsreaktionen durchgeführt. 25 μl Ansätze enthielten folgende Bestandteile: 1 x SPAB (2.4.3), 2 mM Magnesiumacetat, 80 fmol A_{80} , 2,5 U RNasin, 50 fmol PAP und steigende Mengen (100-1600 fmol) PABPN1, PABPN1-Punktmutanten bzw. chimäre Proteine. Es wurden Mehrfachansätze hergestellt, auf die Reaktionsgefäße verteilt und die Proteine zugegeben. Die Ansätze wurden 2 Min. bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von ATP (0,5 mM Endkonzentration) gestartet und nach 15 Min. Reaktionszeit durch Zugabe von Proteinase-K-Mix (2.4.3) abgestoppt. Die RNA wurde mittels Ethanol gefällt, die Präzipitate in 10 μl Formamid-Ladepuffer (2.3.2.2) aufgenommen, 5 Min. bei $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ erhitzt und im 5-8 %-igen denaturierenden Polyacrylamidgel (2.3.2.2) aufgetrennt. Die Gele wurden mittels Phosphor-Imaging ausgewertet. Wurden Änderungen von den hier angegebenen Bedingungen vorgenommen, ist dies bei den jeweiligen Experimenten vermerkt.

2.7.2. Prozessive Polyadenylierung von L3pre- A_{15}

Verfügt eine RNA über ein Polyadenylierungssignal, kann der Poly(A)-Schwanz der RNA durch die Poly(A)-Polymerase mit Hilfe von CPSF und PABPN1 prozessiv bis zu einer

Länge von etwa 250 nt verlängert werden (1.2.2). Für einen 25 µl-Ansatz wurden folgende Komponenten pipettiert: 12 fmol PAP, 265-300 fmol PABPN1, 80 fmol L3pre-A₁₅ und 120 fmol CPSF in 1 x SPAB (2.4.3). Es wurden Mehrfachreaktionen hergestellt und für 2 Min. bei 37 °C vorinkubiert. Zum Start der Reaktion wurde ATP (0,5 mM Endkonzentration) zugegeben und nach entsprechenden Zeitpunkten (30 s, 1 Min., 3 Min., 6 Min.) wurden Aliquots entnommen, welche mittels Proteinase-K-Mix (2.4.3) abgestoppt wurden. Weiter wurde wie unter 2.7.1 beschrieben verfahren. Wurden Änderungen von den hier angegebenen Bedingungen vorgenommen, ist dies bei den jeweiligen Experimenten vermerkt.

2.7.3. Polyadenylierung von L3pre-A₂₅₀

Zur Überprüfung der Polyadenylierungsreaktion auf vollständig verlängerter RNA wurde L3pre-A₂₅₀ (2.4.2 und 2.4.3) als Substrat verwendet. Der Ansatz setzte sich analog zu 2.7.2 zusammen, jedoch wurden die Menge an PABPN1 erhöht, um eine volle Bedeckung des Poly(A)-Schwanzes zu gewährleisten. Es wurde pro Reaktion eingesetzt: 9 fmol PAP, 2 pmol PABPN1, 80 fmol L3pre-A₂₅₀, 100 fmol CPSF. Es wurde ebenfalls eine Kinetik aufgenommen mit den Zeitpunkten 10 Min., 30 Min. und 60 Min. Die Reaktionsprodukte wurden im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt.

3. Ergebnisse

Das nukleäre Poly(A)-Bindungsprotein 1 (PABPN1) wurde von Nemeth *et al.* (1995) kloniert, überexprimiert und hinsichtlich seiner RNA-Bindungseigenschaften untersucht. Die RNP-Domäne und der C-Terminus sind für die Affinität zur RNA verantwortlich. Die Interaktionen von PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase wurden von C. Temme (Diplomarbeit, 1998) näher betrachtet. Eine direkte Wechselwirkung zwischen den Proteinen konnte nicht eindeutig nachgewiesen werden. Die Wahrscheinlichkeit, dass solch eine direkte Wechselwirkung besteht, welche nicht RNA-vermittelt ist, ist jedoch sehr hoch. Unter diesen Voraussetzungen sollten im Rahmen dieser Arbeit weitere Untersuchungen zu den Wechselwirkungen von PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase sowie zur Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze durchgeführt werden.

3.1. *Der Einfluss von PABPN1 auf K_M und v_{max} der Poly(A)-Polymerase*

Die Poly(A)-Polymerase allein addiert nur sehr langsam Adenylatreste an das 3'OH-Ende der prä-mRNA. PABPN1 und CPSF können die Poly(A)-Polymerase zu einer prozessiven Synthese stimulieren. Um den Einfluss von PABPN1 auf die Poly(A)-Polymerase in der Polyadenylierungsreaktion unter spezifischen Bedingungen (mit Mg^{2+}) näher zu charakterisieren, wurden die enzymkinetischen Parameter $K_M(\text{Poly(A)})$ und V_{max} der Poly(A)-Polymerase während der Addition von Adenylatresten in Ab- und Anwesenheit von PABPN1 untersucht. Es wurde der Einbau von $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}] \text{AMP}$ in unfraktioniertes Poly(A) bestimmt (2.6.2.1). Die Menge an eingebautem radioaktiven AMP wurde in Abhängigkeit von der Substratkonzentration quantitativ erfasst. Das Ergebnis des Einbaus von radioaktivem AMP in das unbedeckte Poly(A) ist in Abbildung 3.2 A dargestellt.

Für die Bestimmung der Parameter von PABPN1-bedecktem Poly(A) wurde zuerst das optimale Verhältnis von PABPN1 zu Poly(A) ermittelt. Es ergab sich ein Optimum von 1 pmol PABPN1 pro 8 pmol Poly(A) (AMP, siehe Abbildung 3.1).

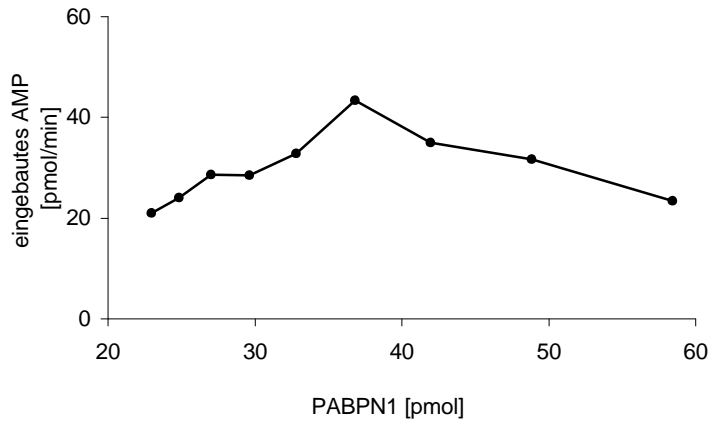


Abbildung 3.1: Bestimmung des optimalen Verhältnisses von Poly(A) zu PABPN1

Zu 290 pmol (100 ng) Poly(A) (AMP) und 20-60 pmol PABPN1 wurden im 50 μ l-Ansatz 200 fmol PAP gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von [α - 32 P] ATP gestartet und nach 10 Min. mittels 10 % TCA, 100 mM Natriumpyrophosphat abgestoppt. In der unstimulierten Reaktion wurden unter diesen Bedingungen 0.3 pmol AMP/Min. eingebaut.

Für die Bestimmung der Parameter der Poly(A)-Polymerase auf PABPN1-besetztem Poly(A) wurden die Poly(A)-PABPN1-Komplexe im oben ermittelten optimalen Verhältnis eingesetzt und der Einbau an radioaktivem AMP bestimmt. In Abbildung 3.2 **B** ist die ermittelte Substratabhängigkeit dargestellt.

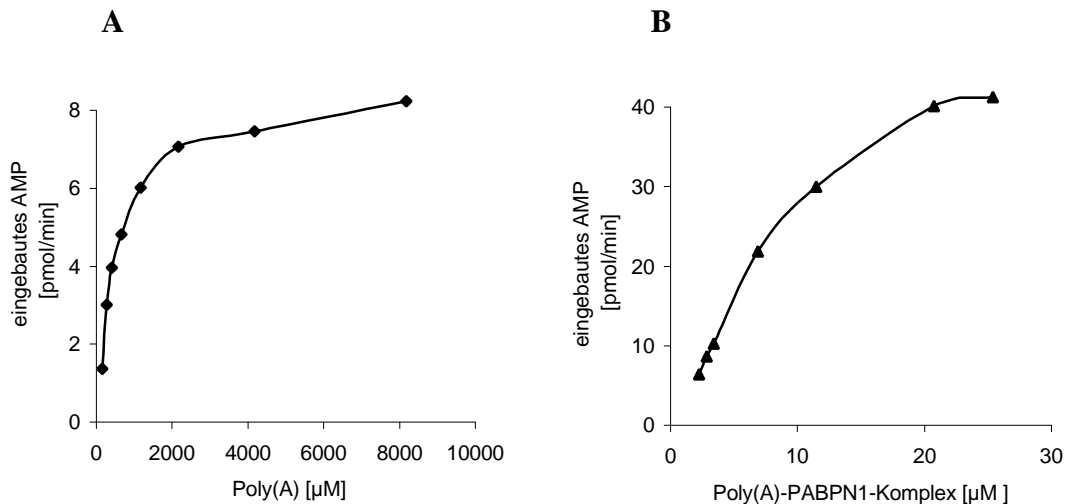
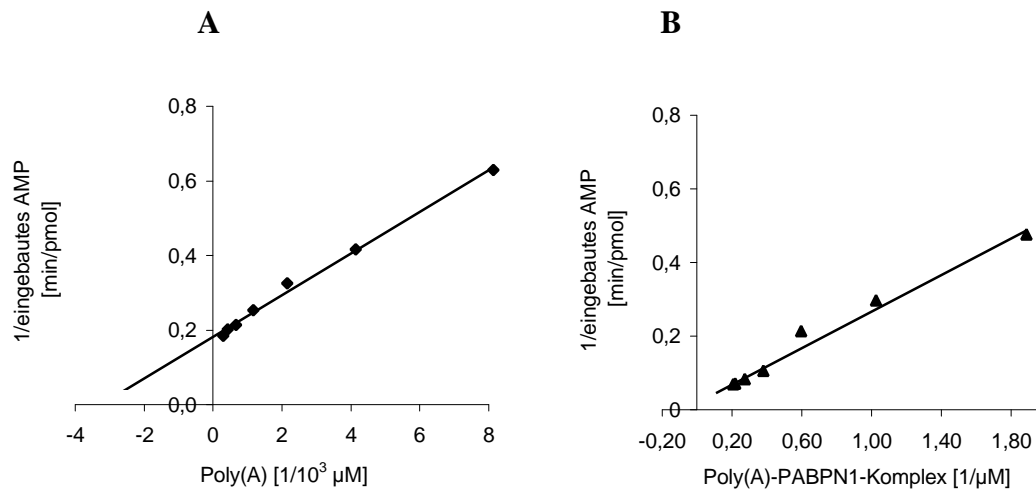


Abbildung 3.2: Bestimmung von k_M (Poly(A)) und V_{max} der Poly(A)-Polymerase

Zur Bestimmung der Parameter wurden in **A** 2-200 nmol Poly(A) mit 20 fmol PAP versetzt bzw. in **B** 14-580 pmol PABPN1 besetztes Poly(A) mit 200 fmol PAP eingesetzt. Die Reaktionen wurden mittels $5'$ - 32 P-ATP-Zugabe gestartet und nach 10 Min. Inkubation bei 37 $^{\circ}$ C abgestoppt. Die Konzentration (μ M) des Poly(A)/PABPN1-Komplexes (B) bezieht sich auf Poly(A), welches im Verhältnis 1 pmol PABPN1/8 pmol Poly(A) (AMP) eingesetzt wurde.

Um die Parameter K_M und V_{max} zu bestimmen, wurden die ermittelten Daten doppelt reziprok aufgetragen. Die Lineweaver-Burk-Diagramme sind in Abbildung 3.3 dargestellt.



$$K_M = 2,2 \mu\text{M } 3'\text{OH-Enden Poly(A)}$$

$$V_{max} = 4 \mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$$

$$K_M = 0,076 \mu\text{M } 3'\text{OH-Enden Poly(A)}$$

$$V_{max} = 3,5 \mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$$

Abbildung 3.3: Lineweaver-Burk-Auftragung der Daten zur Bestimmung von K_M und v_{max}

Die Daten aus Abbildung 3.2 wurden nach Lineweaver-Burk linearisiert und die Parameter K_M und v_{max} mittels der Geradengleichungen berechnet. Die Messungen wurden mehrfach durchgeführt. Die Standardabweichung des k_M für Poly(A) betrug $s=0,28 \mu\text{M}$, für den Poly(A)-PABPN1-Komplex $s=0,0013 \mu\text{M}$. Die Standardabweichungen der V_{max} betragen $s=0,67 \mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$ für Poly(A) und $s=0,45 \mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$ für den Poly(A)-PABPN1-Komplex.

Aus den Geradengleichungen der Lineweaver-Burk-Auftragungen wurden $K_M(\text{Poly(A)})$ und V_{max} ermittelt. Die Bestimmungen wurden jeweils mehrfach durchgeführt, eines der Experimente mit den Ergebnissen ist jeweils dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass PABPN1 den K_M der Poly(A)-Polymerase für Poly(A) um etwa den Faktor 30 verringert, wohingegen v_{max} gleich bleibt. Dies deutet darauf hin, dass PABPN1 die Affinität der Poly(A)-Polymerase zum Substrat erhöht, jedoch nicht direkt in die Katalyse eingreift.

3.2. Der Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Stimulierung der Polyadenylierung

Von A. Nemeth (Doktorarbeit, 1998) wurden erste Experimente zur Domänenstruktur von PABPN1 durchgeführt. Verschiedene Deletions- und Punktmutanten wurden hinsichtlich

ihrer RNA-Bindung und der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase untersucht. Es stellte sich heraus, dass an der RNA-Bindung nur die RNP-Domäne und der C-Terminus beteiligt sind. Für die Substratspezifität zeichnet die RNP-Domäne verantwortlich.

Drei Punktmutanten in der RNP-Domäne (Y175A, F215A und Y175/F215A) wurden von A. Nemeth kloniert, überexprimiert und hinsichtlich Bindung an die RNA überprüft. Der Name der Punktmutanten enthält die ursprüngliche Aminosäure, deren Position im Protein PABPN1 und die Aminosäure, gegen die sie ausgetauscht wurde. Dabei bedeutet z.B. Y175A, dass die Aminosäure Tyrosin an Position 175 im Protein PABPN1 gegen Alanin ausgetauscht wurde.

Die Aminosäuren Y175 und F215 befinden sich in den β -Faltblättern β 1 bzw. β 3 der RNA-Bindungsdomäne (siehe 1.2.3). Vier weitere hochkonservierte Aminosäuren in den α -Helices auf der „Rückseite“ der RNP-Domäne (E187, E189, A190 in α 1 und E234 in α 2, siehe 1.2.3) sollten im Rahmen dieser Arbeit mutiert werden, um auch den Einfluss der α -Helices auf die RNA-Bindung und die Stimulierung der Polyadenylierung zu untersuchen.

3.2.1. Klonierung und Überexpression der Punktmutanten

Die Punktmutanten Y175A, F215A und Y175/F215A wurden von U. Kühn als homogene Proteine erhalten. Die Mutanten E187A, E189A, A190S und E234A wurden mittels *Site Directed Mutagenesis* unter Verwendung der in Tabelle 1 genannten Oligonukleotide in den Vektor pGM synPABPN1 eingefügt (siehe 2.3.6). Die Inserts einiger Punktmutanten wurden in den Vektor pUK (2.1.5) versetzt, um die Effizienz der Überexpression zu erhöhen (siehe Tabelle 2, Seite 28). Die Richtigkeit der Sequenzen wurde mittels Restriktion und Sequenzierung überprüft.

Die Punktmutanten wurden in *E. coli* BL 21 pUBS überexprimiert (2.5.1). In der Mehrzahl der Fälle konnte schon im Rohextrakt überexprimiertes Protein nachgewiesen werden. Dies war besonders deutlich bei den Proteinen zu erkennen, deren Gen in den Vektor pUK versetzt wurde. Die Proteine wurden einer Reinigung an Ni^{2+} -NTA-Agarose (2.1.6) unterzogen. Die Eluate der Säule wurden gegen Puffer E (2.5.3) dialysiert und die Proteine mittels FPLC auf einer MonoS-Säule (2.5.3) zur Homogenität gereinigt. Die Konzentrationen der Proteine wurden mittels Bradford-Protein-Assay oder durch Vergleich mit bekannten Mengen BSA aus dem SDS-Gel bestimmt (2.5.4).

3.2.2. Die RNA-Bindung der Punktmutanten in der RNP-Domäne

Die Mutanten Y175 und F215 wurden bereits hinsichtlich ihrer RNA-Bindung charakterisiert (Nemeth, Doktorarbeit 1998, Kühn *et al.*, in Vorbereitung). Für die Mutante Y175A konnte eine 30-fach verringerte Affinität zu Oligo(A) detektiert werden. Die Mutante F215A und die Doppelpunktmutante Y175A/F215A erfuhren eine 75- bis 80-fache Verringerung der Affinität zu Oligo(A).

Die RNA-Bindung aller im Rahmen dieser Arbeit hergestellten PABPN1-Punktmutanten (siehe auch 3.5) wurde im Vergleich zum wt PABPN1 mittels Filterbindungsassays bestimmt. Alle angefertigten Punktmutanten wurden auf ihre Bindung an 5'-radioaktiv markiertes A₁₅ geprüft. Als Kontrolle wurde dabei wt PABPN1 verwendet. Sowohl das Wildtypprotein als auch die Punktmutanten verfügen über einen N-terminalen [His]₆-tag.

Zu 2,5 fmol A₁₅ (3' OH-Enden) wurden steigende Mengen Protein titriert, die Reaktionen 30 Min. inkubiert und mittels Filterbindungsassays die an Protein gebundene RNA-Menge bestimmt (2.6.1). Das Ergebnis der Messungen ist am Beispiel von zwei Mutanten in Abbildung 3.4 dargestellt.

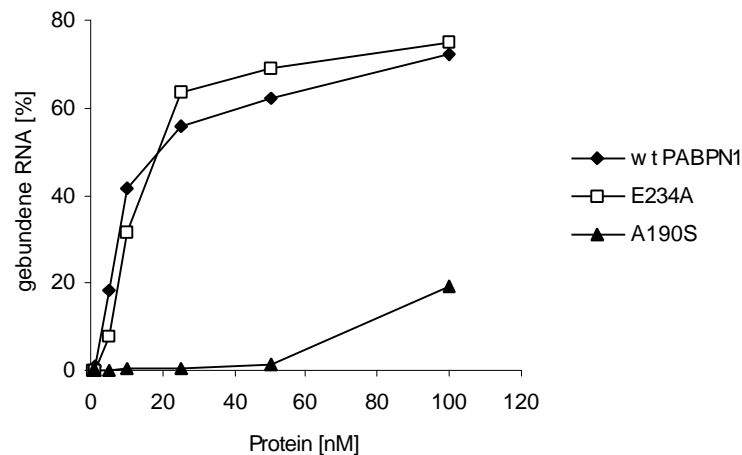


Abbildung 3.4: Die RNA-Bindung der Mutanten A190S und E234A

2,5 fmol radioaktiv markiertes A₁₅ (3' OH-Enden) wurde mit 0,5-100 nM Protein versetzt, 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und die Reaktionen auf Nitrocellulose-Filter appliziert. Ungebundene RNA wurde von den Filtern gewaschen, die gebundene RNA-Menge mittels Szintillationszählung bestimmt und graphisch aufgetragen.

Die Mutanten E189A und E234A banden etwa mit Wildtypaffinität RNA. Ein K_D von ca. 8-10 nM konnte aus den Bindungskurven abgelesen werden. Die RNA-Bindung von E187A war etwas reduziert, ein K_D von etwa 60 nM wurde abgeschätzt. A190S wies einen schweren

Defekt in der RNA-Bindung auf, sehr viel Protein ist nötig, um auch nur 20 % der RNA zu binden. Ein K_D konnte bei dieser Mutante nicht abgeschätzt werden, da keine höheren Proteinkonzentrationen als 100 nM eingesetzt wurden. Die Mutante A190S ist wahrscheinlich durch den Austausch von Alanin gegen Serin strukturell verändert. Ein direkter Einfluss der Mutation auf die RNA-Bindung ist dahingehend unwahrscheinlich, da die Mutation auf der „Rückseite“ des RNP-Motivs liegt, welche nicht an der RNA-Bindung beteiligt sein sollte (siehe auch 1.2.3). Dadurch lassen sich aus den Ergebnissen für diese Mutante keine Schlüsse ziehen.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass schon der Austausch einer einzelnen Aminosäure in den β -Faltblättern der hochkonservierten RNP-Domänen (Y175A, F215A) zur rapiden Verschlechterung der RNA-Bindung führt. Mutationen in den α -Helices der RNA-Bindungsdomänen verändern kaum oder gar nicht die RNA-Bindungseigenschaften der Proteine (E187A, E189A, E234A).

3.2.3. Ist die RNA-Bindung von PABPN1 Voraussetzung für die Stimulation der Polyadenylierung?

Die β -Faltblätter der RNP-Domäne stehen mit der RNA in Wechselwirkung (siehe 3.2.2). Die RNP-Motive umfassen sechs bzw. acht Aminosäuren und sind somit zu klein, um gleichzeitig in Interaktionen mit RNA und Proteinen zu treten.

Um einen direkten Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Polyadenylierung nachzuweisen, wurden die Punktmutanten der RNP-Domäne in *in vitro*-Polyadenylierungsreaktionen untersucht (2.7.1). Eine verringerte Affinität zur RNA sollte zu Defekten in der Stimulation der Polyadenylierung führen. Es wurde die Verlängerung von A_{80} durch die Poly(A)-Polymerase mit den Punktmutanten beobachtet.

Abbildung 3.5 A zeigt das Ergebnis der Polyadenylierung von A_{80} mit den Mutanten Y175A, F215A und Y175/F215A. F215A und Y175A/F215A zeigten starke Defekte in der Stimulation der Polyadenylierung (siehe Spuren 14 bis 23). Erst durch Einsatz der vierfachen Proteinmenge waren die Mutanten in der Lage, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren. Die Stimulierungsrate des Wildtyps konnte mit den hier getesteten Proteinkonzentrationen jedoch nicht erreicht werden. Die Mutante Y175A stimuliert auf A_{80} die Poly(A)-Polymerase wie das Wildtypprotein. Dies war ein unerwartetes Ergebnis, da die Mutante über starke Defekte in

der RNA-Bindung verfügt. Erst durch Einsatz von Oligo(A₂₅) als Primer konnte die erwartete Verringerung der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase beobachtet werden (Abbildung 3.5 B, Spuren 6-9). Der Unterschied in der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase auf Oligo(A) und Poly(A) könnte in der Kooperativität von PABPN1 begründet liegen. Möglicherweise wird die RNA-Bindung auf Poly(A) durch die Kooperativität insoweit verbessert, dass eine für die Stimulierung ausreichende Bindung des Substrats erfolgen kann. Die Ergebnisse der RNA-Bindung und der Stimulation der Polyadenylierung sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

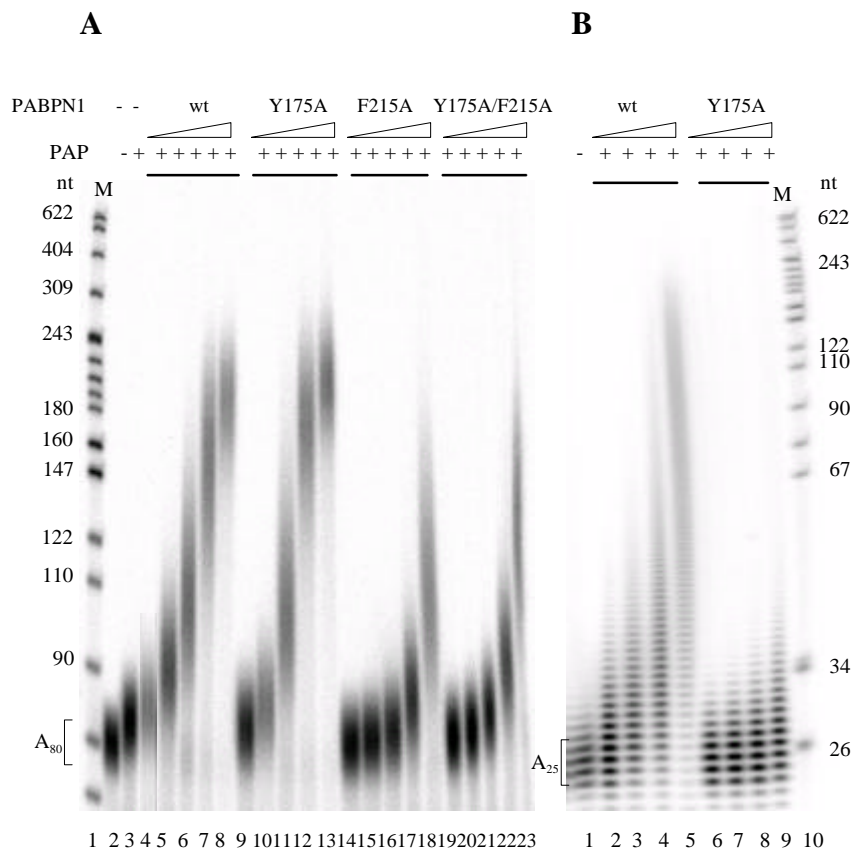


Abbildung 3.5: Stimulierung der Polyadenylierung durch Y175A, F215A und Y175A/F215A

80 fmol 5'-markierte RNA wurden mit 50 fmol PAP und steigenden Mengen Protein (PABPN1 bzw. Punktmutanten) versetzt, 2 Min. bei 37 °C inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet und nach der Reaktionszeit mittels Proteinase K-Verdau abgestoppt. **A:** Substrat war A₈₀, 100, 200, 400, 800, 1600 fmol Protein wurde zugegeben, Reaktionszeit 15 Min. **B:** Substrat war A₂₅, 200, 400, 800, 1600 fmol Protein wurde zugegeben, 30 Min. Reaktionszeit

Tabelle 3: Die RNA-Bindung und die Stimulation der Polyadenylierung durch die Punktmutanten

Die Bezeichnung „- / wt“ gibt das unterschiedliche Verhalten der Mutante A175A auf Oligo(A) und Poly(A) wieder, *wt*: wie der Wildtyp, -: reduziert, - -: stark reduziert

Punktmutante	RNA-Bindung	Stimulation der Polyadenylierung
Y175A	--	- / <i>wt</i>
F215A	--	-
Y175/F215A	--	-
E187A	(-)	<i>wt</i>
E189A	<i>wt</i>	<i>wt</i>
A190S	--	-
E234A	<i>wt</i>	<i>wt</i>

Aus Tabelle 3 kann man erkennen, dass es einen Zusammenhang zwischen RNA-Bindung und Stimulation der Polyadenylierung gibt. Proteine mit starken Defekten in der RNA-Bindung (Mutanten F215A, Y175/F215A und A190S) sind auch nur in begrenztem Maße zur Stimulation der Polyadenylierung befähigt. Geringe Defekte in der RNA-Bindung können jedoch in einer dem Wildtyp ähnlichen Stimulation der Polyadenylierung resultieren (siehe Mutante E187A). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass für eine effektive Polyadenylierung die Bindung an die RNA eine Grundvoraussetzung ist.

3.3. Die Mutante DN113

Es wurden Sequenzvergleiche von bovinem PABPN1 (EMBL X89969) mit dem humanen PABPN1 (EMBL AF026029), Maus-PABPN1 (EMBL U93050), ROX 2 (dem PABPN1-Homologen aus der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster*, EMBL L34934), PABPC1 aus *Xenopus laevis* (EMBL AF257236), PABPC1 aus *C. elegans* (EMBL Z81037.1) und einem PABPN1-ähnlichen Protein aus *Schizosaccharomyces pombe* (EMBL Z99759.1) durchgeführt (siehe Abbildung 3.7). Dabei treten bis zu 96,7 % Identität auf Aminosäureebene (bovines und Maus-PABPN1) auf.

ROX2 und die Proteine aus *S. pombe* und *C. elegans* sind deutlich kürzer als das bovine PABPN1. Es unterscheiden sich vor allem die N-Termini der Proteine. Ein großer Teil des N-

Terminus des bovinen PABPN1 ist in den oben genannten Proteinen gar nicht vorhanden. Eine signifikante Aminosäure-Identität tritt erst ab der Aminosäure 116 auf. Dies könnte darauf hindeuten, dass für die Funktion des bovinen Proteins die Aminosäuren 1-115 von keiner großen Bedeutung sind. Um dies zu untersuchen, wurde von C. Temme (Diplomarbeit, 1989) eine N-terminale Mutante von PABPN1 kloniert. Das Protein Δ N113 enthält die Aminosäuren 114-306 und einen N-terminalen [His]₆-tag (2.3.6). Als Vektor diente pGM 10. Eine weitere N-terminal verkürzte Version des Proteins wurde von A. Nemeth (Doktorarbeit, 1998) hergestellt. Die Mutante Δ N160 enthält nur noch die RNP-Domäne und den C-Terminus von PABPN1. Der N-Terminus wurde vollständig deletiert.

3.3.1. Die Überexpression von DN113

Die Überexpression der N-terminal verkürzten PABPN1-Variante Δ N113 wurde erstmals im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt. Als Expressionsstamm wurde *E. coli* BL21 pUBS ausgewählt. Nach den in 2.5.1 und 2.5.2 angegebenen Verfahren wurden die Bakterien mit der DNA transformiert, die Proteine überexprimiert und die Zellen geerntet und aufgeschlossen. Der Rohextrakt wurde einer Adsorptionschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose (2.5.3) unterzogen und nachfolgend wurde eine FPLC mit einer Mono Q-Säule durchgeführt (2.5.3). Das Protein eluierte bei einer Salzkonzentration von 300-350 mM KCl. Die Konzentration des Proteins wurde mittels Bradford-Proteinassay bestimmt. Abbildung 3.6 zeigt das saubere Protein im SDS-Gel.

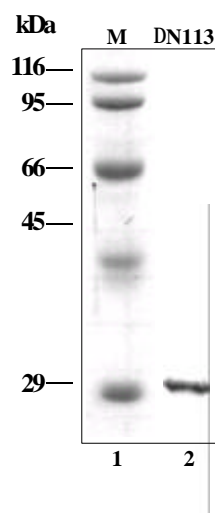


Abbildung 3.6: SDS-Gel einer sauberen Fraktion DN113 nach der MonoQ-Säule.

Es wurden 10 μ l der Fraktion aufgetragen. Die Größen des Protein-Größenstandards sind auf der linken Seite wiedergegeben.

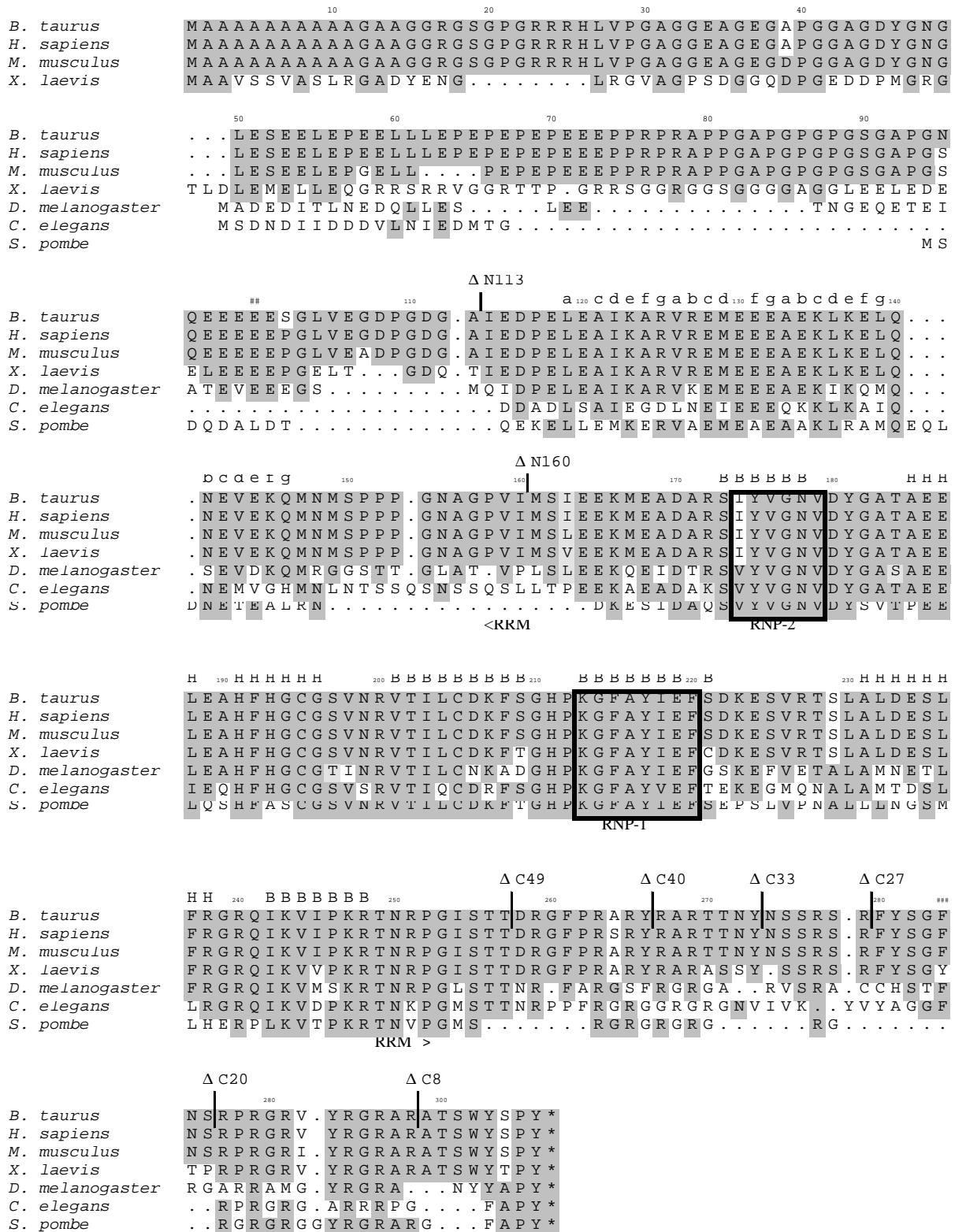


Abbildung 3.7: Vergleich der Aminosäuresequenzen von homologen Genen aus verschiedenen Organismen zum bovinen PABPN1

Die Nummerierung bezieht sich auf das bovine PABPN1. Die hochkonservierten RNP-Domänen sind durch Rahmen gekennzeichnet. Mit H werden Positionen in einer Helix bezeichnet, B bedeutet β -Faltblatt. Mit a bis g sind die repetitiven Sequenzen der Helikalen Domäne des N-Terminus gekennzeichnet (vergl. Abb. 3.9). Beginn bzw. Ende von N- und C-terminal verkürzten Versionen des bovinen PABPN1 sind über den Sequenzen markiert. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt (Abbildung nach U. Kühn).

3.3.2. Die RNA-Bindung von DN113

Die N-terminale Deletionsmutante $\Delta N113$ wurde hinsichtlich ihrer RNA-Bindung untersucht. Dazu wurden Filterbindungsexperimente (2.6) durchgeführt. Es wurde eine RNA-Konzentration unterhalb des K_D gewählt. Als Substrat wurde Poly(A) mit einer mittleren Länge von ca. 80 Nukleotiden (A_{80}) eingesetzt. Da PABPN1 eine mittlere Bedeckungslänge von etwa 15 Nukleotiden aufweist (Keller *et al.*, 2000; Meyer *et al.*, 2002), können 5-6 PABPN1-Moleküle auf einer RNA binden. In diesem Assay wird jedoch nur das zuerst bindende Protein detektiert. Die Ergebnisse wurden graphisch aufgetragen.

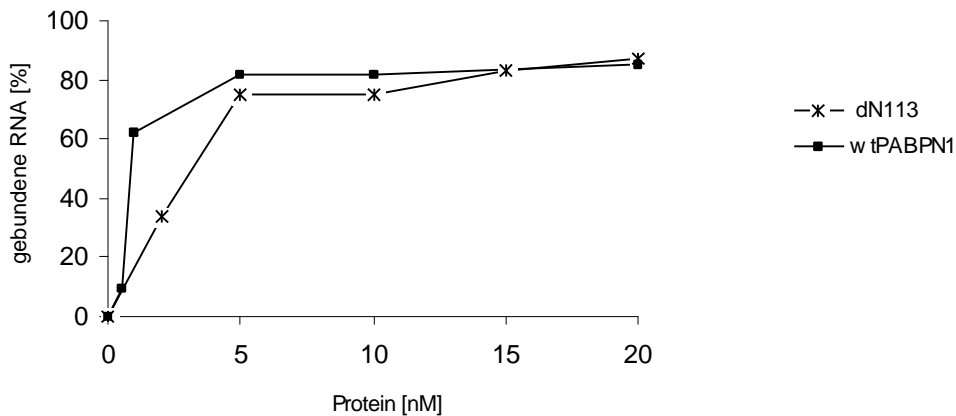


Abbildung 3.8: Die RNA-Bindung der Mutante DN113

10 fmol radioaktiv markiertes A_{80} wurde im 50 μ l-Ansatz mit 0,5-20 nM Protein versetzt, 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert, über einen Nitrozellulose-Filter gegeben und die Menge an gebundener RNA bestimmt. Als Positivprobe wurde wt PABPN1 eingesetzt. Es wurden jeweils die rekombinanten Proteine mit einem N-terminalen $[\text{His}]_6\text{-tag}$ genutzt.

Wie in der Abbildung gut zu erkennen ist, bindet die Mutante $\Delta N113$ annähernd mit Wildtypaffinität die angebotene RNA. Die fehlenden Aminosäuren 1-113 des N-Terminus scheinen demzufolge keinen großen Einfluss auf die RNA-Bindung zu haben. Der K_D der Mutante $\Delta N160$ wurde von Nemeth (Doktorarbeit 1998) mit 100-400 nM für A_{14} bestimmt. Dieser Wert ist jedoch möglicherweise aufgrund der Aggregationsneigung des Proteins zu hoch. Die Proteine $\Delta N113$ und $\Delta N160$ binden somit mit ähnlicher Affinität das Substrat, wie das Wildtypprotein.

3.3.3. Die Aminosäuren 114-160 von PABPN1 sind nötig für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase

Um zu überprüfen, inwieweit die Aminosäuren 114-160 im N-Terminus von PABPN1 in eine mögliche Interaktion mit der Poly(A)-Polymerase involviert sind, sollten die Mutanten Δ N113 und Δ N160 hinsichtlich der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase getestet werden. Dazu wurden Polyadenylierungs-Reaktionen (2.7.1) durchgeführt mit dem Wildtypprotein und den Mutanten Δ N113 und Δ N160. Die Verlängerung von A_{80} durch die Poly(A)-Polymerase im Beisein jeweils eines der oben genannten Proteine wurde beobachtet (Abbildung 3.9).

Dieser Assay zeigt, dass die Aminosäuren 114-160 für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase essentiell sind. Während die Mutante Δ N113 ähnlich wie das Wildtypprotein die Polyadenylierung stimuliert, ist die Mutante Δ N160, welcher der gesamte N-Terminus fehlt, völlig inaktiv (siehe auch Nemeth, Doktorarbeit 1998). Es konnte nur schwach die Verlängerung von A_{80} durch die Poly(A)-Polymerase allein detektiert werden (vergleiche Spur 2 und 7). Mit zunehmender Menge an Δ N160 wird die Poly(A)-Polymerase sogar gehemmt (Spuren 8 und 9).

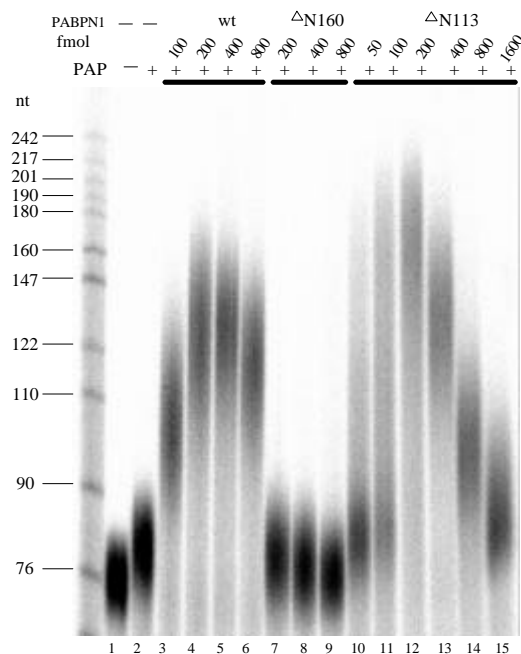


Abbildung 3.9: PABPN1 und DN113 stimulieren die Poly(A)-Polymerase, nicht jedoch DN160

In jedem Reaktionsansatz (25 μ l) wurden 80 fmol 5^{\prime} - 32 P-markiertes A_{80} und 50 fmol PAP mit steigenden Mengen *wt* PABPN1 (100-800 fmol, Spur 3-6), Δ N160 (200-800 fmol, Spur 7-9) bzw. Δ N113 (50-1600 fmol, Spur 10-15) gemischt. Spur 1 enthält nur das Substrat, in Spur 2 wurde nur PAP zugegeben. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 0,5 mM ATP gestartet und 17 Min. bei 37 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden abgestoppt und im denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt.

Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass die Aminosäuren 114 bis 160 essentiell für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase sind.

Mittels Computerprogrammen, welche Voraussagen zu Proteinstrukturen treffen, wurde postuliert, dass die Aminosäuren 119-147 im N-Terminus von PABPN1 eine α -Helix formen. Diese im weiteren als Helikale Domäne bezeichneten Aminosäuren wurden aufgrund der Ergebnisse der Polyadenylierungsassays mit Δ N160 und Δ N113 als mögliche Interaktionsdomäne des Proteins mit der Poly(A)-Polymerase in Betracht gezogen. Die Helikale Domäne lässt sich folgendermaßen als repetitive Sequenz von je 7 Aminosäuren darstellen:

Repeat/Pos. a b c d e f g

1	L	E	A	I	K	A	R
2	V	R	E	M	E	E	E
3	A	E	K	L	K	E	L
4	Q	N	E	V	E	K	Q
	M						

Abbildung 3.10: Darstellung der Helikalen Domäne im N-Terminus von PABPN1

Es sind die Aminosäuren L119 (*Repeat 1/Position a*) bis M147 (hinter *Repeat 4/Position a*) als sich wiederholende Sequenz von je 7 Aminosäuren dargestellt. Die sauren Aminosäuren sind rot markiert, die basischen hellblau. (Abbildung nach U. Kühn)

An den Positionen a und d der repetitiven Sequenz befinden sich hydrophobe, vorwiegend Helix-stabilisierende Aminosäuren wie Alanin, Valin, Leucin, Glutamin oder Methionin. An den anderen Positionen sind geladene, vorwiegend Helix-destabilisierende Aminosäuren wie Glutaminsäure, Arginin und Lysin zu finden. Solche Strukturmerkmale findet man in *coiled-coil*-Domänen, welche an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt sind. Von T. Scheuermann (persönliche Kommunikation) konnte durch die Bestimmung von CD-Spektren eine α -Helix im N-Terminus von PABPN1 identifiziert werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Helikalen Domäne um eine *coiled-coil*-Domäne.

Eine Projektion der Helikalen Domäne in die Ebene könnte wie in Abbildung 3.11 dargestellt aussehen:

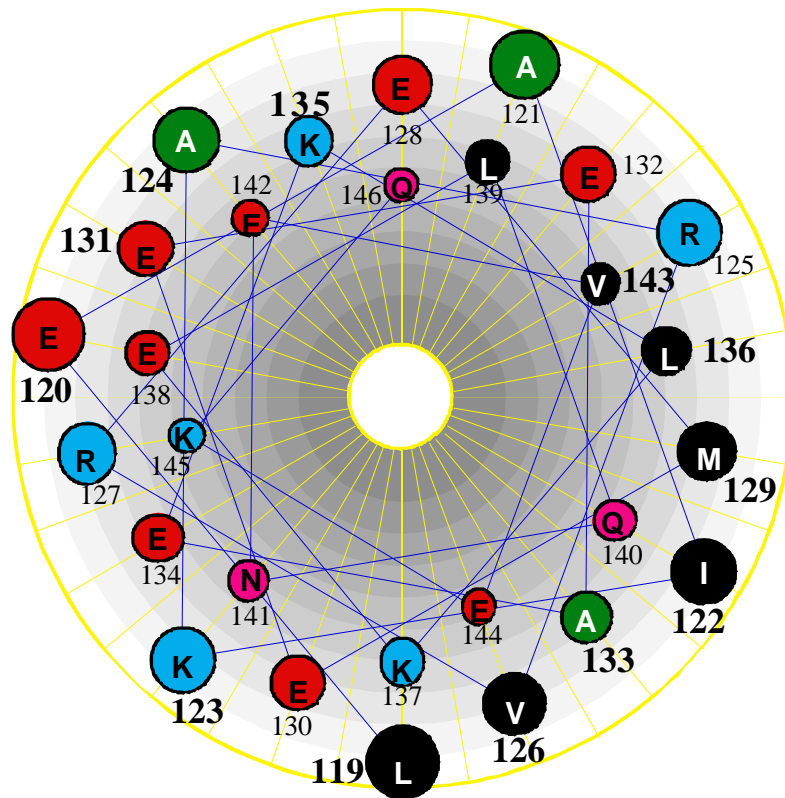


Abbildung 3.11: Projektion der Helikalen Domäne von PABPN1 in die Ebene

Die Kreise stellen die (mittels des Einbuchstaben-Codes markierten) Aminosäuren dar. Blaue Linien zeigen schematisch die Peptidbindungen zwischen den aufeinanderfolgenden Aminosäuren. Die Zahlen bezeichnen die Position der Aminosäure im Protein PABPN1. Dabei sind alle im Rahmen dieser Arbeit mutierten Aminosäuren mit fett gedruckten Zahlen versehen, alle dünn beschrifteten Aminosäuren wurden nicht mutiert. (Abbildung nach Dr. U. Kühn, geändert)

3.4. Chimäre Proteine

Ob die Helikale Domäne ausreicht, um die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren und welchen Einfluss die RNP-Domäne und der C-Terminus auf die Stimulierung der Polyadenylierung haben, sollte mittels chimärer Proteine untersucht werden.

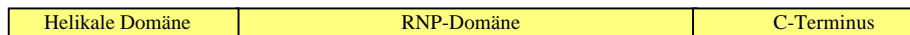
3.4.1. Herstellung der chimären Proteine

Da die Bindung der RNA essentiell für die Stimulation der Polyadenylierung ist, die Helikale Domäne aber keine RNA bindet, wurde ein chimäres Protein hergestellt aus der Helikalen Domäne von PABPN1 (H) und den *Xenopus laevis* RNA-Bindungsdomänen 1 und 2 von PABPC1 (bezeichnet als 12, entspricht N12 aus Nietfeld *et al.*, 1990). 12 von PABPC1 weist

dieselbe RNA-Bindungsfähigkeit auf wie das *wt* PABPC1 (Kühn & Pieler, 1996). Das chimäre Protein wurde H12 benannt (**H**elikale Domäne + 12, siehe Abbildung 3.12). PABPC1 wurde ausgewählt, weil es ebenfalls spezifisch Poly(A) bindet, aber die Polyadenylierung nicht stimuliert.

Zwei weitere chimäre Proteine sollten den Einfluss der RNP-Domäne bzw. des C-Terminus von PABPN1 auf die Funktion des Proteins klären. Da die genannten Domänen in die RNA-Bindung involviert sind, wurden sie gegen RNA-Bindungsdomänen von PABPC1 ausgetauscht. Dafür wurde jeweils die RNP-Domäne bzw. der C-Terminus von PABPN1 gegen die RNA-Bindungsdomäne 4 (RBD 4) von PABPC1 ausgetauscht. Diese chimären Proteine wurden H4C (**H**elikale Domäne+RBD **4**+C-Terminus) bzw. HR4 (**H**elikale Domäne+**RNP**-Domäne+RBD **4**) genannt (siehe Abbildung 3.12).

PABPN1



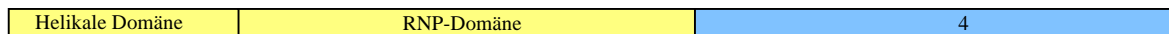
HN12



H4C



HR4



PABPC1



Abbildung 3.12: Übersicht über die chimären Proteine aus PABPN1 und PABPC1

Als Vergleich sind bovines PABPN1 und *Xenopus leavis* PABPC1 (dieses im Maßstab verkleinert) über bzw. unter den chimären Proteinen abgebildet. Alle Domänen des bovinen PABPN1 sind gelb dargestellt, die Domänen des PABPC1 erscheinen als blaue Rechtecke. N: N-Terminus; 1 (bzw. 2, 4): RNA-Bindungsdomäne 1 (bzw. 2, 4); C: C-Terminus, Die chimären Proteine sind mit einem N-terminalen [His]₆-tag versehen, welcher nicht dargestellt ist.

Zur Herstellung von H12 wurde per PCR sowohl der N-Terminus von PABPN1 mit flankierenden *Nde* I und *Dra* I Schnittstellen als auch die RNA-Bindungsdomänen 1 und 2 von PABPC1 mit angefügten *Bgl* II Schnittstellen amplifiziert. Beides wurde gemeinsam in pGM10[His]₆ kloniert (siehe auch 2.3.5.1).

Die allgemeine Strategie zur Herstellung der chimären Proteine H4C und HR4 bestand in der Einführung von *Kpn* I-Schnittstellen zwischen den Domänen von PABPN1, wodurch die auszutauschenden Domänen mittels Restriktionsverdau entfernt werden konnten. Sie wurden durch Domänen von PABPC1 ersetzt, welche mit flankierenden *Kpn* I-Schnittstellen versehen waren (siehe 2.3.5.2).

Die Überexpression der chimären Proteine erfolgte in *E. coli* BL 21 pUBS. Die Proteine wurden als N-terminale Fusionsproteine mit einem [His]₆-Fusionsanteil exprimiert. Die Anzucht der transformierten Zellen, die Induktion, die Zellernte und der Zellaufschluss mittels Ultraschall erfolgte wie unter 2.5.1 und 2.5.2 beschrieben. Aliquots der Zellen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Die Überexpression der Proteine konnte durch Einsatz eines Antikörpers gegen den [His]₆-Fusionsanteil nachgewiesen werden. Die Proteine wurden einer Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie (2.5.3) unterzogen. In den Eluaten von H12 und HR4 waren noch eine Anzahl anderer Proteine vorhanden, das Eluat von H4C enthielt nur noch 2 weitere Proteine. Die verunreinigenden Proteine sollten durch Ionenaustauschchromatographie vom jeweiligen Zielprotein getrennt werden. Das dialysierte H12-Eluat wurde auf eine MonoQ-Säule aufgetragen, das Protein band jedoch nicht an das Säulenmaterial. Trotzdem kam es zu einer Reinigung, da alle anderen enthaltenen Proteine sowie DNA und RNA binden konnten und damit abgetrennt wurden. Das Protein lag nach der Chromatographie in sehr verdünnter Form vor. Die Proteinkonzentration wurde mittels Centricon-Proteinkonzentrator (2.1.8) erhöht.

Das dialysierte H4C-Eluat wurde auf eine MonoS-Säule aufgebracht. Es konnte an das Säulenmaterial binden und eluierte bei einer Konzentration von ca. 400 mM KCl. HR4 konnte nicht an eine Mono S-Säule binden. Aus diesem Grund wurde eine weitere Dialyse gegen den Auftragspuffer einer MonoQ-Säule durchgeführt und HR4 wurde auf die MonoQ-Säule gegeben. Das Protein konnte von der Säule mit ca. 75 mM KCl eluiert werden.

Alle chimären Proteine lagen nach der Ionenaustauschchromatographie in reiner Form vor. Die Konzentrationen der Proteine wurden mittels Bradford Protein-Assay (2.5.4) bestimmt. Als ein Beispiel ist das gereinigte und im SDS-Gel aufgetrennte Protein H4C dargestellt (Abbildung 3.13)

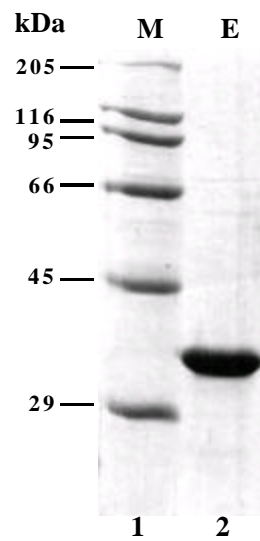


Abbildung 3.13: SDS-Gel einer MonoQ-gereinigten Fraktion von H4C

Es wurden 10 μ l der Fraktion der MonoQ-Säule im SDS-Gel aufgetrennt und mittels Coomassie angefärbt.

3.4.2. Die RNA-Bindung der chimären Proteine

Das Protein PABPN1 ist hinsichtlich seiner RNA-Bindungseigenschaften gut untersucht. Um die RNA-Bindung mit Wildtyp-Affinität zu gewährleisten, muss sowohl die RNP-Domäne als auch der C-Terminus des Proteins vorhanden sein. Der N-Terminus ist an der RNA-Bindung nicht oder kaum beteiligt. Inwieweit der Austausch von RNP-Domäne bzw. C-Terminus gegen andere RNA-bindende Domänen einen Einfluss auf die Affinität der chimären Proteine ausübt, sollte mit dem folgenden Experiment geklärt werden.

Die RNA-Bindung der Mutanten H12, HR4 und H4C wurde auf A_{80} wie unter 3.3.2 beschrieben bestimmt. Für jedes Experiment wurden mindestens Doppelbestimmungen durchgeführt, bei den hier angegebenen Kurven handelt es sich um Mittelwerte. Abbildung 3.14 zeigt die ermittelten Bindungskurven.

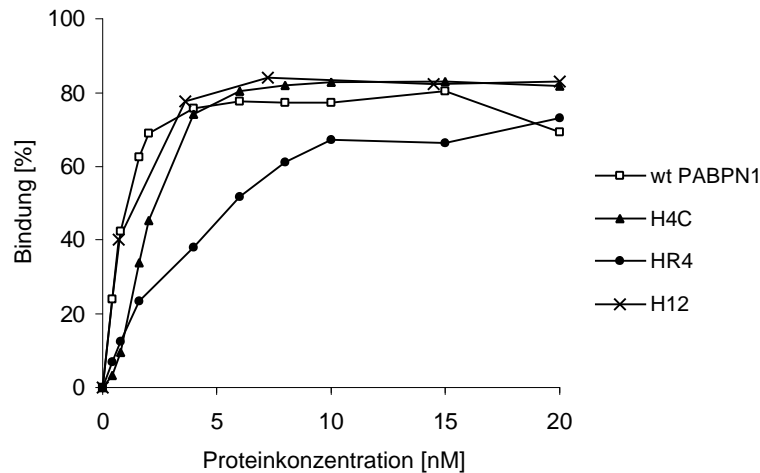


Abbildung 3.14: Bindung der chimären Proteine an A₈₀

Bei wt PABPN1 und den chimären Proteinen handelt es sich um die rekombinanten Proteine, welche über einen [His]₆-tag verfügen. Als Substrat wurde 10 fmol 5'-³²P-markiertes A₈₀ in einem Volumen von 50 µl eingesetzt. Die Reaktionen wurden 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und über einen Nitrocellulose-Filter gegeben, gewaschen und die gebundene Radioaktivität bestimmt.

Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass sowohl H12 als auch H4C mit ähnlicher Affinität wie das Wildtyp-Protein die RNA binden. Die RNA-Bindung von HR4 ist etwa um den Faktor 5 schlechter, bei Proteinkonzentrationen über 10 nM wird jedoch auch ein Großteil der RNA gebunden.

3.4.3. Die Helikale Domäne ist nicht ausreichend für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase

Ob die Helikale Domäne im N-Terminus von PABPN1 eine Interaktionsdomäne mit der Poly(A)-Polymerase darstellt, sollte durch Polyadenylierungsassays mit dem Protein H12 geklärt werden. Wenn die Helikale Domäne ausreicht, um die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren, sollte das Protein H12 eine dem Wildtyp entsprechende Stimulierung der Polyadenylierung aufweisen. Die Verlängerung von A₈₀ wurde *in vitro* getestet (2.7.1). Steigende Mengen H12 wurden mit der Poly(A)-Polymerase und der Substrat-RNA versetzt und die Produkte der Reaktionen im denaturierenden Acrylamidgel beobachtet (Abbildung 3.15). Als Kontrolle wurde das Protein 12 eingesetzt (enthält nur die RBD 1 und 2 von PABPC1). 12 kann die Poly(A)-Polymerase nicht stimulieren.

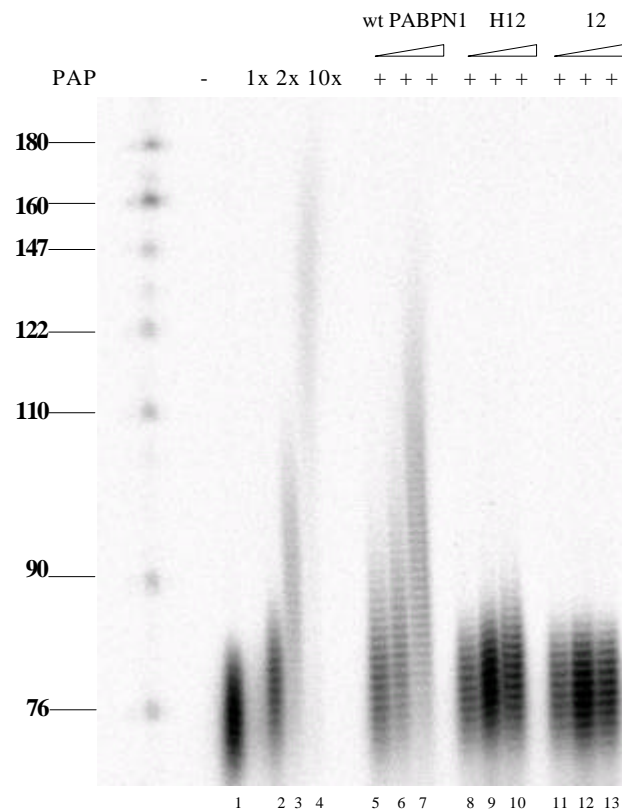


Abbildung 3.15: H12 kann die Polyadenylierung nicht stimulieren

80 fmol radioaktiv markiertes A₈₀ wurde im 15 µl-Ansatz mit 15 fmol PAP versetzt und 100, 200 und 400 fmol *wt* PABPN1 (Spur 5-7) bzw. 25, 100, 400 fmol H12 (Spur 8-10) bzw. als Kontrolle 25, 100, 400 fmol 12 (Spur 11-13) zugegeben. In den Spuren 3 und 4 wurde die zwei- bzw. zehnfache Menge PAP eingesetzt. Nach 2-minütiger Vorinkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0,5 mM ATP gestartet und nach 15 Min. mittels Proteinase K-Verdau abgestoppt. Die RNA wurde gefällt und im 8 %igen denaturierenden Acrylamidgel aufgetrennt.

Aus der Abbildung ist erkennbar, dass H12 keine signifikante Stimulierung der Poly(A)-Polymerase bewirkt (vergleiche Spur 5 bis 7 mit 8 bis 10). Es konnten nur einige wenige Adenylatreste addiert werden. Das Protein 12, welches über dieselben RNA-Bindungsdomänen wie H12 verfügt, jedoch die Helikale Domäne nicht enthält, war völlig inaktiv. Die verringerte Fähigkeit von H12 zur Stimulation der Poly(A)-Polymerase bei einer dem Wildtyp ähnlichen RNA-Bindung deutet darauf hin, dass die Helikale Domäne nicht ausreicht, um die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren. Weitere Bereiche von PABPN1 müssen also für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase von Bedeutung sein.

Deshalb sollte untersucht werden, welche Rolle die RNP-Domäne bzw. der C-Terminus von PABPN1 in der Polyadenylierung spielen und wie sie die Wirkung der Helikalen Domäne in der Polyadenylierung ergänzen. Dazu wurden die chimäre Proteine H4C und HR4 konstruiert, in welchen entweder die RNP-Domäne (H4C) bzw. der C-Terminus (HR4) gegen die RNA-Bindungsdomäne 4 von PABPC1 ausgetauscht wurden (siehe Abbildung 3.12). *In vitro*-

Polyadenylierungsreaktionen (Kapitel 2.7.1) sollten klären, ob diese chimären Proteine die Polyadenylierung stimulieren.

Als Substrat fand 5'-radioaktiv-markiertes A₈₀ Verwendung. Das Ergebnis der Polyadenylierungs-Reaktionen zeigt Abbildung 3.16.

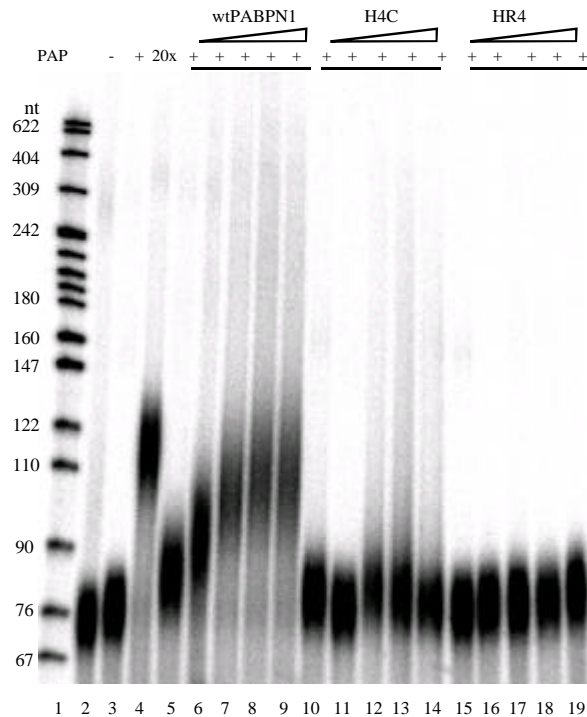


Abbildung 3.16: Stimulierung der Polyadenylierung durch H4C und HR4

40 fmol radioaktiv markiertes A₈₀ wurde im 25 µl-Ansatz mit 15 fmol PAP versetzt und 100 – 1600 fmol *wt* PABPN1 bzw. chimäre Proteine zugegeben. Nach 2-minütiger Vorinkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen durch Zugabe von 0,5 mM ATP gestartet und nach 15 Min. mittels Proteinase K-Verdau abgestoppt. Die RNA wurde gefällt und im 8 %igen denaturierenden Acrylamidgel aufgetrennt. In dem mit 20x bezeichneten Reaktionsansatz (Spur 4) war die 20-fache Menge PAP und kein PABPN1 enthalten.

Die Poly(A)-Polymerase konnte in geringem Ausmaß durch H4C stimuliert werden. Während die RNA durch Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch das Wildtypprotein um bis zu 210 AMP-Reste verlängert werden konnte, wurden mit H4C an nur wenige Moleküle Substrat-RNA maximal 40 AMP-Reste angehängt (Spuren 10-14). Der Großteil des Substrates konnte nur um wenige Adenylatreste verlängert werden.

Das Protein HR4 war völlig inaktiv hinsichtlich der Stimulierung der Polyadenylierung. Die scheinbare Verlängerung des Substrats in den Spuren 17 bis 19 ist auf die Elektrophorese zurückzuführen. Die Proben am Rand des Gels bewegten sich etwas langsamer.

Um die Stimulation der Poly(A)-Polymerase durch H4C zu quantifizieren, wurde die Verlängerung des Poly(A) durch den Einsatz von radioaktiv markiertem ATP beobachtet (2.6.2). Als Positivprobe wurde das Wildtypprotein in den Assay einbezogen.

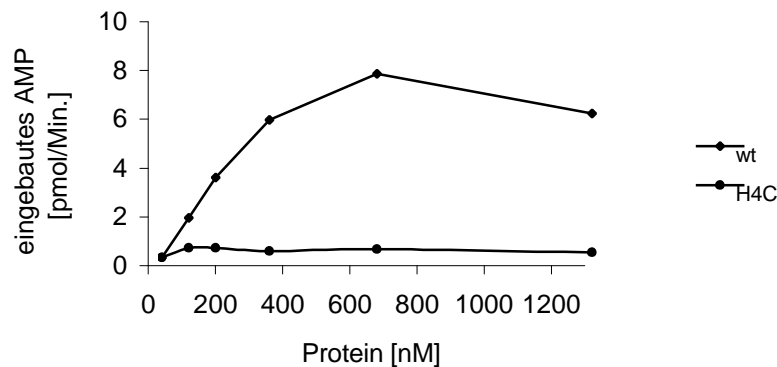


Abbildung 3.17: Quantifizierung der Polyadenylierung durch H4C

1,7 pmol A_{94} wurden mit 200 fmol PAP und steigenden Mengen (2-36 pmol) *wt* PABPN1 bzw. H4C versetzt, 2 Min. bei 37 °C vorinkubiert und die Reaktion durch Zugabe von 0,5 mM radioaktivem ATP gestartet. Nach 30 Min. Inkubation bei 37 °C wurde die Reaktion mittels TCA abgestoppt, über einen Glasfaser-Filter gegeben und die eingebaute Radioaktivität bestimmt. Der unstimulierte Einbau durch die PAP allein betrug 0,2 pmol AMP/Min.

Aus dem Kurvenverlauf des chimären Proteins H4C lässt sich unter den hier eingesetzten Bedingungen keine Stimulation der Polyadenylierung nachweisen. Durch Zugabe von steigenden Mengen Protein konnte keine Erhöhung der eingebauten Menge an radioaktivem AMP erfasst werden. Die im Polyadenylierungsassay (Abbildung 3.16) beobachtete sehr geringe Stimulierung konnte in diesem Experiment nicht detektiert werden.

Die chimären Proteine H12 und H4C waren also unter den getesteten Bedingungen nur in sehr geringem Maße in der Lage, die Polyadenylierung von A_{80} zu stimulieren, HR4 war völlig inaktiv. Zusammengefasst mit den Ergebnissen von $\Delta N113$ und $\Delta N160$ (siehe 3.3.3) kann geschlussfolgert werden, dass für eine effektive Stimulierung der Poly(A)-Polymerase sowohl die Helikale Domäne im N-Terminus als auch die RNP-Domäne und der C-Terminus benötigt werden.

3.4.4. Die chimären Proteine in der prozessiven Polyadenylierung

Um zu überprüfen, ob die Ergebnisse der Stimulation der Poly(A)-Polymerase auf Homopolymeren (z.B. A_{80}) übertragbar sind auf die Polyadenylierung von mRNA mit einem Oligo(A)-Schwanz (z.B. L3pre- A_{15}), wurde die prozessive Polyadenylierung untersucht. Diese ist an eine Reihe von Vorbedingungen geknüpft: die zu polyadenylierende RNA muss über ein Polyadenylierungssignal verfügen (AAUAAA-Sequenz, siehe 1.2.1), CPSF muss in der Reaktion anwesend sein (an die AAUAAA-Sequenz gebunden) und die RNA muss über

einen kurzen Oligo(A)-Schwanz (ca. A₁₀) verfügen (siehe 1.2.2). Als letzte Bedingung ist PABPN1 nötig, um eine maximale Prozessivität der Poly(A)-Polymerase gemeinsam mit CPSF hervorzurufen. Die Mutante Δ N113 und die chimären Proteine wurden in der prozessiven Polyadenylierung im Vergleich zum Wildtyp-PABPN1 getestet.

Es stellte sich, wie erwartet, heraus, dass es keinen Unterschied im Stimulierungsverhalten der Proteine auf den verschiedenen RNA-Substraten gibt. Ist eine Mutante nicht fähig, die Poly(A)-Polymerase auf A₈₀ zu stimulieren, so kann sie dies auch nicht in der prozessiven Polyadenylierung von L3pre-A₁₅. Die Mutante Δ N113 verhielt sich auf beiden Substraten wie das Wildtypprotein.

3.5. Die Punktmutanten in der Helikalen Domäne von PABPN1

Um die für die Funktion von PABPN1 wichtigen Aminosäuren in der Helikalen Domäne (siehe 3.4.1) zu identifizieren, wurden Punktmutanten in der Helikalen Domäne von PABPN1 angefertigt. Die Helix weist eine amphipathische Struktur auf, welche für *coiled-coil*-Domänen typisch ist. In der Projektion der Helikalen Domäne in die Ebene (Abbildung 3.11) kann man erkennen, dass sich auf der links dargestellten Seite hauptsächlich Aminosäuren mit geladenen polaren Gruppen wie Glutaminsäure und Lysin befinden. Auf der rechts dargestellten Seite der Helix findet man vorwiegend Aminosäuren mit hydrophoben Seitengruppen wie Methionin, Isoleucin, Leucin und Valin. Hydrophobe Aminosäuren sind oft an Protein-Protein-Wechselwirkungen beteiligt. Es wäre also möglich, dass sich in diesem Bereich Aminosäuren befinden, welche mit Resten der Poly(A)-Polymerase in Wechselwirkung treten und auf diese Weise die Affinität der Poly(A)-Polymerase für ihr Substrat erhöhen.

Ein Großteil der Aminosäuren mit hydrophoben Seitenketten der in Abbildung 3.11 dargestellten Helikalen Domäne sollte gegen andere Aminosäuren wie Alanin oder Serin ausgetauscht werden, um deren Funktion zu überprüfen.

Folgende Punktmutanten wurden hergestellt: L119A, E120A, I122Q, K123A, A124S, V126S, M129A, E131A, A133S, K135A, L136A, L136S, V143A (siehe auch Tabelle 2, Seite 28). Das Vorgehen entsprach dem unter 3.2.1 beschriebenen.

3.5.1. Die RNA-Bindung der Punktmutanten

Die Messung der RNA-Bindung wurde analog zu 3.2.2 mit A₁₅ als Substrat-RNA durchgeführt. Außer der Mutante A124S binden alle Mutanten die RNA annähernd mit Wildtypaffinität. Der K_D dieser Mutanten liegt auf A₁₅ bei etwa bei 8-30 nM. Der geschätzte K_D für die Bindung der Mutante A124S liegt bei etwa 60 nM.

Wird die RNA-Bindung auf A₁₄ durchgeführt, kann nur ein Molekül PABPN1 auf der RNA binden. Die Bindung von mehreren Molekülen PABPN1 wird auf längerer RNA durch die Kooperativität ($\omega=50$, Meyer *et al.*, 2002) erleichtert. Da sich die Mutante L 136 S im weiteren Verlauf der Arbeit als wichtig herausstellte, wurde eine Bestimmung der RNA-Bindung auch auf A₈₀ durchgeführt. Auf RNA dieser Länge können ca. sechs PABPN1-Moleküle binden. Dabei ist die Bindung des zweiten, dritten usw. Moleküls PABPN1 erleichtert, wenn das erste Molekül PABPN1 gebunden hat. Die Messung wurde mit 10 fmol A₈₀ im 50 μ l-Ansatz mit 0,5-20 nM Protein im Vergleich zum Wildtypprotein durchgeführt.

Abbildung 3.18 zeigt die ermittelten Bindungskurven.

Die Mutante L136S weist auf A₈₀ ebenso wie auf A₁₄ dieselben Bindungseigenschaften wie das Wildtypprotein auf. Ein K₅₀ von etwa 1 nM für A₈₀ kann sowohl für den Wildtyp als auch für die Mutante L136S aus dem Diagramm geschlossen werden.

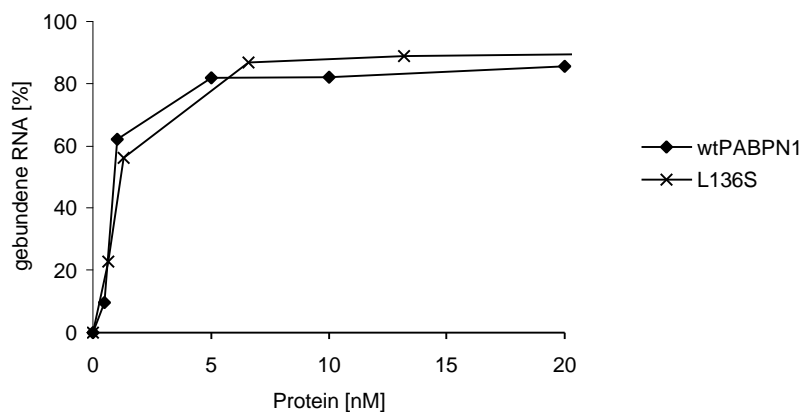


Abbildung 3.18: Die Bindung von L136S an A₈₀

10 fmol A₈₀ (3'-OH-Enden) wurden mit 0,5-20 nM Protein versetzt, 30 Min. bei Raumtemperatur inkubiert und die an Protein-gebundene RNA mittels Filterbindungassay und anschließender Scintillationszählung bestimmt.

Die Mutanten E120A, K123A, V126S, A133S und K135A stimulierten die Poly(A)-Polymerase wie das Wildtypprotein. L119A, I122Q, A124S, M129A, E131A und V143A zeigten ein deutlich verringertes Stimulationsvermögen, die Mutanten L136A und L136S gar keines mehr. Die Stimulation der Poly(A)-Polymerase auf den beiden RNA-Substraten unterschied sich nicht voneinander. Tabelle 4 gibt eine Zusammenfassung über die RNA-Bindung und die Stimulation der Poly(A)-Polymerase in der distributiven und prozessiven Polyadenylierung.

Die Defekte in der Stimulierung der Polyadenylierung lassen sich nicht auf die RNA-Bindung zurückführen, da alle Punktmutanten mit Wildtyp-ähnlicher Affinität RNA banden. Besonders deutlich wird dies bei den Mutanten L136A und L136S, welche trotz normaler RNA-Affinität nicht in der Lage sind, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren. Die Aminosäure Leucin 136 scheint also essentiell für die Stimulierungsfunktion von PABPN1 zu sein. Möglicherweise ist sie in Protein-Protein-Wechselwirkungen mit der Poly(A)-Polymerase involviert. Im folgenden sind weitere Versuche mit der Mutante L136S dargestellt, welche zum besseren Verständnis der Funktionsweise des Proteins führen sollten.

Tabelle 4: RNA-Bindung und Stimulation der Polyadenylierung durch PABPN1-Punktmutanten

wt: die Punktmutante verhält sich im entsprechenden Assay wie der Wildtyp, -: Bindung/Polyadenylierung ist leicht reduziert, - -: Bindung/Polyadenylierung ist stärker reduziert, - - -: Protein ist inaktiv in Bindung/Polyadenylierung, n.g.: nicht getestet

Punktmutante	RNA-Bindung	Polyadenylierung von A₈₀	Polyadenylierung von L3pre-A₁₅
L 119 A	wt	- -	- -
E 120 A	wt	wt	n.g.
I 122 Q	wt	- -	-
K 123 A	wt	wt	n.g.
A 124 S	(wt)	-	n.g.
V 126 S	wt	wt	wt
M 129 A	wt	-	-
E 131 A	wt	-	-
A 133 S	wt	wt	wt
K 135 A	wt	wt	n.g.
L 136 A	wt	- - -	- - -
L 136 S	wt	- - -	- - -
V 143 A	wt	-	-

3.5.3. L136S ist ein kompetitiver Inhibitor für PABPN1

Die Punktmutante L136S bindet mit Wildtypaffinität RNA, kann jedoch die Poly(A)-Polymerase nicht stimulieren. Es sollte getestet werden, ob die Mutante das Wildtypprotein kompetieren kann und wie viele Moleküle L136S nötig sind, um den Effekt des Wildtypproteins zu unterbinden. Es wurde ein spezifischer Polyadenylierungsassay durchgeführt (siehe 2.7.2). L3pre-A₁₅ wurde durch die Poly(A)-Polymerase innerhalb von 1 Min. polyadenyliert. Zu den Reaktionen wurde *wt* PABPN1 zugegeben. Diesen Ansätzen wurden weitere Mengen *wt* PABPN1 bzw. L136S zugesetzt. Als Kontrollreaktionen wurde ein Ansatz ohne PABPN1 und ein Ansatz nur mit L136S (ohne *wt* PABPN1) angefertigt. Das Ergebnis zeigt Abbildung 3.20.

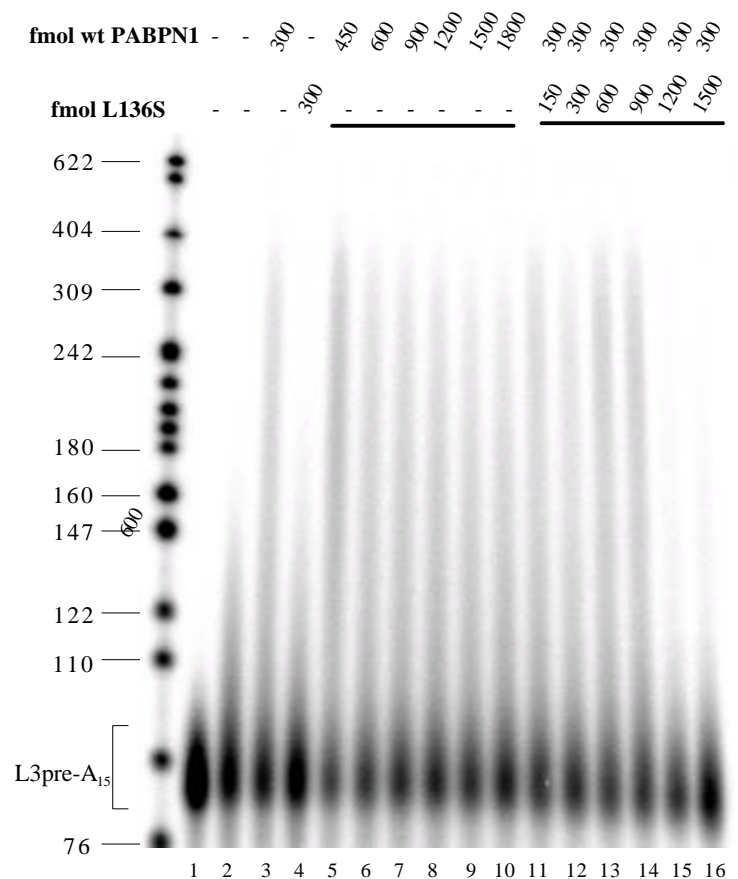


Abbildung 3.20: Konkurrenz des PABPN1-Effektes mit steigenden Mengen L136S

Zu 80 fmol L3pre-A₁₅ wurden im 25 µl-Ansatz 11,75 fmol PAP, 120 fmol CPSF und 300 fmol PABPN1 (Spur 3) bzw. L136S (Spur 4) gegeben. Es wurden steigende Mengen *wt* PABPN1 bzw. L136S zugegeben. Spur 1 enthält unbehandelte Substrat-RNA, in Spur 2 wurde die RNA durch PAP und CPSF ohne PABPN1 verlängert. Die Reaktionen wurden nach zweiminütiger Inkubation bei 37 °C durch Zugabe von 0,5 mM ATP gestartet, nach 1 Min. die Reaktion mittels Proteinase K-Verdau abgestopt und im denaturierenden Acrylamidgel aufgetrennt.

Ein Teil der Substrat-RNA wird in Abwesenheit von PABPN1 um ca. 10-20 Adenylatreste verlängert (Spur 2). Werden 300 fmol *wt* PABPN1 zugegeben, erreichen die Poly-(A)-Schwänze Längen von bis zu 250 Adenylatresten (Spur 3). Durch Zugabe von 300 fmol der Mutante L136S wird der Poly(A)-Schwanz nicht länger als ohne Zugabe von PABPN1 (vergl. Spuren 2 und 4). Werden steigende Mengen *wt* PABPN1 zugegeben, wird die Polyadenylierung leicht gehemmt, es bleibt mehr Substrat unverlängert, die Poly(A)-Schwänze werden nur noch auf ca. 200-250 Adenylatreste verlängert (Spuren 5 – 10).

Gibt man zu 300 fmol *wt* PABPN1 steigende Mengen L136S in den Ansatz, findet vorerst keine deutliche Hemmung der Polyadenylierung statt, die Poly(A)-Schwänze erreichen weiterhin eine Länge von ca. 250 nt (Spuren 11 – 14). Durch Zugabe eines Überschusses L136S (1200-1500 fmol, Spuren 15 und 16) wird das *wt* PABPN1 von den Poly(A)-Schwänzen verdrängt. Das *wt* PABPN1 kann die Poly(A)-Polymerase nicht mehr stimulieren, die Mutante L136S ist inaktiv hinsichtlich einer Stimulierung. Es ist nur noch die durch CPSF hervorgerufene Stimulation der Poly(A)-Polymerase detektierbar (vergl. Spur 2 mit 15 und 16).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Mutante L136S das Wildtypprotein von den Poly(A)-Schwänzen verdrängen kann. Demzufolge wird L136S in den Polyadenylierungskomplex eingebaut. Man kann schlussfolgern, dass die Mutante korrekt gefaltet vorliegt und ein kompetitiver Inhibitor des Wildtypproteins ist.

3.5.4. Nur ein Molekül PABPN1 auf dem Poly(A)-Schwanz interagiert mit der Poly(A)-Polymerase

Die Punktmutante L136S konnte als kompetitiver Inhibitor des *wt* PABPN1 identifiziert werden. Um zu überprüfen, wie viele Moleküle PABPN1 auf dem Poly(A)-Schwanz mit der Poly(A)-Polymerase interagieren, wurde in einem TCA-Fällungsassay (2.6.2.2) Poly(A) zu 80 % mit PABPN1 besetzt und der Einbau von [α -³²P] ATP in den wachsenden Poly(A)-Schwanz quantitativ verfolgt. Das Mischungsverhältnis zwischen *wt* PABPN1 und L136S wurde in weiteren Reaktionen schrittweise so geändert, bis nur noch L136S im Ansatz enthalten war. Das Ergebnis dieser Messung ist in Abbildung 3.21 dargestellt.

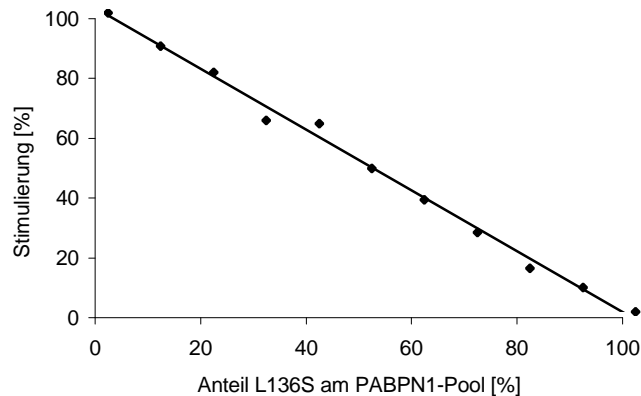


Abbildung 3.21: Stimulierung der PAP mit steigendem Anteil L136S im PABP2-Pool

1,7 pmol A_{95} (3'OH-Enden) wurden mit 200 fmol PAP versetzt und 8,5 pmol PABPN1 bzw. L136S im abnehmenden Mischungsverhältnis zugesetzt. Die Reaktionen wurden 2 Min. bei 37 °C inkubiert und durch Zugabe von ATP (0,5 mM ca. 1.250.000 cpm) gestartet. Nach 30 Min. wurden die Reaktionen durch Zugabe von 100 μ l 10 % TCA, 100 mM Natriumpyrophosphat abgestoppt, gewaschen und auf einen Glasfaserfilter appliziert. Die eingebaute Menge an Radioaktivität wurde bestimmt und graphisch aufgetragen. 100 % Stimulierung entspricht 8,4 pmol AMP/Min., 0 % Stimulierung (PAP allein) entspricht 0,8 pmol AMP/Min.

Die direkte Proportionalität spricht dafür, dass nur ein bestimmtes und wahrscheinlich das der Poly(A)-Polymerase benachbarte PABPN1-Molekül mit der Poly(A)-Polymerase interagiert. Die Interaktion eines beliebigen Moleküls PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase wäre durch eine geringere Sensitivität gleichzeitig mit einer Nichtlinearität gekennzeichnet. Die Wechselwirkung mehrerer Moleküle PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase würde eine stärkere Sensibilität hervorrufen. Als Kontrolle für dieses Experiment wurde jede RNA mit maximal einem PABPN1 (rechnerisch 0,8 Moleküle PABPN1 pro RNA) versetzt und dieselbe Reaktion durchgeführt. Der direkte Proportionalität bestätigte sich (Abbildung nicht gezeigt).

3.6. Die Polyadenylierung von vollständig verlängerter RNA

RNA mit einem Poly(A)-Schwanz von ca. 250 Adenylatresten wird als vollständig erkannt und die prozessive Poly(A)-Synthese wird zu Gunsten einer distributiven Verlängerung eingestellt (1.2.2). Um den Mechanismus der Längenkontrolle zu analysieren, wurden Experimente mit einer RNA durchgeführt, welche über einen vollständig verlängertem Poly(A)-Schwanz verfügt (L3pre- A_{250}).

3.6.1. Charakterisierung des Polyadenylierungskomplexes auf L3pre-A₂₅₀

Um zu ermitteln, wie der Längenkontrollmechanismus funktioniert, wurde die Zusammensetzung des Polyadenylierungskomplexes auf vollständig verlängerter RNA überprüft. Möglicherweise wird mit Erreichen einer kritischen Größe des Poly(A)-Schwanzes ein Protein aus dem Komplex verdrängt und kann nicht mehr an der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase mitwirken. Da die Poly(A)-Polymerase weiterhin das Substrat verlängert, wenn der Poly(A)-Schwanz eine Länge von 250 AMP-Resten erreicht hat, kommen nur CPSF oder PABPN1 in Frage, welche aus dem Polyadenylierungskomplex gedrängt werden könnten.

Es wurden native *Gelshift*-Experimente mit L3pre-A₂₅₀₋₃₀₀ durchgeführt. Dabei bewegen sich Protein-RNA-Komplexe langsamer als RNA allein. Aus dem Maß der Verzögerung lässt sich auf die Zusammensetzung der Protein-RNA-Komplexe schließen. Die RNA wurde wie in 2.4.2 und 2.4.3 beschrieben hergestellt und mit den in Abbildung 3.22 bezeichneten Proteinen inkubiert. Es wurde in diesem Experiment ebenfalls überprüft, ob der Polyadenylierungskomplex anders zusammengesetzt ist, wenn die Mutante L136S beteiligt ist. Der Ablauf des Experiments ist unter (2.6.3) beschrieben.

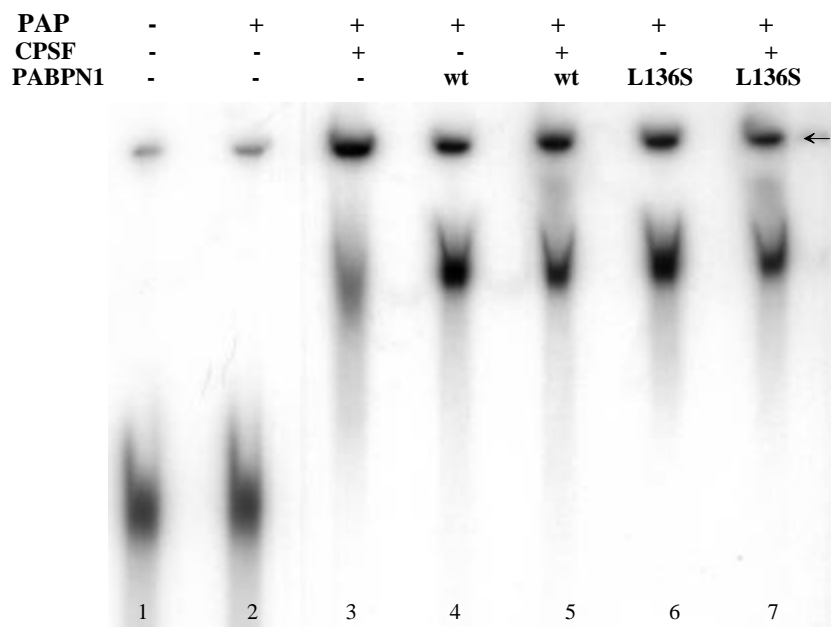


Abbildung 3.22: Gelretardation von Protein-RNA-Komplexen

160 fmol PAP, 240 fmol CPSF, 3,2 pmol PABPN1 bzw. L136S und 160 fmol L3pre-A₂₅₀ wurden 30 Min. bei 37 °C inkubiert und im nativen Gel aufgetrennt. Der Pfeil bezeichnet den Startpunkt der Elektrophorese. Durch den Gehalt an PVA im Puffer verbleibt ein Teil der RNA in den Taschen des Gels.

Die Zugabe von Poly(A)-Polymerase zur RNA führt nicht zur Retardation der RNA (vergl. Spuren 1 und 2). Darin zeigt sich die geringe Affinität des Enzyms für sein Substrat. Wird diesen Reaktionen neben der Poly(A)-Polymerase CPSF oder PABPN1 zugegeben, findet eine deutliche Retardation der Komplexe statt (Spur 3 und 4). Genauso sieht dies beim vollständigen Polyadenylierungskomplex (RNA/PAP/CPSF/*wt* PABPN1, Spur 5) aus. Die gleiche Retardation findet man, wenn anstelle des *wt* PABPN1 die Mutante L136S verwendet wird (Spur 7). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass sich der Polyadenylierungskomplex auf vollständig verlängertem Poly(A) mit *wt* PABPN1 in der Zusammensetzung nicht von dem unterscheidet, welcher mit der Mutante L136S entsteht. Dieses Experiment lässt weiteren folgenden Schluss zu: PABPN1 verbleibt im Komplex, da die Komplexe in den Spuren 3 und 5 ein unterschiedliches Laufverhalten zeigen. Ob CPSF im Komplex verbleibt, lässt sich nicht bestimmen, da kein Unterschied im Laufverhalten der Komplexe in Spur 4 und 5 bzw. 6 und 7 sichtbar ist.

Das Vorhandensein von CPSF im Polyadenylierungskomplex auf langem Poly(A) sollte durch ein weiteres Experiment geklärt werden. Die Stücke des *Shiftgels*, welche Protein-RNA-Komplexe enthielten, wurden ausgeschnitten. Die enthaltenen Proteine wurden im denaturierenden SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose-Membranen transferiert (siehe 2.6.3). Es folgte eine Immunfärbung mit Antikörpern gegen CPSF-100K. Das Ergebnis ist in Abbildung 3.23 dargestellt. In Abbildung 3.23 **A** sind die Positionen markiert, an welchen die Protein-RNA-Komplexe aus dem Gel ausgeschnitten wurden. Die Spur, aus welcher die Fragmente 7 und 8 isoliert wurden, enthielt CPSF ohne RNA und diente sowohl als Positivkontrolle (Nr. 7) als auch als Negativkontrolle für CPSF-100K (Nr. 8). Die Nummern der Spuren in Abbildung 3.23 **B** entsprechen den Nummern der in **A** markierten Fragmente.

CPSF-100K konnte sowohl im Komplex mit RNA (Spur 2) als auch im vollständigen Polyadenylierungskomplex mit PABPN1 (Spur 5) bzw. L136S (Spur 6) nachgewiesen werden. Die Negativkontrolle (Spur 8) verdeutlicht, dass CPSF ohne RNA nicht in Höhe des vollständigen Polyadenylierungskomplexes retardiert. Aus diesem Experiment kann geschlossen werden, dass neben der Poly(A)-Polymerase und PABPN1 auch CPSF im Polyadenylierungskomplex verbleibt.

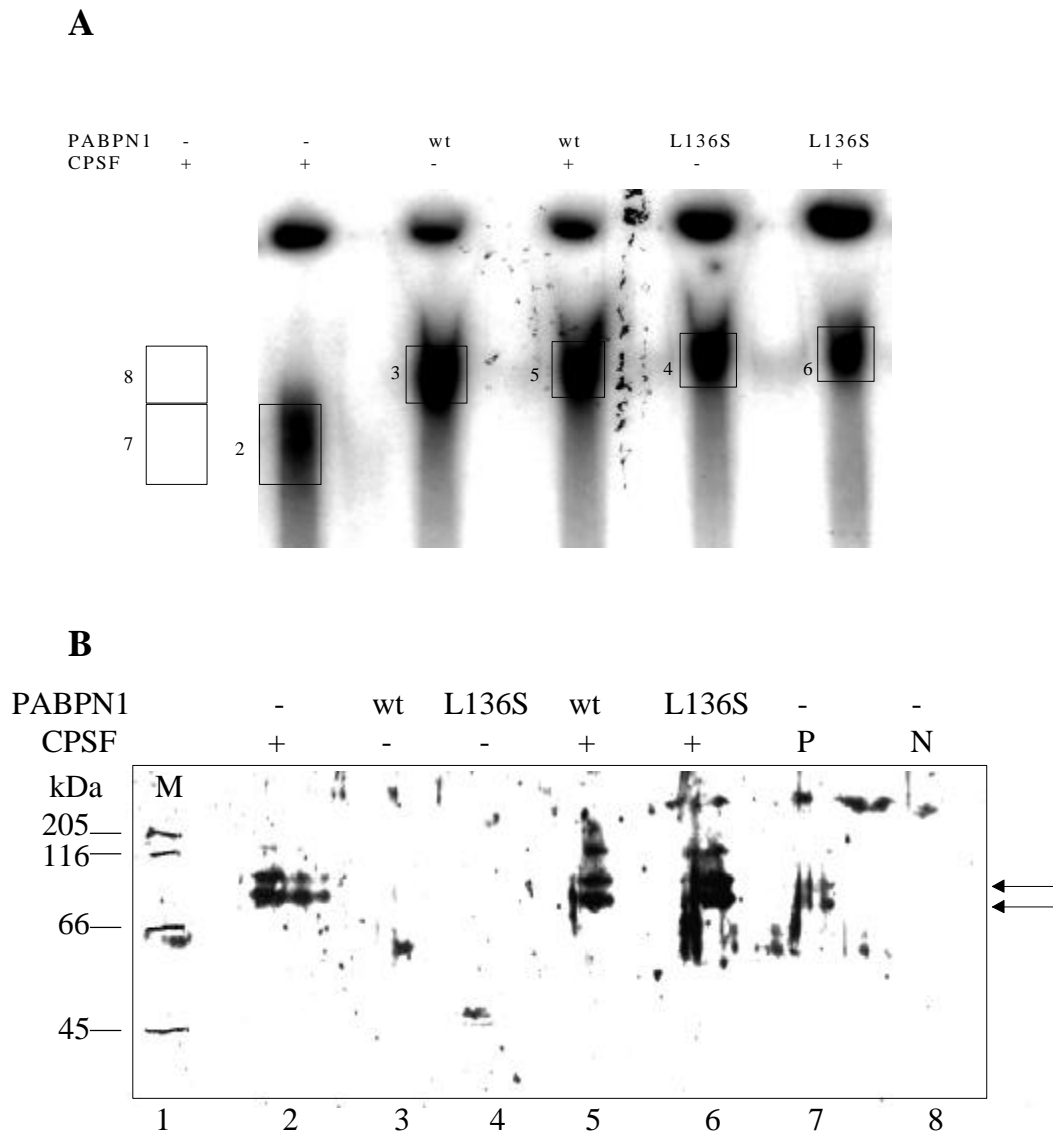


Abbildung 3.23: Analyse von Polyadenylierungskomplexen mittels Western Blot und Immunfärbung

Die Protein-RNA-Komplexe wurden aus dem nativen *Shift*-Gel laut den Makierungen in **A** ausgeschnitten, direkt im SDS-Gel aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Die Proteine wurden mit Antikörpern gegen CPSF-100K behandelt. Die Pfeile auf der rechten Seite in **B** markieren die erwarteten Banden (vollständiges CPSF-100K und Abbauprodukt), P: Positivkontrolle (im *Shiftgel* aufgetragenes CPSF ohne RNA, auf Höhe des CPSF-RNA-Komplexes ausgeschnitten), N: Negativkontrolle (im *Shiftgel* aufgetragenes CPSF ohne RNA, auf Höhe des CPSF-PABPN1-RNA-Komplexes ausgeschnitten), Die Nummerierung in **A** stimmt mit der Nummerierung der Spuren in **B** überein.

3.6.2. Die Mutante L136S unterbindet den CPSF-Effekt bei der Polyadenylierung von langem Poly(A)

Da die Mutante L136S nicht in der Lage ist, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren, sollte ihr Verhalten auf RNA mit vollständig verlängertem Poly(A)-Schwanz getestet werden. Es wurden Polyadenylierungsreaktionen mit L3pre-A₃₀₀ durchgeführt (2.7.3). Zur Substrat-RNA

wurde Poly(A)-Polymerase zugegeben und die Reaktion für 10, 30 bzw. 60 Min. beobachtet. In weiteren Ansätzen wurde CPSF, PABPN1 bzw. die Kombination aus CPSF und PABPN1 zu den Reaktionen gegeben. Anstelle des wt PABPN1 wurde auch die Mutante L136S eingesetzt. Die Ergebnisse der Reaktionen sind in der folgenden Abbildung dargestellt.

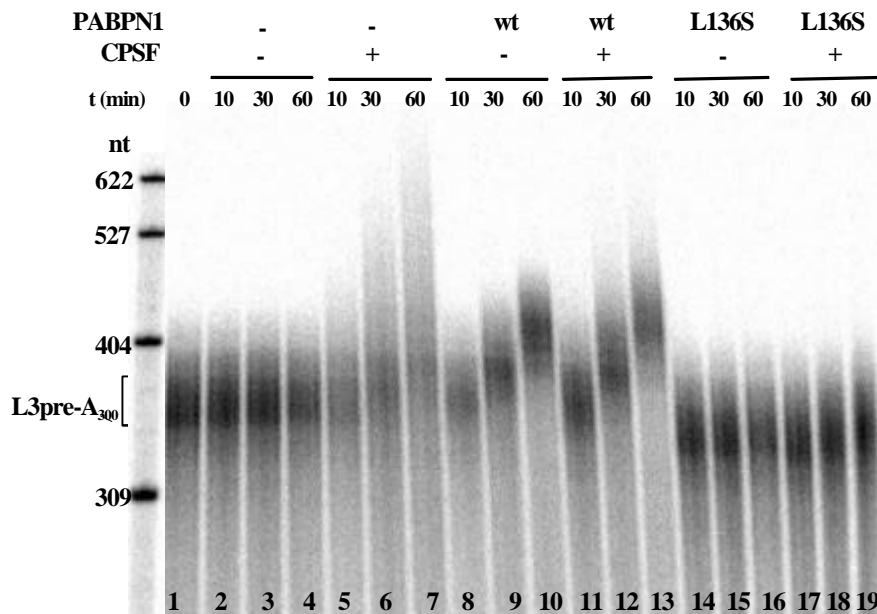


Abbildung 3.24: Polyadenylierung von L3pre-A₃₀₀

Im 25 μ l-Ansatz wurden 80 fmol L3pre-A₃₀₀, 9 fmol PAP, 2 pmol PABPN1 bzw. L136S, 100 fmol CPSF, 0,5 mM ATP 10, 30 und 60 Min. inkubiert und die Reaktionsprodukte im denaturierenden Gel aufgetrennt.

Die Poly(A)-Polymerase allein kann das Substrat in den getesteten Zeiträumen nicht meßbar verlängern (Spur 2-4). Durch die Zugabe von CPSF (Spur 5-7) und/oder wt PABPN1 (Spur 8-10 bzw. 11-13) zur Reaktion wird die Poly(A)-Polymerase stimuliert, die Reaktion bleibt jedoch ineffizient. Es ist kein deutlicher Unterschied im Stimulierungsverhalten von CPSF, PABPN1 bzw. CPSF/PABPN1 zu erkennen. Innerhalb 60 Min. werden noch bis zu ca. 200 AMP-Reste in den Poly(A)-Schwanz integriert. Die Punktmutante L136S war nicht fähig, die Poly(A)-Polymerase auf RNA mit vollständig verlängertem Poly(A)-Schwanz zu stimulieren (Spur 14-16). Interessanterweise verhindert L136S auch die Stimulation durch CPSF (Spur 17-19). Das Substrat wird gar nicht mehr verlängert. Dies bedeutet, dass durch L136S der Kontakt von der Poly(A)-Polymerase zum CPSF auf langem Poly(A) unterbrochen wird. Es wird also eine Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze durchgeführt. Demgegenüber wird auf kurzen Poly(A)-Schwänzen (L3pre-A₁₅) die CPSF-abhängige Stimulation der Poly(A)-Polymerase nicht durch L136S inhibiert (siehe Abbildung 3.19B).

3.6.3. Wie viele Moleküle L136S sind nötig, um die CPSF-abhängige Stimulierung der Poly(A)-Polymerase auf langem Poly(A) zu unterbinden?

Im vorangegangenen Kapitel wurde gezeigt, dass die Mutante L136S die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase durch CPSF auf langen Poly(A)-Schwänzen unterbinden kann (3.6.2). Nun sollte überprüft werden, inwieweit der Poly(A)-Schwanz mit der Mutante bedeckt sein muss, um die Stimulierung durch CPSF zu inhibieren. Dazu wurden die Poly(A)-Schwänze der Substrat-RNA von 10 % bis 150 % mit L136S besetzt. Dies bedeutet, dass bei 10 % Besetzung der Großteil der Poly(A)-Schwänze unbedeckt vorlag, wohingegen bei (theoretischen) 150 % Besetzung L136S im Überschuss vorlag und somit alle Bindungsstellen auf dem Poly(A)-Schwanz mit L136S besetzt sind. Es wurden Polyadenylierungs-Reaktionen von L3pre-A₃₀₀ wie unter 2.7.3 beschrieben durchgeführt. Steigende Mengen L136S wurden zugesetzt und die Reaktion für 60 Min. bei 37 °C inkubiert. Das Ergebnis dieses Experiments ist in Abbildung 3.25 dargestellt.

Um die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase durch CPSF vollständig zu inhibieren, ist es nötig, den gesamten Poly(A)-Schwanz der Substrat-RNA mit der Mutante L136S zu besetzen (Spur 12). Bis zu einer 40 %-igen Besetzung des Poly(A)-Schwanzes kommt es zu keiner sichtbaren Reduktion des stimulierenden Effektes von CPSF. Dies erkennt man am übereinstimmenden Aussehen der Spuren 3 und 6 bis 9. Erst durch Zugabe von 65-80 % L136S kommt es zu einer reduzierten Stimulierung der Poly(A)-Polymerase durch CPSF, welche mit Erreichen von 100 % Besetzung der RNA mit der Mutante L136S völlig zum Erliegen kommt (Spuren 12-14). Aus diesem Experiment kann geschlussfolgert werden, dass PABPN1 die Länge der Poly(A)-Schwänze misst, da erst mit Erreichen einer vollständigen Besetzung des vollständig verlängerten Poly(A)-Schwanzes mit L136S die Stimulation durch CPSF unmöglich wird.

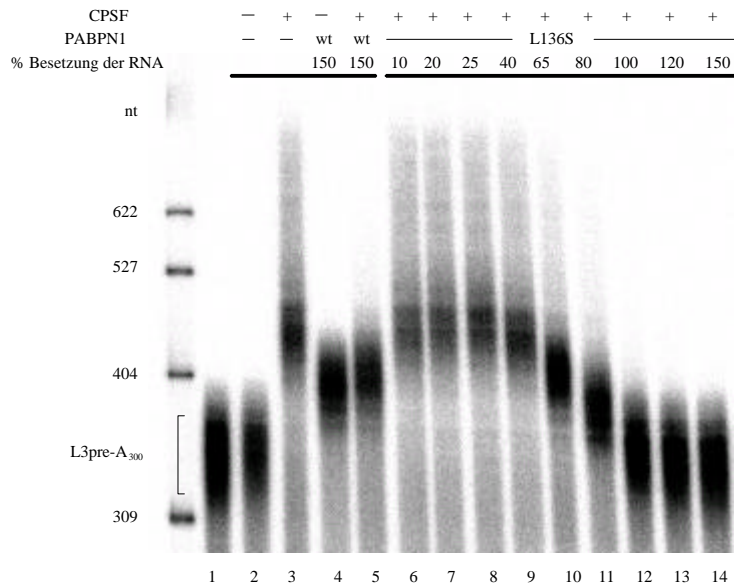


Abbildung 3.25: Die Hemmung der CPSF-abhängigen Stimulierung der PAP durch L136S

Die Polyadenylierung wurde mit je 80 fmol radioaktiv markiertem L3pre-A₃₀₀ durchgeführt. In den Spuren 2-14 sind je 9 fmol PAP enthalten. Die Spuren 2-5 dienen als Kontrollreaktionen (Spur 2: unstimulierte Reaktion, Stimulation durch 100 fmol CPSF (Spur 3), 2 pmol *wt* PABPN1 (Spur 4) und CPSF + PABPN1 (Spur 5)). In den Spuren 6-14 wurden neben CPSF steigende Mengen L136S (0,16-2 pmol) zugegeben. Die RNA wurde dadurch zu den oben angegebenen Prozentzahlen mit der Mutante gesättigt (120% und 150 % bedeutet, dass die Mutante im Überschuss vorlag).

4. Diskussion

PABPN1 stimuliert die Poly(A)-Polymerase und kontrolliert die Länge der synthetisierten Poly(A)-Schwänze. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von PABPN1 auf den K_M -Wert der Poly(A)-Polymerase für Poly(A) bestimmt. Die Domänenstruktur von PABPN1 wurde hinsichtlich der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase untersucht. Die Helikale Domäne im N-Terminus von PABPN1 erwies sich als essentiell aber nicht ausreichend für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase. Für die Stimulation wichtige Aminosäuren innerhalb der Helikalen Domäne und in der RNP-Domäne wurden identifiziert und es wurde untersucht, wie viele Moleküle PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase interagieren. Eine Unterbrechung der CPSF-Poly(A)-Polymerase-Kontakte durch PABPN1 wurde als Mechanismus der Längenkontrolle identifiziert. Dafür ist die stöchiometrische Besetzung des A₂₅₀-Schwanzes mit PABPN1 nötig.

4.1. *PABPN1 erhöht die Affinität der Poly(A)-Polymerase für Poly(A)*

PABPN1 rekrutiert die Poly(A)-Polymerase für ihr Substrat, indem es eine weitere Bindungsstelle für die Poly(A)-Polymerase auf der RNA bereitstellt. Durch die dadurch erhöhte Affinität der Poly(A)-Polymerase für ihr Substrat, und nur dadurch, wird die Poly(A)-Polymerase stimuliert (Rekrutierungsmodell).

Durch die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter K_M und v_{max} der Poly(A)-Polymerase für Poly(A) und PABPN1-besetztes Poly(A) konnte der Einfluss von PABPN1 auf die Poly(A)-Polymerase charakterisiert werden. PABPN1 erhöht die Affinität der Poly(A)-Polymerase für Poly(A). Für die unstimulierte Reaktion wurde ein K_M von 2,2 μM 3'OH-Enden Poly(A) ermittelt, v_{max} betrug 4 $\mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$ (siehe 3.1). Die Messung des K_M unter unphysiologischen Polyadenylierungsbedingungen (mit Mn^{2+} anstelle von Mg^{2+}) ergab einen Wert von 13,7 nM, v_{max} betrug 10,5 $\mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$ (Daten nicht gezeigt). Die Messungen wurden auf Poly(A) mit einer durchschnittlichen Länge von 170 AMP-Resten durchgeführt.

Maximalgeschwindigkeiten dieser Größenordnung wurden auch bei früheren Messungen bestimmt. Wittmann & Wahle (1997) ermittelten für rekombinante Poly(A)-Polymerasen, welche in *E. coli*- bzw. *Baculovirus*-infizierten Sf21-Zellen überexprimiert wurden, v_{max} -

Werte auf A_{5-30} von $25 \mu\text{mol/Min.}\cdot\text{mg}$ bzw. $35 \mu\text{mol/Min.}\cdot\text{mg}$. Maximalgeschwindigkeiten von $3 \mu\text{mol/Min.}\cdot\text{mg}$ auf Poly(A) und $40 \mu\text{mol/Min.}\cdot\text{mg}$ auf Oligo(A) ermittelte Wahle (1991) für eine C-terminal verkürzte Version der bovinen Poly(A)-Polymerase. Vergleicht man diese Werte, wird deutlich, dass Poly(A)-Polymerasen auf Poly(A) im Allgemeinen höhere Maximalgeschwindigkeiten aufweisen als auf Oligo(A). Dies könnte darin begründet liegen, dass PABPN1 auf langem Poly(A) viel mehr Möglichkeiten hat, auf der RNA zu binden. Theoretisch liegt jeweils ein Nukleotid versetzt die nächste Bindungsstelle, und dies auf die gesamte Länge des Poly(A). Auf Oligo(A) hingegen ist die Anzahl an Bindungsstellen aufgrund der geringen Anzahl von AMP-Resten vergleichsweise klein.

Die Werte für k_M bewegen sich in einem sehr weiten Bereich. In Tabelle 5 wurden die Ergebnisse von k_M -Bestimmungen verschiedener Poly(A)-Polymerasen zusammengefasst.

Tabelle 5: Übersicht über die Konstanten K_M verschiedener Poly(A)-Polymerasen

Es ist jeweils der Organismus angegeben, aus welchem die Poly(A)-Polymerase stammt, das zur Untersuchung eingesetzte Substrat und das Kation. Die k_M -Werte sind jeweils in μM 3'-OH-Enden angegeben. In der letzten Spalte sind die Referenzen für die aufgelisteten Werte aufgeführt.

Organismus	Substrat	Kation	K_M (μM 3'OH)	Quelle
<i>Bos taurus</i>	A_{5-30}	Mg^{2+}	100-180	Wittmann & Wahle (1997)
<i>Bos taurus</i>	A_{12-18}	Mg^{2+}	300	Wahle (1991)
<i>Bos taurus</i>	A_{80}	Mg^{2+}	140-360	Wahle (1991)
<i>Bos taurus</i>	A_{170}	Mg^{2+}	2,2	diese Arbeit
<i>Bos taurus</i>	A_{5-30}	Mn^{2+}	0,3-1,6	Wittmann & Wahle (1997)
<i>Bos taurus</i>	A_{11-20}	Mn^{2+}	0,08	Martin & Keller (1996)
<i>Bos taurus</i>	A_{12-18}	Mn^{2+}	10	Wahle (1991)
<i>Bos taurus</i>	A_{80}	Mn^{2+}	3,6	Wahle (1991)
<i>Bos taurus</i>	A_{170}	Mn^{2+}	0,0014	diese Arbeit
<i>H. sapiens</i>	A_{15}	Mn^{2+}	0,051	Kyriakopoulou <i>et al.</i> (2001)

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass sich die Werte für k_M sowohl unter physiologischen als auch unter unphysiologischen Bedingungen in einem sehr weiten Bereich bewegen. Die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte liegen vergleichsweise niedrig. Die Nutzung verschiedener Puffer bei den Messungen kann nicht der alleinige Grund für diese großen Unterschiede sein. Wurde die Bestimmung des K_M -Wertes der Poly(A)-Polymerase mit dem bei Wahle (1991) angegebenen Puffer durchgeführt, wurde ein um Faktor 3 höherer Wert

erhalten (Daten nicht gezeigt). Als Substrat wurde in dieser Arbeit im Gegensatz zu den in der Tabelle dargestellten Messungen unfractioniertes Poly(A) mit einer Durchschnittslänge von 170 AMP-Resten genutzt. Die Länge der einzelnen Poly(A)-Moleküle war jedoch sehr heterogen. Möglicherweise ist dies eine weitere Ursachen für die hier ermittelten niedrigen Werte für K_M . Ziel der Bestimmungen der enzymkinetischen Parameter war es jedoch, den Einflusses von PABPN1 auf die Poly(A)-Polymerase zu charakterisieren. Für diesen Zweck ist die Nutzung solch eines heterogenen Substrates ausreichend, da die K_M -Werte desselben Substrats bestimmt und verglichen werden.

Bot man der Poly(A)-Polymerase mit PABPN1 besetztes Poly(A) als Substrat an, verminderte sich der k_M etwa um den Faktor 30 auf 76 nM Poly(A). Die Maximalgeschwindigkeit änderte sich durch die Zugabe von PABPN1 zur Reaktion nicht signifikant ($V_{max} = 3,5 \mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$, siehe 3.1). Die Verringerung des k_M -Wertes bei gleichbleibender Maximalgeschwindigkeit deutet auf eine Erhöhung der Affinität der Poly(A)-Polymerase für Poly(A) durch PABPN1 hin. Eine Erhöhung der Affinität kann zwei verschiedene Ursachen haben: die Beschleunigung des geschwindigkeitsbestimmenden Schritts der Reaktion durch Zunahme der Assoziationsrate oder die Erhöhung der Stabilität des Proteinkomplexes durch Abnahme der Dissoziationsrate (Luo & Goss, 2001). Bei der Wirkung von PABPN1 auf die Poly(A)-Polymerase kann von einer Stabilisierung des RNA/Poly(A)-Polymerase-Komplexes ausgegangen werden. PABPN1 rekrutiert die Poly(A)-Polymerase für ihr Substrat und stimuliert dadurch die Polyadenylierung. Eine ebensolche Erhöhung der Affinität wurde auch für die Poly(A)-Polymerase des Vaccina Virus beschrieben. VP55, die katalytisch aktive Untereinheit der Poly(A)-Polymerase wird durch die Untereinheit VP39 stimuliert (Gershon & Moss, 1993). VP39 erhöht die Affinität von VP55 für den wachsenden Poly(A)-Schwanz.

4.2. Für die Stimulierung der Polyadenylierung ist die RNA-Bindung von PABPN1 nötig

Eine direkte Abhängigkeit der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase von der RNA-Bindung des PABPN1 konnte mittels Punktmutanten in der RNA-Bindungsdomäne nachgewiesen werden. Aminosäuren in den stark konservierten RNP-Motiven (Y175 in RNP 2, F215 in RNP 1) wurden mutiert. Es zeigte sich, dass Mutanten mit verringerter Affinität zu Poly(A) nur noch teilweise bzw. gar nicht mehr in der Lage waren, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren.

RNA-Bindungsdomänen und die darin enthaltenen RNP-Motive sind evolutionär konservierte Domänen, welche in prä-mRNA-, mRNA-, prä-rRNA- und snRNA-bindenden Proteinen, in

Spleissfaktoren und hnRNP vorkommen (Dreyfuss *et al.*, 1993; Kenan *et al.*, 1991). Die β -Faltblätter mit den sie verbindenden *Loops* und den angrenzenden N- und C-terminalen Regionen der RBD bilden zusammen eine exponierte Plattform für die direkte und spezifische RNA-Bindung (Görlach *et al.*, 1992). Durch gerichtete Mutagenese von Aminosäuren im RNP-1 und RNP-2 wurden zum Beispiel die Aminosäuren Asn9, Thr11, Tyr13, Gln54, Phe56 und Gln83 aus U1A als essentiell für die Bindung an die Substrat-RNA erkannt (Scherly *et al.*, 1989, 1990; Jessen *et al.*, 1991; Wan *et al.*, 2001). Übereinstimmend mit den Ergebnissen für U1A wiesen die Punktmutanten Y175 (entspricht Tyr13 in U1A) und F215 (entspricht Gln54 in U1A) von PABPN1 eine ebensolche Verringerung der Affinität für RNA auf. Auch von Wan *et al.* (2001) wurden die entsprechenden Reste im hnRNP C1 als essentiell für die RNA-Bindung beschrieben. Keines der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Proteine mit Punktmutationen in den RNP-Motiven war in der Lage, die Poly(A)-Polymerase wie das Wildtypprotein auf A₂₅ zu stimulieren. Etwa vier mal mehr Protein musste eingesetzt werden, um diese Stimulierung hervorzurufen. Die Mutante Y175A kann überraschender Weise die Polyadenylierung von A₈₀ im selben Maße wie das Wildtypprotein stimulieren. Dies muss jedoch auf die Kooperativität des PABPN1 zurückgeführt werden, da diese Mutante auf A₂₅ ebenfalls Defekte in der Stimulierung zeigt (siehe dazu auch 4.3.2).

Bis auf die auf die Kooperativität zurückzuführende Ausnahme wiesen alle getesteten Mutanten mit einem Defekt in der RNA-Bindung auch eine verringerte Fähigkeit zur Stimulation der Polyadenylierung auf. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die RNA-Bindung eine Grundvoraussetzung für die Stimulation der Polyadenylierung ist. Eine Mutante, welche gar nicht zur Bindung von RNA befähigt ist, muss demzufolge völlig inaktiv in der Stimulierung der Polyadenylierung sein. Diese Ergebnisse deuten auf die Korrektheit des Rekrutierungsmodells (siehe 4.1) hin.

4.3. Die Helikale Domäne von PABPN1 ist notwendig aber nicht ausreichend für die Stimulierung der Polyadenylierung

Um den Einfluss der einzelnen Domänen von PABPN1 auf die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase zu untersuchen, wurden N-terminal verkürzte und chimäre Proteine aus PABPN1 und PABPC1 hergestellt. Die Proteine Δ N113, H12, H4C und HR4 (Übersicht siehe

Abbildung 3.12, Seite 54) wurden auf ihre Fähigkeit, RNA zu binden und die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren, getestet (siehe 3.3 und 3.4).

4.3.1. Ist die Helikale Domäne eine *coiled-coil*-Domäne?

Es wurde postuliert, dass sich die Aminosäuren 119-147 des N-Terminus von PABPN1 α -helikal anordnen. Von T. Scheuermann (pers. Mitteilung) konnte durch Messung des CD-Spektrums von PABPN1 die α -helikale Struktur der Domäne gezeigt werden. Die Helikale Domäne ist hoch konserviert (100 % Identität zu den Proteinen aus *H. sapiens*, *M. musculus* und *X. laevis*, (siehe

Abbildung 3.7, Seite 49), 81 % Identität zum homologen Protein aus *Drosophila melanogaster*, Benoit *et al.*, 1999).

Die Aminosäuren Leucin 119 bis Methionin 147 lassen sich als Wiederholungssequenz von jeweils sieben Aminosäuren (a bis g) anordnen, wobei die Positionen a und d von hydrophoben Aminosäuren eingenommen werden. In den anderen Positionen befinden sich vorwiegend geladene Aminosäuren (siehe 3.3.3). Diese Strukturmerkmale sind typisch für *coiled-coil*-Domänen. Sie sind an der Ausbildung von Superhelices durch eng assoziierte Paare von α -Helices beteiligt. Sie dienen der Dimerisierung von Proteinen bzw. ermöglichen Protein-Protein-Wechselwirkungen (McLachlan & Karn, 1982, Lupas *et al.*, 1991). Auch andere RNA-Bindungsdomänen verfügen über *coiled-coil*-Domänen, über welche sie in Protein-Protein-Wechselwirkungen treten können (Wan *et al.*, 2001). Für das homologe Protein XPABPII aus *Xenopus laevis* wird eine α -helikale *coiled-coil*-Domäne im N-Terminus beschrieben (Kim *et al.*, 2001). Auch das hnRNP C1 verfügt über eine *coiled-coil*-Domäne, welche Dimerisierungen des Proteins vermittelt. Für PABPN1 wurde nachgewiesen, dass das Protein *in vitro* zu Aggregationen neigt (Nemeth *et al.*, 1995). Die Dimerisierung von PABPN1 konnte durch GST-*Pulldown*-Experimente gezeigt werden. So banden sowohl das *wt* PABPN1 als auch die Mutanten Δ N113 und Δ N160 an immobilisiertes PABPN1 (U. Kühn, persönliche Mitteilung).

Die Aggregationsneigung des Proteins wird durch Erhöhung der Anzahl an GCG-Wiederholungen (sechs im Gen des N-Terminus des *wt* PABPN1 gegenüber neun in der mutierten Form) noch erhöht und führt möglicherweise zur Oculopharyngealen Muskeldystrophie (OPMD). Die Proteine aggregieren in Filamenten mit einem Durchmesser

von 8,5 nm (Tome & Fardeau; 1980, Uyama *et al.*, 1996; Brais *et al.*, 1998, 1999). Die durch GCG codierten zusätzlichen Alanine in N-Terminus von PABPN1 können Strukturen ausbilden, welche durch unpolare Interaktionen der Seitenketten aufgrund einer Falschfaltung zu unlöslichen Filamenten aggregieren und zum Zelltod führen können (Perutz, 1999; Rankin *et al.*, 2000; Calado *et al.*, 2000).

4.3.2. RNA-Bindung und Kooperativität

Es wurde gezeigt, dass die Voraussetzung für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase durch PABPN1 die Bindung des Proteins an die RNA ist. Das N-terminal um 113 Aminosäuren verkürzte PABPN1 ($\Delta N113$) und die chimären Proteine H12 und H4C (Übersicht siehe 3.4.1) zeigten kaum Veränderung in der RNA-Bindung verglichen mit der des Wildtypproteins (siehe 3.3.2, 3.4.2). HR4 band mit etwas schlechterer Affinität RNA (ca. Faktor 5, siehe 3.4.2).

Die RNA-Bindung wird im nukleären Poly(A)-Bindungsprotein 1 von der RNP-Domäne vermittelt, der C-Terminus leistet einen weiteren Beitrag. Für die Spezifität der Bindung zu Poly(A) ist die RNA-Bindungsdomäne zuständig (Nemeth, 1998).

Die isolierte RNP-Domäne von PABPN1 weist eine vergleichsweise hohe Dissoziationskonstante (k_D) von ca. 1,5 μM für A_{14} auf, der k_D des Wildtyp beträgt 8 nM (nach Kühn *et al.*, in Vorbereitung). Die ist nicht weiter ungewöhnlich und wird auch bei isolierten Domänen anderer RNA-bindender Proteine wie Nucleolin und hnRNP A1 nachgewiesen (Shamoo *et al.*, 1994; Abdul-Manan *et al.*, 1996; Serin *et al.*, 1997). Die RNA-Bindung der isolierten RBD 4 des cytosolischen Poly(A)-Bindungsproteins PABPC1 liegt etwa um Faktor 100 niedriger (k_D auf $A_{23} = 72\text{--}340$ nM) als die des Wildtyp-PABPC1 (k_D auf $A_{23} = 2\text{--}6$ nM, Kühn 1996). Der isolierte C-Terminus von PABPN1 weist einem k_D für A_{14} von 800 nM auf (Nemeth, Doktorarbeit 1998).

Die Punktmutante Y175A in der RNP-Domäne zeigte auf A_{25} eine deutlich verringerte Stimulation der Polyadenylierung, während die Mutante die Polyadenylierung von Poly(A) wie das Wildtypprotein stimulierte (siehe 3.2.3). Da auf A_{25} theoretisch nur ein Molekül PABPN1 binden kann, auf A_{80} jedoch sechs, ist der Unterschied in der Stimulierung der Polyadenylierung höchstwahrscheinlich auf die Kooperativität von PABPN1 zurückzuführen. Diese ist mit einem Wert von $\omega = 50$ relativ niedrig (Meyer *et al.*, 2002). Eine ähnlich niedrige Kooperativität weist das Protein hnRNP A1 ($\omega = 36$) auf. Diese wird, wie auch bei

PABPN1 durch den C-Terminus des Proteins vermittelt (Nadler *et al.* 1991; Kühn *et al.*, in Vorbereitung). Die C-Termini von PABPN1 und hnRNP A1 zeigen keine Sequenzähnlichkeiten, sie sind jedoch beide Arginin-reich und weisen Dimethylierungen der Arginine auf (Kim *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999). Offensichtlich reicht eine solch geringe Kooperativität aus, um die Defekte in der RNA-Bindung des einzelnen PABPN1 zu kompensieren und in der gemeinsamen Reaktion mehrerer Moleküle Y175A eine dem Wildtyp entsprechende Stimulation der Polyadenylierung auf Poly(A) hervorzurufen.

4.3.3. Die Stimulation der Polyadenylierung durch DN113 und die chimären Proteine

ΔN113, H12, H4C und HR4 wurden in *in vitro*-Polyadenylierungsassays hinsichtlich der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase getestet (3.3.3 und 3.4.3). Die Deletion der ersten 113 Aminosäuren des N-Terminus von PABPN1 verursachte keine Änderung der Stimulation der Poly(A)-Polymerase (siehe 3.3.3). Wurde jedoch der gesamte N-Terminus deletiert (Aminosäuren 1 bis 160), konnte keinerlei stimulierende Aktivität mehr nachgewiesen werden (Nemeth, Doktorarbeit 1998 und Kapitel 3.3.3). Die im N-Terminus von PABPN1 befindliche Helikale Domäne (Aminosäuren 119–147) wurde daher als Interaktionsdomäne mit der Poly(A)-Polymerase vorgeschlagen.

Da die isolierte Helikale Domäne keine RNA binden kann, wurde versucht, die stimulierende Fähigkeit der Helikalen Domäne auf eine RNA-bindende Domäne von PABPC1 zu übertragen. PABPC1 bindet Poly(A)-Schwänze im Cytoplasma, ist jedoch nicht fähig, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren (Wahle, 1993). Als RNA-bindender Teil des chimären Proteins wurde die Kombination aus den RNA-Bindungsdomänen 1 und 2 (12) von PABPN1 ausgewählt, weil sie mit *wt* PABPC1-Affinität RNA binden (Kühn & Pieler, 1996). Das chimäre Protein H12 stimulierte die Poly(A)-Polymerase nicht signifikant (siehe 3.4.3). Die Poly(A)-Bindung war jedoch nicht beeinflusst. Möglicherweise besitzt das Protein H12 nicht die für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase nötige Struktur. Eine weitere Erklärung könnte das Fehlen anderer, für die Stimulation der Poly(A)-Polymerase wichtiger Aminosäuren bzw. Domänen von PABPN1 sein.

Aus diesem Grund wurden sowohl die RNP-Domäne als auch der C-Terminus von PABPN1 gegen eine RNA-Bindungsdomäne des cytosolischen Poly(A)-Bindungsproteins ausgetauscht und dadurch deren Funktion in der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase untersucht. Für

diese Proteine wurde nicht 12 (siehe oben) sondern RBD 4 von PABPC1 als zusätzliche RNA-Bindungsdomäne genutzt. Im chimären Protein verblieb jeweils eine der RNA-bindenden Domänen von PABPN1. Die Affinität zur Substrat-RNA sollte durch das Zusammenwirken von RNP-Domäne (bzw. C-Terminus) und RBD 4 erhöht werden.

Das chimäre Protein H4C konnte die Poly(A)-Polymerase nur in sehr geringem Maße stimulieren. Die Stimulation war verglichen mit dem Wildtypprotein derart niedrig, dass sie nicht quantifiziert werden konnte (3.4.3). Der Grund dafür ist unbekannt. Die RNP-Domäne ist für die Spezifität der RNA-Bindung verantwortlich (Nemeth, Doktorarbeit 1998). Eine Funktion der RNP-Domäne in der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase ist möglich aber nicht sehr wahrscheinlich.

Auch das chimäre Protein HR4 konnte die Poly(A)-Polymerase nicht stimulieren. Es wurde nur die durch die unstimulierte Poly(A)-Polymerase hervorgerufene Verlängerung des Poly(A) beobachtet (siehe 3.4.3). Für das C-terminal verkürzte Protein Δ C-His₆ konnte von A. Nemeth (Doktorarbeit 1998) keine Stimulierung der Poly(A)-Polymerase detektiert werden. Diese funktionelle Inaktivität wurde auf die schlechte RNA-Bindung des Proteins zurückgeführt. Das chimäre Protein HR4 bindet zwar auch schlechter als PABPN1 die RNA, jedoch sollte die Affinität zur RNA ausreichen, um eine Stimulierung der Polyadenylierung zu gewährleisten. Da diese nicht beobachtet werden konnte, deuten die Ergebnisse auf eine Funktion des C-Terminus in der Stimulierung der Polyadenylierung hin. Kühn *et al.*, (in Vorbereitung) konnten mittels *GST-Pulldown*-Experimenten zeigen, dass der C-Terminus in Protein-Protein-Wechselwirkungen sowohl mit der Poly(A)-Polymerase, mit CPSF-30K als auch mit PABPN1 selbst involviert ist. Etwas überraschend an diesen Bindungsexperimenten war, dass das N-terminal deletierte PABPN1 (Δ N) stärker als das *wt* PABPN1 an die Poly(A)-Polymerase band. Das Protein Δ N113 zeigte eine noch stärkere Bindung an die Poly(A)-Polymerase als die Mutante Δ N. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Helikale Domäne essentiell für Stimulierung der Polyadenylierung ist. Das C-terminal um die letzten 33 Aminosäuren verkürzte PABPN1 (Δ C33) konnte weder mit der Poly(A)-Polymerase noch mit *wt* PABPN1 interagieren. Bringt man diese Ergebnisse mit den in dieser Arbeit erhaltenen Resultaten in Zusammenhang, ergibt sich folgendes Modell: der saure N-Terminus und der basische C-Terminus von PABPN1 interagieren miteinander. Die Poly(A)-Polymerase tritt mit der Helikalen Domäne und dem C-Terminus von PABPN1 in Wechselwirkungen. Die Poly(A)-Polymerase konkurriert mit dem C-Terminus von PABPN1 um die Wechselwirkung mit dem N-Terminus von PABPN1. Die Affinität der Poly(A)-Polymerase für ihr Substrat wird durch PABPN1 erhöht, die Polyadenylierungs-

reaktion wird stimuliert. Durch die Deletion der ersten 113 Aminosäuren von PABPN1 ist keine Wechselwirkung zwischen N- und C-Terminus mehr möglich. Die Helikale Domäne des N-Terminus von PABPN1 ist für die Interaktion mit der Poly(A)-Polymerase frei. Da die Poly(A)-Polymerase nicht mehr mit dem C-Terminus um die Bindung an den N-Terminus konkurrieren muss, ist die Bindung zwischen Poly(A)-Polymerase und PABPN1 fester, eine geringe Steigerung der Stimulierung der PAP ist zu verzeichnen. Wird nun der gesamte N-Terminus deletiert, kann die Poly(A)-Polymerase immer noch sehr gut mit PABPN1 über dessen C-Terminus interagieren, da keine sterische Hinderung durch den N-Terminus auftritt. Die Poly(A)-Polymerase wird jedoch durch das Fehlen der Helikalen Domäne im N-Terminus von PABPN1 nicht mehr stimuliert. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die Helikale Domäne sowohl in die Bindung als auch in die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase involviert ist, während der C-Terminus nur für die Bindung nötig ist.

Wie spezifisch diese Wechselwirkungen des C-Terminus sind, konnte bisher noch nicht geklärt werden. Es ist vorstellbar, dass die den Poly(A)-Schwanz bedeckenden PABPN1-Moleküle jeweils durch Wechselwirkungen zwischen den Helikalen Domänen und zwischen den C-Termini oder zwischen Helikaler Domäne des ersten Moleküls und C-Terminus den folgenden Moleküls miteinander interagieren.

Bisher gelang es nicht, PABPN1 zu kristallisieren. Die Struktur anderer RNA-bindender Proteine, wie z.B. U1A (Oubridge *et al.*, 1994) und hnRNP (Görlach *et al.*, 1992) konnte jedoch bereits bestimmt werden. Beide Proteine nehmen solch eine Struktur ein, dass N- und C-Terminus in relativ geringem Abstand und annähernd in die selbe Richtung die RNA-Bindungsdomäne verlassen. Dies könnte auf Interaktionen zwischen N- und C-Terminus der Proteine deuten. Der saure N- Terminus und der basische C-Terminus von PABPN1 könnten auf diese Weise ebenso miteinander interagieren. Weitere Hinweise für diese Theorie geben die Methyltransferasen PRMT1 und PRMT3, welche sowohl das wt PABPN1 als auch die N-Terminal verkürzte Variante von PABPN1 (Δ N160) methylieren konnten. Als besser für die Methylierung geeignet als das Wildtypprotein stellten sich übereinstimmend mit den vorangegangenen Überlegungen sowohl der isolierte C-Terminus als auch das N-Terminal verkürzte PABPN1 heraus (Smith *et al.*, 1999). Die Neigung von PABPN1 zu Aggregationen (Wahle *et al.*, 1993; Kühn *et al.*, in Vorbereitung) könnte auf intermolekulare Protein-Protein-Wechselwirkungen zurückzuführen sein.

4.4. Der Einfluss von Punktmutationen auf die Stimulierung der Polyadenylierung

Mittels Deletionsmutanten konnte die Bedeutung der Helikalen Domäne für die Stimulierung der Poly(A)-Polymerase erkannt werden. Punktmutationen in der Helikalen Domäne sollten die Funktion einzelner Aminosäuren in der Stimulierung der Polyadenylierung klären.

Es wurden vorwiegend die hydrophoben Aminosäuren in den Positionen a und d (siehe Abbildung 3.10) für die Mutation ausgewählt, da sie an der Ausbildung von Protein-Protein-Wechselwirkungen entweder zu anderen PABPN1-Molekülen oder der Poly(A)-Polymerase beteiligt sein sollten.

Die hydrophoben Aminosäuren wurden vorwiegend gegen hydrophile ausgetauscht (z.B. Leucin→Serin), teilweise wurde jedoch die Eigenschaft der Hydrophobizität nicht verändert sondern nur die Größe der Seitenkette (z.B. Leucin→Alanin). Die geladenen polaren Aminosäuren der „Rückseite“ der Helikalen Domäne (Positionen b, c, e, f, g) wurden ausnahmslos gegen Alanin ausgetauscht. Soweit möglich, wurde darauf geachtet, dass die ausgetauschte Aminosäure nicht größer ist als die ursprüngliche, um sterische Effekte auszuschließen.

Die Ergebnisse dieser Experimente zeigen, dass eine Mutation der hydrophoben Aminosäuren in Position d zwangsläufig eine Verringerung der Stimulation der Polyadenylierung hervorruft. Für Punktmutationen der hydrophoben Aminosäuren in Position a konnte nur teilweise eine Verringerung der Stimulation der Polyadenylierung beobachtet werden. Die Mutation der geladenen Aminosäuren in den anderen Positionen resultierte mit nur einer Ausnahme in keiner Änderung der stimulierenden Eigenschaften.

Aminosäureaustausche wurden von Wan *et al.* (2001) in der *coiled-coil*-Domäne von hnRNP C1 durchgeführt. Die Domäne ist für die Dimerisierung des Proteins zuständig. Aminosäuremutationen in den hydrophoben Aminosäuren der Positionen a und d führten zu Proteinen, welche nicht mehr dimerisieren konnten.

Fasst man diese Ergebnisse zusammen, spricht alles dafür, dass die hydrophoben Aminosäuren der Helikalen Domäne eine Plattform bilden, welche mit Aminosäureresten der Poly(A)-Polymerase in Wechselwirkungen treten kann. Die „Rückseite“ der Helix, welche von geladenen Aminosäuren gebildet wird, ist in die Interaktion nicht involviert.

4.5. *Leucin 136 ist bedeutsam für die Stimulation der Polyadenylierung*

Die Aminosäure Leucin 136 in der Helikalen Domäne ist essentiell für die Funktion des Proteins in der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase (3.5.2). Ein Austausch des Leucins 136 sowohl gegen Alanin, als auch gegen Serin führte zum vollständigen Verlust der stimulierenden Funktion des Proteins.

Die RNA-Bindung blieb vom jeweiligen Aminosäureaustausch unbeeinflusst (3.5.1). Dies ist nicht weiter erstaunlich, da die RNA-Bindeeigenschaften von der RNP-Domäne und dem C-Terminus vermittelt werden, welche nicht von der Mutation betroffen waren. Leucin ist eine hydrophobe Aminosäure. Wurde Serin, eine polare, Helix-destabilisierende Aminosäure anstelle des Leucin 136 in das Protein eingebaut, konnte keinerlei Stimulation der Poly(A)-Polymerase nachgewiesen werden. Dies könnte auf die Zerstörung bzw. veränderte Faltung der Helikalen Domäne durch den Einbau des Serins gründen. Leucin 136 befindet sich an Position d des Repeats drei der Helix (3.3.3). In den Positionen a und d der Repeats befinden sich ausnahmslos hydrophobe Aminosäuren wie Leucin, Valin, Isoleucin und Methionin. Es wäre also möglich, dass durch die Einführung einer Helix-destabilisierenden Aminosäure wie Serin die Struktur einer Helix nicht mehr oder nur unvollständig eingenommen werden kann und so die Interaktion mit der Poly(A)-Polymerase nicht mehr möglich ist. Diese Erklärung wird aber durch den Austausch des Leucins 136 gegen Alanin, eine Aminosäure, welche nicht destabilisierend auf Helices wirkt, entkräftet. Die Tatsache, dass das Protein L136A auch nicht in der Lage ist, die Poly(A)-Polymerase zu stimulieren, spricht dafür, dass die Aminosäure Leucin 136 in Interaktionen mit der Poly(A)-Polymerase treten kann und unentbehrlich für die Stimulierung der Polyadenylierung ist. Durch den Vergleich von CD-Spektren des Wildtypproteins mit denen der Mutanten L136A und L136S könnte man das Vorhandensein der Helix auch in den Punktmutanten bestätigen.

Es liegen mit den Proteinen L136A und L136S zwei Punktmutanten von PABPN1 vor, welche als kompetitive Inhibitoren für das Wildtypprotein identifiziert werden konnten (siehe 3.5.3). Als kompetitive Inhibitoren werden Moleküle bezeichnet, welche mit dem zu untersuchenden Protein um das Substrat konkurrieren. Die Competition spricht für die korrekte Faltung der Proteine. Die Bindung der Mutante L136S an die Poly(A)-Polymerase könnte man durch GST-Pulldown-Experimente nachweisen.

Da die Punktmutanten L136S und L136A dieselben Eigenschaften bezüglich RNA-Bindung und Stimulierung der Polyadenylierung aufwiesen, genügte es, die folgenden Experimente mit nur einer der Punktmutanten, L136S, durchzuführen.

4.6. Nur ein Molekül PABPN1 interagiert mit der Poly(A)-Polymerase

Um festzustellen, wie viele Moleküle PABPN1 mit einem Molekül Poly(A)-Polymerase interagieren, wurde die Mutante L136S als kompetitiver Inhibitor für PABPN1 eingesetzt (siehe 3.5.4). Es gibt mehrere Möglichkeiten für die Interaktion der Poly(A)-Polymerase mit PABPN1: es könnten mehrere bzw. alle Moleküle PABPN1 auf dem Poly(A)-Schwanz mit der Poly(A)-Polymerase interagieren. Dies würde eine überproportionale Hemmung der Polymerase durch Zugabe von L136S bewirken. Die Interaktion eines beliebigen Moleküls PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase sollte in einer recht schwachen und nicht-linearen Hemmung der Polymerase resultieren, recht große Mengen Mutante sollten ignoriert werden. Die beobachtete lineare Abhängigkeit der Hemmung der Poly(A)-Polymerase vom Anteil L136S im PABPN1-Pool deutet darauf hin, dass genau ein bestimmtes Molekül PABPN1 mit der Polymerase interagiert. Dies gilt sowohl für zu 80 % mit PABPN1 besetztes Poly(A) als auch für Poly(A) an welches statistisch nur ein Molekül PABPN1 binden kann. Es interagiert also genau ein, und wahrscheinlich das der Poly(A)-Polymerase benachbarte Molekül PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase.

4.7. Die Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze

Die Regulation der Länge von Poly(A)-Schwänzen dient der Regulation der Translation (Jacobson & Peltz, 1996; Sachs *et al.*, 1997) und dem mRNA *turnover* (Jacobson & Peltz, 1996).

Die Synthese von Poly(A)-Schwänzen kann in zwei Phasen unterteilt werden, eine langsame, distributive Synthese und eine nachfolgende schnelle, prozessive Polymerisation von AMP-Resten (Sheets & Wickens, 1989; Wahle, 1991; Bienroth *et al.*, 1993). Die prozessive Verlängerung der Poly(A)-Schwänze wird erst durch das gemeinsame Einwirken von CPSF und PABPN1 auf die Poly(A)-Polymerase bewirkt (Wahle, 1995). Die prozessive Synthese wird zugunsten einer langsamen distributiven Reaktion eingestellt, sobald die Poly(A)-Schwänze eine Länge von ca. 250 AMP-Resten erreicht haben. Diese Länge wird sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erreicht (Brawerman, 1981; Wahle, 1995). Dabei spielt es in den *in vitro*-Reaktionen keine Rolle, wie viele AMP-Reste der Poly(A)-Schwanz der Substrat-RNA

zu Beginn beinhaltet, die Gesamtlänge ist auf die genannten ca. 250 Nukleotide beschränkt (Wahle 1995).

Die Poly(A)-Polymerase kann weder durch CPSF noch durch PABPN1 noch durch die Kombination aus CPSF und PABPN1 auf RNA mit vollständig verlängerten Poly(A)-Schwänzen zu einer schnellen prozessiven Synthese stimuliert werden. Die Verlängerungsraten auf L3pre-A₃₀₀ mit CPSF und/oder PABPN1 unterscheiden sich kaum (Wahle, 1995).

Durch native *Gelshift*-Experimente konnte nachgewiesen werden, dass CPSF auf vollständig verlängertem Poly(A) nicht aus dem Polyadenylierungskomplex gedrängt wird (siehe 3.6.1). Es wurde bisher nur die 100K-Untereinheit von CPSF im Komplex nachgewiesen, das Vorhandensein der anderen Untereinheiten von CPSF im Komplex sollte in folgenden Experimente bewiesen werden.

Die Mutante L136S bindet mit Wildtypaffinität an Poly(A), kann die Poly(A)-Polymerase jedoch nicht stimulieren (siehe 3.6.2). L136S wurde in Polyadenylierungsassays von vollständig verlängertem Poly(A) eingesetzt, um die Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze näher zu untersuchen. Wurde die Mutante L136S in der Polyadenylierung von langem Poly(A) eingesetzt, konnte wie erwartet keinerlei Verlängerung des Poly(A)-Schwanzes beobachtet werden. Überraschenderweise wurde jedoch auch die durch CPSF hervorgerufene Verlängerung des Poly(A) unterdrückt (siehe 3.6.2). Daraus konnte eine Unterbrechung von Protein-Protein-Kontakten zwischen der Poly(A)-Polymerase und CPSF geschlossen werden. Da CPSF den Polyadenylierungskomplex nicht verlässt (siehe 3.6.1), müssen also Umstrukturierungen des Polyadenylierungskomplexes die Ursache für die unterbrochenen Wechselwirkungen sein. Diese treten erst auf, wenn 1. der Poly(A)-Schwanz die kritische Länge von ca. 250 Nukleotiden erreicht hat und 2. dieser vollständig mit PABPN1 besetzt ist (siehe 3.6.3). Keller *et al.*, (2000) konnten elektronenmikroskopisch zeigen, dass PABPN1-besetztes Poly(A) in zwei verschiedenen Formen auftritt. Unter Bedingungen, bei welchen die RNA im Überschuss vorlag, wurden filamentöse Strukturen beobachtet. Unter physiologischen Bedingungen traten globuläre Partikel mit einem maximalen Durchmesser von 21 nm auf. Wurde sehr großes Poly(A) mit sättigenden Anteilen PABPN1 in der Messung eingesetzt, reihten sich die Partikel wie Perlen auf einer Kette an, wobei sich ca. 200-300 AMP-Reste innerhalb eines Partikels befanden. Dass keine Partikel mit Durchmessern größer als 21 nm gefunden wurden, könnte darauf hindeuten, dass mit 21 nm die maximale Größe des Polyadenylierungskomplexes erreicht ist. Möglicherweise werden durch die Größe der entstehenden Protein-RNA-Komplexe Kontakte zwischen den Proteinen

des Polyadenylierungskomplexes unterbrochen und für die Stimulierung der Polyadenylierung wichtige Protein-Protein-Wechselwirkungen gehen verloren.

Die Unterbrechung von Kontakten im Polyadenylierungskomplex konnte auch von A. Knöth (persönliche Kommunikation) auf Substrat-RNA gezeigt werden, welche innerhalb des Poly(A)-Schwanzes Nicht-Poly(A)-Sequenzen enthielt (L3pre-A₁₅-N₆₃-A₂₀). Die Poly(A)-Polymerase konnte durch CPSF und PABPN1 nur zu einer semiprozessiven Reaktion stimuliert werden. Die Poly(A)-Schwänze wurden *downstream* des Nicht-Poly(A)-Teils (N₆₃) zu der vollständigen Länge von ca. 250 Nukleotiden verlängert. Die 15 AMP-Reste vor der internen Sequenz und der Nicht-Poly(A)-Teil, an welchen PABPN1 kaum binden kann, wurden demzufolge nicht in die Längenmessung einbezogen. Dies spricht für eine stöchiometrische Bedeckung des Poly(A)-Schwanzes mit PABPN1.

Die lückenlose, stöchiometrische Bedeckung konnte aus Experimenten geschlossen werden, bei denen die Poly(A)-Polymerase auf L3pre-A₁₅ durch CPSF in Anwesenheit der Mutante L136S stimuliert werden konnte, auf L3pre-A₃₀₀ diese Stimulation durch CPSF jedoch durch L136S verhindert wurde (siehe 3.5.2 und 3.6.2). Erst bei Besetzung aller Bindungsstellen für PABPN1 auf dem vollständig verlängerten Poly(A)-Schwanz, was einer lückenlosen, stöchiometrischen Bedeckung entspricht, konnte die Poly(A)-Polymerase im Beisein von L136S nicht mehr durch CPSF stimuliert werden.

4.8. Ein Modell der Längenkontrolle

Mit Hilfe dieser Daten kann ein Modell für die Längenkontrolle in Säugetieren aufgestellt werden. Das Modell ist in Abbildung 4.1 dargestellt.

Die Poly(A)-Polymerase ist nach der Spaltungsreaktion mit CPSF in Kontakt und polymerisiert die ersten AMP-Reste (Schritt 1). An den kurzen Oligo(A)-Schwanz bindet das erste Molekül PABPN1 und stimuliert gemeinsam mit CPSF die Poly(A)-Polymerase zu einer schnellen prozessiven Synthese des Poly(A)-Schwanzes. Sind etwa 15 weitere AMP-Reste addiert, kann das nächste Molekül PABPN1 an den Poly(A)-Schwanz binden u.s.w. Das zuerst gebundene Molekül PABPN1 bleibt während der gesamten Reaktion mit der Poly(A)-Polymerase in Verbindung, bis die vollständige Länge des Poly(A)-Schwanzes erreicht ist. Der Polyadenylierungskomplex wird durch die an den wachsenden Poly(A)-Schwanz bindenden PABPN1-Moleküle allmählich immer größer. Durch die Rückfaltung des wachsenden Poly(A)-Schwanzes bleiben die Kontakte zwischen CPSF und der Poly(A)-

Polymerase bestehen (Schritt 2). Der Polyadenylierungskomplex erreicht eine kritische Größe, wenn der Poly(A)-Schwanz auf 250-300 AMP-Reste angewachsen ist. Der Komplex weist einen Durchmesser von 21 nm auf (Schritt 3). Durch die kritische Größe des Komplexes gehen eine oder mehrere Interaktionen zwischen der Poly(A)-Polymerase und CPSF verloren, so dass die Poly(A)-Polymerase nicht mehr prozessiv arbeiten kann. Auf langem Poly(A) kommt es zu einer Umstrukturierung des Polyadenylierungskomplexes (Schritt 4 und 5). Es verlässt weder PABPN1 noch die 100-K Untereinheit von CPSF den Polyadenylierungskomplex.

Inwieweit dieses Modell den tatsächlichen Vorgängen der Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze entspricht, kann bisher nicht bestimmt werden. Alle bisher bekannten Eigenschaften des Prozesses flossen in das Modell ein.

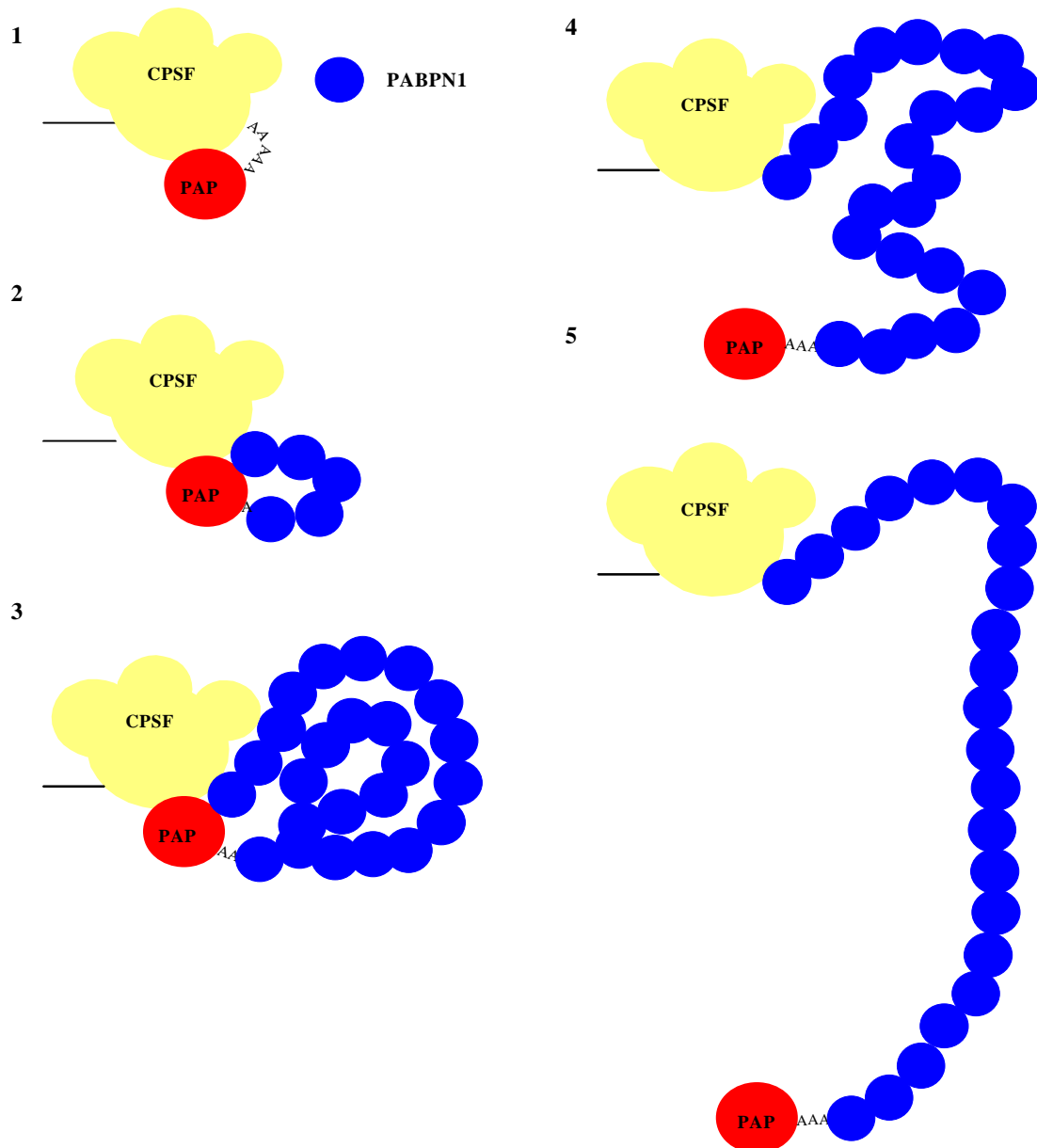


Abbildung 4.1: Ein Modell der Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze
Für die Beschreibung der einzelnen Schritte siehe Text.

5. Zusammenfassung

Das nukleäre Poly(A)-Bindeprotein (PABPN1) ist in die 3'-Prozessierung von prä-mRNA im Zellkern involviert. Das 32,3 kDa große Protein enthält einen sauren N-Terminus, eine RNA-Bindungsdomäne vom RNP-Typ und einen basischen C-Terminus, welcher über dimethylierte Arginine verfügt. Es bindet Purin-Polyribonukleotide mit einer Präferenz für Poly(A). Während der Polyadenylierungsreaktion bindet PABPN1 stöchiometrisch an den wachsenden Poly(A)-Schwanz und regt auf diesem Wege die Poly(A)-Polymerase gemeinsam mit CPSF zu einer schnellen prozessiven Synthese an. Es wird vermutet, dass PABPN1 durch die stöchiometrische Bindung an den Poly(A)-Schwanz die Länge desselben determiniert.

In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, inwieweit die Stimulierung der Polyadenylierung von der RNA-Bindung von PABPN1 abhängt. Durch Polyadenylierungsreaktionen mit Proteinen, welche Punktmutationen in der RNA-Bindungsdomäne aufweisen, konnte gezeigt werden, dass PABPN1 RNA binden muss, um die Poly(A)-Polymerase stimulieren zu können.

Es wurde der Einfluss von PABPN1 auf die Poly(A)-Polymerase hinsichtlich der Parameter $K_M(\text{Poly(A)})$ und v_{\max} bestimmt. Die Ergebnisse dieser Messungen belegen, dass die Affinität der Poly(A)-Polymerase für ihr Substrat durch PABPN1 erhöht wird. Dies drückt sich bei gleichbleibenden v_{\max} -Werten ($3,5 - 4 \mu\text{mol/Min.} \cdot \text{mg}$) durch einen 30-fach geringeren k_M -Wert (76 nM gegenüber $2,2 \mu\text{M}$ 3'OH-EndenPoly(A)) aus, wenn PABPN1 an die RNA gebunden ist.

Beide zuletzt genannten Befunde (die RNA-Bindung ist nötig für Stimulierung der Polyadenylierung und PABPN1 erhöht die Affinität der Poly(A)-Polymerase für ihr Substrat) stehen im Einklang mit dem „Rekrutierungsmodell“.

Eine α -helikale Struktur im N-Terminus von PABPN1 (L119-Q147) wurde als unbedingt notwendig für die Stimulierung der Polyadenylierung identifiziert. Die Deletion des gesamten N-Terminus inklusive der Helikalen Domäne führt zu einem hinsichtlich der Stimulierung der Polyadenylierung inaktiven Protein. Verbleibt die Helikalen Domäne im Protein, stimuliert

das Protein wie der Wildtyp. Die Helikale Domäne wird als *coiled-coil*-Domäne diskutiert, da sie als repetitive Sequenz von je sieben Aminosäuren (a bis g) geschrieben werden kann, wobei sich an den Positionen a und d hydrophobe Aminosäuren, in den anderen Positionen geladene Aminosäuren befinden. *Coiled-coil*-Domänen findet man in Protein-Protein-Wechselwirkungsdomänen. Aus diesem Grund wird die α -Helix als Wechselwirkungsdomäne mit der Poly(A)-Polymerase diskutiert.

Die Helikale Domäne konnte durch die Untersuchung chimärer Proteine als notwendig, jedoch nicht ausreichend für die Stimulierung der Polyadenylierung identifiziert werden. Die stimulierenden Eigenschaften der Helikalen Domäne konnten nicht auf zwei RNA-Bindungsdomänen von PABPC1 (dem hinsichtlich Stimulierung der Poly(A)-Polymerase inaktiven Homologen von PABPN1 aus dem Cytoplasma) übertragen werden. Der Austausch von entweder RNP-Domäne oder C-Terminus von PABPN1 gegen RNA-Bindungsdomänen von PABPC1 führte ebenfalls zu inaktiven Proteinen (hinsichtlich Stimulierung der Polyadenylierung).

Eine Anzahl von Proteinen, welche Punktmutationen in der Helikalen Domäne aufweisen, wurden kloniert, überexprimiert und bezüglich der Stimulierung der Poly(A)-Polymerase untersucht. Fünf von zwölf Mutanten zeigten keinen Effekt, sechs Mutanten zeigten eine reduzierte Stimulierung der Polyadenylierung. Der Austausch von Leucin 136 gegen sowohl Serin als auch Alanin führte zu vollständig inaktiven Proteinen. Die RNA-Bindung dieser Mutanten war ähnlich der des Wildtyps. Es konnte gezeigt werden, dass L136S ein kompetitiver Inhibitor des Wildtypproteins ist.

Weitere Experimente ergaben, dass genau ein Molekül PABPN1 mit der Poly(A)-Polymerase interagiert. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um das der Poly(A)-Polymerase benachbarte.

Experimente zur Längenkontrolle der Poly(A)-Schwänze zeigten, dass auf langem Poly(A) Wechselwirkungen zwischen der Poly(A)-Polymerase und CPSF verloren gehen und dadurch wahrscheinlich die prozessive Synthese beendet wird. CPSF wird dabei nicht aus dem Polyadenylierungskomplex gedrängt. Die Poly(A)-Schwänze sind stöchiometrisch mit PABPN1 besetzt.

6. Literaturverzeichnis

- Abdul-Manan N., O'Malley S.M., Williams K.R. (1996):** Origins of binding specificity of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein. *Biochemistry* 35 (11): 3545-3554
- Adesnik M., Salditt M., Thomas W., Darnell J.E. (1972):** Evidence that all messenger RNA molecules (except histone messenger RNA) contain Poly (A) sequences and that the Poly(A) has a nuclear function. *J Mol Biol* 71(1): 21-30
- Amrani N., Minet M., Le Gouar M., Lacroute F., Wyers F. (1997):** Yeast Pab1 interacts with Rna15 and participates in the control of the poly(A) tail length in vitro. *Mol Cell Biol* 17 (7):3694-3701
- Bai C., Tolia P.P. (1996):** Cleavage of RNA hairpins mediated by a developmentally regulated CCCH zinc finger protein. *Mol Cell Biol* 16 (12): 6661-6667
- Barabino S.M., Hubner W., Jenny A., Minvielle-Sebastia L., Keller W. (1997):** The 30-kD subunit of mammalian cleavage and polyadenylation specificity factor and its yeast homolog are RNA-binding zinc finger proteins. *Genes Dev* 11 (13): 1703-1716
- Barabino S.M., Keller W. (1999) :** Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell* 99 (1): 9-11
- Beaudoing E., Freier S., Wyatt J.R., Claverie J.M., Gautheret D. (2000):** Patterns of variant polyadenylation signal usage in human genes. *Genome Res* 10 (7): 1001-1010
- Beelman C.A., Parker R. (1995):** Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell* 81 (2) : 179-183
- Benoit B., Nemeth A., Aulner N., Kuhn U., Simonelig M., Wahle E., Bourbon H.M. (1999):** The Drosophila poly(A)-binding protein II is ubiquitous throughout Drosophila development and has the same function in mRNA polyadenylation as its bovine homolog in vitro. *Nucleic Acids Res* 27 (19): 3771-3778
- Bentley D. (1999):** Coupling RNA polymerase II transcription with pre-mRNA processing. *Curr Opin Cell Biol* 11 (3):347-51
- Beyer K., Dandekar T., Keller W. (1997):** RNA ligands selected by cleavage stimulation factor contain distinct sequence motifs that function as downstream elements in 3'-end processing of pre-mRNA. *J Biol Chem* 272 (42): 26769-26779

- Bienroth S., Keller W., Wahle E. (1993):** Assembly of a processive messenger RNA polyadenylation complex. *EMBO J* 12 (2): 585-594
- Bienroth S., Wahle E., Suter-Crazzolara C., Keller W. (1991):** Purification of the cleavage and polyadenylation factor involved in the 3'-processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem* 266 (29): 19768-19776
- Birnboim H.C., Doly J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7 (6): 1513-1523
- Borman A.M., Michel Y.M., Kean K.M. (2000):** Biochemical characterisation of cap-poly(A) synergy in rabbit reticulocyte lysates: the eIF4G-PABP interaction increases the functional affinity of eIF4E for the capped mRNA 5'-end. *Nucleic Acids Res* 28 (21): 4068-4075
- Bougueleret L., Claverie J.M. (1985) :** Relevance of the lariat model to the splicing of the H-2 gene family. *Cell* 42 (1): 165-171
- Bouvet P., Diaz J.J., Kindbeiter K., Madjar J.J., Amalric F. (1998):** Nucleolin interacts with several ribosomal proteins through its RGG domain. *J Biol Chem* 273 (30): 19025-19029
- Brais B., Bouchard J.P., Xie Y.G., Rochefort D.L., Chretien N., Tome F.M., Lafreniere R.G., Rommens J.M., Uyama E., Nohira O., Blumen S., Korczyn A.D., Heutink P., Mathieu J., Duranceau A., Codere F., Fardeau M., Rouleau G.A., Korczyn A.D. (1998):** Short GCG expansions in the PABP2 gene cause oculopharyngeal muscular dystrophy. *Nat Genet* 18 (2): 164-167
- Brais B., Rouleau G.A., Bouchard J.P., Fardeau M., Tome F.M. (1999):** Oculopharyngeal muscular dystrophy. *Semin Neurol* 19 (1): 59-66
- Brawerman G. (1981):** The Role of the poly(A) sequence in mammalian messenger RNA. *CRC Crit Rev Biochem* 10 (1): 1-38
- 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): 6548-6559
- Burd C.G., Dreyfuss G. (1994):** Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265 (5172): 615-621
- Burd C.G., Matunis E.L., Dreyfuss G. (1991):** The multiple RNA-binding domains of the mRNA poly(A)-binding protein have different RNA-binding activities. *Mol Cell Biol* 11 (7): 3419-3424

- Calado A., Carmo-Fonseca M. (2000):** Localization of poly(A)-binding protein 2 (PABP2) in nuclear speckles is independent of import into the nucleus and requires binding to poly(A) RNA. *J Cell Sci* 113 (Pt 12): 2309-2318
- Chen F., MacDonald C.C., Wilusz J. (1995):** Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 23 (14): 2614-2620
- Chen F., Wilusz J. (1998):** Auxiliary downstream elements are required for efficient polyadenylation of mammalian pre-mRNAs. *Nucleic Acids Res* 26 (12): 2891-2898
- Chen Z., Li Y., Krug R.M. (1999):** Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. *EMBO J* 18 (8): 2273-2283
- Christofori G., Keller W. (1989):** Poly(A) polymerase purified from HeLa cell nuclear extract is required for both cleavage and polyadenylation of pre-mRNA in vitro. *Mol Cell Biol* (1) :193-203
- Coburn G.A., Mackie G.A. (1999):** Degradation of mRNA in Escherichia coli: an old problem with some new twists. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 62: 55-108
- Coppola J.A., Field A.S., Luse D.S. (1983):** Promoter-proximal pausing by RNA polymerase II in vitro: transcripts shorter than 20 nucleotides are not capped. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 (5): 1251-1255
- Dantonel 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
- Davies J.F. 2nd, Almasy R.J., Hostomska Z., Ferre R.A., Hostomsky Z. (1994):** 2.3 Å crystal structure of the catalytic domain of DNA polymerase beta. *Cell* 76 (6): 1123-1133
- de Vries H., Ruegsegger U., Hubner W., Friedlein A., Langen H., Keller W. (2000):** Human pre-mRNA cleavage factor II(m) contains homologs of yeast proteins and bridges two other cleavage factors. *EMBO J* 19 (21): 5895-5904
- Dominski Z., Zheng L.X., Sanchez R., Marzluff W.F. (1999):** Stem-loop binding protein facilitates 3'-end formation by stabilizing U7 snRNP binding to histone pre-mRNA. *Mol Cell Biol* 19 (5): 3561-3570
- Dreyfuss G., Matunis M.J., Pinol-Roma S., Burd C.G. (1993):** hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu Rev Biochem* 62: 289-321
- Eckner R., Ellmeier W., Birnstiel M.L. (1991):** Mature mRNA 3' end formation stimulates RNA export from the nucleus. *EMBO J* 10 (11): 3513-3522
- Ederly I., Sonenberg N. (1985):** Cap-dependent RNA splicing in a HeLa nuclear extract. *Proc Natl Acad Sci USA* 82 (22): 7590-7594

- Fu, X.D. (1995):** The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors. *RNA* 1 (7): 663-680
- Gallie D.R. (1991):** The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5 (11): 2108-2116
- Gershon P.D., Moss B. (1993):** Stimulation of poly(A) tail elongation by the VP39 subunit of the vaccinia virus-encoded poly(A) polymerase. *J Biol Chem* 268 (3): 2203-2210
- Gilmartin G.M., Fleming E.S., Oetjen J., Graveley B.R. (1995):** CPSF recognition of an HIV-1 mRNA 3'-processing enhancer: multiple sequence contacts involved in poly(A) site definition. *Genes Dev* 9 (1): 72-83
- Gilmartin G.M., Nevins J.R. (1989):** An ordered pathway of assembly of components required for polyadenylation site recognition and processing. *Genes Dev* 3 (12B): 2180-2190
- Görlach M., Wittekind M., Beckman R.A., Mueller L., Dreyfuss G. (1992):** Interaction of the RNA-binding domain of the hnRNP C proteins with RNA. *EMBO J* 11 (9): 3289-3295
- Grabowski P.J., Seiler S.R., Sharp P.A. (1985):** A multicomponent complex is involved in the splicing of messenger RNA precursors. *Cell* 42 (1): 345-353
- Gunderson S.I., Vagner S., Polycarpou-Schwarz M., Mattaj I.W. (1997):** Involvement of the carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase in U1A autoregulation and in the coupling of splicing and polyadenylation. *Genes Dev* 11 (6): 761-773
- Hajnsdorf E., Braun F., Haugel-Nielsen J., Le Derout J., Regnier P. (1996):** Multiple degradation pathways of the rpsO mRNA of Escherichia coli. RNase E interacts with the 5' and 3' extremities of the primary transcript. *Biochimie* 78 (6): 416-424
- Hamm J., Mattaj I.W. (1990):** Monomethylated cap structures facilitate RNA export from the nucleus. *Cell* 63 (1): 109-118
- Hector R.E., Nykamp K.R., Dheur S., Anderson J.T., Non P.J., Urbinati C.R., Wilson S.M., Minvielle-Sebastia L., Swanson M.S. (2002):** Dual requirement for yeast hnRNP Nab2p in mRNA poly(A) tail length control and nuclear export. *EMBO J* 21 (7): 1800-1810
- Hilleren P., McCarthy T., Rosbash M., Parker R., Jensen T.H. (2001):** Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature* 413 (6855): 538-542
- Hirose Y., Manley J.L. (1998):** RNA polymerase II is an essential mRNA polyadenylation factor. *Nature* 395 (6697): 93-96

- Hirose Y., Manley J.L. (2000):** RNA polymerase II and the integration of nuclear events. *Genes Dev* 14 (12): 1415-1429
- Huang Y., Carmichael G.C. (1996):** Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. *Mol Cell Biol* 16 (4): 1534-1542
- Jacobson A., Peltz S.W. (1996):** Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem* 65: 693-739
- Jenny A., Hauri HP, Keller W. (1994):** Characterization of cleavage and polyadenylation specificity factor and cloning of its 100-kilodalton subunit. *Mol Cell Biol* 14 (12): 8183-8190
- Jessen T.H., Oubridge C., Teo C.H., Pritchard C., Nagai K. (1991):** Identification of molecular contacts between the U1 A small nuclear ribonucleoprotein and U1 RNA. *EMBO J* 10 (11): 3447-3456
- Jove R., Manley J.L. (1984):** In vitro transcription from the adenovirus 2 major late promoter utilizing templates truncated at promoter-proximal sites. *J Biol Chem* 259 (13): 8513-8521
- Keller R.W., Kühn U., Aragon M., Bornikova L., Wahle E., Bear D.G. (2000):** The nuclear poly(A) binding protein, PABP2, forms an oligomeric particle covering the length of the poly(A) tail. *J Mol Biol* 297 (3): 569-583
- Keller W. (1995):** No end yet to messenger RNA 3' processing! *Cell* 81 (6): 829-832
- Keller W., Bienroth S., Lang K.M., Christofori G. (1991):** Cleavage and polyadenylation factor CPF specifically interacts with the pre-mRNA 3' processing signal AAUAAA. *EMBO J* 10 (13): 4241-4249
- Kenan D.J., Query C.C., Keene J.D. (1991):** RNA recognition: towards identifying determinants of specificity. *Trends Biochem Sci* 16 (6): 214-220
- Kiledjian M., Dreyfuss G. (1992):** Primary structure and binding activity of the hnRNP U protein: binding RNA through RGG box. *EMBO J* 11 (7): 2655-2664
- Kim J., Choi S.C., Chang J.Y., Han J.K. (2001):** Poly(A) binding protein II in *Xenopus laevis* is expressed in developing brain and pancreas. *Mech Dev* 109 (1): 111-114
- Kim S., Merrill B.M., Rajpurohit R., Kumar A., Stone K.L., Papov V.V., Schneiders J.M., Szer W., Wilson S.H., Paik W.K., Williams K.R. (1997):** Identification of N(G)-methylarginine residues in human heterogeneous RNP protein A1: Phe/Gly-Gly-Gly-Arg-Gly-Gly-Gly/Phe is a preferred recognition motif. *Biochemistry* 36 (17): 5185-5192

- Konarska M.M., Padgett R.A., Sharp P.A. (1984):** Recognition of cap structure in splicing in vitro of mRNA precursors. *Cell* 38 (3): 731-736
- Kozlov G., Trempe J.F., Khaleghpour K., Kahvejian A., Ekiel I., Gehring K. (2001):** Structure and function of the C-terminal PABC domain of human poly(A)-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98 (8): 4409-4413
- Krause S., Fakan S., Weis K., Wahle E. (1994):** Immunodetection of poly(A) binding protein II in the cell nucleus. *Exp Cell Res* 214 (1): 75-82
- Kühn U., Nemeth A., Meyer S., Wahle E. (in Vorbereitung):** The RNA binding domains of the nuclear poly(A) binding protein
- Kühn U., Pieler T. (1996):** Xenopus poly(A) binding protein: functional domains in RNA binding and protein-protein interaction. *J Mol Biol* 256 (1): 20-30
- Kühn U. (1996):** Analyse der Domänenstruktur des cytosolischen Poly(A) Bindungsproteins aus *Xenopus laevis*. Doktorarbeit, Fachbereich Chemie, Freie Universität Berlin
- Kyriakopoulou C.B., Nordvang H., Virtanen A. (2001):** A novel nuclear human poly(A) polymerase (PAP), PAP gamma. *J Biol Chem* 2001 Sep 7;276(36):33504-11
- Laemmli U.K. (1970):** Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227 (259): 680-685
- Lee S., Chen D.Y., Humphrey J.S., Gnarr J.R., Linehan W.M., Klausner R.D. (1996):** Nuclear/cytoplasmic localization of the von Hippel-Lindau tumor suppressor gene product is determined by cell density. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93 (5): 1770-1775
- Lee Y.J., Lee J., Yang I.C., Hahn Y., Lee Y., Chung J.H., (1998):** Genomic structure and expression of murine poly(A) binding protein II gene. *Biochim. Biophys. Acta* 1395 (1): 40-46
- Luo Y., Goss DJ. (2001):** Homeostasis in mRNA initiation: wheat germ poly(A)-binding protein lowers the activation energy barrier to initiation complex formation. *J Biol Chem* 276(46):43083-6
- Lupas A., Van Dyke M., Stock J. (1991):** Predicting coiled coils from protein sequences. *Science* 252 (5010): 1162-1164
- MacDonald C.C., Wilusz J., Shenk T. (1994):** The 64-kilodalton subunit of the CstF polyadenylation factor binds to pre-mRNAs downstream of the cleavage site and influences cleavage site location. *Mol Cell Biol* 14 (10): 6647-6654
- Manley J.L. (1995):** A complex protein assembly catalyzes polyadenylation of mRNA precursors. *Curr Opin Genet Dev* 5 (2): 222-228

- Martin G., Keller W., Doublie S. (2000):** Crystal structure of mammalian poly(A) polymerase in complex with an analog of ATP. *EMBO J* 19 (16): 4193-4203
- McCracken S., Fong N., Yankulov K., Ballantyne S., Pan G., Greenblatt J., Patterson S., Wickens M., Bentley D. (1997):** The C-terminal Domain of RNA polymerase II Couples mRNA Processing to Transcription: Evidence for a “mRNA factory”. *Nature* 385: 357-359
- McLachlan A.D., Karn J. (1982):** Periodic charge distributions in the myosin rod amino acid sequence match cross-bridge spacings in muscle. *Nature* 299 (5880): 226-231
- Mears W.E., Rice S.A. (1996):** The RGG box motif of the herpes simplex virus ICP27 protein mediates an RNA-binding activity and determines in vivo methylation. *J Virol* 70 (11): 7445-7453
- Meyer S., Urbanke C., Wahle E. (2002):** Equilibrium studies on the association of the nuclear poly(a) binding protein with poly(a) of different lengths. *Biochemistry* 41 (19): 6082-6089
- Moreira A., Takagaki Y., Brackenridge S., Wollerton M., Manley J.L., Proudfoot N.J. (1998):** The upstream sequence element of the C2 complement poly(A) signal activates mRNA 3' end formation by two distinct mechanisms. *Genes Dev* 12 (16): 2522-2534
- Moreira A., Wollerton M., Monks J., Proudfoot N.J. (1995):** Upstream sequence elements enhance poly(A) site efficiency of the C2 complement gene and are phylogenetically conserved. *EMBO J* 14 (15): 3809-3819
- Müller B., Schümperli D. (1997):** The U7 snRNP and the hairpin-binding protein: key players in histone mRNA metabolism. *Semin Cell Dev Biol.* 8 (6): 567-576
- Munroe D., Jacobson A. (1990):** mRNA poly(A) tail, a 3' enhancer of translational initiation. *Mol Cell Biol* 10 (7): 3441-3455
- Murthy K.G., Manley J.L. (1992):** Characterization of the multisubunit cleavage-polyadenylation specificity factor from calf thymus. *J Biol Chem* 267 (21): 14804-14811
- Murthy K.G., Manley J.L. (1995):** The 160-kD subunit of human cleavage-polyadenylation specificity factor coordinates pre-mRNA 3'-end formation. *Genes Dev* 9 (21): 2672-2683

- Nadler S.G., Merrill B.M., Roberts W.J., Keating K.M., Lisbin M.J., Barnett S.F., Wilson S.H., Williams K.R. (1991):** Interactions of the A1 heterogeneous nuclear ribonucleoprotein and its proteolytic derivative, UP1, with RNA and DNA: evidence for multiple RNA binding domains and salt-dependent binding mode transitions. *Biochemistry* 30 (11): 2968-2976
- Nagai K. (1996):** RNA-protein complexes. *Curr Opin Struct Biol* 6 (1): 53-61
- Nemeth A., Krause S., Blank D., Jenny A., Jenö P., Lustig A., Wahle E. (1995):** Isolation of genomic and cDNA clones encoding bovine poly(A) binding protein II. *Nucleic Acids Res* 23 (20): 4034-4041
- Nemeth, A. (1998):** Klonierung und Charakterisierung der Domänenstruktur des bovinen Poly(A)-Bindungsproteins II und des homologen Proteins (ROX2) von *Drosophila melanogaster*, Inauguraldissertation, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Nietfeld W., Mentzel H., Pieler T. (1990):** The *Xenopus laevis* poly(A) binding protein is composed of multiple functionally independent RNA binding domains. *EMBO J.* 9 (11): 3699-3705
- Oubridge C., Ito N., Evans P.R., Teo C.H., Nagai K. (1994):** Crystal structure at 1.92 Å resolution of the RNA-binding domain of the U1A spliceosomal protein complexed with an RNA hairpin. *Nature* 372 (6505): 432-438
- Perutz M.F. (1999):** Glutamine repeats and neurodegenerative diseases. *Brain Res Bull* 50 (5-6): 467
- Proudfoot N. (1991):** Poly(A) signals. *Cell* 64 (4): 671-674
- Raabe T., Bollum F.J., Manley J.L. (1991):** Primary structure and expression of bovine poly(A) polymerase. *Nature* 353 (6341): 229-234
- Rankin J., Wyttenbach A., Rubinsztein D.C. (2000):** Intracellular green fluorescent protein-polyalanine aggregates are associated with cell death. *Biochem J* 348 Pt 1: 15-19
- Rio D.C. (1992):** RNA processing. *Curr Opin Cell Biol* 4 (3): 444-452
- Rong Zeng W., Soucie E., Sung Moon N., Martin-Soudant N., Berube G., Leduy L., Nepveu A. (2000):** Exon/intron structure and alternative transcripts of the CUTL1 gene. *Gene* 241 (1): 75-85
- Ruegsegger U., Beyer K., Keller W. (1996):** Purification and characterization of human cleavage factor Im involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem* 271 (11): 6107-6113

- Ruegsegger U., Blank D., Keller W. (1998):** Human pre-mRNA cleavage factor Im is related to spliceosomal SR proteins and can be reconstituted in vitro from recombinant subunits. *Mol Cell* 1 (2): 243-253
- Sachs A. (1990):** The role of poly(A) in the translation and stability of mRNA. *Curr Opin Cell Biol* 2 (6): 1092-1098
- Sachs A.B., Sarnow P., Hentze M.W. (1997) :** Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell* 89 (6): 831-838
- Sawaya M.R., Prasad R., Wilson S.H., Kraut J., Pelletier H. (1997):** Crystal structures of human DNA polymerase beta complexed with gapped and nicked DNA: evidence for an induced fit mechanism. *Biochemistry* 36 (37): 11205-11215
- Scherly D., Boelens W., van Venrooij W.J., Dathan N.A., Hamm J., Mattaj I.W. (1989):** Identification of the RNA binding segment of human U1 A protein and definition of its binding site on U1 snRNA. *EMBO J* 8 (13): 4163-4170
- Scherly D., Dathan N.A., Boelens W., van Venrooij W.J., Mattaj I.W. (1990):** The U2B" RNP motif as a site of protein-protein interaction. *EMBO J* 9 (11): 3675-3681
- Schul W., van Driel R., de Jong L. (1998):** A subset of poly(A) polymerase is concentrated at sites of RNA synthesis and is associated with domains enriched in splicing factors and poly(A) RNA. *Exp Cell Res* 238 (1): 1-12
- Scott W.G. (1998):** RNA catalysis. *Curr Opin Struct Biol* 8 (6): 720-726
- Serin G., Joseph G., Ghisolfi L., Bauzan M., Erard M., Amalric F., Bouvet P. (1997):** Two RNA-binding domains determine the RNA-binding specificity of nucleolin. *J Biol Chem* 272 (20): 13109-13116
- Shamoo Y., Abdul-Manan N., Patten A.M., Crawford J.K., Pellegrini M.C., Williams K.R. (1994):** Both RNA-binding domains in heterogenous nuclear ribonucleoprotein A1 contribute toward single-stranded-RNA binding. *Biochemistry* 33 (27): 8272-8281
- Shatkin A.J. (1976):** Capping of eucaryotic mRNAs. *Cell* 9 (4 PT 2): 645-653
- Sheets M.D., Wickens M. (1989):** Two phases in the addition of a poly(A) tail. *Genes Dev* 3 (9): 1401-1412
- Shen E.C., Henry M.F., Weiss V.H., Valentini S.R., Silver P.A., Lee M.S. (1998):** Arginine methylation facilitates the nuclear export of hnRNP proteins. *Genes Dev* 12 (5): 679-691

- Smith J.J., Rücknagel K.P., Schierhorn A., Tang J., Nemeth A., Linder M., Herschman H.R., Wahle E. (1999):** Unusual sites of arginine methylation in Poly(A)-binding protein II and in vitro methylation by protein arginine methyltransferases PRMT1 and PRMT3. *J Biol Chem* 274 (19): 13229-13234
- Sonenberg N. (1988):** Cap-binding proteins of eukaryotic messenger RNA: functions in initiation and control of translation. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 35: 173-207
- Stayton M.M., Kornberg A. (1983):** Complexes of Escherichia coli primase with the replication origin of G4 phage DNA. *J Biol Chem* 258 (21): 13205-13212
- Strudwick S., Borden K.L. (2002):** The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. *Differentiation* 70 (1): 10-22
- Svitkin Y.V., Imataka H., Khaleghpour K., Kahvejian A., Liebig H.D., Sonenberg N. (2001):** Poly(A)-binding protein interaction with eIF4G stimulates picornavirus IRES-dependent translation. *RNA* 7 (12): 1743-1752
- Swanson M.S., Dreyfuss G. (1988):** RNA binding specificity of hnRNP proteins: a subset bind to the 3' end of introns. *EMBO J* 7 (11): 3519-3529
- Takagaki Y., Manley J.L. (1997):** RNA recognition by the human polyadenylation factor CstF. *Mol Cell* 17 (7): 3907-3914
- Takagaki Y., Manley J.L. (2000):** Complex protein interactions within the human polyadenylation machinery identify a novel component. *Mol Cell Biol* 20 (5): 1515-1525
- Takagaki Y., Manley J.L., MacDonald C.C., Wilusz J., Shenk T. (1990):** A multisubunit factor, CstF, is required for polyadenylation of mammalian pre-mRNAs. *Genes Dev* 4 (12A): 2112-2120
- Takagaki Y., Ryner L.C., Manley J.L. (1988):** Separation and characterization of a poly(A) polymerase and a cleavage/specificity factor required for pre-mRNA polyadenylation. *Cell* 52 (5): 731-742
- Takagaki Y., Ryner L.C., Manley J.L. (1989):** Four factors are required for 3'-end cleavage of pre-mRNAs. *Genes Dev* 3 (11): 1711-24
- Tarun S.Z. Jr., Sachs A.B. (1996):** Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J* 15 (24): 7168-7177
- Temme C. (1998):** Gibt es eine direkte Wechselwirkung zwischen der Poly(A)-Polymerase und dem Poly(A)-Bindungsprotein II? Diplomarbeit, Institut für Biochemie, Justus-Liebig-Universität Gießen

- Tome F.M., Fardeau M. (1980):** Nuclear inclusions in oculopharyngeal dystrophy. *Acta Neuropathol (Berl)* 49 (1): 85-87
- Uyama E., Nohira O., Chateau D., Tokunaga M., Uchino M., Okabe T., Ando M., Tome F.M. (1996):** Oculopharyngeal muscular dystrophy in two unrelated Japanese families. *Neurology* 46 (3): 773-778
- Vagner S., Vagner C., Mattaj I.W. (2000):** The carboxyl terminus of vertebrate poly(A) polymerase interacts with U2AF 65 to couple 3'-end processing and splicing. *Genes Dev* 14 (4): 403-413
- Wahle E. (1991):** A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of messenger RNA polyadenylation. *Cell* 66 (4): 759-768
- Wahle E. (1991):** Purification and characterization of a mammalian polyadenylate polymerase involved in the 3' end processing of messenger RNA precursors. *J Biol Chem* 266 (5): 3131-3139
- Wahle E. (1995):** Poly(A) tail length control is caused by termination of processive synthesis. *J Biol Chem* 270 (6): 2800-2808
- Wahle E., Kühn U. (1997):** The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 57: 41-71
- Wahle E., Lustig A., Jenö P., Maurer P. (1993):** Mammalian poly(A)-binding protein II. Physical properties and binding to polynucleotides. *J Biol Chem* 268 (4): 2937-2945
- Wahle E., Martin G., Schiltz E., Keller W. (1991):** Isolation and expression of cDNA clones encoding mammalian poly(A) polymerase. *EMBO J* 10 (13): 4251-4257
- Wahle E., Ruegsegger U. (1999):** 3'-End processing of pre-mRNA in eukaryotes. *FEMS Microbiol Rev* 23 (3): 277-295
- Wan L., Kim J.K., Pollard V.W., Dreyfuss G.(2001):** Mutational definition of RNA-binding and protein-protein interaction domains of heterogeneous nuclear RNP C1. *J Biol Chem* 276(10):7681-7688
- Wang Z., Kiledjian M. (2001):** Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell* 107 (6): 751-762
- Wells S.E., Hillner P.E., Vale R.D., Sachs A.B. (1998):** Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol Cell* 2 (1): 135-140
- Wickens M., Stephenson P. (1984):** Role of the conserved AAUAAA sequence: four AAUAAA point mutants prevent messenger RNA 3' end formation. *Science* 226 (4678): 1045-1051

- Wittmann T., Wahle E. (1997):** Purification and characterization of full-length mammalian poly(A) polymerase. *Biochim Biophys Acta* 1350 (3): 293-305
- Zhang L., Doudna J.A. (2002):** Structural insights into group II intron catalysis and branch-site selection. *Science* 295 (5562): 2084-2088
- Zhao J., Kessler M.M., Moore C.L. (1997):** Cleavage factor II of *Saccharomyces cerevisiae* contains homologues to subunits of the mammalian Cleavage/polyadenylation specificity factor and exhibits sequence-specific, ATP-dependent interaction with precursor RNA. *J Biol Chem* 272 (16): 10831-10838
- Zhao W., Manley J.L. (1996):** Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms. *Mol Cell Biol* 16 (5): 2378-2386

7. Anhang

7.1. Verwendete Proteine

In der folgenden Tabelle sind alle verwendeten Proteine dargestellt. Die mit *¹ gekennzeichneten Proteine wurden von S. Meyer erhalten, mit *² gekennzeichnete waren von E. Wahle, Proteine welche von U. Kühn erhalten wurden, sind mit *³ bezeichnet. Alle Proteine, mit Ausnahme dessen aus Kalbsthymus enthalten einen N-terminalen [His]₆-tag.

Proteine	Molekulargewicht	Konzentration
Wildtypproteine		
PABPN1 aus Sf 21-Zellen * ¹	33,8 kDa	12,8 µM
PABPN1 aus Kalbsthymus * ²	32,2 kDa	7,6 µM
N-terminal verkürzte Proteine		
ΔN113	23 kDa	1 µM
ΔN160 * ³	17,7 kDa	10,7 µM
Punktmutanten von PABPN1		
L119A	33,8 kDa	0,9 µM
E120A	33,7 kDa	2,5 µM
I122Q	33,8 kDa	0,6 µM
K123A	33,7 kDa	3,2 µM
A124S	33,8 kDa	0,8 µM
V126S	33,8 kDa	1 µM
M129A	33,7 kDa	0,7 µM
E131A	33,7 kDa	0,7 µM
A133S	33,8 kDa	11 µM
K135A	33,7 kDa	4,2 µM
L136A	33,8 kDa	6,5 µM
L136S	33,8 kDa	5,8 µM
V143A	33,8 kDa	0,6 µM
E187A	33,7 kDa	2,1 µM
E189A	33,7 kDa	3 µM
A190S	33,8 kDa	1,8 µM
E234A	33,7 kDa	1,7 µM
Y175A * ³	33,7 kDa	13,4 µM
F215A * ³	33,7 kDa	6,1 µM
Y175/F215A * ³	33,6 kDa	15 µM
Chimäre Proteine		
H12	27,9 kDa	0,8 µM
H4C	25,2 kDa	1,4 µM
HR4	28,5 kDa	4 µM
PABPC1-Abkömmling		
I2 * ³	21,6 kDa	0,5 µM

7.2. Ein- und Drei-Buchstabensymbole für Aminosäuren

Aminosäure	Drei-Buchstaben Code	Ein-Buchstaben Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.3. Aminosäuresequenzen der chimären Proteine

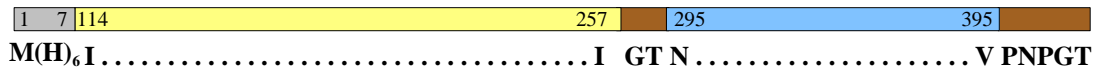
H12







H4C



HR4



-  His₆-tag
-  Aminosäuresequenz von PABPN1
-  Aminosäuresequenz von PABPC1
-  neue Aminosäuren

Die chimären Proteine sind nicht maßstabsgetreu dargestellt. Die Zahlen bezeichnen die Positionen der darunter dargestellten Aminosäuren im jeweiligen Ursprungprotein. Neue Aminosäuren wurden durch die Klonierung der Proteine zusätzlich eingefügt.

7.4. Danksagung

Ich möchte an dieser Stelle allen denen meinen herzlichen Dank aussprechen, die in irgend einer Art und Weise am Entstehen dieser Arbeit beteiligt waren.

An erster Stelle sind wohl Elmar Wahle und Uwe Kühn zu nennen, die diese Arbeit erst ermöglicht haben. Die fruchtbaren Diskussionen, Vorschläge und die viele investierte Zeit für das Lesen dieser Arbeit sind nicht selbstverständlich.

Prof. W. Keller und PD Dr. E. Schwartz erstellen netterweise die Gutachten zu dieser Arbeit.

Meine gesamte Arbeitsgruppe, namentlich Anne, Anke, Barbe, Christopher, Conny, Claudia, Eva, Franzi, Gudrun, Henning, Jörg, Kathrin, Kleo, Marina, Micha, Sylke und Ulla haben mir nicht nur mit Rat und Tat zur Seite gestanden, sondern auch das tägliche Laborleben und die Partys in den Abendstunden zu einem Erlebnis werden lassen.

Markus, schön dass du immer für mich da bist!

Meine Eltern haben mich in allen Situationen so gut wie möglich unterstützt.

DANKE!

7.5. Abkürzungsverzeichnis

µg	Mikrogramm
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	zirka
CF	<i>Cleavage</i> Faktor
CPSF	<i>Cleavage and Polyadenylation Specific Factor</i>
CstF	<i>Cleavage stimulatory</i> Faktor
ddNTPs	Didesoxynukleosidtriphosphate
DEAE	Diethylaminoethyl
dNTPs	Desoxynukleosidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
f	femto (10^{-12})
FPLC	Fast Protein Liquid Chromatographie
h	Stunde
HD	Helikale Domäne im N-Terminus von PABPN1
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid
kDa	Kilodalton
M	molar
Min.	Minute(n)
NEB	<i>New England Biolabs</i>
ng	Nanogramm
nt	Nukleotide
PABPN1	nukleäres Poly(A)-Bindungsprotein 1
PAP	Poly(A)-Polymerase
PCR	Polymerasen-Kettenreaktion
PDA	Piperazin-Diacrylamid
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RBD	RNA-Bindungsdomäne

RNase	Ribunuklease
RNP	Ribonukleoprotein
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'; Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u.a.	unter anderem
UE	Untereinheit
vergl.	vergleiche
w/v	Masse pro Volumen
wt	Wildtyp

7.6. Lebenslauf

12.10.1972	Geburt in Nordhausen
1979-1989	Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule, Abschluss 10. Klasse
1989-1992	Berufsausbildung mit Abitur an den Staatlichen Berufsbildenden Schulen für Wirtschaft und Technik in Gotha, Abschlüsse: Abitur und Facharbeiter für Pflanzenproduktion mit Gleichstellung zum Landwirt
1992-1998	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg
1997-1998	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg zum Thema: „Molekularbiologische und biochemisch Untersuchungen zur Xanthin-Dehydrogenase aus <i>Pseudomonas putida</i> Fu1, Einordnung des Stammes aufgrund von 16SrDNA-Analysen
1998	Diplom in Biochemie Prüfungsfächer: Biochemie, Enzymologie, Organische Chemie, Immunologie und Genetik
1998-2002	Doktorarbeit am Institut für Allgemeine Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. E. Wahle

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Halle/Saale, Juli 2002

.....

Yvonne Kerwitz