

DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE
DER LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Die Charakterisierung von DDX27 als nukleolärer Ribosomenbiogenesefaktor und Interaktionspartner des PeBoW-Komplexes



Von Markus Kellner

25. April 2013

Angefertigt am Helmholtz-Zentrum München
Institut für klinische Molekularbiologie und Tumorgenetik
Abteilung für molekulare Epigenetik

Tag der Abgabe: 25.04.13

Erstgutachter: Prof. Dr. Dirk Eick

Zweitgutachter: Prof. Dr. Angelika Böttger

Tag der mündlichen Prüfung: 14.11.13

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

.....
Markus Kellner

Erklärung

Hiermit erkläre ich,

dass die Dissertation nicht ganz oder in wesentlichen Teilen einer anderen Prüfungskommission vorgelegt worden ist.

dass ich mich anderweitig einer Doktorprüfung ohne Erfolg **nicht** unterzogen habe.

München, den.....

.....
Markus Kellner

Synopsis

Ribosomenbiogenese stellt nicht nur die Translationsmaschinerie einer Zelle her, sondern ist auch eng mit den Mechanismen der Zellzykluskontrolle verbunden. Der Prozess ist somit von höchster Bedeutung für jede proliferierende Zelle, einschließlich Tumorzellen. Hunderte Faktoren beteiligen sich an dem Vorgang. Drei davon, die Proteine Pes1, Bop1 und WDR12, bilden in menschlichen Zellen den sogenannten PeBoW-Komplex. Der Komplex trägt maßgeblich zur Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit und der 28S und 5,8S rRNAs bei. In meiner Diplomarbeit habe ich herausgefunden, dass die DEAD-Box RNA-Helikase DDX27 einen Interaktionspartner des PeBoW-Komplex darstellt. Zahlreiche DEAD-box Helikasen sind als Ribosomenbiogenesefaktoren beschrieben, wohingegen dies nicht für DDX27 der Fall ist.

Diese Doktorarbeit sollte DDX27 in menschlichen Zellen in Hinblick auf Funktion, Interaktion mit dem PeBoW-Komplex und Lokalisation charakterisieren. Der *knockdown* von DDX27 zeigte, dass der Faktor eine Rolle für die Prozessierung der rRNAs der 60S Untereinheit spielt. Die Helikase ist überdies auf eine PeBoW-unabhängige Weise an der Prozessierung des 3'-Bereichs des 47S ribosomalen Primärtranskripts im 90S ribosomalen Partikel involviert. Die Benutzung von DDX27-Deletionsmutanten schuf weitere Einblicke in die Funktion mehrerer Domänen des Faktors. Co-Immunpräzipitationsexperimente offenbarten zum einen, dass sowohl Pes1 als auch Bop1 diejenigen Proteine des PeBoW-Komplexes sind, über welche die DDX27-Interaktion etabliert wird. Zum anderen konnte ein FxF-Motiv innerhalb des N-Terminus von

DDX27 als für die Interaktion essentielle Domäne gefunden werden. Der N-Terminus ist zwar für die Bindung an PeBoW jedoch nicht für die Lokalisation von DDX27 in den Nukleolus essentiell. Hierfür wird der C-Terminus benötigt. Mehrere Domänen auf dem C-Terminus können für sich unabhängig voneinander die Lokalisation auf RNA-abhängige Weise etablieren. Eine Deletion im zentralen Bereich von DDX27 führte zu einer Delokalisation in nukleoplasmatische *Spots*. Der PeBoW-Komplex wird dabei durch die Interaktion mit DDX27 ebenfalls delokalisiert.

Diese Arbeit gewährt Einblicke in die Funktion und Charakteristik eines bislang fast unbekanntes Faktors der Ribosomenbiogenese. Das Gesamtbild dieses Prozesses, welcher insbesondere in Säugern noch relativ wenig erforscht wurde, erweitert sich somit um ein weiteres Fragment.

Inhaltsverzeichnis:

Einleitung	1
1. Ribosomenbiogenese	1
1.1. Der Nukleolus	1
1.2. Die rRNA-Transkription und ihre Regulation	4
1.3. Die rRNA-Prozessierung in Hefe und menschlichen Zellen	6
1.4. Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle	11
1.5. Ribosomenbiogenese und Krankheitsentstehung	14
2. Der PeBoW-Komplex.....	15
2.1. Die PeBoW-Komponenten.....	15
2.2. Der PeBoW-Komplex in der Ribosomenbiogenese.....	18
3. DEAD-Box RNA-Helikasen	20
3.1. Die Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen.....	20
3.2. DEAD-Box Helikasen in der Ribosomenbiogenese.....	24
4. Aufgabenstellung	26
Material und Methoden	28
1. Material.....	28
1.1. Chemikalien	28
1.2. Verbrauchsmaterialien	31
1.3. Geräte	32
1.4. Software	34
1.5. Puffer und Lösungen	34

1.6. Bakterienstämme	37
1.7. Zelllinien	37
1.8. Plasmide	37
1.9. Primer	39
1.10. <i>Northern Blot</i> Sonden.....	41
1.11. SiRNAs	42
1.12. Antikörper	42
2. Methoden	44
2.1. Zellkultur	44
2.1.1. Kultivieren von Zellen.....	44
2.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen	44
2.1.3. Zählen von Zellen	45
2.1.4. Proliferationsassay	466
2.1.5. Transfektion von Plasmiden für die Expression von exogenen Proteinen	46
2.1.6. Transfektion von siRNA	46
2.1.7. Herstellung chemokompetenter E.coli	47
2.1.8. Transformation von E.coli mit Plasmiden	47
2.1.9. Lysieren von Zellen	488
2.2. Klonierung und Mutagenese.....	48
2.2.1. PCR aus einer cDNA-Bank	48
2.2.2. PCR-Mutagenese	49
2.2.3. DNA-Gelelektrophorese und Extraktion.....	50

2.2.4. Ligation von Sequenzen in Plasmide	511
2.2.5. Mini- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA	51
2.3. RNA-Analyse-Methoden	522
2.3.1. Isolierung von RNA	52
2.3.2. RNA-Gelelektrophorese.....	52
2.3.3. <i>In vivo labelling</i> (Pulse-Chase)	52
2.3.4. Northern-Analyse.....	533
2.4. Protein-Analyse-Methoden	54
2.4.1. <i>knockdown</i> von Proteinen über RNA-Interferenz	54
2.4.2. SDS-PAGE.....	54
2.4.3. <i>Western-Analyse</i>	54
2.4.4. Immunpräzipitation	55
2.4.5. Proteinauftrennung über einen Sucrosegradienten.....	56
2.4.6. Immunfluoreszenz-Mikroskopie	56
Ergebnisse	58
1. Die Bedeutung von DDX27 für die Ribosomenbiogenese	58
1.1. DDX27 lokalisiert im Nukleolus	58
1.2. DDX27 assoziiert mit der (Prä-)60S ribosomalen Untereinheit.....	59
1.3. DDX27 <i>knockdown</i> vermindert die Prozessierung der 32S Prä-rRNA zur 28S rRNAs	60
1.4. Der <i>knockdown</i> von DDX27 bewirkt einen 3'-Prozessierungsdefekt der 47S Prä-rRNA.....	64
1.5. Der DDX27 <i>knockdown</i> verlangsamt die Zellproliferation.....	66

2. Herstellung von Deletionsmutanten zur funktionellen Charakterisierung der Domänen von DDX27.....	67
2.1. Die Auswirkungen der Deletionen auf rRNA-Prozessierung	69
2.2. Die Auswirkungen der Deletionen auf Proliferation	71
3. Die Interaktion von DDX27 mit dem PeBoW-Komplex.....	73
3.1. Die Identifikation des Interaktionspartners von DDX27 im PeBoW-Komplex.....	73
3.1.1. DDX27 interagiert mit Pes1 und Bop1	73
3.1.2. Der C- Terminus von Bop1 als mögliche Interaktionsdomäne für DDX27.....	75
3.2. Die Identifikation der PeBoW-Interaktionsdomäne von DDX27	77
3.2.1. Der N- Terminus von DDX27 interagiert mit dem PeBoW-Komplex.....	77
3.2.2. Ein konserviertes FxF Motiv ist essentiell für die Interaktion...	80
4. Der Einfluss von DDX27-Domänen auf die zelluläre Lokalisation	85
4.1. Die nukleoläre Lokalisation von DDX27 hängt vom C- Terminus aber nicht von der Interaktion mit PeBoW ab	85
4.2. Mehrere Domänen im C- Terminus tragen zur Lokalisation von DDX27 im Nukleolus bei.....	87
4.3. Die nukleoläre Lokalisation von DDX27 ist RNA-abhängig	88
4.4. Deletionen im zentralen Bereich von DDX27 führen zur Delokalisation von PeBoW und anderen nukleolären Faktoren in nukleoplasmatische <i>Spots</i>	90
Diskussion	94
1. DDX27 als Ribosomenbiogenesefaktor im Zusammenhang mit PeBoW.....	94

2. DDX27 als Faktor in der 3'-Prozessierung der 47S Prä-rRNA.....	98
3. Die Interaktion zwischen DDX27 und den PeBoW-Faktoren.....	101
4. Das FxF-Motiv des N- Terminus von DDX27 als essentielle Domäne für die Interaktion mit dem PeBoW-Komplex	104
5. Der C- Terminus von DDX27 als Lokalisationsdomäne	110
6. Der zentrale Bereich von DDX27 als RNA-Bindestelle	114
Literaturverzeichnis	117
Anhänge	131
Danksagung	134

Einleitung

1. Ribosomenbiogenese

Ribosomenbiogenese ist von einfachen Bakterien bis zu komplexen vielzelligen Organismen einer der wichtigsten zellulären Prozesse. Die Ribosomen produzieren alle Proteine einer Zelle. Proliferierende eukaryotische Zellen investieren daher bis zu 90% ihrer Energie für die Ribosomenbiogenese, um für die Tochterzellen ausreichende Kapazitäten der Proteinsynthese bereit zu stellen.

Die in dieser Arbeit untersuchten Faktoren spielen eine Rolle in der Ribosomenbiosynthese, daher soll der Vorgang im Folgenden genauer erläutert werden.

1.1. Der Nukleolus

Der Großteil der eukaryotischen Ribosomenbiogenese findet im Nukleolus, einer Unterstruktur des Zellkerns, statt. Die Größe und Anzahl der Nukleoli schwankt je nach Organismus und Zellstatus. Die Größe der menschlichen Nukleoli variiert zum Beispiel von 0,5 – 9 μm . Die Nukleoli lassen sich bereits mit einfacher Lichtmikroskopie als dunkle Bereiche im Nukleus gut erkennen (Abb. 1A). Der Nukleolus ist anders als andere zelluläre Kompartimente nicht durch eine Membran oder Hülle abgeschlossen. Vielmehr versteht man darunter eine Agglomeration von einer Vielzahl an Faktoren, die sich um die ribosomale DNA (rDNA) sammeln. Die DNA wird in Nukleoli transkribiert und kodiert für drei von insgesamt vier ribosomalen RNAs (rRNA). Die rDNA kommt (je nach Organismus) in mehreren hundert Kopien im Genom vor. Mehrere

einzelne Kopien bündeln sich in bestimmten Bereichen der Chromosomen in Tandem-Wiederholungen. Die einzelnen transkribierbaren Bereiche werden dabei von intergenischen Platzhaltern getrennt. Die rDNA-Cluster werden *Nucleolar Organizer Regions* (NORs) genannt, um welche sich einzelne Nukleoli ausbilden (Caburet et al., 2005; Raska et al., 2006). Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt nur einen NOR, um den sich nur ein Nukleolus formt. Beim Menschen findet man mehrere Tandem-Wiederholungs-Cluster, verteilt auf den kurzen Armen der acozentrischen Chromosomen 13, 14, 15, 21 und 22 (Hernandez-Verdun et al., 2011). Nicht alle rDNA-Gene und NORs in einer Zelle sind gleichzeitig aktiv. Viele rDNA-Gene werden über epigenetische Mechanismen, wie DNA-Methylierung, reprimiert. In Säugern ist überdies ein *Nucleolar Remodelling Complex* (NoRC) beschrieben, welcher über kleine 200-300 bp lange pRNAs an rRNA-Gene geleitet wird und diese inaktiviert (Preuss et al., 2008; Santoro et al., 2010). Die heutige Forschung nimmt an, dass es neben aktiven und inaktiven ribosomalen Genen wohl noch einen dritten Zustand gibt. Die Faktoren, welche für die Expression benötigt werden, sammeln sich bei diesem Zustand zwar bereits an den rDNA-Genen. Die Gene werden aber nicht transkribiert, sondern befinden sich in einer Art Abrufstellung (Nemeth und Längst, 2011).

Nukleoli liegen in höheren Eukaryoten nur während der Interphase einer Zelle vor. Bei Ende der Mitose treten zunächst die *prenucleolar bodies* auf, in denen sich Prozessierungsfaktoren der Ribosomenbiogenese aber auch noch unprozessierte rRNA assemblieren. Aus den *prenucleolar bodies* gehen dann die funktionsfähigen Nukleoli an den NORs hervor (Boisvert et al., 2007). Die Nukleoli unterteilen sich in verschiedene strukturelle und funktionelle Bereiche. Die Unterteilung der Bereiche unterscheidet sich zwischen verschiedenen Spezies. Die Nukleoli von Hefen, den meisten Pflanzen und niederen Tieren sind

zweiteilig aufgebaut. Eine granuläre Komponente (GC, *granular component*) umgibt ein Netzwerk aus fibrillären Strängen. Der fibrilläre Kern gliedert sich beim Menschen und höheren Tieren noch in das fibrilläre Zentrum (FC, *fibrillar center*) und die dichte fibrilläre Komponente (DFC, *dense-fibrillar component*) (Abb.1B,C). Die evolutionäre Grenzlinie zwischen zwei- und dreiteiligem Aufbau ist bislang noch nicht vollständig geklärt. Der fibrilläre Bereich dient jedoch in allen Organismen der Transkription von rDNA zu rRNA. Im DFC beginnt zudem die Prozessierung der rRNA. Die rRNA wird im GC weiterprozessiert und in Prä-Ribosomen assembliert (Hernandez-Verdun et al., 2011; Thiry et al., 2011).

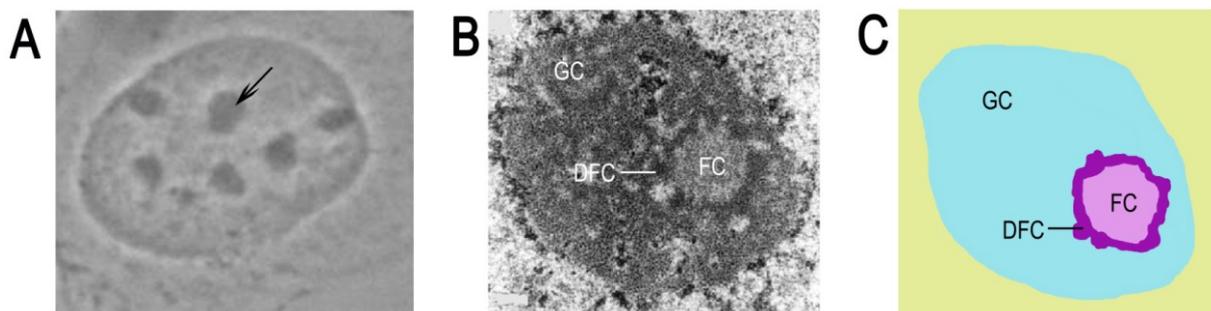


Abb. 1: Der Nukleolus. A) Nukleus einer menschlichen Zelle (u2os). Im Lichtmikroskop sind die Nukleoli klar als dunkle Flecken zu erkennen. B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Nukleolus einer menschlichen Zelle (Hep2). Der Nukleolus gliedert sich das fibrilläre Zentrum (FC), umschlossen von der dichten fibrillären Komponente (DFC) und der granulären Komponente (GC). Entnommen aus Thiry und Lafontaine, 2005. C) Schematische Darstellung des Aufbaus eines menschlichen Nukleolus.

Über 700 Proteine des menschlichen Proteoms wurden dem Nukleolus zugeordnet. Diese Proteine spielen aber nicht alle eine Rolle in der Ribosomenbiogenese. Der Nukleolus scheint noch an weiteren zellulären Prozessen beteiligt zu sein. Dazu zählt unter anderem die Prozessierung weiterer RNA-Arten wie der tRNA, die Assemblierung zu Ribonukleoproteinen (RNPs), Telomerase-Aktivität, *Splicing*, Stress-Reaktionen und die Regulierung des Zellzyklus (Boisvert et al., 2007;

Boulon et al, 2010; Shaw und Brown, 2012). Auf die letzten beiden Punkte wird in Kapitel 1.4. näher eingegangen.

1.2. Die rRNA-Transkription und ihre Regulation

Die Ribosomenbiogenese läuft in mehreren Teilschritten ab. Der erste Schritt im Nukleolus besteht darin die rRNA zu transkribieren (Abb. 2A). Die Initiation der Transkription startet am Promotor des rDNA-Gens. Der Promotor liegt etwa 200 bp oberhalb des Transkriptionsstarts. Der *upstream binding factor* (UBF) bindet an den Promotor, und strukturiert die DNA um, dass sie für weitere Faktoren zugänglich wird. An UBF bindet dann der *promotor selectivity factor* (SL1). SL1 besteht aus dem *TATA-binding protein* (TBP) sowie fünf *TATA-binding protein*-assoziierten Faktoren (TAFs), und bildet zusammen mit dem Transkriptions-Initiations-Faktor 1A (TIF-1A) das Verbindungsstück zur RNA-Polymerase I (Pol I). Die Co-Faktoren rekrutieren die RNA-Polymerase I durch Bindung an den Promoter für die Transkription der rRNA (Denissov et al., 2011; Grummt, 2010). Die RNA-Polymerase I synthetisiert daraufhin das sogenannte 47S prä-ribosomale Primärtranskript. Die Elongation wird durch Bindung des Terminationsfaktors 1 (TTF-1) an den 3' gelegenen Thymidin-reichen Sal-Boxen beendet (Kuhn et al., 1990; Jansa et al., 1998). Die RNA-Polymerase I pausiert an dieser Position und wird schließlich von der DNA abgelöst. Rnt1, zu welchem das Homolog in Säugern unbekannt ist, wurde in der Hefe als Endonuklease beschrieben, die in der 3'-Sequenz des rRNA-Primärtranskripts schneidet (Abb. 2B). Die 5'-3'-Exonuklease Rat1 kann daraufhin die abgetrennte RNA bis zur RNA-Polymerase I hin abbauen, wodurch die RNA-Polymerase von der DNA dissoziiert (Kawauchi et al., 2008; Braglia et al., 2011).

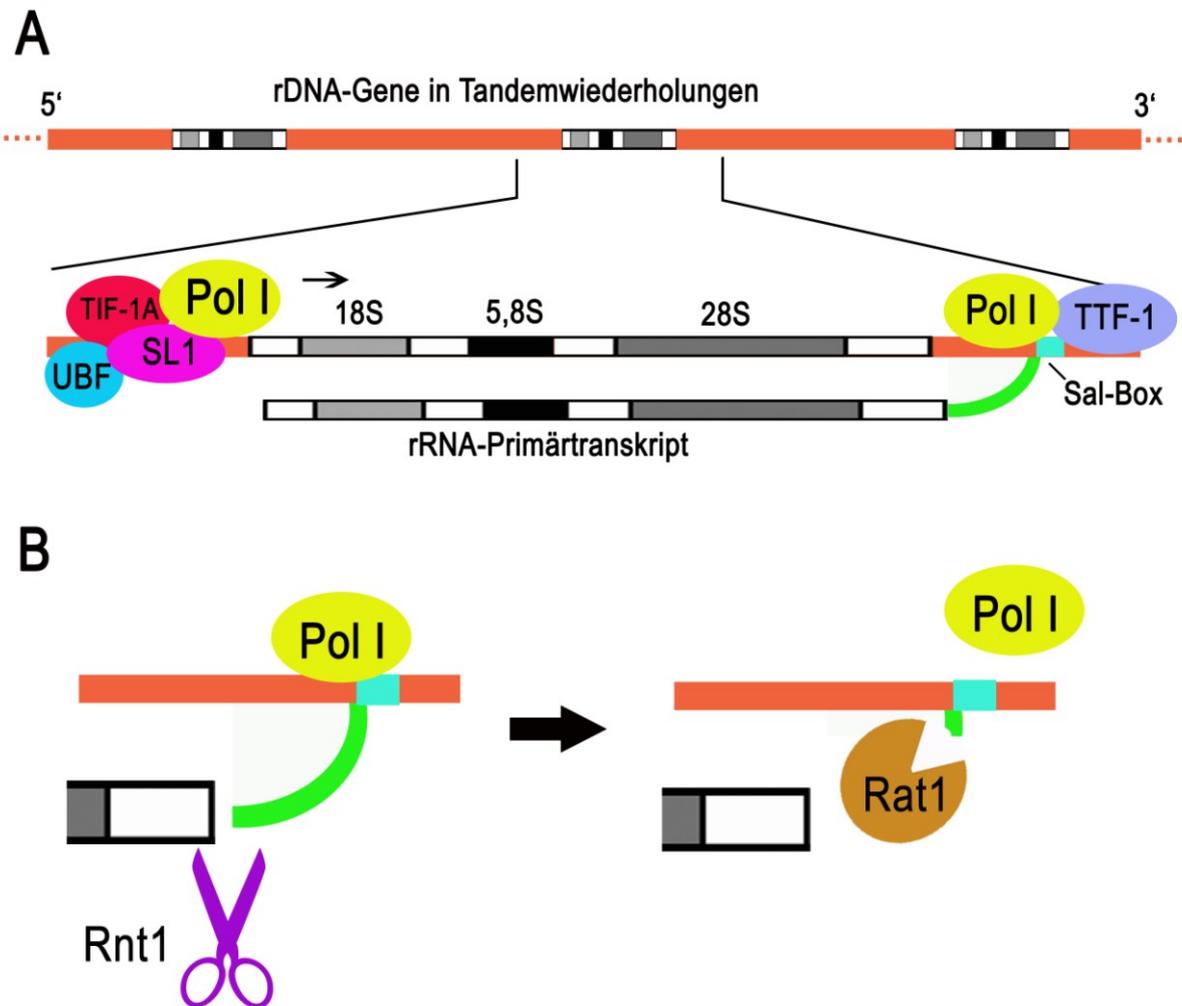


Abb. 2: Schema der rRNA-Transkription. A) Die rDNA-Gene liegen auf den Chromosomen in Tandemwiederholungen mit intergenischen Platzhaltern. Die Faktoren UBF, SL1 und TIF-1A bilden den Prä-Initiationskomplex, der es der RNA-Polymerase I ermöglicht die rRNA zu transkribieren. Die Transkription wird an den Sal-Boxen mit Hilfe von TTF-1 terminiert. B) Die Endonuklease Rnt1 schneidet in der Hefe das Primärtranskript am Ende der 3'-ETS. die RNA-Polymerase I pausiert unterhalb der Schnittstelle an den Thymidin-reichen Stellen (= Sal-Boxen) und wird durch die 5'-3'-Exonuklease-Aktivität von Rat1 abgelöst.

Die RNA-Polymerase I ist zwar strukturell mit den anderen eukaryotischen RNA-Polymerasen (Pol II und III) verwandt, aber anders reguliert. Die Umstände einer Zelle bestimmen dabei wesentlich, welche Signalwege die bereits genannten Co-Faktoren in ihrer Wirksamkeit regulieren. UBF wird generell in proliferierenden Zellen durch die Zellzyklus-abhängigen Kinasen Cdk2 und Cdk4 phosphoryliert und somit aktiviert (Heix et al., 1998; Voit et al., 1999). Auch externe Einflüsse wirken sich aus. Die Anwesenheit von Nährstoffen und/oder

Wachstumsfaktoren aktiviert den mTOR-Signalweg bzw. den ERK-Signalweg, was wiederum zur aktivierenden Phosphorylierung von UBF und TIF-1A führt (Stefanovsky et al., 2001; Zhao et al., 2003; Hannan et al., 2003; Mayer et al., 2004). Ein geringer Energiestatus der Zelle bewirkt über den AMP-Kinase-Pfad dagegen die Phosphorylierung anderer Aminosäuren von TIF-1A und hemmt dadurch die rRNA-Transkription (Hoppe et al., 2009). Zellulärer Stress führt in gesunden Zellen zur Verminderung der rRNA-Expression (Drygin et al., 2010). Tumorsuppressoren wie pRb, PTEN oder auch p53 sorgen für eine Repression der RNA-Polymerase I Transkriptionsmaschinerie (Voit et al., 1997; Zhai et al., 2000; Zhang et al., 2005a). Die Ribosomensynthese wird somit an die Gegebenheiten der Zelle angepasst.

1.3. Die rRNA-Prozessierung in Hefe und menschlichen Zellen

Die rRNA kann bereits während ihrer Transkription weiterprozessiert werden (Kos und Tollervey, 2010). Die rRNA-Prozessierung ist ein hochkomplexer Vorgang, der dazu dient die ribosomalen RNAs aus dem Primärtranskript in die ribosomalen Untereinheiten zu inkorporieren. Die ribosomalen Untereinheiten umfassen die große 60S und die kleine 40S Untereinheit. Da der Prozess in *S. cerevisiae* mit Abstand am besten untersucht wurde, soll der Vorgang zunächst in Hefe erläutert werden (Abb. 3A). Anders als in Säugern wird in *S. cerevisiae* ein kürzeres 35S Primärtranskript erzeugt. Die sequentielle 5' zu 3' Abfolge der späteren rRNAs innerhalb des Transkripts entspricht indes der Abfolge in Säugerzellen (Abb. 2): 18S, 5,8S und 25S (Hefe) bzw. 28S (Säuger). Zwischen diesen Sequenzen erstrecken sich die *internal transcribed spacer 1 und 2* (ITS1 und ITS2). Die 5' bzw. 3' *external transcribed spacer* (5'-ETS und 3'-ETS) grenzen das Primärtranskript an den Seiten ab.

Das U3 snoRNP bindet als einer der ersten Faktoren an die 5'-ETS. SnoRNPs (*small nucleolar ribonucleoprotein complexes*) sind eine Gruppe von Komplexen, die aus mehreren Proteinen und einer ca. 200-300 bp langen snoRNA, einer sogenannten *guide RNA*, bestehen. Die *guide RNA* führt dabei das snoRNP durch Basenkomplementarität an andere Nukleotidstränge heran, wo die snoRNPs diverse Aufgaben erfüllen können. Die U3 snoRNA formt mit Hilfe der an das RNP bindenden tUTP-Komplexe die rRNA so um, dass die RNA, an den Positionen A₀ und A₁ geschnitten werden kann. Die Gesamtheit der Komplexe, welche die (spätere) 18S rRNA im frühen Stadium der Ribosomensynthese umgeben und prozessieren, nennt man auch das *small subunit processosome* (SSU) (Dragon et al., 2002; Perez-Fernandez et al., 2007; Gallagher et al., 2004). Die U3 ist auch für den Schnitt in der ITS1 an der Position A₂ essentiell. Die Menge aus Prä-rRNA und Prozessierungsfaktoren bildet bis zu diesem Schnitt das 90S prä-ribosomale Partikel. Das 90S Partikel spaltet sich nun in ein 66S bzw. 43S prä-ribosomales Partikel auf und der Prozessierungsweg der jeweils zugehörigen Prä-RNAs separiert sich (Granneman und Baserga, 2004). Das 43S Partikel wird schnell vom Nukleolus über das Nukleoplasma ins Cytoplasma exportiert. Das 66S Partikel und seine Prä-rRNA müssen im Nukleolus noch weitere Prozessierungsschritte durchlaufen. Die Endonuklease Rnt1 entfernt zunächst die 3'-ETS (Kufel et al., 1999). Die daraus entstandene 27SA₂ Prä-rRNA wird direkt endonukleolytisch am 5'-Ende der späteren 5,8S geschnitten, wodurch die verbliebene ITS1 abgetrennt wird und die 27SB Prä-rRNA entsteht. Alternativ wird die 27SA₂ durch die RNase MRP in der verbliebenen ITS1 an Position A₃ geschnitten, wodurch zunächst die 27SA₃ Prä-rRNA entsteht (Schmitt et al., 1993). Die 5'-3'-Exonukleasen Rat1 und Xrn1 bauen dann die RNA bis zum Anfang der 5,8S Sequenz, der Position B, ab. (Henry et al., 1994). Aus der 27SA₃ geht somit ebenfalls eine 27SB

Prä-rRNA hervor. Die RNA durchläuft in 85% der Fälle den zweiten Pfad. Der Stopp des Abbaus im zweiten Pfad liegt jedoch ca. 30 Nukleotide weiter 3' als beim ersten Pfad, was nach Ende der Prozessierung zur Entstehung zweier unterschiedliche langer Arten der reifen 5,8S rRNAs, der 5,8S_L (*long*) und 5,8S_S (*short*), führt. Die weiterführenden Schritte sind für die 27SB_L und 27SB_S Prä-RNAs gleich. Die RNA spaltet sich durch einen Schnitt an Position C₂, in der ITS2, in eine 7S und 26S Prä-rRNA auf (Fromont-Racine et al, 2003). Die AAA-ATPase Rea1 hilft beim Export des 60S Vorläuferpartikel aus dem Nukleolus ins Nukleoplasma (Baßler et al., 2010). Die 7S Prä-rRNA reift im Nukleoplasma durch das Exosom, einem Multiproteinkomplex mit 3'-5'-Exonukleaseaktivität, und Rex1 zur 5,8S (Allmang et al., 1999; van Hoof et al., 2000). Rat1 und Xrn1 trimmen die 26S zur reifen 25S (Geerlings et al., 2000). Die dritte ribosomale RNA der großen Untereinheit ist die 5S rRNA. Diese wird nicht durch die RNA-Polymerase I, sondern durch die RNA Polymerase III transkribiert. In der Hefe wird die 5S rRNA im 3'-ETS-Komplementärstrang des rDNA-Gens kodiert (Schneider, 2012). Die 5S rRNA wird im Nukleolus durch Bindung an die ribosomalen Proteine L5 und L11 in das 66S-Partikel eingebaut (Zhang et al., 2007). Das 60S-Partikel muss jetzt noch ins Cytoplasma befördert werden. Die Exportfaktoren Crm1 und Xpo1 erkennen am 60S-assoziierten Faktor Nmd3 ein *nuclear export signal* (NES), wodurch das Partikel mit Unterstützung der GTPase Ran durch die *nuclear pore* Komplexe (NoPC) aus dem Zellkern ins Cytoplasma exportiert werden kann (Fornerod et al., 1997; Gadai et al., 2001). Der Export funktioniert ebenso bei dem 43S-Partikel, allerdings trägt hier der Faktor Ltv1 das NES (Hurt et al., 1999; Seiser et al., 2006). Die 20S Prä-rRNA wird dann im Cytoplasma durch eine Endonuklease, wahrscheinlich Nob1, und mit Hilfe der Kinasen Rio1 und Rio2, zur reifen 18S rRNA prozessiert (Geerlings et al., 2003; Pertschy et al., 2009).

Eine Vielzahl verschiedener weiterer Faktoren beteiligen sich an der Reifung der ribosomalen Untereinheiten und der rRNAs, darunter GTPasen, Helikasen, Nukleasen und snoRNPs. Neben den Prozessierungsfaktoren gibt es auch die ribosomalen Proteine (RPs), die in den reifen Untereinheiten verbleiben (33 ribosomale Proteine in der 40S Untereinheit, 46 ribosomale Proteine in der 60S Untereinheit) (Kressler et al., 2010).

Ribosomenbiogenese läuft in Säugern auf vergleichbare Weise ab (Abb. 3B), ist aber bei Weitem nicht so gut in ihren Einzelheiten erforscht (Mullineux und Lafontaine, 2012). In Säugern wird ein 47S Primärtranskript sukzessive prozessiert.

Zuerst wird die 3' ETS entfernt und es entsteht eine 45S Prä-rRNA. Die Entfernung der 5' ETS folgt als nächstes. Die daraus entstandene 41S Prä-rRNA spaltet sich durch Schnitt in der ITS1 in eine 21S und 32S Prä-rRNA. Die 21S Prä-rRNA reift zur 18S rRNA. Die 32S Prä-rRNA wird durch Abbau der restlichen ITS1 verkürzt und dann in der ITS2 geschnitten. Aus den Teilstücken entstehen die reife 28S rRNA und die 12S Prä-rRNA. Die 12S reift dann noch zur 5,8S rRNA.

Die in Säugerzellen für die Ribosomenbiogenese benötigten Faktoren sind bislang wenig charakterisiert. Da es zu den meisten Faktoren der Hefe Homologe in Säugern gibt, erfüllen diese wahrscheinlich ähnliche Aufgaben. In Säugern kommen zudem noch Faktoren ohne Homologe in der Hefe vor. Bekannte Beispiele dafür sind die U8 snoRNA oder das Phosphoprotein Nukleophosmin (NPM1, auch als B23 bekannt), die beide für die Prozessierung der ITS2 benötigt werden (Bowman et al., 1981; Peculis, 1997; Srivastava et al., 2010; Henras et al., 2008).

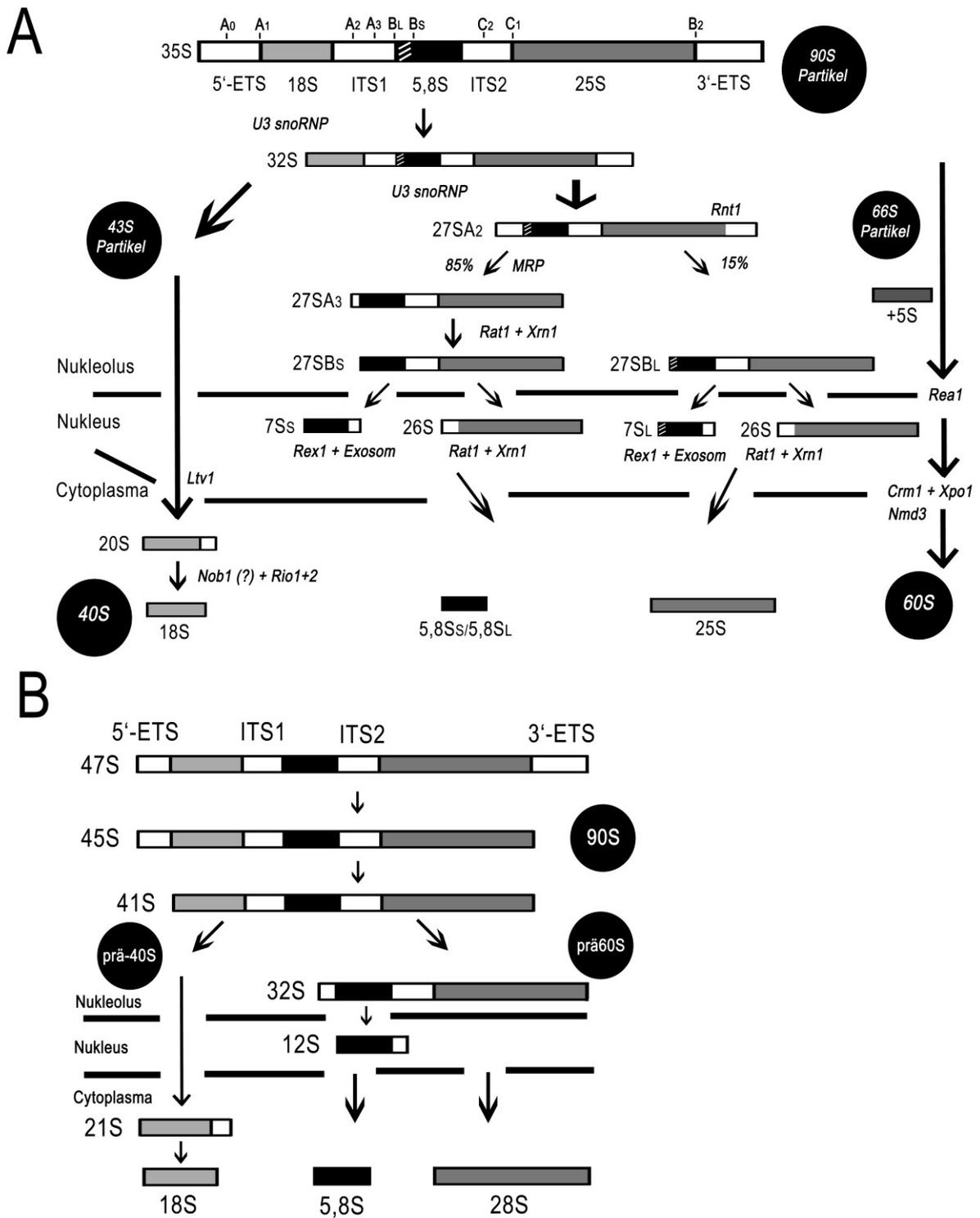


Abb. 3: rRNA-Prozessierungsschema. A) In *Saccharomyces cerevisiae*. B) In menschlichen Zellen.

In Hefe und Säugern existieren zwei Klassen von snoRNPs, die C/D- und H/ACA-Box spezifischen snoRNPs, welche die rRNA an mehreren Positionen chemisch modifizieren. Die snoRNA dieser RNPs bindet durch Basenkomplementarität an definierte Stellen der rRNA. Ein

gepaartes Nukleotid der rRNA wird durch die im C/D-Box snoRNP integrierte Methyltransferase Nop1 (Hefe)/Fibrillarin (Säuger) 2'-O-methyliert (Kiss-Laszlo et al., 1996). Zwei komplementäre Sequenzabschnitte der snoRNA von H/ACA-Box snoRNPs binden an der Prä-rRNA gezielt um Uridine. Die H/ACA-Box snoRNP-assoziierte Pseudouridin-Synthase Cbf5 (Hefe)/ Dyskerin (Säuger) pseudouridinyliert dann dieses Uridin (Ganot et al., 1997). Die Modifikationen beider snoRNP-Typen finden noch während der Prozessierung der rRNA statt, doch haben sie wenig Einfluss auf den Prozess der Ribosomenbiogenese selbst. Die Modifikationen werden in funktionelle Bereiche der Translation eingebaut und beeinflussen die Translationseffizienz der reifen Ribosomen (Decatur und Fournier, 2003; Tollervey et al., 1993; Zebarjadian et al., 1999). Weitere snoRNPs haben andere Aufgaben in der rRNA-Prozessierung, zum Beispiel die bereits erwähnten U3 und U8 snoRNPs (Venema und Tollervey, 1999; Peculis, 1997).

1.4. Ribosomenbiogenese und Zellzykluskontrolle

Die Kontrolle des Zellzyklus ist für mehrzellige Organismen von besonderer Bedeutung, da sicher gestellt werden muss, dass Zellen sich in geregelter Weise teilen. Ein fehlerhafter Zellzyklus kann z.B. zu chromosomaler Instabilität und Krankheiten, insbesondere zur Entstehung von Krebs, führen. Der Nukleolus und die Ribosomenbiogenese haben in der Zellzykluskontrolle eine Schlüsselrolle.

Wichtige Forschungsergebnisse wurden von Rubbi und Milner nach UV-Bestrahlung von Zellen veröffentlicht (Rubbi und Milner, 2003). Eine zelluläre Stress-Antwort trat überraschenderweise nur dann auf, wenn die Bestrahlung auch den Nukleolus traf. „Nukleolärer Stress“ ist die

Voraussetzung für die Stabilisierung des Tumorsuppressors p53 und kann durch verschiedene Ursachen hervorgerufen werden (Boulon et al., 2010). Die meisten Gründe betreffen eine Störung der Ribosomenbiogenese. Die Blockade der rRNA-Synthese, zum Beispiel durch Substanzen wie Actinomycin D, gehört dazu (Fetherston et al., 1984; Burger et al., 2010; Deisenroth und Zhang, 2010). Auch der *knockdown* von essentiellen Faktoren der rRNA-Transkription wie TIF-1A bewirkt nukleolären Stress (Yuan et al., 2005). Die Störung der rRNA-Prozessierung, inklusive durch die Depletion von wichtigen Faktoren, kann ebenfalls nukleolären Stress bedeuten (Pestov et al., 2001b; Hölzel et al., 2005). Der Stress führt in der Regel zur Desintegration der nukleolären Struktur. Aus der nukleolären Desintegration lässt sich auch das am meisten akzeptierte Modell ableiten, wie es zur p53-Hochregulierung kommt (Abb. 4). Erhöhte Mengen von ribosomalen Proteinen migrieren dabei ins Nukleoplasma. Einige von diesen Proteinen können Mdm2 binden. Mdm2 ist eine E3-Ubiquitin-Ligase, welches in nicht gestressten proliferierenden Zellen p53 bindet, ubiquitiniert und somit für den Abbau des Tumorsuppressors durch das Proteasom sorgt (Tao und Levine, 1999a). Die Bindung der ribosomalen Proteine inhibiert hingegen Mdm2, was im Folgenden zur Stabilisierung von p53 führt. Rpl5, Rpl11 (ribosomale Proteine der großen (*large*) 60S Untereinheit) und Rps7 (ribosomales Protein der kleinen (*small*) 40S Untereinheit) scheinen für die p53-Stabilisierung von essentieller Bedeutung zu sein, da eine Depletion jeder einzelnen dieser ribosomalen Proteine den Verlust der p53-Antwort nach Stress zur Folge hat (Lohrum et al., 2003; Zhang et al., 2003; Dai und Lu, 2004; Zhu et al., 2009). Rpl5 und Rpl11 verhelfen überdies dem Faktor Mybbp1a beim Export aus dem Nukleolus. Mybbp1a sorgt in Zusammenarbeit mit der Acetyltransferase p300 für die Acetylierung von p53 und stabilisiert den Tumorsuppressor damit noch weiter (Kuroda et al., 2011). Weitere

ribosomale Proteine wie Rpl23, Rpl26 und Rps27 binden und inhibieren Mdm2 ebenfalls, sind aber für die p53-Antwort nicht derart essentiell wie die zuvor genannten ribosomalen Proteine (Jin et al., 2004; Zhang et al., 2010; Xiong et al., 2011).

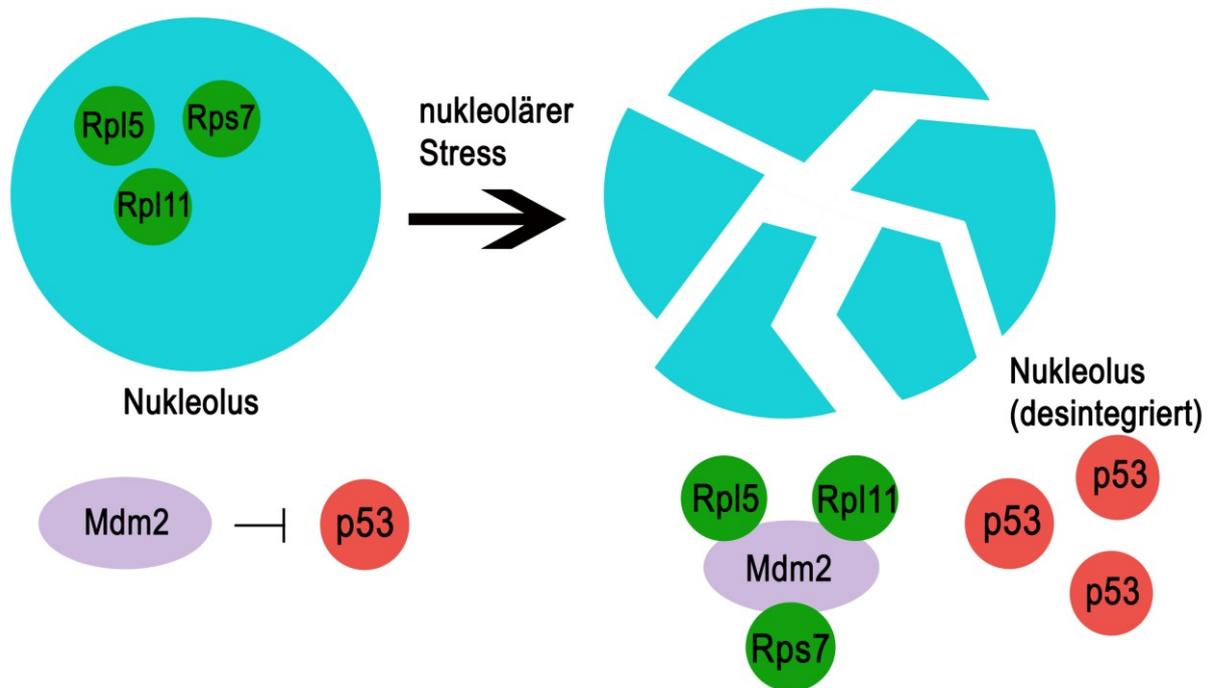


Abb. 4: Pfad der p53-Antwort nach nukleolärem Stress. Der Nukleolus wird durch nukleolären Stress desintegriert, wodurch es zur Freisetzung der ribosomalen Proteine Rpl5, Rpl11 und Rps7 ins Nukleoplasma kommt. Diese Proteine können dann Mdm2 binden und inhibieren. Mdm2 kann p53 daraufhin nicht mehr ubiquitinieren und p53 wird nicht mehr abgebaut.

Auch nukleoläre Faktoren wie Nukleostemin, Nukleophosmin, Nucleolin oder der Tumorsuppressor p14ARF, die nicht zur Klasse der ribosomalen Proteine gehören, sind in der Lage Mdm2 durch Bindung zu inhibieren (Tao und Levine, 1999b; Ithahana et al., 2003; Saxena et al., 2006; Ma et al., 2008). Die Desintegration der nukleolären Struktur scheint aber nicht zwangsläufig für eine L11-abhängige p53-Induktion notwendig zu sein, da wiederum nach Depletion von Rps6 keine Desintegration des Nukleolus, aber p53-Akkumulation zu beobachten ist

(Fumagalli et al., 2009). Diese Erscheinung wird dadurch erklärt, dass es mangels Rps6 zwar zu einer gestörten Gesamttranslation der Zelle kommt, gleichzeitig aber auch zu einer Hochregulierung der Translation der Rpl11 mRNA. Die Rpl11 mRNA verfügt am Translationsstart über einen Oligopyrimidintrakt. Der Trakt bewirkt, dass die mRNA bei fehlendem Rps6 im Ribosom besser translatiert werden kann.

1.5. Ribosomenbiogenese und Krankheitsentstehung

Eine Störung der korrekten Regulation der Ribosomenbiogenese kann zu Krankheit, insbesondere Tumorbildung führen, auch weil eine fortlaufende Produktion an neuen Ribosomen eine Grundvoraussetzung für die Proliferation von Zellen darstellt. Mehrere Krankheiten sind beschrieben, die mit Ribosomenbiogenese assoziiert sind. Viele dieser Krankheiten schließen eine erhöhte Anfälligkeit der Patienten für Krebs mit ein. Der molekularbiologische Hintergrund einer Krankheit kann in unterschiedlichen Teil-Aspekten der Ribosomenbiogenese liegen. Beim Schwachman-Bodian-Diamond-Syndrom, welches sich durch Pankreasinsuffizienz, gestörte Hämatopoese und einem erhöhten Risiko für Leukämie kennzeichnet, ist beispielsweise die 60S ribosomale Untereinheit betroffen. Der Export der 60S Untereinheit wird durch Mutationen im Gen *SBDS* inhibiert (Wong et al., 2011). Die Reifung der 18S rRNA wird hingegen beim Treacher-Collins Syndrom beeinflusst. Mutationen im Faktor Treacle führen zu Fehlbildungen von Ohren, Augen und Gesichtsknochen (Gonzalez et al., 2005). Treacle ist an der Produktion der 40S Untereinheit involviert indem es vermutlich die 18S rRNA methyliert. Nicht der Mangel sondern die fehlerhafte Funktion der Ribosomen führt bei der X-linked Dyskeratosis congenita zum Krankheitsbild mit Knochenmarkfehlbildung und ebenfalls einer Prädisposition für Krebs. Eine Mutation der Pseudouridin-Synthase

Dyskerin liegt dieser Krankheit zu Grunde. Es wird vermutet, dass es durch die fehlende Modifikation der Ribosomen zu reduzierter, insbesondere IRES (interne ribosomale Eintrittsstelle)-abhängiger Translation kommt (Freed et al., 2010). Krankheit kann auch durch Mutation der ribosomalen Proteine entstehen. Bekanntestes Beispiel dafür ist die Diamond-Blackfan-Anämie, bei der es zur Haploinsuffizienz verschiedener, aber nicht immer den gleichen ribosomalen Proteinen kommt. Die Proteine S19, L5 und L11 sind jedoch am häufigsten betroffen. Insbesondere bei letzteren beiden wird angenommen, dass auch ihre Verbindung zu p53 und Zellzyklus mit eine Rolle spielt. Auch diese Krankheit ist durch ein erhöhtes Risiko zur Ausbildung von Krebs geprägt (Narla und Ebert, 2010).

2. Der PeBoW-Komplex

Ein Ribosomenbiogenesefaktor in menschlichen Zellen ist der PeBoW-Komplex. PeBoW wurde in den letzten Jahren von unserem und anderen Laboren erforscht und soll im Folgenden vorgestellt werden.

2.1. Die PeBoW-Komponenten

Der PeBoW-Komplex besteht aus drei Faktoren: den Proteinen Pes1, Bop1 und WDR12. Bop1 stellt dabei das Bindeglied in der trimeren Struktur dar, welches die indirekte Interaktion zwischen Pes1 und WDR12 vermittelt (Abb. 5A). Alle drei Bestandteile sind überwiegend nukleolär lokalisiert.

Pes1 steht für *Pescadillo homolog 1*, da ursprünglich das Homolog Pescadillo im Zebrafisch *Danio rerio* beschrieben wurde. Der homozygote *knockout* von Pescadillo führt zu drastischen Fehlbildungen

wie eingeschränktem Gehirnwachstum, verkleinerten Augen, eingeschränkter Gebissbildung während der Embryogenese und letztlich zur Letalität (Allende et al., 1996). Spätere Forschung offenbarte, dass sich ein *knockout* auch bei anderen Organismen, wie Mäusen, im Embryonalstadium letal auswirkt (Lerch-Gaggl et al., 2002). Die Pes1-Aminosäuresequenz ist hochkonserviert. Das menschliche Pes1 ist zu 75% mit dem Zebrafisch-Homolog und zu 89% mit dem Mäuse-Homolog identisch (Haque et al., 2000). Diverse Domänen sind besonders konserviert. Die NPLP (*N-terminal pescadillo-like protein domain*)-Domäne macht den Großteil des N-Terminus aus. Diese Domäne ist hochkonserviert, tritt aber nur in Pes1 und seinen Homologen, jedoch nicht in anderen Proteinen auf. Die genaue Funktion ist noch ungeklärt, doch scheint in der Domäne die Stelle für die Interaktion mit Bop1 zu liegen (Lapik et al., 2004). Pes1 besitzt auch eine BRCT-Domäne. Diese Eigenschaft ist für ein nukleoläres Protein eine Besonderheit, da die Domäne meistens in DNA-Reparatur-Faktoren vorkommt. Die BRCT-Domäne dient in der Regel der Ausbildung von Protein-Protein-Interaktionen (Deng et al., 2006). Sie spielt in Pes1 eine wichtige Rolle bei der Inkorporation von Pes1 in den trimeren Komplex, obgleich sie nicht die eigentliche Interaktionsstelle für Bop1 darzustellen scheint. (Hölzel et al., 2007). Ein Abschnitt von Pes1, der durch besonders saure Aminosäuren heraussticht, befindet sich weiter C-terminal gelegen. Noch weiter C-terminal liegt eine Domäne, die durch das Ubiquitin-artige SUMO-1 modifiziert werden kann (Ψ KXE). Die genaue Funktion der letzten beiden Domänen ist ebenfalls noch weitestgehend unbekannt.

Bop1 steht für *block of proliferation 1*, da es sich als essentiell für die Proliferation von Zellen herausgestellt hat (Pestov et al., 1998). Der Faktor findet sich auch häufig überexprimiert in Tumorzellen (Killian et al., 2006; Lips et al., 2008; Chung et al., 2011). Bop1 wurde am ausführlichsten in der Maus studiert. Die Sequenz der Maus ist zu über

90% identisch mit der im Menschen (Strezoska et al., 2000). Eine hochkonservierte Domäne von Bop1 erstreckt sich im N- Terminus. Mehrere nukleoläre Proteine besitzen diese PEST-Sequenz (Prolin-, Glutamat-, Serin-, Threonine-reich). Die Funktion der Sequenz ist nicht ganz geklärt, aber es wird vermutet, dass die Domäne als Signal zum schnellen Abbau des Trägerproteins dient (Rogers et al., 1986). Bop1 weist als Protein nur eine recht kurze Halbwertszeit auf (Rohrmoser et al., 2007). Am C- Terminus von Bop1 liegen WD40-Wiederholungen. Diese Motive vermitteln in der Regel Protein-Protein-Bindungen (Neer et al., 1994).

WDR12 (*WD repeat domain 12 protein*) besteht C-terminal ebenfalls zu einem großen Teil aus WD40-Wiederholungen (Hölzel et al., 2005). Der N- Terminus ähnelt in seiner Sequenz dem N- Terminus von Notchless, einer Komponente des Notch-Signalweges. Untersuchungen konnten WDR12 neben seiner Aufgabe in der Ribosomenbiogenese eine weitere Rolle zuweisen. WDR12 tritt auch außerhalb des Nukleolus auf und kann mit Notch1-IC interagieren, welches an den frühen Phasen der primären T-Zell-Differenzierung beteiligt ist (Nal et al., 2002).

Die einzelnen Proteine von PeBoW sind im Komplexverbund bezüglich Stabilität und Lokalisation sehr stark voneinander abhängig (Rohrmoser et al., 2007). Die Depletion von Pes1 oder Bop1 destabilisiert auch das jeweils andere Protein und WDR12. Die nukleoläre Lokalisation von WDR12 hängt überdies von der Bindung zu Bop1 ab, und die nukleoläre Lokalisation von Bop1 hängt wiederum von der Bindung zu Pes1 ab. Der PeBoW-Komplex ist also nur im Kontext der trimeren Konformation als stabiler nukleolärer Faktor zu betrachten.

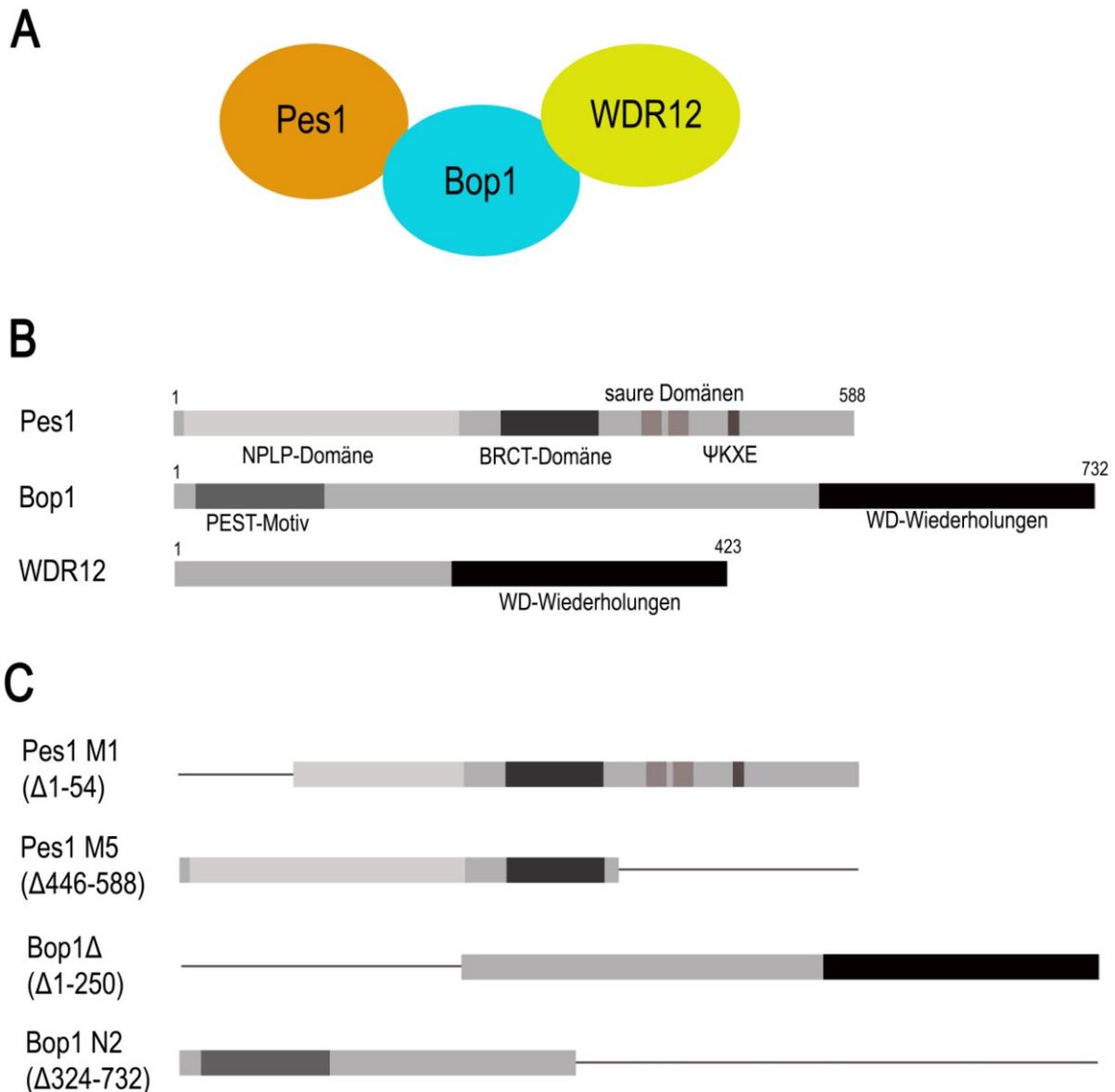


Abb. 5: der PeBoW-Komplex. A) PeBoW ist ein trimerer Komplex bestehend aus Pes1, Bop1 und WDR12. Bop1 stellt dabei das Bindeglied zwischen den beiden anderen Proteinen dar. B) die Domänen der drei Faktoren. C) Deletionsmutanten von PeBoW-Komponenten, welche bekannt dafür sind einen dominant-negativen Einfluss auf die rRNA-Prozessierung zu haben.

2.2. Der PeBoW-Komplex in der Ribosomenbiogenese

Der PeBoW-Komplex assoziiert mit der Prä-60S Untereinheit und ist für die Reifung dieser Untereinheit von essentieller Bedeutung (Rohrmoser et al., 2007). Der Komplex reguliert die Prozessierung zur 32S Prä-rRNA, 5,8S und 28S rRNA. Ein *knockdown* jedes einzelnen PeBoW-

Faktors hat folglich eine Reduktion der 32S Prä-rRNA, 5,8S rRNA und 28S rRNA zur Folge. Die Reifung der 40S Untereinheit und der 18S rRNA ist hingegen nicht betroffen.

Deletionsmutanten von PeBoW können die rRNA-Prozessierung auf ähnliche Weise wie ein *knockdown* hemmen. Ein dominant-negativer Phänotyp bezüglich rRNA-Prozessierung setzt voraus, dass der mutierte Faktor sein endogenes Wildtyp-Pendant am zellulären Wirkungsort im Nukleolus verdrängt. Für Pes1 ist dies bei den Mutanten M1 und M5, für Bop1 bei den Mutanten 1 Δ und N2 der Fall (Abb. 5C) (Strezoska et al., 2002; Grimm et al., 2006). M1 fehlt der N-terminale Teil der NPLP-Domäne. Bei M5 ist der C-Terminus mit dem sauren Bereich und der SUMO-lierungsstelle deletiert. Bop1 Δ fehlt ein Bereich des N-Terminus, inklusive des gesamten PEST-Motivs. Bop1 N2 verfügt nicht mehr über den C-Terminus und die WD-Wiederholungen. Die Auswirkungen, die durch die Deletionen hervorgerufen werden, sind nicht immer gleich. Der rRNA-Prozessierungsdefekt der Bop1 Mutante 1 Δ entspricht dem Defekt nach *knockdown* von Bop1. Die Mutante N2 erzeugt hingegen zwar keine Verringerung der 32S Prä-rRNA Menge, aber es erscheint eine 3'-verlängerte Versionen der 41S Prä-rRNA (Strezoska et al., 2002). Der PeBoW-Komplex ist als Ribosomenbiogenesefaktor auch eng mit dem Zellzyklus verbunden. Die Gene aller drei Faktoren werden durch den Transkriptionsfaktor Myc positiv reguliert (Schlosser et al., 2003). Die Expression von PeBoW ist somit in Zellen mit hochreguliertem Myc erhöht, was insbesondere in Tumorzellen häufig der Fall ist. Die durch den Verlust oder die Mutation eines Faktors hervorgerufenen Defekte in der rRNA-Prozessierung rufen auch den in 1.4. beschriebenen nukleolären Stress und der p53-abhängigen Zellzyklus-Antwort mit inbegriffener Blockierung der Proliferation und reversiblen Zellzyklus-Arrest hervor (Pestov et al., 2001b; Lapik et al., 2004; Hölzel et al., 2005, Grimm et al., 2006).

Der PeBoW-Komplex und seine Funktion sind evolutionär konserviert. Bevor er in menschlichen Zellen beschrieben wurde, fand man ein Homolog in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (Du und Stillman, 2002; Miles et al., 2005). Es besteht aus den essentiellen Proteinen Nop7 (=Pes1), auch als Yph1 bezeichnet, Erb1 (Bop1) und Ytm1 (WDR12), die in der gleichen trimeren Konformation auftreten wie in Säugern. Die Funktion des Komplexes besteht wie in Säugern darin die rRNAs der 60S ribosomalen Untereinheit zu prozessieren (Pestov et al., 2001a; Oeffinger et al., 2002). Die Abhängigkeit der einzelnen Faktoren bezüglich der Rekrutierung ins 66S Partikel entspricht der Abhängigkeit bezüglich des Imports in den Nukleolus in Säugern. Die Rekrutierung von Ytm1 hängt von Erb1 ab, die Rekrutierung von Erb1 von Nop7 (Tang et al., 2008). Eine p53-assoziierte Zellzykluskontrolle gibt es in der Hefe nicht, jedoch fand man heraus, dass der Hefe-PeBoW-Komplex mit dem ORC-Komplex interagiert (Du und Stillman, 2002). Der ORC-Komplex ist an der Initiierung der genomischen Replikation beteiligt, woraus sich vermuten lässt, dass Hefe-PeBoW möglicherweise über diesen Prozess Einfluss auf den Zellzyklus ausübt.

3. DEAD-Box RNA-Helikasen

Der in dieser Arbeit untersuchte Faktor DDX27 gehört zur Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen. Diese Enzymklasse soll daher im Folgenden vorgestellt werden.

3.1. Die Familie der DEAD-Box RNA-Helikasen

DEAD-box RNA-Helikasen, auch DEAD-Box Proteine genannt, gehören zur Superfamilie 2 (SF2) der Helikasen und stellen die größte

Einzelklasse aller Helikasen dar. Sie kommen in allen drei Reichen des Lebens (Bacteria, Archea, Eukaryoten) vor. In menschlichen Zellen wurden bislang 37 Exemplare gefunden, in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* 26 Exemplare (Linder und Jankowsky, 2011). Die Helikasen sind an fast allen RNA-assoziierten Prozessen der Zelle beteiligt. RNA-Stränge falten sich teilweise ungeordnet und von selbst in Sekundärstrukturen mit interner komplementärer Basenpaarung, wie *loops* oder *Helices* (Tinoco und Bustamente, 1999). Die Aufgabe der DEAD-Box Helikasen besteht darin diese Strukturen bzw. die damit zu Grunde liegenden Basenpaarungen aufzulösen. Die RNA kann dadurch in für bestimmte Zwecke günstige strukturelle Konformationen umgewandelt werden, was insbesondere für die korrekte Ausbildung von RNA-Protein-Komplexen (RNPs), wie z.B dem Ribosom, eine Grundvoraussetzung darstellt (Pan und Russel, 2010). Viele DEAD-Box Proteine weisen neben der eigentlichen Helikase-Aktivität auch die Fähigkeit auf, RNA-Protein-Interaktionen positiv oder negativ zu beeinflussen, sowie Basenpaarbindungen eines RNA-Stranges neu zu setzen (Linder und Jankowsky, 2011). Fehler in all diesen Vorgängen können zu Krankheit einschließlich Krebs führen (Abdelhaleem, 2004).

DEAD-Box Helikasen verfügen im Gegensatz zu anderen Helikasen-Klassen über das besondere Merkmal nicht oder kaum prozessiv zu sein (Bizebard et al., 2004; Yang und Jankowsky, 2006; Yang et al., 2007). Das Enzym konzentriert sich also auf eine Region von nur 5-20 Basen anstatt einen RNA-Strang über eine Länge von hunderten oder tausenden Basen abzufahren und aufzuschmelzen. Ein Vorteil besteht darin, dass auf diese Weise große RNP-Komplexe nicht ungewollt auf großer Strecke aufgelöst werden, sondern nur an gezielten Positionen.

Alle DEAD-Box Helikasen haben denselben strukturellen Aufbau (Singleton et al., 2007; Fairman-Williams et al., 2010). Sie haben einen

300-400 Aminosäuren großen Kern, der sich aus zwei RecA-artigen Domänen (DEADc, HELICc) zusammensetzt. Die RecA-Domänen, welche auch in anderen Helikase-Familien vorkommen, sind für sich kompakte strukturelle Module mit mehrheitlich hydrophoben Aminosäuren und sind zueinander über einen flexiblen Linker verbunden (Abb. 6B). Die Gesamtstruktur stellt dadurch eine Art Klammer dar (Abb. 6C). Diese Klammer schließt auf ihrer Innenseite die aufzuschmelzende RNA und eine ATP-Bindestelle des Enzyms ein. ATP ist für die Helikaseaktivität der Enzyme unerlässlich. Die Bindung von ATP bewirkt eine Affinität der Helikase zur RNA. Die Enzymstruktur wandelt sich dabei von einer offenen in eine geschlossene Form, wodurch sich die Klammer also um das ATP und die RNA schließt (Jarmoskaite und Russel, 2011). Das ATP muss im Folgenden nicht für die eigentliche Basenpaartrennung hydrolysiert werden, sondern erst für das Ablösen von der getrennten RNA (Liu et al., 2008; Aregger et al., 2009). Das dann assoziierte ADP lässt das Enzym eine für die RNA-Bindung ungeeignete Konformation einnehmen (Lorsch et al., 1998). Eine einzelne ATP-Hydrolyse reicht meistens für eine RNA-Zielsequenz aus. Ist die Sequenz jedoch länger, wird das ADP in der Helikase zu ATP zurückgewandelt, damit das Enzym auf der RNA weiterfahren kann (Henn et al., 2008).

Die DEAD-Box Proteine verfügen über mehrere spezifische konservierte Motive für die Ausübung der beschriebenen Aktivität (Abb. 6A). Das Q-Motiv, welches für die DEAD-Box Helikasen einzigartig ist, sowie die Motive I, II der ersten RecA-Domäne und das Motiv VI der zweiten RecA-Domäne werden für die ATP-Bindung benötigt (Walker et al., 1982; Pause und Sonnenberg, 1992; Tanner et al., 2003). Das Motiv I wird auch als Walker A Motiv bezeichnet und kommt auch in vielen weiteren Helikase-Familien vor. Motiv II ist als Walker B Motiv auch in anderen Helikase-Familien bekannt, tritt aber nur in der DEAD-Box

Familie in einer bestimmten Aminosäuresequenz in Erscheinung. Der Name der Enzym-Familie stammt von eben dieser Sequenzabfolge Aspartat-Glutamat-Alanin-Aspartat (D-E-A-D) ab. Das Motiv III spielt für die ATP-Hydrolyse eine kritische Rolle (Banroques et al., 2010). Die Motive Ia, Ib von Domäne 1, als auch IV und V von Domäne 2 sind für die RNA-Bindung zuständig (Cordin et al., 2006). Alle Motive lokalisieren auf der Innenseite der aus dem Enzymkern geformten Klammer (Abb. 6B). Wie die genaue Koordination von ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung vonstatten geht ist jedoch noch unklar.

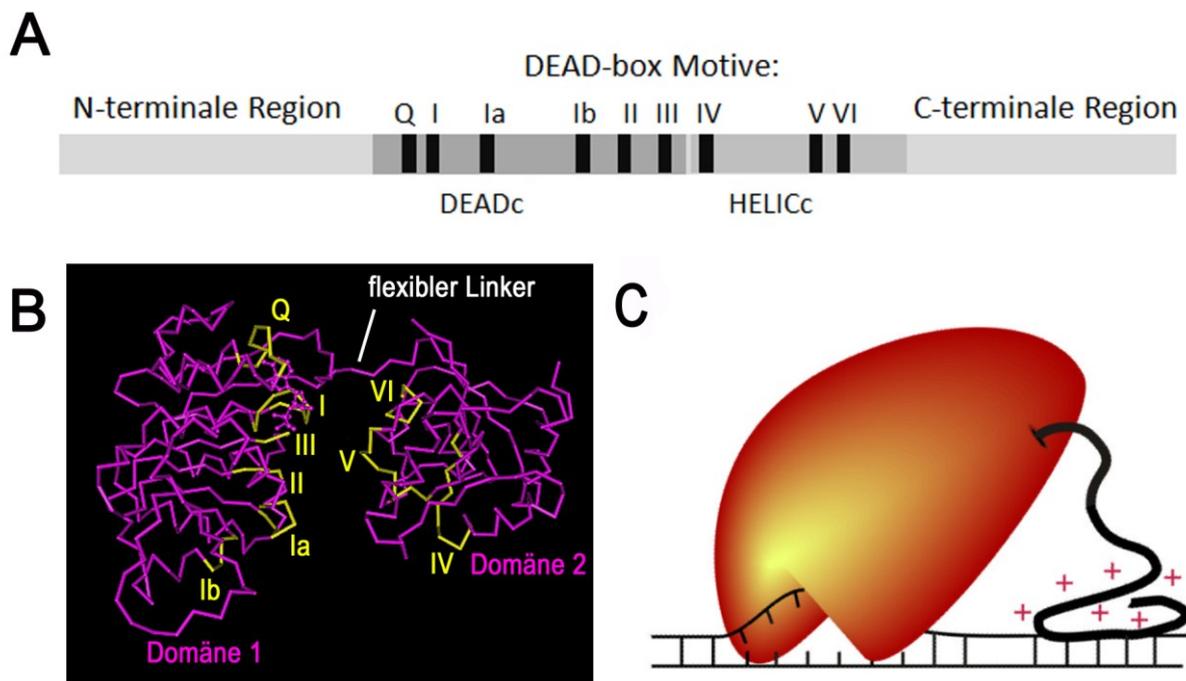


Abb. 6: DEAD-Box RNA-Helikasen. A) Lineare Darstellung des sequentiellen Aufbaus von DEAD-Box Helikasen. Jedes DEAD-Box Protein besitzt einen Kern mit den typischen Motiven. N- und C-Termini flankieren den zentralen Bereich. B) Struktureller Aufbau eines DEAD-Box Helikasen-Kerns (am Beispiel von DDX19). Zwei RecA Helikase-Domänen (DEADc, HELICc) bilden eine Art Klammer. An der Klammer-Innenseite befinden sich die typischen DEAD-Box Motive für ATP-Bindung, ATP-Hydrolyse und RNA-Bindung. C) Schematische Darstellung wie eine DEAD-Box Helikase einen RNA-Strang umklammert und auflöst. Eine (hier positiv geladene) Seitendomäne abseits des Kerns vermittelt die Verankerung in der Nähe der Zielsequenz. Entnommen aus Jarmoskaite und Russel, 2011.

Eine weitere Besonderheit im Gegensatz zu anderen Helikasen besteht darin, dass die DEAD-Box Helikasen nicht zwangsläufig einzelsträngige Sequenzen am Ende (meistens das 3'-Ende) der RNA benötigen, um die

RNA zu binden (Yang und Jankowsy, 2006). Der enzymatische Kern von DEAD-Box Helikasen scheint erstaunlicherweise mit RNA nicht Sequenz-spezifisch zu interagieren. Er stellt nur mit dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der RNA eine Interaktion her, wobei die Bindung die die 2'-OH-Gruppe miteinschließt, und somit DNA-Bindung ausschließt (Sengoku et al., 2006).

Spezifität erlangt die Helikase meist durch Domänen abseits des enzymatischen Kerns. Es wird angenommen, dass die Helikase über diese abseitigen Domänen an andere Stellen des jeweiligen RNA-Komplexes bindet und somit an Zielsequenzen herangeführt wird (Abb. 6C).

3.2. DEAD-Box Helikasen in der Ribosomenbiogenese

DEAD-Box Helikasen sind an einer Vielzahl von Prozessen beteiligt. Diese Vorgänge umfassen Transkription, Translation, *Splicing*, RNA-Abbau, RNA-Export und Ribosomenbiogenese.

Ein großer Anteil der DEAD-Box Helikasen wird für die Ribosomenbiogenese benötigt. Die Helikasen in der Hefe sind deutlich besser beschrieben als in Säugern. Die DEAD-Box Proteine wirken in beiden Organismen an vielen unterschiedlichen Stellen der Ribosomenbiogenese und insbesondere der Prozessierung der rRNA. Die Helikasen lassen sich grob in Faktoren einteilen, die entweder in der Reifung der kleinen 40S Untereinheit oder der großen 60S Untereinheit beteiligt sind (siehe Tabelle 1). In *S. cerevisiae* sind 5 DEAD-box Helikasen spezifisch für die 40S Reifung und 9 spezifisch für die 60S Reifung beschrieben (Granneman et al., 2006; Bernstein et al., 2006; Turner et al., 2009; Bond et al., 2001; Weaver et al., 1997; Daugeron und Linder, 1998). Die Helikase Has1 ist sogar in beide Reifungen einbezogen (Rocak et al., 2005). Fast alle Helikasen der

Ribosomenbiogenese sind essentiell. Die 40S Helikasen assoziieren mit dem 90S Prä-Ribosom meist schon früh und wirken an den Schnitten an den Positionen A₀, A₁ und innerhalb der ITS1 mit. Der Schnitt an Position A₃ und damit die Abspaltung der 60S Untereinheit vom 40S Partikel bleibt hingegen unbeeinflusst. Die DEAD-Box Helikasen, welche an der 60S Prozessierung teilhaben, setzen erst danach an die große Untereinheit an. Die Weiterprozessierung der 60S ribosomalen Untereinheit kann dementsprechend unabhängig von den 40S DEAD-Box Helikasen ablaufen. Die Helikasen setzen auch in der 60S Reifung bei verschiedenen Schritten an. Mak5 beteiligt sich zum Beispiel an der Prozessierung der 35S zur 27S, Spb4 hingegen an der Prozessierung der 27S zur reifen 25S (Zagulski et al., 2003; de la Cruz et al., 1998). DEAD-Box Helikasen können in der Ribosomenbiogenese einerseits die rRNA bzw. deren Vorläufer in eine für die Prozessierung günstige Struktur bringen. Es wird zum Beispiel angenommen, dass Dbp3 die ITS1 so formt, dass die RNase MRP die rRNA an Position A3 zu schneiden vermag (Kressler et al., 1999). Die Helikasen helfen andererseits auch bei der Assoziation und Dissoziation zahlreicher snoRNAs an der Prä-rRNA. Rok1 ist zum Beispiel für die Entfernung der snoRNA snR30 von dem Prä-40S Partikel verantwortlich (Bohnsack et al., 2008).

Humane DEAD-Box Proteine werden mit ähnlichen aber auch abweichenden Funktionen wie ihre Hefe-Homologe beschrieben (DDX10/Dbp4, DDX24/Mak5, DDX47/Rrp3) (Abdelhaleem et al., 2003; Jankowsky et al., 2011; Martin et al., 2012). Es gibt überdies auch menschliche DEAD-box Helikasen ohne Hefe-Homolog. Ein Beispiel dafür ist DDX21, welches in *Xenopus* und menschlichen Zellen untersucht wurde. Diese Helikase wird in beiden Organismen für die Prozessierung der 18S benötigt, aber nur in *Xenopus* zusätzlich für die Stabilisierung der 28S (Henning et al., 2003). Es zeigt sich also, dass

obwohl Ribosomenbiogenese im Wesentlichen ein hochkonservierter Prozess ist, dessen Helikase-Faktoren durchaus evolutionäre Weiterentwicklungen vollziehen können.

	40S-Reifung	60S-Reifung
<i>S. cerevisiae</i>	Dbp4, Dbp8, Fal1, Rok1, Rrp3, Has1	Dbp2, Dbp3, Dbp6, Dbp7, Dbp9, Dbp10, Drs1, Mak5, Spb4, Has1
Säuger	DDX10, DDX21, DDX47, DDX48, DDX50	DDX5, DDX17, DDX21, DDX24, DDX47, DDX50, DDX51

Tabelle 1: Bekannte DEAD-Box Helikasen beteiligt an der Reifung der 40s oder 60s ribosomalen Untereinheit.

Als erste DEAD-Box Helikase in der Hefe überhaupt wurde Drs1 (*deficiency in ribosome synthesis 1*) gefunden. Sie ist essentiell für die Reifung der rRNA der großen ribosomalen Untereinheit (Ripmaster et al., 1992). Ihr Homolog in Säugern heißt DDX27, welches bislang im Kontext von Ribosomenbiogenese jedoch noch nicht genauer erforscht wurde.

4. Aufgabenstellung

Die Ribosomenbiogenese ist eng mit Zellzykluskontrolle und der Ausprägung von Krankheiten verbunden. Der Vorgang ist trotz Bedeutung insbesondere in Säugern noch wenig erforscht. Das wird auch dadurch bedingt, dass Ribosomenbiogenese durch seine zahlreichen Faktoren und Unterprozesse äußerst komplex ist.

Ich habe in meiner Diplomarbeit versucht tiefere Einsicht in diese Komplexität zu erlangen, indem ich einen Faktor der humanen Ribosomenbiogenese, den PeBoW-Komplex, untersucht habe. Um mehr

über die Funktionsweise dieses Komplexes zu verstehen, habe ich über einen kombinierten Co-Immunpräzipitations- und Massenspektrometrie-Ansatz nach Interaktionspartnern gesucht. Die DEAD-Box RNA-Helikase DDX27 konnte als assoziierter Faktor identifiziert werden. Die Interaktion ist zwar stark, doch scheint DDX27 kein integraler Bestandteil des Komplexes zu sein, sondern vielmehr ein Faktor der (eventuell neben anderen) mit PeBoW für bestimmte Zwecke interagiert.

Das menschliche DDX27 wurde bis dahin nicht als Ribosomenbiogenesefaktor beschrieben. Die Aufgabe dieser Doktorarbeit war es daher, den Faktor zu charakterisieren. Es sollte die Funktion von DDX27 im Hinblick auf rRNA-Prozessierung ermittelt werden. Eine weitere Aufgabe war die Interaktion zwischen dem PeBoW-Komplex und DDX27 zu analysieren. Dies betraf insbesondere die Suche nach dem Interaktionspartner innerhalb des PeBoW-Komplexes, sowie den Interaktionsdomänen in DDX27 und PeBoW. Überdies sollte bestimmt werden, wie die nukleoläre Lokalisation von DDX27 realisiert wird.

Material und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

0,5% Trypsin-EDTA	Invitrogen, Karlsruhe
1,4-Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
1-kb-DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
[γ - ³² P] dATP, 6000 μ Ci/mmol	Hartmann-Analytik, Braunschweig
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
Agarose Ultra Pure	Invitrogen, Karlsruhe
Albumin Fraktion V (BSA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Ampicillin	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Borsäure	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Bromphenolblau (BPB)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Calf Intestinal Alkaline Phosphatase (CIAP)	Promega, Mannheim
Ciprobay 400	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt

Material und Methoden

DMEM Medium	Invitrogen, Karlsruhe
DMEM-P Medium	Invitrogen, Karlsruhe
dNTP	Promega, Mannheim
Doxycyclin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
ECL™ Plus Western Blotting	GE-Healthcare, München
ECL™ Western Blot Detection Reagent	GE-Healthcare, München
Ethidiumbromid	Fluka Chemie GmbH, Buchs
Ethanol p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
FACS Clean	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
FACS Rinse	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
Fluorescent Mounting Medium	Dako GmbH, Hamburg
Formaldehyd (37%)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Fötales Kälberserum (FCS)	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Glycerol 86%	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Glycin	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
HEPES	MP Biomedicals Inc., Eschwege
Hygromycin B	Invitrogen, Karlsruhe
Isopropanol p.A.	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
KAPA-Hifi-DNA-Polymerase	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Material und Methoden

L-Glutamin 200mM (100x)	Invitrogen, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Methanol p.A.	Merck KGaA, Darmstadt
MOPS 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Nonidet P-40	Roche, Mannheim
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Paraformaldehyd	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphorus-32 [³² P]	Hartmann-Analytik, Braunschweig
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	ICN Biomedicals Inc., Fountain Pkwy, USA
Polyacrylamid 30% (PAA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Polyfect™	Qiagen, Hilden
Prestained Protein Ladder (PageRuler™)	MBI Fermentas, St. Leon Rot
Proteinase Inhibitor Cocktail	Roche, Mannheim
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas, St. Leon Rot New England Biolabs, Frankfurt
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Sucrose	ICN, Northeim
T4-DANN-Ligase	Promega, Mannheim
T4-Polynukleotidkinase (PNK)	New England Biolabs, Frankfurt

TEMED	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Tris(hydroxymethyl)aminomethanol	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Trichloressigsäure (TCA)	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe
Triton-X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Trypanblaulösung 0,4%	Invitrogen, Karlsruhe
Tween 20	Carl Roth GmbH&CoKG, Karlsruhe

1.2. Verbrauchsmaterialien

Amersham Hyperfilm™ MP	GE Healthcare, München
CEA RP NEW Medical X-Ray Screen Film Blue Sensitive	Agfa Health Care, Mortse, Belgien
Cryoröhrchen 1,5 ml	Nunc GmbH, Wiesbaden
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig
ECL™-Kit	GE Healthcare, München
Entwickler-Lösung	Ernst Christiansen GmbH, Planegg
E-Plate 16	ACEA Biosciences, San Diego, USA
Falcon-Reaktionsgefäße (15 ml, 50 ml)	Becton Dickinson Biosciences, Heidelberg
Fixierer-Lösung	Ernst Christiansen GmbH, Planegg
Hybond-ECL Nitrocellulose-Membran	GE Healthcare, München
Hybond-N+ Nylonmembran	GE Healthcare, München
MicroSpin S-200HR columns	GE Healthcare, München
MiniElute Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Oligofectamin	Invitrogen, Karlsruhe
peqGOLD Gel Extraction Kit	Peqlab, Erlangen
Pipettenspitzen gestopft	Nerbe plus, Germany

Plasmid Mini/Maxi Kit	Qiagen, Hilden
Polyfect	Invitrogen, Karlsruhe
Protease-Inhibitor-Cocktail	Roche Diagnostics, Penzberg
Reaktionsgefäße (1,5 ml, 2 ml)	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Sepharose G <i>Beads</i>	GE Healthcare, München
Total RNA Kit PeqLab Gold	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkulturflaschen (50, 250, 650 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen (10 cm und 15 cm)	Nunc GmbH, Wiesbaden

1.3. Geräte

Axiovert 200M Fluoreszenzmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
BAS-MS Imaging plate	Fujifilm, Düsseldorf
BD FACSCalibur Flow Cytometer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BioScan/ QC4000 XER (Radioisotopen-Zähler)	Bioscan Inc., Washington D.C., USA
BioRad PowerPac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Branson Sonifier 250	G.Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch-Gmünd
Eppendorf Centrifuge 5417R	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Eraser (für Image Plate)	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
FLA-5100 Phosphorimager	Fujifilm, Düsseldorf
Flow-Hood-Sicherheitswerkbank	BDK Luft-und Reinraumtechnik GmbH, Sonnebühl
Fuchs-Rosenthal-Zählkammer	GLW Gesellschaft für Laborbedarf GmbH, Würzburg
Gel Dryer (Model 543)	Bio-Rad Laboratories GmbH, München

Material und Methoden

Gradient machine, Fractionator Foxy Jr., UA-6 UV/Vis Detector	Teledyne ISCO, Lincoln, USA
GS Gene Linker™ UV Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Hybridisierungsöfen	Binder, Tuttlingen
Hypercassette	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Inkubator Heraeus 6000	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
L80 and Optima™ L-90 K Ultracentrifuge	Beckman Coulter, Krefeld
LB122 berthold (□, □-detection) (Geigerzähler)	Berthold Technologies, Bad Wildbad
Leica LSCM SP2 (Konvokalmikroskop)	Leica Microsystems GmbH, Heidelberg
Megafuge 2.0	Heraeus Sepatech GmbH, Osterode
Membran-Vakuumpumpe	Vacuumbrand GmbH & CoKG, Tuttlingen
Mighty Small II for 8x9cm Gels	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
Mighty Small Transphor	Hoefer Inc. San Francisco
NanoDrop 1000	Thermo Fischer Scientific, Braunschweig
OPTIMAX Standard X-Ray Film Processor	Protec GmbH u. CoKG, Oberstenfeld
T Professional standard 96 gradient Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Telaval 31 Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
Thermo Hybaid Px2	Thermo Scientific, München
Thermomixer 5436	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
UV Stratalinker 1800	Stratagene, Amsterdam
xCELLigence System	Roche Diagnostics, Penzberg

1.4. Software

AIDA Version 3.20.116	Raytest Isotopenmessgeräte GmbH, Straubenhardt
Axio Vision 40 4.8.2.	Carl Zeiss Jena GmbH, Göttingen
ImageJ Version 1.44o	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Leica-TCS-confocal-Software 2.61	Leica Microsystems GmbH, Heidelberg
MacVector 12.0.3	MacVector, Inc., Cary, North Carolina, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft, Seattle, USA
Openlab Version 3.0.8	Improvision, Coventry, England
RTCA Software 1.2	ACEA Biosciences, San Diego, USA

1.5. Puffer und Lösungen

10xTBE pH 8,0	Tris 89mM Borsäure 89 mM EDTA 20 mM
2xTris/ SDS pH 8,8	90,72 g Tris/ Base 10 ml SDS 20% ad 1 l H ₂ O pH-Einstellung mit HCl
2xTris/ SDS pH 6,8	30,24 g Tris/ Base 10 ml SDS 20% ad 1 l H ₂ O pH-Einstellung mit HCl
Agarose-Formaldehyd-Gel (1%)	4 g Agarose 300 ml H ₂ O 40 ml MOPS-Puffer (10-fach) 67 ml Formaldehyd (37%)
Blocklösung (Western Blot)	1x TBST 10% Magermilchpulver

Material und Methoden

Blocklösung (Immunfluoreszenz)	1x PBS 10% FCS
Church-Puffer	0,5 M Natriumphosphat-Puffer pH 7,2 7% SDS 1 mM EDTA
DMEM-Vollmedium	500 ml DMEM 50 ml FCS 5 ml L-Glutamin 5 ml Penicillin/Streptomycin
DNA-Ladepuffer (10x, Orange Dye)	20g Sucrose 100 mg Orange G 50 ml H ₂ O
DEPC behandeltes H ₂ O	0,1% DEPC in H ₂ O über Nacht einwirken lassen, anschließend autoklavieren
Einfriermedium	90% FCS 10% DMSO
Hungermedium	500 ml DMEM-P 50 ml FCS (dialysiert)
Lämmli-Puffer (2x)	2% SDS 100 mM DTT 10 mM EDTA 10% Glycerol 60 mM Tris/HCl pH 6,8 0,01% BPB 1mM PMSF
LB-Medium	1% Casein (Pepton 140) 0,5% Hefeextrakt 0,5% NaCl 0,1% Glucose
Lysispuffer	50 mM Tris/HCl pH 8,0 1% NP40 150 mM NaCl ad 50 ml H ₂ O
MOPS-Puffer (10-fach, pH 7,0)	200 mM MOPS 50 mM NaAc (H ₂ O-frei) 10 mM EDTA
Natriumphosphat-Puffer (pH 7,2)	684 ml 1 M Na ₂ HPO ₄ 316 ml 1 M NaH ₂ PO ₄

Material und Methoden

PBS (pH 7,2-7,4)	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ *6H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄
RNA Ladepuffer (2-fach)	50% Formamid 15% Formaldehyd (37%) 1x MOPS pH 7,0 0,1% Bromphenolblau 10µg/ml Ethidiumbromid
SDS-PAGE Trenngel (10,5%)	14 ml PAA 30% 20ml 2xTris/SDS pH 8,8 5,6 ml H ₂ O 334 µl APS 34 µl TEMED
SDS-PAGE Sammelgel (4%)	2 ml PAA 30% 7,5 ml 2xTris/SDS pH 6,8 5,4 ml H ₂ O 90 µl APS 20 µl TEMED
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat pH 7,0
Sucrose (für Gradient)	60g Sucrose ad 100 ml DEPC H ₂ O pH auf 7,5 einstellen
TBS-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris/ HCl (pH 7,5)
TBST-Waschpuffer (1-fach)	10x TBS 1% Tween 20
TCA-Mix	4% TCA In H ₂ O
Western-Laufpuffer (10-fach)	30,24 g Tris 144 g Glycin 50 ml SDS 20% ad 1 l H ₂ O
Western-Transferpuffer (10-fach)	30,24 g Tris 144 g Glycin 50 ml SDS 20% 100 ml Methanol ad 1 l H ₂ O

1.6. Bakterienstämme

Zur Klonierung der Plasmide wurde der *Escherichia coli*-Stamm DH10B verwendet. Sein Genotyp lässt sich wie folgt beschreiben: F- *mcrA* $\Delta(mrr\text{-}hsdRMS\text{-}mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *endA1* *araD139* $\Delta(ara, leu)7697$ *galU* *galK* λ - *rpsL* *nupG*.

1.7. Zelllinien

H1299	Humane nicht-kleinzellige Lungenkarzinom Zelllinie; die Zellen haben eine homozygote Teildeletion von p53 und exprimieren kein p53
HEK-293	humane Adenoviren-transformierte Epithelzellen
Hela	Humane Epithelzelllinie, adhärent
U2OS	Humane Osteosarkom-Zelllinie, p53 Wildtyp

1.8. Plasmide

Augangsvektoren:	Beschreibung:
pSfiExpress	kann für die transiente Transfektion von 293-Zellen eingesetzt werden; trägt ein Gen, welches Kanamycin-Resistenz in <i>E. coli</i> verleiht, Zwischenvektor für Klonierungen
pRTS	kann für die stabile Transfektion in U2OS-Zellen eingesetzt werden; trägt ein Gen, welches Ampicillin-Resistenz in <i>E. coli</i> verleiht; Doxycyclin-induzierbarer bidirektionaler Promotor, der die Expression von eGFP und einem zweiten Gen der Wahl kontrolliert (Bornkamm et al., 2005)

Vektoren mit Sequenzen für die Expression von untersuchten Proteinen:	Quelle:
pRTS-DDX27-HA wt	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-Flag wt	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM1	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM2	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM3	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM4	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM5	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM6	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM7	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM8	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM9	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM10	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM11	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM12	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM13	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM14	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA DM15	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA Ala1	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA Ala2	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA Ala3	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA Ala4	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA Ala5	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA Ala6	Diese Arbeit
pRTS-DDX27-HA Ala7	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA wt	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-Flag wt	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM1	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM2	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM3	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM4	Diese Arbeit

pSfiExpress -DDX27-HA DM5	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM6	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM7	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM8	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM9	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM10	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM11	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM12	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM13	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM14	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA DM15	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA Ala1	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA Ala2	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA Ala3	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA Ala4	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA Ala5	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA Ala6	Diese Arbeit
pSfiExpress -DDX27-HA Ala7	Diese Arbeit
pRTS-HA-Bop1wt (Maus)	Dimitri Pestov, Michael Hölzel
pRTS-HA-Bop1Δ (Maus)	Dimitri Pestov, Michael Hölzel
pRTS-HA-Bop1 N2 (Maus)	Dimitri Pestov, Michael Hölzel
pRTS-Pes1wt	Thomas Grimm (Grimm et al., 2006)
pRTS-Pes1 M1	Thomas Grimm (Grimm et al., 2006)
pRTS-Pes1 M5	Thomas Grimm (Grimm et al., 2006)
pRTS-WDR12 wt	Michael Hölzel (Hölzel et al., 2005)
pRTS-PpanHA	Bastian Mühl
pRTS-PpanHA 670	Bastian Mühl

1.9. Primer

DDX27 ORF fwd	CCACCATGGTACTTGCGCAAAGACG
DDX27 ORF rev	CTTCCTCCTCTTGATCTGG

Material und Methoden

DDX27 DM1 fwd	TCGTTCCAGGACATGAAC
DDX27 DM1 rev	CATGGTGGATCGCCG
DDX27 DM2 fwd	AGGATGCTGGATGAGTAC
DDX27 DM2 rev	GAGGTTTTTCATCGTACTG
DDX27 DM3 fwd	GATGAGCGGAAGATGCT
DDX27 DM3 rev	GTCAGCCTCGTCCAG
DDX27 DM4 fwd	AGGAAGATCGGTTACCC
DDX27 DM4 rev	TTCTCCCACCAGAGAG
DDX27 DM5 fwd	= DDX27 DM4 fwd
DDX27 DM5 rev	= DDX27 DM2 rev
DDX27 DM6 fwd	CCCATTGTGCTGGGCA
DDX27 DM6 rev	= DDX27 DM1 rev
DDX27 DM7 fwd	GATTTTCGTTTTCACTGAGAAG
DDX27 DM7 rev	CCCCTCCTCTTCCTC
DDX27 DM8 fwd	= DDX27 DM1 fwd
DDX27 DM8 rev	AGGGTTGAAATCAGCACTG
DDX27 DM9 fwd	= DDX27 DM1 fwd
DDX27 DM9 rev	GTCATGACATCAGCCA
DDX27 DM10 fwd	ACTGAGAAGGAGGGGA
DDX27 DM10 rev	ATCAGGGTTGAAATCAGCA
DDX27 DM11 fwd	= DDX27 DM3 fwd
DDX27 DM11 rev	= DDX27 DM1 rev
DDX27 DM12 fwd	TTGGCCTTAAGAGGAAAGA
DDX27 DM12 rev	= DDX27 DM4 rev
DDX27 DM13 fwd	TCTGTATTTGATGAAGAACTC
DDX27 DM13 rev	GGCAATTTTCTCCTTCTTC
DDX27 DM14 fwd	= DDX27 DM4 fwd
DDX27 DM14 rev	TTGCTTCTTGGCAGGAC
DDX27 Ala1 fwd	GCAGCAGATTTCAACCCTGATTTC
DDX27 Ala1 rev	AGCAGCCTTCCCCAAAGCTTTT
DDX27 Ala2 fwd	GCAGCAGATTTTCGTTTTCACTGAGA

DDX27 Ala2 rev	AGCAGCAGCACTGCGGTTCTT
DDX27 Ala3 fwd	GCAGCA ACTGAGAAGGAGGG
DDX27 Ala3 rev	AGCAGCAGGGTTGAAATCAGCACT
DDX27 Ala4 fwd	GCAGCAGGGACGTACGATG
DDX27 Ala4 rev	AGCAGCGAAAACGAAATCAGGGTT
DDX27 Ala5 fwd	GCAGCAGGCAGCTGGGCC
DDX27 Ala5 rev	AGCAGCCTCCTTCTCAGTGAAAACGAAAT
DDX27 Ala6 fwd	GCAGCACTGGCTGATGTCATG
DDX27 Ala6 rev	AGCAGCATCGTACGTCCCCT
DDX27 Ala7 fwd	GCAGCAATGAGCCAACTCAAGAAGAAG
DDX27 Ala7 rev	AGCAGCGGCCAGCTGCCAT

Alle Primer wurden von MWG Eurofins synthetisiert.

1.10. Northern Blot Sonden

Sonde 1 (ITS2)	TACGCGCGGGGAGGGCGAGGAGGACGGCGGGGCCTCGGA GGA
Sonde 2 (3'-ETS)	CTCCCAAACCACGCTCCCCGGACCCCGTCCCGGCCCGGAG
Sonde 3 (3'ext)	TCGACCCGTGCGGAGGAGCGAGGAGGAAGGACG
Sonde 4 (3'ext)	GAGAGGGAGTTCGCGTGGTCCCAGCTCCACCGCG
Sonde 5 (3'ext)	CGCGGACGCAAACCTCGCGGTGGGGCTGAA
Sonde 6 (3'ext)	GCGAGAGGGCGAGAGCGACAGAGAGAGAGAG

Alle Sonden wurden von MWG Eurofins synthetisiert. Übernommen von Kaspar Burger.

1.11. SiRNAs

siDD27	UGAGAAAGUUCGAAAGAAAdTdT
siPes1 (UTR)	CCAGAGGACCUAAGUGUGAdTdT
siLuc (GL2)	CGUACGCGGAAUACUUCGAdTdT
siBop1 (ORF)	AUGGCAUGGUGUACAAUGAdTdT
siWDR12 (UTR-1)	CGUACGUUCCGUGGGCAAdTdT

Alle siRNAs wurden von MWG Eurofins synthetisiert.

1.12. Antikörper

Primärantikörper gegen:	Aus Spezies:	Verdünnung:	Hersteller:
3E10 (Serin2 der RNA-Polymerase II CTD)	Ratte	1:10	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
Alpha-Tubulin	Maus	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen
Aktin	Kaninchen	1:10000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen
Bop1	Ratte	1:10	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
Cytohesin	Ratte	1:10	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
DDX27	Maus	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Inc, Heidelberg
Flag-tag M2	Maus	1:5000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen

Flag-tag	Ratte	1:10	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
HA-tag	Ratte	1:1000	Roche Diagnostics, Penzberg
NPM1	Maus	1:2000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH Deisenhofen
Ppan	Ratte	1:10	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München
WDR12	Ratte	1:10	Elisabeth Kremmer, Helmholtz Zentrum München

Sekundärantikörper	Verdünnung:	Hersteller:
α -IgG Kaninchen, HRP-gekoppelt	1:2500	Promega, Mannheim
α -IgG Maus, HRP-gekoppelt	1:5000	Promega, Mannheim
α -IgG Ratte, HRP-gekoppelt	1:5000	Promega, Mannheim
Cy _{TM} 3-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG	1:300	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK
Cy _{TM} 3-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Ratte IgG	1:300	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK
Cy _{TM} 5-conjugated AffiniPure Ziege Anti-Maus IgG	1:500	Jackson ImmunoResearch, Newmarket, Suffolk, UK

2. Methoden

2.1. Zellkultur

2.1.1. Kultivieren von Zellen

Adhärente Zellen wurden bei 37°C und 8% CO₂ in einem Inkubator in DMEM-Medium kultiviert. Die Zellkultur wurde ca. alle 3-4 Tage verdünnt, um ein zu dichtes Wachstum in der Kulturschale oder Flasche zu vermeiden. Dazu wurde von den Zellen zunächst das Vollmedium abgenommen und die Zellen kurz mit PBS gewaschen. Anschließend wurde Trypsin (Konzentration: 0,5 mg/ml) auf die Zellen verteilt und die Zellen für ca. 5 min in den Inkubator gestellt, damit die adhärennten Zellen von der Schale abverdaut wurden. Das Trypsin wurde dann durch Zugabe von mindestens gleichem Volumen Vollmediums inaktiviert und die Zellen suspendiert. Teile der Suspension wurden auf eine neue Kulturschale oder Flasche gleichmäßig verteilt. Der Zellverdünnungsfaktor richtete sich nach Wachstumsdichte der alten Platte und der Zeit, wann die nächste Kultur-Verdünnung erfolgen sollte, sowie nach den Bedingungen des jeweils ausgeführten Experiments. Der Faktor befand sich in der Größenordnung von 1:5 bis 1:20. Die verdünnten Zellen wurden mit dem der Schale oder Flasche entsprechenden Volumen an DMEM-Vollmedium versetzt.

2.1.2. Auftauen und Einfrieren von Zellen

Die tiefgefrorenen Zellen (< -80°C) wurden für ca. 10 min auf Eis aufgetaut, in DMEM-Medium suspendiert und abzentrifugiert (1200 rpm, 4 min). Dann wurden die Zellen im entsprechenden Volumen DMEM-

Vollmedium resuspendiert, um sie auf eine Zellkulturschale oder Flasche auszuplattieren. Das Medium war mit der 20% FCS versetzt, um das Wachstum und die Proliferation der Zellen bis zur ersten Kultur-Verdünnung zu begünstigen.

Beim Einfrieren wurden die Zellen zunächst mit Trypsin von der Schale gelöst und dann abzentrifugiert. Die Zellen wurden anschließend in 1 ml einer FCS-DMSO-Mischung (90% FCS, 10% DMSO) resuspendiert und in entsprechenden 1,5 ml Behältnissen bei $< -80^{\circ}\text{C}$ tiefgefroren.

2.1.3. Zählen von Zellen

Um die Größenordnung an eingesetztem Zellmaterial für die durchgeführten Versuche zu kennen, wurden die Zellen nach Abverdau von der Kulturschale gezählt. Dazu wurde eine Zählkammer nach Fuchs-Rosenthal verwendet. Von der abverdauten homogenen Zellsuspension wurden 40 μl mit dem gleichen Volumen an Trypanblau vermischt und in die Zählkammer pipettiert. Das Aliquot wurde bei erwarteten hohen Zellkonzentrationen der Zellsuspension vorher noch mit Vollmedium verdünnt, damit die Zellen in der Kammer leichter zählbar waren. In der Kammer wurden vier Großquadrate ausgezählt. Die Anzahl der Zellen darin entsprachen nach Multiplikation mit dem Faktor 2500 (sowie evtl. dem oben genannten Verdünnungsfaktor des Aliquots) der Zellzahl eines Milliliters in der Suspension. Die von dem Trypanblau angefärbten Zellen, welche tote Zellen darstellten, wurden nicht in die Zählung mit einbezogen.

2.1.4. Proliferationsassay

Die Proliferationsassays wurden mit dem xCELLigence-System (Roche) durchgeführt. Dabei wurden die Zellen in die vom Hersteller vorgegebenen *E-Plates* ausplattiert. Goldelektroden am Boden der *Plates* bestimmten über den elektrischen Widerstand das Wachstum und die Proliferation der Zellen. Die zugehörige Software gab dieses als dimensionslosen Zell-Index aus.

2.1.5. Transfektion von Plasmiden für die Expression von exogenen Proteinen

Jeweils 1 µg eines Plasmids des Typs pSfiExpress oder pRTS wurden für die Transfektion von ca. 10^5 Zellen verwendet. Dafür wurde zuerst das Transfektionsreagenz Polyfect (Qiagen) mit 0,6 ml OPTI-MEM-Medium vermischt, und dann die DNA hinzu pipettiert. Dieser Ansatz wurde für 30 min bei RT inkubiert, mit 3 ml DMEM vermischt und dann auf die Zellen gegeben. 24h später wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und in DMEM-Vollmedium kultiviert. Das neue Medium war mit Hygromycin (100 µg/ml) oder Puromycin (1 µg/ml) versetzt, um die erfolgreich transfizierten Zellen zu selektieren.

2.1.6. Transfektion von siRNA

Jeweils 0,9 µl (100 µM) eines Typs von siRNA wurden für die Transfektion von ca. 10^5 Zellen verwendet. Die Zellen wurden erst mit PBS gewaschen und dann in 1 ml OPTI-MEM prä-inkubiert. Das Transfektionsreagenz Oligofectamin (Invitrogen) und die siRNA wurden parallel in verschiedenen Behältnissen mit 150 µl OPTI-MEM-Medium

vermischt und für 3 min inkubieren gelassen. Beide Ansätze wurden anschließend vermischt und für 25 min bei RT inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz mit 600 µl OPTI-MEM vermischt und dann auf die Zellen gegeben. 6h später wurde das Transfektionsmedium mit 9 ml DMEM-Vollmedium ausgetauscht.

2.1.7. Herstellung chemokompetenter E.coli

Eine Übernachtskultur von *E.coli* DH10B wurde für 2-3 h in 400 ml LB-Medium inkubiert bis die Kultur eine OD600 von 0,4-0,6 erreicht hatte. Nach der Zentrifugation der Bakteriensuspension (4500 g, 5 min, 4°C) wurden die Zellen mit 80 ml eiskaltem TBF1 gewaschen, in 8 ml eiskaltem TBF2 resuspendiert und für 15-60 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden in 200 µl Aliquots in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert.

2.1.8. Transformation von E.coli mit Plasmiden

50 µl von tiefgefrorenen (-80°C) *E.coli* DH10B wurden für 10 min auf Eis aufgetaut. Dann wurde 1 µg Plasmid-DNA hinzugegeben und für weitere 20 min auf Eis inkubieren gelassen. Dieser Ansatz wurde anschließend erst für 1 min bei 42°C und dann für >30 min auf Eis inkubiert, bevor er in 1 ml LB-Medium verdünnt wurde. In dieser Lösung wurden die Bakterien abzentrifugiert (3200 rpm, 4 min) und in 200 µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden dann auf einer Agarplatte mit entsprechendem Antibiotika ausplattiert und über Nacht in einem Inkubator (37°C) wachsen gelassen.

2.1.9. Lysieren von Zellen

Die Zellen wurden je nach Analyse-Methode unterschiedlich lysiert. Für eine einfache Western-Analyse der Proteine wurde eine angepasste Menge an 2x Lämmli verwendet (ca. 70 μl / 10^5 Zellen). Das 2x Lämmli wurde direkt auf die Zellen in einer Platte gegeben und nach kurzer Lysezeit das Lysat mit einem Schaber und Pipette in ein geeignetes Behältnis überführt. Für eine IP oder den Sucrosegradienten wurden die Zellen mit Trypsin von den Zellkulturschalen abgelöst und zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf Eis in Lysispuffer lysiert. Als Richtwert galten 200 μl / 10^6 Zellen. Die Lysedauer betrug ca. 30 min. Bei der Isolierung von Gesamtzell-RNA wurde der Lysispuffer T aus dem PeqGOLD total RNA Kit direkt auf die Zellen in einer Schale gegeben (ca. 350 μl / 10^5 Zellen). Es wurde im Weiteren nach dem Protokoll des Kits fortgefahren.

2.2. Klonierung und Mutagenese

2.2.1. PCR aus einer cDNA-Bank

Aus einer cDNA-Bank (Hela-Zellen) wurde der (intronlose) ORF von DDX27 über PCR amplifiziert. Dazu wurden die Primer aus Abschnitt 1.8. benutzt. An den fwd-Primer wurde 5' eine Kozak-Sequenz angehängt. Als DNA-Polymerase wurde das Kapa-Hifi-Kit (Peqlab) gewählt.

Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

cDNA	1 µl
Kapa-Hifi-Puffer (10x)	5 µl
Primer (fwd, rev) (10 µM)	Je 1,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,5 µl
Kapa-Hifi-DNA-Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Das Zyklen-Programm der PCR sah wie folgt aus:

95°C Denaturierung	2 min, 1x
95°C Denaturierung	30 s, 25x
50°C <i>Annealing</i>	30 s, 25x
68°C Verlängerung	3min, 25x
72°C finale Verlängerung	5 min, 1x

Schritte 2-4, ein zusammenhängender Zyklus, der 25x wiederholt wurde.

Das Produkt wurde gemäß 2.2.4. in einen pSfiExpress Vektor ligiert.

2.2.2. PCR-Mutagenese

Ein pSfiExpress Plasmid mit integrierter DDX27 wt ORF Sequenz diente als Vorlage, um durch PCR die DDX27-Sequenz zu mutieren. Im Falle einer Deletionsmutagenese wurden Primer so gestaltet, dass das gesamte Plasmid repliziert und amplifiziert wurde, mit Ausnahme der zu deletierenden Sequenz. Bei den Ala-Mutanten wurde 5' an die Primer zwei Codons, die für Alanine kodieren angehängt. Als DNA-Polymerase wurde das Kapa-Hifi-Kit (Peqlab) gewählt. Der Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

Plasmid	10 ng
Kapa-Hifi-Puffer (10x)	5 µl
Primer (fwd, rev) (10 µM)	Je 1,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	1,5 µl
Kapa-Hifi-DNA-Polymerase	1 µl
H ₂ O	ad 50 µl

Das Zyklen-Programm der PCR sah wie folgt aus:

95°C Denaturierung	2 min, 1x
95°C Denaturierung	30 s, 25x
X°C <i>Annealing</i>	30 s, 25x
68°C Verlängerung	XX, 25x
72°C finale Verlängerung	5 min, 1x

Schritte 2-4, ein zusammenhängender Zyklus, der 25x wiederholt wurde.

X = *Annealing*-Temperatur je nach Primern/Mutante unterschiedlich, auf ca. 3°C weniger als die Schmelz-Temperatur (T_M) der Primer ausgelegt

XX = Verlängerungszeit je nach Primern/Mutante unterschiedlich, auf eine Rate von 1kb/30sec ausgelegt

2.2.3. DNA-Gelelektrophorese und Extraktion

PCR-Produkte und verdaute Plasmide wurden mit EtBr markiert und auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen und bei 100V für 2-4h aufgetrennt. Über UV-Licht ließen sich die DNA-Banden nachweisen. Diese konnten über ein Gel-Extraktions-Kit (Qiagen) zur reinen DNA aufgereinigt werden.

2.2.4. Ligation von Sequenzen in Plasmide

Die aus der cDNA-Bank gewonnene DDX27 wt ORF Sequenz wurde über Ligation in einen pSfiExpress Vektor kloniert. Der Vektor besitzt hinter einem Promotor eine einzelne EcoRV-Schnittstelle. An dieser Stelle wurde das Plasmid mit dem EcoRV Restriktionsenzym aufgeschnitten und die DDX27 wt Sequenz hinein ligiert. Dazu wurde eine T4-DNA-Ligase (NEB) verwendet. Die Deletionsmutanten-Sequenzen wurden an ihren offenen Enden direkt miteinander ligiert. Ein Vektor konnte anschließend in *E.coli* transformiert, durch die Bakterien amplifiziert und über Mini/Maxi-Präparation aufgereinigt werden. Der pSfiExpress Vektor diente zunächst als kleinerer Zwischenvektor. Die ORF-Sequenz wurde danach in einen pRTS Vektor umkloniert, welcher stabil in humane Kulturzellen transfiziert werden kann. Der pSfiExpress und der pRTS Vektor besitzen je zwei SfiI-Schnittstellen. So kann das Insert zwischen den SfiI-Stellen aus dem pSfiExpress herausgeschnitten und zwischen die Stellen des pRTS hineinligiert werden.

2.2.5. Mini- und Maxi-Präparationen von Plasmid-DNA

Für die Amplifikation von Plasmiden wurde das Mini- bzw. Maxi-Prep Kit von Qiagen verwendet. Je 2 ml bzw. 400 ml LB-Medium wurden mit *E.coli* DH10B inokuliert. Die Bakterien trugen dabei das zu amplifizierende und aufzureinigende Plasmid. Das Medium war entweder mit Kanamycin (für pSfiExpress) oder Ampicillin (für pRTS) als selektives Antibiotikum versetzt. Nach 16 h Wachstum wurde mit dem Protokoll des jeweiligen Kits fortgefahren. Die Plasmide wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.3. RNA-Analyse-Methoden

2.3.1. Isolierung von RNA

Die Gesamtzell-RNA wurde nach dem Protokoll des PeqGOLD total RNA Kit isoliert. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

2.3.2. RNA-Gelelektrophorese

Innerhalb einer Versuchsreihe wurden Proben von isolierter RNA mit sterilem Wasser auf die gleiche Konzentration und Menge normiert. Es wurde das gleiche Volumen RNA-Ladepuffer (enthält EtBr) hinzugefügt und die Proben für 12 min bei 55°C inkubiert. Dann wurde die RNA auf ein Agarosegel (1%) aufgetragen und bei 35V für 16h bzw. bei 90V für 4h aufgetrennt. Über UV-Licht ließen sich die RNA-Banden nachweisen.

2.3.3. *In vivo* labelling (Pulse-Chase)

Ca. 10^5 Zellen wurden für 1h mit Hungermedium inkubiert. Es folgte ein Mediumwechsel zu Hungermedium (1 ml), das mit radioaktivem ^{32}P -Orthophosphat (15 $\mu\text{Ci}/55,5 \text{ kBq}$) versetzt war. Die Zellen wurden für eine Stunde in diesem Medium inkubiert (Pulse). Danach wurde das Medium zu DMEM-Vollmedium gewechselt (Chase). Je nach Versuch dauerte der Chase unterschiedlich lange (3h bei dem Versuch ohne Zeitkinetik). Anschließend wurde die Gesamtzell-RNA isoliert. Nach der Auftrennung der RNA über ein Agarosegel, wurde das radioaktive Phosphat durch Vakuum auf ein Whatmanpapier geblottet. Das Papier wurde dann in eine Kassette geklebt und ein Film aufgelegt. Filme wurde nach unterschiedlicher Belichtungszeit entwickelt. Um die Signale zu

quantifizieren wurde eine Imaging Plate (Fuji) verwendet, welche in einem Phosphoimager (Fuji) ausgewertet wurde.

2.3.4. Northern-Analyse

Nach der Auftrennung über das Agarosegel wurde die RNA auf eine Hybond-N+ Membran geblottet. Dazu wurde das Gel auf ein Whatmanpapier gelegt, welches wiederum an den Rändern in zwei Pufferreservoirs (Puffer = SSC 1x) getaucht war. Somit entstand ein kapillarer Sog nach oben. Dieser nahm die RNA mit auf die Membran. Die Membran lag oberhalb des Gels. Nach ca. 16h wurde die Membran entfernt und mit der RNA durch UV-Licht (Stratalinker 1800 , Einstellung: Autocrosslink 120 mJ) ein *Crosslink* an die Membran durchgeführt. Die Membran wurde dann mit Church-Puffer (65°C) für ca. 1h prä-inkubiert. Unterdessen wurde eine Sonde mit γ -³²P-ATP markiert. Der Ansatz war wie folgt:

γ - ³² P-ATP (6000 μ Ci/mmol) = (22,2MBq/mmol)	5 μ l
T4-PNK Puffer	1 μ l
Steriles H ₂ O	2 μ l
DNA-Sonde (1 μ M)	1 μ l
T4-Polynukleotid-Kinase	1 μ l

Dieser Ansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und dann über eine Micro Spin Column (GE Healthcare) aufgereinigt. Das Eluat wurde in 40 μ l TE-Puffer verdünnt und nach ca. 3 min Aufkochen bei 95°C in 10 ml Church-Puffer (65°C) überführt. In diesem Puffer wurde die Membran für

2d bei 65°C mit der Sonde hybridisieren gelassen. Danach wurde die Membran je einmal 10 min mit 2xSSC, 1% SDS und 10 min mit 0,1xSSC, 0,1% SDS gewaschen. Die Membran wurde in eine Entwicklerkassette geklebt und ein Film aufgelegt. Filme wurde nach unterschiedlicher Belichtungszeit entwickelt.

2.4. Protein-Analyse-Methoden

2.4.1. *knockdown* von Proteinen über RNA-Interferenz

SiRNA-Transfektion nach 2.1.6. Die Zellen wurden 2d nach der zweiten siRNA-Transfektion lysiert und mit den zweckmäßigen Methoden analysiert.

2.4.2. SDS-PAGE

Nachdem die Lysate in Lämmli-Puffer aufgekocht wurden (95°C, 4 min, 8 min für IP-Proben) konnten sie in ein SDS-PAGE Gel (10,5%) aufgetragen werden. Das Auftragsvolumen betrug in der Regel 10 µl. Zudem wurde 3,5 µl *PageRuler* (Fermentas) Größenstandard zur Bestimmung der Molekulargröße aufgetragen. Die Proteine ließ man dann bei 30 mA/Gel für ca. 2 h in 1x Western-Laufpuffer auftrennen bis die Lauffront den Boden der Laufkammer erreicht hatte.

2.4.3. *Western*-Analyse

Zur weiteren Untersuchung der in der SDS-PAGE gelaufenen Proteine wurden diese aus dem Gel unter Verwendung von 1x Western-Transferpuffer auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Der Transfervorgang dauerte 1,5 h bei 450 mA. Die Membranen wurden

daraufhin mind. 30 min in Blocklösung geschüttelt. Nach dem Blocken wurde die Blocklösung mit Wasser abgewaschen und die Membran mit dem primären Antikörper (5 ml in einem 50 ml Reaktionsgefäß) ÜN bei 4°C inkubiert. (Der Primärantikörper war in 5 ml Antikörper-Stammlösung gelöst). Nach dieser Inkubation wurde die Membran 3x 5 min in 1x TBST gewaschen und dem passenden Sekundärantikörper exponiert. Die Inkubation des Sekundärantikörpers dauerte mind. 1,5 h bei RT. Die Membran wurde dann noch 3x 5 min in 1x TBST gewaschen, das TBST kurz mit Wasser abgewaschen und mit 1 ml ECL benetzt. Nach 2 min Inkubationszeit wurde in der Dunkelkammer ein Fotofilm aufgelegt und nach passender Belichtungszeit entwickelt.

2.4.4. Immunpräzipitation

Es wurden 25 µl Sepharose-G-*Beads* in 1 ml PBS gewaschen (2500 rpm, 1 min) und in 500 µl Antikörperlösung suspendiert. Die Suspension wurde für mind. 1 h bei 4°C im Überschlagschüttler inkubiert, damit die Antikörper an die *Beads* binden konnten. Dann wurden die *Beads* in Lysat (siehe 2.1.9) suspendiert und ÜN bei 4°C im Überschlagschüttler inkubiert. Ein Aliquot des Lysats wurde als Input in gleichem Volumen 2x Lämmli-Puffer weggefroren. Nach der Inkubation wurden die *Beads* 3x mit Lysispuffer (2500 rpm, 1 min) gewaschen. Die *Beads* wurden in einem Fünftel des Ausgangsvolumens resuspendiert und in gleichem Volumen mit 2x Lämmli-Puffer vermischt. Durch ca. 8 min Aufkochen der Kugeln bei 95°C in dem SDS-haltigen Lämmli-Puffer wurden die Proteine von den *Beads* abgelöst. Die Proben konnten nun entweder zur späteren Verwendung bei -20°C eingefroren werden, oder gleich zur Analyse in eine SDS-PAGE aufgetragen werden.

2.4.5. Proteinauftrennung über einen Sucrosegradienten

Der RNA-Gehalt eines Lysats/Probe wurde über ein Nanodrop-Messgerät (Thermo-Fisher) ermittelt. Das Äquivalent von 250 µg RNA wurde auf einen linearen Sucrosegradienten (5-25%) geladen. Dieser Gradient wurde bei 38000 g für 2h zentrifugiert. Anschließend wurde er durch eine *Gradient machine, Fractionator Foxy Jr.* fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen (ca. 250 µl) wurden auf Eis mit 1 ml TCA-Mix versetzt und zentrifugiert (13000 rpm, 30 min, 4°C), um die enthaltenen Proteine auszufällen. Der Überstand wurde verworfen und die gefällten Proteine mit 500 µl eiskaltem Aceton versetzt. Die Proben wurden erneut zentrifugiert (13000 rpm, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen und die gefällten Proteine in 40 µl 1x Lämmli-Puffer resuspendiert. Die Proben wurden dann für 1h stehen gelassen und anschließend für 1 min bei 95°C aufgeköcht. Damit waren sie bereit für die SDS-PAGE und die anschließende *Western*-Analyse.

2.4.6. Immunfluoreszenz-Mikroskopie

Die Deckgläser wurden in 12-Loch-Schalen gelegt und mit dem GS Genelinker (Programm Str 90s, BioRad) durch UV-Strahlung sterilisiert. Anschließend wurden Zellen gemäß den jeweiligen Experimenten darauf ausplattiert (5×10^5 Zellen / Loch).

Die Zellen wurden mit 1 ml Paraformaldehyd (2%) für 4 min fixiert. Es folgten zwei Waschungen mit PBS. Die Zellen wurden dann mit 1 ml TritonX 0,5% (in PBS) permeabilisiert. Es folgten mind. 30 min Behandlung mit Blocklösung. Die Deckgläser wurden dann für mind. 1h in je 80 µl Antikörperlösung gelegt, um sie mit dem jeweiligen Primärantikörper zu inkubieren. Bei confokaler Mikroskopie waren in der

Lösung zwei verschiedene Antikörper (aus unterschiedlichen Spezies) vorhanden. Darauf folgten 3 je 5 min lange Waschungen mit PBS (+0,1% TritonX). Die Deckgläser wurden dann für mind. 1h in je 80 µl Antikörperlösung gelegt, um sie mit dem jeweiligen Cy3- oder Cy5-gekoppelten Sekundärantikörper zu inkubieren. Bei confokaler Mikroskopie wurden waren in der Lösung zwei verschiedene Antikörper (aus unterschiedlichen Spezies und mit unterschiedlichem Fluorogen) vorhanden. Darauf folgten 3 je 5 min lange Waschungen mit PBS (+0,1% TritonX). Die Zellen wurden dann für 4 min in DAPI-Lösung inkubiert und noch einmal mit PBS gewaschen. Zuletzt wurden die Platten auf einen Tropfen Mounting Medium auf einem Objektträger gelegt.

Die Mikroskopie wurde mit dem Axiovert 200M Immunfluoreszenz-Mikroskop (Zeiss) durchgeführt. Die confokale Mikroskopie wurde mit Leica LSCM SP2 durchgeführt.

Ergebnisse

1. Die Bedeutung von DDX27 für die Ribosomenbiogenese

Ich habe in meiner Diplomarbeit gezeigt, dass die DEAD-Box RNA-Helikase DDX27 ein Interaktionspartner des PeBoW-Komplexes ist. Der PeBoW-Komplex stellt einen essentiellen Faktor für die Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit dar. Daraus stellt sich die Frage, ob und welche Funktion DDX27 in der Ribosomenbiogenese hat.

1.1. DDX27 lokalisiert im Nukleolus

Zuerst habe ich die zelluläre Lokalisation von DDX27 untersucht. DDX27 wurde dazu in U2OS-Zellen mittels Immunfluoreszenz über einen entsprechenden Antikörper indirekt angefärbt. Der Versuch zeigte, dass DDX27 konzentriert im Nukleolus lokalisiert (Abb.7A).

DDX27 mit HA-tag wurde in einem weiteren Versuch mittels eines Vektors (pRTS) in U2OS-Zellen überexprimiert. Rekombinantes DDX27 lokalisiert mit erhöhter Menge ebenfalls im Nukleolus (Abb. 7B).

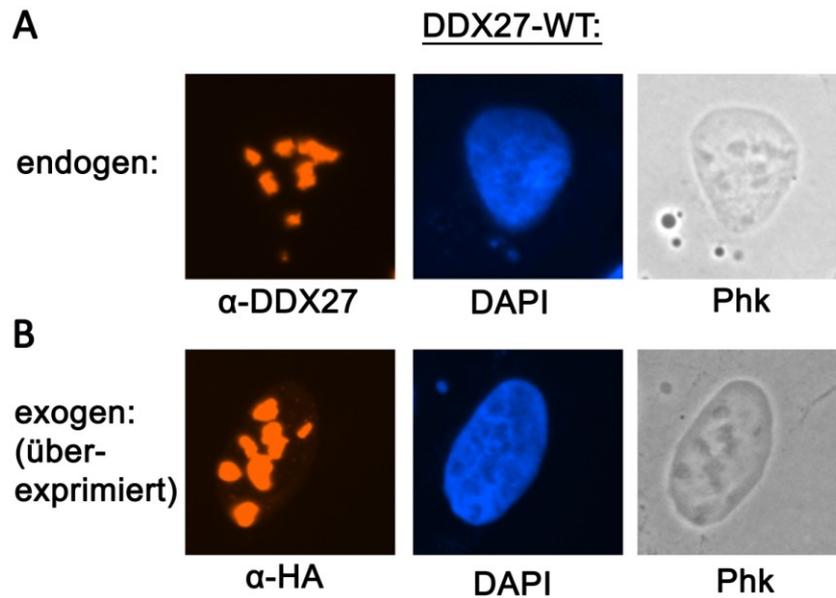


Abb. 7: DDX27 lokalisiert im Nukleolus. Dargestellt sind U2OS-Zellen, welche mit Antikörpern indirekt fluoreszent (Cy3) angefärbt wurden. A) Nicht transfizierte Zelle, bei der das endogene DDX27 mit einem Antikörper angefärbt wurde. B) Zelle, in welcher über einen pRTS-Vektor das Wildtyp DDX27-HA (über-)exprimiert und indirekt über einen HA-Antikörper angefärbt wurde. Phk = Phasenkontrastlichtmikroskopie

1.2. DDX27 assoziiert mit der (Prä-)60S ribosomalen Untereinheit

Ein weiteres Experiment sollte veranschaulichen mit welchen prä-ribosomalen Partikeln DDX27 im Nukleolus assoziiert ist. Wildtyp-DDX27-HA wurde in U2OS-Zellen (über-)exprimiert und die Zellysate durch einen Sucrosegradient aufgetrennt. Ein solcher Gradient fraktioniert die verschiedenen ribosomalen Partikel und die mit den Partikeln assoziierten Proteine.

DDX27 co-fraktioniert mit hoher Abundanz in den (Prä-)60S und 90S Partikel Fraktionen (Abb. 8, Spur 9-13). Der Faktor tritt in den anderen Fraktionen nur bedeutend geringer oder gar nicht auf. Pes1 (stellvertretend für den PeBoW-Komplex) liegt hingegen in den Fraktionen der (Prä-)60S Partikel und weniger in den 90S Fraktionen vor (Abb. 8, Spur 9-13).

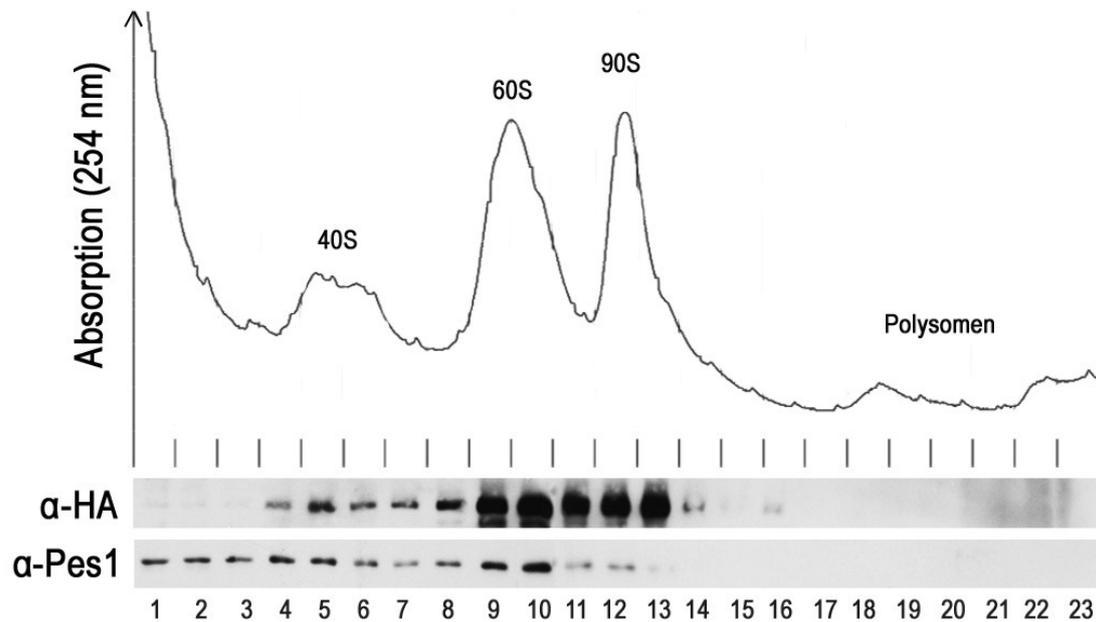


Abb. 8: DDX27 co-fractioniert mit der 60s (prä-)ribosomalen Untereinheit. Rekombinantes DDX27-HA wurde in U2OS exprimiert. Die Ganzzelllysate wurden in einem Sucrosegradienten aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden im *Western Blot* auf die Abundanz von DDX27 und Pes1 überprüft. DDX27 zeigt dabei wie die PeBoW-Komponente Pes1 eine Akkumulation in den 60s Partikel Fraktionen, aber auch erhöhte Mengen in den 90s Partikel Fraktionen.

DDX27 und der PeBoW-Komplex haben somit ein ähnliches aber nicht strikt identisches Verteilungsmuster. Die abweichende Assoziationsverteilung bezüglich der prä-ribosomalen Partikel deutet auf zum Teil unterschiedliche Funktionen der beiden Faktoren hin.

1.3. DDX27 *knockdown* vermindert die Prozessierung der 32S Prä-rRNA zur 28S rRNAs

Der *knockdown* der Einzelproteine des PeBoW-Komplexes führt zu einer Verminderung der Prozessierung hin zu der 32S Prä-rRNA und 28S

rRNA. Im folgenden Experiment sollte getestet werden, wie sich der *knockdown* von DDX27 auf die Prozessierung der rRNA auswirkt. U2OS Zellen wurden je zweimal mit siRNA gegen DDX27 inkubiert. Parallel dazu wurden Zellen auch mit siRNA gegen Pes1 als Positivreferenz, sowie gegen Luziferase (Luc) als Negativkontrolle behandelt. Alle Zellen wurden 24, 42 und 66 Stunden nach der ersten siRNA-Transfektion mit radioaktivem Phosphat versetzt, um eine metabolische Markierung (*in vivo labelling*) der neu synthetisierten und prozessierten RNA zu erreichen. Ein dreistündiger *Chase* ohne radioaktives Phosphat im Kulturmedium folgte dem einstündigen *Pulse*. Die Proben wurden auf ein RNA-Gel aufgetragen und die Signale analysiert.

Die Menge an neu erzeugter 32S Prä-rRNA und vor allem der 28S rRNA nimmt nach *knockdown* von DDX27 im Vergleich zur Negativkontrolle deutlich ab (Abb. 9A). Das deutet auf einen klaren Prozessierungsdefekt der 60S assoziierten Prä-rRNA hin. Der 28S/47S Quotient ist zwei Tage nach der ersten siRNA-Transfektion bereits um mehr als 30% im Vergleich zu Negativkontrolle gesunken, der 32S/47S Quotient um 25% (Abb. 9B). Der 28S/47S Quotient sank nach drei Tagen sogar um mehr als 50% im Vergleich zu Negativkontrolle.

Der DDX27 *knockdown* hemmt die rRNA-Prozessierung auf vergleichbare Weise wie der *knockdown* von Pes1. Die Auswirkung des Pes1 *knockdowns* ist mit einer Reduktion um bis zu 70% des 28S/47S Quotienten bzw. 55% des 32S/47S Quotienten drei Tage nach der letzten siRNA-Transfektion noch stärker als der DDX27 *knockdown*. DDX27 und PeBoW spielen also beide eine wichtige Rolle in der Prozessierung der rRNAs der großen ribosomalen Untereinheit.

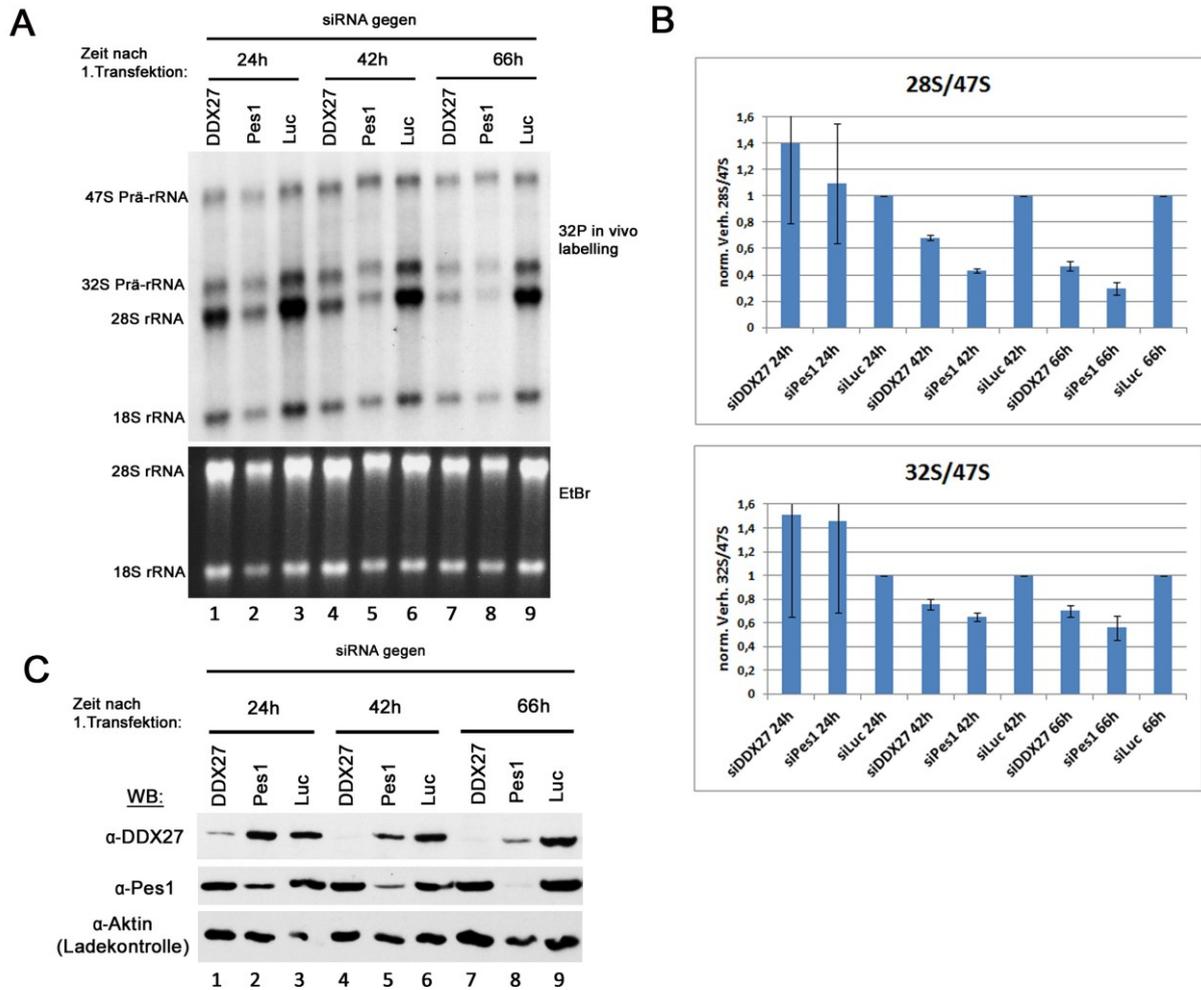


Abb. 9: knockdown von DDX27 mit anschließendem *in vivo* labelling. U2OS Zellen wurden zweifach mit siRNA gegen DDX27, Pes1 oder Luziferase (Negativkontrolle) behandelt. Zu den Zeitpunkten 24h, 42h und 66h nach der ersten Transfektion wurden die Zellen mit radioaktivem Phosphat inkubiert, um die neu erzeugte (Prä-)rRNA zu markieren. A) RNA-Gel auf dem die isolierte RNA der markierten Zellen aufgetragen wurde. Die Menge der neu prozessierten 32S Prä-rRNA und vor allem der 28S rRNA verringert sich nach *knockdown* von DDX27 bzw. Pes1 deutlich im Vergleich zur Luziferase-Kontrolle. B) Darstellung der 28S/47S bzw. 32S/47S Quotienten. Beide Quotienten verringern sich signifikant nach *knockdown* von DDX27 bzw. Pes1. Der Quotient zwischen der 32s bzw. 28S und der 47S rRNA Kontrolle (Luc) wurde für den jeweiligen Tag der Markierung als 1 gesetzt. C) Kontrolle der *knockdowns* im *Western Blot*.

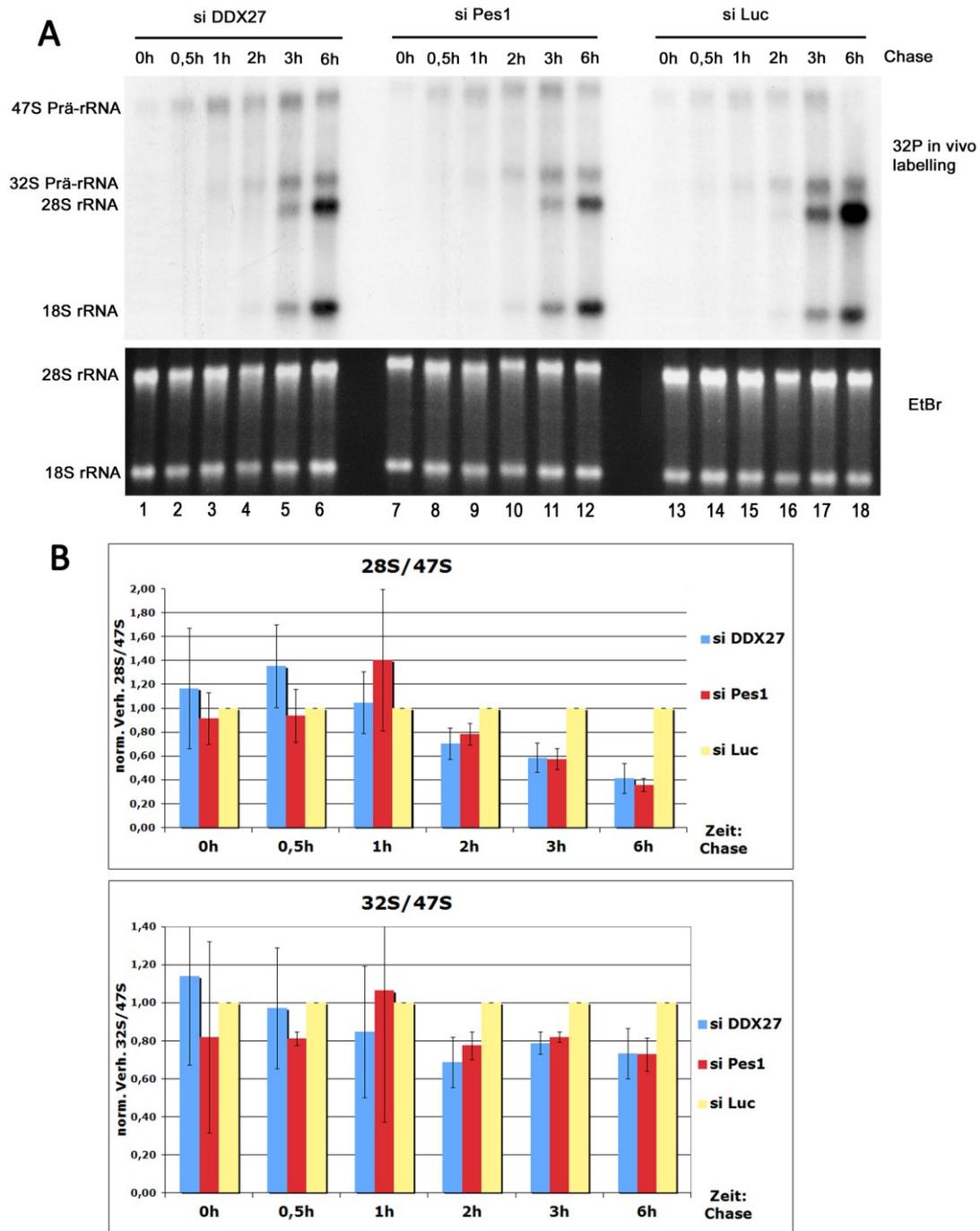


Abb. 10: Chase-Zeitkinetik des *in vivo* labellings nach *knockdown* von DDX27. Experimentelle Verfahrensweise wie in Abb.3, aber Probeentnahme 3d nach 1. siRNA Transfektion zu verschiedenen Chase-Zeitpunkten: 0, 0,5, 1, 2, 3 und 6h. A) Nach *knockdown* von DDX27 bzw. Pes1 ergibt sich im Vergleich zur Negativkontrolle (siLuc) eine klare Verringerung der Prozessierung der 47S zur 32S Prä-rRNA und 28S rRNA. Die Menge der 47S akkumuliert, die Menge der 32Ss und 28S verringert sich. B) Darstellung der 28S/47S bzw. 32S/47S Quotienten zu verschiedenen Chasezeitpunkten. Beide Quotienten verringern sich für die Chase-Zeiten 2,3 und 6h signifikant nach *knockdown* von DDX27 bzw. Pes1. Der Quotient zwischen der 32S bzw. 28S und der 47S rRNA Kontrolle (Luc) wurde für den jeweiligen Chase-Zeitpunkt der Markierung als 1 gesetzt.

Ich habe Zeitkinetik-Experimente durchgeführt, um mehr über die Dynamik der Prozessierungsdefekte zu verstehen. Dafür wurde der zuvor beschriebene *in vivo labelling* Ansatz wiederholt, jedoch in diesem Fall die Proben drei Tage nach der ersten siRNA-Transfektion zu mehreren Chase-Zeitpunkten genommen.

Der DDX27 bzw. Pes1 *knockdown* bewirkt übereinstimmend mit dem vorigen Experiment eine signifikante Verringerung der Menge an 32S Prä-rRNA und 28S rRNA (Abb. 10A). Die 32S nimmt im Verhältnis zur 47S spätestens nach zwei Stunden Chase um etwa 20-30% ab (Abb. 10B). Die Abnahme der 28S rRNA steigert sich mit zunehmender Chase-Zeit bis auf ca. 60% (Abb. 10B). Die zunehmende Menge der prozessierten RNA bei fortlaufender Chase-Zeit demonstriert, dass die RNA-Prozessierung nach DDX27/Pes1 *knockdown* nicht komplett und dauerhaft inhibiert sondern verlangsamt ist.

1.4. Der *knockdown* von DDX27 bewirkt einen 3'-Prozessierungsdefekt der 47S Prä-rRNA

Ich konnte im vorhergehenden Experiment nach *knockdown* von DDX27 eine Akkumulation der 47S Prä-rRNA erkennen. Diese Beobachtung erklärt sich am einfachsten durch eine Blockierung der Prozessierung zu einer der nachfolgenden RNA-Formen. Die Akkumulation lässt sich aber auch auf einen anderen möglichen Grund zurückführen: eine fehlerhafte Termination der rRNA-Transkription, einer inkorrekten Prozessierung der 3'-Region und der anschließenden Akkumulation des fehlerhaften Primärtranskripts. Das folgende Experiment basiert auf den Erkenntnissen meines Kollegen Kaspar Burger. Er hat nach *knockdown* der Kinase Cdk9, die an der snoRNA-Transkription beteiligt ist,

fehlerhafte 3'-verlängerte 47S Transkripte mit Sonden im *Northern Blot* nachgewiesen.

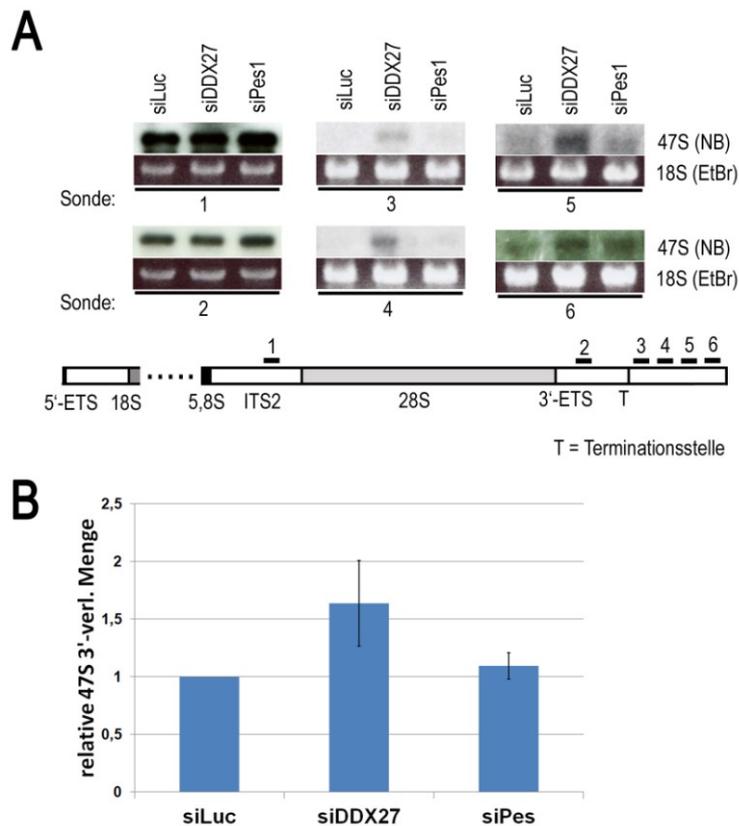


Abb. 11: 3'-ETS Prozessierungsdefekt nach *knockdown* von DDX27. A) U2OS Zellen wurden zweifach mit siRNA gegen DDX27, Pes1 oder Luziferase (Luc, Negativkontrolle) behandelt. Am dritten Tag nach der 1. siRNA-Transfektion wurde die Gesamtzell-RNA im *Northern Blot* überprüft. Die Sonden 3-6 sind spezifisch für die 3'-Region hinter der Terminationsstelle (T) des 47S Transkripts, die Sonde 1 für die ITS2 und die Sonde 2 für die 3'-ETS. Die Sonden 1 und 2 zeigen, dass die Gesamtmenge der 47S rRNA nach *knockdown* gleich bleibt, die Sonden 3-6 demonstrieren aber eine Anreicherung von fehlerhaft prozessierten 47S rRNAs mit verlängerterem 3'-ETS. B) Die Signale der Sonden gegen die 3'-verlängerte Region der 47S wurden quantifiziert. Dargestellt sind Werte für siDDX27 und siPes1 relativ zu siLuc. SiLuc wurde als 1 gesetzt.

Vier Sonden, die gegen die 3' gelegene Region hinter der regulären Terminationsstelle gerichtet sind, detektierten nach *knockdown* von DDX27 eine Akkumulation einer verlängerten 47S rRNA-Form (Abb. 11, Sonden 3-6). Die generelle Menge der 47S blieb in den Zellen dahingegen gleich, da sich keine Änderung der Signalstärke bei einer

Sonde gegen die 3'-ETS und die ITS2 erkennen ließ (Abb. 11, Sonden 1 und 2). Keine signifikante Akkumulation der 3'-verlängerten 47S Prä-rRNA erscheint im Gegensatz nach *knockdown* von Pes1. Es kann somit vermutet werden, dass auf welche Weise DDX27 auch an dem 3'-Prozessierungsschritt beteiligt ist, es dies in Unabhängigkeit von PeBoW durchführt.

1.5. Der DDX27 *knockdown* verlangsamt die Zellproliferation

Eine funktionierende Ribosomenbiogenese stellt eine Grundvoraussetzung für dauerhaftes Wachstum und Proliferation von Zellen dar. Ich testete daher als nächstes, ob sich der Verlust von DDX27 negativ auf Wachstum und Proliferation auswirkt. Es wurde ein *knockdown* von DDX27 in U2OS-Zellen vorgenommen. Der *knockdown* von Pes1 diente auch hier als Positivreferenz und die Behandlung der Zellen mit siRNA gegen Luziferase (Luc) als Negativkontrolle. Das Wachstum und die Proliferation der Zellen wurden mittels eines xCELLigence-Systems (Roche) überwacht (Abb. 12).

Der Zell-Index von DDX27-siRNA behandelten Zellkulturen (rot) steigt langsamer als der Index der Kontrollzellen (blau), aber dennoch stetig. Der Zell-Index von Pes1-siRNA behandelten Zellen (grün) erfährt über die Zeit hingegen einen regelrechten Abfall.

DDX27 ist also ein Faktor, der für das Wachstum einer Zellkultur eine Bedeutung hat.

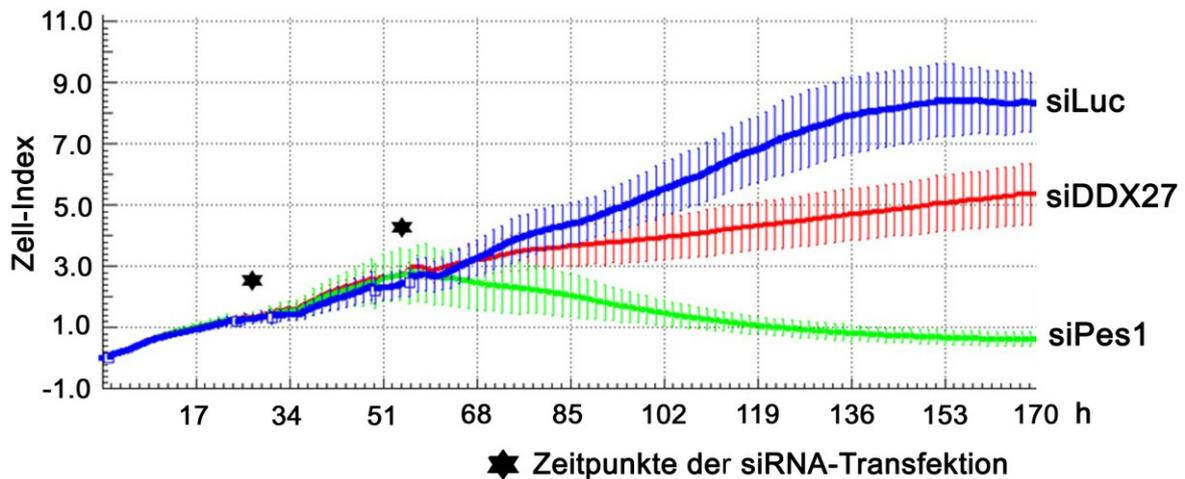


Abb. 12: Messung von Zellproliferation und -wachstum nach *knockdown* von DDX27. U2OS Zellen wurden zweifach mit siRNA gegen DDX27, Pes1 oder Luziferase (Negativkontrolle) behandelt. Der Zell-Index von siDDX27 behandelten U2OS steigt (rot) signifikant langsamer als die Kontrollzellen (Luc, blau). Der Zell-Index von siPes1 behandelten U2OS (grün) fällt nach der zweiten siRNA-Transfektion wieder gegen 0 ab. Sterne markieren die Zeitpunkte der siRNA Transfektionen.

2. Herstellung von Deletionsmutanten zur funktionellen Charakterisierung der Domänen von DDX27

Ich habe mehrere Deletionsmutanten hergestellt, um die Domänen von DDX27 zu charakterisieren (Abb. 13).

Es wurden jeweils gezielt Bereiche von DDX27 entfernt, um diesen Domänen funktionelle Eigenschaften zuordnen zu können. DDX27 besitzt im zentralen Bereich die für DEAD-Box Helikasen typischen konservierten Domänen und Motive, sowie zusätzlich einen N-terminalen Bereich mit 218 Aminosäuren und einen C-terminalen Bereich mit 226 Aminosäuren. Bei der ersten Gruppe Mutanten (DM1-4) wurde je ein großer Bereich (N-Terminus, zentraler Bereich (2x), C-Terminus) deletiert. Die gesamte Sequenz von DDX27 ist durch diese Deletionen abgedeckt. Eine weitere Gruppe von Mutanten diente hauptsächlich der

Erforschung der Interaktion zwischen DDX27 und dem PeBoW-Komplex (siehe: Abschnitt 3.2).

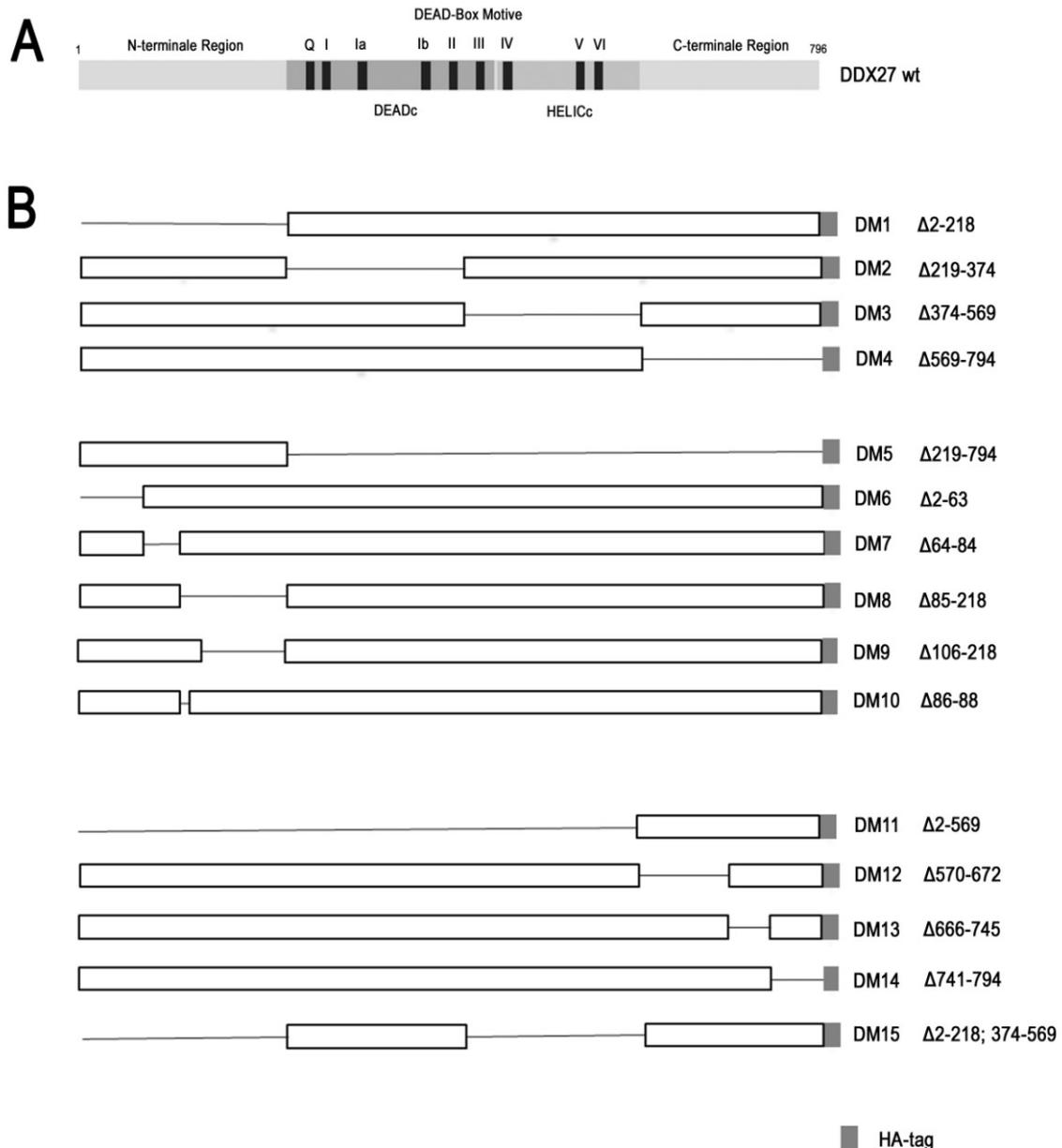


Abb. 13: Schema der DDX27 Deletionsmutanten. A) Schema von DDX27. Der zentrale Bereich von DDX27 weist die für die DEAD-Box Helikasen typischen konservierten domänen (DEADc, HELICc) und Motive (Q-VI) auf. Der Faktor besitzt daneben noch eine wenig konservierte N- und C-terminale Region. B) Die Deletionen der Mutanten DM1-4 umfassen je einen großen Bereich von DDX27 (N-Terminus, zentraler Bereich, C-Terminus). DM5 besteht nur aus dem N-Terminus. Die Mutanten DM6-10 tragen kleinere Deletionen innerhalb des N-Terminus. DM11 besteht nur aus dem C-Terminus. Die Mutanten DM12-14 tragen kleinere Deletionen innerhalb des C-Terminus. DM15 ist eine Kombination aus DM1 und DM3.

Es sind dabei zum einen unterschiedliche Teilstücke des N-terminalen Bereichs entfernt worden (DM6-10). Die Mutante DM5 besteht zum anderen nur aus dem N-Terminus. Die dritte Gruppe an Deletionsmutanten (DM11-15) wurde für die Untersuchung der Lokalisation von DDX27 konzipiert (siehe: Abschnitt 4). Allen Mutanten wurde C-terminal ein HA-tag angehängt.

Zur Expression wurden die Sequenzen von allen Mutanten in einen pRTS-Vektor kloniert. Die (Über-)Expression der jeweiligen Mutante wurde mittels Doxycyclin induziert. Der Vektor kodierte zudem für GFP, das immer parallel induziert wird. Die Expressionseffizienz des Vektors in einer Kultur konnte dadurch überwacht werden (siehe Anhang: Abb. 1).

2.1. Die Auswirkungen der Deletionen auf rRNA-Prozessierung

Die Überexpression von Deletionsmutanten eines Faktors hat häufig negativen Einfluss auf mit dem Faktor assoziierte zelluläre Prozesse. Der exprimierte mutierte Faktor verdrängt dabei, insbesondere durch seine hohe Abundanz, das endogene Wildtyp-Pendant an dessen Wirkungsort. Dem Faktor fehlen jedoch dann benötigte Domänen für seine korrekte Wirkungsweise, wodurch es zu Fehlern oder gar dem ganzen Ausfall des beteiligten Prozesses kommt. Diese dominant-negativen Effekte bezüglich der rRNA-Prozessierung konnten für mehrere Deletionsmutanten der PeBoW-Proteine nachgewiesen werden (Stezoska et al., 2002; Hölzel et al., 2005; Grimm et al., 2006). Diese mutierten PeBoW-Faktoren erzeugten eine Verminderung der Prozessierung zur 32S Prä-rRNA und 28S rRNA.

Es stellte sich nun die Frage, ob die Überexpression von DDX27-Deletionsmutanten sich ebenfalls negativ auf die Prozessierung der rRNA auswirkt. U2OS-Zellen wurden mit Vektoren der Mutanten DM1-4, DM11, sowie dem DDX27-wt und der Bop1-Mutante 1 Δ transfiziert. Es wurde somit zunächst ein Set von DDX27-Mutanten verwendet, bei dem alle Domänen zumindest einmal deletiert waren. Die exogene Expression des Wildtyp-DDX27 kontrollierte, ob die reine Überexpression des Faktors nicht an sich schon zu Veränderungen in der rRNA-Prozessierung führte. Die Expression von Bop1 Δ diente als Positivreferenz, da von dieser Mutante bekannt ist, dass sie eine Verringerung der 32S Prä-rRNA-Prozessierung auslöst. Die Vektoren wurden für 0-3 Tage in den Zellen induziert und anschließend die neu produzierte rRNA *in vivo* mit radioaktivem Phosphat markiert.

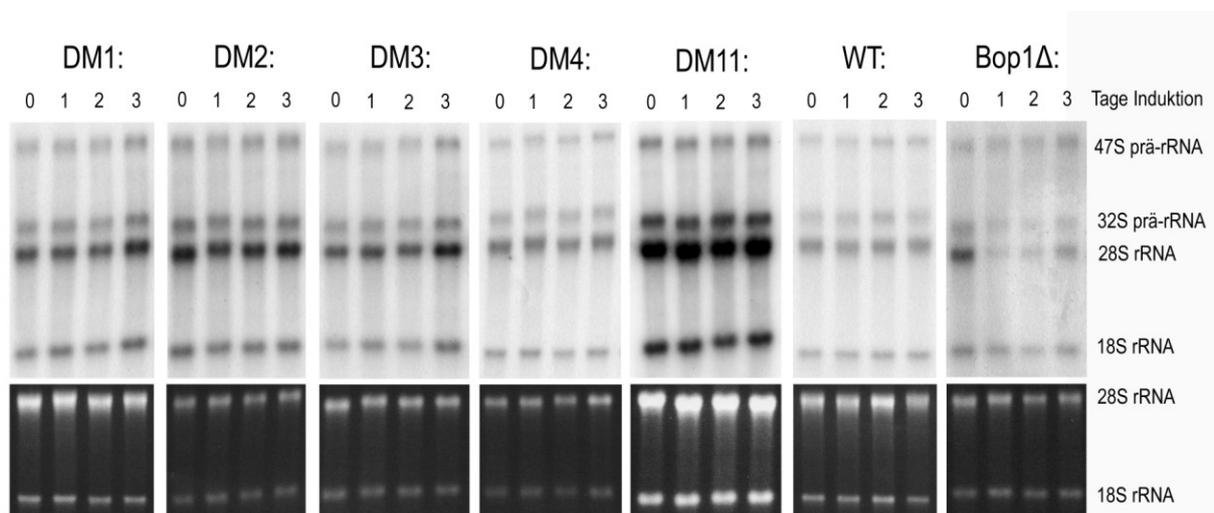


Abb. 14: *In vivo* labelling nach Überexpression von DDX27-Deletionsmutanten. Die Mutanten DM1,DM2,DM3 DM,4 oder DM11 sowie Wildtyp DDX27 und die Bop1 Δ Mutante wurden für 1,2 oder 3 Tage in U2OS-Zellen exprimiert und anschließend die Zellen mit radioaktivem Phosphat inkubiert, um die (Prä-)rRNA zu markieren. Keine der DDX27 Mutanten oder der Wildtyp zeigten eine Veränderung in der Prozessierung der rRNA. Bop1 Δ diente als Positivreferenz, die bekanntermaßen zu einer Verminderung der rRNA-Prozessierung führt.

Keine der DDX27-Mutanten offenbarte, anders als bei den PeBoW-Deletionsmutanten, eine erkennbare Verringerung der Mengen an markierter 32S Prä-rRNA bzw. 28S rRNA (Abb. 14). Es spielte dabei auch keine Rolle, wie lange die mutierten DDX27-Formen exprimiert wurden. Obgleich die Expressionsrate bei allen transfizierten Zelllinien ähnlich gut war (siehe Anhang: Abb. 1), konnte nach allen drei Zeitpunkten keine Veränderung in der Prozessierungsrate festgestellt werden. Auch die Überexpression des DDX27-Wildtyps erbrachte keine Veränderung im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen. Nur bei der Expression der Bop1-Mutante gab es eine klare Abnahme der Menge an 32S und 28S rRNA.

Der Verlust gleich welcher Domäne von DDX27 führt folglich zu keinem dominant negativen Phänotyp bezüglich der Prozessierung zur 32S Pr-rRNA und 28S rRNA.

2.2. Die Auswirkungen der Deletionen auf Proliferation

Ich habe neben dem Einfluss auf die rRNA-Prozessierung in der Ribosomenbiogenese zudem die Auswirkungen auf Wachstum und Proliferation von Deletionsmutanten exprimierende Zellen untersucht. Es wurden wieder die gleichen transfizierten Zelllinien wie in 2.1. (DM1-4, DM11, WT, Bop1 Δ) verwendet, deren Zellindex mit dem xCELLigence-System (Roche) gemessen wurde. Je vier Löcher von einer Zelllinie wurden 24h nach Ausplattierung induziert bzw. parallel dazu nicht induziert.

Große Veränderungen im Zellindex-Verlauf blieben bei den meisten DDX27-Zelllinien aus (Abb. 15). DM1 und 4 zeigen höchstens eine

leichte Verringerung in der Zell-Index-Kurve. Die Zellen der DM3 Mutante wachsen als einzige bedeutend langsamer.

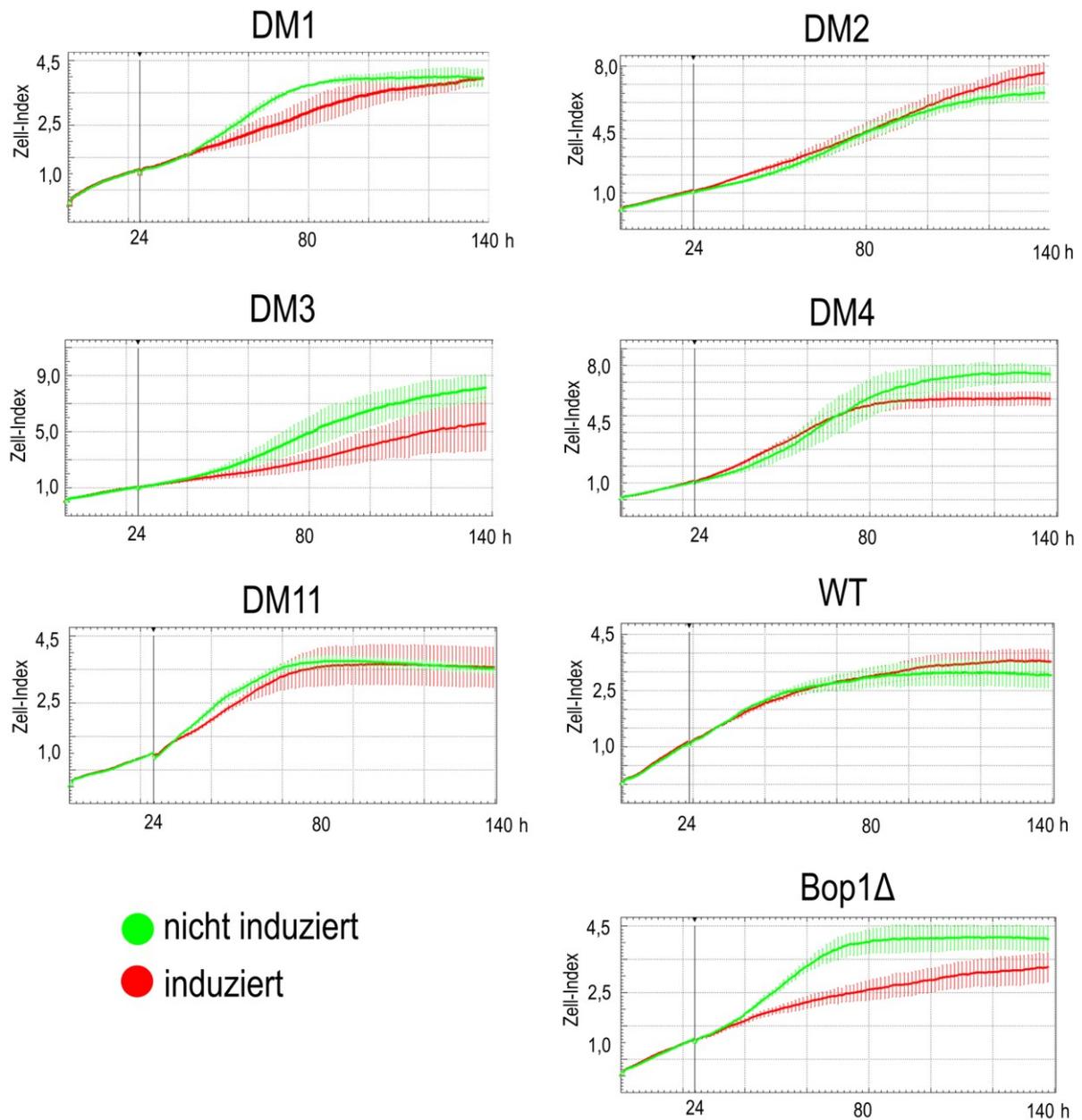


Abb. 15: Messung von Zellproliferation und -wachstum nach Expression von DDX27 Deletionsmutanten. Die Mutanten DM1, DM2, DM3, DM4 und DM11 sowie Wildtyp DDX27 wurden in U2OS Zellen überexprimiert (rot). Der Zell-Index der Mutanten DM1 und DM4 zeigt einen leichten Abfall im Vergleich zu den nicht induzierten Zellen (grün). Die Expression von DM3 führt zu einer Reduktion des Zell-Indexes. Bop1Δ dient als Positivreferenz als bekannte Mutante, deren Expression zu einer Verminderung der Proliferation führt. Striche bei 24h markieren den Zeitpunkt der Expressions-Induktion.

3. Die Interaktion von DDX27 mit dem PeBoW-Komplex

Ein bedeutender Aspekt dieser Arbeit war die Charakterisierung der Interaktion zwischen DDX27 und dem PeBoW-Komplex. Zwei Fragen standen dabei im Vordergrund: i) Welche der drei PeBoW-Komponenten vermittelt die Interaktion zu DDX27 ? ii) Wo liegt die PeBoW-Interaktionsdomäne innerhalb von DDX27 ?

3.1. Die Identifikation des Interaktionspartners von DDX27 im PeBoW-Komplex

3.1.1. DDX27 interagiert mit Pes1 und Bop1

Die nachfolgenden Experimente sollten bestimmen, welcher Faktor des PeBoW-Komplex die Interaktion zu DDX27 etabliert. Folgender Ansatz wurde gewählt: U2OS-Zellen wurden gleichzeitig mit zwei verschiedenen pRTS-Expressionsvektoren transfiziert. Der eine Vektor trug die DDX27-Sequenz mit angefügter Flag-tag-Sequenz. Der andere Vektor trug die Sequenz von je einem Faktor des PeBoW-Komplexes mit angefügter HA-tag-Sequenz. Es wurde (aus Gründen der Verfügbarkeit) ein Bop1 mit Ursprung aus der Maus exprimiert. Vom Bop1 Mäuse-Homolog wird jedoch angenommen, dass es sich funktionell wie das menschliche Homolog verhält (Strezoska et al., 2002; Rohrmoser et al., 2007). DDX27 und je ein PeBoW-Protein konnten also simultan in denselben Zellen überexprimiert werden. Über Co-Immunpräzipitationsansätze wurde dann geprüft, ob beide Faktoren miteinander interagieren. Die beiden jeweils anderen zwei Faktoren des PeBoW-Komplexes wurden einem siRNA-*knockdown* unterzogen, um eine indirekte Interaktion des geprüften PeBoW-Faktors mit DDX27 auszuschließen. Die Antikörper,

welche für die co-IP verwendet wurden, richteten sich gegen die beiden *tags*. Zwei unspezifische Antikörper mit gleichem Immunglobulin-Isotyp dienten als Negativkontrolle.

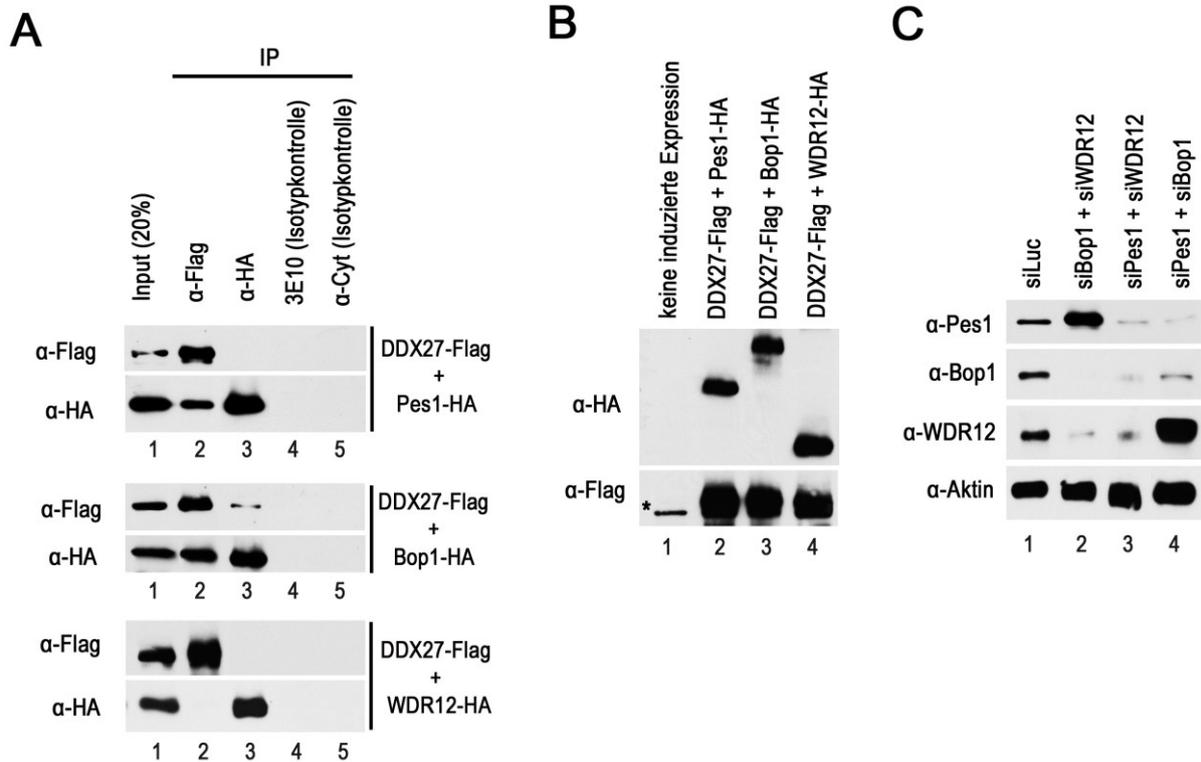


Abb. 16: Pes1 und Bop1 können beide mit DDX27 interagieren. A) Es wurde jeweils DDX27 und eine Komponente des PeBoW-Komplexes überexprimiert, während mit den anderen beiden Komponenten ein *knockdown* vollzogen wurde. DDX27 trägt ein Flag-tag, die PeBoW-Faktoren ein HA-tag. In der entsprechenden Flag-IP (Spur 2) konnte Pes1-HA bzw. Bop1-HA) co-präzipitiert werden, aber nicht WDR12-HA. DDX27-Flag konnte umgekehrt in der entsprechenden HA-IP (Spur 3) nur nach Überexpression von Bop1-HA co-präzipitiert werden. IP = Immunpräzipitation. Ein Volumenäquivalent von 20% wurde vom Input aufgetragen. Die Antikörper 3E10 und α -Cytohesin dienten als IgG-Isotypkontrolle. B,C) Kontrolle ob die exogene Expression der Faktoren bzw. die *knockdowns* funktioniert haben. Spur 1: keine induzierte Überexpression, siRNA gegen Luziferase (Kontrolle); Spur 2: Überexpression von DDX27-Flag und Pes1-HA, siRNA gegen Bop1 und WDR12; Spur 3: Überexpression von DDX27-Flag und Bop1-HA, siRNA gegen Pes1 und WDR12; Spur 4: Überexpression von DDX27-Flag und WDR12-HA, siRNA gegen Pes1 und Bop1. Aktin diente als Ladekontrolle. Exogenes Bop1-HA wird von dem Antikörper gegen Bop1 nicht erkannt. * = unspezifische Bande.

Abbildungen 16B und 16C zeigen, dass sowohl die Expression der untersuchten Faktoren, als auch der *knockdown* der anderen Faktoren in den jeweiligen Ansätzen gut funktioniert hat.

Der Flag-Antikörper war in der Lage Pes1-HA bzw. Bop1-HA zu co-präzipitieren (Abb. 16A, Spur 2 α -HA). Der HA-Antikörper konnte umgekehrt DDX27-Flag über das Protein Bop1-HA co-präzipitieren, nicht allerdings über das Protein Pes1-HA (Abb. 16A, Spur 3 α -Flag). Eine Co-Präzipitation von WDR12-HA über den Flag-Antikörper konnte genauso wenig festgestellt werden (Abb. 16A, Spur 2 α -HA) wie eine Co-Präzipitation von DDX27-Flag über den HA-Antikörper (Abb. 16A, Spur 3 α -Flag).

DDX27 scheint also sowohl über Pes1 als auch Bop1, aber nicht WDR12 mit dem PeBoW-Komplex zu interagieren.

3.1.2. Der C-Terminus von Bop1 als mögliche Interaktionsdomäne für DDX27

Nachdem im letzten Kapitel Pes1 und Bop1 als kritische Interaktionspartner von DDX27 innerhalb des PeBoW-Komplexes gefunden wurden, war die nächste Frage, über welche Domänen die zwei PeBoW-Faktoren interagieren. Der gleiche Ansatz wie in 3.1.1., also das Überexprimieren von DDX27-Flag und eines PeBoW-Proteins bei gleichzeitigem *knockdown* der anderen zwei, wurde gewählt, um diese Frage zu beantworten. Statt der Wildtyp-Sequenz wurde hier je eine Pes1/Bop1-Deletionsmutante benutzt. Es standen insgesamt vier Mutanten zur Verfügung: die Pes1-Mutanten M1, bei welcher die ersten 54 Aminosäuren des N- Terminus fehlen, und M5, bei welcher die 142 C-terminalen Aminosäuren fehlen, sowie die Bop1-Mutanten 1 Δ und N2. Bei Bop1 Δ fehlen die Aminosäuren 1-250, bei Bop1 N2 die Aminosäuren

324-732. (siehe dazu auch Einleitung Abb. 5C). Die Bop1-Mutanten basieren wie der in 3.1.1. verwendete Wildtyp auf der Mäuse-Sequenz. Alle PeBoW-Mutanten besaßen wie die Wildtypen ein HA-tag.

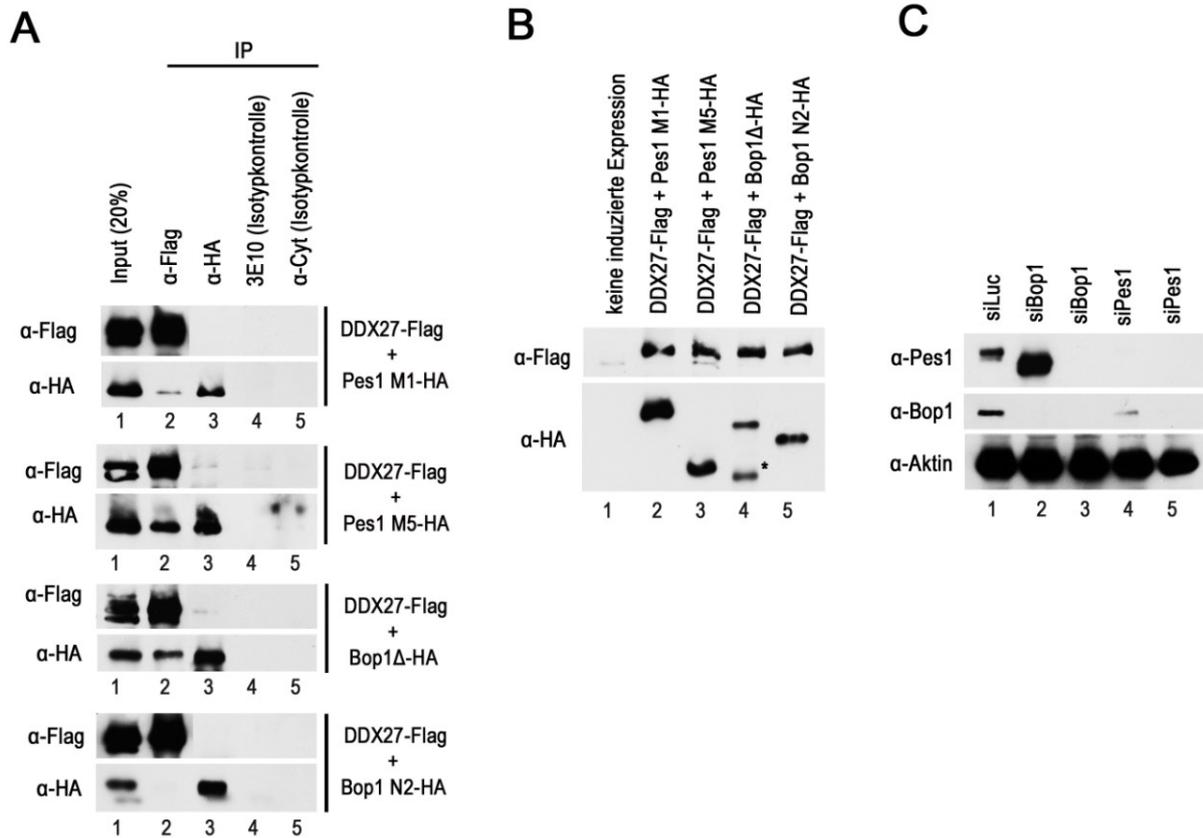


Abb. 17: Untersuchung von PeBoW-Deletionsmutanten auf Interaktionsfähigkeit mit DDX27. A) Es wurde jeweils DDX27 (wt) und eine Mutante von Pes1 oder Bop1 überexprimiert, während mit den anderen beiden endogenen PeBoW-Faktoren ein *knockdown* vollzogen wurde. DDX27 trägt ein Flag-tag, die PeBoW-Mutanten ein HA-tag. Nur bei der Bop1 Mutante N2 gibt es keine in der Immunpräzipitation (IP) nachweisbare Interaktion mit DDX27. Ein Volumenäquivalent von 20% wurde vom Input aufgetragen. Die Antikörper 3E10 und α-Cytohesin dienten als IgG-Isotypkontrollen. B,C) Kontrolle ob die exogene Expression bzw. die *knockdowns* funktioniert haben. Spur 1: keine induzierte Überexpression, siRNA gegen Luziferase (Kontrolle); Spur 2: Überexpression von DDX27-Flag und Pes1 M1, siRNA gegen Bop1 und WDR12; Spur 3: Überexpression von DDX27-Flag und Pes1 M5, siRNA gegen Bop1 und WDR12; Spur 4: Überexpression von DDX27-Flag und Bop1Δ, siRNA gegen Pes1 und WDR12; Spur 5: Überexpression von DDX27-Flag und Bop1 N2, siRNA gegen Pes1 und WDR12. Aktin diente als Ladekontrolle. Da die Mutanten von Pes1 bzw. Bop1 den jeweiligen Wildtyp aus dem PeBoW-Komplex verdrängen und somit destabilisieren können, erscheint in C Spur 3 kein Signal für Pes1 und in den Spuren 4 und 5 höchstens ein schwaches Signal für Bop1. Das Pes1-Signal in Spur 2 stammt von der Mutante M1. * = unspezifische Bande.

Sowohl Überexpression als auch die *knockdowns* haben, wie man in den Abbildungen 17B und 17C erkennen kann, auch hier funktioniert.

Der Flag-Antikörper co-präzipitierte deutliche Mengen der Mutanten Pes1 M5-HA und HA-Bop1 Δ (Abb. 17A, Spur 2 α -HA). In der HA-IP mit Zelllysaten dieser zwei Mutanten war andersherum nur eine sehr schwache Bande des DDX27-Flag Proteins detektierbar (Abb. 17A, Spur 3 α -Flag). Eine schwache Bande von Pes1 M1-HA ist in der Flag-IP (Abb. 17A, Spur 2 α -HA), aber keine Bande von DDX27-Flag in der HA-IP dieser Mutante zu erkennen (Abb. 17A, Spur 3 α -Flag). Die Mutante Bop1 N2 hingegen konnte weder DDX27-Flag co-präzipitieren (Abb. 17A, Spur 3 α -Flag), noch selbst vom Flag-Antikörper co-präzipitiert werden (Abb. 17A, Spur 29,30 α -HA).

Bop1 N2 ist also die einzige hier getestete Deletionsmutante, für die keine Interaktion mit DDX27 nachgewiesen wurde. Von den in dieser Versuchsreihe deletierten Domänen kann folglich nur der C- Terminus von Bop1 essentiell für die Interaktion zu DDX27 zu sein.

3.2. Die Identifikation der PeBoW-Interaktionsdomäne von DDX27

Die zweite bedeutende Frage in der Charakterisierung der Interaktion zwischen PeBoW und DDX27 war, welche Domäne in der Helikase für diese Interaktion wichtig ist.

3.2.1. Der N-Terminus von DDX27 interagiert mit dem PeBoW-Komplex

Ich habe zunächst die in Kapitel 2 beschriebenen Deletionsmutanten DM1-4 (siehe Abb. 13B) auf ihre Interaktionsfähigkeit mit dem PeBoW-

Komplex überprüft. Die Deletionen dieser Mutanten überspannen die gesamte Sequenz von DDX27. Die mutierten Helikasen wurden über einen pRTS-Vektor in U2OS-Zellen exprimiert und die Lysate anschließend mittels Co-Immunpräzipitationsansätzen analysiert.

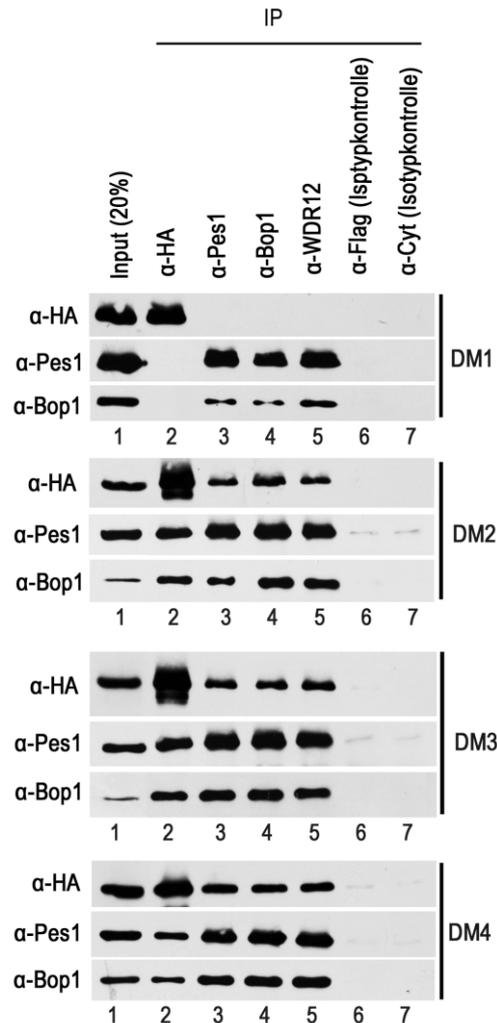


Abb. 18: Der N-Terminus von DDX27 wird für die Interaktion mit PeBoW benötigt. Die Mutanten DM1-4 wurden mittels Immunpräzipitation (IP) auf ihre Interaktionsfähigkeit mit PeBoW untersucht. Die Mutanten DM2, DM3 und DM4 können den PeBoW-Komplex noch co-präzipitieren und umgekehrt. Die N-terminale Mutante DM1 ist dazu nicht in der Lage. Ein Volumenäquivalent von 20% wurde vom Input aufgetragen. Die Antikörper α-Flag und α-Cytohesin dienen als IgG-Isotypkontrolle.

Alle DDX27-Deletionsmutanten werden durch den HA-Antikörper präzipitiert (Abb. 18, Spur 2). Die PeBoW-Komponenten (im Versuch durch Pes1 und Bop1 repräsentiert) werden ebenfalls durch alle PeBoW-Antikörper (co-)präzipitiert (Abb. 18, Spur 3-5). Bei den Mutanten DM2-4 erfolgte eine Co-Präzipitation von DDX27-HA durch die PeBoW-IPs (Abb. 18, Spur 3-5 α -HA) und umgekehrt (Abb. 18, Spur 2 α -Pes1 und α -Bop1). Keine Co-Präzipitation in beiden IP-Richtungen erfolgte jedoch bei der N-terminalen Mutante DM1 (Abb. 18, Spur 2 α -HA, Spur 3-5 α -Pes1 und α -Bop1).

Der N- Terminus von DDX27 ist somit für die Co-Präzipitation von DDX27 durch PeBoW bzw. umgekehrt, und der einhergehenden Interaktion beider Faktoren notwendig.

Ich habe, um die bisherigen Erkenntnisse weiter zu bestätigen, die DDX27 Mutante DM5 kreiert und mittels IP auf ihre Interaktionsfähigkeit mit PeBoW getestet. Sie besteht in ihrer Sequenz nur aus dem N-Terminus (siehe Abb. 13B).

Auch DM5 wurde durch alle gegen PeBoW gerichteten Antikörper co-präzipitiert (Abb. 19, Spur 3-5 α -HA). Der PeBoW-Komplex wird auch umgekehrt von DM5 co-präzipitiert (Abb. 19, Spur 2 α -Flag). Der N-Terminus von DDX27 ist daher für die Interaktion nicht nur essentiell, sondern verfügt selber über (mindestens) eine PeBoW-Bindestelle.

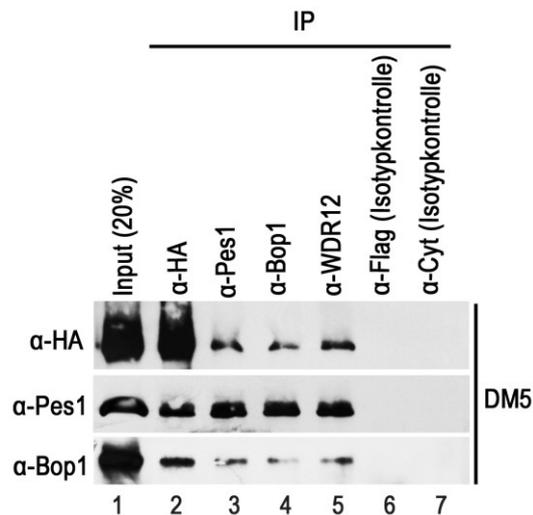


Abb. 19: Der N-Terminus von DDX27 interagiert mit PeBoW. Die DDX27 Mutante DM5 kann den PeBoW-Komplex co-präzipitieren und umgekehrt. Ein Volumenäquivalent von 20% wurde vom Input aufgetragen. Die Antikörper α -Flag und α -Cytohesin dienen als IgG-Isotypkontrolle. IP = immunpräzipitation.

3.2.2. Ein konserviertes FxF Motiv ist essentiell für die Interaktion

Ich habe in vorigem Kapitel festgestellt, dass der N-terminale Bereich von DDX27 mit dem PeBoW-Komplex interagiert. Die nächste Aufgabe bestand darin die Interaktionsdomäne von DDX27 im N-Terminus weiter einzugrenzen. Dafür habe ich Deletionsmutanten von DDX27 generiert, in denen jeweils ein nur Teilbereich des N-Terminus fehlt (DM6-9, Abb. 13B). Alle Deletionen dieser Mutanten decken zusammen die gesamte N-terminale Sequenz ab.

Diese DDX27-Mutanten wurden in U2OS-Zellen exprimiert und in IPs auf ihre Interaktionsfähigkeit mit PeBoW überprüft. Die Mutanten DM6, DM7 und DM9 waren immer noch in der Lage die PeBoW-Komponenten zu co-präzipitieren (Abb. 20, Spur 2 α -Pes1 und α -Bop1) und umgekehrt (Abb. 20, Spur 3-5 α -HA). Die Mutante DM8 co-präzipitierte dagegen weder PeBoW (Abb. 20, Spur 2 α -Pes1 und α -Bop1), noch der PeBoW-Komplex die DDX27-Mutante (Abb. 20, Spur 17-19 α -HA). DM8 fehlen die Aminosäuren 85-218. Da DM9 aber die Aminosäuren 106-218

fehlen, jedoch noch mit PeBoW interagieren kann, sind nur die Positionen 85-105 für die Interaktion offensichtlich kritisch.

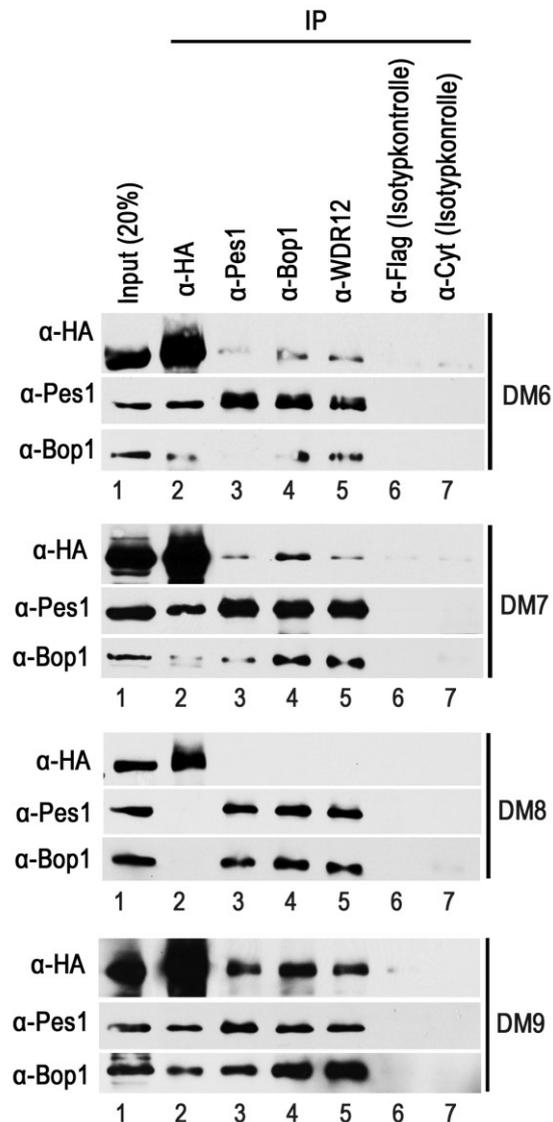


Abb. 20: Eingrenzung der PeBoW-Interaktionsdomäne im N-Terminus von DDX27. Die Mutanten DM6, DM7, DM8 und DM9 mit kleineren Deletionen innerhalb des N-Terminus wurden mittels Immunpräzipitation (IP) auf ihre Interaktionsfähigkeit mit PeBoW getestet. Alle Mutanten bis auf DM8 können den PeBoW-Komplex co-präzipitieren und umgekehrt. Ein Volumenäquivalent von 20% wurde vom Input aufgetragen. Die Antikörper α -Flag und α -Cytohesin dienten als IgG-Isotypkontrolle.

Wenn man diesen kritischen N-terminalen Abschnitt mit den Sequenzen von Homologen in anderen Eukaryoten vergleicht, lässt sich erkennen, dass die Sequenz evolutionär kaum konserviert ist (Abb. 21A). Ein Motiv aus zwei hochkonservierten Phenylalaninen und einer relativ variablen Aminosäure dazwischen befindet sich jedoch genau in diesem Bereich. Dieses FxF-Motiv nimmt beim humanen DDX27 die Positionen 86-88 ein. FxF-Sequenzen wurden bereits als Motive beschrieben, die in Zielfaktoren der MAP-Kinasen-Signalkette vorkommen und wichtig für die Interaktion ebendieser Faktoren mit den MAP-Kinasen sind.

Das Motiv wurde von mir deletiert, um zu testen, ob es für die Interaktion zwischen DDX27 und PeBoW ausschlaggebend ist. Die entsprechende Mutante DM10 co-präzipitierte in der Tat weder den PeBoW-Komplex (Abb. 21B, Spur 2 α -Pes1 und α -Bop1), noch wurde DM10 durch den Komplex co-präzipitiert (Abb. 21B, Spur 3-5 α -HA).

Um die Interaktionsstelle genauer zu untersuchen, sollte als nächstes überprüft werden, ob das Motiv alleine für die Interaktion oder auch Teile seiner unmittelbaren Nachbarschaft benötigt werden. Eine Reihe von Alanin-Kassetten-Mutanten wurde dafür erschaffen. Jeweils vier Aminosäuren der umliegenden Sequenz des FxF-Motivs wurden durch vier Alanine ausgetauscht (Abb. 22A). Alle Mutanten besitzen ein HA-tag.

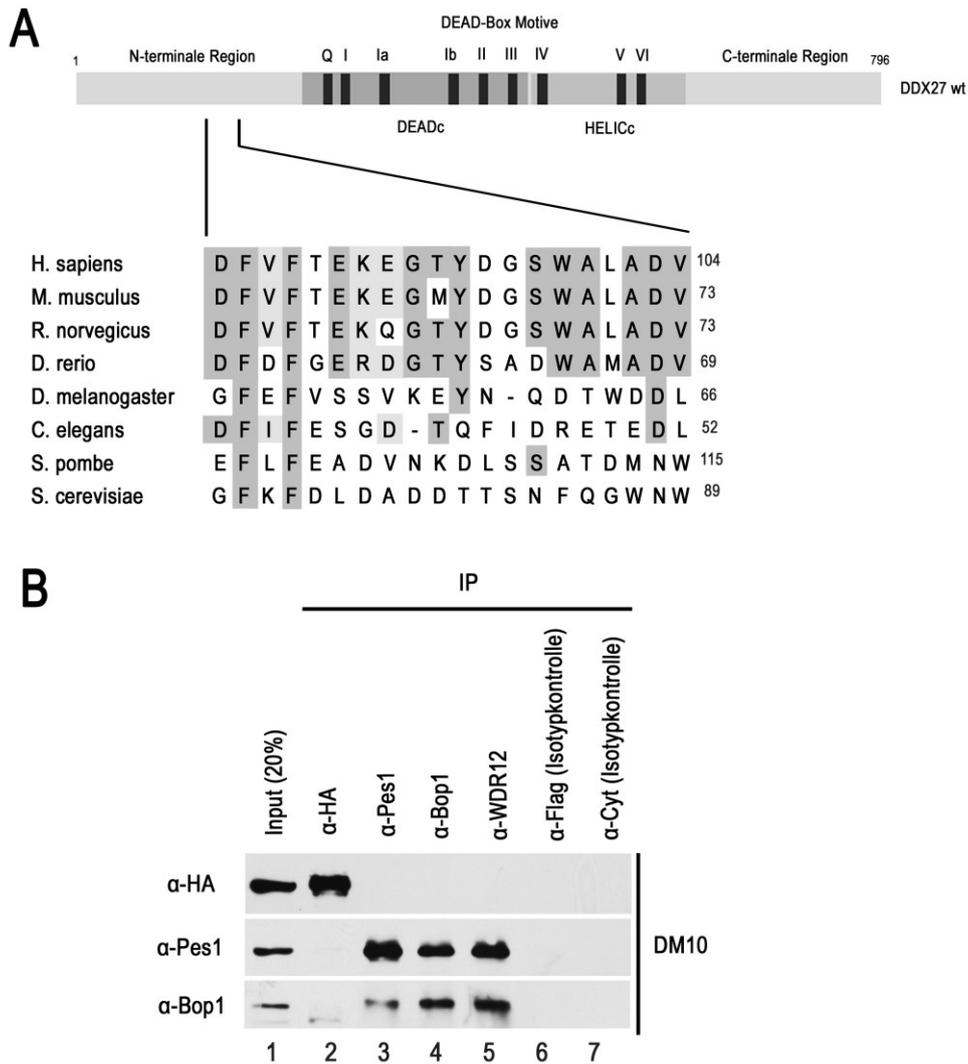


Abb. 21: Ein FxF-Motiv im N-Terminus von DDX27 ist essentiell für die Interaktion mit PeBoW.
 A) Evolutionärer Vergleich des Sequenzabschnittes von DDX27, der für die Interaktion von Bedeutung ist. Zwei Phenylalanine bilden in diesem Bereich ein Motiv, das von der Hefe bis zum Menschen konserviert ist. Dunkelgrau unterlegte Aminosäuren = identisch, hellgrau unterlegte Aminosäuren = ähnlich B) die Mutante DM10, welcher die konservierten Aminosäuren FVF fehlen, kann den PeBoW-Komplex nicht co-präzipitieren bzw. umgekehrt. IP = Immunpräzipitation.

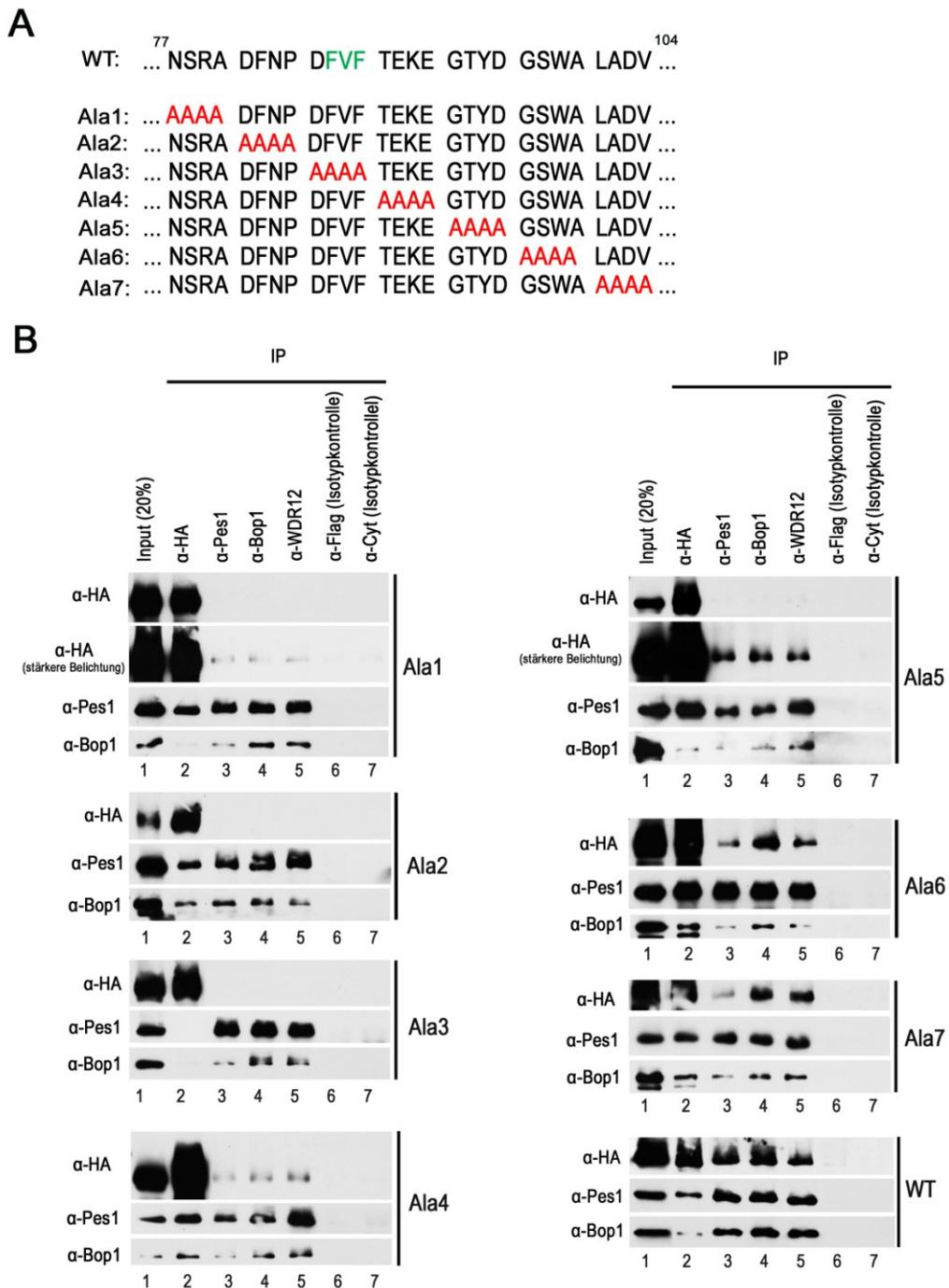


Abb. 22: Alanin-Substitutionsmutanten zur Bestimmung der Wichtigkeit der Nachbarschaft des FxF-Motivs. A) Je vier Aminosäuren in der Nachbarschaft des FxF-Motivs wurden bei den DDX27-Mutanten Ala1-7 durch Alanine ausgetauscht. Alle Mutanten besitzen ein HA-tag. B) Nur die Mutante Ala3, bei welcher das FxF-Motiv ausgetauscht wurde, verliert die Fähigkeit zur co-Präzipitation des PeBoW-Komplexes vollständig. Die übrigen Ala-Mutanten werden in deutlich geringerem Maße durch die PeBoW-Antikörper co-präzipitiert als der Wildtyp (WT) von DDX27. Ein Volumenäquivalent von 20% wurde vom Input aufgetragen. Die Antikörper α -Flag und α -Cytohesin dienten als IgG-Isotypkontrolle. IP = Immunpräzipitation.

Nur die Mutante Ala3, also jene bei der das FxF-Motiv fehlte, war nicht mehr in der Lage sowohl den PeBoW-Komplex zu co-präzipitieren (Abb. 22B, Spur 2 α -Pes1 und α -Bop1) als auch vom PeBoW-Komplex co-präzipitiert zu werden (Abb. 22B, Spur 3-5 α -HA). Die anderen Mutanten waren immer noch fähig Pes1 und Bop1 zu co-präzipitieren. Diese Mutanten konnten außer Ala2 auch selber von den PeBoW-Antikörpern co-präzipitiert werden. Dies geschah jedoch in deutlich geringeren Mengen als beim DDX27-WT.

Das FxF-Motiv scheint also hauptsächlich allein für die Interaktion von DDX27 mit dem PeBoW-Komplex essentiell zu sein.

4. Der Einfluss von DDX27-Domänen auf die zelluläre Lokalisation

DDX27 lokalisiert im Nukleolus (siehe Abb. 7). Im Folgenden sollte nun erforscht werden, welche Domänen von DDX27 eine Rolle für diese Lokalisation spielen.

4.1. Die nukleoläre Lokalisation von DDX27 hängt vom C-Terminus aber nicht von der Interaktion mit PeBoW ab

Die DDX27-Deletionsmutanten DM1-4 (siehe Abb. 13B) wurden in U2OS-Zellen exprimiert und anschließend die zelluläre Lokalisation der Mutanten mittels indirekter Immunfluoreszenzfärbung ermittelt (Abb. 23). Die Mutante DM1 wies wie der Wildtyp von DDX27 eine reine nukleoläre Lokalisation auf. Auch die Mutanten DM2 und DM3 lokalisierten im Nukleolus. Es wurden bei diesen zwei Mutanten aber durch den HA-Antikörper neben den Nukleoli auch noch eine Vielzahl an nukleoplasmatischen *Spots* angefärbt. Diese *Spots* traten vor allem bei DM3 vermehrt auf.

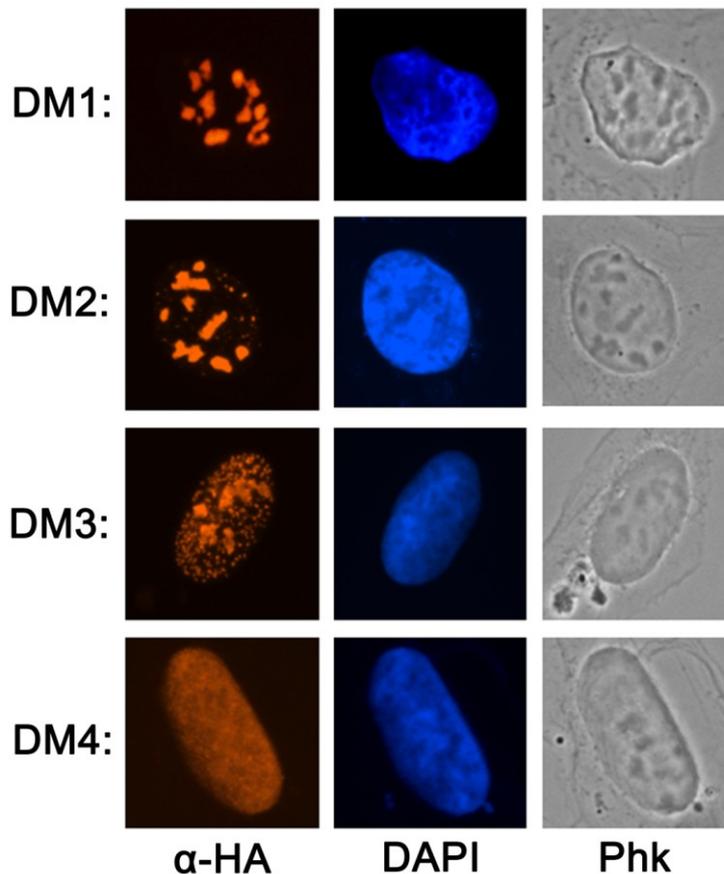


Abb. 23: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von DDX27 Deletionsmutanten. Die Mutanten DM1, DM2, DM3 und DM4 wurden in U2OS Zellen exprimiert und über HA-Antikörper indirekt angefärbt. Die C-terminale Mutante DM4 zeigt eine nukleoplasmatische Verteilung. Die Mutanten DM2 und DM3 befinden sich zum größten Teil noch im Nukleolus, weisen aber auch eine Vielzahl an nukleoplasmatischen *Spots* auf. Die N-terminale Mutante DM1 lokalisiert trotz des Verlustes der PeBoW-Interaktionsdomäne immer noch nukleolär. Phk = Phasenkontrastlichtmikroskopie

Die Mutante DM4 war nicht im Nukleolus lokalisiert, sondern verteilt im gesamten Nukleoplasma der Zelle. Der bei dieser Mutante fehlende C-terminale Bereich muss folglich für die Lokalisation der Helikase im Nukleolus wichtig sein. Der Verlust des N- Terminus (DM1), und damit die Interaktion mit PeBoW, scheint dagegen für die Lokalisation keine wichtige Rolle zu spielen.

Um die Rolle der beiden Sequenzabschnitte genauer zu beleuchten, habe ich geprüft wie sehr die N- bzw. C-terminale Domäne für sich allein in der Lage sind in den Nukleolus zu lokalisieren. Die Mutanten DM5 (nur

N- Terminus) und DM11 (nur C- Terminus) wurden dazu in U2OS-Zellen exprimiert (Abb. 24). Der C-Terminus konnte auch ohne andere Domänen im Nukleolus lokalisieren. Der N-Terminus hingegen wies keine Konzentration im Nukleolus auf, sondern war gleichmäßige im Nukleus verteilt. Die Bindung an PeBoW scheint daher weder ausreichend noch maßgeblich für die Lokalisation von DDX27 im Nukleolus zu sein.

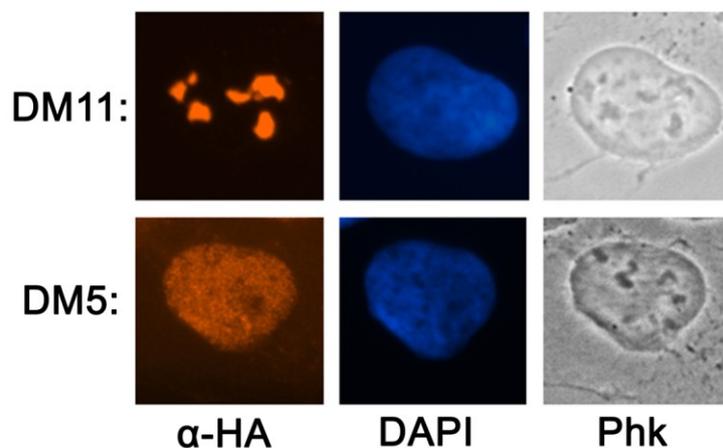


Abb. 24: Immunfluoreszenz-Aufnahmen von DDX27 Deletionsmutanten DM11 und DM5. Die Deletionsmutante DM11 besteht nur aus dem C-Terminus von DDX27 und lokalisiert im Nukleolus. DM5 besteht nur aus dem N-Terminus von DDX27 und lokalisiert nicht im Nukleolus. Phk = Phasenkontrastlichtmikroskopie

4.2. Mehrere Domänen im C-Terminus tragen zur Lokalisation von DDX27 im Nukleolus bei

Ich habe als nächstes versucht zu bestimmen, welche Domäne innerhalb des C-Terminus von DDX27 für die nukleoläre Lokalisation benötigt wird. Ich generierte die Deletionsmutanten DM12-14 (siehe Abb. 13B), um die vermeintliche Lokalisationsdomäne einzugrenzen. Die mutierten Proteine besitzen jeweils kleinere Deletionen innerhalb des C-Terminus. Diese

Deletionen decken zusammengenommen die gesamte Sequenz des C-Terminus ab.

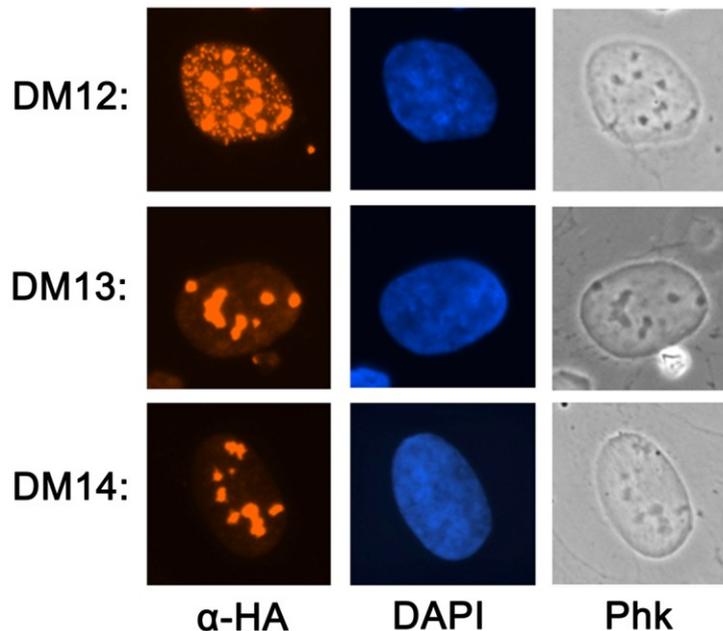


Abb. 25: Mehrere Domänen im C-Terminus lokalisieren DDX27 unabhängig im Nukleolus. Die Mutanten DM12, DM13 und DM14, welche jeweils kleinere Deletionen innerhalb des C-Terminus von DDX27 tragen, lokalisieren immer noch im Nukleolus. Phk = Phasenkontrastlichtmikroskopie

Keine der drei mutierten Faktoren verteilte sich im Nukleoplasma so gleichmäßig, wie das bei DM4, also der Deletion des gesamten C-Terminus, der Fall gewesen ist (Abb. 25). Nur DM12 delokalisierte ähnlich wie DM2 oder DM3 in nukleoplasmatischen *Spots*. Die Lokalisationsdomäne kann somit keinem einzelnen Sequenzbereich im C-Terminus zugeordnet werden. Es existieren also mehrere unabhängige Domänen im DDX27-C-Terminus, die zur nukleolären Lokalisation beitragen können.

4.3. Die nukleoläre Lokalisation von DDX27 ist RNA-abhängig

Es stellte sich Frage, auf welche Weise DDX27 im Nukleolus gehalten wird. Der Nukleolus ist die Produktionsstätte von hohen Mengen an rRNA. Es besteht daher eine plausible Möglichkeit, dass die Lokalisation von DDX27 über die Bindung von RNA etabliert wird. Um dies zu testen, wurden U2OS-Zellen, die exogenes DDX27 exprimierten, vor der Anfärbung durch Immunfluoreszenz-Antikörper mit einer hohen Konzentration (100 µg/ml) RNase A behandelt.

Die RNase-Behandlung bewirkte keine Änderung in der zellulären Verteilung von DDX27 (Abb. 26). Dieser Faktor wird also scheinbar auch nach Verdau der RNA im Nukleolus gehalten.

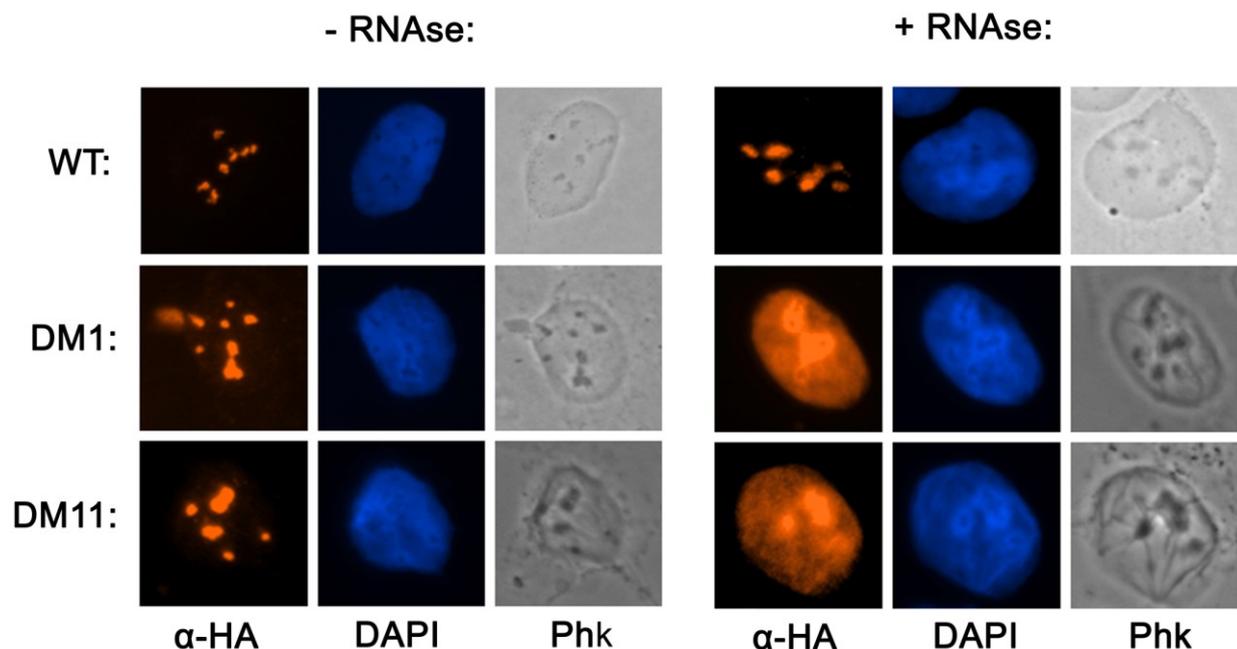


Abb. 26: Die Lokalisation von DDX27 wird unter anderem durch die Bindung an RNA bedingt. U2OS Zellen wurden mit RNase A behandelt und anschließend DDX27 bzw. die DDX27-Mutanten mit HA-Antikörpern indirekt angefärbt. Der DDX27-Wildtyp delokalisiert nach RNase-Behandlung nicht aus dem Nukleolus. Bei den Mutanten DM1 und DM11, bei denen der N-Terminus deletiert und somit die Interaktion zum PeBoW-Komplex aufgehoben wurde, zeigt sich eine Delokalisierung in das Nukleoplasma. Phk = Phasenkontrastlichtmikroskopie

Auch Deletionsmutanten von DDX27 wurden nach RNase-Verdau auf eine Veränderung der Lokalisation überprüft, um die Analyse zu

erweitern (Abb. 20). Die mutierten Proteine DM1 und DM11 delokalisierten durch die Behandlung ins Nukleoplasma. Beide DDX27-Mutanten besitzen keinen N-Terminus mehr. DDX27 bindet demnach tatsächlich RNA, wird aber wohl in der Wildtyp-Form durch seinen N-Terminus im Nukleolus zurückgehalten.

4.4. Deletionen im zentralen Bereich von DDX27 führen zur Delokalisation von PeBoW und anderen nukleolären Faktoren in nukleoplasmatische *Spots*

In Kapitel 4.1. wurde beschrieben, dass die Mutanten DM2 und besonders DM3, bei welchen Deletionen im zentralen konservierten Bereich vorkommen, zum Teil in nukleoplasmatischen *Spots* delokalisieren (Abb. 23). Ich habe bei den genannten Mutanten auch die Lokalisation der PeBoW-Proteine überprüft. Die Zellen, welche DM3 exprimieren wurden mit Antikörpern gegen Pes1, Bop1 bzw. WDR12 indirekt immunfluoreszent angefärbt.

Auch die drei PeBoW-Faktoren, und damit der gesamte PeBoW-Komplex, delokalisierten in nukleoplasmatischen *Spots* (Abb. 27).

Es war unklar was diese *Spots* darstellen. Die Deletionsmutante Ppan sigma70 des Ribosomenbiogenesefaktors Ppan delokalisiert ebenfalls in nukleoplasmatischen *Spots*. Ich habe daher versucht herauszufinden, ob es sich bei der Expression beider Mutanten, DDX27 DM3 und Ppan sigma70, um dieselben *Spots* handelt. Beide Mutanten wurden dazu simultan in U2OS-Zellen exprimiert und anschließend mit Antikörpern angefärbt. Beide Faktoren akkumulierten in den identischen *Spots* innerhalb des Nukleus (Abb. 28).

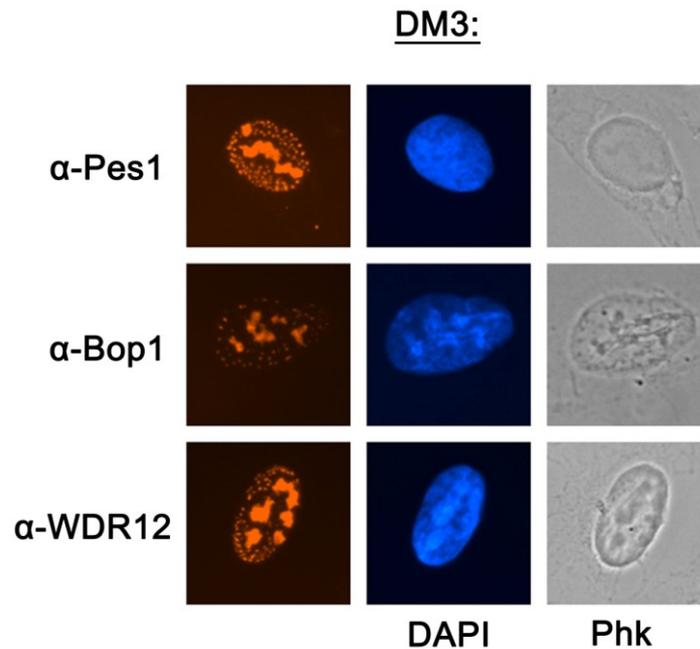


Abb. 27: Die Deletionsmutante DM3 delokalisiert den PeBoW-Komplex in nukleoplasmatischen **Spots**. Sowohl Pes1, Bop1 und WDR12 sind nach Expression der DDX27-Mutante DM3 ebenfalls in nukleoplasmatischen *Spots* zu finden. Phk = Phasenkontrastlichtmikroskopie

Pes1 (repräsentativ für PeBoW) und der nukleoläre Faktor NPM1 konnten ebenfalls in diesen Spots gefunden werden (Abb. 28). Diese Spots scheinen bezüglich Delokalisation für mehrere nukleoläre Proteine einen Sammelort darzustellen.

Die Delokalisation des PeBoW-Komplexes bei der Mutante DM3 könnte indirekt über die Interaktion mit DDX27 geschehen. Das mutierte DDX27 würde demnach primär delokalisiert werden, und den gebundenen PeBoW-Komplex aus dem Nukleolus sekundär mitziehen. Ich habe daher eine Deletionsmutante erstellt (DM15, siehe Abb. 13B), welcher neben der zentralen Deletion von DM3 auch der N-Terminus fehlt. Diese Mutante ist also nicht mehr fähig mit dem PeBoW-Komplex zu interagieren.

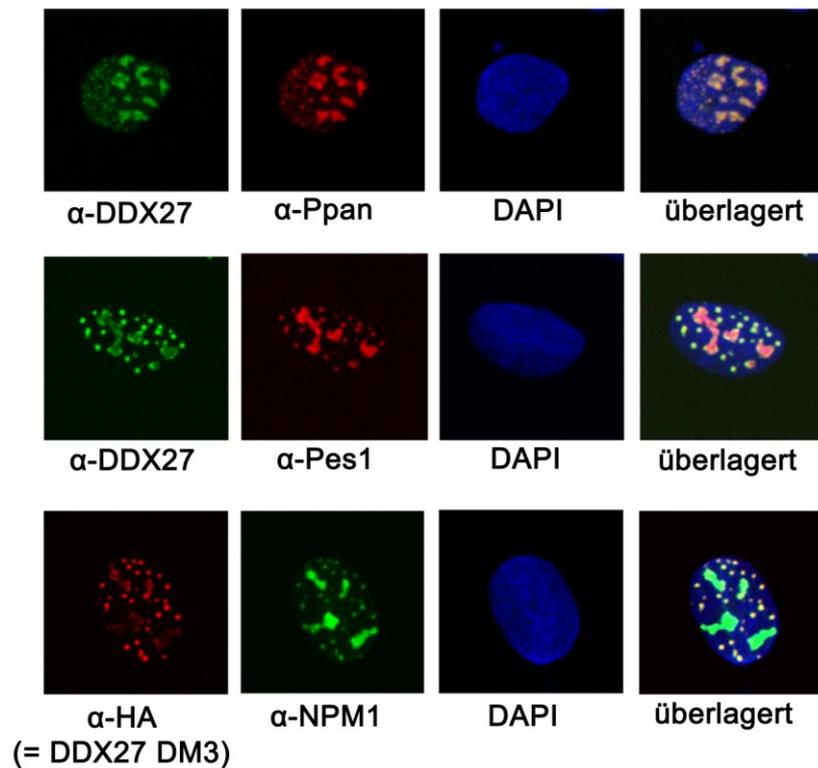


Abb. 28: DDX27 DM3 lokalisiert in den gleichen Spots wie die Ppan-Mutante sigma70. DDX27 DM3 und Ppan sigma70 wurden gleichzeitig in U2OS-Zellen exprimiert. Von der Ppan-Mutante ist aus früheren Arbeiten bekannt, dass sie ebenfalls in nukleoplasmatischen Spots delokalisiert. Dargestellt sind confokal-mikroskopische Aufnahmen, die zeigen, dass sowohl DDX27 DM3, als auch Ppan sigma70 in den gleichen Spots co-lokalisieren. Auch Pes1 und der nukleoläre Faktor NPM1 werden in diesen Spots gefunden

Auch DDX27 DM15 lokalisierte wie DM3 in nukleoplasmatischen Spots (Abb. 29). Der PeBoW-Komplex war hingegen lediglich in den Nukleoli detektierbar. Die Delokalisation von PeBoW scheint folglich von der Bindung an DDX27 abhängig zu sein.

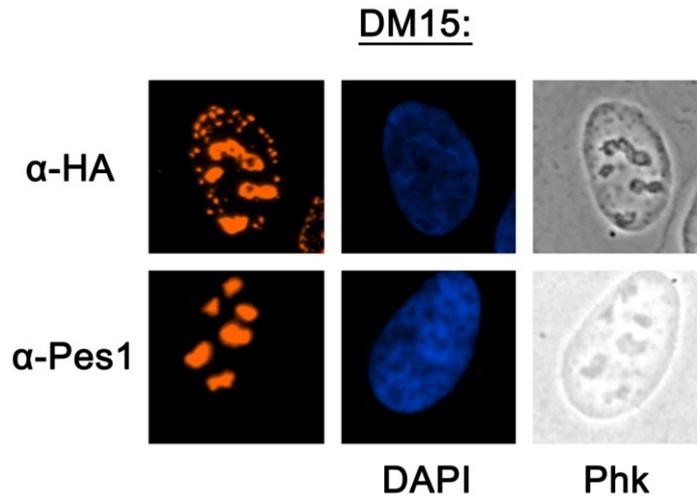


Abb. 29: Die Delokalisation von PeBoW ist von der Interaktion mit DDX27 abhängig. Im Gegensatz zu der Mutante DM3 wird bei der Mutante DM15, welcher zusätzlich der N-Terminus und damit die Interaktion zu PeBoW fehlt, der PeBoW-Komplex nicht in die nukleoplasmatischen *Spots* delokalisiert. Phk = Phasenkontrastlichtmikroskopie.

Diskussion

Ich habe die DEAD-Box RNA-Helikase DDX27 in meiner Diplomarbeit als Interaktionspartner des PeBoW-Komplexes verifiziert. Das Ziel meiner Doktorarbeit war es DDX27 in Bezug auf Funktion, Interaktion zu PeBoW und Lokalisation zu charakterisieren.

1. DDX27 als Ribosomenbiogenesefaktor im Zusammenhang mit PeBoW

Hunderte von unterschiedlichen Faktoren sind an der Ribosomenbiogenese beteiligt. Drei dieser Faktoren, Pes1, Bop1 und WDR12, bilden zusammen den PeBoW-Komplex und sind für Reifung der 5,8S und 28S rRNA der großen 60S ribosomalen Untereinheit wichtig. Es war naheliegend zu vermuten, dass DDX27 als PeBoW-Interaktionspartner mit dem Komplex in der Ribosomenbiogenese kooperieren könnte. Der PeBoW-Komplex selbst besitzt keine bekannten enzymatischen Domänen, jedoch eine recht hohe Zahl an Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Eine mögliche Schlussfolgerung daraus ist, dass PeBoW über Interaktion andere Faktoren an deren Wirkungsort in der Prozessierung und Reifung der rRNA leitet. DDX27 ist als RNA-Helikase für eine entsprechende Aufgabe prädestiniert. Der *knockdown* von DDX27 zeigte eine vergleichbare Verringerung in der Prozessierung zur 32S Prä-rRNA und 28S rRNA wie der *knockdown* von Pes1. DDX27 verfügt also wie PeBoW über eine wichtige Funktion in der Reifung der 60S rRNAs. Ob jedoch diese Funktion in Verbindung mit PeBoW ausgeübt wird, muss zunächst offen bleiben, selbst wenn das durch die Interaktion wahrscheinlich anmutet. Die Expression der

Deletionsmutante DM1, welche nicht mit DDX27 interagieren kann, erzeugt jedenfalls keinen Prozessierungsdefekt. Jedoch ist zu beachten, dass das endogene DDX27 bei DM1 Expression nicht simultan depletiert wurde, und es sehr gut möglich ist, dass das endogene DDX27 seine Aufgabe noch voll erfüllen kann. Die Mutante ist zudem unfähig mit PeBoW zu interagieren und wäre demnach eventuell gerade eben nicht in der Lage seinen endogenen Gegenpart vom Komplex zu verdrängen.

Größere Unterschiede offenbaren sich hingegen zwischen den *knockdowns* von DDX27 und Pes1 bei der Proliferationsrate der Zellen. Der Anstieg des Zell-Indexes erhöht sich nach *knockdown* von DDX27 signifikant geringer als die Kontrollzellen, aber nach *knockdown* von Pes1 ist die Proliferation und das Wachstum der Zellen geradezu blockiert. Die Proliferationsdefekte werden wahrscheinlich durch die Defekte in der Ribosomenbiogenese und rRNA-Prozessierung hervorgerufen. Der *knockdown* von DDX27 vermag aber die Menge des Faktors vielleicht nicht so stark zu reduzieren, dass das Fehlen einen starken nukleolären Stress bedeutet, wie das nach *knockdown* Pes1 der Fall ist. Pes1 könnte aber auch noch neben der Ribosomenbiogenese von anderer Bedeutung für die Zelle zu sein. Weitere Funktionen sind für Pes1 bzw. dessen Homologe bereits beschrieben worden. Das Hefehomolog Nop7 interagiert zum Beispiel mit Komponenten des ORC-Komplexes. Eine thermosensitive Mutante von Nop7 erzeugt diesbezüglich eine Inhibierung der S-Phase (Du und Stillman, 2002). Pes1 scheint auch an der Organisation und Modifikation der Chromatinstruktur beteiligt zu sein (Zhang et al., 2005b). Die Depletion von Nop7 als auch von Pes1 führt überdies zu aberranten Mitosen (Killian et al., 2004). Wie sehr Pes1 diese Funktionen im Kontext des trimeren PeBoW-Komplexes ausübt ist bislang jedoch unbekannt.

Aberrante Mitosen traten jedenfalls auf die gleiche Weise auch nach Bop1 *knockdown* auf (Killian et al., 2004).

Pes1 stabilisiert allerdings auch die Menge der anderen beiden PeBoW-Proteine (Rohrmoser et al., 2007). Weitere Funktionen von Bop1 und WDR12, zusätzlich zur rRNA-Prozessierung, könnten insofern durch einen Pes1 *knockdown* betroffen sein. Für WDR12 wurde bereits eine Assoziation mit Notch1-IC gefunden (Nal et al., 2002). Neueste Massenspektrometrie-Analysen unserer Gruppe legen den Schluss nahe, dass auch Bop1 eine Funktion abseits der Ribosomenbiogenese besitzt. Die Proteine Hip1r (*huntingtin interacting protein 1 related*) und ACAP1 (*ARFGAP with coiled-coil, ANK repeat and PH domain-containing protein 1*) wurden in IPs durch Bop1-Antikörper nicht aber durch Pes1-Antikörpern co-präzipitiert (siehe Anhang Tabelle 1). Hip1r ist beteiligt an der Abschnürung von Clathrin-ummantelten Vesikeln, indem es bei der Assoziation mit dem Zytoskelett hilft (Chen und Brodsky, 2005; Brady et al., 2010; Gottfried et al., 2010). ACAP1 ist ein GTPase-Aktivierungsprotein für ARF. ARF ist wiederum an dem Aufbau von Aktinfilamenten beteiligt und ebenfalls mit Clathrin-Vesikeln assoziiert (Li et al., 2007; Bai et al., 2012). Es ist gut vorstellbar, dass Bop1 mit diesen co-präzipitierten Faktoren einen Komplex eingeht und ebenfalls für Vesikeltransport und Zytoskelleorganisation benötigt wird. Da diese Funktionen aber anscheinend ohne die Interaktion mit Pes1 ausgetragen werden, stellt sich die Frage, wie sehr Bop1 im Kontext eines zweiten Komplexes stabilisiert wird. Das Cytoplasma, wo sich der Vesikeltransport abspielt, weist keine bedeutenden Mengen von Bop1 und Pes1 auf. Das legt den Schluss nahe, dass es sich um eine sehr geringe Fraktion der gesamten zellulären Menge an Bop1 handeln muss, die von der Stabilisierung durch Pes1 unabhängig ist. Es kann aber auch nicht völlig ausgeschlossen werden, dass Pes1 einen Gesamtpool von

Bop1 in der Zelle stabilisiert. Bop1 würde dementsprechend über unbekannte Mechanismen aus diesem Pool für den zweiten Komplex rekrutiert werden.

Der geringere Proliferationsdefekt nach *knockdown* von DDX27 könnte auch darin begründet sein, dass es einen weiteren Faktor gibt, der DDX27 zu ersetzen vermag. Eine Redundanz zwischen DEAD-Box Helikasen in der Ribosomenbiogenese konnte für DDX5 und DDX17 gezeigt werden (Jalal et al., 2007). Nur der Doppel-*knockdown* hatte einen Defekt in Proliferation und rRNA-Prozessierung zur Folge. Eine DEAD-Box Helikase mit ähnlich hoher Sequenzhomologie zu DDX27, wie zwischen DDX5 und DDX17, existiert in Säugerzellen allerdings nicht. Ebenfalls ist keine weitere DEAD-Box Helikase in den erwähnten Massenspektrometriedaten mit ähnlich hohem Score und dementsprechend wohl ähnlich hoher Affinität zu PeBoW vertreten (siehe Anhang Tabelle 1).

DDX27 könnte durch den PeBoW-Komplex an die ITS2 positioniert werden und diesen RNA-Abschnitt dann für die weitere Prozessierung der Prä-rRNA unzustrukturieren (Abb. 30). Es wäre auch möglich, dass DDX27 die RNA für die Weiterprozessierung durch PeBoW vorbereitet. Mögliche Endonukleasen, die dann in der Prä-rRNA schneiden könnten, sind für die Prozessierung der 32S und 28S in menschlichen Zellen leider unbekannt. Nukleophosmin (NPM1) zeigte *in vitro* Endonukleaseaktivität im Bereich der ITS2 (Savkur und Olson, 1998). NPM1 ist eines der Proteine, die in unseren Massenspektrometriedaten mit am stärksten in den IPs gegen PeBoW gefunden wurde (siehe Anhang: Tabelle 1). Die Endonukleaseaktivität von NPM1 konnte jedoch *in vivo* bisher nicht bestätigt werden.

DDX27 müsste eventuell nicht einmal katalytisch aktiv sein. Das Hefe-Homolog von DDX27 in *S. cerevisiae*, Drs1, ist, ähnlich wie sein humanes Ortholog, für die Reifung der 60S ribosomalen rRNAs essentiell. Die Depletion des gesamten Proteins Drs1 führt zu einer Inhibierung des Prozessierungsschritts von der 27SA₂ zur 27SA₃ Prä-rRNA (Ripmaster et al., 1992). Bei Mutanten, denen die enzymatische Aktivität fehlt, ist dagegen erst der Prozessierungsschritt von der 27SB zur 25S blockiert (Adams et al., 2002). Es wird vermutet, dass bereits die reine physische Anwesenheit von Drs1 in der Struktur des Prä-Ribosoms wichtig ist, um weitere Faktoren korrekt an das Prä-Ribosom zu rekrutieren, wo diese ihre jeweilige Funktion ausüben können. Mutanten von DDX27 mit Deletionen im katalytischen Bereich (DM2, DM3) erzeugten keinen dominant negativen Effekt auf rRNA-Prozessierung, waren aber wahrscheinlich nicht in der Lage das funktionelle endogene DDX27 stark genug zu verdrängen.

2. DDX27 als Faktor in der 3'-Prozessierung der 47S Prä-rRNA

Ich konnte zeigen, dass der *knockdown* von DDX27 zur Akkumulation einer 3'-verlängerten Form der 47S Prä-rRNA führt. Somit besitzt die Helikase eine Funktion in der 3'-Prozessierung dieser Prä-rRNA-Form. Der *Pes1 knockdown* erzeugt jedoch keine Akkumulation einer verlängerten 47S Prä-rRNA. Das legt den Schluss nahe, dass DDX27 an der 3'-Prozessierung der 47S Prä-rRNA unabhängig vom PeBoW-Komplex beteiligt ist (Abb. 30). Die Möglichkeit besteht natürlich, dass nach *knockdown* von *Pes1* die verbliebene Menge des PeBoW-Komplexes in der Zelle noch ausreicht, um eine korrekte Prozessierung des 3'-Endes zu gewährleisten. Ebenso kann durch einen starken

nukleolären Stress nach *Pes1 knockdown* ein tatsächlicher Prozessierungsdefekt durch vermehrten induzierten Zelltod verschleiert worden sein. Die Zellen mit den 3'-verlängerten 47S Prä-rRNAs wären in diesem Fall schon tot bevor ihre RNA experimentell analysiert worden wäre. Die Fraktionierung von DDX27 im Sucrosegradient unterstützt eine PeBoW-unabhängige Rolle von DDX27. Die Transkription und Prozessierung des 3'-Endes der 47S Prä-rRNA findet in den 90S Prä-Ribosomen statt. DDX27 tritt (bezogen auf die Abundanz in den 60S Partikeln) deutlich stärker als *Pes1* bereits in den 90S Partikeln auf.

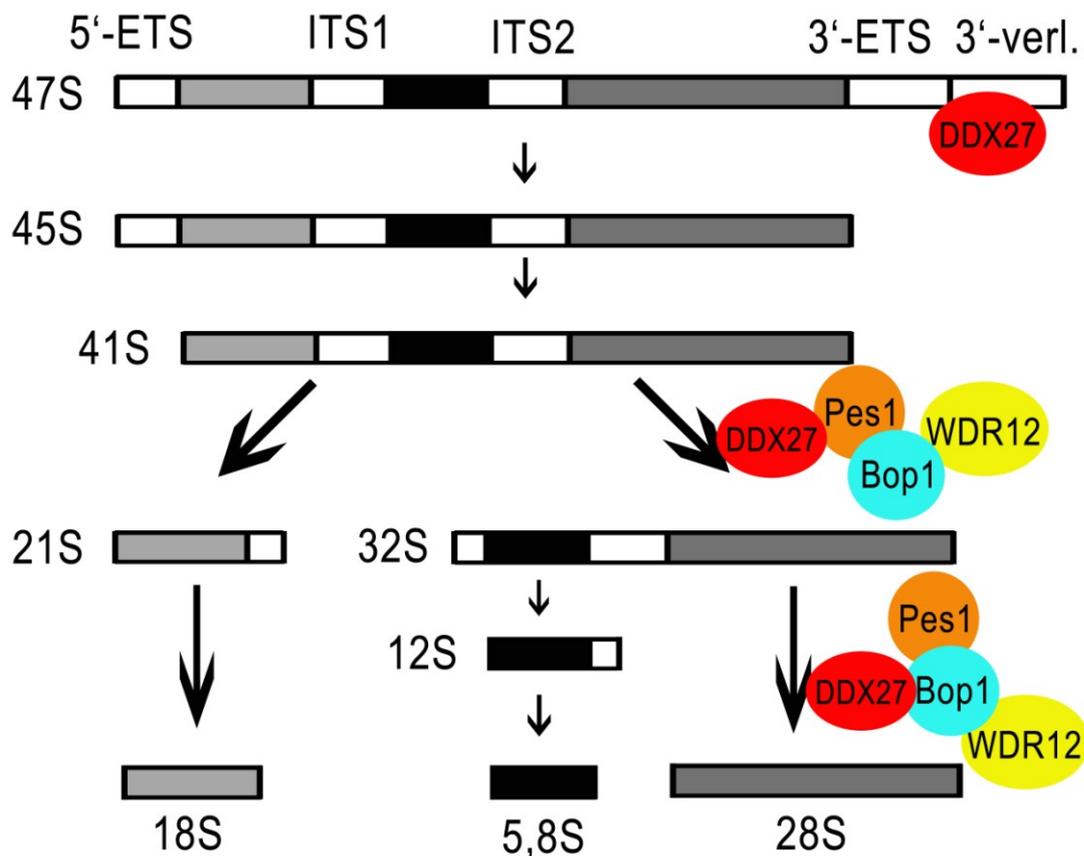


Abb. 30: Wirkungspunkte von DDX27 in der rRNA-Prozessierung. DDX27 ist ohne Mitwirkung von PeBoW an der 3'-Prozessierung des Primärtranskripts beteiligt. Wahrscheinlich in Zusammenarbeit mit PeBoW ist DDX27 an der weiteren Reifung der 32S und 28S (Prä-)rRNA beteiligt.

Es ist noch unklar, ob die verlängerte RNA durch eine fehlerhafte Transkriptions-Termination oder einen blockierten Abbau des 3'-Endes der 47S Prä-rRNA entsteht. In der Hefe wurde gezeigt, dass die Endonuklease Rnt1 das Primärtranskript am 3'-Ende schneidet, wodurch die freie 35S (= 47S) Prä-rRNA entsteht (Kawauchi et al., 2008; Braglia et al., 2011). Dadurch trennt sich die rRNA auch von der RNA-Polymerase I. DDX27 ist vielleicht daran beteiligt, die Struktur der 3'-rRNA-Sequenz so zu verändern, dass das Säugerhomolog von Rnt1 die RNA schneiden kann. Mein Kollege Kaspar Burger hat in seiner Arbeit einen *knockdown* mit der Kinase Cdk9 durchgeführt und ebenfalls eine Akkumulation von 3'-verlängerten 47S Prä-rRNAs detektiert. Das Auftreten dieser verlängerten RNA-Formen wurde dort in Verbindung mit der Reduzierung verschiedener snoRNAs gesehen. Besonderes Augenmerk fiel auf die U8 snoRNAs. Diese snoRNA ist wichtig für die Reifung der 28S und 5,8S rRNAs und ist dabei auch an der Prozessierung der 3'-ETS beteiligt (Peculis und Steitz, 1993; Peculis, 1997; Michot et al., 1999). Es wäre denkbar, dass DDX27 einen Co-Faktor der U8 bei der Assoziation mit der 47S Prä-rRNA darstellt. Das wurde aber im Rahmen meiner Arbeit nicht weiter untersucht. Kürzlich betriebene Forschung zeigte, dass die DEAD-Box Helikase DDX51 für die Ablösung der U8 snoRNA von der 47S Prä-rRNA benötigt wird (Srivastava et al., 2010). Ein *knockdown* von DDX51 inhibierte dadurch die Trennung der 3'-ETS von der 28S. Es wurde dabei aber nicht untersucht, ob der DDX51 *knockdown* auch zu einer Akkumulation von rRNA-Formen führt, die jenseits der 3'-ETS verlängert sind.

3. Die Interaktion zwischen DDX27 und den PeBoW-Faktoren

Ich habe in meiner Diplomarbeit eine Interaktion zwischen dem PeBoW-Komplex und DDX27 nachweisen können. DDX27 wurde in allen drei IPs gegen die drei PeBoW-Faktoren Pes1, Bop1 und WDR12 in gleicher Quantität co-präzipitiert. Die PeBoW-Proteine interagieren somit mit DDX27 in Form des trimeren Komplexes. Die Frage blieb aber noch offen über welche der drei PeBoW-Proteine die Interaktion etabliert wird. Ich habe in dieser Doktorarbeit einen Versuchsansatz gewählt bei dem DDX27 und je ein Faktor des PeBoW-Komplexes in Zellen überexprimiert wurden, während gleichzeitig die anderen beiden PeBoW-Faktoren über siRNA depletiert wurden. IPs offenbarten dann, ob DDX27 und der jeweilige Faktor noch zu interagieren vermögen. Diese Versuche erbrachten, dass sowohl Pes1 als auch Bop1, unabhängig von den jeweils anderen zwei PeBoW-Proteinen, mit DDX27 eine Interaktion aufbauen können.

Ein einzelnes Protein vermag durchaus mit verschiedenen Domänen mehrere Stellen bzw. Faktoren eines Komplexes zu binden. Es stellte sich allerdings nur ein einzelnes FxF-Motiv aus der Sequenz von DDX27 als für die Interaktion mit PeBoW essentiell heraus. Das Motiv müsste genau an der Position der PeBoW-Struktur ansetzen, wo Bop1 und Pes1 ihrerseits miteinander interagieren, wenn das FxF die einzige Interaktionsstelle auf Seite der Helikase ist (Abb. 30A). Die Bindung des FxF-Motivs müsste dabei derart gestaltet sein, dass sie noch stark genug für die Bindung an Pes1 oder Bop1 allein ist, sollte einer der beiden Faktoren fehlen. Die genauen physischen Kontaktstellen der Interaktion zwischen Pes1 und Bop1 wurden auf beiden Seiten nie mit Sicherheit festgestellt und nie auf wenige Aminosäuren eingengt. Die BRCT-Domäne als auch ein Bereich der NPLP-Domäne von Pes1 sind

aber für die Verbindung bedeutend (Lapik et al., 2004; Hölzel et al., 2006). Bei Bop1 wurde nicht explizit nach wichtigen Domänen für die Pes1-Interaktion gesucht. Die nukleoläre Lokalisation von Bop1 hängt jedoch von der Interaktion zu Pes1 ab (Rohrmoser et al., 2007). Eine Versuchsreihe mit mehreren Bop1 Deletionsmutanten zeigte des Weiteren die wichtige Bedeutung eines etwa 70 Aminosäuren großen Bereichs der Proteinsequenz von Bop1 (Positionen 251-323) für die nukleoläre Lokalisation von Bop1 auf (Strezoska et al., 2002). Es ist also denkbar, dass dieser Bereich für die Interaktion mit Pes1 und somit indirekt für die nukleoläre Lokalisation benötigt wird. Bop1-interaktionsunfähige Pes1-Mutanten haben bemerkenswerterweise Insertionen in einem Bereich der NPLP-Domäne mit hoher Konzentration von unpolar hydrophoben Aminosäuren (Positionen 198-204) (Lapik et al., 2004). Diese hydrophoben Reste würden sich theoretisch für die Interaktion mit dem ebenfalls hydrophoben Aminosäuren FVF von DDX27 eignen. Auch die vermeintliche Pes1-Interaktionsdomäne von Bop1 und die BRCT-Domäne besitzen hydrophobe Aminosäuren, aber nicht in überproportional erhöhter Menge. Ein Großteil der hydrophoben Aminosäuren der BRCT-Domäne ist gleichwohl stark konserviert (Hölzel et al., 2006).

Ich testete in dieser Arbeit auch mit welchen Deletionsmutanten von Pes1 und Bop1 der Faktor DDX27 interagieren kann, um so DDX27-Interaktionsdomänen des PeBoW-Komplexes zu finden. Die Deletionen, der Pes1-Mutanten M1, M5 und der Bop1 Δ lassen eine Interaktion zwischen PeBoW und DDX27 weiterhin zu. Alle diese Mutanten verfügen noch über die vermeintliche Pes1-Bop1-Interaktionsstelle. Die Bop1-Mutante N2, welche auch über die Sequenz der Pes1-Bop1 Interaktion verfügt, etabliert hingegen keine Interaktion mit DDX27, was gegen die

Hypothese spricht, dass DDX27 an der Interaktionsstelle von Pes1 und Bop1 bindet. WD-Wiederholungen, welche allgemein für die Etablierung von Protein-Protein-Interaktionen bekannt sind, machen im bei N2 deletierten Bereich einen großen Teil aus. Ob sich darin aber auch die DDX27 Interaktionsstelle befindet kann noch nicht abschließend gesagt werden. Es ist schließlich nicht ganz auszuschließen, dass der in diesem Fall deletierte C-Terminus von Bop1 nur indirekt für die Interaktion mit DDX27 benötigt wird. Die Expression der Mutante N2 inhibiert jedenfalls die Prozessierung der 32S Prä-rRNA zur 28S rRNA (Strezoska et al., 2002). Die fehlende Interaktion von Bop1 mit DDX27 könnte diese Beobachtung erklären, indem die Helikase durch den PeBoW-Komplex nicht an seinen Wirkungsort geführt würde. Der *knockdown* von DDX27 bewirkt jedoch auch einen Defekt in der Prozessierung hin zur 32S. Die Interaktion zu Pes1 könnte in diesem Fall von Bedeutung sein. Die Bindung zu Pes1 würde demnach für DDX27 genügen, um die Helikase so an die Prä-rRNA zu führen, dass die 32S erzeugt wird. Die Bindung zu Bop1 wäre aber für DDX27 wichtig, um für die Prozessierung der 32S Prä-rRNA zur 28S rRNA im Prä-Ribosom richtig positioniert zu werden. DDX27 könnte aber die Prozessierung zur 32S auch ohne Interaktion mit PeBoW durchführen. Widersprüchlich zur Hefe ist, dass der C-Terminus von Erb1 im Gegensatz zum Säuger scheinbar nicht essentiell ist (Tang et al., 2008). Die Interaktion zwischen dem Hefehomolog von PeBoW und Drs1 wird in der Hefe aber möglicherweise anders geregelt. Leider stand nur ein begrenztes Set an Deletionsmutanten von Pes1 und Bop1 für die Analyse in dieser Arbeit zur Verfügung. Der Test von weiteren Mutanten könnte die für die Interaktion bedeutenden Domänen weiter eingrenzen.

4. Das FxF-Motiv des N-Terminus von DDX27 als essentielle Domäne für die Interaktion mit dem PeBoW-Komplex

Dem N-Terminus von DDX27 konnte in dieser Arbeit eine essentielle Rolle für die Interaktion mit dem PeBoW-Komplex zugeordnet werden. Nur die Deletion der N-terminalen Domäne erzeugte einen Verlust der Interaktion von DDX27 mit PeBoW. Ein im N-Terminus gelegenes FxF-Motiv wurde im Weiteren als für die Interaktion essentieller Bereich eingegrenzt.

FxF-Sequenzen wurden als Motive beschrieben, die für die Interaktion bestimmter Proteine essentiell sind. Die Motive wurden zum größten Teil bei den Zielfaktoren der MAPK (*mitogen-activated protein kinase*) ERK2 (*extracellular-signal regulated kinase 2*), wie LIN-1, Ksr1, SAP-1, Elk1 und dem Kernporenkomplex-Protein Tpr, untersucht (Jacobs et al., 1999; Galanis et al., 2001; Fantz et al., 2001; Vomastek et al., 2008). Das FxF-Motiv wird daher auch DEF-Motiv genannt (*docking site for ERK2, FXF*). Es leitet die Bindung von ERK2 an den Zielfaktor ein, was dann im Folgenden zur Phosphorylierung einer Phosphoakzeptorstelle des ERK2-Interaktionspartners führt (Sheridan et al., 2008). Das FxF-Motiv wurde neben den ERK2 Zielfaktoren auch bei wenigen anderen Interaktionen gefunden, wie der Bindung zwischen Nbs1 und Tel1 (*S. pombe* Homolog der Kinase ATM) in der DNA-Reparatur (You et al., 2005). Bei Ribosomenbiogenese-Faktoren wurde das Motiv jedoch bislang nicht als Interaktionsdomäne beschrieben.

Es stellt sich die Frage, ob das FxF-Motiv auf DDX27 direkt mit PeBoW interagiert oder nur essentiell für die Struktur des DEAD-Box Proteins bei der Ausbildung der Interaktion zu PeBoW ist. Bisherige Erkenntnisse deuten eher auf erstere Möglichkeit hin, da ca. 10-15 Aminosäure lange Peptide, die das FxF-Motiv trugen, immer noch an ERK2 binden konnten (Jacobs et al., 1999; Galanis et al., 2001; Ngoei et al., 2011).

Der N-Terminus von DDX27 (DM5) ist zudem in der Lage für sich allein mit PeBoW zu interagieren. Man muss aber bedenken, dass DDX27 mit zwei PeBoW-Komponenten interagieren kann. Es wirkt unwahrscheinlich, dass nur ein FxF-Motiv mit zwei Faktoren gleichzeitig zu interagieren vermag. Die FxF-Motive auf den ERK2 Zielproteinen agieren oft auch in Zusammenarbeit mit anderen Bindemotiven. Die anderen Motive stabilisieren und stärken die Interaktion (Burkhard et al., 2011). Das FxF-Motiv in DDX27 ist dagegen als einziges Motiv essentiell für die Bindung zu PeBoW. Die Sequenz könnte in eine wie in Abschnitt 3 beschriebene gemeinsame Interaktionstelle von Pes1-Bop1 leichter binden, wenn es zusätzlich seine unmittelbare Nachbarschaft mit einbeziehen würde. Meine Experimente mit Alanin-Substitutionsmutanten kennzeichneten die Umgebung des DDX27 FxF-Motivs jedoch als nicht essentiell für die Interaktion zwischen Helikase und PeBoW. Auch bei den Untersuchungen mit ERK2-bindenden Peptiden inhibierte die Mutation der meisten das Motiv umgebenden Aminosäuren die Interaktion nicht (Ngoei et al., 2011). Bis auf die zwei Phenylalanine sind darüber hinaus keine weiteren Aminosäuren der Sequenznachbarschaft des DDX27 FxF-Motivs von der Hefe bis zum Menschen konserviert.

Es wurde postuliert, dass ERK2 für die Bindung des FxF-Motivs eine hydrophobe Tasche, die FRS (*F-site recruitment site*), ausbildet (Lee et al., 2004). Mehrere verstreute Aminosäuren spielen in dieser Tasche eine Rolle (auf ERK2: Y185, M197, L198, Y231, L232, L235, Y261). Die einzelnen Aminosäuren sind je nach Bindungspartner unterschiedlich wichtig (unbedeutend bis essentiell) und wären somit auf möglichen anderen FRS-tragenden Faktoren wohl nicht identisch (Burkhard et al., 2011). Es fällt daher schwer zu bestimmen, ob und mit welchen Sequenzabschnitten Pes1/Bop1 eine entsprechende Tasche ausprägen

würde. Die Möglichkeit besteht, dass Pes1 und Bop1 im Zusammenspiel eine Tasche bilden. Die Struktur müsste aber dann auch ohne den jeweils anderen Partner noch so weit ausgeformt werden, dass die Bindung zu DDX27 stabilisiert wird.

Die Existenz eines (oder eventuell auch mehrerer) Brückenfaktoren in der Interaktion zwischen PeBoW und DDX27 wäre eine weitere mögliche Erklärung, warum DDX27 (trotz nur einer einzelnen Interaktionsdomäne) mit zwei verschiedenen PeBoW-Bestandteilen interagieren kann (Abb. 31B). DDX27 würde demzufolge über sein FxF-Motiv mit diesem vermeintlichen Brückenfaktor interagieren. Der Brückenfaktor würde wiederum mit verschiedenen Domänen an Pes1 und Bop1 binden. Eine Vielzahl anderer (nukleolärer) Faktoren neben DDX27 wurden bei Co-IP-Versuchen mit PeBoW-Antikörpern in der massenspektrometrischen Analyse als co-präzipitierte Proteine gefunden (siehe Anhang: Tabelle 1). Eines dieser Proteine übernimmt vielleicht die Aufgabe eines Bindeglieds, obgleich DDX27 abgesehen von den drei PeBoW-Komponenten den höchsten Messwert in der MS erzielte. Die Organisation eines prä-ribosomalen Partikels gilt es schließlich auch als Netzwerk von zahlreichen assoziierten Faktoren zu verstehen (Harnpicharnchai et al.; 2001; Nissan et al., 2002; Saveanu et al., 2003; Lebreton et al., 2008).

Ein prominenter co-präzipitierter Faktor ist Nucleolin. Dieses beteiligt sich neben der Ribosomenbiogenese an einer Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Genregulation, Replikation oder der Stabilisierung von Kinetochor-Mikrotubuli Interaktionen (Tajrishi et al., 2011). Nucleolin komplexiert dabei für die jeweiligen Belange mit entsprechenden Co-Faktoren. Nucleolin erfüllt in der Ribosomenbiogenese zwar auch wichtige Aufgaben, jedoch betreffen diese Funktionen eher die

Transkription und die frühe Prozessierung des Primärtranskripts (Srivastava und Pollard, 1999). Überdies zeigte sich nach Depletion des Hefe-Homologs Nsr1 nur eine Verminderung der 40S, nicht aber der 60S Untereinheit (Lee et al., 1992).

Nukleophosmin (NPM1) ist ebenfalls ein multifunktionales Protein, das auch als Faktor der Reifung der 60S ribosomalen Untereinheit beschrieben wurde (Itahana et al., 2003). NPM1 wird zudem in den Lokalisationsexperimenten dieser Arbeit durch die Mutante DM3 delokalisiert, was für eine mögliche Interaktion mit DDX27 spräche. Zu NPM1 existiert jedoch kein Homolog in der Hefe. Das DDX27 Homolog Drs1 scheint dagegen auch in *S. cerevisiae* mit Hefe-PeBoW assoziiert zu sein (Harnpichnarchai et al., 2001; Adams et al., 2002; Collins et al., 2007; Merl et al., 2010). Die Interaktion in Hefe muss folglich anders etabliert werden, wenn NPM1 in Säugerzellen wirklich die Brücke zwischen DDX27 und PeBoW bildet. Tiefergehende Versuchsreihen zur Interaktion zwischen Hefe-PeBoW und Drs1 wurden kaum durchgeführt. Ein *yeast-two-hybrid assay* für Nop7 und Drs1 fiel indes negativ aus (Adams et al., 2002). Dies würde zusätzlich für eine indirekte Interaktion zwischen Pes1 und DDX27 sprechen.

Ein weiterer co-präzipitierter Faktor war Nop2, eine Methyltransferase, welche ebenfalls für die Reifung der 60S Untereinheit benötigt wird (Hong et al., 1997). Dieser Faktor wurde bislang jedoch nur in der Hefe charakterisiert. Depletionen von NPM1 und Nop2 erzeugen aber, anders als PeBoW und DDX27, nur einen Defekt im letzten Prozessierungsschritt zur 28S/25S rRNA. NPM1 und Nop2 können somit höchstens als Brückenfaktor dienen, falls die Assoziation zwischen PeBoW und DDX27 erst für die Prozessierung der 32S zur 28S (Prä-) rRNA benötigt würde.

Ein anderer interessanter Kandidat ist Nog1. Dieses GTP-bindende Protein ist ebenfalls wichtig für die Reifung der 60S Untereinheit (Jensen et al., 2003). Der Faktor arbeitet in Säugern mit DDX51 zusammen an der Prozessierung der 3'-ETS in einer wahrscheinlich PeBoW-unabhängigen Weise (Srivastava et al., 2010). Hefe-Nog1 wird aber von Nop7 stark co-präzipitiert und eine Überexpression von Nop7 kann Wachstumsdefekte von Nog1-Mutanten unterdrücken (Harnpicharnchai et al., 2001; Honma et al., 2006). Nog1 wurden zudem Protein-stabilisierende Eigenschaften zugesprochen (Lee et al., 2007).

Eine weitere denkbare Erklärung, warum nur ein einzelnes FxF-Motiv von DDX27 für die Interaktion mit zwei verschiedenen Faktoren zur Verfügung steht, könnte darin liegen, dass ein DDX27-Protein nicht gleichzeitig Pes1 und Bop1 bindet (Abb. 31C). DDX27 würde demnach an einem einzelnen PeBoW-Molekül entweder mit Pes1 oder Bop1 direkt interagieren. Der jeweils andere PeBoW-Faktor würde aber in IP-Experimenten durch indirekte Interaktion immer auch co-präzipitiert werden. Ob es gar zwei unterschiedliche Subklassen/-populationen in der DDX27-PeBoW-Interaktion gibt, die eventuell auch für verschiedene funktionale Aspekte verantwortlich sind, muss noch nachgewiesen werden.

Ein tieferer Einblick in die Zusammenhänge der Interaktion zwischen den einzelnen Faktoren könnte über die Reihenfolge der Assoziation ins Prä-Ribosomen erlangt werden. Solche Daten wurden bislang nicht für Säuger, doch vermehrt für die Hefe erhoben (Harnpicharnchai et al., 2001; Nissan et al., 2002; Saveanu et al., 2003; Dez et al., 2004; Dez und Tollervey, 2004; Miles et al., 2005; Tang et al., 2008; Lebreton et al., 2008). Es zeigte sich, dass Nop7, Erb1, Ytm1 und Drs1 weitestgehend zeitgleich in den gleichen Partikeln, von den frühen 90S Partikeln bis

mittelalten 60S Prä-Ribosomen, vorkommen. Das trifft auch für Faktoren wie Nog1 und Nop2 zu. Nop7 und Erb1 sind dabei zuerst für die gegenseitige Assoziation an das Prä-Ribosom wichtig, und anschließend für die Inkorporation von Ytm1 (Tang et al., 2008). Wie sehr Drs1 bei seiner Rekrutierung von anderen Faktoren abhängt bzw. andere Faktoren von Drs1 abhängen ist bislang noch nicht klar.

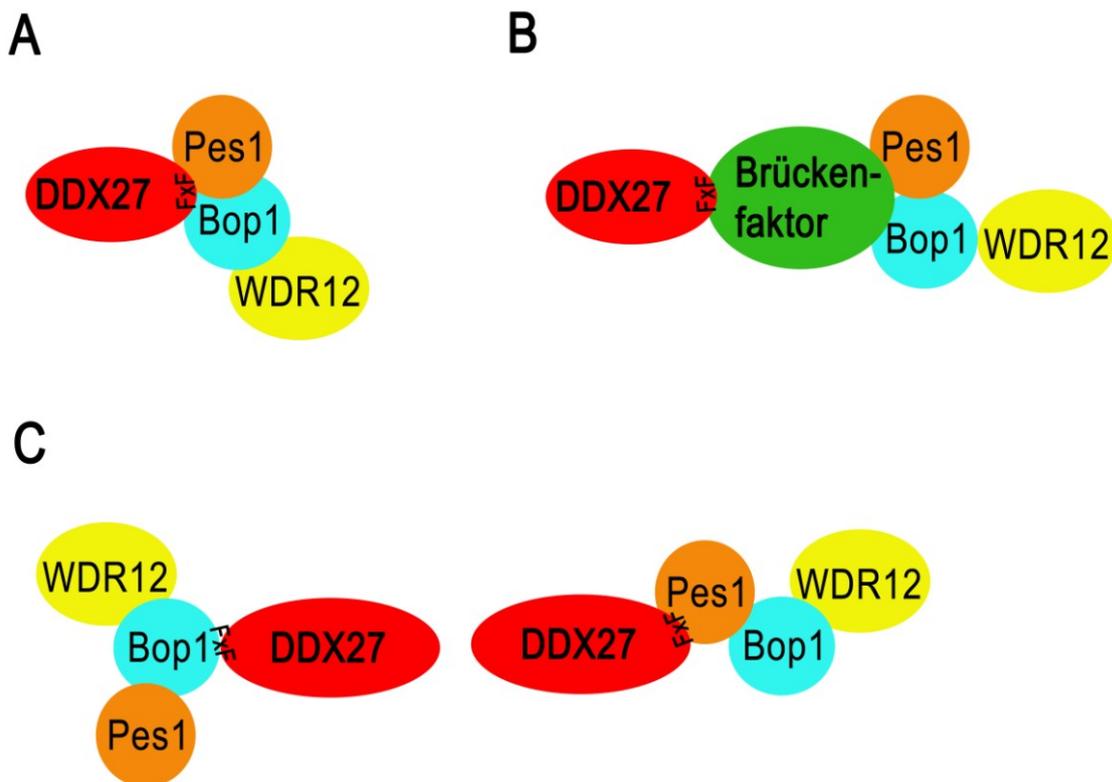


Abb. 31: Mögliche Interaktionsarten zwischen DDX27 und dem PeBoW-Komplex. A) Pes1 und Bop1 bilden zusammen eine hydrophobe Tasche. Das FxF-Motiv von DDX27 kann dann in dieser Tasche binden. DDX27 bindet somit gleichzeitig beide PeBoW-Komponenten. B) DDX27 bindet über sein FxF-Motiv einen noch unbekanntes Faktor. Der Faktor vermag selber Pes1 und Bop1 gleichzeitig zu binden und als Brücke zwischen PeBoW und DDX27 zu dienen. C) DDX27 bindet über sein FxF-Motiv entweder Pes1 oder Bop1 im Komplexverbund. Beide Möglichkeiten treten gleichzeitig in der Zelle auf.

5. Der C-Terminus von DDX27 als Lokalisationsdomäne

Die zelluläre Lokalisation des Faktors DDX27 war ein weiterer Aspekt, der in dieser Arbeit untersucht wurde. DDX27 lokalisiert als Wildtyp konzentriert im Nukleolus. Das geht konform mit der Beteiligung des Faktors an den Reifungsschritten der frühen und mittleren prä-ribosomalen Partikel.

Ich suchte insbesondere danach, welche Domänen von DDX27 für die nukleoläre Lokalisation benötigt werden. Die Mutante DM4 verteilt sich über das Nukleoplasma und akkumuliert nicht im Nukleolus. Der C-Terminus ist daher bedeutend für die nukleoläre Lokalisation von DDX27. Die C-terminale Domäne ist nicht nur für die nukleoläre Lokalisation wesentlich, sondern auch ausreichend, da sie für sich allein (DM11) auch schon in den Nukleolus lokalisiert. Dass DM4 nicht im Nukleolus lokalisiert macht klar, warum diese Mutante keinen dominant-negativen Effekt auf rRNA-Prozessierung haben kann. DM4 kann das endogene DDX27 an seinem Wirkungsort im Nukleolus nicht verdrängen.

Die genaue Position der Domäne für die nukleoläre Lokalisation wurde in darauf folgenden Experimenten über kleinere Deletionen innerhalb des C-Terminus gesucht. Die Lokalisationsdomäne konnte aber auf keine kleinere Region eingegrenzt werden. Es muss im C-Terminus also mehrere Stellen geben, die unabhängig voneinander die nukleoläre Lokalisation etablieren können. Experimente mit RNase-Verdau offenbarten in dieser Arbeit, dass die Lokalisation (zumindest zu einem großen Teil) durch RNA bedingt wird. Es befindet sich im gesamten C-terminalen Bereich von DDX27 eine erhöhte Anzahl an basischen Aminosäuren (Lysine, Arginine), welche mit hoher Affinität an die RNA binden könnten. RNA, mit welcher DDX27 assoziieren könnte, liegt im

Nukleolus natürlich in erhöhter Menge vor. Es kann aber auch eine RNA nicht ausgeschlossen werden, die ihrerseits durch unbestimmte Mechanismen in den Nukleolus importiert wird und DDX27 mit geleitet.

In der Mehrzahl der nukleolären Proteine wurden sogenannte nukleoläre Lokalisations-Signale (NoLS) gefunden (Emmot und Hiscox, 2009; Scott et al., 2010). Diese NoLS werden für die nukleoläre Lokalisation ihres Trägerproteins benötigt, verfügen jedoch nicht über eine bestimmte gemeinsame Sequenz und können auch in ihrer Länge stark variieren (6-30 Aminosäuren). Ein NoLS findet sich überdies meistens in strukturell leicht zugänglicher Lage am Anfang oder Ende einer Proteinsequenz, was am C-Terminus von DDX27 durchaus auch gegeben wäre. Alle NoLS-Arten haben trotz der vielen unterschiedlichen Sequenzzusammensetzungen gemeinsam, dass sie zum großen Teil aus basischen Aminosäuren bestehen. In vielen nukleolären Proteinen kommt nur ein NoLS vor. Es gibt aber auch Beispiele, wie bei SARS-CoV N oder Parafibromin, bei denen ein Faktor mehrere Exemplare besitzt (Hahn und Marsh, 2007; You et al., 2007). Auch DDX27 muss über mehrere NoLS verfügen.

Bei DDX27 befinden sich zudem mehrere basische Aminosäuren im N-Terminus. Zumindest einige davon müssen zwar nicht für die nukleoläre Lokalisation, aber als nukleäres Lokalisations-Signal (NLS) fungieren, da alle getesteten Mutanten zumindest im Zellkern zu finden waren. Auch einige Sequenzen im C-Terminus müssen demzufolge NLSs sein.

Der Verdau der RNA (durch RNase) führt nur zu einer Delokalisation von DDX27, wenn der Helikase der N-Terminus fehlt. Eine Verbindung zur Interaktion mit PeBoW drängt sich auf. Die N-terminale Deletionsmutante DM1 weist (ohne RNase) keinen Verlust ihrer nukleolären Lokalisation auf. Die nukleoläre Lokalisation hängt somit nicht primär von der Interaktion zu PeBoW ab. Der N-Terminus allein (DM5) wird überdies

nicht in den Nukleolus lokalisiert. Die Bindung von DDX27 zu PeBoW allein reicht daher für die nukleoläre Lokalisation auch nicht aus. Diese Befunde unterstützen die Annahme, dass DDX27 auch ohne PeBoW in der 3'-Prozessierung der rRNA involviert ist.

Das folgende Modell lässt sich nun ableiten (Abb. 32): DDX27 wird über seinen C-Terminus an die RNA des Nukleolus verankert und in dieses Kompartiment somit primär lokalisiert. (Das geschieht bei DM4 also erst gar nicht). DDX27 bindet dann mit seinem N-Terminus im Nukleolus an den PeBoW-Komplex. Diese Bindung reicht aber aus, um DDX27 auch nach Verlust der Bindung zur RNA im Nukleolus zu halten.

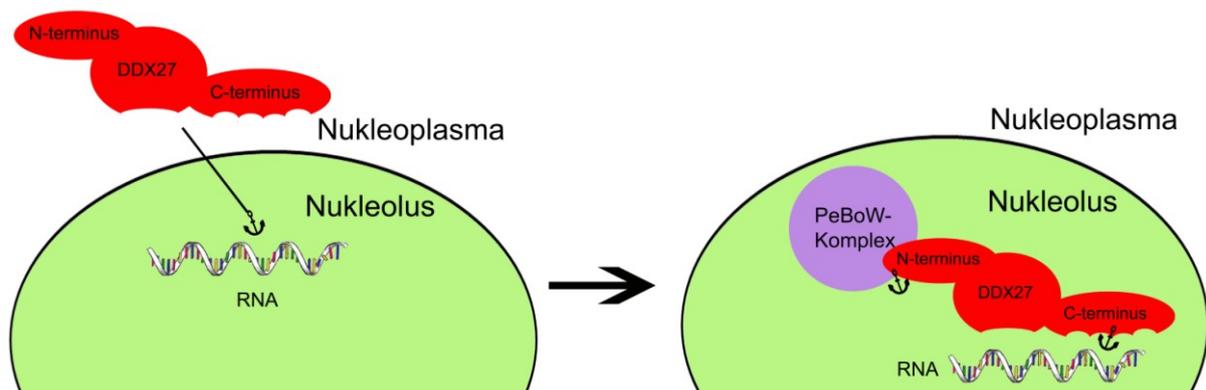


Abb. 32: Modell zur Verankerung von DDX27 im Nukleolus. Der C-Terminus von DDX27 sorgt für einen Import des Faktors in den Nukleolus und verankert sich dort über die Bindung an nukleoläre RNA. DDX27 bindet über seinen N-Terminus im Nukleolus an den PeBoW-Komplex, was zu einer weiteren Verankerung führt.

Indessen kann noch nicht gesagt werden, ob andersherum der Import des PeBoW-Komplexes von DDX27 abhängt, da in den Experimenten dieser Arbeit stets die endogene Wildtyp-Helikase in den untersuchten Zellen vorhanden war. DM4 delokalisierte PeBoW jedenfalls durch Interaktion nicht ins Nukleoplasma (siehe Anhang Abb. 2).

Es wäre zunächst denkbar, dass es nur im Nukleolus zu einer stabilen Interaktion zwischen DDX27 und PeBoW kommen kann. Dagegen

spricht jedoch, dass DM4 sehr gut mit PeBoW in den IP-Experimenten interagieren konnte, obwohl diese Mutante nicht im Nukleolus lokalisiert. Die Bindung zwischen DDX27 und PeBoW scheint sich also auch *in vitro* im Lysat bilden zu können.

Es ist trotzdem denkbar, dass auch weitere Faktoren (in Form von Proteinen) am Import bzw. an der Lokalisation von DDX27 im Nukleolus beteiligt sind. Es gibt Beispiele dafür wie Faktoren für die nukleoläre Lokalisation anderer Faktoren wichtig sind. Gerade das multifunktionale Nucleolin besitzt selber kein NoLS, bindet aber das NoLS-tragende NPM1. Nucleolin wird somit durch Nukleophosmin in den Nukleolus importiert (Li et al., 1996). NPM1 beeinflusst auch die Lokalisation von an der Ribosomenbiogenese beteiligten DEAD-Box Helikasen. Es bindet DDX5 und überführt die Helikase auf diese Weise in den Nukleolus (Saporita et al., 2011). Der Tumorsuppressor p14ARF inhibiert diese Interaktion, um dadurch die Ribosomenbiogenese zu drosseln. Die Beeinflussung der Interaktion zweier nukleolärer Faktoren stellt damit einen weiteren Mechanismus zur Regelung der nukleolären Lokalisation einzelner Faktoren dar.

DDX50 (auch als RNA Helikase II GuB bekannt) bindet direkt an den Transkriptionsfaktor c-Jun, der seinerseits durch die MAP-Kinase JNK kontrolliert wird. Die JNK-Signale vermitteln eine erhöhte c-Jun-DDX50 Bindung. Beide Faktoren werden anschließend aus dem Nukleolus exportiert, um im Nukleoplasma für die Transkriptionsregulierung diverser Zielgene bereitzustehen (Westermarck et al., 2002). Weitere Daten sprechen dafür, dass DDX50 sich im Nukleolus sogar inhibierend auf die Transkription der rRNA auswirkt (Valdez et al., 2002). JNK verstärkt hingegen die nukleoläre Lokalisation von DDX21 (auch als RNA Helikase II GuA, DDX56 oder NOH61 bekannt), indem es die Helikase

phosphoryliert und so das Pendeln des DEAD-Box Proteins zwischen Nukleoplasma und Nukleolus vermindert (Mialon et al., 2008). Die Bindung an c-Jun scheint überdies für die Lokalisation von DDX21 im Nukleolus prinzipiell nötig zu sein (Holmström et al., 2008). DDX21 wird in dem Kompartiment auch über die Interaktion zu Nukleostemin gehalten (Romanova et al., 2009). Diese Assoziation ist anders als bei DDX27 für die Lokalisation zwar essentiell, aber nicht ausreichend, da DDX21 in RNase behandelten Zellen ins Nukleoplasma delokalisiert (Zirwes et al., 2000).

6. Der zentrale Bereich von DDX27 als RNA-Bindestelle

Die DDX27-Mutanten DM2 und DM3, welchen Teile des zentralen enzymatischen Bereichs fehlen, delokalisieren zusammen mit dem PeBoW-Komplex aberrant in nukleoplasmatischen *Spots*. Die Mutante DM15, welcher neben einem Bereich im Zentrum auch der N-Terminus und somit die Interaktionsmöglichkeit zu PeBoW fehlt, delokalisierte zwar selbst in *Spots*, PeBoW jedoch nicht. Der Komplex wurde daher durch DDX27 in die genannten *Spots* nur passiv mit hineingezogen.

Die korrekte 28S rRNA-Reifung nach Expression von DM2 oder DM3 widerspricht der Möglichkeit, dass die Delokalisation im Zusammenhang mit fehlerhafter Ribosomenbiogenese steht. Es kam auch zu keinem gravierenden Einbruch der Proliferation, welchen man durch die p53-Antwort nach Desintegration eines Nukleolus erwarten würde. Die Mutante DM3 erzeugt nur eine geringe Verminderung der Proliferationsrate. Diese Verminderung wird eventuell dadurch bedingt, dass möglicherweise auch kleine Mengen an L5 und L11 durch das mutierte DDX27 aus dem Nukleolus mit hinausgezogen werden.

Nukleoplasmatische *Spots* traten auch bei bestimmten Deletionsmutanten des Ribosomenbiogenesefaktors Ppan auf. Dieser

Faktor ist an der Reifung der 60S Untereinheit beteiligt und ihm werden Tumorsuppressoreigenschaften zugeschrieben (Welch et al., 2000; Fatica et al., 2002). Bei den entsprechenden Deletionsmutanten von Ppan wurde die sigma70 Domäne entfernt. Dieses Motiv besitzt RNA-bindefähigkeit (Wehner und Baserga, 2002). Das ist insbesondere interessant, da auch in den DDX27-Mutanten DM2+3 RNA-Bindemotive deletiert sind. Es ergibt sich daraus die Möglichkeit, dass die beobachtete Delokalisation in *Spots* aus einem Mangel der Bindung der Faktoren an RNA entstanden ist. Zumindest ein gewisser Anteil der Menge von DDX27 bzw. Ppan würde demnach durch den Verlust dieser RNA-Bindung aus dem Nukleolus delokalisiert werden.

Es stellt sich nun allerdings die Frage was die nukleoplasmatischen *Spots* darstellen und warum die Faktoren in diesen assemblieren. Ich konnte zeigen, dass es sich für DDX27 und Ppan um dieselben *Spots* handelt. Meine Kollegin Anastasia Malamoussi hat in ihrer Arbeit über Ppan nachgewiesen, dass es sich bei den *Spots* nicht um *PML-bodies*, *splicing speckles* oder *Cajal bodies* handelt, also andere bekannte Subkompartimente des Zellkerns. Nukleäre Stress-Granula, welche nach zellulärem Stress auftreten, bleiben als potentielle Kandidaten übrig. Stress kann durch die Expression einer Mutante durchaus erzeugt werden. In meiner Arbeit wurde nicht getestet, ob DDX27 in Stress-Granula delokalisieren, jedoch kommen die Granula allgemein nicht so zahlreich wie die *Spots* bei den untersuchten Mutanten vor (Biamonti und Vourc'h, 2010).

Die *Spots* könnten auch Konglomerate von ausgefallenem DDX27 Protein sein. Wenn ein Teil des recht hydrophob geprägten Helikasen-Kerns deletiert ist, kann sich die restliche Proteinsequenz von DDX27 DM3 eventuell nicht immer korrekt falten und vereinigt sich in *Spots*.

Dafür spricht auch, dass wenn der Enzymkern ganz entfernt wurde, wie bei DM5 und DM11, keine *Spots* erscheinen. Interessant ist in diesem Zusammenhang auch, dass die Mutante DM12, welcher der dem Helikasen-Kern am nächsten gelegene Teil des C-Terminus fehlt, auch in *Spots* aggregiert. Diese benachbarte Region wird gegebenenfalls zusätzlich für die Ausbildung oder Stabilisierung der Helikasen-Kern-Struktur benötigt.

Fehlt DDX27 jedoch der gesamte C-Terminus (DM4) bilden sich andererseits keine *Spots*. Wenn man auf das in Abschnitt 5 postulierte Modell zurückgreift, dass DM4 gar nicht erst in den Nukleolus importiert wird, so ergäbe sich die denkbare Möglichkeit, dass es zur Aggregation in *Spots* erst in Korrelation von weiteren nukleolären Komponenten (RNA oder Proteine) kommen kann. Diese Komponenten würden dann die Lokalisation in eine unbekannte nukleäre Struktur (= *Spots*) vermitteln. Der PeBoW-Komplex fällt dafür aber als Kandidat gemäß den erlangten Ergebnissen mit DM15 aus.

Literaturverzeichnis

- Abdelhaleem, M. (2004) Do human RNA helicases have a role in cancer? *Biochim Biophys Acta*, **1704**, 37-46.
- Abdelhaleem, M., Maltais, L. and Wain, H. (2003) The human DDX and DHX gene families of putative RNA helicases. *Genomics*, **81**, 618-622.
- Adams, C.C., Jakovljevic, J., Roman, J., Harnpicharnchai, P. and Woolford, J.L., Jr. (2002) Saccharomyces cerevisiae nucleolar protein Nop7p is necessary for biogenesis of 60S ribosomal subunits. *Rna*, **8**, 150-165.
- Allende, M.L., Amsterdam, A., Becker, T., Kawakami, K., Gaiano, N. and Hopkins, N. (1996) Insertional mutagenesis in zebrafish identifies two novel genes, pescadillo and dead eye, essential for embryonic development. *Genes Dev*, **10**, 3141-3155.
- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E. and Tollervey, D. (1999) Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *Embo J*, **18**, 5399-5410.
- Aregger, R. and Klostermeier, D. (2009) The DEAD box helicase YxiN maintains a closed conformation during ATP hydrolysis. *Biochemistry*, **48**, 10679-10681.
- Bai, M., Pang, X., Lou, J., Zhou, Q., Zhang, K., Ma, J., Li, J., Sun, F. and Hsu, V.W. (2012) Mechanistic insights into regulated cargo binding by ACAP1 protein. *J Biol Chem*, **287**, 28675-28685.
- Banroques, J., Doere, M., Dreyfus, M., Linder, P. and Tanner, N.K. (2010) Motif III in superfamily 2 "helicases" helps convert the binding energy of ATP into a high-affinity RNA binding site in the yeast DEAD-box protein Ded1. *J Mol Biol*, **396**, 949-966.
- Bassler, J., Kallas, M., Pertschy, B., Ulbrich, C., Thoms, M. and Hurt, E. (2010) The AAA-ATPase Rea1 drives removal of biogenesis factors during multiple stages of 60S ribosome assembly. *Mol Cell*, **38**, 712-721.
- Bernstein, K.A., Granneman, S., Lee, A.V., Manickam, S. and Baserga, S.J. (2006) Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases involved in large ribosomal subunit biogenesis. *Mol Cell Biol*, **26**, 1195-1208.
- Biamonti, G. and Vourc'h, C. (2010) Nuclear stress bodies. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, **2**, a000695.
- Bizebard, T., Ferlenghi, I., Iost, I. and Dreyfus, M. (2004) Studies on three E. coli DEAD-box helicases point to an unwinding mechanism different from that of model DNA helicases. *Biochemistry*, **43**, 7857-7866.
- Bohnsack, M.T., Kos, M. and Tollervey, D. (2008) Quantitative analysis of snoRNA association with pre-ribosomes and release of snR30 by Rok1 helicase. *EMBO Rep*, **9**, 1230-1236.
- Boisvert, F.M., van Koningsbruggen, S., Navascues, J. and Lamond, A.I. (2007) The multifunctional nucleolus. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**, 574-585.
- Bond, A.T., Mangus, D.A., He, F. and Jacobson, A. (2001) Absence of Dbp2p alters both nonsense-mediated mRNA decay and rRNA processing. *Mol Cell Biol*, **21**, 7366-7379.

- Bornkamm, G.W., Berens, C., Kuklik-Roos, C., Bechet, J.M., Laux, G., Bachl, J., Korndoerfer, M., Schlee, M., Holzel, M., Malamoussi, A., Chapman RD., Nimmerjahn F., Mautner J., Hillen W., Bujard H., Feuillard J. (2005). Stringent doxycycline-dependent control of gene activities using an episomal one-vector system. *Nucleic Acids Res*, **33**, e137.
- Boulon, S., Westman, B.J., Hutten, S., Boisvert, F.M. and Lamond, A.I. (2010) The nucleolus under stress. *Mol Cell*, **40**, 216-227.
- Bowman, L.H., Rabin, B. and Schlessinger, D. (1981) Multiple ribosomal RNA cleavage pathways in mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, **9**, 4951-4966.
- Brady, R.J., Damer, C.K., Heuser, J.E. and O'Halloran, T.J. (2010) Regulation of Hip1r by epsin controls the temporal and spatial coupling of actin filaments to clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, **123**, 3652-3661.
- Braglia, P., Kawauchi, J. and Proudfoot, N.J. (2010) Co-transcriptional RNA cleavage provides a failsafe termination mechanism for yeast RNA polymerase I. *Nucleic Acids Res*, **39**, 1439-1448.
- Burger, K., Muhl, B., Harasim, T., Rohrmoser, M., Malamoussi, A., Orban, M., Kellner, M., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Holzel, M. and Eick, D. (2010) Chemotherapeutic drugs inhibit ribosome biogenesis at various levels. *J Biol Chem*, **285**, 12416-12425.
- Burger, Kaspar (2012), Cdk9 links Polymerase II transcription to processing of ribosomal RNA (Dissertation)
- Burkhard, K.A., Chen, F. and Shapiro, P. (2011) Quantitative analysis of ERK2 interactions with substrate proteins: roles for kinase docking domains and activity in determining binding affinity. *J Biol Chem*, **286**, 2477-2485.
- Caburet, S., Conti, C., Schurra, C., Lebofsky, R., Edelstein, S.J. and Bensimon, A. (2005) Human ribosomal RNA gene arrays display a broad range of palindromic structures. *Genome Res*, **15**, 1079-1085.
- Chen, C.Y. and Brodsky, F.M. (2005) Huntingtin-interacting protein 1 (Hip1) and Hip1-related protein (Hip1R) bind the conserved sequence of clathrin light chains and thereby influence clathrin assembly in vitro and actin distribution in vivo. *J Biol Chem*, **280**, 6109-6117.
- Chen, D. and Huang, S. (2001) Nucleolar components involved in ribosome biogenesis cycle between the nucleolus and nucleoplasm in interphase cells. *J Cell Biol*, **153**, 169-176.
- Chung, K.Y., Cheng, I.K., Ching, A.K., Chu, J.H., Lai, P.B. and Wong, N. (2011) Block of proliferation 1 (BOP1) plays an oncogenic role in hepatocellular carcinoma by promoting epithelial-to-mesenchymal transition. *Hepatology*, **54**, 307-318.
- Collins, S.R., Kemmeren, P., Zhao, X.C., Greenblatt, J.F., Spencer, F., Holstege, F.C., Weissman, J.S. and Krogan, N.J. (2007) Toward a comprehensive atlas of the physical interactome of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Proteomics*, **6**, 439-450.
- Cordin, O., Banroques, J., Tanner, N.K. and Linder, P. (2006) The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, **367**, 17-37.
- Dai, M.S. and Lu, H. (2004) Inhibition of MDM2-mediated p53 ubiquitination and degradation by ribosomal protein L5. *J Biol Chem*, **279**, 44475-44482.
- Daugeron, M.C. and Linder, P. (1998) Dbp7p, a putative ATP-dependent RNA helicase from *Saccharomyces cerevisiae*, is required for 60S ribosomal subunit assembly. *Rna*, **4**, 566-581.

- de la Cruz, J., Kressler, D., Rojo, M., Tollervey, D. and Linder, P. (1998) Spb4p, an essential putative RNA helicase, is required for a late step in the assembly of 60S ribosomal subunits in *Saccharomyces cerevisiae*. *Rna*, **4**, 1268-1281.
- Decatur, W.A. and Fournier, M.J. (2003) RNA-guided nucleotide modification of ribosomal and other RNAs. *J Biol Chem*, **278**, 695-698.
- Deisenroth, C. and Zhang, Y. (2010) Ribosome biogenesis surveillance: probing the ribosomal protein-Mdm2-p53 pathway. *Oncogene*, **29**, 4253-4260.
- Deng, C.X. (2006) BRCA1: cell cycle checkpoint, genetic instability, DNA damage response and cancer evolution. *Nucleic Acids Res*, **34**, 1416-1426.
- Denissov, S., Lessard, F., Mayer, C., Stefanovsky, V., van Driel, M., Grummt, I., Moss, T. and Stunnenberg, H.G. (2011) A model for the topology of active ribosomal RNA genes. *EMBO Rep*, **12**, 231-237.
- Dez, C., Froment, C., Noaillac-Depeyre, J., Monsarrat, B., Caizergues-Ferrer, M. and Henry, Y. (2004) Npa1p, a component of very early pre-60S ribosomal particles, associates with a subset of small nucleolar RNPs required for peptidyl transferase center modification. *Mol Cell Biol*, **24**, 6324-6337.
- Dez, C. and Tollervey, D. (2004) Ribosome synthesis meets the cell cycle. *Curr Opin Microbiol*, **7**, 631-637.
- Dragon, F., Gallagher, J.E., Compagnone-Post, P.A., Mitchell, B.M., Porwancher, K.A., Wehner, K.A., Wormsley, S., Settlege, R.E., Shabanowitz, J., Osheim, Y., Beyer, A.L., Hunt, D.F. and Baserga, S.J. (2002) A large nucleolar U3 ribonucleoprotein required for 18S ribosomal RNA biogenesis. *Nature*, **417**, 967-970.
- Drygin, D., Rice, W.G. and Grummt, I. (2010) The RNA polymerase I transcription machinery: an emerging target for the treatment of cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **50**, 131-156.
- Du, Y.C. and Stillman, B. (2002) Yph1p, an ORC-interacting protein: potential links between cell proliferation control, DNA replication, and ribosome biogenesis. *Cell*, **109**, 835-848.
- Emmott, E. and Hiscox, J.A. (2009) Nucleolar targeting: the hub of the matter. *EMBO Rep*, **10**, 231-238.
- Fairman-Williams, M.E., Guenther, U.P. and Jankowsky, E. (2010) SF1 and SF2 helicases: family matters. *Curr Opin Struct Biol*, **20**, 313-324.
- Fantz, D.A., Jacobs, D., Glossip, D. and Kornfeld, K. (2001) Docking sites on substrate proteins direct extracellular signal-regulated kinase to phosphorylate specific residues. *J Biol Chem*, **276**, 27256-27265.
- Fatica, A., Cronshaw, A.D., Dlakic, M., and Tollervey, D. (2002). Ssf1p prevents premature processing of an early pre-60S ribosomal particle. *Mol Cell*, **9**, 341-351.
- Fetherston, J., Werner, E. and Patterson, R. (1984) Processing of the external transcribed spacer of murine rRNA and site of action of actinomycin D. *Nucleic Acids Res*, **12**, 7187-7198.
- Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, **90**, 1051-1060.
- Freed, E.F., Bleichert, F., Dutca, L.M. and Baserga, S.J. (2010) When ribosomes go bad: diseases of ribosome biogenesis. *Mol Biosyst*, **6**, 481-493.

- French, S.L., Osheim, Y.N., Schneider, D.A., Sikes, M.L., Fernandez, C.F., Copela, L.A., Misra, V.A., Nomura, M., Wolin, S.L. and Beyer, A.L. (2008) Visual analysis of the yeast 5S rRNA gene transcriptome: regulation and role of La protein. *Mol Cell Biol*, **28**, 4576-4587.
- Fromont-Racine, M., Senger, B., Saveanu, C. and Fasiolo, F. (2003) Ribosome assembly in eukaryotes. *Gene*, **313**, 17-42.
- Fumagalli, S., Di Cara, A., Neb-Gulati, A., Natt, F., Schwemberger, S., Hall, J., Babcock, G.F., Bernardi, R., Pandolfi, P.P. and Thomas, G. (2009) Absence of nucleolar disruption after impairment of 40S ribosome biogenesis reveals an rpl11-translation-dependent mechanism of p53 induction. *Nat Cell Biol*, **11**, 501-508.
- Gadal, O., Strauss, D., Kessler, J., Trumpower, B., Tollervey, D. and Hurt, E. (2001) Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. *Mol Cell Biol*, **21**, 3405-3415.
- Galanis, A., Yang, S.H. and Sharrocks, A.D. (2001) Selective targeting of MAPKs to the ETS domain transcription factor SAP-1. *J Biol Chem*, **276**, 965-973.
- Gallagher, J.E., Dunbar, D.A., Granneman, S., Mitchell, B.M., Osheim, Y., Beyer, A.L. and Baserga, S.J. (2004) RNA polymerase I transcription and pre-rRNA processing are linked by specific SSU processome components. *Genes Dev*, **18**, 2506-2517.
- Ganot, P., Bortolin, M.L. and Kiss, T. (1997) Site-specific pseudouridine formation in preribosomal RNA is guided by small nucleolar RNAs. *Cell*, **89**, 799-809.
- Gavin, A.C., Aloy, P., Grandi, P., Krause, R., Boesche, M., Marzioch, M., Rau, C., Jensen, L.J., Bastuck, S., Dumpelfeld, B., Edelmann, A., Heurtier, M.A., Hoffman, V., Hoefert, C., Klein, K., Hudak, M., Michon, A.M., Schelder, M., Schirle, M., Remor, M., Rudi, T., Hooper, S., Bauer, A., Bouwmeester, T., Casari, G., Drewes, G., Neubauer, G., Rick, J.M., Kuster, B., Bork, P., Russell, R.B. and Superti-Furga, G. (2006) Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, **440**, 631-636.
- Geerlings, T.H., Faber, A.W., Bister, M.D., Vos, J.C. and Raue, H.A. (2003) Rio2p, an evolutionarily conserved, low abundant protein kinase essential for processing of 20 S Pre-rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **278**, 22537-22545.
- Geerlings, T.H., Vos, J.C. and Raue, H.A. (2000) The final step in the formation of 25S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae* is performed by 5'→3' exonucleases. *Rna*, **6**, 1698-1703.
- Gonzales, B., Henning, D., So, R.B., Dixon, J., Dixon, M.J. and Valdez, B.C. (2005) The Treacher Collins syndrome (TCOF1) gene product is involved in pre-rRNA methylation. *Hum Mol Genet*, **14**, 2035-2043.
- Gottfried, I., Ehrlich, M. and Ashery, U. (2010) The Sla2p/HIP1/HIP1R family: similar structure, similar function in endocytosis? *Biochem Soc Trans*, **38**, 187-191.
- Granneman, S. and Baserga, S.J. (2004) Ribosome biogenesis: of knobs and RNA processing. *Exp Cell Res*, **296**, 43-50.
- Granneman, S., Bernstein, K.A., Bleichert, F. and Baserga, S.J. (2006) Comprehensive mutational analysis of yeast DEXD/H box RNA helicases required for small ribosomal subunit synthesis. *Mol Cell Biol*, **26**, 1183-1194.
- Grimm, T., Holzel, M., Rohmoser, M., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E. and Eick, D. (2006) Dominant-negative Pes1 mutants inhibit ribosomal RNA processing and

- cell proliferation via incorporation into the PeBoW-complex. *Nucleic Acids Res*, **34**, 3030-3043.
- Grummt, I. (2010) Wisely chosen paths--regulation of rRNA synthesis: delivered on 30 June 2010 at the 35th FEBS Congress in Gothenburg, Sweden. *Febs J*, **277**, 4626-4639.
- Hahn, M.A. and Marsh, D.J. (2007) Nucleolar localization of parafibromin is mediated by three nucleolar localization signals. *FEBS Lett*, **581**, 5070-5074.
- Hannan, K.M., Brandenburger, Y., Jenkins, A., Sharkey, K., Cavanaugh, A., Rothblum, L., Moss, T., Poortinga, G., McArthur, G.A., Pearson, R.B. and Hannan, R.D. (2003) mTOR-dependent regulation of ribosomal gene transcription requires S6K1 and is mediated by phosphorylation of the carboxy-terminal activation domain of the nucleolar transcription factor UBF. *Mol Cell Biol*, **23**, 8862-8877.
- Haque, J., Boger, S., Li, J. and Duncan, S.A. (2000) The murine Pes1 gene encodes a nuclear protein containing a BRCT domain. *Genomics*, **70**, 201-210.
- Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Horsey, E., Miles, T., Roman, J., Rout, M., Meagher, D., Imai, B., Guo, Y., Brame, C.J., Shabanowitz, J., Hunt, D.F. and Woolford, J.L., Jr. (2001) Composition and functional characterization of yeast 66S ribosome assembly intermediates. *Mol Cell*, **8**, 505-515.
- Heix, J., Vente, A., Voit, R., Budde, A., Michaelidis, T.M. and Grummt, I. (1998) Mitotic silencing of human rRNA synthesis: inactivation of the promoter selectivity factor SL1 by cdc2/cyclin B-mediated phosphorylation. *Embo J*, **17**, 7373-7381.
- Henn, A., Cao, W., Hackney, D.D. and De La Cruz, E.M. (2008) The ATPase cycle mechanism of the DEAD-box rRNA helicase, DbpA. *J Mol Biol*, **377**, 193-205.
- Henning, D., So, R.B., Jin, R., Lau, L.F. and Valdez, B.C. (2003) Silencing of RNA helicase II/Gualpha inhibits mammalian ribosomal RNA production. *J Biol Chem*, **278**, 52307-52314.
- Henras, A.K., Soudet, J., Gerus, M., Lebaron, S., Caizergues-Ferrer, M., Mouglin, A. and Henry, Y. (2008) The post-transcriptional steps of eukaryotic ribosome biogenesis. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2334-2359.
- Henry, Y., Wood, H., Morrissey, J.P., Petfalski, E., Kearsley, S. and Tollervey, D. (1994) The 5' end of yeast 5.8S rRNA is generated by exonucleases from an upstream cleavage site. *Embo J*, **13**, 2452-2463.
- Hernandez-Verdun, D. (2011) Assembly and disassembly of the nucleolus during the cell cycle. *Nucleus*, **2**, 189-194.
- Holmstrom, T.H., Mialon, A., Kallio, M., Nymalm, Y., Mannermaa, L., Holm, T., Johansson, H., Black, E., Gillespie, D., Salminen, T.A., Langel, U., Valdez, B.C. and Westermarck, J. (2008) c-Jun supports ribosomal RNA processing and nucleolar localization of RNA helicase DDX21. *J Biol Chem*, **283**, 7046-7053.
- Hölzel, M., Grimm, T., Rohmoser, M., Malamoussi, A., Harasim, T., Gruber-Eber, A., Kremmer, E. and Eick, D. (2007) The BRCT domain of mammalian Pes1 is crucial for nucleolar localization and rRNA processing. *Nucleic Acids Res*, **35**, 789-800.
- Hölzel, M., Rohmoser, M., Schlee, M., Grimm, T., Harasim, T., Malamoussi, A., Gruber-Eber, A., Kremmer, E., Hiddemann, W., Bornkamm, G.W. and Eick, D. (2005) Mammalian WDR12 is a novel member of the Pes1-Bop1 complex and is required for ribosome biogenesis and cell proliferation. *J Cell Biol*, **170**, 367-378.

- Hong, B., Brockenbrough, J.S., Wu, P. and Aris, J.P. (1997) Nop2p is required for pre-rRNA processing and 60S ribosome subunit synthesis in yeast. *Mol Cell Biol*, **17**, 378-388.
- Honma, Y., Kitamura, A., Shioda, R., Maruyama, H., Ozaki, K., Oda, Y., Mini, T., Jenou, P., Maki, Y., Yonezawa, K., Hurt, E., Ueno, M., Uritani, M., Hall, M.N. and Ushimaru, T. (2006) TOR regulates late steps of ribosome maturation in the nucleoplasm via Nog1 in response to nutrients. *Embo J*, **25**, 3832-3842.
- Hoppe, S., Bierhoff, H., Cado, I., Weber, A., Tiebe, M., Grummt, I. and Voit, R. (2009) AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 17781-17786.
- Hurt, E., Hannus, S., Schmelzl, B., Lau, D., Tollervey, D. and Simos, G. (1999) A novel in vivo assay reveals inhibition of ribosomal nuclear export in ran-cycle and nucleoporin mutants. *J Cell Biol*, **144**, 389-401.
- Itahana, K., Bhat, K.P., Jin, A., Itahana, Y., Hawke, D., Kobayashi, R. and Zhang, Y. (2003) Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell*, **12**, 1151-1164.
- Jacobs, D., Beitel, G.J., Clark, S.G., Horvitz, H.R. and Kornfeld, K. (1998) Gain-of-function mutations in the *Caenorhabditis elegans* lin-1 ETS gene identify a C-terminal regulatory domain phosphorylated by ERK MAP kinase. *Genetics*, **149**, 1809-1822.
- Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J. and Kornfeld, K. (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev*, **13**, 163-175.
- Jalal, C., Uhlmann-Schiffler, H. and Stahl, H. (2007) Redundant role of DEAD box proteins p68 (Ddx5) and p72/p82 (Ddx17) in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Nucleic Acids Res*, **35**, 3590-3601.
- Jankowsky, A., Guenther, U.P. and Jankowsky, E. (2011) The RNA helicase database. *Nucleic Acids Res*, **39**, D338-341.
- Jansa, P., Mason, S.W., Hoffmann-Rohrer, U. and Grummt, I. (1998) Cloning and functional characterization of PTRF, a novel protein which induces dissociation of paused ternary transcription complexes. *Embo J*, **17**, 2855-2864.
- Jarmoskaite, I. and Russell, R. (2011) DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, **2**, 135-152.
- Jensen, B.C., Wang, Q., Kifer, C.T. and Parsons, M. (2003) The NOG1 GTP-binding protein is required for biogenesis of the 60 S ribosomal subunit. *J Biol Chem*, **278**, 32204-32211.
- Jin, A., Itahana, K., O'Keefe, K. and Zhang, Y. (2004) Inhibition of HDM2 and activation of p53 by ribosomal protein L23. *Mol Cell Biol*, **24**, 7669-7680.
- Kawauchi, J., Mischo, H., Braglia, P., Rondon, A., Proudfoot, N.J. (2008) Budding yeast RNA polymerases I and II employ parallel mechanisms of transcriptional termination. *Genes Dev*, **22**, 1082-92.
- Kellner, Markus (2009) Identifikation der DEAD-box RNA-Helikase DDX27 als neuen Interaktionspartner des PeBoW-Komplexes (Diplomarbeit)

- Killian, A., Le Meur, N., Sesboue, R., Bourguignon, J., Bougeard, G., Gautherot, J., Bastard, C., Frebourg, T. and Flaman, J.M. (2004) Inactivation of the RRB1-Pescadillo pathway involved in ribosome biogenesis induces chromosomal instability. *Oncogene*, **23**, 8597-8602.
- Killian, A., Sarafan-Vasseur, N., Sesboue, R., Le Pessot, F., Blanchard, F., Lamy, A., Laurent, M., Flaman, J.M. and Frebourg, T. (2006) Contribution of the BOP1 gene, located on 8q24, to colorectal tumorigenesis. *Genes Chromosomes Cancer*, **45**, 874-881.
- Kiss-Laszlo, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M. and Kiss, T. (1996) Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*, **85**, 1077-1088.
- Kos, M. and Tollervey, D. (2010) Yeast pre-rRNA processing and modification occur cotranscriptionally. *Mol Cell*, **37**, 809-820.
- Kressler, D., Hurt, E. and Bassler, J. (2010) Driving ribosome assembly. *Biochim Biophys Acta*, **1803**, 673-683.
- Kressler, D., Linder, P. and de La Cruz, J. (1999) Protein trans-acting factors involved in ribosome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **19**, 7897-7912.
- Krogan, N.J., Cagney, G., Yu, H., Zhong, G., Guo, X., Ignatchenko, A., Li, J., Pu, S., Datta, N., Tikuisis, A.P., Punna, T., Peregrin-Alvarez, J.M., Shales, M., Zhang, X., Davey, M., Robinson, M.D., Paccanaro, A., Bray, J.E., Sheung, A., Beattie, B., Richards, D.P., Canadien, V., Lalev, A., Mena, F., Wong, P., Starostine, A., Canete, M.M., Vlasblom, J., Wu, S., Orsi, C., Collins, S.R., Chandran, S., Haw, R., Rilstone, J.J., Gandi, K., Thompson, N.J., Musso, G., St Onge, P., Ghanny, S., Lam, M.H., Butland, G., Altaf-Ul, A.M., Kanaya, S., Shilatifard, A., O'Shea, E., Weissman, J.S., Ingles, C.J., Hughes, T.R., Parkinson, J., Gerstein, M., Wodak, S.J., Emili, A. and Greenblatt, J.F. (2006) Global landscape of protein complexes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **440**, 637-643.
- Kufel, J., Dichtl, B. and Tollervey, D. (1999) Yeast Rnt1p is required for cleavage of the pre-ribosomal RNA in the 3' ETS but not the 5' ETS. *Rna*, **5**, 909-917.
- Kuhn, A., Bartsch, I. and Grummt, I. (1990) Specific interaction of the murine transcription termination factor TTF I with class-I RNA polymerases. *Nature*, **344**, 559-562.
- Kuroda, T., Murayama, A., Katagiri, N., Ohta, Y.M., Fujita, E., Masumoto, H., Ema, M., Takahashi, S., Kimura, K. and Yanagisawa, J. (2011) RNA content in the nucleolus alters p53 acetylation via MYBBP1A. *Embo J*, **30**, 1054-1066.
- Lapik, Y.R., Fernandes, C.J., Lau, L.F. and Pestov, D.G. (2004) Physical and functional interaction between Pes1 and Bop1 in mammalian ribosome biogenesis. *Mol Cell*, **15**, 17-29.
- Lebreton, A., Rousselle, J.C., Lenormand, P., Namane, A., Jacquier, A., Fromont-Racine, M. and Saveanu, C. (2008) 60S ribosomal subunit assembly dynamics defined by semi-quantitative mass spectrometry of purified complexes. *Nucleic Acids Res*, **36**, 4988-4999.
- Lechertier, T., Sirri, V., Hernandez-Verdun, D. and Roussel, P. (2007) A B23-interacting sequence as a tool to visualize protein interactions in a cellular context. *J Cell Sci*, **120**, 265-275.
- Lee, H., Kim, D., Dan, H.C., Wu, E.L., Gritsko, T.M., Cao, C., Nicosia, S.V., Golemis, E.A., Liu, W., Coppola, D., Brem, S.S., Testa, J.R. and Cheng, J.Q. (2007) Identification and characterization of putative tumor suppressor NGB, a GTP-binding protein that interacts with the neurofibromatosis 2 protein. *Mol Cell Biol*, **27**, 2103-2119.

- Lee, T., Hoofnagle, A.N., Kabuyama, Y., Stroud, J., Min, X., Goldsmith, E.J., Chen, L., Resing, K.A. and Ahn, N.G. (2004) Docking motif interactions in MAP kinases revealed by hydrogen exchange mass spectrometry. *Mol Cell*, **14**, 43-55.
- Lee, W.C., Zabetakis, D. and Melese, T. (1992) NSR1 is required for pre-rRNA processing and for the proper maintenance of steady-state levels of ribosomal subunits. *Mol Cell Biol*, **12**, 3865-3871.
- Lerch-Gaggl, A., Haque, J., Li, J., Ning, G., Traktman, P. and Duncan, S.A. (2002) Pescadillo is essential for nucleolar assembly, ribosome biogenesis, and mammalian cell proliferation. *J Biol Chem*, **277**, 45347-45355.
- Li, J., Peters, P.J., Bai, M., Dai, J., Bos, E., Kirchhausen, T., Kandror, K.V. and Hsu, V.W. (2007) An ACAP1-containing clathrin coat complex for endocytic recycling. *J Cell Biol*, **178**, 453-464.
- Li, Y.P., Busch, R.K., Valdez, B.C. and Busch, H. (1996) C23 interacts with B23, a putative nucleolar-localization-signal-binding protein. *Eur J Biochem*, **237**, 153-158.
- Linder, P. and Jankowsky, E. (2011) From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **12**, 505-516.
- Lips, E.H., van Eijk, R., de Graaf, E.J., Oosting, J., de Miranda, N.F., Karsten, T., van de Velde, C.J., Eilers, P.H., Tollenaar, R.A., van Wezel, T. and Morreau, H. (2008) Integrating chromosomal aberrations and gene expression profiles to dissect rectal tumorigenesis. *BMC Cancer*, **8**, 314.
- Liu, F., Putnam, A. and Jankowsky, E. (2008) ATP hydrolysis is required for DEAD-box protein recycling but not for duplex unwinding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 20209-20214.
- Ljungman, M. (2000) Dial 9-1-1 for p53: mechanisms of p53 activation by cellular stress. *Neoplasia*, **2**, 208-225.
- Lohrum, M.A., Ludwig, R.L., Kubbutat, M.H., Hanlon, M. and Vousden, K.H. (2003) Regulation of HDM2 activity by the ribosomal protein L11. *Cancer Cell*, **3**, 577-587.
- Lorsch, J.R. and Herschlag, D. (1998) The DEAD box protein eIF4A. 1. A minimal kinetic and thermodynamic framework reveals coupled binding of RNA and nucleotide. *Biochemistry*, **37**, 2180-2193.
- Ma, H. and Pederson, T. (2008) Nucleophosmin is a binding partner of nucleostemin in human osteosarcoma cells. *Mol Biol Cell*, **19**, 2870-2875.
- Malamoussi, Anastasia (2008) Peter Pan, A new link between Ribosome biogenesis and cell cycle control (Dissertation)
- Martin, R., Straub, A.U., Doebele, C. and Bohnsack, M.T. (2012) DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. *RNA Biol*, **9**.
- Mayer, C., Zhao, J., Yuan, X. and Grummt, I. (2004) mTOR-dependent activation of the transcription factor TIF-IA links rRNA synthesis to nutrient availability. *Genes Dev*, **18**, 423-434.
- Merl, J., Jakob, S., Ridinger, K., Hierlmeier, T., Deutzmann, R., Milkereit, P. and Tschochner, H. (2010) Analysis of ribosome biogenesis factor-modules in yeast cells depleted from pre-ribosomes. *Nucleic Acids Res*, **38**, 3068-3080.
- Mialon, A., Thastrup, J., Kallunki, T., Mannermaa, L., Westermarck, J. and Holmstrom, T.H. (2008) Identification of nucleolar effects in JNK-deficient cells. *FEBS Lett*, **582**, 3145-3151.

- Michot, B., Joseph, N., Mazan, S. and Bachellerie, J.P. (1999) Evolutionarily conserved structural features in the ITS2 of mammalian pre-rRNAs and potential interactions with the snoRNA U8 detected by comparative analysis of new mouse sequences. *Nucleic Acids Res*, **27**, 2271-2282.
- Miles, T.D., Jakovljevic, J., Horsey, E.W., Harnpicharnchai, P., Tang, L. and Woolford, J.L., Jr. (2005) Ytm1, Nop7, and Erb1 form a complex necessary for maturation of yeast 66S preribosomes. *Mol Cell Biol*, **25**, 10419-10432.
- Mühl, Bastian (2011) Die Rolle von Peter Pan in der Ribosomenbiogenese (Dissertation)
- Mullineux, S.T. and Lafontaine, D.L. (2012) Mapping the cleavage sites on mammalian pre-rRNAs: where do we stand? *Biochimie*, **94**, 1521-1532.
- Nal, B., Mohr, E., Silva, M.I., Tagett, R., Navarro, C., Carroll, P., Depetris, D., Verthuy, C., Jordan, B.R. and Ferrier, P. (2002) Wdr12, a mouse gene encoding a novel WD-Repeat Protein with a notchless-like amino-terminal domain. *Genomics*, **79**, 77-86.
- Narla, A. and Ebert, B.L. (2010) Ribosomopathies: human disorders of ribosome dysfunction. *Blood*, **115**, 3196-3205.
- Neer, E.J., Schmidt, C.J., Nambudripad, R. and Smith, T.F. (1994) The ancient regulatory-protein family of WD-repeat proteins. *Nature*, **371**, 297-300.
- Nemeth, A. and Langst, G. (2011) Genome organization in and around the nucleolus. *Trends Genet*, **27**, 149-156.
- Ngoei, K.R., Catimel, B., Church, N., Lio, D.S., Dogovski, C., Perugini, M.A., Watt, P.M., Cheng, H.C., Ng, D.C. and Bogoyevitch, M.A. (2011) Characterization of a novel JNK (c-Jun N-terminal kinase) inhibitory peptide. *Biochem J*, **434**, 399-413.
- Nicol, S.M., Bray, S.E., Derek Black, H., Lorimore, S.A., Wright, E.G., Lane, D.P., Meek, D.W., Coates, P.J. and Fuller-Pace, F.V. (2012) The RNA helicase p68 (DDX5) is selectively required for the induction of p53-dependent p21 expression and cell-cycle arrest after DNA damage. *Oncogene*.
- Nissan, T.A., Bassler, J., Petfalski, E., Tollervey, D. and Hurt, E. (2002) 60S pre-ribosome formation viewed from assembly in the nucleolus until export to the cytoplasm. *Embo J*, **21**, 5539-5547.
- Oeffinger, M., Leung, A., Lamond, A. and Tollervey, D. (2002) Yeast Pescadillo is required for multiple activities during 60S ribosomal subunit synthesis. *Rna*, **8**, 626-636.
- Olson, M.O. and Dundr, M. (2005) The moving parts of the nucleolus. *Histochem Cell Biol*, **123**, 203-216.
- Pan, C. and Russell, R. (2010) Roles of DEAD-box proteins in RNA and RNP Folding. *RNA Biol*, **7**, 667-676.
- Pause, A. and Sonenberg, N. (1992) Mutational analysis of a DEAD box RNA helicase: the mammalian translation initiation factor eIF-4A. *Embo J*, **11**, 2643-2654.
- Peculis, B.A., Steitz, J.A. (1993) Disruption of U8 nucleolar snRNA inhibits 5.8S and 28S rRNA processing in the *Xenopus* oocyte. *Cell*, **73**, 1233-45.
- Peculis, B.A. (1997) The sequence of the 5' end of the U8 small nucleolar RNA is critical for 5.8S and 28S rRNA maturation. *Mol Cell Biol*, **17**, 3702-3713.

- Perez-Fernandez, J., Roman, A., De Las Rivas, J., Bustelo, X.R. and Dosil, M. (2007) The 90S preribosome is a multimodular structure that is assembled through a hierarchical mechanism. *Mol Cell Biol*, **27**, 5414-5429.
- Pertschy, B., Schneider, C., Gnadig, M., Schafer, T., Tollervey, D. and Hurt, E. (2009) RNA helicase Prp43 and its co-factor Pfa1 promote 20 to 18 S rRNA processing catalyzed by the endonuclease Nob1. *J Biol Chem*, **284**, 35079-35091.
- Pestov, D.G., Grzeszkiewicz, T.M. and Lau, L.F. (1998) Isolation of growth suppressors from a cDNA expression library. *Oncogene*, **17**, 3187-3197.
- Pestov, D.G., Stockelman, M.G., Strezoska, Z. and Lau, L.F. (2001a) ERB1, the yeast homolog of mammalian Bop1, is an essential gene required for maturation of the 25S and 5.8S ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res*, **29**, 3621-3630.
- Pestov, D.G., Strezoska, Z. and Lau, L.F. (2001b) Evidence of p53-dependent cross-talk between ribosome biogenesis and the cell cycle: effects of nucleolar protein Bop1 on G(1)/S transition. *Mol Cell Biol*, **21**, 4246-4255.
- Phair, R.D. and Misteli, T. (2000) High mobility of proteins in the mammalian cell nucleus. *Nature*, **404**, 604-609.
- Polychronopoulos, S., Verykokakis, M., Yazicioglu, M.N., Sakarellos-Daitsiotis, M., Cobb, M.H. and Mavrothalassitis, G. (2006) The transcriptional ETS2 repressor factor associates with active and inactive Erks through distinct FXF motifs. *J Biol Chem*, **281**, 25601-25611.
- Preuss, S.B., Costa-Nunes, P., Tucker, S., Pontes, O., Lawrence, R.J., Mosher, R., Kasschau, K.D., Carrington, J.C., Baulcombe, D.C., Viegas, W. and Pikaard, C.S. (2008) Multimegabase silencing in nucleolar dominance involves siRNA-directed DNA methylation and specific methylcytosine-binding proteins. *Mol Cell*, **32**, 673-684.
- Price, D.H. (2000) P-TEFb, a cyclin-dependent kinase controlling elongation by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*, **20**, 2629-2634.
- Raska, I., Shaw, P.J. and Cmarko, D. (2006) Structure and function of the nucleolus in the spotlight. *Curr Opin Cell Biol*, **18**, 325-334.
- Ripmaster, T.L., Vaughn, G.P. and Woolford, J.L., Jr. (1992) A putative ATP-dependent RNA helicase involved in *Saccharomyces cerevisiae* ribosome assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **89**, 11131-11135.
- Rocak, S., Emery, B., Tanner, N.K. and Linder, P. (2005) Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs. *Nucleic Acids Res*, **33**, 999-1009.
- Rogers, S., Wells, R. and Rechsteiner, M. (1986) Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis. *Science*, **234**, 364-368.
- Rohrmoser, M., Holzel, M., Grimm, T., Malamoussi, A., Harasim, T., Orban, M., Pfisterer, I., Gruber-Eber, A., Kremmer, E. and Eick, D. (2007) Interdependence of Pes1, Bop1, and WDR12 controls nucleolar localization and assembly of the PeBoW complex required for maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol Cell Biol*, **27**, 3682-3694.
- Romanova, L., Grand, A., Zhang, L., Rayner, S., Katoku-Kikyo, N., Kellner, S. and Kikyo, N. (2009) Critical role of nucleostemin in pre-rRNA processing. *J Biol Chem*, **284**, 4968-4977.

- Rubbi, C.P. and Milner, J. (2003) Disruption of the nucleolus mediates stabilization of p53 in response to DNA damage and other stresses. *Embo J*, **22**, 6068-6077.
- Santoro, R., Schmitz, K.M., Sandoval, J. and Grummt, I. (2010) Intergenic transcripts originating from a subclass of ribosomal DNA repeats silence ribosomal RNA genes in trans. *EMBO Rep*, **11**, 52-58.
- Saporita, A.J., Chang, H.C., Winkeler, C.L., Apicelli, A.J., Kladney, R.D., Wang, J., Townsend, R.R., Michel, L.S. and Weber, J.D. (2011) RNA helicase DDX5 is a p53-independent target of ARF that participates in ribosome biogenesis. *Cancer Res*, **71**, 6708-6717.
- Saveanu, C., Bienvenu, D., Namane, A., Gleizes, P.E., Gas, N., Jacquier, A. and Fromont-Racine, M. (2001) Nog2p, a putative GTPase associated with pre-60S subunits and required for late 60S maturation steps. *Embo J*, **20**, 6475-6484.
- Saveanu, C., Namane, A., Gleizes, P.E., Lebreton, A., Rousselle, J.C., Noaillac-Depeyre, J., Gas, N., Jacquier, A. and Fromont-Racine, M. (2003) Sequential protein association with nascent 60S ribosomal particles. *Mol Cell Biol*, **23**, 4449-4460.
- Savkur, R.S. and Olson, M.O. (1998) Preferential cleavage in pre-ribosomal RNA by protein B23 endoribonuclease. *Nucleic Acids Res*, **26**, 4508-4515.
- Saxena, A., Rorie, C.J., Dimitrova, D., Daniely, Y. and Borowiec, J.A. (2006) Nucleolin inhibits Hdm2 by multiple pathways leading to p53 stabilization. *Oncogene*, **25**, 7274-7288.
- Schlosser, I., Holzel, M., Murnseer, M., Burtscher, H., Weidle, U.H. and Eick, D. (2003) A role for c-Myc in the regulation of ribosomal RNA processing. *Nucleic Acids Res*, **31**, 6148-6156.
- Schmitt, M.E. and Clayton, D.A. (1993) Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, **13**, 7935-7941.
- Schneider, D.A. (2012) RNA polymerase I activity is regulated at multiple steps in the transcription cycle: recent insights into factors that influence transcription elongation. *Gene*, **493**, 176-184.
- Scott, M.S., Boisvert, F.M., McDowall, M.D., Lamond, A.I. and Barton, G.J. (2010) Characterization and prediction of protein nucleolar localization sequences. *Nucleic Acids Res*, **38**, 7388-7399.
- Seiser, R.M., Sundberg, A.E., Wollam, B.J., Zobel-Thropp, P., Baldwin, K., Spector, M.D. and Lycan, D.E. (2006) Ltv1 is required for efficient nuclear export of the ribosomal small subunit in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **174**, 679-691.
- Sekiguchi, T., Hayano, T., Yanagida, M., Takahashi, N. and Nishimoto, T. (2006) NOP132 is required for proper nucleolar localization of DEAD-box RNA helicase DDX47. *Nucleic Acids Res*, **34**, 4593-4608.
- Sengoku, T., Nureki, O., Nakamura, A., Kobayashi, S. and Yokoyama, S. (2006) Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell*, **125**, 287-300.
- Shaw, P. and Brown, J. (2012) Nucleoli: composition, function, and dynamics. *Plant Physiol*, **158**, 44-51.
- Sheridan, D.L., Kong, Y., Parker, S.A., Dalby, K.N. and Turk, B.E. (2008) Substrate discrimination among mitogen-activated protein kinases through distinct docking sequence motifs. *J Biol Chem*, **283**, 19511-19520.
- Singleton, M.R., Dillingham, M.S. and Wigley, D.B. (2007) Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. *Annu Rev Biochem*, **76**, 23-50.

- Srivastava, L., Lapik, Y.R., Wang, M. and Pestov, D.G. (2010) Mammalian DEAD box protein Ddx51 acts in 3' end maturation of 28S rRNA by promoting the release of U8 snoRNA. *Mol Cell Biol*, **30**, 2947-2956.
- Srivastava, M. and Pollard, H.B. (1999) Molecular dissection of nucleolin's role in growth and cell proliferation: new insights. *Faseb J*, **13**, 1911-1922.
- Stefanovsky, V.Y., Pelletier, G., Hannan, R., Gagnon-Kugler, T., Rothblum, L.I. and Moss, T. (2001) An immediate response of ribosomal transcription to growth factor stimulation in mammals is mediated by ERK phosphorylation of UBF. *Mol Cell*, **8**, 1063-1073.
- Strezoska, Z., Pestov, D.G. and Lau, L.F. (2000) Bop1 is a mouse WD40 repeat nucleolar protein involved in 28S and 5. 8S RRNA processing and 60S ribosome biogenesis. *Mol Cell Biol*, **20**, 5516-5528.
- Strezoska, Z., Pestov, D.G. and Lau, L.F. (2002) Functional inactivation of the mouse nucleolar protein Bop1 inhibits multiple steps in pre-rRNA processing and blocks cell cycle progression. *J Biol Chem*, **277**, 29617-29625.
- Tajrishi, M.M., Tuteja, R. and Tuteja, N. (2011) Nucleolin: The most abundant multifunctional phosphoprotein of nucleolus. *Commun Integr Biol*, **4**, 267-275.
- Tang, L., Sahasranaman, A., Jakovljevic, J., Schleifman, E. and Woolford, J.L., Jr. (2008) Interactions among Ytm1, Erb1, and Nop7 required for assembly of the Nop7-subcomplex in yeast preribosomes. *Mol Biol Cell*, **19**, 2844-2856.
- Tanner, N.K., Cordin, O., Banroques, J., Doere, M. and Linder, P. (2003) The Q motif: a newly identified motif in DEAD box helicases may regulate ATP binding and hydrolysis. *Mol Cell*, **11**, 127-138.
- Tao, W. and Levine, A.J. (1999a) Nucleocytoplasmic shuttling of oncoprotein Hdm2 is required for Hdm2-mediated degradation of p53. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 3077-3080.
- Tao, W. and Levine, A.J. (1999b) P19(ARF) stabilizes p53 by blocking nucleo-cytoplasmic shuttling of Mdm2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 6937-6941.
- Thiry, M. and Lafontaine, D.L. (2005) Birth of a nucleolus: the evolution of nucleolar compartments. *Trends Cell Biol*, **15**, 194-199.
- Thiry, M., Lamaye, F. and Lafontaine, D.L. (2011) The nucleolus: when 2 became 3. *Nucleus*, **2**, 289-293.
- Tinoco, I., Jr. and Bustamante, C. (1999) How RNA folds. *J Mol Biol*, **293**, 271-281.
- Tollervey, D., Lehtonen, H., Jansen, R., Kern, H. and Hurt, E.C. (1993) Temperature-sensitive mutations demonstrate roles for yeast fibrillarin in pre-rRNA processing, pre-rRNA methylation, and ribosome assembly. *Cell*, **72**, 443-457.
- Turner, A.J., Knox, A.A., Prieto, J.L., McStay, B. and Watkins, N.J. (2009) A novel small-subunit processome assembly intermediate that contains the U3 snoRNP, nucleolin, RRP5, and DBP4. *Mol Cell Biol*, **29**, 3007-3017.
- Valdez, B.C., Perlaky, L. and Henning, D. (2002) Expression, cellular localization, and enzymatic activities of RNA helicase II/Gu(beta). *Exp Cell Res*, **276**, 249-263.

- van Hoof, A., Lennertz, P. and Parker, R. (2000) Three conserved members of the RNase D family have unique and overlapping functions in the processing of 5S, 5.8S, U4, U5, RNase MRP and RNase P RNAs in yeast. *Embo J*, **19**, 1357-1365.
- Venema, J. and Tollervey, D. (1999) Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet*, **33**, 261-311.
- Voit, R., Hoffmann, M. and Grummt, I. (1999) Phosphorylation by G1-specific cdk-cyclin complexes activates the nucleolar transcription factor UBF. *Embo J*, **18**, 1891-1899.
- Voit, R., Schafer, K. and Grummt, I. (1997) Mechanism of repression of RNA polymerase I transcription by the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol*, **17**, 4230-4237.
- Vomastek, T., Iwanicki, M.P., Burack, W.R., Tiwari, D., Kumar, D., Parsons, J.T., Weber, M.J. and Nandicoori, V.K. (2008) Extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2) phosphorylation sites and docking domain on the nuclear pore complex protein Tpr cooperatively regulate ERK2-Tpr interaction. *Mol Cell Biol*, **28**, 6954-6966.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J. and Gay, N.J. (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *Embo J*, **1**, 945-951.
- Weaver, P.L., Sun, C. and Chang, T.H. (1997) Dbp3p, a putative RNA helicase in *Saccharomyces cerevisiae*, is required for efficient pre-rRNA processing predominantly at site A3. *Mol Cell Biol*, **17**, 1354-1365.
- Wehner, K.A. and Baserga, S.J. (2002) The sigma(70)-like motif: a eukaryotic RNA binding domain unique to a superfamily of proteins required for ribosome biogenesis. *Mol Cell*, **9**, 329-339.
- Welch, P.J., Marcusson, E.G., Li, Q.X., Beger, C., Kruger, M., Zhou, C., Leavitt, M., Wong-Staal, F. and Barber, J.R. (2000) Identification and validation of a gene involved in anchorage-independent cell growth control using a library of randomized hairpin ribozymes. *Genomics*, **66**, 274-283.
- Westermarck, J., Weiss, C., Saffrich, R., Kast, J., Musti, A.M., Wessely, M., Ansorge, W., Seraphin, B., Wilm, M., Valdez, B.C. and Bohmann, D. (2002) The DEXD/H-box RNA helicase RHIII/Gu is a co-factor for c-Jun-activated transcription. *Embo J*, **21**, 451-460.
- Wong, C.C., Traynor, D., Basse, N., Kay, R.R. and Warren, A.J. (2011) Defective ribosome assembly in Shwachman-Diamond syndrome. *Blood*, **118**, 4305-4312.
- Xiong, X., Zhao, Y., He, H. and Sun, Y. (2011) Ribosomal protein S27-like and S27 interplay with p53-MDM2 axis as a target, a substrate and a regulator. *Oncogene*, **30**, 1798-1811.
- Yang, Q., Del Campo, M., Lambowitz, A.M. and Jankowsky, E. (2007) DEAD-box proteins unwind duplexes by local strand separation. *Mol Cell*, **28**, 253-263.
- Yang, Q. and Jankowsky, E. (2006) The DEAD-box protein Ded1 unwinds RNA duplexes by a mode distinct from translocating helicases. *Nat Struct Mol Biol*, **13**, 981-986.
- You, J.H., Reed, M.L. and Hiscox, J.A. (2007) Trafficking motifs in the SARS-coronavirus nucleocapsid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, **358**, 1015-1020.
- You, Z., Chahwan, C., Bailis, J., Hunter, T. and Russell, P. (2005) ATM activation and its recruitment to damaged DNA require binding to the C terminus of Nbs1. *Mol Cell Biol*, **25**, 5363-5379.

- Yuan, X., Zhou, Y., Casanova, E., Chai, M., Kiss, E., Grone, H.J., Schutz, G. and Grummt, I. (2005) Genetic inactivation of the transcription factor TIF-IA leads to nucleolar disruption, cell cycle arrest, and p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*, **19**, 77-87.
- Zagulski, M., Kressler, D., Becam, A.M., Rytka, J. and Herbert, C.J. (2003) Mak5p, which is required for the maintenance of the M1 dsRNA virus, is encoded by the yeast ORF YBR142w and is involved in the biogenesis of the 60S subunit of the ribosome. *Mol Genet Genomics*, **270**, 216-224.
- Zebarjadian, Y., King, T., Fournier, M.J., Clarke, L. and Carbon, J. (1999) Point mutations in yeast CBF5 can abolish in vivo pseudouridylation of rRNA. *Mol Cell Biol*, **19**, 7461-7472.
- Zhai, W. and Comai, L. (2000) Repression of RNA polymerase I transcription by the tumor suppressor p53. *Mol Cell Biol*, **20**, 5930-5938.
- Zhang, C., Comai, L. and Johnson, D.L. (2005a) PTEN represses RNA Polymerase I transcription by disrupting the SL1 complex. *Mol Cell Biol*, **25**, 6899-6911.
- Zhang, H., Fang, Y., Huang, C., Yang, X. and Ye, Q. (2005b) Human pescadillo induces large-scale chromatin unfolding. *Sci China C Life Sci*, **48**, 270-276.
- Zhang, J., Harnpicharnchai, P., Jakovljevic, J., Tang, L., Guo, Y., Oeffinger, M., Rout, M.P., Hiley, S.L., Hughes, T. and Woolford, J.L., Jr. (2007) Assembly factors Rpf2 and Rrs1 recruit 5S rRNA and ribosomal proteins rpL5 and rpL11 into nascent ribosomes. *Genes Dev*, **21**, 2580-2592.
- Zhang, Y., Forys, J.T., Miceli, A.P., Gwinn, A.S. and Weber, J.D. (2011) Identification of DHX33 as a mediator of rRNA synthesis and cell growth. *Mol Cell Biol*, **31**, 4676-4691.
- Zhang, Y., Wang, J., Yuan, Y., Zhang, W., Guan, W., Wu, Z., Jin, C., Chen, H., Zhang, L., Yang, X. and He, F. (2010) Negative regulation of HDM2 to attenuate p53 degradation by ribosomal protein L26. *Nucleic Acids Res*, **38**, 6544-6554.
- Zhang, Y., Wolf, G.W., Bhat, K., Jin, A., Allio, T., Burkhardt, W.A. and Xiong, Y. (2003) Ribosomal protein L11 negatively regulates oncoprotein MDM2 and mediates a p53-dependent ribosomal-stress checkpoint pathway. *Mol Cell Biol*, **23**, 8902-8912.
- Zhao, J., Yuan, X., Frodin, M. and Grummt, I. (2003) ERK-dependent phosphorylation of the transcription initiation factor TIF-IA is required for RNA polymerase I transcription and cell growth. *Mol Cell*, **11**, 405-413.
- Zhu, Y., Poyurovsky, M.V., Li, Y., Biderman, L., Stahl, J., Jacq, X. and Prives, C. (2009) Ribosomal protein S7 is both a regulator and a substrate of MDM2. *Mol Cell*, **35**, 316-326.
- Zirwes, R.F., Eilbracht, J., Kneissel, S. and Schmidt-Zachmann, M.S. (2000) A novel helicase-type protein in the nucleolus: protein NOH61. *Mol Biol Cell*, **11**, 1153-1167.

Anhänge

Name of protein	Pes1-IP				Bop1-IP				Summe (gesamt)
	1	2	3	Summe	1	2	3	Summe	
Pescadillo homolog 1 (Pes1)	391	886	793	2070	185	375	351	911	2981
Block of proliferation 1 (Bop1)	314	241	453	1008	195	282	237	714	1722
WD-repeat protein 12 (WDR12)	155	67	210	432	120	184	368	672	1104
ACAP1	0	0	0	0	158	204	173	535	535
Huntingtin-interacting protein 1-related protein (Hip1r)	0	0	0	0	90	246	153	489	489
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX27	80	75	79	234	25	42	25	92	326
Nucleolin	39	58	66	163	25	36	26	87	250
Nuclease-sensitive element-binding protein 1	18	157	27	202	9	10	10	29	231
Nucleophosmin (NPM1)	28	12	21	61	39	30	34	103	164
Arginine and glutamate-rich protein 1	10	43	4	57	9	75	6	90	147
ATP-dependent RNA helicase A	27	27	40	94	19	6	6	31	125
Myb-binding protein 1A	15	24	54	93	5	1	11	17	110
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX5	15	21	19	55	11	9	14	34	89
Putative ribosomal RNA methyltransferase (Nop2)	12	9	16	37	3	9	17	29	66
Zinc finger protein 828	0	0	0	0	20	22	20	62	62
Pre-mRNA-processing-splicing factor 8	6	13	4	23	3	26	3	32	55
Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41	5	20	3	28	3	20	4	27	55
Putative rRNA methyltransferase 3	10	7	24	41	0	6	5	11	52
Nucleolar GTP-binding protein 1 (Nog1)	12	10	14	36	3	1	11	15	51
ATP-dependent RNA helicase DHX15	10	7	8	25	7	10	8	25	50
U5 small nuclear ribonucleoprotein 200 kDa helicase	4	19	3	26	4	17	2	23	49
Splicing factor 3B subunit 1	8	6	17	31	2	4	8	14	45
RNA-binding protein 25	3	9	4	16	3	9	4	16	32

Tabelle 2 Anhang: Liste der am stärksten gemessenen Proteine nach einem kombinierten Co-IP und Massenspektrometrie-Ansatz. Immunpräzipitationen wurden mit Pes1- bzw. Bop1-Antikörpern an Gesamtzelllysaten von Raji-Zellen durchgeführt. Der Versuch wurde für jeden Antikörper dreimal wiederholt. Die gemessenen Score-Werte der MS sind für die einzelnen Messungen und in Summe aufgelistet. Die Tabelle ist nach der Gesamtsumme sortiert. Abgeleitet aus den Versuchsreihen meiner Kollegin Kirsten Voß.

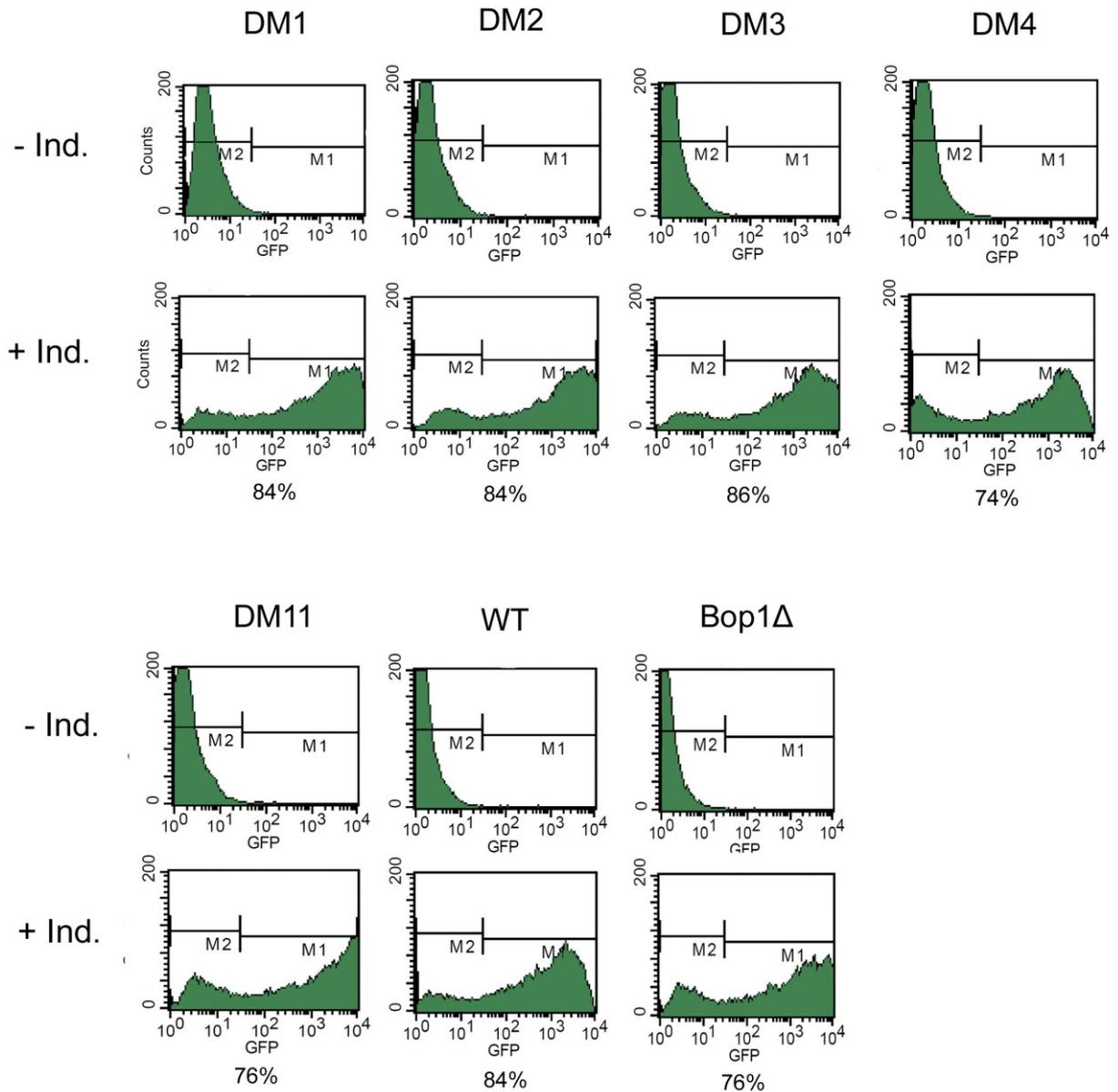


Abb. 1 Anhang: Expressionskontrolle der DDX27-Deletionsmutanten mittels GFP. Die pRTS-Vektoren, von denen das ektopische DDX27 exprimiert wird, exprimieren simultan GFP. Dieses wurde über FACS gemessen, wodurch die Expressionsrate bestimmt werden konnte. Diese ist unter den jeweiligen Graphen angegeben. +ind = mit Induktion, -ind = ohne Induktion des Vektors.

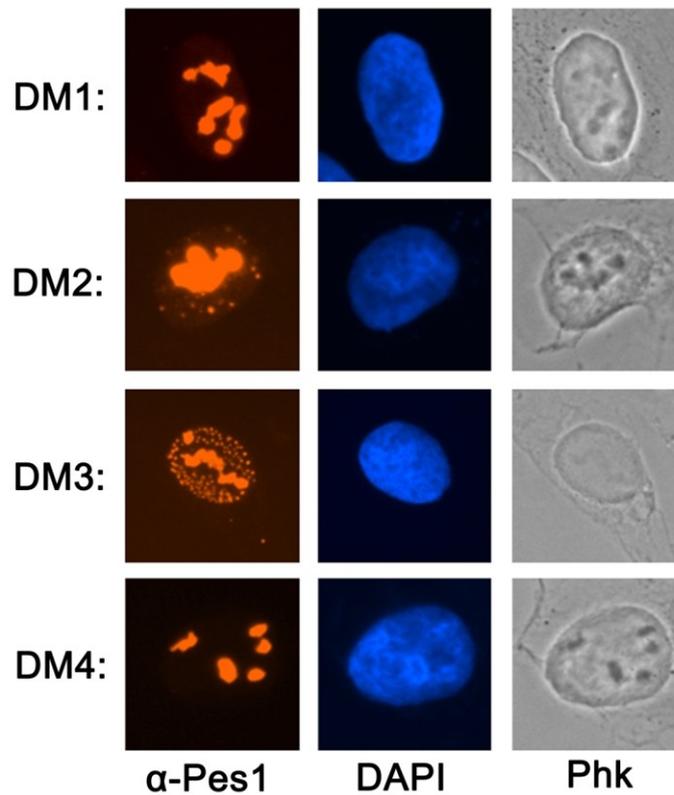


Abb. 2 Anhang: Lokalisation des PeBoW-Komplexes bei Expression der DDX27-Deletionsmutanten DM1-4. Die Mutanten DM1, DM2, DM3 und DM4 wurden in U2OS Zellen exprimiert und der PeBoW-Komplex über Antikörper von Pes1 angefärbt. In allen vier Fällen lokalisiert PeBoW noch nukleolär, auch bei Expression von DM4, welche selber nicht mehr im Nukleolus lokalisiert. Bei den Mutanten DM2 und DM3 wird der Komplex wie die deletierten Proteine von DDX27 in nukleoplasmatische Spots delokalisiert.

Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Prof. Dr. Dirk Eick für die Möglichkeit, in einem exzellenten Umfeld an diesem überaus interessanten Thema forschen zu können.

Natürlich geht mein Dank für die fachliche Beratung und die gute Laboratmosphäre auch an alle Angehörigen der Arbeitsgruppe Eick: Dr. Michaela Rohrmoser, Dr. Bastian Mühl, Dr. Thomas Harasim, Mathias Orban, Anita-Gruber-Eber, Dr. Martin Heidemann, Dr. Corinna Hintermair, Roland Schüller, Kirsten Voß, Dr. Lothar Hültner, Dr. Anastassia Malamoussi und Nilay Shah.

Vielen Dank an Prof. Dr. Axel Imhof und Dr. Aloys Scheper für ihre Beratung als Mitglieder meines Thesis Committees.

Ebenfalls geht mein Dank an alle Mitarbeiter in unserem Institut für ihre Unterstützung. Insbesondere bei Dr. Elisabeth Kremmer und ihrer Arbeitsgruppe für ihre Bereitstellung von Antikörpern, sowie Dr. Gerhard Laux für die Einführung in radioaktives Arbeiten.

Ich danke im Weiteren Katharina Brünger und Juliane Horenk für ihre Hilfe mit dem Sucrosegradienten.

Nicht zuletzt möchte ich mich auch bei meinen Eltern, meinem Bruder und allen Freunden bedanken, die zu dem Gelingen der Arbeit beigetragen haben.