

INAUGURAL – DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht - Karls - Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom - Biologin Anne-Susan Gantzert

aus: Berlin

Tag der mündlichen Prüfung: 06. September 2010

T h e m a

**Stressabhängige Ribonukleoproteinkomplex Formation
in der Kontrolle der Prothrombin Genexpression**

Gutachter: Prof. Dr. Werner Buselmaier

Prof. Dr. Dr. Andreas Kulozik

Zusammenfassung

Die 3'Endprozessierung ist neben dem Capping und Spleißen ein wichtiger posttranskriptioneller Genexpressionsmechanismus. Die Prothrombin (F2) mRNA ist ein Prototyp für eine Genfamilie, die ein ungewöhnliches RNA Sequenz Motiv in der 3' untranslatierten Region aufweist. Stromaufwärts des Polyadenylierungssignals befindet sich ein Sequenzelement (USE), welches die 3'Endprozessierung sequenz- und positionsabhängig stimuliert. Dabei fungieren interessanterweise einige Spleißfaktoren (hnRNPI, U2AF35 und U2AF65) als positive F2 USE-Effektorproteine, indem sie den kanonischen 3'Endprozessierungsapparat an die prä-mRNA rekrutieren. Des Weiteren wurden AU-reiche elementbindende Proteine (sog. ARE-BPs) als hochaffine und spezifische F2 USE Interaktionspartner identifiziert, deren potentielle Bedeutung in der 3'Endprozessierung bisher nicht beschrieben und analysiert wurde. Ziel dieser Arbeit war es die Ribonukleoprotein (RNP) Komposition exemplarisch an dem F2 USE Motiv unter Stressbedingungen zu analysieren und dessen Einfluss auf die Regulation der 3'Endprozessierung zu untersuchen.

In molekularen Analysen des F2 USE RNP Komplexes konnte gezeigt werden, dass die meisten ARE-BPs direkt und spezifisch an das USE Motiv binden. Stress führt zur Hyperphosphorylierung von einigen der ARE-BPs (FBP2 und FBP3) und reduziert deren Bindungsaffinität zum F2 USE Motiv. Somit scheinen die FBPs als Stresssensoren zu fungieren, wodurch die Komposition des F2 USE RNP Komplexes dynamisch an physiologische Prozesse angepasst werden kann. Diese und weitere im Labor generierten Daten deuten darauf hin, dass FBP2 und FBP3 wahrscheinlich stressabhängig mit den positiven USE-Effektorproteinen um die Bindung an das F2 USE Motiv konkurrieren.

Um die Frage zu beantworten, ob die 3'Endprozessierung der F2 mRNA unter Stressbedingungen reguliert wird, wurden stabile Reporter-Zelllinien generiert. In Stressexperimenten verhielten sich die stabilen Zellklone sehr heterogen bzgl. der Regulation der 3'Endprozessierung, was möglicherweise mit der zufälligen Integration der Tandemreporter in das Genom zu erklären ist. Trotz dieser Variabilität deuten aber diese *in vivo* Daten auf eine USE-abhängige Regulation der 3'Endprozessierung hin, was jedoch mit neuen experimentellen Ansätzen wie zum Beispiel lokusspezifischen, stabil transfizierten Zelllinien zu prüfen ist. Insgesamt zeigt die hier vorgestellte Arbeit, dass die regulierte 3'Endprozessierung eine bedeutende Rolle bei der stressabhängigen Adaptation der Genexpression spielt.

Summary

The mRNA 3' end processing is an important posttranscriptional gene expression control mechanism. The prothrombin (F2) mRNA is a prototype for a gene family which has an unusual RNA sequence motif in their 3' untranslated region. In this mRNA, an upstream sequence element (USE) is located 30 nucleotides upstream of the polyadenylation signal, which stimulates 3' end processing in a sequence- and position dependent manner. Interestingly, some splicing factors (hnRNPI, U2AF35 and U2AF65) act as positive F2 USE effector proteins by recruiting the canonical 3' end processing machinery to the pre mRNA. Furthermore AU-rich element binding proteins (so called ARE-BPs) were identified to interact with the F2 USE with a high affinity and specificity. So far their role in 3' end processing is not described and analysed. The aim of this study was to analyse the ribonucleoprotein (RNP) composition at the F2 USE motif under stress conditions and to investigate their influence in the regulation of 3' end processing.

Molecular analysis showed that most of the ARE-BPs bind directly and specifically to the F2 USE motif. Stress hyperphosphorylates some of the ARE-BPs (FBP2 and FBP3), which results in a reduced binding affinity to the F2 USE motif. FBPs thus seem to act as stress sensors that dynamically modulate the F2 USE RNP complex in response to physiological conditions. These and further data of the lab indicate a stress dependent competition of FBP2/3 and the positive USE effector proteins at the F2 USE motif.

In order to answer the question, if F2 3' end processing is regulated under stress conditions, stable cell lines were generated. These cell lines were exposed to stress and observed to behave differently in the regulation of 3' end processing. This is maybe due to the random integration of the tandem reporter into the genome. In spite of the variability, these *in vivo* data indicate an USE dependent regulation of 3' end processing. Further experimental settings i.e. based on locus specific stable cell lines are expected to further validate these findings. Altogether these data indicate that regulated 3' end processing plays an important role in stress dependent adaptation of gene expression.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	3
Abkürzungsverzeichnis	7
Abbildungsverzeichnis	10
Tabellenverzeichnis	12
1 Einleitung	13
1.1 Posttranskriptionelle Prozessierung als Mechanismus der Genexpressionskontrolle.....	13
1.2 Die 3'Endprozessierung von prä-mRNAs mit kanonischen Sequenzelementen	16
1.3 Ein nicht kanonisches Sequenzelement stimuliert die 3'Endprozessierung der Prothrombin mRNA.....	18
1.4 Die ARE-BPs integrieren extrazelluläre Signale und regulieren somit die Genexpression .	23
1.5 Fragestellung.....	24
2 Material	26
2.1 Chemikalien.....	26
2.2 Molekularbiologische und biochemische Reagenzien.....	27
2.3 Antikörper.....	28
2.4 Oligonukleotide	29
2.5 Lösungen/Puffer.....	30
2.6 Medien/Lösungen in der Zellkultur	31
2.7 Kits.....	31
2.8 Kunststoffwaren.....	31
3 Methoden	32
3.1 Molekularbiologie.....	32
3.2 Proteinbiochemie	43
3.3 Zellkultur	47
3.4 Statistik	50
3.5 Quantifizierung.....	50
4 Resultate	51

4.1	Molekulare Analyse des USE Ribonukleoprotein Komplexes	51
4.2	Analyse der USE abhängigen 3' Endprozessierung <i>in vivo</i>	65
5	<i>Diskussion</i>	77
5.1	FBPs als Stresssensor am F2 USE in der Regulation der 3' Endprozessierung	77
5.2	Zellkulturbasierte Studien zeigen keinen Effekt in der stressabhängigen Regulation der 3' Endprozessierung	81
5.3	Beispiele für regulierte 3' Endprozessierung <i>in vivo</i>	85
5.4	Thrombinfunktionen und die Rolle der regulierten 3' Endprozessierung in Physiologie und Pathologie	89
6	<i>Ausblick</i>	92

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Aniso	Anisomycin
ARE	AU-rich element (AU-reiches Element)
ARE-BP	AU-rich element binding protein (AU-reiches elementbindendes Protein)
bp	Basenpaar
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
C	Cytosin
cDNA	complementary (komplementäre) DNA
CF	cleavage Faktor (Spaltfaktor)
CMV	Cytomegalovirus
cpm	counts per minute (radioaktive Zerfälle pro Minute)
CPSF	cleavage and polyadenylation specificity factor (Spezifitätskomponente)
cRNA	complementary (komplementäre) RNA
CS	cleavage site (Schnittstelle)
CstF	cleavage stimulating factor (stimulierender Faktor)
CTD	C-terminal domane (C-terminale Domäne)
dATP	Desoxyandenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanodintriphosphat
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)
DSE	downstream sequence element (stromabwärts gelegendes Sequenzelement)
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminetetraazetat
F2	Prothrombin (Faktor 2)
FCS	fetal calf serum (fötales Kälberserum)
FS	flanking sequence (flankierende Sequenz)
g	Gramm
G	Guanin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase

GFP	green fluorescent protein (grünfluoreszierendes Protein)
GTP	Guanosin-Triphosphat
h	Stunde
HBB	humanes beta Globin
HeLa	Zervixkarzinom Zelllinie
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-Ethansulfonsäure
HepG2	humane Leberkarzinom Zelllinie
HUH-7	humane Hepatozyten Zelllinie
IP	Immunopräzipitation
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
kb	Kilobasenpaare
KH	k homology
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani Medium (Kulturmedium für Bakterien)
MAPK	Mitogenaktivierte Protein Kinase
MM	Magermilch
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonat
mRNA	messenger RNA (Boten RNA)
nt	Nukleotid
ORF	open reading frame (offenes Leseraster)
PABP	Poly(A) bindendes Protein
PABPN1	Poly(A) bindendes Protein im Nukleus
PABPC	Poly(A) bindendes Protein im Zytoplasma
PAP	Poly(A) Polymerase
PAT PCR	Poly(A) Schwanz Test Polymerasenkettenreaktion
PCR	polymerase chain reaction (Polymerasenkettenreaktion)
Pol II	Polymerase II
prä-mRNA	primäre mRNA
p-Wert	Signifikanzwert
RNA	ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RRM	RNA recognition motif (RNA Erkennungsmotiv)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung

sek	Sekunde
T	Thymin
TBS	Tris buffered saline
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer RNA
U	Uridin
USE	upstream sequence element (stromaufwärts gelegenes Sequenzelement)
USEmut	RNA Oligonukleotid, drei Punktmutationen in der USE Sequenz
Unrel	RNA Oligonukleotid, nicht verwandte USE Sequenz
USEBP	USE bindendes Protein
UTR	untranslatierte Region
Vgl.	vergleiche
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZF	Zinkfinger

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung posttranskriptioneller Modifikationen der prä-mRNA im Rahmen der Genexpression.....	14
Abbildung 2: Immunoglobulinklassenswitch durch alternatives Spleißen und Polyadenylierung	15
Abbildung 3: Mechanismus der 3'Endprozessierung polyadenylierter mRNAs	17
Abbildung 4: Vergleich der 3'untranslatierten und 3'flankierenden Sequenzen der HBB und F2 prä-mRNA	19
Abbildung 5: Modell der USE-abhängigen RNA Prozessierung an einem nicht kanonischen 3'Endprozessierungssignal, wie dem der F2 prä-mRNA.....	20
Abbildung 6: Die nonamerische Kernsequenz des USE Motivs befindet sich häufig nahe am 3'Ende der mRNA.....	21
Abbildung 7: Interaktionspartner des F2 USE Motivs	22
Abbildung 8: Arbeitshypothese wonach die RNP Formation am USE Motiv der Prothrombin mRNA über extrazelluläre Signale reguliert werden könnte.....	25
Abbildung 9: Vektorkarte pCI-neo Vektor.....	37
Abbildung 10: Vektorkarte pGEM [®] -7Zf Vektor (+).....	38
Abbildung 11: Expressionsanalyse der transient transfizierten USEBP Konstrukte mittels Western Blot	52
Abbildung 12: AU-reiche elementbindende Proteine (ARE-BPs) binden spezifisch und mit einer hohen Affinität direkt an das USE Motiv	53
Abbildung 13: Anisomycin induziert den p38 MAPK Signalweg	55
Abbildung 14: Aktivierung von p38 MAPK phosphoryliert FBP1, FBP2 und FBP3.....	57
Abbildung 15: Phosphorylierungskinetiken der Flag-gekoppelten Proteine FBP1, FBP2 und FBP3... ..	59
Abbildung 16: Stressinduktion reduziert Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 an das USE RNA Oligonukleotid.....	61
Abbildung 17: Reduktion der RNA Bindungsaffinität von FBP2 an das RNA USE Oligonukleotid nach Stressinduktion unter variierenden Hybridisierungsbedingungen.....	62
Abbildung 18: Stressinduktion für 4 h reduziert Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 an das USE RNA Oligonukleotid	63
Abbildung 19: Schematische Darstellung der Tandemreporterkonstrukte im heterologen Kontext	66
Abbildung 20: Schematische Darstellung der Tandemreporter Konstrukte im homologen Kontext	67
Abbildung 21: USE Motiv stimuliert die 3'Endprozessierung	70
Abbildung 22: PAT PCR misst Unterschiede in der 3'Endprozessierung.....	71
Abbildung 23: Stress führt zu keiner Regulation der 3'Endprozessierung des Tandemreporters USE-HBB/HBB in stabil transfizierten HeLa Zelllinien	72
Abbildung 24: Die stabilen Zelllinien verhalten sich unterschiedlich in der Regulation der USE-vermittelten 3'Endprozessierung nach Stressinduktion	73

Abbildung 25: Anisomycin aktiviert p38 MAPK in transient und stabil transfizierten HeLa Zellen.....	74
Abbildung 26: Stress induziert die Expression des Tandemreporters, führt jedoch nicht zu einer regulierten 3'Endprozessierung in transient transfizierten HeLa Zellen.....	76
Abbildung 27: Bioinformatisch vorausgesagte Phosphorylierungsstellen der FBPs befinden sich u. a. in KH Domänen	78
Abbildung 28: Modell für die stressabhängige Ribonukleoprotein Komposition am USE Motiv von mRNAs mit USE-haltigen 3'UTR	79
Abbildung 29: Das Flp-In TM System ermöglicht die Generierung von lokusspezifischen stabilen Zelllinien	84
Abbildung 30: Die 3'Endprozessierung wird nach DNA Schädigung zunächst inhibiert.....	87
Abbildung 31: Zwei Mechanismen des Influenza A Virus zur Inhibierung der 3'Endprozessierung der Wirtszelle	88

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper	28
Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung	29
Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für quantitative real-time PCR.....	29
Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für Klonierung	29
Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für Mutagenese	30
Tabelle 6: Übersicht der USE bindenden Proteine	51
Tabelle 7: Vorausgesagte Phosphorylierungsstellen der USEBPs.....	56
Tabelle 8: Charakterisierungskriterien der stabilen Zellklone.....	69

1 Einleitung

1.1 Posttranskriptionelle Prozessierung als Mechanismus der Genexpressionskontrolle

Jede menschliche Zelle enthält im Zellkern die gesamte Erbinformation, das sogenannte Genom. Jedoch unterscheiden sich die menschlichen Zellen untereinander sehr stark. Etwa 200 verschiedene Zelltypen ermöglichen das Leben und die Fortpflanzung jedes menschlichen Individuums (Mitalipov and Wolf, 2009). Wie kommt es zu der phänotypischen Vielfalt, wenn die genomische Grundausstattung in jeder Zelle die gleiche ist? Der hierfür entscheidende Prozess ist die Kontrolle der Genexpression und somit die zell- und gewebsspezifische Nutzung der genetischen Erbinformation. Die Kontrolle der Genexpression ist dabei auf mehreren Kontrollebenen regulierbar. Hierbei spielen Prozesse wie die strukturelle Aktivierung eines Gens, die Initiation der Transkription, die Prozessierung der prä-mRNA, der Transport der mRNA in das Zytoplasma sowie die Translation und der regulierte Abbau der Proteine eine wichtige Rolle (Maniatis and Reed, 2002; Moore and Proudfoot, 2009).

Noch während der Transkription wird die neu synthetisierte prä-mRNA posttranskriptionell prozessiert (schematische Darstellung der posttranskriptionellen Prozessierung siehe Abbildung 1). An das 5'Triphosphatende der prä-mRNA wird eine Methylguanosingruppe (m^7GpppG) angehängt. Dieser Prozess wird als Capping bezeichnet und schützt die RNA vor dem Abbau durch Phosphatasen und Nukleasen und erleichtert die Erkennung der RNA für das Ribosom. Ein weiterer wichtiger Prozessierungsschritt ist das Spleißen, bei dem nicht kodierende Sequenzen, sogenannte Introne, aus der prä-mRNA herausgeschnitten werden und die kodierenden Abschnitte, sogenannte Exone, fusioniert werden. Über 50% der humanen Gene werden zell- und gewebsspezifisch alternativ gespleißt (Kwan et al., 2008; Shin and Manley, 2004; Wang et al., 2008) und tragen durch die Verknüpfung unterschiedlicher Exone in signifikantem Ausmaß zu der existierenden Proteindiversität bei. Zusätzlich werden mit Ausnahme der Histon mRNAs alle eukaryotischen prä-mRNA Moleküle am 3'Ende polyadenyliert. Dabei wird das Primärtranskript zunächst gespalten und danach wird eine ca. 200-nukleotidlange Adenosinkette an das 3'Ende synthetisiert (ausführliche Erläuterung der 3'Endprozessierung siehe Kapitel 1.2). Die Polyadenylierung beeinflusst den nukleären Export, die mRNA Stabilität und Lokalisation sowie die Translationseffizienz (Lutz, 2008; Millevoi and Vagner, 2009). Nur vollständig prozessierte mRNA wird aus dem Zellkern in das Zytoplasma transportiert.

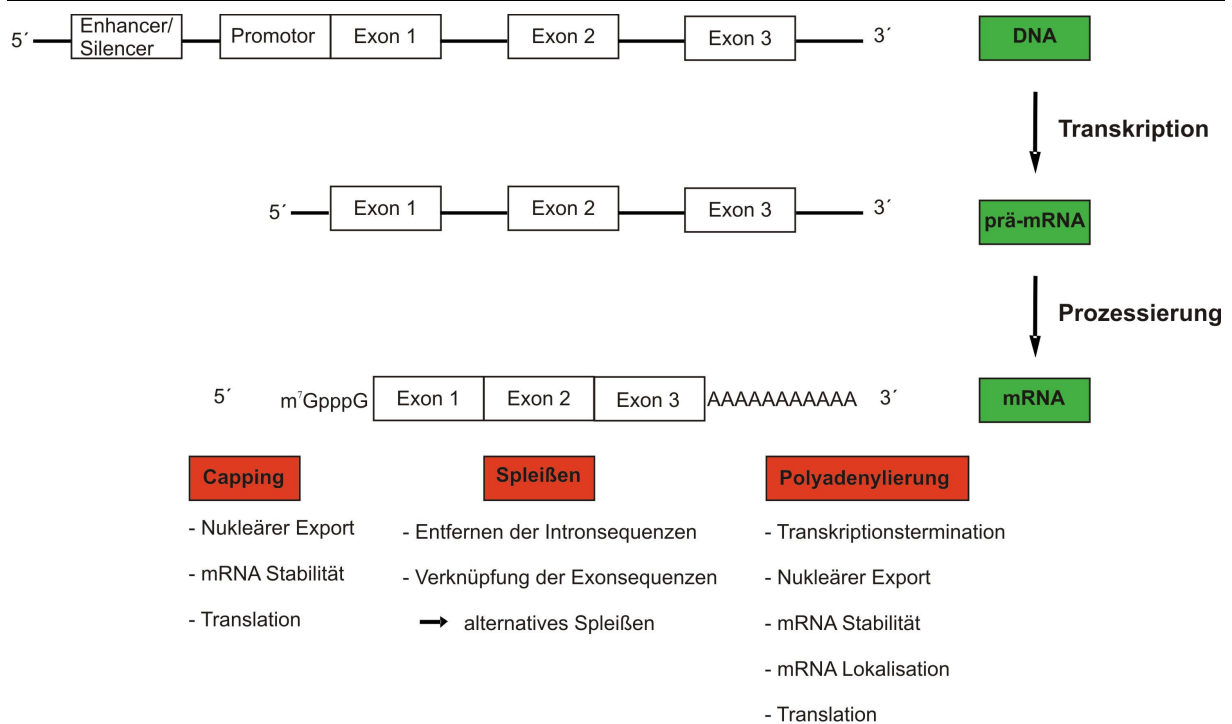


Abbildung 1: Schematische Darstellung posttranskriptioneller Modifikationen der prä-mRNA im Rahmen der Genexpression

Während der Transkription wird die prä-mRNA posttranskriptionell modifiziert. An das 5' Ende der prä-mRNA wird eine Methylguanosingruppe angehängt. Diese Modifizierung beeinflusst den mRNA Export sowie die mRNA Stabilität und Translation. Während des Spleißens werden die Introne aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die Exone miteinander verknüpft. Durch das alternative Spleißen werden verschiedene Exone miteinander verknüpft und somit die Proteindiversität enorm gesteigert. Das 3' Ende der prä-mRNA wird zuerst endonukleolytisch gespalten und anschließend polyadenyliert. Dieser Prozess beeinflusst u. a. die Transkriptionstermination und mRNA Stabilität.

Obwohl die meisten prä-mRNAs konstitutiv polyadenyliert werden (mit Ausnahme der Histon mRNAs, siehe Kapitel 1.2), ist die alternative und regulierte Polyadenylierung ein entscheidender Prozess in der Kontrolle der Genexpression. Über die Hälfte aller humanen Transkripte besitzen alternative Polyadenylierungsstellen und werden differentiell polyadenyliert (Ara et al., 2006; Beaudoin and Gautheret, 2001; Carninci et al., 2005; Edwalds-Gilbert et al., 1997; Kwan et al., 2008; Lutz, 2008; Tian et al., 2005; Wang et al., 2008; Wilhelm et al., 2008; Zhang et al., 2005). Als Konsequenz existieren mRNA Isoformen mit entweder unterschiedlich langen 3' untranslatierten Regionen (3'UTR), die ihrerseits die Stabilität, Lokalisation und Translation unterschiedlich regulieren können (Mayr and Bartel, 2009; Sandberg et

al., 2008; Wilhelm et al., 2008) oder alternativ Transkriptisoformen, die für Proteine mit unterschiedlichen C-Terminus kodieren (siehe unten Immoglobulinklassenswitch).

Ein bekanntes Beispiel für die alternative und regulierte 3'Endprozessierung ist die Bildung der schweren Kette des Immoglobulins M während der B-Zell Differenzierung. Undifferenzierte Zellen bilden die membranständige Form, wohingegen differenzierte Zellen die sezernierte Form bilden, weil die stromaufwärts gelegene Polyadenylierungsstelle genutzt wird (Takagaki et al., 1996) (siehe Abbildung 2).

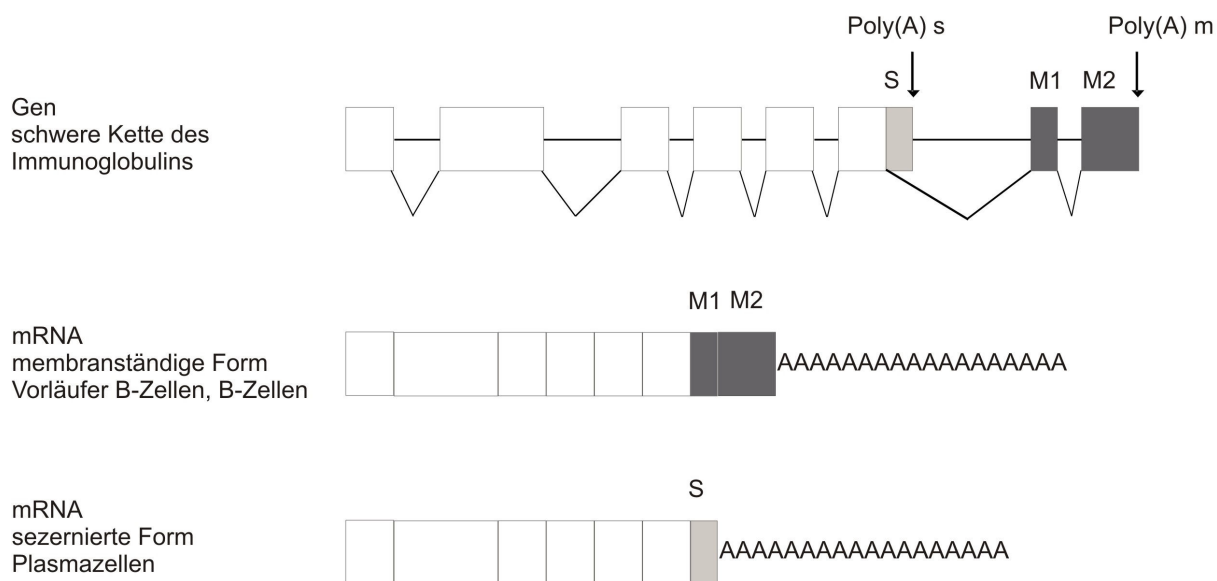


Abbildung 2: Immoglobulinklassenswitch durch alternatives Spleißen und Polyadenylierung

Während der B-Lymphozyten Differenzierung wird die Expression der schweren Kette des Immoglobulins über die alternative RNA Prozessierung reguliert. Die membranständige Form ist die längere mRNA Transkriptisoform und enthält die Exone M1 und M2 am 3'Ende, die für einen Membrananker am C-Terminus der schweren Kette kodieren. Diese mRNA wird von Vorläufer B-Zellen und B-Zellen exprimiert, wohingegen die Plasmazellen die sezernierte Form bilden. Die sezernierte Form ist die kürzere mRNA Transkriptisoform, der die kodierende Region für den Membrananker fehlt (Abbildung modifiziert nach Takagaki *et al* 1996).

Ein weiteres Beispiel für alternative und regulierte 3'Endprozessierung ist die Expression des Transkriptionsfaktors NF-ATc während der T-Zell Differenzierung. In den unreifen T-Zellen existieren zwei lange Isoformen, wohingegen eine kurze Isoform des NF-ATc in den T-Effektor Zellen vorkommt (Chuvpilo et al., 1999).

Damit erlaubt die alternative und regulierte 3'Endprozessierung die Regulation der Genexpression. Trotz der Häufigkeit der alternativen und regulierten Polyadenylierung ist bisher wenig über den 3'Endprozessierungsmechanismus in diesem Zusammenhang bekannt.

1.2 Die 3'Endprozessierung von prä-mRNAs mit kanonischen Sequenzelementen

Bis auf Histon mRNA Moleküle werden alle eukaryotischen mRNAs an ihren 3'Enden polyadenyliert. Die 3'Endprozessierung von polyadenylierten Transkripten besteht aus zwei Teilschritten, zunächst wird die prä-mRNA endonukleolytisch gespalten und anschließend polyadenyliert.

Die primären Transkripte (prä-mRNAs) enthalten zusätzlich zu den kodierenden Sequenzen auch untranslatierte und flankierende Regionen an den 3'Enden (siehe Abbildung 3a). Meist gibt es zwei essentielle cis-Sequenzelemente, je eines in der 3'untranslatierten Region (3'UTR) und in der 3'flankierenden Sequenz (3'FS) gelegen, die die 3'Endprozessierung ermöglichen. Das Poly(A) Signal besteht meistens aus der Sequenz AAUAAA und befindet sich ungefähr 10-30 Nukleotide stromaufwärts der Schnittstelle (CS). Das Poly(A) Signal interagiert mit einem multimeren Proteinkomplex (siehe Abbildung 3b), der sogenannten Spezifitätskomponente (CPSF- cleavage and polyadenylation specificity factor), die die Schnittstelle der prä-mRNA festlegt. Dieser Proteinkomplex besteht aus den fünf Untereinheiten CPSF-30, -73, -100, -160 und hFip1. Das zweite essentielle cis-Sequenzelement ist das DSE (downstream sequence element). Es befindet sich ca. 30 Nukleotide stromabwärts der prä-mRNA Schnittstelle und ist in seiner Sequenz weniger stark konserviert. Es zeichnet sich jedoch durch eine hohe Dichte an Guanin/Uridin-reichen oder Uridin-reichen Sequenzen aus. Das DSE wird von dem stimulierenden Proteinkomplex (CstF- cleavage stimulation factor) erkannt, und unterstützt die 3'Endprozessierung (siehe Abbildung 3b). Dieser Proteinkomplex setzt sich aus den drei Untereinheiten CstF-64, -50 und -77 zusammen. Die Schnittstelle der prä-mRNA befindet sich zwischen dem Polyadenylierungssignal und dem DSE meist hinter einem CA Dinukleotid. Beide Proteinkomplexe (CPSF und CstF) interagieren mit dem C-terminalen Ende der RNA Polymerase II (Pol II) und begleiten diese während der Transkription (siehe Abbildung 3b). Diese Proteinkomplexe dissoziieren von der Pol II und binden anschließend an die kanonischen 3'Endprozessierungssequenzen der prä-mRNA.

Bioinformatische Studien identifizierten zusätzlich nicht kanonische cis-agierende Hilfselemente (U-reiche und GU-reiche Elemente, UAUA, UGUA), die die Effizienz der Polyadenylierung erhöhen (Hu et al., 2005). Die stromaufwärts gelegenen Sequenzelemente (USE- upstream sequence element) des SV40, humanes Komplement C2, Kollagen, Cyclooxygenase-2 und Prothrombin stimulieren die 3'Endprozessierung (Carswell and Alwine, 1989; Danckwardt et al., 2007; Hall-Pogar et al., 2005; Moreira et al., 1995; Natalizio et al., 2002). Weitere Proteine wie CF I und CF II helfen bei der Erkennung des Poly(A) Signals und inter-

agieren mir der C-terminalen Region der RNA Polymerase II. Die endonukleolytische Spaltung wird von der Endonuklease CPSF 73 katalysiert (siehe Abbildung 3c). Die Poly(A) Polymerase (PAP) synthetisiert dann den Poly(A) Schwanz unabhängig von einer Matrize an das 3' Ende der mRNA (siehe Abbildung 3d). Das Poly(A) Bindungsprotein (PABP) assoziiert mit dem Poly(A) Schwanz und erhöht die Polyadenylierung um das ca. 80-fache. PABN1 ist nur im Zellkern an dem Poly(A) Schwanz gebunden und wird im Zytoplasma durch PABPC ersetzt. Während PABN im Nukleus die Polyadenylierung nach ca. 200 Adenosinresten beendet, erhöht PABPC die mRNA Stabilität und Translation (Übersichtsartikel siehe (Colgan and Manley, 1997; Danckwardt et al., 2006a; Lutz, 2008; Mandel et al., 2008; Millevoi and Vagner, 2009; Proudfoot, 2000; Wahle and Kuhn, 1997)).

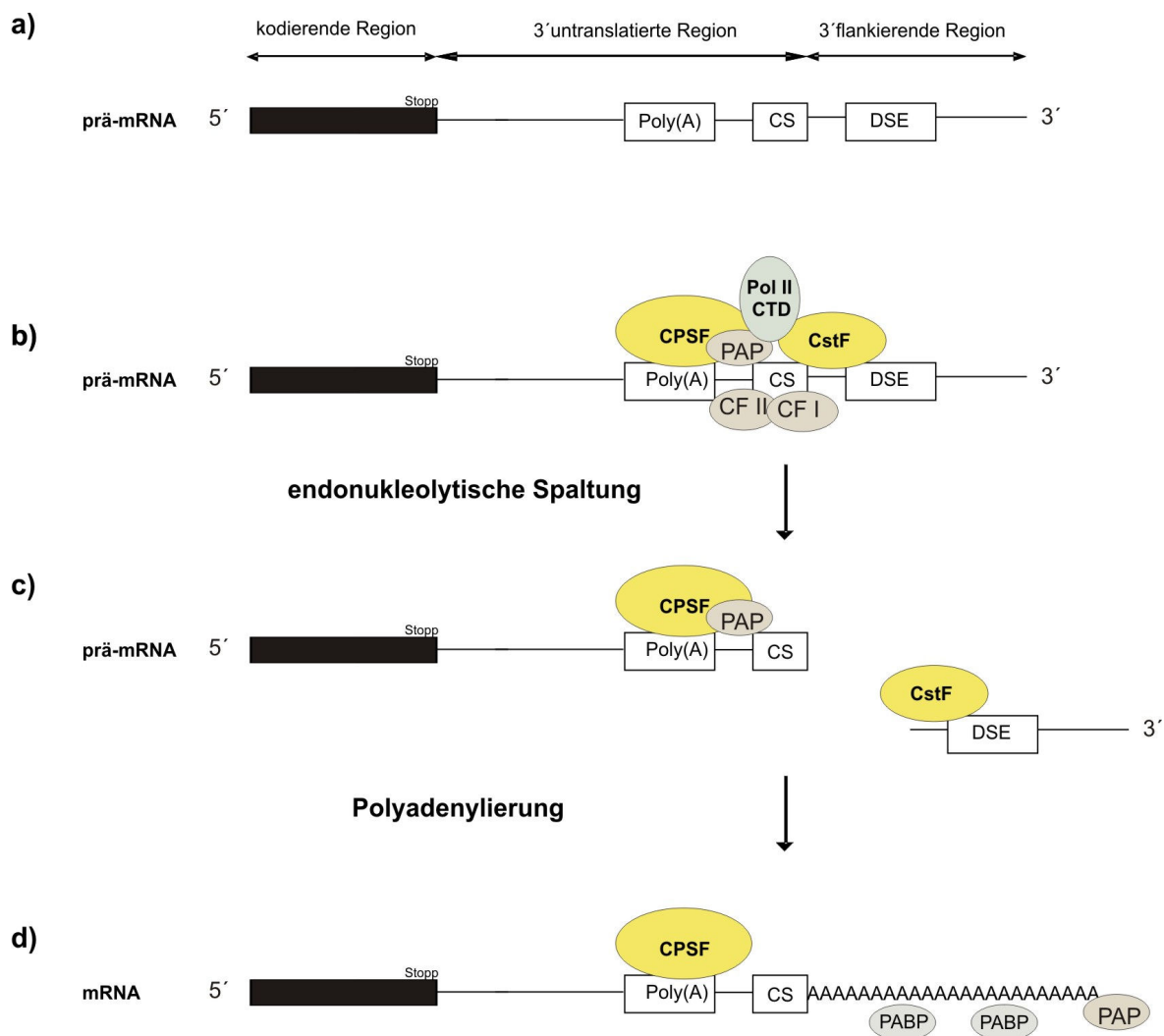


Abbildung 3: Mechanismus der 3' Endprozessierung polyadenylierter mRNAs

a) Die prä-mRNA besitzt in der 3'untranslatieren Region das Poly(A) Signal und die Schnittstelle (CS). In der 3'flankierenden Region befindet sich das stromabwärts gelegene Sequenzelement (DSE). **b)** Das Poly(A) Signal

wird von dem CPFS Proteinkomplex erkannt. Das DSE Motiv wird von dem CstF Proteinkomplex gebunden. Beide Proteinkomplexe bestimmen den Ort der 3'Endprozessierung. **c)** Die prä-mRNA wird am 3'Ende (CS) endonukleolytisch gespalten. **d)** Die Poly(A) Polymerase (PAP) synthetisiert matrizenunabhängig den Poly(A) Schwanz an das 3'Ende der mRNA. Poly(A) bindende Proteine (PABP) binden an den Poly(A) Schwanz und stoppen die Polyadenylierung nach ca. 200 Adenosinresten.

Die Bedeutung einer korrekten 3'Endprozessierung wird bei vielen humanen Erkrankungen verdeutlicht, die Fehler in diesem Prozess aufweisen. Eine Deregulierung kann sowohl durch Mutationen kanonischer RNA Sequenzelemente hervorgerufen werden, als auch durch Mutationen der trans-agierenden Proteinfaktoren (Danckwardt et al., 2008). Beispielsweise sind Mutationen in der 3'UTR des Blutgerinnungsfaktors Prothrombin (F2, Faktor II) häufig genetische Risikofaktoren für Thromboseerkrankungen (Poort et al., 1996). Die F2 20210 G → A Mutation findet sich bei ca. 1-2% der kaukasischen Bevölkerung. Heterozygote Träger der Mutation haben eine 1,3-fach höhere Prothrombin Plasmakonzentration und damit ein 3-fach höheres Risiko an Thrombose zu erkranken (Poort et al., 1996). Mechanistisch verändert die Mutation das letzte Nukleotid der F2 mRNA an dem die endonukleolytische Spaltung der prä-mRNA stattfindet. Aus einem ineffizienten CG Dinukleotid (Chen et al., 1995) wird ein effizientes CA Dinukleotid (Gehring et al., 2001) was zu einer gesteigerten Prozessierung der F2 prä-mRNA führt. Als Konsequenz kommt es zu einer vermehrten Bildung der F2 mRNA sowie einer erhöhten Proteinsynthese (Gehring et al., 2001). Eine weitere Mutation F2 20221 C → T befindet sich in der 3'flankierenden Region der Prothrombin mRNA. Diese Mutation ändert die Region dahingehend, dass ein Thymin anstatt eines Cytosins eingebaut wird, wodurch die Bindungsstelle für den CstF Proteinkomplex besser erkannt wird. Merkmalsträger besitzen ebenfalls eine erhöhte Prothrombin Plasmakonzentration. Diese Mutation prädisponiert ebenso für das Auftreten von Thrombosen (Danckwardt et al., 2004). Diese Studien illustrieren, dass Effizienzveränderungen der 3'Endprozessierung der F2 mRNA (von 1,3-1,8-fach) in bedeutendem Ausmaß Krankheitsrelevanz haben.

1.3 Ein nicht kanonisches Sequenzelement stimuliert die 3'Endprozessierung der Prothrombin mRNA

Der Vergleich der sehr effizient 3'endprozessierten humanen β-Globin (HBB) prä-mRNA mit der weniger effizient 3'endprozessierten Prothrombin (F2) prä-mRNA zeigt Sequenzunterschiede sowohl in der 3'untranslatierten als auch 3'flankierenden Region (siehe schema-

tische Darstellungen und Sequenzen in der Abbildung 4). Die F2 prä-mRNA besitzt ein CG Dinukleotid an dem Ende der 3'UTR, wohingegen die HBB prä-mRNA ein effizientes CA Dinukleotid besitzt (Chen et al., 1995). Somit unterscheiden sich die Schnittstellen der beiden prä-mRNAs. Ein weiterer Unterschied betrifft das DSE Motiv. Die 3' flankierende Region der F2 prä-mRNA erscheint eher G/U-arm, wohingegen die HBB prä-mRNA ein G/U-reiches Sequenzelement trägt. Es ist bekannt, dass das DSE Motiv nachhaltig die 3'Endprozessierung fördert (Übersichtsartikel siehe (Colgan and Manley, 1997; Lutz, 2008; Mandel et al., 2008; Millevoi and Vagner, 2009; Proudfoot, 2000; Wahle and Kuhn, 1997)) und das CA Dinukleotid am effizientesten geschnitten wird (Chen et al., 1995), was damit die effiziente Prozessierung der HBB prä-mRNA erklärt. Interessanterweise befindet sich stromaufwärts des Polyadenylierungssignals (-33 bis -17 Nukleotide) eine auffallend U-reiche Region in der F2 prä-mRNA. Dieses USE Motiv (upstream sequence element) (Danckwardt et al., 2004) ist nicht in der HBB prä-mRNA zu finden.

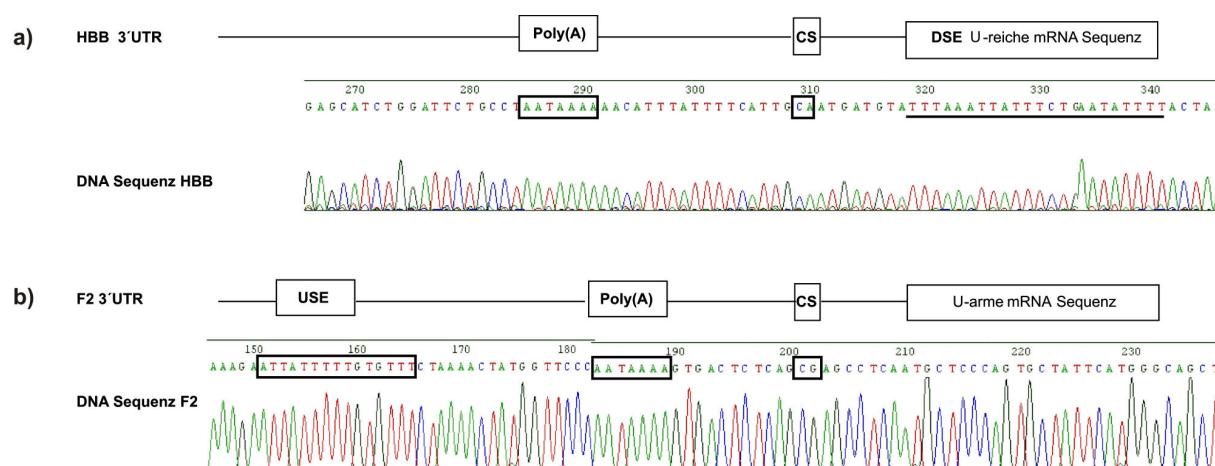


Abbildung 4: Vergleich der 3'untranslatierten und 3'flankierenden Sequenzen der HBB und F2 prä-mRNA

Diese Abbildung enthält sowohl schematische Darstellungen der prä-mRNAs als auch DNA Sequenzen der 3'untranslatierten und 3'flankierenden Region des HBB und F2 Gens. **a) HBB:** In der 3'UTR befindet sich das Poly(A) Signal und die Schnittstelle (CS). In der 3'flankierenden Region befindet sich das DSE. **b) F2:** Diese Abbildung zeigt die ungewöhnliche Architektur von F2 prä-mRNA. Die F2 prä-mRNA besitzt ein stromaufwärts gelegenes Sequenzelement (USE), das Uridin-reich ist und die Schnittstelle befindet sich nach einem GC Dinukleotid. Des Weiteren ist die stromabwärts gelegene Region Uridin- oder Guanin/Uridin-arm.

Funktionelle Studien identifizierten das USE Motiv als eine Sequenz, die die 3'Endprozessierung der F2 mRNA spezifisch stimuliert. Mutationen der USE-Sequenz führen

zu einer signifikanten Reduktion der 3'Endprozessierung. Neben der konservierten Sequenz des F2 USE, existiert zudem auch ein positioneller Effekt. Je näher sich das USE Motiv an dem Polyadenylierungssignal befindet, desto effizienter wird die prä-mRNA prozessiert. Die Effizienz der 3'Endprozessierung ist hingegen deutlich verringert, wenn das USE Motiv weiter stromaufwärts des Polyadenylierungssignals verschoben ist. Das F2 USE Motiv kompensiert somit die ineffiziente Schnittstelle und das Fehlen des DSE und stimuliert die 3'Endprozessierung (Danckwardt et al., 2007).

Vorherige Affinitätsaufreinigungen mit anschließender Massenspektrometrie identifizierten Spleißfaktoren (hnRNPI, U2AF35, U2AF65, PSF, DHX15 und Raver1) sowie Proteine des 3'Endprozessierungsapparates (CPSF160, CPSF100, CstF77, CstF64, CstF50 und p54nrb) die mit dem USE Motiv der F2 mRNA interagieren (siehe

Abbildung 7a und b) (Danckwardt et al., 2007). In funktionellen Analysen konnte der stimulierende Einfluss der Spleißfaktoren hnRNPI, U2AF35 und U2AF65 auf die F2 3'Endprozessierung gezeigt werden (im Weiteren werden diese Proteine in Bezug auf deren Rolle in der 3'Endprozessierung neutral als „positive USE-Effektorproteine“ bezeichnet, um sprachliche Verwirrung zu vermeiden).

Der USE Ribonukleoprotein Komplex interagiert mit dem kanonischen 3'Endprozessierungsapparat (CPSF und CstF) (Modell siehe Abbildung 5) und stimuliert so die 3'Endprozessierung (Blechingberg et al., 2007; Danckwardt et al., 2007; Gu and Schoenberg, 2003; Hall-Pogar et al., 2007; Hamon et al., 2004; Ko and Gunderson, 2002; Le Sommer et al., 2005; Lou et al., 1999; Millevoi et al., 2009; Millevoi et al., 2002; Millevoi et al., 2006; Moreira et al., 1995).

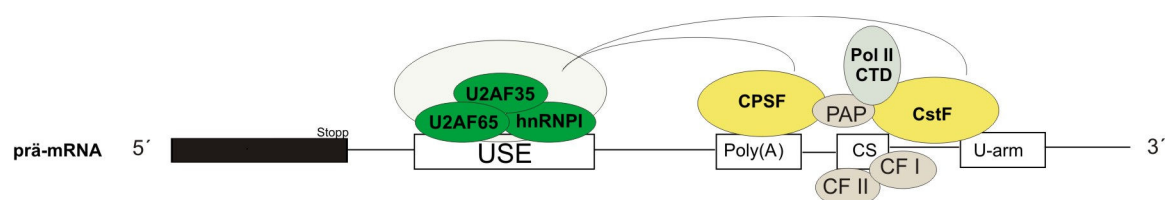


Abbildung 5: Modell der USE-abhängigen RNA Prozessierung an einem nicht kanonischen 3'Endprozessierungssignal, wie dem der F2 prä-mRNA

Die positiven USE-Effektorproteine hnRNPI, U2AF35 und U2AF65 binden an das USE Motiv der Prothrombin mRNA und sind essentiell für die 3'Endprozessierung. Des Weiteren interagieren die kanonischen

3'Endprozessierungsfaktoren (CPSF und CstF) mit dem USE. Der USE Ribonukleoproteinkomplex stabilisiert die RNA Interaktion der Proteinkomplexe CPSF und CstF in der Nähe der Schnittstelle (Abbildung modifiziert nach Danckwardt *et al* 2007).

Sequenzvergleiche zeigten, dass das F2 USE Motiv bei höheren Eukaryoten in der 3'UTR hoch konserviert ist (Danckwardt *et al.*, 2007). Des Weiteren ist die nonamerische Kernsequenz (TATTTTTGT) des USE Motivs (ATTATTTTTGTGTTT) in etwa 6% der humanen Gene vorhanden und zudem häufig nahe am 3'Ende der mRNA lokalisiert (siehe Abbildung 6). Diese Daten deuten auf eine allgemeine und nicht nur prothrombinspezifische Funktion in der Regulation der 3'Endprozessierung hin (Danckwardt *et al.*, 2007). Somit stellt die Prothrombin mRNA einen Prototyp für eine USE-abhängige 3'Endprozessierung dar.

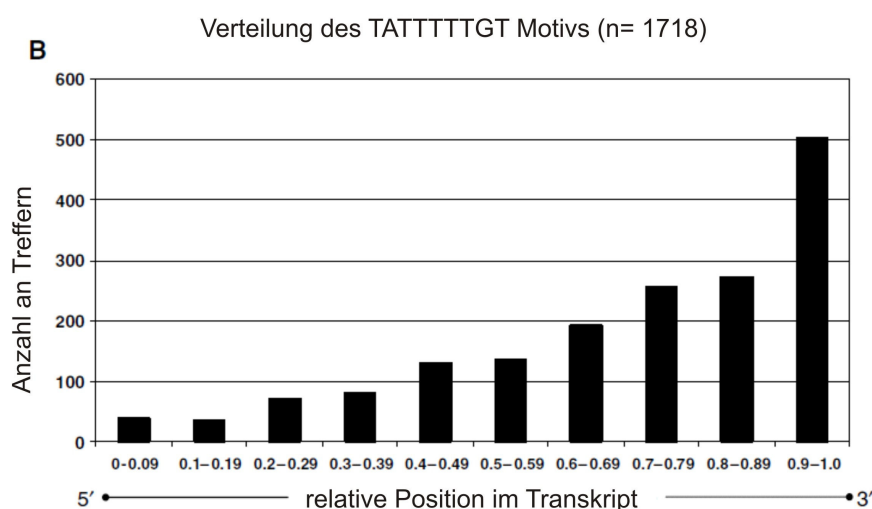


Abbildung 6: Die nonamerische Kernsequenz des USE Motivs befindet sich häufig nahe am 3'Ende der mRNA

Sequenzsuchalgorithmen identifizierten die nonamerische Kernsequenz des USE Motivs in über 1700 Genen. Die Anzahl der Treffer ist in Bezug zu deren Lokalisation in der mRNA dargestellt (X-Achse des Balkendiagramms ist von rechts nach links in der 5' zu 3' mRNA Orientierung eingeteilt) (Abbildung modifiziert nach Danckwardt *et al* 2007).

Interessanterweise identifizierten Affinitätsaufreinigung und anschließende Massenspektrometrie weitere USE bindende Proteine (siehe

Abbildung 7A und B), nämlich FBP1, FBP2, FBP3, TIA, TIAR, CUGBP und HUR. Diese Proteine gehören zu den AU-reichen elementbindenden Proteinen (ARE-BP). In der

Abbildung 7A und B ist zu erkennen, dass die ARE-BPs mit einer hohen Affinität (500-2000 mM NaCl, siehe Spuren 1, 4 und insbesondere Spur 7) und Spezifität (keine Interaktion mit der infunktionellen Dreifachmutante USEmut, siehe Spuren 2, 5 und 8 und einer nicht USE verwandten Sequenz Unrel, siehe Spuren 3, 6 und 9) an das USE Motiv binden.

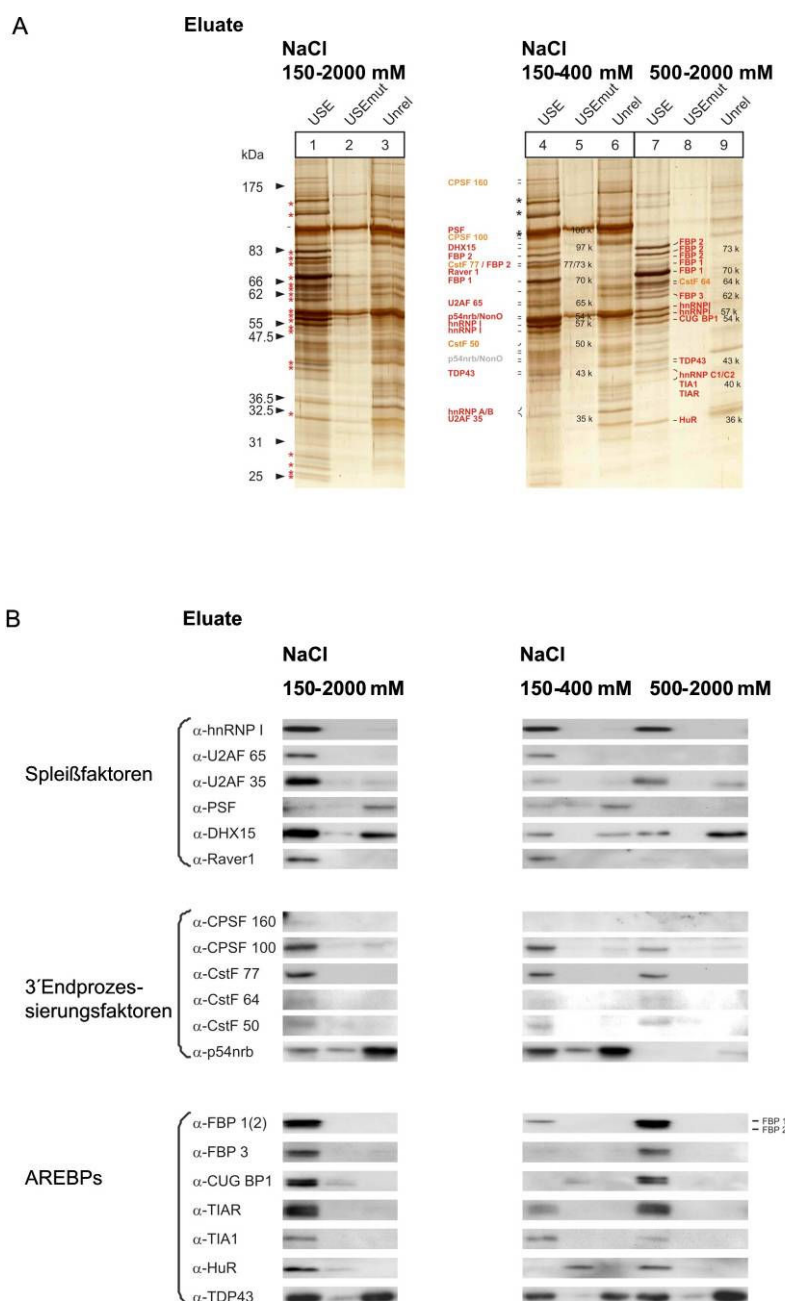


Abbildung 7: Interaktionspartner des F2 USE Motivs

A) Silbergefärbtes Polyacrylamidgel zeigt USE bindende Proteine nach Affinitätsaufreinigung (siehe Spuren 1, 4 und 7). Nichtfunktionelle USE Sequenzen (USEmut und Unrel) dienen zur Spezifitätskontrolle (Spur 2&3, 5&6, 8&9). Spuren 1-3 zeigen Proteinproben, die bei einer Salzkonzentration von 150-2000 mM eluiert wurden. Spuren 4-6 zeigen Proteininteraktionen, die bei einer niedrigen Salzkonzentration (150-400 mM) eluiert wurden.

In den Spuren 7-9 sind hochaffine Proteininteraktionen zu sehen, die erst bei höheren Salzkonzentrationen eluiert wurden (500-2000 mM). **B)** Western Blots der affinitätsaufgereinigten Eluate bestätigen die Identität der Proteine, die in der Massenspektrometrie ermittelt wurden und belegen die spezifische, hochaffine Bindung von hnRNPI, U2AF65, U2AF35, Raver, CPSF (160, 100), CstF (77, 64, 50), FBP1, FBP2, FBP3, CUG-BP1, TIAR, TIA und HuR an das USE, wohingegen die Proteine PSF, DHX15, p54nrb und TDP43 auch an die nichtfunktionellen USE-Sequenzen binden (Abbildung aus Danckwardt & Gantzer *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das USE Motiv der Prothrombin mRNA die 3'Endprozessierung erhöht (Danckwardt *et al.*, 2007). Die positiven USE-Effektorproteine hnRNPI, U2AF35 und U2AF65 stimulieren die Polyadenylierung, indem sie mit den kanonischen 3'Endprozessierungsapparat interagieren (Danckwardt *et al.*, 2007). Des Weiteren wurden AU-reiche elementbindende Proteine an dem USE Motiv identifiziert (siehe hierzu Kapitel 1.4). Bisher ist deren Funktion bzgl. der Regulation der 3'Endprozessierung noch nicht beschrieben worden.

1.4 Die ARE-BPs integrieren extrazelluläre Signale und regulieren somit die Genexpression

Ca. 5-8% der humanen Transkripte besitzen AU-reiche Elemente (AREs) in ihren 3'UTR Sequenzen (Bakheet *et al.*, 2003). Dazu gehören meist mRNA Transkripte mit kurzen Halbwertszeiten wie Zytokine, Proto-Onkogene oder Wachstumsfaktoren (Frevel *et al.*, 2003). An diese ARE-haltigen mRNAs binden Proteine (sogenannte „ARE-BPs“ für *AU-rich element binding proteins*), die sowohl stabilisierend (z.B. HUR, HUD) als auch destabilisierend (z.B. FBP2, CUGBP, TTP, Hsp70, TIA, TIAR) auf die mRNA Transkripte wirken können (Bevilacqua *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2004; Garneau *et al.*, 2007; Wilusz and Wilusz, 2004). Letzteres resultiert aus der Rekrutierung der mRNA Abbau-Maschinerie, z.B. des Exosoms an das Transkript (Briata *et al.*, 2005).

Die Wirkung der ARE-BPs auf die mRNA Transkripte kann über Signalwege reguliert werden. Die Zellen können damit extra- und intrazelluläre Signale integrieren und somit die mRNA Abbauraten an physiologische Prozesse wie Zellwachstum, Zelldifferenzierung oder Immunantwort anpassen (Bevilacqua *et al.*, 2003; Briata *et al.*, 2005; Dean *et al.*, 2004; Frevel *et al.*, 2003; Garneau *et al.*, 2007; Wilusz and Wilusz, 2004). p38 und die c-Jun N-terminale/stressaktivierte Protein Kinase (JNK/SAPKs) werden hauptsächlich über Stress (Osmotischer Schock, Hypoxie, Hitzeschock, oder durch proinflammatorische Stimuli bzw.

Zytokine) aktiviert. Beide Kinasen gehören zusammen mit der extrazellulär regulierten Kinase (ERK) zu der mitogenaktivierten Protein-Kinase (MAPK) Kaskade (Ashwell, 2006).

Es konnte gezeigt werden, dass FBP2 über die Aktivierung des p38 Signalweges posttranslational modifiziert wird und sich somit dessen RNA Bindungsaffinitäten verändert. Die Komposition des Proteinkomplexes auf der RNA (sog. Ribonukleoproteinkomplex) kann somit reguliert werden, was letzten Endes die Stabilität von entsprechenden ARE-haltigen RNAs beeinflusst (Briata et al., 2005; Dean et al., 2004; Frevel et al., 2003; Garneau et al., 2007).

Das hochaffine Binden der ARE-BPs an das F2 USE Motiv sowie deren Fähigkeit extrazelluläre Signale zu integrieren (über die Regulation ihrer RNA Bindungsaffinität) könnte auf eine posttranskriptionelle Regulation der Prothrombin Expression hindeuten, die über die 3'Endprozessierung gesteuert wird (siehe detailliert im folgenden Kapitel).

1.5 Fragestellung

Zusammengefasst wurde in den vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe die Prothrombin 3'UTR genauer charakterisiert (siehe Kapitel 1.3). Dabei wurde ein nicht kanonisches Sequenzelement identifiziert, welches sequenz- und positionsabhängig die 3'Endprozessierung stimuliert. An das USE binden diverse Proteine und bilden somit einen spezifischen Ribonukleoproteinkomplex. Die sonst als Spleißfaktoren bekannten Proteine (U2AF35, U2AF65, hnRNPI) stimulieren die 3'Endprozessierung der Prothrombin mRNA, indem sie mit dem kanonischen 3'Endprozessierungsapparat (CPSF und CstF) interagieren und dessen Binden auf der RNA wahrscheinlich stabilisieren (Danckwardt et al., 2007).

Des Weiteren wurden AU-reiche elementbindende Proteine (ARE-BPs) als hochaffine und hochspezifische trans-agierende Proteine an dem USE Motiv identifiziert, deren potentielle Rolle in der 3'Endprozessierung bisher weder beschrieben noch analysiert wurde. Bisher ist bekannt, dass ARE-BPs extrazelluläre Signale integrieren und somit die Genexpression regulieren (siehe Kapitel 1.4). Es stellte sich die Frage, ob extrazelluläre Signale die Komposition des Ribonukleoproteinkomplexes modulieren und darüber die 3'Endprozessierung der F2 mRNA regulieren (siehe Abbildung 8).

Dieser Arbeit lag die grundlegende Hypothese zugrunde, dass beide Gruppen (positive USE-Effektorproteine und ARE-BPs) sich zueinander antagonistisch verhalten und damit die USE Ribonukleoprotein Komposition über die Effizienz der 3'Endprozessierung entscheidet. Es ist

bereits bekannt, dass eine Stressinduktion über die Aktivierung des p38 Signalweges einige ARE bindende Proteine posttranslational modifiziert und somit deren Bindungsaffinität zu dem USE Motiv reduziert (Briata et al., 2005; Dean et al., 2004; Frevel et al., 2003). In Analogie hierzu könnten somit nach Stressinduktion die positiven USE-Effektorproteine vermehrt an das USE Motiv binden und damit die Effizienz der 3'Endprozessierung steigern (Abbildung 8).

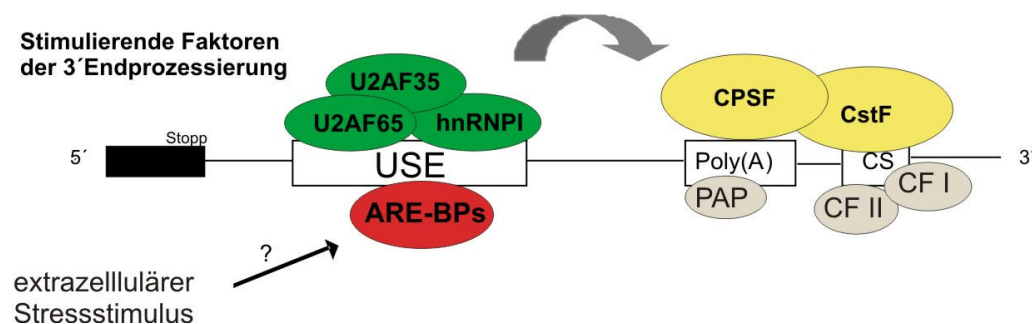


Abbildung 8: Arbeitshypothese wonach die RNP Formation am USE Motiv der Prothrombin mRNA über extrazelluläre Signale reguliert werden könnte

AU-reiche elementbindende Proteine (ARE-BPs- rot) binden mit hoher Affinität und Spezifität an das F2 USE Motiv. Diese Proteinfamilie integriert üblicherweise extrazelluläre Signale, die deren Bindungsaffinität modifizieren. Darüber könnte das Binden positiver USE-Effektorproteine (grün) moduliert und infolgedessen die 3'Endprozessierung der F2 mRNA stressabhängig reguliert werden.

Global betrachtet könnte das USE Motiv zudem ein generelles regulatorisches Element der 3'Endprozessierung sein, da dieses in ca. 6% aller humanen Gene vorkommt. In Analogie zu regulatorischen Elementen, die das Spleißen regulieren (Shin and Manley, 2004) könnten extrazelluläre Stimuli somit die Genexpression über die 3'Endprozessierung regulieren.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte daher in biochemischen Studien die dynamische Proteinkomplexkomposition stellvertretend am F2 USE untersucht werden. Zusätzlich sollte überprüft werden, in wieweit Stress einige der bereits identifizierten USE-bindenden Proteine posttranslational modifiziert und dadurch deren RNA Bindungsaffinität beeinflusst (siehe Kapitel 4.1). In einem zweiten Projekt sollten stabil transfizierte Reporterzelllinien generiert werden, um die physiologische Relevanz einer etwaig dynamisch modulierten USE-RNP-Komplexkomposition im Hinblick auf regulierte 3'Endprozessierung *in vivo* zu messen (siehe Kapitel 4.2).

2 Material

2.1 Chemikalien

2-Propanol	Roth
6- Aminohexansäure	Merck
Acetonitril	Roth
BES	Sigma
Borsäure	Roth
Bromphenolblau	Serva
Dinatriumhydrogensulfat	Merck
EDTA	Roth
Essigsäure	Roth
Ethanol	Roth
Formaldehyd	Merck
Formamid	Sigma
Glycerol	Roth
Gycin	Roth
Harnstoff	Roth
HEPES	Sigma
Methanol	Roth
MOPS	Sigma
Natrium Dodecylsulfat	Serva
Natriumacetat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumfluorid	Sigma
Natriumhydroxid	Roth
Natriumorthovanadat	Sigma
Natriumpyruvat	Sigma
NP-40	Fluka
Rotiphorese (30% Acrylamid)	Roth
Salzsäure	Roth
SDS	Roth
TEMED	Roth
Tri [®] Reagent LS (Trizol)	Sigma

Trichlormethan/Chloroform	Roth
Trinatriumzitat	Merck
Tris-Base	Sigma
Tween 20	Gerbu
β -Mercaptoethanol	Sigma

2.2 Molekularbiologische und biochemische Reagenzien

Adenosin 5' triphosphat ($\gamma^{32}\text{P}$)	PerkinElmer
Agarose	Biozym
Albumin, Huhn	Sigma
Alkalische Phosphatase	Roche
Ampicillin	Grünenthal
Anisomycin	Calbiochem
Anti Flag M2 Affinity Gel	Sigma
Aqua	Braun
Bacto Yeast Extract	Difco, Detroit, USA
Bacto-Agar	Difco, Detroit, USA
Bacto-Tryptone	Difco, Detroit, USA
BSA	Roth
Chromatographiepapier	Roth
Complete	Roche
DNA Ladepuffer	Fermentas
DNA Leiter	Fermentas
DNA Methylase	Invitrogen
dNTPs	Roth
DTT	Promega
ECL Western Blot Detektionsreagenz	Amersham Biosciences
Ethidiumbromid	Roth
Flag [®] Peptid	Sigma
Geneticin	GIBCO
Glykogen	Roche
Guanin 5' triphosphat ($\alpha^{32}\text{P}$)	PerkinElmer
High Fidelity DNA Polymerase	Invitrogen

Hyperfilm™ ECL	Amersham
Milchpulver	Sucofin
Nitrocellulosemembran	Schleicher&Schuell
Nylonmembran	Schleicher&Schuell
Orthophosphate ($\gamma^{32}\text{P}$)	PerkinElmer
Pfu DNA Polymerase	Stratagene
Phusion Polymerase	Finnzymes
Platinum® Tac DNA Polymerase High Fidelity	Invitrogen
Protein Marker	Fermentas
Reverse Transkriptase	Roche
Ribonukleotide	Roche
RNasin®	Promega
SP6 RNA Polymerase	Roche
T4 DNA Ligase	Promega
T4 Polynukleotid Kinase	New England BioLabs
Taq DNA Polymerase	New England BioLabs
TRI® Reagent	Sigma
tRNA/Hefe	Sigma

Alle Restriktionsenzyme wurden von dem Hersteller New England Biolabs (NEB) bezogen.

2.3 Antikörper

Tabelle 1: Übersicht der verwendeten Antikörper

Artikelbezeichnung	Verdünnung	Verdünnungsmedium	Hersteller
Anti-Flag	1:10.000	5 % Magermilch	Sigma
Anti-phospho-p38 (pThr180/ pTyr182)	1:1.000	5 % Magermilch	Sigma
Anti-Rabbit IgG	1:10.000	5 % Magermilch	Sigma
Anti-Goat/Sheep IgG	1:10.000	5 % Magermilch	Sigma
Anti-p38 α MAP Kinase	1:1.000	5 % Magermilch	Cell Signaling
Anti-phospho-ATF-2 (Thr71)	1:1.000	5% Rinderserumalbumin	Cell Signaling

2.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden bei den Firmen Sigma und Operon bezogen.

Tabelle 2: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für PCR und Sequenzierung

#	Gen/Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5' zu 3'
1	Anchor-oligoA antisense	TTGTGATTGTGTTGGCG(T)16A
2	Anchor-oligoC antisense	TTGTGATTGTGTTGGCG(T)16C
3	Anchor-oligoG antisense	TTGTGATTGTGTTGGCG(T)16G
4	Anchor-PCR antisense	TTGTGATTGTGTTGGCGTC
5	GAPDH sense	TGAGCTTGACAAAGTGGTCCG
6	GAPDH antisense	GGCTCTCCAGAACATCATCC
7	Seq-pCI antisense	TGCATTCTAGTTGTGGTTTGTGTC
8	β -Globin antisense I	TCCCAAGGTTTGAAGTACTAGCTCTTC
9	β -Globin antisense II	CTTGTGCACAGTGCAGCTCA
10	β -Globin sense I	CTCCTGGGCAACGTGCTGGTCTG
11	β -Globin sense II	ACCTGACTCCTGAGGAGAA
12	β -Globin sense III	CTGCTGGTGGTCTACCCTTTGGACC

Tabelle 3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für quantitative real-time PCR

#	Gen/Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5' zu 3'
13	p54nrb sense	TCATTGTGGATGATCGAGGA
14	p54nrb antisense	CAGGACGAGGAAATGTGGTT
15	CstF2 sense	CAATGCTGCCAGTAAAAGA
16	CstF2 antisense	CCTGGGGACTATTCTGGACA
17	CstF1 sense	ACTCGGAATGGAAAACGATG
18	CstF1 antisense	GGCCAACATCCTCTCTGTGT
19	CPSF1 sense	GCGGCTTCCTGTACTTCAAC
20	CPSF1antisense	TCCACGTGGTAAGCCACATA

Tabelle 4: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für Klonierung

#	Gen/Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5' zu 3'
21	U2AF35 sense	AGATCCGCTCGAGGCGGAGTATCTGGCCTCCATC
22	U2AF35 antisense	AAACCTCTAGATCAGAATCGCCCAGATCTTTCACG
23	U2AF65 sense	AGATCCGCTCGAGTCGGACTTCGACGAGTTTCGAGC
24	U2AF65 antisense	AAACCTCTAGACTACCAGAAGTCCCGGCGGTG
25	hnRNP1 sense	AGATCCGCTCGAGGACGGCATTGTCCCAGATATAGCC
26	hnRNP1antisense	AAACCTCTAGACTAGATGGTGGACTTGGAGAAGG
27	FBP1 sense	AGATCCGCTCGAGGCAGACTATTCAACAGTGCCTCCCCCT
28	FBP1antisense	AAACCTCTAGATTATTGGCCCTGAGGTGCTGGAGGATGC
29	FBP2 sense	AGATCCGCTCGAGTCGGACTACAGCACGGGAGGACCC
30	FBP2antisense	AAACCTCTAGATCATTGAGCCTGCTGCTGTCCCTGC
31	FBP3 sense	AGATCCGCTCGAGGCGGAGCTGGTGCAGGGGCGAGAGCGC
32	FBP3 antisense	AAACCTCTAGACTACTGCTCCTGGCTGTGGCCCTGCCG
33	CUG-BP sense	AGATCCGCTCGAG AA CGGCACCCTG GACCACCCAG
34	CUG-BP antisense	AAACCTCTAGATCAGTAGGGCTTGTGCTGCTATTCTTCG
35	HUR sense	AGATCCGCTCGAGTCTAATGGTTATGAAGACCACATGG
36	HUR antisense	AAACCTCTAGA TTATTTGTGGGACTTGTGGTTTTGAAGG

Tabelle 5: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide für Mutagenese

#	Gen/Orientierung	Oligonukleotidsequenz 5' zu 3'
37	TIAR sense	TGCCATTGTTTCGGTGAACGGTACTACGATTGAA
38	TIAR antisense	TTCAATCGTAGTACCGTTCCACCGAAACAATGGCA
39	HUR sense	GGCTCCC GCGGACCATGACCCAGAAGGACGTAGA
40	HUR antisense	TCTACGTCCTTCTGGGTCATGGTCCGCGGGAGCC
41	CUGBP sense I	TGCAATGCAGTTACAGAATTTGGCTGCACTAGCT
42	CUGBP antisense I	AGCTAGTGCAGCCAAATTCTGTAAGTGCATTGCA
43	CUGBP sense II	TCAGCGTGCTCACTAGTTCAGGGTCCCTCACCTAGCT
44	CUGBP antisense II	AGCTAGGTGAGGACCCTGAACTAGTGAGCACGCTGA
45	CUGBP sense III	AGGCCCTCACTCAGGCCTACTCGGGTATCCAGCAATAT
46	CUGBP antisense III	ATATTGCTGGATACCCGAGTAGGCCTGAGTGAGGGCCT
47	TIA sense	TGGTGATCTCAGCCCACAAATTACAAGTGAAGATATA
48	TIA antisense	TATATCTTCAGTTGTAATTTGTGGGCTGAGATCACCA
49	USEx	CCATAGTTTTAGGCGCTCTCGTTCGTTCTTTCACGGG

2.5 Lösungen/Puffer

Bezeichnung	Zusammensetzung
10% Polyacryamidgel	10% Rotiphorese, 1 M Tris, pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,0001% APS, 0,0004% TEMED
12% Polyacryamidgel	12% Rotiphorese, 1 M Tris pH 8,8, 0,1 % SDS, 0,001% APS, 0,0004% TEMED
Anodenpuffer	25 mM Tris
Church Puffer	0,5 M Na ₂ HPO ₄ *2H ₂ O, 1 M EDTA, 7% SDS, pH 7,2
Elutionspuffer	Waschpuffer II und 200 µg/ml Flag [®] Peptid
Hybridisierungspuffer	20 mM Hepes pH 8,0, 20% Glycerol, 0,2 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,01% NP-40 and 0,15 µg/µl tRNA, 250 mM NaCl,
Kathodenpuffer	25 mM Tris, 40 mM 6 Aminohexansäure, 0,01% SDS
Lämmli-puffer	20 mM Tris, 190 mM Glycin, 0,1 % SDS
LB-Agarplatten	10 g NaCl, 10 g Bacto Tryptone, 5 g yeast extract, 15 g Agar in 1 l dH ₂ O gelöst, autoklaviert und 1,2 g Ampicillin Natriumsalz + H ₂ O dazugeben
Luria-Bertani Medium	5 g NaCl, 5 g Bacto Tryptone, 2,5 g yeast extract in 500 ml dH ₂ O gelöst
MOPS-Puffer pH 8.0 (10 x)	0,2 M MOPS, 80 mM Natriumazetat, 10 mM EDTA, pH 7,0
Proteinladepuffer (6x)	2,8 M Tris-Cl/0,1 SDS pH 6,8, 33% Glycerol, 0,35 M SDS, 0,65 M DTT, 1,7 mM Bromphenolblau
Ripalysepuffer	150 mM Natriumchlorid, 20 mM TrisCl pH 7.4, Complete (Proteaseinhibitor), 1% NP-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1% SDS, 25 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumorthovanadat, 2 mM Natriumpyruvat
RNA Ladepuffer	50% Glycerol, 1 mM EDTA, 0,25% Brompholblau
Sammelgel	5,1% Rotiphorese, 1M Tris, pH 6,8, 0,1% SDS, 0,001% APS, 0,001% TEMED
SSC (20x)	3 M NaCl, 0,3 M Trisnatriumcitrat, pH 7,0
TBE	90 mM Tris, 80 mM Borsäure, 5 mM EDTA
TBS	140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 25 mM Tris, pH 7,4, autoklaviert
TBS-Tween	140 mM NaCl, 20mM Tris-Cl pH 7,5, 0,1% Tween 20
Waschpuffer I	150 mM Natriumchlorid, 50 mM TrisCl, 0,5% NP-40, Complete (Proteaseinhibitor), 25 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumorthovanadat, 2 mM Natriumpyruvat
Waschpuffer II	9 mM Hepes pH 8,0, 9% Glycerol, 0,09 mM EDTA, 0,05 mM DTT, 0,005% NP-40, Complete (Proteaseinhibitor), 25 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumorthovanadat, 2 mM Natriumpyruvat

2.6 Medien/Lösungen in der Zellkultur

DMEM ohne Phosphat	MP, Biomedicals
DMEM	Gibco
DMSO	Serva
FCS	Gibco
Geneticin	PAA
Lipofectamin	Invitrogen
Optimem	Gibco
PBS	PAA
Penicillin/Streptomycin	PAA
Trypsin	PAA

2.7 Kits

Amicon [®] Ultra 0.5 mL Centrifugal Filters	Millipore
Bio-Spin [®] Chromatografie Säulen	BIO-RAD
GeneTailor [™] site directed mutagenesis system	Invitrogen
NucleoBond Xtra Midi	Macherey-Nagel
NucleoSpin Extract II	Macherey-Nagel
NucleoSpin Plasmid	Macherey-Nagel
PCR Optimizer [™] Kit	Invitrogen
ProQ Diamond Phosphoprotein Gel Stain	Invitrogen
QIAquick [®] PCR Purification	Qiagen
SilverQuest Silver Staining Kit	Invitrogen
Sypro Ruby Protein Gel Stain	Invitrogen

2.8 Kunststoffwaren

Sämtliche Kunststoffwaren für experimentelle Arbeiten in den Bereichen Molekularbiologie, Proteinbiochemie und Zellkultur wurden von den Firmen Eppendorf, Falcon und Sarstedt bezogen.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologie

3.1.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Elektrophorese werden DNA Fragmente entsprechend ihrer Größe in einem Agarosegel aufgetrennt. Große DNA Fragmente wandern aufgrund ihres höheren Widerstandes langsamer durch die Poren des Gels als kleine DNA Fragmente. Die verwendeten Agarosekonzentrationen lagen zwischen 0,7 - 2%, entsprechend dem gewünschten Auflösungsvermögen. Mit 2%igen Gelen können niedermolekulare Fragmente präzise aufgetrennt werden z.B. die Produkte der Poly(A) Schwanz Test PCR (siehe Kap. 3.1.2.2). Mit 0,7 %igen Gelen können hingegen hochmolekulare Fragmente optimal voneinander getrennt werden, z.B. die Produkte eines Restriktionsverdau während der Klonierung der USEBPs (insetierte Fragmente der Größen 980-2100 bp sowie der geöffnete Vektor pCI-neo mit 5400 bp).

Die Herstellung eines Agarosegels erfolgt immer nach dem gleichen Grundprinzip. Die eingewogene Agarosemenge wird mit dem 1x TBE Puffer aufgekocht und somit gelöst. Danach wird für die Erkennung der DNA Ethidiumbromid [35 µg/100 ml] hinzugeben bevor die flüssige Agarose in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen wird. Sobald die Agarose erstarrt ist, kann das Gel in die Gelelektrophoresekammer gelegt werden, welche mit 1x TBE Puffer gefüllt ist. Danach wird die DNA inklusive Ladepuffer in die Taschen geladen. Als Vergleich wird ein DNA Größenstandard (DNA Leiter) mitgeladen. Die Gelelektrophorese erfolgt bei einer angelegten Spannung von ca. 150 Volt, wobei die negativ geladene DNA in Richtung Anode läuft. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wird am Transilluminator (Herolab) unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ermöglicht die *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten zur Genisolierung während einer Klonierung oder dient analytischen Zwecken wie z. B. der Messung der mRNA Transkripte nach erfolgter cDNA Synthese.

Die Reaktion gliedert sich in folgende Schritte: Im ersten Schritt wird die Ausgangs-DNA unter Hitzewirkung denaturiert (Denaturierung - 95°C). Danach können sich die Oligonukleotide bei einer geringeren Temperatur an den komplementären DNA Abschnitt anlagern

(Annealing - 50-65°C). Zum Schluss erfolgt die Synthese des komplementären Stranges (Elongation - 72°C).

3.1.2.1 Klonierungs-PCR

Für die Amplifikation der USE-bindenden Proteine wurde die Pfu Polymerase verwendet, da diese Polymerase eine *Proofreading* Aktivität besitzt. Eine Ausnahme stellt die Amplifikation von FBP2 dar. Hierfür wurde die Phusion Polymerase benutzt, die auch eine *Proofreading* Aktivität besitzt sowie der 5x Puffer B [7,5 mM MgCl₂, pH 8,5] des PCR Optimizer™ Kits.

PCR Ansatz (alle USE bindenden Proteine bis auf FBP2):

5 µl	Pfu Puffer (10x)
1 µl	Primer vorwärts [10 mM]
1 µl	Primer rückwärts [10 mM]
1 µl	dNTPs [je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP dTTP]
1 µl	Pfu Polymerase [2,5U/µl]
40 µl	ddH ₂ O
1 µl	Vektor DNA [100 ng]

PCR-Programm:

94°C	45 sek	
94°C	45 sek	} 35 Zyklen
50-60°C	45 sek	
72°C	120-180 sek	
72°C	10 min	

PCR-Ansatz für FBP2:

10 µl	Puffer A (5x)
1 µl	FBP2 for [10 mM]
1 µl	FBP2 rev [10 mM]
1 µl	dNTPs [je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP dTTP]
1 µl	Phusion Polymerase [2 U/µl]
5 µl	DMSO
30 µl	ddH ₂ O
1 µl	Vektor DNA [100 ng]

PCR-Programm:

94°C	3 min		
94°C	45 sek	}	35 Zyklen
50°C	30 sek		
72°C	150 sek		
72°C	10 min		

3.1.2.2 Poly(A) Schwanz Test PCR

Mit Hilfe der Poly(A) Schwanz Test PCR (PAT PCR) können polyadenylierte Transkripte in ihrer Quantität gemessen werden (Salles et al., 1999). Alle eukaryotischen mRNAs (bis auf Histon mRNAs) werden an ihren 3'Enden polyadenyliert und besitzen danach eine ca. 200 nukleotidlange Andenosinkette (siehe Kapitel 1.2). Dieses Charakteristikum wird während der cDNA Synthese genutzt, um prozessierte RNA Moleküle zu amplifizieren. Die Oligo d(T) Primer bestehen aus 16 Thymidinnukleotiden und einer Ankersequenz am 3'Ende für die spätere spezifische PCR (Anchor-oligo d(T) Primer). Ein Pool aus drei unterschiedlichen Anchor-oligo d(T) Primern wird in die cDNA Synthese eingesetzt, die am 5'Ende entweder die Base C, G oder A tragen. Damit wird die Amplifikation an das Ende des Tandemreporter Transkriptes gelegt, so dass der Oligo d(T) Primer nicht in der Mitte des Poly(A) Schwanzes bindet. Dadurch werden distinkte Banden nach der Amplifikation sichtbar. Nach der cDNA Synthese können nun beide RNA Isoformen der Tandemreporter amplifiziert werden (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20). Nachdem die PCR Produkte mit einem 2%igen Agarosegel aufgetrennt wurden, sind abhängig von dem Tandemreporter zwei PCR Produkte zu erkennen. Das längere PCR Produkt wurde an der 3' gelegenen Poly(A) Stelle prozessiert, wohingegen das kürzere PCR Produkt an der 5' gelegenen Poly(A) Stelle prozessiert wurde. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Typhoon TRIO + (GE Healthcare) und der 1 D Gel Analyse Software.

PCR-Ansatz:

5 µl	ThermoPol Puffer (10x)
1 µl	Primer vorwärts # 12 [10 µM]
1 µl	Primer rückwärts # 4 [10 µM]
1 µl	dNTPs [je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP dTTP]
0,5 µl	Taq DNA Polymerase [5 U/µl]
40,5 µl	ddH ₂ O
1 µl	cDNA [25-100 ng]

PCR Programm:

94°C	2 min	
94°C	30 sek	} 35 Zyklen
58 °C	30 sek	
72°C	80 sek	
72°C	10 min	

3.1.2.3 Quantitative *real-time* PCR (QRT PCR)

Die quantitative *real-time* PCR (QRT PCR) ermöglicht die Quantifizierung von Nukleinsäuren und somit können Expressionsunterschiede zwischen unterschiedlichen Genen gemessen werden. Das Prinzip beruht auf der Messung von Signalen des Farbstoffes SYBR[®]Green I, welcher an doppelsträngige DNA bindet. Der Ct Wert (*Cycle Treshhold*) gibt die Zyklenzahl an, bei der das Fluoreszenzsignal des Produktes signifikant ansteigt (Wert liegt über dem Hintergrundrauschen) und somit für ein spezifisches und messbares PCR Produkt steht. Zwingend notwendig ist hierbei die Messung während der exponentiellen Amplifikation, da es in dieser Phase nicht zu Messartefakten der PCR kommt (wie z. B. Produkthemmung). Hierbei wird die Abundanz eines spezifischen Gens, welches Untersuchungsgegenstand ist, mit einem internen Standard verglichen, welches in konstanten Mengen exprimiert wird (hier das Haushaltsgen GAPDH). Die Auswertung erfolgt unter der Berechnung der Δ Ct Werte und dem Vergleich der Δ Ct Werte unterschiedlicher experimenteller Ansätze (siehe Kap. 3.3.5).

$$\Delta Ct = 1,78^{-(Ct \text{ spez. Gen} - Ct \text{ GAPDH})}$$

PCR-Ansatz:

10 µl	Absolute [™] QPCR SYBR Green Capillary Mix (2x)
1 µl	Primer vorwärts (10 µM)
1 µl	Primer rückwärts (10 µM)
6 µl	ddH ₂ O
2µl	cDNA (25-100 ng)

PCR Programm:

95°C	610 sek		
95°C	3 sek	}	45 Zyklen Amplifikation
60°C	10 sek		
72°C	20 sek		
95°C	15 sek		
60°C	60 sek		
T _A +0,3 ¹	60 sek		Schmelzkurve
95°C	15 sek		

3.1.3 Klonierung

Die Klonierung ist eine Methode, bei der ein beliebiges DNA Fragment in einen Vektor integriert wird. Dies ermöglicht zum einen eine massenhafte Vermehrung eines DNA Abschnittes in Bakterien. Des Weiteren können die Vektoren in verschiedene Zelllinien transfiziert werden. Der pCI-neo Vektor (siehe Kap. 3.1.3.2) eignet sich z.B. für Expressionsanalysen in Säugerzellen.

3.1.3.1 Klonierungsstrategien

- USE-bindende Proteine in dem pCI-neo Vektor

Freundlicherweise erhielten wir Ausgangsvektoren, die die cDNA der identifizierten USE-bindenden Proteine enthielten, von anderen Laboratorien: CUGBP von Carol and Jeffrey Lutz, FBP1, FBP2 und FBP3 von Hye-Jung Chung und David Levens, HUR von Ann-Bin Shyu, TIA1 und TIAR von José Izaquierdo und Juan Valcárcel, U2AF35, U2AF65 und hnRNPI von Michael Sattler.

Da alle USE-bindenden Proteine unter gleichen Expressionsbedingungen analysiert werden sollten, wurden die cDNA Sequenzen aus den bereitgestellten Vektoren herausamplifiziert. Hierbei wurden die Oligonukleotide so konstruiert, dass zusätzlich an deren 5'Enden die Sequenzen der Restriktionsschnittstellen sowie weitere sechs willkürliche Basen existierten (Oligonukleotidsequenzen siehe Kap. 2.4). Anschließend wurde das verdaut PCR Produkt in den

¹ Schmelztemperatur beginnt bei 60°C und wird in jedem darauffolgenden Zyklus um 0,3°C erhöht bis schließlich 90°C erreicht werden.

geöffneten Vektor über die Schnittstellen über XhoI und XbaI kloniert. Der pCI-neo Vektor lag bereits in modifizierter Form im Labor vor. Er enthielt zusätzlich die Sequenz für ein Flagepitop, welches sich später am N-Terminus der jeweiligen Proteine befand und für die Aufreinigung der Proteine benötigt wurde (siehe hierzu 3.2.2). Dieses Flagepitop befindet sich zwischen den Schnittstellen NheI und XhoI.

- Tandemreporter Konstrukte in dem pGEM[®]-7Zf Vektor (+)

Das HBB (humanes β -Globin)-F2 WT Hybrid-Gen-Konstrukt und die entsprechenden Tandemreporter Konstrukte standen im Labor bereits zur Verfügung (Gehring et al., 2001; Danckwardt et al., 2004). Modifikationen der USE Sequenzmotive wurden in Mutagenese-reaktionen durchgeführt. Der Aufbau der Konstrukte ist grafisch in der Abbildung 19 bzw. Abbildung 20 dargestellt sowie im Kapitel 4.2.1 beschrieben.

3.1.3.2 Vektoren

- pCI-neo Vektor

Der pCI-neo Vektor (Promega) eignet sich für die Expression eines spezifischen Gens in Säugerzellen, da dieser einen *Cytomegalovirus* (CMV) Enhancer/Promotor und ein *Simian Virus* (SV40) Polyadenylierungssignal besitzt.

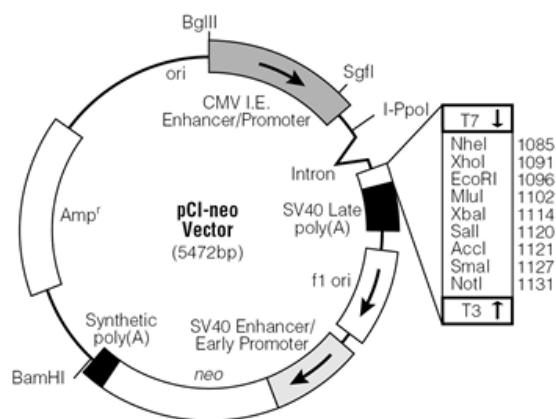


Abbildung 9: Vektorkarte pCI-neo Vektor

Alle USE bindenden Proteine wurden zwischen die Schnittstellen XhoI und XbaI kloniert. Alle Konstrukte sind in dem Uhrzeigersinn orientiert und stehen unter der Kontrolle des CMV/I.E. Enhancer/Promotors.

- pGEM[®]-7Zf Vektor (+)

Der pGEM[®]-7Zf Vektor (+) ist ein Standardklonierungsvektor des Herstellers Promega.

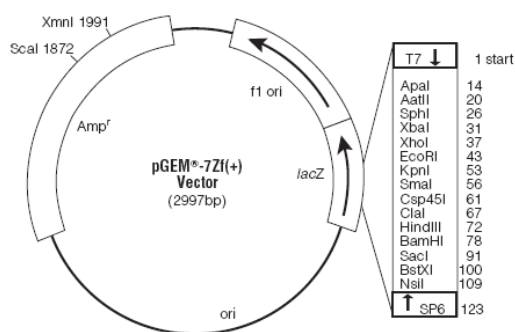


Abbildung 10: Vektorkarte pGEM[®]-7Zf Vektor (+)

Alle Tandemreporter wurden zwischen die Schnittstellen XbaI und EcoRI kloniert. Alle Konstrukte sind gegen den Uhrzeigersinn orientiert und stehen unter der Kontrolle des humanen HBB Promotors (Gehring et al., 2001).

3.1.3.3 Restriktionsverdau

Mit Hilfe von Restriktionsenzymen lässt sich DNA an spezifischen Sequenzen schneiden. Restriktionsenzyme erkennen eine Sequenz von vier bis acht Basenpaaren auf der DNA und binden dort. In der Regel wird 1 µg Vektor DNA mit 1 Unit Enzym und dem vom Hersteller bereitgestellten Puffer bei 37°C über Nacht verdaut. In Anschluss wird der geschnittene Vektor mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und mit Chromatographiesäulchen nach Herstellerangaben aufgereinigt (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel). Restriktionsenzyme schneiden nicht nur Vektor DNA sondern auch PCR Produkte. Geschnittene PCR Produkte werden ebenfalls über Chromatographiesäulchen nach Angaben des Herstellers aufgereinigt (Nucleo Spin Extract II, Macherey-Nagel).

3.1.3.4 Ligation

Während der Ligation wird ein DNA Abschnitt in einen geöffneten Vektor integriert. Dazu wurde 100 ng linearisierter Vektor, 500 ng des zu integrierenden DNA Fragmentes (Insert) mit 1 Unit T4 DNA Ligase und Ligasepuffer gemischt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurde immer eine Ligationskontrolle mit angesetzt. Dieser Ansatz enthält den geöffneten Vektor sowie die Ligase und den entsprechenden Puffer, jedoch nicht das Insert. Ziel ist es, die Religationshäufigkeit des Vektors zu testen und somit die Auswertung der Transformation zu erleichtern.

3.1.3.5 Transformation

Bei der Transformation werden Vektoren in Bakterien eingeschleust, die anschließend den Vektor auf schnelle und einfache Weise amplifizieren. Dazu wurden 80 µl chemisch kompe-

tente Zellen *E. coli* XL-1 blue auf Eis aufgetaut und mit 10 µl des Ligationsansatzes ($\approx 50\%$) bzw. bei einer Retransformation mit 100 ng Vektor gemischt. Dieser Ansatz wurde für 20 min auf Eis und anschließend für 90 sek bei 42°C inkubiert (Hitzeschock). Dieser Temperaturwechsel führt zur Aufnahme des Vektors in das Bakterium. Danach wurde der Ansatz für weitere 3 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 300 µl LB Medium ohne Antibiotika hinzugegeben und bei 37°C für 1 h unter Bewegung inkubiert. Dieser Bakterienansatz wurde zum Schluss auf eine LB Platte mit dem entsprechenden Selektionsmarker (bei pCI neo und pGEM[®]-7Zf jeweils Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C im Bakterienbrutschrank inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Transfektionsergebnis anhand der Koloniezahl zunächst ausgewertet. Fiel die Anzahl an Kolonien der Ligationsplatte deutlich höher als die Zahl der Kolonien auf der Kontrollplatte (Testung auf Religation) aus, deutet dies auf eine erfolgreiche Insertion des DNA Fragmentes in den geöffneten Vektor hin. Anschließend wurden einige Klone gepickt und in Minikulturen über Nacht vermehrt (1 Klon in 5 ml LB Medium). Einen Tag später wurden die Plasmide mittels Chromatographiesäulchen isoliert (NucleoSpin Plasmid). In einem Restriktionsverdau wurde das Vorhandensein des Inserts (kloniertes DNA Fragment) überprüft. Bei einem positiven Befund wurde die Plasmid DNA sequenziert und bei korrekter Sequenz eine Midikultur (10 µl Minikultur in 100 ml LB Medium) über Nacht angesetzt. Die Plasmide wurden nach dem Protokoll des Herstellers mittels Chromatographiesäulen isoliert (NucleoBond Xtra Midi).

3.1.3.6 Mutagenese

Ziel der Mutagenese ist die genomische Veränderung einer DNA Sequenz. Um die Selektion der manipulierten DNA von der Ausgangs-DNA zu erleichtern, wurde die Ausgangs-DNA in einem ersten Schritt methyliert. Bakterien bauen später diese methylierte DNA mittels Restriktionsenzymen ab und vermehren nur die manipulierte DNA. Mutagenesen waren unter anderem für die Korrektur der cDNA Sequenzen der USE-bindenden Proteine notwendig bzw. bei der Modifizierung der Tandemreporter Konstrukte (Oligonukleotidsequenzen siehe 2.4).

PCR-Ansatz:

1 µl	Vektor DNA [100 ng]
1,6 µl	Methylierungspuffer (10x)
1,6 µl	SAM (10x)
1,0 µl	DNA Methylase [4 U/µl]
10,8 µl	ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Im darauffolgenden Schritt wurde die Vektor DNA mit modifizierten Primern in einer PCR verändert.

PCR-Ansatz:

5,0 µl	High Fidelity PCR-Puffer (10x)
1,5 µl	dNTPs [je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP dTTP]
1,0 µl	MgSO ₄ [50 mM]
1,5 µl	Primer vorwärts [10 mM]
1,5 µl	Primer rückwärts [10 mM]
4,0 µl	methylierte DNA [25 ng]
0,5 µl	Platinum Taq high Fidelity [5 U/µl]
35,0 µl	ddH ₂ O

PCR Programm:

94°C	2 min	
94°C	30 sec	} 20x
55°C	30 sec	
68°C	8 min	
68°C	10 min	

Danach wurde der PCR-Ansatz in *E. coli* XL-1 blue Bakterien transformiert (siehe Kap. 3.1.3.5). Nach der Isolierung von DNA aus Minikulturen wurde diese dann sequenziert (siehe Kap. 3.1.4). Nach erfolgreicher Manipulation der Vektor DNA wurde dieses Konstrukt *in vivo* analysiert.

3.1.4 Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von dem Unternehmen GATC BIOTECH durchgeführt. Dazu wurde entweder 30 µl der Vektor DNA [30-100 ng/µl] bzw. 30 µl eines aufgereinigten PCR Produktes [10-50 ng/µl] (NucleoSpin Extract II, Macherey-Nagel) sowie 30 µl des Sequenzierungsprimers [10 pmol/µl] verschickt. Die Sequenzen konnten mit der Software Chromas Version 1.45 gelesen werden. Die Auswertung erfolgte online mit der BLAST Software.

3.1.5 RNA Isolierung

HeLa Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und in 250 µl PBS resuspendiert. Da Gesamt RNA analysiert wurde, konnte im nächsten Schritt die Zelllyse mit TRI LS (Trizol) erfolgen. Hierzu wurde zu den 250 µl Zellsuspension 750 µl TRI LS hinzugegeben und für 5 min bei

Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform hinzugegeben, der Ansatz gemischt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die beginnende Phasentrennung wurde durch einen weiteren Zentrifugationsschritt von 15 min bei 13.000 x g (4°C) vollendet. Die obere wässrige Phase (enthält die RNA) wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die RNA wurde mit 500 µl eiskaltem Isopropanol und 1 µl Glykogen [20µg/ml] bei einer Zentrifugation bei 13.000 x g pelletiert. Das RNA Pellet wurde mit eiskaltem 75% Ethanol nochmals gewaschen und in Wasser gelöst.

3.1.6 Komplementäre DNA Synthese

Um Genexpressionsanalysen durchführen zu können, müssen die RNA Transkripte als erstes in cDNA umgeschrieben werden. Der RT-PCR Ansatz I wird für 5 min auf 65°C erhitzt, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis, welche die Anlagerung der Oligonukleotide an die RNA fördert, wird der RT-PCR Ansatz II hinzugegeben und für 1 h bei 42°C inkubiert. Die cDNA-Synthesereaktion wird durch Hitzeinaktivierung (15 min, 70°C) gestoppt. Für quantitative *real-time* PCRs wurde die cDNA im Anschluss über Chromatographiesäulchen nach Herstellerangaben aufgereinigt (NucleoSpin Extract II).

RT-PCR Ansätze:

I)	1 µl	RNA [0,5-2 µg/µl]
	1 µl	Anchor-oligo A/G/C (#1, 2, 3) [je 33µM]
	Ad 12 µl	ddH ₂ O
II)	0,5 µl	reverse Transkriptase [20 U/µl]
	0,5 µl	RNasin [40 U/µl]
	4 µl	Reverse Transkriptase Puffer (5x)
	2 µl	DTT [0,1 M]
	1 µl	dNTPs [je 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP dTTP]

3.1.7 Northern Blot

Zur Analyse der mRNA Expression stabil transfizierter HeLa-Zellen wurde die isolierte RNA in einen denaturierenden Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran transferiert und anschließend durch Hybridisation mit radioaktiven cRNA-Sonden sichtbar gemacht.

Zu Beginn wurde RNA unter denaturierenden Bedingungen in Formaldehydgelen (2,5%) aufgetrennt. Dazu wurde Agarose in doppelt autoklaviertem ddH₂O aufgekocht und mit MOPS-Puffer (Endkonzentration 1x MOPS) sowie Formaldehyd (pH > 4, Endkonzentration 2,4 M) gemischt. Dieser Ansatz wurde in einen Gelschlitten mit Kamm gegossen und für 1 h erstarren gelassen. Als Laufpuffer wurde 1 x MOPS verwendet. 5 µg der zu untersuchenden RNA wurden mit 10 µl Formamid, 3,5 µl Formaldehyd (pH > 4) und 2 µl 10 x MOPS-Puffer gemischt und bei 65°C für 15 min denaturiert. Danach wurden 0,5 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) und 2 µl RNA Probenpuffer hinzugegeben. Die Proben wurden dann in die Geltaschen geladen. Die Auftrennung erfolgte bei 50 V für 14 h. Die Laufzeit der Gelelektrophorese wurde anhand der Auftrennung der 28S und 18S Bande der RNA geschätzt.

Bevor der Transfer der RNA auf eine Membran stattfand, wurde das Agarosegel zunächst für 15 min in ddH₂O gewaschen und anschließend für weitere 40 min in 20 x SSC äquilibriert. Der Transfer der RNA aus dem Agarosegel auf eine Nylonmembran erfolgte nach der Kapillarblotmethode für 6 h. Die RNA wurde anschließend mit 1200 Joule kovalent an die Membran gebunden (Stratalinker 2400, Stratagene[®]).

Zur Detektion der RNA auf der Membran wurden komplementäre genspezifische cRNA-Sonden durch radioaktive *in vitro* Transkription hergestellt. Dazu wurde in das Plasmid pSP65 (Boehringer Mannheim) ein 195 bp langes β-Globin DNA Fragment in reverser Orientierung hinter den *in vitro* transkriptionsfähigen SP6 Promotor kloniert. Um die Transkription unspezifischer, stromabwärts gelegener Plasmidsequenz-Anteile zu verhindern wurde das Plasmid 3' des β-Globin-,Inserts“ mit BamHI im Polylinker linearisiert und gelgereinigt. Das dadurch entstehende Transkript ergab eine cRNA-Sonde komplementärer Sequenz zu 48 nt der β-Globin 3'UTR, 128 nt des Exon III und 19 nt des Exon II.

Ansatz *in vitro* Transkription:

1 µg	linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	Transkriptionspuffer (10x)
20 Units	RNasin
0,6 mM	je ATP, CTP, UTP
50 µCi	α- ³² P-GTP (800 Ci/mM)
10 Units	SP6-Polymerase
Ad 20 µl	doppelt autoklaviertes ddH ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 40°C inkubiert. Anschließend wurden 10 Units DNase I hinzugegeben und erneut bei 37°C für 20 min inkubiert, um den DNA Matrizenstrang zu verdauen. Nicht eingebaute, radioaktive Nukleotide wurden mit einer Quick-Spin Säule nach Angaben des Herstellers entfernt und das Filtrat zur Hybridisation direkt eingesetzt. Zur Prähybridisierung der Nylonmembran wurde diese zunächst für 2 h in 30 ml Churchpuffer in einer Glasröhre bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Churchpuffer verworfen und durch 5 ml frischen Churchpuffer inkl. cRNA Sonde ersetzt. Die Membran wurde mit diesem Ansatz bei 65°C über Nacht inkubiert. Für die Entfernung nicht hybridisierter Sonde wurde die Nylonmembran bei 65°C für jeweils 15 min zweimal mit 2 x SSC/0,1% SDS und anschließend zweimal mit 0,2 x SSC/0,1% SDS gewaschen. Zur Detektion der spezifischen radioaktiven Signale wurden Röntgenfilme (Kodak X-Omat) benutzt. Zur Quantifizierung der Signale wurde der Phosphoimager (FUJIFILM) verwendet und die Daten mit der Software BASreader, Aida Image Analyzer V.3.28 ausgewertet.

3.2 Proteinbiochemie

3.2.1 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots lassen sich Proteine ihrer Größe nach auftrennen und spezifisch mit Antikörpern nachweisen. Während der Elektrophorese wandern die Proteine in einem elektrisch geladenen Feld in Richtung der Anode durch die Poren eines Polyacrylamidgels. SDS ist sowohl im Proteinladepuffer als auch in dem Polyacrylamidgel enthalten, so dass die Proteine denaturiert und deren Ladungsunterschiede ausgeglichen werden. Die Auftrennung der Proteine erfolgt somit aufgrund ihres Molekulargewichtes. Zu Beginn wandern die Proteine durch ein Sammelgel, in dem sie fokussiert werden. Im Trenngel erfolgt dann die Auftrennung aufgrund ihres Molekulargewichtes. Je höher der Anteil an Polyacrylamid ist, desto besser lassen sich kleine Proteine auftrennen. Anschließend erfolgt der Transfer der Proteine aus dem SDS-Gel auf eine PVDF Membran mittels einer angelegten Spannung. In Anschluss werden freie Bindungsstellen auf der Membran mit 5% Magermilch bzw. 5% BSA-Lösung abgesättigt, um unspezifische Signale des Antikörpers zu verhindern. Der 1. Antikörper wurde immer über Nacht bei 4°C inkubiert. Danach wurde die Membran insgesamt viermal mit TBS-Tween je 5 min gewaschen. Der 2. Antikörper wurde für 1 h bei Raumtemperatur mit der Membran inkubiert. Der 2. Antikörper erkennt den 1. Antikörper und ist mit einem Enzym, der Meerrettich-Peroxidase (HRP=horseradish peroxidase) gekoppelt. Die Membran wurde wieder viermal mit TBS-Tween je 5 min gewaschen. Das HRP Enzym katalysiert die Umset-

zung des Substrates Luminol und ermöglicht die chemilumineszente Detektion. Diese Lichtemission wird mit Hilfe eines sensitiven Films semiquantitativ detektiert.

3.2.2 Immunopräzipitation

Mit Hilfe der Immunopräzipitation lassen sich Flag-gekoppelte Proteine aus dem Gesamtzelllysate isolieren. Pro Immunopräzipitation wurden 50 µl Agarose beads (Anti Flag M2 Affinity Gel) mit TBS pH 7,5 gewaschen. Danach wurden die Agarose beads bei 3.000 x g für 5 min pelletiert. Die Zellen einer konfluenten 10 cm Zellkulturschale wurden mit 700 µl Ripazellysispuffer geerntet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Dieses Zelllysate wurde für 10 min bei 10.000 x g (4°C) zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand vollständig auf die Agarose beads geladen. Die Inkubation dauerte 2 h (4°C) unter rotierenden Bewegungen. Die Agarose beads wurden dreimal mit 500 µl Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II gewaschen. Die Elution erfolgte kompetitiv mit Hilfe des Flag[®] Peptides, welches in Elutionspuffer verdünnt wurde (Endkonzentration 200µg/ml). Mittels Chromatographiesäulchen (Bio-Rad) konnten die Agarose beads entfernt werden. Das Endprodukt einer Immunopräzipitation sind isolierte Flag-gekoppelte Proteine.

3.2.3 *In vitro* Dephosphorylierung

Als Positivkontrolle für die phosphospezifischen Proteinfärbungen (siehe Methode 3.2.4.2 und 3.2.4.3) wurde Ovalbumin *in vitro* dephosphoryliert.

Ansatz *in vitro* Dephosphorylierung:

20 µg	Ovalbumin
10 µl	alkaline Phosphatase (1 Unit/µl)
10 µl	alkaline Phosphatase Puffer (10x)
Ad 100 µl	H ₂ O

Dieser Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Vergleich wurde zusätzlich phosphoryliertes Ovalbumin mit auf das SDS Gel geladen. Dieser Ansatz entspricht den oben genannten, nur dass eine hitzeinaktivierte alkaline Phosphatase (1 h bei 95°C) hinzugegeben wurde. Es wurde grundsätzlich 1 µg phosphoryliertes/dephosphoryliertes Ovalbumin pro Geltasche geladen.

3.2.4 Proteinfärbung

3.2.4.1 Silberfärbung (Gesamtproteinfärbung)

Die Silberfärbung ermöglicht eine schnelle Detektion von Proteinen in einem Polyacrylamidgel. Hierbei ermöglicht das SilverQuest Silver Staining Kit von Invitrogen eine Sensitivität im Nanogrammbereich. Nachfolgend wird kurz das Prinzip erläutert. Das detaillierte Basisprotokoll ist dem Handbuch des Herstellers zu entnehmen.

Als erstes wurden die Proteine während des Fixierschrittes im Polyacrylamidgel gebunden und zeitgleich interferierende Ionen entfernt. Danach wurde mit Hilfe des Sensibilisators der Kontrast der Färbung erhöht. Nach einigen Waschschritten wurden die Silberionen hinzugegeben, die kovalent an die Proteine gebunden wurden. Bevor die Entwicklungsreaktion gestartet wurde, wurden ungebundene Silberionen in einem weiteren Waschschriff mit Wasser entfernt. Während der Entwicklungsreaktion wurden die Silberionen zu metallischem Silber reduziert und eine Proteinbande wurde sichtbar (Farbspektrum von gelb bis braun). Diese Reaktion konnte jederzeit gestoppt werden. Die Zeitdauer der Färbung resultiert aus der geladenen Proteinmenge. Je mehr Nanogramm Protein geladen wurde, desto kürzer ist die Zeit der Entwicklungsreaktion.

3.2.4.2 ProQ[®] Diamond Färbung (Phosphoprotein)

Phosphoproteine können in einem Polyacrylamidgel unter Verwendung des ProQ[®] Diamond Fluoreszenzfarbstoffes von Invitrogen angefärbt werden. Vorteilhaft ist, dass dieser Farbstoff an alle drei Residuen (Phosphothreonin, Phosphotyrosin und Phosphoserin) bindet. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei Raumtemperatur unter leichter Bewegung (Schüttler) in einem Gesamtvolumen von 100 ml durchgeführt.

In der Zellkultur wurden Stressexperimente (siehe 3.3.5) in transient transfizierten HeLa Zellen (siehe 3.3.2) durchgeführt und die Flag-gekoppelten Proteine über Immunopräzipitation (siehe 3.2.2) isoliert. Diese Eluate wurden anschließend in einem SDS Polyacrylamidgel (max. 16 x 16 cm) separiert und zweimal für 30 Minuten fixiert (50% Methanol, 10% Essigsäure). Anschließend wurde das Gel dreimal für 10 Minuten mit autoklaviertem H₂O gewaschen, um die Fixierlösung vollständig zu entfernen. Danach wurden die Phosphoproteine mit 50 ml des Fluoreszenzfarbstoffes ProQ[®] Diamond spezifisch angefärbt. Die Inkubationszeit betrug 90 Minuten. Um das Signal vom unspezifisch gefärbten Hintergrund zu unterscheiden, wurde das Gel anschließend entfärbt (20% Acetonitril, 50 mM Natriumacetat, pH 4,0). Hierfür wurde das Gel dreimal für 20 min in der Entfärbungslösung inkubiert. Zum Schluss wurde

das SDS Gel zusätzlich zweimal für 5 min mit autoklaviertem H₂O gewaschen. Die Signale wurden mit dem Typhoon TRIO + (GE Healthcare) detektiert (siehe 3.5).

3.2.4.3 SYPRO[®] Ruby Färbung (Gesamtprotein)

SYPRO[®] Ruby ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der das Gesamtprotein in einem SDS Polyacrylamidgel detektiert. Nach der Quantifizierung der Phosphoproteine der ersten Färbung (siehe Kap. 3.2.4.2), wurde das Gel über Nacht mit 50 ml SYPRO[®] Ruby bei 4 °C inkubiert. Danach wurde das Gel für 30 min gewaschen (10% Methanol, 7% Essigsäure) und anschließend für weitere 5 Minuten mit autoklavierten H₂O inkubiert bevor die Detektion und Quantifizierung mit den Typhoon TRIO + (GE Healthcare) erfolgte.

Das Verhältnis der Signalintensität von Pro-Q[®] Diamond gefärbten Banden zu SYPRO[®] Ruby gefärbten Banden ergibt einen relativen Wert. Anschließend wurde der X-fache Unterschied des Phosphorylierungsstatus bestimmt, indem der Quotient von den relativen Werten (z.B. gestressten IP Eluat zu ungestresstem IP Eluat) gebildet wurde.

- Relatives Verhältnis des Phosphoproteins zum Gesamtprotein (Referenz)

$$X = \frac{\text{ProQ Wert (Bandenintensität pro Fläche)}}{\text{SYPRO Ruby Wert (Bandenintensität pro Fläche)}}$$

- X-facher Unterschied des Phosphorylierungsstatus

$$\Delta X = \frac{\text{gestresstes IP Eluat (Anisomycin)}}{\text{ungestresstes IP Eluat (DMSO)}}$$

3.2.5 RNA-Protein Interaktionsstudien

Die RNA Oligonukleotide wurden von biomers.net[®] bezogen:

USE	5'-AGAAUUAUUUUUGUGUUUCUA-3'
USEmut:	5'-AGAAACACUUUUUGUGUUUCUA-3'
USEunrel:	5'-AGAACGAGACGAGCGGCCUA-3'

Diese RNA Oligonukleotide wurden in einer *in vitro* Reaktion am 5' Ende radioaktiv markiert.

Ansatz *in vitro* Markierung:

6 µl	ddH ₂ O
1 µl	RNA Oligonukleotid [1-2 pM]
1 µl	T4 Polynukleotid Kinase Puffer (10x)

1 μ l T4 Polynukleotid Kinase [10 U/ μ l]

1 μ l γ ATP [3000Ci/mmol]

Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 37°C wurden die radioaktiv markierten RNA Oligonukleotide über Chromatographiesäulchen aufgereinigt (QIAquick[®] PCR Purification). Ca. 100.000 cpm (Einheit für den radioaktiven Zerfall pro Minute) des radioaktiv markierten RNA Oligonukleotides wurde mit 10 μ l Eluat der Immunopräzipitation (immunopräzipitiertes Flag USEBP (\triangleq 25% einer 10 cm Zellkulturschale) und 20 μ l Hybridisierungspuffer für 15 min auf Eis inkubiert. Die Proben wurden anschließend für 5 min mit UV Licht auf Eis bestrahlt (Stratalinker 2400, Stratagene[®]). Anschließend wurde Proteinladepuffer hinzugegeben und die Proteine über ein SDS Gel separiert. Die radioaktiven Ribonukleoproteinkomplexe wurden aufgrund der Autoradiografie mit dem Phosphorimager bzw. radioaktivitätssensitiven Filmen ausgewertet.

3.3 Zellkultur

3.3.1 Kultivierung von HeLa Zellen

Als Zelllinie zur Untersuchung physiologischer *in vivo* Prozesse wurde HeLa verwendet. Diese Zellen entstammen ursprünglich den Epithelzellen eines Zervixkarzinoms. Diese Zelllinie wurde 1951 isoliert und wird heute noch in vielen Laboratorien für die Analyse von molekularbiologischen und biochemischen Fragestellungen herangezogen.

Die Kultivierung der HeLa Zellen erfolgte in DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) inklusive 10% FCS (fötale Kälberserum) und 1% Penicillin/Streptomycin (100 Units Penicillin/ml bzw. 0,1 mg/ml) bei 37°C und 5% CO₂. Etwa alle 2-3 Tage wurden die Zellen passagiert. Die Zellen wurden maximal 25-mal passagiert und für Experimente verwendet, bevor sie durch eine neue Zelllinie ersetzt wurden. Vor dem Passagieren wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Dabei lösten sich die adhären Zellen von der Oberfläche der Zellkulturschale. Diese Reaktion wurde mit Zellkulturmedium gestoppt. Zum Schluss wurde die Zellzahl mit der Neubauer Zählkammer bestimmt.

3.3.2 Stabile Expression

Um eine höhere Transfektionseffizienz zu erzielen, wurden die HeLa Zellen anstatt mit Calciumphosphat mit Lipofectamin transfiziert. Dieses Reagenz komplexiert mit DNA und bildet

Liposomen aus. Der Komplex fusioniert dann mit der Zellmembran der Zellen und schleust somit den Vektor ein.

Am ersten Tag wurden 1×10^6 HeLa Zellen in einer 10 cm Schale ausgesät. Am zweiten Tag wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und in 10 ml DMEM inkl. 10% FCS kultiviert. Es wurden danach zwei Ansätze vorbereitet. Der Ansatz 1 enthielt 15 μg Vektor DNA (Tandemreporter im pGem[®] Vektor), 1 μg Selektionsvektor (pCI-neo Vektor inklusive dem Gen für das grünfluoreszierende Protein (GFP) und einem Resistenzgen gegen Geneticin) sowie 1 ml Optimem. Der Ansatz 1 wurde gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Der Ansatz 2 enthielt 20 μl Lipofectamin und 980 μl Optimem. Der Ansatz 2 wurde auch gemischt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die beiden Ansätze miteinander gemischt und für insgesamt 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dieser Ansatz wurde dann zu den Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 18 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Am nächsten Tag wurde das alte Medium gegen neues Medium (DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) ersetzt. 48 h nach der Transfektion wurde mit der Selektion begonnen. Das Medium enthielt nun zusätzlich den Selektionsmarker Geneticin (DMEM, 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und Geneticin in einer Endkonzentration von 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Alle drei Tage wurde nun das Medium gewechselt. Nicht transfizierte Zellen starben innerhalb der ersten 3 bis 9 Tage. Die Selektion mittels Geneticin wurde mit untransfizierten HeLa Zellen kontrolliert. Diese starben innerhalb der ersten Selektionswoche. In den darauffolgenden Wochen wurde durch den anhaltenden Selektionsdruck der Vektor stabil in das Genom der HeLa Zellen integriert. Es wuchsen Zellklone heran, die nach etwa 4-6 Wochen makroskopisch sichtbar waren und isoliert werden konnten. Die Charakterisierung der Zellklone ist in dem Kapitel 4.2.1 näher erläutert.

3.3.3 Transiente Expression

Am ersten Tag wurden 1×10^6 HeLa Zellen in einer 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am zweiten Tag wurde 2-4 Stunden vor der transienten Transfektion das Medium gewechselt (10 ml Medium/10 cm Schale). Bei der Calciumphosphat Transfektion wurden 19 μg Vektor DNA (z.B. pGem[®] Vektor inklusive Tandemreporter oder pCI-neo Vektor inklusive USEBP) mit 1 μg pCI-neo Vektor inklusive GFP (Transfektionskontrolle) mit 450 μl H₂O gemischt. Anschließend wurden 50 μl einer 2,5 M Calciumchloridlösung hinzugegeben und alles gemischt. Zum Schluss wurden 500 μl 2xBBS hinzugegeben und alles erneut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 20 min bei Raumtemperatur hatte sich ein Calcium-DNA-Präzipitat ausgebildet, das nun auf die Zellen gegeben wurde. Die Zellen wurden für 20 h bei 37°C und 3%

CO₂ kultiviert. Die Zellen nahmen die DNA über Endozytose auf. Am dritten Tag wurden die Zellen zweimal mit autoklaviertem TBS pH 7,4 gewaschen und mit Trypsin gelöst. Durch dieses Verfahren konnte sichergestellt werden, dass Aliquots mit der gleichen Transfektionseffizienz verteilt werden konnten. Die Zellmenge richtete sich nach der Fragestellung.

RNA Analysen: 200.000 Zellen/2,6 cm Schale

Proteinanalysen: eine transient transfizierte 10 cm Schale wurde 1:2 gesplittet

Nach einem Tag wurden dann Stressexperimente durchgeführt (siehe 3.3.5).

3.3.4 Radioaktive Markierung von *de novo* Phosphorylierungen *in vivo*

Am ersten Tag wurden $1,2 \times 10^6$ HeLa Zellen pro 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Am zweiten Tag wurden diese Zellen mittels der Calciumphosphat Methode transient transfiziert (siehe 3.3.3). Am dritten Tag wurden die Zellen zweimal mit TBS pH 7,4 gewaschen, trypsiniert und auf zwei 5 cm Zellkulturschalen verteilt. Am vierten Tag wurden die Zellen für 5 h in phosphatdepletiertem Medium kultiviert. Danach erfolgte eine kurze Äquilibration (30 min) mit radioaktivem ³²P Orthophosphat [Endkonzentration 125 µCi/ml]. Anschließend wurden Stressexperimente durchgeführt (Anisomycin [20µg/ml] bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle, Inkubationszeit 2,5 h; Resultate siehe Kapitel 4.1.4). Die Zellen wurden zusammen mit dem Medium geerntet und bei 1.000 x g für 5 min pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet mit 500 µl PBS gewaschen und in 700 µl Ripalysepuffer (150 mM NaCl, 20 mM TrisCl, pH 7,4, Complete, 1% NP-40, 0,5% Natriumdesoxycholat, 0,1 % SDS, 40 Units RNaseA, und den Phosphataseinhibitoren (25 mM Natriumfluorid, 1 mM Natriumorthophosphat, 2 mM Natriumpyruvat)) resuspendiert und in flüssigem Stickstoff komplett lysiert.

3.3.5 Stressexperimente

HeLa Zellen wurden für 0,5 bis 6 Stunden mit 20 µg/ml Anisomycin bzw. der Lösungsmittelkontrolle DMSO behandelt (Resultate siehe Kap. 4.1.3, 4.1.4, 4.1.5, 4.1.6, 4.2.3, und 4.2.4). Anisomycin wird in Bakterien produziert und aktiviert den JNK/SAP und p38 Signalweg (Ashwell, 2006).

3.4 Statistik

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden mit Microsoft Excel ausgerechnet. T-Test Analysen für normal verteilte Strichproben wurden mit dem Statistikprogramm GraphPAD Prism4 durchgeführt.

3.5 Quantifizierung

Radioaktive Signale wurden mit dem Phosphoimager (FUJIFILM) detektiert und mit der Software BASreader, Aida Image Analyzer V.3.28 ausgewertet.

Der Typhoon TRIO + (GE-Healthcare) detektierte zum einen die Fluoreszenzsignale der ProQ[®] Diamond und SYPRO[®] Ruby Färbung (siehe Methoden 3.2.4.2 und 3.2.4.3) als auch die Signale von Ethidiumbromid-gefärbten Agarosegelen der PAT PCR (siehe Methode 3.1.2.2). Nach dem Einlesen der Signale wurden diese mit der Software 1D gel analysis of Image Quant TL getting started 28-9184-96 Edition AB ausgewertet. Dabei wurde der Hintergrund mit der *rolling ball method* herausgerechnet.

Farbstoff	Emission	Anregungsenergie
ProQ [®] Diamond	580 nm	532 nm
SYPRO [®] Ruby	610 nm	488 nm
Ethidiumbromid	610 nm	532 nm

4 Resultate

4.1 Molekulare Analyse des USE Ribonukleoprotein Komplexes

4.1.1 Versuchsaufbau

Vorherige Affinitätsaufreinigungen mit anschließender Massenspektrometrie identifizierten mehr als 25 Proteine (siehe

Abbildung 7), die mit dem USE Motiv der Prothrombin mRNA interagieren (Danckwardt et al., 2007; Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt). Dazu gehören Proteine, die bekannte Funktionen in der 3'Endprozessierung, Spleißen und RNA Stabilität besitzen. In funktionellen Studien konnte gezeigt werden, dass U2AF35, U2AF65 und hnRNPI spezifisch mit dem USE interagieren und den kanonischen 3'Endprozessierungsapparat an die Schnittstelle rekrutieren und somit bisher nicht bekannte Funktionen in der 3'Endprozessierung besitzen und diesen stimulieren (Danckwardt et al., 2007). Des Weiteren wurden Proteine identifiziert, sog. AU-reiche elementbindende Proteine (ARE-BPs), denen nur bisher eine Rolle in der Regulation der mRNA Stabilität zugeschrieben wurde (Bevilacqua et al., 2003; Dean et al., 2004; Garneau et al., 2007; Wilusz and Wilusz, 2004). Dazu gehören FBP1, FBP2, FBP3, TIA, TIAR, HUR und CUGBP. Diese binden mit einer hohen Affinität und Spezifität an das USE Motiv (Danckwardt & Gantzert *et al*, Manuskript fertiggestellt). Von dieser Proteingruppe ist bekannt, dass sie stressabhängig phosphoryliert werden können (Briata et al., 2005). In Tabelle 6 sind die USE bindenden Proteine (USEBPS) aufgelistet, die im Rahmen dieser Arbeit in Hinblick auf posttranslationale Modifikationen nach Stressinduktion und deren RNA Bindungsaffinitäten untersucht werden sollten.

Tabelle 6: Übersicht der USE bindenden Proteine

USEBP	Name	ORF	Gruppe	Proteinidentifikationsnummer	kDa
FBP1	far upstream element binding protein 1	90-2024	AREBP	Q96AE4	70
FBP2	far upstream element binding protein 2	111-2246	AREBP	Q92945	73
FBP3	far upstream element binding protein 3	109 - 1827	AREBP	Qp6124	62
TIA	nucleolysin TIA-1	186 - 1313	AREBP	P31483	40
TIAR	nucleolysin TIAR	565 -1692	AREBP	P70318	40
HUR	Hu-antigen R/ELAV-like protein 1	168 -1148	AREBP	Q15717	36
CUGBP	CUG triplet repeat RNA-binding protein 1	11-1471	AREBP	Q92879	54
hnRNPI	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I	107-1759	Spleißfaktor	P26599	57
U2AF65	splicing factor U2AF 65 kD subunit	1056-2483	Spleißfaktor	P26368	65
U2AF35	splicing factor U2AF 35 kDa subunit	85-807	Spleißfaktor	Q01081	35

Für die weitere Charakterisierung des F2 USE Ribonukleoprotein (RNP) Komplexes wurden für diese Arbeit Vektoren hergestellt, die in der *multiple cloning site* des pCI-neo Vektors (Vektorkarte siehe Abbildung 9) die offenen Leseraster (ORF) der entsprechenden USE bindenden Proteine enthielten sowie einen Flag-Tag am N-Terminus des jeweiligen Proteins (Methoden siehe Kap. 3.1.3.). Der pCI-neo Vektor (Promega) eignet sich für die Expression eines spezifischen Gens in Säugerzellen, da dieser einen viralen Enhancer/Promotor (CMV) und ein virales Polyadenylierungssignal (SV40) besitzt. Nach erfolgreicher Integration der cDNA Sequenzen wurde deren Sequenzen bestätigt und die jeweiligen Konstrukte transient in HeLa Zellen transfiziert. Die Expression des Inserts wurde mittels eines anti Flag Western Blots überprüft (siehe Abbildung 11). Alle Flag-gekoppelten USE bindenden Proteine (USEBPs) wurden erfolgreich kloniert und in HeLa Zellen in der gewünschten Größe exprimiert.

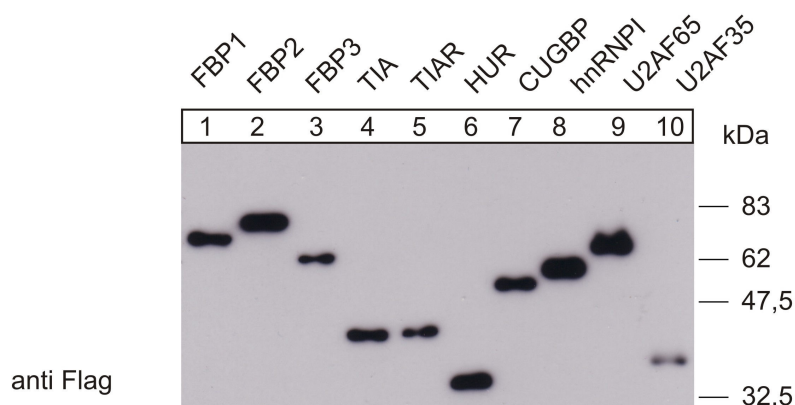


Abbildung 11: Expressionsanalyse der transient transfizierten USEBP Konstrukte mittels Western Blot

Die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges durch extrazelluläre Signale führt zur Phosphorylierung von FBP2 und moduliert somit dessen RNA-Bindungsaffinität (Briata et al., 2005). Um der Hypothese nachzugehen, ob extrazelluläre Signale einen Einfluss auf die Ribonukleoprotein Komposition ausüben, sollten folgende drei Aspekte analysiert werden:

1. Charakterisierung der RNA-Protein-Interaktionen am USE-Motiv (4.1.2)
2. Ermittlung von posttranslationaler Modifizierung nach Stressinduktion (4.1.3-4.1.5)
3. Charakterisierung des RNP Komplexes nach Stressinduktion (4.1.6).

4.1.2 Charakterisierung der RNA-Protein-Interaktionen am USE Motiv

Zur weiteren Analyse des Ribonukleoproteinkomplexes wurden RNA-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt (experimenteller Ablauf Abbildung 12A bzw. Methoden 3.2.5), die direkte RNA-Protein Interaktionen nachweisen. HeLa Zellen wurden transient mit USEBP Konstrukten transfiziert und die Flag-gekoppelten Proteine über Immunopräzipitation aufgereinigt. Anschließend wurden diese Proteine mit radioaktiv markierten USE- oder Kontroll- RNA-Oligonukleotiden inkubiert. Mittels ultravioletter Strahlung wurden direkte Interaktionen zwischen dem RNA-Oligonukleotid und dem immunopräzipitierten Protein durch kovalente Bindung konserviert. Die Proben wurden mittels einer SDS Gel Elektrophorese aufgetrennt, wobei eine kovalente Bindung zwischen Protein und radioaktiv markierter RNA anschließend durch Exposition des Gels detektiert werden konnte. Bei einer direkten Interaktion ist ein radioaktives Signal in Höhe des entsprechenden Proteins zu erwarten.

Das Silbergel ist eine interne Qualitätskontrolle, das sowohl die Expression der Proteine, die Reinheit der Eluate nach Immunopräzipitation sowie die homogene Ladung innerhalb der Serie eines Flag-gekoppelten Proteins zeigt. Die Ladekontrolle für U2AF35 wurde zusätzlich in einem Western Blot gegen das Flag-Epitop gezeigt, da die Detektion von U2AF35 nicht im Silbergel möglich war (Abbildung 12B).

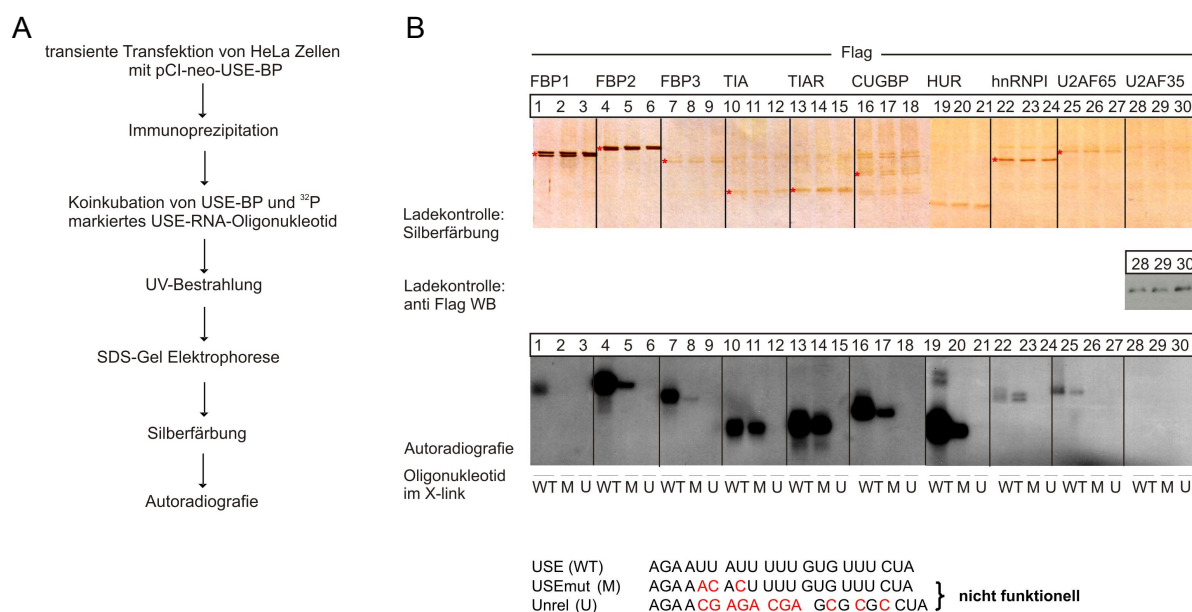


Abbildung 12: AU-reiche elementbindende Proteine (ARE-BPs) binden spezifisch und mit einer hohen Affinität direkt an das USE Motiv

A) Experimenteller Ablauf siehe Text **B)** Das silbergefärbte SDS Polyacrylamidgel und der Flag Western Blot zeigen die gleichmäßige Ladung der Proteine in dem obersten und mittleren Bild. Die Autoradiografie im unteren Bild zeigt, dass die meisten Proteine (FBP1, FBP2, FBP3, CUGBP, HUR, U2AF65) prädominant direkt an

das funktionelle USE RNA Oligonukleotid binden (siehe Spuren 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28) im Vergleich zu der nicht funktionellen Dreifachmutante USEmut (Spuren 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29) bzw. der nicht verwandten Sequenz Unrel (3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30). Dieses Bild ist ein repräsentatives Bild von drei unabhängigen Experimenten.

Die Exposition des silbergefärbten SDS-Polyacrylamidgel zeigt, dass FBP1, FBP2, FBP3, TIA, TIAR, CUGBP, HUR, hnRNPI und U2AF65 in individuellen experimentellen Ansätzen direkt an das F2 USE Motiv binden (Abbildung 12B /Autoradiografie, Spuren 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 und 25), U2AF35 hingegen nicht (siehe Spur 28). Die Bindungsaffinität von FBP1, FBP2, FBP3, CUGBP, HUR, U2AF65 ist zudem für das Wildtyp USE Motiv hochspezifisch, da diese signifikant reduziert ist, wenn das USE-Oligonukleotid drei Punktmutationen trägt (vgl. Spuren 1, 4, 7, 16, 19 & 25 mit 2, 5, 8, 20 & 26) oder eine beliebige Sequenz (vgl. Spuren 1, 4, 7, 16, 19 & 25 mit 3, 6, 9, 21 & 27).

4.1.3 Anisomycin aktiviert den p38 Signalweg

Zu Beginn der Stressanalysen wurden diverse Substanzen (Anisomycin, Sorbitol, UV Strahlung) für die Induktion des p38 Signalweges getestet (Daten nicht gezeigt). Anisomycin aktiviert neben dem JNK/SAPK Signalweg (Danckwardt & Gantzert et al. 2010, Manuskript fertiggestellt) auch den p38 MAPK Signalweg (Ashwell, 2006; Ono and Han, 2000; Shafer and Slice, 2005). Anisomycin induzierte nach 1 h robust den p38 MAPK Signalweg in HeLa Zellen, die Lösungsmittelkontrolle DMSO hingegen nicht (Abbildung 13A, vgl. Spuren 1&2, 3&4, 5&6). In der Kinetik ist zu erkennen, dass phospho p38 über die gesamte Zeitdauer von 6 h aktiviert vorliegt (Anisomycin [20µg/ml]), wohingegen DMSO behandelte HeLa Zellen keine Stressinduktion zeigten (Abbildung 13B, vgl. Spuren 1-8 & 9-16). Der Transkriptionsfaktor ATF-2 ist ein bekanntes stromabwärts gelegenes Zielprotein von phospho p38 (Ashwell, 2006). In der Abbildung 13B ist zu erkennen, dass ATF-2 nach 0,5 h Anisomycinbehandlung am stärksten hyperphosphoryliert ist und danach die relative Phosphorylierung abnimmt (vgl. Spuren 1-8 & 9-16).

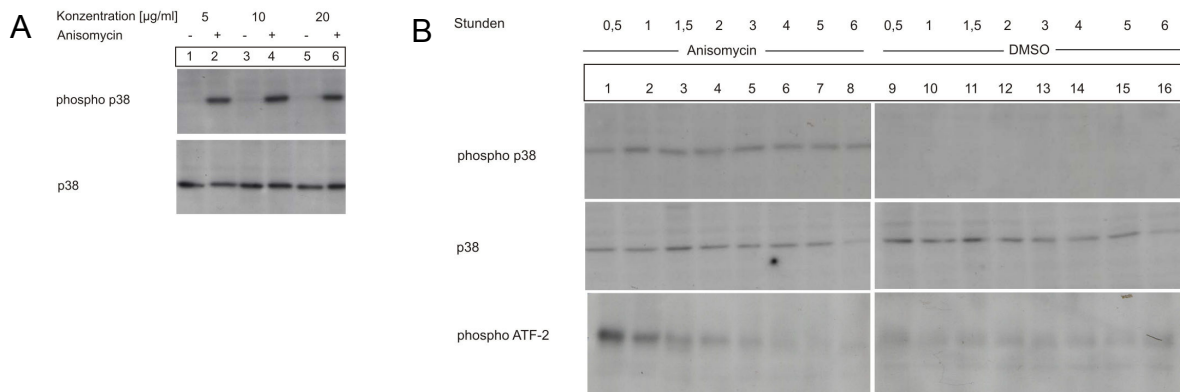


Abbildung 13: Anisomycin induziert den p38 MAPK Signalweg

A) Anisomycin aktiviert robust den p38 MAPK Signalweg, die Lösungsmittelkontrolle DMSO hingegen nicht (vgl. 1&2, 3&4, 5&6). **B)** Anisomycin aktiviert den p38 MAPK Signalweg für eine Zeitspanne bis zu 6 h (vgl. Spuren 1-8) sowie dessen stromabwärts gelegenes Zielprotein ATF-2. ATF-2 ist nach 0,5 h Anisomycinbehandlung am stärksten phosphoryliert (vgl. Spur 1 mit 2-8).

Hiermit konnte gezeigt werden, dass Anisomycinbehandlung als experimentelles Hilfsmittel für weiterführende Analysen den p38 Signalweg robust induziert.

4.1.4 Stress führt zur differentiellen Phosphorylierung von FBP1, FBP2 und FBP3 *in vivo*

In dem nächsten Experiment sollte der Einfluss des externen Stressstimulus Anisomycin auf den Phosphorylierungsstatus der F2 USE bindenden Proteine überprüft werden (siehe Tabelle 7). Für alle USEBPs wurden Phosphorylierungsstellen vorausgesagt (phosphosite™ database: www.phosphosite.org). Erwähnenswert ist, dass nahezu alle der hier untersuchten ARE-BPs (im Gegensatz zu den drei bekannten positiven USE-Effektor Proteinen: hnRNPI, U2AF35 und U2AF65) Phosphorylierungsstellen in den RNA-Bindungsdomänen aufweisen (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Vorausgesagte Phosphorylierungsstellen der USEBPs²

USEBP	RNA Bindungsdomänen	vorausgesagte Phosphorylierungsstellen	
		Anzahl total	Anzahl in den RNA Bindungsdomänen
FBP1	4 KH	9	2
FBP2	4 KH	21	6
FBP3	4 KH	6	1
TIA	3 RRM	2	0
TIAR	3 RRM	2	1
HUR	3 RRM	11	5
CUGBP	3 RRM	2	1
hnRNPI	3 RRM	8	0
U2AF65	3 RRM	4	0
U2AF35	2 ZF, 1 RRM	3	0

HeLa Zellen wurden transient mit dem pCI-neo Vektor und dem entsprechenden USEBP transfiziert und mit phosphatdepletiertem Medium kultiviert, bevor ³²P Orthophosphat ins Zellkulturmedium hinzugegeben wurde. Danach wurden Stressexperimente mit Anisomycin (bzw. einer DMSO Lösungsmittelkontrolle) durchgeführt. Die Flag-gekoppelten Proteine wurden mittels Immunopräzipitation isoliert und auf einem SDS-Polyacrylamidgel separiert (experimenteller Ablauf siehe Abbildung 14A bzw. Methode 3.3.4).

Das Silbergel zeigt eine interne Qualitätskontrolle für die Expression der Flag-gekoppelten Proteine, die Reinheit der Eluate nach Immunopräzipitation sowie deren homogene Ladung für den Vergleich zwischen DMSO (Lösungsmittelkontrolle) behandelten und Anisomycin behandelten Zellen (siehe oberes Bild der Abbildung 14B). Der Western Blot gegen das Flag Epitop dient als eine weitere Ladekontrolle (siehe mittleres Bild der Abbildung 14B).

Im direkten Vergleich der Autoradiografiesignale fällt auf, dass FBP1, FBP2 und FBP3 nach Anisomycinbehandlung im Vergleich zu DMSO behandelten Proben hyperphosphoryliert sind (Abbildung 14B, vgl. Spuren 1&2, 3&4 und 5&6). Die Messung der Autoradiografie der inkorporierten ³²P Orthophosphatisotope ergab für FBP1 eine 1,7-fache, für FBP2 eine 1,9-fache und FBP3 eine 1,4-fache Induktion der Phosphorylierung nach Anisomycinstress. Die Exposition des Silbergels (Abbildung 14B) zeigt außerdem für TIA, TIAR und hnRNPI keine *de novo* Phosphorylierungen (vgl. Spuren 7&8, 9&10 und 15&16). Für HUR, CUGBP, U2AF35 und U2AF65 hingegen ist keine stress-abhängige differentielle Phosphorylierung zu erkennen (vgl. Spuren 11&12, 13&14, 17&18, 19&20).

² In der Tabelle 7 werden folgende Abkürzungen verwendet: RRM- RNA recognition motif, ZF- zinc finger, KH-K homologe

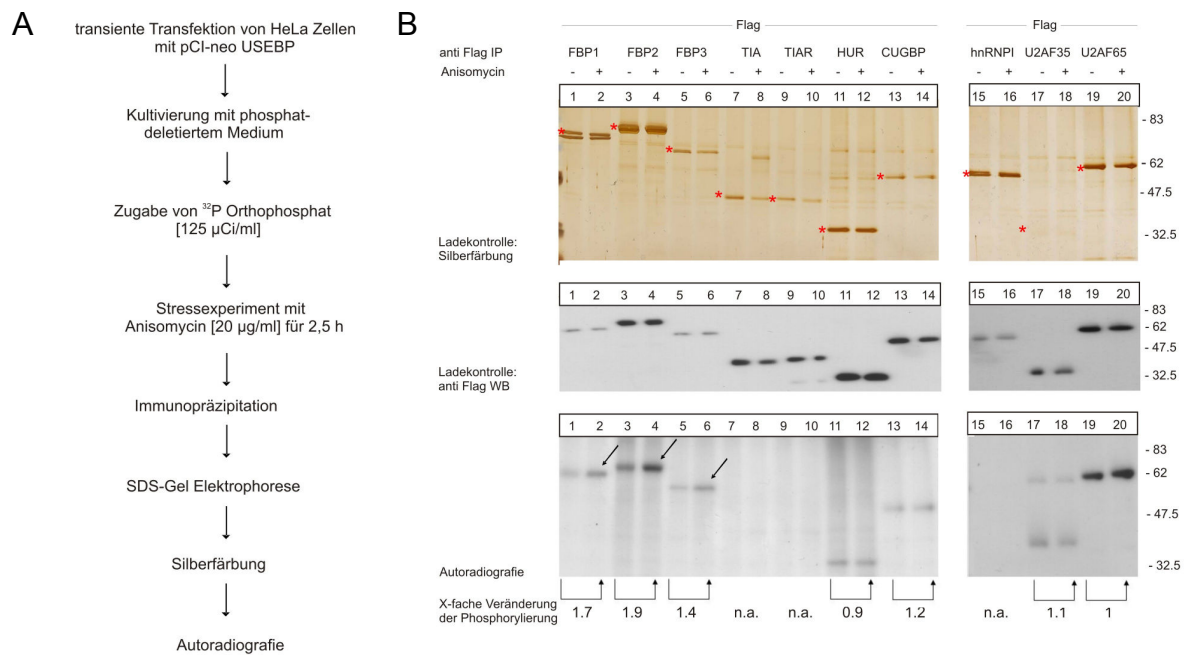


Abbildung 14: Aktivierung von p38 MAPK phosphoryliert FBP1, FBP2 und FBP3

A) Experimenteller Ablauf siehe Text **B)** Das obere Bild zeigt das silbergefärbte SDS Gel und weist die transiente Expression, die Reinheit der IP-Eluat und die gleichmäßige Ladung innerhalb des zu vergleichenden Paares nach. Das mittlere Bild ist ein anti Flag Western Blot, der die gleichmäßige Ladung der IP Eluate zusätzlich zeigt. Die Autoradiografie im unteren Bild zeigt die *de novo* Phosphorylierungsunterschiede nach Anisomycinbehandlung. Die Autoradiografiesignale wurden mit dem Phosphoimager quantifiziert. Dieses Bild ist ein repräsentatives Beispiel zweier unabhängiger Experimente. Die roten Sterne im Silbergel markieren die immunpräzipitierten Flag-gekoppelten Proteine. Die schwarzen Pfeile markieren die hyperphosphorylierten Flag-gekoppelten Proteine nach Stressinduktion.

Zusammengefasst konnte hiermit erstmals für FBP1, FBP2 und FBP3 eine stressabhängige Induktion der Phosphorylierung gezeigt werden, wohingegen ein solcher Effekt für bekannte positive Effektoren der USE-abhängigen 3'Endprozessierung (U2AF35, U2AF65 und hnRNPI) (Danckwardt et al., 2007) nicht nachweisbar war.

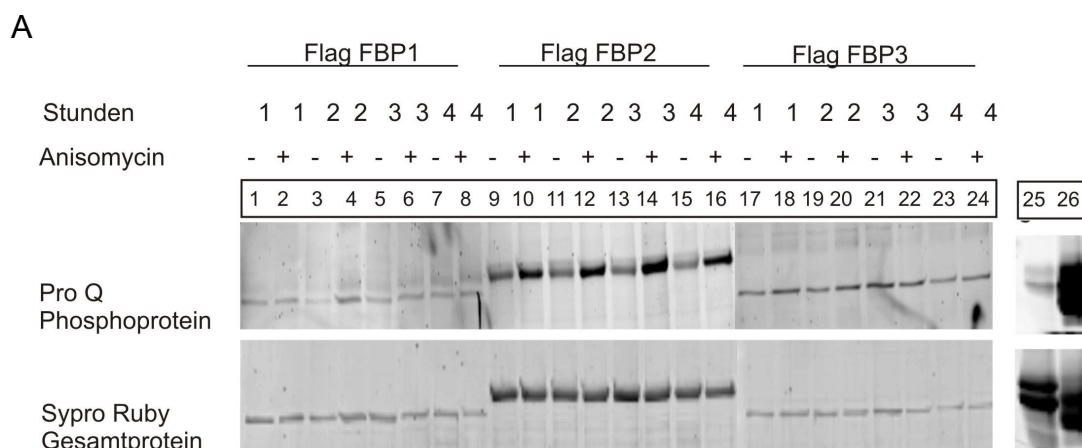
4.1.5 Phosphorylierungskinetiken von FBP1, FBP2 und FBP3

Um schließlich den Zeitpunkt zu bestimmen, an dem eine maximale differentielle Phosphorylierung von FBP1, FBP2 und FBP3 gemessen werden kann, wurden Kinetiken über vier Stunden durchgeführt. Ziel war es einen geeigneten Zeitpunkt zu finden, um in weiteren Experimenten einen möglichen Einfluss des Phosphorylierungsstatus der Proteine auf die USE RNA-Oligonukleotid Bindungsaffinität zu untersuchen. Hierfür wurden HeLa Zellen transient mit den pCI-neo USEBP Vektoren transfiziert und Stressexperimente durchgeführt. Anschlie-

ßend wurden die Proteine über den Flag-Tag aufgereinigt und der Phosphorylierungsstatus über Gelfärbungen analysiert (3.2.4.2 bzw. 3.2.4.3).

In der Abbildung 15A ist exemplarisch eine Kinetik (1-4 Stunden) der Phosphorylierung für die Flag-gekoppelten Proteine FBP1, FBP2 und FBP3 eines Stressexperimentes dargestellt. Besonders für das Protein Flag FBP2 ist augenscheinlich, dass nach Stressinduktion mit Anisomycin mehr hyperphosphoryliertes FBP2 vorliegt als im Vergleich zu DMSO behandelten Proben (Abbildung 15A, vgl. 9&10, 11&12, 13&14 und 15&16). Das obere Gel ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff ProQ gefärbt, welches Phosphoproteine spezifisch markiert. Das untere Gel ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff Sypro Ruby gefärbt, der das Gesamtprotein detektiert und somit als Ladekontrolle bzw. Referenz dient. Des Weiteren wurde dephosphoryliertes (Spur 25) und phosphoryliertes (Spur 26) Ovalbumin mitgeladen, um die Spezifität der Färbung zu kontrollieren (siehe Methode 3.2.3). Es ist zu erkennen, dass das dephosphorylierte Ovalbumin deutlich weniger Signal in der ProQ Färbung zeigt, als das phosphorylierte Ovalbumin (vgl. Spuren 25&26, ProQ Färbung), obwohl gleiche Mengen an Protein geladen wurden (vgl. Spuren 25&26, Sypro Ruby Färbung).

Insgesamt wurden drei unabhängige Kinetiken analysiert und der Phosphorylierungsstatus mit dem Typhoon TRIO + (GE Healthcare) und der Software 1D gel analysis quantifiziert und statistisch ausgewertet. Die Ergebnisse sind in Form von Balkendiagrammen (Mittelwert und Standardabweichung (SD)) in der Abbildung 15C dargestellt. Demnach ist FBP1 nach 3 Stunden Anisomycinbehandlung signifikant hyperphosphoryliert (vgl. DMSO zu Aniso), wohingegen FBP2 und FBP3 nach 2, 3 und 4 Stunden Anisomycinbehandlung signifikant hyperphosphoryliert sind (vgl. DMSO zu Aniso).



B

FBP1				
Zeit (h)	Mittelwert	SD	p-Wert	Signifikanz
1	1,0	0,4	0,440	ns
2	1,9	1,0	0,131	ns
3	2,0	0,6	0,049	*
4	1,7	1,0	0,169	ns

FBP2				
Zeit (h)	Mittelwert	SD	p-Wert	Signifikanz
1	1,3	0,4	0,124	ns
2	1,6	0,3	0,043	*
3	2,6	0,7	0,032	*
4	2,1	0,5	0,036	*

FBP3				
Zeit (h)	Mittelwert	SD	p-Wert	Signifikanz
1	1,3	0,3	0,054	ns
2	1,7	0,5	0,020	*
3	1,8	0,7	0,036	*
4	2,4	0,7	0,014	*

C

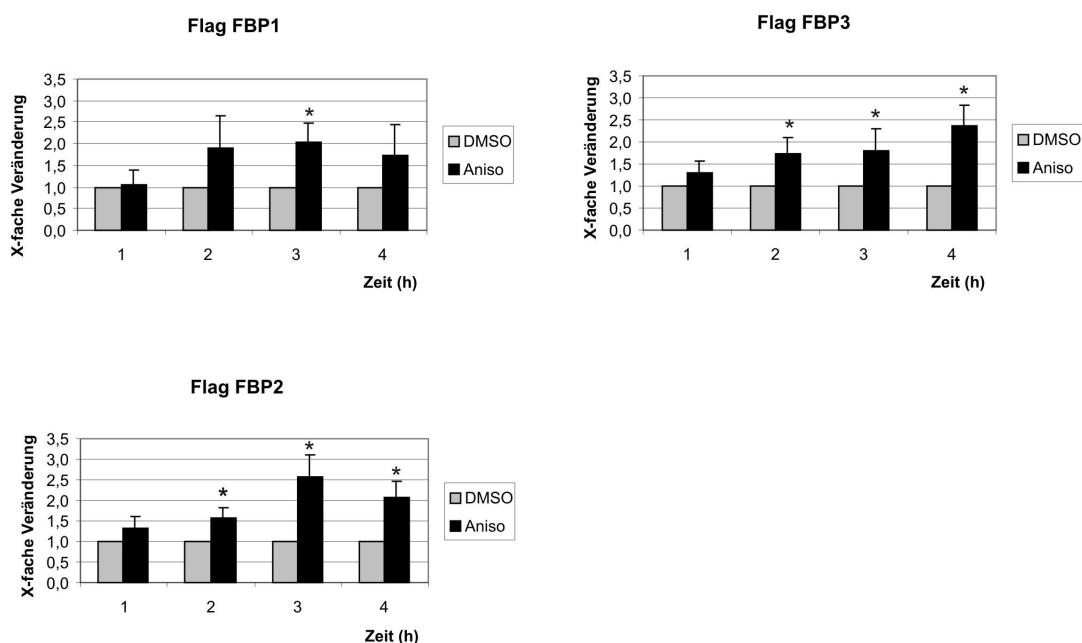


Abbildung 15: Phosphorylierungskinetiken der Flag-gekoppelten Proteine FBP1, FBP2 und FBP3

A) HeLa Zellen wurden transient mit den USE bindenden Proteinen transfiziert und Stressexperimente mit Anisomycin durchgeführt. Nach Immunopräzipitation wurden die Flag-gekoppelten Proteine in einem SDS Polyacrylamidgel separiert und die Proteine mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Das obere Bild zeigt Phosphoproteine, das untere Bild zeigt Gesamtprotein. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Typhoon TRIO+. **B)** In der Tabelle sind Mittelwerte, Standardabweichungen und p-Werte der Phosphorylierungsunterschiede (Anisomycin

versus DMSO) dargestellt. Der Mittelwert bezieht sich auf die relative Änderung der Phosphorylierung nach Stress normalisiert zu DMSO, siehe 3.2.4.3 C) Phosphorylierungsunterschiede wurden zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten (1-4 h) bestimmt. Balkendiagramme zeigen die Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens 3 unabhängigen Experimenten (* $p \leq 0,05$).

4.1.6 FBP2 und FBP3 zeigen eine reduzierte Bindungsaffinität nach Stressinduktion

Zur weiteren Charakterisierung des USE RNP Komplexes wurde untersucht, ob die Induktion der Phosphorylierung nach Stressinduktion die USE-RNA Bindungsaffinität von FBP1, FBP2 und FBP3 beeinflusst. Dazu wurden RNA-Protein-Interaktionsstudien durchgeführt, die dem experimentellen Ansatz des Versuches 4.1.1 ähneln. HeLa Zellen wurden transient mit dem pCI-neo inkl. USEBP transfiziert und anschließend mit Anisomycin bzw. DMSO behandelt. Nach anschließender Zellernte und Immunopräzipitation wurden ^{32}P markierte 21-mer RNA Oligonukleotide mit Flag-gekoppelten Proteinen koinkubiert und direkte Interaktionen durch UV-Bestrahlung kovalent konserviert (experimenteller Ablauf siehe 3.2.5).

Die Auswertung des Experimentes reproduzierte zum einen die Ergebnisse der Versuche 4.1.1 insofern, als dass FBP1/2/3 prädominant an das Wildtyp USE RNA Oligonukleotid binden (Abbildung 16B, Spuren 1, 7 und 13), hingegen kaum bzw. nicht an die mutierten RNA Oligonukleotidsequenzen USEmut (Spuren 3&4, 9&10 und 15&16) und Unrel (Spuren 5&6, 11&12 und 17&18).

Interessanterweise zeigen FBP2 und FBP3 nach Stressinduktion (2,5 h Stressinduktion) eine signifikant reduzierte RNA Bindungsaffinität (auf etwa 20%) zu dem USE RNA Oligonukleotid (Abbildung 16B, vgl. Spuren 7&8, 13&14). Im Gegensatz hierzu weist FBP1 keine veränderte RNA Bindungsaffinität zu dem USE RNA Oligonukleotid (vgl. Spuren 1&2) auf, obgleich die Aktivierung des p38 MAPK Signalweges durch die Anisomycinbehandlung tatsächlich erfolgreich war (Abbildung 16A vgl. Spuren 1&2).

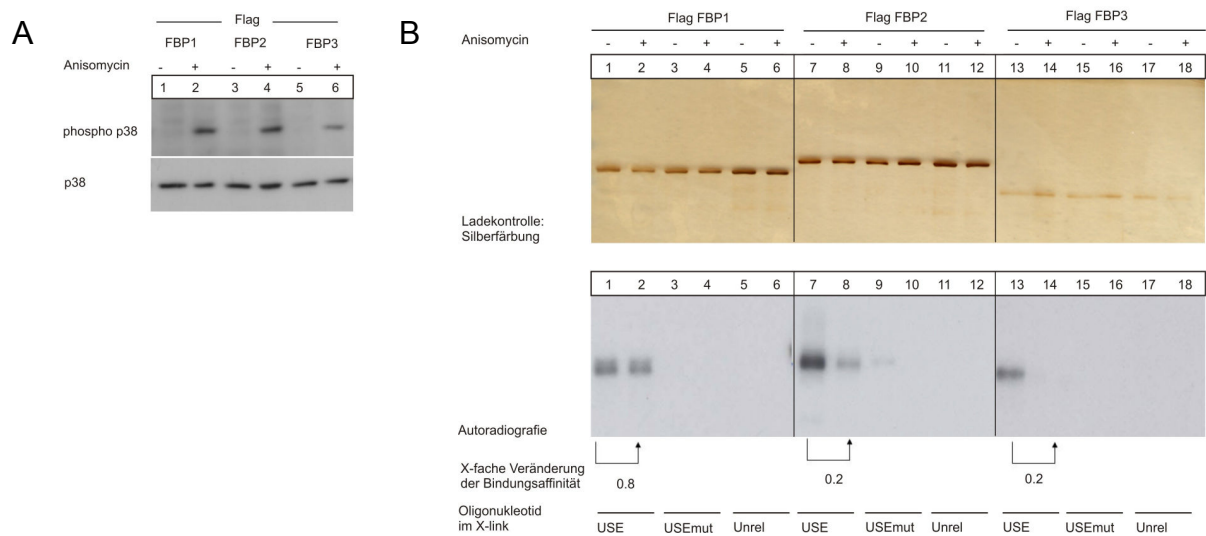


Abbildung 16: Stressinduktion reduziert Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 an das USE RNA Oligonukleotid

A) Western Blot gegen phospho p38 zeigt die Phosphorylierung von p38 MAPK. **B)** Das obere Bild zeigt das silbergefärbte SDS-Gel als Ladekontrolle. Das untere Bild zeigt die reduzierte USE-RNA Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 nach Stressinduktion in RNA-Protein Interaktionsstudien.

In technischen Replikaten konnte gezeigt werden, dass die differentielle Bindungsaffinität von FBP2 auch bei variierenden Hybridisierungsbedingungen robust nachweisbar blieb: so z.B. bei unterschiedlichen Natriumchloridkonzentrationen [33 mM, 66 mM, 166 mM] und diversen tRNA Konzentrationen [0,05µg/µl, 0,01µg/µl, 0,15 µg/µl]. In jedem technischen Replikat reduzierte sich die RNA-Bindungsaffinität auf das 0,2-fache nach Stressinduktion (siehe Abbildung 17).

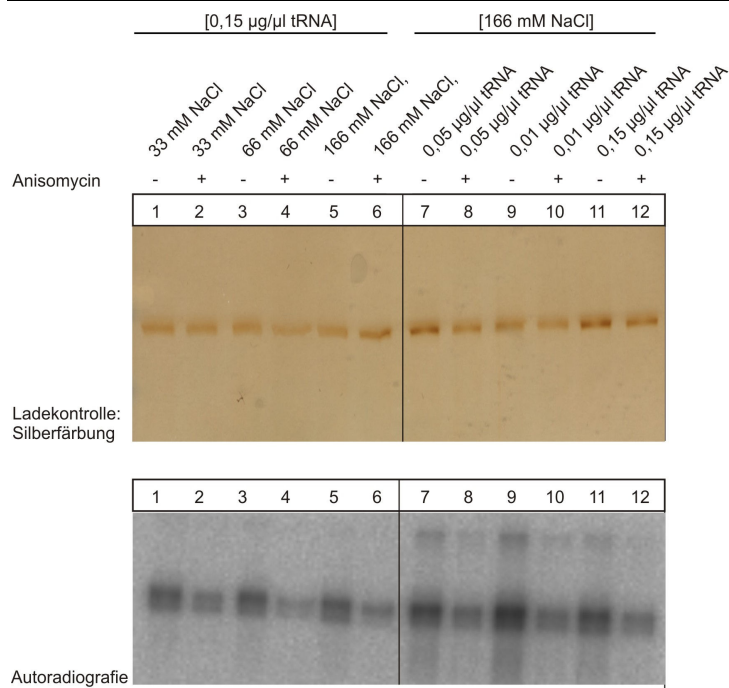


Abbildung 17: Reduktion der RNA Bindungsaffinität von FBP2 an das RNA USE Oligonukleotid nach Stressinduktion unter variierenden Hybridisierungsbedingungen

In technischen Replikaten konnte gezeigt werden, dass FBP2 sowohl bei unterschiedlichen Salzkonzentrationen (vgl. Spuren 1&2, 3&4, 5&6) als auch bei unterschiedlicher tRNA Konzentration (vgl. Spuren 7&8, 9&10, 11&12) differentiell an das USE Oligonukleotid nach Stressinduktion bindet. Die Bindungsaffinität reduzierte sich konstant auf 0,2 nach Anisomycinbehandlung.

Die Ergebnisse ließen sich jedoch nicht unter den gewählten Zellkulturbedingungen reproduzieren, was in Hinblick auf die Hyperphosphorylierung von FBP2 und 3 insbesondere zu späteren Zeitpunkten (Anisomycinbehandlung für 3 und 4 h, siehe Abbildung 15C) hier durch die relativ kürzere Anisomycinbehandlung (2,5 h) und/oder Artefakte infolge der Probenaufbereitung (Dephosphorylierung) möglicherweise zu erklären wäre.

In einem weiteren experimentellen Ansatz wurde daher der Einfluss der Zeitdauer der Stressinduktion getestet. In den darauffolgenden Experimenten (n=3) konnte festgestellt werden, dass es zu keiner Änderung der USE RNA Oligonukleotid Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 kam, wenn diese für 2 h mit Anisomycin behandelt wurden (Daten nicht gezeigt).

Analog zu den Phosphorylierungsdaten (siehe Abbildung 15C) änderte sich die USE RNA Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 hingegen signifikant, wenn die Zellen für 4 h mit Anisomycin behandelt wurden. Nach dieser Stressinduktion reduziert sich die Bindungsaffinität von FBP2 signifikant auf $0,80 \pm 0,07$ ($p = 0,01$) und für FBP3 signifikant auf $0,56 \pm 0,09$ ($p = 0,01$) (siehe Abbildung 18).

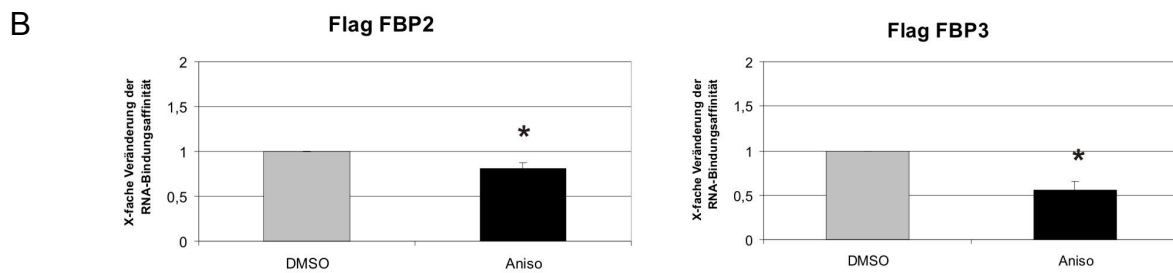
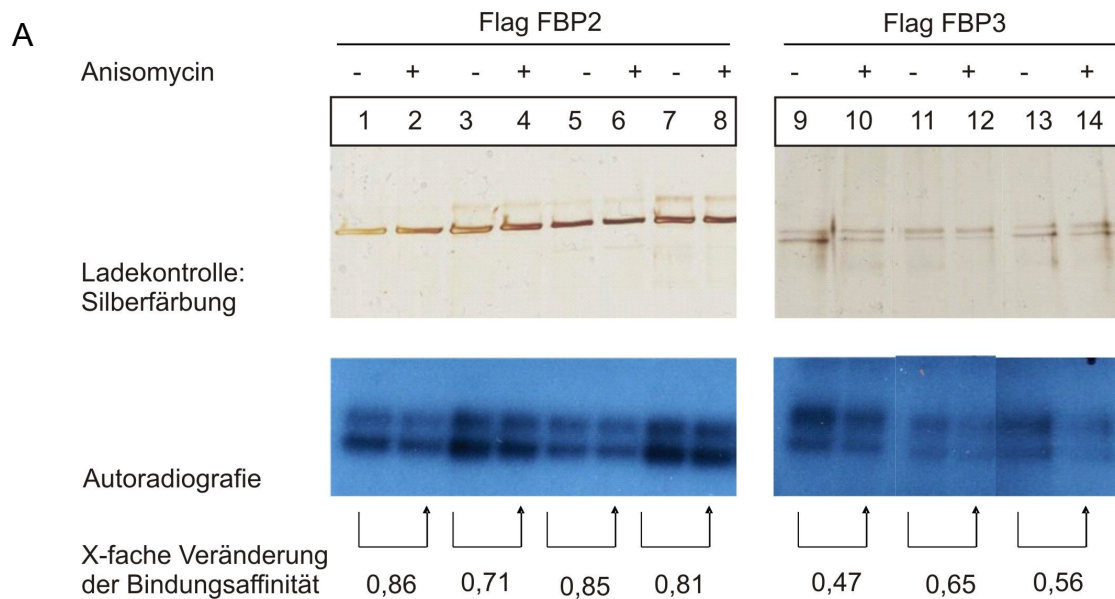


Abbildung 18: Stressinduktion für 4 h reduziert Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 an das USE RNA Oligonukleotid

A) Drei bzw. vier unabhängige Experimente zeigen in RNA-Protein Interaktionsstudien, dass FBP2 und FBP3 mit einer reduzierten Bindungsaffinität an das USE RNA Oligonukleotid binden, wenn die Proben für 4 h mit Anisomycin behandelt wurden. **B)** T-Tests ergaben eine signifikante Veränderung der Bindungsaffinität von FBP2 und FBP3 an das USE-RNA-Oligonukleotid nach 4 h Stressinduktion.

Damit zeigt sich, dass die Dauer des Stressstimulus einen bedeutenden Einfluss auf die differentielle F2 USE RNA-Bindung von FBP2 und FBP3 hat, was möglicherweise direkt den höheren Phosphorylierungsgrad der beiden Proteine zu späteren Zeitpunkten nach Stressinduktion (siehe Abbildung 15) widerspiegelt. Interessanterweise konnte für FBP2 gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung des Threoninrestes 692 die RNA-Bindungsaffinität zu einem ARE enthaltenden Transkript drastisch reduziert (Briata et al., 2005).

4.1.7 Zusammenfassung der molekulare Analyse des USE Ribonukleoprotein Komplexes

Im ersten Teilprojekt dieser Arbeit konnte in *in vitro* RNA-Protein-Interaktionsstudien gezeigt werden, dass FBP1, FBP2, FBP3, TIA, TIAR, CUGBP, HUR, hnRNPI und U2AF65 direkt an das F2 USE Motiv binden. Mit *in vivo* Experimenten wurde untersucht, ob eine Stressinduktion die Phosphorylierungsstatus der USE bindenden Proteine modifiziert. Es konnte gezeigt werden, dass FBP1, FBP2 und FBP3 nach Stressinduktion hyperphosphoryliert werden, wohingegen positive Effektorproteine der 3'Endprozessierung (Danckwardt et al., 2007) nicht phosphoryliert wurden. Anschließende *in vitro* RNA-Protein-Interaktionsstudien konnten zeigen, dass hyperphosphoryliertes FBP2 und FBP3 nach der Stressinduktion eine reduzierte F2 USE Bindungsaffinität besitzen.

Weitere Experimente im Labor konnten zusätzlich zeigen, dass nach Stressinduktion nicht nur FBP2 und FBP3 in ihren Bindungsaffinitäten reguliert werden können, sondern auch hnRNPI, U2AF35 und U2AF65. Interessanterweise erhöhte sich die Affinität dieser Proteine zu dem F2 USE Motiv nach Stressinduktion. Des Weiteren bestätigten p38 Kinaseinhibitorexperimente die p38-abhängige USE RNP Formation nach Stressinduktion (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt).

Diese Daten deuten darauf hin, dass einige der hochaffinen USE-bindenden ARE-BPs (nämlich FBP2 und FBP3) und die positiven USE-Effektorproteine (hnRNPI, U2AF35 und U2AF65) stressabhängig um die Bindung an das F2 USE Motiv konkurrieren (siehe Fragestellung in dem Kapitel 1.5). Diese Daten zeigen außerdem zum ersten Mal, dass die Zusammensetzung des USE-RNP Komplexes von externen Stimuli reguliert wird (Modell siehe Abbildung 28).

Es war somit interessant zu wissen, ob die veränderte USE RNP Komplexförmation nach Stressinduktion einen direkten Einfluss auf die Effizienz der F2 3'Endprozessierung hat (siehe Kapitel 4.2).

4.2 Analyse der USE abhängigen 3' Endprozessierung in vivo

4.2.1 Versuchsaufbau

Um die Frage zu beantworten, ob die 3' Endprozessierung der F2 mRNA unter Stressbedingungen regulierbar ist, wurden stabile Zelllinien mit den jeweiligen Tandemreportern generiert, die eine Messung der 3' Endprozessierungseffizienz erlauben. Es wurden Stressexperimente mit den stabilen Zelllinien durchgeführt und anschließend die Abundanz der RNA Isoformen mit Hilfe der PAT PCR (siehe Methode 3.1.2.2) visualisiert und quantifiziert.

Die HBB (humanes beta-Globin)-F2 WT Hybridgen Konstrukte und die entsprechenden Tandemreporter standen für diese Arbeit im Labor bereits zur Verfügung (Herstellung siehe (Danckwardt et al., 2004; Gehring et al., 2001)). Diese Konstrukte bestehen aus den Exonen 1-3, zwei Intronsequenzen des β -Globin Gens sowie variierenden 3' untranslatierten Regionen (UTR) und 3' flankierenden Sequenzen (FS) entweder des F2 Gens oder des HBB Gens. Der Grund für Benutzung dieses Hybridgens liegt in der Tatsache, dass das gesamte Prothrombin Gen relativ groß ist (27314 bp) und somit nicht für diese Experimente verwendet werden kann. Es ist bekannt, dass das β -Globin aufgrund der geringeren Größe effizient gespleißt wird, einfach zu transfizieren ist und eine ähnliche mRNA Stabilität besitzt (Ross and Pizarro, 1983). In diesen Konstrukten wurden die USE Motive durch Mutagenesen mit dem Kit GeneTailor™ site directed mutagenesis system (Invitrogen) teilweise modifiziert (siehe Methode 3.1.3.6).

Es wurden zwei unterschiedliche Arten der Tandemreporter Konstrukte generiert und genutzt.

A) Tandemreporter mit dem F2 USE im heterologen Kontext

Dieser Tandemreporter besteht neben den Exonen 1-3 und den dazwischen liegenden Intronsequenzen des β -Globin Gens aus zwei hintereinander liegenden Kassetten mit jeweils einem Poly(A) Signal und einer Schnittstelle (CS). Dieser Reporter steht in einem heterologen Kontext und ist eine Fusion der F2 3'UTR und 62 Nukleotide der HBB 3'FS in der 1. Kassette. Die zweite Kassette besteht aus der HBB 3'UTR und 3'FS (schematische Darstellung siehe Abbildung 19). Das Konstrukt USE-HBB/HBB trägt in der 3'UTR der ersten Kassette die USE WT Sequenz (ATTATTTTGTGTTT). Das zweite Konstrukt UNR-HBB/HBB besitzt eine nicht USE verwandte Sequenz (ACGAGACGAGCGCGC). Der Vorteil dieses Tandemreporters liegt möglicherweise in der Expression der mRNA Isoform 1 (Prozessierung an der

5'Poly(A) Stelle) des Konstruktes UNRHBB/HBB. Dieser Tandemreporter besitzt nämlich zusätzlich in der 3'FS das DSE Motiv des β -Globin Gens, welches bekannterweise die Prozessierung fördert (siehe Übersichtsartikel (Danckwardt et al., 2006a; Mandel et al., 2008; Proudfoot, 2004)).

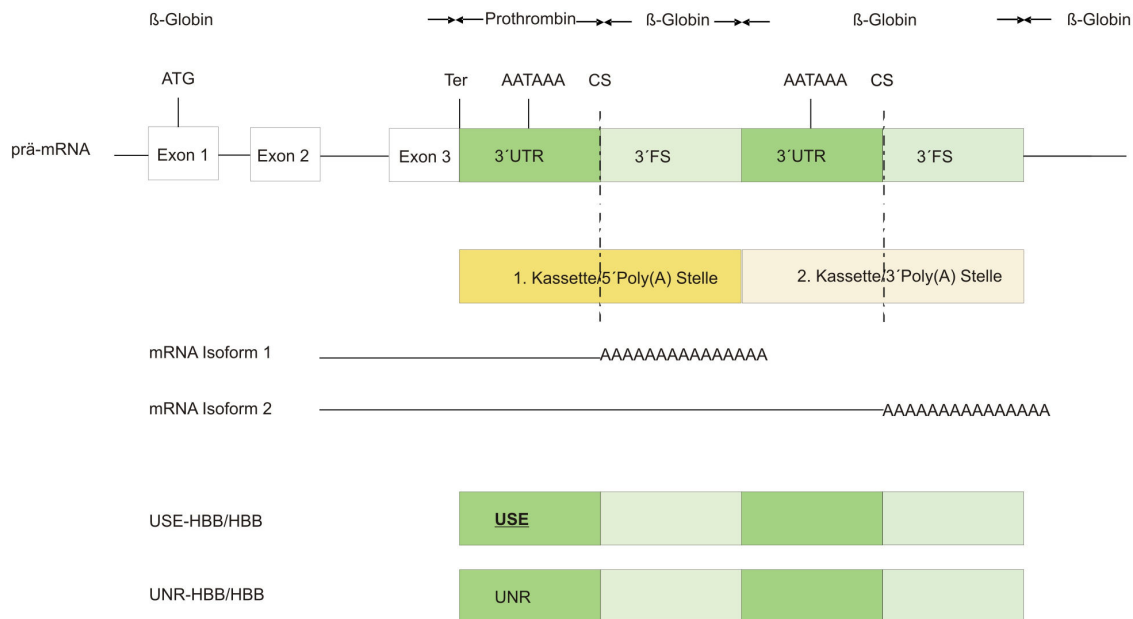


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Tandemreporterkonstrukte im heterologen Kontext

Die HBB-F2 Hybridgen Konstrukte bestehen aus zwei Tandemkassetten, die jeweils ein Poly(A) Signal (AATAAA) und eine Schnittstelle (CS) besitzen. In den Hybridgenen wurde die 3'UTR Region des HBB Gens durch die entsprechenden Sequenzen der F2 3'UTR in der 1. Kassetten ersetzt. Die verkürzte 3'FS von 62 Nukleotiden entspricht dem HBB. Eine Variante des Tandemreporter Konstruktes enthält ein funktionelles USE Motiv (ATTATTTTTGTGTTT), das andere Derivat UNR-HBB/HBB enthält eine nicht funktionelle Form der F2 USE Sequenz (ACGAGACGAGCGCGC) (Danckwardt et al., 2007).

B) Tandemreporter mit dem F2 USE im homologen Kontext

Dieser Tandemreporter besteht neben den Exonen 1-3 und den dazwischen liegenden Intronsequenzen des β -Globin Gens aus zwei hintereinander liegenden identischen Tandemkassetten (siehe Abbildung 20). Dabei wurde die 3'UTR und 62 Nukleotide der 3'FS der β -Globin Sequenz durch die 3'UTR und 140 Nukleotide der 3'FS des Prothrombin ersetzt. Beide Tandemkassetten besitzen jeweils ein Poly(A) Signal und eine Schnittstelle, so dass die prä-mRNA Transkripte in zwei unterschiedliche Isoformen prozessiert werden können. Die Abundanz der prozessierten mRNA Isoformen zeigt die bevorzugte Prozessierungsstelle des jeweiligen Tandemreporters. Um ausschließlich USE-vermittelte 3'Endprozessierung zu mes-

sen, wurden drei unterschiedliche Tandemreporter Konstrukte hergestellt, die entweder eine funktionelle USE Sequenz (ATTATTTTTGTGTTT), in der ersten Kassette (5' Poly(A) Stelle) oder in der zweiten Kassette (3' Poly(A) Stelle) besitzen. Des Weiteren gab es ein Konstrukt, welches das USE Motiv in beiden Kassetten trug. Dieses Set von Konstrukten erlaubt die Messung der Effizienz der USE-vermittelten 3'Endprozessierung und beinhaltet eine interne Kontrolle für Mechanismen wie Transkription, Spleißeffizienz und mRNA Stabilität. Es ist bekannt, dass die Mutation an der Schnittstelle (202010G→A) zu einer etwa 1,3-1,6-fach gesteigerten 3'Endprozessierung führt (Danckwardt et al., 2004; Gehring et al., 2001). Ein Vergleich der Tandemreporter USE/USE und USE(202010G→A)/USE eignet sich daher idealerweise um das Auflösungsvermögen der PAT PCR zu überprüfen. Das Konstrukt USE(202010G→A)/USE sollte deutlich mehr am 5' Poly(A) Signal prozessiert werden als das Konstrukt USE/USE.

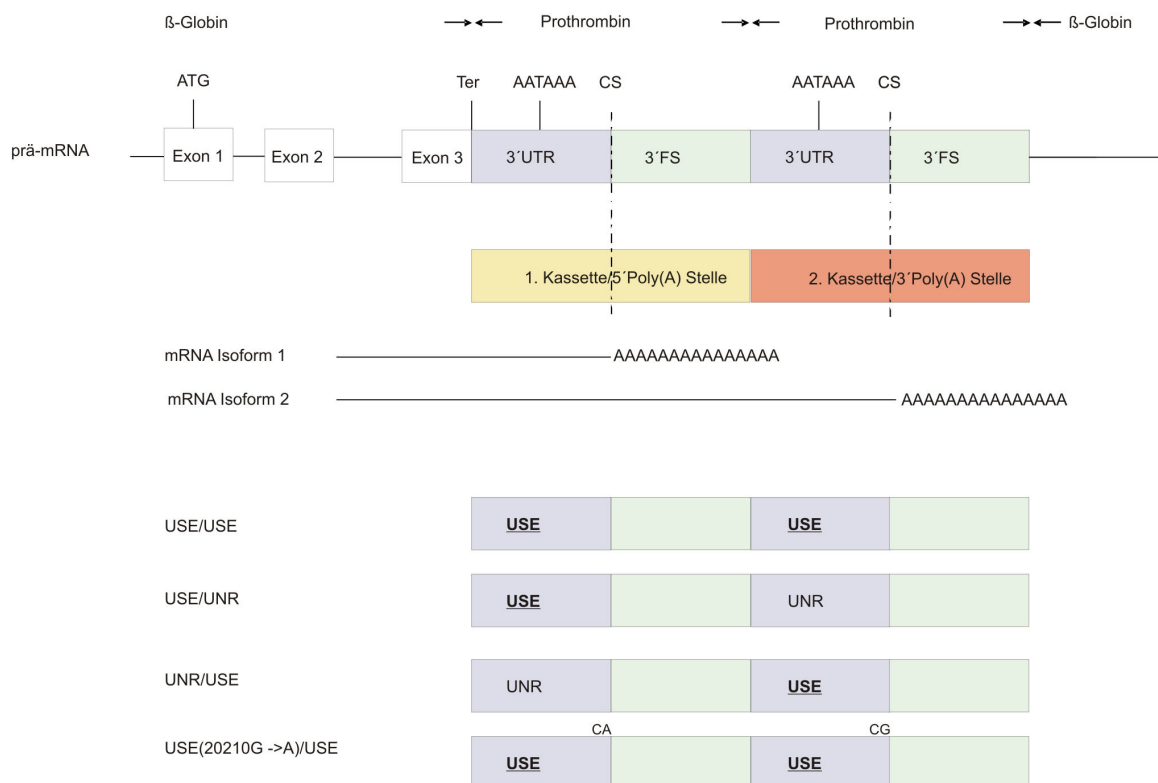


Abbildung 20: Schematische Darstellung der Tandemreporter Konstrukte im homologen Kontext

Die HBB-F2 Hybridgen Konstrukte bestehen aus zwei Tandemkassetten, die jeweils ein Poly(A) Signal (AATAAA) und eine Schnittstelle (CS) besitzen und dessen Primärtranskript somit in zwei unterschiedliche mRNA Isoformen (entweder an der 5' Poly(A) Stelle oder an der 3' Poly(A) Stelle polyadenyliert) prozessiert werden kann. Die unterschiedlichen Derivate des oben gezeigten Tandemreporter Konstruktes enthalten entweder in beiden Kassetten das USE Motiv, bzw. nur in der 1. Kassette/5' Poly(A) Stelle oder in der 2. Kasset-

te/3' Poly(A) Stelle. Zusätzlich existiert ein Konstrukt USE(20210G→A)/USE, das eine Mutation in der ersten Schnittstelle (20210G→A) trägt. Dieses Konstrukt ermöglicht im Vergleich mit dem USE/USE Konstrukt das Auflösungsvermögen der PAT PCR zu messen (Erläuterung siehe Text).

Stabile Expression

Stabile Zelllinien bieten theoretisch den Vorteil, dass die Anzahl der Tandemreporterkopien annähernd endogenen Maßstäben entspricht. Durch die wochenlange Selektion der transient transfizierten HeLa Zellen mit dem Selektionsmarker Geneticin wird der Tandemreporter in wenigen Fällen stabil ins Genom integriert. Höchstwahrscheinlich können aufgrund der geringen Kopienanzahl des Transgens Prozessierungsunterschiede der Tandemreporter visualisiert und quantifiziert werden. Ein weiterer Vorteil liegt darin, dass maximale Unterschiede zwischen gestressten und ungestressten Zellen gemessen werden können, da kein Transfektionsstress unmittelbar zuvor stattgefunden hat.

Es wurden für alle oben genannten Tandemreporter Konstrukte (USE/USE, USE/UNR, UNR/USE, USE-HBB/HBB, UNR-HBB/HBB) stabile Zelllinien hergestellt (3.3.2) und ihre transgene Expression untersucht (siehe Tabelle 8). Die HeLa Zellen wurden dafür zeitgleich mit zwei unterschiedlichen Vektoren transfiziert. Die Tandemreporter befinden sich in dem pGEM 7Zf Vektor, der keinen Selektionsmarker beinhaltet. Deswegen wurde der pCI-neo Vektor kotransfiziert, der sowohl das Gen für das grünfluoreszierende Protein (GFP), als auch ein Geneticinresistenzgen besitzt. Die Wahrscheinlichkeit, dass beide Vektoren kotransfiziert werden, ist hoch. Die transfizierten Zellen wurden einige Wochen mit Geneticin selektioniert bis makroskopisch Zellklone zu erkennen waren. Insgesamt wurden zwölf grünfluoreszierende Klone pro Tandemreporter Konstrukt isoliert und separat kultiviert. In einem zweiten Schritt wurde die transgene Expression durch Northern Blots (siehe Methode 3.1.7) überprüft. Dafür wurde Total RNA der stabilen Zelllinien isoliert und in einem denaturierenden Gel separiert. Die RNA wurde anschließend auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membran wurde danach mit einer radioaktiv markierten cRNA Sonde inkubiert, die homolog zu dem dritten Exon des β -Globins ist. Exprimierte ein Zellklon das Transgen, hybridisierte die radioaktiv markierte Sonde mit dem RNA Transkript. Mit Hilfe des Phosphoimagers konnten die Ergebnisse quantifiziert werden. Klone, die positive Signale des Transgens im Northern Blot zeigten, wurden anschließend sequenziert. Klone mit fehlerfreien Transgenen wurden in ei-

nem letzten Schritt in der PAT PCR auf ihr Prozessierungsmuster hin überprüft. Zum Schluss wurden die Stressexperimente durchgeführt.

Tabelle 8: Charakterisierungskriterien der stabilen Zellklone

Tandemreporter	USE/USE	USE/UNR	UNR/USE	USE-HBB/HBB	UNR-HBB/HBB
GFP Signal	✓	✓	✓	✓	✓
Northernblot	✓	✓	✓	✓	✓
DNA Sequenz	✓	✓	✓	✓	✓
Expression PAT PCR	✓	✓	✓	✓	✓
Anzahl getesteter Klone	12	12	12	12	12
Anzahl positiver Klone	5	8	3	4	3

Transiente Expression

Transiente Expressionen bieten grundsätzlich den Vorteil, dass die Reporter nicht durch endogene enhancer oder silencer Elemente zusätzlich in deren Expression reguliert werden. Transiente Expressionen führen zu einer starken Überexpression der Tandemreporter und es ist somit nicht auszuschließen, dass nicht alle prä-mRNA Moleküle des Transgens in einer definierten (kurzen) Zeit prozessiert werden können und damit Prozessierungsunterschiede nach Stressinduktion nicht aufgelöst werden können.

Um jedoch potentielle Effekte der Transgenintegration in stabil transfizierten Zellen zu umgehen, wurden zusätzlich transient transfizierte Zellen in weiterführenden Experimenten untersucht. In allen Experimenten (sowohl mit stabil als auch transient transfizierten Zellen) wurde die Prozessierung der Tandemreporter in HeLa Zellen analysiert. Hierzu wurden Stressexperimente mit Anisomycin durchgeführt und Gesamt-RNA zu unterschiedlichen Zeitpunkten isoliert (siehe Methoden 3.3.5 und 3.1.5), diese in cDNA umgeschrieben (siehe Methode 3.1.6) und das Prozessierungsmuster mittels der PAT PCR (siehe Methode 3.1.2.2) ausgewertet. Hierbei wurden die Prozessierungsmuster zwischen Anisomycin und DMSO behandelten Zellen miteinander verglichen, so dass eine Aussage getroffen werden konnte, ob ein externer Stressstimulus die USE-vermittelte 3' Endprozessierung regulieren kann.

4.2.2 F2 USE Sequenz stimuliert die 3' Endprozessierung

Zu Beginn wurde die Prozessierungsaktivität der transient transfizierten Tandemreporter analysiert. In der Abbildung 21 sind die RNA Isoformen exemplarisch dargestellt, die aus den prä-mRNA Transkripten prozessiert wurden. Es ist zu erkennen, dass der Tandemreporter

USE/USE an beiden Poly(A) Stellen prozessiert wird. Die Quantifizierung der PAT PCR Produkte ergibt ein Prozessierungsverhältnis von ca. 40% an der 5' Poly(A) Stelle und ca. 60% an der 3' Poly(A) Stelle (siehe Spur 2). Die Prozessierung des Tandemreporters USE/UNR hingegen erfolgt präferentiell an der 5' gelegenen Poly(A) Stelle (ca. 80%). Entsprechend wird der Tandemreporter UNR/USE hingegen vermehrt an der 3' Poly(A) Stelle prozessiert (siehe Spur 4, ca. 95%). Der gleiche stimulierende Einfluss des F2 USE Motivs auf die 3' Endprozessierung ist auch bei dem F2-HBB/HBB Tandemreporter zu erkennen (siehe Spuren 6 und 7). Die Prozessierungsaktivität an der 5' Poly(A) Stelle ist deutlich reduziert, wenn eine nicht funktionelle USE Sequenz in der 1. Kassette vorliegt (vgl. Spur 7 mit 6).

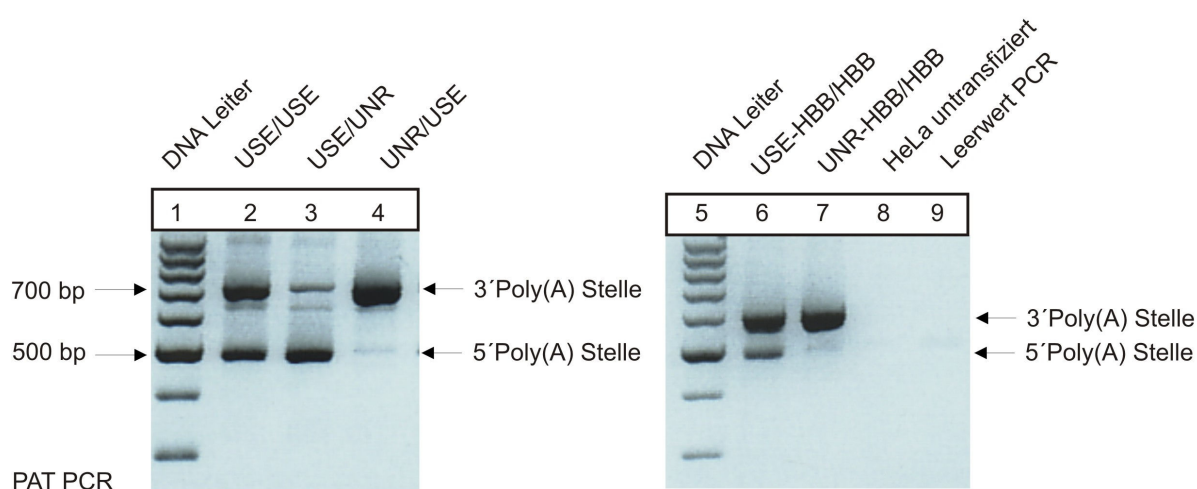


Abbildung 21: USE Motiv stimuliert die 3' Endprozessierung

PAT PCR Ergebnisse von transient transfizierten HeLa Zellen. Die unteren Banden (500 bp) zeigen mRNA Isoformen, die an der 5' Poly(A) Stelle prozessiert wurden. Die oberen Banden (700 bp bzw. 600 bp) stellen mRNA Isoformen dar, die an der 3' Poly(A) Stelle prozessiert wurden. Die Spur 8 zeigt, dass in untransfizierten HeLa Zellen kein Produkt amplifiziert wird. Die PAT PCR ist somit spezifisch für das Transgen (Tandemreporter).

In diesen Experimenten konnte der stimulierende Effekt der F2 USE Sequenz auf die 3' Endprozessierung (Danckwardt et al., 2007) reproduziert werden. Aufgrund der sehr geringen Prozessierung an der 5' Poly(A) Stelle der Tandemreporter UNR/USE und UNR-HBB/HBB erscheint jedoch eine eventuelle Regulation der 3' Endprozessierung technisch schwierig messbar. Somit wurden diese Konstrukte in weiteren Stressexperimenten nicht analysiert.

Um auch kleine Änderungen der regulierten 3' Endprozessierung erfassen zu können, wurde das Auflösungsvermögen der PAT PCR überprüft. Dazu wurden die Prozessierungsmuster der

Tandemreporter Konstrukte USE(20210(G→A))/USE und USE/USE miteinander verglichen. Wie bereits zuvor erwähnt, führt die Mutation an der Schnittstelle der prä-mRNA (F2 20210G→A) zu einer erhöhten 3'Endprozessierung (Gehring et al., 2001). In der Abbildung 22 ist zu erkennen, dass die prä-mRNA Transkripte des Tandemreporters USE(20210(G→A))/USE viermal mehr an der 5'Poly(A) Stelle prozessiert werden als die des Tandemreporters USE/USE. Dieses Ergebnis reproduziert zum einen die gesteigerte 3'Endprozessierung bei Vorliegen der Mutation F2 20210G→A (Danckwardt et al., 2004; Gehring et al., 2001) und zeigt zusätzlich, dass die PAT PCR für die Messung einer etwaig (gering-gradig) regulierten 3'Endprozessierung herangezogen werden kann.

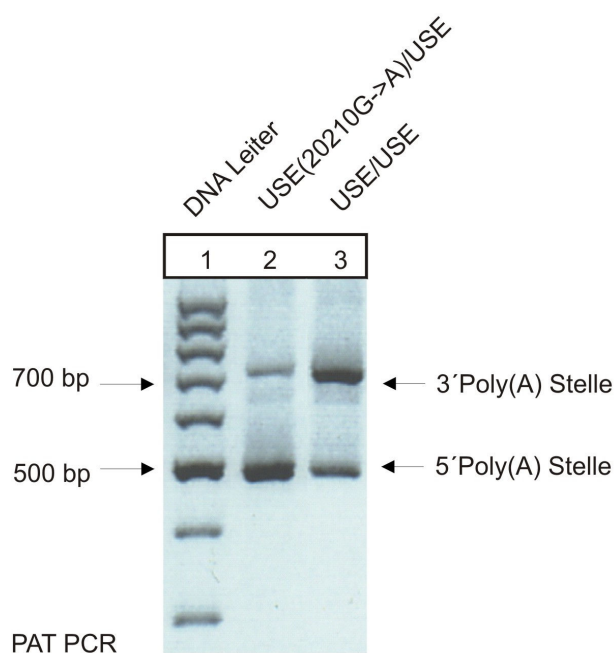


Abbildung 22: PAT PCR misst Unterschiede in der 3'Endprozessierung

PAT PCR Ergebnisse von transient transfizierten HeLa Zellen. Der Tandemreporter USE(20210G→A)/USE trägt eine Mutation in der Schnittstelle der ersten Kasette. Diese Mutation führt zu einer gesteigerten 3'Endprozessierung nach dem 5'Poly(A) Signal (4-fach) im Vergleich zu dem Tandemreporter USE/USE, der diese Mutation nicht trägt (vgl. Spur 2 mit 3).

4.2.3 Analyse der Tandemreporter Konstrukte mit F2 im heterologen Kontext

In Stressexperimenten mit einem stabilen Klon des Tandemreporters USE-HBB/HBB wurde die 3'Endprozessierung zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. In der Abbildung 23A ist zu erkennen, dass die Stressexperimente mit Anisomycin bzw. DMSO als Lösungsmittelkontrolle zu einer differentiellen Phosphorylierung von p38 MAPK führten (exemplarischer Western Blot: 1 h Anisomycin [20µg/ml]). Der Vergleich der Prozessierungsmuster mit und ohne

Stress ergab jedoch keine stressabhängige Regulation der 3'Endprozessierung bei Vorliegen eines heterologen Hybrid Konstruktes (siehe Abbildung 23B).

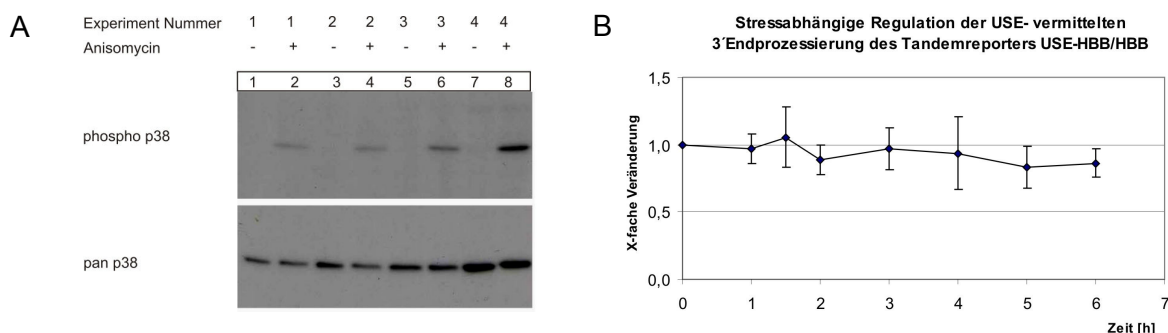


Abbildung 23: Stress führt zu keiner Regulation der 3'Endprozessierung des Tandemreporters USE-HBB/HBB in stabil transfizierten HeLa Zelllinien

A) Anti phospho p38 Western Blot zeigt die Phosphorylierung von p38 MAPK nach Stressinduktion. **B)** Die Auswertung der stabilen Zelllinie USE-HBB/HBB ergab in der PAT PCR keinen Unterschied in der USE-vermittelten 3'Endprozessierung nach Stressinduktion. Der Y-Wert zeigt die Änderung der 3'Endprozessierung nach Stressinduktion und ergibt sich aus dem folgenden Quotienten:

$$Y = \frac{\text{Anisomycin (5'PCR Produkt/3'PCR Produkte)}}{\text{DMSO (5'PCR Produkt/3'PCR Produkte)}}$$

In dem Diagramm sind die Mittelwerte und Standardabweichung dargestellt (n=4).

Der Tandemreporter USE-HBB/HBB ist insofern ein heterologes Fusionsprodukt, als dass die 3'UTR der ersten Kasette dem Prothrombin, die 3'FS jedoch dem HBB entspricht (siehe Abbildung 19). Eventuell ist für die regulierte 3'Endprozessierung jedoch die natürliche 3' flankierende Sequenz essentiell. Deswegen wurden in den weiteren Experimenten die Tandemreporter Konstrukte mit F2 im homologen Kontext untersucht. Diese enthalten sowohl die 3'UTR als auch die 3'FS des Prothrombins (siehe Abbildung 20).

4.2.4 Analyse der Tandemreporter Konstrukte mit F2 im homologen Kontext

Zur weiteren Analyse einer möglichen Regulation der 3'Endprozessierung wurden die Tandemreporter USE/UNR und USE/USE in Stressexperimenten analysiert. Beide Konstrukte zeigten quantifizierbare mRNA Isoformen in der PAT PCR sowohl nach der 5' gelegenen als auch 3' gelegenen Poly(A) Stelle.

In den darauffolgenden Stressexperimenten wurden insgesamt drei unterschiedliche Klone der Tandemreporter USE/UNR und USE/USE untersucht. Die stabilen Zelllinien wurden zu un-

terschiedlichen Zeitpunkten (1-4 Stunden vor der Zellernte) mit Anisomycin behandelt. In der Abbildung 24 sind die Prozessierungsaktivitäten von drei unterschiedlichen Klonen dargestellt.

Nach statistischer Auswertung ungepaarter einseitiger T-Tests ist zu erkennen, dass der Klon USE/UNR #1 (siehe Abbildung 24A, roter Graph) im Vergleich zu dem Referenzklon USE/USE #1 (siehe Abbildung 24A, blauer Graph) signifikant mehr an dem 5' gelegenen Poly(A) Signal prozessiert wird, wenn beide Klone für 1 h mit Anisomycin behandelt wurden. Dies deutet auf eine stressinduzierte Erhöhung der USE-vermittelten 3'Endprozessierung unmittelbar nach Stressinduktion (1 h Anisomycinbehandlung) hin, während dies sich zu späteren Zeitpunkten normalisiert (roter Graph, 1= unveränderte Expression des Reporters aus gestressten *versus* ungestressten Zellen). Bei Betrachtung weiterer stabiler Zellklone fällt auf, dass sich die Klone nach Stressinduktion unterschiedlich verhalten. Die Klone USE/UNR #2 und #3 (siehe Abbildung 24B und C, rote Graphen) zeigten keine stressabhängige USE-vermittelte Induktion der 3'Endprozessierung nach 1 h Anisomycinbehandlung.

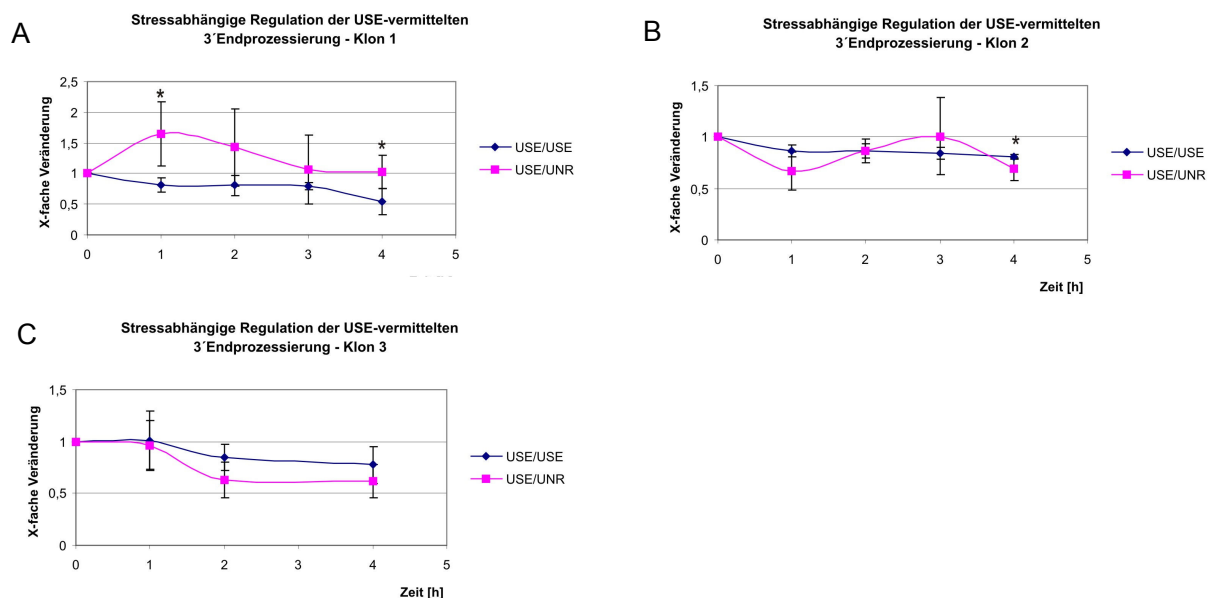


Abbildung 24: Die stabilen Zelllinien verhalten sich unterschiedlich in der Regulation der USE-vermittelten 3'Endprozessierung nach Stressinduktion

A) Der Vergleich der beiden Klone USE/UNR #1 und USE/USE #1 zeigt, dass diese nach 1 h Anisomycinbehandlung signifikant unterschiedlich prozessiert werden. Nach 1 h Stressinduktion wird der Tandemreporter USE/UNR #1 (roter Graph) signifikant mehr an dem 5' gelegenen Poly(A) Signal prozessiert als der Klon USE/USE #1 (blauer Graph). **B)** Der Vergleich der beiden Klone USE/UNR #2 (roter Graph) und USE/USE #2 (blauer Graph) zeigt, dass diese nach 1 h Stressinduktion nicht unterschiedlich prozessiert werden. **C)** Die statis-

tische Auswertung der Reporterexpression der beiden Klone USE/UNR #3 (roter Graph) und USE/USE #3 (blauer Graph) zeigt, dass diese nach Stressinduktion nicht unterschiedlich prozessiert werden.

In der Auswertung wurden die Prozessierungsaktivitäten der Tandemreporter Konstrukte zu den jeweiligen Zeitpunkten miteinander verglichen. In den Diagrammen sind die Mittelwerte (n=3), Standardabweichungen und Signifikanzen (ungepaarter, zweiseitiger T-Test: * p≤ 0,005) dargestellt. Der Y-Wert zeigt die Änderung der 3'Endprozessierung nach Stressinduktion und ergibt sich aus dem folgenden Quotienten:

$$Y = \frac{\text{Anisomycin (5' PCR Produkt/3' PCR Produkte)}}{\text{DMSO (5' PCR Produkt/3' PCR Produkte)}}$$

Es ist hiermit festzuhalten, dass sich die stabilen Zellklone nach Stressinduktion unterschiedlich in der Regulation der USE-vermittelten 3'Endprozessierung verhalten. Dies könnte möglicherweise durch positionelle Effekte der Tandemreporter erklärt werden, da diese nicht locuspezifisch im Genom integriert wurden.

Um positionelle Effekte von endogenen silencern und enhancern durch die zufällige Integration auszuschließen, wurden transient transfizierte HeLa Zellen auf eine mögliche Regulation der 3'Endprozessierung hin untersucht. Der Nachweis der erfolgreichen Stressinduktion erfolgte mittels eines phospho p38 Western Blots und erwies sich in transient transfizierten Zellen als robust, vergleichbar mit dem Effekt in stabilen Zelllinien (exemplarischer Western Blot siehe Abbildung 25, vgl. Spuren 1&2, 3&4, 5&6, 7&8, 9&10 und 11&12).

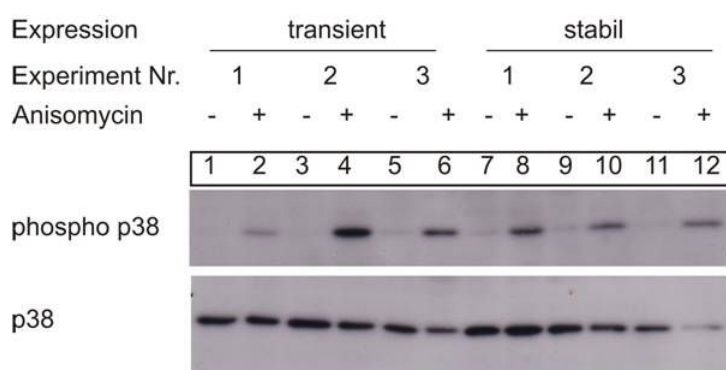


Abbildung 25: Anisomycin aktiviert p38 MAPK in transient und stabil transfizierten HeLa Zellen

Anisomycin [20µg/ml] aktiviert p38 MAPK nach 1 h sowohl in transient transfizierten HeLa Zellen als auch in stabilen Zelllinien.

Des Weiteren wurden die mRNA Abundanzen der Tandemreporter und der kanonischen Faktoren CstF50 und CPSF160 untersucht, um eine Stressinduktion auf RNA Ebene nachweisen zu können. Es ist bekannt, dass externe Stressstimuli die mRNA Expression von Prothrombin mRNA (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt) sowie einige Faktoren des kanonischen Apparates induzieren (Shell et al., 2005). Aus diesem Grund wurde in quantitativen *real-time* PCRs die Abundanz des Tandemreporters und der Faktoren CPSF160 und CstF50 gemessen.

In der Abbildung 26 sind die Ergebnisse der quantitativen *real-time* PCR dargestellt. Es ist zu erkennen, dass in transient transfizierten HeLa Zellen sowohl der Tandemreporter (in diesem Fall USE/UNR) als auch zwei kanonische Faktoren des 3'Endprozessierungsapparates (CstF50 und CPSF160) signifikant nach Anisomycinbehandlung induziert sind (siehe Abbildung 26 A, B, C). Obwohl der Tandemreporter USE/UNR in den transient transfizierten Zellen induziert ist (siehe Abbildung 26A), konnte keine Regulation der 3'Endprozessierung gemessen werden (Abbildung 26D). Es ist zu vermuten, dass Prozessierungsmodifikationen aufgrund der starken Überexpression des Tandemreporters nicht aufgelöst werden konnten und/oder die transiente Transfektion andere für die Regulation von 3'Endprozessierung relevante (aber hier nicht gemessene) Signaltransduktionswege basal aktiviert (z.B. JNK 1,2 im Sinne eines globalen Transfektionsstresses).

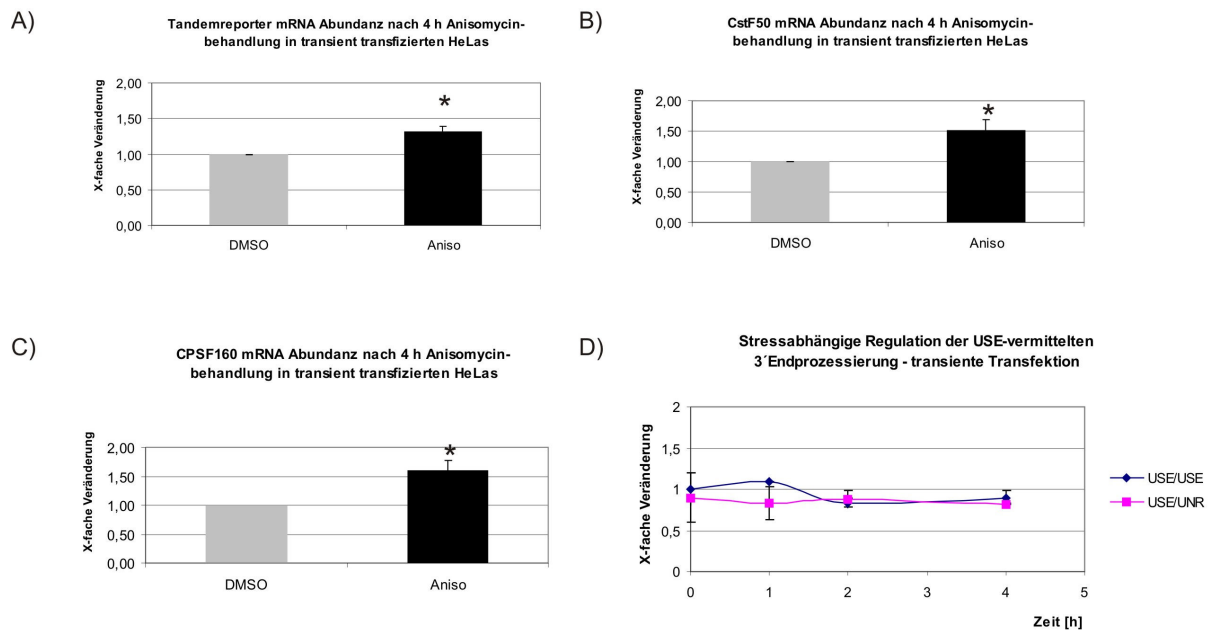


Abbildung 26: Stress induziert die Expression des Tandemreporters, führt jedoch nicht zu einer regulierten 3' Endprozessierung in transient transfizierten HeLa Zellen

A) Transient transfizierte HeLa Zellen zeigen eine signifikante Induktion der Tandemreporter mRNA nach Anisomycinbehandlung. **B)** CstF50 ist signifikant erhöht, wenn transient transfizierte HeLa Zellen mit Anisomycin behandelt werden. **C)** CPSF160 ist ebenfalls in transient transfizierten HeLa Zellen nach Anisomycinbehandlung induziert. **D)** In der PAT PCR ist keine regulierte 3' Endprozessierung zu erkennen.

Zusammenfassend verhalten sich die stabilen Zellklone sehr heterogen bzgl. der Regulation der 3' Endprozessierung. Dies lässt sich möglicherweise am ehesten durch die zufällige Integration der Tandemreporter in das Genom erklären und zeigt die Limitierung des hier genutzten (wenn auch aufwendigen) Versuchsaufbaues mit stabil transfizierten und gut charakterisierten (siehe Kapitel 4.2) Reporterzellklonen.

Jedoch weisen diese Daten auch auf eine stressabhängige, regulierte 3' Endprozessierung hin (siehe Abbildung 24A), die die *in vitro* beobachtete USE-abhängige Regulation der 3' Endprozessierung teilweise bestätigen (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt). Während dies nur für den Klon USE/UNR #1 nachgewiesen werden konnte, zeigten dies andere Zellklone nicht. Eine weiterführende Diskussion zur Generierung zukünftig nutzbarer, besser geeigneter Reporter ist im Kapitel 5.2 finden.

5 Diskussion

5.1 FBPs als Stresssensor am F2 USE in der Regulation der 3'Endprozessierung

Die physiologische Genexpression erfordert koordinierte und regulierte Prozesse während der Transkription, der Reifung der prä-mRNA (Prozessierung) und der nachfolgenden Translation (Pawlicki and Steitz; Proudfoot et al., 2002). Bisher ist wenig darüber bekannt, wie extrazelluläre Signale die RNA Prozessierung beeinflussen.

In der 3'UTR der Prothrombin mRNA befindet sich ein stromaufwärts des Polyadenylierungssignals gelegenes Sequenzelement, das sogenannte USE Motiv, an dem verschiedene Proteine binden (Spleißfaktoren, 3'Endprozessierungsfaktoren und AU-reiche Elementbindende Proteine, siehe Affinitätsaufreinigungen und Western Blots der

Abbildung 7). Die Spleißfaktoren hnRNPI, U2AF35 und U2AF65 wurden als positive USE-Effektorproteine identifiziert, die die 3'Endprozessierung stimulieren, indem sie mit dem kanonischen 3'Endprozessierungsapparat interagieren (Danckwardt et al., 2007). Des Weiteren wurden hochaffin bindende Proteine identifiziert, die zu der Gruppe der AU-reichen elementbindenden Proteine (ARE-BPs) gehören. Es ist bekannt, dass einige ARE-BPs extrazelluläre Signale integrieren können und dadurch z.B. mRNA Stabilitäten regulieren (Briata et al., 2005; Dean et al., 2004; Frevel et al., 2003; Garneau et al., 2007).

In Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob einige USE bindende Proteine extrazelluläre Signale integrieren können und sich daraus resultierend der Ribonukleoproteinkomplex am F2 USE verändert. Eine mögliche Modulation des RNP Komplexes nach Stressinduktion könnte daraufhin die Effizienz der 3'Endprozessierung regulieren.

In *in vivo* Experimenten (Resultate siehe 4.1.4 und 4.1.5) wurde untersucht, ob die ARE-BPs (FBP1, FBP2, FBP3, TIA, TIAR, CUGBP und HUR) und die positiven USE-Effektorproteine (hnRNPI, U2AF35 und U2AF65) nach Stressinduktion posttranslational modifiziert werden. Es konnte erstmalig gezeigt werden, dass nach einer Stressinduktion durch Anisomycin FBP1, FBP2 und FBP3 posttranslational signifikant hyperphosphoryliert werden.

Unter Anwendung der PhosphoSitePlus[®] Datenbank (<http://www.phosphosite.org>) wurden sowohl bei FBP1, FBP2 und FBP3 mehrere Phosphorylierungsstellen bioinformatisch vorausgesehen (siehe Tabelle 7 in den Ergebnissen 4.1.4). Interessanterweise befinden sich für FBP1, FBP2 und FBP3 einige der Phosphorylierungsstellen in den KH Domänen (siehe Abbildung 27). Proteine mit KH Domänen sind dafür bekannt, dass sie an einzelsträngige RNA binden

können und somit eine wichtige Rolle in der Regulation des zellulären RNA Metabolismus spielen (Burd and Dreyfuss, 1994; Musco et al., 1996).

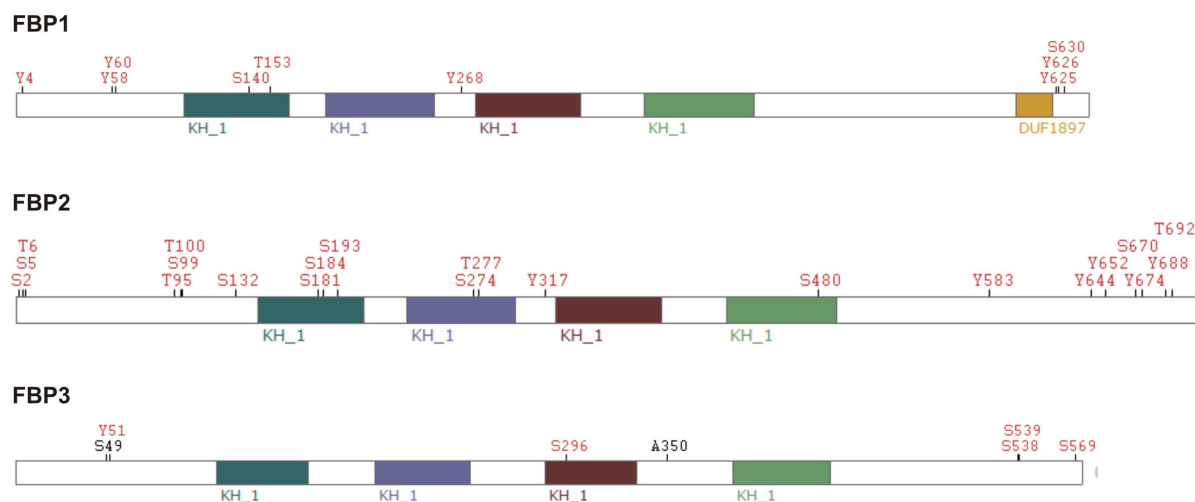


Abbildung 27: Bioinformatisch vorausgesagte Phosphorylierungsstellen der FBPs befinden sich u. a. in KH Domänen

In der Abbildung sind die Positionen von bioinformatisch vorhergesagten Phosphorylierungsstellen (in roter Schrift: S-Serin, Y-Thyrosin, T-Threonin) dargestellt. Sowohl FBP1, FBP2 und FBP3 besitzen vorausgesagte Phosphorylierungsstellen in den KH Domänen (blau-grüne, blaue, braune und grüne Box). Proteine mit KH-Domänen binden an einzelsträngige RNA und beeinflussen somit den RNA Metabolismus.

In RNA-Protein Interaktionsstudien konnte anschließend gezeigt werden, dass hyperphosphoryliertes FBP2 und FBP3 signifikant reduziert an das F2 USE Motiv binden (Resultate siehe 4.1.6). Diese Ergebnisse konnten in Affinitätsaufreinigungen mit gestressten und ungestressten HeLa Zelllysaten reproduziert werden (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt). Nicht nur FBP2 und FBP3 änderten nach Stressinduktion ihre USE Bindungsaffinität, sondern auch die positiven USE-Effektorproteine (hnRNPI, U2AF35 und U2AF65). Diese Proteine zeigten eine erhöhte Bindung zu dem USE Motiv nach Stressinduktion.

Diese Daten deuten daraufhin, dass einige hochaffin USE-bindende Proteine (nämlich FBP2 und FBP3) mit den positiven USE-Effektorproteinen (hnRNPI, U2AF35, U2AF65) stressabhängig um die Bindung an dem F2 USE Motiv konkurrieren (siehe Fragestellung in dem Kapitel 1.5). Eine Stressinduktion reduziert die Bindungsaffinität von hyperphosphoryliertem FBP2 und FBP3, wohingegen hnRNPI, U2AF35 und U2AF65 stärker an das F2 USE binden

können. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Zusammensetzung des USE RNP Komplexes von einem externen Stressstimulus reguliert werden kann (Modell siehe Abbildung 28). Weitere im Labor generierte Daten (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt) sowie bereits publizierte Ergebnisse deuten auf eine Veränderung des F2 USE Ribonukleoprotein Komplexes über den p38 mitogenaktivierten Protein-Kinase Signalweg hin.

Die Prothrombin USE Ribonukleoprotein Formation ist von externen Stressstimuli abhängig.

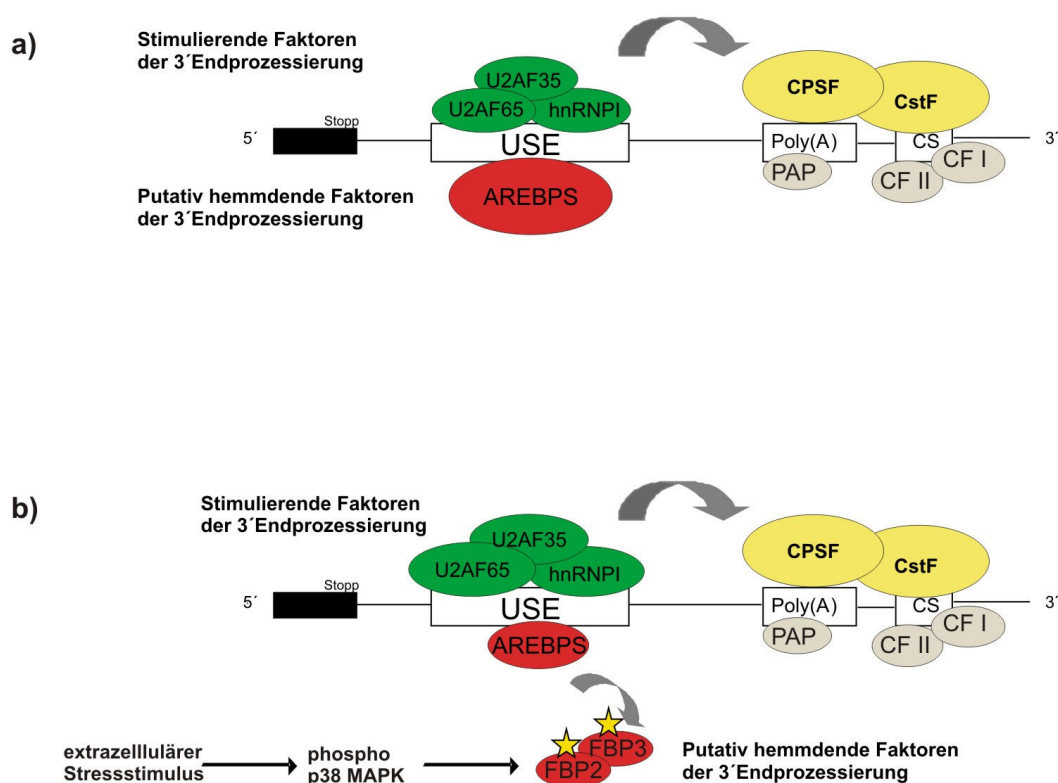


Abbildung 28: Modell für die stressabhängige Ribonukleoprotein Komposition am USE Motiv von mRNAs mit USE-haltigen 3'UTR

Zwei unterschiedliche Proteingruppen konkurrieren um die Bindung an das USE Motiv der F2 mRNA: zum einen die positiven USE-Effektorproteine U2AF35, U2AF65 und hnRNPI (grün dargestellt) und zum anderen die AU-reichen elementbindenden Proteine (rot dargestellt). **a)** Unter normalen, ungestressten Bedingungen binden sowohl die positiven USE-Effektorproteine als auch die ARE-BPs an das USE Motiv der F2 mRNA. **b)** Ein extrazellulärer Stressstimulus hyperphosphoryliert FBP2 und FBP3 und reduziert somit deren USE Bindungsaffinität. U2AF35, U2AF65 und hnRNPI zeigen hingegen eine erhöhte USE Bindungsaffinität nach Stressinduktion (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt). Stress moduliert somit die Komplex-

formation am F2 USE Motiv und könnte so die 3'Endprozessierung der F2 mRNA und anderen USE-haltigen mRNAs stimulieren.

Hiermit konnte gezeigt werden, dass FBP2 und FBP3 extrazelluläre Signale integrieren und als Stresssensor die USE RNP Komplexbildung verändern.

Interessanterweise sind in der Literatur weitere Beispiele zu finden, in denen FBP2 extrazelluläre Signale integriert und somit den RNA Metabolismus beeinflusst. Während der Muskelzellendifferenzierung etwa wird FBP2/KSRP über die Aktivierung des p38 Signalweges an dem Residuum Threonin 692 phosphoryliert (Briata et al., 2005), wodurch myogene Transkripte stabilisiert werden. Phosphoryliertes FBP2/KSRP besitzt eine reduzierte Bindungsaffinität zu ARE-haltigen Transkripten und verhindert so deren Degradation durch das Exosom.

Die Aktivierung eines anderen Signalweges (AKT) führt hingegen zu einer Konformationsänderung von FBP2/KSRP, indem das Residuum Ser193 der KH 1 Domäne phosphoryliert wird und somit die KH 1 Domäne entfaltet wird. Phosphoryliertes FBP2 kann somit nicht mit 14-3-3 ζ interagieren, wodurch FBP2/KSRP im Zellkern zurückgehalten wird und so im Zytoplasma die Exosom-vermittelte Degradation von ARE-haltigen Transkripten verhindert (Diaz-Moreno et al., 2009).

Diese zwei Beispiele zeigen, dass FBP2/KSRP extrazelluläre Signale integriert und auf verschiedene Art und Weise die mRNA Abundanz reguliert und zwar entweder über direkte Protein-RNA Interaktionen (Briata et al., 2005) oder aber die Lokalisation von FBP2 (Diaz-Moreno et al., 2009).

In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass kompetitives Binden von RNA-bindenden Proteinen ein wiederkehrendes Prinzip in der Regulation der Genexpression darstellt. Beispielsweise konkurrieren PTB/hnRNPI und TIA um die RNA Bindung und regulieren damit alternatives Spleißen (Shukla et al., 2005). Hier determiniert die Abundanz von TIA die Bindungsaffinität von PTB/hnRNPI. Wenn die TIA Proteinexpression niedrig ist, kann PTB/hnRNPI an ein U-reiches Element der RNA binden und das Spleißen eines alternativen Exons unterdrücken (Shukla et al., 2005). Ein weiteres Beispiel für das kompetitive Binden von ARE-BPs ist die Genexpressionsregulation von MYC. Es wurde berichtet, dass AUF1 die Bindung von TIA an die MYC RNA limitiert und somit die Translation und Zellproliferation fördert (Liao et al., 2007).

Die Änderung der Bindungsaffinität eines einzelnen Proteins kann im Weiteren die Bindung von anderen interagierenden Proteinen modulieren. In dem hier beschriebenen Beispiel führt die reduzierte Bindungsaffinität von hyperphosphoryliertem FBP2 und FBP3 zu einer erhöhten Bindung von hnRNPI, U2AF35 und U2AF65 zu dem F2 USE (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt).

Interessanterweise wurden auch weitere AU-reiche elementbindende Proteine (ARE-BP) im Zusammenhang mit der Regulierung der Polyadenylierung beschrieben. HUR bindet an U-reiche Regionen und blockiert die 3'Endprozessierung, indem es die Interaktion von CstF64 mit der mRNA verhindert (Zhu *et al.*, 2007). Des Weiteren wurde Cth2/TTP bei der Wahl der Poly(A) Stelle als regulatorisches Protein in Hefen identifiziert (Prouteau *et al.*, 2008).

Diese und weitere Daten deuten darauf hin, dass ARE-BPs multifunktionelle Proteine sind und neben der mRNA Stabilität auch die 3'Endprozessierung regulieren können.

5.2 Zellkulturbasierte Studien zeigen keinen Effekt in der stressabhängigen Regulation der 3'Endprozessierung

Nach wie vor ist der Mechanismus der regulierten 3'Endprozessierung der F2 mRNA (sowie anderer USE-haltiger mRNAs) nach Stressinduktion noch nicht vollständig geklärt. Stressexperimente mit der Leberzelllinie HUH-7 zeigten eine signifikante Induktion der F2 mRNA, wobei eine erhöhte transkriptionelle Aktivität und gesteigerte mRNA Stabilität ausgeschlossen werden konnte. Des Weiteren konnte eine stressinduzierte F2 mRNA Expression auch im Mausmodell gemessen werden, nachdem den Mäusen eine entzündungsfördernde Substanz (Lipopolysaccharid) injiziert wurde (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt). *In vitro* Studien konnte zudem zeigen, dass Stress die Polyadenylierung der F2 mRNA fördert (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt).

In molekularbiologischen und biochemischen Studien konnte gezeigt werden, dass extrazellulärer Stress den p38 MAPK Signalweg aktiviert. Daraufhin werden FBP2 und FBP3 hyperphosphoryliert und besitzen somit eine reduzierte F2 USE Bindungsaffinität. Als Konsequenz dessen binden vermehrt positive USE-Effektorproteine (hnRNPI, U2AF35 und U2AF65) an das F2 USE Motiv, die somit die Polyadenylierung stimulieren (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt).

Um zu überprüfen, ob Stress zu einer USE-vermittelten Induktion der 3'Endprozessierung führt, wurden stabile HeLa Zelllinien mit unterschiedlichen Tandemreporter Konstrukten generiert (siehe Methode 3.3.2). Diese Tandemreporter besitzen zwei Kassetten mit jeweils einem Poly(A) Signal und einer Schnittstelle (siehe Abbildung 19 und Abbildung 20 sowie die Erläuterungen im Text 4.2.3 und 4.2.4).

Das heterologe Konstrukt (USE-HBB/HBB) besitzt in der ersten Tandemkassette die 3'untranslatierte Region (3'UTR) der F2 mRNA und in der 3'flankierenden Region (FS) die Sequenzen der β -Globin mRNA (siehe Abbildung 19). Diese stabile Zelllinie zeigte keine stressinduzierte Regulation in der 3'Endprozessierung (siehe Resultate 4.2.3). Es ist zu vermuten, dass die 3'FS für eine regulierte 3'Endprozessierung der F2 mRNA notwendig ist.

Anschließend wurden die Konstrukte im homologen Kontext (USE/UNR und USE/USE) analysiert. Diese besitzen sowohl in der 3'UTR als auch in der 3'FS die Sequenzen der F2 mRNA (siehe Abbildung 20). In den Stressexperimenten konnte beobachtet werden, dass sich die stabilen Klone bzgl. der stressinduzierten Regulation der 3'Endprozessierung unterschiedlich verhielten (Resultate siehe 4.2.4). Einer von drei USE/UNR Klonen zeigte eine USE-abhängige Induktion der 3'Endprozessierung nach Stress (siehe Abbildung 24A), die anderen zwei Klone hingegen nicht (siehe Abbildung 24B und C). Dieser diskrepante Befund soll im Folgenden zur Generierung zukünftig besser geeigneter Reporter diskutiert werden.

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Fähigkeit zur Regulation der 3'Endprozessierung könnte in der zufälligen Insertion der Tandemreporter in das HeLa Genom liegen. Diese Positionseffekte könnten Signaltransduktionswege unterbrechen, die etwa für die Übermittlung extrazellulärer Signale an die (basale) 3'Endprozessierungsmaschinerie notwendig sind. Des Weiteren kann die Expression des Tandemreporters möglicherweise zusätzlich von endogenen expressionsverstärkenden (enhancer) und expressionsverringern (silencer) Elementen reguliert werden. Um die verschiedenen Tandemreporter Konstrukte in der gleichen genetischen Konstellation zu analysieren, wäre die Verwendung des Flp-InTM Systems (Invitrogen) geeignet (Erläuterung siehe unten). Dieses System ermöglicht die Integration und Expression der Tandemreporter an der gleichen Position im Genom einer gewählten Säugerzelllinie. In Anbetracht der zell- und gewebsspezifischen Expressionsunterschiede wäre eine Leberzelllinie (HUH-7 oder HepG2) ratsam, da Prothrombin präferentiell in der Leber exprimiert wird.

Darüberhinaus ist bekannt, dass der CMV (*Cytomegalovirus*) Promotor und Enhancer häufig methyliert wird und somit die Transgenexpression reduziert (Brooks et al., 2004). Des Weiteren wurde kürzlich berichtet, dass alternative Polyadenylierung von der Epigenetik (*genomic imprinting*) beeinflusst wird. Demnach bewirkt eine Hypomethylierung des Promotors den Gebrauch von stromaufwärts gelegenen Poly(A) Stellen, wohingegen eine Hypermethylierung des Promotors stromabwärts gelegene Poly(A) Stellen bevorzugt (Wood et al., 2008). Da die verwendeten Tandemreporter Konstrukte unter der Kontrolle des CMV Promotors und Enhancers stehen, ist nicht auszuschließen, dass aufgrund von Methylierungsereignissen die Prozessierungsaktivität eingeschränkt ist und eine regulierte 3'Endprozessierung nicht in jedem Fall gemessen werden kann. Eventuell führen somit unterschiedliche Methylierungsmuster der stabilen Zellklone zu den diskrepanten Ergebnissen wie in der Abbildung 24 dargestellt. Dieser Aspekt und die Tatsache, dass die 3'Endprozessierung auch unmittelbar mit der Transkription verknüpft ist (Maniatis and Reed, 2002; Proudfoot, 2000, 2004), sprechen für Tandemreporter Konstrukte mit endogenen F2 Promotoren (anstatt des viralen CMV Promotors und Enhancer) in einem Flp-In System.

Um die eventuelle Verknüpfung der 3'Endprozessierung mit der Transkriptionsinitiation zu adressieren, müssten idealerweise weitere Tandemreporter Konstrukte mit dem Flp-In System generiert werden. In einem ersten Schritt müsste eine generelle stressinduzierte USE-abhängige 3'Endprozessierung nachgewiesen werden, indem der endogene F2 Promotor zusammen mit dem jeweiligen Tandemreporter USE/UNR bzw. UNR/USE (siehe Abbildung 20) unter Verwendung des Flp-InTM Systems stabil transfiziert wird. Die Prozessierungsaktivität der Reporter könnte nach Stressinduktion mit der PAT PCR (siehe 3.1.2.2) ausgewertet werden. Falls eine stressinduzierte USE-abhängige 3'Endprozessierung stattfindet, könnte in einem zweiten Schritt getestet werden, ob diese Regulation an den endogenen Promotor gekoppelt ist. Dafür müssten die Tandemreporter unter die Kontrolle von diversen Promotoren kloniert werden (z.B. Promotoren von Haushaltsgenen) und anschließend die stressinduzierte 3'Endprozessierung erneut in PAT PCR gemessen werden. Falls es nur zu einer regulierten 3'Endprozessierung mit dem endogenen Promotor kommt, spricht dies entweder für einen stressinduzierten Promotor oder für eine positive Rückkopplung der 3'Endprozessierung, bei der möglicherweise (nur) die Transkriptionsinitiation sekundär mit induziert ist (siehe 5.3.3). Eine weitere Möglichkeit den Einfluss des Promotors auf eine regulierte 3'Endprozessierung zu testen, ist die Verwendung des Tet Expressionssystem. Hier lässt sich die Promotoraktivität

gezielt an- und ausschalten, so dass die stressinduzierte 3'Endprozessierung unter beiden Bedingungen analysiert werden kann (Gossen and Bujard, 1992).

Ein möglicher experimenteller Ansatz für die lokusspezifische Analyse der Tandemreporter wäre die Verwendung des zuvor genannten Flp-InTM Systems. Dieses System erfordert zwei Transfektionsschritte, bei dem zunächst eine stabile Wirtszelllinie generiert wird. Dafür werden die Zellen mit dem pFRT/lacZeo Vektor transfiziert und die FRT (FLP Recombination Target) Stelle in das Genom der Säugerzelllinie eingeschleust (siehe Abbildung 29a). Die Tandemreporter werden dann in den pcDNATM 5/FRT Vektor kloniert. Der pcDNATM 5/FRT Vektor wird mit dem pOG44 Vektor in die Wirtszelllinie kotransfiziert. Die Flp Rekombinase des pOG44 Vektors vermittelt die homologe Rekombination zwischen den FRT Stellen, so dass das pcDNATM 5/FRT Konstrukt in das Genom mit den FRT Stellen integriert wird ((O'Gorman et al., 1991), Invitrogen Protoktbeschreibung) (siehe Abbildung 29b).

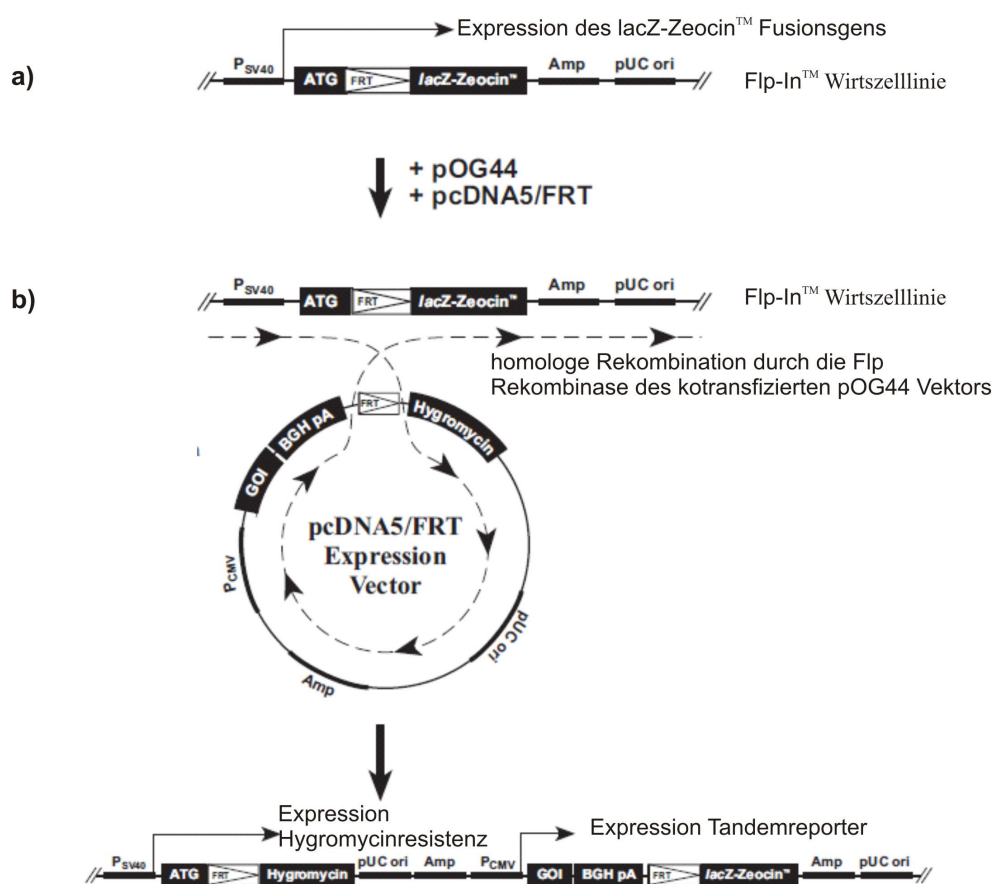


Abbildung 29: Das Flp-InTM System ermöglicht die Generierung von lokusspezifischen stabilen Zelllinien

A) Zu Beginn wird eine Flp-InTM Wirtszelllinie hergestellt, indem der pFRT/lacZeo Vektor in eine Säugerzelllinie transfiziert wird. Die Zellen können mittels der ZeocinTM und β -Galaktosidaseaktivität selektioniert werden. Danach werden die Tandemreporter in den pcDNATM 5/FRT kloniert. **B)** Anschließend werden der pcDNATM 5/FRT inklusive der Tandemreporter und der pOG44 Vektors in die Flp-InTM Wirtszelllinie kotransfiziert und auf

Hygromycinrestistenz selektioniert und die Expression des Transgens gemessen (Abbildung modifiziert nach der Invitrogen Produktinformation).

Die Vorteile des Flp-InTM Systems wären eine schnelle und effiziente Integration von verschiedenen Tandemreportern in eine vorhandene Wirtszelllinie. Dabei ist die Generierung von isogenetischen Zelllinien durch homologe Rekombination eine essentielle Voraussetzung für vergleichende Analysen. Damit kann die 3'Endprozessierung der Tandemreporter unter der gleichen genetischen Konstellation untersucht werden, so dass es keine Variablen gibt, die die Regulation der 3'Endprozessierung zusätzlich beeinflussen können. Die Expression der Tandemreporter ist zudem mit diesem System gleich hoch.

5.3 Beispiele für regulierte 3'Endprozessierung *in vivo*

Über die Hälfte aller humanen Transkripte besitzen alternative Polyadenylierungsstellen (Ara et al., 2006; Beaudoin and Gautheret, 2001; Carninci et al., 2005; Edwalds-Gilbert et al., 1997; Lutz, 2008; Tian et al., 2005; Wang et al., 2008; Wilhelm et al., 2008; Zhang et al., 2005) (Kwan et al., 2008; Mayr and Bartel, 2009; Sandberg et al., 2008). Die regulierte Polyadenylierung trägt maßgeblich zur Gendiversität bei und beeinflusst somit die räumliche und zeitliche Dimension der Genexpression (Edwalds-Gilbert et al., 1997; Hall-Pogar et al., 2005; Takagaki et al., 1996; Zhao and Manley, 1996). Insgesamt scheinen etwa 20% des Transkripts durch die Modulation der 3'Endprozessierung reguliert zu sein (Kwan et al., 2008). Die 3'Endprozessierung kann sowohl von physiologischen Bedingungen wie z.B. Zellwachstum, Zellzyklus, Differenzierung und Entwicklung als auch von pathologischen Ursachen wie akuter und chronischer Inflammation sowie von viralen Infektionen reguliert werden. Die Bedeutung der koordinierten Regulation der 3'Endprozessierung für die Genexpressionskontrolle lässt sich an Hand vieler Erkrankungen verdeutlichen, die ihre Ursachen in Fehlern der 3'Endformation haben (Danckwardt et al., 2008) (siehe hierzu auch Kapitel 5.4).

5.3.1 Regulierte 3'Endprozessierung während der Differenzierung

Die Wahl der Poly(A) Stelle wird über die cis-agierenden Sequenzen, die Abundanz und Aktivität der 3'Endprozessierungsfaktoren sowie über gewebs- und entwicklungsspezifische Faktoren reguliert (Barabino and Keller, 1999).

Die Expressionskontrolle der schweren Kette des Immunglobulins (Immunglobulinklassenswitch) wird von der Abundanz des kanonischen 3' Endprozessierungsfaktors CstF64 reguliert. Während der B-Zelldifferenzierung kommt es zu einer Erhöhung dieses Faktors, wodurch die stromaufwärts gelegene Poly(A) Stelle gewählt wird (siehe Abbildung 2 in der Einleitung) und somit die sezernierte Form anstatt der membranständigen Form gebildet wird (Takagaki et al., 1996).

Ein ähnlicher Mechanismus reguliert die Expression des Transkriptionsfaktors NF-ATc während der Differenzierung der T-Zellen. Die langen Transkriptisoformen werden von unreifen T-Zellen produziert, wohingegen die kurzen Transkriptisoformen von den Effektorzellen produziert werden. Auch hier entscheidet die Abundanz von CstF64 über die Wahl der Poly(A) Stelle. Während der T-Zell Stimulation wird CstF64 induziert, wodurch die proximale Poly(A) Stelle als 3' Endprozessierungssignal erkannt wird (Chuvpilo et al., 1999).

Auch extrazellulärer Stress (verursacht durch Lipopolysaccharide) beeinflusst die Wahl der Poly(A) Stelle, beispielsweise in Makrophagen. Stress induziert CstF64, wohingegen andere 3' Endprozessierungsfaktoren nicht beeinflusst werden. In der Konsequenz werden bei mehreren prä-mRNAs proximale Poly(A) Stellen bevorzugt und somit kürzere Transkriptisoformen generiert (Shell et al., 2005).

Das Ergebnis regulierter Polyadenylierung bestimmt nicht nur die Struktur und Funktion der Proteine, sondern beeinflusst auch die mRNA Stabilität, Translationseffizienz und mRNA Lokalisation (Lutz, 2008; Millevoi and Vagner, 2009) und hat bedeutende funktionelle Konsequenzen auch in der T-Zell Maturation (Sandberg et al., 2008), der Onkogenese (Mayr and Bartel, 2009) und der Stammzellreprogrammierung (Ji and Tian, 2009).

5.3.2 Regulierte 3' Endprozessierung (und Transkription) während der DNA Reparatur

DNA Schäden, die infolge von schädigenden Substanzen wie z.B. UV-Bestrahlung in Säugerzellen hervorgerufen werden, werden zunächst repariert, bevor die DNA erfolgreich transkribiert werden kann (Kleiman and Manley, 1999). Der 3' Endprozessierungsfaktor CstF50 interagiert mit dem Tumorsuppressor BRCA1 assoziierten Protein BARD1 und hemmt die mRNA Polyadenylierung vorübergehend (siehe Abbildung 30). Die Inhibierung beinhaltet auch die proteasomale Degradation der RNA Polymerase II von nicht vollständig prozessierten und terminierten mRNA Transkripten. Dieser Mechanismus scheint die Zelle vor einer unsachgemäßen RNA Transkription und Prozessierung zu schützen, indem ein

CstF50/BARD1/BRCA1 Komplex ausgebildet wird (Kleiman and Manley, 1999, 2001; Kleiman et al., 2005).

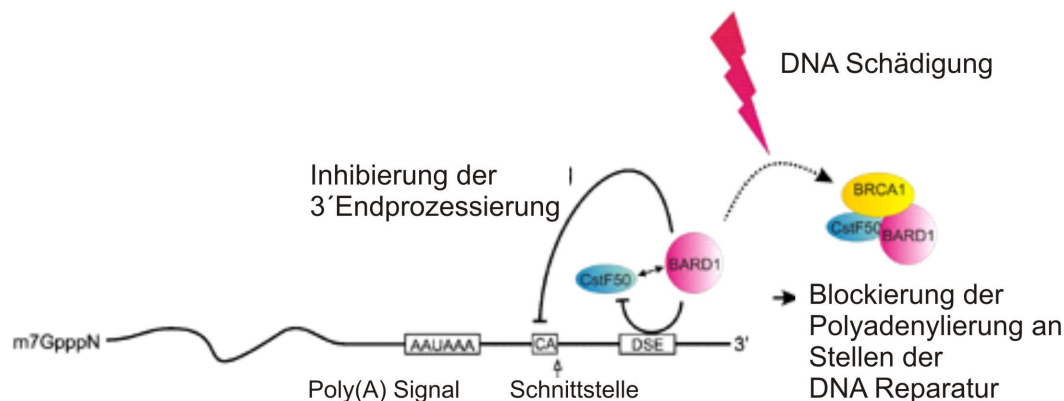


Abbildung 30: Die 3' Endprozessierung wird nach DNA Schädigung zunächst inhibiert

BARD1 interagiert mit CstF50 und inhibiert die 3' Endprozessierung von geschädigten Transkripten (Abbildung modifiziert nach Danckwardt *et al* 2008).

5.3.3 Die 3' Endprozessierung des Wirtes wird nach der Infektion mit dem Influenza Virus A inhibiert

Das Influenza A Virus produziert das NS1 Protein, welches zum einen mit dem 3' Endprozessierungsfaktor CPSF30 interagiert und zum anderen zusätzlich mit dem Poly(A) bindenden Protein II. Damit wird sowohl die endonukleolytische Spaltung als auch die Polyadenylierung der primären Transkripte der Wirtszelle gestört und die unprozessierten Transkripte werden im Zellkern zurückgehalten (siehe Abbildung 31). Gleichzeitig wird in einem als „cap-snatching“ bezeichneten Prozess die 5' gelegene Kappe des Wirtstranskriptes endonukleolytisch abgespalten und dient als Primer für die virale mRNA Synthese (nicht gezeigt) (Nemeroff et al., 1998). Durch diesen Regulationsschritt werden keine Wirtstranskripte ins Zytoplasma transportiert und die Genexpression des Wirtes kommt zum Erliegen, wohingegen Virusproteine ungehindert synthetisiert werden (Chen et al., 1995; Nemeroff et al., 1998).

A) Inhibierung der endonukleolytischen Spaltung

B) Inhibierung der Polyadenylierung

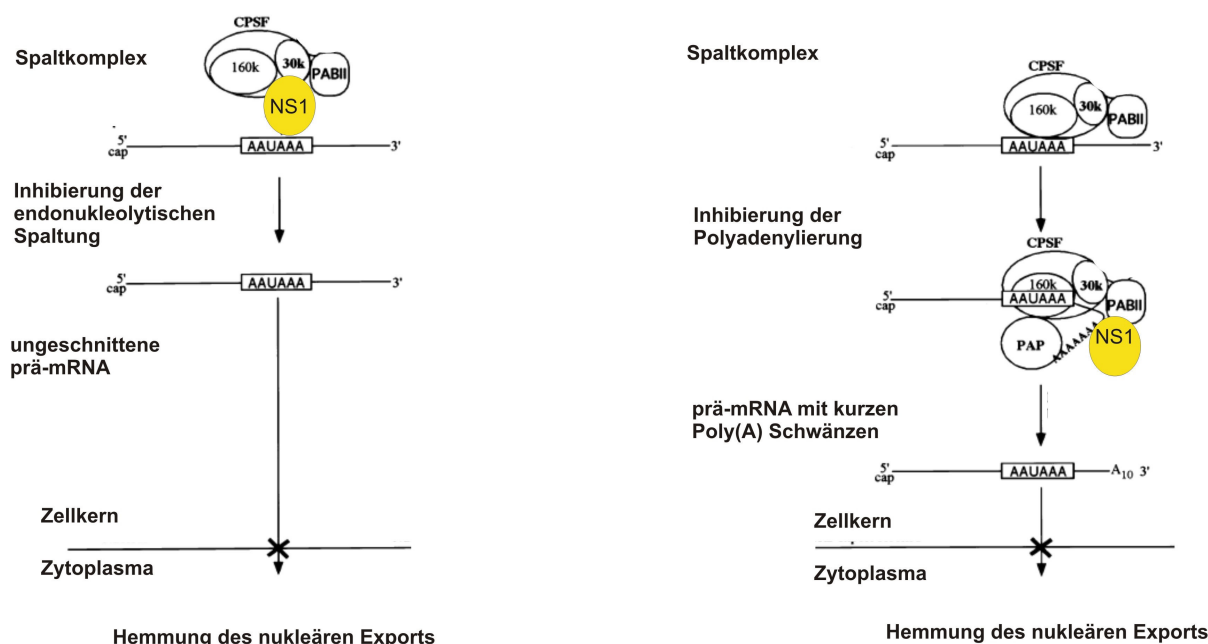


Abbildung 31: Zwei Mechanismen des Influenza A Virus zur Inhibierung der 3' Endprozessierung der Wirtszelle

A) Die Interaktion des NS1 Proteins mit der CPSF30 Komponente des Spaltkomplexes verhindert dessen Bindung an das Poly(A) Signal (AAUAAA). Somit wird ein Teil der prä-mRNA Transkripte nicht geschnitten und verbleibt im Zellkern. **B)** Die Bindung des Spaltkomplexes (CPSF) kann zwar stattfinden, jedoch verhindert die Bindung des NS1 Proteins die Interaktion mit dem Poly(A) Bindungsprotein II (PABII). Die prä-mRNA Transkripte werden zwar geschnitten, jedoch besitzen sie nur kurze Poly(A) Schwänze und werden somit auch nicht aus dem Zellkern transportiert (Abbildung modifiziert nach Chen *et al* 1995).

Zusammengefasst ist die 3' Endprozessierung ein dynamisch regulierter Prozess, der intra- und extrazelluläre Signale integrieren kann. Dies ermöglicht den Zellen wahrscheinlich im Gegensatz zu anderen Genexpressionsmechanismen eine noch schnellere Anpassung der Genexpression an Entwicklungs- und Differenzierungsstadien bzw. sich ändernden Umwelteinflüssen.

Interessanterweise sind die Transkription, Elongation und Termination miteinander eng gekoppelt und werden ständig überprüft, damit sichergestellt werden kann, dass die RNA exakt und effizient prozessiert wird (Proudfoot, 2004). Dabei wird die Genexpression keineswegs nur über die Aktivität des Promotors reguliert. Viele Aspekte sprechen für eine positive Rückkopplung der 3' Endprozessierung auf die Transkriptionsinitiation. Während der Transkription

ist der 3'Endprozessierungsapparat (CPSF und CstF) mit der C-terminalen Domäne (CTD) der RNA Polymerase II (RNA Pol II) assoziiert. Nachdem das Poly(A) Signal erkannt wurde, dissoziieren CPSF und CstF von der RNA Pol II ab und binden an die RNA, wo sie die endonukleolytische Spaltung und Polyadenylierung bewerkstelligen. Erstaunlicherweise kann die Pol II CTD alleine die 3'Endprozessierung begünstigen, was wiederum zeigt, wie eng diese beiden Prozesse miteinander gekoppelt sind. Die RNA Pol II dissoziiert nach der endonukleolytischen Spaltung der RNA ab und wird für eine neue Transkriptionsinitiation wiederverwendet (Proudfoot, 2004). Mutationen des Poly(A) Signals verhindern die endonukleolytische Spaltung und Polyadenylierung. Des Weiteren findet keine korrekte Transkriptionstermination statt und somit transkribiert die RNA Pol II noch hinter der Terminationsregion (Proudfoot, 2000). In einem Modell wird angenommen, dass die RNA Pol II Prozessivitätsfaktoren verliert, wenn sie ein funktionellen Poly(A) Signal passiert und somit vom Matrizenstrang abdissoziiert (Proudfoot, 2000). Ein weiteres Modell greift die Idee auf, dass nach der endonukleolytischen Spaltung die RNA Polymerase an die stromabwärts liegende RNA Region immer noch bindet, jedoch besitzt diese RNA Region keine 5'Kappe und ist somit instabil und wird degradiert, wodurch die RNA Pol II dann abdissoziiert und wieder für eine neue Transkriptionsinitiation zu Verfügung steht. Die Effizienz der 3'Endprozessierung könnte somit einen entscheidenden Einfluss auf die Genexpression haben, indem die Transkriptioninitiation sekundär (passiv) folgt und direkt mitreguliert sein könnte.

Diese Beispiele zeigen wie eng die 3'Endprozessierung mit der Transkription gekoppelt ist. Nur ungefähr 30% der primären Transkripte werden polyadenyliert (Jackson et al., 2000), so dass ein großer Spielraum für eine Modulation der 3'Endprozessierung existiert. Dabei ist die exakte Regulation der 3'Endprozessierung entscheidend für die Physiologie. Selbst kleinste Veränderungen beispielsweise der Prothrombin mRNA Abundanz können zu pathologischen Erscheinungen führen (Danckwardt et al., 2008) (siehe nächstes Kapitel 5.4).

5.4 Thrombinfunktionen und die Rolle der regulierten 3'Endprozessierung in Physiologie und Pathologie

Thrombin ist eine der wichtigsten Proteasen der Blutgerinnungskaskade, indem es Fibrinogen in Fibrin spaltet, das anschließend den Blutpfropfen der Thrombozyten stabilisiert und somit den Wundverschluss einleitet. Die Kontrolle der F2 Expression hat einen wichtigen Einfluss

auf die Physiologie und Pathophysiologie, denn F2 spielt nicht nur in der Blutgerinnung eine wichtige Rolle. Obwohl F2 primär in Hepatozyten exprimiert wird, ist unter diversen pathologischen Umständen eine Induktion von F2 auch in anderen Organen, z.B. im Gehirn nach Ischämie (Riek-Burchardt et al., 2002) oder während der Embryonalentwicklung (Zoubine et al., 1996; Sun et al., 1998; Xue et al., 1998; Dihanich et al., 1991) zu finden. Des Weiteren spielt F2 eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität als ein vollwertiger Ersatz der C3 abhängigen C5 Konvertase in Mäusen, denen die Komplement Komponente C3 fehlt (Huber-Lang et al., 2006). Weiterhin besitzt F2 diverse Funktionen als Wachstumsfaktor während Entzündungsreaktionen (Coughlin, 2000; Huber-Lang et al., 2006) und man vermutet daher, dass es zu Erkrankungen wie z.B. der entzündungsbedingten Gehirnerkrankung Multiple Sklerose (Chapman, 2006) beiträgt.

Selbst kleinste Veränderungen in der Prothrombinexpression (1,5-1,7-fach) erhöhen das Risiko einer Thromboseentstehung (Poort et al., 1996; Lane and Grant, 2000; Danckwardt et al., 2004; Gehring et al., 2001; Danckwardt et al., 2006b; Danckwardt et al., 2008), eines Aborts (Rey et al., 2003) oder Herzerkrankungen (Ye et al., 2006) signifikant.

Erstaunlicherweise ist das Auftreten der Prothrombinmutation 20210G→A in Krebspatienten höher als in Kontrollgruppen (Blom et al., 2005) (2,5% versus 1,0%). Eine hyperaktivierte Blutgerinnung ist mit einem schnellen Tumorwachstum assoziiert (Miller et al., 2004; Nierodzik and Karpatkin, 2006; Schulman and Lindmarker, 2000). Die Zunahme des invasiven und metastatischen Potentials durch die Protease F2 scheint ein wichtiges funktionelles Ereignis in der Tumorentwicklung zu sein, als dass die Überexpression der Serin-Protease (Joyce and Pollard, 2009) die Tumorinvasion, Metastasen und Tumorangiogenese (Nierodzik and Karpatkin, 2006) begünstigt. In umgekehrter Weise zeigen F2 hypomorphe Mäuse eine drastisch reduzierte Bildung pulmonaler Metastasen (Palumbo et al., 2007) und Patienten, die mit Antikoagulantien behandelt werden, zeigen eine Inhibierung des invasiven Wachstums von Tumorzellen und Metastasen (Klerk et al., 2005; Petralia et al., 2005). Des Weiteren sind F2 Rezeptoren insbesondere in hochmalignen, metastasierenden Tumoren überexprimiert (Even-Ram et al., 1998; Finak et al., 2008).

Auffällig ist, dass viele Erkrankungen, die eine Deregulation der F2 Expression als Ursache haben, mit inflammatorischen Prozessen gekoppelt sind (Multiple Sklerose (Chapman, 2006), Ischämie (Riek-Burchardt et al., 2002), Hyperkoagulation bei Sepsis Patienten (Levi et al., 1999; Rittirsch et al., 2008), Tumorerkrankungen (Blom et al., 2005; Joyce and Pollard, 2009; Miller et al., 2004; Schulman and Lindmarker, 2000). P38 ist während der Inflammation häu-

fig aktiviert und stellt die physiologisch relevanteste Kinase während der Inflammation dar (Kumar et al., 2003). Eine Therapie mit p38 Inhibitoren könnte somit erstens die Produktion von inflammatorischen Zytokinen inhibieren und zweitens mit den hier identifizierten molekularen Mechanismen der regulierten 3'Endprozessierung direkt interferieren, so dass die inflammationsbedingte Induktion des Thrombins abgemildert werden könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit und weiterer im Labor generierter Daten (Danckwardt & Gantzert *et al* 2010, Manuskript fertiggestellt) wurde ein neuartiger Mechanismus identifiziert, der die Prothrombinregulation dynamisch an Umweltbedingungen anpasst und somit reguliert werden kann. Die regulierte 3'Endprozessierung zeichnet sich als ein Mechanismus der Genregulation mit weitreichender biologischer und medizinischer Bedeutung ab.

6 Ausblick

Interessanterweise zeigten Sequenzvergleiche, dass das F2 USE Motiv in höheren Eukaryoten hochkonserviert ist und sich an ähnlichen Positionen stromaufwärts des Polyadenylierungssignals befindet (Danckwardt et al., 2007). Des Weiteren tragen mehr als 1.700 humane Gene (entspricht ca. 6% des humanen Genoms) die nonamerische Kernsequenz des USE Motivs, von denen viele eine bedeutende Funktion in der Inflammation, Tumorsuppression und Tumorprogression haben. Ungefähr 150 Gene davon tragen eine nonamerische Kernsequenz auch in der Nähe des Poly(A) Signals (Danckwardt et al., 2007) (siehe Abbildung 6), was möglicherweise auf ein weitverbreitetes Prinzip der regulierten 3'Endprozessierung in der Genexpressionskontrolle hindeutet.

Die Lokalisation des USE Motivs in der 3' untranslatierten Region von mRNA Transkripten könnte zudem deren Funktion bestimmen. Je näher sich das USE Motiv zum Poly(A) Signal befindet, desto mehr stimuliert es die 3'Endprozessierung (Danckwardt et al., 2007). Was passiert jedoch, wenn das USE eine größere Entfernung zum Poly(A) Signal hat? Beeinflusst das Poly(A) Signal dann vielleicht die Stabilität der mRNA? Hat das USE Motiv somit in Abhängigkeit seiner Position in der 3'UTR unterschiedliche Funktionen?

Es wäre außerdem interessant zu wissen, ob eine Stressinduktion von USE-haltigen mRNAs mit mehreren Poly(A) Signalen die Wahl des Poly(A) Signals beeinflusst. Alternative und regulierte Polyadenylierung sind ein weit verbreitetes Phänomen der Genexpressionskontrolle (ca. 50% aller humanen Gene), deren Mechanismen bisher kaum verstanden sind.

Danksagung

Für die Überlassung des Dissertationsthemas, das mir entgegengebrachte Vertrauen sowie die wissenschaftliche Betreuung möchte ich mich ganz besonders bedanken bei Herrn Prof. Dr. Dr. A. E. Kulozik und bei Herrn Prof. Dr. M. W. Hentze.

Herrn Prof. Dr. W. Buselmaier danke ich für die Bereitschaft mich extern zu betreuen sowie sein Interesse an dem Fortgang meiner Promotion.

Großen Dank gebührt meinem Mentor Herrn Dr. Sven Danckwardt, der jederzeit engagiert und interessiert meine wissenschaftliche Arbeit betreute und stets sehr gute Ratschläge einbrachte.

Frau Margit Happich, Frau Mandy Medenhoff und Frau Gabriele Tolle danke ich für die technischen Ratschläge und Hilfestellungen im Laboralltag sowie für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors bedanken für das stets freundliche und angenehme Arbeitsklima sowie die vielen interessanten und hilfreichen Anregungen.

Meinen Eltern danke ich für die Unterstützung während meines Studiums und der Promotion sowie das mir entgegengebrachte Interesse an meiner Forschungsarbeit, auch wenn es für Laien nicht einfach zu verstehen ist.

Ein großes Dankeschön geht natürlich auch an meinen Ehemann Oliver, der mir während meiner Promotion immer mit Rat und Tat zur Seite stand und mir stets die notwendige Unterstützung und Kraft gab.

Eidstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Anne-Susan Gantzert, an Eides Statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Heidelberg, den

Anne-Susan Gantzert

Literaturnachweis

- Ara, T., Lopez, F., Ritchie, W., Benech, P., and Gautheret, D. (2006). Conservation of alternative polyadenylation patterns in mammalian genes. *BMC Genomics* 7, 189.
- Ashwell, J.D. (2006). The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 6, 532-540.
- Bakheet, T., Williams, B.R., and Khabar, K.S. (2003). ARED 2.0: an update of AU-rich element mRNA database. *Nucleic Acids Res* 31, 421-423.
- Barabino, S.M., and Keller, W. (1999). Last but not least: regulated poly(A) tail formation. *Cell* 99, 9-11.
- Beaudoing, E., and Gautheret, D. (2001). Identification of alternate polyadenylation sites and analysis of their tissue distribution using EST data. *Genome Res* 11, 1520-1526.
- Bevilacqua, A., Ceriani, M.C., Capaccioli, S., and Nicolin, A. (2003). Post-transcriptional regulation of gene expression by degradation of messenger RNAs. *J Cell Physiol* 195, 356-372.
- Blechingberg, J., Lykke-Andersen, S., Jensen, T.H., Jorgensen, A.L., and Nielsen, A.L. (2007). Regulatory mechanisms for 3'-end alternative splicing and polyadenylation of the Glial Fibrillary Acidic Protein, GFAP, transcript. *Nucleic Acids Res* 35, 7636-7650.
- Blom, J.W., Doggen, C.J., Osanto, S., and Rosendaal, F.R. (2005). Malignancies, prothrombotic mutations, and the risk of venous thrombosis. *Jama* 293, 715-722.
- Briata, P., Forcales, S.V., Ponassi, M., Corte, G., Chen, C.Y., Karin, M., Puri, P.L., and Gherzi, R. (2005). p38-dependent phosphorylation of the mRNA decay-promoting factor KSRP controls the stability of select myogenic transcripts. *Mol Cell* 20, 891-903.
- Brooks, A.R., Harkins, R.N., Wang, P., Qian, H.S., Liu, P., and Rubanyi, G.M. (2004). Transcriptional silencing is associated with extensive methylation of the CMV promoter following adenoviral gene delivery to muscle. *J Gene Med* 6, 395-404.
- Burd, C.G., and Dreyfuss, G. (1994). Conserved structures and diversity of functions of RNA-binding proteins. *Science* 265, 615-621.
- Carninci, P., Kasukawa, T., Katayama, S., Gough, J., Frith, M.C., Maeda, N., Oyama, R., Ravasi, T., Lenhard, B., Wells, C., *et al.* (2005). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.

-
- Carswell, S., and Alwine, J.C. (1989). Efficiency of utilization of the simian virus 40 late polyadenylation site: effects of upstream sequences. *Mol Cell Biol* 9, 4248-4258.
- Chapman, J. (2006). Thrombin in inflammatory brain diseases. *Autoimmun Rev* 5, 528-531.
- Chen, F., MacDonald, C.C., and Wilusz, J. (1995). Cleavage site determinants in the mammalian polyadenylation signal. *Nucleic Acids Res* 23, 2614-2620.
- Chuvpilo, S., Zimmer, M., Kerstan, A., Glockner, J., Avots, A., Escher, C., Fischer, C., Inashkina, I., Jankevics, E., Berberich-Siebelt, F., *et al.* (1999). Alternative polyadenylation events contribute to the induction of NF-ATc in effector T cells. *Immunity* 10, 261-269.
- Colgan, D.F., and Manley, J.L. (1997). Mechanism and regulation of mRNA polyadenylation. *Genes Dev* 11, 2755-2766.
- Coughlin, S.R. (2000). Thrombin signalling and protease-activated receptors. *Nature* 407, 258-264.
- Danckwardt, S., Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Hundsdoerfer, P., Pforsich, M., Frede, U., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2004). The prothrombin 3'end formation signal reveals a unique architecture that is sensitive to thrombophilic gain-of-function mutations. *Blood* 104, 428-435.
- Danckwardt, S., Hartmann, K., Gehring, N.H., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2006a). 3' end processing of the prothrombin mRNA in thrombophilia. *Acta Haematol* 115, 192-197.
- Danckwardt, S., Hartmann, K., Katz, B., Hentze, M.W., Levy, Y., Eichele, R., Deutsch, V., Kulozik, A.E., and Ben-Tal, O. (2006b). The prothrombin 20209 C->T mutation in Jewish-Moroccan Caucasians: molecular analysis of gain-of-function of 3' end processing. *J Thromb Haemost* 4, 1078-1085.
- Danckwardt, S., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2008). 3' end mRNA processing: molecular mechanisms and implications for health and disease. *Embo J* 27, 482-498.
- Danckwardt, S., Kaufmann, I., Gentzel, M., Foerstner, K.U., Gantzert, A.S., Gehring, N.H., Neu-Yilik, G., Bork, P., Keller, W., Wilm, M., *et al.* (2007). Splicing factors stimulate polyadenylation via USEs at non-canonical 3' end formation signals. *Embo J* 26, 2658-2669.
- Dean, J.L., Sully, G., Clark, A.R., and Saklatvala, J. (2004). The involvement of AU-rich element-binding proteins in p38 mitogen-activated protein kinase pathway-mediated mRNA stabilisation. *Cell Signal* 16, 1113-1121.

-
- Diaz-Moreno, I., Hollingworth, D., Frenkiel, T.A., Kelly, G., Martin, S., Howell, S., Garcia-Mayoral, M., Gherzi, R., Briata, P., and Ramos, A. (2009). Phosphorylation-mediated unfolding of a KH domain regulates KSRP localization via 14-3-3 binding. *Nat Struct Mol Biol* 16, 238-246.
- Dihanich, M., Kaser, M., Reinhard, E., Cunningham, D., and Monard, D. (1991). Prothrombin mRNA is expressed by cells of the nervous system. *Neuron* 6, 575-581.
- Edwalds-Gilbert, G., Veraldi, K.L., and Milcarek, C. (1997). Alternative poly(A) site selection in complex transcription units: means to an end? *Nucleic Acids Res* 25, 2547-2561.
- Even-Ram, S., Uziely, B., Cohen, P., Grisaru-Granovsky, S., Maoz, M., Ginzburg, Y., Reich, R., Vlodavsky, I., and Bar-Shavit, R. (1998). Thrombin receptor overexpression in malignant and physiological invasion processes. *Nat Med* 4, 909-914.
- Finak, G., Bertos, N., Pepin, F., Sadekova, S., Souleimanova, M., Zhao, H., Chen, H., Omeroglu, G., Meterissian, S., Omeroglu, A., *et al.* (2008). Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer. *Nat Med* 14, 518-527.
- Frevel, M.A., Bakheet, T., Silva, A.M., Hissong, J.G., Khabar, K.S., and Williams, B.R. (2003). p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Mol Cell Biol* 23, 425-436.
- Garneau, N.L., Wilusz, J., and Wilusz, C.J. (2007). The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 113-126.
- Gehring, N.H., Frede, U., Neu-Yilik, G., Hundsdoerfer, P., Vetter, B., Hentze, M.W., and Kulozik, A.E. (2001). Increased efficiency of mRNA 3' end formation: a new genetic mechanism contributing to hereditary thrombophilia. *Nat Genet* 28, 389-392.
- Gossen, M., and Bujard, H. (1992). Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 5547-5551.
- Gu, H., and Schoenberg, D.R. (2003). U2AF modulates poly(A) length control by the poly(A)-limiting element. *Nucleic Acids Res* 31, 6264-6271.
- Hall-Pogar, T., Liang, S., Hague, L.K., and Lutz, C.S. (2007). Specific trans-acting proteins interact with auxiliary RNA polyadenylation elements in the COX-2 3'-UTR. *Rna* 13, 1103-1115.
- Hall-Pogar, T., Zhang, H., Tian, B., and Lutz, C.S. (2005). Alternative polyadenylation of cyclooxygenase-2. *Nucleic Acids Res* 33, 2565-2579.
- Hamon, S., Le Sommer, C., Mereau, A., Allo, M.R., and Hardy, S. (2004). Polypyrimidine tract-binding protein is involved in vivo in repression of a composite internal/3' -

-
- terminal exon of the *Xenopus* alpha-tropomyosin Pre-mRNA. *J Biol Chem* 279, 22166-22175.
- Hu, J., Lutz, C.S., Wilusz, J., and Tian, B. (2005). Bioinformatic identification of candidate cis-regulatory elements involved in human mRNA polyadenylation. *Rna* 11, 1485-1493.
- Huber-Lang, M., Sarma, J.V., Zetoune, F.S., Rittirsch, D., Neff, T.A., McGuire, S.R., Lambris, J.D., Warner, R.L., Flierl, M.A., Hoesel, L.M., *et al.* (2006). Generation of C5a in the absence of C3: a new complement activation pathway. *Nat Med* 12, 682-687.
- Jackson, D.A., Pombo, A., and Iborra, F. (2000). The balance sheet for transcription: an analysis of nuclear RNA metabolism in mammalian cells. *Faseb J* 14, 242-254.
- Ji, Z., and Tian, B. (2009). Reprogramming of 3' untranslated regions of mRNAs by alternative polyadenylation in generation of pluripotent stem cells from different cell types. *PLoS One* 4, e8419.
- Joyce, J.A., and Pollard, J.W. (2009). Microenvironmental regulation of metastasis. *Nat Rev Cancer* 9, 239-252.
- Kleiman, F.E., and Manley, J.L. (1999). Functional interaction of BRCA1-associated BARD1 with polyadenylation factor CstF-50. *Science* 285, 1576-1579.
- Kleiman, F.E., and Manley, J.L. (2001). The BARD1-CstF-50 interaction links mRNA 3' end formation to DNA damage and tumor suppression. *Cell* 104, 743-753.
- Kleiman, F.E., Wu-Baer, F., Fonseca, D., Kaneko, S., Baer, R., and Manley, J.L. (2005). BRCA1/BARD1 inhibition of mRNA 3' processing involves targeted degradation of RNA polymerase II. *Genes Dev* 19, 1227-1237.
- Klerk, C.P., Smorenburg, S.M., Otten, H.M., Lensing, A.W., Prins, M.H., Piovella, F., Prandoni, P., Bos, M.M., Richel, D.J., van Tienhoven, G., *et al.* (2005). The effect of low molecular weight heparin on survival in patients with advanced malignancy. *J Clin Oncol* 23, 2130-2135.
- Ko, B., and Gunderson, S.I. (2002). Identification of new poly(A) polymerase-inhibitory proteins capable of regulating pre-mRNA polyadenylation. *J Mol Biol* 318, 1189-1206.
- Kumar, S., Boehm, J., and Lee, J.C. (2003). p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases. *Nat Rev Drug Discov* 2, 717-726.

-
- Kwan, T., Benovoy, D., Dias, C., Gurd, S., Provencher, C., Beaulieu, P., Hudson, T.J., Sladek, R., and Majewski, J. (2008). Genome-wide analysis of transcript isoform variation in humans. *Nat Genet* 40, 225-231.
- Lane, D.A., and Grant, P.J. (2000). Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease. *Blood* 95, 1517-1532.
- Le Sommer, C., Lesimple, M., Mereau, A., Menoret, S., Allo, M.R., and Hardy, S. (2005). PTB regulates the processing of a 3'-terminal exon by repressing both splicing and polyadenylation. *Mol Cell Biol* 25, 9595-9607.
- Levi, M., de Jonge, E., van der Poll, T., and ten Cate, H. (1999). Disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 82, 695-705.
- Liao, B., Hu, Y., and Brewer, G. (2007). Competitive binding of AUF1 and TIAR to MYC mRNA controls its translation. *Nat Struct Mol Biol* 14, 511-518.
- Lou, H., Helfman, D.M., Gagel, R.F., and Berget, S.M. (1999). Polypyrimidine tract-binding protein positively regulates inclusion of an alternative 3'-terminal exon. *Mol Cell Biol* 19, 78-85.
- Lutz, C.S. (2008). Alternative polyadenylation: a twist on mRNA 3' end formation. *ACS Chem Biol* 3, 609-617.
- Mandel, C.R., Bai, Y., and Tong, L. (2008). Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. *Cell Mol Life Sci* 65, 1099-1122.
- Maniatis, T., and Reed, R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* 416, 499-506.
- Mayr, C., and Bartel, D.P. (2009). Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* 138, 673-684.
- Miller, G.J., Bauer, K.A., Howarth, D.J., Cooper, J.A., Humphries, S.E., and Rosenberg, R.D. (2004). Increased incidence of neoplasia of the digestive tract in men with persistent activation of the coagulant pathway. *J Thromb Haemost* 2, 2107-2114.
- Millevoi, S., Decorsiere, A., Loulergue, C., Iacovoni, J., Bernat, S., Antoniou, M., and Vagner, S. (2009). A physical and functional link between splicing factors promotes pre-mRNA 3' end processing. *Nucleic Acids Res* 37, 4672-4683.
- Millevoi, S., Geraghty, F., Idowu, B., Tam, J.L., Antoniou, M., and Vagner, S. (2002). A novel function for the U2AF 65 splicing factor in promoting pre-mRNA 3'-end processing. *EMBO Rep* 3, 869-874.

-
- Millevoi, S., Loulergue, C., Dettwiler, S., Karaa, S.Z., Keller, W., Antoniou, M., and Vagner, S. (2006). An interaction between U2AF 65 and CF I(m) links the splicing and 3' end processing machineries. *Embo J* 25, 4854-4864.
- Millevoi, S., and Vagner, S. (2009). Molecular mechanisms of eukaryotic pre-mRNA 3' end processing regulation. *Nucleic Acids Res.*
- Mitalipov, S., and Wolf, D. (2009). Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 114, 185-199.
- Moore, M.J., and Proudfoot, N.J. (2009). Pre-mRNA processing reaches back to transcription and ahead to translation. *Cell* 136, 688-700.
- Moreira, A., Wollerton, M., Monks, J., and Proudfoot, N.J. (1995). Upstream sequence elements enhance poly(A) site efficiency of the C2 complement gene and are phylogenetically conserved. *Embo J* 14, 3809-3819.
- Musco, G., Stier, G., Joseph, C., Castiglione Morelli, M.A., Nilges, M., Gibson, T.J., and Pastore, A. (1996). Three-dimensional structure and stability of the KH domain: molecular insights into the fragile X syndrome. *Cell* 85, 237-245.
- Natalizio, B.J., Muniz, L.C., Arhin, G.K., Wilusz, J., and Lutz, C.S. (2002). Upstream elements present in the 3'-untranslated region of collagen genes influence the processing efficiency of overlapping polyadenylation signals. *J Biol Chem* 277, 42733-42740.
- Nemeroff, M.E., Barabino, S.M., Li, Y., Keller, W., and Krug, R.M. (1998). Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. *Mol Cell* 1, 991-1000.
- Nierodzik, M.L., and Karpatkin, S. (2006). Thrombin induces tumor growth, metastasis, and angiogenesis: Evidence for a thrombin-regulated dormant tumor phenotype. *Cancer Cell* 10, 355-362.
- O'Gorman, S., Fox, D.T., and Wahl, G.M. (1991). Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* 251, 1351-1355.
- Ono, K., and Han, J. (2000). The p38 signal transduction pathway: activation and function. *Cell Signal* 12, 1-13.
- Palumbo, J.S., Talmage, K.E., Massari, J.V., La Jeunesse, C.M., Flick, M.J., Kombrinck, K.W., Hu, Z., Barney, K.A., and Degen, J.L. (2007). Tumor cell-associated tissue factor and circulating hemostatic factors cooperate to increase metastatic potential through natural killer cell-dependent and-independent mechanisms. *Blood* 110, 133-141.

- Pawlicki, J.M., and Steitz, J.A. (2010). Nuclear networking fashions pre-messenger RNA and primary microRNA transcripts for function. *Trends Cell Biol* 20, 52-61.
- Petralia, G.A., Lemoine, N.R., and Kakkar, A.K. (2005). Mechanisms of disease: the impact of antithrombotic therapy in cancer patients. *Nat Clin Pract Oncol* 2, 356-363.
- Poort, S.R., Rosendaal, F.R., Reitsma, P.H., and Bertina, R.M. (1996). A common genetic variation in the 3'-untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood* 88, 3698-3703.
- Proudfoot, N. (2000). Connecting transcription to messenger RNA processing. *Trends Biochem Sci* 25, 290-293.
- Proudfoot, N. (2004). New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Curr Opin Cell Biol* 16, 272-278.
- Proudfoot, N.J., Furger, A., and Dye, M.J. (2002). Integrating mRNA processing with transcription. *Cell* 108, 501-512.
- Prouteau, M., Daugeron, M.C., and Seraphin, B. (2008). Regulation of ARE transcript 3' end processing by the yeast Cth2 mRNA decay factor. *Embo J* 27, 2966-2976.
- Rey, E., Kahn, S.R., David, M., and Shrier, I. (2003). Thrombophilic disorders and fetal loss: a meta-analysis. *Lancet* 361, 901-908.
- Riek-Burchardt, M., Striggow, F., Henrich-Noack, P., Reiser, G., and Reymann, K.G. (2002). Increase of prothrombin-mRNA after global cerebral ischemia in rats, with constant expression of protease nexin-1 and protease-activated receptors. *Neurosci Lett* 329, 181-184.
- Rittirsch, D., Flierl, M.A., and Ward, P.A. (2008). Harmful molecular mechanisms in sepsis. *Nat Rev Immunol* 8, 776-787.
- Ross, J., and Pizarro, A. (1983). Human beta and delta globin messenger RNAs turn over at different rates. *J Mol Biol* 167, 607-617.
- Salles, F.J., Richards, W.G., and Strickland, S. (1999). Assaying the polyadenylation state of mRNAs. *Methods* 17, 38-45.
- Sandberg, R., Neilson, J.R., Sarma, A., Sharp, P.A., and Burge, C.B. (2008). Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science* 320, 1643-1647.

-
- Schulman, S., and Lindmarker, P. (2000). Incidence of cancer after prophylaxis with warfarin against recurrent venous thromboembolism. Duration of Anticoagulation Trial. *N Engl J Med* 342, 1953-1958.
- Shafer, L.M., and Slice, L.W. (2005). Anisomycin induces COX-2 mRNA expression through p38(MAPK) and CREB independent of small GTPases in intestinal epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* 1745, 393-400.
- Shell, S.A., Hesse, C., Morris, S.M., Jr., and Milcarek, C. (2005). Elevated levels of the 64-kDa cleavage stimulatory factor (CstF-64) in lipopolysaccharide-stimulated macrophages influence gene expression and induce alternative poly(A) site selection. *J Biol Chem* 280, 39950-39961.
- Shin, C., and Manley, J.L. (2004). Cell signalling and the control of pre-mRNA splicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 727-738.
- Shukla, S., Del Gatto-Konczak, F., Breathnach, R., and Fisher, S.A. (2005). Competition of PTB with TIA proteins for binding to a U-rich cis-element determines tissue-specific splicing of the myosin phosphatase targeting subunit 1. *Rna* 11, 1725-1736.
- Sun, W.Y., Witte, D.P., Degen, J.L., Colbert, M.C., Burkart, M.C., Holmback, K., Xiao, Q., Bugge, T.H., and Degen, S.J. (1998). Prothrombin deficiency results in embryonic and neonatal lethality in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7597-7602.
- Takagaki, Y., Seipelt, R.L., Peterson, M.L., and Manley, J.L. (1996). The polyadenylation factor CstF-64 regulates alternative processing of IgM heavy chain pre-mRNA during B cell differentiation. *Cell* 87, 941-952.
- Tian, B., Hu, J., Zhang, H., and Lutz, C.S. (2005). A large-scale analysis of mRNA polyadenylation of human and mouse genes. *Nucleic Acids Res* 33, 201-212.
- Wahle, E., and Kuhn, U. (1997). The mechanism of 3' cleavage and polyadenylation of eukaryotic pre-mRNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 57, 41-71.
- Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., and Burge, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* 456, 470-476.
- Wilhelm, B.T., Marguerat, S., Watt, S., Schubert, F., Wood, V., Goodhead, I., Penkett, C.J., Rogers, J., and Bahler, J. (2008). Dynamic repertoire of a eukaryotic transcriptome surveyed at single-nucleotide resolution. *Nature* 453, 1239-1243.
- Wilusz, C.J., and Wilusz, J. (2004). Bringing the role of mRNA decay in the control of gene expression into focus. *Trends Genet* 20, 491-497.

-
- Wood, A.J., Schulz, R., Woodfine, K., Koltowska, K., Beechey, C.V., Peters, J., Bourc'his, D., and Oakey, R.J. (2008). Regulation of alternative polyadenylation by genomic imprinting. *Genes Dev* 22, 1141-1146.
- Xue, J., Wu, Q., Westfield, L.A., Tuley, E.A., Lu, D., Zhang, Q., Shim, K., Zheng, X., and Sadler, J.E. (1998). Incomplete embryonic lethality and fatal neonatal hemorrhage caused by prothrombin deficiency in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7603-7607.
- Ye, Z., Liu, E.H., Higgins, J.P., Keavney, B.D., Lowe, G.D., Collins, R., and Danesh, J. (2006). Seven haemostatic gene polymorphisms in coronary disease: meta-analysis of 66,155 cases and 91,307 controls. *Lancet* 367, 651-658.
- Zhang, H., Lee, J.Y., and Tian, B. (2005). Biased alternative polyadenylation in human tissues. *Genome Biol* 6, R100.
- Zhao, W., and Manley, J.L. (1996). Complex alternative RNA processing generates an unexpected diversity of poly(A) polymerase isoforms. *Mol Cell Biol* 16, 2378-2386.
- Zhu, H., Zhou, H.L., Hasman, R.A., and Lou, H. (2007). Hu proteins regulate polyadenylation by blocking sites containing U-rich sequences. *J Biol Chem* 282, 2203-2210.
- Zoubine, M.N., Ma, J.Y., Smirnova, I.V., Citron, B.A., and Festoff, B.W. (1996). A molecular mechanism for synapse elimination: novel inhibition of locally generated thrombin delays synapse loss in neonatal mouse muscle. *Dev Biol* 179, 447-457.