

**Die Deadenylierung von mRNAs durch den
CCR4/NOT-Komplex in *Saccharomyces cerevisiae* und
*Drosophila melanogaster***



Dissertation

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

vorgelegt der
Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Fachbereich Biochemie/Biotechnologie

von

Claudia Temme

geb. am 29.02.1972 in Kaltenkirchen

Gutachter:

1. Prof. Dr. Elmar Wahle
2. Dr. Bertrand Séraphin
3. Prof. Dr. Helmut Holtmann

Tag der Verteidigung: 31.01.04

urn:nbn:de:gbv:3-000006437

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3A3Agbv%3A3-000006437>]

**Alles Wissen und alle Vermehrung unseres Wissens
endet nicht mit einem Schlusspunkt,
sondern mit Fragezeichen.**

Hermann Hesse

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	mRNA-Abbauwege in Eukaryoten	1
1.1.1	Deadenylierungsabhängiger mRNA-Abbau	1
1.1.1.1	Deadenylierung	2
1.1.1.2	Abbau in 5'-3'-Richtung	3
1.1.1.3	Abbau in 3'-5'-Richtung	5
1.1.2	Abbau durch endonukleolytische Spaltung	6
1.1.3	Nonsense-mediated decay	7
1.1.3.1	NMD und Deadenylierung	7
1.1.4	Non-stop-decay	8
1.2	AU-reiche Sequenzen beeinflussen die mRNA-Stabilität	9
1.3	Der CCR4/NOT-Komplex	10
1.4	Die Hitzeschock-Antwort in <i>Drosophila</i>	13
1.4.1	Deadenylierung von Hsp70-mRNA	14
1.5	Zielsetzung	15
2	MATERIAL UND METHODEN	16
2.1	Material	16
2.1.1	Bakterienstämme	16
2.1.2	Hefestämme	16
2.1.3	<i>Drosophila melanogaster</i> -Zellen	16
2.1.4	Enzyme und Proteine	17
2.1.5	Nukleinsäuren und Nukleotide	18
2.1.6	Vektoren	18
2.1.7	Oligonukleotide	19
2.1.8	Säulen und Säulenmaterialien	20
2.1.9	Feinchemikalien	20
2.1.10	Systeme	21
2.1.11	Sonstiges	21
2.2	Methoden	22
2.2.1	Sterilisation von Lösungen und Gegenständen	22
2.2.2	Kultivierung von <i>E. coli</i>	22
2.2.3	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.2.4	Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> -Zellen	22
2.2.5	Expression von dCAF1 und dCCR4	23
2.2.6	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23
2.2.7	Herstellung von Hefe-Glycerinkulturen	24
2.2.8	Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation	24
2.2.9	Sporulation diploider Hefestämme	25
2.2.10	Tetradenanalyse	25
2.2.11	Kultivierung von <i>Drosophila</i> -Schneider2 Zellen	25
2.2.11.1	Bestimmung der Lebendzellzahl von Schneider2-Zellen	26

2.2.12	Genetische Manipulation von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.2.12.1	Deletion des POP2-Gens in den haploiden Hefestämmen W303 und BMA41a	26
2.2.12.2	Einfügen von Punktmutationen in das POP2-Gen durch die pop-in/pop-out-Methode	27
2.2.13	Protein-Reinigungen	28
2.2.13.1	Reinigung des CCR4/NOT-Komplexes mittels TAP-tag aus <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.13.2	Reinigung von rekombinantem dCAF1 unter nativen Bedingungen	29
2.2.13.3	Denaturierende Reinigung von dCCR4 ?N aus inclusion bodies	30
2.2.14	Herstellung und Fraktionierung von S2-Extrakten	30
2.2.14.1	Herstellung von S2-Zellextrakten für Western blots	30
2.2.14.2	Präparation von cytoplasmatischem S2-Zellextrakt	31
2.2.14.3	Fraktionierung von S2-CXT über DEAE-Sepharose	31
2.2.14.4	Gelfiltration	32
2.2.15	RNA-Interferenz in Schneider2-Zellen	32
2.2.16	Western blot-Analyse	33
2.2.17	Affinitätsreinigung von CAF1-Antikörpern aus Immunsereum	33
2.2.18	Immundepletion von dCAF1 und dCCR4	34
2.2.19	Nukleins äuretechniken	35
2.2.19.1	Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i>	35
2.2.19.2	DNA-Mini-Präparation aus Hefezellen	35
2.2.19.3	DNA-Mini-Präparation aus Hefezellen für PCR	36
2.2.19.4	Isolierung von RNA	37
2.2.19.4.1	Isolierung von RNA aus S2-Zellen	37
2.2.19.4.1	Isolierung von RNA aus Hefezellen	37
2.2.19.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	38
2.2.19.6	DNA-Sequenzierung	38
2.2.19.7	Reverse Transkription	38
2.2.19.8	Herstellung doppelsträngiger RNA für RNAi-Experimente	39
2.2.20	Herstellung radioaktiver Substrate	39
2.2.20.1	Radioaktive 5'-Markierung	39
2.2.20.2	<i>In vitro</i> -Transkription	40
2.2.20.3	Polyadenylierung radioaktiv markierter Transkripte	41
2.2.20.4	Herstellung von homogen markiertem Poly(A)	42
2.2.21	Deadenylierungsexperimente	42
2.2.21.1	TCA-Fällungsexperiment	42
2.2.21.2	Deadenylierungsexperimente mit polyadenylierter RNA	43
2.2.22	Bestimmung der <i>in vivo</i> Poly(A)-Schwanzlänge	43
2.2.23	Darstellung der Poly(A)-Schwänze spezifischer mRNAs nach Strickland et al. (1995)	44
2.2.24	Gelsysteme	45
2.2.24.1	Agarose-Gele	45
2.2.24.2	Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese	45
2.2.24.3	SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung	45

3	ERGEBNISSE	46
3.1	Untersuchungen zum CCR4/NOT-Komplex in <i>S. cerevisiae</i>	46
3.1.1	Eine Deletion von POP2 beeinflusst das Wachstum der mutierten Hefen	46
3.1.2	Die Deletion von POP2 hat einen Einfluss auf die Poly(A)-Schwanzlänge <i>in vivo</i>	47
3.1.3	Der Hefe CCR4/NOT-Komplex besitzt Nukleaseaktivität <i>in vitro</i>	49
3.1.4	Der CCR4/NOT-Komplex besitzt <i>in vitro</i> eine Poly(A)-spezifische 3'-Exonukleaseaktivität	50
3.1.5	Der CCR4/NOT-Komplex spaltet Poly(A) hydrolytisch zu 5'-AMP	51
3.1.6	Pab1p inhibiert die Deadenylierung durch den CCR4/NOT-Komplex	52
3.1.7	Punktmutationen in der Exonukleasedomäne von POP2 zeigen keinen Phänotyp	54
3.1.7.1	Punktmutationen in der Exodomäne beeinflussen das Sporenwachstum nicht	54
3.1.7.2	Punktmutationen in der Exodomäne haben keinen Effekt auf die durchschnittliche Poly(A)-Schwanzlänge	55
3.2	Der CCR4/NOT-Komplex aus <i>Drosophila melanogaster</i>	57
3.2.1	Klonierung, Expression und Reinigung von dCAF1 und dCCR4	59
3.2.2	Cytoplasmatischer Extrakt aus S2-Zellen zeigt <i>in vitro</i> Deadenylase-Aktivität	62
3.3	Fraktionierung von S2-CXT	64
3.3.1	Eine deadenylierende Aktivität korreliert mit dCAF1- und dCCR4-haltigen Fraktionen einer DEAE-Säule	64
3.3.2	Das Aktivitätsmaximum der DEAE-Säule wird von einem Inhibitor überlagert	65
3.3.3	CAF1 und CCR4 eluieren in einem Komplex während der Gelfiltration	67
3.3.4	CAF1- und CCR4-Antikörper depletieren die deadenylierende Aktivität	68
3.3.5	Der CAF/CCR4-Komplex ist nicht die einzige in S2-Zellen aktive 3'-Exonuklease	70
3.4	RNA-Interferenz-Experimente	72
3.4.1	RNA-Interferenz (RNAi) gegen CAF1 und CCR4 beeinflusst die Menge an mRNA und an Protein	72
3.4.2	RNAi gegen CAF beeinflusst die Poly(A)-Schwanzlänge <i>in vivo</i>	75
3.4.3	RNAi gegen NOT1, NOT2 und NOT3/5 hat ebenfalls einen Effekt auf die <i>steady state</i> -Poly(A)-Schwanzlänge	76
3.4.4	Untersuchung der Deadenylierung von Hsp70-mRNA in CAF-RNAi-Zellen	79
3.4.4.1	Hsp70-mRNA wird <i>in vivo</i> durch den CAF1/CCR4/NOT-Komplex deadenyliert	79
3.5	Untersuchungen zur Deadenylierung in S2-Zellen nach Hitzeschock	83
3.5.1	Hitzeschock vermindert die deadenylierende Aktivität cytoplasmatischen S2-Extraktes	83
3.5.2	Eine weitere Nuklease wird in S2-Zellen durch Hitzeschock induziert	85
3.6	Der 25°C- und der 37°C-CXT enthalten einen Inhibitor der Deadenylierung	88
3.6.1	Der Inhibitor ist spezifisch für die <i>Drosophila</i> -3'-Exonukleasen	90
3.7	Beide Poly(A)-abbauende Enzyme besitzen 3'-Exonukleaseaktivität	91
3.8	Die zwei Deadenylasen besitzen unterschiedliche Eigenschaften	93

4	DISKUSSION	95
4.1	Der CCR4/NOT-Komplex aus <i>S. cerevisiae</i>	95
4.1.1	Die Rolle von Pop2p im CCR4/NOT-Komplex	95
4.1.2	Die Deadenylierung von mRNA durch den CCR4/NOT-Komplex	98
4.1.3	Der Einfluss von Pab1p auf die Deadenylierungsreaktion	99
4.2	Der CCR4/NOT-Komplex ist in höheren Eukaryoten konserviert	100
4.3	Deadenylierung im <i>Drosophila</i>-CXT	105
4.3.1	Fraktionierung von S2-CXT	105
4.3.2	Die CAF1-CCR4-Interaktion	106
4.4	Die Deadenylierung im Hitzeschock	107
4.4.1	Der CCR4/NOT-Komplex wird im Hitzeschock inaktiviert	108
4.4.2	Stabilisierung ARE-haltiger mRNAs im Hitzeschock	109
5	ZUSAMMENFASSUNG	111
6	LITERATURVERZEICHNIS	113
7	ANHANG	125
7.1	Abkürzungsverzeichnis	125
7.2	Lebenslauf	127
7.3	Publikationen	128
7.4	Erklärung	129
7.5	Danksagung	130

1 Einleitung

Die Primärtranskripte der RNA-Polymerase II werden vor dem Export in das Cytoplasma prozessiert. Sie erhalten alle an ihrem 5'-Ende eine m⁷Gppp-Struktur (*cap*), werden gespleisst und am 3'-Ende polyadenyliert. Eine Ausnahme bilden die replikationsabhängigen Histon-mRNAs. Das 5'-*cap* und der Poly(A)-Schwanz sind wichtige Elemente, die die mRNA-Stabilität beeinflussen. Die Regulation der Genexpression eukaryotischer Zellen findet auf vielen Ebenen statt. Sie beginnt bei der Transkription und der prä-mRNA-Prozessierung im Zellkern, und endet bei der Translation und dem Abbau der mRNA im Cytoplasma. Die Menge an mRNA in der Zelle ist von deren Syntheserate und der Rate des Abbaus abhängig. Unterschiede in der Stabilität spiegeln sich in unterschiedlichen mRNA-Halbwertszeiten wieder, die von wenigen Minuten für Protoonkogene bis zu vielen Tagen für Globin-mRNAs reichen und spezifisch für die jeweiligen mRNAs sind. Sie können durch eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli beeinflusst werden (Shim and Karin, 2002).

Außer durch m⁷Gppp-*cap* am 5'-Ende und Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende der mRNAs wird deren Stabilität durch Sequenzelemente bestimmt, die sich sowohl in der codierenden Region wie auch in den nicht translatierten Bereichen (UTR) der mRNAs befinden (Beelman and Parker, 1995; Xu et al., 1997). Der Abbau der mRNA kann sowohl vom 3'-Ende als auch vom 5'-Ende her erfolgen. Die meisten Erkenntnisse beruhen auf Untersuchungen der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*. In höheren Eukaryoten scheinen diese Abbauewege jedoch konserviert zu sein.

1.1 mRNA-Abbauewege in Eukaryoten

1.1.1 Deadenylierungsabhängiger mRNA-Abbau

Der Hauptweg des mRNA-Abbaus in *S. cerevisiae* wird durch eine Verkürzung des Poly(A)-Schwanzes vom 3'-Ende her eingeleitet. Nachdem der Poly(A)-Schwanz entfernt wurde, wird die m⁷Gppp-*cap*-Struktur am 5'-Ende enzymatisch entfernt, und so der weitere Abbau in 5'-3'-Richtung durch eine Exonuklease ermöglicht.

1.1.1.1 Deadenylierung

Untersuchungen der Kinetik des mRNA-Abbaus durch *pulse-chase*-Experimente in *S. cerevisiae* zeigten, dass die mRNA nicht abgebaut wird, bevor nicht der Poly(A)-Schwanz entfernt bzw. stark verkürzt wurde (Brewer and Ross, 1988; Decker and Parker, 1993). In Eukaryoten sind drei Enzymkomplexe mit deadenylierender Aktivität beschrieben. Zwei der drei Komplexe wurden in Hefe identifiziert. Die Poly(A)-Nuklease PAN, die aus den Proteinen Pan2p und Pan3p besteht, deadenyliert mRNA in Abhängigkeit von Pab1p. Dieses ca. 70 kDa große Protein ist in Eukaryoten hoch konserviert und bindet den Poly(A)-Schwanz cytoplasmatischer mRNAs (Bernstein et al., 1989). Es konnte gezeigt werden, dass PAN und Pab1p direkt miteinander interagieren (Boeck et al., 1996; Brown et al., 1996; Lowell et al., 1992; Sachs and Deardorff, 1992). Pan2p ist ein Mitglied der RNase D-Familie der 3'-5'-Exonukleasen (Moser et al., 1997) und wahrscheinlich die katalytisch aktive Untereinheit des Komplexes. Weder Pan2p noch Pan3p sind essentiell in Hefe. Deletionsmutanten von PAN2/PAN3 sind lebensfähig, besitzen aber mRNAs mit verlängerten Poly(A)-Schwänzen (Boeck et al., 1996). Pan2p/Pan3p ist wahrscheinlich für das Trimmen der nukleären Poly(A)-Schwänze auf ihre definierte Länge von 50-70 Nukleotiden vor dem Export ins Cytoplasma verantwortlich. Dieses ist Voraussetzung für die spezifische Poly(A)-Schwanzlängenkontrolle in *S. cerevisiae* (Brown and Sachs, 1998). Die Tatsache, dass eine *pan2/pan3*-Deletion nur einen geringen Effekt auf die Rate der Deadenylierung hat, legt die Vermutung nahe, dass es noch weitere deadenylierende Enzyme in *S. cerevisiae* gibt.

Erst vor kurzem wurde der CCR4/NOT-Komplex, der bisher als negativer Regulator der Transkription beschrieben worden war, als Deadenylase identifiziert. Die Deletion von zwei Komponenten des Komplexes (POP2=CAF1 und CCR4) hat ein stark vermindertes Wachstum der Zellen und eine verminderte Deadenylierung von Reporter-mRNAs *in vivo* zur Folge. Wird zusätzlich zu *pop2* und *ccr4* auch noch *pan2* deletiert, ist *in vivo* die Deadenylierung vollständig unterbunden (Tucker et al., 2001a). Sowohl Ccr4p als auch Pop2p besitzen Deadenylaseaktivität *in vitro* (Daugeron et al., 2001; Tucker et al., 2001b)

In höheren Eukaryoten wurde zunächst eine andere Deadenylase identifiziert. Sie wurde als 74 kDa Protein aus Kalbsthymus gereinigt. Diese Poly(A)-spezifische Nuklease (PARN) baut Poly(A) mit einem freien 3'-Hydroxylende ab und setzt 5'-AMP frei. In Anwesenheit von Pab1p lässt sich *in vitro* das Muster von partiell gekürzten Intermediaten reproduzieren, welches bei der Deadenylierung von polyadenylierter RNA durch cytoplasmatischen Extrakt zu beobachten ist (Körner and Wahle, 1997). Das Enzym wurde schon früher aus HeLa-Zellen (Astrom et al., 1991; Astrom et al., 1992) und *Xenopus*-Oocyten (Körner et al., 1998)

isoliert und ist wie Pan2p ein Mitglied der RNase D-Familie von Exonukleasen. In *Xenopus*-Oocyten ist PARN im Zellkern und im Cytoplasma lokalisiert und während der Oocytenreifung für die entwicklungspezifische Deadenylierung von maternalen mRNAs im Cytoplasma verantwortlich (Körner et al., 1998). Deadenylierung durch PARN wird durch die Anwesenheit einer m⁷Gppp-cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA stimuliert. Durch Präzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass PARN selbst an die cap-Struktur bindet. Diese Bindung ist spezifisch für die natürlich vorkommende 7-Methyl-cap-Struktur. Cap-Analoga und eIF4E hemmen PARN *in vitro*, indem sie um die cap-Bindestelle kompetieren (Dehlin et al., 2000; Gao et al., 2000). Sequenzen für PARN findet man im Genom vieler Eukaryoten, wie z. B. *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans* oder *Arabidopsis thaliana*. In *S. cerevisiae* und in *Drosophila melanogaster* konnte kein zu PARN homologes Protein gefunden werden. Im Gegensatz dazu wurden im Säugergenom Sequenzen sowohl für die Untereinheiten des CCR4/NOT-Komplexes (Albert et al., 2000), als auch für PAN2/PAN3 identifiziert.

1.1.1.2 Abbau in 5'-3'-Richtung

Nachdem der Poly(A)-Schwanz und somit die Bindestellen für Pab1p entfernt wurden, kann das Entfernen der m⁷Gppp-cap-Struktur, das sogenannte *decapping* der mRNA erfolgen. Die m⁷Gppp-Cap-Struktur am 5'-Ende der mRNA wird von der eIF4E-Untereinheit des Translationsinitiationsfaktors eIF4F gebunden. Die Untereinheit eIF4G bindet sowohl an eIF4E als auch an Pab1p (Imataka et al., 1998; Kessler and Sachs, 1998; Tarun and Sachs, 1996; Wells et al., 1998). Die dadurch verursachte Zirkularisierung der mRNA stimuliert den Aufbau des Translationsinitiationskomplexes am 5'-cap und bewirkt dadurch eine gesteigerte Translation (Otero et al., 1999; Preiss and Hentze, 1998). Der Verlust von Pab1p führt zum Aufbrechen des eIF4F-Komplexes und ermöglicht das *decapping* (Muhlrad et al., 1994; Muhlrad et al., 1995). Die cap-Struktur wird in *S. cerevisiae* durch den Dcp1p/Dcp2p-Komplex entfernt. Erst vor kurzem konnte Dcp2p als katalytisch aktive Untereinheit (van Dijk et al., 2002) identifiziert werden. Dcp2p wurde zunächst als Aktivator von Dcp1p, der vermeintlichen *decapping*-Aktivität beschrieben (Dunckley and Parker, 1999; LaGrandeur and Parker, 1998). Dcp2p hydrolysiert das m⁷-cap an deadenylierter mRNA und setzt m⁷GDP frei.

Translation und mRNA-Abbau sind demzufolge eng miteinander verknüpft. Untersuchungen im Labor von R. Parker zeigen, dass nach der Deadenylierung und dem Verlust des Pab1p eine Reorganisation des mRNP stattfindet, und Dcp1p/Dcp2p den Platz von eIF4E und eIF4F einnehmen (Tharun and Parker, 2001).

Die Bindung von Dcp1p/Dcp2p an die mRNA wird durch den Komplex aus den Lsm-Proteinen 1-7 und den Pat/Mtr-Proteinen verstärkt (Tharun et al., 2000; Tharun and Parker, 2001). Der Lsm1p-7p-Komplex bildet eine Ringstruktur aus und interagiert, wie durch Co-Immunpräzipitationsexperimente gezeigt werden konnte, bevorzugt mit deadenylierter mRNA. Eine Co-Immunpräzipitation mit eIF4G, eIF4E und Pab1p, die ihrerseits auf translationsaktiver mRNA binden, fand nicht statt. Stattdessen konnten Dcp1p/Dcp2p RNA-abhängig mit dem Lsm1p-7p Komplex copräzipitiert werden. *Decapping* wird *in vivo* durch zwei Proteine verstärkt, Edcp1p und Edcp2p (= enhancer of decapping). Für das *decapping* sind sie nicht essentiell. Die Interaktion zwischen Edcp1p und Dcp1p bzw. Dcp2p wird durch die Anwesenheit von RNA verstärkt. Edcp1p und Edcp2p könnten eventuell den Aufbau des *decapping*-Komplexes unterstützen (Dunckley et al., 2001).

Ist die *cap*-Struktur entfernt, kann die verbleibende mRNA in 5'-3'-Richtung durch die Exonuklease Xrn1p abgebaut werden. Xrn1p ist als die vorherrschende cytoplasmatische RNase in *S. cerevisiae* für den mRNA-Abbau verantwortlich (Muhlrad et al., 1994; Stevens, 1980). Stämme, in denen XRN1 deletiert ist, akkumulieren deadenylierte und *cap*-freie mRNAs. Dabei ist der Anteil an normalerweise kurzlebigen mRNAs überproportional erhöht (Hsu and Stevens, 1993). Neben Xrn1p gibt es in Hefe eine zweite 5'-3'-Exonuklease, Rat1p. Beide Enzyme sind homolog zueinander und haben die gleiche Funktion: Sie degradieren einzelsträngige RNA mit einem 5'-Monophosphatende unter Freisetzung von Mononukleotiden (Kenna et al., 1993). Während Rat1p, das im Zellkern lokalisiert ist, für die Zelle essentiell ist und auch nicht durch Überexpression von Xrn1p ersetzt werden kann, ist das cytoplasmatische Xrn1p für die Zelle entbehrlich (Johnson, 1997; Johnson, 2001). Erst kürzlich wurde beobachtet, dass in der Hefe *decapping*-Enzyme sowie Intermediate des mRNA-Abbaus in diskreten cytoplasmatischen Foci, den sogenannten *P-bodies* akkumuliert sind. Dieses könnte darauf hindeuten, dass dort das *decapping* und der nachfolgende Abbau der mRNA stattfindet. Wurde das *decapping* unterbunden, konnten keine *P-bodies* nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurde deren Anzahl und Größe gesteigert, wenn der mRNA-Abbau erst nach dem *decapping* blockiert wurde (Sheth and R., 2003; van Dijk et al., 2002).

1.1.1.3 Abbau in 3'-5'-Richtung

Neben dem Abbau der mRNA vom 5'-Ende her, wird auch in *S. cerevisiae* ein Teil der mRNAs vom 3'-Ende her abgebaut. Es wird angenommen, dass dieser Abbauweg in höheren Eukaryoten, zumindest für den Abbau ARE-haltiger mRNAs, der vorherrschende ist (Chen et al., 2001a; Mukherjee et al., 2002; Wang and Kiledjian, 2001). Nach der Deadenylierung (1.1.1.1) wird die mRNA weiter vom 3'-Ende her abgebaut und erst am Schluss die verbleibende *cap*-Struktur gespalten.

Der mRNA-Abbau in 3'-5'-Richtung wird in Hefe von einem Komplex durchgeführt, der mindestens zehn essentielle Untereinheiten besitzt, von denen neun 3'-5'-Exoribonukleaseaktivität besitzen. Die essentiellen Komponenten des so genannten Exosoms sind Rrp4p, Rrp40p, Rrp41p/Ski6p, Rrp42p, Rrp43p, Rrp44p/Dis3p, Rrp45p, Rrp46p, Mtr3p und Csl4p (Mitchell et al., 1997). Das Exosom wurde zunächst im Zellkern für die Prozessierung und Degradation von snoRNAs, rRNAs und prä-rRNA-*spacer*-Fragmenten und für den Abbau von nukleären prä-mRNAs und mRNAs verantwortlich gemacht (Allmang et al., 2000; Allmang et al., 1999; Jacobs Anderson and Parker, 1998; Mitchell et al., 1997; van Hoof et al., 2000a). Das Exosom ist aber auch im Cytoplasma für den 3'-5'-Abbau deadenylierter mRNAs verantwortlich. Der cytoplasmatische Komplex unterscheidet sich vom nukleären durch das Fehlen der Untereinheit Rrp6p. Sie ist nur im Kern zu finden (Briggs et al., 1998; Burkard and Butler, 2000). Stämme, die kein Rrp6p besitzen, zeigen keinen Defekt in der cytoplasmatischen Degradation. Sie akkumulieren stabile nukleäre RNAs mit unvollständig prozessiertem 3'-Ende (Briggs et al., 1998; Hilleren et al., 2001). Andere Proteine sind mit dem cytoplasmatischen Exosom assoziiert, wie z.B. die Ski-Proteine 2, 3, 4, 6, 7 und 8. Mutationen dieser Proteine verursachen einen Defekt im cytoplasmatischen 3'-5'-mRNA-Abbau (Anderson and Parker, 1998; van Hoof et al., 2000b)

Das Exosom ist in der Evolution hoch konserviert (Mitchell et al., 1997). Zu vielen Untereinheiten wurden die homologen humanen Proteine identifiziert. Neben hRrp4p, hRrp40p, hRrp41p, hRrp42p, hRrp46p, und hCsl4p wurden zwei Proteine (PM-Scl75 und pM-Scl100) durch Autoantikörper von Patienten, die an der Autoimmunkrankheit PM-Scl leiden, identifiziert. Immundepletion mit dem Antikörper gegen PM-Scl75, die das Exosom aus cytoplasmatischem Extrakt entfernt, zeigte, dass das humane Exosom *in vitro* für einen effizienten 3'-5'-exonukleolytischen mRNA-Abbau notwendig ist. Immundepletierte Extrakte können durch die Zugabe von gereinigten Exosomen wieder aktiviert werden (Chen et al., 2001a). PM-Scl75 bindet an AU-reiche Sequenzen (siehe unten) und verstärkt dadurch den Abbau vom 3'-Ende (Mukherjee et al., 2002).

Wenn die mRNA weitestgehend abgebaut ist, findet das *decapping* statt. Erst vor kurzem wurde eine *decapping*-Aktivität in HeLa-cytoplasmatischem Extrakt identifiziert, die auf Substraten mit einem Poly(A)-Schwanz inaktiv war. Diese DcpS (= scavenger) *decapping*-Aktivität hydrolysiert das nach dem mRNA-Abbau verbleibende *cap* und setzt m^7GMP frei. Die Aktivität ließ sich *in vitro* mit freiem m^7cap , nicht aber mit unmethyliertem *cap* inhibieren (Wang and Kiledjian, 2001). DcpS ist sowohl in Säugern als auch in Hefe zu finden und lässt sich aus humanem S130-Extrakt mit Antikörpern gegen Untereinheiten des Exosoms copräzipitieren, was auf eine Assoziation mit dem Exosom hindeutet (van Hoof and Parker, 1999; Wang and Kiledjian, 2001).

1.1.2 Abbau durch endonukleolytische Spaltung

Endonukleasen spielen beim Abbau von mRNAs nur eine untergeordnete Rolle. Der Abbau von mRNAs, die durch endonukleolytische Spaltung degradiert werden, ist meist durch extrazelluläre Stimuli reguliert. Beispiele für solche Transkripte sind die mRNAs des Transferrin-Rezeptors (Binder et al., 1994), des IGFII (= insulin-like growth factor II) (Scheper et al., 1995), die c-myc- (Ioannidis et al., 1996; Lee et al., 1998) oder die α -Globin-mRNA (Wang and Kiledjian, 2000a). Die Spaltung produziert freie 3'- und 5'-Enden und macht die Produkte leicht zugänglich für weiteren Abbau durch Exonukleasen und somit sehr instabil. Sekundärstrukturen in der mRNA haben oft einen großen Einfluss auf den Abbau. Der 3'-UTR des Transferrin Rezeptors enthält z. B. fünf *stem-loop*-Strukturen, die das sogenannte *iron-response-element* (IRE) bilden und Regulation der mRNA-Menge in Abhängigkeit von Eisen vermitteln. Bei geringer intrazellulärer Eisenkonzentration binden Proteine diese Strukturen und stabilisieren so die mRNA, indem sie die dort vorhandene Spaltstelle für eine noch nicht identifizierte Endonuklease bedecken. Für den endonucleolytischen Schnitt scheint keine vorhergehende Deadenylierung notwendig zu sein (Binder et al., 1994; Casey et al., 1989).

α -Globin-mRNA enthält in ihrem 3'-UTR eine cytosinreiche Sequenz, die mit einem Ribonukleoproteinkomplex (α -Komplex) interagiert. Diese Bindung verhindert die Spaltung der mRNA durch die in den Abbau der stabilen α -Globin-mRNA involvierte sequenzspezifische Endonuklease ErEN (= Erythroid cell enriched endoribonuclease). Bindung des α -Komplexes wird durch PABC1 verstärkt, was darauf hindeuten könnte, dass der Poly(A)-Schwanz einen negativen Effekt auf den α -Globin-mRNA-Abbau haben könnte (Wang et al., 1999; Wang and Kiledjian, 2000b)

1.1.3 Nonsense-mediated decay

Nonsense-mediated-decay (NMD) ist eine der Kontrollmöglichkeiten, die die Zelle hat um mRNAs zu zerstören, die ein vorzeitiges Stopcodon enthalten, so dass nur Proteine der vollen Länge hergestellt werden. In Säugerzellen ist NMD an Spleissen gekoppelt. Ein wichtiges Kriterium, ob eine mRNA durch NMD abgebaut wird, ist die Lage des Stopcodons relativ zum am weitesten 3'-gelegenen Intron. Natürliche Stopcodons liegen normalerweise im terminalen Exon, während vorzeitige Stopcodons weniger als 50 Nukleotide oberhalb der letzten Exon-Exon-Grenze liegen (Nagy and Maquat, 1998; Wagner and Lykke-Anderson, 2002). Es wird vermutet, dass die Positionen des Spleissens im Zellkern über „Markierungen“ auf der mRNA an den Translationsapparat weitergegeben werden. Eine solche Markierung, der *exon-junction-complex* (EJC), wurde kürzlich identifiziert. (Le Hir et al., 2001). Der Komplex bleibt an die frisch exportierte mRNA gebunden und könnte so im Cytoplasma die Exon-Exon-Grenze markieren (Kim et al., 2001b; Kim et al., 2001a). Da in *S. cerevisiae* die meisten mRNAs nicht gespleisst werden, enthalten sie sogenannte *downstream elements*, die wahrscheinlich eine ähnliche Funktion erfüllen wie die *exon-junctions* (Wagner and Lykke-Anderson, 2002). Die UPF 1-3 Proteine sind konserviert von Hefe bis zu den Säugern und spielen eine entscheidende Rolle beim NMD. Der EJC rekrutiert wahrscheinlich Upf3p, ein Protein, das zwischen dem Zellkern und dem Cytoplasma hin- und hertransportiert wird (Lykke-Anderson et al., 2000; Serin et al., 2001). Upf3p interagiert mit Upf2p, welches seinerseits wiederum mit Upf1p interagiert (Serin et al., 2001). Wie die an die mRNA gebundenen Upf-Proteine den Abbau fördern, ist noch nicht genau bekannt.

Auch in *D. melanogaster* sind die UPF-Proteine für den Abbau von NMD-Reporter-RNAs essentiell, ebenso wie die Proteine SMG5-7 (Gatfield et al., 2003). mRNAs mit vorzeitigen Stopcodons werden auch dann abgebaut, wenn keine 3'-Exon-Grenze vorhanden ist, was die Frage nach dem Erkennungsmechanismus offen lässt (Gatfield et al., 2003).

1.1.3.1 NMD und Deadenylierung

Der Mechanismus, durch den NMD den beschleunigten Abbau von Transkripten mit vorzeitigem Stopcodon fördert, wurde vor allem in *S. cerevisiae* untersucht und scheint ein schnelles deadenylierungsunabhängiges *decapping* sowie 5'-3'-Abbau der RNA zu beinhalten. Wenn *decapping* oder 5'-3'-Abbau blockiert sind, findet NMD aber auch in 3'-5'-Richtung statt (Muhlrad and Parker, 1994). Neuere Studien zeigen jetzt, dass das *decapping*, abhängig von der Position des Stopcodons, und auch die Rate der Deadenylierung beschleunigt ist. Diese Veränderungen sind abhängig von Upf1p. Die beschleunigte

Deadenylierung ist abhängig von Ccr4p, der vorherrschenden Deadenylase in *S. cerevisiae*. Wie die beschleunigte Deadenylierung zu Stande kommt, ist noch nicht bekannt (Cao and Parker, 2003).

Auch ein weiterer NMD-Weg, der über einen Abbau der mRNA durch das Exosom vom 3'-Ende her geschieht, wird durch eine schnelle Deadenylierung eingeleitet. Auch dieser Weg benötigt Translation der RNA und ist abhängig von Upf1p (Mitchell and Tollervey, 2003).

In Säugern wurde ebenfalls ein cytoplasmatischer NMD-Weg beschrieben, der durch eine beschleunigte Deadenylierung eingeleitet wird. Transkripte mit vorzeitigem Stopcodon werden stabilisiert, wenn die Deadenylierung durch ein Blockieren der Translationsinitiation oder durch Überexpression RNA-bindender Proteine, NSAP1 und UNR, gestört ist. Auch in Säugern scheint dieser Vorgang translationsabhängig zu sein und UPF1 zu involvieren (Chen and Shyu, 2003). Die Nuklease ist ebenfalls nicht bekannt. Eine mögliche Kandidatin wäre PARN, da sie mit NSAP1 und UNR in GST-Präzipitationsexperimenten interagiert. Die Autoren spekulieren, dass ein vorzeitiges Stopcodon die Deadenylierung durch eine Interaktion zwischen dem 3'-Poly(A)-Schwanz/PABC1 und dem Terminationskomplex der Translation geschieht (Chen and Shyu, 2003).

1.1.4 Non-stop-decay

Im Gegensatz zu NMD, ist der *non-stop-decay* nicht abhängig von den Upf-Proteinen. Wie beim NMD ist Translation notwendig und resultiert in einem schnellen Abbau aberranter Transkripte, denen ein Stopcodon fehlt. In Hefe erfordert der 3'-5'-Abbau das cytoplasmische Exosom, den assoziierten Ski-Komplex aus Ski2p, Ski3p, Ski8p und ein Adaptorprotein Ski7p. Ski7p kann mit dem Exosom und dem Ski-Komplex interagieren. Diese Interaktion scheint für die Funktion des cytoplasmatischen Exosoms notwendig zu sein (Butler, 2002). Neben seiner Rolle im normalen 3'-5'-Abbau in Hefe ist Ski7p auch für den *non-stop-decay* essentiell (van Hoof et al., 2002). Ski7p zeigt eine gewisse Homologie zu dem Translationselongationsfaktor EF1A und dem *release*-Faktor eRF3. Ski7p könnte eventuell für die Unterscheidung von *non-stop*- und normalen mRNAs sorgen, indem es die freie A-Stelle im Ribosom bindet, wenn dieses am 3'-Ende der mRNA angekommen ist und so das Exosom rekrutieren, das die mRNA abbaut. Der Poly(A)-Schwanz wird dabei von einer anderen Nuklease als dem CCR4/NOT-Komplex abgebaut. Deletion von SKI7 resultiert in einer Akkumulation von polyadenylierten *non-stop*-Transkripten, was darauf hindeutet, dass Ski7p für die Aktivierung der Deadenylierung notwendig ist (Frischmeyer et al., 2002; van Hoof et al., 2002).

1.2 AU-reiche Sequenzen beeinflussen die mRNA-Stabilität

Der mRNA-Abbau ist für verschiedene Transkripte unterschiedlich schnell und wird durch endogene oder exogene Signale beeinflusst. Viele mRNAs für Transkripte mit kurzer Halbwertszeit, d. h. für Wachstumsfaktoren, Lymphokine, Cytokine oder Protoonkogene enthalten so genannte AU-reiche Elemente (ARE), meist in ihrer 3'-untranslatierten Region (UTR). AREs sind durch ihre Fähigkeit definiert, schnelle Deadenylierung zu unterstützen (Chen and Shyu, 1995). Sie werden gemäß ihrer Sequenz in drei verschiedene Klassen eingeteilt, obwohl diese nur wenig konserviert sind. Das Sequenzmotiv AUUUA ist in den meisten AREs in unterschiedlicher Anzahl und Anordnung enthalten (Xu et al., 1997).

Der Effekt der AREs auf die Halbwertszeit der mRNAs wird durch ARE-bindende Proteine vermittelt, die das Transkript entweder stabilisieren oder destabilisieren.

Tristetraprolin (TPP) fördert den Abbau von TNF- α -mRNAs in Makrophagen und GM-CSF-mRNAs in Granulocyten (Lai et al., 1999). Ein weiteres TPP-verwandtes Protein, BRF1, wurde ebenfalls als Regulator des ARE-abhängigen Cytokin-mRNA-Abbaus identifiziert (Stoecklin et al., 2002). Sowohl TPP als auch BRF1 wurden im Cytoplasma als auch im Zellkern nachgewiesen.

In Untersuchungen mit TPP-*knock-out*-Mäusen wurde gezeigt, dass die GM-CSF-mRNA in diesen Tieren nicht nur stabiler war, sondern auch das Verhältnis von vollständig polyadenylierter zu deadenylierter mRNA erhöht war (Caballo et al., 2000). Diese TPP-induzierte Deadenylierung wurde in Transfektionsstudien weiter untersucht. Es wurde gezeigt, dass die Tandem-Zink-Finger-*repeats* im TPP notwendig für die Aktivierung der Deadenylierung ARE-haltiger RNAs ist (Lai et al., 2002). Kürzlich wurde gezeigt, dass TPP auch *in vitro* in der Lage ist, die Deadenylierung ARE-haltiger mRNAs zu stimulieren (Lai et al., 2003). Die aktivierte Nuklease benötigt Mg^{2+} -Ionen, ist aber ATP-unabhängig und benötigt kein vorheriges *decapping* der mRNA. Co-Transfektionsexperimente zeigten, dass es sich bei dieser Nuklease wahrscheinlich um PARN handelt. Die stimulierte Deadenylierung fand nicht statt, wenn eine TPP-Mutante verwendet wurde, die keine RNA binden konnte oder wenn die RNA ein mutiertes ARE enthielt, an das TPP nicht binden konnte. Die Deadenylierung anderer mRNAs durch PARN blieb unbeeinflusst (Lai et al., 2003).

ARE-enthaltende mRNAs werden in Säugern wahrscheinlich durch das Exosom abgebaut nachdem sie deadenyliert worden sind. mRNAs, die durch AREs destabilisiert sind, werden in Extrakten, die mit Antikörpern gegen das Exosom behandelt worden sind, stabilisiert. Einige Untereinheiten des Exosoms binden an AREs. Diese Bindung wird für die Spezifität des

Abbaus verantwortlich gemacht (Mukherjee et al., 2002). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ARE-bindende Proteine, die *in vivo* mRNAs mit AREs destabilisieren, an das Exosom binden und die mRNAs auch *in vitro* destabilisieren. ARE-bindende Proteine, die *in vivo* ARE-haltige mRNAs stabilisieren, binden nicht an das Exosom und zeigen auch keinen Effekt auf den Abbau ARE-haltiger mRNAs *in vitro* (Chen et al., 2001a). AREs beeinflussen nicht nur den Abbau durch das Exosom, sondern stimulieren auch die Deadenylierung der mRNAs und das *decapping*. Wie genau dieses geschieht ist noch unklar. Eine Möglichkeit wäre, dass der ARE-Proteinkomplex die Interaktion zwischen PABPC und dem Poly(A)-Schwanz oder zwischen eIF4E und der *cap*-Struktur verändert und dadurch der Deadenylase (z.B. PARN) einen Angriff auf den Poly(A)-Schwanz ermöglicht. Auf der anderen Seite könnten auch die ARE-bindenden Proteine direkt mit der Deadenylase interagieren (van Hoof and Parker, 2002; Wilusz et al., 2001).

1.3 Der CCR4/NOT-Komplex

Der CCR4/NOT-Komplex wurde als Regulator identifiziert, der die Transkription positiv oder negativ beeinflusst (Collart and Struhl, 1994; Liu et al., 1998). Neben der Transkriptionsregulation scheint er auch eine Bedeutung in der Transkriptionselongation zu haben (Denis et al., 2001).

Der CCR4/NOT-Komplex scheint in *S. cerevisiae* in zwei Varianten zu existieren, einem 1,9 MDa und einem 1,0 MDa großem Komplex (Liu et al., 1998). Der 1,0 MDa Komplex wurde gereinigt und die darin enthaltenen Proteine identifiziert. Er besteht aus mindestens neun Untereinheiten, die mit weiteren Proteinen mehr oder weniger stabil assoziiert sind (Chen et al., 2001b). Bei der Reinigung konnten Not1p-Not5p, Ccr4p, Caf1p (= Pop2p), Caf40p und Caf130p nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zur Funktion des CCR4-NOT-Komplexers beruhen zum größten Teil auf Deletionsmutationen und ihrer phänotypischen Charakterisierung.

Not1p (CDC36) ist in *S. cerevisiae* das einzige essentielle Protein des Komplexes, wobei der C-Terminus des Proteins ausreichend für die Funktion ist. Not1p wurde als ein negativer Regulator der TC-abhängigen Transkription, d.h der Transkription von Promotoren ohne TATA-Box (NOT= negative on TATA) beschrieben (Collart and Struhl, 1994). Alle anderen Not-Proteine sind nicht essentiell und weisen unterschiedliche Phänotypen auf. Die Mutation aller Not-Proteine hat eine verminderte ADH2-Expression unter nicht-fermentativen Bedingungen zur Folge. Alle außer der *not3*-Deletion zeigten Sensitivität gegenüber Koffein und Staurosporin, Phänotypen die aus Defekten der Zellwandintegrität herrühren (Liu et al.,

1998). Die *not2(CDC36)*-Deletion führt zu vermindertem Wachstum bei 30°C. NOT2 wurde isoliert als temperatursensitive Mutation, die einen Zell-Zyklus-Arrest in G₁ bewirkt und die Pheromonantwort konstitutiv aktiviert.

Weiterhin führt die Deletion von NOT4 in Kombination mit der Deletion jedes weiteren *core*-Proteins des Komplexes zur Letalität, genauso wie die Kombination der Deletionen von NOT5 und POP2 oder CCR4 bzw. die Kombination von POP2 und NOT2 (Maillet et al., 2001). Ccr4p wird für die Expression von ADH2 und anderer Gene des nicht-fermentativen Stoffwechsels (Denis and Malvar, 1990), sowie für die Expression von noch nicht identifizierten Genen, die in die Zellwandintegrität involviert sind (Liu et al., 1997), benötigt. *ccr4*-Deletion hat einen partiellen Zell-Zyklus-Arrest in der Telophase und eine Erhöhung der Sensitivität gegenüber Li²⁺- und Mg²⁺-Ionen zur Folge (Liu et al., 1997). Eine Deletion von CAF1 (=POP2) zeigt einen Glukose-Derepression-resistenten Phänotyp, der mit einem Defekt in der Sporulation, einem Wachstumsphänotyp und einer reduzierten Menge von Speicherkohlenhydraten einhergeht (Sakai et al., 1992). Weiterhin sind *pop2?*-Stämme sensitiv gegenüber Staurosporin, einem Inhibitor der Proteinkinase C (Hata et al., 1998).

Caf40p wurde in CCR4-Immunopräzipitaten gefunden und als Bestandteil des 1,0 MDa- und des 1,9 MDa-Komplexes identifiziert. Eine Deletion von CAF40 resultiert in einem ähnlichen Phänotyp wie der der *caf1*- und *not4*-Deletionen. Die Zellen zeigen ebenfalls einen Sporulationsdefekt. Im Gegensatz zu den Phänotypen anderer *not*-Deletionen gibt es keine erhöhte HIS3-Expression und keine ADH2-Derepression (Chen et al., 2001b).

Parallel mit dieser Arbeit wurden Ccr4p und Pop2p als Deadenylyasen identifiziert, die für den Großteil der deadenylierenden Aktivität in Hefe verantwortlich sind (Daugeron et al., 2001; Tucker et al., 2001b). Die bei den Deletionsstudien beobachteten pleiotropen Phänotypen sind konsistent mit einem Einfluss auf die mRNA-Stabilität.

Co-Immunpräzipitationsexperimente lassen auf eine feste Struktur innerhalb des Komplexes schließen, in dem Not1p als größtes Protein des Komplexes eine zentrale Rolle einnimmt (Abb. 1.1.4.1). Ccr4p und Caf1p interagieren mit Not1p, wobei nur Caf1p direkt an Not1p bindet. Deletion von CAF1 verhindert die Assoziation von Ccr4p mit Not1p und Not2p (Liu et al., 1998). Bei Fraktionierung eines Extraktes aus *caf1*-Deletionsstämmen ist Ccr4p nicht mehr mit dem 1,9 MDa oder dem 1,0 MDa-Komplex assoziiert, sondern eluiert bei 0,5 MDa von der Gelfiltrationssäule (Liu et al., 1997) Not2p, Not3p, Not4p und Not5p binden ebenfalls an Not1p. Caf40p und Caf130p interagieren unabhängig von Caf1p/Ccr4p und den anderen Not-Proteinen mit Not1p (Chen et al., 2001b). Weiterhin konnte genetisch und biochemisch gezeigt werden, dass Not4p und Not5p miteinander assoziieren (Lemaire and Collart, 2000).

Not2p bindet im Komplex ebenfalls hauptsächlich an Not5p (Bai et al., 1999). Es spielt wahrscheinlich eine entscheidende Rolle für die Integrität des Komplexes (Russell et al., 2002).

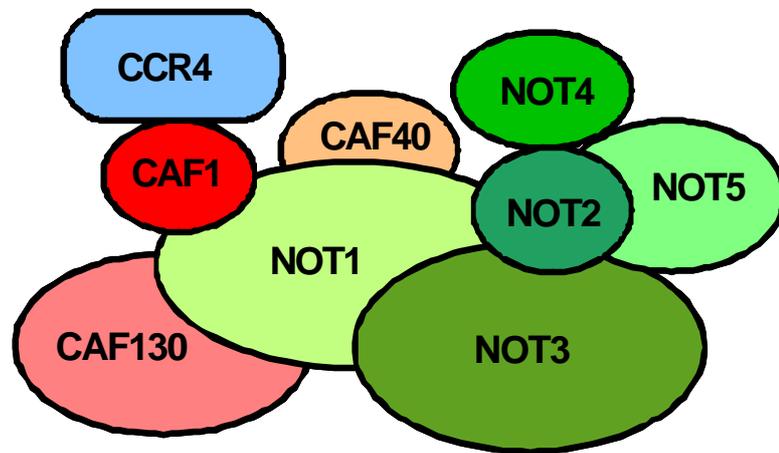


Abb. 1.1.4.1 Der CCR4/NOT-Komplex aus *S. cerevisiae* nach Chen *et al.* 2001. Schematische Darstellung der Anordnung der Kernkomponenten des Komplexes basierend auf Co-Immunpräzipitationen und *yeast-two-hybrid-screens*.

Der 1,9 MDa-Komplex enthält zusätzlich zu den oben erwähnten Proteinen Dhh1p, Dbf2p, Caf4p und Caf16p (Hata et al., 1998; Liu et al., 2001; Liu et al., 1997). Die Assoziation von Caf4p und Caf16p mit dem Komplex ist Ccr4p-abhängig (Chen et al., 2001b). Dhh1p gehört zu der Familie der DEAD-box-Helikasen und stimuliert das *decapping* von mRNAs. *dhh1?*-Mutanten akkumulieren deadenylierte, *gecapte* RNAs (Coller et al., 2001). Weiterhin interagiert Dhh1p mit Pop2p und Not1p (Maillet and Collart, 2002).

Dbf2p, eine Zellzyklus-regulierte Proteinkinase, wurde in einem *yeast-two-hybrid-screen* als ein Ccr4p-assoziertes Protein identifiziert. Es interagiert ebenfalls mit Ccr4p und Pop2p in Co-Immunpräzipitationsexperimenten. Dbf2p ist für das Eintreten des Zellzyklus von der Telophase in die G₁-Phase notwendig. Die Substrate für Dbf2p sind bis jetzt noch nicht bekannt (Liu et al., 1997).

Caf1p, Not4p und Not5p werden in der Co-Immunpräzipitation in verschiedenen Varianten detektiert, die wahrscheinlich auf posttranslationale Modifikation zurückzuführen sind. Caf1p und Not5p werden phosphoryliert.

Die Proteine des Komplexes gehen weitere Interaktionen mit Proteinen anderer Komplexe ein: Not2p interagiert z.B. mit Ada2p, einer Komponente des SAGA-Komplexes, Not5p kontaktiert den Transkriptionsinitiationsfaktor TFIID (Chen et al., 2001b).

1.4 Die Hitzeschock-Antwort in *Drosophila*

Zellen und Gewebe müssen sich ständig auf veränderte Umweltbedingungen einstellen. Ein besonders gut untersuchtes Phänomen ist dabei die Hitzeschock-Antwort. Wahrscheinlich wird die Hitzeschock-Antwort durch eine große Menge denaturierter Proteine ausgelöst, was zu der erhöhten Expression von Hitzeschock-Proteinen führt, die als molekulare Chaperone wirken und bei der korrekten Zurückfaltung der denaturierten Proteine assistieren. In *Drosophila* gibt es drei Klassen von Hitzeschock-Genen: die Hsp70-Genfamilie, die Hsp83-Gene und die Klasse der kleinen Hsp-Gene, Hsp22, 23, 26 und 27. Hsp83 wird konstitutiv exprimiert und nur wenig durch Hitzeschock induziert. Im Gegensatz zu den anderen Hsp-Genen besitzt es ein Intron. Die Hitzeschock-Proteine werden asynchron induziert und nach einem Hitzeschock auch unterschiedlich schnell wieder abgebaut (Pauli et al., 1992b).

Stress-induzierte Transkriptionsaktivierung benötigt die Aktivierung eines *heat shock factors* (HSF), der an das *heat shock promotor element* (HSE), das durch viele benachbarte und inverse Wiederholungen des Pentanukleotids 5'-nGAAn-3' charakterisiert ist, bindet. HSF wird konstitutiv exprimiert und als inaktive, monomere Form in der Zelle gespeichert. Durch einen Hitzeschock wird HSF phosphoryliert und in das aktive Homotrimer umgewandelt, welches an das HSE binden kann. In den HSF sind die DNA-Bindedomäne vom *helix-turn-helix*-Motiv, eine benachbarte 80 Aminosäuren lange hydrophobe Region, die für die Trimerisierung essentiell ist, und eine C-terminale Transaktivierungsdomäne konserviert. Das Binden von HSF führt zur Veränderung in der Chromatinstruktur in den 5'-flankierenden Regionen der Hitzeschock-Gene. Daran ist auch die Bindung des GAGA-Faktors beteiligt. Um möglichst schnell auf einen Hitzeschock reagieren zu können, sind am Hitzeschock-Promotor schon im nicht-induzierten Zustand TBP (TATA-binding-Protein), der GAGA-Faktor und ein RNA-Polymerase II-Komplex, der nach der Initiation eines kurzen Transkriptes zum Pausieren gebracht wurde, gebunden. Die kurzen RNAs, die mit der RNA-Pol. II assoziiert sind, werden während der Transkription vor dem Pausieren *gecapt*. Der Mechanismus, der das Pausieren hervorruft, ist noch nicht bekannt. Sequenzen 5' der TATA-box (GAGA Sequenzen und HSE) sind ausreichend, das Pausieren zu induzieren. Nach einem Hitzeschock bindet HSF an 4 HSE und die Polymerase setzt die Elongation fort. Das Wiederherstellen der Polymerase II-Elongation scheint der geschwindigkeitsbestimmende Schritt bei der Hsp70-Transkription zu sein und deshalb das Haupt-Ziel für Regulationen. Im pausierten Zustand ist die C-terminale Domäne nicht phosphoryliert, während sie während der Elongation stark phosphoryliert vorliegt (reviewed in (Lis and Wu, 1993; Morimoto, 1998; Wilkins and Lis, 1997).

1.4.1 Deadenylierung von Hsp70-mRNA

Hsp70 ist das abundanteste durch Hitzeschock induzierbare Protein in *D. melanogaster* (Lindquist and Craig, 1988; Pauli et al., 1992a). Es ist Bestandteil einer Familie von hoch konservierten Proteinen. Ihre bakteriellen, archaebakteriellen und eukaryotischen Mitglieder sind zu mindestens 50 % identisch (Gupta and Singh, 1992; Hunt and Morimoto, 1985; Lindquist and Craig, 1988). Eukaryoten besitzen mehrere Hsp70-Proteine. Einige werden konstitutiv exprimiert und für das normale Wachstum benötigt, während andere durch Hitze induziert werden und der Zelle so helfen, mit dem Stress fertig zu werden. In *D. melanogaster* gibt es fünf nahezu identische hitzeinduzierte Hsp70-Proteine, welche auf Proteinebene 70-80 % Identität, in den 3'- und 5'-UTRs jedoch keine Homologie zu den konstitutiv exprimierten Hsp70-Genen aufweisen (Perkins et al., 1990). Hsp70 kann in Zellen unter normalen Wachstumsbedingungen kaum nachgewiesen werden. Nach einem Hitzeschock steigt die Proteinkonzentration in der Zelle um mehr als das 1000-fache an (Velarquez et al., 1983). Diese schnelle Steigerung wird durch die offene Konfiguration der 5'-Enden der Hsp70-Gene erreicht, was das Binden der RNA-Polymerase II und der Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren an konservierte DNA-Sequenzen im Hsp70-Promotor, die sogenannten *heat shock elements*, erleichtert (siehe oben). Weiterhin besitzen Hsp70-mRNAs keine Introns, was den Transkripten erlaubt, trotz einer hitzeinduzierten Blockierung des Spleißens in das Cytoplasma transportiert zu werden (Yost and Lindquist, 1986). Weiterhin wird die sonst kurzlebige Hsp70-mRNA durch hohe Temperaturen stabilisiert und sehr effektiv translatiert. Die erhöhte Translation ist auf Sequenzen im 5'-UTR der mRNA zurückzuführen (Lindquist, 1993). Dieser ist besonders arm an Sekundärstrukturen. Durch das Einführen von Sekundärstrukturen oder durch Deletion des AUG-nahen Teiles des 5'-UTR wird die Translation im Hitzeschock stark reduziert (Hess and Duncan, 1996). Für den regulierten Abbau der mRNA ist der 3'-UTR der Hsp70-mRNA ausreichend (Petersen and Lindquist, 1989). Die Stabilisierung der mRNA von einer Halbwertszeit von weniger als 15 min. bei 25°C auf eine Halbwertszeit von mehreren Stunden bei 36°C (Peterson and Lindquist, 1988) wird durch eine verminderte Deadenylierung der Hsp70-mRNA unter Hitzeschockbedingungen hervorgerufen. Hsp70-mRNA wird sehr schnell deadenyliert, wenn die Temperatur nach einem Hitzeschock wieder sinkt, wobei die Deadenylierung schneller nach einem milden Hitzeschock als nach einem schweren Hitzeschock erfolgt. In der Erholungsphase wird die deadenylierte mRNA schnell weiter abgebaut (Dellavalle et al., 1994). Das Enzym, das für die regulierte Deadenylierung während bzw. nach Ende des Hitzeschocks verantwortlich ist, konnte bisher noch nicht identifiziert werden.

1.5 Zielsetzung

Die Genexpression hängt von der Transkriptmenge ab, die durch das Verhältnis von Transkription und mRNA-Abbau reguliert wird. Deadenylierung ist meist der einleitende und oft auch der Geschwindigkeitsbestimmende Schritt des mRNA-Abbaus.

Bisher war in *S. cerevisiae* eine deadenylierende Aktivität bekannt, die früheren Studien zufolge nicht die Hauptaktivität darstellen konnte. Auch in *D. melanogaster* war das deadenylierende Enzym nicht bekannt.

Im Rahmen dieser Studie sollte das Protein Pop2p (=Caf1p) aus *S. cerevisiae*, eine Untereinheit des CCR4/NOT-Komplexes, das in die Klasse der Exonukleasen eingeordnet wurde, und seine Rolle bei der Deadenylierung von mRNAs untersucht werden. Weiterhin sollte die Bedeutung des CCR4/NOT-Komplex bei der Deadenylierung in *D. melanogaster* und seine Rolle bei der Deadenylierung der Hsp70-mRNA während der Erholung von einem Hitzeschock mittels RNA-Interferenz untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp
<i>Escherichia coli</i> BI21(DE3) Codon +	<i>E. coli</i> B, F, <i>dcm</i> , <i>ompT</i> , <i>hsdS</i> (_{r_B} , _{m_B}), <i>gal</i> ?(DE3) [Codon+]
<i>Escherichia coli</i> XL1-blue	<i>E. coli</i> K12, <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> ⁻ , {F', <i>proAB</i> , <i>lacIqZ</i> ? M 15, Tn10(Tet) ^r

2.1.2 Hefestämme

Stamm	Genotyp
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> BMA41a	<i>ade2</i> , <i>leu2</i> , <i>ura3</i> , <i>trp1d</i> , <i>his3</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W303a	<i>ura3-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3</i> , <i>113</i> , <i>his3-11</i> , <i>15</i>
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> W3032n	<i>ura3-1</i> , <i>trp1-1</i> , <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3</i> , <i>113</i> , <i>his3-11</i> , <i>15</i>

Die haploiden Stämme BMA41a und W303a wurden von Walter Keller (Biozentrum, Basel) zur Verfügung gestellt und zur Herstellung von *pop2*-Deletionsmutanten verwendet.

Der diploide Stamm W303 wurde von Bertrand Seraphin (CNRS, Gif-sur-Yvette) unter der Bezeichnung YMC# 83 zur Verfügung gestellt und für die Herstellung der Punktmutationen im POP2-Gen durch das *Pop-in-pop-out*-Verfahren verwendet sowie zur Herstellung einer *pop2*-Deletionsmutante, bei der nur die Exonukleasedomäne deletiert wurde.

2.1.3 *Drosophila melanogaster*-Zellen

S2-Zelllinie (Invitrogen) Die Zelllinie stammt von einer Primärkultur von 20-24 h alten *Drosophila melanogaster*-Embryonen ab (Schneider, 1972).

2.1.4 Enzyme und Proteine

Alkalische Phosphatase	CIP, Roche Diagnostics
bov. PAP 513	(Temme, 1998)
BSA	Merck
CAF1-Antikörper	Kaninchenserum, affinitätsgereinigt (diese Arbeit)
CCR4-Antikörper	Kaninchenserum (diese Arbeit)
DNase I	Roche Diagnostics
Leupeptin	Roche Diagnostics
methyliertes BSA	C. Körner
M-MLV-RNase H- Reverse Transkriptase	Promega
Pepstatin	Roche Diagnostics
Proteinase K	Merck
Proteinstandard SDS-6H	Roche Diagnostics
Pwo-Polymerase	Hybaid AGS
Restriktionsenzyme und Puffer	New England Biolabs
RNase A	Roth
RNase T1	Sigma Aldrich
RNase-Inhibitor	RNasin, Promega
Sekundärer Antikörper	Peroxidase-gekoppelter Schwein-anti- Kaninchen-Antikörper, DAKO
SP6-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
T4-Ligase	New England Biolabs
T4-Polynukleotidkinase	New England Biolabs
T7-RNA-Polymerase	Roche Diagnostics
Taq-Polymerase	A. Jenny
Tubulin-Antikörper	Sigma Aldrich
yPab1p	U. Kühn
Zymolyase 20T	Seikagaku Coop.

2.1.5 Nukleinsäuren und Nukleotide

(α - ^{32}P) 3'-dATP(Cordycepin)	NEN
(α - ^{32}P) ATP, (α - ^{32}P) UTP, (α - ^{32}P) GTP	Amersham Pharmacia
(γ - ^{32}P) ATP	Amersham Pharmacia
DNA-Größenstandard	1 kb Ladder, Invitrogen
dNTPs, NTPs	Amersham Pharmacia
m ⁷ GpppG	New England Biolabs
OligoA ₍₂₀₎	U. Kühn
Poly(A)	Roche Diagnostics
rRNA (<i>E. coli</i>)	16S und 23S, Roche Diagnostics
Hefe-RNA	Merck
<i>D. melanogaster</i> cDNA-Genbank	Invitrogen

2.1.6 Vektoren

pBluescript	Stratagene
pBR322	New England Biolabs
pET19b	Novagen
pGEM3zf+	Promega
pRSETc	Invitrogen
pRS406	Stratagene
pSP6-L3pre	(Christofori and Keller, 1989)
pSP6-L3pre A ₍₈₀₎	analog (Kerwitz et al., 2003)
pSP6-L3pre A ₍₁₁₀₎	(Kerwitz et al., 2003)
pSP6- β -Globin	(Körner and Wahle, 1997)
pGC-GM-CSF	(Voeltz and Steitz, 1998), modifiziert:(Dardoussis, 2001)
pUG6	(Güldener et al., 1996)

2.1.7 Oligonukleotide

Die für die PCR, Klonierung und Sequenzierung verwendeten Oligonukleotide sind in der Tabelle 1 aufgeführt. Sie wurden von den Firmen Metabion bzw. Invitrogen bezogen.

Tabelle 1 Name und Sequenz der verwendeten Oligonukleotide

Name	x-mer	Sequenz 5'-3'
3'POP kanMX down	60	gTg TAT ACA TAT AgT ACA TAA ATg ATC ATT ggT CCC CAT CCA TAg gCC ACT AgT ggA TCT
5'POP kanMX up	60	gTT TAT AAA gTA TAA TAT TCC AAT AgA AAA CTT AAg TTC gCA gCT gAA gCT TCg TAC gCT
CCR4 start1	24	ATg AAA ggC AAT CAT TAT AAA ATg
CCR4 start2	22	ATg CTg gAC AAC TTg TCA TTT A
CCR4 stop	20	CTA CCg gCg ATT gAT CAg CC
Droso CAF-start	21	ATG AAA Tgg ACA ATg CCC TCg
Droso CAF-stop	22	TCA TgA AgC gCT gTT CgT CTC A
hind-yPop2 back	25	AAC gTT TCA TTg gTC CCC ATC AAT A
hsp70 endmRNA	25	gAA TTC AAg TTg ACT TTA AAT TTC A
hsp70 Sal	18	gTC gAC TAA ggC CAA AgA
KanMX down (Ape)	20	CgT CTg TgA ggg gAg CgT TT
KanMX up (Cla)	20	gAT TgT ATg ggA AgC CCg AT
L3pre+1ffw	23	gAA TAC AAg CTT ggg CTg CAg gT
mut POP-exo2 down	33	gAT CAg gAA ACC TAg AgC gTA TgC CgC ATg gTA
mut POP-exo2 up	33	TAC CAT gCg gCA TAC gCT CTA ggT TTC CTg ATC
OBS 167	65	TTT ACA gTg AAT TCg CCg TTA TAA gAC AAC Tgg TCT CgC AgT ATA ATC gCT TgT TgT TCC TTA CC
OBS 168	65	AAT CCT CCT TgT TgT Tgg gCA Tgg AgT CAT TCA TTA gAA Tgt TgA TCA TAC gAC TCA CTA TAg gg
OBS 170	20	CAG gTg TAG gTT TAG ACg AC
OBS 171	20	TCT CCC ATA TgA TTg TCT CC
oligo(dT) anchor	30	gCg AgC TCC gCg gCC gCg TTT TTT TTT TTT
pET19b-Sma-down	10	TAC CCg ggA g
pET19b-Sma-up	10	TAC TCC Cgg g
POP2-blunt-+1	22	AAT gCA ATC TAT gAA TgT ACA A
POPmutS-A+E-Q ffw	40	AgT ATA ATC ATg TgT CAA TCg CTA CTC AgT TTg Tgg ggA C
POPmutS-A+E-Q rev	40	gTC CCC ACA AAC TgA gTA gCg ATT gAC ACA TgA TTA TAC T
T7-dCAF-753	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAT TTg AAg AAg gCC ATg CCC gT
T7-dCAF-start	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAA TgA AAT ggA CAA TgC CCT Cg
T7-dCCR4 700	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAC ATA gTg CCg TAT CTC gTC gA
T7-dCCR4-start	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAC AAA gAC AAA TAC gAC AgC gC
T7-dNot1-2 down	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAg TAG gCg AAg gCC gAC ACA AT
T7-dNot1-2 up	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAg CTC ACT CAg CAT CgC CAT Cg
T7-dNot2(Rga) down	42	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAg gAg AgC gTC ACC AgA TTg
T7-dNot2(Rga) up	42	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAC CTC gCT gAC gAA TgC gCg
T7-dNot3 down	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAg TTg CgT TTA TCg gCA TgC CC
T7-dNot3 up	44	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAA AgA Tgg ATC CTg CCC AgC gT
T7-Luciferase down	42	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAT CTg ACg CAg GCA gTT CTA Tg
T7-Luciferase up	42	TAA TAC gAC TCA CTA TAg ggA gAg AAA ggC CCg gCg CCA TTC
XIVpop+200	21	CTT gTA CAg TCT TCg TTT TgT
XIVpop-450	21	gCA CTT ggA AAg AAC TTA CgA

2.1.8 Säulen und Säulenmaterialien

Ni-NTA-Agarose	QIAGEN
DEAE-Sepharose	Amersham Pharmacia
Protein-A-Sepharose	Amersham Pharmacia
Sephadex G-50	Amersham Pharmacia
Superdex 200 HS	Amersham Pharmacia

2.1.9 Feinchemikalien

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

Aminosäuren für die Hefekultivierung	Sigma Aldrich
40 % Acrylamid (19:1)	Accugel, National Diagnostics
40 % Acrylamid	Bio-Rad
Agarose	Invitrogen
Benzamidin	Sigma Aldrich
Bis-Acrylamid	Merck
Coomassie Brilliant Blue R250	Merck
DEPC	Sigma Aldrich
DTT	Gerbu
5'-Fluoroorotsäure (5'-FOA)	Sigma Aldrich
Geneticin® (G418)	Invitrogen
Glycogen	Roche Diagnostics
Leupeptin-Hemisulfat	Sigma Aldrich
SDS	Fluka
Nonidet P-40	Fluka
Pepstatin A	Fluka
Phenol	Aqua-Roti®-Phenol, Roth
Phenol, TE-gesättigt	Roti®-Phenol, Roth
PMSF	Merck
Reagenzien für Bakterienmedien und Platten	Gibco
Reagenzien für Hefemedien und Platten	Difco
Reagenzien für die S2-Zellkultur	Invitrogen
TEMED	Merck

2.1.10 Systeme

Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction	PE Applied Biosystems
MEGAscript-T7-Kit	Ambion
PCR Purification Kit	Roche
Plasmid Midi Kit	QIAGEN

2.1.11 Sonstiges

Biorad Protein Assay	Proteinbestimmung nach Bradford (Biorad)
Blotmembran	Protran Nitrozellulose, Schleicher & Schüll
Dialyseschläuche	Serva
Dünnschichtchromatographieplatten	Merck
Membranfilter	RC 58, Porengröße 0,2 µm, Schleicher & Schüll
PhosphorImager-Screens	Molecular Dynamics, Fuji
Röntgenfilme	Scientific Imaging Film X-Omat AR, Kodak
Scintillationscocktail	Lumasafe™Plus, Lumac LSC
<i>Western blot</i> -Detektion	Super Signal, Pierce

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Sterilisation von Lösungen und Gegenständen

Hitzebeständige Geräte und Lösungen wurden bei 121°C und Überdruck für 30 min autoklaviert. Hitzeempfindliche Lösungen wurden vor Gebrauch sterilfiltriert (0,2 µm-Filter, Nalgene).

2.2.2 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte, falls nicht anders vermerkt, in LB-Medium bei 37°C. Für die Selektion wurden LB-Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen verwendet.

Luria-Bertani (LB)-Medium:

1 % (w/v) Bactotrypton
0,5 % (w/v) Hefeextrakt
1 % (w/v) NaCl
mit NaOH auf pH 7,5 eingestellt
ggf. 1,2 % Agar

2.2.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*-Zellen

400 ml LB-Medium (2.2.2) wurde mit 400 µl einer Bakterienvorkultur und den entsprechenden Antibiotika angeimpft und bei 37°C inkubiert, bis eine OD₆₀₀ der Kultur von 0,5-1 erreicht war. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 4000 x g geerntet, einmal mit 400 ml eiskaltem, sterilem Wasser, anschließend dreimal mit sterilem, eiskaltem 10 %-igen Glycerin gewaschen, wobei das Volumen dabei auf 200 ml, 20 ml und schließlich auf 1 ml reduziert wurde. Die Zellen wurden in 50 µl Aliquots aufgeteilt und sofort verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.4 Transformation elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Die elektrokompetenten Zellen (2.2.3) wurden auf Eis aufgetaut, mit 100 ng–500 ng Plasmid-DNA gemischt und in eine gekühlte Elektrottransformationsküvette (PeqLab) gegeben. Die Transformation erfolgte im Elektroporator (PeqLab) durch einen Stromstoß (1700 V, 25 µF, 5 ms). Sofort nach dem Puls wurden die Zellen mit 1 ml LB-Medium (2.2.2) versetzt, in ein Gefäß gegeben und eine Stunde bei 37°C geschüttelt. Danach wurden sie auf antibiotikahaltigen Agarplatten unter Verwendung von sterilisierten Glaskugeln ausplattiert oder zum Animpfen einer größeren Kultur in antibiotikahaltiges Medium überführt.

2.2.5 Expression von dCAF1 und dCCR4

Je 100 ng der Expressionsplasmide wurden durch Elektroporation in BI21(Codon+)-Zellen transformiert (2.2.4) und positive Klone durch Ausstreichen auf ampicillinhaltigen Agarplatten selektiert. Aus Einzelkolonien wurden Vorkulturen in LB-Medium (2.2.2), dem 100 µg/ml Ampicillin und 30 µg/ml Chloramphenicol zugegeben wurden, angeimpft. Mit dieser Vorkultur wurden 800 ml LB-Medium mit Antibiotika beimpft. Die Kultur wurde so lange bei 37°C unter heftigem Schütteln (200 rpm) inkubiert, bis sie eine OD₆₀₀ von ca. 1 erreicht hatte. Die Induktion der Expression erfolgte dann durch Zugabe von 0,8 mM IPTG. Nach weiteren 4 Stunden Inkubation wurden die Zellen durch eine Zentrifugation von 10 min bei 4000 x g geerntet und das Zellpellet bis zur Verarbeitung bei -80°C eingefroren.

2.2.6 Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht von *S. cerevisiae* erfolgte routinemäßig in YPD-Medium. Für die Herstellung von Festmedien (Agarplatten) wurden dem YPD-Medium 2 % (w/v) Agar zugesetzt.

YPD-Medium:

1 % (w/v) Difco-Hefeextrakt

2 % (w/v) Difco-Pepton

2 % (w/v) Difco-Dextrose (= wurde als 20 %ige Lösung getrennt autoklaviert)

Zur Selektion auf eine Aminosäureprototrophie wurde SD (= synthetic dropout)-Medium verwendet. Zur Herstellung wurden 5 x YNB-Medium, 20 %ige Glucose, dd H₂O und gegebenenfalls 4 % Agar getrennt autoklaviert, danach gemischt und mit den für die entsprechenden Hefen essentiellen Aminosäuren (Sigma Aldrich), die als 100 x Lösung sterilfiltriert wurden, versetzt.

SD-Medium:

1 x YNB (6,7 g/l yeast nitrogen base)

2 % Glucose

1 x Aminosäurelösungen

ggf. 2 % Agar

100 x Aminosäurelösungen :

L-Adenin-Hemisulfat 2 g/l

L-Arginin 2 g/l

L-Histidin 2 g/l

L-Leucin 6 g/l

L-Lysin 3 g/l

L-Methionin 2 g/l

L-Threonin 20 g/l

L-Tryptophan 2 g/l

L-Tyrosin 3 g/l

L-Uracil 2 g/l

Für die Gegenselektion des *URA3-pop-out* wurden frisch hergestellte 5'-FOA-haltige SD-Agarplatten verwendet. Die 5'-FOA Konzentration betrug 10 mg/ml.

2.2.7 Herstellung von Hefe-Glycerinkulturen

Hefezellen wurden auf YPD-Agarplatten (2.2.6) ausgestrichen und 2-4 Tage kultiviert. Die Zellen wurden mit einer sterilen Impföse von der Platte in ein Kryoröhrchen mit 1 ml sterilem 15 %-igen Glycerin überführt, resuspendiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.2.8 Herstellung kompetenter Hefezellen und Transformation

Es wurde die Methode von Gietz *et al.* (1992) verwendet, bei der die Hefezellwände durch die Behandlung mit Lithiumacetat für die DNA permeabilisiert werden.

50 ml YPD-Medium (2.2.6) wurden mit einer Über-Nacht-Vorkultur auf eine OD_{600} von 0,2 angeimpft und bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,7-1,0 bei 30°C und 200 rpm kultiviert. Die Zellen wurden 10 min bei $4000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet in 20 ml sterilem Wasser resuspendiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml sterilem Wasser resuspendiert und in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden dann in der Tischzentrifuge bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert und das Pellet in 1,5 ml frisch hergestelltem $1 \times \text{TE/LiOAc}$ resuspendiert. Die Zellen wurden erneut zentrifugiert und in $200 \mu\text{l}$ $1 \times \text{TE/LiOAc}$ aufgenommen.

Für die Transformation wurden $50 \mu\text{l}$ kompetente Zellen mit 50-200 ng zirkulärer DNA oder 1-2 μg linearer DNA und 50 μg frisch denaturierter, gescherter Heringssperma-Carrier-DNA bei RT gemischt. Es wurden $300 \mu\text{l}$ frisch hergestellter 40 % PEG4000-Lösung zugegeben und 30 min bei 30°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen 30 min bei 42°C inkubiert, mit $800 \mu\text{l}$ sterilem Wasser versetzt und kurz bei 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 1 ml YPD-Medium resuspendiert, für mindestens 1,5 h bei 30°C geschüttelt (*recovery*) und auf Selektivmedium ausplattiert.

10 x TE-Puffer:

0,1 M Tris-HCl pH 7,5
10 mM EDTA

10 x LiOAc:

1 M LiOAc pH 7,5

40 % PEG 4000:

8 Vol. 50 % PEG 4000
1 Vol. 10 x TE-Puffer
1 Vol. 10 x LiOAc

2.2.9 Sporulation diploider Hefestämme

Für die Sporulation diploider Hefestämme wurden 0,5 ml einer Über-Nacht-Kultur in YPD-Medium (2.2.6) bei 3000 x g 3 min zentrifugiert, das Zellpellet einmal mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 5 ml 0,2 M KAc pH 7,0 dem die für den jeweiligen Hefestamm essentiellen Aminosäuren zugesetzt worden sind (je 0,01 %), resuspendiert. Die Kultur wurde 2-4 Tage bei 30°C kultiviert und die Sporenbildung unter dem Mikroskop kontrolliert.

2.2.10 Tetradenanalyse

Bei einer Sporulationsrate von ca. 80 % der Hefezellen wurden 200 µl der Sporulationskultur in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, zentrifugiert und das Zellpellet in 200 µl 1,2 M SCE-Puffer (2.2.19.2) resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 20000 U Zymolyase 20T versetzt und bei 30°C inkubiert um die Ascuswand aufzulösen. Da zu lange Inkubation mit dem Enzym eine Trennung der Sporen bereits im Medium verursacht, wurden nach 10 min, 15 min und 20 min je 50 µl entnommen und in 200 µl steriles Wasser gegeben, um die Reaktion zu stoppen. Je ca. 20 µl der Suspensionen wurden anschließend als Streifen nahe dem Rand auf eine YPD-Agarplatte (2.2.6) aufgetragen. Nachdem die Flüssigkeit eingetrocknet war, wurden mit Hilfe eines Mikromanipulators vier zusammenhängende Sporen aufgenommen und diese anhand eines Rasters vereinzelt auf der Agarplatte abgelegt.

Nach 2-3 Tagen Inkubation bei 30°C wurde die Keimfähigkeit der Sporen überprüft und die Kolonien der einzelnen Sporen hinsichtlich ihrer Größe verglichen. Tetraden, bei denen alle vier Sporen Kolonien gebildet hatten, wurden zur Vermehrung nochmals auf YPD-Platten ausgestrichen und erst dann für weitere Experimente eingesetzt.

2.2.11 Kultivierung von *Drosophila*-Schneider2 Zellen

Schneider2 (S2)-Zellen stammen von einer Primärkultur 20-24 h alter *Drosophila*-Embryonen ab (Schneider 1972). Die Kultivierung erfolgte standardmäßig in Zellkulturschalen bei 25-26°C in *Schneider's Insect Medium* (Sigma Aldrich) mit 5-10 % hitzeinaktiviertem fetalem Kälberserum (Biochrom) oder in serumfreiem SF-900 Medium (Invitrogen), denen jeweils eine Antibiotika/Antimycotica-Lösung (Gibco) zugesetzt worden war. Die Kultivierung in Suspension erfolgte in Erlenmeyerkolben, die bei 135 rpm auf einem orbitalen Schüttler bewegt wurden. Für Suspensionskulturen wurde das Medium zusätzlich mit 0,05 % *Pluronic Solution* (Invitrogen) versetzt.

Routinemäßig wurden semiadhärente Zellen in Kulturschalen alle 4-5 Tage 1:10 in frischem Medium in eine neue Schale überführt, ohne die Zellzahl bestimmt zu haben. Suspensionskulturen wurden verdünnt, wenn die Zellzahl 1×10^7 Zellen/ml überstieg.

2.2.11.1 Bestimmung der Lebendzellzahl von Schneider2-Zellen

Über den Trypan-Blau-Ausschluss kann die Anzahl von toten Zellen in einer Kultur ermittelt werden. 20 μ l Zellsuspension wurde mit 180 μ l Trypan-Blau-Lösung gemischt und unter dem Mikroskop in einer Zählkammer (Thoma) untersucht. Nur tote Zellen nehmen den Farbstoff auf und färben sich blau. Die Anzahl an toten Zellen sollte während der logarithmischen Wachstumsphase 5 % nicht übersteigen.

Trypan-Blau-Lösung:

0,4 % (w/v) Trypan-Blau in 1 x PBS pH 7,4

2.2.12 Genetische Manipulation von *S. cerevisiae*

2.2.12.1 Deletion des POP2-Gens in den haploiden Hefestämmen W303 und BMA41a

Über homologe Rekombination wurde der ORF des POP2-Gens gegen ein $\text{kan}^{\text{r}}\text{MX}$ -Expressionsmodul nach der Methode von Güldener *et al.* (1996) ausgetauscht. Die Disruptionskassette wurde von dem Plasmid pUG6 mit Primern amplifiziert (2.2.19.5), die in ihrem 5'-Ende 45 Nukleotide enthalten, die zum Integrationsort in *S. cerevisiae* homolog sind. Das PCR-Produkt wurde gereinigt (2.2.24.1) und die Stämme W303a und BMA41a damit transformiert (2.2.8). Die Selektion positiver Klone erfolgte auf Geneticin®-G418-haltigen YPD-Agarplatten (2.2.6). Die korrekte Integration des $\text{kan}^{\text{r}}\text{MX}$ -Expressionsmoduls (POP2:: $\text{kan}^{\text{r}}\text{MX}$) wurde durch PCR mit genomischer DNA untersucht. Als Primer wurden die Oligonukleotide XIV-450 und XIV+200, die 5' und 3' vom Integrationsort hybridisieren, sowie die Primer Kan-MX up und Kan-MX down (2.1.7), die auf dem $\text{kan}^{\text{r}}\text{MX}$ -Expressionsmodul hybridisieren, verwendet.

2.2.12.2 Einfügen von Punktmutationen in das POP2-Gen durch die *pop-in/pop-out*-Methode

Die *pop-in/pop-out*-Methode wurde von Scherer und Davis (1979) entwickelt und beinhaltet zwei Schritte: Plasmidintegration mit URA3 als Selektionsmarker und Plasmidexcision durch Gegenselektion auf 5'-FOA-haltigem Medium (2.2.6). Das veränderte Gen wird in einen auf URA3-basierendem Integrationsvektor kloniert und das Plasmid durch homologe Rekombination an die entsprechende Stelle im Chromosom integriert. Es entsteht eine Genduplikation mit einer wt-Kopie und einer mutierten Kopie. Dazwischen liegt die Vektorsequenz. Die Zellen werden dann unter nicht-selektiven Bedingungen kultiviert und auf 5'-FOA-Platten auf das Ausschneiden des Plasmids und damit den Verlust von URA3 selektiert. Bei der Plasmidexcision bleibt entweder die wt-Kopie oder die mutierte Kopie erhalten. 5'-FOA-resistente Zellen werden auf ihren Genotyp und veränderten Phänotyp untersucht.

Für das Einfügen von Punktmutationen in die Exo-Domäne von POP2 wurde zunächst der POP2-ORF von genomischer DNA mit den Primern Hind-yPop2-back und Pop2-blunt+1 (2.1.7) amplifiziert und in einen *PvuII*-geöffneten pRSET-Expressionsvektor kloniert. Über das *Quick Change Site Directed-Mutagenesis*-Protokoll (Stratagene) wurden Mutationen in die Sequenz eingefügt. Diese Methode nutzt komplementäre Primer, die beide die entsprechende Mutation enthalten, zur Amplifikation des gesamten Plasmides. Die parentale DNA wurde nach der PCR-Reaktion mit *DpnI* verdaut. Das mutierte Plasmid wurde in *E. coli*-XL1-Blue transformiert (2.2.4) und die Plasmide präpariert. Über die Primer PopmutS-A+E-Q-up und PopmutS-A+E-Q-down wurden die Codons für die Aminosäuren S188 und E190 zu A bzw. Q mutiert und in der DNA eine *ScaI*-Schnittstelle entfernt. Über die Primer mut-Popexo-up und mut-Popexo-down wurde die Aminosäure D 310 zu A mutiert und dadurch eine *NdeI*-Schnittstelle entfernt. Der Verlust der beiden Restriktionsschnittstellen wurde zur späteren Identifikation mutierter Hefen genutzt.

Aus dem Vektor pRSET-Pop2 wurde ein Großteil der codierenden Sequenz mit den Restriktionsenzymen *BglII* und *KpnI* herausgeschnitten und in einen *BamHI* /*KpnI*-geöffneten pRS406 Vektor, der den URA3-Marker enthält, ligiert. Dieser Vektor wurde in einem *E. coli*-Dcm⁻-Stamm (BL21(DE3)) vermehrt, isoliert und mit *SexAI* in der POP2-Sequenz 5' der RNase D-Domäne linearisiert. Je 3 µg linearisierte Vektor-DNA wurden in den diploiden Stamm YMC#83 transformiert (2.2.8). Die Selektion erfolgte auf SD-URA⁻-Platten (2.2.6). Einige Kolonien wurden auf SD-URA⁻-Platten subkloniert, die DNA isoliert (2.2.19.2) und in einer PCR-Reaktion mit den Primern OBS 168 und OBS 169 bzw. OBS 170 und OBS 171

(2.1.7) auf die korrekte Integration der URA3-Kassette untersucht. Weiterhin wurde die DNA auf die mutierte POP2-Sequenz überprüft. Von genomischer DNA wurde der POP2-ORF amplifiziert und mit *ScaI* bzw. *NdeI* geschnitten. Bei positiven Klonen sollte ein Drittel des PCR-Produktes gegen den Restriktionsverdau resistent sein, da nach Integration des Vektors neben den zwei wt-Allelen eine mutierte Kopie enthalten ist, die die Restriktionsschnittstelle nicht mehr enthält. Durch einen *Southern blot* mit *HindIII* geschnittener, genomischer DNA und der POP2-Promotorsequenz als Sonde wurde auf eine Einzelintegration des URA3-Vektors untersucht. Klone, die nur einen URA3-Vektor integriert hatten und in einer Kopie die gewünschte Mutation aufwiesen, wurden für die *Pop-out*-Selektion drei Tage in YPD-Medium geschüttelt. Je 100 µl der Kulturen wurde auf 5'-FOA-Platten (2.2.6) ausplattiert. Nach zwei Tagen wurden Einzelkolonien sichtbar, die dann auf YPD-Platten subkloniert wurden. Wiederum wurde die DNA isoliert (2.2.19.3) und der Genotyp, wie oben beschrieben, untersucht. Positive Klone, die je ein wt- und ein mutiertes POP2-Gen enthielten, wurden zur Sporulation gebracht und für weitere Experimente eingesetzt.

2.2.13 Protein-Reinigungen

2.2.13.1 Reinigung des CCR4/NOT-Komplexes mittels TAP-tag aus *S. cerevisiae*

Die Reinigung wurde in Zusammenarbeit mit M.C. Daugeron im Labor von B. Seraphin (CNRS, Gif-sur-Yvette) durchgeführt.

Die haploiden Stämme mit TAP-Pop2p, TAP-Ccr4p oder TAP-Snu71p wurden im Labor von B. Seraphin im *W303-background* hergestellt. Die Stämme wurden wie beschrieben konstruiert (Puig et al., 2001a). Aus je 5 l Kulturen mit einer OD₆₀₀ von 2,4 (TAP-Pop2p, TAP-Ccr4p) bzw. 2 l (TAP-Snu71p) mit einer OD₆₀₀ von 4,0 wurden Zellextrakte hergestellt und der CCR4/NOT-Komplex bzw. der U1-snRNP zunächst über eine IgG-Agarosesäule und anschließend über eine Calmodulin-Säule daraus gereinigt (Puig et al., 2001a). Von der Calmodulin-Säule wurden die Proteine mit 5 x 200 µl EGTA-haltigem Puffer eluiert. Je 70 µl der fünf Eluate der Calmodulin-Säule wurden lyophilisiert, in einem SDS-Gradientengel aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Beide Komplexe enthielten die Proteine in den erwarteten Größen (Daten nicht gezeigt). Die Eluate 3 bis 5 wurden vereinigt (400 µl), die Hälfte gegen 1 x PBS (2.2.13.2) dialysiert und bei 4°C gelagert, die andere Hälfte gegen Deadenylierungspuffer (2.2.21.1) dialysiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.13.2 Reinigung von rekombinantem dCAF1 unter nativen Bedingungen

Alle Reinigungsschritte fanden sofern nicht anders angegeben bei 4°C statt.

Das Zellpellet der Expression (2 x 400 ml) wurde in 80 ml Lysispuffer mit 15 µg/ml DNase I resuspendiert und die Zellen durch Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Die Suspension wurde dazu in ein Becherglas überführt und in eine Kältemischung (Eis mit Kochsalz) gestellt. Es wurde fünfmal für 1 min mit je 1 min Pause beschallt (Branson Sonifier, Einstellung: 50 % *duty cycle*, Stufe 7). Zelltrümmer wurden danach durch Zentrifugation von 15 min bei 4000 x g präzipitiert. Der Überstand wurde mit 2 ml in Lysispuffer äquilibrierter Ni-NTA-Agarose für 1 h auf dem Rollschüttler inkubiert. Die Ni-NTA-Agarose wurde durch Zentrifugation pelletiert, der Überstand abgenommen und das Säulenmaterial zweimal mit 40 ml Lysispuffer, der 20 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Für die Elution der Proteine von der Ni-NTA-Agarose wurde diese in eine Säule (Bio Rad) gefüllt. Gebundene Proteine wurden durch 2 x 25 ml Lysispuffer mit 250 mM Imidazol eluiert. Die Eluate wurden für die weitere Reinigung des dCAF1 für 4 h gegen 4 x 1 l Niedrigsalzpuffer dialysiert und auf eine 1 ml MonoQ FPLC Säule gegeben. Die Proteine wurden mit einem Salzgradienten von 50 bis 500 mM KCl eluiert. Da dCAF1 in vielen Fraktionen des Gradienten zu finden war, wurden die Fraktionen 20-40 des MonoQ-Laufes vereinigt und nochmals mit 0,75 ml Ni-NTA-Agarose auf dem Rollschüttler inkubiert. Die Suspension wurde in eine 10 ml Säule (Bio Rad) gefüllt. Nacheinander wurden nun 10 ml MonoQ-Puffer mit 25 mM Imidazol, 10 ml mit 50 mM Imidazol, 5 ml mit 100 mM Imidazol und 5 ml mit 250 mM Imidazol über die Säule gegeben und die gebundenen Proteine so eluiert. Je 5 µl jeder Fraktion wurde auf einer 10 %-igen SDS-PAGE mit anschließender Coomassiefärbung analysiert.

Die 100 mM und 250 mM Imidazol-Eluate wurden gegen 3 x 600 ml 1 x PBS Puffer mit 0,5 mM DTT dialysiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Lysispuffer:

50 mM Tris-HCl pH 8,0
100 mM KCl
10 % Glycerin
0,01 % NP-40
1 mM PMSF
2 µg/ml Leupeptin
2 µg/ml Pepstatin

MonoQ-Niedrigsalzpuffer:

25 mM Tris-HCl pH 8,0
20 mM KCl
10 % Glycerin
0,01 % NP-40
1 mM DTT

1 x PBS:

80 mM Na₂HPO₄
20 mM NaH₂PO₄
100 mM NaCl

2.2.13.3 Denaturierende Reinigung von dCCR4 ?N aus *inclusion bodies*

Das Zellpellet einer 400 ml-Expression wurde in 5 ml 0,1 M Tris-HCl pH 7,0, 1 mM EDTA resuspendiert und mit 1,5 mg Lysozym 30 min bei 4°C inkubiert. Der Zellaufschluss erfolgte durch Ultraschall für 3 x 1 min mit je 1 min Pause (Branson Sonifier, Einstellung: 50 % *duty cycle* Stufe 7). Die Suspension wurde auf 3 mM MgCl₂ eingestellt und mit 10 mg/ml DNase I für 30 min bei RT inkubiert. Danach wurde das 0,5-fache Volumen an 60 mM EDTA, 6% Triton X-100, 1,5 M NaCl pH 7,0 dazugegeben. Die *inclusion bodies* wurden 10 min bei 31000 x g präzipitiert und das Pellet mit 0,1 M Tris-HCl, 20 mM EDTA gewaschen. Danach wurden die *inclusion bodies* in 5 ml Harnstoffpuffer resuspendiert und gevortext. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 31000 x g wurde der Überstand mit 1 ml in Harnstoffpuffer äquilibrierter Ni-NTA-Agarose für 1 h bei RT auf dem Rollschüttler inkubiert. Nachdem die Suspension in eine Säule (Bio Rad) gefüllt wurde, wurde mit 2 x 10 ml Harnstoffpuffer und 1 x 10 ml Harnstoffpuffer mit 20 mM Imidazol gewaschen. dCCR4 wurde in 2 ml Harnstoffpuffer mit 250 mM Imidazol eluiert. Das Eluat wurde gegen 3 x 100 ml Harnstoffpuffer dialysiert und unterschiedliche Mengen mit verschiedenen Mengen BSA zur Abschätzung der Proteinkonzentration auf einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Harnstoffpuffer:

8 M Harnstoff
0,1 M Tris-HCl pH 8,0
0,1 M Na₂HPO₄

2.2.14 Herstellung und Fraktionierung von S2-Extrakten

2.2.14.1 Herstellung von S2-Zellextrakten für *Western blots*

Da nach RNAi-Experimenten Zellextrakt nur aus einer geringen Zellzahl gewonnen werden konnte, wurde das Zellpellet in 100-200 µl Lysispuffer resuspendiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und auf Eis wieder aufgetaut. Nach zwei Frier-Tau-Zyklen wurden die Lysate bei 20000 x g und 4°C 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Lysis Puffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,5
150 mM NaCl
1 % NP-40

2.2.14.2 Präparation von cytoplasmatischem S2-Zellextrakt

S2-Suspensionskulturen wurden bei einer Zellzahl von $1-2 \times 10^7$ Zellen/ml geerntet. Die Kultur wurde 10 min bei $1000 \times g$ zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet einmal mit $1 \times$ PBS (2.2.13.2) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pelletvolumen abgeschätzt und die Zellen im 3 bis 5-fachen Volumen eiskalten hypotonischen Puffers resuspendiert. Nach 10 min erfolgte der Zellaufschluss durch 15-20 Stöße in einem *Dounce*-Homogenisator auf Eis. Der Aufschluss wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Der Rohextrakt wurde auf 10 % Glycerin und 0,02 % NP-40 eingestellt, vorsichtig gemischt und bei 4°C bei $20000 \times g$ 1 h zentrifugiert. Der Überstand wurde als cytoplasmatischer Extrakt in Experimenten eingesetzt.

Hypotonischer Puffer:

10 mM HEPES pH 7,9
1,5 mM MgCl_2
10 mM KCl
0,5 mM DTT
0,2 mM PMSF
2 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin
1 $\mu\text{g/ml}$ Pepstatin

2.2.14.3 Fraktionierung von S2-CXT über DEAE-Sepharose

Alle Fraktionierungen wurden bei $4-8^\circ\text{C}$ durchgeführt.

Eine Leersäule (1,6/30, Pharmacia) wurde mit 40 ml gequollener DEAE-Sepharose gefüllt. Die Säule wurde an eine Pumpe angeschlossen und mit 20 Säulenvolumen Niedrigsalzpuffer äquilibriert. Die Flussrate betrug 2 Säulenvolumen/Stunde (cv/h). Der S2-CXT wurde mit einer Flussrate von 1 cv/h auf die Säule gepumpt und die Säule im Anschluss mit 4 cv Puffer gewaschen. Der Durchfluss wurde fraktioniert aufgefangen. Die an die Säule gebundenen Proteine wurden mit einem 10 cv umfassenden KCl-Gradienten (20 mM – 1 M bzw. 20 mM - 2 M) eluiert. Es wurden jeweils 4,5 bis 5 ml-Fractionen gesammelt. Die Säule wurde nach Ende des Gradienten mit 5 cv 2 M KCl gewaschen und danach mit 0,1 % Natriumazid in H_2O gespült. Die in Kapitel 3.3.1 und 3.5.2 beschriebenen Fraktionierungen wurden unter Nutzung einer Pumpe P2 (Pharmacia), eines Gradientenmischers und einer UV-Detektionseinheit mit angeschlossenem Schreiber durchgeführt. Die Leitfähigkeit wurde in jeder fünften Fraktion des Gradienten durch Verdünnung von 20 μl Probe in 12 ml Wasser gemessen und über einen Vergleich mit der Leitfähigkeit der Puffer in KCl-Konzentrationen umgerechnet. Die in Kapitel 3.3.5 beschriebene Fraktionierung erfolgte in der FPLC-Anlage (Pharmacia).

DEAE-Niedrigsalzpuffer:

50 mM Tris-HCl pH 7,5
10 % Glycerin
20 mM KCl
0,02 % NP-40
0,5 mM DTT
0,2 mM PMSF
2 µg/ml Leupeptin
2 µg/ml Pepstatin

Hochsalzpuffer:

1 M bzw. 2 M KCl
sonst wie Niedrigsalzpuffer

2.2.14.4 Gelfiltration

Die FPLC-Superdex 200 HS-Gelfiltrationssäule (25 ml, Pharmacia) wurde mit 50 ml Gelfiltrationspuffer äquilibriert. Die Säule hat ein Ausschlussvolumen von ca. 8 ml und eine Ausschlussgröße von ca. 600 kDa. Die Flussrate betrug während des gesamten Laufes 0,25 ml/min. 200 µl der Fraktion 7 der ersten DEAE-Fraktionierung (3.3.1) wurden über eine Probenschleife auf die Säule gegeben. Nach 5 ml wurde begonnen, den Durchfluss in 0,7 ml-Fraktionen zu sammeln. Der Lauf wurde nach Fraktion 40 (33 ml) abgebrochen. Die Fraktionen wurden im TCA-Fällungsexperiment (2.2.21.1) auf deadenylierende Aktivität getestet. Für den *Western blot* (2.2.16) wurden je 300 µl der Fraktionen mit 100 µl 50 % TCA versetzt, bei RT 30 min inkubiert und dann zentrifugiert. Das Proteinpellet wurde zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen, in SDS-Ladepuffer resuspendiert und auf einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt.

2.2.15 RNA-Interferenz in Schneider2-Zellen

Die Experimente wurden entsprechend der Anleitung aus dem Labor von Jack Dixon (Clemens et al., 2000) durchgeführt. *Drosophila*-S2-Zellen wurden gezählt und in serumfreiem Medium (*Schneider's Insect Medium* oder SF-900 Medium) in einer Konzentration von 1×10^6 Zellen/ml resuspendiert. Je 1 ml der Zellsuspension wurde in eine Vertiefung einer 6-well-Platte gegeben und sofort mit 15 µg doppelsträngiger, *in vitro* transkribierter RNA versetzt (2.2.19.8) und gemischt. Nach einer Inkubation von 30-45 min bei RT wurde den jetzt adhären Zellen 2 ml Medium zugegeben. Erfolgte das Experiment in *Schneider's Insect Medium*, enthielt dieses 10 % FCS. Nach vier Tagen im Inkubator bei 25°C wurden die adhären Zellen mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturschale gelöst, vorsichtig im Medium resuspendiert und in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Die Gesamtzellzahl wurde bestimmt und die Zellen bei 1000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann verworfen und die Zellpellets bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

2.2.16 Western blot-Analyse

Die Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel (2.2.24.3) aufgetrennt und nach einem Verfahren von Kyhse-Andersen (1984) mittels einer *Semi-dry*-Blotapparatur (Hoefer) auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Die auf der Membran gebundenen Proteine wurden mit PonceauS-Lösung angefärbt, und die Lage der Markerbanden gekennzeichnet. Nachdem die Membran in TN-Tween-Lösung entfärbt worden ist, wurden unspezifische Bindungen durch 30-60 min Blocken mit 2,5 % BSA in TN-Tween abgesättigt. Der affinitätsgereinigte CAF-Antikörper bzw. das CCR4-Antiserum wurden 1:1000 in TN-Tween-Puffer verdünnt und die Membran für 2 h darin inkubiert. Nachdem fünfmal 5 min mit TN-Tween gewaschen wurde, folgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Peroxidase-gekoppelten Schwein-anti-Kaninchen-Antikörper in TN-Tween. Die Membran wurde wiederum fünfmal 5 min in TN-Tween gewaschen. Danach erfolgte die Detektion mit dem Super-Signal-Substrat (Pierce) nach Herstellerangaben. Die an den sekundären Antikörper gekoppelte Peroxidase katalysierte die Nachweisreaktion. Die dabei entstandene Chemilumineszenz wurde durch Exposition eines Röntgenfilms sichtbar gemacht.

Transferpuffer:

48 mM Tris-HCl pH 9,2
39 mM Glycin
1,3 mM SDS
20 % Methanol

PonceauS-Lösung:

0,5 % (w/v) PonceauS
1 % Essigsäure

TN-Tween :

50 mM Tris-HCl pH 7,5
0,2 % Tween
150 mM NaCl (CAF-Blot)
bzw. 250 mM NaCl (CCR4-blot)

2.2.17 Affinitätsreinigung von CAF1-Antikörpern aus Immuns serum

100 µg rekombinantes dCAF1 wurde in einer SDS-PAGE (2.2.24.3) aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembran transferiert. Die Membran wurde mit PonceauS-Lösung angefärbt und das Membranstück mit dem Protein ausgeschnitten. Die Membran wurde 60 min in TN-Tween (2.2.16) mit 2,5 % BSA geschüttelt und danach mit 1 ml CAF-Antiserum 2 h inkubiert. Das Membranstück wurde fünfmal mit 1 ml TN-Tween gewaschen und in kleine Stücke geschnitten. Die Membranstücke wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Durch Inkubation von 15 min unter Schütteln bei RT mit je 400 µl 0,2 M Glycin pH 2,8, 1 mM EGTA wurde der dCAF1 gebundene Antikörper von der Membran eluiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein Gefäß mit 40 µl 1 M Tris-HCl pH 8,0 überführt und sofort gemischt. Die so gewonnenen Antikörper wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.18 Immundepletion von dCAF1 und dCCR4

Protein A-Sepharose (PAS) wurde in Wasser gequollen und gewaschen. Es wurde eine 50 %-ige Suspension in ddH₂O hergestellt. Je 150 µl der Suspension wurden kurz zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Sepharose 1 h mit je 350 µl Antiserum bei RT inkubiert (jeweils Kaninchen *final bleeding*: PARN, dCAF1 1354, dCCR4 2384, bzw. 2385 Präimmunsereum). Die PAS wurde durch Zentrifugation pelletiert und der Überstand entfernt. Die Pellets wurden noch viermal mit je 300 µl IP-Puffer gewaschen und dann in je 100 µl IP-Puffer resuspendiert.

Für die Immundepletion wurden je 10 µl der Suspension mit 15 µl der Fraktion 7 der ersten DEAE-Fraktionierung (3.3.1) für 1 h auf Eis inkubiert und gelegentlich vorsichtig gemischt. Die Suspension wurde durch eine mit IP-Puffer äquilibrierte *spin column* (BioRad) zentrifugiert und der Durchfluss erneut 1 h mit 15 µl frischer PAS-Suspension auf Eis inkubiert. Die Sepharose wurde wiederum mittels Zentrifugation durch eine *spin column* entfernt und der Durchfluss in einem TCA-Fällungsexperiment (2.2.21.1) auf deadenylierende Aktivität untersucht. Die Proteinmenge wurde durch eine Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford ermittelt.

Für den Test auf deadenylierende Aktivität im Präzipitat wurde die PAS-Suspension nach der ersten Inkubation nicht filtriert, sondern im Reaktionsgefäß pelletiert. Der Überstand wurde abgenommen und die restliche PAS erst dann durch Filtration daraus entfernt. Das Präzipitat wurde mit 190 µl Deadenylierungspuffer versetzt, gemischt, zentrifugiert und danach 190 µl des Überstandes wieder entfernt. Nach nochmaligem Wiederholen dieses Waschschrittes wurde das Pellet in 190 µl Deadenylierungspuffer (2.2.21.1) resuspendiert und 5 µl der Suspension in einem TCA-Fällungsexperiment auf deadenylierende Aktivität untersucht.

IP-Puffer:

20 mM Tris-HCl pH 7,5

150 mM NaCl

0,02 % NP-40

2.2.19 Nukleinsäuretechniken

Grundlegende Techniken wie z.B. Ethanol-fällung oder Phenol-/Chloroformextraktion von Nukleinsäuren wurden entsprechend der Protokolle gängiger Laborhandbücher durchgeführt (Ausubel et al., 1996; Sambrook et al., 1989).

Restriktionsspaltungen, Phosphorylierung, Dephosphorylierung und Ligation von DNA wurden entsprechend der Herstellerangaben in den mitgelieferten Puffern durchgeführt, falls nicht anders aufgeführt.

2.2.19.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Um kleine Mengen Plasmid-DNA aus *E. coli* zu isolieren (Birnboim and Doly, 1976), wurden 1-2 ml einer Über-Nacht-Kultur durch einminütige Zentrifugation bei 14000 rpm geerntet, in 100 µl-Lösung I resuspendiert und 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung II auf Eis und kurzem Mischen wurde das Lysat durch Zugabe von 150 µl 3 M NaAc pH 5,2 neutralisiert und 15 min weiter auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (30 min bei 14000 rpm) wurde der Überstand abgenommen, und die Plasmid-DNA daraus durch eine Ethanol-fällung präzipitiert. Die Konzentration wurde durch Messung der A_{260} bestimmt, wobei mit $A_{260} 1 = 50 \mu\text{g/ml}$ gerechnet wurde.

Lösung I

25 mM Tris-HCl pH 8,0
50 mM Glucose
10 mM EDTA

Lösung II

200 mM NaOH
1 % SDS

Größere Mengen Plasmid-DNA wurden mittels des „Plasmid-Midi-Kits“ von QIAGEN entsprechend der Herstellerangaben präpariert.

2.2.19.2 DNA-Mini-Präparation aus Hefezellen

Diese Methode der DNA-Präparation wurde verwendet, wenn die DNA in *Southern blots* oder für Restriktionsverdau eingesetzt werden sollte. Die Zellwände der Hefen werden durch die Verwendung von Lyticase (Sigma Aldrich) perforiert, was die Ausbeute an DNA erheblich steigert.

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden 5 min bei 5000 rpm bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde einmal mit 1 ml ddH₂O gewaschen, danach in 150 µl Lysispuffer durch vortexen resuspendiert und 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden 500 µl der Lösung II

dazugegeben, durch invertieren gemischt und 30 min bei 65°C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl 5 M KAc wurde der Ansatz durch Invertieren gemischt und 1 h auf Eis inkubiert. Die gefällten Proteine wurden durch zehnmünütige Zentrifugation bei 4°C präzipitiert, der wässrige Überstand in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltenen Nukleinsäuren durch Zugabe von 700 µl Isopropanol gefällt. Nach zehnmünütiger Inkubation bei RT wurde der Ansatz 10 s zentrifugiert, der Überstand entfernt und das entstandene Pellet in 200 µl TE-Puffer (2.2.19.3) mit 10 µg DNase-freier RNase A resuspendiert und 30 min bei 37°C inkubiert. Die verbleibende DNA wurde danach durch Zusatz von 20 µl 3 M NaAc und 450 µl Ethanol gefällt, 15 min bei RT zentrifugiert und das Pellet mit 70% igem Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurde die DNA in 50 µl TE-Puffer resuspendiert.

1,2 M SCE:

1,2 M Sorbitol
0,1 M Natrium Citrate
75 mM EDTA pH 7,0

Lysispuffer:

5 ml 1,2 M SCE
5000 U Lyticase
50 µl β-Mercaptoethanol

Lösung II:

100 mM Tris-HCl pH 9,7
50 mM EDTA
0,5 % SDS

2.2.19.3 DNA-Mini-Präparation aus Hefezellen für PCR

Mit dieser Methode präparierte DNA wurde für PCR-Reaktionen eingesetzt, in denen die Mutagenese überprüft werden sollte. Diese Methode ist weniger zeitaufwendig, die erhaltene DNA aber weniger sauber.

1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert und das Pellet in 100 µl Lysispuffer resuspendiert. Nachdem 15 min in einem automatischen Schüttler inkubiert wurde, wurden 500 µl TE-Puffer zugegeben und mit 500 µl Phenol extrahiert. Die Nukleinsäuren wurden aus dem wässrigen Überstand der Phenolextraktion durch Zugabe von 50 µl NaAc und 600 µl Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation präzipitiert. Das Pellet wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, im Vakuum getrocknet und in 20 µl TE-Puffer mit 10 µg RNase A resuspendiert. Standardmäßig wurden 0,5 µl in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

Lysispuffer:

3 % SDS
1 % β-Mercaptoethanol
10 mM Tris-HCL pH 7,5
1 mM EDTA

TE-Puffer:

20 mM Tris-HCl pH 7,5
1 mM EDTA

2.2.19.4 Isolierung von RNA

2.2.19.4.1 Isolierung von RNA aus Schneider2-Zellen

Die Extraktionsmethode basiert auf der Trizol®-Methode (Invitrogen).

Die S2-Zellen wurden bei 200-500 x g 5 min zentrifugiert, das Medium abgenommen und das Zellpellet im 5-10 fachen Volumen, mindestens aber in 1 ml Extraktionspuffer resuspendiert. Die Suspension wurde 1 min gevortext, 5 min bei RT inkubiert und wiederum 1 min gevortext. 20 % des Extraktionspuffervolumens wurde an Chloroform zugegeben, für 30 s heftig geschüttelt und 5 min inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte für 15 min bei 20000 x g und 4°C. Die obere Phase wurde nochmals mit Chloroform extrahiert und die RNA daraus mit dem gleichen Volumen an Isopropanol gefällt. Das Präzipitat wurde mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert. Die Konzentration wurde durch Messung der A_{260} bestimmt, wobei mit $A_{260} 1 = 40 \mu\text{g/ml}$ gerechnet wurde.

Extraktionspuffer:

0,8 M Guanidiniumthiocyanat

0,4 M Ammoniumthiocyanat

0,1 M NaAc pH 5,0

5 % Glycerin

38 % H₂O gesättigtes Phenol

2.2.19.4.2 Isolierung von RNA aus Hefezellen

Die RNA wurde analog der Trizol®-Methode oder mit der „*hot acid phenol*“-Methode (Ausubel *et al.*, 1996) aus den Hefezellen isoliert.

Für die „*hot acid phenol*“-Methode wurde eine 10 ml Hefekultur bei einer OD₆₀₀ von 1-2 durch Zentrifugation von 3 min bei 1500 x g geerntet und mit 1 ml eiskaltem DEPC-behandeltem Wasser gewaschen. Das Pellet wurde in 400 µl TES-Puffer aufgenommen, mit 400 µl H₂O-gesättigtem Phenol gemischt und 1 h bei 65°C mit gelegentlichem Vortexen inkubiert. Die Suspension wurde 5 min auf Eis abgekühlt und 5 min bei 14000 x g und 4°C zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde nochmal mit 400 µl saurem Phenol und dann mit 400 µl Chloroform extrahiert. Die RNA wurde aus der wässrigen Phase mit 0,3 M Natriumacetat und 2,5 Vol. Ethanol gefällt, das Präzipitat mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und getrocknet. Die RNA wurde in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert.

TES Puffer:

10 mM Tris-HCl pH 7,0

10 mM EDTA

0,5 % (w/v) SDS

2.2.19.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dient dazu, ausgewählte DNA-Abschnitte zu vervielfältigen und gegebenenfalls über die verwendeten Primer Mutationen in die DNA einzufügen. Standardmäßig wurden in 50 µl-Reaktionen 50 ng Plasmid-DNA oder 1 µl einer Reversen-Transkriptionsreaktion mit je 50 pmol der entsprechenden Primer und 10 pmol eines dNTP-Mixes mit den mit der Polymerase gelieferten Puffern und 2-5 U der thermostabilen Polymerase nach Herstellerangaben gemischt. In der Regel wurde zunächst 5 min bei 95°C denaturiert. Dann wurden 25-35 Zyklen von 45 s Denaturieren bei 95°C, 45 s Hybridisierung bei einer primerabhängigen Temperatur und 45 s bis 4 min (je nach Länge der zu amplifizierenden DNA) Synthese bei 72°C durchlaufen. Zum Schluß wurde nochmals 10 min bei 72°C verlängert und anschließend auf 4°C abgekühlt. Die Berechnung der Hybridisierungstemperatur der Primer erfolgte nach der „2+4-Regel“. Für die Amplifikationen der POP2-, dCAF- und dCCR4-ORFs wurde *Pwo*-Polymerase verwendet, da sie eine *proof-reading*-Aktivität besitzt. Für die PCRs, die zur Kontrolle der korrekten Integration von Markergenen in das Hefegenom und zur Überprüfung der Mutationen im POP2-Gen dienten, wurde *Taq*-Polymerase verwendet.

2.2.19.6 DNA-Sequenzierung

Sequenzierungen wurden zur Überprüfung der Integrität von Plasmiden, die zur Proteinexpression verwendet werden sollten, durchgeführt. Weiterhin wurden sie zum Überprüfen der korrekten Insertion von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren eingesetzt.

Die verwendete Sequenziermethode basiert auf dem enzymatischen Kettenabbruch durch Einbau von Didesoxynukleotiden (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierung wurde mit dem „*Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit*“ (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Reaktion wurde Plasmid-DNA aus einer Midi-Präparation verwendet. Die Detektion und Analyse der Fragmente erfolgte in einer Kapillarelektrophorese (*Genetic Analyser*, ABI).

2.2.19.7 Reverse Transkription

Bei der reversen Transkription wird mRNA mit Hilfe eines Oligo(dT)-Primers und einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase in cDNA umgeschrieben. Mit sequenzspezifischen Primern können dann einzelne cDNAs in einer anschließenden PCR-Reaktion amplifiziert werden. Standardmäßig wurden 1,5 µg Gesamt-RNA mit 1,25 pmol Oligo(dT)-Primer in 10 µl Gesamtvolumen 5 min bei 70°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Zu den

Nukleinsäuren wurden 5 µl 5 x M-MLV-Puffer, je 0,5 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP und 200 U M-MLV-Reverse Transkriptase gegeben und das Reaktionsvolumen auf 25 µl mit DEPC behandeltem Wasser aufgefüllt. Die Reaktion wurde 1 h bei 42°C inkubiert und danach durch Erhitzen auf 70°C für 30 min gestoppt.

2.2.19.8 Herstellung doppelsträngiger RNA für RNAi-Experimente

Für die RNA-Interferenzexperimente (2.2.15) werden große Mengen doppelsträngiger RNA (dsRNA) (15 µg/2 x 10⁶ Zellen) benötigt. Diese wurden mittels des MEGAscript-T7-Kits der Firma Ambion hergestellt. Als *template* wurden PCR-Produkte eingesetzt, die mit Primern amplifiziert wurden, die an ihrem 5'-Ende die T7-Promotorsequenz trugen und am 3'-Ende spezifisch für die zu amplifizierende DNA waren. Von den Expressionsplasmiden (CAF und CCR4) wurden 500-700 Nukleotide lange Fragmente der ORFs amplifiziert. Wenn kein cDNA-Klon vorhanden war, wurde 1 µl einer reversen Transkription von S2-Gesamt-RNA in die PCR eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden nach Herstellerangaben über einen *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche) gereinigt. Je 1 µg PCR-Produkt wurde nach Herstellerangaben in der Transkriptionsreaktion eingesetzt. Nach 4 h bei 37°C wurde die entstandene RNA mit 0,3 M NaAc pH 5,2 und 2,5 Vol. Ethanol gefällt. Nach dem Trocknen wurde die RNA in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert. Die Lösung wurde 30 min auf 65°C erhitzt und langsam auf RT abgekühlt, um die komplementären RNA-Stränge zu hybridisieren. Die Konzentration wurde durch Messung der A₂₆₀ bestimmt, wobei mit A₂₆₀ 1 = 45 µg/ml gerechnet wurde.

2.2.20 Herstellung radioaktiver Substrate

2.2.20.1 Radioaktive 5'-Markierung

Die T4-Polynukleotidkinase (PNK) katalysiert die Phosphorylierung von 5'-Hydroxylenden von DNA oder RNA. Mit [γ -³²P] ATP als Phosphatgruppendonator können Nukleinsäuren durch das Übertragen des γ -Phosphatrestes radioaktiv markiert werden. Für die Markierung von Primern wurden in einer 15 µl-Reaktion 100 pmol Oligonukleotide mit 5 U PNK (NEB) und 5-15 µCi [γ -³²P] ATP (3000 Ci/mmol) in PNK-Puffer (NEB) 60-90 min bei 37°C inkubiert. Durch eine anschließende Ethanol-fällung wurden die nicht eingebauten Nukleotide entfernt.

2.2.20.2 *In vitro*-Transkription

Für die Untersuchung der Deadenylierung wurden radioaktiv markierte RNAs durch *in vitro*-Transkription hergestellt. Anschließend wurden sie posttranskriptional mit einem Poly(A)-Schwanz versehen, wenn dieser nicht auf dem Plasmid vorhanden war (2.2.20.3). In einem Standard-Transkriptionsansatz wurden 1-2 µg linearisierte Plasmid-DNA in einer 50 µl-Reaktion mit je 0,5 mM ATP, GTP, CTP, 0,1 mM UTP, 20 U RNasin (Promega), 20-50 µCi [α - 32 P] UTP und 20 U SP6- bzw. T7-RNA-Polymerase im mitgelieferten Puffer für 2 h bei 37°C inkubiert. Wenn die Transkripte cotranskriptional mit einem 5'-*cap* versehen werden sollten, wurde die GTP-Konzentration ebenfalls auf 0,1 mM erniedrigt und zusätzlich 1 mM m⁷GpppG (NEB) in die Reaktion gegeben. Für die Transkription des Hsp70-3'-UTR wurde wegen besserer Ausbeuten [α - 32 P] GTP als markiertes Nukleotid eingesetzt und die Menge an nicht-markiertem GTP auf 0,1 mM erniedrigt. Wegen des hohen A/U-Gehalts des Transkriptes wurden die ATP- und UTP-Konzentrationen auf 2,5 mM erhöht.

Nach der Transkription wurden die Transkripte mit 2,5 M Ammoniumacetat und Ethanol gefällt, in Formamid-Ladepuffer (2.2.20.3) aufgenommen, bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf ein 5-8 %-iges denaturierendes Polyacrylamidharnstoffgel (2.2.24.2) aufgetragen. Die radioaktiven Transkripte wurden nach Ende des Gellaufs durch kurzes Auflegen eines Röntgenfilmes lokalisiert und Transkripte voller Länge aus dem Gel ausgeschnitten. Durch Über-Nacht-Inkubation in Elutionspuffer bei 37°C im Thermoschüttler wurde die RNA aus dem Gel eluiert. Nach einer Phenol/Chloroformextraktion wurde die RNA mit Ethanol gefällt, in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und die Menge an Transkript über die spezifische Radioaktivität bestimmt.

Zur Transkription wurden verschiedene Plasmide verwendet:

pSP6-L3pre enthält eine Sequenz, die sich von der L3-Polyadenylierungssequenz der Adenovirus-2 *major-late*-Transkriptionseinheit ableitet. Das Plasmid wurde zur Transkription mit dem Restriktionsenzym *RsaI* geschnitten. Das Transkript hatte eine Länge von 65 Nukleotiden (Christofori und Keller, 1989).

pSP6-L3pre A₍₈₀₎ bzw. pSP6-L3pre A₍₁₁₀₎ enthält die L3-pre-Sequenz und einen Plasmid-codierten Poly(A)-Schwanz von 80 bzw. 110 Nukleotiden (Kerwitz et al., 2003).

pSP6-β-Globin enthält 240 Nukleotide des β-Globin 3'UTR. Für die Transkription wurde es mit *EcoRI* linearisiert (Körner and Wahle, 1997).

pGEM hsp70-3'-UTR ist ein pGEM3zf+-Vektor (Promega), in den ein PCR-Produkt über die *Sall*- und *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt worden ist, welches 214 Nukleotide des 3'-UTR des *Drosophila melanogaster* HSP70-Gens des distalen Locus 87A7 vom Stopcodon bis zur *cleavage Site* enthält. Die Transkription erfolgte nach Linearisierung mit *EcoRI* vom T7-Promotor und ergab ein Transkript von 238 Nukleotiden.

vGC-GM-CSF kodiert den 5'-UTR des humanen Globin, den 3'-UTR des humanen GM-CSF, in dem die AU-reichen Sequenzen durch Austausch nach G bzw. C mutiert sind, und einen Poly(A)-Schwanz von 100 Nukleotiden. Das Transkript hat eine Länge von 240 Nukleotiden (Voeltz and Steitz, 1998), modifiziert (Dardoussis, 2001).

Gel Elutionspuffer:

750 mM Ammoniumacetat
10 mM Magnesiumacetat
1 mM EDTA
1 % (w/v) SDS

2.2.20.3 Polyadenylierung radioaktiv markierter Transkripte

Wenn die DNA, die zur *in vitro*-Transkription (2.2.20.2) benutzt wurde, nicht für einen Poly(A)-Schwanz kodierte, musste dieser posttranskriptional in einer unspezifischen Polyadenylierungsreaktion (Wahle, 1991) angefügt werden. Dazu wurden in einem 25 µl-Ansatz 20 pmol Transkript in unspezifischem Polyadenylierungspuffer mit 0,5 mM ATP und ca. 150 fmol PAP 513 1,5 bis 3 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 25 µl 2 x PK-Puffer, 20 µg Proteinase K und 1 µg rRNA abgestoppt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Aufreinigung der Reaktionsprodukte erfolgte wie in Kapitel 2.2.20.2 beschrieben.

Unspezifischer PAP-Puffer:

25 mM Tris-HCl pH 8,3
40 mM KCl
10 % Glycerin
0,05 mM EDTA
0,5 mM MnCl₂
0,2 mg/ml mBSA
0,02 % NP-40
0,5 mM DTT

2 x PK-Puffer

0,2 M Tris-HCl pH 7,9
0,3 M NaCl
25 mM EDTA
2 % SDS

Formamid-Ladepuffer

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

2.2.20.4 Herstellung von homogen markiertem Poly(A)

Die Herstellung homogen markierten Poly(A)s erfolgte durch Verlängerung eines kurzen Oligo(A)-Primers in einer unspezifischen Polyadenylierungsreaktion (Wahle, 1991).

In einer 50 µl-Reaktion wurden 150 pmol eines ca. 20 Nukleotide langen Oligo(A)-Primers in unspezifischem Polyadenylierungspuffer (2.2.20.3) mit 0,5 mM MnCl₂, 0,5 mM ATP, ca. 50 µCi [α-³²P] ATP und 2 pmol PAP 513 1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktionsprodukte wurden nach einer Ethanol-fällung in DEPC-behandeltem Wasser resuspendiert und zur vollständigen Abtrennung nicht eingebauteter Nukleotide über eine Sephadex G-50 *spin column* gereinigt. Die Radioaktivität eines Aliquots wurde im Scintillationszähler gemessen und die spezifische Aktivität bestimmt. So erhaltenes Poly(A) besaß eine durchschnittliche Länge von 400-600 Nukleotiden.

2.2.21 Deadenylierungsexperimente

2.2.21.1 TCA-Fällungsexperiment

Das TCA-Fällungsexperiment wurde verwendet, um eine deadenylierende Aktivität in Extrakten oder Säulenfraktionen nachzuweisen und zu quantifizieren. Die Durchführung erfolgte wie in Körner et al. (1997) beschrieben. Für die Deadenylierung durch den Hefe CCR4/NOT-Komplex wurde der Puffer nach Daugeron et al. (2001) verändert. Standardmäßig wurden in einer 50 µl-Reaktion 1 µg nicht fraktioniertes Poly(A) und homogen markiertes Poly(A) (2.2.20.4) mit einer Aktivität von 30000 bis 100000 cpm in Deadenylierungspuffer mit den Proteinfractionen bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 150 µl eiskalter 16 %iger TCA gestoppt und 15 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Polynukleotide werden durch TCA gefällt, freigesetzte Mononukleotide sind säurelöslich und bleiben nach der Zentrifugation im Überstand. Die Hälfte des Überstandes wurde mit 3 ml Scintillationsflüssigkeit versetzt und die Radioaktivität im Scintillationszähler bestimmt. Über die spezifische Radioaktivität des Poly(A) wurde aus den gemessenen cpm die Menge an freigesetztem AMP errechnet.

Deadenylierungspuffer:

20 mM HEPES pH 7,05
10 % Glycerin
0,02 % (v/v) NP-40
0,2 % mg/ml mBSA
1 mM DTT
1 mM MgAc
150 mM KCl

Deadenylierungspuffer Hefe:

10 mM HEPES pH 7,4
20 % Glycerin
0,02 % (v/v) NP-40
2 mM DTT
2 mM Spermidin
1 mM MgAc

2.2.21.2 Deadenylierungsexperimente mit polyadenylierter RNA

In vitro transkribierte und polyadenylierte RNA, die in einigen Fällen am 5'-Ende durch eine m⁷Gppp-cap-Struktur modifiziert war, wurde in Deadenylierungspuffer (2.2.21.1) mit den Proteinfractionen bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des gleichen Volumens 2 x PK-Puffer (2.2.20.3) und 20 µg Proteinase K pro Reaktion gestoppt und weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Nach einer anschließenden Ethanol-fällung wurde die RNA in einer denaturierenden Harnstoff-PAGE (2.2.24.2) aufgetrennt und durch einen PhosphorImager detektiert.

2.2.22 Bestimmung der *in vivo* Poly(A)-Schwanzlänge

Die Gesamt-RNA wurde aus 5 ml Hefe-Kultur bei einer OD₆₀₀ von 1 bzw. aus 3 ml einer S2-Kultur (0,5-2 x 10⁷ Zellen) isoliert. Je 1-1,5 µg RNA wurde in einer 20 µl Reaktion in unspezifischem Polyadenylierungspuffer (2.2.20.3) mit 10 µCi 3'-dATP und 100 U yPap1p für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Phenol/Chloroformextraktion und Ethanol-fällung wurde die markierte RNA in 50 µl 10 mM Tris-HCl pH 8,0 resuspendiert und die Radioaktivität pro µl bestimmt.

Gleiche Mengen Radioaktivität (100000-500000 cpm) wurden in einer 20 µl Reaktion in 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 100 mM KCl mit 20 µg Hefe-RNA, 5 ng RNase A und 25 U RNase T1 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des gleichen Volumens 2 x PK Puffer (2.2.20.3) mit 20 µg Proteinase K, 2 µg rRNA und 1 µg Glycogen gestoppt. Nach einer weiteren Inkubation von 30 min bei 37°C wurde die RNA gefällt, in Formamid-Ladepuffer (2.2.20.3) resuspendiert und auf einem 10 oder 15% Harnstoff-Polyacrylamidgel (2.2.24.2) analysiert.

Für die Kontrollen des RNase-Verdau wurden 1 µg rRNA bzw. Poly(A) ebenfalls markiert und wie die Hefe-Proben behandelt. Von dem markierten Poly(A) wurde nur 1/10 der Radioaktivität in den Verdau eingesetzt. Als Kontrolle für den Verdau der S2-RNA wurde 1 pmol *in vitro*-transkribierte L3-prä A₍₈₀₎-RNA wie oben beschrieben markiert. In den Verdau wurden 10000 cpm eingesetzt.

2.2.23 Darstellung der Poly(A)-Schwänze spezifischer mRNAs (Sallés and Strickland, 1999)

3 µg Gesamt-RNA wurden mit 50 ng Oligo(dT)-Primer und 2 ng L3-prä A₍₁₀₀₎-RNA in 7 µl Wasser gemischt und 5 min bei 65°C denaturiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden 4 µl 5 x M-MLV-Reaktionspuffer, 2 µl 100 mM DTT, 1 µl 10 mM dNTPs, 1 µl 10 mM ATP und 10 U T4-DNA-Ligase in einem Gesamtvolumen von 13 µl gemischt und bei 42°C 3 min erwärmt. Die denaturierte RNA wurde ohne weiteres Abkühlen dazugegeben und der Ansatz weitere 30 min bei 42°C inkubiert. In dieser Zeit hybridisieren die Oligo(dT)-Primer mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNAs. Nachdem 1 µg Oligo(dT)-anchor-Primer dazugegeben wurde, wurde der Ansatz 2 h bei 12°C inkubiert. Durch die Erniedrigung der Temperatur kann der Oligo(dT)-Teil des Oligo(dT)-anchor-Primers mit den noch nicht besetzten 3'-Enden der mRNAs hybridisieren. Die Primer werden durch die Ligase verknüpft. Danach werden 200 U M-MLV-RNase H- dazugegeben und die Reaktion 1 h bei 42°C inkubiert. Nachdem die Primärstrang-Synthese abgeschlossen ist, wurde die Reverse Transkriptase 30 min bei 70°C inaktiviert. Nach der Inaktivierung wurden die Reaktionen auf Eis abgekühlt und je 1 µl der Reaktion als *template* in eine PCR-Reaktion eingesetzt.

In einem 50 µl Ansatz wurden 1 µl der reversen Transkription in 1 x Taq-Puffer (Amersham) mit 300 µM dATP/dCTP/dGTP/dTTP, 0,5 µM Oligo(dT)-anchor-Primer und 0,5 µM eines genspezifischen 5'-Primers (hsp70 Sal oder L3pre+1 ffw.) mit 0,5 µl *Taq*-Polymerase gemischt. Für die Detektion der PCR-Produkte waren die Primer am 5'-Ende radioaktiv markiert. Die Radioaktivität betrug 100000-300000 cpm/Reaktion.

Der Ansatz wurde 3 min bei 94°C im Thermocycler (Biometra) denaturiert. Danach wurden 35 Zyklen von 30 s 94°C, 45 s 58°C und 2 min 72°C durchlaufen. Es folgte eine 5 min Inkubation bei 72°C und ein Herunterkühlen der Proben auf 4°C. Die PCR-Ansätze wurden mit Phenol/Chloroform extrahiert, die DNA gefällt und das Pellet nach dem Trocknen in 10 µl Formamid-Ladepuffer (2.2.20.3) aufgenommen. Je 6 µl wurden auf einem 5% Harnstoff-Polyacrylamidgel (2.2.24.2) aufgetrennt und die PCR-Produkte durch den PhosphorImager detektiert.

2.2.24 Gelsysteme

2.2.24.1 Agarose-Gele

Nukleinsäurefragmente von ca. 0,2 – 20 kb Größe wurden in Agarose-Gelen aufgetrennt. Die Konzentration der Agarose (0,6 – 2 % w/v) in 1 x TBE Puffer richtete sich nach der Größe der zu trennenden Moleküle. Für die spätere Detektion der DNA wurde 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in das Gel gegeben. Die DNA-Proben wurden mit 1/10 Volumen 10 x Ladepuffer versetzt. Als Größenstandard wurde die *Ikb ladder* (Gibco) verwendet. Nach der Elektrophorese wurde die DNA auf einem UV-Leuchttisch sichtbar gemacht und mit einem Videosystem (INTAS) dokumentiert.

TBE-Puffer

90 mM Tris-Borat
90 mM Borsäure
4 mM EDTA

Ladepuffer:

30 % Glycerin
0,25 % Bromphenolblau
0,25 % Xylencyanol
in 1 x TBE-Puffer

Zur Aufreinigung von DNA aus Agarose-Gelen wurde der *QIAEX*-Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.24.2 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

In diesem Gelsystem können je nach Polyacrylamidkonzentration und dem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid Nukleinsäuremoleküle entsprechend ihrer Länge voneinander getrennt werden. Die Gele bestanden aus 5–20 % Polyacrylamid (Verhältnis Acryl-/Bisacrylamid 19:1), 8,3 M Harnstoff in 1 x TBE (2.2.24.1). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von 130 µl 10 % APS und 30 µl TEMED pro 25 ml Gellösung gestartet. Als Laufpuffer wurde 1 x TBE verwendet. Die Proben wurden in Formamid-Ladepuffer (2.2.20.3) aufgenommen, 2 min bei 95°C denaturiert, auf Eis abgekühlt und nach einem Vorlauf von 30 min auf das Gel aufgetragen und bei konstanter Leistung (20 Watt für ein 20 cm x 20 cm x 0,1 cm Gel) aufgetrennt. Als Größenstandard diente *HpaII*-verdauter und radioaktiv markierter pBR322-Vektor.

2.2.24.3 SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli, 1970) verwendet. Die Proteine wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit dem gleichen Volumen 2 x Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95°C denaturiert. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit Coomassie-Brilliant-Blue R250 angefärbt und getrocknet.

3 Ergebnisse

3.1 Untersuchungen zum CCR4/NOT-Komplex in *S. cerevisiae*

Bei der Suche nach homologen Proteinen zu der humanen Poly(A)-Nuklease PARN in *S. cerevisiae* wurde das Pop2-Protein als bestes Homolog identifiziert. Wie PARN besitzt es eine zentrale Exonukleasedomäne vom RNase D-Typ. Außerhalb dieser Region gibt es keine nennenswerte Homologie. *In vivo*- und *in vitro*-Untersuchungen sollten klären, ob Pop2p in die Deadenylierung von mRNA involviert ist.

3.1.1 Eine Deletion von POP2 beeinflusst das Wachstum der mutierten Hefen

Das POP2-Gen wurde in den haploiden Hefestämmen *S. cerevisiae* W303a und BMA41a über homologe Rekombination ausgetauscht (2.2.12.1). Die Deletion von POP2 war nicht letal, doch die mutierten Hefen zeigten ein stark vermindertes Wachstum auf Festmedium. Durch die Aufnahme von Wachstumskurven wurde das verminderte Wachstum quantifiziert. Kulturen der Mutanten sowie der Wild-Typ-Stämme wurden im Schüttler inkubiert und ihr Wachstum über die Messung der OD₆₀₀ bestimmt.

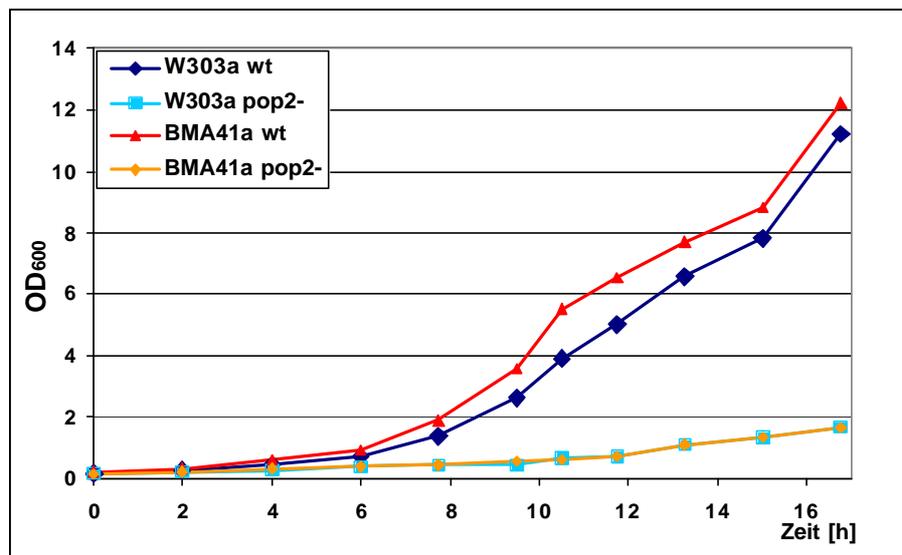


Abb. 3.1.1.1 Wachstumskurve der *pop2*-Deletionsmutanten und der Wildtypstämme W303a und BMA41a. Die OD₆₀₀ ist gegen die Kultivierungszeit aufgetragen. Die Hefen wurden in YPD-Medium bei 30°C im Schüttler kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die optische Dichte bei 600 nm photometrisch bestimmt. Bei einer OD₆₀₀>1 wurden die Proben für die Messung verdünnt.

Beide Hefestämme hatten ungefähr die gleiche Teilungsrate in YPD-Vollmedium. Am Anfang der Kultivierung teilten sich die wt-Stämme zunächst alle 2 Stunden später alle 4 (BMA41a) bis 4,5 (W303a) Stunden. (Die Abnahme der Teilungsrate bei höherer optischer Dichte ist wahrscheinlich auf einen beginnenden Nährstoffmangel im Medium zurückzuführen.) Nach 16,75 Stunden Kultivierung erreichten die wt-Stämme eine OD_{600} von 11,2 (W303a) bzw. 12,2 (BMA41a). Die *pop2*-Deletionsmutanten dagegen waren nach 16,75 h noch nicht nennenswert gewachsen. Ihre Verdopplungszeit betrug etwa 6,5 Stunden. Nach 16,75 Stunden erreichten beide *pop2*-Deletionsstämme bei gleicher Ausgangszellzahl nur eine OD_{600} von 1,7.

Das verringerte Wachstum der *pop2*-Deletionsmutanten lässt darauf schließen, dass das Pop2-Protein, obwohl es nicht essentiell ist, eine wichtige Funktion im Stoffwechsel hat, die nicht ohne weiteres durch ein anderes Protein kompensiert werden kann.

3.1.2 Die Deletion von POP2 hat einen Einfluss auf die Poly(A)-Schwanzlänge *in vivo*

Nachdem die Deletion von POP2 das Wachstum der mutierten Hefen stark beeinflusst, wurde untersucht, ob diese auch eine Auswirkung auf die Länge der Poly(A)-Schwänze cytoplasmatischer mRNAs der Hefezelle haben. Um dies zu überprüfen, wurde die Gesamt-RNA aus den Wildtyp- und *pop2*-Deletionsstämmen isoliert (2.2.19.4.1). Das 3'-Ende der RNAs wurde mit radioaktivem 3'-dATP markiert und die RNA einem RNase A- und RNase T1-Verdau unterzogen (2.2.22). RNase A spaltet RNA hinter Pyrimidinresten, RNase T1 hinter Guanosinresten. Poly(A) wird bei geeigneten Reaktionsbedingungen durch diese Enzyme nicht angegriffen. Die verbleibenden Poly(A)-Schwänze wurden in einem denaturierendem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch einen PhosphorImager analysiert. Als Kontrolle für die Qualität des Verdau wurde neben der Hefe-RNA auch Poly(A)₁₀₀ und rRNA mit den RNasen behandelt.

RNase A und -T1 sollten den Nicht-Poly(A)-Anteil der RNA verdauen, die Poly(A)-Schwänze aber nicht angreifen. Die Kontrollen zeigen, dass die eingesetzte rRNA vollständig verdaut wurde (Spur 6), während das Poly(A)₁₀₀ im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle unverändert blieb (vgl. Spur 7 und 8). Die eingesetzte Menge an RNasen war für einen vollständigen Verdau des Nicht-Poly(A)-Anteils der Gesamt-RNA richtig bemessen.

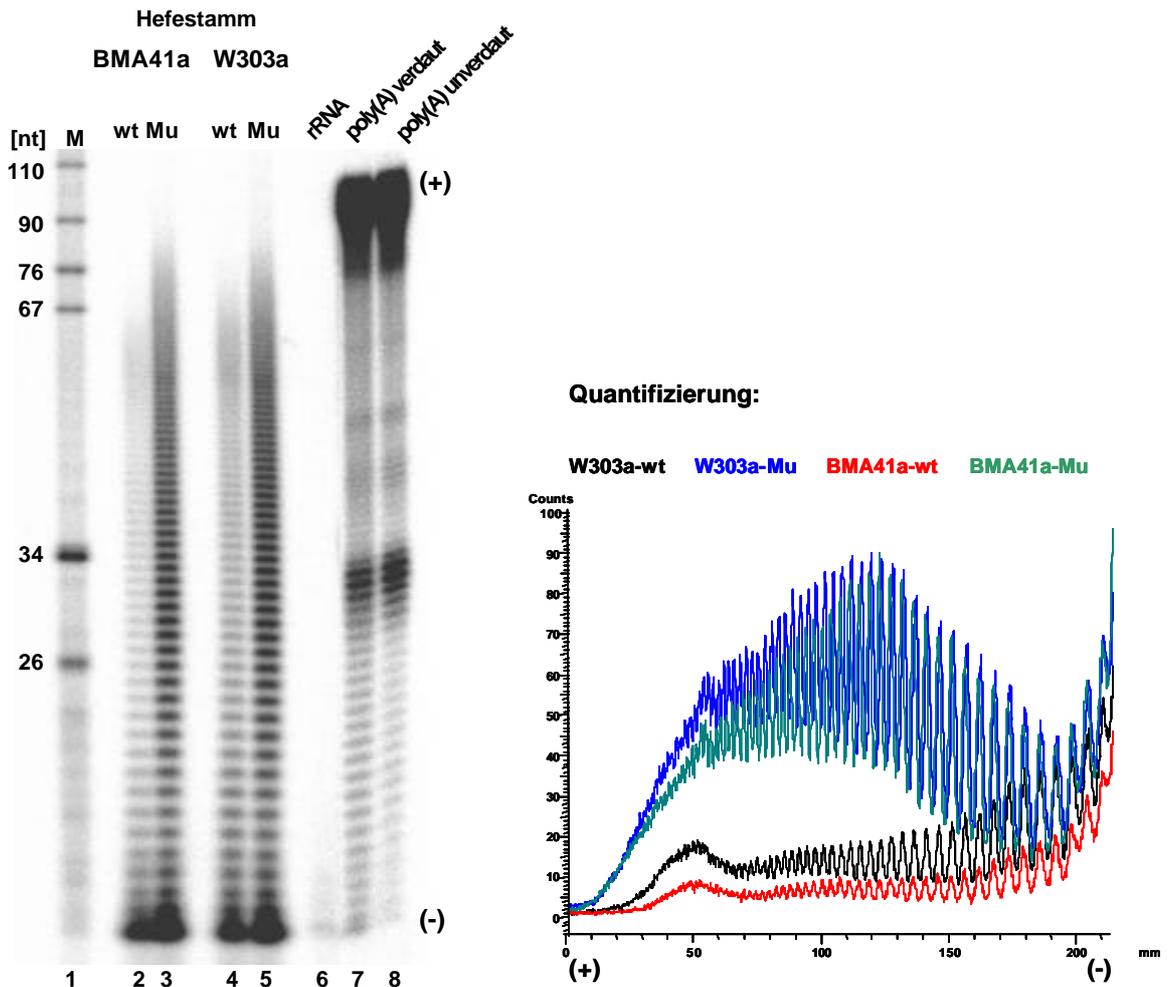


Abb. 3.1.2.1 Bestimmung der *in-vivo* Poly(A)-Schwanzlänge von *pop2*-Deletionsstämmen. Gleiche Mengen markierter Gesamt-RNA aus *pop2*-Deletionsstämmen bzw. wt-Stämmen wurden in Gegenwart von 20 μ g unmarkierter Hefe-RNA mit 25 U RNase T1 und 5 ng RNase A 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Proteinase K und SDS abgestoppt, die verbleibende RNA gefällt und auf einem 10 %-igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Spur 1 ist ein radioaktiv markierter Standard (M) aufgetragen. Die Länge der Fragmente ist in Nukleotiden [nt] angegeben.

Die Poly(A)-Schwänze der *pop2*-Deletionsstämmen hatten eine maximale Länge von ca. 80-90 Nukleotiden, während die der wt-Stämme nicht mehr als 70 Nukleotide lang waren. Es fällt auf, dass die Menge an verbleibendem Poly(A) bei den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich erhöht war (vgl. Intensität Spur 2 und 3 bzw. Spur 4 und 5). Weiterhin war bei den Mutanten der Anteil der Fragmente zugunsten der längeren Poly(A)-Schwänze verschoben. Daraus lässt sich schließen, dass Pop2p *in vivo* an der Deadenylierung von mRNAs beteiligt ist. Da Pop2p Bestandteil eines Multienzymkomplexes, des CCR4/NOT-Komplexes ist, in dem ein weiteres Protein, Ccr4p, Homologien zur Exonuklease III aus *E. coli* zeigt, ist nicht sicher, ob durch die Deletion von Pop2p ein katalytisch aktives Peptid entfernt oder die Interaktion der Komponenten des Komplexes und damit dessen Funktion gestört wurde.

3.1.3 Der Hefe CCR4/NOT-Komplex besitzt Nukleaseaktivität *in vitro*

Hefestämme, in denen POP2 oder CCR4 deletiert sind, zeigen einen stark vermindertes Wachstum und eine verringerte Deadenylierung *in vivo* (3.1.1). Der CCR4/NOT-Komplex wurde über Pop2p bzw. CCR4p, die einen N-terminalen TAP-tag trugen, aus Hefen isoliert (2.2.13.1) und auf Deadenylaseaktivität *in vitro* untersucht. Der TAP-tag kodiert für die IgG-Bindedomäne des Protein A, eine TEV-Protease-Erkennungssequenz und eine Calmodulin-Bindedomäne. Proteinkomplexe konnten damit aus Hefelysaten über zwei Affinitätschromatographien nativ gereinigt werden. Als Kontrolle wurde der U1-Proteinkomplex ebenfalls über TAP-Snu71 gereinigt. Dieser am prä-mRNA-Spleißen beteiligte Komplex besitzt keine deadenylierende Aktivität.

Zunächst wurde die Kinetik des Abbaus von homogen markiertem Poly(A) im TCA-Fällungsexperiment untersucht (2.2.21.1).

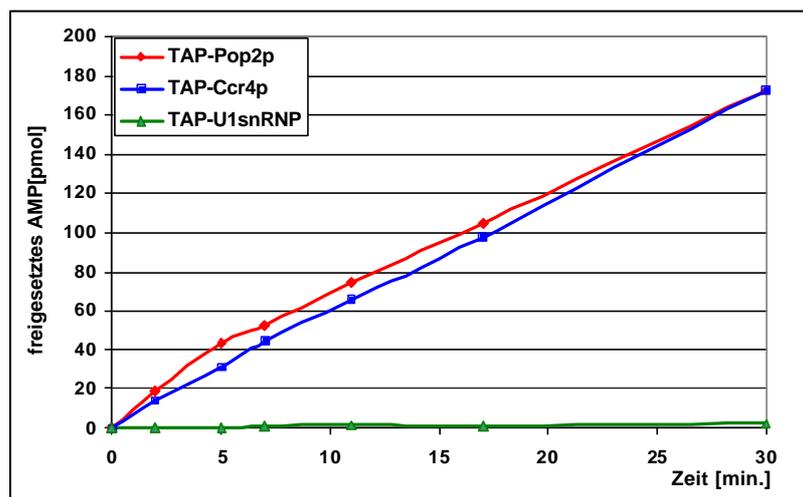


Abb. 3.1.3.1 Abbau von ^{32}P -markiertem Poly(A) durch über den TAP-tag gereinigte Proteinkomplexe. pop2: CCR4/NOT-Komplex gereinigt über TAP-Pop2; ccr4: CCR4/NOT-Komplex gereinigt über TAP-Ccr4, u1: U1-snRNP gereinigt über TAP-Snu71p. Pro Zeitpunkt wurde 1 μg Poly(A) in spermidinhaltigem Puffer eingesetzt. Der Reaktionsmix wurde auf Eis gemischt, geteilt und 5 min bei 30°C vorgewärmt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von je 1 μl TAP-tag Proteinkomplex pro 40 μl Mix gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten je 40 μl in 120 μl 16 %-igen TCA abgestoppt. Die Menge an freigesetztem AMP ist gegen die Reaktionsdauer aufgetragen.

Der U1-Proteinkomplex zeigte keine Deadenylaseaktivität. Die durch TAP-Pop2p und TAP-CCR4p isolierten Komplexe setzten AMP aus Poly(A) frei. Die Rate der Deadenylierung betrug ca. 5,5 pmol/min/ μl für beide CCR4/NOT-Komplexe. In beiden Fällen wurden die für die Deadenylaseaktivität notwendigen Untereinheiten des Komplexes mitgereinigt. Da in beiden Komplexen Ccr4p und Pop2p enthalten waren, lässt sich die gefundene Aktivität nicht einem der beiden Proteine zuordnen.

Eine spezifische Aktivität konnte leider nicht berechnet werden, da die Proteinmenge in den Präparationen nicht bekannt war. Ein Vergleich der Stärke der Proteinbanden im Coomassiegefärbten SDS-Gel, ließ auf etwa gleiche Proteinkonzentration in den verschiedenen Eluaten schließen, so dass die relativen Aktivitäten durchaus vergleichbar waren.

Aus diesem Experiment lässt sich noch nicht schließen, ob der Abbau des Poly(A) vom 3'-Ende her geschieht und ob die Deadenylaseaktivität spezifisch für Poly(A) ist. Dieses wurde durch die Deadenylierung einer polyadenylierten RNA untersucht.

3.1.4 Der CCR4/NOT-Komplex besitzt *in vitro* eine Poly(A)-spezifische 3'-Exonukleaseaktivität

Untersucht man den Abbau einer polyadenylierten RNA, deren vor dem Poly(A)-Schwanz liegende Sequenz radioaktiv markiert ist, lassen sich sowohl Aussagen über die Direktionalität des Abbaus als auch über die Spezifität des Enzyms treffen (2.2.21.2).

Radioaktiv markierte, *gecapte* und polyadenylierte β -Globin-RNA (2.2.20.2) wurde mit TAP-CCR4/NOT-Komplexen bzw. mit dem TAP-U1snRNP als Kontrolle inkubiert. Die Reaktionen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten abgestoppt, die Produkte auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch den PhosphorImager dargestellt.

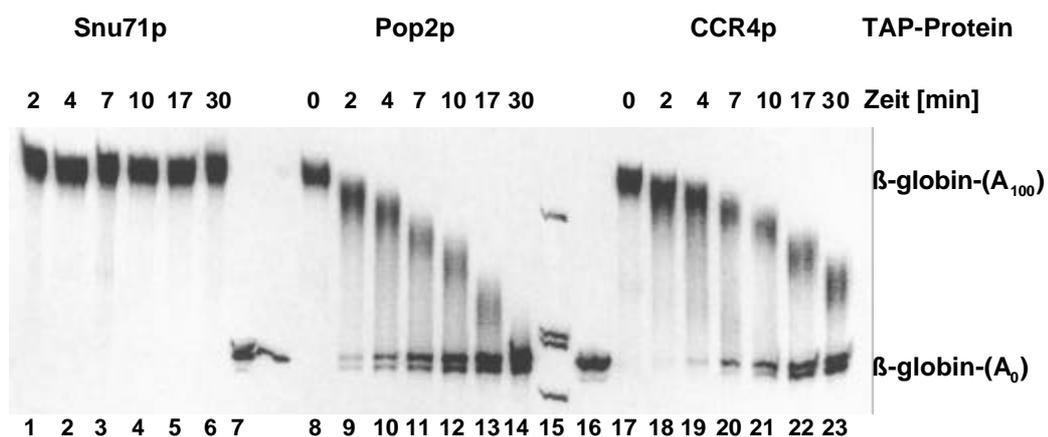


Abb. 3.1.4.1 Deadenylierung von β -Globin-RNA durch den TAP-Tag gereinigten CCR4/NOT-Komplex. Pro Zeitpunkt wurden je 20 fmol β -Globin-(A)₁₀₀-RNA mit 0,1 μ l der gereinigten Komplexe in spermidinhaltigem Puffer inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe des Enzyms und Transfer auf 30°C gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen und in Formamid-Ladepuffer gestoppt. In den Spuren 8 und 17 ist nicht inkubiertes Substrat, in den Spuren 7 und 16 nicht polyadenylierte β -Globin-RNA aufgetragen.

Das eingesetzte β -Globin-Transkript besaß eine Länge von 238 Nukleotiden, an die posttranskriptional ein ca. 100 Nukleotide langer Poly(A)-Schwanz synthetisiert wurde. Wurde diese RNA mit dem U1-Proteinkomplex inkubiert, fand über einen Zeitraum von 30 min kein Abbau statt. Die Menge an Substrat verringerte sich nicht, auch eine Produktbildung war nicht zu beobachten (Spuren 1-7). Bei der Inkubation mit dem CCR4/NOT-Komplex, der über ein TAP-Pop2p gereinigt wurde, erkennt man eine zeitabhängige Verkürzung des Substrates und eine Akkumulation der vollständig deadenylierten RNA. Nach 30 min war die RNA vollständig deadenyliert. Ein weiterer Abbau der RNA fand nicht statt (Spuren 9-15). Die Deadenylierung durch den über TAP-CCR4p-gereinigten Komplex verlief langsamer, jedoch mit denselben Intermediaten. Auch hier war nach Ende der Reaktionszeit ein Großteil der Poly(A)-Schwänze verkürzt und vollständig deadenylierte β -Globin-RNA akkumuliert.

Durch die Akkumulation vollständig deadenylierter RNA ist zu erkennen, dass der Abbau der RNA vom 3'-Ende erfolgt haben muss. Abbau vom 5'-Ende hätte eine Abnahme der Radioaktivität in den einzelnen Spuren zur Folge gehabt. Ebenso wird deutlich, dass der CCR4/NOT-Komplex klar Poly(A)-spezifisch ist. Wenn dies nicht der Fall wäre, würde man eine weitere Verkürzung der RNA über den Poly(A)-Anteil hinaus beobachten. Es ist nicht zu erkennen, ob die Reaktion prozessiv oder distributiv verlaufen ist. Auf der einen Seite werden die Substratmoleküle gleichmäßig verkürzt, was für eine distributive Reaktionsweise des Enzyms spricht. Für eine prozessive Reaktion spricht allerdings, dass bereits nach 2 min Reaktionszeit schon vollständig deadenylierte RNA zu sehen ist, obwohl der Großteil der RNA nur verkürzt wurde. Diese Frage lässt sich anhand dieses Experimentes nicht eindeutig beantworten.

3.1.5 Der CCR4/NOT-Komplex spaltet Poly(A) hydrolytisch zu 5'-AMP

Wenn Poly(A) vom 3'-Ende her abgebaut wird, kann dieses sowohl hydrolytisch als auch phosphorolytisch geschehen. Die Produkte der jeweiligen Spaltungen wären AMP bei der Hydrolyse bzw. ADP bei der Phosphorolyse, da das angreifende Phosphat am abgespaltenen AMP verbleiben würde. Durch Dünnschichtchromatographie lassen sich die Produkte der Spaltung voneinander trennen. Homogen markiertes Poly(A) wurde mit dem TAP-tag gereinigten CCR4/NOT-Komplex inkubiert und die Produkte der Spaltung dünn-schichtchromatographisch analysiert (2.2.21.1). Durch die Entwicklung in zwei unterschiedlichen Laufmitteln lassen sich sowohl AMP und ADP voneinander trennen (Abb. 3.1.5.1 A), als auch 5'-AMP von 3'-AMP (Abb. 3.1.5.1 B).

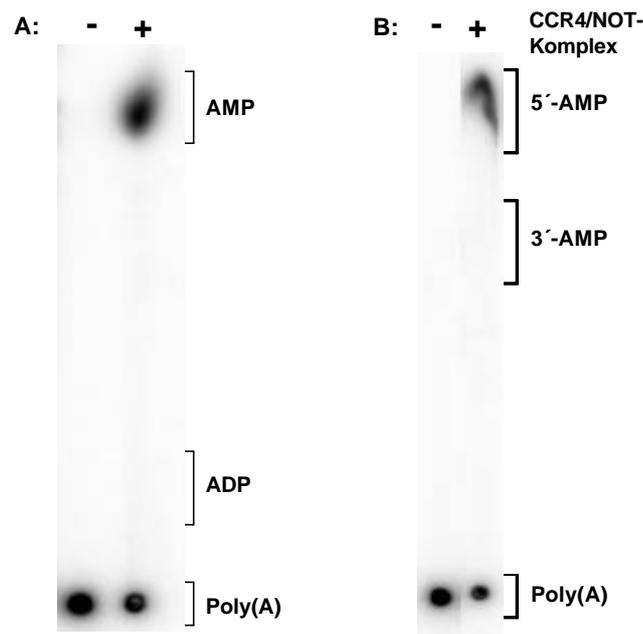


Abb. 3.1.5.1 Dünnschichtchromatographische Analyse der Produkte des Poly(A)-Abbaus. Intern markiertes Poly(A) wurde mit dem über TAP-Pop2p gereinigten CCR4/NOT-Komplex in spermidinhaltigem Puffer 60 min inkubiert und je 2 μ l der Reaktionen auf DC-Platten aufgetragen. Ebenfalls wurden in die gleiche Stelle nach dem Trocknen nichtradioaktive Standards aufgetragen, deren Position nach dem Lauf unter UV-Licht sichtbar gemacht und eingezeichnet werden konnte. Ihre Laufhöhe ist mit eckigen Klammern markiert. **A:** Trennung von AMP und ADP. Die DC-Platte wurde in 1 % Ameisensäure und 0,25 M LiCl entwickelt. **B:** Trennung von 5'-AMP und 3'-AMP. Die DC-Platte wurde zunächst in 1 N Essigsäure, danach in 0,3 M LiCl entwickelt. Die Platten wurden nach dem Lauf getrocknet und die Produkte autoradiographisch dargestellt.

In Abbildung A ist zu erkennen, dass die Spaltung des Poly(A) ausschließlich hydrolytisch geschieht. Produkt der Spaltung ist AMP. Wird die DC-Platte in einem anderen Medium entwickelt, erkennt man, dass ausschließlich 5'-AMP entsteht. Es entsteht bei der Spaltung immer ein freies 3'-Hydroxylende. Dieses ist wahrscheinlich Voraussetzung für eine effektive Deadenylierung durch den CCR4/NOT-Komplex.

3.1.6 Pab1p inhibiert die Deadenylierung durch den CCR4/NOT-Komplex

Als Poly(A)-bindendes Protein hat Pab1p Einfluss auf die Deadenylierungsrate verschiedener Deadenylasen. Während Pab1p den PAN2/PAN3-Komplex der Hefe *in vitro* stimuliert, wird das humane PARN durch PABPC gehemmt (Körner et al., 1998). In diesem Experiment sollte nun der Einfluss von rekombinantem Pab1p auf die Deadenylierung von polyadenylierter β -Globin-RNA (2.2.20.2) durch den CCR4/NOT-Komplex untersucht werden. Dazu wurde

die RNA mit dem CCR4/NOT-Komplex und steigenden Mengen Pab1p inkubiert (2.2.21.2). Die Produkte wurden in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch dargestellt.

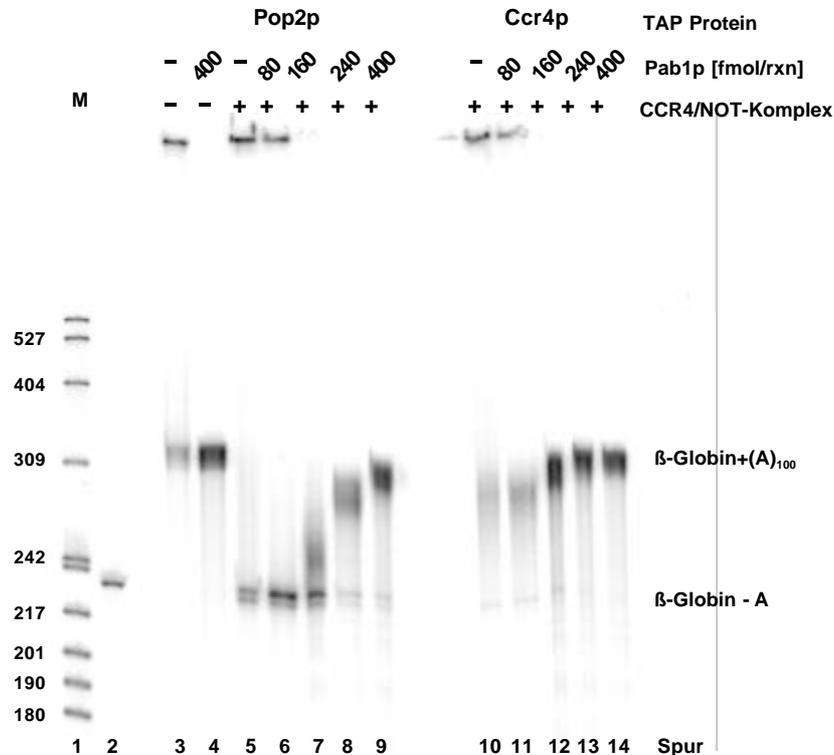


Abb. 3.1.6.1 Deadenylierung von β -Globin-RNA in Anwesenheit von Pab1p. Je 70 fmol polyadenylierte β -Globin-RNA wurde in Anwesenheit von Spermidin in einer 20 μ l Reaktion mit je 1 μ l CCR4/NOT-Komplex und den angegebenen Mengen Pab1p 20 min bei 30°C inkubiert. In Spur 2 ist nicht polyadenylierte β -Globin-RNA aufgetragen.

Bei einer Inkubation der polyadenylierten β -Globin-RNA mit Pab1p ohne die Deadenylase fand kein Abbau statt (Spur 4). In Abwesenheit von Pab1p wurde die gesamte RNA innerhalb der Reaktionszeit durch den CCR4/NOT-Komplex deadenyliert und vollständig deadenylierte RNA akkumuliert (Spur 5). In Gegenwart einer zur RNA äquimolaren Menge Pab1p wurde das Substrat ebenfalls vollständig deadenyliert (Spur 6). Bei Erhöhung der Pab1p Menge im Ansatz wurde die Deadenylierung verlangsamt. Bei einem dreifachen molaren Überschuss von Pab1p über das Substrat, was bei einer theoretischen „Bedeckungslänge“ von 30 Nukleotiden pro Pab1p Molekül eine vollständige „Bedeckung“ der Poly(A)-Schwänze bedeuten würde, verlief die Reaktion nur noch sehr langsam (Spur 8) und wurde bei einem 5-fachen Überschuss fast vollständig inhibiert (Spur 9). Die Inhibierung der Deadenylase durch Pab1p ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass der Poly(A)-Schwanz nach Bindung von Pab1p nicht mehr oder nur noch schlecht für die Nuklease zugänglich ist.

Bei dem Experiment mit dem TAP-Pop2p-Komplex war unter den gewählten Bedingungen die gesamte RNA bei Ende der Reaktion deadenyliert. Ein positiver Effekt von Pab1p wäre somit nicht zu sehen gewesen, da die RNA bereits ohne Pab1p vollständig deadenyliert war. Der positive Effekt wäre nur bei der Deadenylierung durch den TAP-Ccr4p-Komplex zu sehen gewesen, da hier die Deadenylierung der RNA bei Ende der Reaktion noch nicht vollständig war. Dieses war jedoch nicht der Fall (Vgl. Spur 10 und 11).

3.1.7 Punktmutationen in der Exonukleasedomäne von POP2 zeigen keinen Phänotyp

Wie in den vorhergehenden Kapiteln beschrieben hat das Fehlen von Pop2p eine starke Auswirkung auf die Wachstumsgeschwindigkeit der Hefezellen (3.1.1). Beobachtet wurde auch, dass die Poly(A)-Schwänze der mRNAs im Durchschnitt länger waren. Durch das Einführen von Punktmutationen in die konservierten Exo 1- und Exo 2-Motive der RNase D-Domäne von Pop2p sollte untersucht werden, ob der Verlust einer möglichen katalytischen Aktivität von Pop2p die oben beschriebenen Phänomene erklärt (2.2.12.2).

Der 1302 Nukleotide lange ORF von POP2 wurde von chromosomaler DNA amplifiziert und in einen *E. coli*-Expressionsvektor kloniert. Über gerichtete Mutagenese wurden im Exo-Motiv 1 die wahrscheinlich katalytisch aktiven Aminosäuren Serin 188 zu Alanin und Glutamat 190 zu Glutamin und im Exo-Motiv 2 Aspartat 310 zu Alanin ausgetauscht. Durch die „*Pop-in/pop-out*“-Methode wurde in diploiden Hefen ein wt-Allel durch den ORF mit der Einfachmutation (Exo 1 oder Exo 2) bzw. die Doppelmutteration (Exo 1 + Exo 2) ersetzt, die Hefen zur Sporulation gebracht und die erhaltenen haploiden Stämme auf ihr Wachstum und die Länge ihrer Poly(A)-Schwänze untersucht.

3.1.7.1 Punktmutationen in der Exodomäne beeinflussen das Sporenwachstum nicht

Der diploide Wildtypstamm W303 und die für POP2 heterozygoten Mutanten (Punktmutation oder Deletion) wurden zur Sporulation gebracht (2.2.9) und die Sporen einiger Asci vereinzelt (2.2.10). Nach Inkubation bei 30°C wurde die Größe der Kolonien verglichen. Zur Auswertung kamen nur Asci, aus denen alle vier Sporen gekeimt waren.

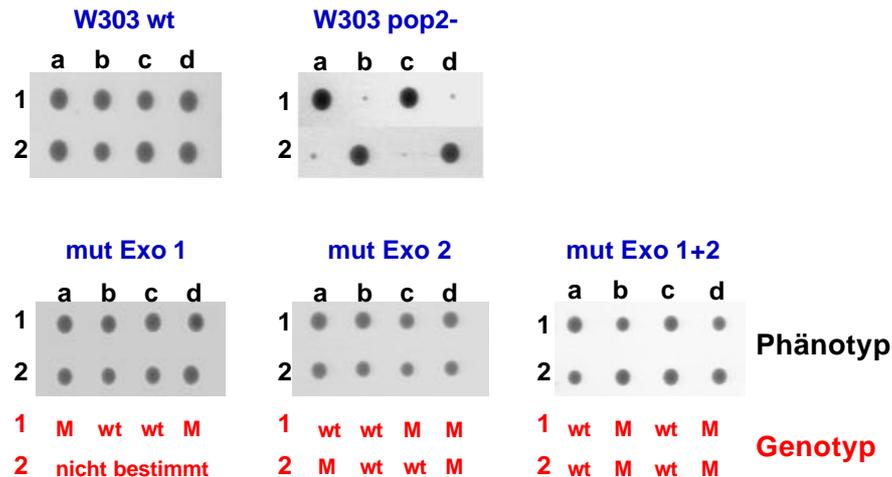


Abb. 3.1.7.1 Tetradenanalyse nach Sporulation der manipulierten diploiden Hefen. Die diploiden Hefestämme wurden zur Sporenbildung 3 Tage lang in 0,2 M KOAc geschüttelt. Die Asci wurden durch Zusatz von Zymolyase angedaut und die einzelnen Sporen mittels eines Mikromanipulators auf YPD-Agar separiert. Nach zweitägiger Inkubation der Platten bei 30°C wurden die gekeimten Sporen auf Wachstumsphänotypen untersucht. W303 wt: nicht manipulierter Stamm; W303 pop2-: Austausch der Exonukleasedomäne von POP2 durch eine Ura3-Kassette in einem Allel; untere Reihe: Die Hefen tragen in einem Allel Punktmutationen der katalytischen Aminosäuren in den angegebenen Exomotiven von POP2. Exo1: S188A, E190Q; Exo 2: D310A.

Die Sporen des Wildtypstamms hatten wie erwartet alle die gleiche Form und Größe. Bei dem *pop2*-Deletionsstamm gab es eine 2:2 Verteilung der Kolonien. Je 2 der Kolonien ähneln vom Phänotyp dem Wildtyp, während die beiden anderen ein stark vermindertes Wachstum zeigten und viel kleiner waren.

Bei den Punktmutanten gab es wie beim Wildtyp nur marginale Größenunterschiede zwischen den einzelnen Kolonien. Vom Phänotyp ließ sich nicht auf den Genotyp schließen. Dieser wurde durch Amplifikation des POP2-Gens und anschließenden Restriktionsverdau ermittelt. Dabei stellte es sich heraus, dass die Größenunterschiede nicht auf den POP2-Genotyp zurückzuführen waren. So sind zu Beispiel die Kolonien b und d der Tetrade delta exo1+2 b kleiner als die beiden anderen, aber a+b sind mutiert, c+d tragen das Wildtypgen.

Die Mutationen der vermeintlich katalytischen Aminosäuren haben somit keinen Einfluss auf das Wachstum der Hefen.

3.1.7.2 Punktmutationen in der Exodomäne haben keinen Effekt auf die durchschnittliche Poly(A)-Schwanzlänge

Nachdem bei der Tetradenanalyse kein Wachstumsphänotyp feststellbar war, wurde die *in vivo* Poly(A)-Schwanzlänge der mutierten Stämme mit der der Wildtypstämme verglichen. Die RNA der jetzt haploiden Stämme wurde isoliert (2.2.19.4.2). Gleiche Mengen der RNA

wurden mit 3'-dATP am 3'-Ende markiert, mit RNase A und RNase T1 verdaut und die verbleibenden Poly(A)-Schwänze auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt (2.2.22).

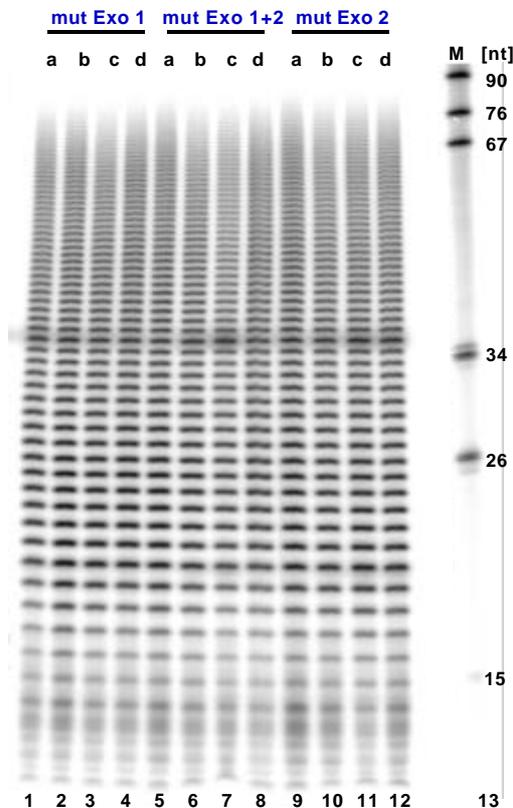


Abb. 3.1.7.2 Bestimmung der *in vivo* Poly(A)-Schwanzlänge der haploiden *pop2*-Mutationsstämme. Gleiche Mengen 3'-markierter Gesamt-RNA aus Stämmen mit dem POP2-wt-Allel bzw. mit den Punktmutationen im Exo-Motiv wurden in Gegenwart von 20 µg Hefe-RNA mit 25 U RNase T1 und 5 ng RNase A 30 min bei 30°C inkubiert. Die verbleibende RNA wurde nach dem Stoppen der Reaktion gefällt und auf einem 15 %-igen Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Spur 13 ist ein Standard aufgetragen. Die Länge ist in Nukleotiden [nt] angegeben. Die Sporen einer Tetrade sind mit a-d bezeichnet.

Die Mutationen der katalytischen Aminosäuren der Exonukleasedomäne von Pop2p hatten keinen Einfluss auf die Länge der Poly(A)-Schwänze *in vivo*. Auch in dieser Analyse war es nicht möglich, vom Phänotyp auf den POP2-Genotyp der Stämme zu schließen. Die Poly(A)-Schwänze aller untersuchten Stämme waren maximal 80 Nukleotide lang und auch in der Längenverteilung gab es keinen signifikanten Unterschied zwischen den Sporen einer Tetrade.

Somit ist wahrscheinlich, dass Pop2p nicht direkt an der Katalyse der Deadenylierung beteiligt ist, sondern vielmehr eine stabilisierende oder regulierende Rolle einnimmt.

3.2 Der CCR4/NOT-Komplex aus *Drosophila melanogaster*

Nachdem die Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms abgeschlossen war, konnten über Datenbankrecherchen zu den meisten Proteinen des *Saccharomyces cerevisiae*-CCR4/NOT-Komplexes Homologe in *Drosophila* gefunden werden. Der *S. cerevisiae*-CCR4/NOT-Komplex besteht aus 9 Proteinen: Pop2p, Ccr4p, Not1p-Not5p, Caf40p und Caf130p. Diesem *core*-Komplex sind unterschiedlich viele andere Proteine assoziiert, je nachdem welche Funktion er ausübt, und ob er im Kern oder im Cytoplasma lokalisiert ist (Chen et al., 2001b). Die Sequenzen für die CCR4/NOT-kodierenden cDNAs wurden der *Saccharomyces Genome Database* (www.yeastgenome.org) entnommen und in der *Drosophila*-Datenbank BDGP (www.fruitfly.org) gegen alle Leseraster der verfügbaren DNA Sequenzen unter Verwendung des Algorithmus *tBLASTn* (Altschul et al., 1990) abgeglichen.

Es konnten zu acht der neun *core*-Proteine des *S. cerevisiae*-CCR4/NOT-Komplexes Homologe gefunden werden. Nur zu Caf130p (YGR134W) wurde unter Standardbedingungen keine homologe Sequenz gefunden. Die Aminosäuresequenz der anderen Proteine ist unterschiedlich stark konserviert. Die Proteine unterscheiden sich in hohem Maße in ihrer Domänenstruktur. Dem *D. melanogaster* -CAF1-Protein (CG5684) fehlt im Gegensatz zu yPop2p (YGL094C) der sehr glutaminreiche N-Terminus. Dieser ist auch bei keinem bekannten CAF-Homologen aus anderen höheren Eukaryoten (Maus, Mensch) vorhanden. In einem Bereich, der bei dCAF1 die Aminosäuren 25-215 und bei Pop2p die Aminosäuren 160-355 umfasst, sind beide Proteine zu 45,3 % identisch. Dieser Bereich enthält die beiden ersten Exo-Motive der Exonuklease-Domäne vom RNaseD-Typ (dCAF: AS 48-59 und 170-179; yPop2p: AS 183-194 und 306-315). In dCAF1 sind die Exo-Motive stärker konserviert als in yPop2p. Alle Exo-Motive sind klar vorhanden, auch das dritte Exo-Motiv in den Aminosäuren 236-248, welches bei yPop2p so nicht zu finden ist.

CCR4 ist zwischen *S. cerevisiae* (YAL021C) und *D. melanogaster* (CG31137) in weiten Bereichen hoch konserviert. Außer dem N-Terminus, der dem CCR4-Protein aus *D. melanogaster* fehlt, sind sowohl der *Leucine-Rich-Repeat* am N-Terminus des Proteins (AS 39-336) als auch die Nukleasedomäne im C-Terminus (AS 359-538) mit 40 % bzw. 31,5 % Identität hoch konserviert zwischen dCCR4 und den entsprechenden Bereichen im yCcr4p (AS 336-649 bzw. 663-830).

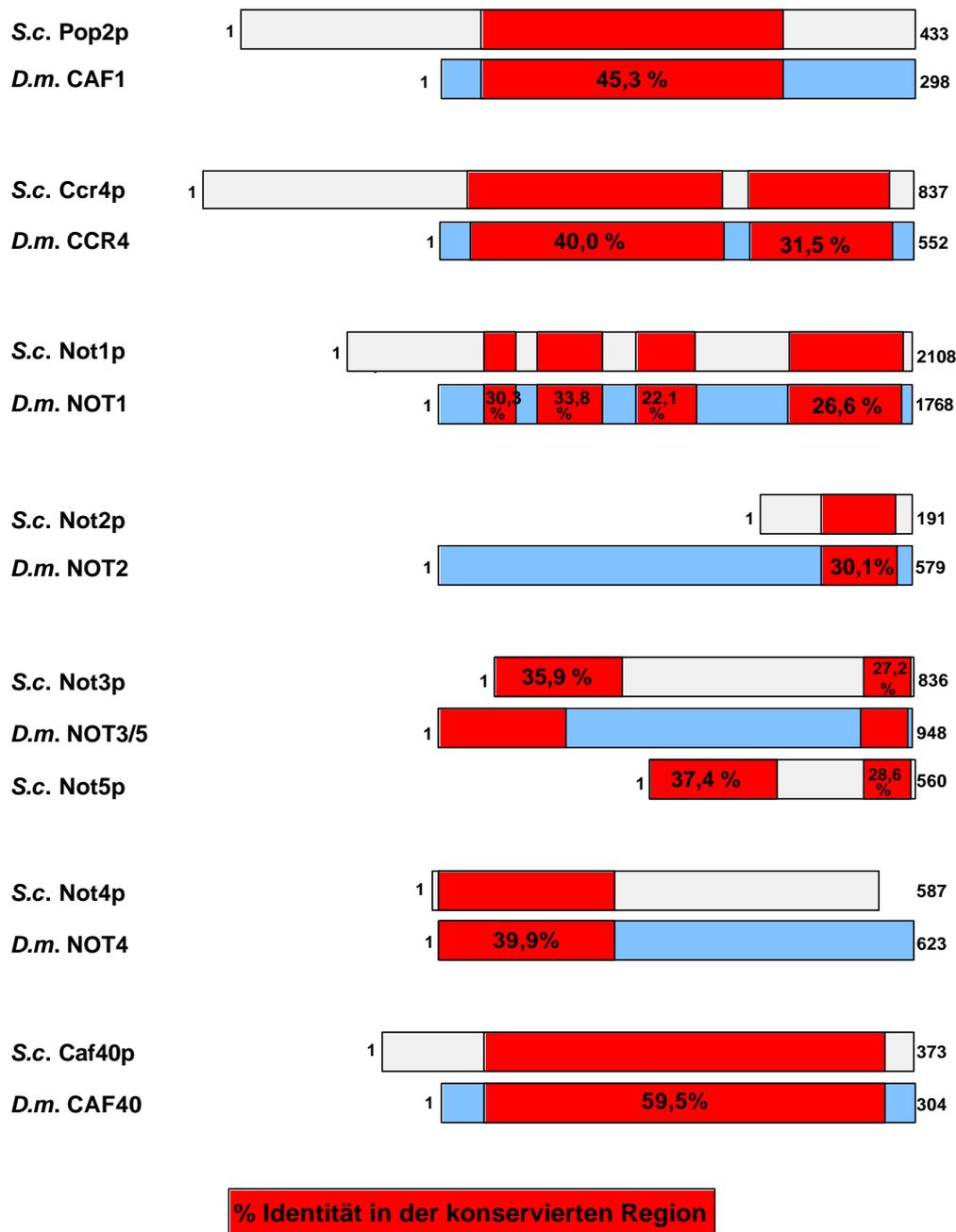


Abb. 3.1.7.1 Schematische Darstellung des Sequenzvergleiches für die homologen Proteine des CCR4/NOT-Komplexes aus *S. cerevisiae* und *D. melanogaster*. Hoch konservierte Bereiche sind rot unterlegt. Mit den Sequenzen der *S. cerevisiae*-Proteine wurde unter Verwendung der Standardeinstellungen des Algorithmus tblastn die BDGP-Genbank nach homologen Sequenzen in allen 6 Leserastern durchsucht. Der Abgleich der kompletten Proteinsequenzen erfolgte durch das Programm „Megalign“ (DNASTAR) unter Verwendung der Standardeinstellungen (*Gap Penalty* 10, *Gap Length Penalty* 10) des „clustal method“-Algorithmus.

NOT1 (CG1884) ist auch im *D. melanogaster* CCR4/NOT-Komplex das größte Protein. Es zeigt in nur vier Bereichen, die über die gesamte Sequenz verteilt liegen, Homologie zum Hefe Not1p (CDC39/YCR93W). Die Homologie zwischen beiden Proteinen ist mit einer

maximalen Identität von 33,8 % die schwächste in allen untersuchten Alignments. Ebenso groß ist der Unterschied zwischen den beiden NOT2-Proteinen. Während Not2p aus Hefe (CDC36/YDL165W) mit nur 191 Aminosäuren das kleinste Protein im Komplex ist, besteht das *D. melanogaster*-Protein (CG2138) aus 579 Aminosäuren. Der konservierte Bereich erstreckt sich über die Hälfte des Hefeproteins, der dem C-Terminus des dNOT2 entspricht. In dem Bereich zwischen den Aminosäuren 471-567 des dNOT2 und der Aminosäuren 97-179 des yNot2p liegt die Identität bei 30,1 %. *D. melanogaster* NOT2 wurde bereits als Protein Rga beschrieben (Frolov et al., 1998).

Datenbanksuchen mit yNot3p (YIL038C) und yNot5p (YPR072W) ergaben nur ein einziges homologes *D. melanogaster*-Protein (CG8426). Sowohl die N- als auch die C-Termini der Proteine von yNot3p, yNot5p und dNOT3/5 sind konserviert. yNot5p zeigt mit 37,4 % in den ersten 250 Aminosäuren und 28,6 % in den letzten 100 Aminosäuren des C-Terminus eine geringfügig höhere Identität zu dem *D. melanogaster* -Protein als yNot3p mit 35,9 % und 27,2 %. Dieser Grad der Identität entspricht auch in etwa dem, den die beiden Hefeproteine untereinander aufweisen. Die Länge der zwischen den konservierten Bereichen liegenden Sequenz ist bei allen drei Proteinen unterschiedlich.

Für yNot4p (=MOT2: YER038W) wurde das *D. melanogaster* Homolog CG31716 identifiziert, das in den Aminosäuren 6-228 des N-Terminus mit 39,9 % Identität eine hohe Homologie zum Hefeprotein (AS 26-268) aufweist. In diesem Bereich liegen eine RING-Domäne, die eine spezielle Form des Zinkfingermotivs enthält und ein *RNA recognition Motif* (RRM). Beide Motive sind auch in dNOT4 vorhanden. Außerhalb dieser hoch konservierten Bereiche gibt es keine erkennbaren Ähnlichkeiten.

yCaf40p (YNL288W) ist in *D. melanogaster* am höchsten konserviert (CG14213). Über die Aminosäuren 29-285, der bei dem etwas kürzeren *Drosophila*-Protein 80 % der Gesamtlänge ausmacht, sind die Proteine zu 59,5 % homolog. In *D. melanogaster* gibt es noch ein weiteres homologes Protein (CG9573) zu Caf40p. Beide *Drosophila*-Proteine zeigen auch eine hohe Homologie zu Rcd1.

3.2.1 Klonierung, Expression und Reinigung von dCAF1 und dCCR4

Nach der Identifizierung der homologen Proteine des CCR4/NOT-Komplexes in *D. melanogaster* wurden dCAF1 und dCCR4, die durch das Vorhandensein von Exonukleasedomänen als mögliche katalytische Untereinheiten des Komplexes in Frage kamen, kloniert. Die Proteine wurden in *E. coli* exprimiert, gereinigt und für die Produktion

von polyklonalen Antikörpern verwendet (2.2.13.2;2.2.13.3). Mit den gereinigten Proteinen wurden *in vitro* Deadenylierungsexperimente durchgeführt.

Der dCAF-ORF wurde mittels PCR aus einer mittels Oligo(dT)-Primern hergestellten cDNA-Genbank amplifiziert. Die Lage der Primer wurde durch Vergleich der bis dahin in der BDGP veröffentlichten ESTs mit genomischen Sequenzen und der „Annotated Genes“-Datenbank (www.fruitfly.org) gewählt. Das PCR-Produkt hatte, dem gesamten ORF entsprechend, eine Länge von 894 Nukleotiden. Es wurde in die *EcoRV*-Schnittstelle des *E. coli*-Expressionsvektors pRSET *in frame* mit einem N-terminalen His₆-tag kloniert. Die Klonierung wurde durch vollständige Sequenzierung der inserierten Sequenz überprüft. Das dCAF-Protein wurde in BL21 Codon(+)-Zellen überexprimiert. Nach Aufschluss der Zellen und Zentrifugation wurde das Protein unter nativen Bedingungen aus dem Überstand durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie, eine MonoQ-Säule und eine weitere Ni-NTA-Säule gereinigt. Abb. 3.2.1.1 zeigt die Analyse des Proteins nach der letzten Ni-NTA-Säule in einem 10 %-igen mit Coomassie gefärbten SDS-Polyacrylamidgel.

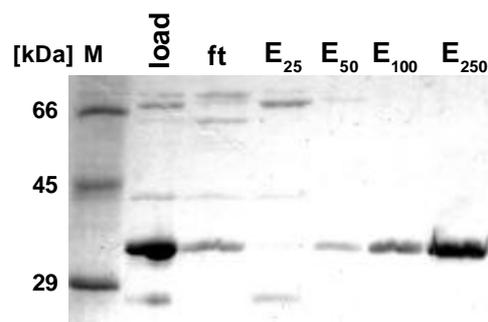


Abb. 3.2.1.1 Reinigung von rekombinantem dCAF1 durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Es wurden 5 μ l des *Loads* und je 10 μ l des Durchflusses (*ft*) und der Eluate der 2. Ni-NTA-Säule (25 mM -250 mM Imidazol) in einer SDS-PAGE aufgetrennt und das Gel mit Coomassie gefärbt.

Vor der letzten Ni-NTA-Säule waren noch viele kontaminierende Proteine vorhanden. Diese konnten jedoch fast vollständig im Durchfluss bzw. im ersten Waschschrift mit 25 mM Imidazol abgetrennt werden. In den 100 mM (*E*₁₀₀) und 250 mM Imidazol-Eluaten (*E*₂₅₀) ist ausschließlich dCAF in der Coomassiefärbung zu sehen. Das rekombinante Protein hat eine Größe von ca. 36 kDa, was der errechneten Größe entspricht. Die Proteinkonzentration der Eluate wurde über eine Mengenbestimmung nach Bradford ermittelt. Der Proteingehalt in der 100 mM Imidazol-Fraktion betrug 0,14 mg/ml, in der 250 mM Fraktion 0,4 mg/ml, was eine Gesamtausbeute von 2,7 mg gereinigtem dCAF1 aus 400 ml Bakterienkultur bedeutete. Das Protein der *E*₂₅₀-Fraktion wurde gegen 1 x PBS, 0,5 mM DTT dialysiert und zur Antikörperproduktion und für Aktivitätstest verwendet.

In den dCAF1-Eluaten der Ni-NTA-Säule konnte eine geringe deadenylierende Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Diese Aktivität ist jedoch wahrscheinlich auf eine kontaminierende *E. coli*-Nuklease zurückzuführen gewesen, da in Eluaten von Ni-NTA-Reinigungen aus Kontrolleexpressionen ebenfalls eine deadenylierende Aktivität zu finden war, auch wenn diese etwas geringer war als die der dCAF-Reinigung. Ein weiteres Indiz dafür, dass die Aktivität nicht auf dCAF1 zurückzuführen war, ist, dass die schwache Aktivität nicht mit der Hauptmenge an rekombinantem Protein nach Gelfiltration korrelierte (Daten nicht gezeigt). dCAF1 war in den Fraktionen des Ausschlussvolumens der Säule zu finden. Dieses lässt den Schluss zu, dass das Protein zwar löslich war, jedoch in großen Aggregaten von mehr als 600 kDa vorlag. Das bedeutet, dass dCAF1 durchaus Nukleaseaktivität besitzen könnte, wenn es unter Bedingungen exprimiert wird, die eine korrekte Faltung des Proteins ermöglichen. Die Expression in eukaryotischen Zellen wäre eine Möglichkeit, vielleicht aktives rekombinantes Protein zu produzieren.

Der dCCR4-ORF wurde ebenfalls aus der cDNA Genbank amplifiziert. Es wurden PCR-Produkte hergestellt, die am Startcodon oder am Methionincodon 161 begannen. Die Klonierung in den Expressionsvektor gelang nur mit dem verkürzten Fragment, welches das *Leucine-Rich-Repeat* im N-Terminus nicht besitzt. Nach Überexpression in *E. coli* lag das Protein in *inclusion bodies* vor und konnte nur unter denaturierenden Bedingungen gereinigt werden. Die *inclusion bodies* wurden in 8M Harnstoff aufgelöst und dCCR4?N aus dem Lysat durch eine einzige Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Für die Überprüfung der Reinheit und zur Mengenabschätzung wurden unterschiedliche Mengen des Eluates mit verschiedenen definierten Mengen BSA auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassie angefärbt (Abb. 3.2.1.2)

Ein Vergleich mit der BSA-Eichreihe ergab eine Proteinkonzentration von ca. 0,7 mg/ml und eine Gesamtausbeute von 1,4 mg pro 400 ml Bakterienkultur. Das Protein hatte im SDS-Gel eine Größe von ca. 45 kDa, was dem errechneten Molekulargewicht entspricht. Da das Protein nicht in nativer Form gereinigt werden konnte, wurden keine Aktivitätstests durchgeführt. Für die Antikörperproduktion wurde das Eluat der Ni-NTA-Säule zum Entfernen des Imidazols gegen einen Harnstoffpuffer dialysiert.

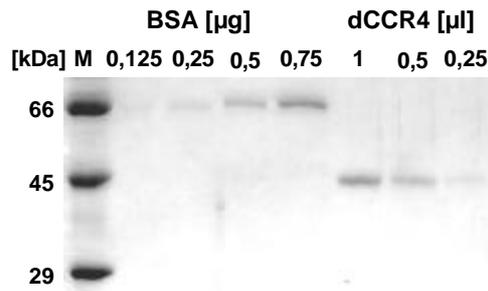


Abb. 3.2.1.2 SDS-PAGE zur Überprüfung der Reinheit und zur Konzentrationsbestimmung der dCCR4-Präparation. In den Spuren 2-5 ist BSA in den angegebenen Mengen, in den Spuren 6-8 unterschiedliche Mengen dCCR4-Eluat der denaturierenden Ni-NTA-Affinitätschromatographie aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

3.2.2 Cytoplasmatischer Extrakt aus S2-Zellen zeigt *in vitro* Deadenylase-Aktivität

Um zu untersuchen, ob eine deadenylierende Aktivität mit *D. melanogaster*-CAF1/CCR4 assoziiert ist, wurde zunächst getestet, ob ein cytoplasmatischer S20-Extrakt aus *Drosophila*-Schneider2-Zellen (S2-Zellen) deadenylierende Aktivität zeigt. Radioaktiv markierte, *gecapte* und polyadenylierte RNA wurde mit dem Extrakt inkubiert (2.2.21.2). Die Produkte der Reaktion wurden auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch über einen PhosphorImager dargestellt. Die Reaktion wurde unter für die humane 3'-Exonuklease PARN bereits beschriebenen Bedingungen durchgeführt (Körner and Wahle, 1997).

Abb. 3.2.2.1 zeigt, dass mit längerer Inkubationszeit die Substratmenge abnahm und nach 30 min Reaktionszeit vollständig deadenylierte L3prä-RNA zu detektieren war. Da der Nicht-Poly(A)-Anteil der RNA radioaktiv markiert war, lässt die Akkumulation einer RNA von ca. 70 Nukleotiden auf das Vorhandensein einer 3'-Exonukleaseaktivität schließen. Die Akkumulation der vollständig deadenylierten RNA war nicht ausgeprägt, was wahrscheinlich darauf zurückzuführen ist, dass neben Poly(A)-Nukleasen weitere RNA spaltende Enzyme im Extrakt vorhanden und unter den gewählten Reaktionsbedingungen aktiv waren.

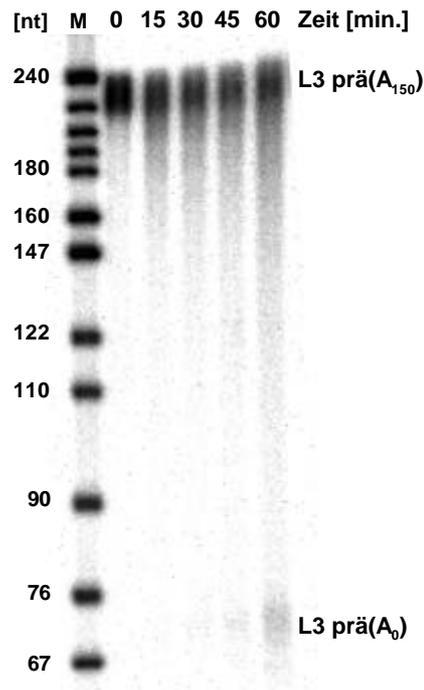


Abb. 3.2.2.1 Kinetik der Deadenylierung von L3prä(A₁₅₀) durch cytoplasmatischen S2-Extrakt. Pro Zeitpunkt wurden in einer 50 µl-Reaktion 20 nM polyadenylierte, radioaktiv markierte RNA mit 5 µg S2-CXT in Deadenylierungspuffer mit 0,5 mM MgAc und 100 mM KAc gemischt und bei 30°C für die angegebene Zeit inkubiert. Nachdem die Reaktionen durch Zugabe von Proteinase K und SDS gestoppt waren, wurde die RNA präzipitiert und auf einem 8 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Der Zeitpunkt t=0 zeigt das Substrat vor Extraktzugabe. Die Größe der Markerfragmente ist in Nukleotiden angegeben.

In weiteren Experimenten wurden die Reaktionsbedingungen so modifiziert, dass der Abbau von Poly(A) im Vergleich zum Abbau der RNA begünstigt wurde und so Deadenylierung besser verfolgt werden konnte. Eine Erhöhung der Salz- und Magnesiumkonzentration begünstigte die Deadenylierung (Daten nicht gezeigt). Die folgenden Experimente wurden in Anwesenheit von 150 mM KCl und 1 mM MgAc durchgeführt.

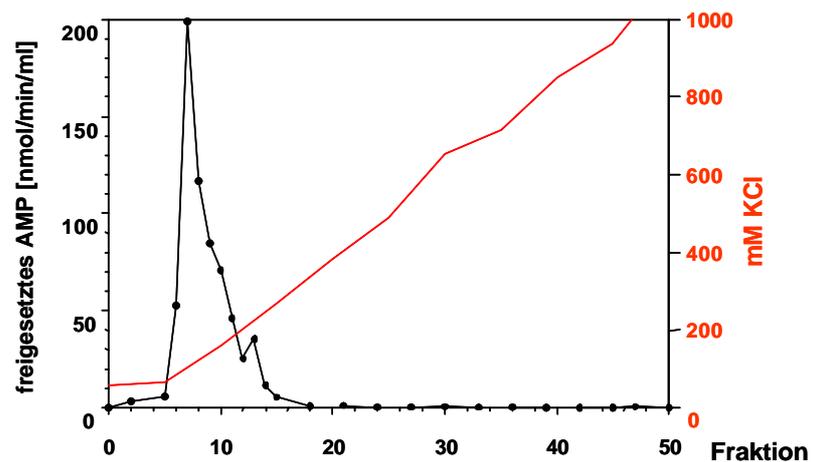
3.3 Fraktionierung von S2-CXT

3.3.1 Eine deadenylierende Aktivität korreliert mit dCAF1- und dCCR4-haltigen Fraktionen einer DEAE-Säule

Die Fraktionierung des cytoplasmatischen S2-Extraktes über eine DEAE-Säule sollte Aufschluss darüber geben, ob die gemessene deadenylierende Aktivität mit dem CAF/CCR4-Komplex assoziiert ist.

S20-cytoplasmatischer Extrakt aus $1,2 \times 10^{10}$ Zellen (400 mg Protein) (2.2.14.2) wurde auf eine vorbereitete 40 ml DEAE-Sepharose-Säule gegeben (2.2.14.3). Die an die Säule gebundenen Proteine wurden über einen Salzgradienten eluiert. Die Fraktionen wurden in einem TCA-Präzipitationsexperiment auf deadenylierende Aktivität untersucht. In einem *Western blot* (2.2.16) wurden die aktiven Fraktionen auf das Vorhandensein von dCAF1 und dCCR4 überprüft.

A:



B:

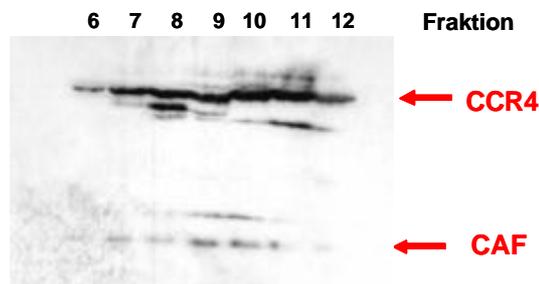


Abb. 3.3.1.1 **A:** Aktivitätsprofil der Fraktionierung von S2-CXT über eine DEAE-Sepharose. In 50 μ l-Reaktionen wurden 1 μ g Poly(A) mit je 1 μ l der Fraktion gemischt, und 10 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch eine TCA-Fällung gestoppt. Die im Überstand enthaltene Radioaktivität wurde gemessen und die Menge an entstandenem AMP berechnet. Die Aktivität der Fraktionen ist auf das Gesamtvolumen bezogen und zusammen mit der KCl-Konzentrationen der untersuchten Fraktionen dargestellt. **B:** *Western blot* gegen dCAF1 und dCCR4 über die aktiven Fraktionen der DEAE-Sepharose. Je 15 μ l der Fraktionen wurden in einer 10% SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und zunächst mit dem CCR4-Antiserum und danach mit affinitätsgereinigtem CAF1-Antikörper inkubiert. Die Lage der Proteine ist mit Pfeilen gekennzeichnet.

In Tabelle 2 ist die Summe der in den Fraktionen erhaltenen Aktivität gezeigt. Der Vergleich mit dem Aktivitätsprofil der DEAE-Säule zeigt, dass rund ein Viertel der Aktivität nicht an die DEAE-Säule gebunden hatte. Sie fand sich im Durchfluss wieder. Die restliche Aktivität eluierte schon bei niedrigen Salzkonzentrationen von etwa 30-150 mM KCl in den Fraktionen 6 bis 14. Die Hauptaktivität befand sich in Fraktion 7.

Tabelle 2 Deadenylierungsaktivität der einzelnen Fraktionen der DEAE-Sepharose gemessen im TCA-Fällungsexperiment. Extrakt: S2-CXT; Durchfluss und Waschfraktionen; Gradientenfraktionen: Summe der Aktivitäten, die in den Fraktionen 1 bis 50 gemessen wurden.

Fraktion	Aktivität [nmol AMP/min]
Extrakt	4480
Durchfluss- und Waschfraktionen	1030
Gradientenfraktionen	3296

In den Fraktionen, in denen eine deadenylierende Aktivität nachzuweisen war, konnten auch dCCR4 und dCAF1 im *Western blot* detektiert werden. dCAF1 konnte im Extrakt, im Durchfluss (Daten nicht gezeigt) sowie in den Fraktionen 7-15 mit einem Maximum in den Fraktionen 10 bis 13 detektiert werden. Im Extrakt und Durchfluss (Daten nicht gezeigt) sowie in den Fraktionen 6 bis 15 konnte auch dCCR4 nachgewiesen werden, mit dem stärksten Signal in den Fraktionen 9 bis 11. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass beide Proteine auch in *D. melanogaster* Teile eines aktiven Proteinkomplexes sind.

Das Aktivitätsmaximum und das Proteinmaximum von dCAF1 und dCCR4 waren in den Fraktionen der DEAE-Säule nicht deckungsgleich. Die CAF/CCR4 Proteinmaxima waren gegenüber dem Aktivitätsmaximum um 3 Fraktionen verschoben.

Das könnte darauf hindeuten, dass die beobachtete Aktivität nicht dem CAF/CCR4-Komplex zugeordnet werden kann, oder dass in den späteren Fraktionen ein Inhibitor von der Säule eluiert, der das Aktivitätsmaximum überlagert.

3.3.2 Das Aktivitätsmaximum der DEAE-Säule wird von einem Inhibitor überlagert

Um das Phänomen der Verschiebung des Aktivitätsmaximums relativ zum CAF/CCR-Proteinmaximum der DEAE-Säule zu erklären, wurde untersucht, ob die Fraktionen 9-15 die deadenylierende Aktivität der Fraktion 7 (Aktivitätsmaximum) inhibieren. Fraktion 7 wurde mit den zu testenden Fraktionen zu gleichen Teilen gemischt und

die deadenylierende Aktivität des resultierenden Gemisches im TCA-Fällungsexperiment mit homogen markiertem Poly(A) bestimmt (2.2.21.1). Die erwarteten Aktivitäten, die aus der Addition der Einzelaktivitäten resultieren, wurden mit den tatsächlich gemessenen Aktivitäten der Kombinationen verglichen.

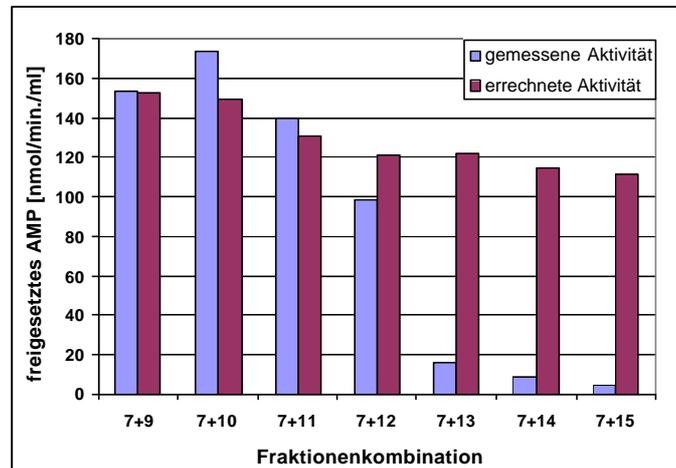


Abb. 3.3.2.1 Deadenylierungsexperiment zur Untersuchung des Einflusses späterer Fraktionen auf die Aktivität der Fraktion 7 der DEAE-Sepharose mit Poly(A). In einer 50 μ l-Reaktion wurden 1 μ g Poly(A) mit 1 μ l Fraktion 7 und 1 μ l der angegebenen Fraktionen in Standard-Deadenylierungspuffer 5 min bei 30°C inkubiert. Nach TCA-Fällung wurde die Radioaktivität im Überstand gemessen und die Menge an freigesetztem AMP bestimmt. Die theoretische, errechnete Aktivität, die sich aus der Summe der Einzelaktivitäten der Fraktionen ergibt, wurde der tatsächlich gemessenen Aktivität gegenübergestellt.

Während die gemessene Aktivität der Kombinationen 7+9, 7+10 und 7+11, wie in der Abb. 3.3.2.1 gezeigt, nahezu einer Addition der Einzelaktivitäten entsprach, wurde die deadenylierende Aktivität der Fraktion 7 durch den Zusatz der Fraktionen 13 bis 15 nahezu vollständig gehemmt. Die gemessene Aktivität war in der Kombination von Fraktion 7 und 14 um den Faktor 13, in der Kombination von Fraktion 7 und 15 sogar um den Faktor 25 geringer als die errechnete Aktivität. Sie entsprach nur noch der zuvor einzeln in den Fraktionen 13-15 gemessenen Aktivität.

Es ist daher wahrscheinlich, dass die gemessene Deadenylierungsaktivität in den Fraktionen der DEAE-Säule unterschätzt wird, da geringe Mengen des Inhibitors ebenfalls in diesen Fraktionen vorhanden sind. Die Verschiebung von CAF/CCR4-Proteinmaximum und Aktivitätsmaximum wäre so zu erklären.

Die nachgewiesene inhibitorische Aktivität unterstützt also die Vermutung, dass die deadenylierende Aktivität mit dem CAF/CCR4-Komplex assoziiert ist.

3.3.3 CAF1 und CCR4 eluieren in einem Komplex während der Gelfiltration

Um zu untersuchen, ob CAF1 und CCR4 wirklich miteinander assoziiert in einem Komplex vorliegen und nicht nur durch ähnliche Eigenschaften gemeinsam von der DEAE-Säule eluieren, wurde die Fraktion 7 der DEAE-Säule, die das Aktivitätsmaximum darstellt, auf eine 30 ml Superdex 200 Gelfiltrationssäule aufgetragen (2.2.14.4). Hier werden Proteine durch Filtration in Abhängigkeit ihrer Größe aufgetrennt. Sie sollten im Idealfall nicht mit der Säulenmatrix interagieren.

200 μ l der DEAE-Fraktion 7 (3.3.1) wurden ohne Konzentrierung und Pufferwechsel geladen. Nach Durchfluss von 5 ml Puffer wurde mit dem Sammeln von 0,7 ml großen Fraktionen begonnen. Die deadenylierende Aktivität wurde in einem TCA-Fällungsexperiment mit homogen markiertem Poly(A) als Substrat bestimmt (2.2.21.1). Für die *Western blot*-Analyse (2.2.16) wurde ein Teil der Fraktionen mit TCA gefällt und auf Vorhandensein von dCCR4 und dCAF1 untersucht.

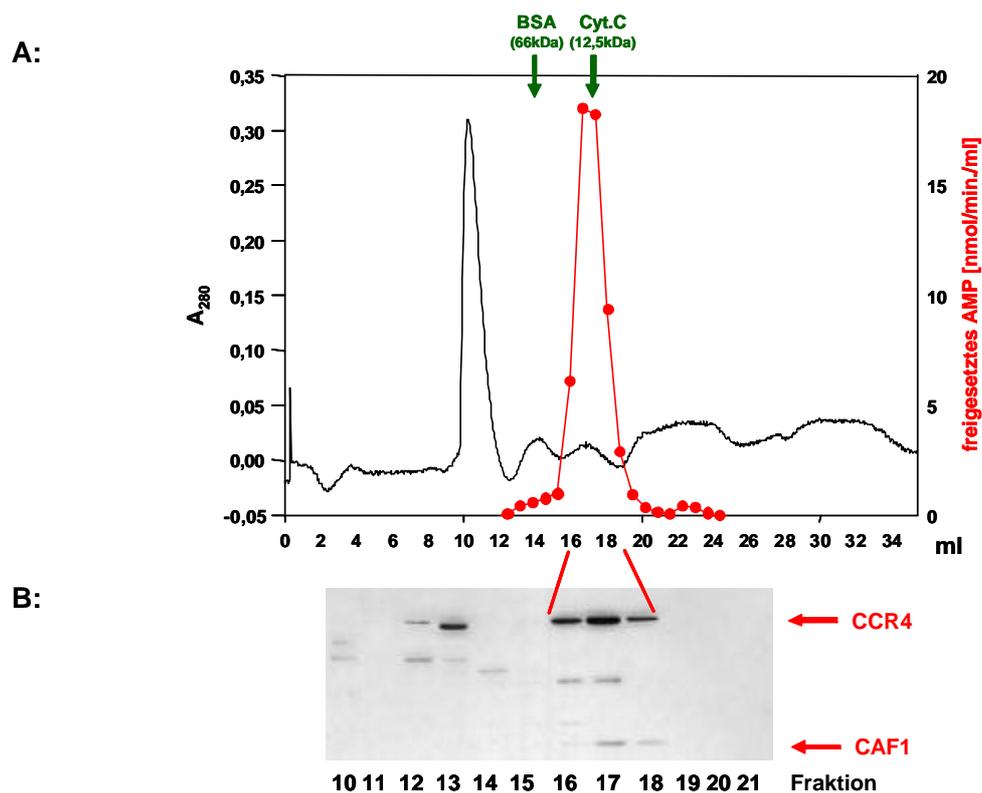


Abb. 3.3.3.1 **A:** Aktivitätsprofil und Profil der A_{280} der Gelfiltrationssäule. Je 10 μ l der Fraktionen 6-29 der Gelfiltrationssäule wurden in einer 50 μ l Reaktion in Standard-Deadenylierungspuffer mit 1 μ g Poly(A) 20 min bei 30°C inkubiert. Nach TCA-Fällung wurde die Radioaktivität im Überstand gemessen und die Menge an freigesetztem AMP bestimmt. **B:** *Western blot* gegen dCAF1 und dCCR4. Je 300 μ l der angegebenen Fraktionen wurden mit TCA gefällt. Die Proteine wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte gleichzeitig mit beiden Antikörpern. Die Lage der Proteine im Blot ist durch Pfeile gekennzeichnet.

Die Superdex HS 200-Säule hat eine Ausschlussgröße von ca. 600 kDa. Alle Proteine oder Proteinkomplexe, die größer sind, können auf dieser Säule nicht weiter getrennt werden und sind im Ausschlussvolumen der Säule nach ca. 10 ml zu finden. Die deadenylierende Aktivität konnte in den Fraktionen 11-20, die einem Durchlauf zwischen 14 ml und 20 ml entsprachen, gemessen werden. Die höchste Aktivität war in den Fraktionen 16 und 17 nachweisbar. In diesen Fraktionen wurde auch dCAF1 und dCCR4 im *Western blot* detektiert. Die *Western blot*-Signale waren sehr schwach, obwohl die Proteine durch TCA-Fällung konzentriert wurden. Auch die Aktivitätsausbeute betrug nur etwa 50 %. Dies könnte daran gelegen haben, dass die Proteine durch die Verdünnung an Aktivität verloren haben. Eine Interaktion mit dem Säulenmaterial würde ebenfalls die späte Elution von dCAF1 und dCCR4 erklären. In einem Kontrolllauf eluierte BSA (66 kDa) nach ca. 14 ml und das 12,5 kDa große Cytochrom C nach 17-18 ml. Die Proteine in den entsprechenden Fraktionen waren, wie im *Western blot* durch unspezifische Hybridisierung des CAF-Antikörpers zu sehen, eindeutig größer.

Aufgrund der Co-Elution von dCCR4 und dCAF1 von dieser Säule ist es aber wahrscheinlich, dass beide Proteine im cytoplasmatischen Extrakt assoziiert vorliegen und die gemessene deadenylierende Aktivität auf diesen Komplex zurückzuführen ist.

3.3.4 CAF1- und CCR4-Antikörper depletieren die deadenylierende Aktivität

In vorangehenden Experimenten konnte gezeigt werden, dass die deadenylierende Aktivität während der Fraktionierung über eine DEAE-Sepharose wie auch in der anschließenden Gelfiltration mit dCAF1 und dCCR4 assoziiert war. Wenn diese Proteine oder der mit ihnen assoziierte Komplex an der Katalyse der Reaktion beteiligt sind, sollten Antikörper gegen dCCR4 und dCAF1 die Aktivität depletieren.

Die Antikörper wurden aus dem Immuns serum an Protein-A-Sepharose gekoppelt und mit der Fraktion 7 der DEAE-Sepharose inkubiert (2.2.18). Nach zweimaliger Inkubation mit den Antikörpern wurde der Proteingehalt der depletierten Fraktionen bestimmt und deren deadenylierende Aktivität im TCA-Fällungsexperiment mit homogen markiertem Poly(A) getestet (2.2.21.1). Als Negativkontrolle wurde in einem Experiment CCR4-Präimmuns serum, in einem anderen Immuns serum gegen humanes PARN eingesetzt. Im letzteren Experiment wurde auch das Pellet der Immunpräzipitation auf deadenylierende Aktivität untersucht.

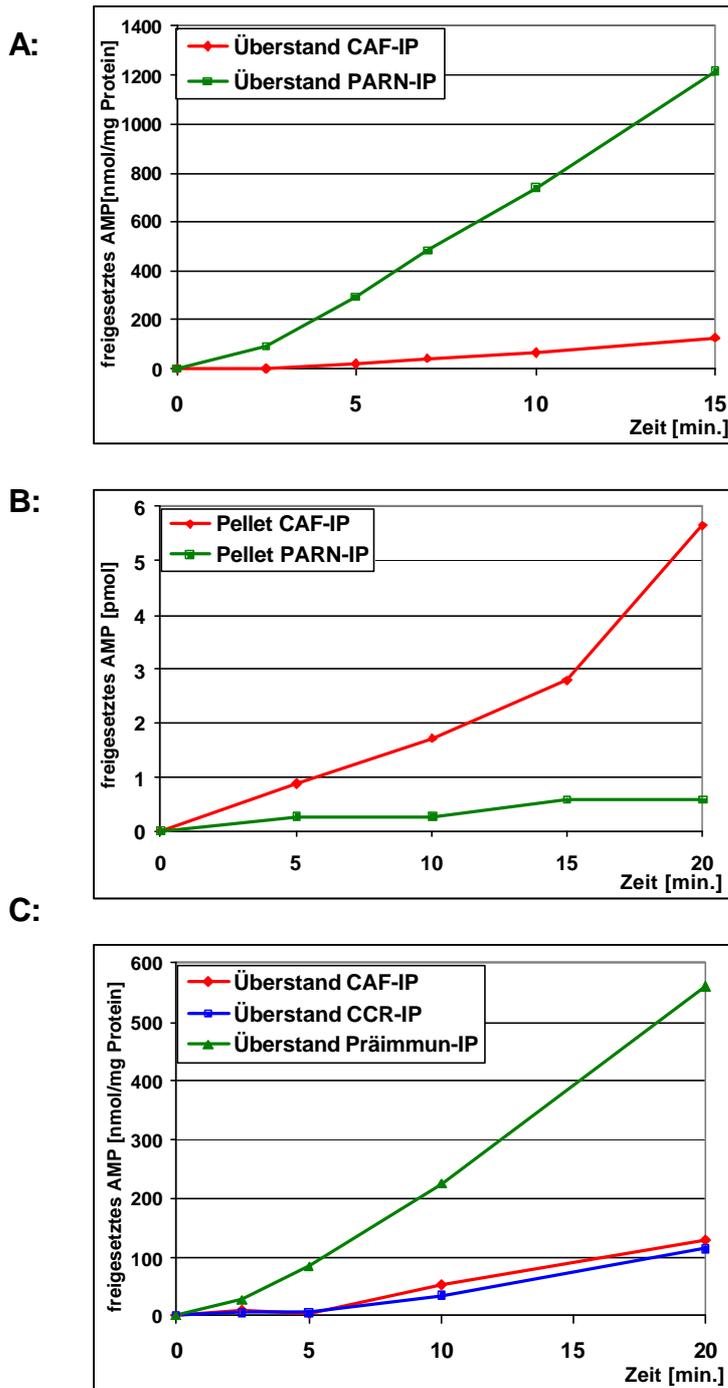


Abb. 3.3.4.1 Analyse der Aktivität der Fraktion 7 der DEAE-Säule nach Immundepletion von dCAF1 und dCCR4. **A:** Aktivität im Überstand der zweiten Immundepletion mit CAF- und PARN- Antikörpern. Je 5 μ l des Überstandes der zweiten Immundepletion mit CAF und PARN Antikörpern wurden in einem 200 μ l-Ansatz mit 80 ng/ μ l Poly(A) in Deadenylierungspuffer gemischt und bei 30°C inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden je 30 μ l entnommen. Die Reaktion wurde mit TCA abgestoppt und gefällt. Nach der TCA-Fällung wurde die Radioaktivität im Überstand gemessen und die Menge an freigesetztem AMP bestimmt. Die ermittelten Werte wurden auf 1 mg eingesetztes Protein normiert. **B:** Aktivität der Pellets der Immundepletion. Das Pellet der ersten Immundepletion wurde mit Deadenylierungspuffer zweimal gewaschen und anschließend in 200 μ l Puffer resuspendiert. Von der Suspension wurden je 5 μ l in einem 180 μ l Reaktionsansatz analog des unter A: beschriebenen Experimentes eingesetzt. Die Menge an freigesetztem AMP ist gegen die Reaktionszeit aufgetragen. **C:** Aktivität im Überstand der zweiten Immundepletion mit CAF- und CCR4-Antikörpern und dem CCR4-Präimmunsereum. Das Experiment wurde wie in A: beschrieben durchgeführt.

In der Abb. 3.3.4.1.A: ist die Menge an freigesetztem AMP/mg Protein gegen die Reaktionszeit aufgetragen. Wie zu erkennen, war in dem Überstand der Immunpräzipitation, die mit PARN-spezifischen Antikörpern durchgeführt wurde, eine deadenylierende Aktivität messbar. Im Überstand der Immunpräzipitation mit dem CAF-spezifischen Antikörper konnte nur eine 10-fach geringere Aktivität nachgewiesen werden. Wurden hingegen die Präzipitate der Immunpräzipitationen untersucht, zeigte sich das umgekehrte Bild (Abb. 3.3.4.1.B:). Während im Präzipitat mit den CAF-spezifischen Antikörpern eine geringe Aktivität nachgewiesen werden konnte, zeigte das durch PARN-spezifische Antikörper erhaltene Präzipitat keine Aktivität, die signifikant über dem Hintergrund lag. Wie in Abb. 3.3.4.1.C: zu erkennen, ließ sich die deadenylierende Aktivität nicht nur mit CAF-spezifischen Antikörpern aus der Fraktion 7 der DEAE-Säule depletieren, sondern auch mit den CCR4-spezifischen Antikörpern. Beide Depletionen waren in etwa gleich effektiv. Der Unterschied in der verbleibenden Aktivität der Überstände im Vergleich zur Kontrolldepletion mit dem Präimmenserum war auch in diesem Experiment deutlich. Der Unterschied zwischen der Aktivität der CAF/CCR4-Depletionen und der Kontrolldepletion war jedoch schwächer als in dem vorherigen Experiment (A: Faktor 10, C: Faktor 5). Dieses ist darauf zurückzuführen, dass die Fraktion 7 schon erheblich an Aktivität verloren hatte (Vergleich Menge an freigesetztem AMP Abb. A und C).

Durch die Immunpräzipitation konnte gezeigt werden, dass eine deadenylierende Aktivität in cytoplasmatischem S2-Extrakt sowohl mit dCAF1 als auch mit dCCR4 assoziiert ist. Ob die Proteine direkt an der Katalyse der Reaktion beteiligt sind und welches der beiden Proteine diese ausführt, wurde bisher nicht untersucht.

3.3.5 Der CAF/CCR4-Komplex ist nicht die einzige in S2-Zellen aktive 3'-Exonuklease

Es wurde nochmals cytoplasmatischer Extrakt aus einer S2-Suspensionskultur präpariert (2.2.14.2) und über eine DEAE-Sepharose fraktioniert (2.2.14.3). Um eine bessere Auftrennung zu erhalten, wurde bei dieser Fraktionierung ein flacherer Gradient von 20-500 mM KCl für die Elution gewählt. Die erhaltenen Fraktionen wurden im TCA-Fällungsexperiment mit homogen markiertem Poly(A) auf Deadenylaseaktivität untersucht. Die Fraktionen 1 bis 30 wurden außerdem in einem *Western blot* auf dCAF1 und dCCR4 untersucht.

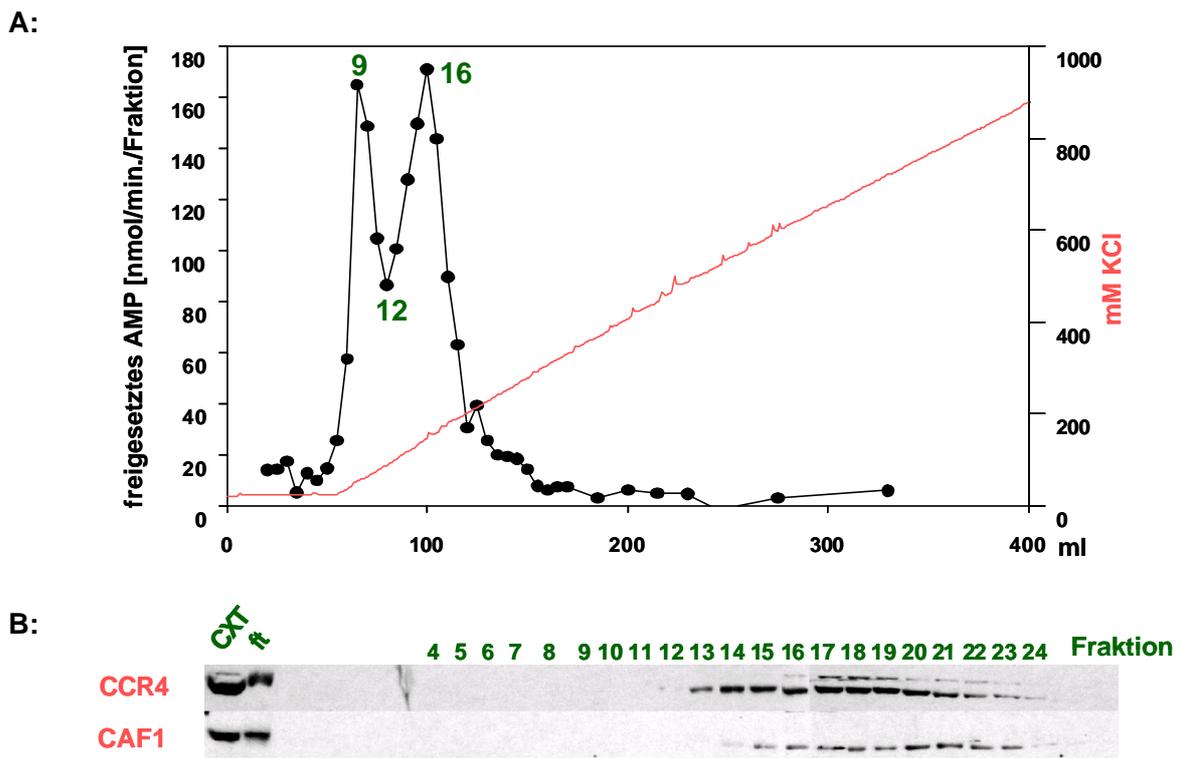


Abb. 3.3.5.1.A: Aktivitätsprofil der Fraktionierung von S2-CXT über eine DEAE-Sepharose. In 50 μ l-Reaktionen wurden 1 μ g Poly(A) mit je 1 μ l der zu testenden Fraktion gemischt, bei 30°C inkubiert und nach 10 min durch eine TCA-Fällung gestoppt. Die Radioaktivität im Überstand wurde gemessen und die Menge an entstandenem AMP berechnet. Die Aktivität der Fraktionen 9, 12, und 16 ist im Diagramm gekennzeichnet **B**: Western blot gegen dCAF1 und dCCR4 über die aktiven Fraktionen der DEAE-Sepharose. Je 15 μ l der Fraktionen wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit CCR4-Antiserum oder mit affinitätsgereinigtem CAF1-Antikörper inkubiert.

Im Gegensatz zur ersten Fraktionierung, in der ein Aktivitätsmaximum zu verzeichnen war, waren bei dieser Fraktionierung zwei Aktivitätsmaxima in den Fraktionen 9 und 16 nachzuweisen. Sie eluierten bei ca. 65 mM bzw. ca. 157 mM KCl. Die Aktivitätsmaxima waren unter den gegebenen Reaktionsbedingungen nahezu identisch. Auffällig bei dieser Fraktionierung war, dass sich ein Großteil der Aktivität im Durchfluss der Säule befand.

Tabelle 3 Deadenylierungsaktivität der einzelnen Fraktionen der DEAE-Sepharose gemessen im TCA-Fällungsexperiment. Extrakt: S2-CXT; Durchfluss; Gradientenfraktionen: Summe der Aktivitäten, die in den Fraktionen 1 bis 40 gemessen wurden.

Fraktion	Aktivität [nmol AMP/min]
Extrakt	430,7
Durchfluss	546,6
Gradientenfraktionen	1738

Im Vergleich zum Ausgangsmaterial ist die Aktivität die im Durchfluss und den Fraktionen des Gradienten gesammelt werden konnte, 5,3-fach höher als die Aktivität, die geladen wurde (Tabelle 3).

Betrachtet man den *Western blot*, stellt man fest, dass nur die später eluierende Aktivität mit einem CAF- und CCR4-Signal zusammenfiel. Die zuerst eluierte Aktivität war nicht mit CAF oder CCR4 assoziiert. Die hohe Aktivität im Durchfluss ist vielleicht mit dem großen Anteil an nicht-bindendem CAF1- und CCR4-Protein zu erklären. Beim Vergleich der Intensitäten der *Western blot*-Signale von CAF und CCR4 in den Fraktionen fällt auf, dass beide Proteine zwar in den gleichen Fraktionen enthalten waren, die jeweils größten Proteinkonzentrationen jedoch leicht gegeneinander verschoben waren. Dieses war bei der Elution mit einem doppelt so steilen Salzgradienten nicht der Fall (Vgl. 3.3.1) Die CAF/CCR4-assozierte Aktivität ging eher mit dem CCR4- als mit dem CAF-Signal. (Siehe auch 3.5.2)

3.4 RNA-Interferenz-Experimente

3.4.1 RNA-Interferenz (RNAi) gegen CAF1 und CCR4 beeinflusst die Menge an mRNA und an Protein

Durch RNA-Interferenz (RNAi) werden spezifische mRNAs *in vivo* degradiert, wodurch die Synthese der von ihnen codierten Proteine reduziert wird. So kann die Auswirkung einer Reduktion eines Proteins direkt, ohne Manipulation des Genoms, untersucht werden. Ein Nachteil der Methode ist, dass die Proteinexpression nicht vollständig unterbunden wird und somit die Ergebnisse nicht mit einem genetischen *knock-out* vergleichbar sind. Doppelsträngige RNA, die zu der des auszuschaltenden Proteins homolog ist, wird in die Zelle gebracht. Dort wird sie zu 21 nt-langen Fragmenten gespalten. Diese hybridisieren mit der zellulären mRNA, die darauf von spezifischen RNasen gespalten wird (Elbashir et al., 2001). Für ein RNAi-Experiment in S2-Zellen kann die doppelsträngige RNA (dsRNA) direkt in das Kulturmedium gegeben werden. Es ist keine Transfektion notwendig, da die dsRNA auf einem nicht bekannten Weg von den Zellen aufgenommen wird. Die Effizienz des *knock-down* ist meist sehr hoch, aber unterschiedlich für verschiedene Ziel-RNAs (Clemens et al., 2000).

Ein Teil des CAF1- bzw. CCR4-ORFs wurde mit Primern amplifiziert, die die Sequenz des T7-Promotors am 5'-Ende trugen (2.2.19.5). Nach Transkription der PCR-Produkte (2.2.19.8) wurden die dabei entstandenen RNA-Stränge hybridisiert und die dsRNAs, die ca. 700 bp der codierenden Sequenz von dCAF1 bzw. dCCR4 entsprachen, in das Kulturmedium der S2-

Zellen gegeben (2.2.15). Nach vier Tagen wurde die Zellzahl bestimmt, die Zellen wurden geerntet und entweder zur Präparation eines Zellextraktes (2.2.14.1) oder zur Präparation von Gesamt-RNA verwendet (2.2.19.4.1). Der RNAi-Effekt wurde auf Proteinebene durch einen *Western blot* gegen CAF1 bzw. CCR4 (2.2.16) und auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR (2.2.19.7) überprüft. Zum Vergleich dienten Zellen, die nicht mit dsRNA behandelt worden sind.

Phänotypisch waren die behandelten Zellen unter dem Mikroskop nicht von den unbehandelten Zellen zu unterscheiden. Sie waren normal geformt, und der Anteil der toten Zellen war nicht erhöht. RNAi gegen dCAF1 wirkte sich jedoch negativ auf die Zellteilungsrate aus. Im Durchschnitt war nach vier Tagen Inkubation mit dCAF-dsRNA die Zellzahl in den Kulturen um 25 % geringer als in den unbehandelten Kulturen. RNAi gegen dCCR4 hatte keinen Effekt auf die Zellteilungsrate. (Daten nicht gezeigt).

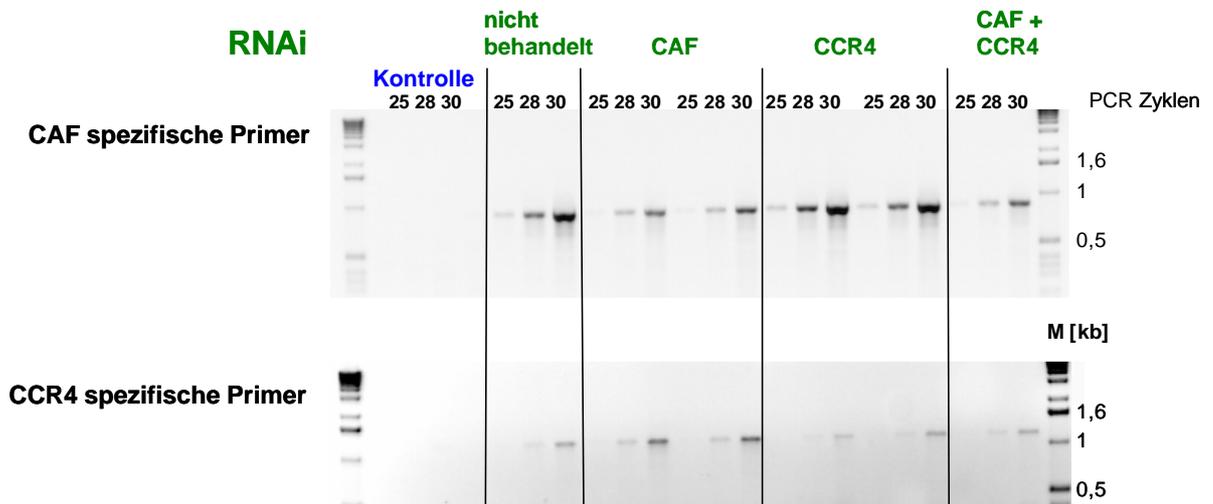


Abb. 3.4.1.1 RT-PCR zur Quantifizierung der CAF1- und CCR4-mRNA nach RNAi. Mit je 1,5 µg Gesamt-RNA und 0,75 µg Oligo(dT)-Primer wurde eine reverse Transkription (RT) durchgeführt. Je 1 µl der RT-Reaktion wurde als Template in PCR-Reaktionen mit CAF-bzw. CCR4-spezifischen Primern eingesetzt. Nach 25, 28 oder 30 Zyklen wurden die Reaktionen gestoppt und gleiche Mengen auf einem 1 % Agarose-Gel analysiert. Als Kontrolle wurde eine PCR mit einer RT durchgeführt, in der kein Primer eingesetzt worden war.

Mittels RT-PCR wurde die Reduktion der spezifischen mRNA überprüft (Abb. 3.4.1.1). Durch das Abstoppen nach verschiedenen PCR-Zyklen ließ sich die Menge an PCR-Produkt semiquantitativ ermitteln. Als Kontrolle für die Reinheit der RNA wurde die PCR ohne vorherige reverse Transkription durchgeführt. Diese ergab mit beiden Primerkombinationen kein spezifisches Produkt. Die RNA-Präparation war also frei von kontaminierender DNA. Die RT-PCR mit CAF-spezifischen Primern zeigte, dass die Menge an PCR-Produkt aus den behandelten Zellen nach 30 PCR-Zyklen ungefähr der Menge an PCR-Produkt aus 28 Zyklen

mit RNA aus unbehandelten Zellen entsprach. Dieses würde eine Reduktion auf ungefähr 25 % bedeuten. Die gleiche Reduktion an CAF-mRNA gab es auch in den Zellen, die mit dsRNAs gegen CAF und CCR4 behandelt wurden. RNAi gegen dCCR4-mRNA hatte keinen Einfluss auf die Menge an CAF-mRNA; die Menge an PCR-Produkt entsprach der von unbehandelten Zellen. Ein entsprechendes Ergebnis gab es bei der Verwendung von CCR4-spezifischen Primern: Die Menge an PCR-Produkt war deutlich reduziert in den Ansätzen mit RNA aus dsCCR4-behandelten Zellen im Vergleich zu den Zellen, die mit dsCAF behandelt wurden. Die geringe Menge an CCR4-PCR-Produkt im Ansatz mit der RNA aus unbehandelten Zellen ist auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen.

Die Verringerung der mRNA wirkte sich auch auf die Proteinmenge aus (Abb. 3.4.1.2). Das zeigte ein *Western blot*, in dem gleiche Mengen Lysat aufgetragen wurden.

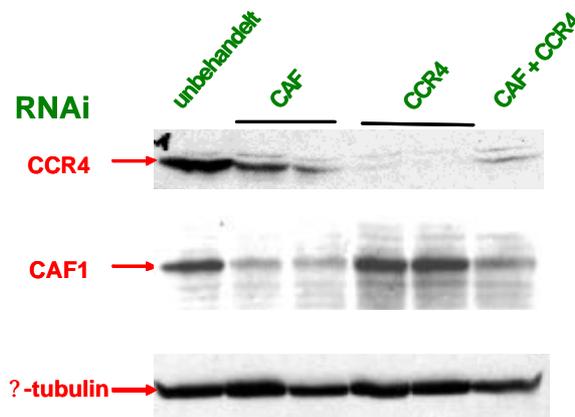


Abb. 3.4.1.2 *Western blot* zur Bestimmung der dCAF- und dCCR4-Menge nach RNAi. Die S2-Zellen wurden in je 150 μ l Lysispuffer resuspendiert und durch 2 Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen. Je 15 μ l des Lysates wurden in einer 10 % SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit CCR4-Antiserum oder mit affinitätsgereinigtem α CAF1-Antikörper inkubiert. Als Ladekontrolle diente eine Inkubation mit α -Tubulin-spezifischem Antikörper.

Nach RNAi war in den dsCAF-behandelten Zellen kein CAF-Protein mehr nachweisbar, während in den dsCCR4-behandelten Zellen die Menge an CAF1 im Vergleich zu der Menge an Protein in den unbehandelten Zellen nicht reduziert war. Der Unterschied in der CAF-Konzentration war nicht auf unterschiedliche Proteinkonzentrationen zurückzuführen, was ein Vergleich der α -Tubulinsignale zeigt, die sich nur schwach in ihrer Intensität unterschieden. Behandlung mit dsCCR4 führte zu einer Reduktion des CCR4-Signals in den jeweiligen Zellen. Es fällt auf, dass die CCR4-Menge in den dsCAF-RNA behandelten Zellen im Vergleich zu der Menge der unbehandelten Zellen verringert war. Dieses ist wahrscheinlich auf eine größere Proteinmenge in Spur 1 zurückzuführen. Aus Mangel an Extrakt konnte der *Western blot* mit der Tubulin-Kontrolle leider nicht wiederholt werden.

3.4.2 RNAi gegen CAF beeinflusst die Poly(A)-Schwanzlänge *in vivo*

Obwohl RNAi gegen dCAF1 keine morphologische Veränderung der S2-Zellen hervorgerufen, war die Zellteilungsrate in diesen Zellen geringer (3.4.1).

Wird eine deadenylierende enzymatische Aktivität in Zellen reduziert, sollte sich das auf die Länge der Poly(A)-Schwänze der mRNAs auswirken, wenn diese Aktivität die vorherrschende ist. Durch die Analyse der durchschnittlichen Länge aller Poly(A)-Schwänze in den Zellen, in denen die Expression von dCAF1 bzw. dCCR4 oder beider Proteine durch RNAi reduziert war, wurde untersucht, ob die Proteine auch *in vivo* an der Regulation der Poly(A)-Schwanzlänge beteiligt sind. Eine Reduktion der Deadenylase sollte in einer Verlängerung der Poly(A)-Schwänze der isolierten mRNAs resultieren.

Die Gesamt-RNA wurde aus Zellen, die zuvor mit dsRNA gegen CAF1, CCR4 oder einer Kombination aus beiden behandelt wurden, isoliert (2.2.19.4.1). Als Kontrolle diente eine nicht mit dsRNA behandelte Kultur. Jeweils gleiche Mengen RNA wurden am 3'-Ende mit 3'-dATP radioaktiv markiert und mit RNase A und RNase T1 inkubiert (2.2.22). Da Poly(A) nicht von diesen Nukleasen gespalten wird, konnten die verbleibenden Poly(A)-Schwänze auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch über einen PhosphorImager dargestellt werden. In Abb. 3.4.2.1 B. ist die Radioaktivität der Spuren 1, 2 und 6 des Autoradiogramms, mit ImageQuant quantifiziert, dargestellt.

Die maximale Länge der Poly(A)-Schwänze betrug in nicht behandelten Zellen etwa 160 Nukleotide, wobei die Hauptpopulation der Poly(A)-Schwänze 45 bis 70 Nukleotide lang war (A: Spur 1). Wurden die Zellen mit dsRNA gegen dCCR4 behandelt (Spuren 4 + 5), konnte kein Unterschied zum Wildtyp festgestellt werden; die Längenverteilung der Poly(A)-Schwänze war nahezu identisch. Wurden die Zellen jedoch mit dsRNA gegen CAF1 behandelt, war das Längenspektrum zugunsten der längeren Poly(A)-Schwänze verschoben. Die Menge an kürzeren Poly(A)-Schwänzen war nahezu identisch. Die Quantifizierung bestätigte diesen Eindruck (Abb. 3.4.2.1 B). Die Kurven lagen im Bereich der kürzeren Poly(A)-Schwänze übereinander und verliefen bei den längeren unterschiedlich.

Die Verlängerung der Poly(A)-Schwänze bei CAF1-RNAi unterstützt die These, dass auch in *Drosophila* der CAF/CCR4/NOT-Komplex eine wichtige Rolle bei der Deadenylierung von mRNA spielt. Ob dCAF1 selbst die deadenylierende Aktivität besitzt, ist nicht bekannt.

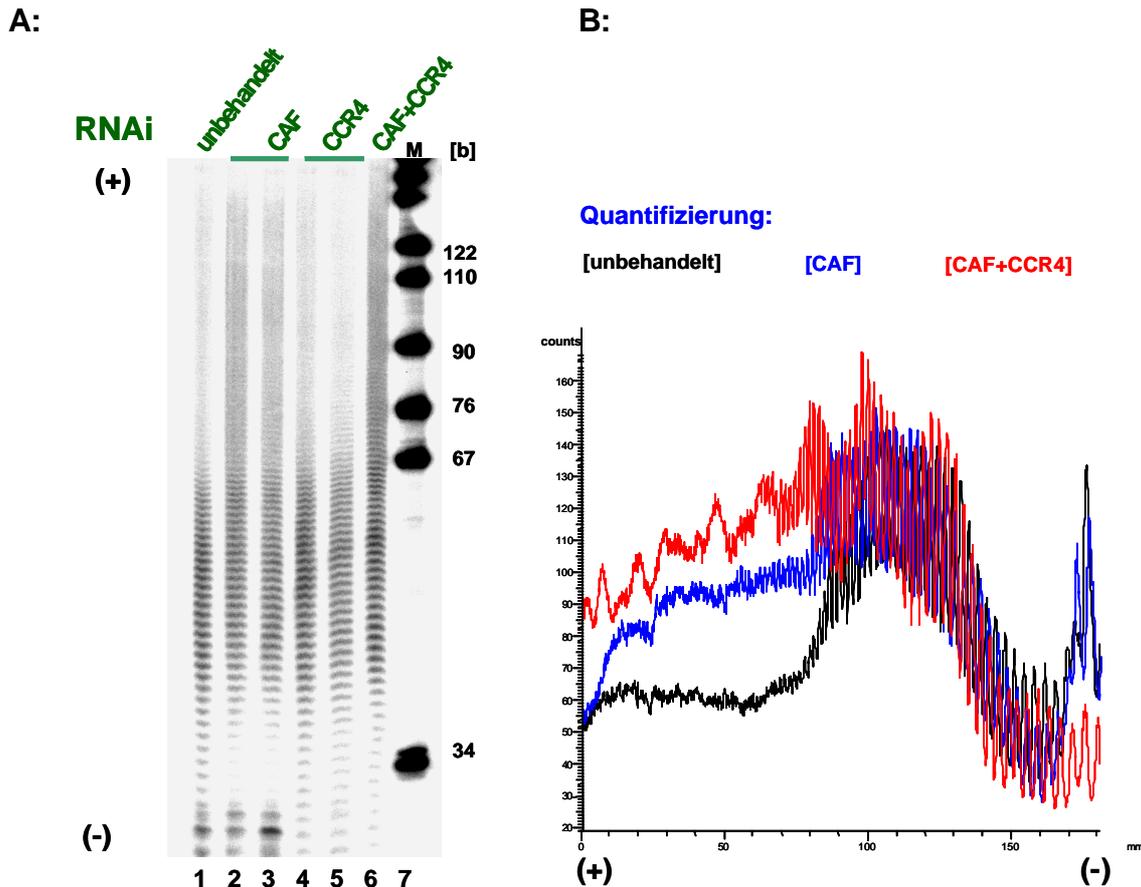


Abb. 3.4.2.1 **A:** Analyse der Poly(A)-Schwanzlänge von Gesamt-RNA nach RNAi gegen dCAF1 und dCCR4. Je 2 μg Gesamt-RNA wurden mit $3'$ -dATP radioaktiv markiert. Die Menge an eingebauter Radioaktivität wurde bestimmt und je 250000 cpm zusammen mit 20 μg Hefe-RNA, 10 ng RNase A und 25 U RNase T1 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch SDS und Proteinase K-Verdau beendet, die verbleibende RNA gefällt, in Formamid-Ladepuffer aufgenommen und auf einem 10 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Darstellung erfolgte im PhosphorImager. **B:** Quantifizierung der Bandenintensität der Spuren 1 (unbehandelt), 2 (CAF1 RNAi) und 6 (CAF1 + CCR4 RNAi) durch ImageQuant. (+) und (-) bezeichnet die elektrischen Pole.

3.4.3 RNAi gegen NOT1, NOT2 und NOT3/5 hat ebenfalls einen Effekt auf die *steady state*-Poly(A)-Schwanzlänge

Im Folgenden wurde der Effekt von RNAi gegen weitere Proteine des CCR4/NOT-Komplexes untersucht. Zum Zeitpunkt des Experimentes konnten in Datenbankrecherchen nur DNA-Sequenzen von NOT1, NOT2 und NOT3/5 in *D. melanogaster* gefunden werden. Ein Teil der jeweiligen ORFs wurde mit Primern amplifiziert, die die Sequenz des T7-Promotors am $5'$ -Ende trugen. Nach Transkription der PCR-Produkte wurden die beiden Stränge hybridisiert und für RNAi verwendet (2.2.15). Als zusätzliche Kontrolle wurde Luciferase-dsRNA eingesetzt. Die Gesamt-RNA wurde isoliert (2.2.19.4.1), mit $3'$ -dATP markiert und einem RNase T1- und RNase A-Verdau unterzogen (2.2.22). Die Produkte

wurden auf einem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch durch einen PhosphorImager dargestellt. Als Kontrolle für die Vollständigkeit des Nukleaseverbaus wurde 3'-markierte, polyadenylierte L3prä-RNA unter gleichen Bedingungen wie die *Drosophila*-RNA inkubiert.

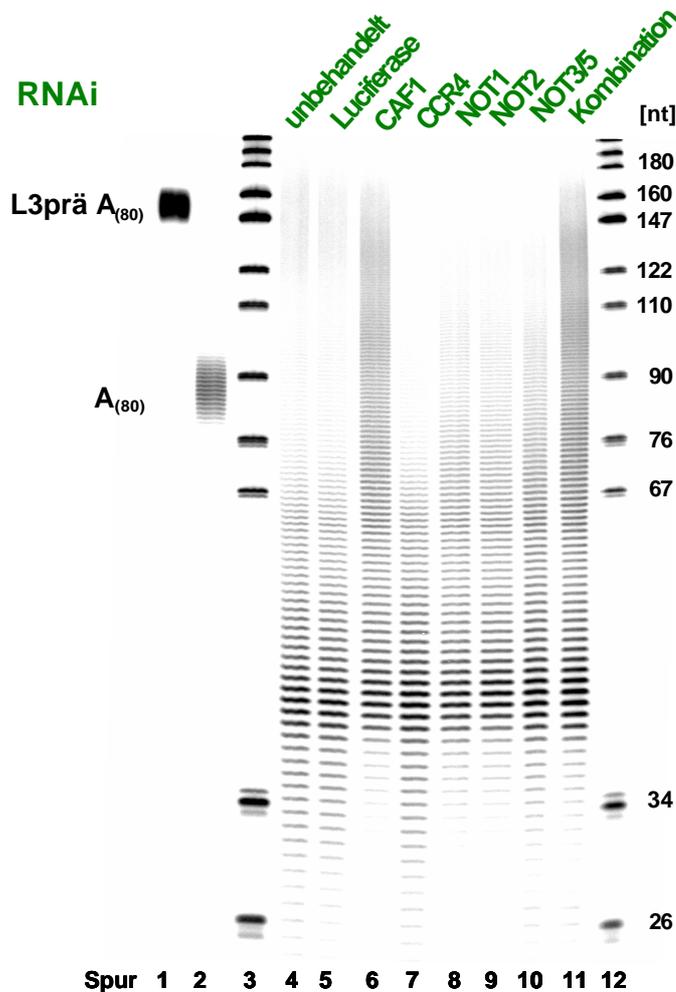


Abb. 3.4.3.1 Analyse der Poly(A)-Schwanzlänge von Gesamt-RNA nach RNAi gegen dCAF, dCCR4 und dNOT1, 2 und 3/5. Je 1 µg Gesamt-RNA oder 50 ng L3prä(A₈₀)-RNA wurden mit 3'-dATP radioaktiv markiert, die Menge an eingebauter Radioaktivität bestimmt und je 500000 cpm (S2) oder 10000 cpm (L3prä(A₈₀)) zusammen mit 20 µg Hefe-RNA mit 5 ng RNase A und 25 U RNase T1 30 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch SDS und Proteinase K-Verdau gestoppt, die verbleibende RNA gefällt, in Formamid-Ladepuffer aufgenommen und auf einem 10 % Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Spur 1 sind 5000 pm unverdauter L3prä(A₈₀)-RNA aufgetragen. Kombination bezeichnet das RNAi Experiment mit CAF-, CCR4- und den NOT-dsRNAs.

Wie in den vorhergehenden Experimenten beobachtet, hatte die *Drosophila*-RNA eine *steady state*-Poly(A)-Schwanzlänge von maximal 180 Nukleotiden. Die Länge der Poly(A)-Schwänze aus den unbehandelten Zellen und Zellen, die mit einer Kontroll-dsRNA behandelt worden waren, war wie erwartet identisch (Spuren 4 + 5). Die in diesen Spuren zu sehende Population von längeren RNAs war in keinem weiteren Experiment zu beobachten und ist wahrscheinlich nicht von Bedeutung, sondern ein experimentelles Artefakt. Wie vorher beschrieben, hatte RNAi gegen CAF1 eine deutliche Verschiebung der Verteilung zugunsten der längeren Poly(A)-Schwänze zur Folge (Spur 6). RNAi gegen CCR4 beeinflusste auch in diesem Experiment die durchschnittliche Länge der Poly(A)-Schwänze nicht (Spur 7). Nach

der Inkubation der S2-Zellen mit dsRNA gegen die NOT-Proteine konnte eine leichte Verlängerung der Poly(A)-Schwänze beobachtet werden (Spuren 8 - 10), während die Menge an kurzen Poly(A)-Schwänzen abnahm. Ein unterschiedlicher Effekt, resultierend aus der RNAi gegen unterschiedliche NOT-Proteine, wird nicht beobachtet. Im Vergleich zu der durch CAF1-RNAi hervorgerufenen Verlängerung, fiel die durch die NOT-Proteine verursachte Verlängerung der Poly(A)-Schwanzlänge eher gering aus. Bei Kombination aller verfügbaren dsRNAs waren die Poly(A)-Schwänze wie bei RNAi gegen CAF1 allein verlängert (Spur 11).

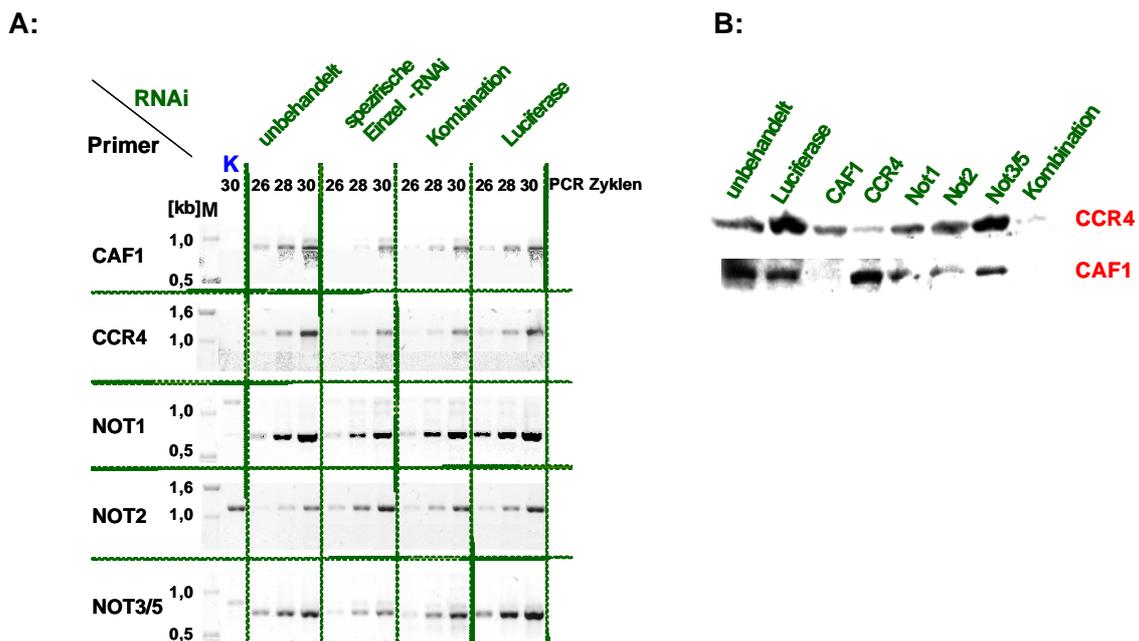


Abb. 3.4.3.2 **A:** Western blot zur Bestimmung der dCAF1- und dCCR4-Menge nach RNAi. Die S2-Zellen wurden in je 150 μ l Lysispuffer resuspendiert und durch 2 Frier-Tau-Zyklen aufgeschlossen und die Proteinkonzentration im Extrakt bestimmt. Je 10 μ g der Extrakte wurden in einer 10 %SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit dem CCR4-Antiserum oder mit affinitätsgereinigtem CAF1-Antikörper inkubiert. **B:** RT-PCR zur Überprüfung der mRNA-Menge von CAF, CCR4 und der NOT-Proteine nach RNAi. Mit je 1,5 μ g Gesamt-RNA und 0,75 μ g Oligo(dT)-Primer wurde eine reverse Transkription (RT) durchgeführt. Je 1 μ l der RT wurde als *template* in PCR-Reaktionen mit genspezifischen Primern eingesetzt. Nach 26, 28 oder 30 Zyklen wurden die Reaktionen gestoppt und gleiche Volumina in einem 1 % Agarose-Gel analysiert. Als Kontrolle wurde eine PCR mit einer RT durchgeführt, in der kein Primer eingesetzt worden war.

Der Erfolg des RNAi Experimentes konnte nur bei CAF und CCR4 auf Proteinebene verfolgt werden, da gegen die NOT-Proteine keine Antikörper zur Verfügung standen. Im *Western blot* (2.2.16) war eine deutliche Reduktion von dCAF in den entsprechenden RNAi-Extrakten zu verzeichnen. Wie schon vorher beobachtet, war die Reduktion an dCCR4 nicht so ausgeprägt.

Auf mRNA-Ebene wurde mittels RT-PCR (2.2.19.7) der Einfluss von RNAi für alle verwendeten dsRNAs untersucht. Die Reduktion von NOT1- und NOT3/5-mRNA ist der von

CCR4 und CAF1 vergleichbar. Der *knock-down* von NOT2 war über die RT-PCR Methode nicht nachzuweisen, da auch in der Kontrolle für die reverse Transkription ein PCR-Produkt der gleichen Länge wie NOT2 zu detektieren war.

Bislang wurde gezeigt, dass neben CAF1-RNAi auch RNAi gegen NOT1, NOT2 und auch gegen NOT3/5 *in vivo* eine Verlängerung der *steady state*-Poly(A)-Schwanzlänge zur Folge hatten. Der Effekt der einzelnen RNAi-Experimente war nicht additiv, wenn mehrere Proteine gleichzeitig ausgeschaltet wurden.

3.4.4 Untersuchung der Deadenylierung von Hsp70-mRNA in CAF-RNAi-Zellen

3.4.4.1 Hsp70-mRNA wird *in vivo* durch den CAF1/CCR4/NOT-Komplex deadenyliert

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Poly(A)-Schwanz hauptsächlich durch den CCR4/NOT-Komplex deadenyliert wird, wurde die Rate der Deadenylierung einer spezifischen mRNA untersucht.

Die Syntheserate der Hsp70-mRNA ist unter normalen Bedingungen sehr gering. Zusätzlich ist die mRNA sehr instabil, was vor allem an einer schnellen Deadenylierung der Transkripte liegt. Im Hitzeschock wird die Transkription der Hsp70-mRNA induziert. Eine hohe Rate der Proteinsynthese wird außerdem durch eine erhöhte Halbwertszeit der Hsp70-mRNA erreicht. Diese resultiert aus dem verlangsamten Abbau der mRNA infolge verminderter Deadenylierung. Sinkt die Temperatur wieder, wird der Deadenylierungs-Block aufgehoben und die Hsp70-mRNA schnell deadenyliert und degradiert (Dellavalle et al., 1994). Der *turnover* der Hsp70-mRNA stellt also ein natürliches „pulse-chase“-Experiment dar, in dem die Synthese der mRNA durch Temperaturerhöhung angeschaltet und nach einer erneuten Temperatursenkung die Deadenylierung bzw. der Abbau der Transkripte verfolgt werden kann.

Durch die Analyse der Poly(A)-Schwanzlänge während der Erholung von einem Hitzeschock wurde untersucht, ob ein Ausschalten von dCAF und dCCR4 mittels RNAi einen Effekt auf die Rate der Deadenylierung von Hsp70-mRNA hat. Hierzu wurden S2-Zellen mit dCAF-dsRNA oder einer Kombination aus dCAF- und dCCR4-dsRNA behandelt (2.2.15). Als Kontrolle erfolgte eine Behandlung mit Luciferase-dsRNA. Die Kulturen wurden einem Hitzeschock von 36°C ausgesetzt und die Zellen nach unterschiedlichen Zeiten der Erholung geerntet. Die RNA wurde isoliert und ein „*PAT-assay*“ durchgeführt. In diesem Experiment werden Oligo(dT)-Primer mit den Poly(A)-Schwänzen der mRNAs hybridisiert und

miteinander ligiert. An die am 3'-Ende statistisch freibleibenden Adenylatreste wird bei verminderter Temperatur ein Oligo(dT)-Primer hybridisiert, der einen G/C-reiches 3'-Ende besitzt (Oligo(dT)-anchor-Primer). Nach einer reversen Transkription können dann die Poly(A)-Schwänze eines spezifischen Transkriptes mit einem genspezifischen Primer und dem Oligo(dT)-anchor-Primer in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden (2.2.23). Auf diese Weise wurde der Hsp70-3'-UTR und eine polyadenylierte Kontroll-RNA, die zu Beginn des Experimentes mit jeder RNA-Probe vermischt wurde, unter Verwendung von radioaktiv markierten Primern spezifisch amplifiziert, in einer denaturierenden PAGE aufgetrennt, und die Länge der PCR-Produkte durch einen PhosphorImager autoradiographisch dargestellt.

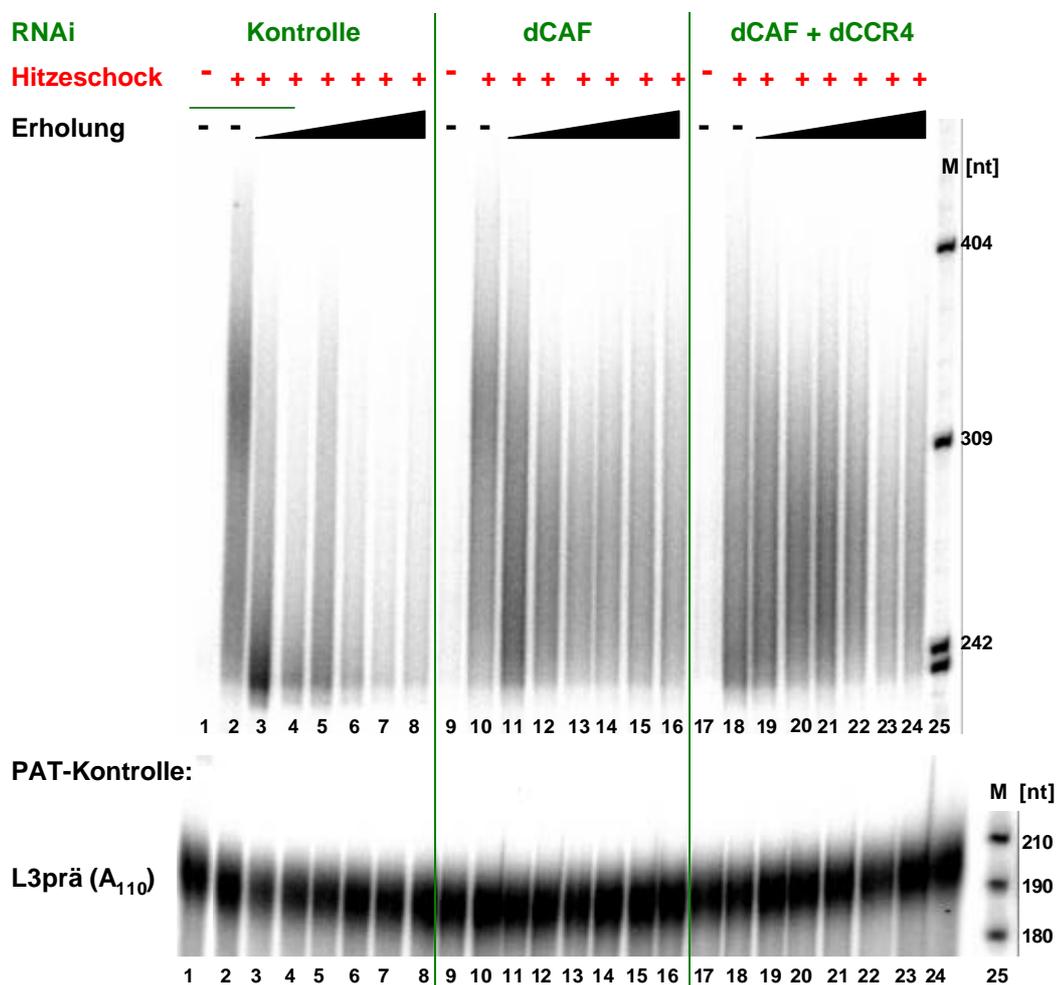


Abb. 3.4.4.1 *PAT-assay* aus RNAi-Zellen mit Hsp70-3'-UTR nach Hitzeschock. Luciferase-, CAF- oder CAF+CCR4-RNAi-Zellen wurden nach einem 36°C-Hitzeschock von 30 min zu unterschiedlichen Zeiten der Erholung (0, 30, 75, 120, 165, 210, 315 min) geerntet und die RNA isoliert. Je 3 µg RNA wurden mit 1 ng L3prä(A₁₁₀)-Transkript versetzt. In einem *PAT-assay* wurden cDNAs synthetisiert. Mit 1 µl als *template* wurden in einer anschließenden PCR-Reaktion mit den radioaktiv markierten Primern hsp70 Sal und Oligo(dT)-anchor-Primer die Hsp70-3'-UTR inklusive der Poly(A)-Schwänze amplifiziert. Als Kontrolle für das Experiment wurden außerdem mit den radioaktiv markierten Primern L3prä-start und Oligo(dT)-anchor L3prä (A₁₁₀) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf zwei 10 % denaturierenden Polyacrylamidgelen aufgetrennt und durch den PhosphorImager autoradiographisch dargestellt und quantifiziert.

Wenn die Zellen keinem Hitzeschock unterzogen wurden, war kein Hsp70-PCR-Produkt nachweisbar, unabhängig davon ob in den Zellen der CCR4/NOT-Komplex vorhanden war oder nicht (Abb. 3.4.4.1 Spuren 1, 9, 17). Das Ausschalten von dCAF reichte nicht aus, polyadenylierte Hsp70-mRNA in den Zellen nachweisbar zu machen. Dieses hätte durch einen verminderten Abbau und eine dadurch bedingte Akkumulation der wenigen Transkripte, die unter normalen Bedingungen gebildet werden, erreicht werden können.

Betrachtet man die Länge der frisch synthetisierten Poly(A)-Schwänze, stellt man fest, dass diese direkt nach dem Hitzeschock eine maximale Länge von ca. 180 Nukleotiden hatten und die Längenverteilung in allen drei gemessenen Proben gleich war, unabhängig vom RNAi-Experiment (Spuren 2, 10, 18). Ein Unterschied zwischen den einzelnen Proben zeigte sich erst während der Erholungsphase. Während die Poly(A)-Schwänze der Transkripte aus den Kontrollzellen schnell abgebaut wurden, war die Deadenylierungsrate bei den Transkripten aus den dCAF- und den dCAF+dCCR4-RNAi-Zellen stark verlangsamt, wobei der Effekt im Doppel-RNAi-Experiment noch etwas stärker war. Schon nach 30 min war ein Großteil der Poly(A)-Schwänze der Transkripte aus den Kontrollzellen abgebaut, während die Poly(A)-Schwänze aus den dCAF-RNAi-Zellen nur leicht verkürzt waren (Spuren 3, 11, 19). Diese Verkürzung der Poly(A)-Schwänze scheint auch im weiteren Verlauf der Erholung in den dCAF-RNAi-Zellen nur sehr langsam zu sein oder sogar zu stagnieren (Spuren 12-16). In den Kontrollzellen war nach 165 min Erholung kaum noch polyadenyliertes Hsp70-Transkript nachweisbar (Spuren 6-8). Wahrscheinlich wurden die Proben der 75 min- und der 120 min-Zeitpunkte der Kontrollzellen bei der Präparation der RNA vertauscht. Anders ist ein plötzliches Ansteigen der Poly(A)-Schwanzlänge nicht zu erklären (Spuren 4 und 5), da dieses Phänomen in weiteren Experimenten nicht zu beobachten war.

Im Gegensatz zum Hsp70-Transkript konnte in allen Ansätzen etwa die gleiche Menge Kontroll-PCR-Produkt der erwarteten Länge von ca. 200 Nukleotiden amplifiziert werden. Da zu Beginn des Experimentes jeweils die gleiche Menge Kontroll-RNA mit der RNA der einzelnen RNAi-Experimente vermischt wurde, kann man davon ausgehen, dass die Unterschiede in der Menge des Hsp70-PCR-Produktes nicht auf einen experimentellen Fehler zurückzuführen sind. Die leichten Unterschiede in der Menge des Kontroll-PCR-Produktes spiegeln die experimentell bedingte Varianz der PCR-Ergebnisse wieder.

Dieses Experiment zeigte, dass der CAF/CCR4/NOT-Komplex *in vivo* an der Deadenylierung von Hsp70-mRNA während der Erholung nach einem Hitzeschock beteiligt ist. Es bleibt zu überprüfen, ob auch weitere mRNAs spezifisch durch ihn deadenyliert werden.

Um zu überprüfen, ob die verlängerten Poly(A)-Schwänze tatsächlich durch eine Verminderung der Deadenylierungsrate und nicht durch eine Induktion der Transkription zustande kommen, wurde der Hitzeschock in Gegenwart von Actinomycin D durchgeführt. Actinomycin D ist ein wirksamer Inhibitor der Transkription. Es interkaliert mit seinem planaren Phenoxazonanteil in die DNA-Doppelhelix und bindet mit den zwei zyklischen Polypeptidketten in die kleine Furche der DNA. Diese Interkalation macht die DNA zu einem schlechten *template* für die RNA-Polymerase (Stryer, 1995).

S2-Zellen wurden mit CAF1-dsRNA oder mit Luciferase-dsRNA behandelt. Nach vier Tagen wurden die Zellen in An- oder Abwesenheit von Actinomycin D einem Hitzeschock unterzogen. Die Gesamt-RNA wurde direkt nach dem Hitzeschock oder nach verschiedenen langen Zeiten der Erholung präpariert. Über eine RT-PCR mit spezifischen, radioaktiv markierten Primern wurden der Hsp70-3'-UTR inklusive seiner Poly(A)-Schwänze amplifiziert, auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und durch den PhosphorImager autoradiographisch dargestellt.

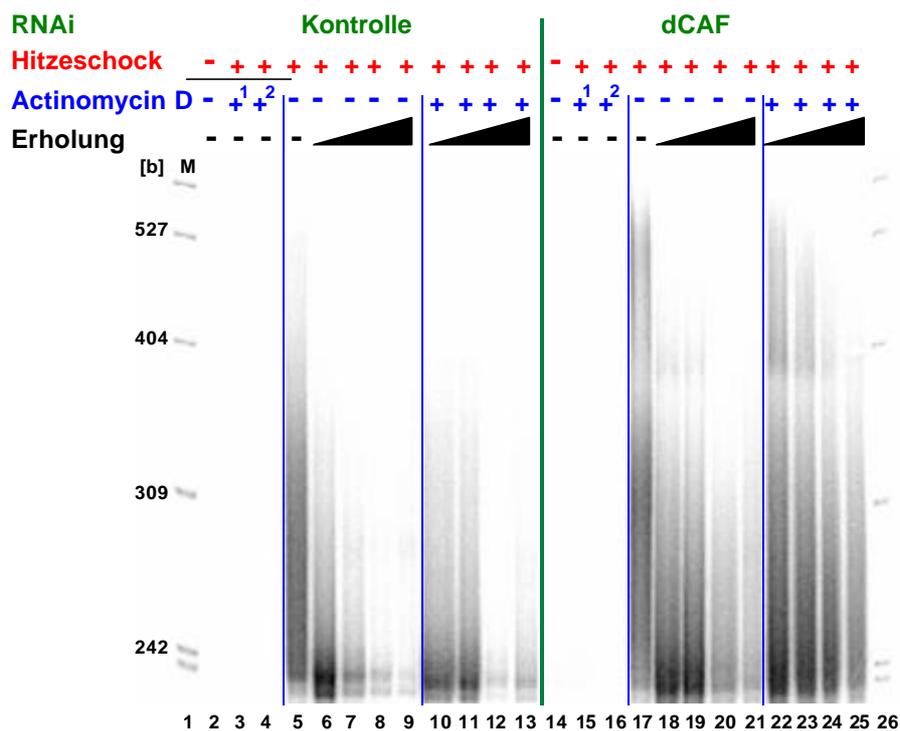


Abb. 3.4.4.2 Untersuchung des Einflusses von Actinomycin D auf die Poly(A)-Schwänze der Hsp70-mRNA nach Hitzeschock durch den *PAT-assay*. Je 3 µg RNA aus Luciferase- oder CAF-RNAi-Zellen, die zu unterschiedlichen Zeiten der Erholung (0, 30, 60, 90, 150 min) von einem 35,5°C-Hitzeschock von 30 min, der in An- oder Abwesenheit von 5 µg/ml Actinomycin D durchgeführt wurde, geerntet worden sind, wurden mit Oligo(dT)-Primer und Oligo(dT)-anchor-Primer versetzt. In einem *PAT-Assay* wurden in einer reversen Transkription cDNAs synthetisiert. Mit 1 µl als *template* wurden in einer anschließenden PCR-Reaktion mit den radioaktiv markierten Primern hsp70 Sal und Oligo(dT)-anchor die Hsp70-3'-UTR inklusive der Poly(A)-Schwänze amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf einem 10 % denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch durch den PhosphorImager dargestellt. Actinomycin D +1: Actinomycin D-Zugabe 5 min vor dem Hitzeschock; +2: Actinomycin D-Zugabe unmittelbar bei Hitzeschock.

Wenn kein Hitzeschock stattgefunden hatte, war kein polyadenyliertes hsp70-Transkript nachzuweisen (Spuren 1 und 14). Wurde 5 min vor dem Hitzeschock (Spuren 2 und 15) oder direkt mit dem Hitzeschock (Spuren 3 und 16) 5 µg/ml Actinomycin D in das Medium gegeben, konnte ebenfalls zum Ende des Hitzeschocks kein polyadenyliertes Hsp70-Transkript nachgewiesen werden. Actinomycin D zeigte sich somit als schnell wirkender Inhibitor der RNA-Neusynthese. Ohne Actinomycin D-Zusatz während des Hitzeschocks konnte sowohl in den Kontrollzellen als auch in den dCAF1-RNAi-Zellen polyadenylierte Hsp70-RNA nachgewiesen werden (Spuren 5 und 17). Die Poly(A)-Schwänze hatten eine maximale Länge von ca. 250 Nukleotiden. In den CAF-RNAi-Zellen war die Längenverteilung zugunsten der längeren Poly(A)-Schwänze verschoben. Wie bereits beschrieben, ist die Rate der Deadenylierung während der Erholung bei den CAF-RNAi-Zellen stark verlangsamt. Nach 30 min Erholung war bei den Kontrollzellen ohne Actinomycin D-Behandlung kaum noch polyadenyliertes Hsp70-Transkript nachzuweisen (Spur 6) und nach 120 min fast der Zustand vor dem Hitzeschock erreicht (Spur 9). Bei den CAF-RNAi-Zellen dagegen war nach 120 min Erholung noch polyadenylierte Hsp70-mRNA nachweisbar (Spur 21). Der Unterschied in der Rate der Deadenylierung zwischen den CAF-RNAi- und den Kontroll-Zellen wird also nicht vom Zusatz von Actinomycin D beeinflusst, d.h. er ist nicht auf eine Neusynthese zurückzuführen. Der Unterschied zwischen den beiden Kulturen war in Anwesenheit von Actinomycin D sogar deutlicher.

3.5 Untersuchungen zur Deadenylierung in S2-Zellen nach Hitzeschock

3.5.1 Hitzeschock vermindert die deadenylierende Aktivität cytoplasmatischen S2-Extraktes

Während des Hitzeschocks sind die mRNAs, die für Hitzeschockproteine kodieren, besonders stabil. Im Fall von Hsp70 ist eine starke Herabsetzung der Deadenylierung der Hsp70-mRNA dafür verantwortlich. Auch weitere mRNAs, wie z. B. *c-myc* und *c-fos* werden im Hitzeschock stabilisiert. Daher sollte untersucht werden, ob in Zellen, die einem starken Hitzeschock ausgesetzt waren, die deadenylierende Aktivität generell reduziert ist. Im folgenden Experiment wurde *in vitro* die deadenylierende Aktivität eines cytoplasmatischen S2-Zellextraktes, der aus Zellen gewonnen wurde, die einem starken Hitzeschock (37°C für 2 h) ausgesetzt waren (2.2.14.2), mit der eines Extraktes aus unbehandelten Zellen verglichen.

Dazu wurde *in vitro* transkribierte und polyadenylierte Hsp70-3'-UTR (2.2.20.2) mit gleichen Mengen Extrakt bei RT inkubiert und die Deadenylierung zu verschiedenen Zeitpunkten untersucht (2.2.21.2).

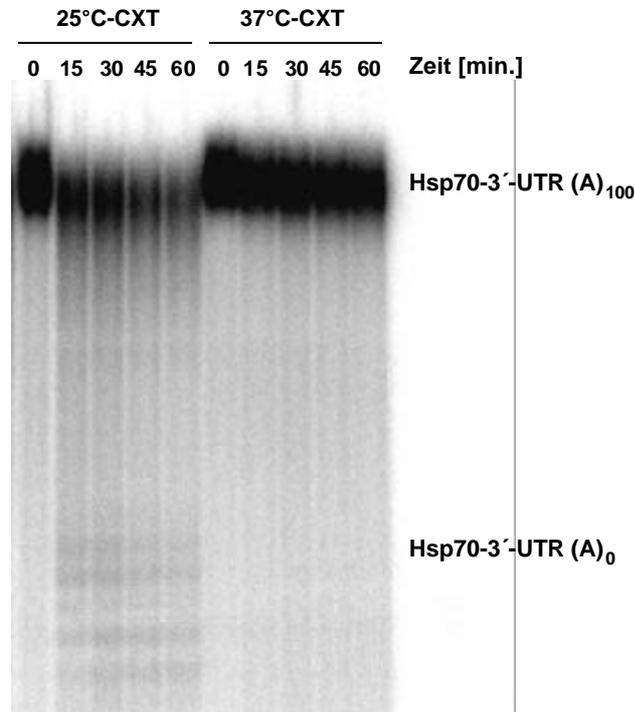


Abb. 3.5.1.1 Kinetik der Deadenylierung von polyadenyliertem hsp70-3'-UTR durch CXT aus S2-Zellen, die einem Hitzeschock von 2 h bei 37°C unterzogen wurden, und aus nicht behandelten Zellen. Für jede Kinetik wurde eine 275 µl-Reaktion mit 0,4 nM radioaktiv markierten, polyadenylierten Transkripten in Standard-Deadenylierungspuffer auf Eis gemischt. Nach Zugabe von 11 µl Extrakt wurden 50 µl als t=0 entnommen und die Reaktionen durch Transfer auf 30°C gestartet. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden weitere Aliquots entnommen und abgestoppt. Die Produkte der Reaktion wurden in einem 5%-igen denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt und autoradiographisch mit dem PhosphorImager dargestellt. Die Position des Substrates und des vollständig deadenylierten Produktes ist gekennzeichnet.

Der polyadenylierte Hsp70-3'-UTR wurde bei Inkubation mit cytoplasmatischem Extrakt aus unbehandelten S2-Zellen abgebaut. Es war eine Reduktion der Substratbande zu beobachten. Nach 15 min konnte das Auftreten einer schwachen Bande in Höhe des vollständig deadenylierten Substrates beobachtet werden. Da keine Akkumulation des Produktes über die Zeit erfolgte, kann man davon ausgehen, dass noch weitere Nukleasen im Extrakt vorhanden waren, die die 3'-UTR weiter degradierten. Bei der Inkubation mit CXT aus hitzebehandelten Zellen war nur eine leichte Verkürzung des Substrates zu beobachten. Es war kein Auftreten einer vollständig deadenylierten RNA nachweisbar.

Auffällig ist, dass nicht nur die Deadenylierung, sondern auch andere Nukleasen durch den Hitzeschock scheinbar inhibiert wurden, da kein Abbau stattfand. Wenn man davon ausgeht, dass die Deadenylierung auch in *Drosophila*-Zellen der erste Schritt beim Abbau von mRNA ist, wäre diese Beobachtung zu erklären.

3.5.2 Eine weitere Nuklease wird in S2-Zellen durch Hitzeschock induziert

Cytoplasmatischer Extrakt aus Zellen, die einem Hitzeschock unterzogen wurden, zeigte eine verminderte deadenylierende Aktivität. Diese ist nicht mit einer Reduktion von CAF1- und CCR4-Protein im Extrakt zu erklären. Die Mengen im Hitzeschock-CXT (= 37°C-CXT) sind vergleichbar mit denen aus 25°C-CXT (Siehe unten *Western Blot*).

Um zu untersuchen, ob die verminderte deadenylierende Aktivität eines Hitzeschock-Extraktes vielleicht auf eine verminderte Aktivität des CCR4/NOT-Komplexes zurückzuführen ist, wurde eine bei 25°C kultivierte S2-Suspensionskultur geteilt. Eine Hälfte wurde weiter bei 25°C inkubiert, die andere wurde einem zweistündigen 37°C-Hitzeschock ausgesetzt. Nach dem Ernten und dem Zellaufschluss wurden beide Extrakte (2.2.14.2) nacheinander über eine DEAE-Sepharose-Säule fraktioniert (2.2.14.3). Gleiche Mengen der Fraktionen wurden in einem *Western blot* auf dCAF1 und dCCR4 untersucht (2.2.16) und die deadenylierende Aktivität über einen TCA-Fällungsexperiment mit markiertem Poly(A) als Substrat bestimmt (2.2.21.1).

Bezüglich der Absorption bei 280 nm sahen beide Profile nahezu identisch aus. Sie waren nur um drei Fraktionen gegeneinander verschoben. Dieses lag an dem später beginnenden KCl-Anstieg bei der Fraktionierung des 25°C-CXT. Die Aktivitätsprofile der Säulen unterschieden sich jedoch deutlich voneinander. Wie schon vorher auf polyadenylierter RNA beobachtet (vgl. 3.5.1), besaßen die auf die Säule aufgetragenen cytoplasmatischen Extrakte auch auf Poly(A) unterschiedliche Aktivität. Der CXT aus normalen Zellen war ca. 10-fach aktiver als der CXT aus hitzebehandelten Zellen. Auch bei dieser Fraktionierung des 25°C-CXT fand sich rund die Hälfte der Aktivität im Durchfluss und Waschschrift wieder. Im Gegensatz dazu war die Aktivität, die bei der Fraktionierung des 37°C-CXT nicht an die Säule gebunden hatte, deutlich höher als die der 25°C-CXT-Fraktionierung. Bei beiden Fraktionierungen war trotz des flachen Salzgradienten im Gegensatz zu Abb. 3.3.5.1 nur je ein Aktivitätsmaximum in den Fraktionen des Gradienten zu verzeichnen. Die maximale Aktivität der 25°C-CXT-Fraktionierung eluierte bei ca. 150 mM KCl in der Fraktion 16, die der 37°C-CXT-Fraktionierung schon bei ca. 70 mM KCl in der Fraktion 7. Die KCl-Konzentrationen, bei denen diese beiden Aktivitäten eluierten, entsprachen etwa denen der vorher beschriebenen Fraktionierung (siehe 3.3.5), nur, dass beide Aktivitäten in einem Extrakt vorhanden waren.

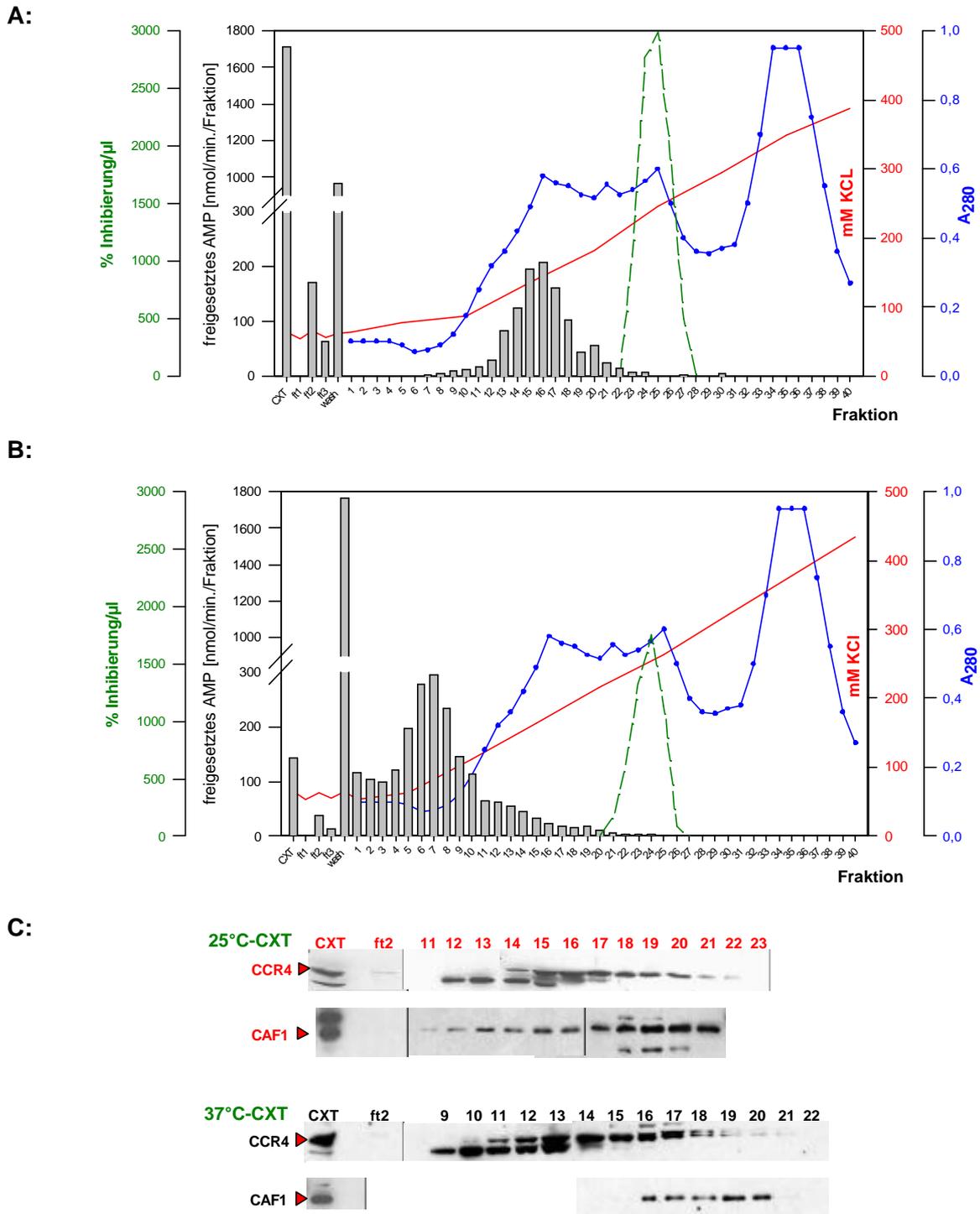


Abb. 3.5.2.1 Profil der Fraktionierung von **A:** S2-25°C-CXT und **B:** 37°C-CXT über DEAE-Sephrose. Für das Aktivitätsprofil wurden in 50 µl-Reaktionen 1 µg Poly(A) mit je 1 µl der zu testenden Fraktion gemischt, bei 30°C inkubiert und nach 10 min durch eine TCA-Fällung gestoppt. Die Radioaktivität im Überstand wurde gemessen und die Menge an entstandenem AMP berechnet. Die Aktivität der Fraktionen ist auf das Gesamtvolumen bezogen. Neben dem Aktivitätsprofil (grau) ist das Profil der A₂₈₀ (blau), die KCl-Konzentration (rot) und das Inhibitorprofil (grün) aufgetragen. Die inhibitorische Wirkung wurde in einem in 3.6.1 beschriebenen Experiment ermittelt. Die Detektierbarkeit von dCAF1 und dCCR4 im **C:** Western blot: Je 15 µl der Fraktionen wurden in einer 10 %SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembran übertragen und mit CCR4-Antiserum oder mit affinitätsgereinigtem aCAF1-Antikörper inkubiert.

Bezüglich der Absorption bei 280 nm sahen beide Profile nahezu identisch aus. Sie waren nur um drei Fraktionen gegeneinander verschoben. Dieses lag an dem später beginnenden KCl-Anstieg bei der Fraktionierung des 25°C-CXT. Die Aktivitätsprofile der Säulen unterschieden sich jedoch deutlich voneinander. Wie schon vorher auf polyadenylierter RNA beobachtet (vgl. 3.5.1), besaßen die auf die Säule aufgetragenen cytoplasmatischen Extrakte auch auf Poly(A) unterschiedliche Aktivität. Der CXT aus normalen Zellen war ca. 10-fach aktiver als der CXT aus hitzebehandelten Zellen. Auch bei dieser Fraktionierung des 25°C-CXT fand sich rund die Hälfte der Aktivität im Durchfluss und Waschschrift wieder. Im Gegensatz dazu war die Aktivität, die bei der Fraktionierung des 37°C-CXT nicht an die Säule gebunden hatte, deutlich höher als die der 25°C-CXT-Fraktionierung. Bei beiden Fraktionierungen war trotz des flachen Salzgradienten im Gegensatz zu Abb. 3.3.5.1 nur je ein Aktivitätsmaximum in den Fraktionen des Gradienten zu verzeichnen. Die maximale Aktivität der 25°C-CXT-Fraktionierung eluierte bei ca. 150 mM KCl in der Fraktion 16, die der 37°C-CXT-Fraktionierung schon bei ca. 70 mM KCl in der Fraktion 7. Die KCl-Konzentrationen, bei denen diese beiden Aktivitäten eluierten, entsprachen etwa denen der vorher beschriebenen Fraktionierung (siehe 3.3.5), nur, dass beide Aktivitäten in einem Extrakt vorhanden waren. Betrachtet man die Proteinanalyse der Fraktionen mittels *Western blot*, stellt man fest, dass die Aktivität der 25°C-CXT-Fraktionierung eindeutig mit einem CCR4- und CAF-Signal zusammentraf, die Aktivität der 37°C-CXT-Fraktionierung jedoch nicht. CAF und CCR4 sind auch im 37°C-CXT in ähnlichen Mengen wie im 25°C-CXT enthalten und eluieren in den gleichen Fraktionen. Die Verschiebung der beiden Proteinmaxima gegeneinander scheint in der Fraktionierung des 37°C-CXT deutlicher zu sein, als in der des 25°C-CXT.

Tabelle 4: Vergleich der Aktivitäten der einzelnen Fraktionen der 25°C- und 37°C-DEAE-Sephrose-Fraktionierungen gemessen im TCA-Fällungsexperiment. Durchfluss: Durchfluss- und Waschfraktionen; Gradientenfraktionen: Summe der Aktivitäten, die in Fraktionen 1-40 gemessen wurden.

	25°C-CXT	37°C-CXT
Fraktion	Aktivität [nmol AMP/min]	Aktivität [nmol AMP/min]
CXT	1700	142,3
Durchfluss	1180	1813
Gradientenfraktionen	1100	2067

Die Gesamtaktivität über alle Fraktionen der DEAE-Säule war bei der Fraktionierung des 25°C-CXT um ca. 30 % gegenüber der Aktivität des auf die Säule gegebenen Extraktes erhöht. Bei der Fraktionierung des 37°C-CXT dagegen gab es eine ca. 25-fache Steigerung

der Aktivität der Fraktionen im Vergleich zu der des CXT. Außerdem scheint die CAF/CCR4-assoziierte Aktivität im Hitzeschock inhibiert und eine zweite deadenylierende Aktivität induziert zu werden. Die starke Steigerung der Aktivität der Fraktionen gegenüber der des 37°C-CXT ließe sich durch das Abtrennen eines Inhibitors der „Hitzeschock-Nuklease“ während der Fraktionierung erklären.

3.6 Der 25°C- und der 37°C-CXT enthalten einen Inhibitor der Deadenylierung

Die Aktivität der Fraktionen der DEAE-Säule ist beim 37°C-CXT wesentlich höher als die des auf die Säule gegebenen Extraktes. Dieses Phänomen ließe sich durch das Abtrennen eines Inhibitors auf der Säule erklären (siehe oben). Bereits bei der ersten Fraktionierung von S2-CXT über eine DEAE-Säule und Elution mit einem steilen Salzgradienten wurde die Aktivität durch einen Inhibitor überlagert (siehe 3.3.2). Durch den Test der inhibitorischen Eigenschaften der Fraktionen der DEAE-Säule auf die Fraktion mit der höchsten Aktivität sollte untersucht werden, ob möglicherweise die Menge an Inhibitor im 37°C-CXT im Vergleich zum 25°C-CXT erhöht war oder ein zweiter Inhibitor im Hitzeschock aktiviert wurde. Zunächst wurde in einem TCA-Fällungsexperiment mit radioaktiv markiertem Poly(A) die Aktivität der Fraktion 7 der 37°C-CXT DEAE-Säule allein bestimmt. Im Folgenden wurde diese Fraktion mit den in Abb. 3.5.2.1 angegebenen Fraktionen des Durchflusses und des Gradienten inkubiert und wiederum die Menge an freigesetzter säurelöslicher Radioaktivität bestimmt. Die Aktivität der Fraktion 7 allein wurde mit denen, die mit Zusatz einer weiteren Fraktion erreicht wurden, verglichen.

Der Zusatz des 37°C-CXT sowie der Zusatz der Fraktionen 20-26 hatten eine deutliche Reduktion der Aktivität der Fraktion 7 zur Folge, während bei Zusatz der Fraktionen 2-16 und des Durchflusses ungefähr die aus den Einzelaktivitäten errechnete Gesamtaktivität erreicht wurde (Vergleich mit Abb. 3.5.2.1). Neben dem schon vorher beobachteten Inhibitor scheint kein weiterer von der Aktivität abgetrennt worden zu sein. Die gleiche Inhibierung der Fraktion 7 konnte auch durch die entsprechenden Fraktionen der 25°C-CXT-Fraktionierung erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

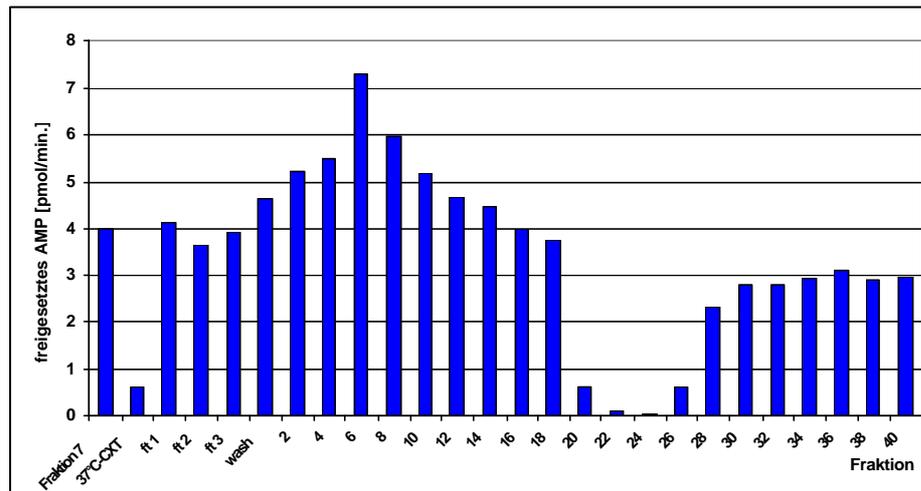


Abb. 3.5.2.1. Test der Fraktionen der 37°C-CXT-DEAE-Fraktionierung auf Inhibitoraktivität. Das Vielfache einer 50 µl-Standard-Deadenylierungsreaktion wurde mit 2 µl Fraktion 7 der 37°C-CXT-Fraktionierung/50 µl in Puffer gemischt, der Ansatz geteilt und jeweils 2 µl der zu testenden DEAE-Fraktion hinzugegeben. Die Reaktion wurde durch Zusatz von 1 µg Poly(A)-Substrat und Transfer auf 30°C gestartet. Nach 10 min wurden die Reaktionen durch eine TCA-Fällung gestoppt, die Menge an Radioaktivität im Überstand gemessen und die Menge an freigesetztem AMP/min errechnet. Die Aktivität ist gegen die getestete Fraktion aufgetragen.

Im Folgenden wurde untersucht, wie viel der Fraktionen für eine Hemmung eingesetzt werden muss. Hierzu wurde die Fraktion 24 der DEAE-Säule stark verdünnt und zu der Fraktion 7 titriert. Die resultierende Aktivität wurde in einem TCA-Fällungsexperiment mit radioaktiv markiertem Poly(A) gemessen. In dem Diagramm ist die Hemmung in Prozent gegen die Menge an Inhibitor aufgetragen.

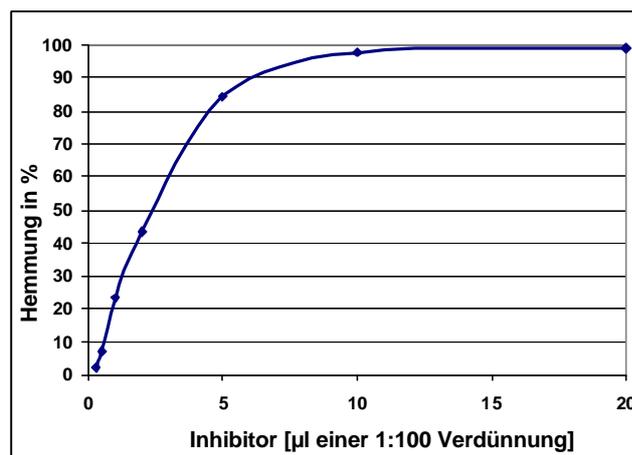


Abb. 3.5.2.2 Titration der Inhibitorfraktion. Die Inhibitorfraktion 24 der Fraktionierung des 37°C-CXT wurde 1:100 in Deadenylierungspuffer verdünnt. Das Vielfache einer 50 µl-Standard-Deadenylierungsreaktion wurde mit 1 µl Fraktion 6 der 37°C-CXT-Fraktionierung/50 µl in Puffer gemischt, der Ansatz geteilt und mit den angegebenen Mengen der Inhibitorverdünnung gemischt. Die Reaktionen wurden durch Zusatz von 1 µg Poly(A)-Substrat und Transfer auf 30°C gestartet. Nach 10 min wurden sie durch eine TCA-Fällung gestoppt, die Radioaktivität im Überstand gemessen und die Menge an freigesetztem AMP/min errechnet. Die Hemmung ist in % gegen Menge an Inhibitor aufgetragen. Eine Hemmung von 100 % entspricht 0 pmol freigesetztem AMP.

Der Inhibitor war schon in sehr hohen Verdünnungen aktiv. Bei einem Verhältnis Fr. 24:Fr. 6 zwischen 1:20 und 1:400 war der Grad der Hemmung annähernd linear zur Verdünnung und betrug bei einer 1:50 Verdünnung ungefähr 50 %. Da die Konzentrationen des Inhibitors und der Deadenylase nicht bekannt sind, kann nichts über die Art der Inhibierung gesagt werden.

Um die Menge an Inhibitor in den Fraktionen der DEAE-Säulen (3.5.2) zu quantifizieren, wurde das anfängliche Experiment nochmals sowohl für die Fraktionierung des 37°C-CXT als auch für die des 25°C-CXT durchgeführt. Der Inhibitor wurde in den Fraktionen mit starker Hemmung in zwei Verdünnungen eingesetzt, so dass im linearen Bereich gemessen werden konnte. Die entsprechenden Werte sind als (%) Hemmung pro μ l Fraktion in Abb. 3.5.2.2 dargestellt. Die Inhibitoraktivität war in den Fraktionen der 37°C-CXT-Fraktionierung nicht erhöht im Vergleich zur Fraktionierung des 25°C-CXT, sondern fast um die Hälfte niedriger. In beiden Säulen eluierte der Inhibitor ungefähr bei den gleichen KCl-Konzentrationen.

Da die Aktivitäten beider Extrakte durch die Inhibitoren beider Säulen wechselseitig hemmbar waren, ist es wahrscheinlich, dass es sich in den beiden Extrakten um denselben Inhibitor handelt. Eine Erklärung für die Aktivitätssteigerung bei der Fraktionierung des 37°C-CXT konnte auf diese Weise nicht gefunden werden. Während die deadenylierende Aktivität des 37°C-CXT wahrscheinlich nicht von dem Inhibitor überlagert wurde, kann die Aktivität der CCR4/CAF-Nuklease bei der Fraktionierung eventuell unterschätzt worden sein, da sich beide Maxima am Rande überlagerten.

3.6.1 Der Inhibitor ist spezifisch für die *Drosophila*-3'-Exonukleasen

Die zwei bei der Fraktionierung von S2-CXT gefundenen Nukleasen lassen sich beide durch Inhibitorfraktionen hemmen. Durch Inkubation mit rekombinantem PARN sollte die Spezifität des Inhibitors untersucht werden. Die Inhibitorfraktion 24 der 37°C-CXT-Fraktionierung wurde in steigenden Mengen mit der Fraktion 7 der 37°C-CXT-Fraktionierung (3.5.2) oder rekombinantem PARN und radioaktivmarkierten Poly(A) inkubiert. Die Menge an freigesetztem AMP wurde durch einen TCA-Fällungsexperiment ermittelt (2.2.21.1).

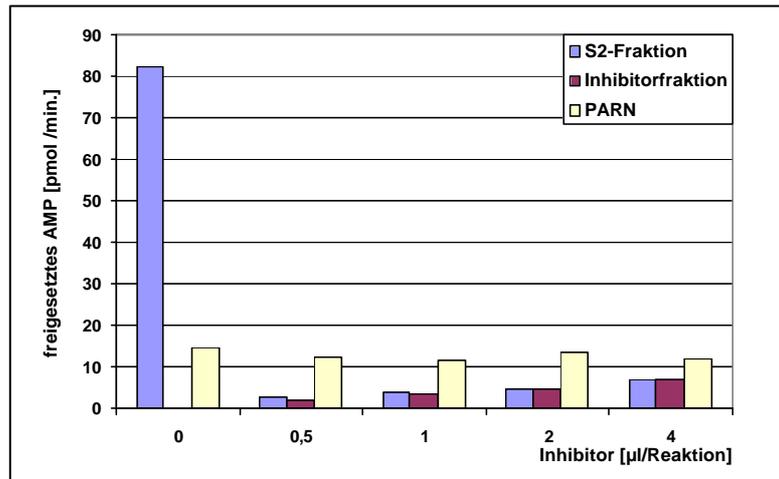


Abb. 3.6.1.1 Einfluss der Inhibitorfraktion 24 auf die Aktivität von humanem PARN und der Peakfraktion der 37°C-CXT-Fraktionierung. In einem 50 µl-Standard-Deadenylierungsassay wurden je 2 µl der Fraktion 7 und 100 fmol rekombinanten hPARNs mit 1 µg Poly(A) und den angegebenen Mengen der Inhibitorfraktion 5 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch TCA-Zugabe gestoppt. Nach der TCA-Fällung wurde die Radioaktivität im Überstand gemessen und die Menge an freigesetztem AMP bestimmt. Die Aktivität ist in Abhängigkeit des Volumens der Inhibitorfraktion aufgetragen.

Der Zusatz von kleinen Mengen (0,5 µl) des Inhibitors zu der Drosophilanuklease hatte deren vollständige Hemmung zur Folge. Die gemessene Aktivität entsprach der der Inhibitorfraktion alleine. PARN ließ sich selbst mit relativ hohen Mengen der Inhibitorfraktion nicht hemmen, obwohl auch hier die gemessene Aktivität nicht der Summe der Aktivität der Einzelerperimente entsprach, sondern geringer war. Die Aktivität blieb weitestgehend konstant, unabhängig von der Inhibitormenge.

Weil die Inhibierung spezifisch für die beiden Drosophila-Nukleasen war, lässt sich fast ausschließen, dass es sich um eine unspezifische Hemmung durch ein Poly(A)-bindendes Protein handelt, oder durch RNAs, die mit dem radioaktiv markierten Substrat konkurrieren könnten. Ob es sich bei dem Inhibitor um ein Protein handelt, ist bisher nicht bekannt. Nach einer Inkubation der 1:100 verdünnten Fraktion von 15 min bei 95°C, sank die Aktivität nur um etwa 50%. Es könnte sich also um ein sehr hitzestabiles Protein handeln.

3.7 Beide Poly(A)-abbauende Enzyme besitzen 3'-Exonukleaseaktivität

Bei der Fraktionierung von cytoplasmatischem Extrakt, der aus S2-Zellen gewonnen wurde, die einem schweren Hitzeschock von 2 h bei 37°C unterzogen worden waren, ließ sich eine Nukleaseaktivität nachweisen, die nicht mit dem CCR4/NOT-Komplex assoziiert war (3.5.2). Der Nachweis der Aktivität erfolgte durch Abbau von homogen markiertem Poly(A) und Messung des freigesetzten AMP. Mit dieser Methode lässt sich nicht klären, ob der Abbau

endo- oder exonukleolytisch erfolgt. Diese Frage sollte durch die Inkubation der aktiven Fraktionen der DEAE-Säulen mit polyadenylierter und mit einem 5'-cap versehener RNA, die in ihrem Nicht-Poly(A)-Anteil radioaktiv markiert war (2.2.20.2), nachgewiesen werden. In den Aktivitätstest wurden gleiche Aktivitätsmengen eingesetzt. Die Produkte der Reaktion wurden auf einem Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt und über einen PhosphorImager dargestellt.

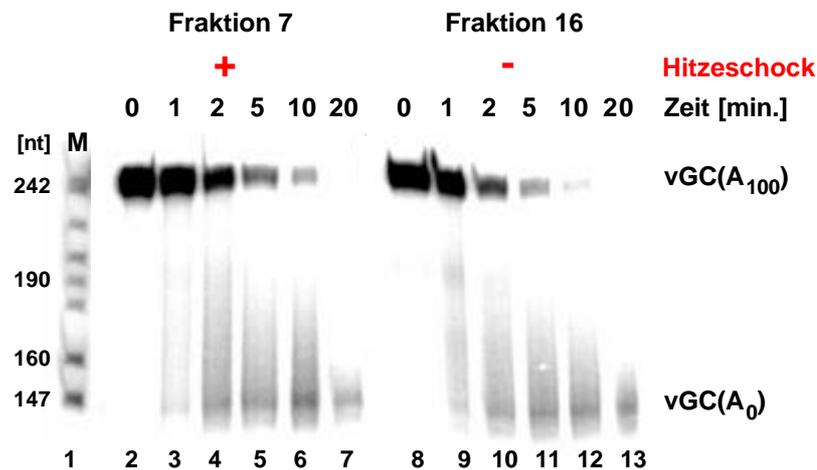


Abb. 3.6.1.1 Kinetik der Deadenylierung von vGC-RNA durch Fraktion 7 der Fraktionierung des 37°C-CXT und Fraktion 16 der 26°C-CXT-Fraktionierung. 0,66 μ l Fraktion 7 bzw. 1 μ l der Fraktion 16 wurden in einer 20 μ l-Reaktion in Standard-Deadenylierungspuffer (2.2.21.1) mit 2 pmol polyadenylierter vGC-RNA und 10 U RNasin auf Eis gemischt. Sofort nach Enzymzugabe wurden 3 μ l entnommen und in 5 μ l Formamid-Ladepuffer abgestoppt. Die Inkubation wurde durch Transfer auf 30°C gestartet und zu den angegebenen Zeitpunkten Aliquots entnommen und ebenfalls in Ladepuffer abgestoppt. Die RNA wurde auf einem 5%-igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. In Spur 1 ist ein Standard aufgetragen.

Die eingesetzte RNA besaß zu Beginn der Reaktion einen Poly(A)-Schwanz von etwa 100 Nukleotiden (Spuren 2 und 8). Im Verlauf der Inkubation mit den Fraktionen nahm die Menge an Substrat kontinuierlich ab, während schon nach einer Minute Reaktionszeit das Auftreten einer Bande bei ca. 145 Nukleotiden beobachtet werden konnte, welche der vollständig deadenylierten RNA entspricht. Nach 5 Minuten Reaktionszeit war bereits der Großteil der polyadenylierten RNA abgebaut (Spuren 5 und 11).

Die Reaktionen scheinen keinem einheitlichen Reaktionsmechanismus zu folgen; schon zu sehr frühen Zeitpunkten war vollständig deadenylierte RNA zu sehen, was auf eine prozessiv verlaufende Reaktion hinweist. Auf der anderen Seite waren Zwischenprodukte der Deadenylierung zu erkennen, die im Laufe der Zeit verkürzt wurden und als Schmier zwischen 220 und 150 Nukleotiden zu sehen war. Dieses entspräche eher einer distributiven Reaktionsweise. Ein Unterschied zwischen den beiden Enzymen konnte nicht festgestellt werden.

3.8 Die zwei Deadenylylasen besitzen unterschiedliche Eigenschaften

Nachdem gezeigt werden konnte, dass sowohl die CAF/CCR4-assoziierte Nuklease als auch die „Hitzeschock-Nuklease“ 3'-Exonukleaseaktivität besitzen, sollten diese beiden Aktivitäten hinsichtlich einiger Reaktionsparameter untersucht werden. Es wurde die Aktivität in Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration und der KCl-Konzentration sowie die Aktivierbarkeit durch Spermidin untersucht. In unterschiedlichen TCA-Fällungsexperimenten wurden die beiden Fraktionen mit der größten Aktivität mit radioaktiv markiertem Poly(A) inkubiert (2.2.21.1) und nach der Reaktion die Menge an entstandenem TCA-löslichen AMP ermittelt (Abb. 3.6.1.1).

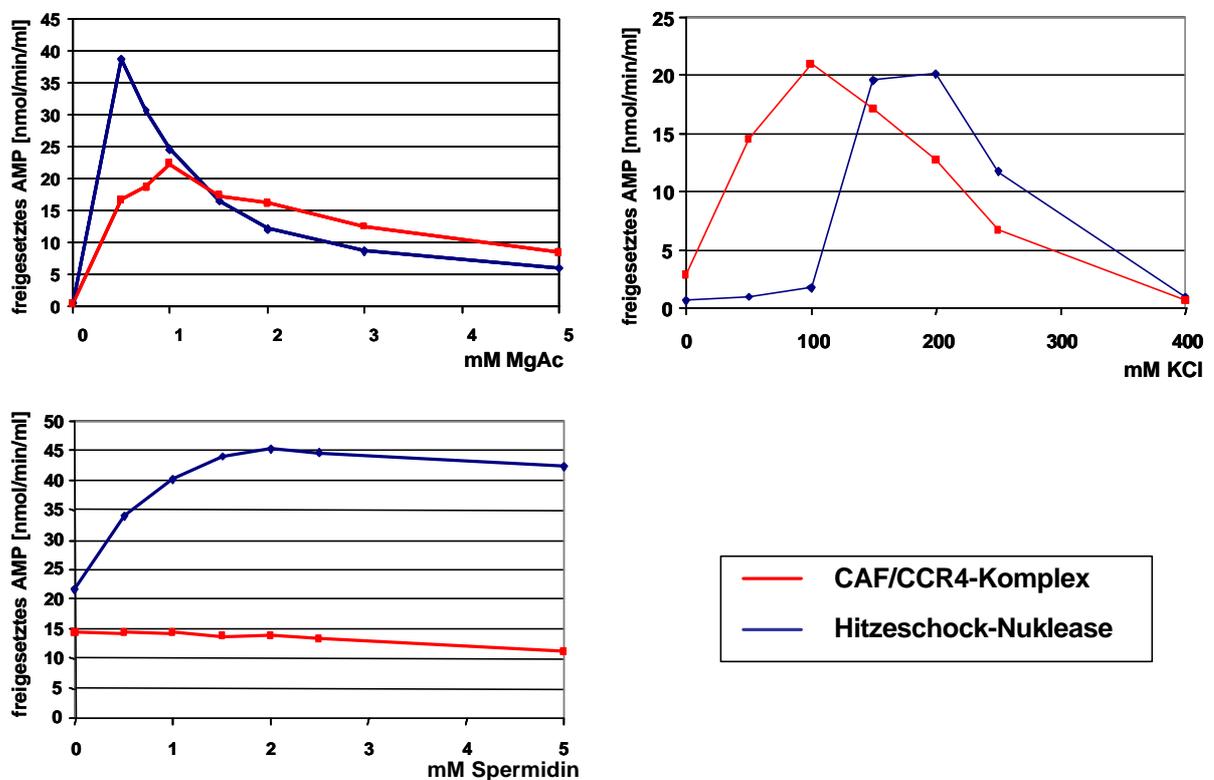


Abb. 3.6.1.1 Bestimmung der Mg^{2+} - und KCl-Optima und der Aktivierbarkeit durch Spermidin der beiden Deadenylylasen. Je 0,66 μ l Fraktion 7 (37°C-CXT-Fraktionierung) bzw. 1 μ l Fraktion 16 (25°C-CXT-Fraktionierung) wurden in 50 μ l Deadenylierungspuffer mit 1 μ g Poly(A) 10 min inkubiert. Die Reaktionen wurden als Vielfaches, ohne die zu testende Substanz, auf Eis gemischt, der Ansatz geteilt, die entsprechende Menge an MgAc, KCl oder Spermidin hinzugefügt und die Reaktion durch Transfer auf 30°C gestartet. Nach einer TCA-Fällung wurde die Radioaktivität im Überstand der Fällung bestimmt und die Menge an freigesetztem AMP berechnet. Die Menge an freigesetztem AMP/min/ml Fraktion ist gegen die Konzentration der getesteten Substanz aufgetragen.

Zur Ermittlung der für die Reaktionen optimalen Magnesiumkonzentrationen wurden Magnesiumacetatkonzentrationen zwischen 0 und 5 mM eingesetzt. Beide Enzyme waren ohne Zusatz von Magnesium inaktiv. Sie unterschieden sich sehr in ihrem Magnesium-

abhängigen Aktivitätsprofil; die CAF/CCR4-assoziierte Nuklease hatte ein breites Optimum zwischen 0,5 mM und 2 mM Magnesium, während die „Hitzeschock-Nuklease“ bei Zusatz von 0,5 mM Magnesium sehr aktiviert wurde, und Zusatz höherer Konzentrationen die Aktivität wieder reduzierte.

Neben dem Magnesiumoptimum sollte auch das KCl-Optimum für die beiden Enzyme im Bereich zwischen 0 und 400 mM untersucht werden. Ohne zusätzliches Salz wurden durch den Zusatz der Proteinfractionen ungefähr 2 mM KCl im Reaktionsansatz erreicht. Bei diesen Konzentrationen waren beide Nucleasen fast inaktiv. Die Aktivität der CAF/CCR4-Nuklease stieg fast linear mit Erhöhung der KCl-Konzentration bis 100 mM und sank wiederum fast linear bei weiterer Erhöhung der Salzkonzentration. Die „Hitzeschock-Nuklease“ dagegen war bis zu 100 mM KCl fast völlig inaktiv. Eine Erhöhung der KCl-Konzentration auf 150 mM-200 mM bewirkte eine maximale Aktivierung der Nuklease. Auch hier führte eine weitere Erhöhung der KCl-Konzentration zu einer Abnahme der Aktivität.

In Gegenwart von KCl lässt sich die humane Deadenylase PARN durch Zusatz von Spermidin stimulieren und ist nur mit Spermidin aktiver als mit KCl (Körner and Wahle, 1997). Auch die Hefe-Deadenylase PAN2/PAN3 lässt sich in Abwesenheit von Pab1p durch Zugabe von Spermidin effizient stimulieren (Sachs and Deardorff, 1992). Dieses sollte auch für die beiden *Drosophila*-Deadenylasen untersucht werden. Die Aktivität wurde in Gegenwart von 150 mM KCl und Spermidinkonzentrationen zwischen 0 und 5 mM gemessen. Der Zusatz von Spermidin hatte auf die Aktivität der CAF/CCR4-assoziierten Nuklease keinen stimulierenden Effekt. Die Aktivität der „Hitzeschock-Nuklease“ ließ sich durch den Zusatz von Spermidin stimulieren. Bei Zusatz von 2 mM Spermidin verdoppelte sich die Aktivität.

Bei den beiden gefundenen Aktivitäten handelt es sich also um unterschiedliche Enzyme, die sich in den benötigten Reaktionsbedingungen stark voneinander unterscheiden. Es bleibt zu untersuchen, welches Enzym oder welcher Enzymkomplex für die Hitzeschock-Aktivität verantwortlich ist, und wie die Induktion der Expression in der Zelle reguliert wird.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Bedeutung des CCR4/NOT-Komplexes, bzw. zweier seiner Komponenten, Pop2p (=Caf1p) und Ccr4p für die Deadenylierung von mRNAs sowohl in *S. cerevisiae* als auch in *D. melanogaster* untersucht. Während diese Arbeit entstand, publizierten Tucker *et al.* und Daugeron *et al.*, dass der CCR4/NOT-Komplex die vorherrschende Nuklease in *S. cerevisiae* darstellt und für die Deadenylierung von mRNAs verantwortlich ist (Daugeron *et al.*, 2001; Tucker *et al.*, 2002). Ihre Ergebnisse deckten sich im Wesentlichen mit den hier in der Arbeit dargestellten.

4.1 Der CCR4/NOT-Komplex aus *S. cerevisiae*

Pop2p (=Caf1p) ist in *S. cerevisiae* das Protein mit der besten Homologie zu der aus Säugern gereinigten Poly(A)-spezifischen Nuklease PARN (Daugeron *et al.*, 2001). Deswegen wurde untersucht, ob Pop2p in die Deadenylierung involviert ist.

Pop2p ist ein Bestandteil des CCR4/NOT-Komplexes. Dieser wurde bisher als Regulator der Transkription beschrieben (siehe Einleitung). Erst vor kurzem wurde er als die wesentliche deadenylierende Aktivität in *S. cerevisiae* identifiziert. Zwei der neun Hauptkomponenten, Pop2p (=Caf1p) und Ccr4p besitzen Nukleasedomänen und könnten somit die eigentliche katalytische Aktivität darstellen (Dupressoir *et al.*, 2001; Moser *et al.*, 1997).

4.1.1 Die Rolle von Pop2p im CCR4/NOT-Komplex

Zunächst wurde untersucht, welcher Phänotyp durch die *pop2*-Deletion hervorgerufen wird. Nach dem Ersetzen des Gens in zwei haploiden Hefestämmen durch eine Kan-Kassette war das Wachstum der Mutanten stark vermindert (3.1.1). Dieser Phänotyp wurde bereits 1992 für eine *pop2*-Deletion beschrieben (Sakai *et al.*, 1992). In den *pop2*[?]-Stämmen (=PGK promotor directed overproduction) wurde eine fehlende Glucose-Derepression beobachtet, d.h. Genexpression, die normalerweise durch die Anwesenheit von Glukose im Medium ausgeschaltet wird, blieb weiter aktiv (Sakai *et al.*, 1992). Außerdem waren die homozygoten diploiden Zellen sporulationsunfähig. In dieser Arbeit wurde bereits beschrieben, dass die *steady-state*-Konzentration des PGK-Genproduktes in *pop2*[?]-Stämmen in der stationären Wachstumsphase 5-10 fach erhöht war, während die Konzentration der URA3-mRNA unverändert blieb. Die Autoren zogen daraus zwei mögliche Schlüsse, nämlich dass entweder die Transkription erhöht war, oder dass die mRNA in den Deletionsstämmen stabiler war.

Um der Frage nachzugehen, ob die in *pop2?*-Stämmen beobachtete erhöhte Transkriptmenge auf eine erhöhte mRNA-Stabilität als Folge verminderter Deadenylierung zurückzuführen ist, wurde die *steady-state*-Poly(A)-Schwanzlänge in den haploiden Hefen während der logarithmischen Wachstumsphase untersucht (3.1.2). Es wurde eine Erhöhung der Poly(A)-Menge in den *pop2?*-Stämmen sowie eine leichte Verlängerung der Poly(A)-Schwänze beobachtet. Die Poly(A)-Schwänze haben in Wildtyp-Stämmen eine Länge zwischen 12 und 75 Nukleotiden (Decker and Parker, 1993). In *pop2?*-Stämmen wurden dagegen auch Poly(A)-Schwänze von mehr als 90 Nukleotiden Länge beobachtet. Tucker et al. konnten durch transkriptionale *pulse-chase*-Experimente zeigen, dass auch die Rate der Deadenylierung von PGK- und MFA- Reporter-mRNAs in *pop2?* -Stämmen gegenüber dem Wildtyp verlangsamt ist (Tucker et al., 2002). Eine Verlängerung der Poly(A)-Schwänze konnte auch bei der Untersuchung der Deadenylierung einer MFA-Reporter-mRNA *in vivo* beobachtet werden (Daugeron et al., 2001). Eine *ccr4*-Deletion zeigt den gleichen Phänotyp wie die *pop2*-Deletion. Auch bei einer Deletion beider Gene kann noch Deadenylierungsaktivität *in vivo* beobachtet werden. Die restliche Deadenylaseaktivität wird wahrscheinlich durch den PAN-Komplex hervorgerufen. Eine gleichzeitige Deletion von CCR4 und PAN2 verhinderte die Deadenylierung *in vivo* komplett (Tucker et al., 2002).

Wie bereits oben erwähnt, ist Pop2p ein Mitglied der RNase D-Familie der Exonukleasen. Es wurde durch BLAST-Analysen gegen hPARN identifiziert (Daugeron et al., 2001). Die katalytischen Aminosäuren der drei sogenannten Exomotive umfassen einen Aspartatrest, der von einem Glutamatrest gefolgt wird (D-X-E) im Exo-Motiv I, einen Aspartatrest im Exo-Motiv II und im Exo-Motiv III einen Histidin- und einem Aspartatrest (H-X-X-X-D) (Moser et al., 1997; Zuo and Deutscher, 2001). Im Pop2-Protein sind nur zwei der fünf katalytischen Aminosäuren konserviert. Das Aspartat im Exo-Motiv I ist durch ein Serin ersetzt. Die katalytischen Aminosäuren des Exo-Motivs III scheinen ganz zu fehlen. Das Exo-Motiv II besitzt eine nicht-kanonische Sequenz, die für Pop2p und die homologen Proteine aus anderen Eukaryoten charakteristisch ist. Das *S. cerevisiae*-Protein besitzt als einziges eine sehr glutaminreiche, N-terminale Sequenz, die in keinem Homolog vorhanden und für die Funktion entbehrlich ist (Shimizu-Yoshida et al., 1999). Pop2p konnte als N-terminal verkürzte Variante in *E. coli* überexprimiert und gereinigt werden und zeigte eine deadenylierende Aktivität *in vitro* (Daugeron et al., 2001). Erst kürzlich wurde die Kristallstruktur der Exonukleasedomäne von Pop2p mit einer Auflösung von 2,3 Å aufgeklärt. Die Struktur ähnelt sehr der Exonukleasedomäne der DNA-Polymerase I und der Epsilon-Untereinheit der DNA-Polymerase III (Pol. IIIe), obwohl die Sequenzidentität nur

15-20 % beträgt. 6 β -Faltblätter bilden den Kern der Struktur, die von den 13 α -Helices flankiert werden. In der Mitte entsteht so eine stark negativ geladene „Grube“, die das aktive Zentrum darstellt. Aufgrund der Sequenzunterschiede im Exo-Motiv I ist die negative Ladung im aktiven Zentrum geringer als bei Pol. IIIe. Es könnte daher sein, dass Pop2p nur ein Mg^{2+} -Atom bindet und nach einem anderen Katalysemechanismus arbeitet (Thore et al., 2003).

Die beiden in Pop2p enthaltenen katalytischen Aminosäuren wurden mutiert und die Auswirkung auf das Wachstum der Hefen sowie auf die Länge der Poly(A)-Schwänze untersucht (3.1.7). Es stellte sich heraus, dass sich weder die Mutation eines der beiden Exo-Motive noch die kombinierte Mutation beider Exo-Motive auf die Teilungsrate oder die durchschnittliche Länge der Poly(A)-Schwänze auswirkte. *In vitro* war jedoch eine Verminderung der Deadenylaseaktivität des Proteins, das im Exo-Motiv II mutiert war, zu sehen (B. Seraphin, persönliche Mitteilung). Auch im Zuge der Kristallisation von Pop2p konnte gezeigt werden, dass das rekombinante N-terminal verkürzte Protein Poly(A)-spezifische Nukleaseaktivität besitzt, die durch die Mutationen S44A und E46A im Exo-Motiv I verloren geht (Thore et al., 2003).

Da die in dieser Arbeit beschriebene Mutation in einem Wildtyp-Stamm und nicht in einem *ccr4?*-Stamm durchgeführt wurde, ist vermutlich die Aktivität von Ccr4p der Grund dafür, dass die *pop2*-Mutation keine Auswirkung auf die *in vivo*-Poly(A)-Schwanzlänge hatte. Die Untersuchungen in den Laboren von C. Denis und R. Parker zeigten ebenfalls, dass Ccr4p die bedeutendere Nukleaseaktivität im CCR4/NOT-Komplex darstellt. Sie konnten zeigen, dass der Komplex keine Aktivität besaß, wenn er über FLAG-Pop2p aus einem *ccr4?*-Stamm isoliert wurde (Tucker et al., 2001b). Weiterhin konnte der *pop2?*-Phänotyp durch POP2-Gene, die Punktmutationen der Exo-Domäne trugen, komplementiert werden (Chen et al., 2002). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine Ccr4p-Überexpression in einem *pop2?*-Stamm den Deadenylierungsendpunkt-Defekt, d.h. die längeren Poly(A)-Schwänze bei Ende der Reaktion, supprimieren kann. Im entgegengesetzten Fall war dies nicht möglich. Ebenso konnte kein Unterschied in der Deadenylierungsrate zwischen einem aus wt-Zellen isolierten FLAG-Ccr4p und einem aus *pop2?*-Zellen gereinigten FLAG-Ccr4p beobachtet werden (Chen et al., 2002; Tucker et al., 2002). Rekombinant hergestelltes Ccr4p besitzt, wie rekombinantes Pop2p, Deadenylaseaktivität *in vitro*. Nach Mutation der oben erwähnten katalytischen Reste war keine Aktivität mehr messbar (Chen et al., 2002; Tucker et al., 2002). Für die katalytische Aktivität von Ccr4p scheinen sowohl Pop2p als auch die Not-Proteine entbehrlich zu sein (Tucker et al., 2002).

4.1.2 Die Deadenylierung von mRNA durch den CCR4/NOT-Komplex

Auch *in vitro* wurde die deadenylierende Aktivität des CCR4/NOT-Komplexes nachgewiesen. Der mit Hilfe der TAP-tag-Methode (Puig et al., 2001b) gereinigte Komplex zeigte sowohl auf reinem Poly(A) als auch auf polyadenylierter mRNA Nukleaseaktivität (3.1.4). Die Nuklease scheint dabei streng Poly(A)-spezifisch zu sein, was an der Akkumulation der vollständig deadenylierten β -Globin-mRNA zu erkennen ist (3.1.4). *In vivo* wird die mRNA bis zu einer Länge von 10-12 Nukleotiden deadenyliert, bevor sie von anderen Enzymen weiter vom 5'-Ende her abgebaut wird (Decker and Parker, 1993). In Zellen, in denen POP2 oder CCR4 deletiert sind, ist der Endpunkt der Deadenylierung in Richtung der längeren Poly(A)-Schwänze verschoben. Die kürzesten Poly(A)-Schwänze der Reporter-mRNAs MFA2pG und pGK1pG waren 20-26 Nukleotide für *ccr4?*- bzw. 14-20 Nukleotide für *pop2?*-Stämme (Tucker et al., 2001b). Diese nicht vollständige Deadenylierung *in vivo* lässt sich nicht durch die Spezifität der Deadenylase begründen, da sie *in vitro* in der Lage ist, vollständig deadenylierte RNA zu produzieren. Ein Grund für die verbleibenden kurzen Poly(A)-Schwänze *in vivo* könnte der weitere Abbau der Transkripte vom 5'-Ende her sein. Wenn der Poly(A)-Schwanz auf eine Länge von ca. 12 Nukleotiden verkürzt wurde, kann Pab1p nicht mehr binden (Sachs et al., 1987) und die Inhibierung des *decapping* durch Pab1p (Caponigro and Parker, 1995; Decker and Parker, 1993; Muhrad et al., 1994) wird aufgehoben. Der weitere Abbau kann dann schnell vom 5'-Ende her erfolgen. Das Produkt der Deadenylierungsreaktion ist 5'-AMP. Dieses konnte durch dünnschichtchromatographische Analyse der Spaltprodukte ermittelt werden (3.1.5). Die Spaltung erfolgt also hydrolytisch. Der Mechanismus ist wahrscheinlich gleich dem anderer 3'-5'-Exonukleasen. Wahrscheinlich wird Mg^{2+} verwendet, um Wasser für einen Angriff auf die Phosphodiesterbindung zu aktivieren. Das Produkt dieser Reaktion ist ein freies 3'-OH-Ende und ein 5'-Phosphat. Zu den Mg-abhängigen Nukleasen gehören unter anderem die RNase II aus *E.coli*, die für mehr als 95 % der deadenylierenden Aktivität in der Zelle verantwortlich ist (Deutscher and Reuven, 1991), die humane PARN (Körner and Wahle, 1997) und verschiedene Untereinheiten des Exosoms wie z.B. Rrp4p und Rrp40p, das RNase II-Homologe Rrp44p oder das nukleäre Rrp6p, das Homologie zur RNase D zeigt (Mitchell et al., 1997; van Hoof and Parker, 1999). Da auch Pop2p in die Familie der Nukleasen vom RNase D-Typ eingeordnet wurde, sind die Produkte mit einer durch Pop2p katalysierte Reaktion konsistent (Moser et al., 1997).

Ccr4p, das zweite Protein, das für die Katalyse verantwortlich sein kann, gehört ebenfalls in eine Nukleasefamilie, die der Mg^{2+} -abhängigen Endonukleasen. Weitere Mitglieder dieser

Familie sind die bovine DNase I (Suck and Oefner, 1986), Exonuclease III aus *E. coli* und das humane APE1 (Mol et al., 1995). Die beiden letzteren reparieren abasische Stellen in der DNA und besitzen zudem noch 3'-Phosphodiesterase-Aktivität, 3'-Phosphomonoesterase-Aktivität, RNaseH-Aktivität und eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität (Barziley et al., 1995; Gorman et al., 1997; Lucas et al., 1999; Nguyen et al., 2000). Auch Sphingomyelinasen und Inositol-Polyphosphat-5'-Phosphatasen wurden vor kurzem als in diese Gruppe gehörend identifiziert (Dlakic, 2000; Whisstock et al., 2000). Für APE1 ist der Reaktionsmechanismus bekannt. Aminosäurereste aller fünf konservierten Motive sind an der Katalyse beteiligt (Mol et al., 2000; Wilson et al., 1997). Auch Ccr4p besitzt eine 3'-5'-Exoribonucleaseaktivität und eine ss-DNase-Aktivität mit einer Präferenz für Poly(A) als Substrat. Das Produkt ist auch hier 5'-AMP. Punktmutationen in Resten der konservierten Motive inaktivieren das Enzym *in vivo*. Nur die Mutation in Motiv IV, das wahrscheinlich nur indirekt an der Katalyse beteiligt ist, zeigt eine signifikante Restaktivität (Chen et al., 2002; Tucker et al., 2002).

Ist Ccr4p auch in dem durch den TAP-tag isolierten CCR4/NOT-Komplex aktiv, sollte einzelsträngige DNA ebenfalls als Substrat dienen können. Da der isolierte Komplex sehr instabil war und selbst bei Lagerung bei -80°C schnell an Aktivität verlor, war diese Untersuchung nicht mehr möglich.

4.1.3 Der Einfluss von Pab1p auf die Deadenylierungsreaktion

Pab1p wurde bereits als Aktivator der Deadenylierung von mRNA in Hefe beschrieben, der die Nuklease PAN stimuliert (Sachs and Deardorff, 1992). Ebenfalls wurde gezeigt, dass das humane PABC1 die Nuklease PARN, die bei niedrigen Salzkonzentrationen in Abwesenheit von Spermidin inaktiv ist, *in vitro* stimulieren kann. Das nukleäre PABN1 war nicht in der Lage PARN zu stimulieren (Körner and Wahle, 1997). Bei annähernd physiologischen Salzkonzentrationen von 120 mM KAc wird PARN durch Zugabe von PABC1 partiell gehemmt. Dabei wird beim Abbau poladenylierter RNA ein charakteristisches Abbaumuster produziert, dessen Intermediate sich um ca. 30 Nukleotide in ihrer Länge unterscheiden, was der Bedeckungslänge eines PABC1-Moleküls auf Poly(A) entspricht (Körner et al., 1998). Pab1p inhibiert ebenfalls die Deadenylierung von mRNA in *Xenopus*-Oocyten (Wormington et al., 1996)

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass auch der CCR4/NOT-Komplex *in vitro* durch rekombinantes Pab1p inhibiert wird (3.1.6). Diese Beobachtung machten auch Tucker *et al.* mit FLAG-tag-gereinigtem Ccr4p. Bei 10-fachem Überschuss von Pab1p über Ccr4p war die Deadenylierung signifikant verlangsamt (Tucker et al., 2002). Da die in dieser Arbeit

verwendeten Konzentrationen des Komplexes nicht bekannt waren, kann leider kein Vergleich der Effektivität der Hemmung gemacht werden. Wahrscheinlich ist das Verhältnis zwischen Pab1p und Nuklease aber nicht relevant, sondern das Verhältnis Pab1p:RNA. Außerdem wurde gezeigt, dass für eine Stimulierung von PARN die PABC1-Konzentration nahe des K_D für die PABC1-Oligo(A)-Interaktion liegen muss (Körner and Wahle, 1997). Im Gegensatz zu der Deadenylierung durch hPARN in Anwesenheit von PABC1 konnte bei der Deadenylierung durch den CCR4/NOT-Komplex das charakteristische Muster an Intermediaten nicht beobachtet werden, welches durch die Bindung von PABC1 an den Poly(A)-Schwanz herrührt. Auch Tucker *et al.* konnten dieses Muster nicht beobachten, so dass es nicht nur durch die Bedeckung des Poly(A)-Schwanzes durch Pab1p herrühren, sondern spezifisch für die entsprechende Nuklease sein könnte.

4.2 Der CCR4/NOT-Komplex ist in höheren Eukaryoten konserviert

Die Deadenylierung ist ein wichtiger Prozess bei der Regulation der mRNA-Stabilität. In *D. melanogaster* wie auch in anderen höheren Eukaryoten spielt sie auch eine wichtige Rolle bei der Translationsregulation in der Embryogenese, wo die Expression der maternalen mRNAs über die Länge ihrer Poly(A)-Schwänze reguliert wird (Richter, 1996). In *Xenopus*-Oocyten ist die Nuklease PARN für die Deadenylierung maternaler mRNAs verantwortlich (Körner et al., 1998). In *D. melanogaster* wird z.B. die Deadenylierung der *hunchback*-mRNA im posterioren Pol des Embryos durch die Proteine *Nanos* und *Pumilio* gefördert, was eine verminderte Translation der *hunchback*-mRNA im posterioren Pol zur Folge hat und eine asymmetrische Verteilung des Proteins im Embryo verursacht (Wreden et al., 1997).

Bislang ist noch keine Deadenylase in *D. melanogaster* beschrieben worden. Nachdem die Sequenzierung des *Drosophila*-Genoms abgeschlossen war, wurden über Datenbankrecherchen Homologe zu PARN gesucht. Obwohl diese Nuklease nicht nur in Säugern, sondern auch in *S. pombe*, *C. elegans* und *A. thaliana* Homologe zu haben scheint, konnte in *D. melanogaster* keine entsprechende Sequenz gefunden werden. Über Datenbankrecherchen konnten jedoch Homologe zu acht der neun *core*-Komponenten des CCR4/NOT-Komplexes, gefunden werden (3.2). Nur yCaf130p scheint kein Homolog in *D. melanogaster* zu haben. Ein yCaf130-Homolog konnte auch in keinem anderen Genom eines höheren Eukaryoten ausgemacht werden. Dagegen konnten in der Zwischenzeit Homologe des CCR4/NOT-Komplexes auch im humanen Genom identifiziert werden (Albert et al., 2000; Gavin et al., 2002). Zwischen den *Drosophila*- und den humanen Proteinen gibt es eine größere Ähnlichkeit als zwischen den *Drosophila*- und den Hefe-Proteinen.

Im yPop2p-Homolog dCAF1 ist vor allem die Exonuklease-Domäne konserviert. Dem *Drosophila*- wie auch dem humanen Protein fehlt der lange glutaminreiche N-Terminus. Dieser ist in Hefezellen in die Regulation des Glukosestoffwechsels involviert. Am Threonin 97 wird Pop2p durch die Proteinkinase Yak1p in Antwort auf einen Mangel an Glukose phosphoryliert. Diese Phosphorylierung führt zu einem Zellzyklusarrest (Moriya et al., 2001). Die Pop2p-Homologe aus höheren Eukaryoten zeigen eine bessere Konservierung der katalytischen Reste der Exonukleasedomäne der Nukleasen der RNase D-Familie. Als solche sind sowohl yPop2p als auch das *Drosophila*-Homologe bereits vor Jahren identifiziert worden (Moser et al., 1997). Im humanen Genom gibt es neben CAF1 noch ein weiteres CAF-Protein, welches als CALIF (=CAF-like) bezeichnet wird und zu CAF1 auf Aminosäureebene zu 75 % identisch ist (Albert et al., 2000). Das Expressionsmuster unterscheidet sich jedoch voneinander: Während hCALIF stark in Gehirn, Placenta und Niere exprimiert wird, wird CAF1 vor allem in der Skelettmuskulatur, im Herzen, im Testis und in den Ovarien exprimiert. hCALIF ist in der Lage, den yPop2p-Phänotyp zu komplementieren, und interagiert mit CCR4 über dessen *leucine-rich-repeat*. Für das murine CAF1 konnte in diesem Zusammenhang keine Interaktion mit dem CCR4/NOT-Komplex gezeigt werden, so dass CALIF als das „wahre“ Homologe angesehen wird (Albert et al., 2000). Allerdings wurden sowohl CAF1 als auch CALIF bei der TAP-Reinigung des humanen CCR4/NOT-Komplexes über TAP-NOT2 gefunden (Gavin et al., 2002). Erst vor kurzem wurde gezeigt, dass das rekombinant exprimierte humane CAF1, wie yPop2p, *in vitro* Deadenylaseaktivität zeigt (B. Seraphin, persönliche Mitteilung). In *D. melanogaster* konnte nur ein Pop2p-Homolog gefunden werden, das die gleiche Homologie zu hCAF1 wie auch zu hCALIF zeigt. Ob es ebenfalls *in vitro* Nukleaseaktivität besitzt, konnte bislang nicht gezeigt werden. Auch CCR4 wurde, während diese Arbeit entstand, durch Datenbanksuchen mit dem Hefe-Protein in höheren Eukaryoten identifiziert. In *Drosophila* und auch in Maus, Mensch und *Xenopus* konnten vier CCR4-Familien identifiziert werden, von denen nur eine den konservierten *leucine-rich repeat* enthält und als das „wahre“ CCR4-Homologe angesehen wird (Dupressoir et al., 2001). Unter den Homologen der drei CCR4-Familien sind das *angel*- und das *nocturnin*-Protein. Sie enthalten alle die C-terminale Nukleasedomäne und zeigen in diesem Bereich eine starke Homologie untereinander. Alle beschriebenen yCcr4p-Homologe sind N-terminal verkürzt. Ihnen fehlt eine im Hefe-Protein enthaltene Domäne, die für die Aktivierung verantwortlich sein soll (Draper et al., 1994). Nocturnin besitzt ebenfalls Deadenylaseaktivität (Baggs and Green, 2003). Es wird zirkadian im Cytoplasma von Photorezeptorzellen in der Retina von *Xenopus laevis* exprimiert, wobei die größte Menge an

Protein zu Beginn der Nacht gefunden wird. Nocturnin degradiert Poly(A) spezifisch vom 3'-Ende her in Abhängigkeit von Magnesium-Ionen. Da keine Reaktionsintermediate gefunden wurden, scheint die Reaktion prozessiv abzulaufen. Gelfiltrationsexperimente zeigten, dass Nocturnin ebenfalls Bestandteil eines größeren Komplexes ist. Ein mögliches Substrat von Nocturnin ist die Vasopressin-mRNA, deren Poly(A)-Schwanzlänge über den Tag variiert. Die kürzeren Poly(A)-Schwänze werden während der Nacht gefunden (Baggs and Green, 2003).

Das NOT1-Protein scheint auch im *Drosophila*-Komplex eine zentrale Rolle einzunehmen, da die Proteinabschnitte, die im yNot1p für die Interaktionen mit anderen Mitgliedern des Komplexes benötigt werden, auch im dNOT1 konserviert sind. Not2p, Not4p und Not5p binden Not1p an dessen C-Terminus (Aminosäuren 1490-2108), Not3p bindet an den C- und N-Terminus von Not1p und Pop2p und Ccr4p interagieren mit Not1p über dessen Aminosäuren 667-1152 (Chen et al., 2001b). Auch in diesem Bereich ähneln sich das Hefe- und das *Drosophila*-Protein, so dass ähnliche Interaktionen auch im *Drosophila*-Komplex möglich wären.

Not2p aus Hefe ist weitaus kürzer als das entsprechende Homolog aus *Drosophila*, welches bereits 1998 als solches identifiziert und als *Regena* (*Rga*) bezeichnet wurde (Frolov et al., 1998). *Rga* ist im Gegensatz zu seinem Pendant in Hefe essentiell. Es wurde bei einer Suche nach autosomal rezessiv letalen P-Element-Insertionen, die mit dem *white*-locus interagieren, isoliert. *Rga* ist in die Regulation der Chromatinfunktion involviert, da es in der Lage ist, Positioneffekt-Variegation zu unterdrücken. Da es keine bekannte DNA-Bindedomäne enthält, ist eine direkte Interaktion mit dem Chromatin aber unwahrscheinlich. Frolov et al. postulierten, dass NOT2 über die Interaktion mit einem möglicherweise auch in *Drosophila* vorhandenen Komplex die Transkription reguliert. Neben der konservierten Domäne trägt *Rga* in seinem N-Terminus Polyglutamin-*repeats*, die charakteristisch für Transkriptionsfaktoren sind und für Protein-Protein-Wechselwirkungen dienen können (Frolov et al., 1998).

In der BDGP-Datenbank konnte nur eine *Drosophila*-Sequenz gefunden werden, die sowohl zum yNot3p als auch zum yNot5p Homologie zeigt. Da beide Hefeproteine auch untereinander eine ähnlich starke Homologie wie die zum *Drosophila*-Protein zeigen, könnte es sich um eine Redundanz handeln, die während der Evolution verloren gegangen ist. Auch bei der Identifikation der humanen Homologe des CCR4/NOT-Komplexes konnte nur ein humanes NOT3/NOT5-Protein identifiziert werden, das jedoch gegenüber dem Hefe-Not3p und dem *Drosophila*-Protein C-terminal verkürzt ist (Albert et al., 2000), also von seiner

Länge eher yNot5p entspricht, während das *Drosophila*-Homolog eher Not3p entspricht. Der konservierte N-Terminus enthält ein putatives *coiled-coil*-Motiv.

In Hefe scheint Not3p nicht so fest mit dem Komplex assoziiert zu sein. Es copräzipitiert zwar mit dem Komplex, ist in einer Gelfiltration jedoch nur als Monomer zu detektieren. NOT2 scheint dagegen im Komplex eine stabilisierende Funktion einzunehmen (Bai et al., 1999). In *not2*-Deletionsstämmen wurde eine Verminderung der Pop2p-Konzentration gefunden. Ebenso scheinen sich die Mengen von Not2p und Not5p gegenseitig zu beeinflussen: Wird eine der beiden Untereinheiten deletiert, ist das Level der jeweils anderen vermindert (Bai et al., 1999).

Not4p gehört zu der Klasse der RING-Finger-Proteine. Es besitzt in seinem N-Terminus eine RING-Domäne des ungewöhnlichen C4C4-Typs. Diese bindet Zinkatome, die für die korrekte Faltung des Proteins notwendig sind. Not4p besitzt Ubiquitin-Protein-Ligaseaktivität (E3-Aktivität). Die RING-Domäne ist für die Interaktion mit dem *ubiquitin-conjugating-enzyme* notwendig. Rekombinantes humanes NOT4 war aktiv in *in vitro* Ubiquitinierungsexperimenten. Als Substrate könnten die anderen Komponenten des Komplexes dienen oder nur transient assoziierte Proteine wie z.B. TFIID. Auch eine Autoubiquitinierung von NOT4 wurde gefunden (Albert et al., 2002). Von dem entsprechenden NOT4 aus humanen Zellen sind drei unterschiedlich lange Varianten bekannt. Die cDNAs besitzen den gleichen 5'-UTR, aber unterschiedlich lange 3'-UTR. Die Proteine unterscheiden sich ebenfalls in ihrer Länge. Bis zur Aminosäure 357 sind alle Proteine gleich, doch der C-Terminus ist verschieden. Die kurze Variante enthält am C-Terminus eine Sequenz, die ein Kern-Lokalisierungssignal darstellen könnte (Albert et al., 2000). In *Drosophila* scheint es nur eine Variante zu geben, die der längsten hNOT4-Variante entspricht. Das Kernlokalisierungssignal ist nicht vorhanden.

CAF40 ist das am besten konservierte Protein im CCR4/NOT-Komplex in *Drosophila*. yCaf40p und dCAF40 sind fast zu 60 % identisch. yCaf40p wurde in CCR4-Immunopräzipitaten gefunden und als Bestandteil des 1,0 MDa- und des 1,9 MDa-Komplexes identifiziert. Caf40p interagiert im Komplex mit Not1p, das durch das humane Protein ersetzbar ist, und zeigt mehr als 70 % Homologie zu RCD1 aus *S. pombe* (Chen et al., 2001b). Dieses Protein spielt in *S. pombe* eine Rolle bei der Kontrolle der Sexualentwicklung, die durch Stickstoffmangel induziert wird. Der molekulare Mechanismus, durch den RCD1 die Sexualentwicklung steuert, ist noch nicht geklärt. Homologe Proteine wurden auch in *Arabidopsis*, *C. elegans* und *H. sapiens* gefunden. RCD1 wird im Menschen ubiquitär exprimiert, besonders stark aber im Testis, in den Ovarien und im Thymus (Okazaki et al.,

1998). Auch im *D. melanogaster* existiert ein RCD1-Protein, das sich nur wenig von CAF40 unterscheidet. Seine Funktion ist bisher ungeklärt.

Der CCR4/NOT-Komplex scheint nicht nur in *H. sapiens*, sondern auch in *D. melanogaster* konserviert zu sein. Obwohl für die Hefe-Proteine zahlreiche Interaktionen durch Copräzipitation bzw. 2-Hybrid-Methoden nachgewiesen werden konnten, scheint die Zusammensetzung des Komplexes nicht statisch zu sein. In *D. melanogaster* sind zwar die homologen Proteine vorhanden, die wahrscheinlich ebenfalls in einem großen Komplex assoziiert sind. Bei der Fraktionierung von S2-CXT über eine Superose 6-Gelfiltrationssäule eluierten CAF und CCR4 schon sehr früh zwischen 2 und 0,5 mDa von der Säule. Während CCR4 auch in Fraktionen eluierte, die ungefähr dem Molekulargewicht des Monomers entsprachen, konnte CAF im Western Blot ausschließlich in den frühen Fraktionen der Säule, also als Bestandteil eines größeren Komplexes nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

RNAi-Experimente zeigten, dass der CCR4/NOT-Komplex auch in *Drosophila* in die Deadenylierung von mRNA involviert ist (3.4). Sowohl der *knock-down* von CAF als auch der der drei untersuchten NOT-Proteine hatten eine Verlängerung der Poly(A)-Schwänze in S2-Zellen zu Folge, wobei der *knock-down* von CAF den stärksten Effekt hatte. Überraschenderweise konnte bei einem RNAi-Experiment gegen CCR4 keine Verlängerung der Poly(A)-Schwänze gefunden werden. Dieses könnte zum einen daran liegen, dass die verbleibende Menge CCR4 für die Deadenylierung ausreichte, oder dass RNAi weniger effizient war. Die tatsächliche Effizienz des *knock-down* hätte durch quantitative *Western blots* eventuell abgeschätzt werden können. Weiterhin wurde nicht untersucht, ob die möglicherweise auch in *Drosophila* aktiven CCR4-Homologe *angel* und *nocturnin* bei einer CCR4-Deletion dessen Funktion übernehmen könnten (siehe oben). Es ist unwahrscheinlich, dass sie durch das RNAi-Experiment ebenfalls inaktiviert wurden, da die dsRNA gegen das 5'-Ende der CCR4-mRNA gerichtet war. Es ist auch möglich, dass dCCR4 nicht direkt an der Katalyse beteiligt ist, und die Aktivität des Komplexes durch den Verlust des Proteins nicht beeinträchtigt wird. Die Auswirkungen der noch nicht getesteten CCR4/NOT-Komplex-Mitglieder NOT4 und CAF40 auf die Poly(A)-Schwanzlänge und RNAi-Experimente mit verschiedenen Kombinationen werden die Relevanz der Proteine für die Deadenylierung in *Drosophila* weiter beleuchten.

4.3 Deadenylierung im *Drosophila*-CXT

In vitro wurde eine deadenylierende Aktivität in cytoplasmatischem Extrakt aus *Drosophila*-S2-Zellen nachgewiesen (3.2.2). Bei der Deadenylierung einer polyadenylierten RNA wurde keine ausgeprägte Akkumulation des vollständig deadenylierten Transkripts beobachtet, was darauf schließen lässt, dass weitere Nukleasen im Extrakt vorhanden sind, die den „Körper“ der RNA abbauen. Erst vor kurzem wurde die Reinigung des Exosoms aus *Drosophila* beschrieben (Forler et al., 2003). TAP-hRrp4p, eine der Untereinheiten des Exosoms, wurde in S2-Zellen exprimiert, das dRrp4p durch RNAi ausgeschaltet und der Komplex 5 Tage nach RNAi aus dem cytoplasmatischen Extrakt isoliert. Der *Drosophila*-Komplex enthielt alle *core*-Komponenten und weitere noch nicht identifizierte Proteine. Dieser Komplex aus 3'-5'-Exonukleasen könnte für den weiteren Abbau der deadenylierten Transkripte verantwortlich sein. Inkubiert man S2-CXT mit homogen markiertem Poly(A) und untersucht die Produkte, kann man neben AMP auch geringe Mengen an ADP nachweisen (Daten nicht gezeigt). Da das Exosom zum großen Teil phosphorolytische 3'-5'-Aktivitäten enthält (van Hoof and Parker, 1999), könnte dieses ein weiteres Indiz für die Beteiligung des Exosoms am beobachteten RNA-Abbau sein.

4.3.1 Fraktionierung von S2-CXT

Bei der Fraktionierung von S2-CXT über eine DEAE-Sepharose-Säule war zumindest eine deadenylierende Aktivität mit CAF1 und CCR4 assoziiert (3.3.1). Dabei korrelierten die gemessenen Aktivitäten nicht genau mit der Menge an Protein in den einzelnen Fraktionen. Die CAF- und CCR4-Protein-Maxima fielen bei der ersten Fraktionierung zusammen, waren jedoch bei den Fraktionierungen mit einem flacheren KCl-Gradienten leicht gegeneinander verschoben (3.3.5). Dieses könnte auf der einen Seite bedeuten, dass beide Proteine unabhängig voneinander an die DEAE-Säule binden oder dass der Komplex nicht besonders stabil ist, bzw. in unterschiedlichen Formen vorliegt. Da CAF1 und CCR4 sowohl im Hefekomplex als auch im humanen Komplex interagieren (siehe oben), ist die erste Möglichkeit unwahrscheinlich.

Ein Großteil der Aktivität fand sich auch im Durchfluss der Säulen wieder (3.3.5). Wurde dieser Durchfluss ein zweites Mal auf die Säule gegeben, konnte ein Großteil der Aktivität wiederum im Durchfluss gefunden werden, was eine Überladung der ersten Säule unwahrscheinlich macht. Es bleibt zu untersuchen, ob es sich bei der „Durchfluss-Nuklease“ um einen Teil der Aktivität handelt, die vor CAF1/CCR4 von der Säule eluiert oder um eine zusätzliche Aktivität.

Der Grund für die Verschiebung des CAF1-CCR4-Proteinmaximums relativ zum Aktivitätsmaximum scheint ein Inhibitor zu sein, der etwas später von der Säule eluiert (3.3.2). Beide Aktivitäten überlagern sich. Wenn ein flacherer Gradient für die Fraktionierung verwendet wird, scheint diese Überlappung der Aktivitäten aufgehoben zu sein (3.6). Der Inhibitor ist spezifisch für die Drosophila-Deadenylyasen (3.6.1). Die humane Nuklease PARN wird in ihrer Aktivität nur sehr wenig beeinflusst. Die Art des Inhibitors ist nicht bekannt. Durch Erhitzen auf 95°C ließ er sich nur um 50 % hemmen (Daten nicht gezeigt), was bedeutet, dass es sich um ein besonders hitzestabiles Protein, um eine Nukleinsäure (z.B. ein RNA-Molekül) oder um einen Co-Faktor handeln könnte. Falls es sich um ein Protein handelt, sollte sich dieses durch weitere Fraktionierungen reinigen lassen.

Die Anwesenheit des Inhibitors kann jedoch nicht die nach der Fraktionierung gefundene erhebliche Aktivitätszunahme im Vergleich zur Aktivität des Extraktes erklären. Ein zweiter Inhibitor konnte in den entsprechenden Säulen nicht gefunden werden. Eventuell könnte der zweite Inhibitor auch aus mehreren Untereinheiten bestehen, die während der Reinigung voneinander getrennt wurden und nur durch Kombination verschiedener Fraktionen aktiv werden können.

4.3.2 Die CAF1-CCR4-Interaktion

CAF1 und CCR4 eluieren gemeinsam in der Gelfiltration (3.3.3) und die deadenylierende Aktivität einer DEAE-Fraktion kann sowohl mit dem CAF1-Antikörper als auch mit dem CCR4-Antikörper depletiert werden (3.3.4). Ein direkter Nachweis der Interaktion durch Co-Immunpräzipitations-Experimente scheiterte bislang an einer fehlenden Nachweismöglichkeit der Proteine im *Western blot*. Da die Antikörper gegen beide Proteine aus dem Kaninchen stammen, wird auch der Antikörper, mit dem präzipitiert wird, von dem im *Western blot* benutzten sekundären Antikörper erkannt. Mögliche CAF1- bzw. CCR4-Signale werden von den durch die IgG-Ketten verursachten Signalen überlagert, da sich die Molekulargewichte nur wenig unterscheiden. Eine kovalente Kopplung der Antikörper an ein Trägermaterial könnte Abhilfe schaffen. Weiterhin wird versucht, dCAF mit einem *myc-tag* in S2-Zellen zu exprimieren und den Komplex mit monoklonalen *myc*-Antikörpern zu isolieren. Leider ist es bislang nicht gelungen, eine stabile Zelllinie zu produzieren. Das Material einer transienten Expression war für das Experiment nicht ausreichend.

4.4 Die Deadenylierung im Hitzeschock

Während eines Hitzeschocks kommt es zu einer Akkumulation von Hitzeschock-Proteinen in der Zelle, die durch Stress-induzierte Aktivierung auf der Ebene der Transkription, durch erhöhte mRNA-Stabilität, erhöhte Translation und erhöhte Proteinstabilität hervorgerufen wird (Lindquist and Craig, 1988). Hsp70 ist das abundanteste induzierbare Hitzeschock-Protein. Die Halbwertszeit der mRNA steigt von weniger als 15 Minuten im normalen Zustand auf mehrere Stunden unter Hitzeschock-Bedingungen. Während der Erholung von einem Hitzeschock wird die mRNA schnell wieder abgebaut (Petersen and Lindquist, 1989; Peterson and Lindquist, 1988). Um diese Phänomen *in vitro* zu untersuchen, wurde polyadenylierter Hsp70-3'-UTR mit cytoplasmatischem Extrakt aus normalen und Hitzeschock-S2-Zellen inkubiert (3.5.1). Der Hitzeschock-Extrakt war wie erwartet nicht in der Lage, den Hsp70-3'-UTR zu deadenylieren. Die Rate, mit der die Deadenylierung im S2-CXT stattfand, der keinem Hitzeschock ausgesetzt war, unterschied sich *in vitro* jedoch nicht zwischen dem Hsp70-3'-UTR und anderen, stabilen mRNAs wie z. B. Adh. Es konnte *in vitro* keine Abhängigkeit der Deadenylierung von der RNA-Sequenz beobachtet werden, auch wenn der Hsp70-3'-UTR *in vivo* ausreicht, die schnelle Deadenylierung unter normalen Bedingungen zu vermitteln (Dellavalle et al., 1994).

Überraschenderweise konnte bei der Fraktionierung von CXT aus S2-Zellen, die einem starken Hitzeschock ausgesetzt waren, eine deadenylierende Aktivität nachgewiesen werden (3.5.2). Warum die Aktivität im Extrakt nicht nachzuweisen war, konnte bislang nicht ermittelt werden. Eine solche Aktivität in Hitzeschock-Zellen war jedoch zu erwarten: Bei einem längeren Hitzeschock werden Deadenylierung und Abbau von Hsp70-mRNA entkoppelt. Die Transkripte werden zwar deadenyliert, nicht aber weiter abgebaut. Dieses könnte ein Schutz vor dem toxischen Effekt zu großer Mengen des Proteins sein, wenn hohe Temperaturen den Abbau der mRNA verhindern (Dellavalle et al., 1994).

Die Hsp70-Transkripte werden während der Erholung von einem Hitzeschock schnell wieder abgebaut, und dieses wird durch eine schnelle Deadenylierung eingeleitet (Dellavalle et al., 1994). Bei der Untersuchung der Deadenylierung der Hsp70-mRNA *in vivo* während der Erholung von einem Hitzeschock durch den *PAT-assay* wurden diese Ergebnisse bestätigt (3.4.4.1). Auch bei den hier durchgeführten Experimenten konnte die Induktion der hsp70-mRNA durch Hitzeschock und deren schnelle Deadenylierung in der Erholungsphase, abhängig von der Länge und der Stärke des Hitzeschocks, beobachtet werden (3.4.4.1, Daten nicht gezeigt). Durch das Ausschalten von CAF durch RNAi konnte eine Verlangsamung der Deadenylierung erreicht werden. Der Unterschied war deutlicher nach einem milderen

Hitzeschock, nach dem die Deadenylierung unter Normalbedingungen schneller abläuft. CAF bzw. der CCR4/NOT-Komplex sind also wahrscheinlich für die Deadenylierung von Hsp70-RNA nach einem Hitzeschock verantwortlich. Gestützt wird diese These durch Experimente im Labor von M. Simonelig, die eine verlangsamte Deadenylierung der Hsp70-mRNA in Fliegen mit P-Element-Insertionen im CCR4-Gen beobachtet hat (persönliche Mitteilung). Ob Ausschalten von CCR4 durch RNAi in S2-Zellen einen Einfluss auf die Hsp70-Deadenylierung hat, obwohl kein Effekt auf die Gesamt-Poly(A)-Länge festgestellt werden konnte, wird noch untersucht.

4.4.1 Der CCR4/NOT-Komplex wird im Hitzeschock inaktiviert

Bei der Fraktionierung von S2-Extrakt aus Zellen, die einem starken Hitzeschock unterzogen worden waren, stellte sich heraus, dass der CCR4/CAF1-Komplex keine deadenylierende Aktivität mehr besaß, obwohl die Proteine in vergleichbaren Mengen zum normalen Extrakt vorhanden waren (3.5.2). Stattdessen konnte eine zweite 3'-Exonukleaseaktivität gefunden werden, die sich von der CCR4/CAF-assozierten Nuklease durch ihr chromatographisches Verhalten und in ihren Anforderungen an Reaktionsbedingungen unterscheidet (3.8). Ein wichtiger Unterschied ist die Aktivierbarkeit durch Spermidin. Die „Hitzeschock-Nuklease“ ließ sich in KCl-haltigem Puffer durch Spermidin stark stimulieren und ist auch bei sehr geringen KCl-Konzentrationen (> 10 mM) durch Spermidin aktivierbar. Die CCR4/CAF1-assozierte Nuklease ist unter diesen Bedingungen fast inaktiv (Daten nicht gezeigt). Auch Pan2p/Pan3p aus Hefe lässt sich *in vitro* in Abwesenheit von Pab1p durch Spermidinzugabe aktivieren (Lowell et al., 1992). Es wäre also denkbar, dass die im Hitzeschock aktivierte Nuklease der PAN2/PAN3-Komplex ist. Sequenzvergleiche haben ergeben, dass das Drosophila-Genom Sequenzen für homologe Proteine enthält (PAN2:CG8232; PAN3:CG11468). Durch die Verwendung von PAN-Antikörpern ließe sich feststellen, ob die gefundene Aktivität mit PAN assoziiert ist. Die beiden Drosophila-Nukleasen ließen sich *in vitro* nicht durch PABC stimulieren, was daran liegen kann, dass aus Mangel an Drosophila-PABC das Experiment mit dem humanen und dem Hefe-Protein durchgeführt wurde (Daten nicht gezeigt). Weiterhin wäre interessant zu wissen, ob und in welchen Fraktionen PABC enthalten ist. Ebenfalls ist es von großem Interesse, was die Inaktivierung der CCR4/CAF1-assozierten Nuklease im Hitzeschock bewirkt.

Da die „Hitzeschock-Nuklease“ bei ungefähr den gleichen KCl-Konzentrationen von der DEAE-Säule eluiert wie die Nuklease, die als erste von der DEAE-Säule eluierte, als die Fraktionierung des S2-CXT aus normalen Zellen mit einem flacheren Gradienten

durchgeführt wurde (3.3.5), wäre es denkbar, dass es sich um die gleichen Aktivitäten handelt. Es ist nicht ausgeschlossen, dass die Kultivierungstemperatur der S2-Zellen leicht erhöht war (bis 30°C) und so eine partielle Induktion dieser „Hitzeschock-Nuklease“ stattgefunden hat. Die Induzierbarkeit dieser Nuklease muss allerdings noch untersucht werden.

4.4.2 Stabilisierung ARE-haltiger mRNAs im Hitzeschock

Untersuchungen in humanen Zellen haben gezeigt, dass nicht nur Hsp70-mRNAs, sondern auch andere ARE-haltige mRNAs wie z. B. die der Proto-Onkogene *c-myc* und *c-fos* im Hitzeschock stabilisiert werden (Andrews et al., 1988; Sadis et al., 1988). Es gibt Hinweise, dass das ARE-bindende Protein AUF1, das den schnellen Abbau ARE-haltiger mRNAs unter Normalbedingungen fördert, im Hitzeschock für die Stabilisierung solcher mRNAs mit verantwortlich ist. Im Hitzeschock wurde das sonst ubiquitär in der Zelle verteilte Protein ausschließlich im Zellkern gefunden, komplexiert mit Hsp70. In diesem Komplex konnten auch eIF4G und PABC1 gefunden werden. Dieses könnte die destabilisierende Funktion von AUF1 aufheben und so zu einer Stabilisierung von ARE-haltigen mRNAs im Hitzeschock führen. Die Kernlokalisierung von AUF1 und HSP70 wurde auch durch einen Block des Ubiquitin-abhängigen Proteinabbaus durch den Inhibitor MG132 erreicht. Dabei stieg auch die AUF1-Konzentration leicht an, was vermuten lässt, dass AUF1 durch das Ubiquitin-abhängige Proteasom abgebaut wird. Eine Polyubiquitinierung von AUF1 unterstützt diese These (Laroia et al., 1999). Ubiquitinierung könnte auch der Mechanismus sein, den CCR4/NOT-Komplex zu inaktivieren. NOT4 besitzt eine Ubiquitin-Protein-Ligase-Funktion und auch eine Autoubiquitinierung wurde gefunden (Albert et al., 2002). Ein weiteres Protein, das in die Stabilisierung von ARE-haltigen mRNAs im Hitzeschock involviert zu sein scheint, ist die Doppelstrang-RNA-abhängige-Proteinkinase PKR. Sie ist in Säugern essentiell für die Hitzeschock-Antwort. In Deletionsmutanten ist nicht die HSF1-Aktivierung gestört, sondern die Stabilisierung der Hsp70-mRNA. Dieser Effekt wird durch die AREs im 3'UTR der Hsp70-mRNA vermittelt. Die Substrate der PKR und die genaue Rolle bei der Hitzeschock-Regulation sind nicht bekannt (Zhao et al., 2002). Die Autoren spekulieren, dass eventuell AUF1 phosphoryliert und dadurch stabilisiert werden könnte.

Eine Stabilisierung der Hsp70-mRNA könnte ebenso durch eine Inaktivierung der Deadenylase erreicht werden. Es wäre zu untersuchen, ob Untereinheiten des CCR4/NOT-Komplexes im Hitzeschock phosphoryliert werden.

Der CCR4/NOT-Komplex stellt in Hefe die Haupt-Deadenylase dar. Es bleibt zu untersuchen, welche Funktion dieser Komplex in höheren Eukaryoten, speziell bei der Deadenylierung von ARE-haltigen mRNAs spielt und wie die Aufgaben zwischen den verschiedenen Deadenylasen in der Zelle verteilt sind.

5 Zusammenfassung

Genexpression hängt zu einem großen Teil von der Menge der jeweiligen mRNA in der Zelle ab. Diese wird sowohl durch die Syntheserate als auch durch die Rate des Abbaus bestimmt. Der erste Schritt des Hauptweges des mRNA-Abbaus in Eukaryoten ist das Entfernen des Poly(A)-Schwanzes durch eine 3'-5'-Exoribonuklease, die so genannte Deadenylierung. Nach der Deadenylierung wird die *cap*-Struktur entfernt und die verbleibende RNA in 5'-3'-Richtung weiter abgebaut oder der mRNA-Abbau wird vom 3'-Ende her fortgesetzt und dann die verbleibende *cap*-Struktur hydrolysiert.

Deadenylierung kann der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des gesamten Abbauprozesses sein. Destabilisierende Sequenzen, z. B. AU-reiche Sequenzen im 3'-UTR transient exprimierter mRNAs, beschleunigen die Rate der Deadenylierung und fördern so den mRNA-Abbau.

Das Enzym, welches in höheren Eukaryoten für die Deadenylierung verantwortlich ist, war bislang nicht bekannt.

In dieser Studie und gleichzeitig in den Labors von R. Parker und B. Séraphin konnte der CCR4/NOT-Komplex, in dem zwei Untereinheiten, Ccr4p und Pop2p, Homologie zu Exonukleasen aufweisen, als die vorherrschende deadenylierende Aktivität in *S. cerevisiae* identifiziert werden.

Die Deletion einer Untereinheit des Komplexes, Pop2p, das als Mitglied der RNase D-Familie der Exonukleasen identifiziert worden war, verlangsamte das Wachstum der mutierten Hefen stark. In den Deletionsstämmen wurde auch eine Verlängerung der Gesamt-Poly(A)-Schwanzlänge beobachtet. Punkt-Mutationen in den konservierten katalytischen Resten führten allerdings zu keinem Phänotyp, was den Schluss nahe legt, dass Pop2p *in vivo* nicht die vorherrschende katalytische Untereinheit des Komplexes ist.

Der CCR4/NOT-Komplex konnte über TAP-*tag*-Pop2p und TAP-*tag*-Ccr4p aus Hefeextrakt isoliert werden und zeigte *in vitro* eine poly(A)-spezifische, Magnesium-abhängige 3'-5'-Exonukleaseaktivität. Poly(A) wurde dabei ausschließlich hydrolytisch gespalten und 5'-AMP freigesetzt. Die Nukleaseaktivität wurde durch den Zusatz von Pab1p inhibiert.

Auch im Genom von *Drosophila melanogaster* wurden durch Datenbankrecherchen Homologe zu den Untereinheiten des Hefe-CCR4/NOT-Komplexes gefunden. Zu sieben der neun Kernkomponenten wurden die entsprechenden Proteine identifiziert. Nur zu Caf130p konnte kein entsprechendes homologes Protein gefunden werden. Anstelle von yNot3p und yNot5p, die auch Homologie untereinander aufweisen, scheint es in *D. melanogaster* nur ein entsprechendes Protein zu geben, das zu beiden homolog ist. Die Bedeutung des Komplexes für die Deadenylierung wurde durch RNA-Interferenz getestet. Das Ausschalten von CAF1(=POP2) hatte eine Verlängerung der Gesamt-Poly(A)-Schwanzlänge zur Folge. In einem geringeren Ausmaß traf dies auch für NOT1-3 zu. RNAi gegen CCR4 hatte keine Veränderung der Poly(A)-Schwanzlänge zur Folge. Dieses könnte auf eine unvollständige Depletion oder CCR4-ähnliche Proteine zurückzuführen sein.

Bei der Fraktionierung von S2-CXT war die im Extrakt beobachtete deadenylierende Aktivität auf der DEAE-Säule und auf einer daran angeschlossenen Gelfiltrationssäule mit CAF1 und CCR4 korreliert. Die Aktivitätsmaxima der DEAE-Säule wurden zum Teil von einem Inhibitor überlagert. Die deadenylierende Aktivität konnte durch CAF1- und CCR4-Antikörper aus aktiven Fraktionen der DEAE-Säule depletiert werden.

Wurden die Zellen vor der Extraktpräparation einem Hitzeschock ausgesetzt, konnten CAF1 und CCR4 zwar in den entsprechenden Fraktionen der DEAE-Säule nachgewiesen werden, diese besaßen aber keine deadenylierende Aktivität. Dafür wurde eine zweite Deadenylase durch Hitzeschock induziert. Sie eluierte schon bei sehr niedrigen Salzkonzentrationen von der DEAE-Säule und unterschied sich von der CAF1/CCR4-assoziierten Nuklease durch ihr Salz- und Mg^{2+} -Optimum und durch die Aktivierbarkeit durch Spermidin.

Als ein Substrat des CCR4/NOT-Komplexes konnte die HSP70-mRNA identifiziert werden. Sie wird durch einen Hitzeschock induziert und schnell wieder abgebaut, wenn die Temperatur wieder gesunken ist. In Zellen, die vorher mit RNAi gegen CAF1 behandelt worden waren, wurde eine verlangsamte Deadenylierung der Hsp70-mRNA während der Erholungsphase von einem Hitzeschock beobachtet.

6 Literatur

- Albert, T.K., Hanzawa, H., Legtenberg, Y.C., de Ruwe, M.J., van den Heuvel, F.A., Collart, M.A., Boelens, R. and Timmers, H.T. (2002) Identification of a ubiquitin-protein ligase subunit within the CCR4-NOT transcription repressor complex. *EMBO J.*, **21**, 355-364.
- Albert, T.K., Lemaire, M., van Berkum, N.L., Gentz, R., Collart, M.A. and Timmers, H.T. (2000) Isolation and characterization of human orthologs of yeast CCR4-NOT complex subunits. *Nucl. Acids Res.*, **28**, 809-817.
- Allmang, C., Mitchell, E., Petfalski, D. and Tollervy, D. (2000) Degradation of ribosomal RNA precursors by the exosome. *Nucl. Acids Res.*, **28**, 1684-1691.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M. and Tollervy, D. (1999) The yeast exosome and human PM-Sci are related complexes of 3'-5' exoribonucleases. *Genes Dev.*, **13**, 2148-2158.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.*, **215**, 403-410.
- Anderson, J.S.J. and Parker, R. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover, that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.*, **17**, 1497-1506.
- Andrews, G.K., Harding, M.A., Calvert, J.P. and Adamson, E.D. (1988) The heat shock response in HeLa cells is accompanied by elevated expression of the *c-fos* proto-oncogene. *Mol. Cell. Biol.*, **7**, 3452-3458.
- Astrom, J., Astrom, A. and Virtanen, A. (1991) In vitro deadenylation of mammalian mRNA by a HeLa cell 3' exonuclease. *EMBO J.*, **10**, 3067-3071.
- Astrom, J., Astrom, A. and Virtanen, A. (1992) Properties of a HeLa Cell 3' exonuclease specific for degrading poly(A) tails of mammalian mRNA. *J. Biol. Chem.*, **267**, 18154-18159.
- Ausubel, S.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Baggs, J.E. and Green, C.B. (2003) Nocturnin, a Deadenylation in *Xenopus laevis* Retina. A Mechanism for Posttranscriptional Control of Circadian-Related mRNA. *Curr. Biol.*, **13**, 189-198.
- Bai, Y., Salvatore, C., Chiang, Y.C., Collart, M.A., Liu, H.Y. and Denis, C.L. (1999) The CCR4 and CAF1 proteins of the CCR4-NOT complex are physically and functionally separated from NOT2, NOT4, and NOT5. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 6642-6651.
- Barziley, G., Mol, C.D., Robson, C.N., Walker, L.J., Cunningham, R.P., Tainer, J.A. and Hickson, I.D. (1995) Identification of critical active-site residues in the multifunctional human DNA repair enzyme HAP1. *Nature Struct. Biol.*, **2**, 561-568.

- Beelman, C.A. and Parker, R. (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell*, **81**, 179-183.
- Bernstein, P., Peltz, S.W. and Ross, J. (1989) The poly(A)-poly(A)-binding protein complex is a major determinant of mRNA stability in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 659-670.
- Binder, R., Horowitz, J.A., Babilion, J.P., Koeller, D.M., Klausner, R.D. and Harford, J.B. (1994) Evidence that the pathway of transferrin receptor mRNA degradation involves an endonucleolytic cleavage within the 3'-UTR and does not involve poly(A) tail shortening. *EMBO J.*, **13**, 1969-1980.
- Birnboim, H.C. and Doly, J. (1976) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acid Res.*, **7**, 1513-1523.
- Boeck, R., Tarun, S., Rieger, M., Deardorf, J.A., Muller-Auer, S. and Sachs, A.S. (1996) The yeast Pan2 protein is required for poly(A)-binding-protein-stimulated poly(A)-nuclease activity. *J. Biol. Chem.*, **271**, 432-438.
- Brewer, G. and Ross, J. (1988) Poly(A) shortening and degradation of the 3' A+U-rich sequences of human c-myc mRNA in a cell-free system. *Mol. Cell. Biol.*, **8**, 1697-1708.
- Briggs, M.W., Burkard, K.T. and Butler, J.S. (1998) Rrp6p, the yeast homologue of the human PM-Scl 100-kDa autoantigen, is essential for efficient 5.8 S RNA 3' end formation. *J. Biol. Chem.*, **273**, 13255-13263.
- Brown, C.E. and Sachs, A.B. (1998) Poly(A) tail length control in *Saccharomycetes cerevisiae* occurs by message-specific deadenylation. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6548-6559.
- Brown, C.E., Tarun, S.Z., Boeck, R. and Sachs, A.B. (1996) PAN3 encodes a subunit of the Pab1p-dependent poly(A) nuclease in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 5744-5753.
- Burkard, K.T. and Butler, J.S. (2000) A nuclear 3'-5' exonuclease involved in mRNA degradation interacts with poly(A) polymerase and the hnRNA protein Npl3p. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 406-416.
- Butler, J.S. (2002) The yin and yang of the exosome. *Trends Cell. Biol.*, **12**, 90-96.
- Caballo, E., Lai, W.S. and Blackshear, P.J. (2000) Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood*, **95**, 1891-1899.
- Cao, D. and Parker, R. (2003) Computational modeling and experimental analysis of nonsense-mediated decay in yeast. *Cell*, **113**, 533-545.
- Caponigro, G. and Parker, R. (1995) Multiple functions for the poly(A)-binding protein in mRNA decapping and deadenylation in yeast. *Genes Dev.*, **9**, 2421-2432.
- Casey, J.L., Koeller, D.M., Ramin, V.C., Klausner, R.D. and Harford, J.B. (1989) Iron regulation of transferrin receptor mRNA levels require iron-responsive elements and a rapid turnover determinant in the 3' untranslated region of the mRNA. *EMBO J.*, **8**, 3693-3699.

- Chen, C.Y., Gherzi, R., Ong, S.E., Chan, E.L., Raijmakers, R., Pruijn, G.J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M. and Karin, M. (2001a) AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, **107**, 451-464.
- Chen, C.-Y. and Shyu, A.-B. (1995) AU-rich elements: characterization and importance in mRNA degradation. *Trends Biochem. Sci.*, **20**, 465-470.
- Chen, C.-Y.A. and Shyu, A.-B. (2003) Rapid deadenylation triggered by a nonsense codon precedes decay of the RNA body in a mammalian cytoplasmic nonsense-mediated decay pathway. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 4805-4813.
- Chen, J., Chiang, Y.-C. and Denis, C.L. (2002) CCR4, a 3'-5' poly(A) RNA and ssDNA exonuclease, is the catalytic component of the cytoplasmic deadenylase. *EMBO J.*, **21**, 1414-1426.
- Chen, J., Rappsilber, J., Chiang, Y.-C., Russell, P., Mann, M. and Denis, C. (2001b) Purification and characterization of the 1.0 MDa CCR4-NOT-complex identifies two novel components of the complex. *J. Mol. Biol.*, **314**, 683-694.
- Christofori, G. and Keller, W. (1989) Poly(A) Polymerase purified from from HeLa cell nuclear extract is required for both cleavage and polyadenylation of pre-mRNA in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, **9**, 193-203.
- Clemens, J.C., Worby, C.A., Simonson-Leff, N., Muda, M., Maehama, T., Hemmings, B.A. and Dixon, J.E. (2000) Use of double-stranded RNA interference in *Drosophila* cell lines to dissect signal transduction pathways. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 6499-6503.
- Collart, M.A. and Struhl, K. (1994) NOT1 (CDC39), NOT2 (CDC36), NOT3 and NOT4 encode a global-negative regulator of transcription that differentially affects TATA-element utilization. *Genes Dev.*, **8**, 525-537.
- Coller, J.M., Tucker, M., Sheth, U., Valencia-Sanchez, M.A. and R., P. (2001) The DEAD box helicase, Dhh1p, functions in mRNA decapping and interacts with both the decapping and deadenylase complexes. *RNA*, **7**, 1717-1727.
- Dardoussis, K. (2001) Die Rolle von hPABPI bei der Deadenylierung von RNAs mit AU-reichen Elementen. *Diplomarbeit am Institut für Biochemie*. MLU-Halle-Wittenberg, Halle.
- Daugeron, M.C., Mauxion, F. and Séraphin, B. (2001) The yeast POP2 gene encodes a nuclease involved in mRNA deadenylation. *Nucl. Acids Res.*, **29**, 2448-2455.
- Decker, C.J. and Parker, R. (1993) A turnover pathway for both stable and unstable mRNAs in yeast: evidence for a requirement for deadenylation. *Genes Dev.*, **7**, 1632-1643.
- Dehlin, E., Wormington, M., Körner, C.G. and Wahle, E. (2000) Cap-dependent deadenylation of mRNA. *EMBO J.*, **19**, 1079-1086.
- Dellavalle, R.P., Petersen, R. and Lindquist, S. (1994) Preferential deadenylation of *Hsp70* mRNA plays a key role in regulating Hsp70 Expression in *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 3646-3659.

- Denis, C.L., Chiang, Y.-C., Cui, Y. and Chen, J. (2001) Genetic evidence supports a role for the yeast CCR4-NOT complex in transcriptional elongation. *Genetics*, **158**, 627-634.
- Denis, C.L. and Malvar, T. (1990) The CCR4 gene from *Saccharomyces cerevisiae* is required for both nonfermentative and spt-mediated gene expression. *Genetics*, **124**, 283-291.
- Deutscher, M.P. and Reuven, N.B. (1991) Enzymatic basis for hydrolytic versus phosphorolytic mRNA degradation in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**.
- Dlakic, M. (2000) Functionally unrelated signalling proteins contain a fold similar to Mg²⁺-dependent endonucleases. *TIBS*, **25**, 272-273.
- Draper, M.P., Liu, H.-Y., Nelsbach, A.H., Mosley, S.P. and Denis, C.L. (1994) CCR4 is a glucose-regulated transcription factor whose leucine-rich repeat binds several proteins important for placing CCR4 in its proper promotor context. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 4522-4531.
- Dunckley, T. and Parker, R. (1999) The DCP2 Protein is required for mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae* and contains a functional MutT motif. *EMBO J.*, **18**, 5411-5422.
- Dunckley, T., Tucker, M. and Parker, R. (2001) Two related proteins, Edcp1p and Edcp2p, stimulate mRNA decapping in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **157**, 27-37.
- Dupressoir, A., Morel, A.P., Barbot, W., Loireau, M.P., Corbo, L. and T., H. (2001) Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics*, **2**.
- Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, **15**, 188-200.
- Forler, D., Köcher, T., Rode, M., Gentzel, M., Izaurralde, E. and Wilm, M. (2003) An efficient protein complex purification method for functional proteomics in higher eukaryotes. *Nature biotechnology*, **21**, 89-92.
- Frischmeyer, P.A., van Hoof, A., O'Donnell, K., Guerreiro, A.L., Parker, R. and Dietz, H.C. (2002) An mRNA surveillance mechanism that eliminates transcripts lacking termination codons. *Science*, **295**, 2258-2261.
- Frolov, M.V., Benevolenskaya, E.V. and Birchler, J.A. (1998) Regena (Rga), a *Drosophila* homolog of the global negative transcriptional regulator CDC36 (NOT2) from yeast, modifies gene expression and suppresses position effect variegation. *Genetics*, **148**, 317-329.
- Gao, M., Fritz, D.T., Ford, L.P. and Wilusz, J. (2000) Interaction between a poly(A)-specific ribonuclease and the 5' cap influences mRNA deadenylation rates in vitro. *Mol. Cell*, **5**, 479-488.

- Gatfield, D., Unterholzer, L., Ciccarelli, F.D., Bork, P. and Izaurralde, E. (2003) Nonsense-mediated mRNA decay in *Drosophila*: at the intersection of the yeast and mammalian pathways. *EMBO J.*, **22**, 3960-3970.
- Gavin, A.C., Bösch, M., Krause, R., Grandi, P., Marzioch, M., Bauer, A., Schultz, J., Rick, J.M., Michon, A.M., Cruciat, C.M., Remor, M., Höfert, C., Schelder, M., Brajenovic, M., Ruffner, H., Merino, A., Klein, K., Hudak, M., Dickson, D., Rudi, T., Gnau, V., Bauch, A., Bastuck, S., Huhse, B., Leutwein, C., Heutrier, M.-A., Copley, R.C., Edelmann, A., Querfurth, E., Rybin, V., Drewes, G., Raida, M., Bouwmeester, T., Bork, P., Seraphin, B., Kuster, B., Neubauer, G. and Superti-Furga, G. (2002) Functional organisation of the yeast proteome by systematic analysis of protein complexes. *Nature*, **415**, 141-147.
- Gorman, M.A., Morera, S., Rothwell, D.G., de la Fortelle, E., Mol, C.D., Tainer, J.A., Hickson, I.D. and Freeman, P.S. (1997) The crystal structure of the human DNA repair endonuclease HAP1 suggests the recognition of extra-helical deoxyribose at DNA abasic sites. *EMBO J.*, **16**, 6548-6558.
- Güldener, U., Hech, S., Fiedler, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nuc. Acids Res.*, **24**, 2519-2524.
- Gupta, R.S. and Singh, B. (1992) Cloning of the HSP70 gene from *Halobacterium marismortui*: relatedness of archaeobacterial HSP70 to its eubacterial homologs and a model for the evolution of the HSP70 gene. *J. Bacteriology*, **174**, 4594-4605.
- Hata, H., Mitsui, H., Liu, H., Bai, Y., Denis, C.L., Shimizu, Y. and Sakai, A. (1998) Dhh1p, a putative RNA helicase, associates with the general transcription factors Pop2p and Ccr4p from *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 1998 Feb;148(2):571-9., **148**, 571-579.
- Hess, M.A. and Duncan, R.F. (1996) Sequence and structure determinants of *Drosophila* Hsp70 mRNA translation: 5'-UTR secondary structure specifically inhibits heat shock protein mRNA translation. *Nuc. Acids Res.*, **24**, 2441-2449.
- Hilleren, P., McCarthy, T., Rosbash, M., Parker, R. and Jensen, T.H. (2001) Quality control of mRNA 3'-end processing is linked to the nuclear exosome. *Nature*, **413**, 538-542.
- Hsu, C.L. and Stevens, A. (1993) Yeast cells lacking 5'-3' exoribonuclease 1 contain mRNA species that are poly(A) deficient and partially lack the 5' cap structure. *Mol. Cell Biol.*, **13**, 4826-4835.
- Hunt, C. and Morimoto, R.J. (1985) Conserved features of eukaryotic *hsp70* genes revealed by the comparison with the nucleotide sequence of human *hsp70*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **82**, 6455-6459.
- Imataka, H., Gradi, A. and Sonenberg, N. (1998) A newly identified N-terminal amino acid sequence of human eIF4G binds poly(A)-binding protein and functions in poly(A)-dependent translation. *EMBO J.*, **17**, 7480-7489.
- Ioannidis, P., Havredaki, M. and Curtis, N. (1996) In vivo generation of 3' and 5' truncated species in the process of c-myc mRNA decay. *Nucl. Acids Res.*, **24**, 4969-4977.

- Jacobs Anderson, J.S. and Parker, R. (1998) The 3' to 5' degradation of yeast mRNAs is a general mechanism for mRNA turnover that requires the SKI2 DEVH box protein and 3' to 5' exonucleases of the exosome complex. *EMBO J.*, **17**, 1497-1506.
- Johnson, A.W. (1997) Rat1p and Xrn1p are functionally interchangeable exoribonucleases that are restricted to and required in the nucleus and cytoplasm, respectively. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 6122-6130.
- Johnson, A.W. (2001) Rat1p nuclease. *Meth. Enzymol.*, **342**, 260-268.
- Kenna, M., Stevens, A., McCammon, M. and Douglas, M.G. (1993) An essential yeast gene with homology to the exonuclease-encoding XRN1/KEM1 gene also encodes a protein with exoribonuclease activity. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 341-350.
- Kerwitz, Y., Kuhn, U., Knoth, A., Scheuermann, T., Friedrich, H., Schwartz, E. and Wahle, E. (2003) Simulation of poly(A) polymerase through a direct interaction with the nuclear poly(A) binding protein allosterically regulated by RNA. *EMBO J.*, **22**, 3705-3714.
- Kessler, S.H. and Sachs, A.B. (1998) RNA recognition motif 2 of yeast Pab1p is required for its functional interaction with the eukaryotic translation initiation factor 4G. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 51-57.
- Kim, V.N., Kataoka, N. and Dreyfuss, G. (2001b) Role of the nonsense-mediated decay factor hUPF3 in the splicing-dependent exon-exon junction complex. *Science*, **293**, 1832-1836.
- Kim, V.N., Yong, J., Kataoka, N., Abel, L., Diem, M.D. and Dreyfuss, G. (2001a) The Y14 protein communicates to the cytoplasm the position of exon-exon junctions. *EMBO J.*, **20** 2062-2068.
- Körner, C. and Wahle, E. (1997) Poly(A) tail shortening by a mammalian poly(A)-specific 3'-exoribonuclease. *J. Biol. Chem.*, **272**, 10448-10456.
- Körner, C.G., Wormington, M., Muckenthaler, M., Schneider, S., Dehlin, E. and Wahle, E. (1998) The deadenylating nuclease (DAN) is involved in poly(A) tail removal during the meiotic maturation of *Xenopus* oocytes. *EMBO J.*, **17**, 5427-5437.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LaGrandeur, T.E. and Parker, R. (1998) Isolation and characterization of Dcp1, the yeast mRNA decapping enzyme. *EMBO J.*, **17**, 1487-1496.
- Lai, W.S., Carballo, E., Strum, J.R., Kennington, E.A., Phillips, R.S. and Blackshear, P.J. (1999) Evidence that tristetraprolin binds to AU-rich elements and promotes the deadenylation and destabilization of tumor necrosis factor alpha mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4311-4323.
- Lai, W.S., Kennington, E.A. and Blackshear, P.J. (2002) Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: non-binding tristetraprolin mutants exert an inhibitory effect on degradation of AU-rich element-containing mRNAs. *J. Bio. Chem.*, **275**, 9606-9613.

- Lai, W.S., Kennington, E.A. and Blackshear, P.J. (2003) Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by Poly(A) Ribonuclease. *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 3798-3812.
- Larويا, G., Cuesta, R., Brewer, G. and Schneider, R.J. (1999) Control of mRNA decay by heat shock-ubiquitin-proteasome pathway. *Science*, **284**, 499-502.
- Le Hir, H., Gatfield, D., Izaurralde, E. and Moore, M.J. (2001) The exon-exon-junction complex provides a binding platform for factors involved in mRNA export and NMD. *EMBO J.*, **20**, 4987-4997.
- Lee, C.H., Leeds, P. and Ross, J. (1998) Purification and characterization of a polysome-associated endoribonuclease that degrades c.myc mRNA in vitro. *J. Biol. Chem.*, **273**, 25261-25271.
- Lemaire, M. and Collart, M.A. (2000) The TATA-binding protein-associated factor yTafII19p functionally interacts with components of the global transcriptional regulator Ccr4-Not complex and physically interacts with the Not5 subunit. *J. Biol. Chem.*, **275**, 26925-26934.
- Lindquist, S. (1993) Autoregulation of the heat shock response. In Ilan, J. (ed.), *Translational regulation of gene expression*. Plenum Press, New York, Vol. 2.
- Lindquist, S. and Craig, E.A. (1988) The heat-shock proteins. *Annu. Rev. Genet.*, **22**, 631-677.
- Lis, J. and Wu, C. (1993) Protein traffic on the heat shock promotor: Parking, stalling, and trucking along. *Cell*, **74**, 1-4.
- Liu, H.-Y., Badarinarayana, V., Audino, D., Rappsilber, J., Mann, M. and Denis, C.L. (1998) The NOT proteins are part of the CCR4 transcriptional complex and affect gene expression both positively and negatively. *EMBO J.*, **17**, 1096-1106.
- Liu, H.Y., Chiang, Y.-C., Pan, J., Chen, J., Salvatore, C., Audino, D.C., Badarinarayana, V., Palaniswamy, V., Anderson, B. and L., D.C. (2001) Characterization of CAF4 and CAF16 reveals a functional connection between the CCR4-NOT complex and a subset of SRB proteins of the RNA polymerase II holoenzyme. *J. Biol. Chem.*, **276**, 7541-7548.
- Liu, H.Y., Toyn, J.H., Chiang, Y.C., Draper, M.P., Johnston, L.H. and Denis, C.L. (1997) DBF2, a cell cycle-regulated protein kinase, is physically and functionally associated with the CCR4 transcriptional regulatory complex. *EMBO J.* 1997 Sep 1;16(17):5289-98., **16**, 5289-5298.
- Lowell, J.E., Rudner, D.Z. and Sachs, A.B. (1992) 3'-UTR-dependent deadenylation by the yeast poly(A) nuclease. *Genes Dev.*, **6**, 2088-2099.
- Lucas, J.A., Masuda, Y., Bennett, R.A., Strauss, N.S. and Strauss, P.R. (1999) Single-turnover analysis of mutant human apurinic/apyrimidinic endonuclease. *Biochemistry*, **38**, 4958-4964.
- Lykke-Anderson, J., Shu, M.-D. and Steitz, J.A. (2000) Human Upf proteins target an mRNA for nonsense-mediated decay when bound downstream of a termination codon. *Cell*, **103**, 1121-1131.

- Maillet, L. and Collart, M.A. (2002) Interaction between Not1p, a component of the Ccr4-not complex, a global regulator of transcription, and Dhh1p, a putative RNA helicase. *J. Biol. Chem.*, **277**, 2835-2842.
- Maillet, L., Tu, C., Hong, Y.K., Shuster, E.O. and Collart, M.A. (2001) The essential function of Not1 lies within the Ccr4-Not complex. *J. Mol. Biol.*, **303**, 131-143.
- Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M. and Tollervey, D. (1997) The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'-5' exoribonuclease activities. *Cell*, **91**, 457-466.
- Mitchell, P. and Tollervey, D. (2003) An NMD pathway in yeast involving accelerated deadenylation and exosome-mediated 3'-5' degradation. *Mol. Cell*, **11**, 1405-1413.
- Mol, C.D., Izumi, T., Mitra, S. and Tainer, J.A. (2000) DNA-bound structures and mutants reveal abasic DNA binding by APE1 DNA repair and coordination. *Nature*, **403**, 451-456.
- Mol, C.D., Kuo, C.F., Thayer, M.M., Cunningham, R.P. and Tainer, J.A. (1995) Structure and function of the multifunctional DNA-repair enzyme exonuclease III. *Nature*, **374**, 381-386.
- Morimoto, R.I. (1998) Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones and negative regulators. *Genes Dev.*, **12**, 3788-3796.
- Moriya, H., Shimizu-Yoshida, Y., Omori, A., Iwashita, S., Katoh, M. and Sakai, A. (2001) Yak1p, a DYRK family kinase, translocates to the nucleus and phosphorylates yeast Pop2p in response to a glucose signal. *Genes Dev.*, **15**, 1217-1228.
- Moser, M.J., Holley, W.R., Chatterjee, A. and Mian, I.S. (1997) The proofreading domain of Escherichia coli DNA polymerase I and other DNA and/or RNA exonuclease domains. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 5110-5118.
- Muhlrad, D., Decker, C.J. and Parker, R. (1994) Deadenylation of the unstable mRNA encoded by the yeast MFA2 gene leads to decapping followed by 5'-3' digestion of the transcript. *Genes Dev.*, **8**, 855-866.
- Muhlrad, D., Decker, C.J. and Parker, R. (1995) Turnover mechanism of the stable yeast PGK1 mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 2145-2156.
- Muhlrad, D. and Parker, R. (1994) Premature translational termination triggers mRNA decapping. *Nature*, **370**, 578-581.
- Mukherjee, D., Gao, M., O'Connor, J.P., Raijmakers, R., Pruijn, G., Lutz, C.S. and Wilusz, J. (2002) The mammalian exosome mediates the efficient degradation of mRNAs that contain AU-rich elements. *EMBO J.*, **21**, 165-174.
- Nagy, E. and Maquat, L.E. (1998) A rule for termination-codon position within intron-containing genes: when nonsense affects RNA abundance. *Trends Biochem. Sci.*, **23**, 189-199.

- Nguyen, L.H., Barski, D., Erzberger, J.P. and Wilson, D.M.I. (2000) Mapping of the protein-DNA interface and the metal-binding site of the major human apurinic/aprimidinic endonuclease. *J. Mol. Biol.*, **298**, 447-459.
- Okazaki, N., Okazaki, K., Watanabe, Y., Kato-Hayashi, M., Yamamoto, M. and Okayama, H. (1998) Novel factor highly conserved among eukaryotes controls sexual development in fission yeast. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 887-895.
- Otero, L.J., Ashe, M.P. and Sachs, A.B. (1999) The yeast poly(A)-binding protein Pab1p stimulates in vitro poly(A)-dependent and cap-dependent translation by distinct mechanisms. *EMBO J.*, **18**, 3153-3163.
- Pauli, D., Arrigo, A.-P. and Tissières. (1992a) Heat shock response in *Drosophila*. *Experientia*, **48**, 623-629.
- Pauli, D., Arrigo, A.-P. and Tissières, A. (1992b) Heat shock response in *Drosophila*. *Experientia*, **48**, 623-629.
- Perkins, L., Doctor, J., Zhang, K., Stinson, L., Perrimon, N. and Craig, E. (1990) Molecular and developmental characterization of the heat shock cognate 4 gene of *Drosophila melanogaster*. *Mol. Cell. Biol.*, **10**, 3232-3238.
- Petersen, R.B. and Lindquist, S. (1989) Regulation of HSP70 synthesis by messenger RNA degradation. *Cell Regulation*, **1**, 135-149.
- Peterson, R. and Lindquist, S. (1988) The *Drosophila* hsp70 message is rapidly degraded at normal temperatures and stabilized by heat shock. *Gene*, **72**, 161-168.
- Preiss, T. and Hentze, M.W. (1998) Dual function of the messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature*, **392**, 516-520.
- Puig, O., Caspary, F., Rigaut, G., Rutz, B., Bouveret, E., Bragado-Nilsson, E., Wilm, M. and Séraphin, B. (2001a) The Tandem Affinity Purification (TAP) method: A general procedure of protein complex purification. *Methods*, **24**, 218-229.
- Richter, J.D. (1996) Dynamics of poly(A) addition and removal during development. In Hershey, J., Sonenberg, N. and Mathews, M. (eds.), *Translational Control*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Russell, P., Benson, J.D. and Denis, C.L. (2002) Characterization of mutations in NOT2 indicates that it plays an important role in maintaining the integrity of the CCR4-NOT complex. *J. Mol. Biol.*, **322**, 27-39.
- Sachs, A.B., Davis, R.W. and Kornberg, R.D. (1987) A single domain of yeast poly (A)-binding protein is necessary and sufficient for RNA binding and cell viability. *Mol. Cell. Biol.*, **7**.
- Sachs, A.B. and Deardorff, J.A. (1992) Translation initiation requires the PAB-dependent poly(A) ribonuclease in yeast. *Cell*, **70**, 961-973.
- Sadis, S., Hickey, E. and Weber, L.A. (1988) Effect of heat shock on RNA metabolism in HeLa cells. *J. Cell Physiol.*, **135**, 377-386.

- Sakai, A., Chibazakura, T., Shimizu, Y. and Hishinuma, F. (1992) Molecular analysis of *POP2* gene, a gene required for glucose-derepression of gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids. Res.*, **20**, 6227-6233.
- Sallés, F.J. and Strickland, S. (1999) Analysis of Poly(A) tail lengths by PCR: The PAT-assay. *Methods in Molecular Biology*, **118**, 441-448.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 5463-5467.
- Scheper, W., Meinsma, D., Holthuizen, P.E. and Sussenbach, J.S. (1995) Long-range RNA interaction of two sequence elements required for endonucleolytic cleavage of human insulin-like growth factor II mRNAs. *Moll. Cell. Biol.*, **15**, 235-245.
- Serin, G., Gersappe, A., Black, J.D., Aronoff, R. and Maquat, L.E. (2001) Identification and characterization of human orthologues to *Saccharomyces cerevisiae* Upf2 protein and Upf3 protein (*Caenorhabditis elegans* SMG-4). *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 209-223.
- Sheth, U. and R., P. (2003) Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, **300**, 805-808.
- Shim, J. and Karin, M. (2002) The control of mRNA stability to extracellular stimuli. *Mol. Cells*, **14**, 321-331.
- Shimizu-Yoshida, Y., Sasamoto, M., Yoshida, A., Yoshioka, T., Matsumoto, A. and Sakai, A. (1999) Mouse CAF1, a mouse homologue of the yeast POP2 gene, complements the yeast pop2 null mutation. *Yeast*, **15**, 1357-1364.
- Stevens, A. (1980) Purification and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* exoribonuclease which yields 5'-mononucleotides by a 5'-3' mode of hydrolysis. *J. Biol. Chem.*, **255**, 3080-3085.
- Stoecklin, G., Colombi, M., Raineri, I., Leuenberger, S., Mallaun, M., Schmidlin, M., Gross, B., Lu, M., Kitamura, T. and Moroni, C. (2002) Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover. *EMBO J.*, **21**, 4709-4718.
- Stryer, L. (1995) *Biochemistry*. W.H. Freeman and company, New York.
- Suck, D. and Oefner, C. (1986) Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA. *Nature*, **321**, 620-625.
- Tarun, S.Z. and Sachs, A.B. (1996) Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.*, **15**, 7168-7177.
- Temme, C. (1998) Gibt es eine direkte Wechselwirkung zwischen der Poly(A)-Polymerase und dem Poly(A)-Bindungsprotein II. *Institut für Biochemie*. Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Tharun, S., He, W., Mayes, A.E., Lennertz, P., Beggs, J.D. and Parker, R. (2000) Yeast Sm-like proteins function in mRNA decapping and decay. *Nature*, **404**, 515-518.

- Tharun, S. and Parker, R. (2001) Targeting an mRNA for decapping: displacement of translation factors and association of the Lsm1p-7p complex on deadenylated yeast mRNAs. *Mol. Cell*, **8**, 1075-1083.
- Thore, S., Mauxion, F., Séraphin, B. and Suck, D. (2003) X-ray structure and activity of the yeast Pop2 protein: a nuclease subunit of the mRNA deadenylase complex. *Embo J.*, **in press**.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrads, D. and R., P. (2002) Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 2002 Mar 15;21(6):1427-36., **21**, 1427-1436.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L. and Parker, R. (2001) The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, **104**, 377-386.
- van Dijk, E., Cougot, N., Meyer, S., Babajko, S., Wahle, E. and Seraphin, B. (2002) Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures. *EMBO J.*, **21**, 6915-6924.
- van Hoof, A., Frischmeyer, P.A., Dietz, H.C. and Parker, R. (2002) Exosome-mediated recognition and degradation of mRNAs lacking a termination codon. *Science*, **295**, 2262-2264.
- van Hoof, A., Lennertz, P. and Parker, R. (2000a) Yeast exosome mutants accumulate 3'-extended polyadenylated forms of U4 small nuclear RNA and small nucleolar RNAs. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 441-452.
- van Hoof, A. and Parker, R. (1999) The exosome: a proteasome for RNA? *Cell*, **99**, 347-350.
- van Hoof, A. and Parker, R. (2002) Messenger RNA degradation: Beginning at the end. *Curr. Biol.*, **12**, 285-287.
- van Hoof, A., Staples, R.R., Baker, R.E. and Parker, R. (2000b) Function of the Ski4p (Csl4p) and Ski7p proteins in 3'-to 5'-degradation of mRNA. *Mol. Cell. Biol.*, **20**.
- Velarquez, J., Sonoda, S., Burgaisky, G. and Lindquist, S. (1983) Is the major heat shock protein in *Drosophila* present in cells that have not been heat shocked? *J. Cell. Biol.*, **96**, 286-290.
- Voeltz, G.K. and Steitz, J.A. (1998) AUUUA sequences direct mRNA deadenylation uncoupled from decay during *Xenopus* early development. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 7537-7545.
- Wagner, E. and Lykke-Anderson, J. (2002) mRNA surveillance: the perfect persists. *J. Cell. Sci.*, **115**, 2215-2228.
- Wang, Z., Day, N., Trifillis, P. and Kiledjian, M. (1999) An mRNA stability complex functions with poly(A) binding protein to stabilize mRNA in vitro. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 4552-4560.

- Wang, Z. and Kiledjian, M. (2000a) Identification of an erythroid-enriched endoribonuclease activity involved in specific mRNA cleavage. *EMBO J.*, **19**, 295-305.
- Wang, Z. and Kiledjian, M. (2000b) The poly(A)-binding protein and an mRNA stability protein jointly regulate an endoribonuclease activity. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6334-6341.
- Wang, Z. and Kiledjian, M. (2001) Functional link between the mammalian exosome and mRNA decapping. *Cell*, **107**, 751-762.
- Wells, S.E., Hillner, P.E., Vale, R.D. and Sachs, A.B. (1998) Circularization of mRNA by eukaryotic translation initiation factors. *Mol. Cell*, **2**, 135-140.
- Whisstock, J.C., Romero, S., Gurung, R., Nandurkar, H., Ooms, L.M., Bottomley, S.P. and Mitchell, C.A. (2000) The inositol polyphosphate 5-phosphatases and the apuric/apyrimidinic base excision repair endonucleases share a common mechanism for catalysis. *J. Biol. Chem.*, **275**, 37055-37061.
- Wilkins, R.C. and Lis, J.T. (1997) Dynamics of potentiation and activation: GAGA factor and its role in the heat shock gene regulation. *Nuc. Acids Res.*, **25**, 3963-3968.
- Wilson, D.M.I., Takeshita, M. and Demple, B. (1997) Abasic site binding by the human apurinic endonuclease, Ape and determination of the DNA contact sites. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 933-939.
- Wilusz, C.J., Wormington, M. and Peltz, S.W. (2001) The cap-to-tail guide to mRNA turnover. *Nature Reviews*, **2**, 237-246.
- Wormington, M., Searfoss, A.M. and Hurney, C.A. (1996) Overexpression of poly(A) binding protein prevents maturation-specific deadenylation and translational inactivation in *Xenopus* oocytes. *EMBO J.*, **15**, 900-909.
- Wreden, C., Verrotti, A.C., Schisa, J.A., Lieberfarb, M.E. and Strickland, S. (1997) Nanos and pumilio establish embryonic polarity in *Drosophila* by promoting posterior deadenylation of hunchback mRNA. *Development*, **124**, 3015-3023.
- Xu, N., Chen, C.-Y.A. and Shyu, A.-B. (1997) Modulation of the fate of cytoplasmic mRNA by AU-rich elements: key sequence features controlling mRNA deadenylation and decay. *Mol. Cell. Biol.*, **17**, 4611-4621.
- Yost, H.J. and Lindquist, S. (1986) RNA splicing is interrupted by heat shock and is rescued by heat shock protein synthesis. *Cell*, **45**, 185-193.
- Zhao, M., Tang, D., Lechpammer, S., Hoffman, A., Asea, A., Stevenson, M.A. and Calderwood, S.K. (2002) Double-stranded-RNA-dependent protein kinase (pkr) is essential for thermotolerance, accumulation of HSP70, and stabilization of ARE-containing HSP70 mRNA during stress. *J. Biol. Chem.*, **277**, 44539-44547.
- Zuo, Y. and Deutscher, M.P. (2001) Exoribonuclease superfamilies: structural analysis, and phylogenetic distribution. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1-10.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

A ₂₆₀	Absorption bei 260 nm
Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxiddisulfat
BLAST	basic local alignment sequence tool
b bzw. bp	Basen bzw. Basenpaare
bov.	bovin
BSA	bovines Serum Albumin
m ⁷ -cap	m ⁷ G(5')ppp(5')N-Struktur
<i>C. elegans</i>	<i>Caenorhabditis elegans</i>
Ci	Curie (3,7 x 10 ¹⁰ Bequerel)
cpm	counts per minute
CXT	cytoplasmatischer Extrakt
DC	Dünnschichtchromatographie
DEAE	Diethylaminoethyl
DEPC	Diethylpyrocarbonat
<i>D. melanogaster</i>	<i>Drosophila melanogaster</i>
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylenamintetraacetat
eIF	eukaryotischer Translationsinitiationsfaktor
5'-FOA	5'-Fluoroorotsäure
FPLC	fast performance liquid chromatographie
g	Erdbeschleunigung oder Gramm
HEPES	Hydroxyethyl-piperazinyl-ethansulfonsäure
His	Histidin
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kDa	kilo-Dalton
KAc	Kaliumacetat
LB	Luria Bertani
LiOAc	Lithiumacetat
Ni-NTA	Nickel-nitrilo-tri-acetic-acid
NP-40	Nonidet P40
OD	Optische Dichte
ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PAP	Poly(A)-Polymerase
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PNK	Polynukleotidkinase
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	Umdrehungen pro Minute
dsRNA	doppelsträngige RNA
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur oder Reverse Transkription

S2-Zellen	Schneider2-Zellen
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetraethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>units</i>
UTR	<i>untranslated region</i>
UV	ultraviolett
wt	Wildtyp
w/v	Masse/Volumen
v/v	Volumen/Volumen

7.2 Lebenslauf

Name: Claudia Temme
geboren am: 29.2.1972
in: Kaltenkirchen
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

beruflicher Werdegang :

- 1984 – 1991 Ulrichsgymnasium in Norden, Abschluss mit dem Abitur
9/91 – 8/92 Au-pair-Aufenthalt in Frankreich
- 1992 – 1994 Grundstudium der Biologie, Justus-Liebig-Universität Gießen
9/94 Vordiplom in Biologie
1994 – 1998 Hauptstudium der Biologie
Schwerpunkte: Biochemie, Mikrobiologie, Genetik, Virologie
Diplomarbeit am Institut für Biochemie unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. Wahle
Thema: Gibt es eine direkte Wechselwirkung zwischen der Poly(A)-Polymerase und dem nukleären Poly(A)-Bindungsprotein 1
- 8/98-6/03 Doktorandin am Institut für Biochemie der Martin-Luther-Universität Halle in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. E. Wahle
- 10/01 EMBO Short term fellowship für einen Forschungsaufenthalt am CNRS in Gif-sur-Yvette in der Arbeitsgruppe von B. Seraphin.
- seit 9/03 Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie und Biotechnologie der Martin-Luther-Universität Halle in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. E. Wahle

Halle, den 17.10.2003

Claudia Temme

7.3 Publikationen

Juge,F., S. Zaessinger, C. Temme, E. Wahle and M. Simonelig (2002) Control of poly(A) polymerase level is essential to cytoplasmic polyadenylation and early development in *Drosophila*. *EMBO J.*, **21**, 6603-6613

7.4 Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Jene Stellen, die ich anderen Untersuchungen und Arbeiten dem Wortlaut oder Sinn entsprechend entnommen habe, sind durch Quellenangaben gekennzeichnet.

Ich versichere weiterhin, diese Arbeit an keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht zu haben.

Claudia Temme

Halle, den 17.10.2003

7.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Elmar Wahle für die engagierte wissenschaftliche Betreuung dieser Arbeit bedanken, dafür, dass er stets sehr an ihrem Fortgang interessiert war und dass er immer ein offenes Ohr für die kleineren oder größeren Probleme hatte.

Bei Herrn Prof. Holtmann und Herrn Prof. Séraphin bedanke ich mich für die Übernahme der Gutachten zu dieser Arbeit.

Ein *Merci beaucoup* möchte ich B. Seraphin und seiner Arbeitsgruppe in Gif-sur-Yvette, besonders aber M.-C. Daugeron sagen, für die freundliche Aufnahme in Gif, die große Hilfe bei der TAP-Reinigung und bei der Manipulation der Hefen.

Danken möchte ich auch meinen Freunden Béatrice und Jean-Eric Lefèvre, die mir in dieser Zeit Unterschlupf gewährt haben.

Bei den Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Reuter bedanke ich mich für Hilfe mit den *Drosophila*-Datenbanken und die Überlassung der cDNA-Genbank.

Herzlich danken möchte ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe in Halle, besonders aber Eva Dehlin, Ulla Niesbach-Klöggen und Michael Reuter, für die gute Atmosphäre im Labor, die Diskussionen fachlicher und weniger fachlicher Art und ihre stete Hilfsbereitschaft. Conny Herrmann möchte ich für ihre große Hilfe bei der Beschaffung von Literatur danken. Sylke Meyer, Ulla Niesbach-Klöggen und Dirk Ostareck danke ich sehr für die kritische Betrachtung des Manuskriptes während seiner Entstehungsphase.

Bedanken möchte ich mich auch bei der Mannschaft von Labor 211, die mir oft mit Chemikalien und Kaffee ausgeholfen hat und immer ein paar aufmunternde Worte für mich hatte.

Meinen Freunden in Halle, besonders aber Tina Parther, Daniel Gröbe, Thomas Bernasch, Anke Grzam, Claudia Keil und Bettina Kuhnt danke ich für ihre Unterstützung und für die schöne Zeit außerhalb des Labors.

Last but not least möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich durch alle Höhen und Tiefen der Promotionszeit begleitet hat und immer für mich da war.